

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

**PERİFERİK SİNİR HASARINDAN SONRA ZONİSAMİDE
VE DİKLOFENAK SODYUM KOMBİNE TEDAVİSİNİN
SİNİR REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ**

Alper ÇELENK

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Leman SENCAR**

ADANA-2023

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

**PERİFERİK SİNİR HASARINDAN SONRA ZONİSAMİDE
VE DİKLOFENAK SODYUM KOMBİNE TEDAVİSİNİN
SİNİR REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ**

Alper ÇELENK

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Leman SENCAR**

ADANA-2023

KABUL VE ONAY

X X X X

ETİK BEYAN



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarımın başından sonuna kadar, bütün aşamalarda birebir ilgilenen, bilimsel bilgi birikimi ve entelektüel deneyimi ile her zaman yol gösteren, beni cesaretlendiren, örnek aldığım ve beraber çalışmaktan çok mutlu olduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Leman SENCAR'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca gerek tez çalışmalarım sırasında gerekse de eğitim aldığım süre boyunca yardım ve destekleri ile her zaman yanımda olan başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Sait POLAT olmak üzere Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, her zaman fikirlerine danışabildiğim ve çalışmalarımda yol gösteren, fakültemiz Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Derviş Mansuri YILMAZ'a da saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca deneyler sırasındaki yardımlarından dolayı Anabilim Dalımız teknisyenleri Nevriz DURAL ve Zuhale ÖZKURT'a teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmam sırasında her aşamada benimle çalışan, desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Dilek ŞAKER'e ve uzun eğitim süresini beraber paylaştığım, dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tanıştığımız ilk günden beri beni her konuda sabırla destekleyen, her zaman yanımda olan sevgili eşim Meltem ÇELENK'e ve varlığıyla beni motive edip umutlandıran kızım Duru ÇELENK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bütün yaşamım boyunca beni destekleyen ve hep arkamda duran sevgili annem Naime ÇELENK ve sevgili babam Taner ÇELENK ile kardeşim Ezgi Pınar ÇELENK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Alper ÇELENK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Periferik Sinir Sistemi Histolojisi	4
2.1.1. Nöron	5
2.1.2. Periferik Glial Hücreler	7
2.1.3. Periferik Sinir	8
2.2. Periferik Sinir Hasarı (PSH)	9
2.2.1. Wallerian Dejenerasyon	11
2.2.2. Periferik Sinir Hasarında Proksimal Segment ve Perikaryon Bölgesindeki Değişiklikler	12
2.3. Periferik Sinir Rejenerasyonu	13
2.4. Periferik Sinir Hasarında Sitokinlerin Etkisi	14
2.5. Periferik Sinir Hasarından Sonra Zonisamide Tedavisi	16
2.6. Periferik Sinir Hasarından Sonra Diklofenak Sodyum Tedavisi	17
2.7. Periferik Sinir Hasarında Krox-20'nin Rolü	18
2.8. Periferik Sinir Hasarında p75NTR'nin Rolü	19
2.9. Periferik Sinir Hasarında iNOS	21
2.10. Periferik Sinir Hasarında COX-2	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Gruplara Ayrılması	24

3.2. Operasyon	24
3.3. Tedavinin Uygulanması	25
3.4. Biyopsilerin Alınması	25
3.5. Işık Mikroskop Yöntemleri	25
3.6. İmmünohistokimya Yöntemleri	26
3.6.1. İmmünohistokimyasal Skolama Yöntemi.....	27
3.7. Elektron Mikroskop Yöntemleri	28
3.8. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	29
3.9. Kantitatif Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	29
3.10. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR.....	31
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	31
4.1.1. Kontrol Grubu.....	31
4.1.2. Sham Operasyon Grubu.....	33
4.1.3. Deney Kontrol Grubu	34
4.1.4. Diklofenak Sodyum Tedavi Grubu.....	38
4.1.5. Zonisamide Tedavi Grubu	42
4.1.6. Zonisamide ve Diklofenak Sodyum Kombine Tedavi Grubu	45
4.2. Histomorfometrik Bulgular	49
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	51
4.3.1. COX-2 İmmünoreaktivitesi	51
4.3.2. iNOS İmmünoreaktivitesi.....	66
4.4. Moleküler Biyolojik Bulgular	82
4.4.1. Siyatik Sinir Hasarının Krox-20 Ekspresyon Seviyesine Etkisi.....	82
4.4.2. Siyatik Sinir Hasarının p75NTR Ekspresyon Seviyesine Etkisi	83
4.5. Elektron Mikroskopik Bulgular	84
4.5.1. Kontrol Grubu.....	84
4.5.2. Sham Operasyon Grubu.....	86
4.5.3. Deney Kontrol Grubu	88
4.5.4. Diklofenak Sodyum Tedavi Grubu.....	92
4.5.5. Zonisamide Tedavi Grubu	96

4.5.6. Zonisamide ve Diklofenak Sodyum Kombine Tedavi Grubu	100
5. TARTIŞMA	104
6. SONUÇLAR	116
KAYNAKÇA	120
ÖZGEÇMİŞ	128



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 1. COX-2 immünoreaktivitesinin puanlaması.....	81
Tablo 2. iNOS immünoreaktivitesinin puanlaması.	81



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1. Kontrol grubundan alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	32
Şekil 2. Sham operasyon grubundan alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	33
Şekil 3. Deney kontrol grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	35
Şekil 4. Deney kontrol grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	36
Şekil 5. Deney kontrol grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	37
Şekil 6. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	39
Şekil 7. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	40
Şekil 8. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	41
Şekil 9. Zonisamide tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	42
Şekil 10. Zonisamide tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	43
Şekil 11. Zonisamide tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.....	44
Şekil 12. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	46
Şekil 13. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	47
Şekil 14. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	48
Şekil 15. Tüm gruplarda ortalama miyelinli sinir lifi sayıları.	50
Şekil 16. Pozitif ve negatif kontrolde COX-2 immünoreaktivitesi	51
Şekil 17. Kontrol grubunda COX-2 immünoreaktivitesi.....	52
Şekil 18. Sham operasyon grubunda COX-2 immünoreaktivitesi.....	53
Şekil 19. Deney kontrol grubunda 7. günde COX-2 immünoreaktivitesi.	54
Şekil 20. Deney kontrol grubunda 14. günde COX-2 immünoreaktivitesi.....	55
Şekil 21. Deney kontrol grubunda 21. günde COX-2 immünoreaktivitesi.....	56
Şekil 22. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 7. günde COX-2 immünoreaktivitesi	57
Şekil 23. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 14. günde COX-2 immünoreaktivitesi	58

Şekil 24. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 21. günde COX-2 immünoreaktivitesi.....	59
Şekil 25. Zonisamide tedavi grubunda 7. günde COX-2 immünoreaktivitesi.....	60
Şekil 26. Zonisamide tedavi grubunda 14. günde COX-2 immünoreaktivitesi.....	61
Şekil 27. Zonisamide tedavi grubunda 21. günde COX-2 immünoreaktivitesi.....	62
Şekil 28. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubunda 7. günde COX-2 immünoreaktivitesi.....	63
Şekil 29. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubunda 14. günde COX-2 immünoreaktivitesi.....	64
Şekil 30. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubunda 21. günde COX-2 immünoreaktivitesi.....	65
Şekil 31. Pozitif ve negatif kontrolde iNOS immünoreaktivitesi.....	66
Şekil 32. Kontrol grubunun iNOS immünoreaktivitesi.....	67
Şekil 33. Sham operasyon grubunun iNOS immünoreaktivitesi.....	68
Şekil 34. Deney kontrol grubunda 7. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	69
Şekil 35. Deney kontrol grubunda 14. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	70
Şekil 36. Deney kontrol grubunda 21. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	71
Şekil 37. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 7. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	72
Şekil 38. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 14. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	73
Şekil 39. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 21. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	74
Şekil 40. Zonisamide tedavi grubunda 7. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	75
Şekil 41. Zonisamide tedavi grubunda 14. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	76
Şekil 42. Zonisamide tedavi grubunda 21. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	77
Şekil 43. Zonisamide ve diklofenak sodyumun birlikte kullanıldığı kombine tedavi grubunda 7. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	78
Şekil 44. Zonisamide ve diklofenak sodyumun birlikte kullanıldığı kombine tedavi grubunda 14. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	79
Şekil 45. Zonisamide ve diklofenak sodyumun birlikte kullanıldığı kombine tedavi grubunda 21. günde iNOS immünoreaktivitesi.....	80
Şekil 46. Siyatik sinir hasarının Krox-20 ekspresyonuna etkisi.....	82
Şekil 47. Siyatik sinir hasarının p75NTR ekspresyonuna etkisi.....	83
Şekil 48. Kontrol grubundan alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	85
Şekil 49. Sham operasyon grubundan alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	87
Şekil 50. Deney kontrol grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	89
Şekil 51. Deney kontrol grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	90
Şekil 52. Deney kontrol grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	91

Şekil 53. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü	93
Şekil 54. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü	94
Şekil 55. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü	95
Şekil 56. Zonisamide tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü	97
Şekil 57. Zonisamide tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü	98
Şekil 58. Zonisamide tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü	99
Şekil 59. Kombine tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü	101
Şekil 60. Kombine tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü	102
Şekil 61. Kombine tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü	103

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BDNF	: Beyin Kökenli Büyüme Faktörü
Ca⁺²	: Kalsiyum
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DD	: Death District (Ölüm Alanı)
DF	: Diklofenak Sodyum
ER	: Endoplazmik Retikulum
ErbB2	: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
GABA	: Benzodiazepin Gama-Aminobütirik Asit
GAP-43	: Growth Associated Protein-43
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GFAP	: Glial Fibriller Asidik Protein
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
iNOS	: İndüklenmiş Nitrik Oksit Sentaz
JNK, C-JUN	: Jun N-terminal kinaz
Krox-20 (Egr-2)	: The Early Growth Response Gene
MAG	: Miyelinle İlişkili Glikoprotein
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NF-KB	: Nükleer Faktör-Kappa B
NGF	: Nerve Growth Factor
NO	: Nitrik Oksit
NSAID	: Nonsteroid Antienflamatuvar İlaçlar
NRG-1	: Neurogulin-1
NT3	: Nörotrofin-3
PGE2	: Prostaglandin E2
PGG2	: Prostaglandin G2
PSH	: Periferik Sinir Hasarı
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
p75NTR	: The p75 Neurotrophin Receptor
qRT-PCR	: Kantitatif Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri

TGF	: Transforming Growth Factor
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-Alfa
TNFRSF	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptör Süper Ailesi
ZNS	: Zonisamide
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre



ÖZET

Periferik Sinir Hasarından Sonra Zonisamide ve Diklofenak Sodyum Kombine Tedavisinin Sinir Rejenerasyonu Üzerine Etkileri

Periferik sinir hasarı (PSH), dünyada bir milyondan fazla insanı etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Mikrocerrahi tekniklerinin yaygınlaşması, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerin ilerlemesi, sinir onarımının başarısını büyük ölçüde artırmıştır. Bununla birlikte, PSH sonrasında nöroprotektif bir madde olan zonisamide ile antienflamatuvar diklofenak sodyumun kombine uygulanmasının etkilerini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada, siyatik sinirde ezilme tipi bir yaralanma oluşturulduktan sonra, zonisamide ve diklofenak sodyum tedavisinin ayrı ayrı ve kombine tedavilerinin sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin ultrastrüktürel, immünohistokimyasal, histomorfometrik ve moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlandı.

Wistar cinsi 84 erkek sıçan randomize olarak, cerrahi işlem uygulanmayan kontrol grubu, siyatik sinirin açığa çıkarılıp hasar oluşturulmadan kapatıldığı sham operasyon grubu, hasar oluşturulduktan sonra herhangi bir tedavi uygulanmayan deney kontrol grubu, siyatik sinirde hasar oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca günde 1 kere intraperitoneal 2 mg/kg dozunda diklofenak sodyum verilen tedavi grubu, hasar sonrası 7 gün boyunca günde 1 kere oral gavaj ile 100 mg/kg dozunda zonisamide verilen tedavi grubu, hasar sonrası 7 gün boyunca intraperitoneal 2mg/kg dozunda diklofenak sodyum ve oral gavaj ile 100 mg/kg dozunda zonisamide verilen kombine tedavi grubu olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Tedavilerin zamana bağlı etkilerini incelemek üzere deney ve tedavi gruplarından 7., 14. ve 21. günlerde sinir dokuları elde edildi.

iNOS ve COX-2 ekspresyonunun, zonisamide ve kombine tedavi gruplarında deney kontrole oranla belirgin olarak azaldığı ve bu azalmanın en belirgin 21. günde olduğu görüldü. Miyelinli sinir lif sayısının, kombine tedavi gruplarında deney kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı görüldü. Krox-20 ekspresyon seviyesinin hasar sonrası azaldığı, zonisamide ve kombine tedavi gruplarında ise arttığı belirlendi. p75NTR ekspresyon seviyesinin kombine tedavi grubu 14. günde diğer tedavi gruplarına oranla anlamlı olarak arttığı, 21. günde ise en yüksek seviyesine ulaştığı görüldü.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, deneysel PSH sonrası zonisamide ile diklofenak sodyum kombine tedavisinin enflamasyonu baskılayarak, aksonal büyümeyi ve yeniden miyelinizasyonu arttırarak periferik sinir rejenerasyonunu uyarabileceği, yapılacak daha ileri moleküler çalışmalarla tedavi protokollerinde yer alabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Diklofenak Sodyum, Enflamasyon, Periferik Sinir Hasarı, Rejenerasyon, Zonisamide

ABSTRACT

Effects of Combined Treatment with Zonisamide and Diclofenac Sodium on Nerve Regeneration Following Peripheral Nerve Injury

Peripheral nerve injury (PNI) is a significant health problem affecting over a million people worldwide. The widespread use of microsurgical techniques and advancements in histological and immunohistochemical methods have greatly enhanced the success of nerve repair. However, there is no existing literature on a study investigating the effects of combined treatment with zonisamide, a neuroprotective agent, and diclofenac sodium, an anti-inflammatory drug, after PNI. This study aimed to investigate the effects of zonisamide and diclofenac sodium treatments, both individually and in combination, on nerve regeneration using ultrastructural, immunohistochemical, histomorphometric, and molecular methods after crush-type injury to the sciatic nerve.

A total of 84 male Wistar rats were randomly assigned to six groups: control group without any surgical procedures, sham operation group in which the sciatic nerve was exposed but not damaged, experimental control group without any treatment after nerve injury, treatment group receiving intraperitoneal injections of 2 mg/kg diclofenac sodium once daily for 7 days after nerve injury, treatment group receiving oral gavage of 100 mg/kg zonisamide once daily for 7 days after nerve injury, and combination treatment group receiving both intraperitoneal injections of 2 mg/kg diclofenac sodium and oral gavage of 100 mg/kg zonisamide once daily for 7 days after nerve injury. Nerve tissues were collected from the experimental and treatment groups on days 7, 14, and 21 to examine the time-dependent effects of the treatments.

It was observed that the expressions of iNOS and COX-2 were significantly reduced in the zonisamide and combination treatment groups compared to the experimental control group, with the most significant reduction occurring on day 21. The number of myelinated nerve fibers was significantly increased in the combination treatment groups compared to the experimental control group. The expression level of Krox-20 decreased after injury but increased in the zonisamide and combination treatment groups. The expression level of p75NTR in the combination treatment group was significantly higher than the other treatment groups on day 14 and reached its highest level on day 21.

Overall, considering all the findings, it can be concluded that the combined treatment with zonisamide and diclofenac sodium after experimental PNI can suppress inflammation and promote axonal growth and remyelination, thereby stimulating peripheral nerve regeneration. We suggested that further molecular studies can incorporate these treatment protocols into clinical practice.

Key Words: Diclofenac Sodium, Inflammation, Peripheral Nerve Injury, Regeneration, Zonisamide

1. GİRİŞ

Periferik sinir hasarı (PSH) dünya genelinde bir milyondan fazla kişiyi etkileyen önemli bir sağlık problemidir (1). PSH'de sinir onarımının başarısı ve onarım süresi sinir yaralanmasının derecesine bağlıdır (2). Yaralanma sonrasında periferik sinirin distal ve proksimal segmentlerinde ciddi histolojik değişiklikler gözlenmektedir. İlk 6 saat içinde nöron gövdesinde çekirdeğin perifere göç ettiği, Nissl cisimciklerinin kromatolizise uğradığı bilinmektedir. Hasarlı bölgenin distalinde aksonal sitoiskelette ve miyelin kılıfta fragmentasyon ve Wallerian dejenerasyon görülmektedir (3). Bunun bir sonucu olarak, ilk 48-96 saat içinde akson devamlılığı kaybolmakta ve impuls iletimi bozulmaktadır. Miyelin kılıf ile akson atıklarının Schwann hücreleri ve makrofajlar tarafından fagositozunun ardından rejenerasyon süreci başlamaktadır (2, 4). Schwann hücrelerinin oluşan akson filizlerine rehberlik eden Büngner bandlarını oluşturması ile nörilemal tüp içerisinde, aksonun günde 1-3 mm hızla büyümeye başladığı bilinmektedir (5).

PSH tedavisinde temel yaklaşım cerrahi müdahaledir. Günümüzde otograft/allograft transplantasyonu, non-nöronal doku greftleri ve sinir kondüitleri gibi pek çok mikrocerrahi uygulamaları PSH tedavisinde tercih edilmektedir (6). Ayrıca nörotropik faktörler, steroidler, hormonlar, kimyasal maddeler ve düşük frekanslı manyetik alan uygulamalarının da sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşmenin artırılması amacıyla kullanılabileceği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (7).

Bir anti-epileptik ve anti-Parkinson ilacı olan zonisamide'in (ZNS) motor nöron hücre kültürlerinde nörotrofik aktivite gösterdiği ve farelerde PSH'den sonra aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdığı belirtilmiştir (8). Yagi ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada ZNS'nin, motor nöron hücre kültürlerinde nörit büyümesini indüklediğini ve farelerde siyatik sinir hasarından sonra aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdığını bildirmişlerdir. Bu bulgular, ZNS'nin nörotrofik ve nöroprotektif özelliklere sahip olması nedeniyle PSH'de potansiyel tedavi ajanı olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (9).

PSH, kan-sinir bariyerinin bozulması, bunu takiben periferik immün hücrelerin ortama migrasyonu, makrofajların aktivasyonu ve enflamatuvar sinyal yollarının indüksiyonu ile başlatılan bir enflamatuvar cevabı aktive etmektedir (10, 11).

Nonsteroid antienflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler) dünya çapında yaygın kullanılan ilaçlardır. Yapılan çalışmalarda NSAID türevi ilaçlardan olan diklofenak sodyumun postoperatif ağrıyı azalttığı ve analjezik etki gösterdiği belirlenmiştir (12). NSAID'lerin, pro-enflamatuvar bir enzim olan siklooksijenaz (COX) inhibisyonu yoluyla ağrı ve enflamasyonu azalttığı rapor edilmiştir (13). COX, araşidonik asidin prostaglandinlere (PGE) dönüşümünü katalize eden bir enzimdir. Bir sinir hasar gördüğünde, makrofajlarda ve Schwann hücrelerinde COX-1 ve COX-2 ekspresyonları önemli ölçüde artmaktadır (14). Daha önceki araştırmalarda COX-2 inhibitörü olan NSAID'lerin, deneysel koşullar altında oluşturulan PSH'de fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı gösterilmiştir (15). Diklofenak sodyumun, etkilerini COX inhibisyonu yoluyla sağladığı bilinmektedir ve COX-2'nin inhibisyonunda COX-1'den 20 kat daha etkili olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (16). Araştırmacılar diklofenak sodyumun, analjezik, antienflamatuvar ve antipiretik etkileri olduğunu bildirmişlerdir (17).

Nitrik oksit (NO), çok sayıda moleküler hedefi olan bir haberci molekül olup nörotransmisyon gibi iletim ve düzenleme işlevlerini kontrol etmektedir (18). İndüklenebilir NOS genellikle hücrelerde eksprese edilmez, ancak ekspresyonu enflamasyon sırasında bakteriyel lipopolisakkarit, sitokinler ve diğer ajanlar tarafından uyarılabilir. Esas olarak makrofajlarda tanımlanmasına rağmen, uygun indükleyici ajanların varlığında hemen her hücre veya dokuda ekspresyonu stimüle edilebilir (19, 20). NO ve reaktif oksijen radikalleri, enflamasyon üzerinde çok sayıda düzenleyici etkiye sahiptir ve immün sistemin regülasyonunda anahtar rol oynamaktadırlar. Enflamasyon gelişiminin neredeyse her adımını etkilemekte ve iNOS tarafından üretilen büyük miktarlarda NO toksik ve proenflamatuvar olabilmektedir (21).

Sunulan çalışmada, siyatik sinirde ezilme tipi yaralanma oluşturulduktan sonra, zonisamide ve diklofenak sodyum tedavisinin ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmasının sinir iyileşmesi üzerine etkilerinin ultrastrüktürel, immünohistokimyasal, histomorfometrik ve moleküler yöntemler ile araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde, günümüze kadar, periferik sinir yaralanması üzerine bu iki tedavi edici ajanın kombine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla, sıçanların siyatik sinirlerinde ezilme tipi sinir hasarı oluşturulmuş, zonisamide ve diklofenak sodyum kullanılarak tedavi edilen sıçanların sinir dokularında, immünohistokimyasal yöntemle enflamasyon belirteçleri olan indüklenmiş nitrik oksit

sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (Cox-2) moleküllerinin ekspresyonları ile rejenerasyon ve miyelinizasyon belirteçleri olan p75 nörotropin reseptörü (p75NTR) ve Krox20 ekspresyonları gen düzeyinde araştırılmış, miyelinli akson sayıları da histomorfometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİ

2.1. Periferik Sinir Sistemi Histolojisi

Sinir sistemi, organizmanın çevreye verdiği çeşitli tepkileri ve bedensel süreçleri bütünleştiren, insan vücudundaki yüksek düzeyde organize olmuş sistemlerden biridir. Her ikisi de yapı ve işlevleri bakımından farklılık gösteren merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere alt bölümlere ayrılmaktadır. MSS, beyin ve spinal kord'tan oluşur ve vücut içinden köken alan bütün nöral implusları (interoceptive), vücut dışından köken alan uyarıları (eksteroceptive), eklemlerden, kas ve tendonlardan gelen duyuları (proprioceptive) alır (22). PSS, beyin ve spinal kord reseptörlerine bağlı olan spinal ve kraniyal sinir ağını ve gangliyonları içermektedir. PSS'nin işlevi, MSS'den kaslara ve bezlere giden uyarıları aktarmak ve duysal reseptörler aracılığıyla iç ve dış ortamdaki değişiklikler ile ilgili bilgileri MSS'ye iletmektir (23). Ayrıca fonksiyonel olarak, sinir sistemi; somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olmak üzere 2 bölüme ayrılmaktadır. Somatik sinir sistemi refleks arkları hariç, bilinçli kontrol altındaki işlevleri kontrol etmektedir. İç organlar, düz kas, kalp kası ve bezler hariç vücudun tüm bölgelerine duysal ve motor innervasyon sağlamaktadır. Otonom sinir sistemi, MSS ve PSS'nin otonom bölümlerinden oluşmaktadır ve düz kas, kalp kası, iç organlar ve vücut bezlerinin innervasyonu ile ilgilidir. Otonom sinir sistemi de kendi içerisinde sempatik, parasempatik ve enterik olmak üzere 3 bölüme ayrılmaktadır. Enterik bölümü sindirim kanalında görevli olup, MSS ile sempatik ve parasempatik sinir lifleri aracılığı ile bağlantı kurmaktadır ancak bunlardan bağımsız olarak da çalışabilmektedir (22).

Sinir dokuda bulunan hücreler; sinir hücreleri (nöronlar) ve destekleyici hücreler (nöroglia veya glia) olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Nöronlar, uzun mesafelerde sinyal iletimi için özelleşmiş hücrelerdir. Glial hücreler, nöronların işlevlerine yardımcı olur ve MSS'deki astrositleri, mikrogliaları, oligodendrositleri, ependim hücrelerini ve PSS'deki Schwann hücreleri ile satellit hücrelerini içermektedir (24).

2.1.1. Nöron

Nöron, sinir sisteminin temel hücresel ve fonksiyonel birimidir (25). Nöronlar, elektriksel değişikliklerin sinir uyarıları olarak iletilmesinden sorumlu olan hücrelerdir. Nöronlar bir akson, dendritler ve perikaryondan oluşmaktadırlar (26). Akson, nöron perikaryonundan uyarıları alıp, akson uç terminallerine taşıyan nöronun özelleşmiş bölümüdür (27). Perikaryonun boyutu, konumu ve işlevine uygun olarak değişmektedir. Aksonun uzunluğu ile perikaryon boyutu arasında korelasyon bulunduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (26). İnsan sinir sistemi 10 milyardan fazla nöron içermektedir. Bu nöronlar, fonksiyonel olarak, üç genel kategoride gruplandırılabilirler. Bunlar; duyu nöronları, motor nöronlar ve ara nöronlardır. Duyu nöronları, reseptörlerden gelen uyarıları MSS'ye iletmektedir. Bu nöronların uzantıları somatik afferent ve visseral afferent sinir lifleri içinde yer almaktadır. Somatik afferent lifler, vücut yüzeyinden ağrı, sıcaklık, dokunma ve basınç duyularını iletmektedirler. Ayrıca bu lifler vücuttaki organlardan (örneğin kaslar, tendonlar ve eklemler) ağrı ve propriyoseptif (bilinç dışı duyu) uyarılarını iletmektedirler. Ayrıca beyine vücudun ve organların oryantasyonu ile ilgili bilgi sağlamaktadırlar. Visseral afferent lifler, iç organlardan, mukoza zarlarından, bezlerden ve kan damarlarından gelen ağrı duyusunu ve diğer duyuları MSS'ye iletmektedirler. Motor nöronlar, MSS veya gangliyonlardan gelen uyarıları efektör hücrelere iletmektedirler. Bu nöronların uzantıları somatik efferent ve visseral efferent sinir lifleri içerisinde yer almaktadır. Somatik efferent lifler, iskelet kaslarına istemli uyarılar gönderirken, visseral efferent lifler istemsiz uyarıları düz kaslara, kalp kaslarına ileten hücrelere (Purkinje lifleri) ve bezlere iletmektedirler. Ara nöronlar, duysal ve motor nöronlar arasında iletişim kurarak bütünleştirici bir ağ oluşturmaktadırlar. Tüm nöronların %99,9'undan fazlasının bu bütünleştirici ağa ait olduğu tahmin edilmektedir (22).

Nöronlar, hücre gövdesinden uzanan uzantı sayısına göre de sınıflandırılabilir. Bunlar; bir akson ve iki veya daha fazla dendrit içeren multipolar nöronlar, bir dendrit, bir akson içeren bipolar nöronlar ve perikaryona yakın dallanma veren tek bir uzantıya sahip olan psödoünipolar ya da diğer adıyla ünipolar nöronlardır. Psödoünipolar nöronların uzantılarından uzun olanı periferik bölgelerde sonlanırken, kısa olan kısmı ise MSS'ye doğru uzanmaktadır. Nöronların çoğu multipolar nöronlardan oluşmaktadır. Bipolar nöronlar sırasıyla görme, koku ve denge

duyularına hizmet ettikleri retina, olfaktör mukoza ve koklear ve vestibüler ganglionlarda bulunmaktadır. Psödoünipolar nöronlar, spinal gangliyonlarda (omurilik sinirlerinde bulunan duyu gangliyonları) ve kranial gangliyonlarda bulunmaktadır (28).

Dendritler, perikaryon üzerindeki kısa dallanma bölgeleridir ve bitişik sinir hücrelerinden aldıkları uyarıları hücre gövdesine doğru iletmekten sorumludurlar. Genellikle birçok sinaps bölgesi ile kaplıdır. Dendritler nöronlardaki başlıca sinyal alma ve işleme bölgeleridir. Çoğu sinir hücresi, hücrenin alıcı alanını önemli ölçüde arttıran çok sayıda dendrit içermektedir. Nöron hücre gövdesinin sitoplazma yapısı, diğer hücrelere benzemektedir. Perikaryon sitoplazması incelendiğinde merkezi yerleşmiş bir çekirdek ile sitoplazmik organelleri içermektedir. Perikaryon içerisinde mikroskobik olarak görülen organeller, golgi aygıtı ve mitokondriyonlardır. Ayırt edici diğer hücresel elemanlar endoplazmik retikulum ve bununla ilgili ribozomları temsil eden Nissl cisimcikleridir. Sabit bir çapı koruyan aksonların aksine, dendritler dallara ayrıldıkça çok daha ince hale gelmektedirler. Dendritler perikaryonunkine benzer sitoplazmaya sahiptirler, ancak bu sitoplazma farklı olarak golgi komplekslerinden yoksundur (26, 28).

Nöronlar genellikle uzunluk ve çap olarak değişen, silindirik yapıda olan uzun bir aksona sahiptirler. Örnek olarak ayak kaslarını innerve eden omuriliğin motor hücrelerinin aksonlarının uzunluğu 100 cm'ye kadar çıkabilmektedir. Tüm aksonlar, perikaryonda bulunan piramit şeklindeki bir bölgeden, akson tepeciğinden (akson hillock) kaynaklanmaktadır. Aksonun plazma membranına aksolemma denir ve içeriği de aksoplazma olarak bilinmektedir. Akson tepeciğinin hemen altında başlangıç segmenti adı verilen bölge bulunmaktadır. Bu bölge uyarıların toplandığı ve bir sinir uyarısının yayılmasına karar verilen alandır. Başlangıç segmenti iyon kanallarına sahip olması ile karakterizedir ve bu kanallar aksiyon potansiyelinin üretilmesinde önemli görev üstlenmektedir. Aksoplazma mitokondri, mikrotübüller, nörofilamentler ve bazı düz endoplazmik retikulum (ER) sisternalarını içerir. Aksoplazma içerisinde poliribozomların ve granüllü ER'nin yokluğu, aksonun perikaryona bağımlılığını göstermektedir. Bu durumdan dolayı akson kesildiğinde, periferik kısımları hızla dejenere olmaktadır. Akson boyunca küçük ve büyük moleküllerin çift yönlü taşınması gerçekleşmektedir. Hücre gövdesinde sentezlenen organeller ve makromoleküller,

akson boyunca anterograd taşıma ile perikaryondan sinaptik terminallere doğru hareket etmektedirler. Ters yönde retrograd taşımada endositoz ile alınan materyal (virüsler ve toksinler dahil) gibi bazı makromolekülleri periferden hücre gövdesine taşımaktadırlar. Her iki yönde de aksonal taşımada, mikrotübüllere bağlı motor proteinler kullanılmaktadır. Mikrotübülle aktive olan bir ATPaz olan kinesin, veziküllere bağlanmakta ve bunların perikaryondan aksonun uzak bölgelerine mikrotübüller boyunca hareket etmelerini sağlamaktadır. Dynein, aksondan hücre gövdelerine doğru retrograd taşınmaya aracılık eden benzer bir ATPaz'dır (28).

2.1.2. Periferik Glial Hücreler

PSS'de, majör glial hücreler Schwann hücreleridir. Periferik sinirlerdeki tüm aksonları çevrelemektedirler (29). Schwann hücreleri, nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. Nörülasyon sırasında, nöral krest hücreleri nöral tüpten ayrılıp geniş bir doku yelpazesine farklılaşmak için vücut boyunca göç etmektedirler. Nöral krest hücreleri somatik, otonom ve enterik sinir sistemlerinin hem nöral hem de glial hücrelerine farklılaşmaktadırlar (30). Schwann hücrelerinin miyelin oluşturan ve miyelin oluşturmayan olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Miyelin oluşturan Schwann hücreleri, MSS'de bulunan oligodendrositler tarafından yapılan miyelin kılıfla yapı ve işlev bakımından benzer özellikleri bulunan yalıtkan miyelin kılıflar oluşturmaktadırlar. Miyelin oluşturmayan Schwann hücreleri, astrositlerle benzer özellikler göstermektedirler. Metabolik ve mekanik destek işlevlerine sahip olmalarının yanı sıra periferik sinirlerin miyelinsiz kalan kısımlarını çevrelemektedirler (29). Schwann hücreleri ayrıca yaralanmaya yanıt olarak PSS'de onarım süreçlerinde de görev almaktadırlar. Bu görev, yaralanmanın neden olduğu aksonal temasın kaybı ile indüklenmektedir. Aksonal temasın kesilmesiyle birlikte PSH'ye yanıt vermelerini engelleyen olgun Schwann hücre markırlarının down-regülasyonu gerçekleşmektedir (31, 32). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda Schwann hücrelerine özgü çok sayıda markır tanımlanmıştır. Bunlardan en yaygın kullanılanları: S100, MBP, MPZ, p75NTR, GFAP, NCAM, GAP43, PMP22, Sox10, Oct6, Krox20 ve Sox2'dir (33).

Satellit hücreleri, miyelin oluşturmayan Schwann hücrelerine benzer periferik glia hücreleri olup dorsal kök gangliyonlarında bulunan nöron perikaryonlarını çevrelemekte ve desteklemektedirler (34). Potasyum pompalarına sahip olan bu hücreler

perikaryonun iç dengesinin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Potasyum pompaları, doğru hücre fonksiyonu ve aksiyon potansiyeli oluşturma yeteneği için kritik olan hücre dışı potasyumun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (35, 36). Satellit hücreleri nöronları kan damarlarından ve perinöronal boşluklardan ayırmakta ve korumaktadırlar. Bu hücreler gangliyonik nöronları kaplar ve az miktarda sitoplazma içermektedirler. Bu nedenle yüksek yüzey, hacim oranına sahiptirler. Satellit hücreleri ayrıca moleküllerin ve hücrelerin nöronlara erişimini yavaşlatarak, nöronlar için kısmi bir koruyucu tabaka olarak hizmet etmektedir. Bununla birlikte, komşu nöronlar arasındaki Satellit hücre bariyeri çok sıkı değildir ve proteinlere, makrofajlara karşı geçirgendir (37).

2.1.3. Periferik Sinir

PSS’de sinir lifleri, sinirleri oluşturmak için demetler halinde toplanmaktadırlar. Sadece miyelinsiz lifler içeren çok ince sinirler dışında sinirler, miyelin ve kolajen içeriğinden dolayı beyazımsı, parlak bir görünüme sahiptirler (28). Her bir periferik sinir, fasiküller olarak bilinen çok sayıda sinir lifinin gruplar halinde bir araya geldiği düzenlenmeyi oluşturmaktadır. Sinir lifleri olarak da adlandırılan aksonlar, bireysel nöronların uzun iletken kısımlarıdır. Aksonlar ve Schwann hücreleri bağ dokusu katmanları içinde bulunmaktadır. Işık mikroskopunda, enine kesitte bakıldığında periferik bir sinirin fasikülleri birbirinden kolayca ayırt edilebilmektedir (38). Bu fasiküller üç bağ dokusu katmanı tarafından çevrelenmiştir (39). Epinöryum olarak adlandırılan en dış tabaka, bir periferik siniri oluşturmak üzere bir araya gelen tüm fasikülleri içeren bir kılıf oluşturmaktadır. Bu gevşek bağ dokusu tabakası aynı zamanda tek tek fasikülleri çevreleyerek interfasiküler yapıyı meydana getirmektedir. Epinöryum, fleksiyon ve ekstensiyon sırasında sinirin genişlemesine ve kasılmasına izin veren areolar bağ dokusunu içermektedir (40). Perinöryum, daha ince bir bağ dokusunu temsil etmektedir ve her bir fasikülü doğrudan sararak bu yapı içinde homeostazisin korunmasına yardımcı olmaktadır (39). Perinöryum tabakalarında bulunan hücreler, makromoleküllerin geçişine karşı bariyer oluşturan ve sinir lifleri ile iç mikro çevrenin korunmasına yardımcı olan sıkı bağlantılar ile birbirlerine bağlanmaktadırlar (28). İnce bir kolajen lif tabakası olan endonöryum, fasikül içindeki her bir aksonu çevrelemektedir (41). Endonöryum, tip IV kollajen, laminin ve Schwann hücreleri

tarafından üretilen diğer proteinlerin dış laminasıyla birleşen gevşek bağ dokusu tabakasından oluşmaktadır (28). Periferik sinirler değişen oranlarda hem motor hem de duyu nöronlarından oluşmaktadır. Motor sinirler genel olarak miyelinli aksonlara sahipken, duyu sinirleri tipik olarak miyelinsiz aksonlardan oluşmaktadır (40). Her bir miyelinli akson, miyelin tabakaları üretebilen kendi Schwann hücresiyle yakından ilişkili halde bulunmaktadır (41). Schwann hücreleri tarafından sağlanan miyelinizasyon, aynı boyuttaki miyelinsiz aksonlara kıyasla uyarı iletimini 20 ila 100 kat hızlandırmaktadır (42). Miyelinsiz aksonlar genellikle miyelinli aksonlara kıyasla küçüktür; bu nedenle, tek bir Schwann hücresi tarafından birden fazla miyelinsiz akson korunabilmektedir. Miyelinizasyon sürecine ek olarak, Schwann hücreleri periferik sinir rejenerasyonunun başlıca hücresel düzenleyicileridir (41).

2.2. Periferik Sinir Hasarı (PSH)

PSH genellikle motorlu araç çarpışmaları, delici yaralanmalar, yırtılmalar, ateşli silahlar, düşmeler, yanıklar, kırıklar, iskemi, çekme ve ezilme yaralanmaları sonucunda oluşmaktadır (43). Periferik sinirlerdeki travmatik hasar, tüm ekstremit travmalarının %2'sini oluşturmaktadır. Bu hasarlar potansiyel olarak fiziksel ve fonksiyonel kayba sebep olabilen yıkıcı yaralanmalardır. MSS'nin zayıf rejeneratif kapasitesinin aksine, periferik sinir sistemi yaralanmadan sonra büyük oranda yenilenebilir. Bununla birlikte, özellikle proksimal yaralanmalarda veya büyük defektlerin bulunması durumunda klinik sonuç her zaman tatmin edici olmamaktadır (44). Tüm PSH'lerin %33 kadarı, yetersiz sinir iyileşmesi, motor ve duysal fonksiyon kaybı veya kısmi iyileşmesi, kronik ağrı ve son hedef kas atrofisi gibi fonksiyonel bozuklukları içeren sonuçlar doğurabilmektedir (45).

Yaralanmanın şiddetine göre morfolojik ve hücresel düzeydeki değişikliklere bakılarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. PSH şiddeti aynı zamanda sinirin bileşenlerindeki anatomik bozulmanın derecesi ile de ilgilidir. Anatomik düzeyde, periferik sinirler, aksonlar, miyelin kılıf, Schwann hücreleri, kan damarları, yağ ve bağ dokusundan oluşmaktadır (46). Sinir hasarının yaygın olarak kullanılan iki sınıflandırması Seddon ve Sunderland sınıflandırmalarıdır. Seddon, sinir yaralanmalarını artan şiddet sırasına göre nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak gruplandırmıştır. Sinir hasarının en hafif sınıfı olan nöropraksi, genellikle sinirin

belirli bir bölümü boyunca segmental olarak miyelin kılıfta hasar ile karakterize edilmektedir. Nöropraksik yaralanmalar genellikle sinir üzerindeki kompresyon veya traksiyondan kaynaklanmaktadır. Nöroprakside miyelin kılıf hasarından dolayı yalnızca bölgesel uyarı iletim hızında azalma meydana gelmektedir. Aksonotmezis, ayırt edici özellik aksonal bozulma ve bunun sonucunda gerçekleşen Wallerian dejenerasyondur, ancak bazı bağ dokusu yapıları korunmaktadır. Periferik sinirlerde ezilme ve gerilme tipi yaralanmalardan sonra aksonotmezis tipik olarak izlenmektedir. Sinirde kesilme ile karakterize nörotmezis, sinir hasarının en şiddetli sınıfıdır ve genellikle sinir ve bitişik yapılara yönelik önemli travmalardan kaynaklanmaktadır (47, 48).

Sunderland'in sınıflandırması, sinir hasarını beş kategoriye ayırmaktadır. Birinci derece sinir hasarı nöropraksiye tekabül etmektedir ve bu yaralanma tipinde sinirin yaralanma bölgesinin dışında kalan distal segmenti sinir uyarımını normal bir şekilde yapabilmektedir. Burada aksonal yapının korunduğuna inanılmaktadır. İkinci derece sinir hasarında yaralanmalar hedeflerden çok uzakta değildir ve normale yakın iyileşme şansı bulunmaktadır. Bu sinir hasarı tipinde endonöral tüpler korunmuştur ve distalde akson dejenerasyonu ile karakterizedir. Üçüncü derece sinir hasarı, fasiküller ve perinöryumun korunmuş olması ile karakterizedir. Buna karşılık endonöral tüpler ve sinir lifleri tahrip olmuş şekilde görülmektedirler. Fasiküllerin iç yapıları düzensizdir ancak devamlılık göstermektedirler. Dördüncü derece sinir hasarında sadece epinöryum korunmuş olup fasiküller ve perinöral bölgede yıkım görülmektedir. Beşinci derece sinir hasarı, sinir devamlılığının tamamen kaybı, akson ve çevresindeki bağ dokusunun yok olması ile karakterizedir. Bu sinir hasarı Seddon'un sınıflandırmasındaki nörotmezise karşılık gelmektedir (46, 47).

Aksonotmezis ve nörotmezis en şiddetli yaralanmalar olup bu iki durumda lezyon bölgesinin distalindeki sinir lifleri nöronal hücre gövdesi ile temasını kaybetmektedirler. Hücre gövdesiyle temasını kaybeden sinir lifleri perikaryonda sentez edilen proteinler, glikoproteinler, lipidler ve karbonhidratlardan yoksun kalmaktadırlar (49). Bunların sonucu olarak sinir lifleri Wallerian dejenerasyona uğramaktadırlar.

2.2.1. Wallerian Dejenerasyon

Wallerian dejenerasyon, periferik sinir sisteminin en temel reaksiyonlarından biridir. Wallerian dejenerasyon sinir liflerinin devamlılığı travmatik, toksik, iskemik veya metabolik olaylarla kesintiye uğradığında ortaya çıkmaktadır. Aksonal hasar; Schwann hücrelerinin çoğalması, makrofajların aktivasyonu, endonöral boşluğun yeniden düzenlenmesi, nörotrofin ve sitokin üretiminde artış ile endonöral ekstraselüler matriks bileşenlerindeki değişiklikler gibi bir dizi olayı tetiklemektedir (50).

Wallerian dejenerasyon dizisi, sinir lezyonu bölgesinin distalindeki aksoplazma, aksolemma ve miyelin kılıfın ani degradasyonu ile başlamaktadır (50). Aksonal dejenerasyon, aksonu çevreleyen nöronal hücrelerden bağımsız olarak ilerleyen aktif, içsel bir kendi kendini yok etme sürecini tanımlamaktadır (51). Hasar sonrası bozulmuş olan aksonal transport aksonal dejenerasyonu tetiklemektedir. Aksonal dejenerasyonun sonraki adımları, serbest hücre içi Ca^{+2} 'da bir artış ve kalpainlerin aktivasyonunu içermektedir. Bu durum mikrotübüller ve nörofilament protein seviyelerinde büyük bir azalmaya ve 48 saat içinde aksonal parçalanmaya neden olmaktadır. Aksonal teması kaybeden Schwann hücreleri, küçük miyelin sarmallarını izole etme ve lipid damlacıkları oluşturma özellikleri kazanmaktadırlar (50). Ayrıca Schwann hücresi ile akson arasındaki temasın kaybolmasını takiben önce Schwann hücreleri proliferasyon olmakta ardından ortama göç eden makrofajlar tarafından akson parçalanmasını indüklemek için interleukin-1, Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) üretimi meydana gelmektedir. Distal sinir segmentinin yaralanmaya tepkisi, PSH'nin klinik çalışmalarında da araştırılmıştır. Dejenerasyon sürecinde akson PSH sonrası başlangıçta şişmekte, ardından miyelin kılıfının parçalanması meydana gelmekte ve sitoplazmik debris yerinin temizlenmesiyle akson terminallerinde tam dejenerasyon meydana gelene kadar süreç devam etmektedir (52). Yaralanmadan kısa bir süre sonra, Schwann hücreleri hasar sürecine önce bölünme, ardından proliferasyon ve ardından miyelin kılıfı oluşumunun kesilmesi ile yanıt vermektedirler (53). İlk yaralanmadan sonra, Schwann hücreleri transdiferansiye olarak miyelin oluşturma fenotiplerini kaybetmekte ve onarım hücreleri haline gelmektedirler. Miyelin protein ekspresyonları down-regüle edilirken, hücre adezyon moleküllerini, büyüme faktörlerini ve bunların reseptörlerini kodlayanlar da dahil olmak üzere büyümeyi teşvik eden genlerin ekspresyonu artmaktadır (54). Schwann hücre fonksiyonunu etkileyen bir başka iyi tanımlanmış faktör Notch

transmembran proteinidir. Notch proteini hücre içi alanın bölünmesini ve nükleer translokasyonu, proliferasyonu artırır ve Schwann hücrelerinde miyelin üretimini negatif olarak düzenlemektedir (55). Yaralanmadan sonra Schwann hücreleri, ErbB2, tirozin kinaz reseptörünün aktivasyonunun bir sonucu olarak miyelin kılıflarının ayrılmasıyla hızla denervasyon sağlamaktadırlar (56). Schwann hücrelerinin bölünmesinden ve miyelin kılıfın ilk bozunmasından sonra, Schwann hücreleri, bazal laminaların oluşturduğu rehber yol içinde iplikler oluşturmak üzere göç etmektedirler. Oluşturulan bu iplikçikler, filizlenen aksonların yolunu yönlendirmeye yardımcı olan Bungner bantları olarak adlandırılmaktadırlar (57). Yerel makrofajların aktivasyon ve proliferasyonundan önce miyelin kılıfın erken parçalanması, Schwann hücrelerinin hasardan sonra kendi miyelin kılıflarının dejenerasyonunu başlatabildiğini göstermektedir. Schwann hücreleri, miyelin fragmentasyonu ile hasarlı miyelin kılıfın temizlenmesinde ilk adımı gerçekleştirir. Daha sonra, bozulmuş miyelin kılıf, tam miyelin temizliğini gerçekleştirmek için ortamda bulunan makrofajlar tarafından fagosit edilmektedir (50). Hasarlı miyelinin hızlı temizlenmesi, PSH'den sonra aksonal rejenerasyon için en önemli koşul olarak görülmektedir. Bunun sebebi periferik sinir miyelininde ve miyelinli Schwann hücrelerinde bulunan aksonal büyüme inhibitörlerinin varlığıdır (58).

2.2.2. Periferik Sinir Hasarında Proksimal Segment ve Perikaryon Bölgesindeki Değişiklikler

PSH'de hasarlı aksonun proksimal kısmında da geniş çaplı hasarın meydana geldiği bilinmektedir, bu da yaralanma bölgesinden geriye doğru ilk Ranvier düğümüne kadar uzanabilmektedir. Ayrıca proksimaldeki hasar (retrograd), perikaryon içinde de önemli bir yapısal değişiklik göstermektedir. Nöron hücre gövdesindeki değişiklikler, lizozomların etkisiyle protein sentezleyen organellerin yıkılması ve sitoplazmik RNA üretiminde artışla karakterizedir (52). Akson yaralanmasından sonra perikaryonun yapısı, metabolizma ve fizyolojik aktivitesinde derin değişiklikler görülmektedir. Fenotipik değişiklikler ilk önce perikaryonun hipertrofisi, çekirdeğin perifere hareketi ve son olarak bazofilik Nissl cisimciğinin kromatolizise uğraması ile karakterizedir (59). Sonuç olarak bakıldığında perikaryonda gerçekleşen kromatolizis ve ribozom kümelerinin düzensizliği, Wallerian dejenerasyonunun ilk aşamasına karşılık gelen anabolik bir

reaksiyondur. Perikaryonda gerçekleşen metabolik değişikliklere bakıldığında ise sitoplazmik RNA sentezinin ve hücresel protein içeriğinin arttığı, nörotransmitterler ve hücre iskeleti proteinlerinin üretiminin azaldığı görülmektedir (56). Aksonal taşıma proteinleri, RNA ve organeller gibi hücresel içeriklerin aksondan perikaryona hücre içi hareketinde ve bunun tersinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Yaralanmadan 1 ila 2 gün sonra, nöronda transmitter ile ilişkili proteinlerin taşınmasında bir azalma olmaktadır, ancak aksonal aşırı büyümenin başlamasını takiben, taşınan proteinlerin miktarında ve taşıma hızında bir artış olabilmektedir (59). PSH sonrası proksimal segmentin verdiği cevap hayvan deneyleri ile araştırılmıştır. Bu çalışmalarda histolojik ve elektrofizyolojik incelemelerde sinir liflerinin çapında ve sayısında, demiyelinizasyonda ve sinir iletim hızında azalma belirlenmiştir (60). Bunların dışında, Jun N-terminal kinaz (JNK, c-Jun) ve growth associated protein-43 (GAP-43) gibi rejenerasyon için gerekli olan transkripsiyon moleküllerinin ekspresyonunda azalma olabilmektedir. Bazı durumlarda, nöron hücreleri hasar durumunda apoptozise uğrayabilmektedir (27).

2.3. Periferik Sinir Rejenerasyonu

Periferik sinir rejenerasyonunda enflamasyon önemli bir rol oynamaktadır. Periferik sinirin yaralanmasını takiben, yaralanma bölgesinin distalindeki aksonlar dejenere olmaya başlamakta, yaralanma bölgesinde ve sinir boyunca enflamatuvar hücreler birikmekte ve miyelin debrisinin kaldırılarak yeni aksonların yenilenmesi için bir yol açılmaktadır (61). Miyelin kalıntıları, miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG) ve akson büyümesini engelleyen diğer molekülleri içerdiğinden, kalıntıların temizlenmesi sinirin yeniden innervasyonu için gereklidir. Wallerian dejenerasyondan sonra Schwann hücrelerinin bazal laminalarındaki devamlılık sayesinde bu hücreler kendilerini uzunlamasına hizalayarak, rejenerasyon sürecindeki aksonlar için destekleyici ve büyümeyi teşvik eden bir mikro çevre sağlayan Bungner bantları adı verilen hücre sütunlarını oluşturmaktadırlar. Bu sırada endonöral tüpler de küçülmekte, Schwann hücreleri ve makrofajlar bu endonöral boşlukları doldurmaktadır. Yenilenen aksonun uç kısmında, özel hareketli bir keşif aygıtı olan büyüme konisi bulunmaktadır. Büyüme konisi, filopodia adı verilen çok sayıda parmak benzeri çıkıntıların uzantı yaptığı ve mikro ortamlarını keşfettiği, lamellipodia adı verilen düzleştirilmiş hücresel matriks

tabakalarından oluşan bir yapıdan oluşmaktadır. Filopodia elektrofiliktir ve bazal laminanın katyonik bölgelerine bağlanmaktadır. Filopodia içinde aksonal uzamanın oluşması için kasılma yeteneğine sahip aktin proteinleri bulunmaktadır. Koni, hedef organına giden yolu temizlemek için yolundaki matriksi çözen proteazları serbest bırakmaktadır. Büyüme konisi dört faktör tarafından uyarılmaktadır bunlar; nörotrofik faktörler, nörit teşvik edici faktörler, matriks oluşturan öncüler, metabolik ve diğer faktörler. Nörotrofik faktörler, denerve motor ve duysal reseptörlerde bulunan makromoleküler proteinlerdir. Ayrıca rejenerasyon yolu boyunca Schwann hücreleri içinde bulunurlar. Bu faktörler aksonun hayatta kalmasına, uzamasına ve olgunlaşmasına yardımcı olur. Orijinal nörotrofik faktör, sinir büyüme faktörüdür. Trofik bir faktör olmasının (hayatta kalmayı ve büyümeyi teşvik eden) yanı sıra, sinir büyüme faktörü kemoatraktandır ve büyüme konisi morfolojisini etkilemektedir (62).

Büyüme süreci bazen, fonksiyonel iyileşme olmasa ve anormal büyüme oluştursa bile uzun bir süre devam etmektedir. Rejenerasyon sırasında uygun yönlendirmenin olmaması, filizlenen aksonların karışık bir yol izlemesine neden olur ve bu durum olgunlaşmamış aksonlar ile fibröz bağ dokusu karışımından oluşan anormal bir kitle oluşumuna neden olmaktadır (56). Akson, hedeflerinin yeniden innervasyonunu başarılı bir şekilde oluşturduğunda, Schwann hücrelerinin miyelinasyonu yeniden başlamaktadır. Schwann hücrelerinin, büyüme konisi içinde akson rejenerasyonunu arttırmak için plazma zarı yüzeyinde hücre adezyon molekülü olan laminini de eksprese ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Laminin, yaralanmadan sonra up-regüle olmaktadır ve büyüme konisi içindeki aktin hücre iskeleti ağına yapışmayı indüklemek için integrin reseptörlerini bağlayarak doğrudan Schwann hücresi bazal laminası ve bununla ilişkili akson üzerinde etki sağlamaktadır (53).

2.4. Periferik Sinir Hasarında Sitokinlerin Etkisi

Nöroenflamasyon, proenflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenen bir süreçtir. Bu sürecin nöropatik ağrının ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı, nöronal hasarı ve rejenerasyonu düzenlediği bildirilmiştir (63). Sitokinler, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve enflamatuvar tepkileri düzenleyen, heterojen yapıdaki polipeptitlerdir. Sitokinlerin ve onların kemokin gruplarının sinir sisteminde, normal fizyolojik koşulların korunmasında önemli rollere sahip olduğu ve sinir dokusu homeostazını

yeniden sağlamak için çeşitli stres faktörlerinin etkisiyle ekspresyonlarının hızla up-regüle olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Sitokinler birbirleri ile benzer mekanizmalarla çalışabilmekte ve birçok hücre grubu tarafından üretilmektedirler. Ayrıca bir sitokinin ekspresyonu diğer bir sitokinin ekspresyon kaskadını tetikleyebilmektedir (64). Periferik sinir sisteminin sitokinleri, periferik nöronlar ve onların glial hücreleri (örneğin, Schwann hücreleri, duyu gangliyonlarının Satellit hücreleri) ve ayrıca yerleşik immün sistem hücreleri tarafından üretilmektedir (65).

Sitokinler, tıpkı enflamasyonun kendisi gibi, sinir rejenerasyonu ile ilgili olarak iki ucu keskin bir kılıç oluşturmaktadır. Bu zıt etkiler, PSH'de enflamatuvar reaksiyonların derecesi ve zamanlaması ile ilgili olarak görülmektedir. Lokal enflamasyonun akson rejenerasyonu üzerindeki faydalı etkisi muhtemelen, sitokinlerin gereken zamanda üretilmesine ve kritik dönemlerde sitokinleri optimal seviyelerde tutmak için çok hassas olan kontrolüne bağlıdır. PSH veya diğer sinir hastalıklarından sonra kronik bir şekilde aşırı sitokin üretiminin nöropatik ağrıyı indüklediği bilinmektedir (66). Bununla birlikte, optimal sitokin seviyeleri ve bu sitokinlerin PSH'ye faydalı etkileri ile ilgili mekanizmalar hala gizemini korumaktadır (65). Çoğu sitokin, hasarlı sinirin distal bölümünde iki veya üç dalga halinde up-regüle edilmektedir. Wallerian dejenerasyonun erken fazı sırasında aktive edilmiş Schwann hücreleri tarafından sitokinlerin ve kemokinlerin up-regüle edilmesi, ağırlıklı olarak miyelin kılıf yıkımı ve makrofajların göreve çağırılmasıyla ilişkilidir. Bu ilk dalgayı, sitokin/kemokin ekspresyonunda enflamatuvar yanıtın sonlandırılmasını içeren ikinci bir faz takip etmektedir (67). Wallerian dejenerasyonda, Schwann hücrelerinin enflamatuvar reaksiyonu, çoğalma, hayatta kalma ve akson büyümesinin desteklenmesi ile ilgilidir. Düşük pro-enflamatuvar sitokin seviyelerinin nörotrofine bağımlı akson büyümesini uyarabildiği yapılan in vitro çalışmalarda kanıtlanmıştır. Sitokin-nörotrofin etkileşimi, enflamatuvar yanıtın aksonal rejenerasyonu modüle ettiği mekanizmalardan biri olarak görülmektedir (68). Literatürde Schwann hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin ve kemokinlerin, aksonal büyüme üzerinde doğrudan veya dolaylı etkileri olduğu belirtilmektedir. Bu lokal etkiye ek olarak, sitokinler, kemokinler ve bunların sinyal molekülleri, nöronal hücre gövdelerinde ve glial hücrelerde PSH sonrasında önemli roller oynamaktadır. Ayrıca nöronal hayatta kalma ve akson rejenerasyonunu etkilemektedirler (65).

2.5. Periferik Sinir Hasarından Sonra Zonisamide Tedavisi

İlaçlar üzerinde yapılan araştırmaların sıklıkla güncellenmesi veya başka hastalıkların tedavisinde bu ilaçların yeniden kullanılması, ilaçların olası etkilerini keşfetmeye yönelik bir stratejidir ve geleneksel yaklaşımlara kıyasla ilaç geliştirme maliyetini ve süresini önemli ölçüde azaltmaktadır.

ZNS, daha az toksik, daha etkili bir antikonvülzan arayışı içinde geliştirilmiş antiepileptik bir ilaçtır. 1989'dan beri kullanılmaktadır. Basit ve karmaşık kısmi nöbetler, tonik klonik nöbetler, miyoklonik epilepsiler, Lennox-Gastaut sendromu ve infantil spazmlar için etkili olduğu bilinmektedir (69). ZNS, bir sülfonamid türevidir (1,2-benzisoksazol 3-metansülfonamid). Benzodiazepin gama-aminobütirik asit (GABA) A reseptörüne bağlanma gibi antiepileptik etkisine katkı sağlayan bir dizi farklı özelliğe sahiptir. Ayrıca voltaj kapılı sodyum kanalları ve T tipi kalsiyum kanalları üzerinde etkileri bulunmaktadır. ZNS'nin glutaminerjik iletim üzerine uyarıcı etkileri, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca dopamin döngüsünü ve karbonik anhidraz aktivitesini inhibe etmektedir. Ek olarak, bazı deneysel modellerde, serbest radikallerin yok edilmesinde rol oynadığı ve bu nedenle nöroprotektif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. ZNS, %100'e yakın bir biyoyararlanım ile ağızdan hızla emilmektedir. Kanda en yüksek miktara ulaşma süresi yaklaşık 2-6 saattir. Ayrıca sitokrom P450 sistemi tarafından metabolize edilmekte ve renal mekanizma tarafından elimine edilmektedir (70). Araştırmacılar elektroşok ile oluşturulan epileptik hayvan modelinde, ZNS'nin 10-70 µg/ml plazma konsantrasyonlarında nörotoksisite belirtileri olmaksızın nöbetleri önlemede etkili olduğunu tespit etmişlerdir (71). Başka bir çalışmada sıçanlarda oluşturulan epilepsi modelinde, ZNS'nin epileptik nöbetleri karbamazepine benzer bir oranla azalttığı belirlenmiştir (72). Buna benzer şekilde kedilerde oluşturulan epilepsi modelinde, yüksek doz ZNS ile tedavi edilen hayvanlarda nöbetlerin ortadan kalktığı bildirilmiştir (73). Kedilerde, ışık kaynaklı epilepsi modelinde, ZNS'nin titreyen ışığa yanıt olarak nöbet sıklığını önemli ölçüde azalttığı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (74). Bir benzisoksazol türevi olan ZNS, başlangıçta bir anti-epileptik ilaç olarak geliştirilmiştir. Yapılan daha sonraki çalışmalar ile Parkinson hastalığı için de başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir (75). ZNS'nin anti-epileptik etkisini gösterdiği düşünülen birincil mekanizma, voltaj bağımlı sodyum ve T tipi kalsiyum kanallarının inhibisyonu yolağıdır. Son zamanlarda, ZNS'nin,

monoamin oksidaz B'yi inhibe etme yeteneği sayesinde, diğer anti-parkinson ilaçları ile kombinasyon halinde kullanıldığında Parkinson hastalarında semptomları iyileştirdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda etki mekanizmalarının herhangi birinin ya da tamamının periferik veya merkezi nöropatik ağrının tedavisi ile ilgili olabileceği de düşünülmektedir. Hayvan ve insan çalışmalarında, merkezi ve periferik nöropatik ağrı üzerinde ZNS kullanımı ile ilgili olumlu sonuçlar elde edilmiştir (76). Yapılan bir çalışmada, ZNS ve levodopa birlikte uygulandığında, enjeksiyondan sonraki 20 dakika içinde kontralateral rotasyonel davranışta (dönen bir sıçanın dik konuma dönmek için sergilediği davranış) önemli bir artış kaydedilmiştir (77). Yapılan çalışmalarda, ZNS'nin, hayvan modellerinde oksidatif stres ve dopaminerjik nörodejenerasyona karşı nöroprotektif potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (78). Ayrıca klinik çalışmalarda, ZNS'nin nöbet ve iskemiye karşı nöroprotektif etki sağladığı belirlenmiştir (79). Araştırmacılar ZNS'nin, kültüre edilmiş motor nöronlarda akson büyümesini desteklediğini ve farelerde PSH'den sonra aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdığını bulmuşlardır (9). Bu bulgular, PSH'den sonra ZNS'nin nörotrofik ve nöroprotektif özelliklerinin bulunduğunu göstermektedir. ZNS'nin nöroprotektif potansiyeli, rotenonun kortikostriatal beyin bölgelerine akut uygulanmasıyla indüklenen bir in vitro nörotoksisite modelinde test edilmiştir. Çalışma sonucunda ZNS'nin voltaj bağımlı Na^{+1} ve T tipi Ca^{+2} kanallarının inhibisyonu, depolarizasyon kaynaklı glutamat salınımının azalması, GABAerjik ve monoaminerjik iletimin artması ile nöronal disfonksiyonu azalttığı belirlenmiştir (80). Bu durum ZNS'nin PSH için potansiyel bir ilaç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (81).

2.6. Periferik Sinir Hasarından Sonra Diklofenak Sodyum Tedavisi

Diklofenak sodyum, analjezik, antienflamatuvar ve antipiretik özelliklere sahip, yaygın olarak reçete edilen NSAID türevi bir ilaçtır. Çeşitli akut, kronik ağrı ve enflamatuvar durumların tedavisinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Tüm NSAID'lerde olduğu gibi, diklofenak sodyum, etkisini COX-1 ve COX-2'yi baskılayarak prostaglandin sentezinin inhibisyonu yoluyla göstermektedir. Bununla birlikte, kapsamlı araştırmalar, diklofenak sodyumun farmakolojik aktivitesinin COX inhibisyonunun ötesine geçtiğini ve bazı durumlarda yeni etki mekanizmalarını içerdiğini göstermektedir (82). Diklofenak sodyum, PGE2 üretiminin en etkili

inhibitörleri arasındadır ve COX aktivitesinin baskılanmasında diğer NSAID'lere kıyasla molar bazda 3 ila 1000 kat daha güçlü olduğu bildirilmiştir (83). Prostaglandinlerin enflamatuvar süreçlerde, nosiseptörlerin duyarlılaşmasında ve ağrı oluşumunda anahtar rol oynadığı ve COX inhibitörlerinin analjezi sağlamada etkili olduğu uzun süredir bilinmektedir. COX inhibitörleri, periferik enflamasyonu takiben ağrılı uyaranlara karşı davranışsal veya elektrofizyolojik tepkileri azaltmakta ve bu etki COX-2 izoenziminin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (84). Prostaglandinler, lökotrienler ve bunların üretiminden sorumlu olan enzimler, COX ve lipooksijenaz gibi araşidonik asit türevleri, sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu olaylarına katılmaktadırlar (85). COX inhibitörlerinin uygulanması, PSH'den sonra aksonal rejenerasyonu olumsuz etkileyen sinyal mekanizmalarını engellemektedir ve aksonal rejenerasyonun artmasına neden olmaktadır. COX inhibitörleri, Schwann hücrelerinin ve makrofajların fagositik aktivitesini de olumlu yönde etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda, COX-2 inhibitörleri ile tedavi edilen sıçanlarda PSH'den sonra fonksiyonel iyileşmenin hızlandığı, böylece COX-2'nin sinir rejenerasyonunda doğrudan görev yaptığı belirlenmiştir (85). Ek olarak COX inhibitörlerinin, rejenerasyonu olumsuz etkileyen miyelin artıklarının oluşumunu engellediği ve nöronlarda aksonal büyümeyi indüklediği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (86).

2.7. Periferik Sinir Hasarında Krox-20'nin Rolü

Transkripsiyon faktörü Krox-20, miyelinizasyon için gereklidir. Yapılan çalışmalarda Krox-20'nin miyelinizasyon sırasında Schwann hücrelerinde güçlü bir şekilde arttığı ve Krox-20 geni susturulmuş farelerde Schwann hücrelerinin çoğaldığı ancak miyelin farklılaşması başlamasına rağmen, miyelin kılıflarının oluşmadığı görülmüştür (87, 88). Egr2 olarak da bilinen Krox-20'nin daha önce Schwann hücresi gelişiminde önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Krox-20 geni susturulmuş farelerde, Schwann hücre gelişimi belirgin şekilde aksamaktadır. Yapılan başka bir çalışmada Krox-20 geni bulunmayan Schwann hücrelerinin, aksonlarla bire bir ilişki oluşturduğu ve erken miyelin belirteci olan miyelinle ilişkili glikoproteini (MAG) eksprese ettiği belirlenmiştir. Ayrıca Krox-20 geni susturulmuş Schwann hücrelerinin aksonlar etrafında spiral oluşturamadığı, miyelin proteinleri olan P0 ve miyelin bazik proteininin ekspresyon artışını sağlayamadığı araştırmacılar tarafından

bildirilmiştir (89). Yapılan başka bir çalışmada Krox-20 ekspresyonunun DNA sentezini inhibe ettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, Krox-20'nin TGF sinyallerini etkisiz hale getirdiği gösterilmiştir. Ayrıca bu sinyalin engellenmesinin ise hücreleri, büyüme faktörü yoksunluğu tarafından tetiklenen ölümden koruduğu tespit edilmiştir. Schwann hücre kültürlerinde Krox-20 ekspresyonunun, normal şartlar altında JNK-c-Jun yolağını down-regüle ettiği ve bunu NRG-1(Neurogulin-1) ve TGF (Transforming Growth Factor) tarafından JNK-c-Jun aktivasyonunu baskılayarak yaptığı, ancak aksonla temasının kesilmesiyle Krox-20 ekspresyonunun azaldığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (90). Yapılan moleküler ve immünohistokimyasal araştırmalarla, Krox-20'nin, miyelinizasyon ve demiyelinizasyon programlama süreçlerini kontrol eden anahtar bir molekül olduğu sonucuna varılmıştır (91).

2.8. Periferik Sinir Hasarında p75NTR'nin Rolü

p75 ilk olarak nörotrofin reseptörü olarak tespit edilmiş, daha sonra yapılan çalışmalarda reseptör tirozin kinazın Trk ailesinin de nörotrofinlere bağlandığı bulunmuştur (92). p75NTR, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin (TNFRSF) kurucu üyesidir. TNFRSF, hücre dışı alandaki sisteinden zengin alanların sayısı açısından ve hücre içi bölgede ölüm alanı (DD) adı verilen özel bir alanın bulunup bulunmaması bakımından farklılık göstermektedir. p75NTR, hücre dışı bölgede dört sistein açısından zengin alana, hücre içi bölgede ise bir ölüm alanına (DD) sahiptir. p75NTR, TNFRSF ailesinin ilk üyesi olmasına rağmen diğerlerinden farklı yapıdadır. TNFRSF proteinleri trimerik TNFSF ligandları tarafından aktive edilirken, p75NTR, yapısal olarak TNFSF proteinleri ile ilgisi olmayan dimerik nörotrofinler tarafından aktive edilmektedir. Ek olarak, p75NTR, NF-κB ve hücre ölümü yollarını aktive etmek için TNF reseptörü ile ilişkili faktörlerle etkileşime girse de DD içeren FADD, TRADD veya MyD88 gibi proteinlerle etkileşime girmemektedir (92). DD'si olmayan reseptörler, hayatta kalma reseptörleri olarak adlandırılmaktadır ve TNFR2, CD40, CD30, OX40, LTβR, RANK ve TACI'yi içerir. DD içeren reseptörlere ölüm reseptörleri denilmektedir ve TNFR1, Fas ve p75NTR'yi içermektedir. TNFR süper ailesinin reseptörleri, enzimatik bir aktivite göstermemektedir (93). Bunun yerine aktivasyon, sinyal proteinlerinin hücre içi bölgelere alınmasıyla gerçekleşmektedir. TRADD veya FADD gibi bir DD'ye sahip bağdaştırıcı proteinler, ölüm reseptörü sinyalleşmesinde rol

oynamaktadırlar. Bu adaptör proteinlerin TNFR'lere bağlanması, NF- κ B veya AP-1 transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenen farklı yolların aktivasyonunun yanı sıra apoptoz veya nekropitoz gibi hücre ölüm süreçlerinin başlatılması anlamına da gelmektedir (92).

Trk ailesi ve p75, benzer bir affinite ile nörotrofinlere bağlanmaktadır. Ancak p75 varlığında Trk ailesi, nörotrofinler için afinitelerini 100 kat arttırmaktadır. Bu durumdan dolayı Trk ailesi yüksek affiniteli nörotrofin reseptörü olarak bilinirken, p75 ise düşük affiniteli nörotrofin reseptörü olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, p75 ve Trk, farklı bir bağlanma mekanizmasıyla benzer bir affinite ile nörotrofinlere bağımsız olarak bağlandığından bu durum gerçeği yansıtmamaktadır (94). Yapılan çalışmalarda nörotrofinlerin tümünün p75NTR reseptörüne bağlanabildiği ancak diğer Trk tirozin kinaz reseptörlerinin hangi nörotrofini bağlayacakları konusunda daha seçici olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda NGF'nin TrkA'ya bağlandığı, BDNF ve NT4/5'in TrkB'ye, NT3'ün de TrkC'ye bağlandığı gösterilmiştir (95). p75NTR'in sekans analizine bakıldığında, sistein açısından çok zengin bir hücre dışı bölgeye ve katalitik aktiviteye sahip olmayan tip 1 zar proteini içeren hücre içi bir bölgeye sahip olduğu rapor edilmiştir. p75NTR'nin ekstraselüler bölgesindeki sisteinler spesifik olarak düzenlenmiştir (96). p75NTR aracılı sinyalleşme, hücre yapısı ve hücre ölümü sortilin/pro-NGF, aksonal büyüme inhibisyonunda Nogo/Lingo-1/NgR, hayatta kalma ve farklılaşmada TrkA/NGF gibi farklı koreseptörler ve ligandlarla oluşan kompleksler tarafından yönetilmektedir (92).

Nörotrofin reseptörü p75NTR'nin, Trk reseptörleri için bir yardımcı olmaktan çok daha fazla işlevi olduğu bilinmektedir. p75NTR, RhoA GTPaz aktivitesinin modülasyonu yoluyla akson büyümesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (97). RhoA, aktin polimerizasyon durumunu düzenleyen küçük bir GTPaz'dır. Aktif GTP'ye bağlı formunda RhoA, aktin hücre iskeletini sertleştirmektedir. RhoA böylece aksonal uzamayı engellemekte ve büyüme konisinin yapısının bozulmasına neden olmaktadır. p75NTR'ye bağlanan nörotrofin, RhoA ve miyelinle ilişkili proteinler Nogo-66, MAG ve OMgp'yi inhibe etmektedir. Nogo reseptörü/p75NTR'ye bağlı bir mekanizma ile RhoA aktive edilmekte ve nörit büyümesini inhibe edilmektedir (98).

Beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) miyelin oluşumunu arttırmak için p75NTR yoluyla etki ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Biyolojik fonksiyonları çoğunlukla nöronal hücrelerde hayatta kalma, farklılaşma, ve hücre ölümü olan nörotrofin ailesi, sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kökenli büyüme faktörü (BDNF), nörotrofin-3 (NT3) ve nörotrofin 4/5 (NT4/5) gibi büyüme faktörlerini içermektedir (99).

2.9. Periferik Sinir Hasarında iNOS

Geçmiş yıllarda kararsız durumda bulunan zararlı bir gaz olarak görülen NO'nun günümüzde eşsiz bir biyolojik haberci ve gaz taşıyıcı olduğu bildirilmiştir (100). NO'nun ilk olarak makrofajlar tarafından oluşturulduğu, tümör hücrelerini ve mantarları öldürme yeteneğine sahip endotel kaynaklı bir gevşetici faktör olduğu keşfedilmiştir (101). NO, L-arginin moleküllerini substrat olarak kullanan NO sentaz (NOS) üyeleri tarafından sentezlenmektedir (102). NOS'un genetik olarak farklı ve NO üretimi için gerekli olan üç izoformu bulunmaktadır. Bunlar; iNOS, eNOS, nNOS olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda beyinde NOS, gama aminobütirik asit internöronlarında, aminojik ve peptiderjik nöronlarda ve uyarıcı amino asit glutamat vericisi kullanan nöronlarda tespit edilmiştir (100). nNOS ve eNOS'tan gelen NO düşük konsantrasyonda üretilir ve sinyal iletimi için haberci görevi görmektedir. iNOS'tan salınan NO yüksek konsantrasyondadır ve immünolojik destek sağlamaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında, NO konsantrasyonu düşük değerlerdedir (100). Yapılan araştırmalarda beyinde, iskemi veya diğer yaralanmalar sonucunda, glutamat tarafından tetiklenen ve modüle edilen nNOS yoluyla NO üretiminin arttığı rapor edilmiştir (103). Enflamasyon gibi durumlarda, iNOS tarafından üretilen NO seviyesi yüksek olmasına rağmen bu durum geçicidir (104). nNOS ve eNOS kalsiyum bağımlı bir şekilde düzenlenirken, iNOS'un düzenlenmesi gen transkripsiyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. nNOS; PSS, MSS, iskelet kası ve akciğer epitelinde bulunurken iNOS, öncelikle makrofajlarda, glial hücrelerde ve hepatositlerde eksprese olmaktadır. eNOS ise endotel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde ve hipokampüste bulunmaktadır (100, 105, 106).

PSH'de iNOS ve nNOS 'un her ikisinin de önemli olduğu ve bunlar tarafından salınan NO'nun başarılı Wallerian dejenerasyonu ve periferik sinir rejenerasyonuna katıldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

2.10. Periferik Sinir Hasarında COX-2

Enflamatuvar yanıt, PSH'den sonra meydana gelen dejenerasyon ve rejenerasyon süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Enflamatuvar hücreler, bol miktarda COX-2'ye bağımlı PGE2 (COX-2 / PGE2) üretir ve bu durum çeşitli bozukluklarda artar. PGE2 sentezinde düzenleyici enzimlerin iki formu COX-1 ve COX-2'dir. COX-2, hasar görmüş sinirlerde yaralanma bölgesi çevresinde güçlü bir şekilde artmaktadır. Bir sinir hasar gördüğünde, makrofajlarda ve Schwann hücrelerinde hem COX-1, hem de COX-2 ekspresyonu önemli ölçüde artmaktadır. Makrofajlar, aksonal kalıntıların temizlenmesi ve sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve nitrik oksit (NO)'in yaralanan sinirde pro veya anti-enflamatuvar araçlar olarak üretilmesi ve salınması gibi önemli roller oynamaktadırlar (107).

Siklooksijenaz (COX) enzimi, iki katalitik adımla araşidonik asidi prostaglandinlere dönüştürmektedir. Bu adımların ilki, araşidonik aside oksijen ekleyerek kararsız prostaglandin G2'nin (PGG2) oluşmasıdır. İkinci adımda, PGG2'yi prostaglandin H2'ye (PGH2) indirger, daha sonra spesifik sentazlar yoluyla prostaglandin E2 (PGE2), prostaglandin D2, prostasiklin veya tromboksan A2 gibi çeşitli prostanoidlere dönüştürür (108). COX'un iki izoformu bulunmaktadır. Bunlar COX-1 ve COX-2'dir. COX-1, trombosit agregasyonu ve midede koruyucu mukus üretimi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara aracılık etmektedir ve çoğu hücrede eksprese edilmektedir (109). COX-1'in aksine, COX-2 daha az ve esas olarak mide, böbrek, sinir sistemi ve dişi üreme sisteminde üretilmektedir (110). Bununla birlikte, COX-2 ekspresyonu, büyüme faktörleri, sitokinler, karsinojenler, onkogenler ve kronik enflamasyon gibi farklı uyaranlar tarafından diğer hücre tiplerinde de indüklenebilmektedir (111).

Yapılan çalışmalarda NSAID'lerin yan etkilerinin çoğunlukla (örn., gastrointestinal ülserasyon, kanama ve trombosit fonksiyon bozuklukları) COX-1 aktivitesinin baskılanmasından kaynaklandığı, COX-2'den türetilen PG'lerin inhibisyonunun ise enflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkiler gösterdiği belirlenmiştir (112). Örneğin, insan endotel hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar, yüksek glukozaya yanıt olarak COX-2 aktivasyonunun artmış tromboksan A2 üretimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (113). Ayrıca COX-2'den türetilen prostaglandin E2 (PGE2) ekspresyonunun osteoartrit, romatoid artrit, mide ve kolon tümörigenezi

modellerinde arttığını ve seçici COX-2 inhibitörlerinin COX-2'den türetilen PGE2 üretimini azalttığını göstermektedir (114). Yapılan başka bir çalışmada PGE2'yi destekleyen COX-2'ye bağlı bir PG dengesizliğinin, Alzheimer hastalığı modelinde PGE2 reseptör sinyali yoluyla oksidatif stresi ve ardından nöronal hasarı desteklediği belirtilmiştir (115). Periferik dokuların çoğunun aksine, COX-2 normal koşullar altında merkezi sinir sisteminde eksprese edilmektedir. COX-2 sinaptik aktivite, hafıza konsolidasyonu ve fonksiyonel hiperemi gibi temel beyin fonksiyonlarına katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, COX-2 ekspresyonu, sinaptik aktiviteye bağlı olduğundan nöbetler, iskemi ve periferik enflamasyona yanıt olarak hızla artmaktadır. Periferik sinir sisteminin çoğunlukla, normal koşullar altında COX-2 ekspresyonu saptanamaz, ancak mekanik yaralanma, karpal tünel sendromu, kronik enflamatuvar demiyelinizan poliradikülönöropati, vasküler nöropati, Guillain-Barre sendromuna benzer çeşitli hastalık durumlarında bu ekspresyon artmaktadır (114).

PSH ile ilgili hayvan ve insan çalışmalarından elde edilen bulgular COX-2 metabolitlerinin Wallerian dejenerasyon, sinir rejenerasyonu ve kalıcı ağrı ile ilişkili süreçlerde rol oynadığını göstermektedir (114).

Sunulan bu çalışmada periferik sinirde ezilme tipi yaralanma oluşturulduktan sonra, zonisamide ve diklofenak sodyum tedavisinin ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmasının sinir iyileşmesi üzerine etkilerinin ultrastrüktürel, immünohistokimyasal, histomorfometrik ve moleküler yöntemler ile araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde, günümüze kadar, periferik sinir yaralanması üzerine bu iki tedavi edici ajanın kombine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla, ratların siyatik sinirlerinde ezilme tipi sinir hasarı oluşturulmuş, zonisamide ve diklofenak sodyum kullanılarak tedavi edilen ratların sinir dokularında, immünohistokimyasal yöntemle enflamasyon belirteçleri olan İndüklenmiş Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) ve Siklooksijenaz-2 (Cox-2) moleküllerinin ekspresyonları ile aksonal rejenerasyon ve miyelinizasyon belirteçleri olan P75 nörotropin reseptörü (p75NTR) ve Krox20 ekspresyonları gen düzeyinde araştırılmış, miyelinli akson sayıları histomorfometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Gruplara Ayrılması

Deneyssel olarak oluşturulan periferik sinir hasarı sonrasında zonisamide ve diklofenak sodyumun tek başlarına ve kombine tedavilerinin, enflamasyon belirteçleri olan iNOS ve COX-2 molekül seviyelerine; ayrıca aksonal rejenerasyon ve miyelinizasyon belirteçleri olan p75NTR ile Krox-20 ekspresyon seviyelerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneyssel Uygulama ve Araştırma Merkezinden (SABİDAM) 250-300 gr ağırlığında 84 erkek Wistar cinsi sıçan temin edildi.

Bu denekler randomize bir şekilde 6 gruba ayrıldı. Bu gruplar herhangi bir cerrahi işlem yapılmayan ve sağlam bırakılan kontrol grubu (n=6), herhangi bir hasar verilmeden yalnızca siyatik sinir bölgesinin operasyon ile açılıp geri kapatıldığı sham operasyon grubu (n=6), deneklerin siyatik sinirlerinde ezilme tipi hasar oluşturulduktan sonra hiçbir tedavi uygulanmayan deney kontrol grubu (n=18), deneklerin siyatik sinirlerinde ezilme tipi hasar oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca günde 1 kere intraperitoneal yol ile 2 mg/kg dozunda diklofenak sodyum verilen diklofenak sodyum tedavi grubu (n=18), deneklerin siyatik sinirlerinde ezilme tipi hasar oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca günde 1 kere oral gavaj ile 100 mg/kg dozunda zonisamide verilen zonisamide tedavi grubu (n=18), hayvanların siyatik sinirlerinde ezilme tipi yaralanma oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca günde 1 kere intraperitoneal yol ile 2mg/kg dozunda diklofenak sodyum ve oral gavaj ile 100 mg/kg dozunda zonisamide verilen kombine tedavi grubu olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Tedavinin zamana bağlı etkilerini göstermek üzere tüm gruplar kendi içerisinde 7. gün, 14. gün ve 21. gün olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı. Bu alt gruplardaki denekler belirtilen günlerde sakrifiye edilerek siyatik sinir dokuları elde edildi (9, 116, 117).

3.2. Operasyon

Tüm cerrahi prosedürler, intraperitoneal olarak 80 mg/kg ketamin hidroklorid ve 10 mg/kg ksilazinin intramüsküler enjeksiyonu ile anestezi altına alınan deneklerde gerçekleştirildi. Sıçanlarda sağ uyluğun orta kısmı eksize edilerek siyatik sinirin ortaya çıkması sağlandı. Kapanma gücü 50 g olan cerrahi forseps (Aesculap, Almanya) ile 30

saniye boyunca ezilerek periferik sinir hasarı oluşturuldu. Sonrasında hasar bölgesinde kesilen kas ve deri yapıları ipek iplik ile sütur atılarak kapatıldı.

3.3. Tedavinin Uygulanması

Deney kontrol grubundaki deneklere yalnızca serum fizyolojik verildi. Bunun dışında hiçbir tedavi uygulanmadı. Diklofenak sodyum tedavi grubuna hasar oluşturulan gün dahil olmak üzere 7 gün boyunca günde 1 kere olmak üzere 2 mg/kg dozunda diklofenak sodyum verildi. Zonisamide tedavi grubuna hasar oluşturulan gün dahil olmak üzere 7 gün boyunca oral gavaj ile 100 mg/kg zonisamide verildi. Kombine tedavi grubuna hasar oluşturulan gün dahil olmak üzere 7 gün boyunca intraperitoneal olarak 2 mg/kg diklofenak sodyum ve oral gavaj ile 100 mg/kg dozunda zonisamide verildi.

3.4. Biyopsilerin Alınması

Tüm gruplardan doku örnekleri deney başlatılmasını takiben 7., 14. ve 21. günlerde elde edildi. Periferik sinir hasarını takiben hasar ve tedavi gruplarında bulunan deneklerden 6 tanesi 7. günde, 6 tanesi 14. günde, 6 tanesi 21. günde anestezi altında siyatik sinir dokuları elde edildi. Kontrol ve sham gruplarında belirtilen günlerde 2'şer denekten anestezi altında siyatik sinir dokuları elde edildi. Elde edilen siyatik sinir dokuları, ışık, elektron mikroskopik, immünohistokimyasal ve real time PCR incelemeleri için uygun yöntemler ile hazırlandı.

3.5. Işık Mikroskopi Yöntemleri

Deneklerden elde edilen siyatik sinir doku örnekleri %4'lük paraformaldehit içerisinde alınarak oda ısısında 48-72 saat fikse edildi. Sonrasında paraformaldehitin uzaklaştırılması için dokular su ile yıkandı ve ototeknikon cihazı (Leica TP 1020) ile rutin otomatik doku takip yöntemi uygulandı. Ototeknikon cihazında doku örneklerine uygulanan rutin prosedür ise sırasıyla;

- Oda sıcaklığında paraformaldehit içerisinde 30 dk
- Oda sıcaklığında %70'lik etil alkol içerisinde 1 saat
- Oda sıcaklığında %80'lik etil alkol içerisinde 1 saat

- Oda sıcaklığında %90'lık etil alkol içerisinde 1,5 saat
- Oda sıcaklığında saf alkol içerisinde 1 saat
- Oda sıcaklığında saf alkol içerisinde 1 saat
- Oda sıcaklığında saf alkol içerisinde 1,5 saat
- Oda sıcaklığında saf alkol+ ksilol karışımında 1 saat
- Oda sıcaklığında ksilol içerisinde 1 saat
- Oda sıcaklığında ksilol içerisinde 1,5 saat
- 60°C'de parafin içerisinde 1 saat
- 60°C'de parafin içerisinde 1,5 saat bekletme şeklindedir.

Sonrasında bloklama işlemi gerçekleştirildi. Bloklama işleminden sonra 5 µm kalınlığında parafin kesitler lam üzerine alındı. Alınan kesitler immünohistokimyasal analiz için uygun yöntemlerle hazırlandı.

Elektron mikroskopi incelenmesi için hazırlanan bloklardan ultracut s ultramikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Elde edilen yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyandıktan sonra Olympus BX50 ışık mikroskobu (Japonya) altında incelendi ve rastgele seçilen 5 bölge fotoğraflandı. Miyelinli liflerin sayısı, mikroskoba bağlı olan Bioquant Omega II yazılım analiz programı kullanılarak sayıldı (118).

3.6. İmmünohistokimya Yöntemleri

İndüklenmiş nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (Cox-2) moleküllerinin ekspresyonlarının tespit edilmesi amacı ile elde edilen parafin kesitler polilizin kaplı lamlar üzerine alındı. Hazırlanan kesitler işaretleme işlemi öncesinde kurutularak buzdolabında +4 °C'de 15 dakika süreyle bekletildi. Buzdolabından çıkarılan kesitler tekrar kurutuldu ardından 60 °C'de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Deparafinize edildikten sonra oda sıcaklığında ksilol serilerinden geçirildi. Daha sonra derecesi azalan alkol serileri içerisinde hidrasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından kesitler distile su içerisine alındı. Daha sonra örnekler sitrat solüsyonu içerisine alınarak 95 °C'lik su banyosunda, 30 dakika süreyle bekletilerek antijenlerin açığa çıkarılması sağlandı. Soğutma işlemi için 45 dk oda ısısında bekletilen kesitler distile su içerisinde bekletildi ve ardından %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂)

içerisine alındı. 10 dk H₂O₂ içinde bekletilen kesitler saf su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Ardından kesitlerin etrafı silindi ve kurulandı. Kesitlerin üzerine nonspesifik bağlanmayı önlemesi için blocking serum damlatıldı ve 15 dakika oda ısısında nemli ortamda bekletildi. Daha sonra kesitler saf su ve fosfat tamponuyla yıkandı. Sonraki işlem olarak örnekler üzerindeki solüsyonlar temizlendi ve kesitlerin etrafı kurulandı. Daha sonra 1/200 oranında dilüe edilen, anti-COX-2 (COX-2; mouse monoclonal antibody, STJ97061, St John's Laboratory, United Kingdom), 1/100 oranında sulandırılan anti-İNOS (İNOS; rabbit polyclonal antibody, STJ110939, St John's Laboratory, United Kingdom) primer antikoları kesitler üzerine damlatıldı. Tüm örnekler +4 °C'de nemli ortamda bir gece bekletildi. Negatif kontrol olarak kullanılan kesitlere yalnızca tampon solüsyonu damlatıldı. Bir gece bekletildikten sonra kesitler distile su ve fosfat tampon solüsyonundan geçirildi. Ardından üzerlerine biotin (ab93705, Abcam, USA.) damlatılıp 15 dakika süre ile oda ısısında bekletildi. Daha sonra distile su ve fosfat tampon solüsyonundan tekrar geçirildi. Örneklerin çevresi kurulanıp temizlendi ve üzerlerine avidin (ab93705, Abcam, USA.) damlatılıp 20 dakika süreyle oda sıcaklığında tutuldu. Ardından tekrar distile su ve fosfat tampon solüsyonundan geçirildi. Bir sonraki adımda kesitler üzerine, aminoetilkarbozol (AEC) solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildi. Ardından çeşme suyu altında yıkandı. Daha sonra kontrast boyama için hematoksilen ile boyandı. Boyama işleminden sonra çeşme suyu altında tekrardan yıkanan örnekler kurumaya bırakıldı. Kesitlerin kurumasından sonra su bazlı kapama maddesi kullanılarak lamel ile kapatıldı. Hazırlanan kesitler Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japan) ile incelenerek, fotoğrafları çekildi.

3.6.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi

iNOS ve COX-2 ekspresyon derecelerini belirlemek üzere immünohistokimyasal skorlama metodu kullanıldı. Her gruptan alınan kesitler immünohistokimyasal olarak boyandı. Ardından immün boyamanın yoğunluğu minimal ekspresyon (+), hafif ekspresyon (++), orta ekspresyon (+++), şiddetli ekspresyon (+++) olmak üzere değişen bir ölçek kullanılarak puanlandı (118).

3.7. Elektron Mikroskopi Yöntemleri

Elektron mikroskopik inceleme için elde edilen periferik sinir doku örnekleri, fosfat tamponu içerisinde hazırlanan %5'lik gluteraldehit solüsyonu içerisinde 1 saat bekletildi. Daha sonra birkaç damla gluteraldehit damlatılan dişçi mumuyla kaplı petri kabı üzerinde jilet yardımıyla 1 mm³'lük parçalara ayrıldı. Parçalama işleminden sonra 3 saat daha gluteraldehit solüsyonu içerisinde tespiti gerçekleştirildi. Toplamda 4 saat gluteraldehit solüsyonunda tespit edilen dokular fosfat tamponunda iki defa olmak üzere 10'ar dakika bekletildi. Daha sonra fosfat tamponu ile hazırlanmış olan %1'lik osmium tetraoksit (OsO₄) solüsyonu içerisinde ikinci bir tespit işlemi gerçekleştirildi. Toplamda iki saat osmium tetraoksitle tespit işleminden sonra fosfat tamponunda iki defa 10'ar dakika bekletildi. Daha sonra dokular 15'er dakika +4°C'de sırasıyla %50'lik, %70'lik, %86'lık, %96'lık, %100'lük ve tekrar %100'lük olmak üzere artan derecede etil alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler +4°C'de gerçekleştirilen bu işlemlerden sonra %100'lük etil alkol içerisinde 15 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Daha sonra propilen oksit içerisinde 2 kere 15'er dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Dehidratasyon ve şeffaflandırma işlemleri tamamlanan doku parçaları 1 hacim propilen oksit ve 1 hacim rezinden oluşturulan karışım içerisinde 2 defa olmak üzere 30'ar dakika süre ile bekletildi. Daha sonra örnekler taze hazırlanmış rezin içerisinde 1 gece boyunca rotatorda bekletilerek karıştırıldı. Bu işlem ile rezinin doku örnekleri içerisine tamamen nüfuz etmesi sağlandı. Taze rezin hazırlanmasında; 20 ml Araldit (CY 212), 20 ml sertleştirici (HY 964), 0,6 ml hızlandırıcı (DY 064) ve 1 ml plastikleştirici (dibütil fitalat) kullanıldı. Bir gece rotatorda bekleyen örnekler gömme materyali olan taze hazırlanmış rezin kullanılarak beem kapsüller içerisine gömüldü. Gömme işlemi gerçekleştirildikten sonra dokular 60 °C etüv içerisinde 48 saat polimerize edildi. Bu süre sonunda etüvden çıkarılan bloklar soğuması için bekletildi. Hazırlanan bloklardan ultracut s ultramikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Daha sonra toluidin mavisi ile boyanan örneklerden ve doku bloklarından uygun alan seçimleri yapıldı. Tespit edilen alanlardan ultramikrotom ile 50 nm kalınlığında ince kesitler elde edildi. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japan) ile incelenip mikrograflar elde edildi.

3.8. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Moleküler biyolojik değerlendirmeler için gruplardan elde edilen periferik sinir dokuları kriyo tüpler içerisinde sıvı azota alındı ve -80 °C’de RNA izolasyonu yapılana kadar bekletildi. Periferik sinir doku parçalarına Buffer RLT (74104 Qiagen, Almanya) eklenerek homojenizatörde parçalandı. Elde edilen lizat 3 dakika 12000 x g’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak üzerine aynı hacimde %70’lik etanol eklendi. Elde edilen örnekten 700 µl RNeasy Mini Spin kolonlara eklendi, 8000 x g’de 15 saniye santrifüj edildi. Ardından örnekler önce 700 µl RW1 (74104 Qiagen, Almanya) solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra 500 µl RPE (74104 Qiagen, Almanya) solüsyonu ile 2 defa yıkandı. Son olarak RNeasy Mini Spin kolonlara 30 µl RNase içermeyen su eklenerek 8000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen RNA’ların konsantrasyonları ve saflık derecesi (A280/ A260 oranı) spektrofotometre ile ölçüldü. RNA konsantrasyonları RNase içermeyen su ile aynı düzeye getirildi. Elde edilen total RNA QuantiTect Reverse Transcription Kit (205310, Qiagen, Almanya) kullanılarak cDNA (complenmentary DNA)’ya çevrildi. Reverse transkripsiyon miksi hazırlandıktan sonra 15 dakika 42 °C’de ardından 3 dakika 95 °C’de inkübe edildi. Elde edilen cDNA’lar qRT-PCR yapılana kadar -20 °C’de saklandı.

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

Gen ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile Applied Biosystems 7300 (ThermoFisher, Amerika) cihazı kullanılarak kuantifiye edildi. Krox-20 ve p75NTR gen ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Gen ekspresyonunun normalizasyonu için GAPDH ev (house keeping) geni kullanıldı.

3.10. İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA) programı kullanıldı. Elde edilen verilerin normal dağılıma sahip olup olmadıkları “D’Agostino & Pearson omnibus normality test” ile değerlendirildi. Alınan sonuca göre gen ekspresyon analizinde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanılarak tek yönlü varyant analizinin (One-way analysis of variance, 31 ANOVA) Dunnett’s çoklu karşılaştırma testi (Dunnett’s Multiple Comparison Test)

yapıldı. Gen ekspresyon miktarlarının analizi fold regulation ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemine göre hesaplandı. Böylelikle ilgili genlerin ekspresyon miktarlarının kaç kat arttığı/azaldığı belirlendi. Gen ekspresyonunda istatistiki değerlendirme deney, tedavi ve kontrol gruplarının $2^{-\Delta C_t}$ değerlerinin Student t-test ile kıyaslanması ile yapıldı. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

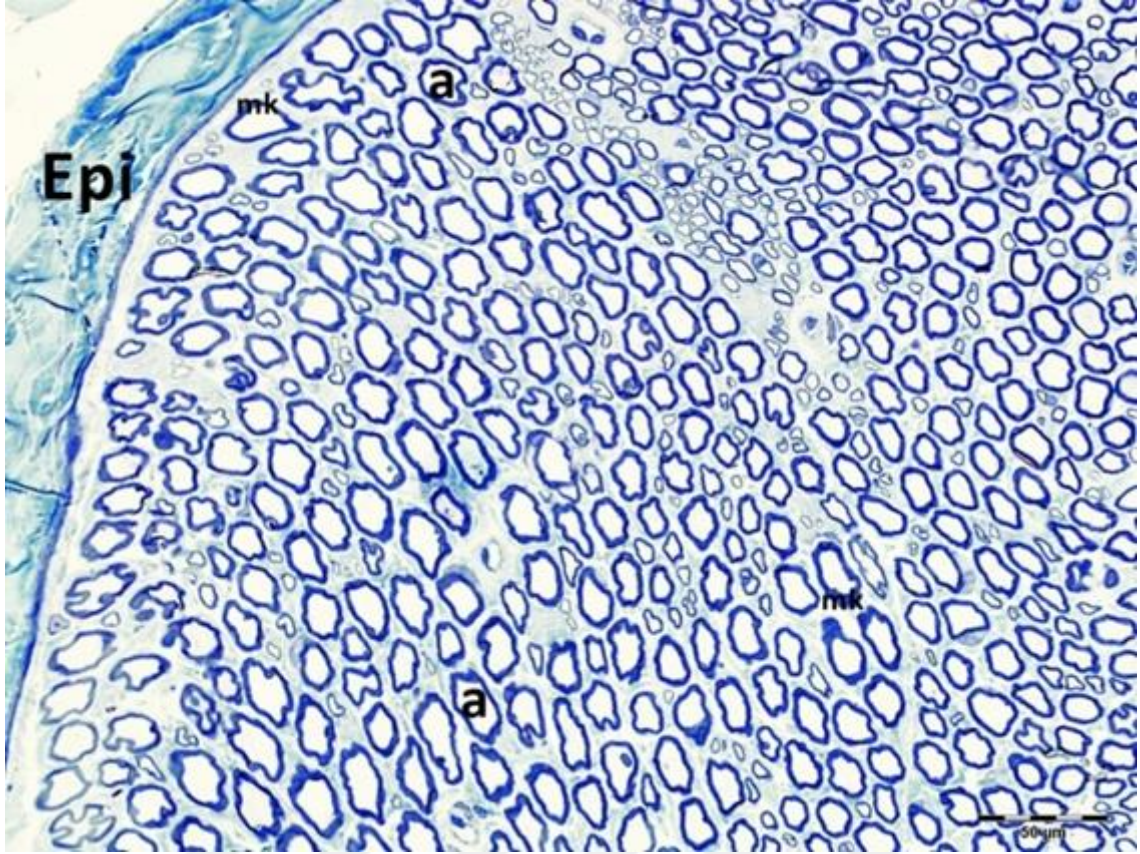


4. BULGULAR

4.1. Işıık Mikroskobik Bulgular

4.1.1. Kontrol Grubu

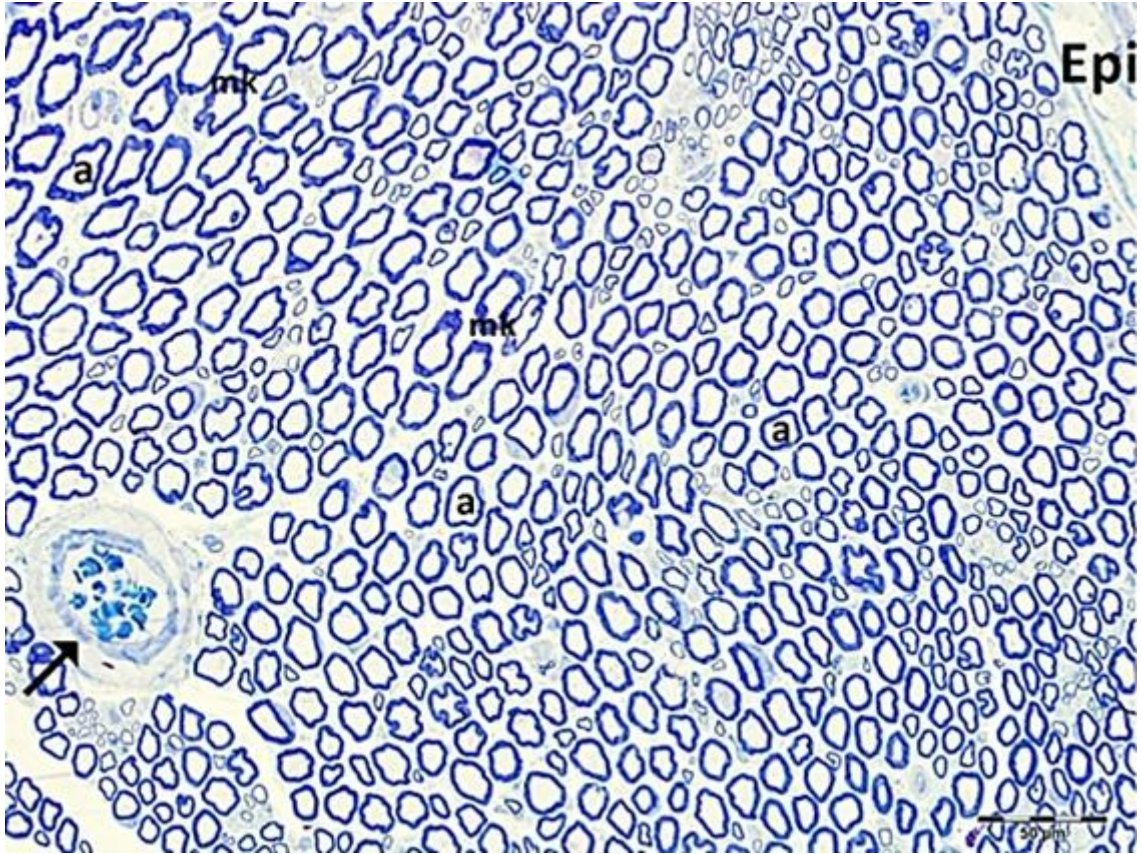
Siyatik sinir hasarı oluşturulmayan ve herhangi bir işlem yapılmadan tamamen sağlam bırakılan kontrol grubuna ait hayvanların sinir doku örneklerinin toluidin mavisi boyaması sonrasında ışık mikroskobik olarak incelenmesinde, siyatik sinirin dıştan bağ dokusu yapısındaki ve kan damarlarından zengin epinöryum ile sarılı olduğu görüldü. Sinir fasikülleri etrafında ise daha ince bir bağ dokusu yapısında olan perinöryum izlendi. Perinöryumdan sinir liflerinin etrafına uzanan daha ince bağ dokusu yapısındaki endonöryumun sinir liflerinin her birini çevrelediği gözlemlendi. Endonöryumun altında Schwann hücrelerinden oluşan nörelemma kılıfının varlığı tespit edildi. Schwann hücrelerinin çekirdekleri oval ya da yuvarlak şekilleri ile ayırt edildi. Aksonların Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülü olduğu ve soluk renkli boyandığı görüldü. Miyelinli sinir liflerinin normal histolojik yapıda olduğu izlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrol grubundan alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Siyatik siniri saran bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) normal histolojik yapıda izlenmektedir. Aksonların (a) etrafında bulunan miyelin kılıfın (mk) mavi renge boyandığı ve normal histolojik yapıda olduğu görülmektedir. Bar = 50μm.

4.1.2. Sham Operasyon Grubu

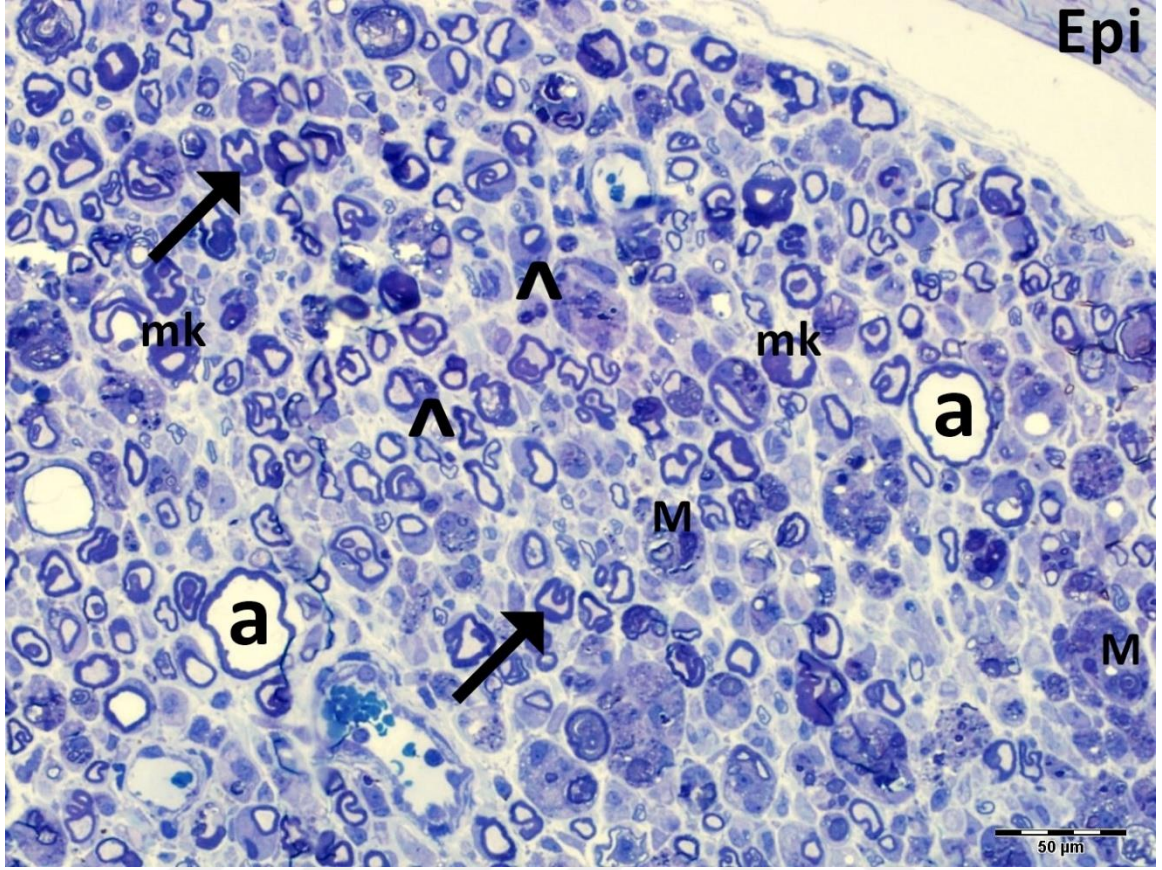
Siyatik sinire herhangi bir hasar verilmeden, yalnızca cerrahi müdahale ile sinirin açığa çıkarıldığı ve daha sonra tekrardan kas ve deri yapılarının dikilerek kapatıldığı sham operasyon grubuna ait sıçanlardan elde edilen sinir doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde siyatik sinir yapısının kontrol grubuna benzerlik gösterdiği tespit edildi. Siyatik sinirin dıştan bağ dokusu yapısındaki epinöryum ile sarılı olduğu görüldü. Sinir fasiküllerinin perinöryumla çevrili olduğu ve perinöryumda kan damarları izlendi. Miyelinli sinir liflerinin ve bu lifleri saran Schwann hücrelerinin normal histolojik yapıda olduğu izlendi (Şekil 2).



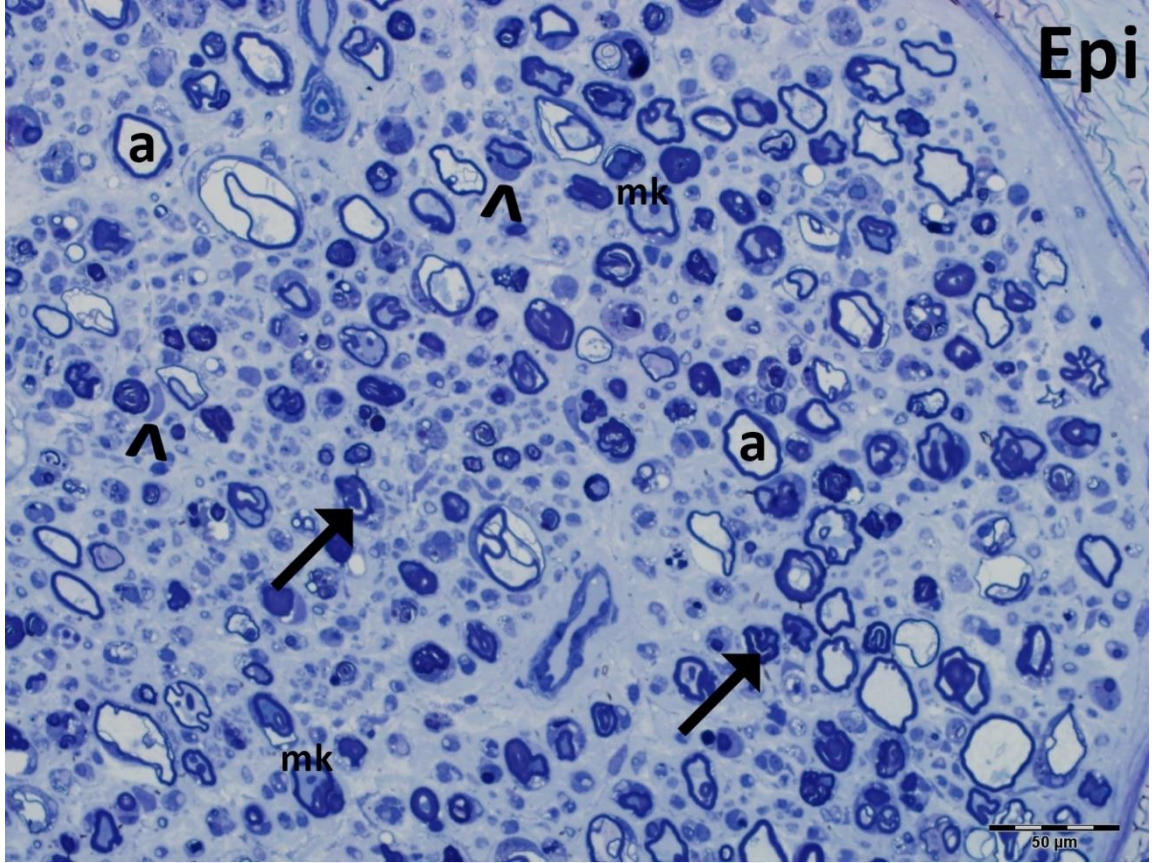
Şekil 2. Sham operasyon grubundan alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Siyatik siniri saran bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) normal histolojik yapıda izlenmektedir. Aksonların (a) etrafında bulunan miyelin kılıfın (mk) mavi renge boyandığı ve normal histolojik yapıda olduğu görülmektedir. Bazı alanlarda kan damarları (ok) görülmektedir. Bar = 50µm.

4.1.3. Deney Kontrol Grubu

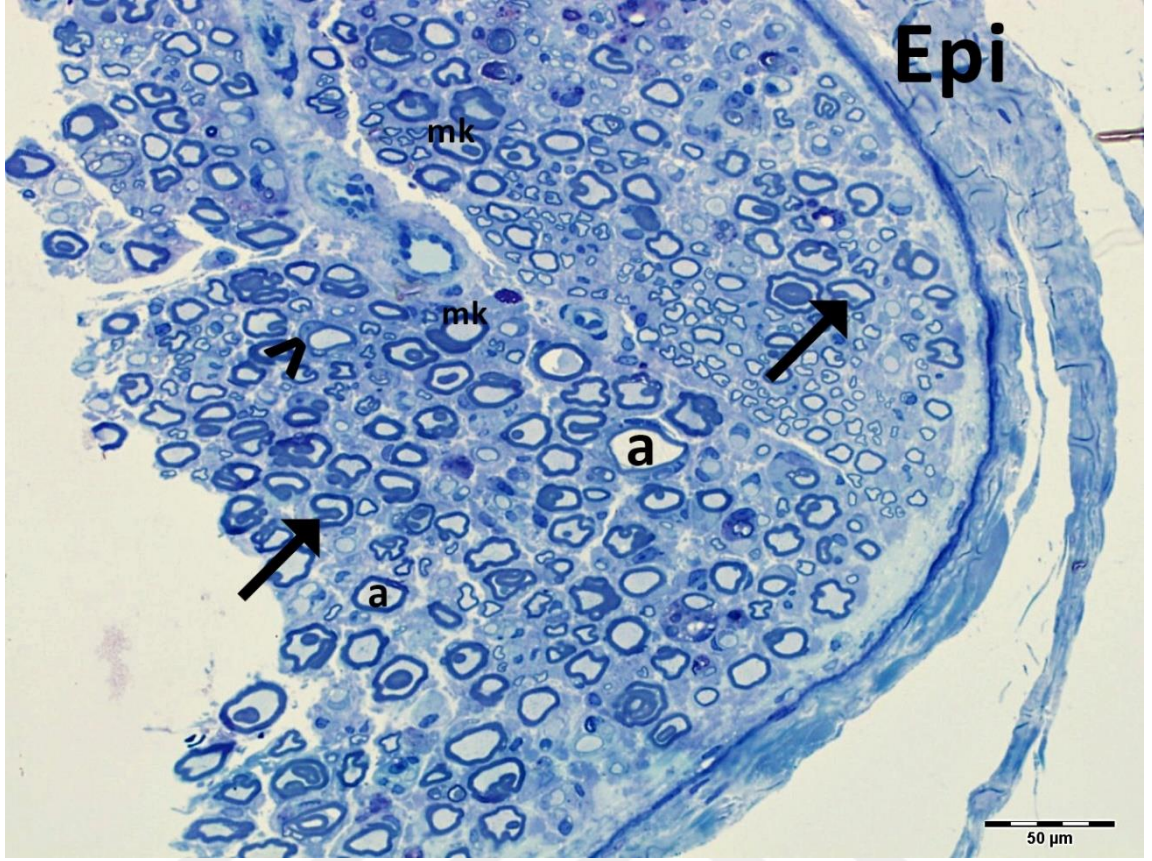
Siyatik sinirde hasar oluşturulan ve sadece serum fizyolojik verilen sıçanlardan, hasardan sonra 7., 14. ve 21. günlerde elde edilen dokuların toluidin mavisi ile boyanan kesitlerinin ışık mikroskopik değerlendirmesinde, sinirin dıştan fibröz bağ dokusu epinöryumla çevrili olduğu ve epinöryumda kan damarlarının bulunduğu görüldü. Bu gruba ait sıçanlardan 7. günde alınan sinir doku kesitlerine bakıldığında miyelinli sinir liflerinin çoğu alanda dejeneratif değişiklikler gösterdiği, lamellar yapılarında bozulmalar olduğu görüldü (şekil 3). 14 ve 21 günlük deney gruplarına bakıldığında ise bu dejeneratif değişikliklerin 7 günlük gruba oranla azalmış olduğu dikkati çekti. Bunun yanısıra 14 ve 21 günlük gruplarda da bazı alanlarda miyelin kılıfın lamellar yapısında bozulmalar olduğu, akson ve miyelin kılıf arasında boşluklar oluştuğu görüldü (şekil 4, 5). Bazı alanlarda dejenere miyelin kılıf artıklarını fagosit etmiş halde makrofajlara rastlandı. Miyelinli aksonların Schwann hücreleri tarafından sarılmış oldukları izlendi. Dejeneratif değişikliklerin, özellikle sinir hasarını takiben 7. günde alınan sinir doku örneklerinde daha belirgin olduğu dikkati çekti (şekil 3). Aynı grup içerisinde bulunan miyelinli sinir lifi sayıları karşılaştırıldığında, 21. gündeki miyelinli sinir lifi sayısının 7. ve 14. güne kıyasla arttığı belirlendi.



Şekil 3. Deney kontrol grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Siyatik siniri dıştan çevreleyen bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) izlenmektedir. Bazı alanlarda aksonda (a) ve bunları çevreleyen miyelin kılıf (mk) yapısında dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Miyelin kılıf etrafında oval çekirdekli Schwann hücreleri (ok başları) izlenmektedir. Dejenere miyelin kılıfları fagosit etmiş halde makrofajlar (M) görülmektedir. Bar = 50µm.



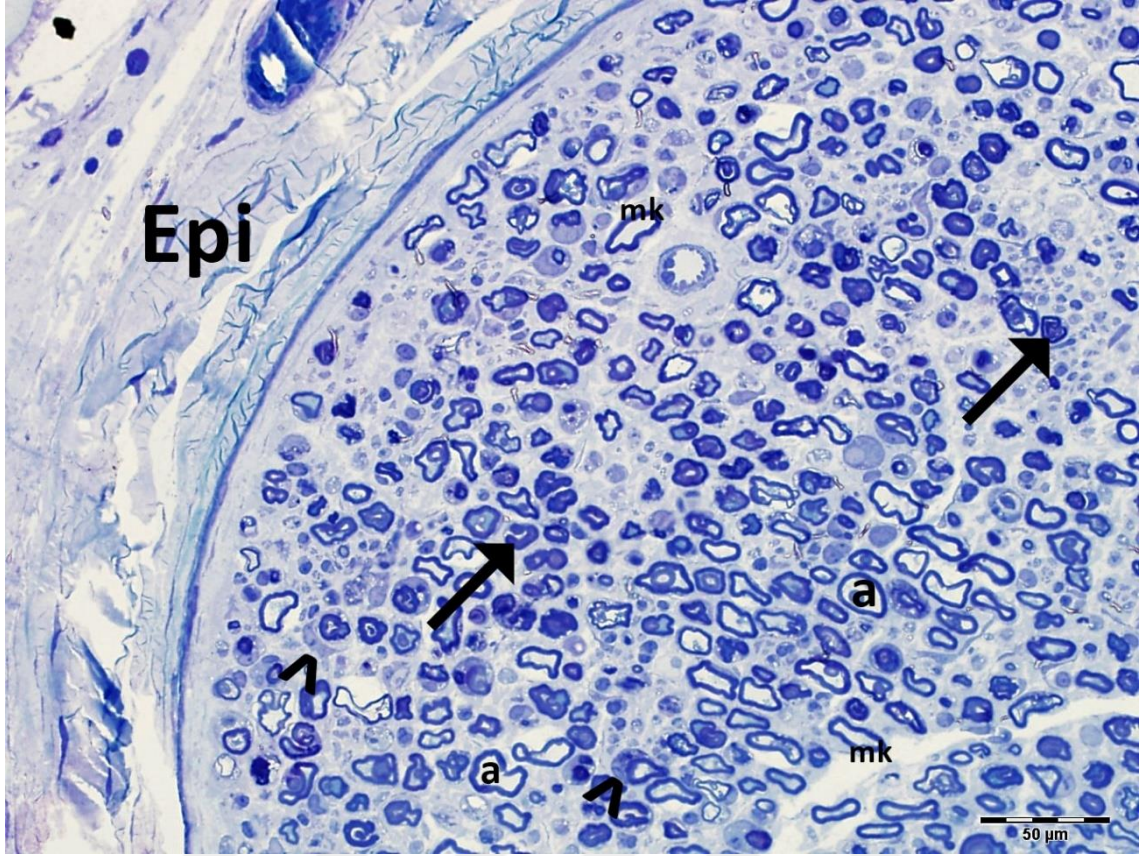
Şekil 4. Deney kontrol grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Siyatik siniri dıştan çevreleyen bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) izlenmektedir. Aynı grubun 7. gününe benzer şekilde miyelin kılıfa (mk) sahip akson (a) sayılarının azaldığı ve dejeneratif değişikliklere (oklar) sahip olduğu görülmektedir. Miyelin kılıf etrafında oval çekirdekli Schwann hücreleri (ok başları) izlenmektedir. Bar = 50μm.



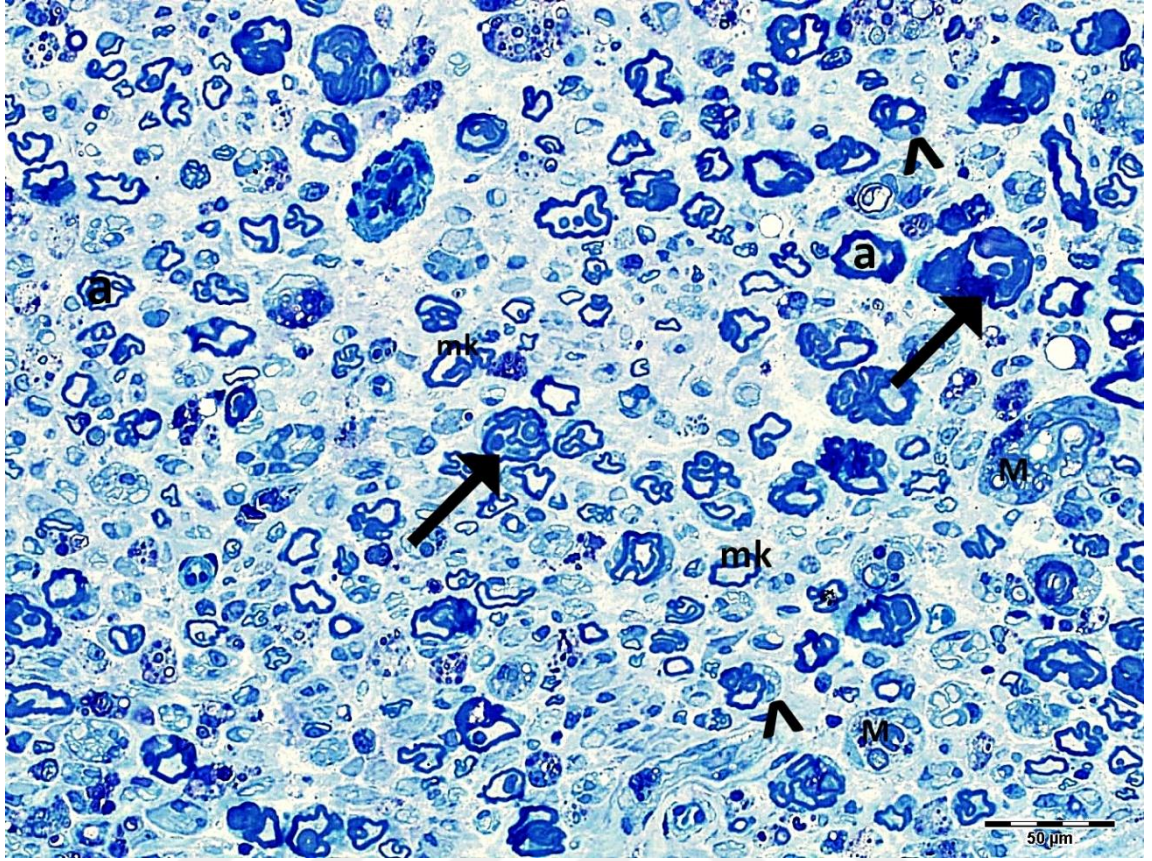
Şekil 5. Deney kontrol grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Siyatik siniri dıştan çevreleyen bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) izlenmektedir. Miyelin kılıfa (mk) sahip akson (a) sayılarının kontrol grubuna kıyasla az olduğu görülmektedir. Bazı alanlarda miyelin kılıfta fokal dejeneratif değişiklikler (oklar) izlenmektedir. Miyelin kılıf etrafında oval çekirdekli Schwann hücreleri (ok başı) izlenmektedir. Bar = 50µm.

4.1.4. Diklofenak Sodyum Tedavi Grubu

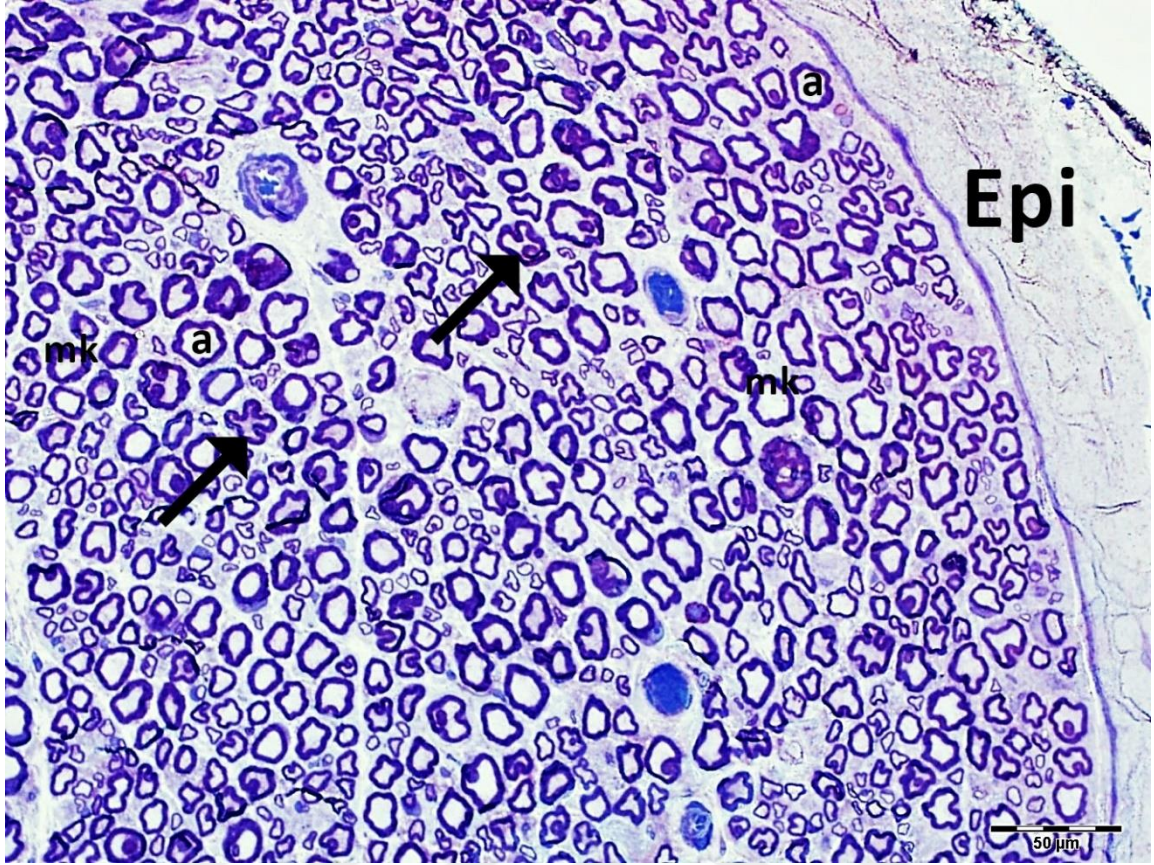
Diklofenak sodyum tedavi grubuna ait deneklerden hasardan sonra 7, 14 ve 21. günlerde alınan siyatik sinir dokularının ışık mikroskopik olarak değerlendirmesinde dıştan epinöryumla sarılı olan sinirin miyelinli liflerden oluştuğu, Schwann hücrelerinin sinir liflerini sarmış olduğu görüldü. Hasar sonrası sadece diklofenak sodyum tedavisi uygulanan bu grupta siyatik sinir dokusunun çoğu alanda deney kontrol grubuna benzer morfolojik özelliklere sahip olduğu belirlendi. Miyelin kılıfı oluşturan Schwann hücreleri, oval çekirdekleri ile ayırt edildi. Özellikle tedavi sonrası 7. günde elde edilen sinir dokularında 14. ve 21. günde elde edilen dokulara kıyasla miyelin kılıfta dejeneratif değişikliklerin daha fazla olduğu ve miyelinin konsantrik lamellar yapısının bozulduğu gözlemlendi. Bazı alanlarda dejenere miyelin kılıf kalıntılarını fagosite etmiş halde makrofajlara rastlandı. Miyelin kılıfın yer yer akson içerisine invajine olduğu görüldü (Şekil 6, 7, 8). Deney kontrol grubu ile kıyaslandığında, diklofenak sodyum tedavisi uygulandıktan sonra 7, 14 ve 21. günlerde elde edilen sinir dokularında miyelinli sinir liflerinin sayısal olarak artmış olduğu görüldü. Aynı grup içerisinde karşılaştırma yapıldığında 21. günde elde edilen siyatik sinir dokularında miyelinli sinir lifi sayısının 7 ve 14 günlük gruplara oranla artmış olduğu tespit edildi .



Şekil 6. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Siyatik siniri dıştan çevreleyen bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) izlenmektedir. Miyelin kılıf etrafında oval çekirdekli Schwann hücreleri (ok başları) izlenmektedir. Bazı alanlarda aksonda (a) ve bunları çevreleyen miyelin kılıf (mk) yapısında dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Bar = 50µm.



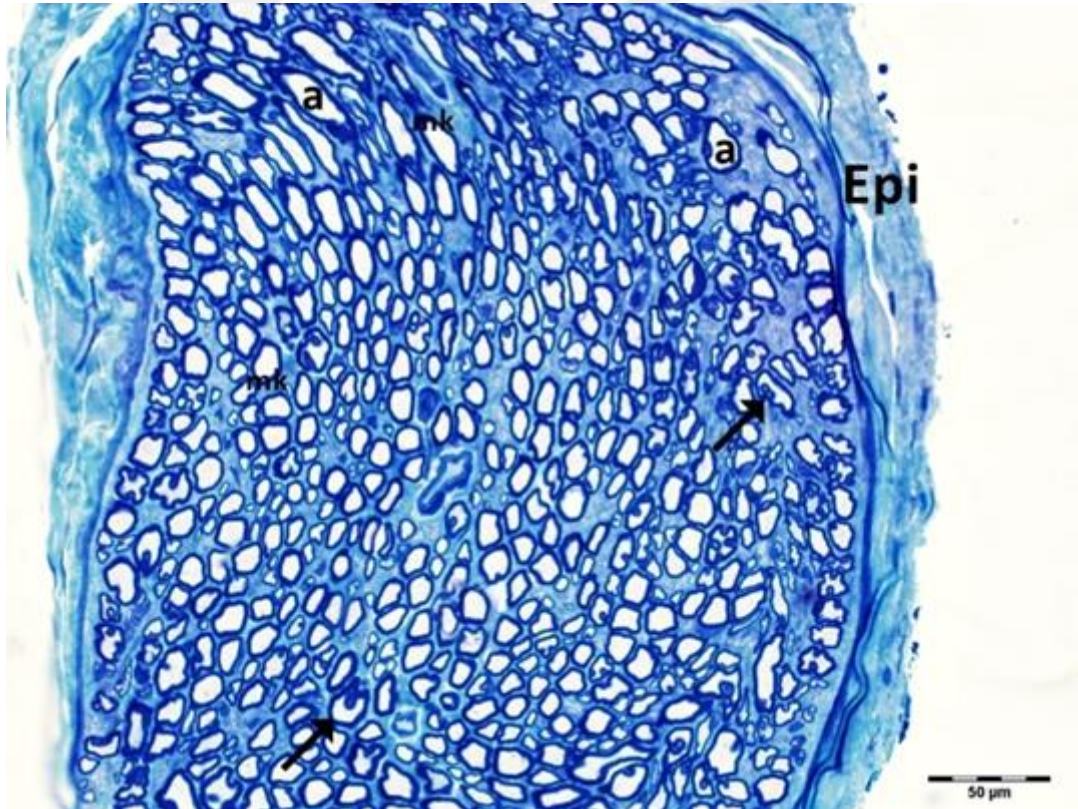
Şekil 7. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Miyelin kılıfa (mk) sahip akson (a) sayılarının azaldığı ve dejeneratif değişikliklere (oklar) sahip olduğu görülmektedir. Miyelin kılıf etrafında oval çekirdekli Schwann hücreleri (ok başları) izlenmektedir. Dejenere miyelin kılıfları fagosit etmiş halde makrofajlar (M) görülmektedir. Bar = 50µm.



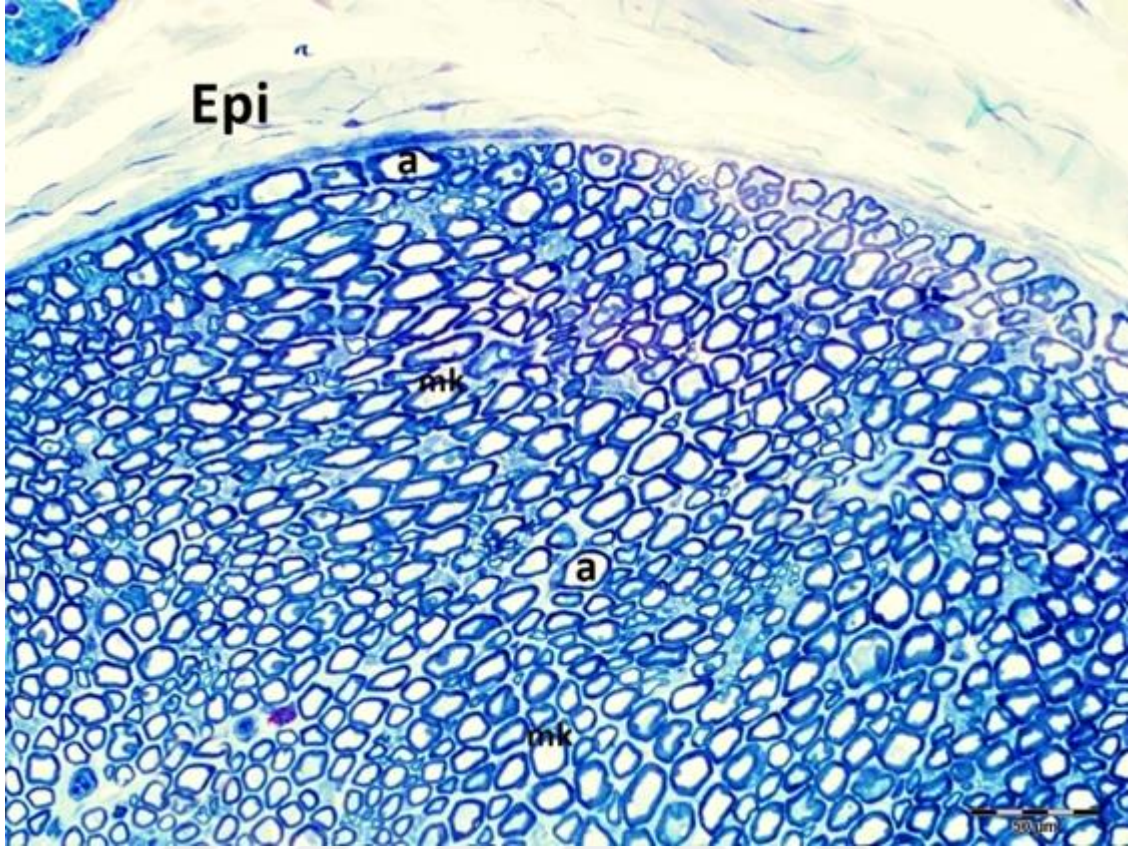
Şekil 8. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Siyatik siniri dıştan çevreleyen bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) izlenmektedir. Miyelin kılıf ve aksonlardaki dejeneratif değişikliklerin azaldığı görülmektedir. Buna karşılık bazı alanlarda aksonda (a) ve bunları çevreleyen miyelin kılıf (mk) yapısında dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Bar = 50µm.

4.1.5. Zonisamide Tedavi Grubu

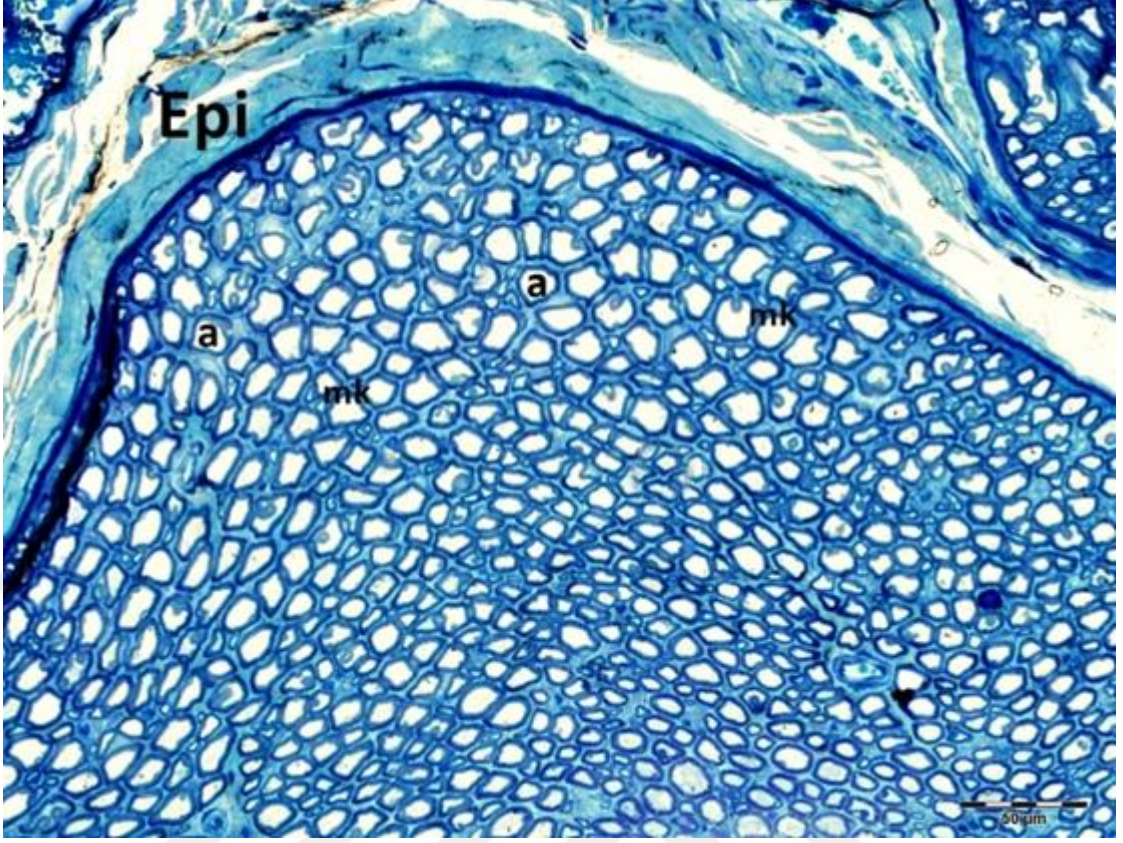
Siyatik sinir hasarından sonra zonisamide tedavisi uygulanan gruptan 7, 14 ve 21. günlerde alınan sinir dokularının ışık mikroskopik değerlendirmesinde sinirin dıştan kalın bir epinöryumla çevrili olduğu, sinir fasiküllerinin etrafında perinöral bağ dokusunun ve bu dokuda kan damarlarının varlığı izlendi. Fasikülleri oluşturan miyelinli sinir liflerinin çoğu alanda sağlam kontrol ve sham gruplarına benzer olarak normal histolojik yapılarını korumuş oldukları izlendi. Miyelin kılıfı oluşturan Schwann hücreleri oval çekirdekleri ile normal yapıda ayırt edildi. Bununla birlikte bazı alanlarda miyelin kılıfta fokal dejeneratif değişikliklerin bulunduğu ve lamellar yapıda hafif değişikliklerin olduğu gözlemlendi (Şekil 9, 10, 11). Zonisamide tedavi grubundan 7., 14. ve 21. günlerde elde edilen siyatik sinir dokularında, deney kontrol grubu ve diklofenak sodyum tedavi grubu ile kıyaslandığında miyelin kılıfa sahip akson sayılarının artmış olduğu belirlendi .



Şekil 9. Zonisamide tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Siyatik siniri dıştan çevreleyen bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) izlenmektedir. Bazı alanlarda aksonda (a) ve bunları çevreleyen miyelin kılıf (mk) yapısında dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Bar = 50µm.



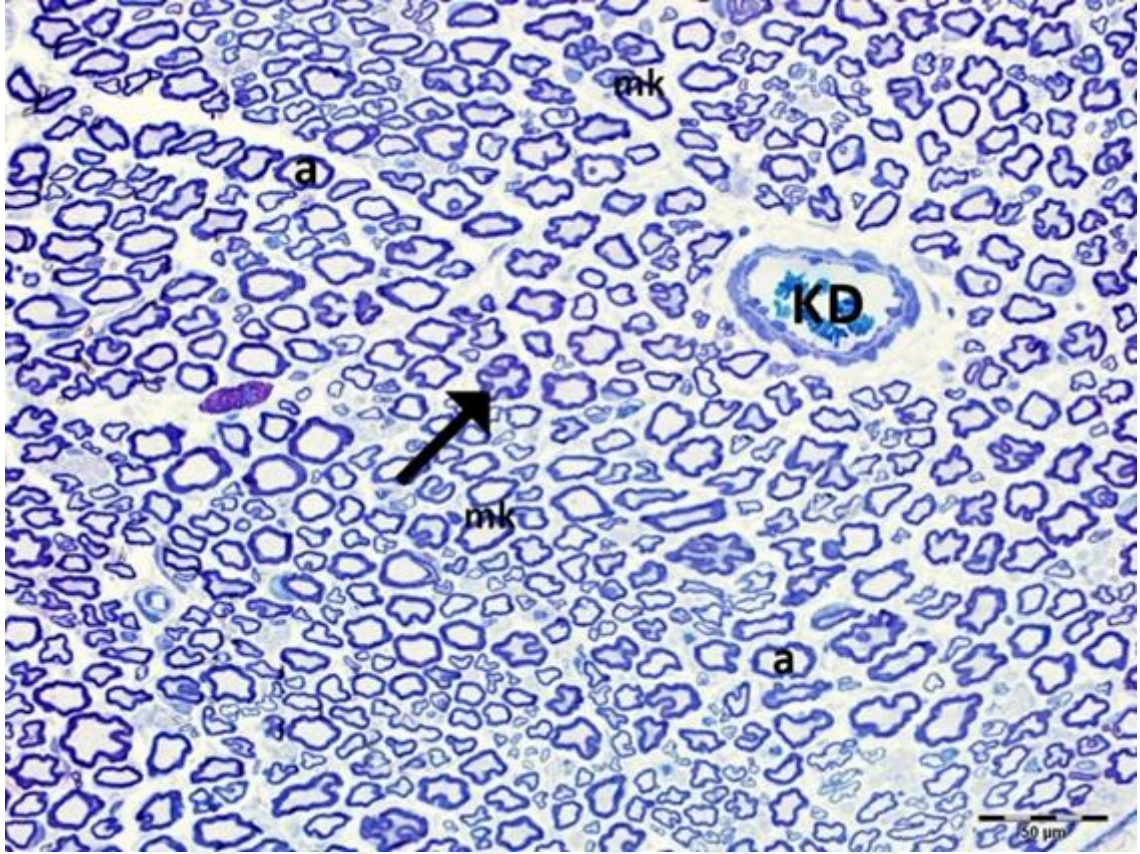
Şekil 10. Zonisamide tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Miyelin kılıfa (mk) sahip aksonlar (a) nispeten normal yapıda izlenmektedir. Siyatik siniri dıştan çevreleyen bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) görülmektedir. Bar = 50µm.



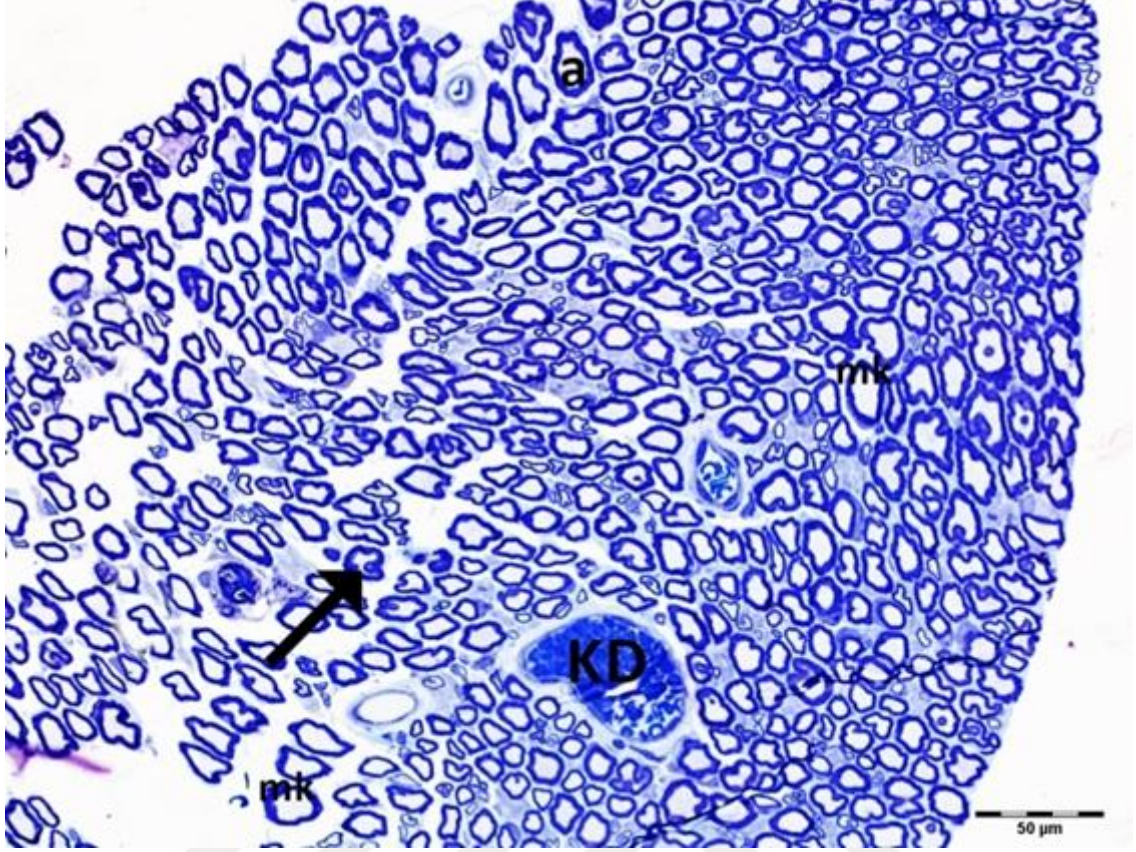
Şekil 11. Zonisamide tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Siyatik siniri dıştan çevreleyen bağ dokusu yapısındaki epinöryum (Epi) izlenmektedir. Miyelin kılıf (mk) ve aksonlardaki (a) dejeneratif değişikliklerin azaldığı görülmektedir. Bar = 50µm.

4.1.6. Zonisamide ve Diklofenak Sodyum Kombine Tedavi Grubu

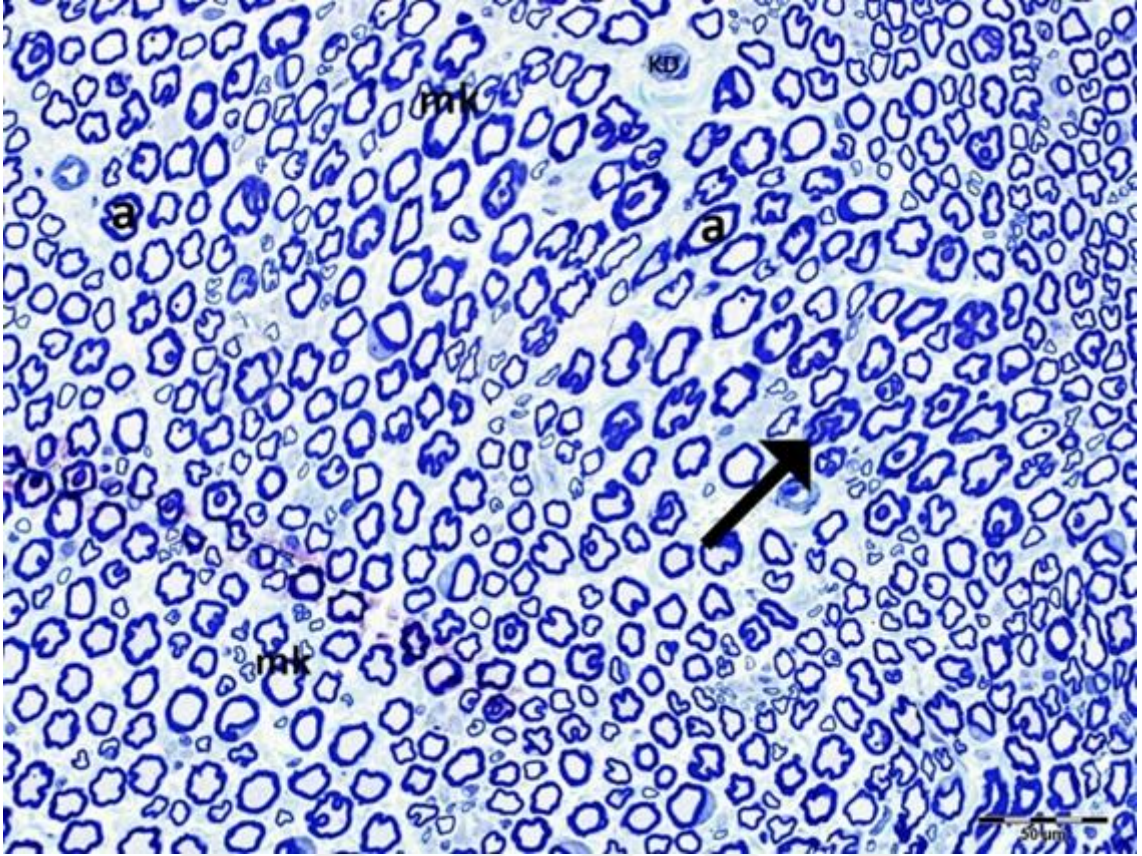
Sinir hasarından sonra zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavisi uygulanan gruptan alınan siyatik sinir dokularının toluidin mavisi ile boyanan kesitlerinin ışık mikroskopik değerlendirmesinde sinirin dıştan epinöryum ile çevrili olduğu izlendi. Epinöryumun altında sinir fasiküllerini çevreleyen ince bağ dokusu perinöryum görüldü. Endonöryum olarak adlandırılan ve tek bir sinir lifini saran ince bağ dokusu içerisinde fibroblastlar ve nörolemmaya ait Schwann hücreleri görülmekteydi. Schwann hücreleri, oval ya da yuvarlak çekirdekleri ile ayırt edildi. Aksonlar, Schwann hücrelerinin sitoplazması içerisinde, soluk renkli olarak izlendi. Miyelinli sinir liflerinde, miyelin kılıfın çoğu alanda konsantrik lamellar yapısını korumuş olduğu görüldü. Bununla birlikte az bir alanda miyelin kılıfta akson içine invajinasyon gibi fokal dejeneratif değişikliklerin bulunduğu kaydedildi. Sinir liflerinin aralarında, sitoplazmasında fagozomlar bulunan makrofajların varlığı gözlemlendi. Bunun dışında, miyelinli sinir liflerinin aralarında, bağ dokusu hücreleri ve kan damarları da ayırt edildi (Şekil 12, 13, 14). Kombine tedavi grubundan 7, 14 ve 21. günlerde elde edilen siyatik sinir dokularında miyelin kılıfa sahip akson sayılarının, deney kontrol grubu ve tek başına diklofenak sodyum tedavisi uygulanan gruba göre artış gösterdiği dikkati çekti .



Şekil 12. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Sinir dokusunun normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Bazı alanlarda aksonda (a) ve bunları çevreleyen miyelin kılıf (mk) yapısında dejeneratif değişiklikler (ok) görülmektedir. Kan damarları (KD) görülmektedir. Bar = 50µm.



Şekil 13. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Miyelin kılıfa (mk) sahip aksonlar (a) görülmektedir. Kan damarları (KD) görülmektedir. Bar = 50µm.

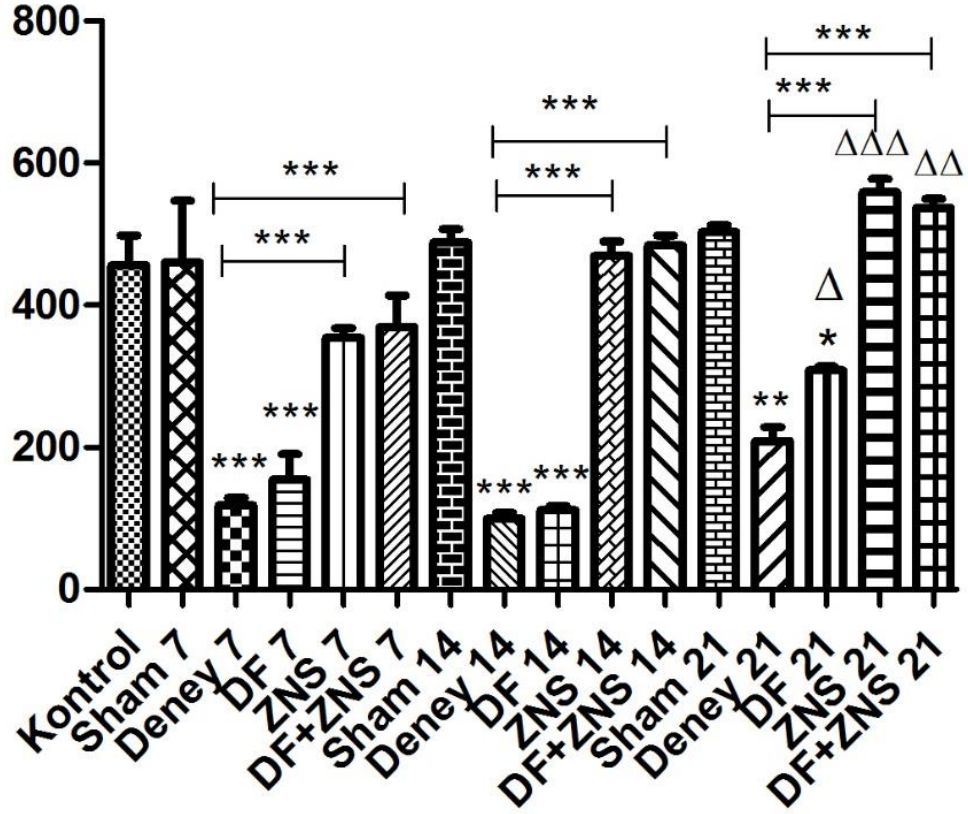


Şekil 14. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Boya: Toluidin mavisi. Miyelin kılıf (mk) ve aksonlardaki (a) dejeneratif değişikliklerin azaldığı buna karşılık bazı alanlarda hafif değişikliklerin bulunduğu (ok) görülmektedir. Bar = 50μm.

4.2. Histomorfometrik Bulgular

Gruplar arasında miyelinli sinir liflerinin sayıları şekil 15’de verilmiştir. Miyelinli sinir lif sayısının, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında, deney kontrol gruplarında ve diklofenak sodyum tedavi gruplarında anlamlı derecede azaldığı bu azalmanın en belirgin 7. ve 14. günlerde olduğu tespit edildi ($***p<0.0001$). Bununla birlikte, miyelinli sinir lif sayısının zonisamide tedavi grupları ile kombine tedavi gruplarında en yüksek olduğu, kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark olmadığı izlendi. Zonisamide tedavi grupları ve kombine tedavi grupları, deney kontrol ve diklofenak sodyum tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında miyelinli sinir lifi sayısının önemli ölçüde arttığı görüldü ($***p<0.0001$). Aynı gruplar içinde günler arası karşılaştırılma yapıldığında ise 21. gün alınan diklofenak sodyum tedavi grubunda bulunan miyelinli sinir lifi sayısının 7. gün alınan diklofenak sodyum tedavi grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($^{\Delta}p<0.01$). Ayrıca, zonisamide tedavi grubu 21. günde sinir lif sayısının 7. güne göre önemli ölçüde arttığı tespit edildi ($^{\Delta\Delta\Delta} p<0,0001$). Zonisamide ile diklofenak sodyum kombine tedavi grubu 21. gün ile 7. gün karşılaştırıldığında, 21. günde miyelinli sinir lif sayısının anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($^{\Delta\Delta} p<0,001$).

Miyelinli sinir lif sayısı

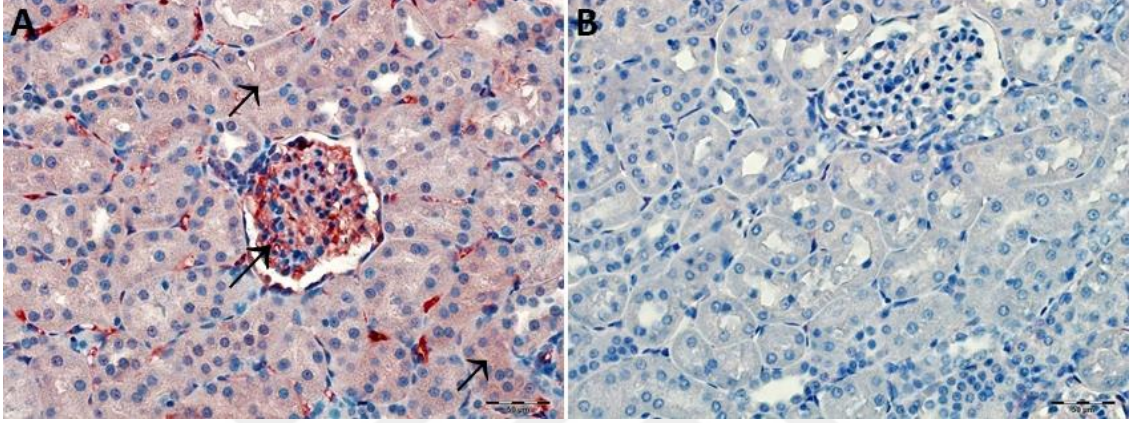


Şekil 15. Tüm gruplarda ortalama miyelinli sinir lifi sayıları (Kontrol ve sham grupları ile karşılaştırma * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$) (Aynı grupların 21. gün ve 7. gün karşılaştırması $\Delta p < 0,01$, $\Delta\Delta p < 0,001$, $\Delta\Delta\Delta p < 0,0001$).

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

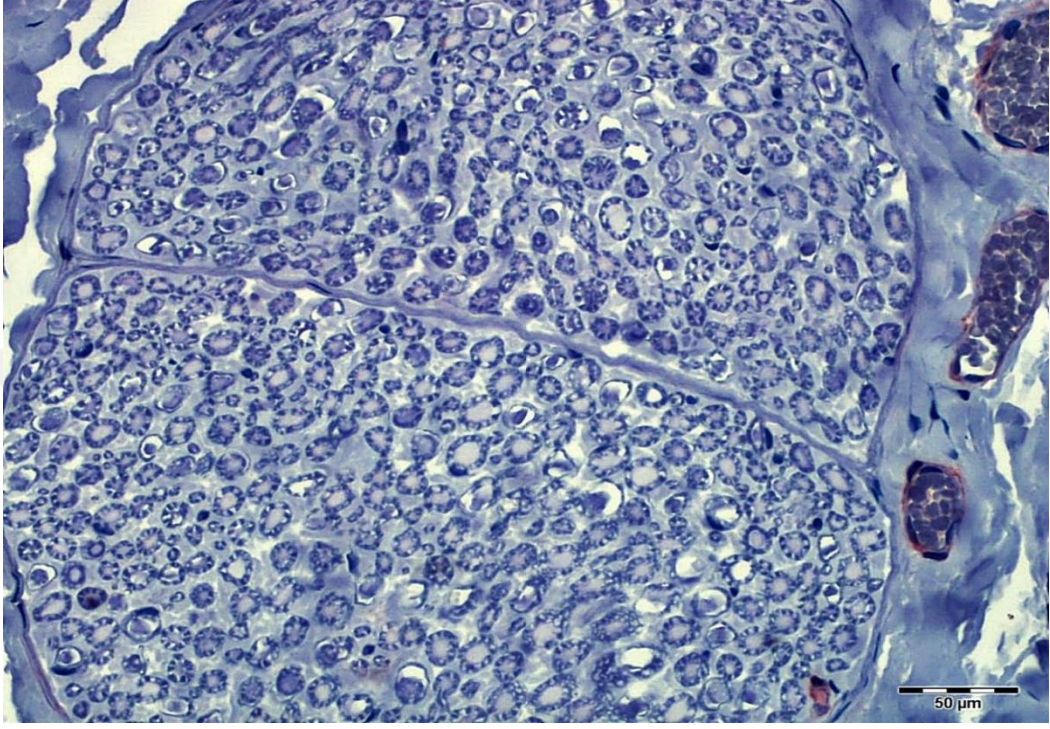
4.3.1. COX-2 İmmünoreaktivitesi

COX-2 aktivitesinin gösterilmesi amacıyla, böbrek dokusundan elde edilen kesitler pozitif kontrol olarak kullanıldı. Primer antikor damlatılmayan böbrek dokusu kesitleri ise negatif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 16).



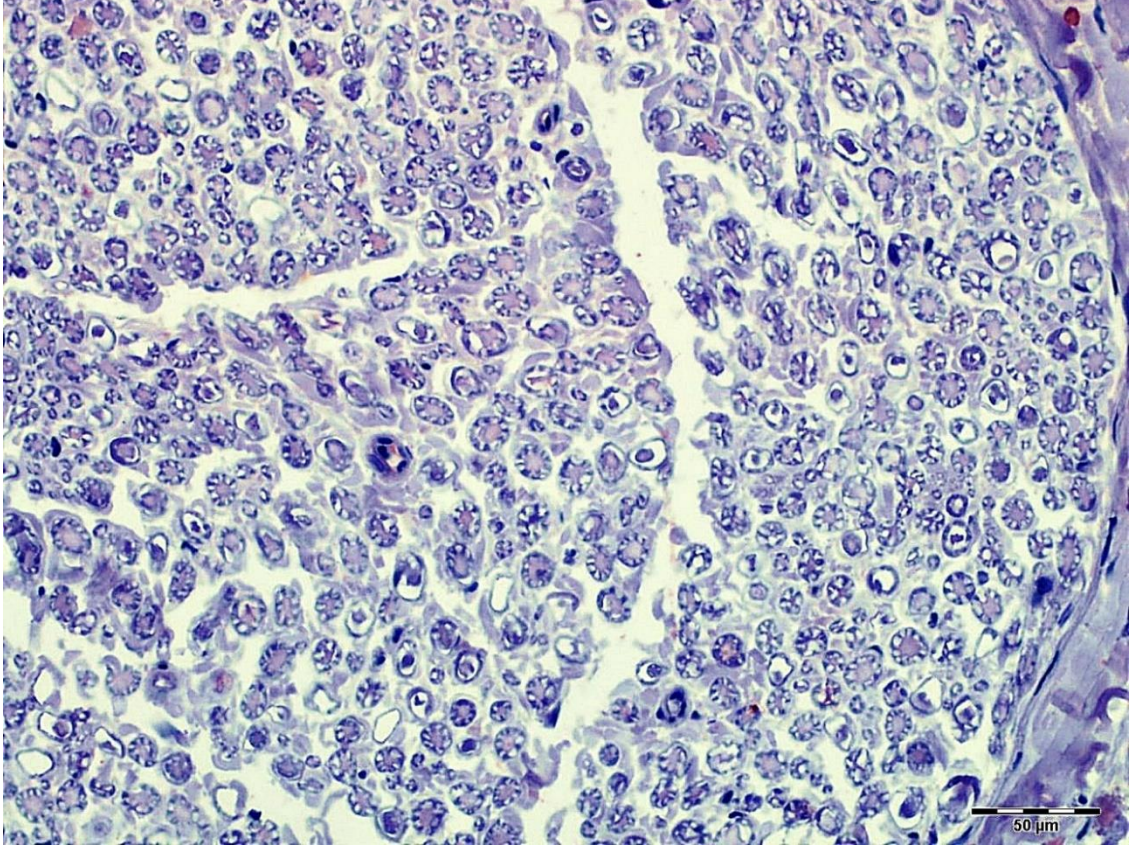
Şekil 16. Pozitif ve negatif kontrolde COX-2 immünoreaktivitesi. A) Pozitif kontrol. Primer antikor damlatılmış böbrek kesitinde glomerüler kapiller endotel hücrelerinde ve tübül hücrelerinde ve tübüllerin aralarındaki bağ dokusunda yer alan kapiller endotelinde COX-2 immünoreaktivitesi izlenmektedir (oklar). Bar 50µm. B) Negatif kontrol. Primer antikor damlatılmamış böbrek kesitinde herhangi bir immünoreaktivite görülmemektedir. Bar = 50µm.

Herhangi bir cerrahi işlem uygulanmayan tamamen sağlam deneklerden elde edilen, kontrol grubuna ait siyatik sinir doku kesitlerinde, minimal düzeyde COX-2 immünoreaktivitesi izlendi (Şekil 17).



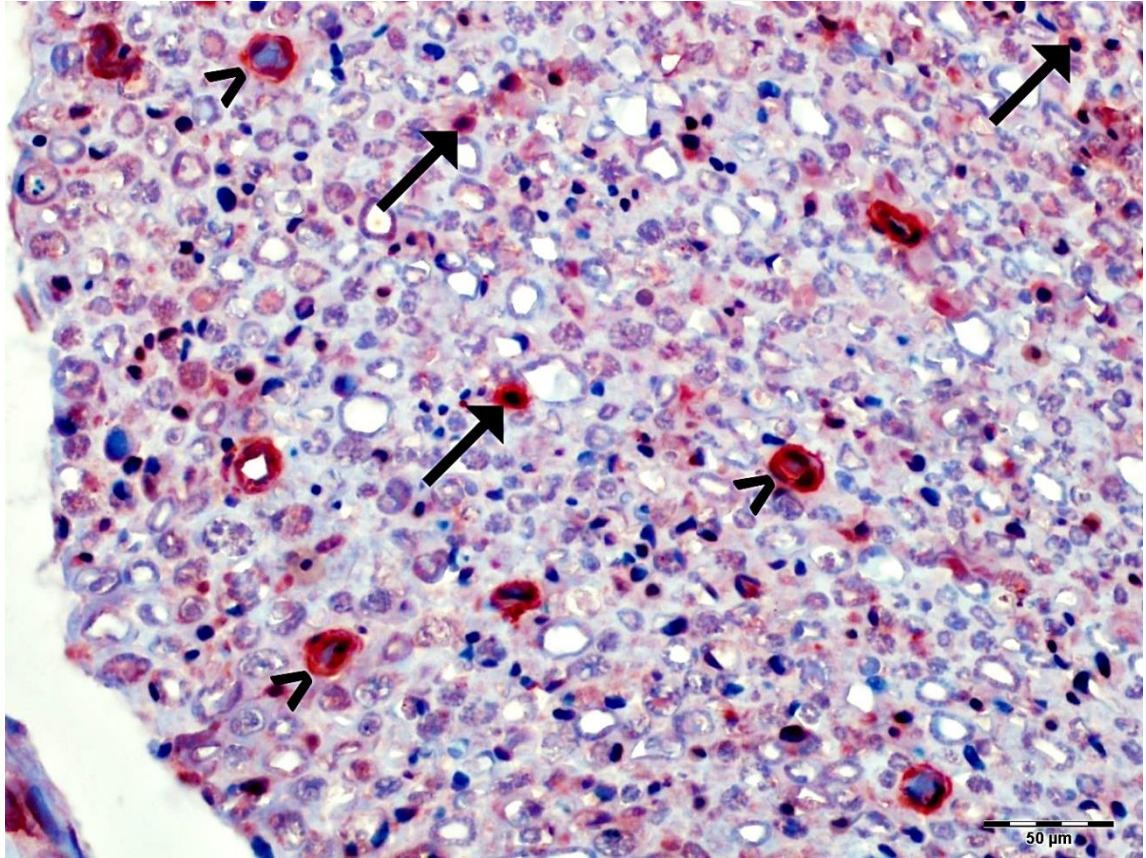
Şekil 17. Kontrol grubunda COX-2 immünoreaktivitesi. Kapiller endotel hücrelerinde minimal düzeyde COX-2 immünoreaktivitesi izlenmektedir. Bar= 50 µm.

Siyatik sinire herhangi bir hasar verilmeden, yalnızca siyatik sinirin açığa çıkartılıp tekrardan kapatıldığı sham operasyon grubuna ait doku kesitlerinde, kontrol grubuna benzer şekilde minimal seviyede COX-2 immünoaktivitesi gözlemlendi (Şekil 18).

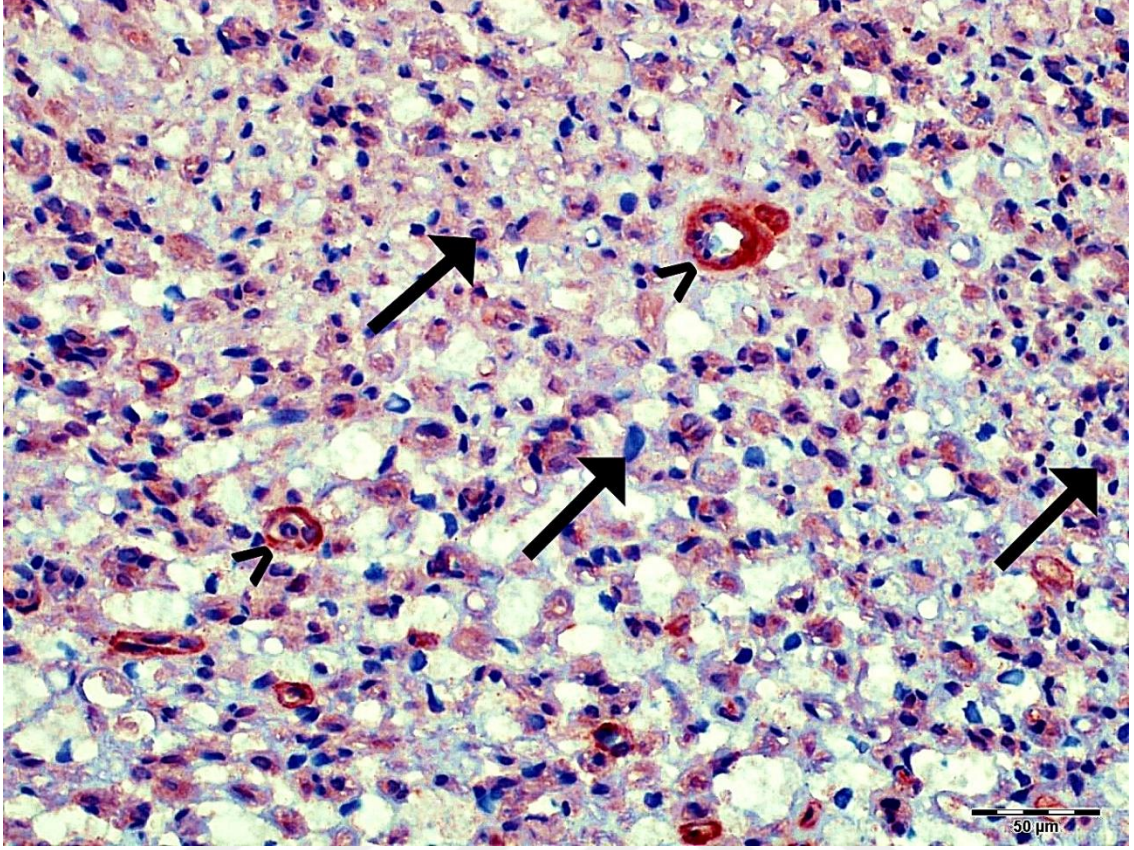


Şekil 18. Sham operasyon grubunda COX-2 immünoaktivitesi. Schwann hücreleri ve kapiller endotel hücrelerinde minimal seviyede COX-2 immünoaktivitesi izlenmektedir. Bar = 50µm.

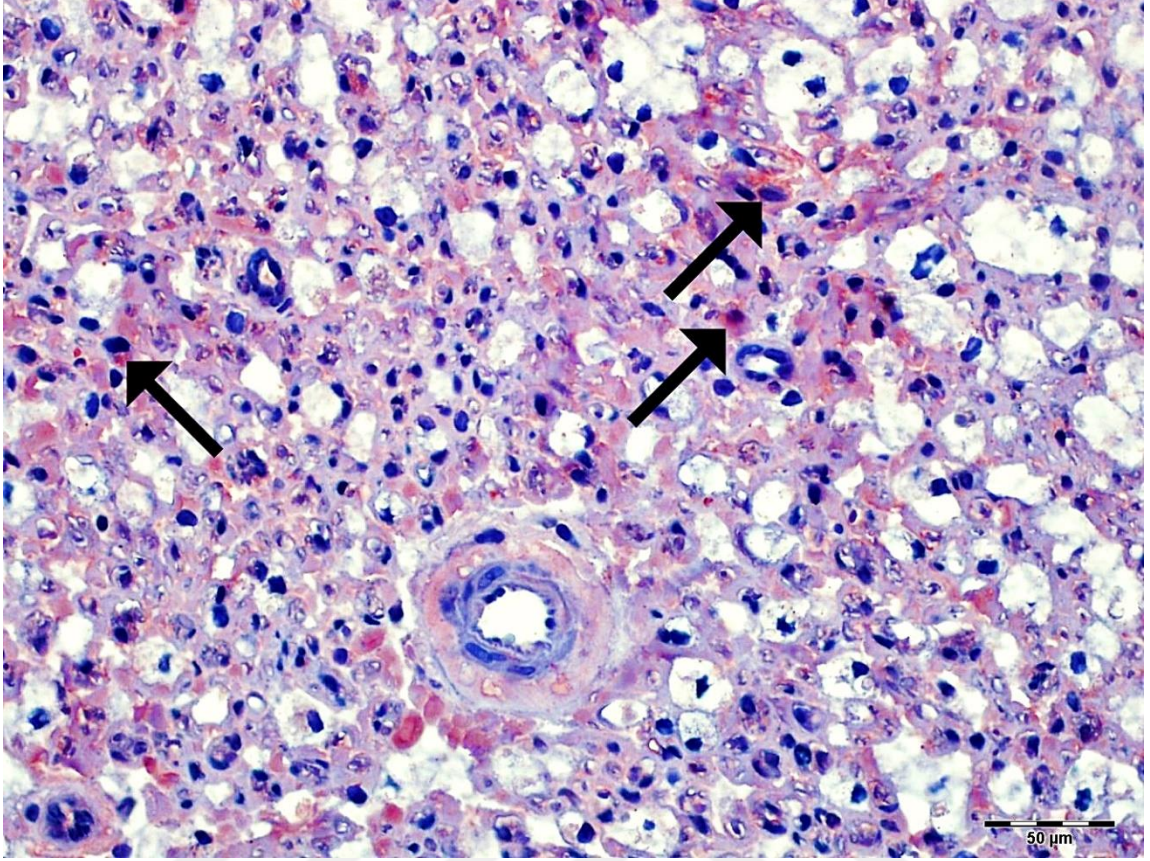
Deney kontrol grubuna ait deneklerden 7. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde, dejenerasyonun yoğun olarak izlendiği alanlarda kapiller endotel hücreleri, enflamatuvar hücreler ve Schwann hücrelerinde, COX-2 immünoreaktivitesinde belirgin bir artış olduğu görüldü (Şekil 19). Aynı gruptan 14. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde ise kapiller endotel hücreleri, enflamatuvar hücreler ve Schwann hücrelerinde COX-2 ekspresyonunun 7. gün alınan örneklerle kıyasla nispeten azaldığı dikkati çekti (Şekil 20). 21. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde ise kapiller endotel hücreleri, enflamatuvar hücreler ve bazı Schwann hücrelerinde COX-2 ekspresyonu izlenirken, 7 ve 14. günde alınan siyatik sinir kesitlerine göre COX-2 immünoreaktivitesinin azalmış olduğu görüldü (Şekil 21).



Şekil 19. Deney kontrol grubunda 7. günde COX-2 immünoreaktivitesi. COX-2 ekspresyonunun kapiller endotelinde (ok başları), enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında (oklar) belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir. Bar = 50µm.

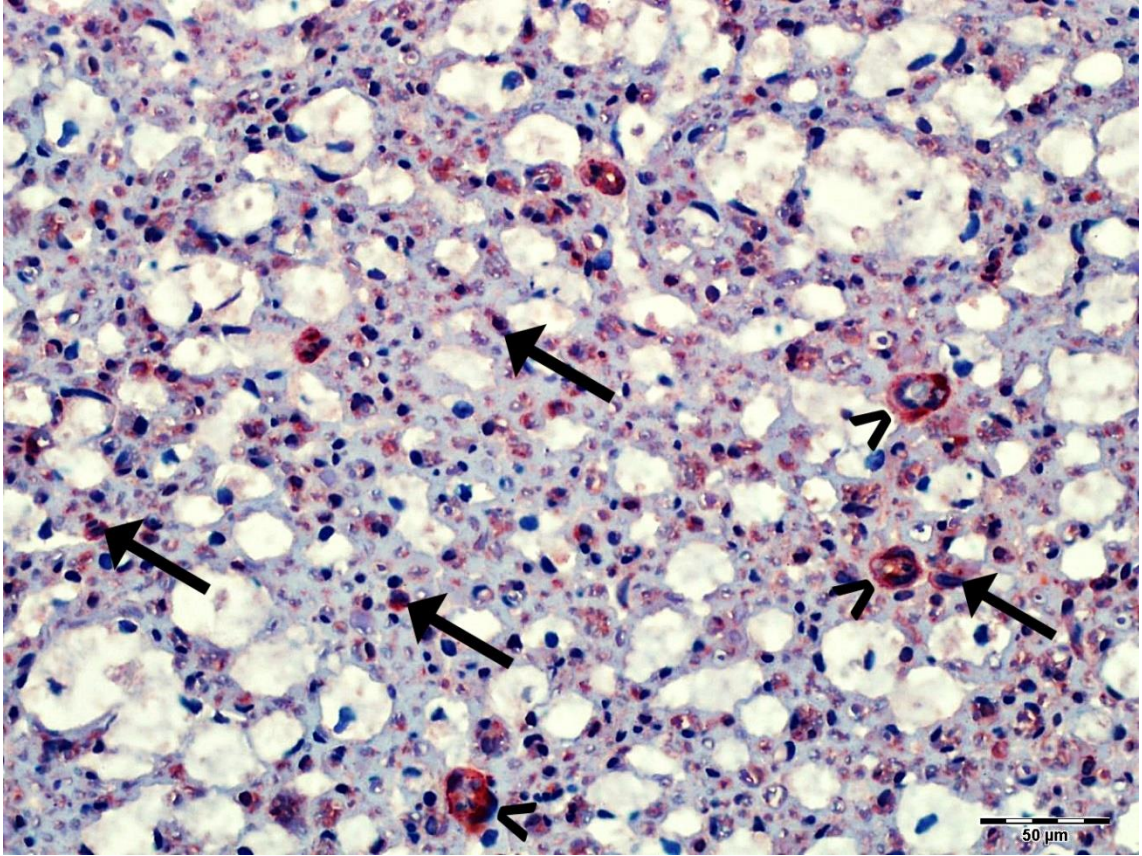


Şekil 20. Deney kontrol grubunda 14. günde COX-2 immünoreaktivitesi. Kapiller endotel hücreleri (ok başları), enflamatuvar hücreler ve Schwann hücrelerinde (oklar) COX-2 ekspresyonunun belirgin olduğu izlenmektedir. Bar = 50μm.

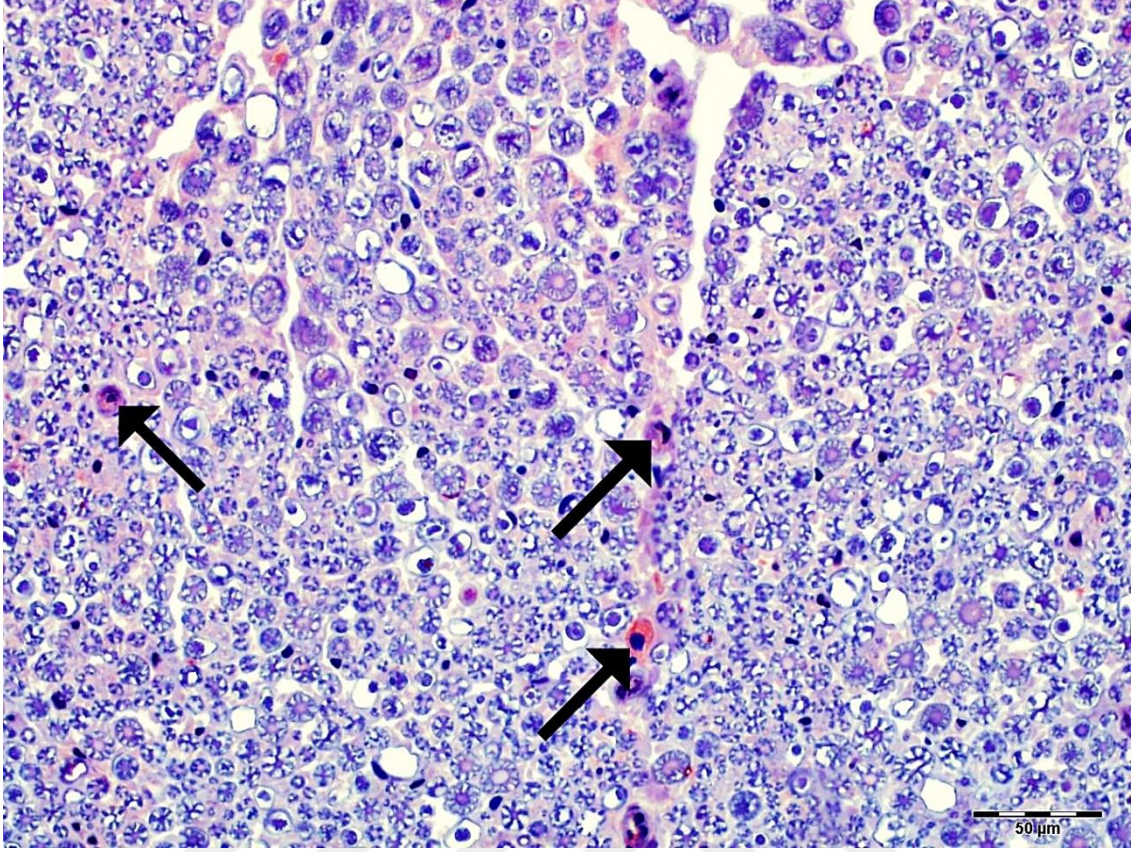


Şekil 21. Deney kontrol grubunda 21. günde COX-2 immünoaktivitesi. Enflamatuvar hücreler ve Schwann hücre sitoplazmalarında (oklar) COX-2 ekspresyonunun varlığı görülmektedir. Bununla birlikte, COX-2 ekspresyonunun 7. ve 14. günlere kıyasla azaldığı gözlenmektedir. Bar = 50μm.

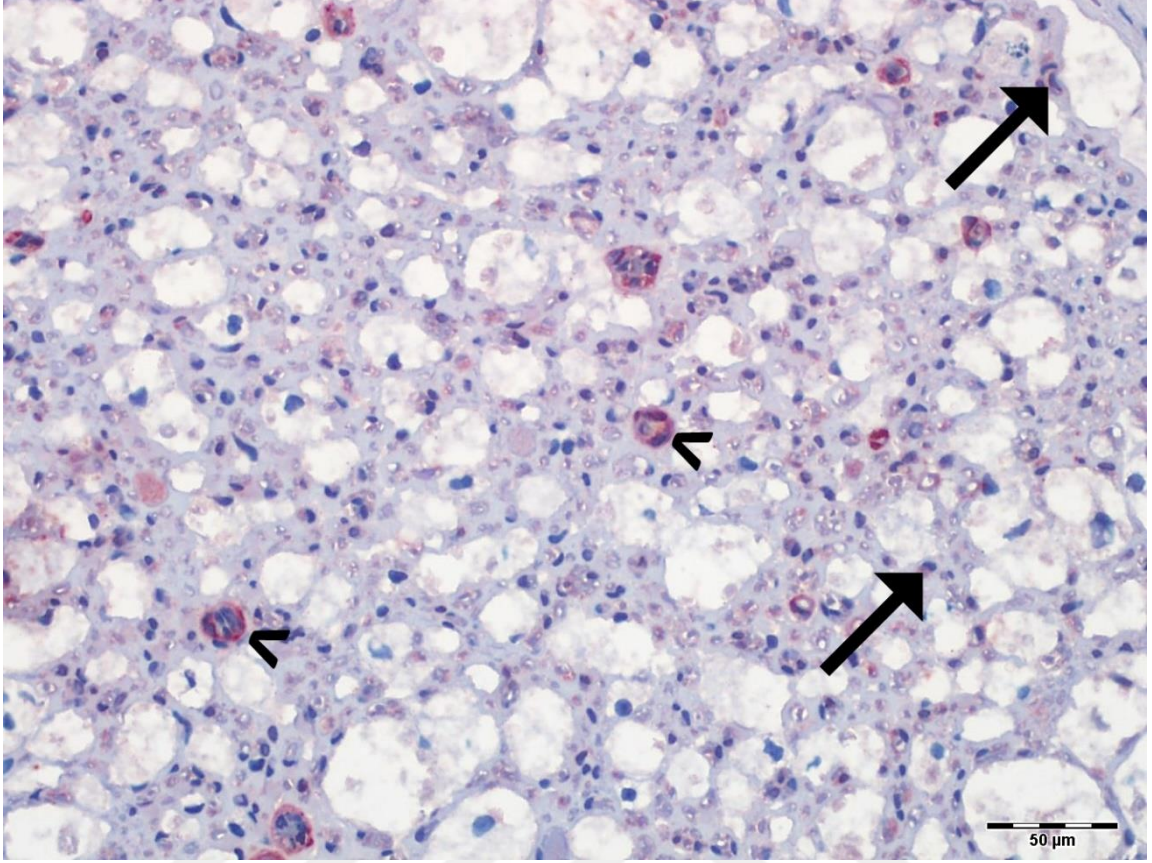
Diklofenak sodyum tedavi grubuna ait deneklerden 7. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde, kapiller endotel hücreleri, Schwann hücreleri ve enflamatuvar hücrelerde COX-2 ekspresyonu gözlemlendi; ancak COX-2 ekspresyonunun deney kontrol grubu 7. güne kıyasla nispeten daha az olduğu belirlendi. (Şekil 22). Aynı gruptan 14. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde, miyelinli sinir liflerinin aralarında, COX-2 immünoaktivitesi gösteren enflamatuvar hücrelere rastlandı (Şekil 23). Aynı gruptan 21. günde alınan dokularda COX-2 immünoaktivitesinin deney kontrol grubu 21. güne göre azalmış olduğu belirlendi. Bazı alanlarda COX-2 eksprese eden enflamatuvar hücreler gözlemlendi (Şekil 24).



Şekil 22. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 7. günde COX-2 immünoaktivitesi. Kapiller endotel hücrelerinde (ok başları), enflamatuvar hücreler ve Schwann hücre sitoplazmalarında (oklar) COX-2 ekspresyonu görülmektedir. Bar = 50µm.

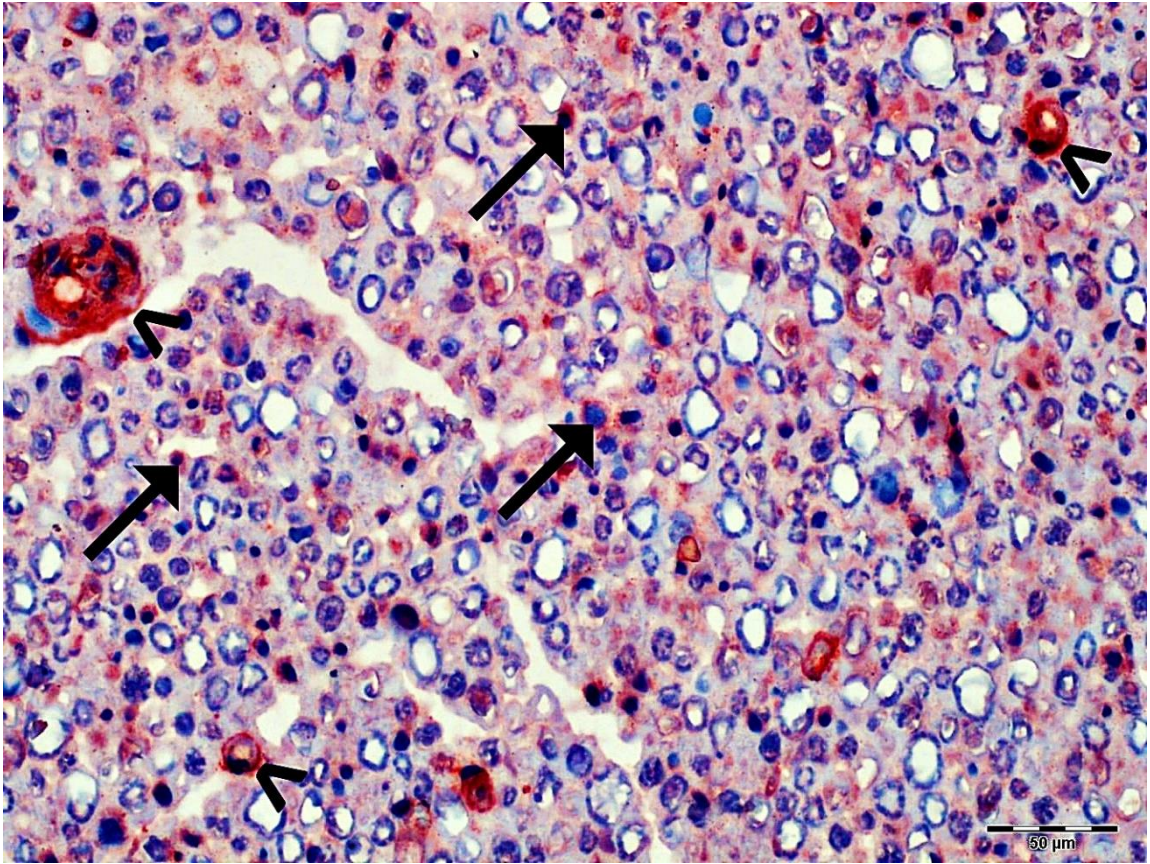


Şekil 23. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 14. günde COX-2 immünoreaktivitesi. Aynı grubun 7. günü ve deney kontrol grubunun 14. gününde alınan siyatik sinir doku kesitlerine kıyasla COX-2 immünoreaktivitesinin azaldığı izlenmektedir (oklar). Bar =50μm.

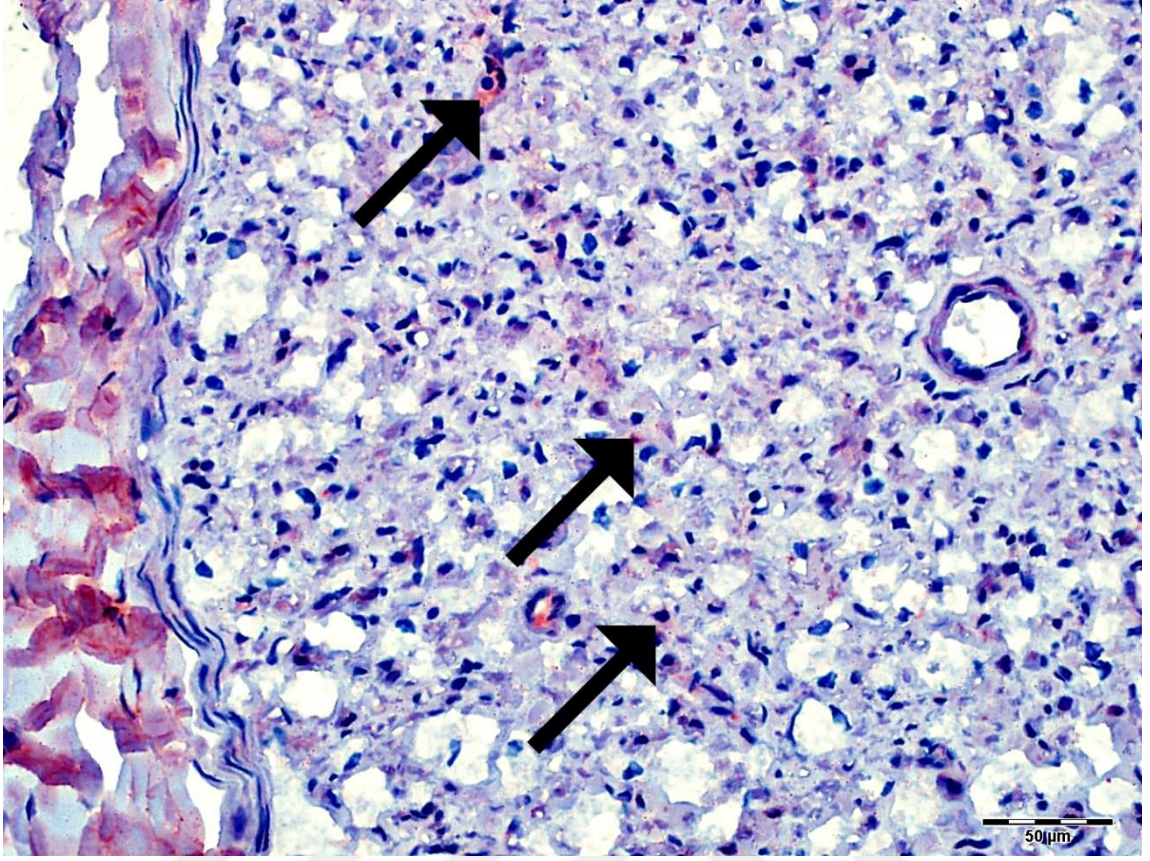


Şekil 24. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 21. günde COX-2 immünoreaktivitesi. Aynı grubun 7 ve 14. günlerine kıyasla COX-2 immünoreaktivitesinin azaldığı gözlenmektedir. Bununla birlikte, kapiller endotel hücrelerinde (ok başları), enflamatuvar hücreler ve Schwann hücrelerinde (oklar) COX-2 ekspresyonunun varlığı görülmektedir. Bar = 50µm.

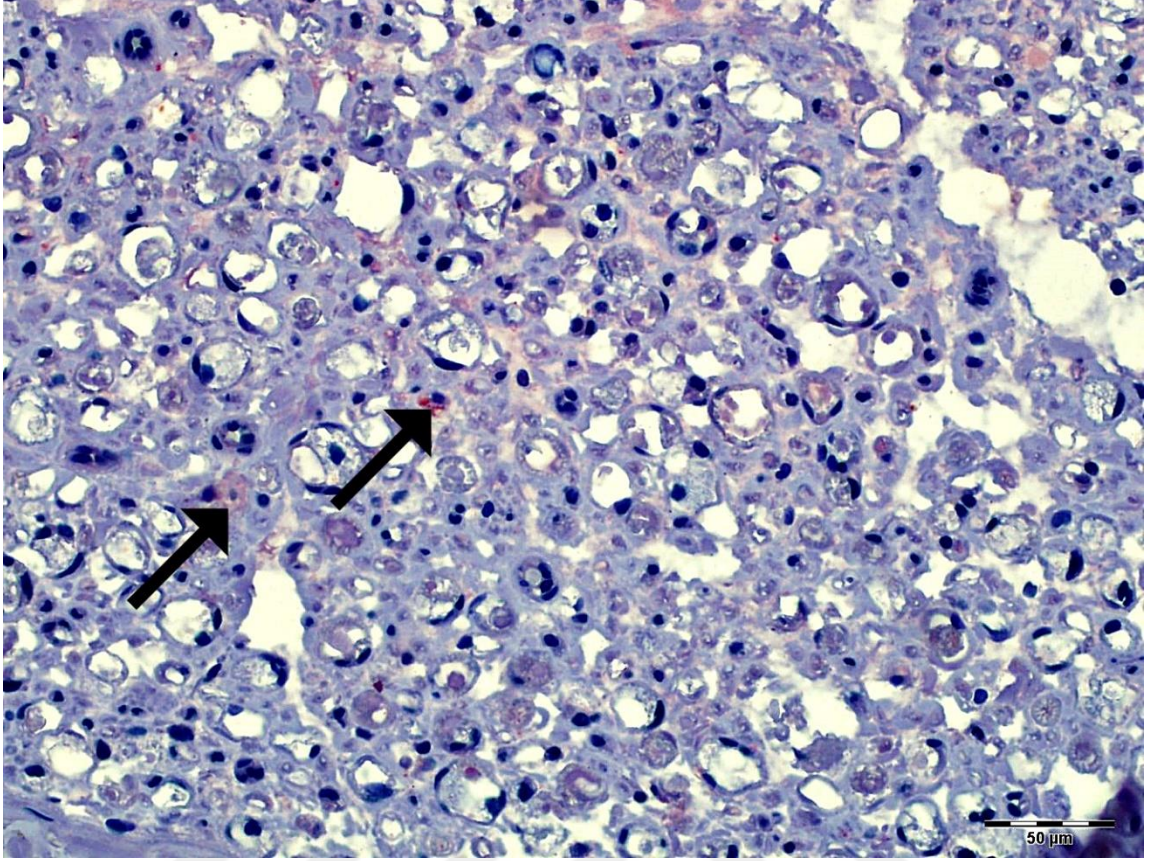
Zonisamide tedavi grubuna ait deneklerden 7. günde alınan siyatik sinir dokularında, COX-2 immünoreaktivitesi gösteren enflamatuvar hücreler ve Schwann hücreleri görüldü (Şekil 25). Aynı gruptan 14. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde, 7. güne kıyasla COX-2 immünoreaktivitesinin azaldığı belirlendi. (Şekil 26). 21. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde ise COX-2 ekspresyonunun enflamatuvar hücre, Schwann hücresi ve kapiller damar endotel hücrelerinde minimal düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 27).



Şekil 25. Zonisamide tedavi grubunda 7. günde COX-2 immünoreaktivitesi. Kapiller endotel hücreleri (ok başları), enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında (oklar) COX-2 immünoreaktivitesi görülmektedir. Bar = 50µm.

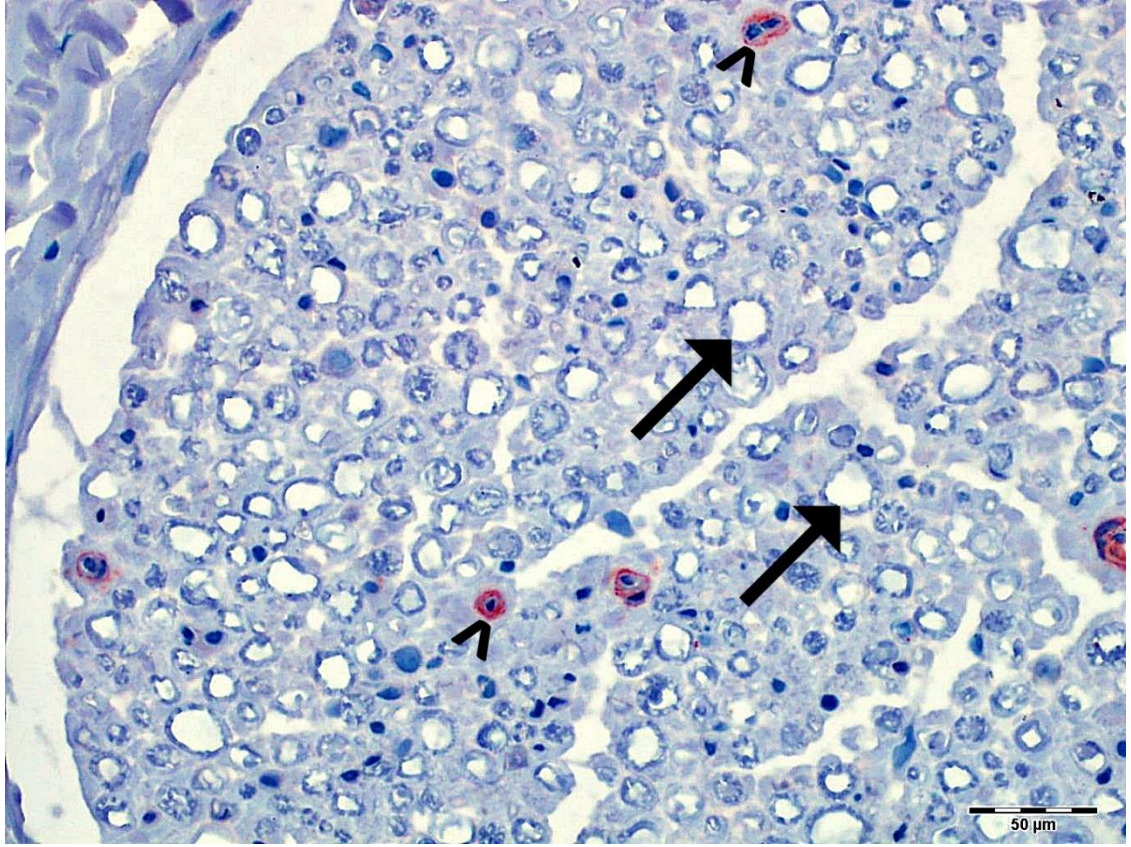


Şekil 26. Zonisamide tedavi grubunda 14. günde COX-2 immünoreaktivitesi. Enflamatuvar hücre ve Schwann hücre sitoplazmalarında (oklar) az miktarda COX-2 immünoreaktivitesi izlenmektedir. Bar =50µm.

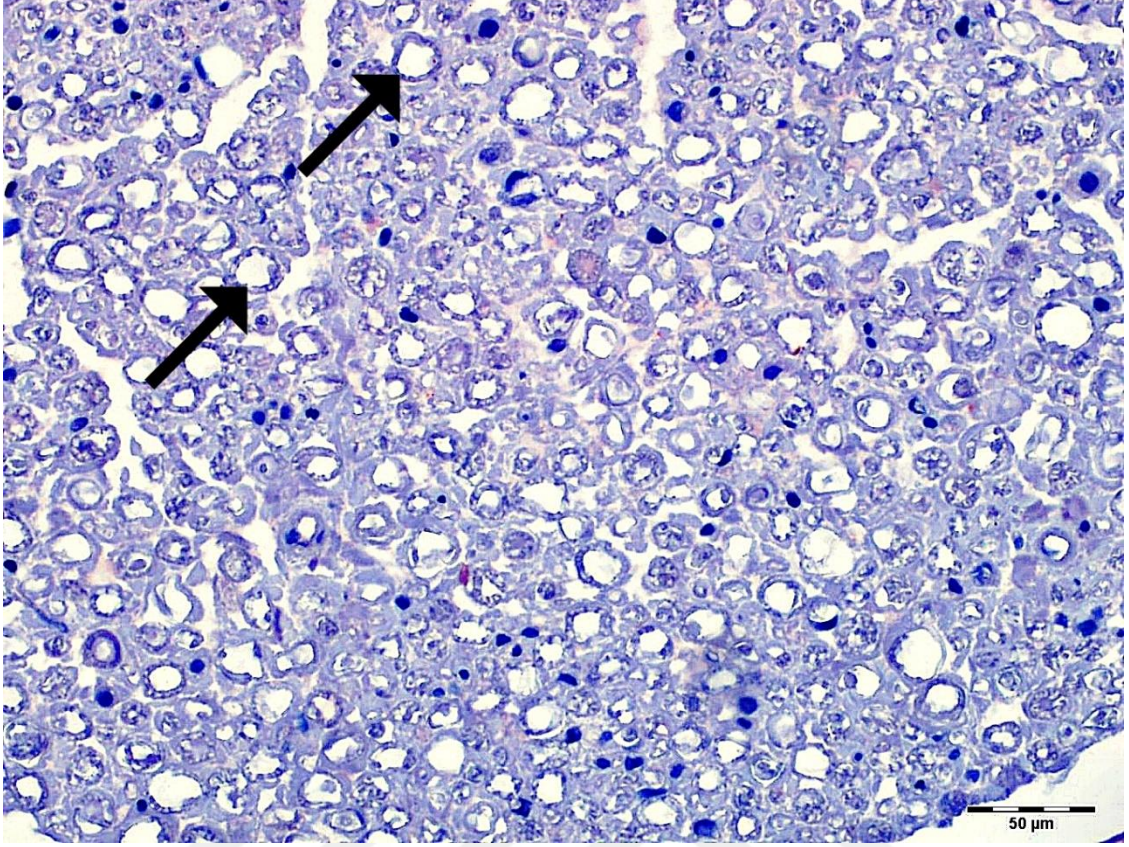


Şekil 27. Zonisamide tedavi grubunda 21. günde COX-2 immünoaktivitesi. COX-2 ekspresyonunun enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinin (oklar) sitoplazmalarında minimal düzeyde olduğu izlenmektedir. Bar = 50µm.

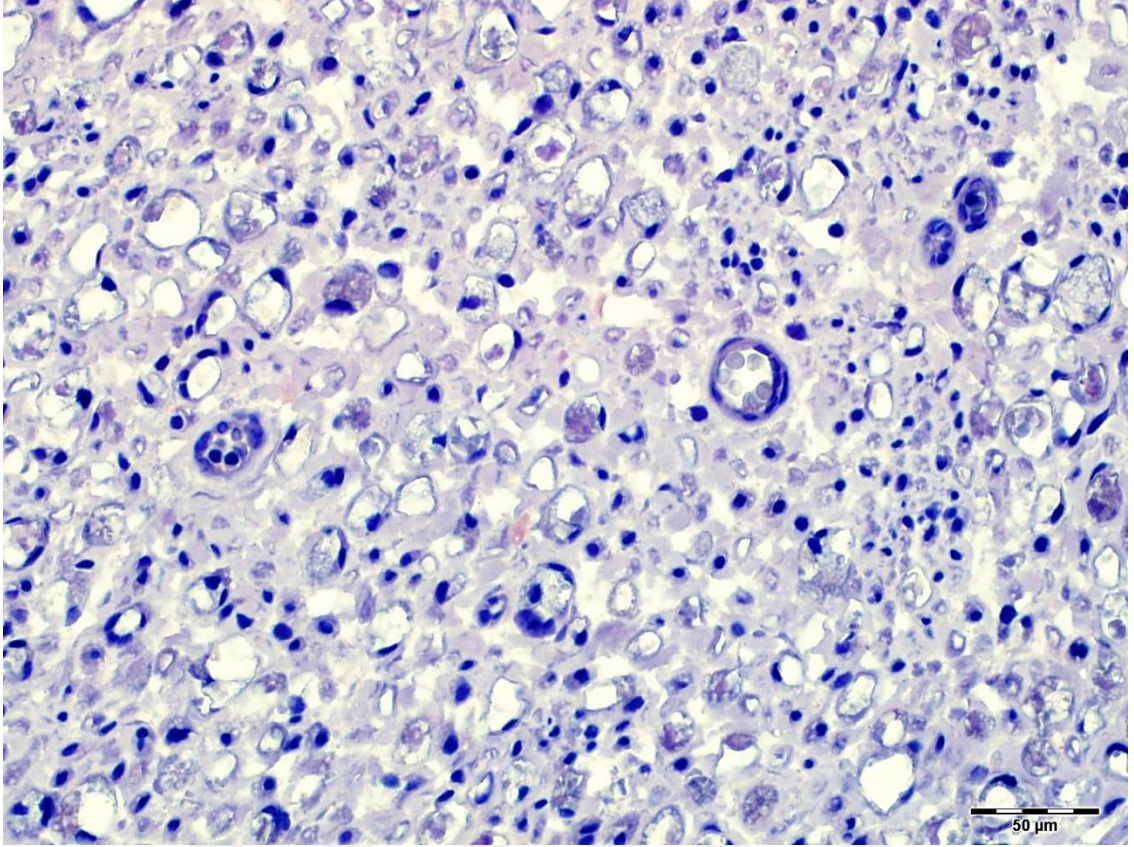
Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavisi uygulanan gruba ait deneklerden 7. günde alınan siyatik sinir dokularında, COX-2'nin enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında minimal seviyede eksprese olduğu, endotel hücrelerinde ise ekspresyonun bulunduğu belirlendi. (Şekil 28). 14. günde elde edilen siyatik sinir dokularında COX-2 immünoaktivitesinin minimal düzeyde olduğu izlendi. Ayrıca normal histolojik görünümdeki aksonların arttığı görüldü (Şekil 29). 21. günde alınan siyatik sinir dokularında COX-2 ekspresyonunun kontrol ve sham gruplarına benzer şekilde enflamatuvar hücre ve Schwann hücre sitoplazmalarında minimal düzeyde olduğu görüldü (Şekil 30).



Şekil 28. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubunda 7. günde COX-2 immünoaktivitesi. Kapiller endotel hücrelerinde (ok başları) COX-2 immünoaktivitesi izlenmektedir. Bazı alanlarda normal histolojik görünümdeki aksonlar (oklar) görülmektedir. Bar = 50µm.



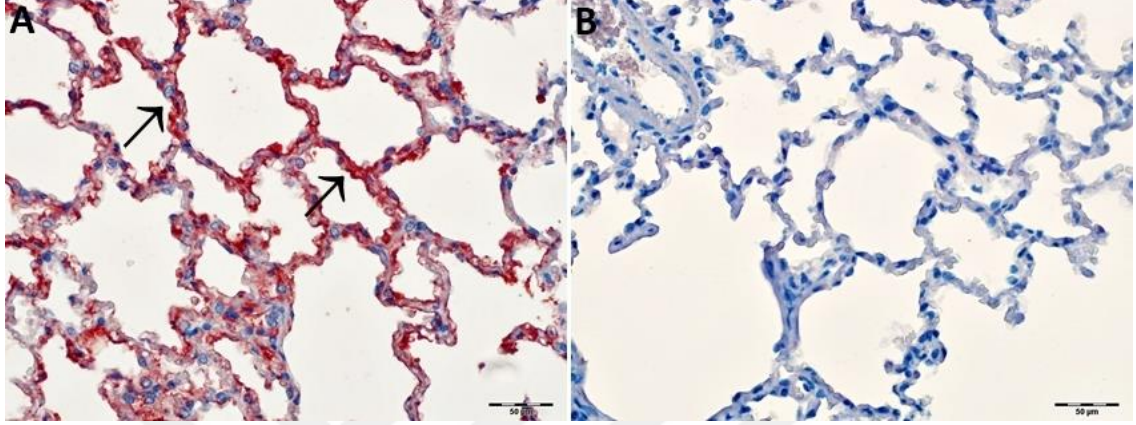
Şekil 29. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubunda 14. günde COX-2 immünoreaktivitesi. COX-2 immünoreaktivitesinin minimal düzeyde olduğu izlenmektedir. Normal histolojik görünümdeki aksonların (oklar) arttığı görülmektedir. Bar = 50µm.



Şekil 30. Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubunda 21. günde COX-2 immünoreaktivitesi. COX-2 immünoreaktivitesinin enflamatuvar hücrelerde, Schwann hücrelerinde ve kapiller endotel hücrelerinde kontrol grubuna benzer şekilde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar = 50µm.

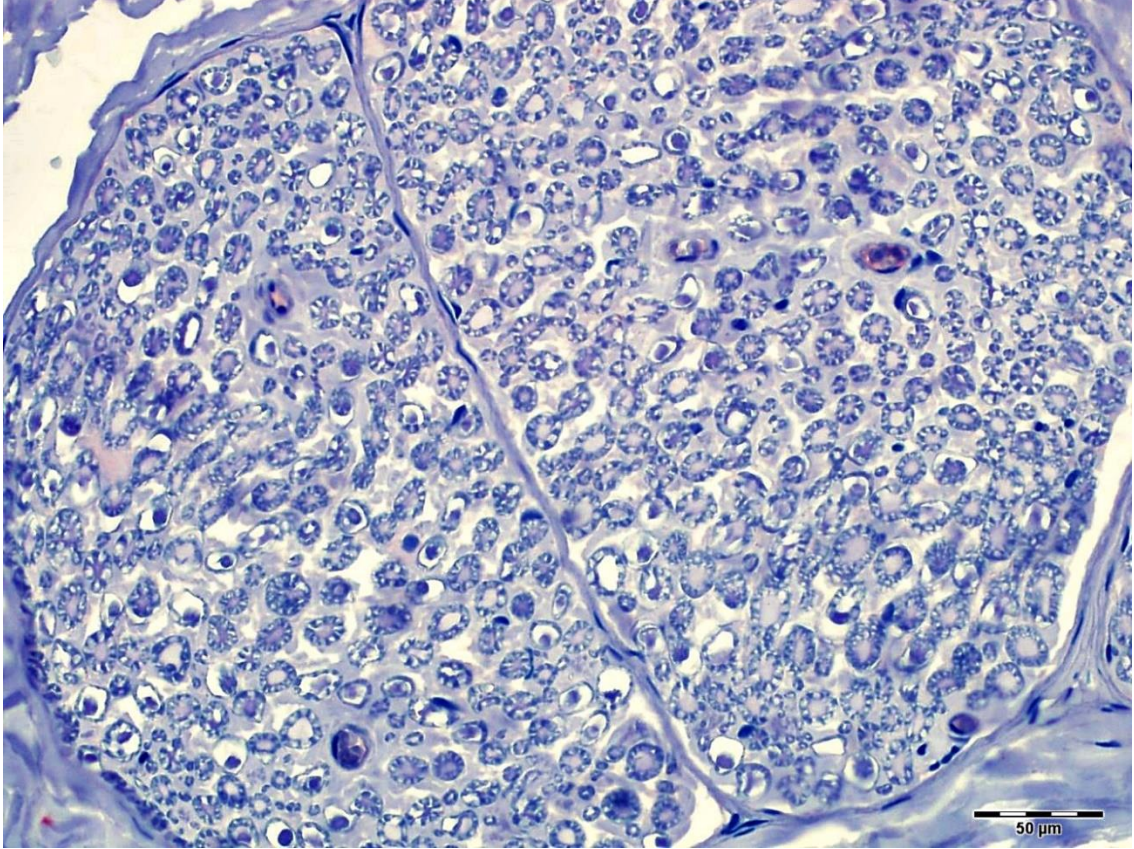
4.3.2. iNOS İmmünoreaktivitesi

Akciğerden alınan doku kesitleri iNOS immünoreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak kullanıldı. Primer antikor damlatılmayan akciğer doku kesiti ise negatif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 31).



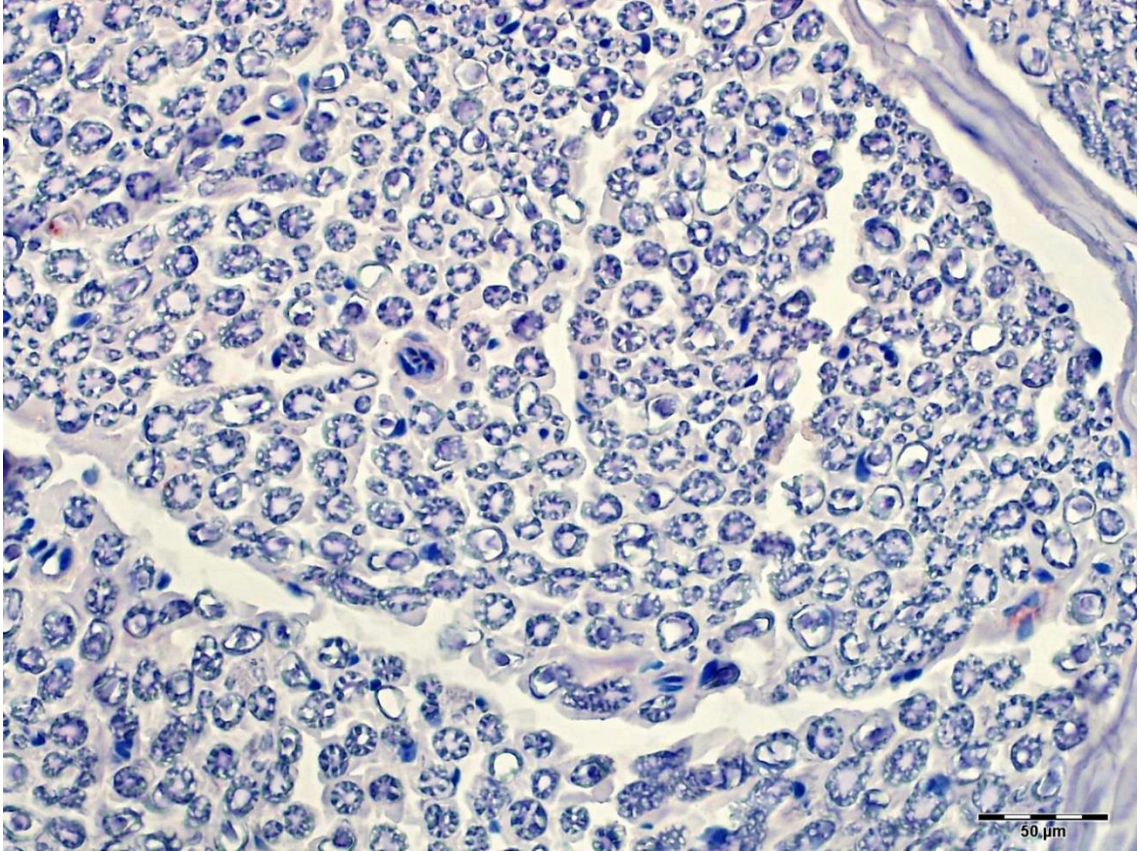
Şekil 31. Pozitif ve negatif kontrolde iNOS immünoreaktivitesi. A) Pozitif kontrol. Primer antikor damlatılmış akciğer kesitinde akciğer alveol hücrelerinde iNOS immünoreaktivitesi izlenmektedir (oklar). Bar 50µm. B) Negatif kontrol. Primer antikor damlatılmamış akciğer kesitinde herhangi bir immünoreaktivite izlenmemektedir. Bar = 50µm.

Herhangi bir cerrahi işlem uygulanmayan tamamen sağlam hayvanlardan elde edilen kontrol grubuna ait siyatik sinir doku kesitlerinde minimal seviyede iNOS immünoreaktivitesi belirlendi ( ekil 32).



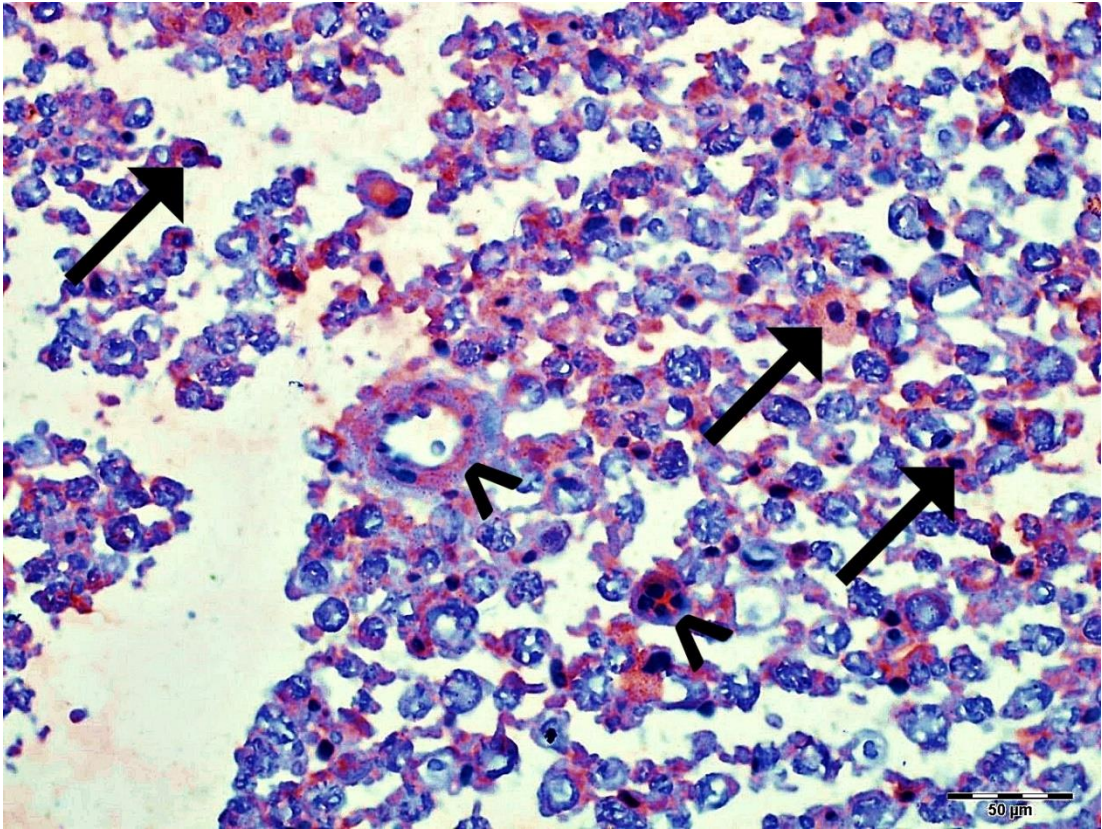
Şekil 32. Kontrol grubunun iNOS immünoreaktivitesi. Schwann hücreleri, enflamatuvar hücreler ve kapiller endotel hücrelerinde minimal düzeyde iNOS ekspresyonu izlenmektedir. Bar= 50  m.

Siyatik sinire herhangi bir hasar verilmeden, yalnızca siyatik sinirin açığa çıkartılıp tekrardan kapatıldığı sham operasyon grubuna ait sıçanlardan elde edilen sinir dokusu kesitlerinde iNOS immünoreaktivitesinin kontrol grubuna benzer şekilde, minimal seviyede olduğu gözlemlendi (Şekil 33).

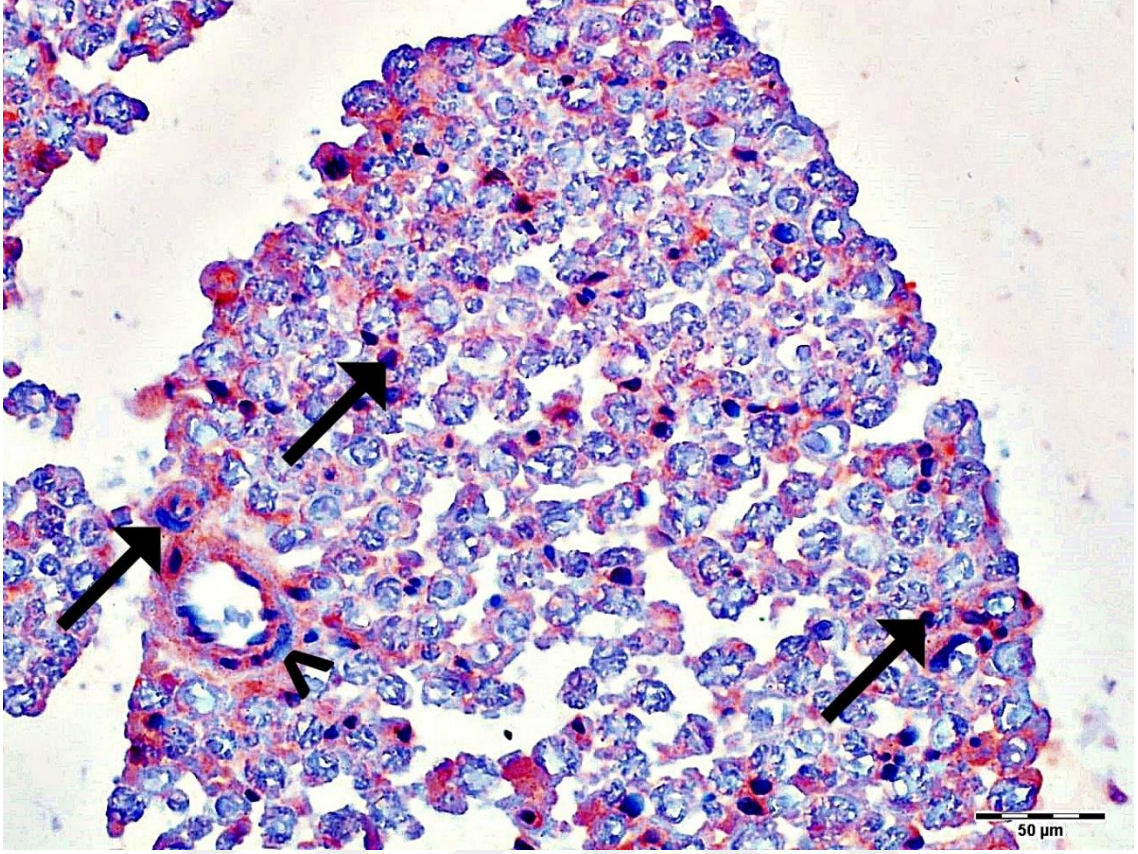


Şekil 33. Sham operasyon grubunun iNOS immünoreaktivitesi. Schwann hücreleri, enflamatuvar hücreler ve kapiller endotel hücrelerinde minimal seviyede iNOS immünoreaktivitesi izlenmektedir. Bar = 50µm.

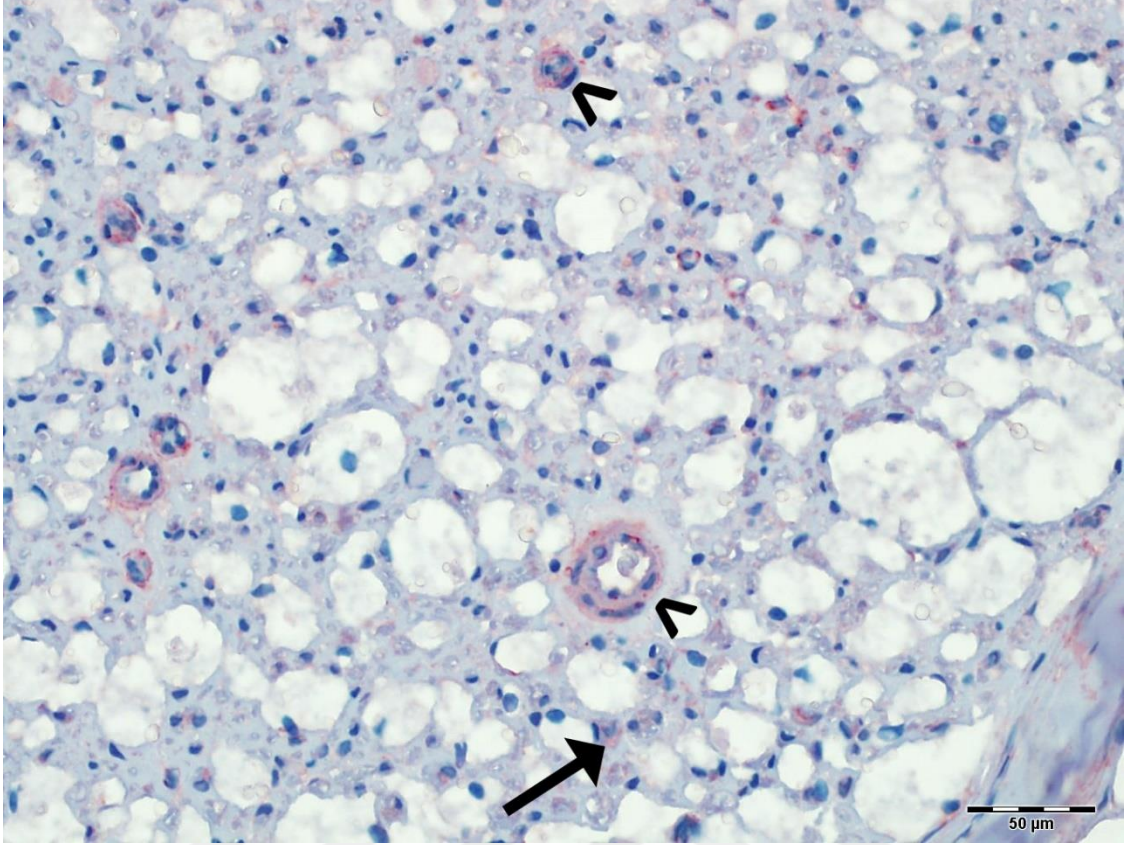
Deney kontrol grubuna ait deneklerden 7. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde, kapiller endotel hücreleri, enflamatuvar hücreler ve Schwann hücrelerinde, iNOS immünoreaktivitesinde belirgin bir artış olduğu belirlendi (Şekil 34). 14. günde alınan sinir kesitlerinde ise kapiller endotel hücreleri, enflamatuvar hücreler ve Schwann hücrelerinde iNOS ekspresyonunun deney kontrol grubu 7. güne benzer şekilde yoğun olduğu görüldü (Şekil 35). 21. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde, iNOS immünoreaktivitesinin diğer 2 güne kıyasla azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 36).



Şekil 34. Deney kontrol grubunda 7. günde iNOS immünoreaktivitesi. iNOS immünoreaktivitesinin kapiller endotel hücrelerinde (ok başları), enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında (oklar) belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir. Bar = 50µm.

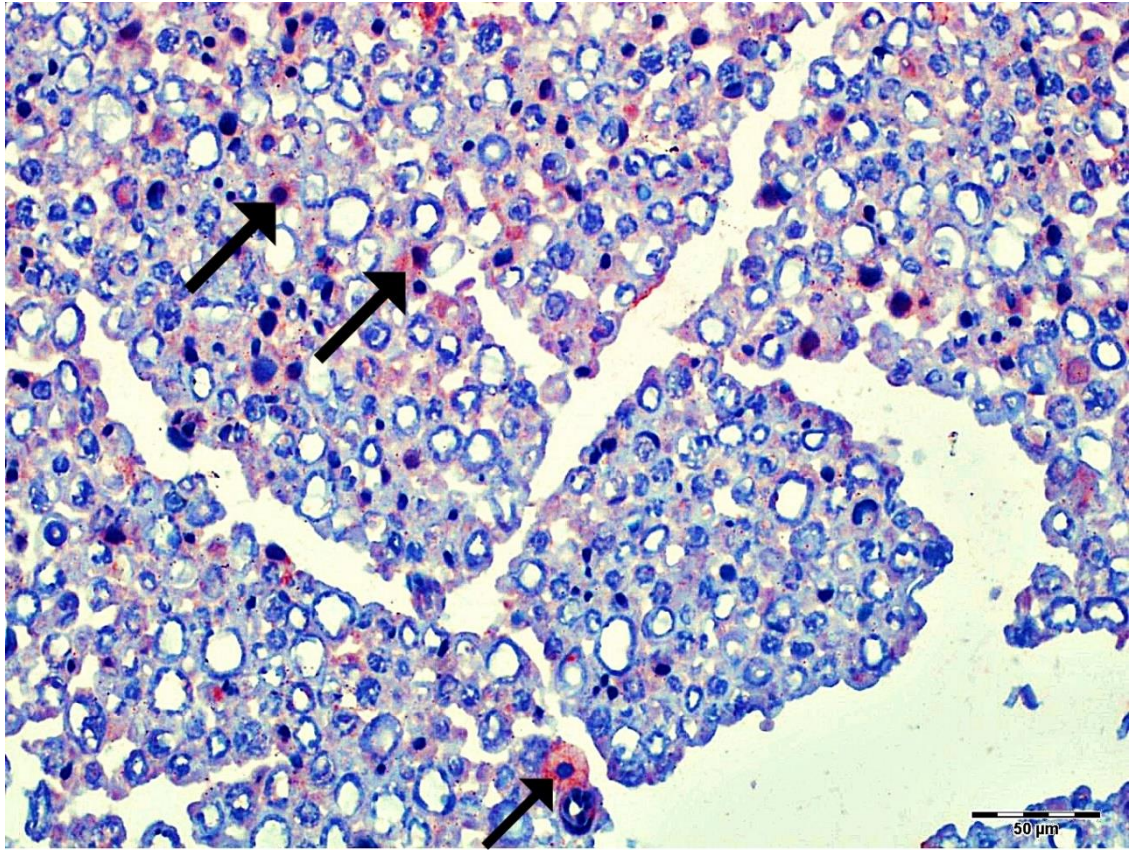


Şekil 35. Deney kontrol grubunda 14. günde iNOS immünoreaktivitesi. Kapiller endotelinde (ok başları), enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinde (oklar) iNOS ekspresyonunun belirgin olduğu gözlenmektedir. Bar = 50µm.

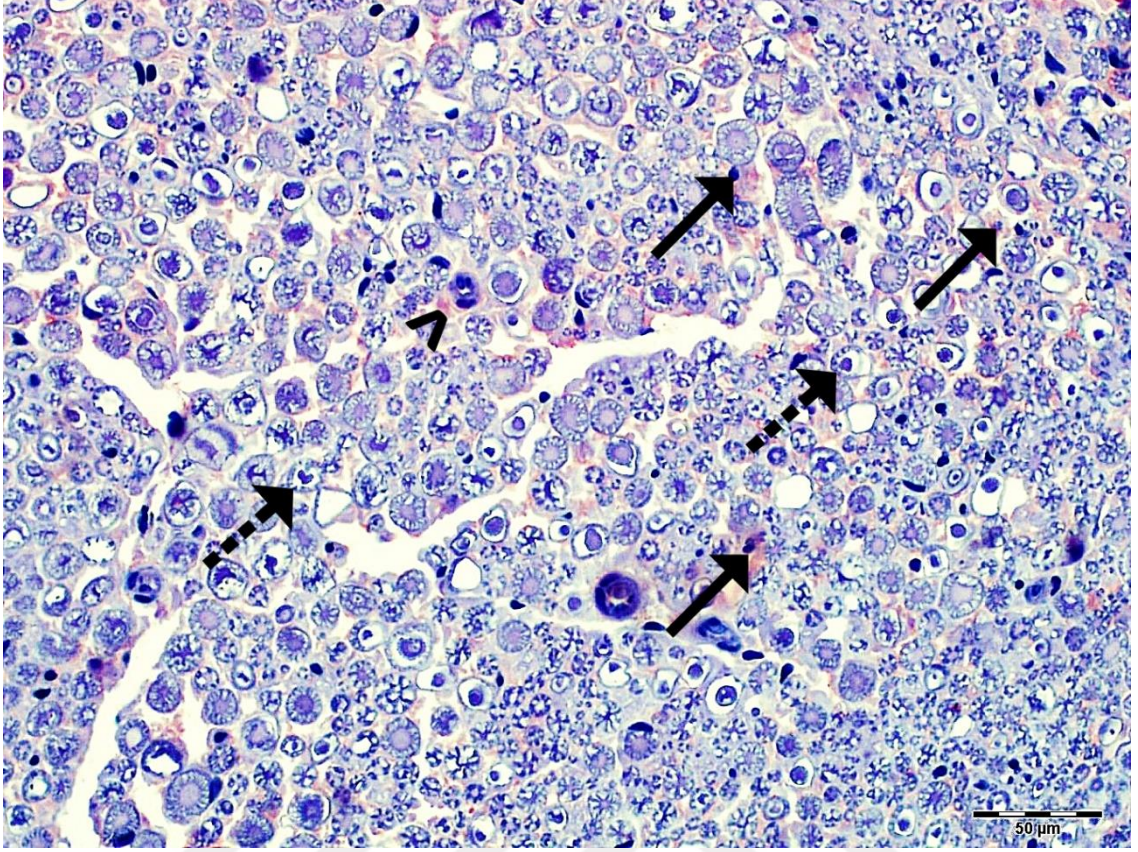


Şekil 36. Deney kontrol grubunda 21. günde iNOS immünoreaktivitesi. iNOS ekspresyonlarının 7. ve 14. günlere kıyasla azaldığı izlenmektedir. Bununla birlikte kapiller endotel hücreleri (ok başları) ve enflamatuvar hücre sitoplazmalarında (ok) iNOS immünoreaktivitesi görülmektedir. Bar = 50µm.

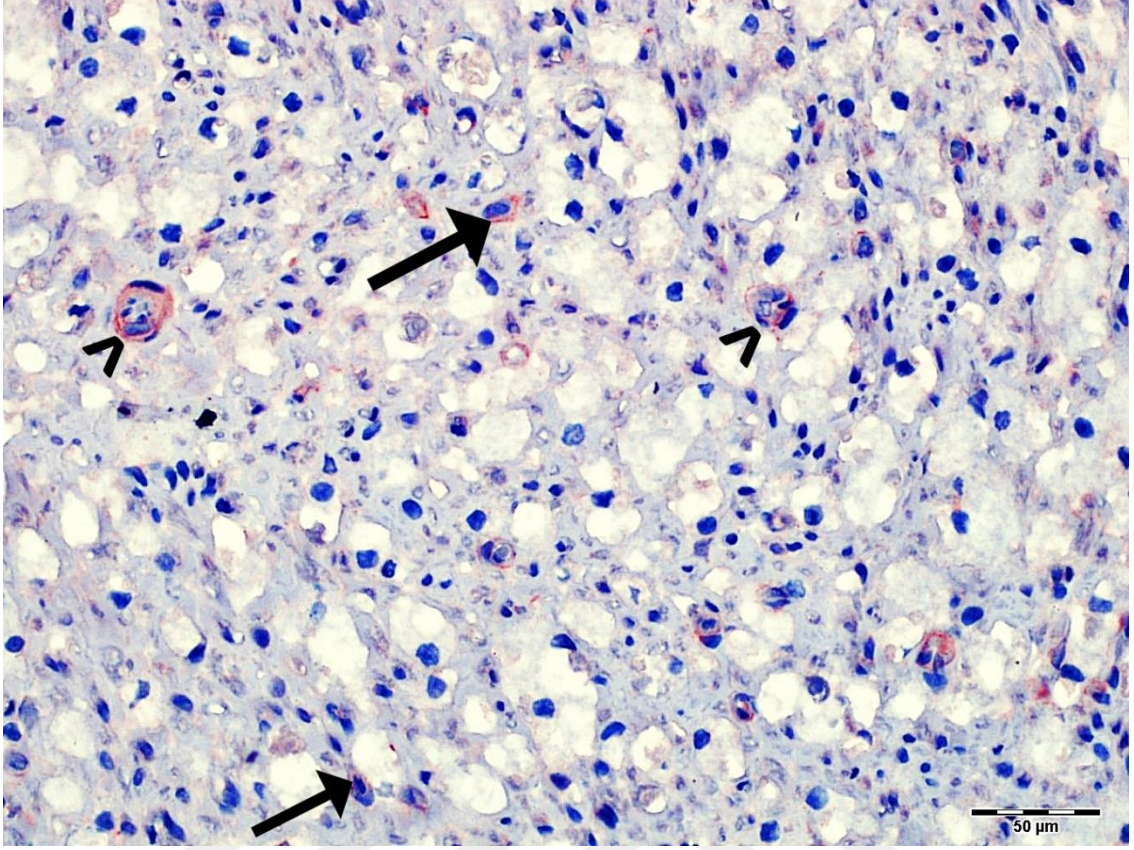
Diklofenak sodyum tedavi grubuna ait deneklerden 7. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde kapiller endotel hücreleri, Schwann hücreleri ve enflamatuvar hücrelerde yoğun iNOS ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 37). Aynı gruptan 14. gün alınan siyatik sinir kesitlerinde, bazı alanlarda iNOS eksprese eden enflamatuvar hücreler ve Schwann hücreleri tespit edildi (Şekil 38). 21. günde alınan siyatik sinir doku kesitlerinde iNOS immünoaktivitesi azalmış olmakla birlikte bazı alanlarda iNOS eksprese eden enflamatuvar hücreler gözlemlendi. (Şekil 39).



Şekil 37. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 7. günde iNOS immünoaktivitesi. Enflamatuvar hücreler ve Schwann hücrelerinde (oklar) iNOS ekspresyonu gözlenmektedir. Bar = 50µm.

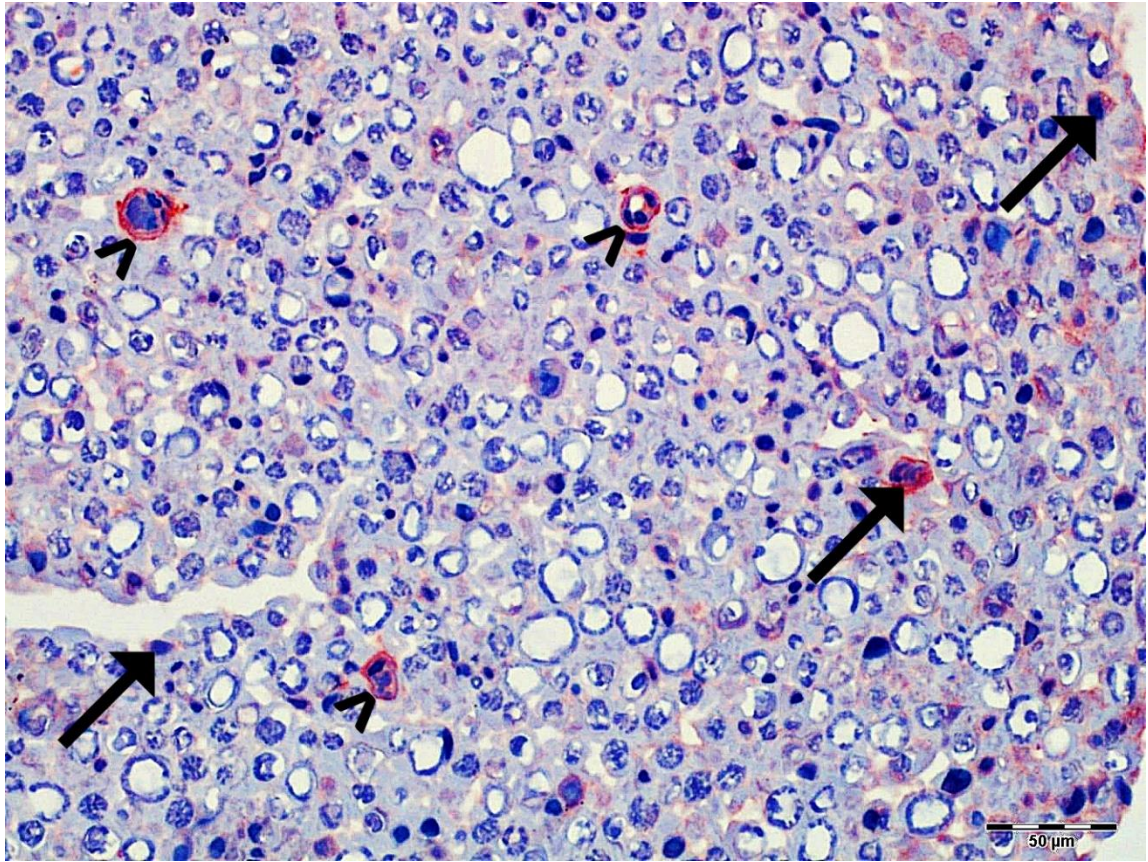


Şekil 38. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 14. günde iNOS immünoreaktivitesi. Bazı alanlarda kapiller endotel hücreleri (ok başı), enflamatuvar hücreler ve Schwann hücrelerinde (oklar) iNOS immünoreaktivitesi izlenmektedir. Yer yer normal histolojik görünümdeki aksonlar (kesikli oklar) görülmektedir. Bar =50µm.

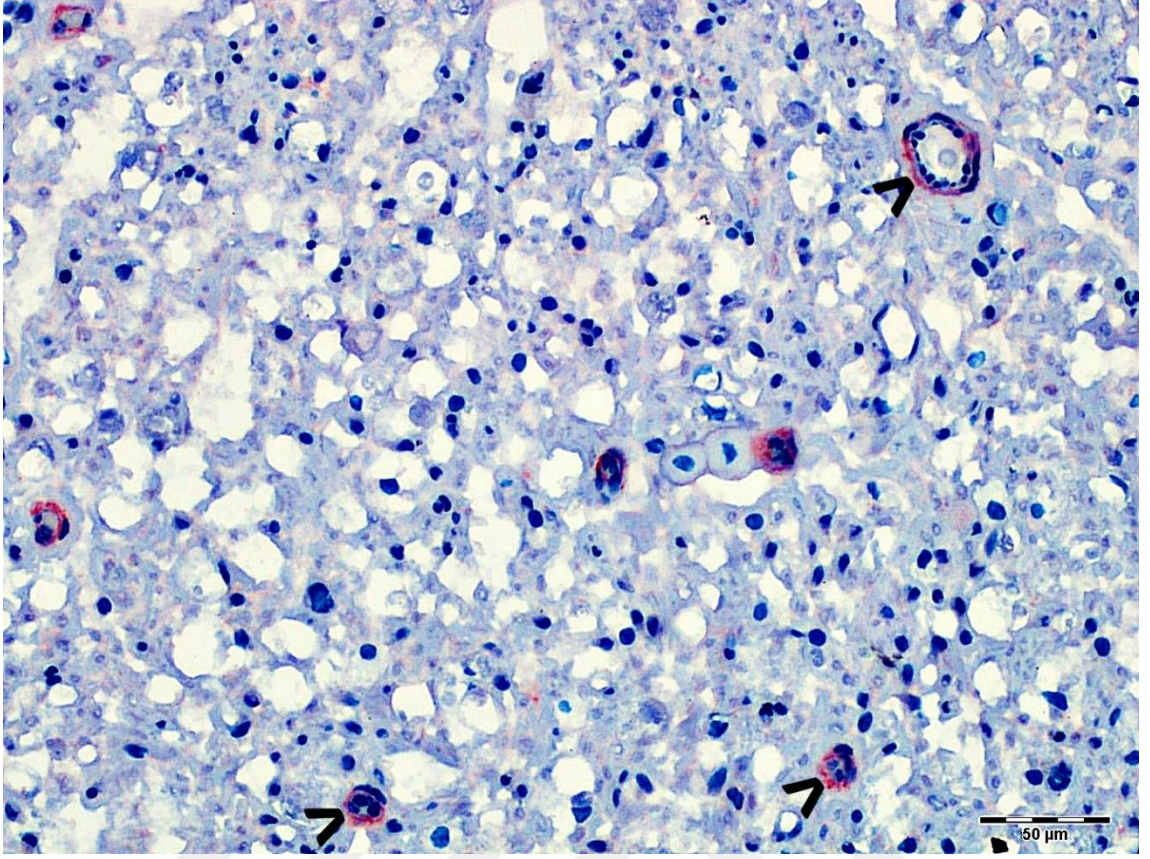


Şekil 39. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 21. günde iNOS immünoreaktivitesi. Aynı grubun 7. ve 14. günlerine kıyasla iNOS ekspresyonunun azaldığı gözlenmektedir. Bununla birlikte bazı alanlarda kapiller endotel hücrelerinde (ok başları), enflamatuvar hücreler ve Schwann hücrelerinde (oklar) iNOS immünoreaktivitesi görülmektedir. Bar = 50µm.

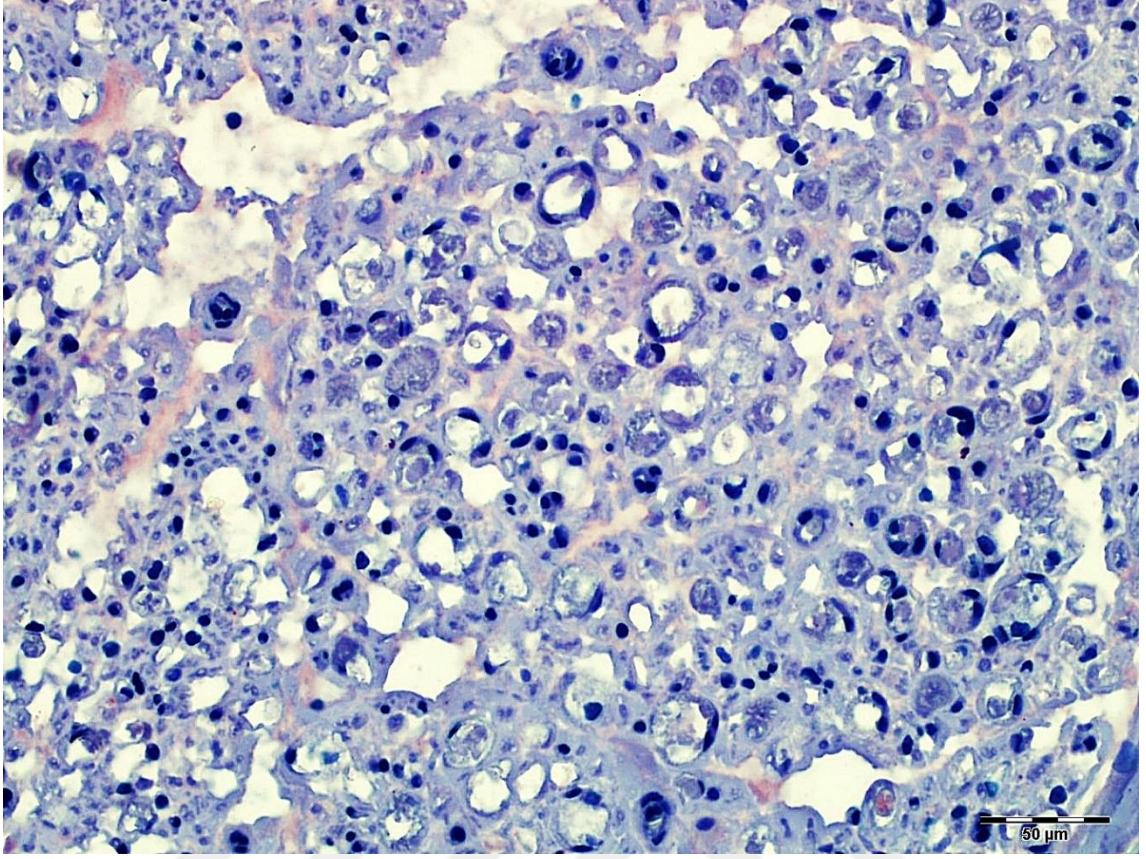
Zonisamide tedavi grubuna ait deneklerden 7. günde alınan siyatik sinir dokularında, enflamatuvar hücre, Schwann hücreleri ve kapiller endotel hücrelerinde iNOS immünoreaktivitesi görüldü (Şekil 40). Aynı gruptan 14. günde alınan siyatik sinir kesitlerinde, 7. güne kıyasla iNOS immünoreaktivitesinin azaldığı belirlendi (Şekil 41). 21. günde alınan siyatik sinir dokularında iNOS ekspresyonunun enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında minimal düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 42).



Şekil 40. Zonisamide tedavi grubunda 7. günde iNOS immünoreaktivitesi. Enflamatuvar hücre ve Schwann hücre sitoplazmalarında (oklar) iNOS immünoreaktivitesi görülmektedir. Ayrıca kapiller endotel hücrelerinde (ok başları) iNOS immünoreaktivitesi izlenmektedir. Bar = 50μm.

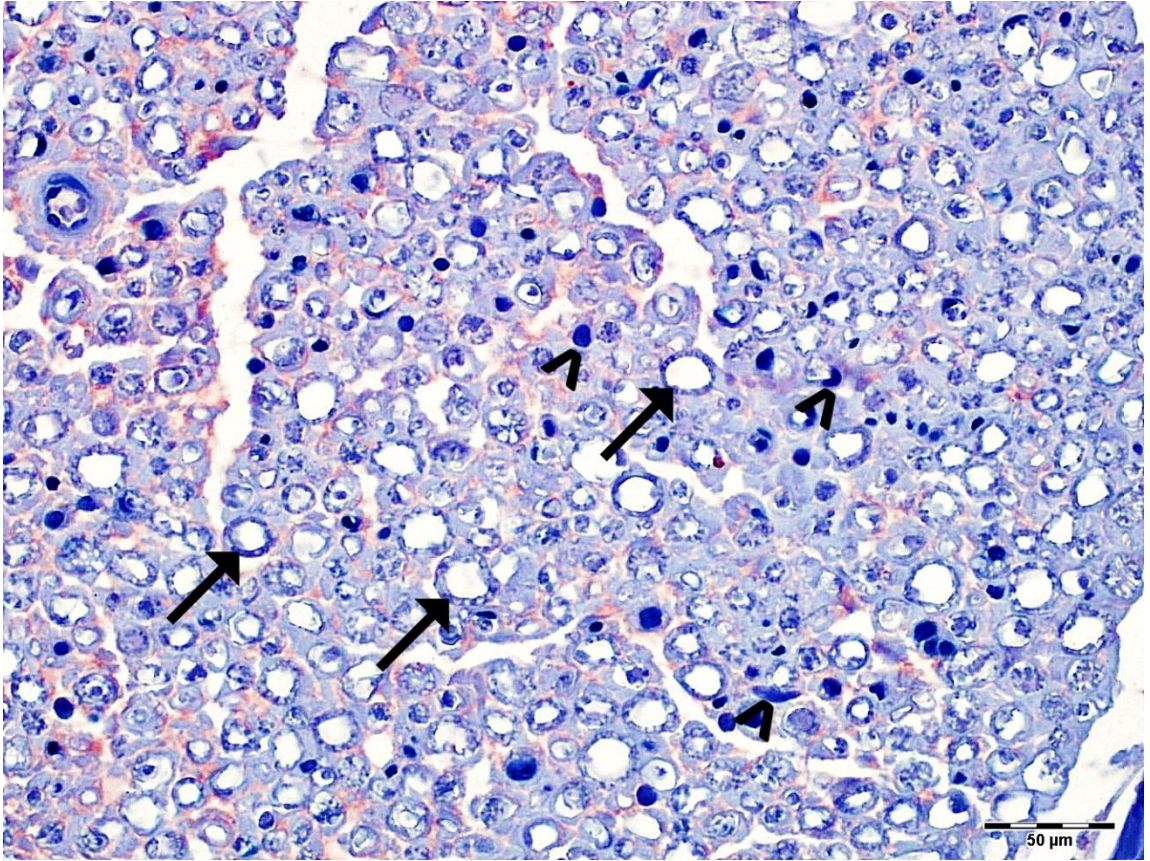


Şekil 41. Zonisamide tedavi grubunda 14. günde iNOS immünoaktivitesi. iNOS immünoaktivitesinin enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinde azaldığı görülmektedir. Bazı alanlarda kapiller endotel hücrelerinde (ok başı) iNOS ekspresyonu gözlenmektedir. Bar =50µm.

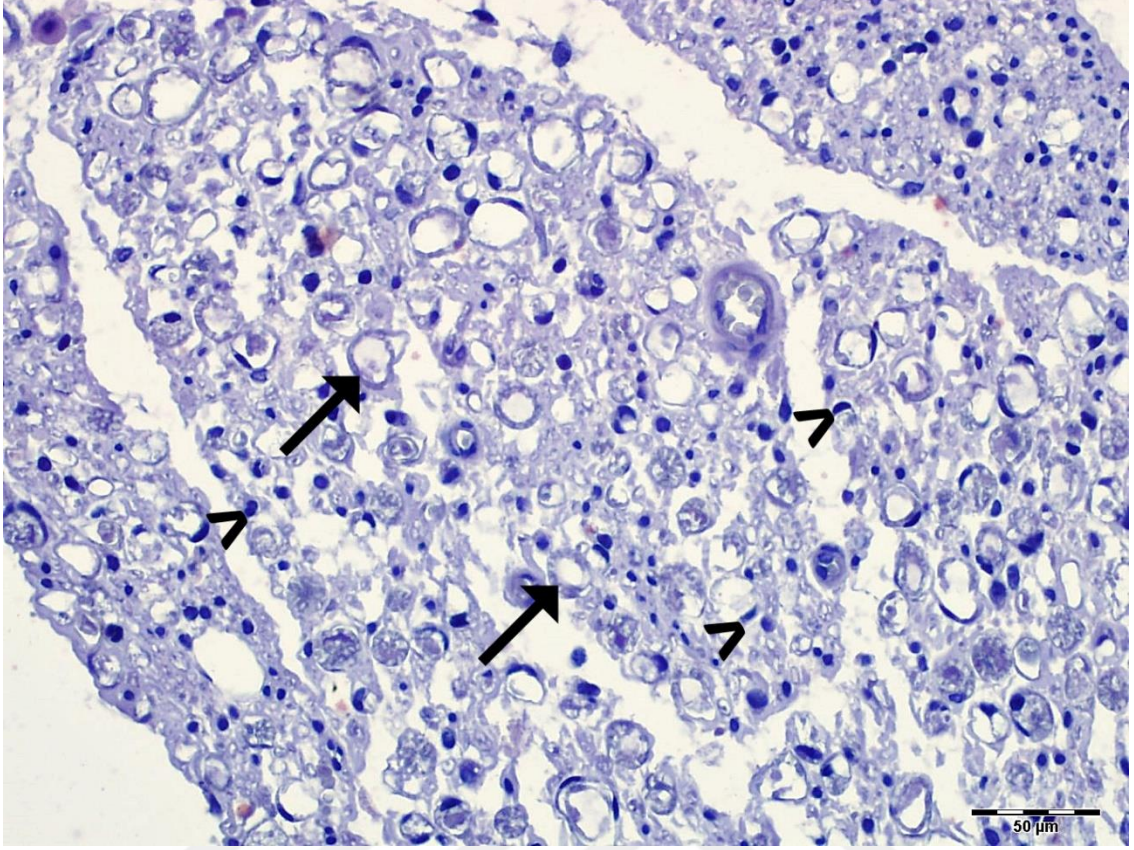


Şekil 42. Zonisamide tedavi grubunda 21. günde iNOS immünoreaktivitesi. iNOS immünoreaktivitesinin minimal düzeyde olduğu izlenmektedir. Bar = 50µm.

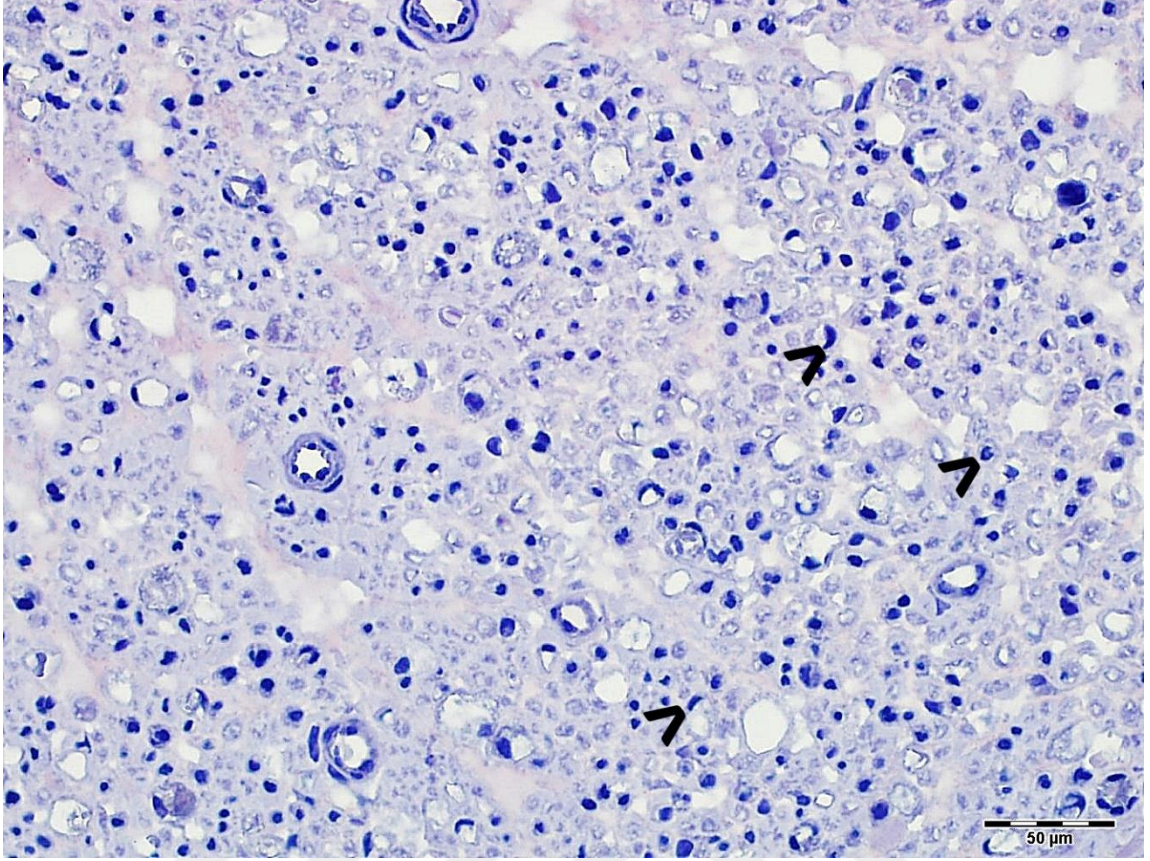
Zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokularında iNOS immünoreaktivitesinin enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında çok az düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 43). 14 ve 21. günlerde elde edilen siyatik sinir dokularında iNOS ekspresyonunun kontrol grubuna benzer şekilde enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında minimal düzeyde olduğu görüldü (Şekil 44, 45).



Şekil 43. Zonisamide ve diklofenak sodyumun birlikte kullanıldığı kombine tedavi grubunda 7. günde iNOS immünoreaktivitesi. Enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında (ok başları) iNOS ekspresyonunun minimal olduğu izlenmektedir. Bazı alanlarda normal histolojik görünümdeki aksonlar (oklar) görülmektedir. Bar = 50µm.



Şekil 44. Zonisamide ve diklofenak sodyumun birlikte kullanıldığı kombine tedavi grubunda 14. günde iNOS immünoreaktivitesi. iNOS immünoreaktivitesinin enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinde (ok başları) minimal düzeyde olduğu izlenmektedir. Normal histolojik görünümdeki aksonların (oklar) arttığı görülmektedir. Bar = 50µm.



Şekil 45. Zonisamide ve diklofenak sodyumun birlikte kullanıldığı kombine tedavi grubunda 21. günde iNOS immünoreaktivitesi. iNOS immünoreaktivitesinin enflamatuvar hücre ve Schwann hücrelerinde (ok başları) kontrol grubuna benzer şekilde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar = 50µm.

Tablo 1. COX-2 immünoaktivitesinin puanlaması.

COX-2 immünoaktivitesi			
Gruplar	7. gün	14. gün	21. gün
Kontrol	+	+	+
Sham	+	+	+
Deney	++++	+++	++
DF	+++	++	+
ZNS	++++	++	+
DF+ZNS	++	+	+

+ minimal ekspresyon, ++ hafif ekspresyon, +++ orta ekspresyon, ++++ şiddetli ekspresyonu göstermektedir (118).

Tablo 2. iNOS immünoaktivitesinin puanlaması.

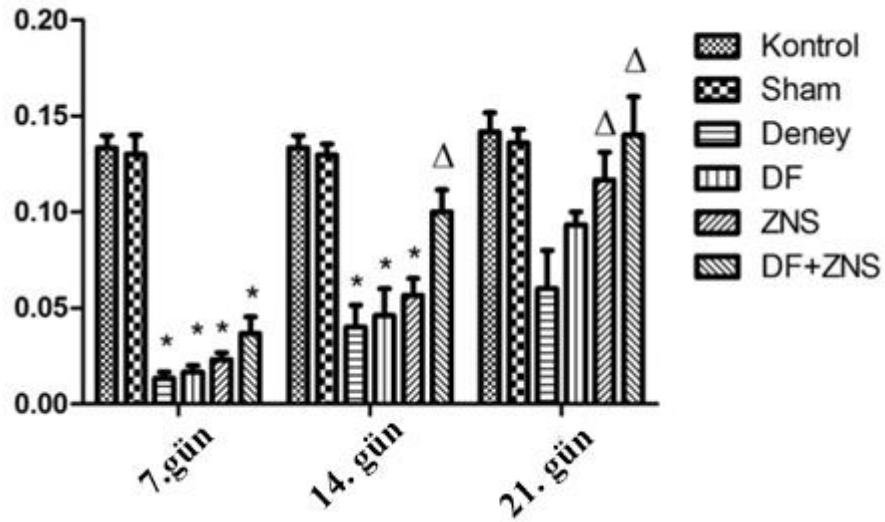
iNOS immünoaktivitesi			
Gruplar	7. gün	14. gün	21. gün
Kontrol	+	+	+
Sham	+	+	+
Deney	++++	+++	+
DF	+++	++	+
ZNS	+++	++	+
DF+ZNS	++	+	+

+ minimal ekspresyon, ++ hafif ekspresyon, +++ orta ekspresyon, ++++ şiddetli ekspresyonu göstermektedir (118).

4.4. Moleküler Biyolojik Bulgular

4.4.1. Siyatik Sinir Hasarının Krox-20 Ekspresyon Seviyesine Etkisi

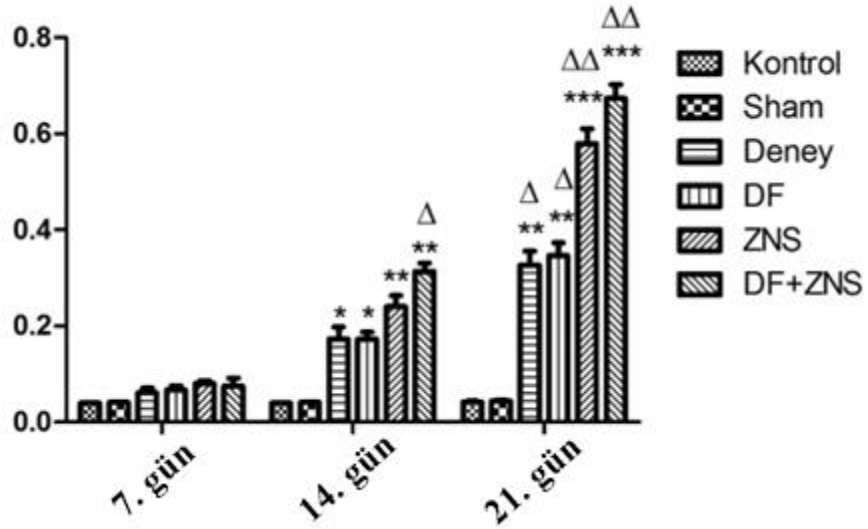
Siyatik sinir hasarından sonra kontrol geni (GAPDH) ile kıyaslandığında, Krox-20 ekspresyonunun kontrole oranla azalmış olduğu görüldü. Bu azalmanın kontrol ve sham operasyon gruplarıyla kıyaslandığında, deney kontrol grubu 7 ve 14. günler; diklofenak sodyum tedavi grubu 7 ve 14. günler, zonisamide tedavi grubu 7. ve 14. günler ve kombine tedavi grubu 7. günde anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.01$). Kombine tedavi grubu 21. günde Krox-20 gen ekspresyonunun kontrol ve sham operasyon gruplarına benzer şekilde yüksek olduğu görüldü. Ek olarak, kombine tedavi grubunda 14. ve 21. günlerde, 7. güne göre Krox-20 ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu izlendi ($p < 0.01$) (Şekil 46).



Şekil 46. Siyatik sinir hasarının Krox-20 ekspresyonuna etkisi (Kontrol grubuyla karşılaştırma, $*P<0,01$; Gruplar arası karşılaştırma, $^{\Delta}p < 0.01$).

4.4.2. Siyatik Sinir Hasarının p75NTR Ekspresyon Seviyesine Etkisi

Siyatik sinir hasarından sonra kontrol geni (GAPDH) ile karşılaştırıldığında, p75NTR ekspresyonunun kontrole oranla artmış olduğu görüldü. p75NTR ekspresyonundaki artışın kontrol ve sham operasyon gruplarıyla kıyaslandığında, deney kontrol grubu 14 ve 21. günler, diklofenak sodyum tedavi grubu 14 ve 21. günler, zonisamide tedavi grubu 14 ve 21. günler ve kombine tedavi grubu 14. ve 21 günlerde anlamlı olduğu tespit edildi. p75NTR ekspresyonunun, zonisamide tedavi grubu 21. gün ve kombine tedavi 21. günde en yüksek seviyede olduğu saptandı ($p<0.0001$). Ek olarak 7, 14 ve 21. günler karşılaştırıldığında kombine tedavi grubunda 14 ve 21. günlerde, 7. güne göre p75NTR ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu görülürken, diklofenak sodyum ve zonisamide tedavi gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı artışın sadece 21. günde olduğu tespit edildi (Şekil 47).

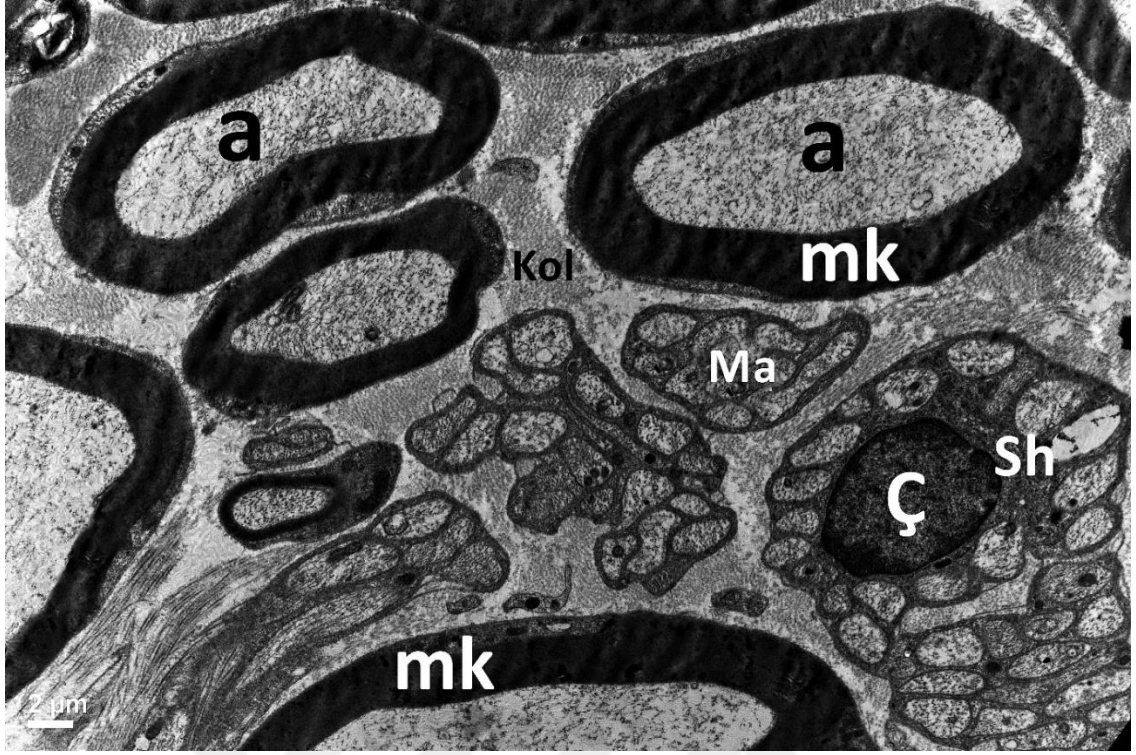


Şekil 47. Siyatik sinir hasarının p75NTR ekspresyonuna etkisi (Kontrol grubuyla karşılaştırma, *** $P<0,0001$, ** $P<0,001$, * $P<0,01$; Gruplar arası karşılaştırma, $\Delta P<0,0,1$ $\Delta\Delta P<0,001$).

4.5. Elektron Mikroskopik Bulgular

4.5.1. Kontrol Grubu

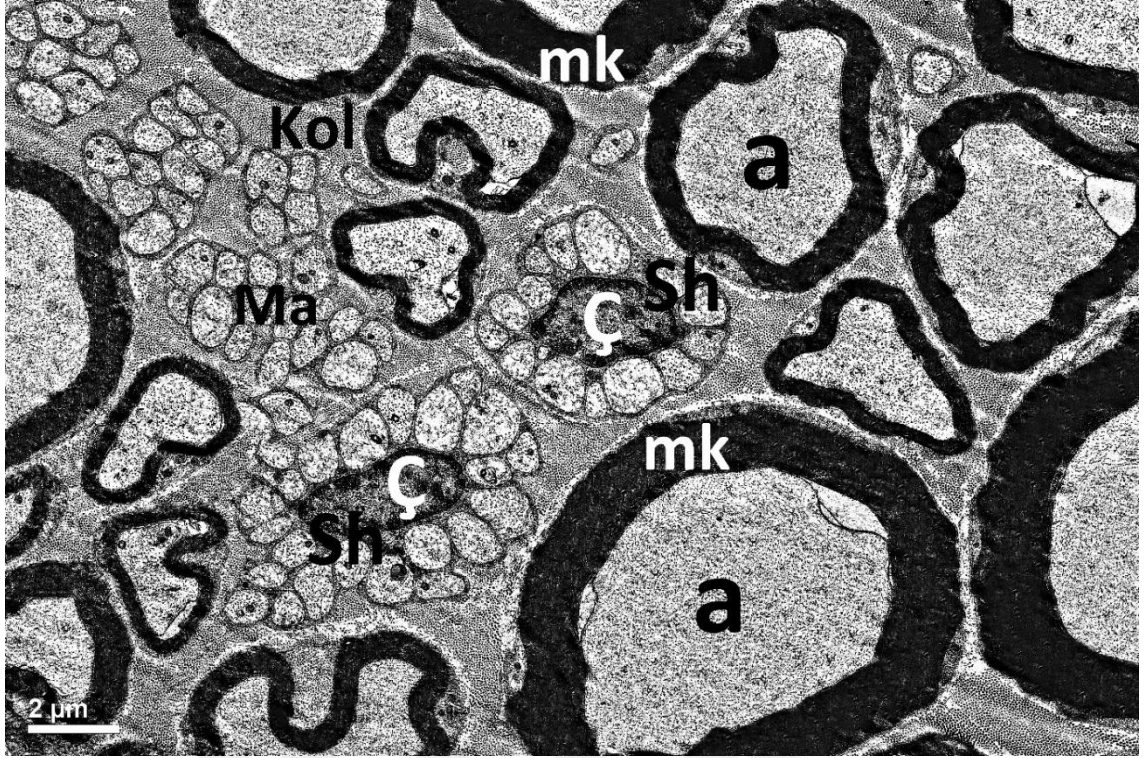
Siyatik sinir hasarı oluşturulmadan tamamen sağlam bırakılan kontrol grubuna ait sıçanların siyatik sinir doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde sinir fasikülleri içerisinde miyelinli ve miyelinsiz aksonların varlığı izlendi. Miyelinli ve miyelinsiz aksonların Schwann hücre sitoplazması içerisine gömülü halde bulundukları görüldü. Miyelinli sinir liflerinde Schwann hücrelerinin tek bir aksonun etrafında konsantrik lamellar yapıdaki miyelin kılıfı oluşturdıkları görüldü. Miyelinsiz sinir liflerinde ise Schwann hücresinin birden fazla aksonu sitoplazması içerisinde bulundurduğu görüldü. Schwann hücrelerinin, çekirdeklerinin oval ya da yuvarlak şekilli olduğu ve heterokromatin yapısına sahip olduğu belirlendi. Heterokromatinin genel olarak çekirdek kılıfı yakınında yerleştiğı izlendi. Schwann hücrelerinin dıştan bir bazal lamina ile sarılı olduğu, sitoplazmalarında golgi aygıtı, endoplazmik retikülüm sisternaları, ribozom ve lizozomlar gibi organellerin normal histolojik yapılarını koruduğı belirlendi. Miyelinli sinir liflerinde aksoplazma içerisinde agranüler endoplazmik retikülüm, fazla sayıda nörofilament ile nörotübül yapısı ve mitokondriyonların bulunduğu izlendi. Ayrıca miyelinli ve miyelinsiz aksonların aralarında heterokromatik çekirdeğe sahip iğ şekilli fibroblastların bulunduğu tespit edildi. Bunların dışında sinir fasikülü içerisindeki sinir liflerinin aralarında kollajen liflerden zengin fibröz bağ dokusu varlığı izlendi. Bu bağ dokusu içerisinde sinir liflerine yakın bölgelerde çok sayıda kapiller damarın bulunduğu görüldü (Şekil 48).



Şekil 48. Kontrol grubundan alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfın (mk) normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Schwann hücre (Sh) çekirdeklerinin (Ç) oval şekilli heterokromatin yapıda olduğu izlenmektedir. Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülü halde bulunan miyelinsiz aksonlar (Ma) görülmektedir. Aksonlar arası alanlarda bulunan kollajen liflerin (Kol) normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Bar = 2µm.

4.5.2. Sham Operasyon Grubu

Siyatik sinir hasarı oluşturulmadan, sinirin cerrahi müdahale ile açığa çıkarılıp kas ve deri yapılarının kapatılarak dikildiği sham operasyon grubuna ait hayvanların sinir doku örnekleri elektron mikroskopik olarak değerlendirildi. Bu grupta, siyatik sinirin ultrastrüktürel yapısının kontrol grubuna benzer özellikler sergilediği görüldü. Miyelinli ve miyelinsiz aksonların sinir fasikülleri içerisinde yer aldığı tespit edildi. Schwann hücrelerinin, aksonların büyük bir kısmının etrafında konsantrik lamellar yapıda düzenlenen miyelin kılıfı oluşturduğu belirlendi. Schwann hücre çekirdeklerinin oval veya yuvarlak şekilli olduğu ve heterokromatin yapısı içerdiği görüldü. Schwann hücre çekirdeklerinin miyelinsiz aksonlarda merkezi yerleştiği ancak miyelinli aksonlarda sitoplazmanın daha fazla bulunduğu alanda yerleştiği izlendi. Schwann hücre sitoplazmasında golgi aygıtı, endoplazmik retikülüm sisternaları, ribozom ve lizozomların varlığı tespit edildi. Ayrıca bu organel yapılarının kontrol grubuna benzer şekilde normal ince yapı özelliklerini korumuş oldukları görüldü. Miyelinli sinir liflerinde aksoplazmada nörofilamentler, agranüler endoplazmik retikülüm, nörofilamentler, nörotübüller ve mitokondriyonların normal ince yapıda oldukları izlendi. Miyelinli ve miyelinsiz aksonların arasında, kollajen liflerden zengin fibröz bağ dokusu bulunduğu görüldü. Bu kollajen liflerin üretiminden sorumlu olan fibroblastlar ise interaksonal bölgelerde iğ şekilli, heterokromatik yapıda çekirdekleri ile ayırt edildi. Ayrıca kontrol grubuna benzer olarak bağ dokuda çok sayıda kapiller damarın bulunduğu tespit edildi (Şekil 49).



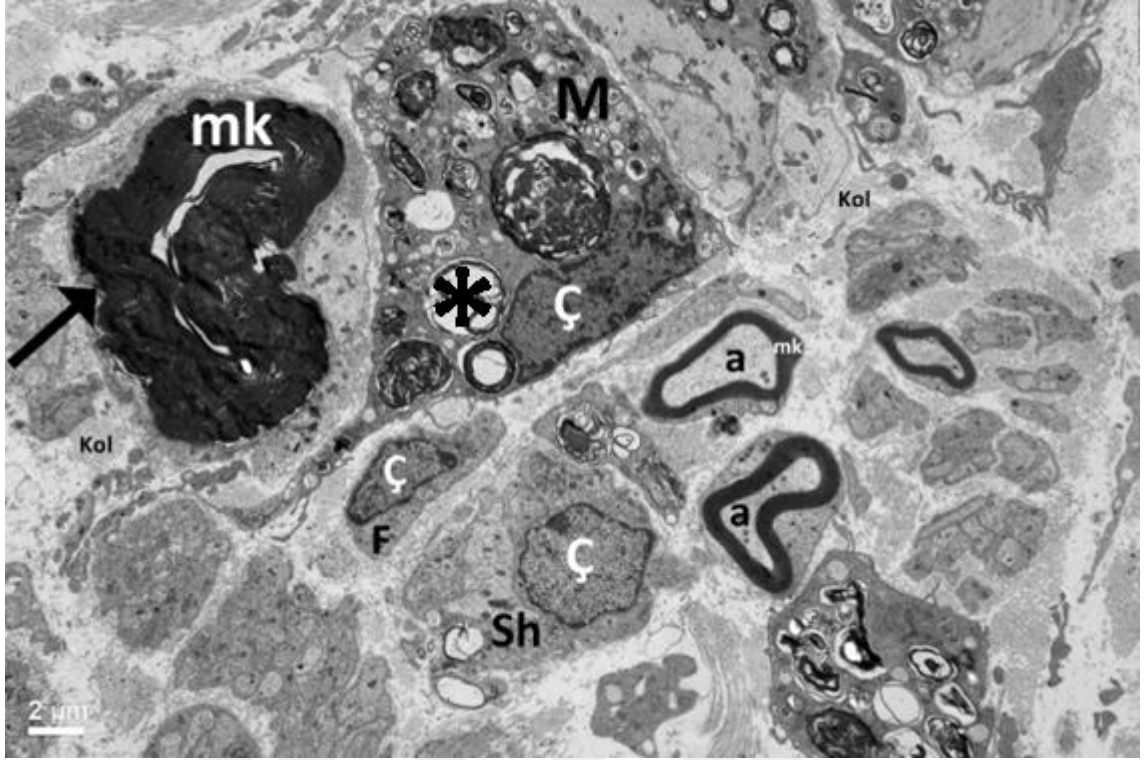
Şekil 49. Sham operasyon grubundan alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü.

Miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfın (mk) normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Schwann hücre (Sh) çekirdeklerinin (Ç) oval şekilli heterokromatin yapıda olduğu izlenmektedir. Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülü halde bulunan miyelinsiz aksonlar (Ma) görülmektedir. Aksonlar arası alanlarda bulunan kollajen liflerin (Kol) normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Bar = 2µm.

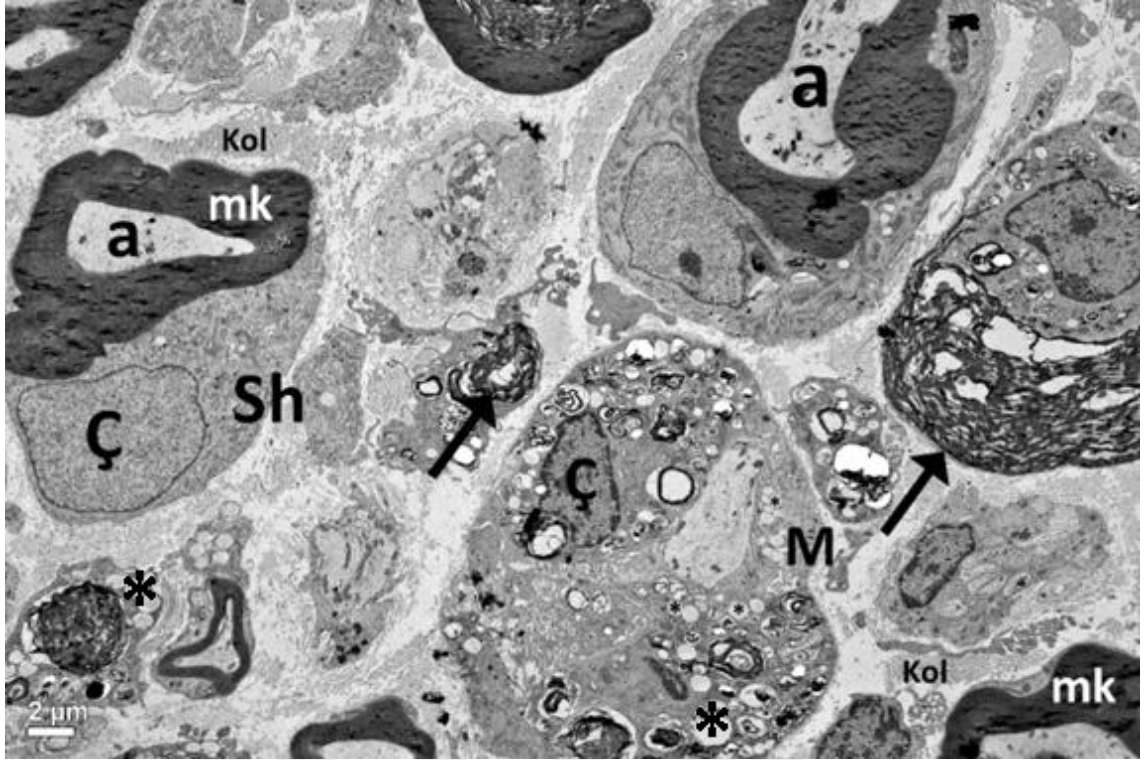
4.5.3. Deney Kontrol Grubu

Deney kontrol grubuna ait sıçanlardan 7 ve 14. günlerde elde edilen sinir dokularının elektron mikroskopik incelemesinde, her iki alt grupta da bazı alanlarda akson ve miyelin kılıfta normal histolojik yapının korunduğu görülmekle birçok alanda miyelin kılıf yapısında şiddetli bozulmalar olduğu görüldü. Miyelin kılıfı oluşturan konsantrik lamellar yapının bozulduğu izlendi. Çoğu alanda miyelin kılıfın akson içerisine doğru invajinasyon oluşturduğu, bunun yanı sıra bazı alanlarda da miyelin kılıf lamellar yapısının bozularak akson dışına doğru evaginasyon gösterdiği görüldü. Çoğu miyelinli sinir lifinde aksonla miyelin kılıf arasında vakuollerin olduğu, bazı alanlarda ise aksonda büzüşmelerin görüldüğü tespit edildi. Miyelinsiz aksonların genellikle normal histolojik yapılarını koruduğu buna karşılık bazı alanlarda dejeneratif değişiklikler içerdiği görüldü. Schwann hücrelerinde çoğu alanda çekirdekte kromatin artışı olduğu ve sitoplazma içerisindeki organel yapılarının dejeneratif değişiklikler sergilediği, özellikle sitoplazmada vakuolizasyonun artmış olduğu izlendi. Miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin aralarında yer alan bağ dokuda özellikle dejenerasyonun şiddetli olduğu alanlarda çok sayıda makrofajın bulunduğu tespit edildi. Makrofaj sitoplazması içerisinde fagosite edilen miyelin kılıf artıkları ve lipid damlacıklarının varlığı dikkati çekti. Ayrıca dejenerasyon alanlarında bağ dokusu içerisinde mast hücreleri ile çok sayıda kapiller damar bulunduğu tespit edildi (Şekil 50, 51).

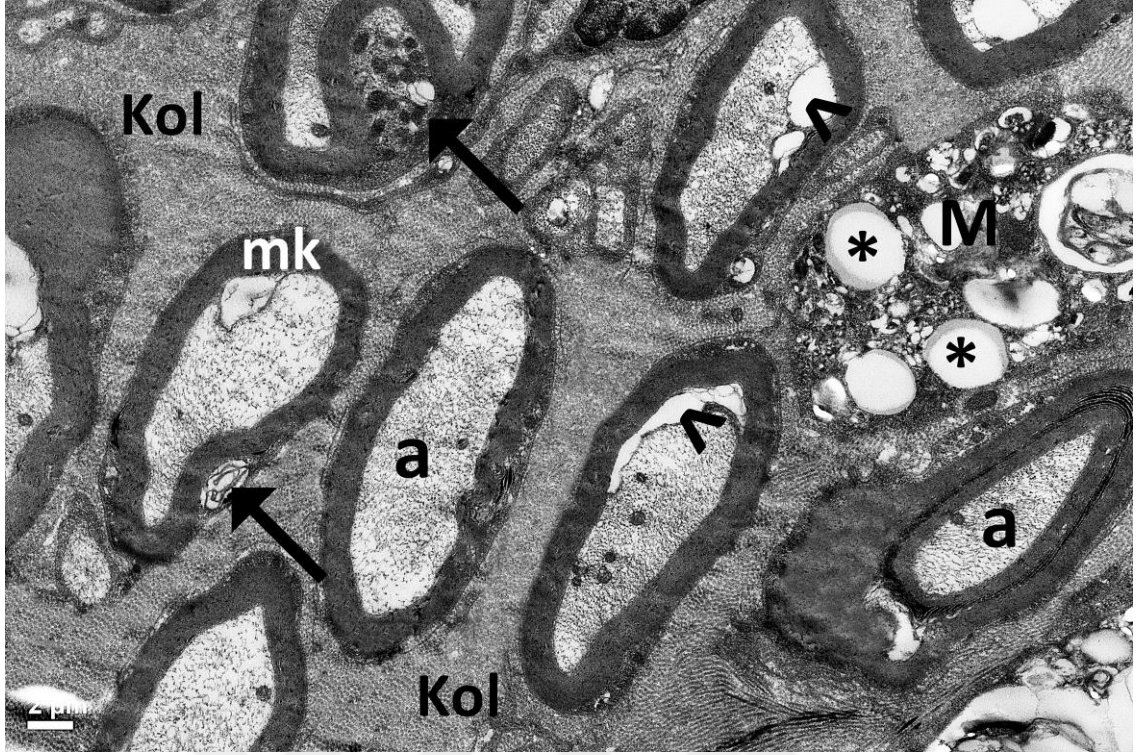
Deney kontrol grubuna ait sıçanlardan sinir hasarından 21 gün sonra elde edilen sinir dokuları elektron mikroskopik olarak değerlendirildiğinde özellikle miyelinli sinir liflerinde çoğu alanda aksoplazma ve miyelin kılıfta ultrastrüktürel değişikliklerin var olduğu, buna karşılık 7. ve 14. güne kıyasla bu dejeneratif değişikliklerin bazı alanlarda nispeten azalmış olduğu tespit edildi. Miyelinli aksonlarda, miyelin kılıfın düzenli konsantrik lamellar yapısının bozulduğu ve kılıfın yer yer akson içerisine doğru invajine olduğu izlendi (Şekil 52).



Şekil 50. Deney kontrol grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Dejeneratif alanlarda Schwann hücreleri (Sh), makrofajlar (M) ve fibroblast hücreleri (F) ile bunların çekirdeklerinin (Ç) bulunduğu izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfın (mk) düzenli lamellar yapısının bozulduğu (ok), şiddetli dejeneratif değişiklikler gösterdiği ve yer yer akson içerisine invajine olduğu görülmektedir. Bu bölgelerde bulunan makrofajların sitoplazmasında fagosite edilen miyelin kılıf artıkları ve lipid damlacıkları (*) dikkati çekmektedir. Aksonlar arası alanda bulunan kollajen liflerin (Kol) bulunduğu görülmektedir. Bar = 2μm.



Şekil 51. Deney kontrol grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelin kılıfının (mk) düzenli konsantrik lamellar yapısının bozulduğu (oklar) ve yer yer akson (a) içerisine doğru invajine olduğu izlenmektedir. Dejeneratif değişikliklerin 7. güne kıyasla azalmış olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu bölgelerde yoğun makrofaj (M) varlığı izlenmektedir. Makrofajlar, sitoplazmalarında fagosite edilen miyelin kılıf artıkları ve lipid damlacıklarıyla (*) birlikte görülmektedir. Sinir liflerinin arasındaki bağ dokuda kollajen lifler (Kol) gözlemlenmektedir. Schwann hücresi (Sh) ve çekirdeği (Ç) izlenmektedir. Bar = 2µm.

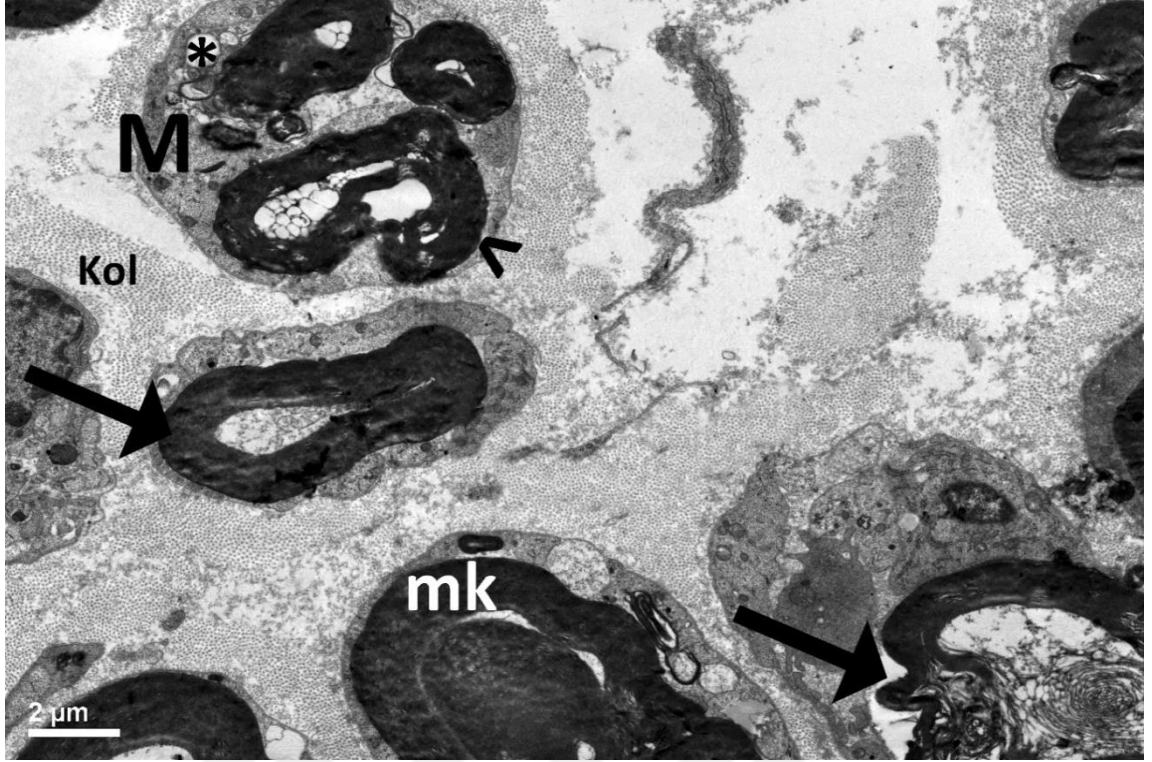


Şekil 52. Deney kontrol grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde çoğu alanda aksoplazma ve miyelin kılıfta (Mk) ultrastrüktürel değişikliklerin hala mevcut olduğu tespit edilmektedir. Miyelin kılıfın düzenli konsantrik lamellar yapısının bozulduğu yer yer akson içerisine doğru invajine olduğu (oklar) ve bazı alanlarda aksoplazmada büzüşmelerin (ok başları) gerçekleştiği gözlenmektedir. Aksonlar arası alanlarda içerisinde fagosite edilmiş miyelin kılıf artıkları ve lipid damlacıklarıyla (*) birlikte makrofajlar (M) izlenmektedir. Sinir liflerinin arasındaki bağ dokuda kollajen lifler (Kol) gözlemlenmektedir. Bar = 2 μ m.

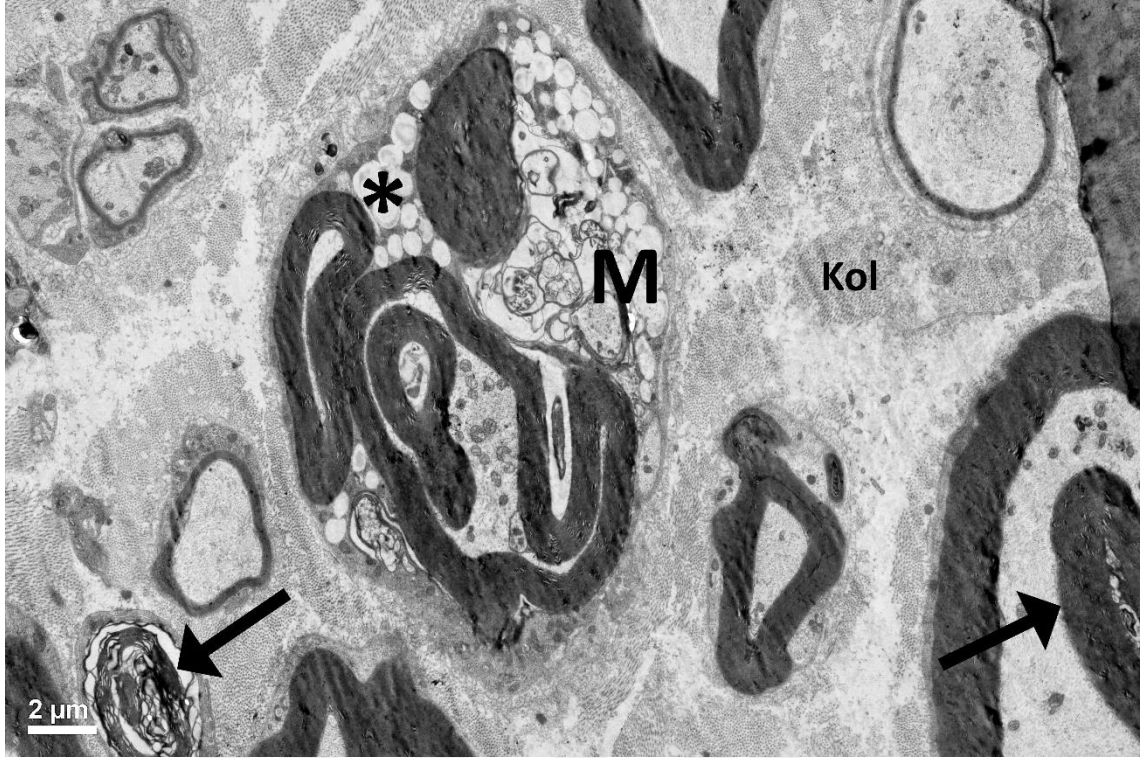
4.5.4. Diklofenak Sodyum Tedavi Grubu

Diklofenak sodyum tedavi grubundan, hasardan sonra 7. günde elde edilen siyatik sinir doku örneklerinin elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesinde, miyelinli sinir liflerinde çoğu alanda miyelin kılıf lamellar yapısının dejeneratif değişiklikler gösterdiği, bazı alanlarda akson içerisine doğru invajinasyon yaptığı görüldü. Deney kontrol grubuna oranla nispeten azalmış olmakla birlikte, bu grupta da birçok alanda aksonla miyelin kılıf arasında vakuollerin oluştuğu, aksoplazmada büzüşmelerin olduğu izlendi. Miyelinsiz sinir liflerinin genel olarak normal ince yapılarını korudukları tespit edildi. Dejeneratif bölgelerde kapiller damar sayısının arttığı görüldü. Sinir liflerinin aralarındaki bağ dokuda yer alan fibroblastların, makrofaj ve mast hücreleri gibi enflamatuvar hücrelerin dejenerasyon bölgelerine yakın alanlarda arttığı, makrofajların dejenere miyelin kılıf artıklarının fagositte ettiği ve sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacığı bulunduğu izlendi. Ayrıca dejeneratif bölgelerde bulunan Schwann hücrelerinde ise deney kontrol grubuna benzer şekilde çekirdekte kromatinin yoğunlaştığı ve organel yapılarında dejeneratif değişiklikler bulunduğu görüldü (Şekil 53).

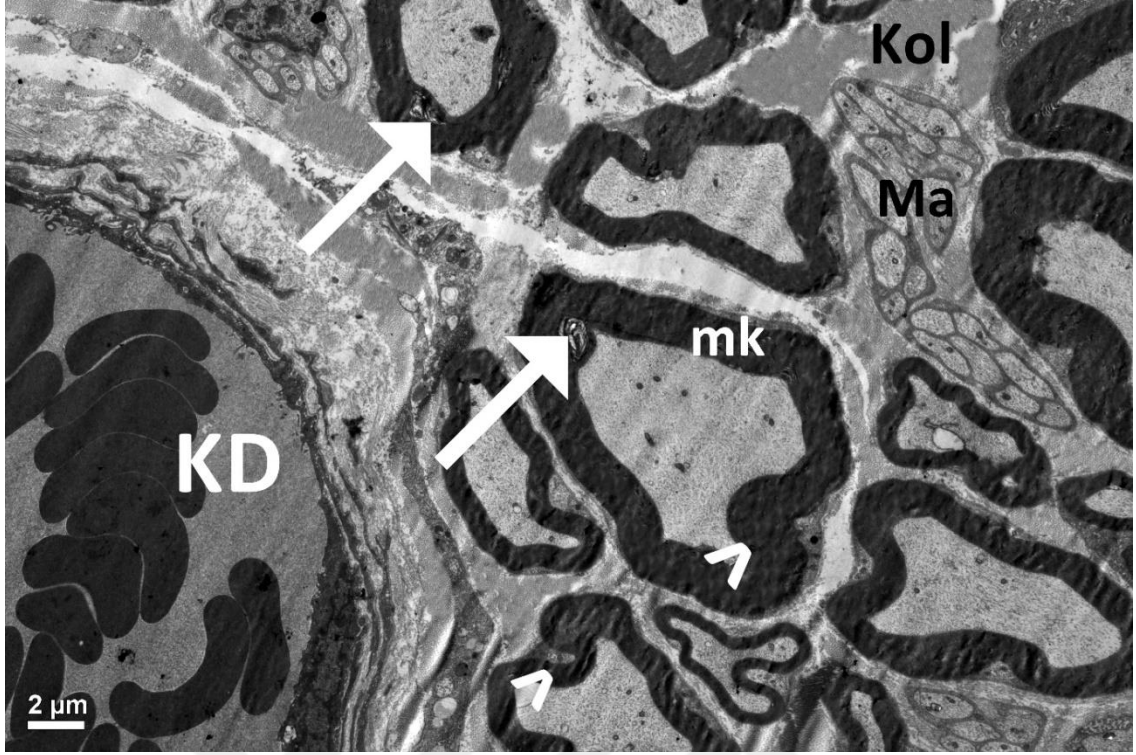
Diklofenak sodyum tedavi grubundan 14. ve 21. günde alınan dokuların elektron mikroskopik incelemesinde, aksoplazmada organel yapılarında ve akson etrafındaki miyelin kılıfın konsantrik lamellar yapısında dejeneratif değişiklikler görülmekle birlikte, bu dejeneratif değişikliklerin aynı grubun 7 günlük alt grubuna oranla nispeten azalmış olduğu görüldü. Özellikle 21 günlük grupta miyelinli sinir liflerinde hafif fokal değişiklikler var olmakla birlikte çoğu alanda sinir lifleri ve onları saran Schwann hücrelerinin normal ince yapıda oldukları dikkati çekti (Şekil 54, 55).



Şekil 53. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf (mk) lamellar yapısında bozulmalar ve akson içerisine invajinasyonlar olduğu (ok) izlenmektedir. Sitoplazmasında miyelin kılıfı fagosit etmiş makrofajlar (M), miyelin kılıf kalıntıları (ok başı) ve lipid damlacıkları (*) izlenmektedir. Aksonlar arasında bağ dokuda kollajen lifler (Kol) görülmektedir. Bar = 2μm.



Şekil 54. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli aksonlarda (a), miyelin kılıf (mk) lamellar yapısında bozulmalar ve invajinasyonlar (oklar) olduğu izlenmektedir. Sitoplazmasında miyelin kılıfı fagosit etmiş makrofajlar (M), miyelin kılıf kalıntıları ve lipid damlacıkları (*) izlenmektedir. Aksonlar arası alanda bağ dokuda kollajen lifler (Kol) görülmektedir. Bar = 2μm.

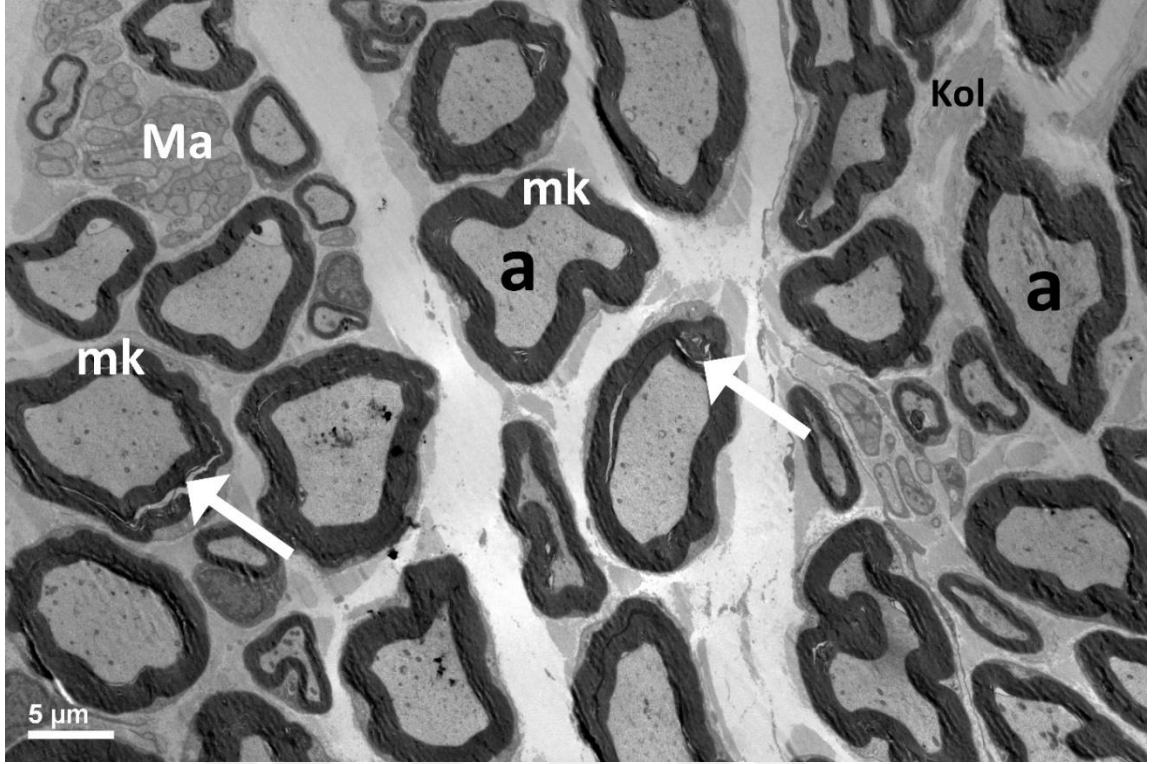


Şekil 55. Diklofenak sodyum tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelin kılıf (mk) yapısında diğer 2 güne kıyasla az olmakla birlikte aksoplazma içerisine doğru yer yer invajinasyonlar (ok başları) ile bazı alanlarda lamellar yapının bozulduğu (oklar) izlenmektedir. Dejenerasyon bölgesinde bulunan kan damarı (KD) yapısı görülmektedir. Miyelinsiz aksonların (Ma) genel olarak normal ince yapılarını korudukları izlenmektedir. Aksonlar arası alanda bağ dokuda kollajen lifler (Kol) görülmektedir. Bar = 2µm.

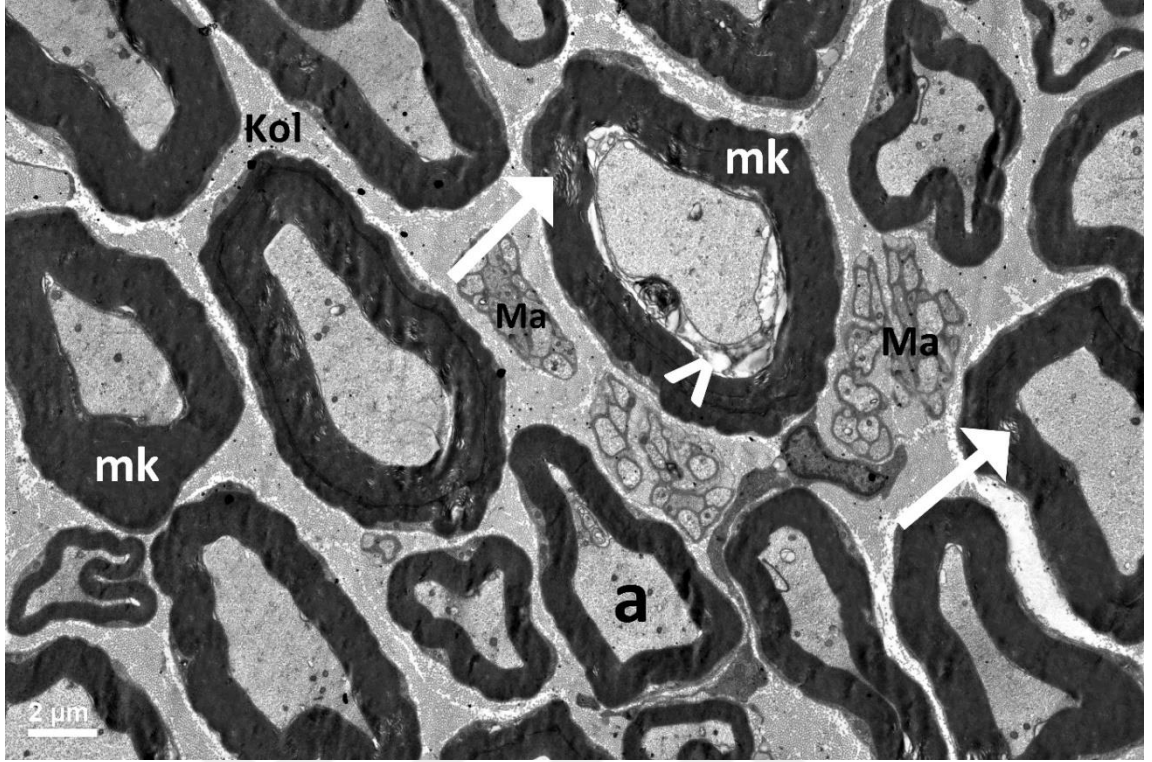
4.5.5. Zonisamide Tedavi Grubu

Siyatik sinir hasarından sonra zonisamide tedavisi uygulanan gruba ait sinir dokularının elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesinde, 7 günlük grupta, bazı miyelinli sinir liflerinde, akson etrafında yer alan miyelin kılıfın normal lamellar yapısının bozulduğu, miyelin kılıf ve aksonun dejeneratif değişiklikler gösterdiği izlenmekle birlikte, miyelinli sinir liflerinin çoğu alanlarda rejenere oldukları ve akson ve miyelin kılıf yapıları ile normal görünümde oldukları kaydedildi. Sinir liflerinin aralarında bulunan bağ dokudaki fagositik hücrelerin, akson ve miyelin yıkıntılarını fagositte ettikleri dikkati çekti. Deney kontrol grubu ve diklofenak sodyum tedavisi uygulanan grupla kıyaslandığında zonisamide tedavisi uygulanan bu grupta rejeneratif alanların artmış olduğu görüldü (Şekil 56).

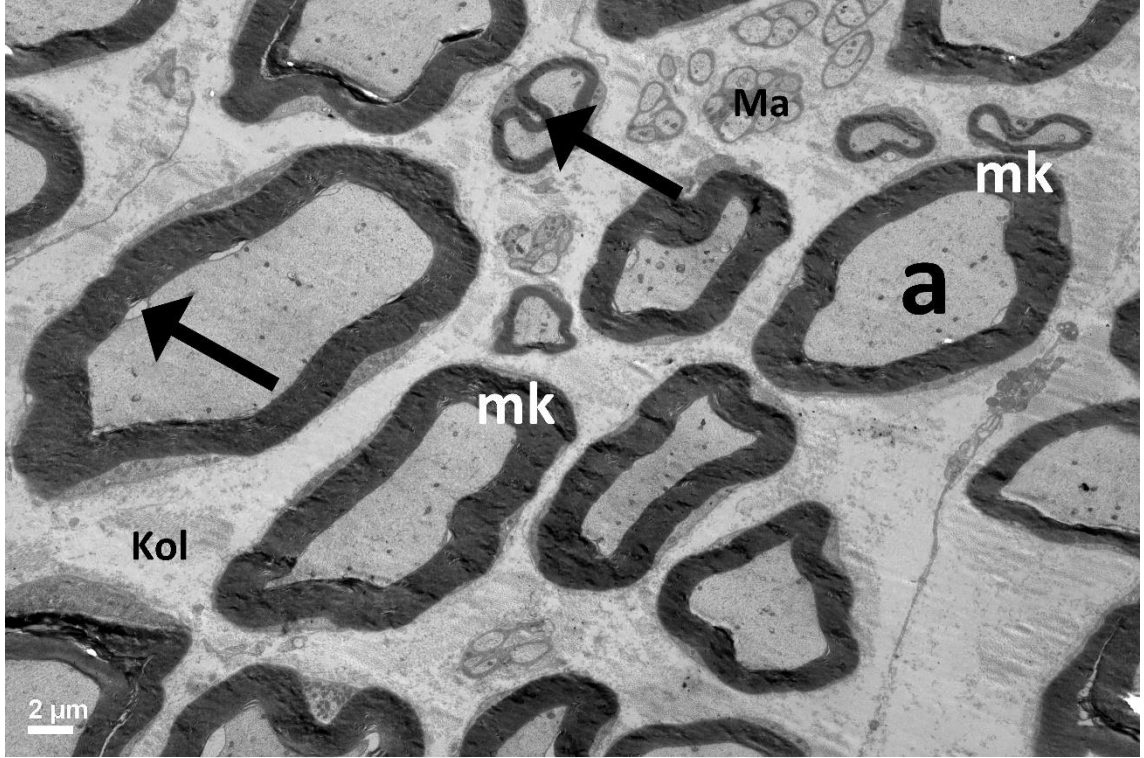
Siyatik sinir hasarı sonrası zonisamide tedavisi uygulanan bu grubun 14 ve 21 günlük alt gruplarının elektron mikroskopik olarak incelenmesinde, 7 günlük grupla kıyaslandığında miyelinli sinir liflerinde aksoplazmadaki organellerin, aksonun etrafındaki miyelin kılıfın yapısının, sinir liflerini saran Schwann hücrelerinin birçok alanda normal ince yapıda olduğu görüldü. Bazı alanlarda miyelin kılıfın akson içine invajinasyonu, akson dışına evaginasyonu gibi fokal dejeneratif değişiklikler var olmakla birlikte, deney kontrol ve tek başına diklofenak sodyum tedavisi uygulanan gruba oranla iyileşmenin arttığı izlendi. Sinir liflerinin aralarındaki bağ dokuda kapillerlerin, fibroblastların ve kollajen liflerin yer aldığı görüldü (Şekil 57, 58).



Şekil 56. Zonisamide tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinin ve miyelin kılıf (mk) yapısının dejeneratif değişikliklere sahip olduğu, yer yer lamellar yapının bozulduğu (oklar) gözlemlenmektedir. Bununla birlikte, çoğu alanda akson (a) ile miyelin kılıfın normal histolojik görünümde olduğu izlenmektedir. Miyelinsiz sinir liflerinin (Ma) Schwann hücre sitoplazmasına gömülü halde normal histolojik yapıda olduğu görülmektedir. Sinir liflerinin arasındaki bağ dokuda kollajen lifler (Kol) gözlemlenmektedir. Bar = 5µm.



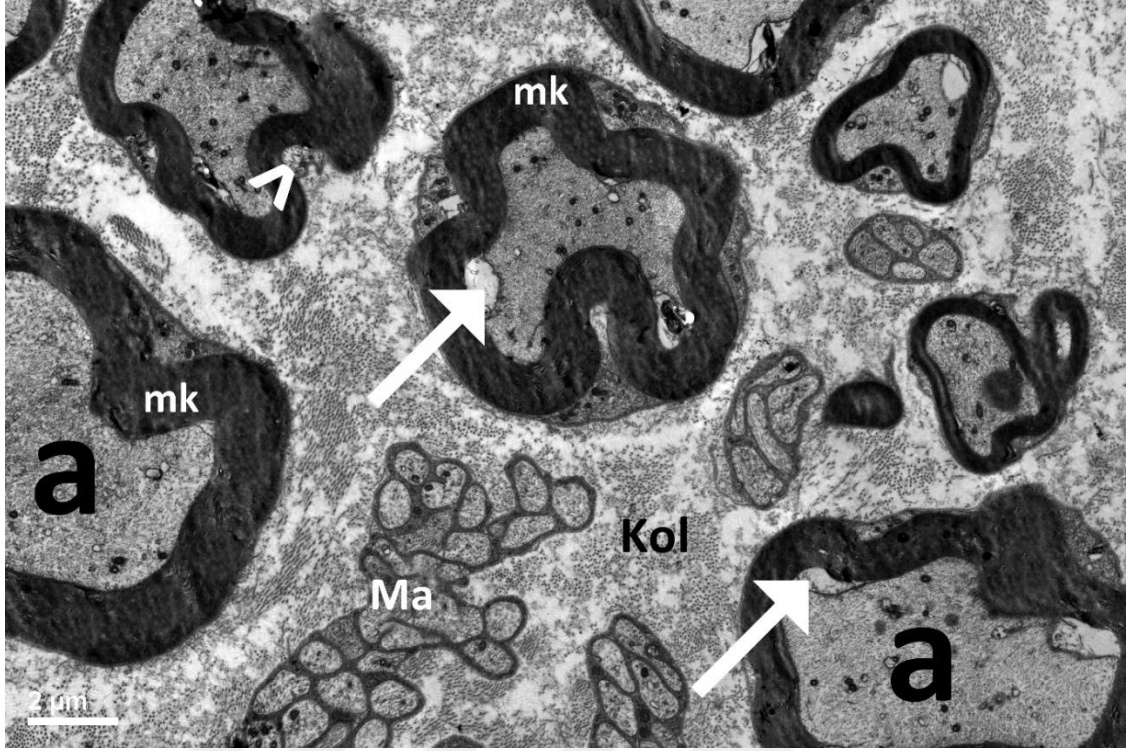
Şekil 57. Zonisamide tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde iyileşmenin devam ettiği görülmektedir. Miyelinli sinir liflerinde aksoplazmadaki organellerin ve aksonun etrafındaki miyelin kılıf (mk) yapısının birçok alanda normal yapıda olduğu izlenmektedir. Bazı bölgelerde miyelin kılıfın lamellar yapısının bozulması (oklar) ve akson (a) içine invajinasyonu gibi bölgesel dejeneratif değişiklikler görülmektedir. Ayrıca yer yer aksoplazmada büzüşmelerin (ok başı) meydana geldiği görülmektedir. Miyelinsiz sinir liflerinin (Ma) Schwann hücre sitoplazmasına gömülü halde normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Sinir liflerinin arasındaki bağ dokuda kollajen lifler (Kol) gözlemlenmektedir. Bar = 2µm.



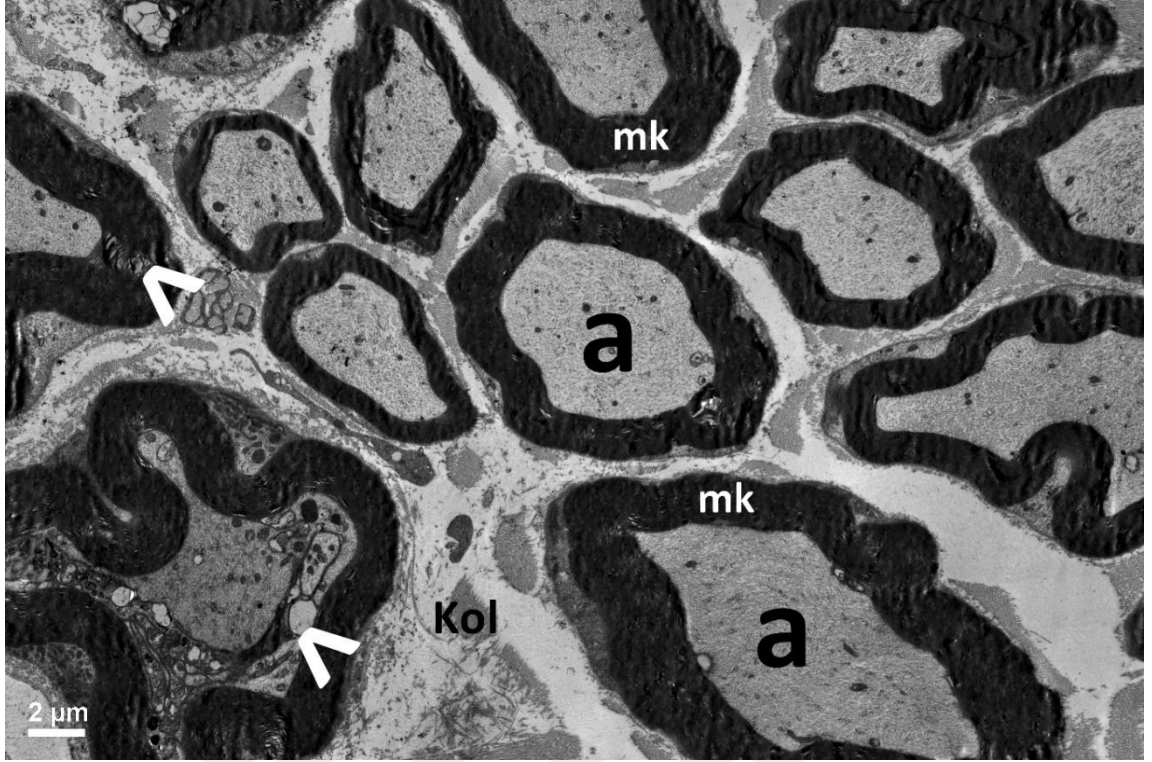
Şekil 58. Zonisamide tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde aksoplazmadaki organellerin ve aksonun (a) etrafındaki miyelin kılıf (mk) yapısının çoğunlukla normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Buna karşılık bazı bölgelerde hala fokal dejeneratif değişiklikler (oklar) gözlemlenmektedir. Miyelinsiz sinir liflerinin (Ma) Schwann hücre sitoplazmasına gömülü halde normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Sinir liflerinin arasındaki bağ dokuda kollajen lifler (Kol) gözlemlenmektedir. Bar = 2μm.

4.5.6. Zonisamide ve Diklofenak Sodyum Kombine Tedavi Grubu

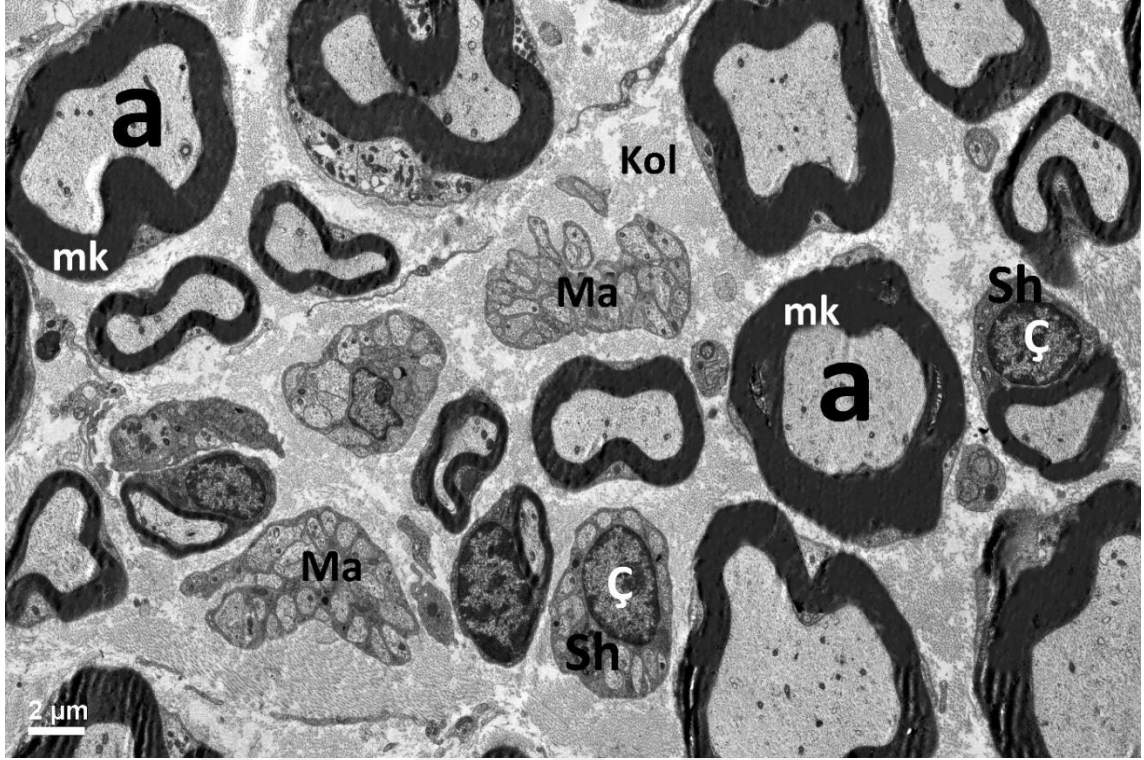
Siyatik sinir hasarı sonrası zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavisi uygulanan gruptan 7. Günde elde edilen sinir dokularının elektron mikroskopik incelenmesinde bazı alanlarda Schwann hücrelerinde heterokromatin artışı, bazı aksonlarda mitokondriyonlarda yapısal bozukluklar ve fagozom içeren makrofajlara rastlansa da çoğu alanlarda sinir liflerinin akson ve miyelin kılıf yapıları ile normale yakın görünümde oldukları görüldü. Miyelinsiz sinir liflerinde aksonların Schwann hücre sitoplazmasına gömülü olarak bulundukları ve genellikle normal yapılarını korudukları izlendi (Şekil 59). Kombine tedavi uygulanan bu grubun 14 ve 21 günlük alt gruplarında kontrol grubuna benzer şekilde miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin çoğu alanda normal histolojik yapıda oldukları görüldü. Aksoplazmada mitokondriyonlar, nörotübül ve nörofilamanlar normal ince yapıdaydı. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfın konsantrik lamellar yapısının çoğu alanda korunmuş olduğu, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerini saran Schwann hücrelerinin de çekirdek ve organelleriyle normal görünümde olduğu izlendi. Sinir liflerinin aralarında, sitoplazmasında fagosit edilen materyal içeren makrofajlara bu grupta da rastlandı. Makrofaj sitoplazmalarında, lizozomlar, lipid damlacıkları görüldü (Şekil 60, 61).



Şekil 59. Kombine tedavi grubundan 7. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinsiz sinir liflerinde (Ma) aksonların Schwann hücre sitoplazmasına gömülü olarak bulundukları ve normal yapılarını korudukları izlenmektedir. Bazı alanlarda miyelin kılıfın (mk) akson (a) içerisine doğru invajine olduğu görülmektedir. Yer yer aksonla miyelin kılıf arasında vakuollerin olduğu ve aksoplazmada büzüşmelerin olduğu (oklar) izlenmektedir. Sinir liflerinin arasındaki bağ dokuda kollajen lifler (Kol) gözlemlenmektedir. Bar = 2µm.



Şekil 60. Kombine tedavi grubundan 14. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli aksonlarda (a) miyelin kılıfın (mk) konsantrik lamellar yapısının çoğu alanda korunmuş olduğu, buna karşılık bazı alanlarda dejeneratif değişikliklerin bulunduğu (ok başları) görülmektedir. Miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin çoğu alanda normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Sinir liflerinin arasındaki bağ dokuda kollajen lifler (Kol) gözlemlenmektedir. Bar = 2μm.



Şekil 61. Kombine tedavi grubundan 21. günde alınan siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli aksonlarda (a) miyelin kılıfın (mk) konsantrik lamellar yapısının çoğu alanda korunmuş olduğu, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerini (Ma) saran Schwann hücrelerinin (Sh) de çekirdek (Ç) ve organelleriyle normal görünümde olduğu izlenmektedir. Sinir liflerinin arasındaki bağ dokuda kollajen lifler (Kol) gözlemlenmektedir. Bar = 2µm.

5. TARTIŞMA

Deneyisel siyatik sinir hasarı sonrası zonisamide ve diklofenak sodyumun ayrı ayrı ve kombine tedavilerinin, enflamasyon ve sinir rejenerasyonuna olan etkilerinin immünohistokimyasal, histomorfometrik ve moleküler biyolojik yöntemlerle incelendiği bu çalışmada, iNOS ve COX-2 ekspresyonlarının, siyatik sinir hasarı sonrasında Schwann hücreleri, enflamatuvar hücreler ve kapiller endotel hücrelerinde arttığı bulundu. Deney kontrol grubunda her iki enflamasyon markırının da ekspresyonlarının 7. günde en yüksek seviyede olduğu, 14. ve 21. günlerde ise azaldığı dikkati çekti. Diklofenak sodyum tedavisi uygulanan grubun, mikroskopik düzeyde deney kontrol grubuna benzer sonuçlar gösterdiği, bununla birlikte, diklofenak sodyum tedavisinin özellikle COX-2 ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya neden olduğu belirlendi. Tek başına zonisamide ile tedavi edilen ve diklofenak sodyum ile zonisamide kombine tedavisi uygulanan gruplarda yaralanmayı takiben iNOS ve COX-2 ekspresyonlarının azaldığı görüldü. Özellikle kombine tedavi uygulanan grupta iNOS ve COX-2 ekspresyonlarının 7. günden itibaren diğer deney gruplarına oranla anlamlı ölçüde azaldığı görüldü. Tüm gruplardan elde edilen siyatik sinir dokularından alınan yarı ince kesitlerin toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda histomorfometrik analizler açısından değerlendirilmesinde deney kontrol grubunda miyelinli sinir lifi sayısının kontrol grubuna göre azaldığı ve bu azalmanın özellikle 7. günde belirgin olduğu tespit edildi. Diklofenak sodyum tedavi grubunda 7., 14. ve 21. günlerde miyelinli sinir lif sayıları incelendiğinde kontrole göre azalmış olduğu, deney kontrol grubuna benzer sonuçlar gösterdiği belirlendi. Buna karşılık diklofenak sodyum tedavisi verilen grubun 7, 14 ve 21 günlük alt grupları kendi aralarında miyelinli sinir lifi sayıları açısından karşılaştırıldığında, 21. günde miyelinli sinir lifi sayısının 7. güne kıyasla arttığı tespit edildi. Tek başına zonisamide uygulanan grup ve zonisamide ile diklofenak sodyum kombine tedavi grubunda ise, her 3 günde de deney kontrol ve diklofenak sodyum tedavi gruplarına göre miyelinli sinir lifi sayısında anlamlı artış olduğu ve bu artışın en yüksek 21. günde olduğu belirlendi. Elektron mikroskopik incelemelerde, deney kontrol grubunda çoğu alanda miyelin kılıfta konsantrik lamellar düzenlenmenin bozulduğu, kılıfın akson içerisine doğru invajine olduğu, miyelinli ve miyelinsiz liflerin aralarındaki bağ dokuda enflamatuvar hücrelerin yaygın olarak

bulunduğu izlendi. Makrofaj sitoplazmalarında fagosite edilmiş miyelin kılıf artıkları ile lipid damlacıklarına rastlandı. Bu dejeneratif değişikliklerin 21. günde nispeten daha az olduğu tespit edildi. Diklofenak sodyum tedavi grubunun elektron mikroskopik değerlendirmesinde de deney kontrol grubuna benzer olarak özellikle 7. günde çoğu alanda miyelin kılıf yapısında dejeneratif değişiklikler olduğu, aksoplazmadaki organellerde harabiyetin olduğu görüldü. Buna karşılık diklofenak sodyum tedavi grubundan 14 ve 21. günde alınan dokuların elektron mikroskopik incelemesinde, aynı grubun 7. günü ile deney kontrol grubunun 7., 14. ve 21. günleriyle kıyaslandığında, çoğu alanda akson ve miyelin kılıfta dejenerasyonun varlığı izlense de rejeneratif alanların artmış olduğu belirlendi. Tek başına zonisamide tedavisi uygulanan grup ve kombine tedavi gruplarında ise deney kontrol ve diklofenak sodyum tedavi gruplarına kıyasla akson ve miyelin kılıfta rejenerasyonun belirgin derecede artmış olduğu gözlemlendi. Her iki grupta da bu iyileşmenin özellikle 21. günde en yüksek düzeye ulaştığı görüldü. Miyelinizasyonun değerlendirilmesi amacıyla Krox-20 gen ekspresyonu seviyelerine bakıldığında, siyatik sinir hasarı sonrası Krox-20 ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. Özellikle kombine tedavi uygulaması sonrası Krox-20 gen ekspresyonunun zaman içinde artarak kontrol ve sham gruplarına benzer seviyelere ulaştığı görüldü. Bu bulgular, kombine tedavi uygulanmasının Krox-20 gen ekspresyonu üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. p75NTR gen ekspresyonunun ise siyatik sinirde hasar oluşumu sonrasında arttığı gözlemlendi. Kombine tedavinin özellikle 14. ve 21. günlerde p75NTR ekspresyonunda anlamlı bir artış sağladığı fakat tek başına zonisamide ve tek başına diklofenak sodyum tedavisi uygulanan gruplarda bu artışın daha sınırlı olduğu belirlendi. Bu bulgular, diklofenak sodyum ile zonisamide kombine tedavisinin sırasıyla aksonal filizlenme ve miyelin kılıf oluşumu ile ilişkili p75NTR ve Krox-20 gen ekspresyonlarının artışını uyardığını bu nedenle siyatik sinir hasarından sonra akson rejenerasyonu ve miyelinizasyonda potansiyel olarak etkin bir tedavi protokolü oluşturmak üzere kullanılabileceğini düşündürmüştür.

PSH, ciddi ve uzun süreli fonksiyonel ve fizyolojik yetersizliklere yol açarak, insan sağlığını ve yaşam kalitesini bozan nörolojik bir bozukluktur (119). Periferik sinir hasarından sonra meydana gelen rejenerasyonun moleküler mekanizmaları hakkındaki bilgiler her geçen gün artmasına rağmen, PSH günümüzde hala önemli bir sağlık

problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (120). Miyelinli sinir lifleri, farklı tür ve şiddette maruz kalınan ezilme tipi hasar ile kolayca zarar görebilecek hassas yapılardır. Bu yapılar beyin ile hedef organ ve kaslar arasında yer aldığından, burada meydana gelen hasarlar iletişimsel bozukluklara neden olabilmektedir (121). Sinir hasarı iatrojenik ve travmatik nedenler gibi birçok sebepten kaynaklanabilmektedir (122, 123). PSH'nin büyük bir çoğunluğu, yetersiz sinir iyileşmesi, duysal ve motor fonksiyon kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bu durum kendini kas atrofisi, kronik ağrı ve zayıflama ile göstermektedir (38). İyileşme sürecinde yeniden oluşan akson filizleri, distal motor uç bölgelerini innerve edebilmek için yavaş bir hızda (1-3 mm/gün) uzun mesafeler boyunca rejenerasyon göstermelidir (124). Bu nedenle PSH'de rejenerasyon süreci zaman alabilmektedir. Ayrıca, sinir dokusunun geniş alanlarda kayba uğraması ve sinirlerin uzun süreli denervasyonu rejenerasyonu olumsuz etkileyen faktörler olup, bu süreç innerve edilen organların geri dönüşümsüz atrofisine yol açarak daha kötü sonuçlara sebep olabilmektedir. (125, 126). Günümüzde, PSH tedavisinde, ileri mikrocerrahi yöntemler ile epinöral dikişler kullanılarak uçtan uca anastomoz yapılmakta, anastomozun mümkün olmadığı durumlarda ise otolog sinir greftleri tercih edilmektedir (127). Yaralanma sonrası, iyileşen hastaların yarısından daha azında tama yakın motor veya duysal fonksiyonel iyileşme görülebilmektedir. Bununla birlikte uygun cerrahi müdahalelere rağmen hastaların üçte birinden daha fazlası, az iyileşme gösterebilmekte veya hiçbir iyileşme gösterememektedir. Bu nedenle, PSH hastalarında fonksiyonel iyileşmeyi sağlayabilmek amacıyla, terapötik ve yardımcı stratejiler geliştirmek üzere yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (128). Periferik sinir hasarı sonrasında meydana gelen enflamatuvar reaksiyonların rejenerasyon ve dejenerasyon süreçleri üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Hasar sonrası, makrofajlar, nötrofiller ve lenfositler gibi enflamatuvar hücrelerin yaralanma bölgesine göç etmesi ile enflamasyon süreci başlamaktadır (129). Bu hücreler, yaralanma bölgesindeki hücresel kalıntıların ve dejenere miyelin kılıf atıklarının temizlenmesinde Schwann hücrelerine yardımcı olmakta ve rejenerasyon sürecine katkıda bulunan sitokinler ile büyüme faktörlerini salgılamaktadırlar (56). Enflamasyon, periferik sinir hasarı sonrası hem rejenerasyonu destekleyen hem de dejenerasyona katkıda bulunan bir süreç olarak iki yönlü işlev görebilir. Enflamatuvar hücrelerin salgıladığı büyüme faktörleri ve sitokinler, sinir liflerinin büyümesini ve rejenerasyonunu teşvik etmektedir (32).

Bununla birlikte, aşırı ve devamlı enflamasyon, sinir hasarının artmasına ve dejenerasyonun hızlanmasına yol açarak, nöronların ve sinir liflerinin fonksiyonlarını bozabilmektedir (130). Bu nedenle, periferik sinir hasarının tedavisi için enflamasyonun dikkate alınması ve yönetilmesi önemlidir. Dikkatli bir enflamasyon kontrolü, periferik sinir hasarı sonrası rejenerasyonu destekleyebilir ve dejenerasyon sürecini yavaşlatabilir (131).

PSH'nin proenflamatuvar mediyatörler olan COX-2 ve iNOS ifadelerinde artışa neden olabileceği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (15, 132-134). Özellikle COX-2'nin yaralanma bölgesinde güçlü bir şekilde arttığı ve enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (132). Ayrıca COX-2'nin, periferik sinirde oluşan enflamasyondan sonra merkezi sinir sisteminde gri ve beyaz madde içindeki non-nöronal hücrelerde ve leptomeninks içerisinde bulunan kan damarlarında da eksprese olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (135). Araştırmacılar PSH'nin, nöropatik ağrının erken gelişim aşamasında spinal kord ve periferik sinirlerde COX-2 ve iNOS ekspresyonlarında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (15, 133, 134, 136). Yapılan bir çalışmada iNOS ekspresyonu yetersiz olan farelerde, periferik sinirin hasara verdiği yanıtın ve akson rejenerasyonunun gecikmesi ile birlikte, miyelinli liflerde Wallerian dejenerasyonunun yavaşlaması gibi belirtiler gözlemlenmiştir (134). Lin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise siyatik sinir hasarından sonra iNOS ifadesinin, sıçanlarda hem mRNA, hem de protein düzeyinde önemli ölçüde yükseldiği ve 7. günde zirveye ulaştığı, ardından tekrar azaldığı gösterilmiştir (136). Bizim çalışmamızda da Lin ve arkadaşlarının bulgularına benzer olarak, periferik sinir hasarından sonra iNOS ekspresyonunun 7. günde çok yüksek olduğu, 14 ve 21. günlerde ise 7. güne oranla belirgin olarak azaldığı bulunmuştur. Ayrıca araştırmacılar iNOS tarafından üretilen nitrik oksit, sinir hasarından sonra periferik nöronal rejenerasyona katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir (137). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda sinir hasarından sonra aşırı iNOS ekspresyonunun sinir rejenerasyonunu engelleyebildiği gösterilmiştir (136, 138). Erken aşamada, büyük miktarda nitrik oksit, hücrelere zarar verebileceği ve hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak için apoptozisi indükleyebileceği bildirilmiştir (139). Bu nedenle araştırmacılar iNOS inhibitörlerinin PSH tedavisinde kullanılabileceğini ve PSH'nin erken dönemlerinde sinir rejenerasyonunu kolaylaştırabileceğini düşünmüşlerdir (136). Günümüze kadar

yapılan çalışmalarda, araştırmacılar, proenflamatuvar bir molekül olan COX-2'nin sinir hasarı sonrasında arttığını, bu nedenle COX-2 inhibitörlerinin PSH'den sonra enflamasyon ve oksidatif stresi azaltmak için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. COX-2 inhibitörü kullanımının sinir liflerinin yenilenme sürecine yardımcı olabileceğini ve fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırabileceğini belirtmişlerdir (140-142). Yapılan çalışmalarda COX-2 inhibitörü olan Celecoxib'in, sıçanlarda siyatik sinir yaralanmasından sonra fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (140, 141). Ayrıca başka bir çalışma, COX-2 inhibitörü olarak GW406381'in, ezilme tipi sinir hasarından sonra sıçanların sural sinirlerinde nöropatik ağrıyı azalttığını göstermiştir (143). Aynı zamanda, başka bir araştırmada, seçici bir COX-2 inhibitörü olan etodolağın, kısmi siyatik sinir ligasyonundan sonra farelerde pençe geri çekme eşiğindeki azalmayı kısmen veya tamamen tersine çevirdiği gösterilmiştir (140). Ganesh ve arkadaşları ise ağrılı sinir kökü basısı oluşturmada önce COX-2 inhibitörü ile ön tedavi uygulamış ve bu durumun spinal kortda enflamasyonu ve periferik sinirlerde oksidatif stresi azaltarak ağrı gelişimini önlediğini öne sürmüşlerdir (142). Bu nedenle araştırmacılar, celecoxib, etodolak, diklofenak sodyum ve meloksikam gibi seçici COX-2 inhibitörlerinin, PSH'den sonra enflamasyon ve oksidatif stresi azaltmak için kullanılabileceğini ve böylece rejenerasyon sürecine yardımcı olarak, fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırabileceğini düşünmüşlerdir (140-142). Sunulan bu çalışmada, literatürdeki çalışmalara paralel olarak, siyatik sinir hasarından sonra COX-2 inhibitörü diklofenak sodyum uygulanan tedavi grubunda, COX-2 ekspresyonunun tedavi uygulanmayan deney kontrol grubuyla kıyaslandığında azalmış olduğunu görüldü. Bu azalmanın tedaviyle birlikte 7. günden itibaren başladığı, 14 ve 21. günlerde ise COX-2 ekspresyonun 7. güne oranla daha da azalmış olduğu bulundu. Bu durum diklofenak sodyumun enflamasyonu azaltarak siyatik sinirin rejenerasyon sürecine katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür. Kakita ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diklofenak sodyumun, mikrogliya kültürlerinde proenflamatuvar sitokinlerle sinerjik etki göstererek iNOS ve NO üretimine neden olduğu, sonuç olarak mikrogliyal fagositik aktivitenin uyarılmasına yol açtığı gösterilmiştir. Araştırmacılar bu bulgular varlığında influenza ilişkili ensefalopatide diklofenak sodyum kullanımının önemli bir mortalite artışına neden olabileceğini düşünmüşlerdir (144). Sunulan çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre diklofenak sodyum verilen tedavi gruplarında deney gruplarına

benzer şekilde iNOS üretiminin arttığı tespit edildi. Bu bulgular Kakita ve arkadaşlarının bulgularını destekler niteliktedir. Çalışmada kullandığımız nöroprotektif özellikleri olan, aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdığı bilinen zonisamide'in gerek tek başına gerekse diklofenak sodyumla kombine olarak verildiği gruplarda iNOS ekspresyonunu azalttığı görüldü. Bu durum diklofenak sodyum sebebiyle artmış olan iNOS ekspresyonunun zonisamide tarafından inhibe edildiğini ve zonisamide'in diklofenak sodyuma karşıt etki göstererek iNOS inhibitörü olarak davrandığını düşündürmüştür.

Başka bir çalışmada ise iNOS inhibitörü olan Aminogüadinin'in (AG) sıçanlarda pati ödemi modeli üzerinde diklofenak sodyumun antienflamatuvar etkinliğini belirgin şekilde arttırdığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, AG'nin NO üretimini inhibe etmesinin diklofenak sodyumun etkinliğinin artmasında rol oynadığını düşünmüşlerdir (145). Nitekim bizim çalışmamızda da bununla uyumlu olarak, kombine tedavi uyguladığımız grupta COX-2 ekspresyonunun, tek başına zonisamide ve diklofenak sodyum uygulanan diğer tedavi gruplarına oranla daha da azalmış olduğu görüldü. Bu durum bize, zonisamide'in diklofenak sodyumun COX-2'yi inhibe ederek gösterdiği antienflamatuvar etkisini arttırmış olabileceğini düşündürdü. Noda ve arkadaşları, zonisamide'in potansiyel etki mekanizmaları arasında aşırı NO üretiminin inhibisyonunun yer aldığını bildirmişlerdir. Yapılan deneysel çalışmalar, zonisamide'in hipokampüste NO sentazı inhibe ettiğini ve NO oluşumunun azaltılması yoluyla nöroprotektif bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu araştırmacılar, zonisamide'in nöroprotektif etkilerinin, antioksidan ve NO modüle edici etkileriyle ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir (146). Araştırmamızdan elde ettiğimiz bulgulara, Noda ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlara benzer olarak, yalnızca zonisamide uygulanan grupta ve diklofenak sodyumla birlikte zonisamide verilen kombine tedavi gruplarında, iNOS ekspresyonunun azaldığı belirlendi. Bu durum, diklofenak sodyum sebebiyle artmış olan iNOS ekspresyonunun zonisamide kullanılarak inhibe edilmesinin, siyatik sinir hasarından sonra miyelinli sinir lifi rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşme üzerine etkili olabileceği hipotezimizi destekler nitelikteydi.

Arias JA ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, kronik alkol maruziyeti olan sıçanların hipokampüsünde zonisamide'in COX-2 ifadesini azalttığı bildirilmiştir. Çalışma, zonisamide'in hipokampüste COX-2 ve diğer enflamatuvar

aracılarn ifadesini azaltarak nöroprotektif etkilerini gösterdiğini öne sürmektedir (147). Sunulan çalışmamızda COX-2 ifadesinin hem zonisamide hem de kombine tedavi gruplarında, deney kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Bu azalmanın kombine tedavi grubunda belirgin olduğu bulundu. Özellikle 21. günde hem zonisamide grubu hem de kombine tedavi grubunda, COX-2 ekspresyonunun kontrol grubuna benzer olarak minimal düzeyde olduğu görüldü. Bu bulgular Arias ve arkadaşlarının hipokampüste yaptığı çalışmanın sonuçlarıyla örtüşmekte ve zonisamide'in siyatik sinirde COX-2 ekspresyonunu azalttığını, dahası kombine tedavi olarak diklofenak sodyumla birlikte kullanıldığında, diklofenak sodyumun COX-2'yi inhibe edici antienflamatuvar etkisini arttırdığını göstermektedir.

Periferik sinir hasarından sonra zonisamide ve diklofenak sodyumun ayrı ayrı ve kombine tedavilerinin enflamasyon üzerine olan etkilerinin yanısıra, miyelinli sinir lifi sayıları ve yeniden miyelinizasyon üzerine olan etkilerini de araştırdığımız çalışmamızda, miyelin kılıf oluşumu ile ilgili gen olan Krox-20 ekspresyonlarını da değerlendirdik. Deney kontrol grubunda, tamamen sağlam olan kontrol grubu ile tedavi gruplarına oranla miyelinizasyon markırı Krox-20'nin anlamlı olarak azalmış olduğunu gösterdik. Bizim çalışmamıza uygun olarak Nagarajan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sinir hasarı sonrasında Krox-20 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar Schwann hücrelerindeki Krox-20 eksikliğini, hücrelerin dediferansiye olmasına ve miyelin yapısının bozulmasına neden olabileceğini düşünmüşlerdir (148). Periferik sinir sistemi glial hücreleri ile ilgili yapılan bir çalışmada ise Schwann hücrelerinde Krox-20'nin hasar sonrası tekrar arttığı, periferik sinir hasarı sonrası remiyelinizasyon sürecinde önemli olduğu rapor edilmiştir. Bu süreçte, Krox-20'nin, miyelinizasyonu düzenleyen diğer genlerin aktivasyonunu da kontrol ettiği belirtilmiştir (91, 149). Bu bulgular çalışmamızda deney kontrol grubundan alınan dokulardan elde ettiğimiz Krox-20 ekspresyon seviyelerinin azalmasını destekler niteliktedir. Yapılan bir çalışmada Krox-20'nin, sinir hasarı sonrasında periferik sinirlerin remiyelinizasyonu üzerine olan etkilerinin BACE1 geninin baskılanmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (150). Başka bir çalışmada ise araştırmacılar Krox-20 transkripsiyon faktörünün, periferik sinir miyelinizasyonunu düzenlediğini ve c-Jun ve Sox2 ile zıt roller oynadığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar Krox-20 geni susturulmuş farelerdeki Schwann hücrelerinin, normal miyelin kılıfı oluşturmamış olduğunu bildirmişlerdir

(89). Buna karşılık Parkinson ve arkadaşları Krox-20'nin aşırı üretilmesinin, JNK/c-Jun aktivasyonunu engellediğini, Schwann hücrelerinin büyüme ve ölüm faktörlerine verdiği tepkileri değiştirdiğini ve bu sayede Schwann hücrelerinin aktif durumdan miyelin üreten sessiz duruma geçişini düzenlediğini açıklamışlardır (90). Decker ve arkadaşları ise, yaptıkları çalışmada Krox-20'nin susturulmasının, Schwann hücrelerinin farklılaşmasının tersine dönmesine ve hücre çoğalmasına yol açtığını tespit etmişlerdir (91). Yapılan deneysel çalışmalarda Krox-20'nin, birçok miyelin ve lipid üretimi ile ilgili genin promotor bölgelerine doğrudan bağlandığını, hücredeki proteinler ve DNA arasındaki etkileşimi araştırmak için kullanılan bir tür immün presipitasyon deneysel tekniği olan, ChIP deneyi ile gösterilmiştir (151, 152). Ayrıca, Krox-20 bağlantı noktası olarak görev yapan asetillenmiş histon bölgesi H3K27'deki değişiklikler belirlendiğinde, periferik sinir yaralanmasının ardından birçok H3K27 bölgesinin asetilasyonunu kaybettiği gösterilmiştir (153). Bu bilgilere karşılık, güncel bir çalışma Krox-20'nin aşırı ekspresyonunun Schwann hücre miyelinizasyonunu in vitro ortamda artırdığını, ancak hücre nakli yapılan farelerde in vivo ortamda miyelinizasyonu azalttığını göstermektedir (154). Araştırmacılar bu çelişkili bulguların, Krox-20'nin biyolojik işlevlerinin rejenerasyon sürecindeki diğer faktörlerden etkilenebileceğini gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar C-Jun ve Sox2'nin Krox-20'yi baskımlarken, Krox-20'nin de karşılıklı olarak c-Jun ve Sox2'yi baskıladığını ve böylece sinirin yeniden filizlenmesinin birden fazla faktörün koordineli etkileşimiyle gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir(155). Bu bulgular ışığında araştırmacılar, Schwann hücrelerinin yeniden programlanması ve miyelinizasyonun temel düzenleyicisi olarak fonksiyon gören Krox-20'nin, periferik sinir hasarından sonra fonksiyonel iyileşmeyi ve aksonal rejenerasyonu uyarmak üzere umut vadeden bir hedef markır olarak kullanılabileceğini düşünmektedirler(156). Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında, siyatik sinir hasarı sonrası Krox-20 ekspresyonunun azaldığı ve tedavi uygulanan gruplarda bu ekspresyonun zamana bağlı olarak artış gösterdiği görülmektedir. Bu durum, Krox-20'nin remiyelinizasyon ve fonksiyonel sinir iyileşmesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Krox-20 ekspresyonunun, tedavi uygulanan gruplarda zamanla artış göstermesi, bu tedavilerin sinir hasarı sonrası miyelinizasyon süreçlerini olumlu yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir. Kombine tedavi grubunda 14. ve 21. günde Krox-20 gen ekspresyonunun kontrol ve sham gruplarına benzer seviyelere ulaşması,

kombine tedavinin sinir iyileşmesine ve remiyelinizasyon sürecine olumlu katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Zonisamide uygulanan grupta da 21. günde Krox-20 ekspresyonu deney kontrol grubu ve diklofenak sodyum grubuna oranla anlamlı bir artış gösterdi. Bu da bize zonisamide tedavisinin nöroprotektif etkilerinden dolayı zamana bağlı olarak miyelinizasyonu arttırdığını, diklofenak sodyumla kombine verildiğinde ise bu etkilerin daha erken dönemde ortaya çıktığını gösterdi. Bu sonuçlar, Krox-20' nin periferik sinir hasarından sonra miyelinizasyon, aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel sinir iyileşmesinin değerlendirilmesinde potansiyel bir hedef markır olarak kullanılabileceğini desteklemektedir. Özellikle Krox-20, c-Jun ve Sox2 gibi transkripsiyon faktörlerinin karmaşık etkileşimleri, sinir yeniden büyümesi ve remiyelinizasyon süreçlerinde çok yönlü düzenleyici roller oynadığını göstermektedir. Bu faktörlerin bir araya gelerek hücre çoğalması, farklılaşma ve miyelinizasyon süreçlerini düzenlediği düşünülmektedir. Dolayısıyla, bu transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu ve dengeli etkileşimlerinin sağlanması, periferik sinir hasarı tedavisinde önemli bir strateji olarak değerlendirilebilir. Farklı tedavi yöntemlerinin bu süreçleri etkileyerek sinir hasarının iyileşmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

p75NTR, MSS'de olduğu gibi Schwann hücrelerinde de öncelikle gelişim sırasında ve yaralanma sonrasında ifade edilmektedir. Schwann hücrelerinin ana işlevi, periferik aksonları miyelin kılıfla kaplamaktır ve bu süreç, hücre çoğalması, hücre göçü, miyelin proteinlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesi ve sonunda aksonların miyelinle kaplanması da dahil olmak üzere iyi düzenlenmiş bir diferansiyasyon programı gerektirmektedir. Özellikle beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), gelişim sırasında ve yaralanma sonrasında (157) periferik sinir miyelinizasyonu üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (158, 159). Cosgaya ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada p75NTR'nin BDNF'nin miyelinizasyon üzerindeki etkisini düzenlemedeki rolü incelenmiş ve dorsal kök ganglion (DRG) nöronları ile Schwann hücrelerinin kokültürleri kullanılarak in vitro ve p75NTR susturulmuş fareler ile yabani tip farelerin karşılaştırılmasıyla in vivo olarak incelenmiştir. Araştırmacılar bu incelemeler sonucunda, p75NTR susturulmuş farelerin miyelin kılıflarının, yabani tip farelerinkinden önemli ölçüde daha ince olduğunu bildirmişlerdir (159). Aynı araştırmacılar periferik sinirlerde, p75NTR baskılayıcı antikorların kullanılmasının, hipomiyelinizasyona neden olduğunu, tam tersi p75NTR'nin stimüle edilmesinin ise

miyelinizasyonda artışa yol açtığını öne sürmüşlerdir(159). Çalışmamızda p75NTR'nin hasar sonrası 7. günde artmaya başladığı 14. ve 21. günlerde ise bu artışın kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı olduğu bulundu. Bu bulgular literatürle uyumludur. Ayrıca elektron mikroskopik görüntüler incelendiğinde hasar sonrası 14. ve 21. günlerde elde edilen dokularda çoğu alanda miyelin kılıfta dejeneratif değişiklikler bulunmasına rağmen 7. güne kıyasla bu değişikliklerin nispeten azalmış olduğu görüldü. Bu bulgular incelendiğinde çalışmamızın sonuçları Cosgaya ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmayla benzerlik göstermektedir. Hasarlı sinir hücreleri ve çevreleyen destek hücrelerinin (glial hücreler) etkileşimi, sinir onarımının sonucunu belirlemektedir. Zhou ve arkadaşları p75NTR'nin, bu rejeneratif süreçte önemli bir rol oynadığını ve dengeleyici bir molekül görevi gördüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar tarafından p75NTR'nin bir yandan, sinir hücrelerinde miyelinle ilişkili inhibe edici faktörlerin sinyallerini ileterek sinir hücre uzantılarının (nörit) kaybolmasına yol açtığı, diğer yandan, sinir hücre uzantılarının büyümesinde nörotrofinler için bağımsız bir reseptör olarak çalıştığı ve sinir onarımı için olumlu bir sinyal görevi yaptığı belirtilmiştir (160). Sunulan bu çalışmada deney kontrol grubu ve diklofenak sodyum uygulanan tedavi gruplarında p75NTR'nin zamana bağlı kısmi artış gösterdiği belirlendi. Buna karşılık zonisamide ve kombine tedavi gruplarındaki artışın diklofenak sodyum tedavi grubu ve deney kontrol grubuyla kıyaslandığında 14. ve 21. günlerde daha anlamlı olduğu belirlendi. Elektron mikroskopik görüntüler incelendiğinde ise bu günlerde zonisamide ve kombine tedavi gruplarında dejeneratif alanların azaldığı, Schwann hücreleri ile miyelinli ve miyelinsiz liflerin normal histolojik yapılarını korumuş oldukları görüldü. Bu bulgular Zhou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya benzer olarak p75NTR'nin aksonal filizlenme ve miyelin oluşumu üzerine olumlu etkileri olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir (160).

Sunulan çalışmada, periferik sinir hasarından sonra diklofenak sodyum ve Zonisamide tedavilerinin ayrı ayrı ve kombine uygulamalarının, enflamasyon, aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel sinir iyileşmesi üzerine olan etkileri immünohistokimyasal, elektron ve ışık mikroskopik düzeyde incelenmiş, ayrıca moleküler biyoloji ve histomorfometrik analizler de uygulanarak değerlendirilmiştir. Literatürde bugüne kadar, PSH' den sonra meydana gelen enflamasyon üzerine zonisamide ile diklofenak sodyumun ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmasının etkisini gösteren bir çalışmaya

rastlanmamıştır. Elektron mikroskopik değerlendirmeler sonucunda özellikle kombine tedavi uygulanan grupta 7. Günden itibaren miyelinli sinir liflerinde rejenerasyonun görülmesi ve bu rejeneratif alanların 14. ve 21. günlerde daha artmış olması kombine tedavinin aksonal iyileşme üzerine olan olumlu etkilerini göstermektedir. Zonisamide tedavisi ve kombine tedavi uyguladığımız gruplarda özellikle 21. günde miyelinli akson sayılarındaki artış da elektron mikroskopik bulgularımızı destekler niteliktedir. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf ve aksoplazmada görmüş olduğumuz rejenerasyonun ve miyelinli sinir liflerindeki artışın, zonisamide'in nöroprotektif, antioksidan etkileri ve diklofenak sodyumun antienflamatuvar etkilerinden kaynaklandığını söylemek yanlış olmayacaktır. Çalışmamızda proenflamatuvar moleküller olan iNOS ve COX-2 seviyelerinin PSH oluşturulan gruplarda arttığı, bu artışın özellikle hasarı takiben 7. günde yüksek olduğu ortaya konulmuştur. PSH'den sonra diklofenak sodyum verilen tedavi gruplarında iNOS seviyelerinin hasar sonrası 7. günde yüksek olmakla birlikte 14. ve 21. günlerde kısmen azaldığı belirlenmiştir. Ancak bu bulgular deney kontrol grubuyla kıyaslandığında aralarındaki farkın anlamlı olmadığı görülmüştür. Zonisamide verilen gruplara bakıldığında ise deney kontrol ve diklofenak sodyum tedavi gruplarına kıyasla hem iNOS hem COX-2 seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı ve bu durumun en belirgin 21. günde gerçekleştiği görülmüştür. Kombine tedavi grubunda da zonisamide tedavi grubuna benzer sonuçlar elde edilmiştir. iNOS ve COX-2 ekspresyonunun daha çok dejenerasyonunun yüksek olduğu alanlarda Schwann hücrelerinde, enflamatuvar hücrelerde ve endotel hücrelerinde belirgin olduğu gösterilmiştir. Literatüre uygun olarak diklofenak sodyum uygulanmasının iNOS ekspresyonunu arttırdığı, buna karşılık zonisamide ile kombine olarak uygulandığında iNOS ekspresyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum bize zonisamide'in iNOS inhibitörü gibi davrandığını düşündürmüştür. Kombine tedavi uygulanan grupta COX-2 ekspresyonunun da anlamlı olarak azalmış olması zonisamide'in diklofenak sodyumun antienflamatuvar etkilerini daha da güçlendirdiğini düşündürmüştür. Kombine tedavi grubunda 14 ve 21. günlerde, zonisamide grubunda 21. günde diğer tedavi gruplarına kıyasla miyelinizasyon markırı Krox-20 ve aksonal büyümeyi gösteren p75NTR ekspresyonlarındaki anlamlı artışın da zonisamide'in nöroprotektif, antioksidan ve diklofenak sodyumun antienflamatuvar özelliğini uyarıcı etkilerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde periferik sinir hasarı sonrasında ilk defa uygulanan zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavisinin, enflamatuvar reaksiyonları azalttığını, aksonal filizlenme ve yeniden miyelin oluşumunu arttırdığını, miyelinli sinir lifi sayılarında artışa neden olduğunu, dolayısı ile akson rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşme üzerine olumlu etkiler gösterdiğini söyleyebiliriz. Daha ileri moleküler araştırmalarla bu kombine tedavinin periferik sinir hasarının onarılmasında potansiyel bir tedavi protokolü olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz.



6. SONUÇLAR

Deneyisel periferik sinir hasarı sonrasında zonisamide ve diklofenak sodyum tedavisinin ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmasının enflamasyon ve sinir iyileşmesi üzerine etkilerinin ultrastrüktürel, immünohistokimyasal, histomorfometrik ve moleküler biyolojik yöntemlerle incelendiği bu çalışma sonucunda:

1. Hasar oluşturulmayan kontrol grubu ve yalnızca siyatik sinirin açığa çıkartılıp tekrar kapandığı sham operasyon gruplarının ışık ve elektron mikroskopik incelenmesinde miyelinli sinir liflerinde aksoplazmadaki organellerin, nörotübül ve nörofilamanların, aksonun etrafındaki konsantrik lamellar yapıdaki miyelin kılıfın ve miyelini oluşturan Schwann hücrelerinin normal yapılarını korudukları,
2. Kontrol ve sham gruplarının immünohistokimyasal incelemelerinde bu gruplardan alınan siyatik sinir doku örneklerinde, iNOS ve COX-2 ekspresyonlarının minimal seviyede olduğu ve kapiller endotel hücrelerinde görüldüğü,
3. qRT-PCR değerlendirmelerinde kontrol ve sham gruplarında, siyatik sinir doku örneklerinde Krox-20 ekspresyonlarının yüksek seviyede olduğu, p75NTR ekspresyonlarının ise minimal düzeyde olduğu görüldü.
4. PSH oluşturulduktan sonra yalnızca, serum fizyolojik verilen deney kontrol grubunun ışık ve elektron mikroskopik değerlendirmelerinde, 7. ve 14. günlerde, siyatik sinir doku örneklerinde miyelinli sinir lifi sayısının azaldığı, miyelinli sinir liflerinde aksoplazmadaki organellerde ve aksonun etrafındaki miyelin kılıfta yapısal dejeneratif değişikliklerin yaygın olduğu ve bu dejeneratif değişikliklerin 21. günde nispeten daha az olduğu,
5. Deney kontrol grubunda özellikle 7. ve 14. günlerde iNOS ve COX-2 ekspresyonlarının enflamatuvar hücreler ile kapiller endotel hücrelerinde yüksek olduğu, ancak 21. günde her iki sitokin immünoreaktivitesinin nispeten azaldığı,

6. Deney kontrol grubunda 7. ve 14. günlerde Krox-20 ekspresyonunun kontrol ve sham operasyon grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı, buna karşılık p75NTR ekspresyonunun kontrol ve sham operasyon gruplarına kıyasla özellikle 14 ve 21. günlerde artmış olduğu görüldü.
7. PSH oluşturulduktan sonra diklofenak sodyum tedavisi uygulanan grubun ışık ve elektron mikroskopik incelemelerinde, özellikle 7 ve 14. günlerde miyelinli sinir lifi sayısının deney kontrol grubuna benzer şekilde azalmış olduğu görüldü. Miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıf arasında vakuol oluşumları, miyelin kılıfın konsantrik lamellar yapısında bozulmalar, Schwann hücrelerinde heterokromatin artışı ve organellerde kısmi dejeneratif değişikliklerin olduğu, bu değişikliklerin 21. günde daha hafif seyrettiği ve bu günde miyelinli sinir lifi sayılarının da artmış olduğu bulundu.
8. Diklofenak sodyum tedavi grubunda özellikle 7. ve 14. günlerde iNOS ekspresyonunun enflamatuvar hücreler ve endotel hücrelerinde yüksek olduğu, 21. günde bu iki güne kıyasla enflamatuvar hücrelerde bu ekspresyonun azaldığı, COX-2 ekspresyonunun ise enflamatuvar hücrelerde ve endotel hücrelerinde 7. günde yüksek olduğu, 14. günde azalmış olduğu ve 21. günde ise ekspresyonun minimal düzeyde olduğu,
9. Diklofenak sodyum tedavi grubunda Krox-20 ekspresyonunun kontrol ve sham operasyon gruplarına kıyasla ve deney kontrol grubuna benzer olarak 7. ve 14. günlerde azaldığı, p75NTR ekspresyonunun ise 14. Ve 21. günlerde kontrol ve sham operasyon gruplarına kıyasla anlamlı olarak arttığı görüldü.
10. PSH oluşturulduktan sonra zonisamide tedavisi uygulanan grubun ışık ve elektron mikroskopik incelemelerinde, miyelinli sinir lifi sayısının deney kontrol ve diklofenak sodyum tedavi gruplarına kıyasla anlamlı derecede arttığı bu artışın en belirgin 21. günde olduğu bulundu. Miyelinli sinir liflerinde aksoplazma ve miyelin kılıfta bazı alanlarda dejeneratif değişiklikler hala görülmekle birlikte bu değişikliklerin özellikle 14 ve 21. günlerde çok daha az olduğu izlendi.

11. Zonisamide tedavi grubunda iNOS ekspresyonunun enflamatuvar hücrelerde 7., 14. ve 21. günlerde diklofenak sodyum grubuna oranla azaldığı, bu ekspresyonda anlamlı azalmanın 21. günde görüldüğü izlendi. COX-2 ekspresyonunun 7. Ve 14. günlerde enflamatuvar hücreler ve endotel hücrelerinde diklofenak sodyum grubuna benzer şekilde olduğu 21. Günde ise ekspresyonun minimal düzeyde olduğu görüldü.
12. Zonisamide tedavi grubunda Krox-20 ekspresyonunun deney kontrol grubuna kıyasla özellikle 21. Günde artış gösterdiği, ekspresyonun kontrol ve sham gruplarına yaklaştığı görüldü. p75NTR ekspresyonundaki artışın kontrol ve sham operasyon gruplarına kıyasla 14. Ve 21. günlerde anlamlı olduğu 21. günde bu artışın en yüksek seviyede olduğu belirlendi.
13. PSH oluşturulduktan sonra zonisamide ve diklofenak sodyum birlikte verilen kombine tedavi grubunun ışık ve elektron mikroskopik incelemelerinde, kontrol ve sham gruplarına benzer olarak miyelinli sinir lifi sayısının arttığı görüldü. Miyelinli sinir liflerinde aksoplazmadaki organel, nörotübül ve nörofilaman yapılarının, miyelin kılıf lamellar yapısının genel olarak çoğu alanda korunmuş olduğu izlendi.
14. Kombine tedavi grubunda iNOS ve COX-2 ekspresyonlarının kontrol grubuna benzer şekilde minimal seviyede olduğu ve bu azalmanın özellikle 14 ve 21. günde çok belirgin olduğu görüldü.
15. Kombine tedavi grubu Krox-20 ekspresyonunun deney kontrol grubuna oranla arttığı ve bu artışın en belirgin olarak 21. Günde görüldüğü bulundu. p75NTR ekspresyonunda deney kontrole oranla 14. ve 21. günlerde artışın olduğu bu artışın ise en yüksek 21. günde bulunduğu belirlendi.

Sonuç olarak periferik sinir hasarından sonra zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavisinin, enflamatuvar sitokinler olan COX-2 ve iNOS ekspresyonlarını azalttığı, miyelinli akson sayısında artışa neden olduğu, aksonal rejenerasyon ve miyelinizasyon markırları olan p75NTR ile Krox-20'yi arttırdığı görüldü. Bu durumun zonisamide'in nöroprotektif, antioksidatif etkileri ile diklofenak sodyumun antienflamatuvar etkilerinin bir araya gelmesinden kaynaklandığını; dahası bulgularımıza bakıldığında, kombine tedavi uygulanan grupta zonisamide'in iNOS

inhibitörü gibi davrandığı ve diklofenak sodyumun COX-2'yi inhibe edici antienflamatuvar özelliğini arttırdığını söylememiz yanlış olmayacaktır. Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, deneysel periferik sinir hasarı sonrası zonisamide ve diklofenak sodyum kombine tedavi uygulamasının, enflamasyonu baskılayarak, miyelinli sinir lifi sayılarında artışa neden olarak, aksonal büyümeyi ve yeniden miyelinlenmeyi indükleyerek periferik sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşmeye katkı sağlayabileceği söylenebilir. Bu alanda daha ileri düzeyde moleküler araştırmalarla, bu kombine tedavinin periferik sinir hasarının onarılması üzerine farklı etkilerinin ortaya konabileceğini ve potansiyel bir tedavi protokolü olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKÇA

1. **Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A.** A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface.* **2012**;9(67):202-21.
2. **Burnett MG, Zager EL.** Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical focus.* **2004**;16(5):1-7.
3. **Robinson LR.** Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine.* **2000**;23(6):863-73.
4. **Pagnotta A, Tos P, Fornaro M, Gigante A, Geuna S, Battiston B.** Neurotrophins and their receptors in early axonal regeneration along muscle-vein-combined grafts. *Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery.* **2002**;22(7):300-3.
5. **Martins RS, Bastos D, Siqueira MG, Heise CO, Teixeira MJ.** Traumatic injuries of peripheral nerves: a review with emphasis on surgical indication. *Arq Neuropsiquiatr.* **2013**;71(10):811-4.
6. **Seddighi A, Nikouei A, Seddighi AS, Zali AR, Tabatabaei SM, Sheykhi AR, et al.** Peripheral nerve injury: a review article. *International Clinical Neurosciences Journal.* **2016**;3(1):1-6.
7. **Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N.** Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *Journal of Neuroscience Methods.* **2003**;129(2):183-90.
8. **Takaku S, Sango K.** Zonisamide enhances neurite outgrowth from adult rat dorsal root ganglion neurons, but not proliferation or migration of Schwann cells. *Histochemistry and cell biology.* **2020**;153(3):177-84.
9. **Yagi H, Ohkawara B, Nakashima H, Ito K, Tsushima M, Ishii H, et al.** Zonisamide enhances neurite elongation of primary motor neurons and facilitates peripheral nerve regeneration in vitro and in a mouse model. *PLoS One.* **2015**;10(11):e0142786.
10. **Hausmann Ob.** Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal cord.* **2003**;41(7):369-78.
11. **Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S.** Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of disease.* **2004**;15(3):415-36.
12. **Acosta M, Luna C, Graff G, Meseguer V, Viana F, Gallar J, et al.** Comparative Effects of the Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Nepafenac on Corneal Sensory Nerve Fibers Responding to Chemical Irritation. *Investigative ophthalmology & visual science.* **2007**;48:182-8.
13. **Ong CK, Lirk P, Tan CH, Seymour RA.** An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Med Res.* **2007**;5(1):19-34.
14. **Ma W, Quirion R.** Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? *Neurosci Lett.* **2008**;437(3):165-9.
15. **Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Barrera-Oranday EA, Cabello-García AJ, García-Tamez A, Fernández-Garza NE.** Celecoxib accelerates functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* **2008**;3:25.
16. **Cryer B, Feldman M.** Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* **1998**;104(5):413-21.
17. **Kaplan AA, Yurt KK, Deniz Ö G, Altun G.** Peripheral nerve and diclofenac sodium: Molecular and clinical approaches. *J Chem Neuroanat.* **2018**;87:2-11.
18. **O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O.** Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1991**;88(24):11285-9.

19. **Pollock JS, Förstermann U, Tracey WR, Nakane M.** Nitric oxide synthase isozymes antibodies. *Histochem J.* **1995**;27(10):738-44.
20. **Förstermann U, Kleinert H.** Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **1995**;352(4):351-64.
21. **Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T.** Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* **2003**;54(4):469-87.
22. **Ross MH, Wojciech P.** *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology.* Philadelphia [etc.]: Wolters Kluwer; **2016**.
23. **Noback CR, Ruggiero DA, Strominger NL, Demarest RJ.** *The human nervous system: structure and function: Springer Science & Business Media;* **2005**.
24. **Purves D.** *Neuroscience.* Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; **2004**.
25. **FitzGerald MJT, Gruener G, Mtui E.** *Clinical neuroanatomy and neuroscience.* Edinburgh, Scotland: Saunders Elsevier; **2012**.
26. **Crossman AR, Neary D.** *Neuroanatomy: an illustrated colour text.* 5th ed. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; **2015**.
27. **Kerns J.** The microstructure of peripheral nerves. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management.* **2008**;12:127-33.
28. **Mescher AL.** *Junqueira's basic histology : text and atlas* **2013**.
29. **Jessen KR.** Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* **2004**;36(10):1861-7.
30. **Le Douarin N, Dulac C, Dupin E, Cameron-Curry P.** Glial cell lineages in the neural crest. *Glia.* **1991**;4(2):175-84.
31. **Jessen K, Mirsky R.** The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of physiology.* **2016**;594(13):3521-31.
32. **Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, et al.** c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron.* **2012**;75(4):633-47.
33. **Liu Z, Jin Y-Q, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, et al.** Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PloS one.* **2015**;10(4):e0123278.
34. **Lawson SN.** Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. *Sensory neurons: diversity, development, and plasticity.* **1992**:27-59.
35. **Konishi T.** Developmental and activity-dependent changes in K⁺ currents in satellite glial cells in mouse superior cervical ganglion. *Brain Res.* **1996**;708(1-2):7-15.
36. **Gola M, Niel JP, Delmas P, Jacquet G.** Satellite glial cells in situ within mammalian prevertebral ganglia express K⁺ channels active at rest potential. *J Membr Biol.* **1993**;136(1):75-84.
37. **Hanani M, Verkhratsky A.** Satellite Glial Cells and Astrocytes, a Comparative Review. *Neurochem Res.* **2021**;46(10):2525-37.
38. **Wang ML, Rivlin M, Graham JG, Beredjikian PK.** Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connect Tissue Res.* **2019**;60(1):3-9.
39. **Stewart JD.** Peripheral nerve fascicles: anatomy and clinical relevance. *Muscle Nerve.* **2003**;28(5):525-41.
40. **Evans GR.** Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec.* **2001**;263(4):396-404.
41. **Mackinnon SE.** *Nerve surgery: Thieme;* **2015**.
42. **Nave KA, Werner HB.** Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2014**;30:503-33.

43. **Campbell WW.** Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology*. **2008**;119(9):1951-65.
44. **Evans PJ, Midha R, Mackinnon SE.** The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Prog Neurobiol*. **1994**;43(3):187-233.
45. **Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R.** Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma*. **1998**;45(1):116-22.
46. **Modrak M, Talukder MAH, Gurgenchashvili K, Noble M, Elfar JC.** Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. *J Neurosci Res*. **2020**;98(5):780-95.
47. **Sunderland S. A** Classification Of Peripheral Nerve Injuries Producing Loss Of Function. *Brain*. **1951**;74(4):491-516.
48. **Sunderland S.** The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*. **1990**;13(9):771-84.
49. **Gordon T.** Peripheral nerve regeneration and muscle reinnervation. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**;21(22):8652.
50. **Dubový P.** Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. **2011**;193(4):267-75.
51. **Saxena S, Caroni P.** Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Prog Neurobiol*. **2007**;83(3):174-91.
52. **Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN.** Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*. **2005**;36 Suppl 4:S24-9.
53. **Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS.** Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*. **2011**;8(1):110.
54. **Scheib J, Höke A.** Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol*. **2013**;9(12):668-76.
55. **Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, et al.** Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci*. **2009**;12(7):839-47.
56. **Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A.** Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. **2007**;82(4):163-201.
57. **Stoll G, Müller HW.** Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*. **1999**;9(2):313-25.
58. **Barrette B, Hébert MA, Filali M, Lafortune K, Vallières N, Gowing G, et al.** Requirement of myeloid cells for axon regeneration. *J Neurosci*. **2008**;28(38):9363-76.
59. **Grafstein B.** The nerve cell body response to axotomy. *Experimental Neurology*. **1975**;48(3, Part 2):32-51.
60. **Gunasekera SM, Wijeskara RL, Sesath HG.** Proximal axonal changes after peripheral nerve injury in man. *Muscle Nerve*. **2011**;43(3):425-31.
61. **Perry VH, Brown MC.** Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. *Bioessays*. **1992**;14(6):401-6.
62. **Lee SK, Wolfe SW.** Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg*. **2000**;8(4):243-52.
63. **Bao Y, Wang S, Xie Y, Jin K, Bai Y, Shan S.** MiR-28-5p relieves neuropathic pain by targeting Zeb1 in CCI rat models. *J Cell Biochem*. **2018**;119(10):8555-63.
64. **Fregnan F, Muratori L, Simões AR, Giacobini-Robecchi MG, Raimondo S.** Role of inflammatory cytokines in peripheral nerve injury. *Neural Regen Res*. **2012**;7(29):2259-66.
65. **Dubový P, Jančálek R, Kubek T.** Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. **2013**;108:173-206.

66. **Austin PJ, Moalem-Taylor G.** The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol.* **2010**;229(1-2):26-50.
67. **Shamash S, Reichert F, Rotshenker S.** The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci.* **2002**;22(8):3052-60.
68. **Gölz G, Uhlmann L, Lüdecke D, Markgraf N, Nitsch R, Hendrix S.** The cytokine/neurotrophin axis in peripheral axon outgrowth. *Eur J Neurosci.* **2006**;24(10):2721-30.
69. **Leppik IE.** Zonisamide: chemistry, mechanism of action, and pharmacokinetics. *Seizure.* **2004**;13 Suppl 1:S5-9; discussion S10.
70. **Shorvon S.** Handbook of epilepsy treatment: John Wiley & Sons; **2010**.
71. **Masuda Y, Utsui Y, Shiraishi Y, Karasawa T, Yoshida K, Shimizu M.** Pharmacokinetic and pharmacodynamic tolerance of a new anticonvulsant agent (3-sulfamoylmethyl-1,2-benzisoxazole) compared to phenobarbital, diphenylhydantoin and carbamazepine in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **1979**;240(1):79-89.
72. **Kamei C, Oka M, Masuda Y, Yoshida K, Shimizu M.** Effects of 3-sulfamoylmethyl-1,2-benzisoxazole (AD-810) and some antiepileptics on the kindled seizures in the neocortex, hippocampus and amygdala in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **1981**;249(1):164-76.
73. **Ito T, Hori M, Kadokawa T.** Effects of Zonisamide (AD-810) on tungstic acid gel-induced thalamic generalized seizures and conjugated estrogen-induced cortical spike-wave discharges in cats. *Epilepsia.* **1986**;27(4):367-74.
74. **Wada Y, Hasegawa H, Yamaguchi N.** Effect of a novel anticonvulsant, Zonisamide (AD-810, CI-912), in an experimental model of photosensitive epilepsy. *Epilepsy Res.* **1990**;7(2):117-20.
75. **Murata M, Kazuko H, Kanazawa I, Shirakura K, Kochi K, Shimazu R.** A Randomized Placebo-controlled Trial of Zonisamide in Patients with Parkinson Disease. *Neurology and Clinical Neuroscience.* **2015**;4.
76. **Moore RA, Wiffen PJ, Derry S, Lunn MPT.** Zonisamide for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* **2015**(1).
77. **Gluck M, Santana L, Granson H, Yahr M.** Novel dopamine releasing response of an anti-convulsant agent with possible anti-Parkinson's activity. *Journal of neural transmission.* **2004**;111(6):713-24.
78. **Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Kimoto N, Kikkawa Y, Takeshima M, et al.** Neuroprotective effects of Zonisamide target astrocyte. *Ann Neurol.* **2010**;67(2):239-49.
79. **Hossain MM, Weig B, Reuhl K, Gearing M, Wu L-J, Richardson JR.** The anti-parkinsonian drug Zonisamide reduces neuroinflammation: Role of microglial Na(v) 1.6. *Experimental neurology.* **2018**;308:111-9.
80. **Condello S, Currò M, Ferlazzo N, Costa G, Visalli G, Caccamo D, et al.** Protective Effects of Zonisamide Against Rotenone-Induced Neurotoxicity. *Neurochemical Research.* **2013**;38(12):2631-9.
81. **Sango K, Yanagisawa H, Kawakami E, Takaku S, Ajiki K, Watabe K.** Spontaneously immortalized Schwann cells from adult Fischer rat as a valuable tool for exploring neuron-Schwann cell interactions. *J Neurosci Res.* **2011**;89(6):898-908.
82. **Gan TJ.** Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion.* **2010**;26(7):1715-31.
83. **Ku EC, Lee W, Kothari HV, Scholer DW.** Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med.* **1986**;80(4b):18-23.
84. **Ma W, Du W, Eisenach JC.** Role for both spinal cord COX-1 and COX-2 in maintenance of mechanical hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Brain research.* **2002**;937(1-2):94-9.

85. **Camara-Lemarroy CR, Gonzalez-Moreno EI, Guzman-de la Garza FJ, Fernandez-Garza NE.** Arachidonic acid derivatives and their role in peripheral nerve degeneration and regeneration. *ScientificWorldJournal*. **2012**;2012:168953.
86. **Fu Q, Hue J, Li S.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs promote axon regeneration via RhoA inhibition. *J Neurosci*. **2007**;27(15):4154-64.
87. **Parkinson DB, Dickinson S, Bhaskaran A, Kinsella MT, Brophy PJ, Sherman DL, et al.** Regulation of the myelin gene periaxin provides evidence for Krox-20-independent myelin-related signalling in Schwann cells. *Mol Cell Neurosci*. **2003**;23(1):13-27.
88. **Zorick TS, Syroid DE, Brown A, Gridley T, Lemke G.** Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells. *Development*. **1999**;126(7):1397-406.
89. **Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, et al.** Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*. **1994**;371(6500):796-9.
90. **Parkinson DB, Bhaskaran A, Droggiti A, Dickinson S, D'Antonio M, Mirsky R, et al.** Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *The Journal of cell biology*. **2004**;164(3):385-94.
91. **Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, Ghislain J, Vallat J-M, Charnay P.** Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *Journal of Neuroscience*. **2006**;26(38):9771-9.
92. **Vilar M.** Structural Characterization of the p75 Neurotrophin Receptor: A Stranger in the TNFR Superfamily. *Vitam Horm*. **2017**;104:57-87.
93. **Li J, Yin Q, Wu H.** Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Adv Immunol*. **2013**;119:135-53.
94. **Bothwell M.** Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci*. **1995**;18:223-53.
95. **Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, et al.** trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*. **1991**;65(5):885-93.
96. **Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, et al.** Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*. **1986**;47(4):545-54.
97. **Yamashita T, Tucker KL, Barde YA.** Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*. **1999**;24(3):585-93.
98. **Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z.** P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*. **2002**;420(6911):74-8.
99. **Huang EJ, Reichardt LF.** Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. **2001**;24:677-736.
100. **Panthi S, Gautam K.** Roles of nitric oxide and ethyl pyruvate after peripheral nerve injury. *Inflamm Regen*. **2017**;37:20-.
101. **Loscalzo J.** The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res*. **2013**;113(2):100-3.
102. **Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM.** Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. **2007**;8(10):766-75.
103. **Keynes RG, Garthwaite J.** Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. *Curr Mol Med*. **2004**;4(2):179-91.
104. **Mocellin S, Bronte V, Nitti D.** Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev*. **2007**;27(3):317-52.

105. **Förstermann U, Sessa WC.** Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* **2012**;33(7):829-37, 37a-37d.
106. **Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H.** Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* **2003**;199(1):8-17.
107. **Barton MJ, John JS, Clarke M, Wright A, Ekberg J.** The Glia Response after Peripheral Nerve Injury: A Comparison between Schwann Cells and Olfactory Ensheathing Cells and Their Uses for Neural Regenerative Therapies. *Int J Mol Sci.* **2017**;18(2).
108. **Mendes RA, Carvalho JF, Waal I.** An overview on the expression of cyclooxygenase-2 in tumors of the head and neck. *Oral Oncol.* **2009**;45(10):e124-8.
109. **Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO.** Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck.* **2002**;24(8):792-9.
110. **Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K.** Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol.* **2019**;234(5):5683-99.
111. **Frejborg E, Salo T, Salem A.** Role of Cyclooxygenase-2 in Head and Neck Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* **2020**;21(23).
112. **Hernández-Díaz S, Rodríguez LA.** Incidence of serious upper gastrointestinal bleeding/perforation in the general population: review of epidemiologic studies. *J Clin Epidemiol.* **2002**;55(2):157-63.
113. **Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, et al.** High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation.* **2003**;107(7):1017-23.
114. **Kellogg AP, Cheng HT, Pop-Busui R.** Cyclooxygenase-2 pathway as a potential therapeutic target in diabetic peripheral neuropathy. *Curr Drug Targets.* **2008**;9(1):68-76.
115. **Quilley J, Chen Y-J.** Role of COX-2 in the enhanced vasoconstrictor effect of arachidonic acid in the diabetic rat kidney. *Hypertension.* **2003**;42(4):837-43.
116. **Krishnamurthy B, Kumar PA, Sathyanarayanan A.** Comparison of the effects of Zonisamide and flupirtine on paclitaxel induced peripheral neuropathy in rats. *J Clin Diagno Res.* **2018**;12(1).
117. **Tamaddonfard E, Samadi F, Egdami K.** The effects of vitamin B12 and diclofenac and their combination on cold and mechanical allodynia in a neuropathic pain model in rats. *Vet Res Forum.* **2013**;4(1):19-24.
118. **Sencar L, Coşkun G, Şaker D, Sapmaz T, Kara S, Çelenk A, et al.** Effects of Theranekron and alpha-lipoic acid combined treatment on GAP-43 and Krox-20 gene expressions and inflammation markers in peripheral nerve injury. *Ultrastructural Pathology.* **2021**;45(3):167-81.
119. **Lopes B, Sousa P, Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Mendonça C, et al.** Peripheral Nerve Injury Treatments and Advances: One Health Perspective. *Int J Mol Sci.* **2022**;23(2).
120. **Guntinas-Lichius O, Hundeshagen G, Paling T, Angelov DN.** Impact of different types of facial nerve reconstruction on the recovery of motor function: an experimental study in adult rats. *Neurosurgery.* **2007**;61(6):1276-83; discussion 83-5.
121. **Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Qasim M, Zafar S, et al.** Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. *Int J Biol Sci.* **2020**;16(1):116-34.
122. **Alvites R, Rita Caseiro A, Santos Pedrosa S, Vieira Branquinho M, Ronchi G, Geuna S, et al.** Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. *Cogent Medicine.* **2018**;5(1):1466404.
123. **Kornfeld T, Vogt PM, Radtke C.** Nerve grafting for peripheral nerve injuries with extended defect sizes. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* **2019**;169(9):240-51.

124. **Slavin BR, Sarhane KA, von Guionneau N, Hanwright PJ, Qiu C, Mao HQ, et al.** Insulin-Like Growth Factor-1: A Promising Therapeutic Target for Peripheral Nerve Injury. *Front Bioeng Biotechnol.* **2021**;9:695850.
125. **Vijayavenkataraman S, Zhang S, Thaharah S, Sriram G, Lu WF, Fuh JYH.** Electrohydrodynamic Jet 3D Printed Nerve Guide Conduits (NGCs) for Peripheral Nerve Injury Repair. *Polymers.* **2018**;10(7):753.
126. **Dong R, Liu Y, Yang Y, Wang H, Xu Y, Zhang Z.** MSC-Derived Exosomes-Based Therapy for Peripheral Nerve Injury: A Novel Therapeutic Strategy. *BioMed Research International.* **2019**;2019:6458237.
127. **Raza C, Riaz HA, Anjum R, Shakeel NUA.** Repair strategies for injured peripheral nerve: Review. *Life Sci.* **2020**;243:117308.
128. **Liu M, Li P, Jia Y, Cui Q, Zhang K, Jiang J.** Role of Non-coding RNAs in Axon Regeneration after Peripheral Nerve Injury. *Int J Biol Sci.* **2022**;18(8):3435-46.
129. **Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, Mackenzie FE, Hoving JJ, Garcia Calavia N, et al.** Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell.* **2015**;162(5):1127-39.
130. **Chen P, Piao X, Bonaldo P.** Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol.* **2015**;130(5):605-18.
131. **Rotshenker S.** Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation.* **2011**;8:109.
132. **Kanda H, Kobayashi K, Yamanaka H, Noguchi K.** COX-1-dependent prostaglandin D2 in microglia contributes to neuropathic pain via DP2 receptor in spinal neurons. *Glia.* **2013**;61(6):943-56.
133. **Durrenberger PF, Facer P, Casula MA, Yiangou Y, Gray RA, Chessell IP, et al.** Prostanoid receptor EP1 and Cox-2 in injured human nerves and a rat model of nerve injury: a time-course study. *BMC Neurology.* **2006**;6(1):1.
134. **Levy D, Kubes P, Zochodne DW.** Delayed peripheral Nerve Degeneration, Regeneration, and pain in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* **2001**;60(5):411-21.
135. **Sukiandra R, Yerizel E, Syafrita Y, Eryati D.** Relationship of Anti-interleukin-6 Receptor Antibody to Interleukin-6 Level and Inducible Nitrite Oxide Levels in Peripheral Nerve Injury in Chronic Constriction Injury-Induced Rats: A Case-Control Study in Indonesia. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences.* **2022**;10:1-5.
136. **Lin H, Hou C, Chen D.** Altered Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase After Sciatic Nerve Injury in Rat. *Cell Biochemistry and Biophysics.* **2011**;61(2):261-5.
137. **Chyu K-Y, Dimayuga P, Zhu J, Nilsson J, Kaul S, Shah PK, et al.** Decreased Neointimal Thickening After Arterial Wall Injury in Inducible Nitric Oxide Synthase Knockout Mice. *Circulation Research.* **1999**;85(12):1192-8.
138. **Wang H, Fang J, Hu F, Li G, Hong H.** Seawater immersion aggravates sciatic nerve injury in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine.* **2015**;9(4):1153-60.
139. **Abe S, Mizusawa I, Kanno K, Yabashi A, Suto M, Kuraya M, et al.** Nitric oxide synthase expressions in rat dorsal root ganglion after a hind limb tourniquet. *NeuroReport.* **2003**;14(17):2267-70.
140. **Inoue N, Ito S, Tajima K, Nogawa M, Takahashi Y, Sasagawa T, et al.** Etodolac Attenuates Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *Journal of Pharmacological Sciences.* **2009**;109(4):600-5.
141. **Takahashi M, Kawaguchi M, Shimada K, Nakashima T, Furuya H.** Systemic meloxicam reduces tactile allodynia development after L5 single spinal nerve injury in rats. *Reg Anesth Pain Med.* **2005**;30(4):351-5.

142. **Ganesh T.** Prostanoid Receptor EP2 as a Therapeutic Target. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2014**;57(11):4454-65.
143. **Zhao F-Y, Spanswick D, Martindale JC, Reeve AJ, Chessell IP.** GW406381, a novel COX-2 inhibitor, attenuates spontaneous ectopic discharge in sural nerves of rats following chronic constriction injury. *PAIN*. **2007**;128(1).
144. **Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Asai H, Hussein MH, Suzuki M, et al.** Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced phagocytosis of cultured microglia via nitric oxide production. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2013**;268(2):99-105.
145. **Al-Majed AA, Khattab M, Raza M, Al-Shabanah OA, Mostafa AM.** Potentiation of diclofenac-induced anti-inflammatory response by aminoguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in rats: The role of nitric oxide. *Inflammation Research*. **2003**;52(9):378-82.
146. **Noda Y, Mori A, Packer L.** Zonisamide inhibits nitric oxide synthase activity induced by N-methyl-D-aspartate and buthionine sulfoximine in the rat hippocampus. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. **1999**;105(1-2):23-33.
147. **Arias AJ, Feinn R, Oncken C, Covault J, Kranzler HR.** Placebo-Controlled Trial of Zonisamide for the Treatment of Alcohol Dependence. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. **2010**;30(3).
148. **Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J.** EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron*. **2001**;30(2):355-68.
149. **Jessen KR, Mirsky R.** The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*. **2005**;6(9):671-82.
150. **Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, et al.** Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci*. **2006**;9(12):1520-5.
151. **Jang SW, LeBlanc SE, Roopra A, Wrabetz L, Svaren J.** In vivo detection of Egr2 binding to target genes during peripheral nerve myelination. *J Neurochem*. **2006**;98(5):1678-87.
152. **Jang SW, Srinivasan R, Jones EA, Sun G, Keles S, Krueger C, et al.** Locus-wide identification of Egr2/Krox20 regulatory targets in myelin genes. *J Neurochem*. **2010**;115(6):1409-20.
153. **Hung HA, Sun G, Keles S, Svaren J.** Dynamic regulation of Schwann cell enhancers after peripheral nerve injury. *J Biol Chem*. **2015**;290(11):6937-50.
154. **Tammia M, Mi R, Sluch VM, Zhu A, Chung T, Shinn D, et al.** Egr2 overexpression in Schwann cells increases myelination frequency in vitro. *Heliyon*. **2018**;4(11):e00982.
155. **Sock E, Wegner M.** Transcriptional control of myelination and remyelination. *Glia*. **2019**;67(11):2153-65.
156. **Zhang Y, Zhao Q, Chen Q, Xu L, Yi S.** Transcriptional Control of Peripheral Nerve Regeneration. *Molecular Neurobiology*. **2023**;60(1):329-41.
157. **Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF.** Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci*. **2000**;12(12):4171-80.
158. **Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM.** Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001**;98(25):14661-8.
159. **Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM.** The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science*. **2002**;298(5596):1245-8.
160. **Zhou XF, Li HY.** Roles of glial p75NTR in axonal regeneration. *J Neurosci Res*. **2007**;85(8):1601-5.