



T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SİYATİK SİNİR HASARI MODELİNDE
PİOGLİTAZONUN
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. HÜSEYİN ANIL ÖZMAT

ANKARA-2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SİYATİK SİNİR HASARI MODELİNDE
PİOGLİTAZONUN ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. HÜSEYİN ANIL ÖZMAT

TEZ DANIŞMANLARI
UZM. DR. MEHMET ÖZGÜR ÖZATEŞ
DOÇ. DR. ATILLA KAZANCI

ANKARA-2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

24.05.2021

Dr. Hüseyin Anıl Özmat



TEŞEKKÜR

Kendileriyle çalışmaktan çok büyük onur ve gurur duyduğum, çalışmalarımı hem öğrenerek hem de keyif alarak yürüttüğüm, her zorlukta yanımda olan, bana yol gösteren, bilgi ve tecrübesinin yanı sıra akademik duruşu, kişiliği ile örnek alınması gereken değerli hocam ve abim aynı zamanda tez danışmanlarım Doç. Dr. Atilla KAZANCI'ya, Op. Dr. Mehmet Özgür ÖZATEŞ'e değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, uzmanlık eğitimim sırasında değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Gıyas Ayberk'e, Prof. Dr. Murad BAVBEK'e , Prof. Dr. Pınar ÖZİŞİK'a, Op. Dr. H. Tayfun BALIM'a, Op. Dr. Hakan TOSUN'a, Prof. Dr. Ömer Faruk TÜRKÖĞLU'na, Doç. Dr. Ahmet Gürhan GÜRÇAY'a, Doç. Dr. Oktay GÜRCAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Ercan BAL'a , Op. Dr. Naci ALTUNDAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Harun DEMİRCİ'ye, Op. Dr. Burak BAHADIR'a, Op. Dr. Hümeyra KULLUKÇU ALBAYRAK'a ve birlikte çalıştığımız bütün hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca benden yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Beyin ve Sinir Cerrahi Anabilim Dalında çalışan çok kıymetli mesai arkadaşlarıma ve kıdemlilerime; Op. Dr. Cevat AKINCI'ya, Op. Dr. İsmail BOZKURT'a, Op. Dr. Pınar ÖZDEMİR'e, Op. Dr. Can KÜÇÜKYILDIZ'a, Op. Dr. S. Kürşat ŞİMŞEK'e, Op. Dr. A. Sinan Apaydın'a Op. Dr. K. Tuğberk ÖZDEMİR'e, Dr. S. Taha ASLAN'a, Dr. Mustafa ÖZKAN'a, Dr. Kadir ÇETİNKAYA'ya, Dr. Yusuf KÜÇÜK'e, Dr. Dila GENCEROĞLU'na, Dr. F. Betül SAYLAK'a, Gülşah KARAARSLAN'a, Esin ÇAKMAK LAÇİNOK'a, Alaattin BİLİCİ'ye, tez çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Hakan Eroğlu'na, Doç. Dr. Salim Neşelioğlu'na, Dr. Cansu Şahin'e sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

Bu süreçte bana büyük bir sabırla, sevgiyle, ilgiyle destek olan, beni hiç yalnız bırakmayan hayat arkadaşım, sevgili ve biricik eşim Dr. Demet Özmat'a, bugünlere gelmemde çok büyük katkıları olan çok kıymetli varlıklarım, annem Zakine Özmat, babam Hasan Özmat ve kardeşim Utku Özmat'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLOLAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. ANATOMİ VE FİZYOLOJİ.....	4
2.2. PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ.....	6
2.2.1. Periferik Sinir Yaralanmaları Evrelemesi	9
2.2.2. Patofizyoloji	12
2.2.3. Periferik Sinir Onarımı.....	15
2.3. PİOGLİTAZON VE NANOTEKNOLOJİ	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. CERRAHİ İŞLEM	19
3.2. İLAÇ HAZIRLAMA YÖNTEMİ.....	21
3.3. DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ.....	26
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ	50
7. KAYNAKÇA.....	51

ÖZET

Amaç

Periferik sinir yaralanmaları, hasarlı sinire bağlı olarak çeşitli semptomlar gösteren, yaygın görülen ve ciddi sosyoekonomik sonuçları olan bir durumdur. Yaralanma ve rejenerasyon mekanizmaları hakkında çok fazla bilgi olmasına rağmen, tam işlevsel iyileşmeyi sağlayan güvenilir tedavi yöntemleri azdır. Bu çalışmada rat deney modelinde kompozit nanofiber ve sistemik verilen pioglitazon tedavisinin periferik sinir hasarı sonrası etkileri incelendi.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada 40 adet Wistar Albino Cinsi yetişkin erkek rat kullanıldı. Denekler her grupta 8 denek olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Deneklerde fonksiyonel yürüme analizi değerleri, ışık mikroskobu çalışması, elektron mikroskobu çalışması ve S-100 değerlendirmesi yapıldı. Biyokimyasal olarak Native Tiyol, Total Tiyol, Disulfide, Disulfide/Native Tiyol, Disülfid/Total Tiyol, Native Tiyol/Total Tiyol, İMA(absu), Albumin, Tümör Nekroz Faktörü (TNF), İnterlökin-6 (IL-6), Total Antioksidan Seviye (TAS), Total Oksidan Seviye (TOS) sonuçları karşılaştırıldı.

Sonuçlar

Fonksiyonel siyatik indeks sonuçlarında tedavi verilmeyen 2. grup ile kompozit nanofiber yöntemiyle tedavi verilen 3. grup ($p:0.0259$) ve intraperitoneal pioglitazon 4. ($p:0,0098$) grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü. Pioglitazon tedavisi verilen gruplarda fonksiyonel siyatik indeks değerlerinin, tedavi verilmeyen gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. Oksidatif hasarı düzenlemede etkili Native Tiyol, Total Tiyol değerlerini pioglitazon tedavisi verilen gruplarda tedavi verilmeyen gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,0001$). Oksidatif tarafa kaymayı gösteren Disulfid, Disulfid/Native tiyol düzeylerinin tedavi verilmeyen gruplarda anlamlı olarak yüksek olduğu izlendi ($p<0,0110$, $p<0,0001$). İnflamasyon belirteçlerinden TNF değerlerinin Pioglitazon tedavisi alan gruplarda anlamlı düştüğü görüldü ($p<0,0001$). Pioglitazon tedavisi alan gruplarda aksonal hasarın tedavi verilmeyen gruplara göre daha az olduğu ve S-100

ekspresyonlarının Schwann hücrelerinde, tedavi verilmeyen gruplara göre daha yoğun olduğu görüldü.

Yorum

Pioglitazon tedavisi verilen gruplarda fonksiyonel siyatik indeks değerlerinin kontrol grubuna yakın bulunduğu, tedavi verilmeyen gruplarda fonksiyonel siyatik indeks değerlerinde bir düzelme olmadığı izlenmiştir. TNF, Native Tiyol, Total Tiyol, disulfid, IMA, Albumin, TAS, TOS, Disulfid/Native tiyol, Disulfid/Total tiyol sonuçlarında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Sistemik ve kompozit nanofiber yöntemi ile verilen pioglitazon tedavisinin, travmatik periferik sinir hasarı tedavisinde anlamlı olarak faydalı olduğu ayrıca kompozit nanofiber yöntemi ile verilen ilacın sistemik verilen ilaca göre daha iyi sonuçlar verdiği sonucuna ulaşılmıştır.

ABSTRACT

Aim

Peripheral nerve injuries are common conditions that include various symptoms based on the damaged nerves included and have serious results. Although there is a lot of information about mechanisms of injury and regeneration, there are few reliable treatment methods that provide full functional recovery. In this study, the effects of systemic and composite nanofiber pioglitazone treatment and after peripheral nerve injury were examined in the rat test model.

Method and Instruments

In this study, 40 Wistar Albino adult male rats were used. The subjects were divided into 5 groups, 8 rats in each group. Functional walking analysis values, light microscope study, electron microscope study and S-100 evaluation were conducted among the groups. Biochemically, Native Thiol, Total Thiol, Disulfide, Disulfide/Native Thiol, Disulfide/Total Thiol, Native Thiol/Total Thiol, IMA (absu), Albumin, Tumor Necrosis Factor (TNF), Interleukin -6 (IL-6), Total Antioxidant Status (TAS), Total Oxidant Status (TOS) values were compared.

Results

Statistically significant difference was found between the non-treatment second group and third group treated with composite nanofiber method ($p:0,02259$), fourth group intraperitoneal pioglitazone ($p:0,0098$) according to sciatic functional index results. Sciatic functional index values in groups treated with pioglitazone were found significantly higher than non-treatment groups.

Native Thiol /Total Thiol values which are effective in regulating oxidative injury were found significantly higher in groups that had pioglitazone treatment ($p<0,0001$). The Disulfide, Disulfide/Native Thiol levels which indicate the shift towards the oxidative direction were observed significantly higher in groups that are not treated ($p<0,0110$, $p<0,0001$). It was observed that TNF values which are inflammation markers reduced significantly in groups had Pioglitazone treatment ($p<0,0001$). In pioglitazone treatment groups, it was observed that the axonal damage was lower than

those of non-treatment groups, and that the S-100 expressions in Schwann cells were higher density than those without treatment.

Comments

In groups that had Pioglitazone treatment, Sciatic functional index values were close to control group but in non-treatment groups, it was observed that there was no improvement in Sciatic functional index values. There were significant differences in the TNF, Native Thiol, Total Thiol, Disulfide, IMA, Albumin, TAS, TOS, Disulfide/Native Thiol, Disulfide/Total Thiol values. It was found that systemic and composite nanofiber Pioglitazone treatment was significantly effective in traumatic peripheral nerve injury treatment and medicine with composite nanofiber method had better results compared to systemic medicine.

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

BCL-2	: B-cell lymphoma 2
Ca	: Kalsiyum
EE	: Enkapsülasyon Etkinliğini
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
HE	: Hematoksilen Eozin
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	: İnterlökin
IMA	: İskemi Modifiye Albümin
K	: Potasyum
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum Hidrojen Fosfat
MMP-9	: Matriks Metalloproteinaz-9
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MV	: Milivolt
Na	: Sodyum
NGF	: Nötrofilik Growth Faktör
PDGF	: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PiO	: Pioglitazon
PLGA	: Poli Laktik-Ko-Glikolik Asit
PPAR γ	: Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gama
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
PSY	: Periferik Sinir Yaralanmaları
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
RP-HPLC	: Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sistemi
SEM	:Taramalı Elektron Mikroskobu
SFİ	: Fonksiyonel Siyatik İndeks
SH	: Schwan Hücreleri
SOD	: Superoksid Dismutaz
SS	: Standart Sapma

TAS	: Total Antioksidan Seviye
TGF	: Transforming Growth Faktör
TLR	: Toll-Like Reseptör
TNF- α	: Tumor Nekroz Faktör Alfa
TOS	: Total Oksidan Seviye
μg	: mikrogram
μm	: mikrometre



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nöronun yapısı.....	5
Şekil 2.2. Periferik Sinirin Yapısı	8
Şekil 2.3. Periferik Sinir Sistemi Yaralanmaları Sınıflandırılması.....	11
Şekil 3.1. Pioglitazon HCl'nin pH 7.4 ortamındaki <i>in vitro</i> salım profili.....	26
Şekil 4.1. Gruplara ait siyatik sinirlerde küçük büyültmeli SEM görüntüleri.	32
Şekil 4.2. Gruplara ait siyatik sinirlerde büyük büyültmeli SEM görüntüleri.	34
Şekil 4.3. Gruplara ait siyatik sinirlerin enine kesitlerinde histolojik boyama görüntüleri.....	35
Şekil 4.4. Gruplara ait siyatik sinirlerde immünohistokimya sonrası S-100 protein ekspresyonları.	37

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. PLGA nanofiberlerinin hazırlanmasında elektrospinning parametrelerini optimize etmek için çalışılan farklı elektrospinning koşulları.....	22
Tablo 3.2. Pioglitazon HCl için Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sisteminin Koşulları	25
Tablo 4.1. 2, 3 ve 4. grupların pioglitazon tedavisinin fonksiyonel siyatik indeks sonuçlarının ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmesi	31
Tablo 4.2. 2, 3 ve 4. grupların pioglitazon tedavisinin fonksiyonel siyatik indeks grafiği.....	31
Tablo 4.3. Gruplara ait siyatik sinirlerde histolojik değerlendirme sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri.	38
Tablo 4.4. Gruplar arasındaki istatistiksel sonuçlar	41
Tablo 4.5. Günlere göre grupların kan sonuçları.....	42
Tablo 4.6. Günlere göre grupların kan sonuçları.....	43

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 3.1.** a; Siyatik sinirin eksplorasyonu. b; Siyatik sinirin anevrizma klibi ile travmatize edilmesi..... 20
- Resim 3.2.** Nanofiberin hasarlı siyatik sinirin etrafına sarılması..... 21
- Resim 3.3.** a; Yürüyüş parkurunda yürütülen deneğin ayak izleri. b; Deneğin ayak izi üzerinde IT (intermediate toe), PL (print length) ve TS (Toe spread) değerlerinin ölçümü. 27



1. GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmaları (PSY) görülme sıklığı yüksek olan, kişinin hayat kalitesini bozan, fonksiyonel kayıplara yol açan klinik bir durumdur. Sinir yaralanmasının neden olduğu şiddetli spontan ağrı, nöropatik ağrı ve işlevsel bozukluklar gibi çeşitli komorbiditelerle kendini gösterir (1). Genç erişkin popülasyonda ve erkeklerde daha sık rastlanmaktadır (2). Gelişmiş ülkelerde PSY insidansının her yıl 100.000 kişide yaklaşık 18 olduğu tahmin edilirken, gelişmekte olan ülkelerde nispeten daha yüksektir (3,4). Travma merkezlerine başvuran hastalarda periferik sinir yaralanmalarının tahmini prevalansı kabaca %2-3'tür (5). Klasik semptomlar, etkilenen uzuvda tam felce veya inatçı nöropatik ağrının gelişmesine neden olabilen duyu ve motor fonksiyon bozukluklarıdır (6). En sık yaralanma bölgesi %73,5 ile üst ekstremité olmakla beraber, bunu takiben alt ekstremité ve yüz bölgesi gelmektedir. Üst ekstremitéde sırasıyla radial, ulnar ve median sinirler, alt ekstremitéde ise sırasıyla siyatik, peroneal sinir ve nadir olarak da tibial ve femoral sinirler yaralanmaktadır (7,8).

PSY'nin en sık nedeni travmalardır (9). Motorlu taşıt kazaları ve ev kazaları travma nedenlerinin başında gelmektedir. Diğer nedenler arasında kollajen ve metabolik hastalıklar, maligniteler, cerrahi girişimler, traksiyon, kompresyon, kimyasal sebepler, toksik sebepler, iskemik sebepler, yanık, elektrik çarpması gibi nedenler sayılabilir. Periferik sinir hasarlanma tiplerine göre; keskin laserasyon, künt laserasyon, gerilme ve kompresyon hasarı, sinir kökü avülsiyonları olarak sıralanabilir. Sinir hasarından sonra kalıcı sakatlıklar, iş gücü kayıpları ve ciddi sosyal ve ekonomik sorunlara neden olmaktadır. Sinir yaralanmalarından dolayı Amerika Birleşik Devleti'nde yıllık harcanan para yaklaşık olarak 150 milyar dolar gibi ciddi maliyetlere ulaşmaktadır (10). Bu sebeplerle periferik sinir yaralanmalarında tedavinin rolü büyüktür. Sinir yaralanmalarının tipine ve şiddetine göre en uygun tedavi seçeneği seçilmelidir. Periferik sinir hasarının onarımı nöroşirürjide önemli bir araştırma alanıdır ve bu konuda birçok zorlukla karşılaşılmaktadır (11). Periferik sinir yaralanmasını onarmanın zorlukları yapılan araştırmalarda bildirilmiştir (12,13,14). Günümüzde akut keskin laserasyonlarda ve temiz sinir kesilerinde yaklaşım uç uca

tamir şeklindedir. Büyük sinir defektlerinde uç uca tamirin mümkün olmadığı durumlarda sentetik materyaller kullanılarak kanal şeklinde tamir yapılabilmektedir. Keskin laserasyonlar dışında olan sinir yaralanmalarında hastanın EMG ile takibi yapılmalı iyileşme durumuna göre gerekirse cerrahi tedavi yöntemi uygulanmalıdır. Periferik sinir yaralanmaları sonrası onarım sürecinde aksonal dejenerasyon sonrasında rejenerasyon meydana gelir. Günümüzde sinir yaralanması sonrası gerçekleşen fizyopatolojik değişiklikler ve iyileşme süreci hakkında önemli bilgiler bilinmesine rağmen kat edilen yol çok tatmin edici değildir. Periferik sinir yaralanmaları tedavisinde tam başarı ile sonuçlanan farmakolojik ajan bulunmaması sebebiyle güncel araştırmalar bu konu üzerinde yoğunlaşmaktadır. Pioglitazon, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan bir peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör-y agonistidir (15). Pioglitazonun daha önce ki çalışmalarda nöroprotektif etkilerinden bahsedilmiştir (5,17,18,19,20,21). Ayrıca pioglitazonun inflamasyon, yağ dağılımı, lipid ve protein metabolizmasında potansiyel faydalı roller oynadığı (22,23), pankreatik hücreleri antioksidatif stres yoluyla palmitik asit kaynaklı sitotoksositeye karşı koruduğunu (24), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ekspresyonunu ve kaspaz-3 aktivasyonunu değiştirerek TNF- α tarafından indüklenen hücre apoptozunu veya endotelial hücrelerdeki stresi azalttığını bildirmişlerdir (25,26). Ek olarak, pioglitazon, diyabetli AGE ile indüklenen fare osteoartriti için potansiyel bir terapötik yeteneğe sahip olan ileri glikasyon son ürünü ile indüklenen kondrosit apoptozunu inhibe ettiği, ayrıca sıkıştırma kaynaklı nucleus pulposus mesenchymal stem cells (NP-MSCs) ölümü üzerindeki etkisi bilinmektedir (27,28).

Nano ölçekli teknolojilerin geliştirilmesi, bu yöntemlerin tıp alanında kullanılmasına imkan tanımıştır. Hastalıkların teşhisi, tedavisi ve önlenmesi açısından gelecekte umut vaat etmektedir. İlaç dağıtımında nanoteknolojinin uygulanması, terapötik etkinliği iyileştirmek ve hastanın yaşam kalitesini artırmak için önemli bir potansiyele sahiptir (131). Kompozit nanofiber yöntemi ilacın direkt hedef bölgeye iletilmesini sağlamaktadır. Bu sayede ilacın yan etkileri azalmakta, ilacın etki bölgesine ulaşmadan metabolik yıkımı önlenmekte, toksik etkileri azalmakta, belirli bir hızda ve uygun miktarda salınmasından dolayı ilaç takibi kolaylaşmaktadır. Bu sayede hasta tedavisi daha etkin ve daha güvenli gerçekleşmektedir.

Yapılan çalışmalarda pioglitazonun n6roprotektif etkileri g6sterilmiştir ancak litaret6rde ratlarda siyatik sinir hasarı sonrası kompozit nanofiber ve sistemik pioglitazon tedavisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda pioglitazonun deneysel siyatik sinir hasarı modeli 6zerinde ki olası etkilerini değerlendirmeyi planladık.



2. GENEL BİLGİLER

Sinir sistemi; Santral Sinir Sistemi (SSS) ve Periferik Sinir Sistemi (PSS) olmak üzere ikiye ayrılır. SSS; beyin ve medulla spinalisten oluşur. PSS ise medulla spinalisten çıkan 31 çift spinal sinir, beyin ve beyin sapından çıkan 12 çift kranyal sinirler ile birlikte bu sinirlerin gangliyonlarından oluşur.

Sinir sisteminde nöron ve nöroglia olmak üzere iki tip ana hücre vardır. Nöronların arasında bulunan nöroglialar, nöronları besler ve destekler. Nöroglialar merkezi sinir sisteminde astrositler, oligodendrositler, ependim hücreleri ve mikroglia olarak bulunurken periferik sinir sisteminde Schwann hücreleri ve satellit hücreleri olarak bulunur.

2.1. ANATOMİ VE FİZYOLOJİ

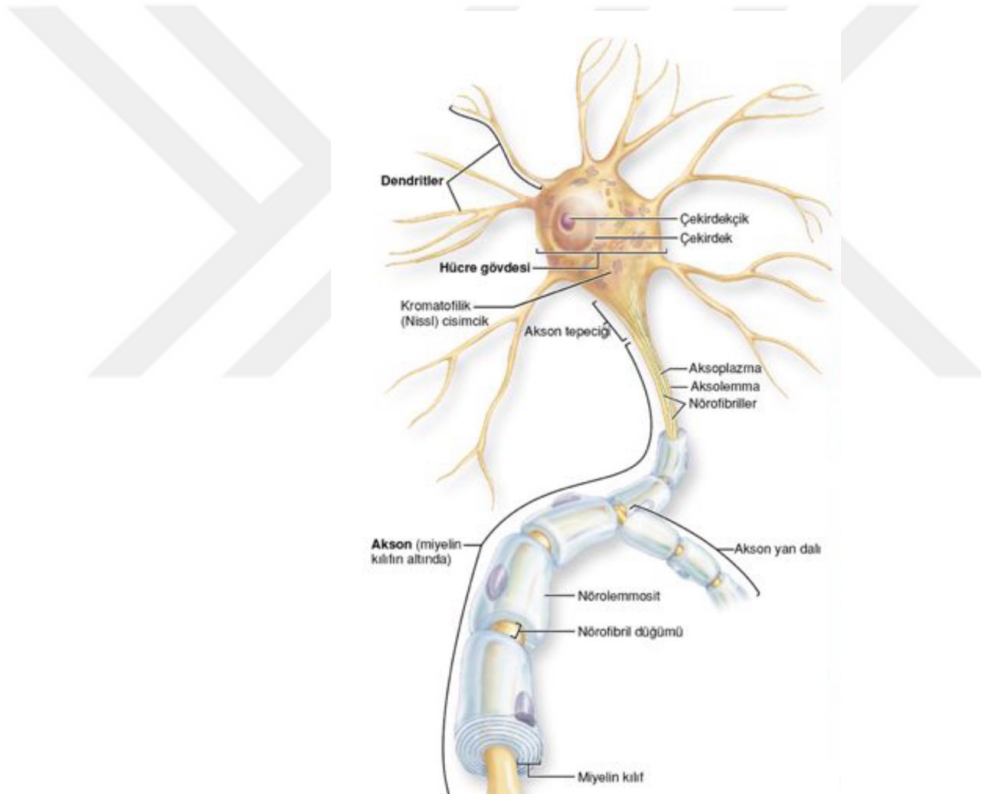
Nöronlar sinir sisteminin yapısal ve temel fonksiyonel birimleridir. Nöronun gövde bölümüne perikaryon, sitoplazmasına nöroplazma denir. Nöronların hücre gövdelerine ek olarak akson ve dendrit denilen özel uzantıları vardır. Akson en uzun olan lifsi uzantıdır ve aksolemma denilen yarı geçirgen bir membranla çevrilidir. Aksonlardan daha kısa hücre gövdesinden çıkan birden fazla olan uzantılarına dendrit denilir. Dendritler çevre hücrelerle bağlantı sağlayan, alınan bilgiyi hücre gövdesi ve aksonlara iletmekle sorumludur. Aksonlar hücre gövdesinden gelen elektriksel iletiyi diğer nörona ya da hedef organa iletirler. Çoğu akson yalıtkan bir madde olan miyelin kılıf ile çevrilidir. Miyelin üretimi SSS'de oligodendrositler tarafından yapılırken, PSS'de ise Schwann hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Miyelin kılıf aksonlar üzerinde düzenli aralıklarla yerleşmiştir ve ranvier boğumları adı verilen miyelinsiz alanlar içerir. Miyelin kılıfın yalıtkan olması nedeniyle ileti bu boğumlarla sıçrayıcı şekilde, diğer bir adıyla saltatorik iletim şeklinde gerçekleşir. İletim hızı; akson çapına, miyelin kılıf kalınlığına ve aksoplazmik iletkenliğe göre değişkenlik gösterir.

Sinir lifleri dört grupta sınıflandırılmıştır.

Tip 1 ve 2 lifler (A-alfa) motor ve duyu lifleridir. Çapları 6-20 nm ve kalın miyelinli aksonlardan oluşur.

Tip 3 lifler (A-delta) 1-6 nm çapında ve ağrının iletilmesinden sorumludurlar.

Tip 4 lifler B ve C lifleri olarak adlandırılırlar. B lifleri preganglionik otonom aksonlar, C lifleri ise daha küçük çaplı ve miyelinsiz sinir lifleridir. Gecikmiş ağrı iletimini sağlarlar (29).



Şekil 2.1. Nöronun yapısı (Mescher'den, 30).

Nöronlar kimyasal ve elektriksel sinyaller aracılığıyla iletişim kurarlar. Bu iletişimin ayrılmaz bir parçası da aksiyon potansiyellerinin aksonlar boyunca iletilmesidir (31). Sinir iletiminde hücre membranları arasındaki elektriksel gerilim farkı önemli rol oynar. Membranın dış yüzü pozitif elektrik yükü taşırken iç yüzeyi negatif elektrik yükü taşımaktadır. İstirahat potansiyeli olarak tanımlanan bu durum

başta Na^+ ve K^+ olmak üzere iyonların konsantrasyon farkı nedeniyle oluşmaktadır. Hücre membranının denge halindeyken potansiyeli -70 mV 'dur. İstirahat potansiyelindeki membranının iç yüzeyi negatif, dış yüzeyi ise pozitif elektrik yükü taşır. Hücre membranına eşik düzeyin üzerinde bir impuls geldiğinde membranda ani elektriksel değişikliğe neden olur ve aksiyon potansiyelini oluştururlar. Bu esnada membranın geçirgenliği artar ve iyon kanalları açılır. Na^+ hücre içine girer ve membranın iç yüzünün pozitif, dış yüzün negatif yüklenmesi ile sonuçlanır. Bu duruma depolarizasyon denilmektedir. Depolarize olan sinir membranında 1 milisaniye sonrasında Na^+ 'a karşı geçirgenlik azalırken K^+ 'a karşı geçirgenlik artışı olur. Hücre dışına yoğun bir K^+ akışı gerçekleşir. Membranın K^+ geçirgenliğinin azalmasıyla tekrar istirahat potansiyeline ulaşılır ve denge sağlanır.

Nöronun akson terminali ile diğer bir nöronun gövdeleri ve dendritleri ile bağlantı yerlerine sinaps denir. İletiyi sinapsa getiren nörona presinaptik nöron, alan nörona postsinaptik nöron adı verilir. Sinapslardaki bu iletim bir takım kimyasal mekanizmalarla ve nörotransmitter adı verilen maddelerle gerçekleşmektedir. Sinaptik aralığa salınan nörotransmitterler, postsinaptik membranda bulunan reseptörlerine bağlanarak membranda depolarizasyon ya da hiperpolarizasyon oluştur ve postsinaptik nöron inhibe ya da stimüle edilir. Sinaptik aralığa salınan nörotransmitterler çeşitli enzimler tarafından parçalanarak tekrar kullanılmak üzere endositoz yoluyla geri alınır. Bu sayede sinir iletimi gerçekleşir.

2.2. PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ

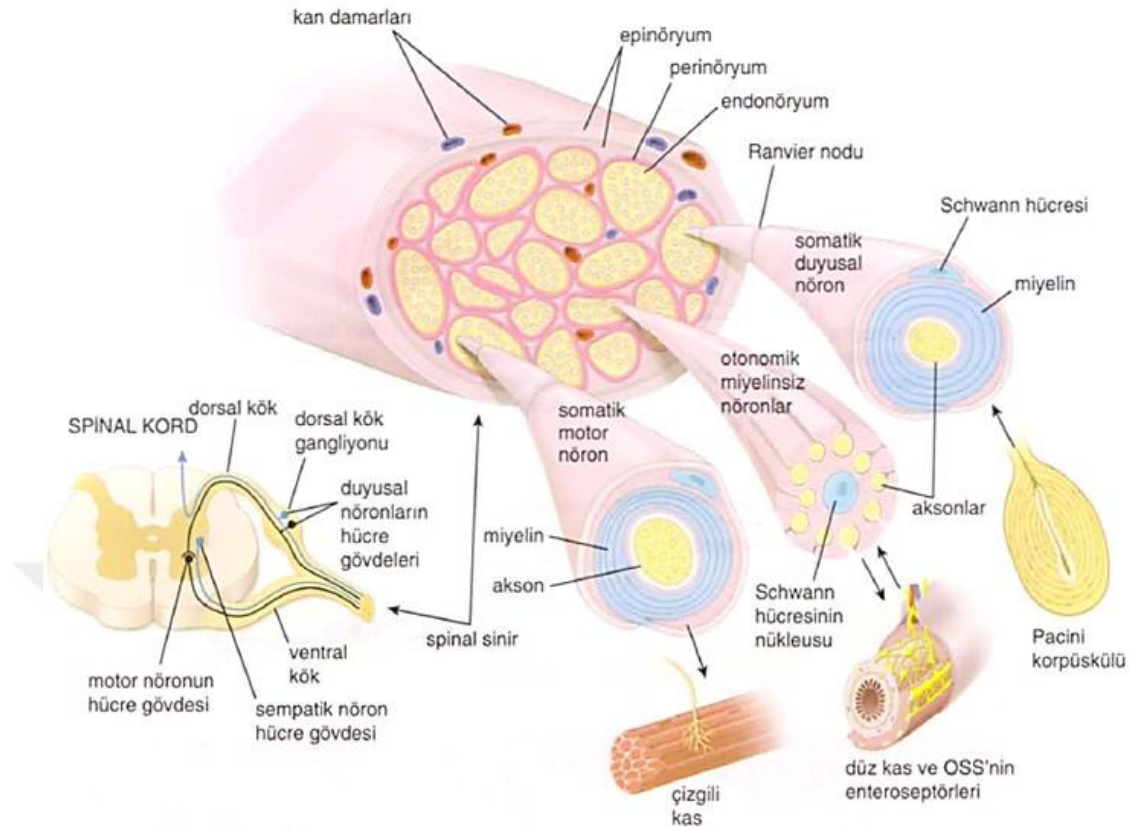
Periferik sinir sisteminde motor duyu ve otonom olmak üzere üç tip periferik sinir bulunmaktadır. Motor sinirler spinal kordun ön boynuz hücrelerinden çıkıp, önde spinal kökün liflerinden geçer ve çizgili kasları uyarır. Duyu sinirleri ise dorsal spinal arka kökler içerisinde yerleşmiştir. Afferent uyarılar arka boynuzdan, efferent uyarılar ise ön boynuzdan iletilirler. Duyusal ve motor sinirler içeren periferik sinirler, dorsal ve ventral spinal köklerin birleşmesinden oluşmaktadır. Otonom sinir sistemine ait sinir hücreleri ise santral sinir sistemi içinde ve dışında bulunan çekirdek ve ganglionlarda toplanmışlardır.

Santralden periferik endonöryum, perinöryum, epinöryum ve mezonöryum olmak üzere siniri çevreleyen bağ dokusu kılıfları mevcuttur. Mezonöryum, sinirde dolaşımı sağlayan gevşek bir bağ dokusudur (32). Siniri çevreleyen bağ dokular, sinire esneklik, sağlamlık ve çevresel faktörlere karşı koruyucu bir etki sağlar (33).

Endonöryum; tek bir aksonu çevreleyen en içteki tabakadır. Küçük çaplı ve fasiküle paralel olarak düzenlenilmiş kollajen bir yapıdır. Kollajen yapı ağırlıklı olarak tip 3 kollajen ve tip 1 kollajen yapıda olup ince kapiller ve mikrodamar içerir fakat lenfatik kanal içermezler (34). Mikrodamarlar perinöral hücreler ile sarılı halde perinöryumdan girer ve kan-sinir bariyeri oluşturulur (35).

Perinöryum; akson demetlerini (fasikülleri) çevreleyen fibroblastlardan zengin, yarı elastik yarı geçirgen bir tabakadır. Bu yapısı sayesinde yaralanmalarda fasiküllerin korunmasında önemlidir (36). Ayrıca çevresel olarak pozitif basınca sahip olmasından dolayı yaralanmalarda basınç yükselerek fasiküllerin korunmasında yardımcı olur. (37) Kan sinir bariyerini destekler.

Epinöryum; periferik siniri oluşturan fasikülleri çevreleyen, kollajen lif ve adipoz dokudan oluşur. Fasiküllerin bütünlüğünü sağlayarak sinire şeklini verir (38). İçerdiği lenfatikler ve vasa nervosum denilen kan damarları fasikülleri besler. Epinöryum sinirin kesitsel alanının %30-70'ini oluşturarak sinire mekanik koruma sağlar. Yağ hücreleri yaralanmalara karşı sinire yastıkçık görevi görür. Sinir tamirinde sütür materyali epinöryumdan geçmektedir.



Şekil 2.2. Periferik Sinirin Yapısı (Ross ve Pawlina'dan, 39).

Schwann hücreleri:

Schwann hücreleri periferik sinir sisteminin başlıca glial hücreleridir. Miyelin ve miyelinsiz (Remark) Schwann hücreleri, nöral krestten köken alırlar (40). Schwann hücreleri periferik doğru göç ederek aksonların etrafını sararlar. Sinir miyelizasyonunda baş rolü oynadıkları gibi aynı zamanda sinirde reseptör özellikleri vardır. Schwann hücrelerinin üzerinde TGF-beta, FGF, PDGF ve IGF-1 gibi faktörler için reseptörler bulunmaktadır (41). S-100 proteinini ekspres ederler. Schwann hücreleri sinir rejenerasyonunda da önemli görevler üstlenmektedir. Schwann hücreleri, sinirde yaralanma söz konusu olduğunda rejenerasyon sırasında birden fazla fonksiyonu gerçekleştirir. Lokasyon, zamanlama ve yaralanma tipine bağlı olarak karakteristik fenotipler veya farklılaşma durumları göstermektedir (42).

2.2.1. Periferik Sinir Yaralanmaları Evrelemesi

Periferik sinir yaralanması sonrası rejenerasyonun maksimum kapasitede olması açısından sinir yaralanmalarının sınıflaması önem arz etmektedir. En temel ve sık kullanılan iki sınıflama Seddon ve Sunderland sınıflandırmalarıdır.

Seddon Sınıflaması

Periferik sinir yaralanmalarında ilk sınıflama 1943 yılında Seddon tarafından yapılmış ve nöropraksi, aksonotmesis ve nörotmesis olarak üçe ayrılmıştır (43).

Nöropraksi: Aksonun bütünlüğünün bozulmadığı hafif bir sinir yaralanması tipidir. Genellikle geri dönüşlüdür. Etyolojide genellikle mekanik kompresyon ve iskemik nedenler yer alır (44,45). Sinirde geçici bir iletim kaybı görülür. Motor fonksiyonlar duyu fonksiyonlarından daha fazla etkilenir. Wallerian dejenerasyon görülmez. Cerrahi tedavi gerektirmez. Günler ya da haftalar içerisinde sinir iletiminde iyileşme görülür.

Aksonotmezis: Bu yaralanma tipinde sinir devamlılığı korunmuştur fakat aksonal yaralanma ile birlikte miyelin hasarı söz konusudur. Epinöryum, perinöryum ve endonöryum sağlamdır. Nöropraksi tipte yaralanmanın aksine Wallerian dejenerasyon görülür. Aksonları destekleyen çevre bağ dokusu elemanları korunduğu için 1 mm/gün hızında aksonal rejenerasyon görülür (44). Prognoz; aksonal hasarın büyüklüğü, hasarlı bölge ile hedef organ uzaklığı gibi faktörlere bağlıdır. Aylar ve yıllar içerisinde tam iyileşme mümkündür.

Nörotmezis: Sinir dokusunun fizyolojik ve anatomik olarak komplet diskonneksiyonu ile sonuçlanan en kötü yaralanma tipidir. Lezyon distalinde iletimin kesilmesine bağlı total fonksiyon kaybı mevcuttur. Cerrahi müdahale gerekir.

Sunderland Sınıflaması:

Sunderland 1951 yılında periferik sinir yaralanmalarını beş dereceye ayırmıştır.

Sunderland 1. derece yaralanma: Seddon sınıflamasında ki nöropraksiye karşılık gelir.

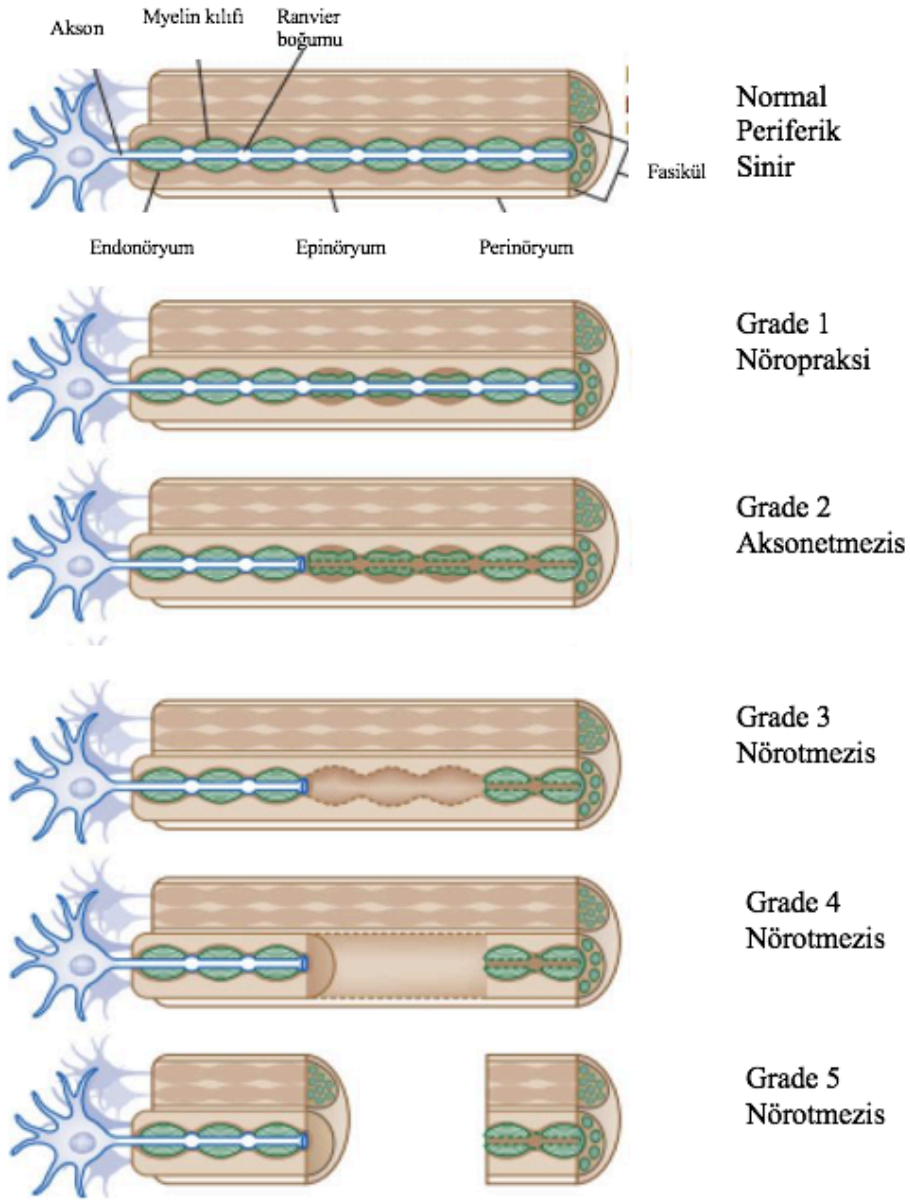
Sunderland 2. derece yaralanma: Sinir kılıflarının intakt kaldığı akson bütünlüğünün kesintiye uğradığı yaralanma tipidir. Seddon sınıflamasında ki aksonotmezise karşılık gelir. Distalde Wallerian dejenerasyon görülür.

Sunderland 3. derece yaralanma: Akson hasarı ile birlikte endonöryumun da bütünlüğünün bozulduğu hasarlanma tipidir. Perinöryum ve epinöryum sağlam olduğu için sinirin fasiküler yapısı ve dış tabaka kollajen bütünlüğü korunmuştur. Wallerian dejenerasyon mevcuttur. İyileşme tam olmayabilir. İnterfasiküler fibrozis aksonal rejenerasyonun oluşmasını engeller.

Sunderland 4. derece yaralanma: Aksonal hasarla birlikte endonöryum ve perinöryum bütünlüğü bozulmuştur. Epinöryum sağlamdır. Rejenerasyon periyodunda skar dokusu oluşur. Nöroma olarak tanımlanan bu durum sinir rejenerasyonuna engel olur. Tam düzelme çok nadirdir. Cerrahi tedavi gerekir.

Sunderland 5. derece yaralanma: Sinir bütünlüğü tam olarak bozulmuştur. Seddon sınıflamasında ki karşılığı nörotmezistir. Uygun cerrahi tamirle olumlu sonuçlar alınabilir.

1988 yılında Mackinnon ve Delon Sunderland sınıflamasına ek olarak aynı sinirde mix tip yaralanmaları içeren kombinasyon oluşturmuştur (46).



Şekil:2.3. Periferik Sinir Sistemi Yaralanmaları Sınıflandırılması (Tsao, Boulis, Bethoux ve Murray'dan, 47).

2.2.2. Patofizyoloji

Periferik sinir hasarlanması sonrası morfolojik ve hücrel birtakım değişiklikler oluşmaktadır. Sinir doku hasarını diğer doku hasarlarından ayıran değişikliklerin bir tanesi de 1850 yılında August Waller tarafından tanımlanan Wallerian dejenerasyondur (48,49).

Wallerian Dejenerasyon:

Sinir hasarını takiben distal bölüm ile ana sinir hattının iletişimi bozulur. Wallerian dejenerasyonunun ilk aşamalarında ortamda hasarlanmış aksonal ve miyelin parçaları bulunur. Sinir dokusundaki makrofajlar, fagositoz yapabilen aktif makrofajlara dönüşerek hücrel artıkları temizlerler. Schwann hücreleri de bu makrofajlara yardımcı olur ve dolaşımdaki monositlerin toplanmasına yol açan bir monosit kemoatraktan protein-1'i üretir. Aksonların proksimal bölgelerinde mRNA translasyonu aktive olarak hücre dışı düzenlenmiş protein kinaz 1/2 vimentin oluşumunu uyarır. Bu kompleks, motor protein dynein tarafından hücre gövdesine retrograd yönde taşınır ve bu sinyal nöronuna aksonal hasar hakkında bilgi verir. Nöron cevap olarak hacmini artırır ve protein sentezini destekleyen endoplazmik retikulum (Nissl cisimleri) agregalarını parçalayarak tepki verir (kromatolizis). Yaralanmadan sonraki ilk saatler içinde, antioksidan proteinler için glutatyon redüktaz ve hem oksijenaz 1 gibi haberci RNA'ların siyatik sinir ezilmesinden sonra arttığını göstermiştir (50). Hasarlı aksonun ucu, nöron hücre gövdesinden gelen maddelerin birikmesiyle hızla kapanır ve şişer. Sinir hasarından sadece birkaç saat sonra, büyüyen aksonal ekstremite filipodia'yı uzatır. İlk başta, bunlar rastgele yönlendirilir, ancak daha sonra, miyozin ve aktin ekspresyonu nöron hücre gövdesi içinde yukarı regüle edildiğinde tek yönlü olurlar (51). Aynı zamanda kan damarlarının yenilenmesi ve yeniden düzenlenmesi de aksonların büyümesine eşlik eder.

Yaralanmadan iki gün sonra, dolaşımdaki monositler aktif makrofajlara farklılaşır ve en az 2 hafta süren bir süreç olan aksonal ve miyelin artıklarının uzaklaştırılmasına katkıda bulunur (52). Erken aşamalarda, hasarlı Schwann hücre (SH)'leri, yaralanma bölgesindeki protein ekspresyon değişikliklerinde rol oynar. SH'ler ve hasarlı aksonlar arasındaki temas kaybı, miyelin kılıfının geri çekilmesine

neden olur ve boşluklu yapıların oluşumuna yol açar. Bu yapılar lezyondan iki gün sonra ortaya çıkar ve en az 2-3 hafta sürer (53). Aksonal temas kaybına paralel olarak, SH'ler giderek miyelin oluşturmeyen bir fenotip kazanır ve proliferatif hale gelir. SH'ler, yaralanmadan 3-4 gün sonra mitotik aktiviteleri en üst düzeydedir ve bu durum aksonal rejenerasyonu indüklemeye etkilidir. Hasarlı sinirlerdeki makrofajlar ayrıca iyi kolesterolü kurtarmaya yardımcı olur ve özellikle apolipoprotein E'yi üreterek gelecekteki miyelinin yeniden yapılandırılmasını sağlar (54).

Wallerian dejenerasyonu, apoptotik hücre ölümünün genetik olarak farklı moleküler programlar tarafından yönlendirildiği düşünülmüştür (55). Distal taraftaki bu olaylar zinciri, proksimaldeki akson rejenerasyonunu sağlamak amacıyla programlanmıştır (56). L tipi Ca^{+2} kanallarından hücre dışı Ca^{+2} girişi, Wallerian dejenerasyonunu etkinleştirmek için gereklidir (57). Hem yaralanmadan sonra aksone Ca^{+2} girişi ve gecikme fazının sonunda hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımı olmaktadır. Bu nedenle, akson ölümü sinyallemesinin ilk korunmuş aracısının kopmuş aksonlara dış Ca^{+2} akışı olması muhtemeldir. Kalsiyumun hücre içi konsantrasyonunun artmasıyla birlikte bazı intraselüler olayları ve gen regülatuar proteinlerinin aktivasyonunu başlatır. Nöronlarda, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), büyüme ile ilişkili protein (GAP) -43 ve c-jun dahil olmak üzere büyüme ile ilişkili proteinlerin üretimi ve kalsitonin geni ile ilgili peptid (CGRP), vazoaaktif intestinal peptid (VIP), P maddesi ve somatostatin düzeyi artarken, nörofilaman sentezi ve nörotransmitterlerin (asetilkolin) salınması baskılanır (58,59). Böylece bir büyüme konisi oluşur (60). Büyüme konisinin gelişimi, skar dokusu tarafından da inhibe edilebilir ve bu nedenle, aksonal büyüme konileri, bu skar dokusunun bozulmasını destekleyen proteazlar ve plazminojen aktivatörleri salgılar (60). Bu proteazlar ve plazminojen etkinleştiriciler ayrıca, büyüme konilerinin ilerlemesini engelleyen nöronal olmayan hücrelerden herhangi bir hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinin temizlenmesine yardımcı olur (60). SH'ler, aksonal büyümeyi teşvik etmek için nöronal gen ekspresyon profilini modifiye etmek için tirozin kinaz reseptörleri ile etkileşime giren nörotrofik faktörlerin ana kaynağıdır. NGF, aksonal büyümeyi ve SH çoğalmasını teşvik etmekten sorumludur (61). Bu aşamada, SH çekirdekleri daha yuvarlak hale gelir ve heterokromatin içeriği azalır

(62). SH'ler ve endonöral fibroblastlar, proksimal ve distal segmentler arasındaki bağlantıyı yeniden sağlamaya çalışan bir doku köprüsü olan nöromayı oluşturmak için lezyon bölgesinde göç eder ve çoğalır. Distal segmentte, denekteki siyatik sinirin kesilmesinden dört gün sonra, proliferen olan SK'ler, endonöral rejenerasyona dahil olan "Büngner bantlarını" oluşturan sütunlarda hizalanır (63). Büngner bantları, aksonal yeniden büyüme için fiziksel bir kılavuz oluşturan iç içe geçmiş SH'lerin doğrusal bantlarıdır. Ayrıca SH'ler, hücre dışı matriks içine dahil edilen fibronektin ve laminin gibi nöriti teşvik eden proteinler üretir. Büyüme konileri, endonöryumun bazal laminaına yapışma için bu proteinleri kullanır (61). Yaralanmadan yaklaşık 3-4 hafta sonra, fonksiyonel bağlantı tamamlanmadan önce olgunlaşmanın gerçekleşmesi gerekmektedir (80). Olgunlaşma süreci remiyelinizasyonu, akson genişlemesini ve son olarak işlevsel yeniden inervasyonu içerir. SH yayılması daha sonra durdurulur ve C-jun üretimi farklılaşmayı teşvik eder; NGF ve CNTF gibi nörotrofik faktörlerin salgılanması meydana gelir (64). Büyüyen aksonal uçlar nörogulin-1 (NRG-1) tip III ve I, ATP ve asetilkolin üretir, bu da SH fenotipinde miyelinleştirmeyen bir fenotipten miyelinleştirici bir fenotipe değişimi teşvik eder (65,66). Miyelinin çıkarılmasının zaman süreci, makrofaj alımının kinetiğiyle ve dejenere miyelini temizlemek için makrofajların ve SH aktivasyonunun kinetiğiyle belirlenir.

Yapılan bir çalışmada kemirgenlerde, yaralanmadan beş hafta sonra, ışık mikroskobu kullanılarak gözlemlenen genel sinir morfolojisinin normal görünümde olduğu izlenmiştir. Bununla birlikte, elektron mikroskobu kullanılarak, sinir lifi sayısında bir azalma (hem miyelinli hem de miyelinsiz) ve "rejenerasyon kümeleri" olarak adlandırılan üç veya dört rejenere aksondan oluşan küçük kümelerin gelişimi gözlemlenir (58). Ek olarak, miyelin kılıflarında makrofaj istilasası gözlenmiştir (67). Yaralanmadan yaklaşık olarak üç ay sonra sinir lifleri normale yakın görünür. Bununla birlikte, endonöryumun, perinöral hücrelere kademeli olarak farklılaşan bir fibroblast bolluğu ile hala birçok mikro bölmeye bölündüğü bulunmuştur. Normal perinöryum da bu süre içinde yenilenir. Birkaç ay sonra, orijinal siyatik fasiküllerin çevresinde yeni oluşan küçük fasiküller gözlemlenir (67,58).

2.2.3. Periferik Sinir Onarımı

Periferik sinir onarımında zamanlamanın üzerinde durmak gerekir. Bazı otoriteler yaralanmadan hemen sonra tamir önerirken, bazıları da üç haftadan sonra tamir önermişlerdir. (68) Onarımın zamanlaması yaralanmanın şekline, doku hasarının derecesine, sinirin uzunlamasına hasarına ve enfeksiyon riskine göre değerlendirilir. Bu faktörlerin baskın olduğu durumlarda geç tamir önerilmektedir. Geç tamirde sinir hasarının demarkasyonu gibi avantajları varken, sinirde küçülme, ikinci bir cerrahi gerekmesi gibi dezavantajları vardır. Temiz ve düzgün hasarlanmalarda ise mümkün olan en kısa zamanda tamir önerilmektedir. Bu dönemde endonöral tüplerde küçülme olmaması ve skar dokusu yokluğu avantajdır.

Periferik sinir onarımında anatomik diseksiyon ve mikroşirürji teknikleri kullanılması önemlidir. Milleri ve Terzis'e göre sinir onarımında 4 basamak vardır;

1. Sinir uçlarının hazırlanması, epinöryumun çıkarılması ve fasiküllere ayrılması,
2. Sinirler arasındaki açıklığın ve suture hattındaki gerginlik derecesinin değerlendirilmesi,
3. Sinir uçlarının fasiküler oryantasyon açısından uyumlarına dikkat edilmesi,
4. Yaklaştırılmış sinir uçlarının suture, fibrin, yapıştırıcı gibi mekanik yöntemlerle devam ettirilmesidir (46).

Tedavide epinöral onarım, fasiküler onarım ve sinir grefti ile onarım teknikleri kullanılır. Epinöral tamirde mikroşirürji teknikleri altında fasiküler yapı ortaya konulduktan sonra gerginlikten kaçınarak, mikrosirkülasyonu bozmadan uç uca anastamoz yapılmalıdır (69). Büyük sinirler 15 numara bistüri ile küçük sinirler mikromakasla sinir gövdesine dik olarak kesilmelidir. 6-0 veya 8-0 suture materyali ile epinöryum tam kat geçilerek anastamoz sağlanmalı, suture materyali fazla bası oluşturmayacak şekilde sıkılmalıdır. İşlem sonrası ekstremitelere 3-4 hafta askıya alınmalı stabilite ve immobilizasyon sağlanmalıdır. Fasiküler onarımda amaç her iki uçtaki fasiküllerin birbirlerine uyumunu yakalamaktır (70). Fibrotik doku eksize edildikten sonra büyütme altında 8-0 veya 10-0 suture ile perinöryum tam kat geçilmelidir. Bu

esnada fasiküler komponentin hasar görmemesine ve endonöral içeriğin fitikleşmamasına dikkat edilmelidir. İşlem sonrası ekstremitelere 4 hafta askıya alınmalı sonrasında uygun fizik tedavi ve rehabilitasyon programı uygulanmalıdır. Sinir uçlarındaki açıklığın fazla olduğu durumlarda uç uca anastomoz yönteminin etkisiz olduğu düşünülmektedir. Bu durumda sinir greftleri kullanılmaktadır. Genellikle otojen duyuşal sinir greftleri kullanılmaktadır. Sinir uçları eksizyonundan sonra fasiküllerin diseksiyonu sağlanır. 10-0 sütür materyali ile yaklaşık %20 pay bırakılarak gerginlik olmadan birleştirilir. Operasyon sonrası ekstremitelere immobilitesine gerek kalmaz.

Periferik sinir yaralanması tedavisi multidisipliner bir yaklaşım ve sabır gerektiren bir süreçtir. Aksonal rejenerasyonu ve nöronal yapıyı uyaran ajanların kullanılması iyileşmeyi olumlu yönde etkileyecektir.

2.3. PİOGLİTAZON VE NANOTEKNOLOJİ

Pioglitazon günümüzde tip 2 diabette glisemik kontrolü sağlamak için kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, beyin travması ve inme modellerinde nöroprotektif özelliklere sahip olduğuna dair önemli kanıtlar vardır (16,17,18,19,20,71). Etki mekanizmaları arasında, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve inflamasyon üzerine etkileri gibi bazı ortak bileşenler olduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte, pioglitazonun nöroprotektif etkisi altında yatan kesin mekanizma (lar) henüz net olarak aydınlatılmamıştır. Pioglitazon, özellikle PD6'da yeni bir nöroprotektif hedef olarak ortaya çıkan bir peroksizom proliferatör aktive reseptör gama (PPAR γ) agonisti olarak kabul edilmektedir. PPAR γ , beyin boyunca eksprese edilen ve promotör bölgelerinde bir PPAR cevap elementi (PPRE) içeren genlerin transkripsiyonunu başlatan, ligandla aktive edilmiş bir nükleer reseptördür.

PPAR γ , aynı zamanda ligandla aktive olan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. PPAR γ , ligandı tarafından aktive edildiğinde, hedef genlerinin promotör bölgesindeki peroksizom proliferatöre duyarlı elemana (PPRE) bağlanır ve böylece bunların ekspresyonunu düzenler (72). PPAR γ 'nin IDE promotöründe PPRE'ye

bağlanarak ve IDE proteininin ekspresyonunu indükleyerek hedef geninin, insülin parçalayıcı enzimin (IDE) transkripsiyonunu düzenleyebildiği gösterilmiştir (73). PPARy ayrıca β -amyloid cleavage enzyme 1 (BACE1) proteininin ekspresyonunu inhibe etmek için başka bir hedef genin, β -amiloid bölünme enzimi 1 (BACE1) promotöründeki PPRE'ye bağlanabilir (74). IDE'nin, A β 'yi bozduğu bilinmektedir (45), oysa BACE1, A β öncüsü APP'yi hidrolize eden ve A β üretiminin başlamasında rol oynayan bir enzimdir (75,76). PPARy agonistleri, adipoz dokudaki sikline bağımlı kinaz (CDK) 5 inhibitör yolu üzerinde etki eder, bu da adipositlerde DNA bağlama alanı ile PPARy'nin ligand bağlama alanı arasındaki menteşe bölgesinde yer alan Ser273 bölgesinin fosforilasyonunu inhibe eder. Bu nedenle, PPARy agonistlerinin beyindeki PPARy'nin fosforilasyonu üzerinde de inhibe edici etkisi düşünülmüştür (77). Bu etkinin CDK5'in inhibisyonu ile ilişkili olduğunu ve PPARy hedef genlerinin, Ide ve Bace1'in ekspresyonunu etkileyebileceğini ve bunun da A β üretimini azaltacağını ve A β bozunmasını teşvik edeceğini ve böylece bir nöroprotektif etki uygulayacağını düşünülmüştür (77). Oksidatif stres savunmasında rol oynayan genlerin indüksiyonu, antiinflamatuvar yanıtların indüksiyonu ve mitokondriyal biyogenezin stimülasyonu dahil olmak üzere çeşitli spesifik nöroprotektif ve onarım mekanizmaları PPARy'ye atfedilmiştir. Bununla birlikte, bu nöroprotektif etkilere yol açan PPARy'nin kesin moleküler mekanizmaları günümüzde yeterince aydınlatılamamıştır. (17) Bazı çalışmalarda pioglitazonun nöroprotektif etkisinin PPARy, NF- κ B ve IL-6 yolu ile aracılık ettiği vurgulanmıştır (78). Pioglitazonun mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirdiği, nöroproteksiyonu sağladığı ve fonksiyonel sonuçları iyileştirdiği gösterilmiştir (79).

Nanoteknoloji, "nanometre" boyut aralığında yapı ve cihazların kontrolüne, manipülasyonuna, çalışmasına ve üretimine izin veren teknoloji olarak tanımlanabilir (129). Günümüzde nanoteknolojide elde edilen gelişmelerin tıbbı uygulanması, hassas bir şekilde tasarlanmış malzemelerin kullanımı ile ilgili, yeni yöntemler geliştirilmesine yol açmıştır. Nanomalzemeler, ultra küçük boyut, geniş yüzey alanı gibi benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir (128). İlaç kullanımında ortaya çıkan problemleri en aza indirmek için, bu özellikleri kullanarak yeni gelişen teknolojilerden faydalanılır. Kompozit nanofiber yöntemi ilacın spesifik organ ya da dokulara

ulaşmasını sağlanmaktadır. Bu seçici hedeflendirme sayesinde, ilaçların istenmeyen yan etkileri azalmakta, en uygun terapötik yanıt elde edilmekte ve yüksek dozlarda kullanım esnasında ortaya çıkan toksik etkileri azaltarak ilacın daha güvenli bir şekilde kullanımını sağlanmaktadır (117). Etkin maddenin vücuttaki kan beyin bariyeri gibi engelleri aşarak hedef alana ulaşılabilmesi ve ilacın etki bölgesine ulaşmadan önce metabolik dönüşümle ortadan kaldırılması gibi olumsuzluklar bu yöntemlerle en aza indirgenmektedir. Bu yöntemle kullanılan etkin maddelerin parçalanması ve kaybı en aza indirilir (130).

Nanoteknoloji sistemleri, biyoaktif ajanların kimyasal reaksiyonda belli hızda belli bir yapıya spesifik olacak şekilde serbestlenmesi sonucu ortaya çıkar (117). Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemi yöntemiyle ilaçları daha etkili ve daha pratik olarak hedefe iletilmesini sağlar. Özellikle geriatrik hasta gruplarında ilaç takibini kolaylaştırır. Bu sayede ilacın düşük veya yüksek doz kullanımında daha etkin ve daha güvenli tedavi sağlanır. Nanotaşıyıcılar doğal veya sentetik polimerlerin kullanılması sonucu elde edilmektedir. Böylece bölgedeki nanotaşıyıcı bağışıklık sistemi tarafından tanınır ve hedeflenen bölgede, yabancı cisim olarak algılanması engellenmiş olur (129). Bu özelliklerden dolayı ilacın sadece hastalıklı bölgeye etki etmesi, tek uygulamada ilacın belirli bir hızda ve yeterli miktar da salım işlevi gerçekleşmiş olur.

Nanoteknoloji tıbbın çeşitli alanlarında halen kullanılmakta ve bu konu üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Yapılan nanopartikül araştırmaları sayesinde bugün birçok hastalığın teşhis ve tedavisi mümkün olmaktadır (132). İlaç taşıyıcı sistemlerde uygulama potansiyeline sahip olması nedeniyle sağlık alanında hızlı bir gelişme göstermekte, gün geçtikçe bu alanda daha fazla yer almaktadır. Nanoteknolojinin kullanımı; farmakolojik ajanların ve taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde önemli rol almaktadır. Gelecekte çalışmaların artması ile hastalıkların teşhis ve tedavisinde çok daha geniş yer alacağı düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada rat siyatik sinir yaralanması modelinde pioglitazonun sistemik ve kompozit nanofiber yöntemi ile verilmesi sonrası etkilerini incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda 40 adet 250-300 gram ağırlığında Wistar Albino cinsi yetişkin erkek rat kullanıldı. Deney süresince denekler standart laboratuvar şartlarında takip edilerek standart yem ve musluk suyu ile beslendi. Cerrahi işlem sonrası 15 gün yaşatılan hayvanlar sakrifiye edilmeden önce histopatolojik değerlendirme yapmak üzere siyatik sinir örnekleri alındı. İşlemler sonrasında intraperitoneal 80 mg/kg ketamine hydrochloride enjeksiyonu ile anestezi uygulanıp, kalp içine formol enjeksiyonu ile sakrifiye edildi.

Çalışma Grupları:

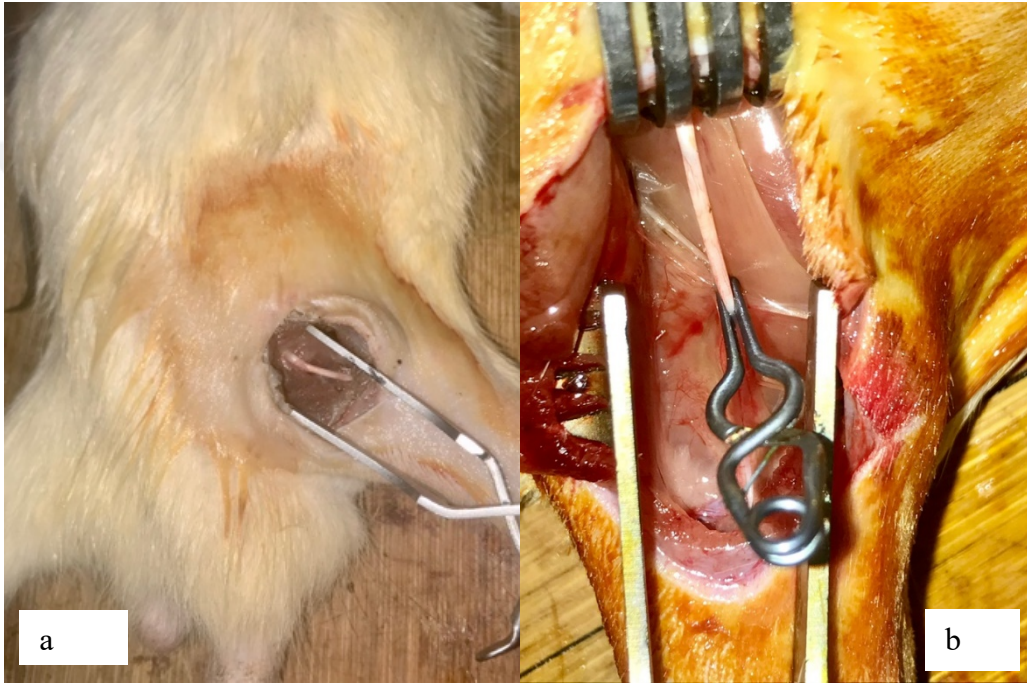
Her grupta sekiz adet hayvan olmak üzere beş grup oluşturuldu.

1. Grup: Hiçbir işlem yapılmayan kontrol grubu
2. Grup: Siyatik sinir hasarı oluşturulduktan sonra kesi yeri kapatılan grup.
3. Grup: Siyatik sinir hasarı oluşturulduktan sonra intraperitoneal yolla 0,5 mg/kg pioglitazon verilen grup.
4. Grup: Siyatik sinir hasarı oluşturulduktan sonra 61,89 ug/cm² pioglitazon içeren kompozit nanofiber'in hasarlı sinirin etrafına sarılan grup.
5. Grup Siyatik sinir hasarı oluşturulduktan sonra ilaç içermeyen kompozit nanofiberin hasarlı sinirin etrafına sarılan grup.

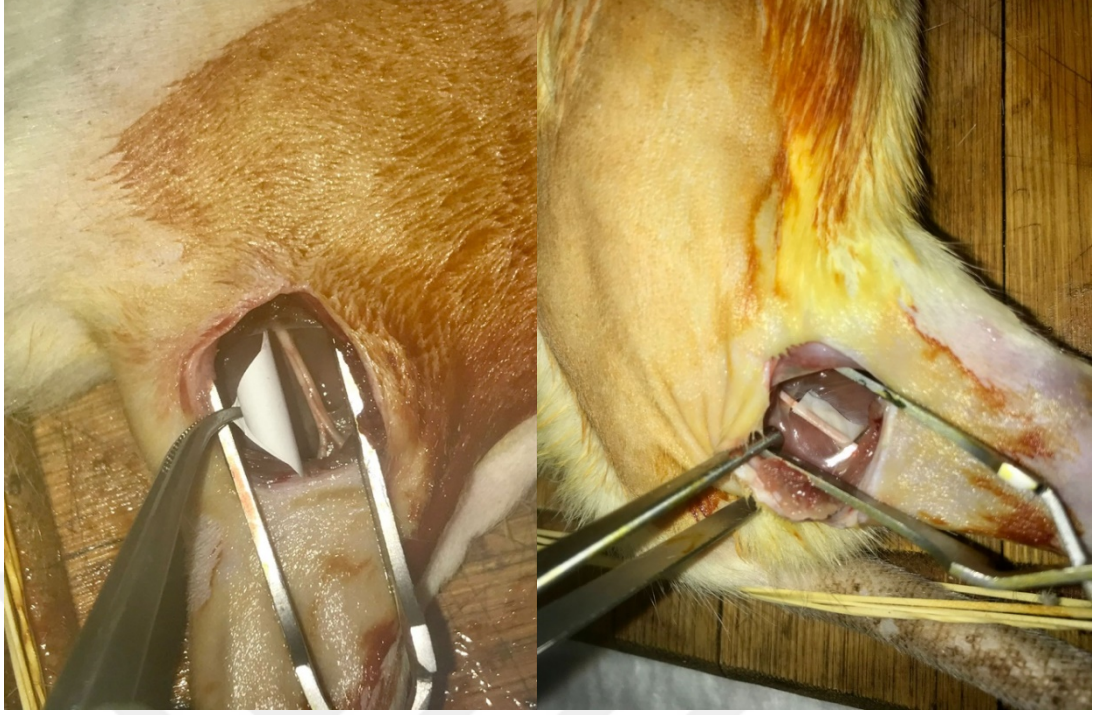
3.1. CERRAHİ İŞLEM

Tüm aşamalar aynı kişi tarafından, standart cerrahi yöntemler uygulanarak gerçekleştirildi. Hayvana intraperitoneal yöntemle 80 mg/kg ketamine hydrochloride ve 5 mg/kg xylazine hydrochloride enjekte edilerek anestezi altına alındı. Gerektiğinde rapel enjeksiyonların yapılması planlandı. Hayvan yüzüstü yatırılarak tespit tahtasına yerleştirildi. Glutea ve sağ uyluk bölgeleri traş edildikten sonra antiseptik solüsyon (povidon iyot) ile cerrahi alan boyandı. Oblik insizyon ile cilt ciltaltı geçildi. Takiben

gluteus maximus ve biceps femoris kasları arasından girilerek künt diseksiyon ile siyatik sinire ulaşıldı. Sinir penset ve mikromakas yardımıyla siyatik çentikten dallanma bölgesine kadar çevre dokulardan serbestleştirildi. Yaklaşık 20 mm uzunluğundaki sinirin orta noktasından Yaşargil anevrizma klipsi ile 1 mm uzunluk boyunca 50 g/cm² tutma kuvveti ile 30 saniye boyunca künt travmaya maruz bırakıldı. Kas, fasya, ciltaltı primer suture edildi. Cilt stapler ile kapatıldı. Tüm denekler cerrahi sonrası spontan olarak uyandırıldı.



Resim 3.1. a; Siyatik sinirin eksplorasyonu. b; Siyatik sinirin anevrizma klipi ile travmatize edilmesi.



Resim 3.2. Nanofiberin hasarlı siyatik sinirin etrafına sarılması.

3.2. İLAÇ HAZIRLAMA YÖNTEMİ

Metot:

Pioglitazon HCl için Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sistemi Yönteminin Geliştirilmesi

Bu çalışmada enkapsülasyon etkinliği ve salım çalışmaları için bir HPLC yöntemi kullanılmıştır. Validasyon çalışması yapılmamıştır. Her analiz öncesinde kalibrasyon eğrisi çizilerek sonuçların güvenilirliği sağlanmıştır. Literatür incelemesi sonucunda Pioglitazon HCl'nin kantitatif analizleri için kullanılan bir HPLC yöntemi modifiye edilerek bu çalışma için optimum RP-HPLC koşulları geliştirilmiştir (114).

Tampon ve stok çözeltilerin hazırlanması

Tampon çözeltisi 1,36 g KH_2PO_4 (potasyum dihidrojen fosfat) ve 1,74 g K_2HPO_4 (dipotasyum hidrojen fosfat) tartılarak belirli miktar deiyonize suda çözündürülmüş ardından orto-fosforik asit çözeltisi pH 2.6 ya ayarlanmıştır. Tampon daha sonra 0,45 μm karışık selüloz ester membran filtreden süzülmüştür.

Asetonitril içinde 0,6 mg/mL konsantrasyonda Pioglitazon HCl içeren stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltisi farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/mL) mobil faz ile seyreltilerek çalışma standardı solüsyonları hazırlandı.

Elektrospinning Yöntemi ile Pioglitazon HCl Yüklü PLGA Nanofiberlerinin Formülasyonu

PLGA, nanofiberlerin üretimi için en uygun polimer olarak belirlenmiştir. İstenilen çapta uniform, boncuksuz nanofiber üretmek için, polimer moleküler ağırlığı, çözücü sistemi, polimer çözelti konsantrasyonu ve nozül toplayıcı arası mesafe dahil olmak üzere elektrospinning parametrelerinin optimizasyonu araştırılmış ve diğer parametreler tüm deneysel çalışmalarda sabit değerlere ayarlanmıştır. Toplamda elektrospinning işleminin optimizasyonu için 6 deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. PLGA nanofiberlerinin hazırlanmasında elektrospinning parametrelerini optimize etmek için çalışılan farklı elektrospinning koşulları.

Çalışma	Polimer molekül ağırlığı	Polimer çözelti konsantrasyonu (%a/h)	Çözücü sistemi	Uygulanan voltaj (kV)	Nozül toplayıcı arası mesafe (cm)	Akış hızı (mL/sa)
1	38,000-54,000	15	THF:DMF (65:35)	20	12	2
2	38,000-54,000	18	THF:DMF (65:35)	20	12	2
3	38,000-54,000	20	THF:DMF (65:35)	20	12	2
4	38,000-54,000	25	THF:DMF (65:35)	20	12	2
5	38,000-54,000	25	THF:DMF (65:35)	20	16	2
6	38,000-54,000	25	THF:DMF (65:35)	20	18	2

Poli (Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA) Nanofiber Üretimi

Nanofiber hazırlama işleminin ilk aşamasında, polimer oranına göre PLGA %25 (a/h) ve Pioglitazon HCl %10 (a/a) miktarı doğru bir şekilde tartılmıştır. 1000 mg PLGA, THF: DMF (65:35, 2,6 mL:1,4 mL) organik çözücü karışımında çözülmüştür. PLGA tamamen çözünene kadar oda sıcaklığında ve manyetik karıştırıcı üzerinde

karıştırılmıştır. Daha sonra çözeltiliye 100 mg Pioglitazon HCl ilave edilmiş ve homojen bir durum elde edilinceye kadar karıştırmaya devam edilmiştir.

Elde edilen çözelti (4 mL, şırınga pompasına (NE-1000 Programlanabilir tek şırınga pompası) yatay olarak sabitlenen 10 mL'lik bir şırıngaya aktarılmıştır ve elektrospinning (Inovenso Ne300 Elektrospinning Cihazı), üretim parametreleri akış hızı = 2 mL/saat, uygulanan voltaj = 20 kV ve nozul toplayıcı mesafesi = 12 cm olarak ayarlanmıştır. Fiberler alüminyum folyo ile kaplı döner toplayıcının (300 RPM) yüzeyinde toplanmıştır.

Aynı elektrospinning parametreleri etkin madde içermeyen PLGA formülasyonu için de geçerlidir.

Enkapsülasyon Etkinliği

Pioglitazon HCl'nin enkapsülasyon etkinliğini (EE) belirlemek için, 1 cm² nanofiber mat kesilerek hassas bir şekilde tartılmış (0,68 mg) ve 10 mL hacimli bir şişede 1 mL DCM içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra şişeye 3 mL metanol ilave edilmiş ve ardından 5 dakika vortekslenmiştir. Ekstraksiyon sürecini, su banyosu sonikatöründe 10 dakika sonikasyon izlemiştir. Daha sonra DCM, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde hafifçe karıştırılarak buharlaştırılmıştır. Çözelti, 0,45 µm PTFE filtreden süzölmüştür. PLGA elektrospun nanofiber içerisindeki Pioglitazon HCl miktarı, geliştirilen HPLC yöntemi kullanılarak örneklerin analizleri ile belirlenmiştir. Pioglitazon HCl'nin EE değerleri aşağıdaki denklemle hesaplanmıştır:

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği (\%)} = \frac{\text{Pratik olarak nanofiber içindeki etkin madde miktarı}}{\text{Teorikteki etkin madde miktarı}}$$

Nanofiber Matın *In vitro* Salım Çalışmaları

Nanofiber formülasyonların *in vitro* salım deneyleri, düzenli kare parçalara (1 cm²; n=6) kesilmiş nanofiber matlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. PLGA nanofiber mattan Pioglitazon HCl'nin salım özellikleri, salım ortamı olarak pH = 7.4 (USP'ye

göre hazırlanmış) ile 40 mL fosfat tampon çözeltisine nanofiber mat parçalarının (yaklaşık 0,65 mg) yerleştirilmesiyle değerlendirilmiştir. Test yatay çalkalayıcılı su banyosunda gerçekleştirilmiştir ve şişeler $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ve 100 RPM'de su banyosunda tutulmuştur. Önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (0.5, 1, 2.5, 3.5, 4.5, 12, 24, 48, 96 saat) 1 mL numune alınmış ve sink koşulu korumak için salım ortamına aynı miktarda taze ortam eklenmiştir. Süzme işleminden sonra numuneler, geliştirilen HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Deneyler altı tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar zamanın bir fonksiyonu olarak kümülatif salım yüzdesi cinsinden sunulmuştur.

SONUÇLAR

Pioglitazon HCl için Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sistemi Yönteminin Geliştirilmesi

Sonuçlara göre, geliştirilen RP-HPLC yöntemi, Pioglitazone HCl'nin kantitatif tayini için uygun bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Pioglitazon HCl için RP-HPLC analizlerinde kullanılacak dalga boyunu seçmek için UV spektrofotometre ile maksimum absorpsiyon tayini yapılmıştır ve maksimum absorbans 267 nm'de gözlenmiştir.

Kromosil 100-5-C₁₈ 4.6x250 mm kolonu kullanılarak Pioglitazon HCl'in analizleri yapılmıştır. Testin optimum performansını sağlamak için çeşitli kromatografik koşullar incelenmiştir. Pioglitazon HCl için optimize edilmiş kromatografik koşul tabloda belirtilmiştir. Pioglitazon HCl için retensiyon süresi 4.5 dakika olarak kaydedilmiştir. Analiz için toplam çalışma süresi 7 dakika olarak seçilmiştir.

Tablo 3.2. Pioglitazon HCl için Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sisteminin Koşulları

Cihaz	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Metot	Ters Faz Kromatografi / izokratik elüsyon
Kolon	Kromosil 100-5-C ₁₈ 4.6x250 mm
Mobil faz	Metanol: Asetonitril: pH 2.6 fosfat tamponu (50:20:30)
Akış hızı	1 mL/dk
Dedektör	DAD
Dalga boyu	267 nm
Sıcaklık	Oda sıcaklığı
Retensiyon süresi	4.5 dk
Enjeksiyon hacmi	10 µl

PLGA Nanofiberler için Elektrosinning Parametrelerinin Optimizasyonu

En düşük PLGA konsantrasyonu (%15 a/h) en yüksek boncuk oluşturma eğilimine sahip olduğu gözlenmiştir. %18 ve %20 PLGA konsantrasyonu içeren formülasyonlar da boncuk içeren fiberlerle sonuçlanmıştır. %25 PLGA konsantrasyonunda boncuk sayısı yok denecek kadar azalmıştır. Nozül ile toplayıcı arasındaki mesafe arttıkça, jet daha da gerilmiş ve dolayısıyla jet çapını azaltmıştır. Sonuç olarak, ortalama lif çapı da azalmıştır.

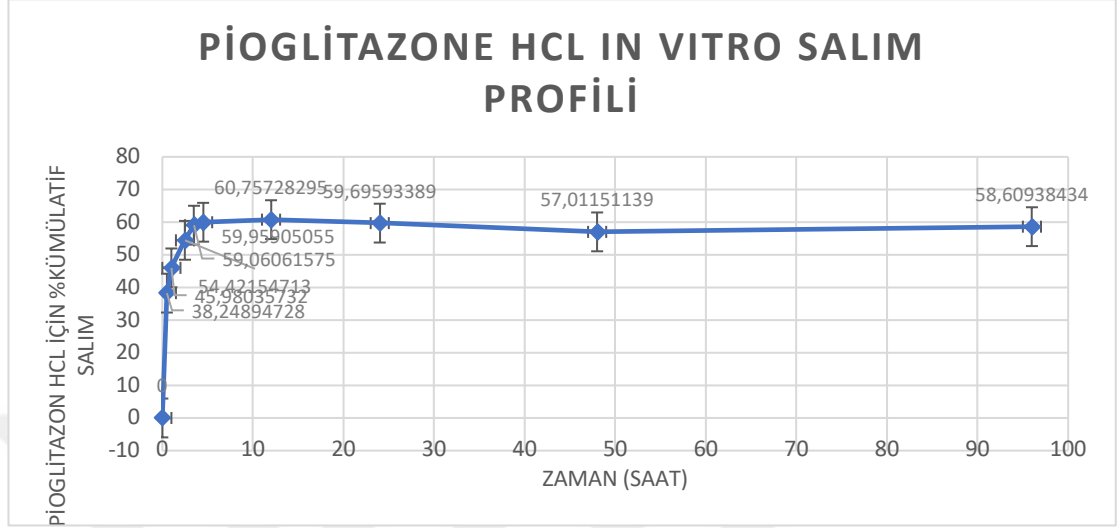
Enkapsülasyon Etkinliği

Enkapsülasyon Etkinliği (EE) analizleri üç kez tekrarlanmıştır. Pioglitazon HCl'nin EE'si %64,91 ±2,871 olarak bulunmuştur.

In vitro salım

In vitro salım çalışmaları pH 7.4 fosfat tamponunda (37 ± 0.5°C ve 100 RPM) 6 falkonda yatay çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. *In vitro* salım testi 96 saate kadar sürdürülmüştür ve önceden belirlenmiş her zaman noktasında 1 mL numune alınmış ve sink koşulun sağlanması için hemen 1 mL taze ortam eklenmiştir.

Pioglitazon HCl'nin ilk 4 saat içinde yaklaşık % 60'lık salım yüzdesi ortaya çıkardığı ve 96 saate kadar devam ettiği görülmüştür.



Şekil 3.1. Pioglitazon HCl'nin pH 7.4 ortamındaki *in vitro* salım profili (ortalama \pm SD; n=6).

3.3. DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

1. Genel değerlendirme

Denekler 15 günlük takip sürecinde oluşan genel değişiklikler izlendi. Postoperatif uyandıktan sonra deneklerin kafeslerinin içinde hareketli olduğu gözlemlendi. Bu süreçte denekler fare yemi ve musluk suyu ile beslendi. Sakrifiye edilen ratların yara yerleri temiz izlendi. Enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı.

2. Fonksiyonel değerlendirme

Motor fonksiyonları değerlendirme planıyla deneklere 60x7x20 cm ölçülerinde yürüyüş parkuru hazırlandı. Yürüyüş parkuru zeminine beyaz kağıtlar yerleştirildi. Deneklerin arka ayakları mürekkep emdirilmiş ıstampaya nazikçe bastırılarak hazırlanan kulvarda yürütülüp ayak izleri alındı. Siyatik fonksiyonel indeks (SFI) formül parametreleri ölçümleri yapıldı ve siyatik fonksiyonel indeks değerleri hesaplandı.

Siyatik fonksiyonel indeks (SFI) aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$SFI = \left| -38.3 \left(\frac{EPL-NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left(\frac{EIT-NIT}{NIT} \right) - 8.8 \right|$$

PL: (print length) 3. parmakla topuk arasındaki mesafe,

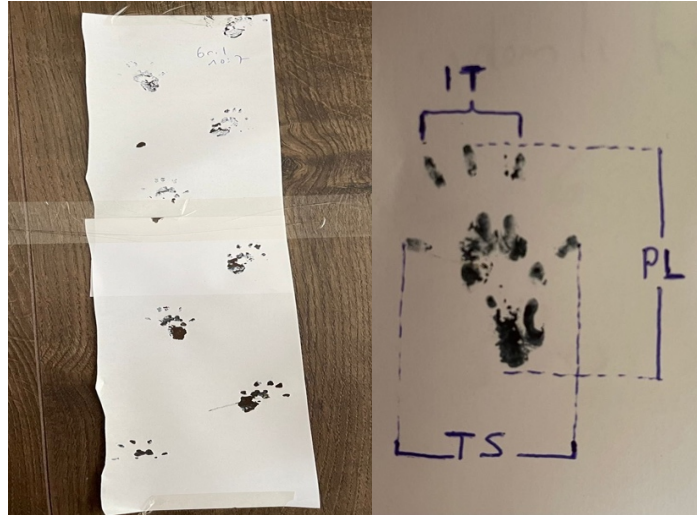
IT: (intermediate toe) 2. ve 4. Parmaklar arasındaki mesafe , adım ortası genişlik

TS: (Toe spread) 1. ve 5. Parmaklar arasındaki mesafe, adım genişliği.

N: normal

E: deneysel

SFI ölçümlerinde 0 ve -100 arası değerler elde edilir. Sıfır değeri normal fonksiyonu gösterirken, -100 değeri tam fonksiyon kaybını göstermektedir.



a

b

Resim 3.3. a; Yürüyüş parkurunda yürütülen deneğin ayak izleri. b; Deneğin ayak izi üzerinde IT (intermediate toe), PL (print length) ve TS (Toe spread) değerlerinin ölçümü.

3. Histolojik değerlendirme:

Denekler sakrifiye edildikten sonra yaklaşık 20 mm uzunluğunda siyatik sinir segmenti histopatolojik değerlendirme amacıyla blok halinde eksize edildi.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Deney gruplarına ait ratların siyatik sinir dokuları %10'luk paraformaldehit (PFA) içerisinde tespit edildi. Dokular distile suya alındıktan sonra sırasıyla; %50, %75, %95 ve %100'lük etil alkollerden 15'er dk ikişer kez geçirildi. Dokular kritik nokta kurutma cihazında (Leica EM, CPD300) kurutuldu. Daha sonra altın kaplama cihazıyla (Leica EM, ACE200) kaplandıktan sonra SEM (Hitachi, SU5000) ile incelendi.

Histolojik Değerlendirme

Çalışma gruplarına ait sakrifiye edilen ratların siyatik sinirleri, %10'luk formaldehitte 24-48 saat fikse edildi. Suda yıkama işleminden sonra %75, %96 ve %100'lük etil alkollerden geçirildi. Saydamlaştırma işleminde ksilol kullanıldıktan sonra dokular parafine gömüldü.

Histolojik doku takibi sonrası parafin bloklardan mikrotom (Leica, RM 2245) yardımıyla lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon için 60°C etüvde 1 gece bekletildi. Sırasıyla; ksilolde 30 dk ve %100, %96 ve %75'lik etil alkollerden geğirildikten sonra kesitler distile suya alındı. Hematoksilen (Sigma-Aldrich, 105174) ile 5 dk ve Eozin (Sigma-Aldrich, 109844) ile 1 dk süreyle boyandı. Masson Trikrom ile boyamalarda ise kit (Moslab, 01062020) kullanıldı. Suda yıkama işlemlerinden sonra artan etil alkol serilerinden geğirilen lamlar, ksilolde bekletildikten sonra entellan kullanılarak kapatıldı. İncelemeler ışık mikroskobu (Olympus, BX43) ile geręekleřtirildi.

İmmünohistokimya Yöntemi

Ratlara ait siyatik sinir dokularında S-100 (S1-61) (Santa Cruz, sc-53438, 1:300) protein lokalizasyonlarını belirlemek amacıyla uygulandı. Doku bloklarından adhezyon özellikli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Ksilol ile

deparafinizasyon işlemi sonrası dokular %100, %90, %80 ve %70'lik etil alkol serilerinden geçirildi. Distile suya alınan kesitlerde antijen retrieval işlemi sitrat solüsyonu içerisinde ve mikrodalga kullanılarak yapıldı. Yıkama işlemlerinden sonra kesitler %3'lük hidrojen peroksitte bekletildi. Bloklama ve sekonder antikor uygulamalarında immünohistokimya kiti (Millipore, DAB500) kullanıldı. DAB kromojeni ile geliştirilen kesitler Mayer's hematoksilen ile boyandı. Entellan kullanılarak kapatıldıktan sonra incelemeler ışık mikroskobu ile yapıldı.

4. Biyokimyasal değerlendirme

Deneklerden 0, 1, 2 ve 15. günlerde kuyruk kanları alındı. Örnekler alındıktan sonra pıhtılaşmanın tamamlanması amacıyla 30 dk. beklenip, takiben 1300xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Örnekler analize kadar - 80 C'de eppendorf tüplerinde muhafaza edilmiştir. Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α), Interlökin-6 (IL-6) ve albumin düzeylerinin ölçümü, ticari olarak mevcut olan ratlara özgü ELISA kitleri (USCN, Wuhan, Çin) kullanılarak yapılmıştır. TNF- α ELISA kiti (SEA133Ra) için örneklerin analizindeki tespit aralığı 15,6-1000 pg/mL ve sensitivitesi 5,9 pg/mL olarak belirtilmiştir. Kit için çalışma içi ve çalışmalar arası CV (coefficient of variation, varyasyon katsayısı) sırasıyla <%10 ve <%12 olarak belirtilmiştir. IL-6 ELISA kiti (SEA079Ra) için örneklerin analizindeki tespit aralığı 7,8-500 pg/mL ve sensitivitesi 3,3 pg/mL olarak belirtilmiştir. Kit için çalışma içi ve çalışmalar arası CV (coefficient of variation, varyasyon katsayısı) sırasıyla <%10 ve <%12 olarak belirtilmiştir. Rat albumin ELISA kiti (CEB028Ra) için örneklerin analizindeki tespit aralığı 12,35-10000 ng/mL ve sensitivitesi 48,3 ng/mL olarak belirtilmiştir. Kit için çalışma içi ve çalışmalar arası CV (coefficient of variation, varyasyon katsayısı) sırasıyla <%10 ve <%12 olarak belirtilmiştir. TNF- α , IL-6, albümin, TAS(total antioksidan seviye), TOS(Total oksidan seviye) ve tiyol değerleri ölçülerek etkilerin değerlendirilmesinin yapılması planlandı.

5. İstatiksel değerlendirme:

Yapılan deney sonuçlarında istatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism programı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplardan alınan kan örneklerinde biyokimyasal değerlendirmeler çift yönlü ANOVA analizleri ile karşılaştırıldı.

Gruplara ait veriler kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı istatistiksel farklılıklar küçük harfler ile belirtildi. Fonksiyonel siyatik indeks verileri Student T testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Gruplara ait siyatik sinirlerde S-100 protein ekspresyonlarının değerlendirilmesinde Image J programı IHC Profiler kullanılarak skorlamalar gerçekleştirildi. Görüntülerin skorlanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

Skor= (Bir bölgedeki piksel sayısı x Bölgenin skoru) / Görüntüdeki toplam piksel sayısı

Bölgenin skoru; pozitif bölge için 3, düşük pozitif bölge için 2 ve negatif bölge için 1 olarak belirlendi. Herhangi bir görüntüde, piksel yüzdesi %66'dan fazla olduğunda o bölgeye doğrudan skor verildi. Bu oran %66'dan az olduğunda ise yukarıdaki formül kullanıldı ve skorlama gerçekleştirildi. Skorlama sonuçları ve morfometrik ölçümler sonrası istatistiksel karşılaştırmalar Student's t-testi ile yapıldı. Tüm bu analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

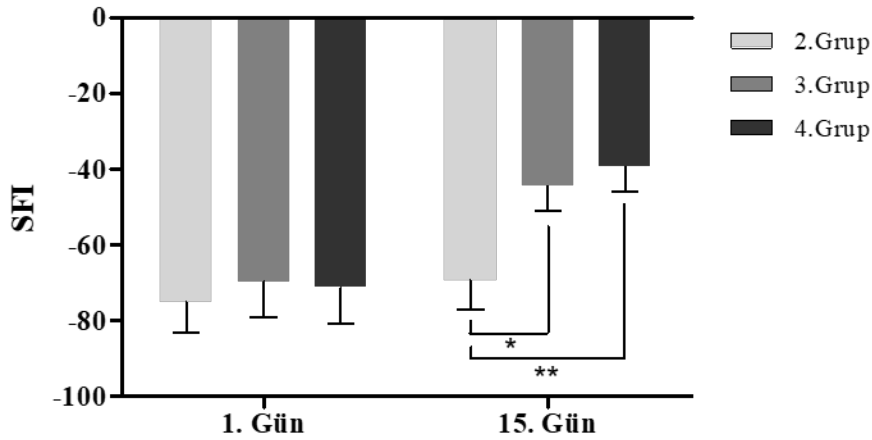
Fonksiyonel Değerlendirme

Yapılan yürüme testleri sonrası gruplar kendi aralarında değerlendirildi. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında değerlerin ortalamaları alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. 3. ve 4. grupların (nanofiber ve intraperitoneal pioglitazon tedavisi verilen grup) fonksiyonel siyatik indeks değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düzelme saptandı. Tedavi verilmeyen diğer grupların fonksiyonel siyatik indeks değerleri ise düşük düzeylerde kaldı. Tedavi verilmeyen 2. grup ile tedavi verilen 3. (p:0.0259) ve 4. (p:0,0098) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlendi.

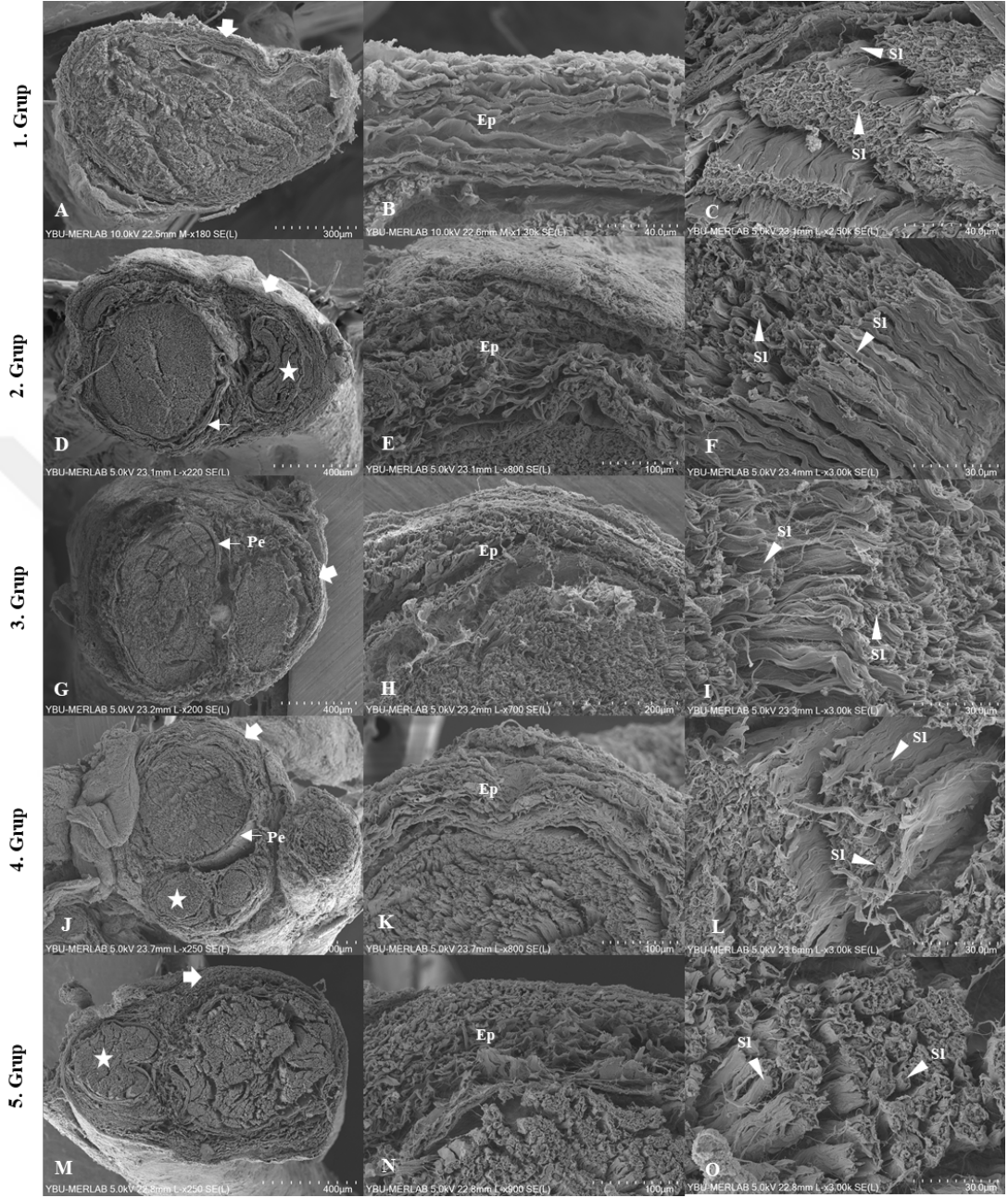
Tablo 4.1. 2, 3 ve 4. grupların pioglitazon tedavisinin fonksiyonel siyatik indeks sonuçlarının ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmesi

TEDAVİ GRUPLARI	1.GÜN	15.GÜN
2.GRUP	-75.11 \pm 22.13	-69,4 \pm 21.68
3.GRUP	-69,70 \pm 26,14	-44,36 \pm 18,40
4.GRUP	-71.17 \pm 27,12	-39,36 \pm 18,40

Tablo 4.2. 2, 3 ve 4. grupların pioglitazon tedavisinin fonksiyonel siyatik indeks grafiği



Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Bulguları



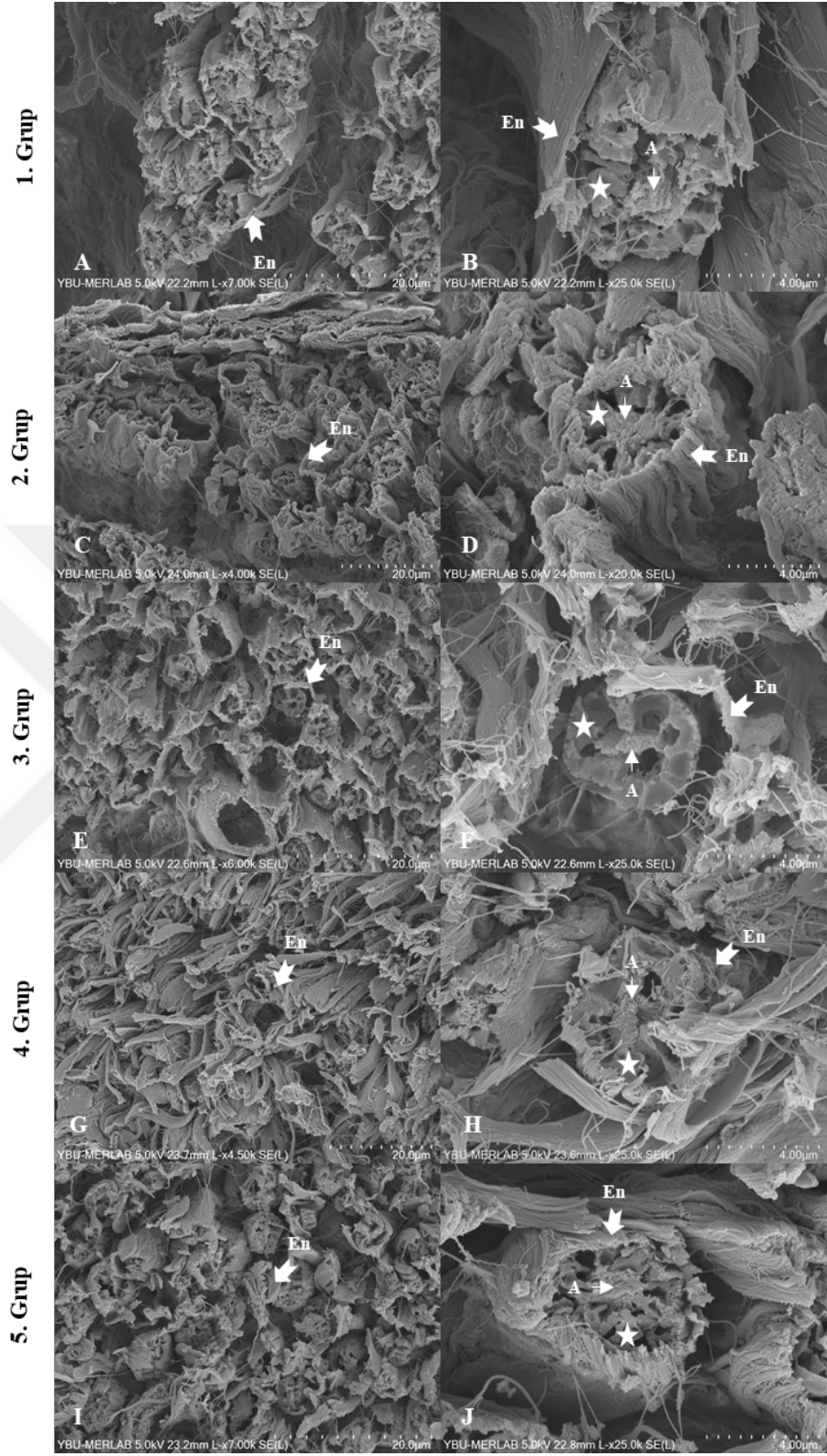
Şekil 4.1. Gruplara ait siyatik sinirlerde küçük büyültmeli SEM görüntüleri.

1. Grup (A-C), 2. Grup (D-F), 3. Grup (G-I), 4. Grup (J-L) ve 5. Grup (M-O). Epinöryum (Ep), Perinöryum (Pe), Fasikül (yıldız) ve Sinir lifleri (SI) (Bar: D,G,J,M: 400 µm, A: 300 µm, H: 200 µm, E,K,N: 100 µm, B,C: 40 µm, F,I,L,O: 30 µm).

Siyatik sinir doku yüzeylerinin 3 boyutlu görüntülerini elde etmek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Sağlıklı kontrol grubunda

siyatik siniri en dıştan saran epinöryum tabakası normal görünümüne sahiptir. Düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındaki epinöryum tabakasının büyük büyültmesinde ise kalın demetler oluşturan bağ dokusu lifleri dikkati çekmektedir. Buna ek olarak kontrol grubunda sinir lifleri düzenli yerleşimlidir. Hasar oluşturulan 2. gruba ait siyatik sinirin epinöryum tabakası ve fasikülleri saran perinöryum tabakası bütünlüğünü koruyamamıştır. Ayrıca sinir liflerini saran gevşek bağ dokusu yapısındaki endonöryum tabakası da zarar görmüştür. Hasar verilen grupla karşılaştırıldığında, 3. grupta epinöryum tabakasındaki bağ dokusu liflerinin arasındaki boşluklar azalmıştır ve daha düzenli bir yapı sergilemektedir. Rejenerasyon sonucu endonöryum tabakasının sinir liflerinin etrafında arttığı görölmüştür. 4. Gruba ait siyatik sinir SEM görüntülerinde epinöryum tabakasının kontrol grubuna benzer bir yapı sergilediği açık bir şekilde izlenmektedir. Aynı zamanda ince endonöryum tabakasının rejenerasyon sonucu sinir liflerinin etrafını sağlıklı grupla benzer bir şekilde sardığı görölmektedir. 2. Grup ile benzer bir yapı sergileyen 5. gruba ait siyatik sinir görüntüsündeki hasar yine belirgindir. Özellikle sinir liflerini çevreleyen endonöryum tabakasının boşluklu bir yapıda olduğu izlenmiş

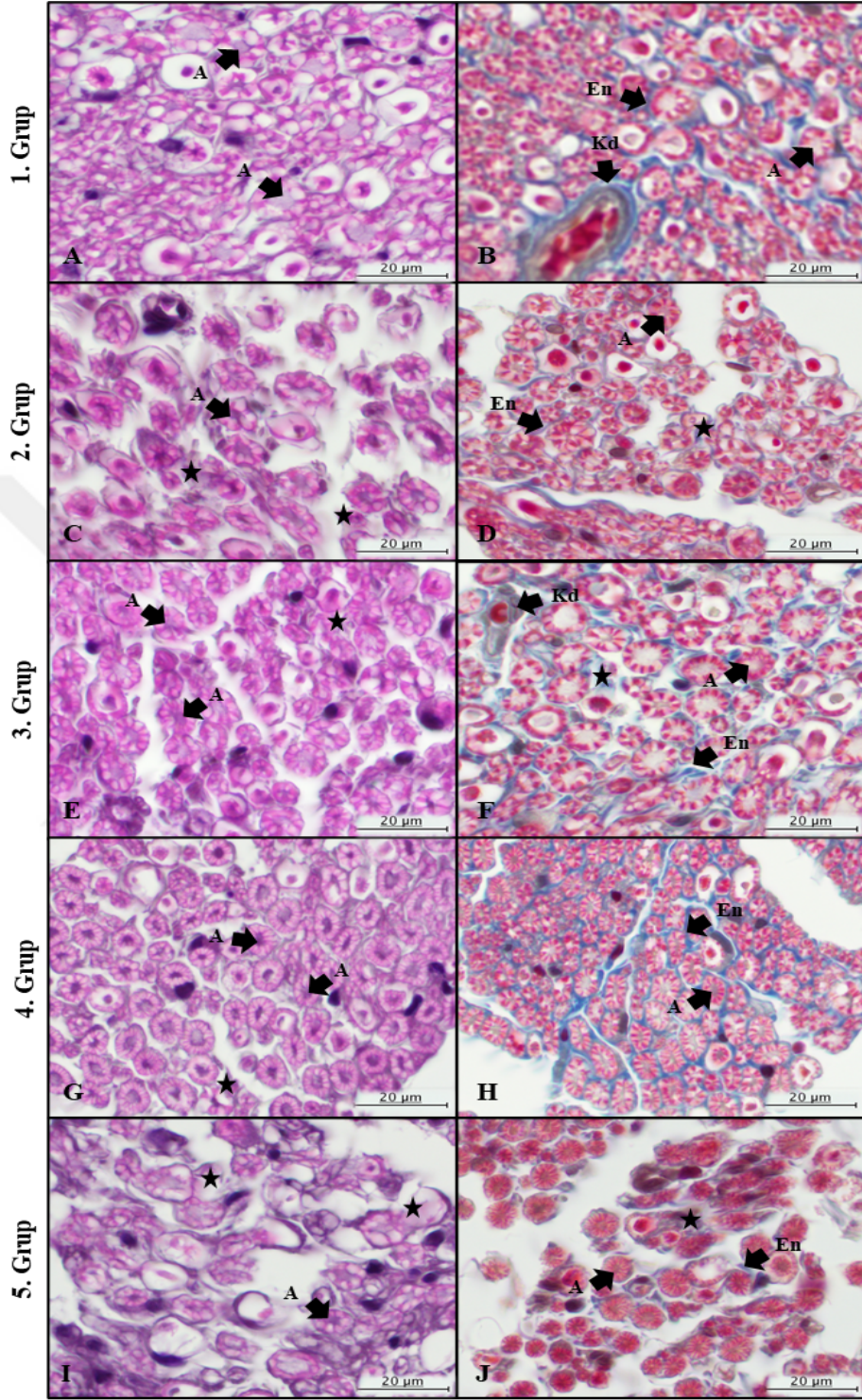
Sağlıklı kontrol grubunda siyatik sinir liflerinin büyük büyültmeli görüntülerinde çaplarının ve miyelin kılıflarının normal yapıda olduğu görölmektedir. Hasar verilen 2. gruptaki sinir liflerinin bazılarında akson ve miyelin kılıflarında önemli yapısal değişiklikler meydana gelmiştir. Özellikle miyelin kılıflarında normal konsantrik lameller yapısının yer yer bozulduğu dikkati çekti. 3. Grupta ise intraperitoneal pioglitazon verilmesi ile miyelin kılıflarda görölen vakuollerin azaldığı görölmüştür. Hasar verilen grup ile karşılaştırıldığında 4. grupta rejenerasyon belirgin bir şekilde artmıştır. Kontrol grubu (1.grup) ile benzerlik gösteren bu gruptaki sinir lifleri normal görünümüne sahiptir. 5. Grupta ise hasar verilen 2. gruptaki sinir liflerine benzer şekilde akson ve miyelin kılıflar zarar görmüştür.



Şekil 4.2. Gruplara ait siyatik sinirlerde büyük büyültmeli SEM görüntüleri.

1. Grup (A,B), 2. Grup (C,D), 3. Grup (E,F), 4. Grup (G,H) ve 5. Grup (I,J). Endonöryum (En), Akson (A) ve Miyelin kılıf (yıldız) (Bar: A,C,E,G,I: 20 µm, B,D,F,H,J: 4 µm).

Histolojik Değerlendirme Bulguları

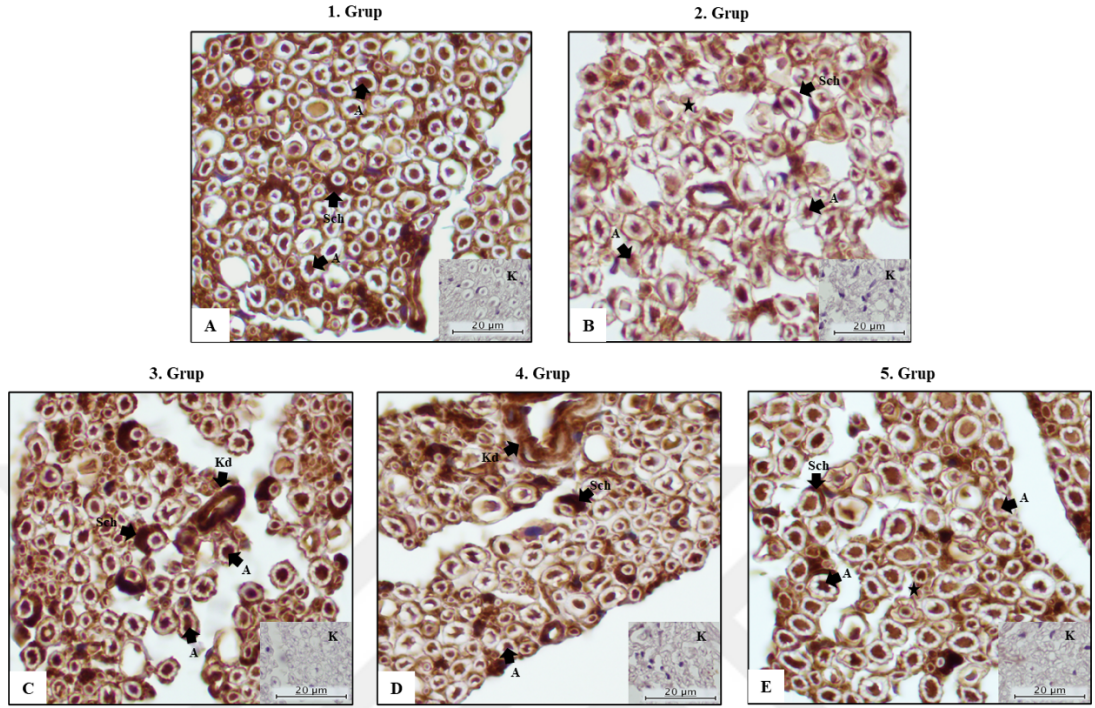


Şekil 4.3. Gruplara ait siyatik sinirlerin enine kesitlerinde histolojik boyama görüntüleri.

Hematoksilen ve Eozin boyamaları: 1. Grup (A), 2. Grup (C), 3. Grup (E), 4. Grup (G) ve 5. Grup (I).
Masson Trikrom boyamaları: 1. Grup (B), 2. Grup (D), 3. Grup (F), 4. Grup (H) ve 5. Grup (J).
Endonöryum (En), Akson (A), Kan damarı (Kd) ve Miyelin kılıf dejenerasyonu (yıldız) (Bar: 20µm).

Sağlıklı kontrol grubuna ait siyatik sinir kesitlerinin Hematoksilen-Eozin ve Masson Trikrom boyamalarında, sinir liflerinin düzenli bir yapıda olduğu dikkati çekmiştir. Doğal yapılarında görülen akson yapıları ve etraflarında miyelin kılıflar bulunmaktadır. 2. Gruba ait siyatik sinirlerde hasar oluşturulduğunda sinir lifleri arasında boşlukların meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca aksonlarda büzüşmeler ve miyelin kılıflardaki dejenerasyonlar dikkati çekmiştir. Hasar sonrası intraperitoneal pioglitazon verilen grupta ise sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında hafif miyelin kılıf dejenerasyonları görülmektedir ancak sinir lifleri genel olarak normal görünümüne yakındır. Lokal olarak siyatik sinirlerin etrafına pioglitazon emdirilmiş kompozit nanofiber uygulanan 4. grupta ise aksonal rejenerasyonun oldukça iyi olduğu görülmüştür. Düzenli miyelin kılıflara sahip sinir liflerinin de sağlıklı olduğu izlenmektedir. Hasar oluşturulduktan sonra ilaçsız nanofiber uygulandığında ise 5. gruba benzer şekilde aksonların büzüştüğü görülmüş ve miyelin kılıflardaki değişiklikler belirgin olduğu dikkat çekmiştir.

İmmünohistokimya Yöntem Bulguları



Şekil 4.4. Gruplara ait siyatik sinirlerde immünohistokimya sonrası S-100 protein ekspresyonları.

1. Grup (A), 2. Grup (B), 3. Grup (C), 4. Grup (D) ve 5. Grup (E). Kontrol grupları (sağ alt köşe), Akson (A), Schwann hücresi (Sch), Kan damarı (Kd) ve Miyelin kılıf dejenerasyonu (yıldız) (Bar: 20 µm).

İmmünohistokimya yöntemi sonrası sağlıklı kontrol grubundaki sinir lifleri normal görünümündedir. Schwann hücrelerinde S-100 protein ekspresyonları belirgindir.

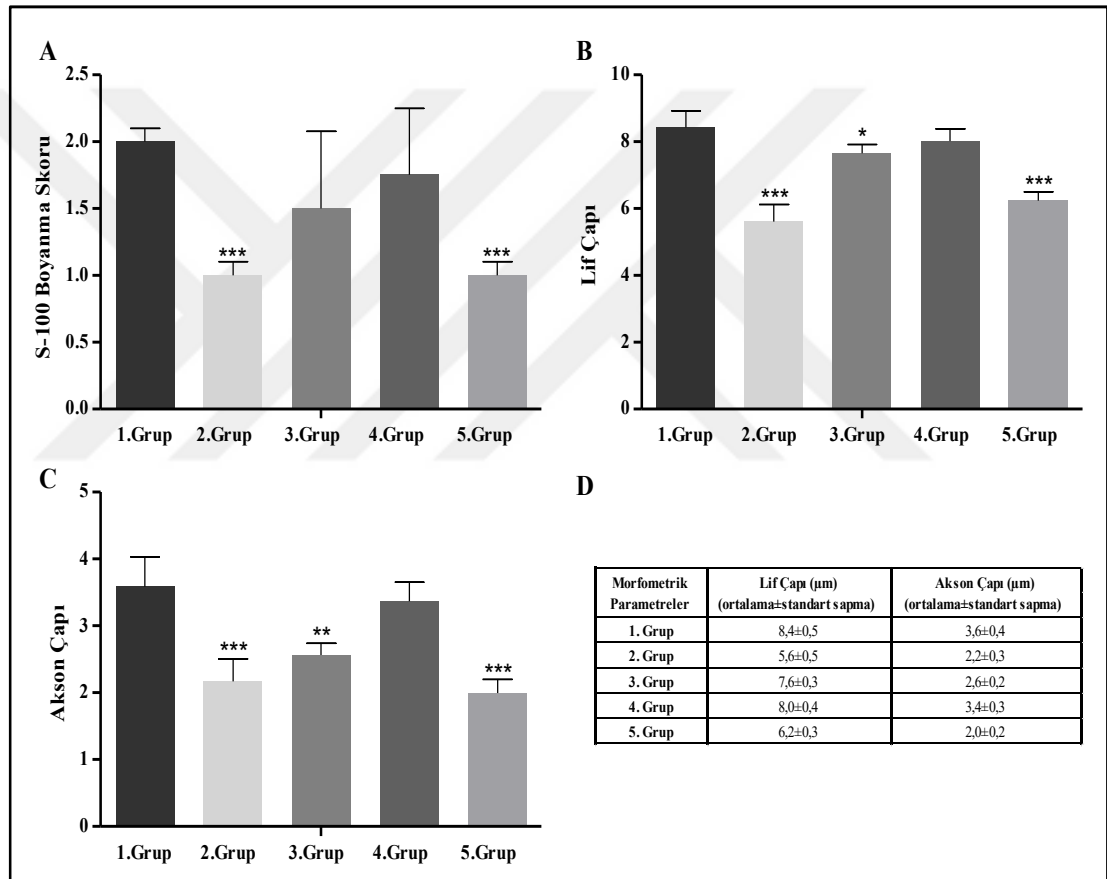
Hasar verilen 2. grupta aksonların büzüştüğü ve miyelin kılıflardaki dejenerasyonlar gözlenmektedir. Sinir liflerinin bazılarında aksonlar tamamen dejenere olmuştur.

3. Gruptaki S-100 ekspresyonlarının Schwann hücrelerinde yoğunluğu görülmektedir. Siyatik sinir liflerinde ve miyelin kılıflarda rejenerasyon olduğu görülmektedir.

S-100 ekspresyonları karşılaştırıldığında, yer yer hasarlı liflerin görülmesine rağmen kontrol grubuna en yakın düzenli görünüm 4. gruptadır. Akson ve miyelin kılıflardaki rejenerasyonlar belirgindir.

5. grupta ise sinir liflerinin düzensizliği ve miyelin kılıflardaki dejenerasyonlar dikkati çekmiştir.

Tablo 4.3. Gruplara ait siyatik sinirlerde histolojik değerlendirme sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri.



A) S-100 protein ekspresyonları, B) Lif çapları, C) Akson çapları, D) Lif ve akson çaplarının ortalama±standart sapma verileri.

Gruplardaki siyatik sinirlere ait S-100 protein ekspresyon düzeyleri, immünohistokimya yöntemi sonrası elde edilen 100x mikroskop görüntülerinden (n=5) Image J programı IHC Profiler ile analiz edilmiştir. Çekirdek boyanmalarına göre yapılan skorlama sonuçları GraphPad Prism'de istatistiksel olarak

değerlendirilmiştir. Student's t-test sonucunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2. ve 5. gruplarda ($p < 0,0001$) istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görülmektedir (anamlılık: $p < 0,05$). 3. ($p: 0,0928$) ve 4. ($p: 0,3048$) gruplar arasında ise kontrole göre anlamlı farklılıklar bulunmamıştır.

Kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi için ayrıca morfometrik parametreler kullanıldı. Çekilen 100x mikroskop görüntülerinden ($n=5$) lif ve akson çapları ölçüldü. Lif çapları değerleri kontrol grubunda 8,4 μm , 2. grupta 5,6 μm , 3. grupta 7,6 μm , 4. grupta 8 μm , 5. grupta 6,2 μm olarak ölçüldü. Yapılan istatistiksel analizler sonrası lif çapları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; 2. ($p < 0,0001$), 3. ($p: 0,0146$) ve 5. ($p < 0,0001$) gruplarda anlamlı azalmalar görüldü. 4. Grupta ise anlamlı bir fark bulunamadı ($p: 0,1645$). Akson çapları değerleri kontrol grubunda 3,6 μm , 2. grupta 2,2 μm , 3. grupta 2,6 μm , 4. grupta 3,4 μm , 5. grupta 2 μm olarak ölçüldü. Akson çapları değerlendirildiğinde ise kontrol grubuna göre; 2. ($p: 0,0005$), 3. ($p: 0,0014$) ve 5. ($p < 0,0001$) gruplarda yine anlamlı azalmalar görüldü. Ancak 4. grupta anlamlı bir fark izlenmedi ($p: 0,3790$). Bu çalışmada yarı ince kesit alacak transmission electron microscope (TEM) kullanılamaması sebebiyle histolojik derecelendirme yapılamadı.

Biyokimyasal Bulgular

Gruplar kendi aralarında oksidatif hasar ve antioksidan durumları karşılaştırıldı. Oksidatif tarafa kaymayı gösteren Disulfid/Total tiyol ($p < 0,0001$), Disulfid/Native tiyol ($p < 0,0001$) ve Disulfid ($p < 0,0110$) değerlerinin tedavi verilmemiş gruplarda anlamlı olarak yüksek bulunurken, Pioglitazon tedavisi verilen gruplarda anlamlı olarak düşük bulundu.

Pioglitazon tedavisi verilen gruplarda Native Tiyol ($p < 0,0001$), ve TAS ($p: 0,0005$) değerleri daha yüksek bulunurken Disulfid ($p < 0,0110$), Disulfid/Native tiyol ($p < 0,0001$), Disulfid/Total tiyol ($p < 0,0001$) ve TOS ($p < 0,0001$) değerleri daha düşük değerlerde bulundu. Pioglitazon verilmeyen gruplarda ise Native tiyol ($p < 0,0001$) ve TAS ($p: 0,0005$) değerleri daha düşük bulunurken Disulfid, Disulfid/Native tiyol ($p < 0,0001$), Disulfid/Total tiyol ($p < 0,0001$) ve TOS ($p < 0,0001$)

değerleri daha yüksek değerlerde bulundu. Albümin düzeylerinde gruplar arası anlamlı bir farklılık görülmedi.

Pioglitazon tedavisi verilen 3. ve 4. gruplarla tedavi verilmeyen 2. ve 5. gruplar arasında Native tiyol, Disulfid değerlerinde anlamlı fark görüldü. Nanofiber pioglitazon tedavisi verilen 4. grubun değerlerinin kontrol grubuna en yakın değerler olduğu görüldü.

Oksidatif hasarın genel durumu hakkında bilgi veren Oksidatif Stress İndeksi (OSİ): TAS/TOS değerleri pioglitazon tedavisi verilen gruplarda, tedavi verilmeyen gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek değerlerde bulundu. ($p < 0,0001$)

Grupların kendi aralarında inflamatuvar yanıtları değerlendirildi. IL-6 düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi. Pioglitazon tedavisi verilen gruplarda TNF ($p:0,0005$) değerleri düşük düzeylerde bulundu. Tedavi verilmeyen gruplarda ise TNF ($p:0,0005$) değerleri anlamlı olarak daha yüksek düzeylerde bulundu.

Tablo 4.4. Gruplar arasındaki istatistiksel sonuçlar

0.Gün					
	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup
Native Thiol (µmol/L)	383,16±37,31	383,16±37,31	393,82±40,41 ^{cd}	393,82±40,41	351,64±62,20
Total Thiol (µmol/L)	409,92±82,93	409,92±82,93 ^d	441,62±34,59 ^d	311,76±90,69 ^{abc}	398,34±60,74
Disulfide (µmol/L)	27,00±3,10	27,00±3,10	23,90±3,14	23,69±3,50	23,35±3,25
(Disulfide/Native Thiol)x100	7,11±1,18	7,11±1,18	6,19±1,58	8,89±2,95	6,86±1,83
(Disulfide/Total Thiol)x100	6,94±2,34	6,94±2,34	5,48±1,21 ^d	7,98±2,03 ^c	6,00±1,40
(Native Thiol/Total Thiol)x100	88,09±1,33	88,09±1,33	89,02±2,43 ^d	84,62±3,90 ^c	85,01±3,59
IMA (ABSU)	0,85±0,47	0,85±0,47	0,71±0,29	0,99±0,51	0,67±0,25
Albumin (g/L)	32,92±1,85	32,92±1,85	34,10±1,62	30,56±3,53	33,38±2,03
TNF	156,77±76,74	156,77±76,74	219,62±48,62 ^{de}	102,44±31,68 ^c	95,27±41,55 ^c
IL-6	11,25±3,90	11,25±3,90	12,55±3,24	11,87±1,32	11,18±1,46
TAS (mmol/L)	0,83±0,13	0,83±0,13	0,82±0,14 ^d	0,78±0,28 ^c	0,74±0,15
TOS (µmol/L)	15,27±9,37	15,27±9,37 ^a	11,54±6,43	17,27±7,70	15,54±5,13 ^a

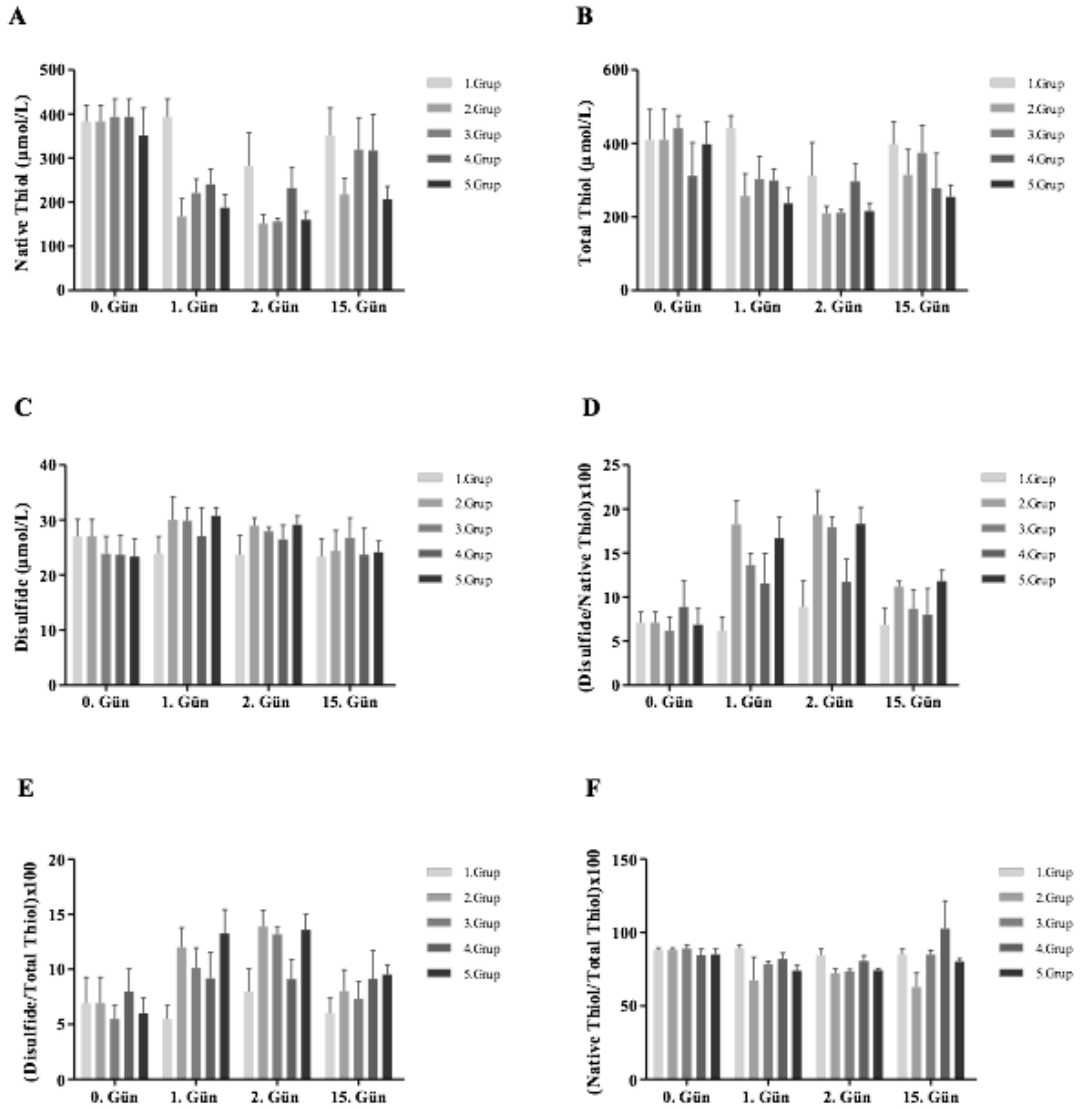
1.Gün					
	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup
Native Thiol (µmol/L)	393,82±40,41 ^{bde}	168,10±39,49 ^a	220,86±31,77 ^a	240,68±34,43 ^a	187,78±29,72 ^a
Total Thiol (µmol/L)	441,62±34,59 ^{bde}	256,74±60,98 ^a	303,48±61,23 ^a	299,80±31,12 ^a	237,30±41,52 ^a
Disulfide (µmol/L)	23,90±3,14 ^{bde}	30,04±4,16 ^a	29,90±2,34 ^a	27,08±5,16 ^a	30,78±1,49 ^a
(Disulfide/Native Thiol)x100	6,19±1,58 ^{bde}	18,25±2,64 ^{acd}	13,66±1,31 ^{ab}	11,56±3,36 ^{abc}	16,69±2,40 ^{cd}
(Disulfide/Total Thiol)x100	5,48±1,21 ^{bde}	12,00±1,78 ^a	10,13±1,82 ^{bc}	9,17±2,35 ^{bc}	13,26±2,15 ^{bc}
(Native Thiol/Total Thiol)x100	89,02±2,43 ^{bde}	67,47±15,67 ^{ac}	78,58±1,63 ^b	81,88±4,21 ^b	74,00±3,45 ^a
IMA (ABSU)	0,71±0,29 ^{bde}	1,40±0,36 ^a	1,55±0,16 ^a	1,35±0,13 ^a	1,34±0,18 ^a
Albumin (g/L)	34,10±1,62 ^b	34,22±3,03	34,58±1,25	35,18±1,88	34,50±0,85
TNF	219,62±48,62 ^{bd}	377,10±92,87 ^{acc}	270,87±73,07 ^b	356,97±114,95 ^{ac}	188,02±80,15 ^{bd}
IL-6	12,55±3,24	15,46±5,58	11,81±0,76 ^d	12,77±0,75 ^c	11,81±0,74
TAS (mmol/L)	0,82±0,14 ^{bde}	0,52±0,08 ^a	0,60±0,08	0,58±0,07 ^a	0,59±0,06
TOS (µmol/L)	15,27±9,37	21,61±2,39 ^d	14,18±3,28	6,71±1,04 ^{ac}	21,96±2,98 ^d

2.Gün					
	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup
Native Thiol (µmol/L)	282,32±75,37 ^{bce}	151,70±19,62 ^{cd}	156,16±7,62 ^{cd}	232,42±46,26 ^{bc}	160,28±17,84 ^a
Total Thiol (µmol/L)	311,76±90,69 ^{bc}	209,62±18,46 ^a	212,06±7,24 ^a	296,62±47,26	215,86±21,79
Disulfide (µmol/L)	23,69±3,50 ^{bde}	28,96±1,41 ^a	27,95±0,78	26,48±2,61 ^a	29,15±1,61 ^a
(Disulfide/Native Thiol)x100	8,89±2,95 ^{bde}	19,35±2,73 ^{cd}	17,93±1,16 ^{cd}	11,74±2,55 ^{abc}	18,32±1,88 ^{cd}
(Disulfide/Total Thiol)x100	7,98±2,03 ^{bde}	13,90±1,46 ^{cd}	13,19±0,62 ^{cd}	9,11±1,78 ^{bc}	13,59±1,39 ^{cd}
(Native Thiol/Total Thiol)x100	84,62±3,90 ^{bde}	72,18±2,92 ^a	73,61±1,25 ^a	80,74±3,66	74,19±1,33
IMA (ABSU)	0,99±0,51	1,07±0,27	1,27±0,09	0,77±0,19 ^c	1,42±0,03 ^d
Albumin (g/L)	30,56±3,53 ^{cd}	36,02±1,71 ^a	34,82±0,88 ^a	34,72±2,26 ^a	33,98±1,67
TNF	102,44±31,68 ^c	213,13±37,13 ^a	164,00±34,45 ^c	134,48±18,86	218,00±92,03 ^{bc}
IL-6	11,87±1,32 ^b	10,94±3,40	11,45±2,23	11,32±3,15	10,94±2,53
TAS (mmol/L)	0,78±0,28 ^b	0,59±0,11 ^d	0,80±0,12 ^c	0,88±0,07 ^{bc}	0,47±0,09 ^{bcd}
TOS (µmol/L)	11,54±6,43	21,23±7,12 ^{cd}	6,79±2,61 ^b	6,80±1,48	12,39±6,15

15.Gün					
	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup
Native Thiol (µmol/L)	351,64±62,20 ^{bde}	217,86±36,73 ^{acd}	319,50±72,49 ^{bc}	317,32±82,00 ^{bc}	206,62±29,13 ^{acd}
Total Thiol (µmol/L)	398,34±60,74 ^c	314,72±68,93	374,32±75,62 ^c	278,66±94,40 ^a	254,94±32,12 ^{bc}
Disulfide (µmol/L)	23,35±3,25	24,37±3,75	26,74±3,61	23,71±4,78	24,16±1,97 ^a
(Disulfide/Native Thiol)x100	6,86±1,83 ^{bde}	11,21±0,60 ^a	8,69±2,15	8,01±2,93 ^{ac}	11,81±1,24 ^{cd}
(Disulfide/Total Thiol)x100	6,00±1,40 ^{bde}	8,03±1,92 ^a	7,33±1,55	9,14±2,56 ^a	9,54±0,81 ^a
(Native Thiol/Total Thiol)x100	85,01±3,59 ^{bde}	62,75±9,74 ^{acc}	85,00±2,91 ^{bd}	102,65±19,06 ^{bce}	80,19±2,00 ^{bd}
IMA (ABSU)	0,67±0,25 ^{de}	1,36±0,37 ^a	1,07±0,41	1,59±0,45 ^a	1,42±0,05 ^a
Albumin (g/L)	33,38±2,03 ^{bde}	29,70±2,01 ^a	30,88±2,69	27,34±2,91 ^a	27,86±2,19 ^a
TNF	95,27±41,55	188,30±49,34 ^{cd}	57,31±50,16 ^b	52,60±23,86 ^b	143,20±26,38
IL-6	11,18±1,46	11,82±4,70	8,36±0,54	7,64±0,68	10,86±4,27
TAS (mmol/L)	0,74±0,15 ^c	0,73±0,13	0,87±0,19 ^c	0,72±0,16	0,61±0,09 ^{bc}
TOS (µmol/L)	17,27±7,70 ^{bc}	35,86±15,32 ^c	21,33±1,92 ^{bc}	25,03±4,85 ^c	37,51±7,89 ^{acd}

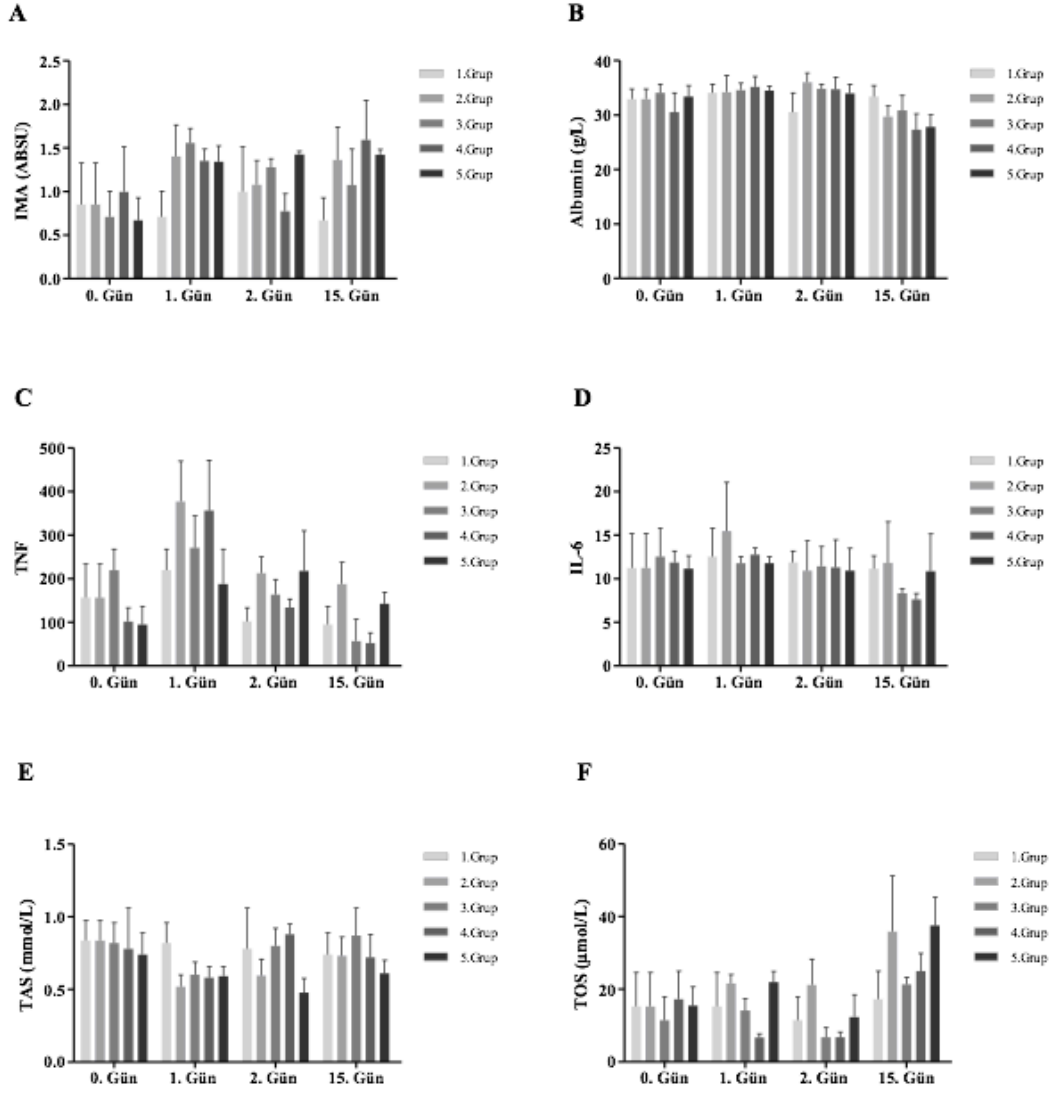
a; 1. Grup ve diğer gruplar arasındaki istatistiksel anlamlı fark, b; 2. Grup ve diğer gruplar arasındaki istatistiksel anlamlı fark, c; 3. Grup ve diğer gruplar arasındaki istatistiksel anlamlı fark, d; 4. Grup ve diğer gruplar arasındaki istatistiksel anlamlı fark, e; 5. Grup ve diğer gruplar arasındaki istatistiksel anlamlı fark.

Tablo 4.5. Günlere göre grupların kan sonuçları.



A: Grupların günlere göre Native Tiyol değerlerinin grafiği, B: Grupların günlere göre Total Tiyol değerlerinin grafiği, C: Grupların günlere göre Disulfid değerlerinin grafiği, D: Grupların günlere göre Disulfid/Native Tiyol değerlerinin grafiği, E: Grupların günlere göre Disulfid/Total Tiyol değerlerinin grafiği, F: Grupların günlere göre Native Tiyol/Total Tiyol değerlerinin grafiği.

Tablo 4.6. Günlere göre grupların kan sonuçları.



A: Grupların günlere göre IMA değerlerinin grafiği, B: Grupların günlere göre Albumin değerlerinin grafiği, C: Grupların günlere göre TNF değerlerinin grafiği, D: Grupların günlere göre IL-6 değerlerinin grafiği, E: Grupların günlere göre TAS değerlerinin grafiği, F: Grupların günlere göre TOS değerlerinin grafiği.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada ratlarda deneysel siyatik sinir hasarı modelinde sistemik ve kompozit nanofiber yöntemiyle lokal verilen pioglitazonun sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşme üzerindeki etkileri araştırıldı. Sonuçlar pioglitazon tedavisinin sinir yaralanma bölgelerinde fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığını, tedavi yöntemi olarak formüle edilmiş nanofiber uygulama yönteminin, sistemik pioglitazon tedavisine göre daha üstün olduğunu gösterdi. Sonuçlar fonksiyonel testler, immünohistokimyasal analizler, taramalı elektron mikroskop bulguları, histolojik değerlendirmeler ve biyokimyasal testlerle desteklendi.

Periferik sinir yaralanmaları nöroşirürji pratiğinde sık karşılaşılan ve hastanın yaşam kalitesini bozan bir durumdur. Tipik semptomlar, etkilenen uzuvda tam felce veya inatçı nöropatik ağrının gelişmesine neden olabilen duyu ve motor fonksiyon bozukluklarıdır (81). Bu durum ciddi iş gücü kaybına ve ekonomik olarak olumsuz sonuçlara yol açmaktadır. Travmatik vakaların yaklaşık %2.8 ila %5'i periferik sinir yaralanmaları olarak sınıflandırılmaktadır (82). Birçok yaralanma cerrahi sinir rekonstrüksiyonu gerektirir. Daha önce yapılan bir çalışmada median ve ulnar sinir onarımlarının sonuçları değerlendirildiğinde sadece %51,6'sının tatmin edici motor iyileşme sağladığını, hatta daha azı tatmin edici duyuusal iyileşme yaşadığını göstermiştir (83). Birçok çalışmada daha düşük bir sınır değeri (yalnızca yerçekimine karşı hareket) kullanarak daha yüksek iyi motor sonuç oranları bildirmektedir. Sinir onarımı tedavisinde amaç, yenilenen duyuusal, motor ve otonomik aksonları distal sinire yönlendirerek, sütür hattında minimum lif kaybıyla hedef organların yeniden inervasyonunu sağlamaktır (84). Günümüzde periferik sinir yaralanmaları tedavisinde çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Fakat tam başarı ile sonuçlanan tedavi yöntemi ve farmakolojik ajan bulunmamaktadır. Bu çalışmada; nöroprotektif etkisi üzerine birçok çalışma olan pioglitazonun periferik sinirde etkilerini ve sinirin hasarlı bölgesine ilacı lokal olarak iletebilen formüle edilmiş nanofiber tedavi yönteminin etkinliğini inceledik. Teknolojik imkanlar kullanılarak hazırlanan nanofiber formülasyonunun, nöroprotektif maddeyi hasarlı sinir bölgesine yeterli

konsantrasyonda uzun süre etki etmesini ve sinir rejenerasyonunu hızlandırması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada pioglitazonun antioksidan etki ile hasarlı sinirde düzelme yapabileceğini düşünülerek ve literatürde henüz bulunmayan Pioglitazon Disülfid/Native Tiyol dengesini ve toplam oksidatif durumun göstergesi olan TAS TOS düzeyleri incelendi. Ayrıca pioglitazonun antiinflamatuvar etkilerini göstermek için TNF ve IL-6 düzeyleri incelendi.

Tiyol, bir karbon atomuna bağlı kükürt ve hidrojen atomlarından oluşan ve hücrelerde oksidatif stres oluşumunu önlemede önemli rol oynayan organik bir bileşiktir (101). Tiyollerdeki fonksiyonel sülfhidril grupları (-SH), antioksidan enzimler için substrat ve serbest radikal süpürücü olarak işlev görmektedir. Plazma tiyol havuzunun büyük çoğunluğu albümin ve diğer plazma proteinlerinden oluşurken, küçük bir kısmı sistein, sisteinilglisin, glutasyon, homosistein ve γ -glutamilsistein gibi düşük moleküler ağırlıklı tiyollerden oluşmaktadır (102). Oksidatif stres koşulları altında, tiyol grupları disülfid bağları adı verilen tersinir formlarına dönüşürler (103). Bu disülfid bağları yeniden tiyol gruplarına indirgenebilir ve böylece dinamik tiyol-disülfid homeostazı korunur (104). Bu dengede ki bir değişikliğin, çeşitli klinik durumların patogeneğinde rol oynadığını bilinmektedir (105). Bu nedenle dinamik Tiyol-Disülfid homeostazının belirlenmesi farklı fizyolojik, patolojik ve biyokimyasal süreçlerde değerli bilgiler vermektedir. Bu çalışmada travmatik sinir hasarı oluşturulan ratlarda pioglitazon tedavisi verilen gruplarda oksidatif tarafa kaymayı gösteren Disülfid, Disülfid/Native Tiyol değerleri istatistiksel anlamlı olarak düşük bulunurken, oksidatif stressle ilişkili Native Tiyol, Total Tiyol değerleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Literatürde Beheshti ve arkadaşları çalışmalarında ratlarda hipokampusta pioglitazonun oksidatif hasarına karşı koruyucu etkileri olduğunu toplam tiyol konsantrasyonu üzerinden göstermişlerdir (125). Baghcheghi ve arkadaşları juvenil hipotiroidi ratlarda pioglitazonun serebellar doku oksidatif hasarı üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (126). Dobrian ve arkadaşları pioglitazon tedavisinin obez ratlarda renal oksidatif stresi azalttığı göstermişlerdir (127). Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak pioglitazon tedavisinin oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Nanofiber yöntemiyle pioglitazon tedavisi

verilen grupta Native Tiyol, Total Tiyol ve Disülfid sonuçları kontrol grubuna en yakın değerlerde bulunmuştur. Ek olarak pioglitazon tedavisi verilen gruplarda oksidatif hasarın genel durumu hakkında bilgi veren TAS değerleri anlamlı olarak daha yüksek bulunurken TOS değerleri anlamlı olarak daha düşük düzeylerde bulunmuştur. Bildiğimiz kadarıyla henüz literatürde bulunmayan, kompozit nanofiber teknolojisi kullanılarak uygulanan Pioglitazon tedavisi ile Disülfid/Native Tiyol dengesini ve toplam oksidatif durumun göstergesi olan TAS TOS düzeyleri ilişkisi, ilk olarak bu çalışmada gösterildi. Morató ve arkadaşları pioglitazon ile tedavinin , X'e bağlı bir adrenolökodistrofide mitokondriyal yıkımı ve oksidatif stresi önleyerek aksonal dejenerasyonu durdurduğunu göstermiştir (106). Cai W ve arkadaşları çalışmalarında inmede pioglitazonun anti-oksidatif ve anti-inflamatuar mekanizmalarla nöroprotektif etkisini göstermişlerdir (18). Peroksizom proliferatör reseptör gama (PPAR γ), kan beyin bariyerini geçen pioglitazon gibi tiazolidindion (TZD) ilaçları tarafından aktive edilir. TZD'ler birçok nörolojik hastalığın moleküler ve davranışsal sekellerini azalttığından bahsedilmektedir (85,86,87). PPAR γ agonistleri tiazolidindionların (TZD'ler, rosiglitazon, pioglitazon ve troglitazon) Alzheimer hastalığı (91), Parkinson hastalığı (92), ve amyotrofik lateral skleroz (93) hayvan modellerinde nörodejenerasyonu önleyebileceğini veya azaltabileceğini göstermiştir. PPAR γ agonistlerinin ayrıca serebral iskemi, omurilik yaralanması ve travmatik beyin hasarı gibi akut merkezi sinir sistemi hasarlarında nöroprotektif etki sağladığı gösterilmiştir (94,95,96). Yapılan çalışmalar oksidatif stresin nöronal hasardan sonraki 24 saat içinde meydana geldiğini göstermiştir (88). Günümüzde pioglitazonun tedavisinde kullanıldığı diyabetik polinöropatide ana fizyopatoloji hipergliseminin neden olduğu oksidatif streslerdeki artış ve anti-oksidatif mekanizmaların bozulmasıdır (89). Yapılan çalışmalar, PIO'nun mikroglial aktivasyonu ve oksidatif stresi azaltmak için PPAR γ aracılığıyla hareket ettiğini teorileştirmiştir (90). Pioglitazonun güçlü antioksidan etkileri, Alzheimer hastalığı ile ilişkili serebrovasküler değişikliklerde (97) ve sıçanlarda iskemi/reperfüzyon modellerinde (98) daha önce bildirilmiştir. Bir hayvan modelinde TZD tedavisinin nöroprotektif potansiyeli araştırılmış ve TZD'nin nöroprotektif etkisini, PPAR c agonistinin TNF-a inhibisyonu ve IL-6 gibi çeşitli etkileri, baskılanmış protein kinaz C (PKC) aktivitesi ve azalmış PKC-alfa ile insülin duyarlılığı ile açıklamaktadır (99,100). Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak

pioglitazonun antioksidan etkisi gösterildi. Ek olarak Tiyol Disulfid dengesi ile Pioglitazonun sinir yaralanmalarında oksidatif hasarı düzenlemede etkili olduğunu gösterildi.

SH'ler, yerleşik makrofajlar ve mast hücreleri tarafından salınan endojen TNF- α , sinir hasarından sonra ortaya çıkmaktadır. Periferik sinir yaralanmasından hemen sonra, lezyon bölgesinde TNF- α ekspresyonu artar ve bu durum makrofaj alımına yol açar (110). Bu alım muhtemelen metalloproteinaz tarafından veya adezyon moleküllerinin veya sitokinlerin up-regülasyonu yoluyla olmaktadır (111). TNF- α aktivasyonundan sonra SC'ler ve endonöryal makrofajlar tarafından üretilen metalloproteinaz-9, kan siniri bariyeri bozulmasını ve demiyelinizasyonu teşvik etmektedir (112). Uncini ve arkadaşları rat modelinde hasarlı siyatik sinirine TNF-a enjeksiyonunun, kan-sinir bariyerinin hasar görmesine ve damar duvarlarında inflamatuvar bir infiltrasyona sebep olarak, kan-sinir bariyeri bozulmasında TNF- α 'nın rolünü göstermişlerdir (113). Çalışmamızda gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında IL-6 düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. TNF değerleri ise Pioglitazon verilen gruplarda anlamlı düzeylerde düşük bulunurken, tedavi verilmeyen gruplarda TNF düzeyleri anlamlı düzeylerde yüksek bulunmuştur. Saxena ve arkadaşları pioglitazonunun artan konsantrasyonlarda, başta TNF-a olmak üzere inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını baskıladığı gösterilmiştir (122). Wang ve arkadaşları gut oluşturulan ratlarda pioglitazon tedavisinin TNF ekspresyonunu inhibe ederek akut gut artriti üzerinde anti inflamatuvar etkisini göstermişlerdir (123). Bu inflamatuvar göstergeler ile Pioglitazon ilişkisi incelendiğinde, literatürle uyumlu olarak Pioglitazonun inflamasyonu azalttığı gösterildi.

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında Hematoksilen-Eozin ve Masson Trikrom boyamalarında, pioglitazon tedavisi verilen gruplarda aksonal rejenerasyonun oldukça iyi olduğu görülmüştür. Miyelin kılıflar düzenli şekilde olup sağlıklı görünümde izlenmiştir. İlaç tedavisi verilmeyen gruplarda sinir lifleri arasında boşlukların meydana geldiği, aksonlarda büzüşme ve miyelin kılıflarda dejenerasyon dikkati çekmiştir. İmmünohistokimya yöntemi incelemesinde pioglitazon verilen gruplarda S-100 ekspresyonlarının Schwann hücrelerinde daha yoğun olduğu görülmüştür. Siyatik sinir liflerinde ve miyelin kılıflarda rejenerasyon daha belirgin

görülmektedir. Tedavi verilmeyen grupta miyelin kılıflardaki dejenerasyonlar daha belirgin görülürken, aksonların büzüştüğü gözlenmektedir. S-100 ekspresyonları karşılaştırıldığında, yer yer hasarlı liflerin görülmesine rağmen kontrol grubuna en yakın düzenli görünüm nanofiber yöntemiyle pioglitazon verilen grupta görülmüştür. Çalışmamızda hasarlı sinirde doku yüzeylerinin 3 boyutlu görüntülerini görmek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Pioglitazon tedavisi verilen gruplarda SEM görüntülerinde epinöryum tabakasının kontrol grubuna benzer bir yapı sergilediği, epinöryum tabakasındaki bağ dokusu liflerinin arasındaki boşlukların azaldığı ve daha düzenli bir yapı sergilediği görülmüştür. Ayrıca endonöryum tabakasının rejenerasyon sonucu sinir liflerinin etrafını sağlıklı grupla benzer bir şekilde sardığı, rejenerasyonun belirgin bir şekilde arttığı izlenmiştir. Nanofiber yöntemiyle pioglitazon tedavisi verilen gruptaki sinir lifleri normal görünümde olduğu izlenmiştir. Tedavi verilmeyen gruplarda ise sinirin epinöryum tabakası ve fasikülleri saran perinöryum tabakası bütünlüğünün bozulduğu görülmüştür. Ayrıca sinir liflerini saran gevşek bağ dokusu yapısındaki endonöryum tabakası da zarar görmüştür. Sinir liflerinin bazılarında akson ve miyelin kılıflarında önemli yapısal değişiklikler izlenmiş olup miyelin kılıflarında normal konsantrik lameller yapısının yer yer bozulduğu görülmüştür. Hu ve arkadaşları Pioglitazonun oksidatif stresi bastırarak nucleus pulposus mezenkimal kök hücrelerinde apoptozu azalttığı göstermiş, sonuçları ışık mikroskopu ve elektron mikroskop bulgularıyla desteklenmiştir. Pioglitazon tedavisi verilen gruplarda mitokondri sayılarında azalma olmadığına dikkat çekmiştir (124). Zhou ve arkadaşları, hematoksilen ve eozin boyamalarında pioglitazon tedavisi verilen periferik nöropati geliştirilen ratlarda, histolojik değişikliklerin ve inflamasyonun önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (109). Bu çalışmanın histopatoloji sonuçları literatürle kıyaslandığında paralel sonuçların elde edildiği görüldü.

Bu çalışmada pioglitazon tedavisinin etkilerinin değerlendirilmesinde histolojik ve biyokimyasal sonuçlarına ek olarak semptomatik değerlendirme de eşlik etmektedir. Fonksiyonel Siyatik İndeks (SFI), siyatik sinir fonksiyonunu değerlendirmek için altın standarttır (107). Fonksiyonel Siyatik İndeks Sıçan siyatik siniri ezilme yaralanma modelinde biyomekanik fonksiyonlar ile histomorfometrik

veriler arasında bir korelasyon olup olmadığının aydınlatılması, hayvanlardan ödün vermeden rejenerasyon durumunun doğru bir şekilde değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (108). Çalışmamızda yürüme testleri sonrası gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde pioglitazon tedavisi verilen grupların fonksiyonel siyatik indeks değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düzelme görülürken, tedavi verilmeyen diğer grupların fonksiyonel siyatik indeks değerlerinde iyileşme görülmemiştir.

Günümüz koşullarında biyoteknolojideki gelişim ve ilerleyen ilaç teknolojisi sayesinde ilaç tasarımlarında önemli aşamalar kaydedilmektedir. İlacın sadece patolojik bölgede etki göstermesi, etken maddenin dozunun azaltılması, dozlama aralığının uzaması, ilacın toksik etkilerinin azalması gibi birçok avantajlar sunmaktadır. Bu yöntem ilacı hedef bölgeye ulaştırın ilaç taşıma sistemleri ile mümkün olmaktadır (115). Bu sayede ilaç, vücudun belirli alanlarına seçici olarak taşınabilmektedir. Farmakolojik ajanın taşınmasının hedefi ilacın seçici olarak etki bölgesine taşınması, absorbe olması ve dağılması olarak tanımlanmıştır (116). Bu sayede, ilaçların istenmeyen yan etkileri azalmakta, en uygun terapötik yanıt elde edilmekte ve yüksek dozlarda kullanım esnasında ortaya çıkan toksik etkiler azaltarak daha güvenli bir şekilde kullanım sağlanmaktadır (117). Su Sena ve arkadaşları metformin içeren kompozit nanofiberlerin diyabetik ülser tedavisinde etkinliği göstermişler (118). Katarina ve arkadaşları tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, siprofloksasin içeren kompozit nanofiberin, sürekli ve kontrollü bir ilaç salım modeli sağladığı göstermiş olup yara iyileşmesinin ilaçsız gruba kıyasla daha kısa sürede gerçekleştiğini bildirmişlerdir (119). H E Colley ve arkadaşları insanlarda oral liken planusta klobetasol içerikli nanofiber tedavisinin etkinliğini göstermişlerdir (120). Haidar, M. K. ve arkadaşları sinir hasarı oluşturulan ratlarda nanofiber yöntemi ile uygulanan lipoic asit ve atorvastatinin nöroprotektif etkilerini göstermişlerdir (121). Bu çalışmada gruplar kendi aralarında kıyaslandığında nanofiber pioglitazon tedavisi verilen grubun değerlerinin kontrol grubuna yakın olduğu, bu yöntemin sistemik pioglitazon tedavisine kıyasla daha olumlu sonuçlar alındığı gösterilmiştir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada periferik sinir hasarı sonrası pioglitazon tedavisinin, fonksiyonel siyatik indeks değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzelme sağladığı, tedavi verilmeyen grupta ise fonksiyonel siyatik indeks değerlerinde düzelme olmadığı değerlendirildi. Biyokimyasal sonuçlar değerlendirildiğinde pioglitazonun oksidatif hasarı düzenlemede ve inflamasyonu azaltmada etkili bir ajan olduğu görüldü. Pioglitazon tedavisi verilen gruplarda Native Tiyol, Total tiyol, TAS değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Tedavi verilmeyen gruplarda Disulfid/Total tiyol, Disulfid/Native tiyol, TOS düzeyleri ise yüksek bulundu. Pioglitazon verilen gruplarda TNF düzeyi, tedavi verilmeyen gruplardan daha düşük değerlerde görüldü. Histopatoloji ve elektron mikroskopi sonuçları değerlendirildiğinde pioglitazon tedavisi verilen gruplarda aksonal hasarın tedavi verilmeyen gruplara göre daha az olduğu tespit edilmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda Pioglitazon tedavisi verilen gruplarda S-100 ekspresyonlarının Schwann hücrelerinde, tedavi verilmeyen gruplara göre daha yoğun olduğu dikkati çekmiştir. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kompozit nanofiber yöntemiyle lokal pioglitazon tedavisi verilen grubun sonuçları kontrol grubuna en yakın sonuçlar olarak bulunmuştur. Pioglitazon tedavisinin periferik sinir hasarı oluşturulan rat modellerinde fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığını, tedavi yöntemi olarak formüle edilmiş kompozit nanofiber uygulama tekniğinin, sistemik pioglitazon tedavisine göre daha başarılı sonuçlar elde edildiğini gösterdi.

7. KAYNAKÇA

1. Shiers, S., Mwirigi, J., Pradhan, G., Kume, M., Black, B., Barragan-Iglesias, P., Moy, J. K., Dussor, G., Pancrazio, J. J., Kroener, S., & Price, T. J. Reversal of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain and cognitive dysfunction via genetic and tomivosertib targeting of MNK. *Neuropsychopharmacology : Official Publication Of The American College Of Neuropsychopharmacology*, 2020. 45(3): 524–533.
2. Kouyoumdjian JA. *Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases*”Muscle Nerve, 34(6):785-8, 2006.
3. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 1998, 282: 1145–1147.
4. Martens W., Bronckaers A., Politis C., Jacobs R., Lambrechts I. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: An update, *Clin. Oral Investig.*, 2013, 17: 1969– 1983.
5. Noble J, Munro CA, Prasad VSSV, Midha R.. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries, *J Trauma*, 1998, 45: 116-22.
6. Siemionow M, Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair, *International Review of Neurobiology*, 2009, 87(C):141–172.
7. Tang P, Wang Y, Zhang L, He C, Liu X. Sonographic evaluation of peripheral nerve injuries following the Wenchuan earthquake. *J Clin Ultrasound*. 2012;40(1):7-13.
8. Grinsell D, Keating C. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies, *BioMed Research International*. Special Issue : 2014.
9. Torres RY, Miranda GE. Epidemiology of Traumatic Peripheral Nerve Injuries Evaluated by Electrodiagnostic Studies in a Tertiary Care Hospital Clinic. *Bol Asoc Med P R*. 2015;107(3):79-84.
10. C. A. Taylor, D. Braza, J. B. Rice, and T. Dillingham. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma, *The American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2008, 87(5):381–385.
11. White JD, Wang S, Weiss AS, Kaplan DL, Silk-tropoelastin protein films for nerve guidance, *Acta Biomater*, 2015, 14:1–10.
12. Jiang B, Zhang P, Zhang D, Fu Z, Yin X, Zhang H. Study on small gap sleeve bridging peripheral nerve injury, *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2006, 34:55–74.
13. Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration, *Biomaterials*, , 2014, 35:6143–6156.

14. Oprych KM, Whitby RL, Mikhalovsky SV, Tomlins P, Adu J. Repairing peripheral nerves: is there a role for carbon nanotubes, *Adv Healthc Mater*, 2006, 5:1253–1271.
15. Aquilante, C. L., Wempe, M. F., Spencer, S. H., Kosmiski, L. A., Predhomme, J. A., & Sidhom, M. S. Influence of CYP2C8*2 on the pharmacokinetics of pioglitazone in healthy African-American volunteers, *Pharmacotherapy*, 2013, 33(9):1000–1007.
16. Swanson CR, Joers V, Bondarenko V. et al., The PPAR-gamma agonist pioglitazone modulates inflammation and induces neuroprotection in parkinsonian monkeys, *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 91.
17. Blackburn, J. K., Curry, D. W., Thomsen, A. N., Roth, R. H., & Elsworth, J. D. Pioglitazone activates paraoxonase-2 in the brain: A novel neuroprotective mechanism, *Experimental neurology*, 2020: 327.
18. Cai W, Yang T, Liu H et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): A master gatekeeper in CNS injury and repair, *Prog Neurobiol*, 2018, 163–164: 27–58.
19. Brakedal B, Flones I, Reiter SF et al. Glitazone use associated with reduced risk of Parkinson’s disease, *Mov Disord*, 2017, 32: 1594–1599.
20. Wu HF, Kao LT, Shih JH et al. Pioglitazone use and Parkinson’s disease: a retrospective cohort study in Taiwan, *BMJ Open*, 2018, 8: e023302.
21. Yonutas, H. M., Hubbard, W. B., Pandya, J. D., Vekaria, H. J., Geldenhuys, W. J., & Sullivan, P. G. Bioenergetic restoration and neuroprotection after therapeutic targeting of mitoNEET: New mechanism of pioglitazone following traumatic brain injury, *Experimental neurology*, 2020, 327: 113243.
22. Djaouti L., Jourdan T., Demizieux L., et al. Different effects of pioglitazone and rosiglitazone on lipid metabolism in mouse cultured liver explants, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2010, 26(4):297–305.
23. Peymani M., Ghaedi K., Hashemi M. S., et al. Ameliorating the effect of pioglitazone on LPS-induced inflammation of human oligodendrocyte progenitor cells, *Cellular and Molecular Neurobiology*; 2018, 38(2):517–527.
24. Shen X., Yang L., Yan S., et al. The effect of FFAR1 on pioglitazone-mediated attenuation of palmitic acid-induced oxidative stress and apoptosis in β TC6 cells, *Metabolism*, 2014, 63(3):335–351.
25. Chen J., Li D., Zhang X., Mehta J. L. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human coronary artery endothelial cells: modulation by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand pioglitazone, *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2004, 9(1):35–41.
26. Werner C., Gensch C., Pöss J., Haendeler J., Böhm M., Laufs U. Pioglitazone activates aortic telomerase and prevents stress-induced endothelial apoptosis, *Atherosclerosis*, 2011, 216(1):23–34.
27. Zhang H. B., Zhang Y., Chen C., Li Y. Q., Ma C., Wang Z. J. Pioglitazone inhibits advanced glycation end product-induced matrix metalloproteinases and

- apoptosis by suppressing the activation of MAPK and NF-Kb, *Apoptosis*, 2016, 21(10):1082–1093.
28. Hu Y, Huang L, Shen M, et al. Pioglitazone Protects Compression-Mediated Apoptosis in Nucleus Pulposus Mesenchymal Stem Cells by Suppressing Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2019:4764071. doi:10.1155/2019.
 29. Lloyd, David, PC. Neuro patterns controlling transmission of ipsilateral hind limb reflexes in cat, *J Neurophysiol* 1943, 6:293-315.
 30. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*, 14th ed. McGraw-Hill Education, 2016: 164.
 31. Schmidt, H., & Knösche, T. R., Action potential propagation and synchronisation in myelinated axons, *PLoS computational biology*, 2009, 15(10): e1007004.
 32. Standring S., *Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice*, Elsevier Health Sciences; 2015.
 33. Kaplan S, Odaci E, Unal B, Sahin B, Fornaro M. Development of the peripheral nerve, *Int Rev Neurobiol*, 2009: 87:9-26.
 34. Mizisin, A. P., & Weerasuriya, A., Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta neuropathologica*, 2011, 121(3): 291-312.
 35. Ubogu EE., Biology of the human blood-nerve barrier in health and disease. *Exp Neurol*, 2020, 328:113272.
 36. King R., *Microscopic anatomy: normal structure. Handbook of clinical neurology*, Elsevier; 2013: 7-27.
 37. Myers RR, Powell HC, Shapiro HM, Costello ML, Lampert PW. Changes in endoneurial fluid pressure, permeability, and peripheral nerve ultrastructure in experimental lead neuropathy, *Ann Neurol*, 1980, 8:392-401
 38. Grinsell, D., & Keating, C. P. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *BioMed research international*, 2014.
 39. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A text and atlas*. 6th Edition, Lipincott Williams and Wilkins, 2014: 356.
 40. Jessen, K. R., Mirsky, R., & Lloyd, A. C. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb perspect in biol*, 2015, 7(7): a020487
 41. Mai JK, Paxinos G. *The human nervous system*: Academic Press; 2011.
 42. Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Wingfield Digby P, Fedorova M, Parkinson DB, Doddrell RD, Nakayama M, Adams RH, Lloyd AC. 2010. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell* 143: 145–155.
 43. Seddon H. Three Types of nerve injury, *Brain*. 1943;66:237-288.
 44. Castaldo JE, Ochoa JL. Mechanical injury of peripheral nerves. Fine structure and dysfunction. *Clin Plast Surg*. 1984;11(1):9-16.

45. Roberts, J. T. The effect of occlusive arterial diseases of the extremities on the blood supply of nerves; experimental and clinical studies on the role of the vasa nervorum. *American heart journal*, 1948, 35(3): 369–392.
46. Bozkurt G, Benli K. *Periferik Sinir Yaralanmaları: Temel Nörosirurji*. 1. Baskı. Benli K (Editör) Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Basımevi, Ankara 2004: 319-327.
47. Tsao B, Boulis N, Bethoux F, Murray B. Trauma of the Nervous System, Peripheral Nerve Trauma. In: *Daroff: Bradley's Neurology in Clinical Practice*, 6th ed. 2012: 984-1001.
48. Mters RR: Anatomy and microanatomy of pheripheral nerve. *Neurosurgery Clin N Am*, 1991, 2:1-20.
49. Massing MW, Robinson GA, Marx CE, Alzate O, Madison RD. Applications of Proteomics to Nerve Regeneration Research. In: Alzate O, ed. *Neuroproteomics*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010.
50. Renno WM, Benov L, Khan KM. Possible role of antioxidative capacity of (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment in morphological and neurobehavioral recovery after sciatic nerve crush injury, *J Neurosurg Spine*. 2017;27:593–613.
51. Marx J. Helping neurons find their way. *Science*. 1995, 268:971–973.
52. Taskinen HS, Røyttä M. The dynamics of macrophage recruitment after nerve transection. *Acta Neuropathol*. 1997;93:252–259.
53. Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*, 1999;9:313–325.
54. Rotshenker S. Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. *J Mol Neurosci*. 2003;21:65–72.
55. Raff MC, Whitmore AV, Finn JT. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science*. 2002;296:868–871.
56. Dubovy P, Jancalek R, Kubek T. Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2013;108:173-206.
57. George EB, Glass JD, Griffin JW. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci*. 1995;15:6445–6452.
58. Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve*. 2000;Suppl 9:S33–38.
59. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*. 1997;14:67–116.
60. Geraldo S, Gordon-Weeks PR. Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci*. 2009;122:3595–3604.
61. Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience*. 1990,35:157–165.

62. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996, 25:101–121.
63. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review, *Neurosurg Focus*, 2004, 16:E1.
64. Elfar JC, Jacobson JA, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ. Erythropoietin accelerates functional recovery after peripheral nerve injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90:1644–1653.
65. Birchmeier C, Nave KA. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growths and differentiation. *Glia.* 2008;56:1491–1497.
66. Vrbova G, Mehra N, Shanmuganathan H, Tyreman N, Schachner M, Gordon T. Chemical communication between regenerating motor axons and Schwann cells in the growth pathway. *Eur J Neurosci.* 2009;30:366–375.
67. Vallat JM, Leboutet MJ, Loubet A, Hugon J, Moreau JJ. Effects of glycerol injection into rat sciatic nerve. *Muscle Nerve.* 1988;11:540–545.
68. Kline DG; Hackett ER: Reevaluation of timing for exploration of civilian peripheral nerve injuries. *Surgery* 1975, 78:54-65.
69. Moberg E: Evaluation and management of nerve injuries in the hand. *Surg Clin North Am*, 1964, 44:1019-1029.
70. Kline DG: Surgical repair of peripheral nerve injury. *Muscle Nerve*, 1990, 13:843-852.
71. Patel SP, Cox DH, Gollihue JL, Bailey WM, Geldenhuys WJ, Gensel JC, Sullivan PG, Rabchevsky AG. Pioglitazone treatment following spinal cord injury maintains acute mitochondrial integrity and increases chronic tissue sparing and functional recovery. *Exp Neurol.* 2017 Jul;293:74-82.
72. Houseknecht K. L., Cole B. M., Steele P. J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and its ligands: A review. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2002, 22: 1–23. 10.1016/s0739-7240(01)00117-5
73. Du J., Zhang L., Liu S. B., Zhang C., Huang X. Q., Li J., et al. PPAR γ transcriptionally regulates the expression of insulin-degrading enzyme in primary neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, 383: 485–490. 10.1016/j.bbrc.2009.04.047
74. Lin N., Chen L. M., Pan X. D., Zhu Y. G., Zhang J., Shi Y. Q., et al. Trolox attenuates β -amyloid generation via suppressing PPAR γ -regulated BACE1 activity in N2a/APP695 cells. *Mol. Neurobiol.* 2006, 53: 6397–6406. 10.1007/s12035-015-9542-2
75. Sadleir, K. R., Eimer, W. A., Kaufman, R. J., Osten, P., & Vassar, R. Genetic inhibition of phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α does not block A β -dependent elevation of BACE1 and APP levels or reduce amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one*, 2014, 9(7): e101643.
76. Farajdokht F., Amani M., Mirzaei Babil F., Alihemmati A., Mohaddes G., Babri S. (2017). Troxerutin protects hippocampal neurons against amyloid β -induced

- oxidative stress and apoptosis. *EXCLI J.* 16, 1081–1089. 10.17179/excli2017-526
77. Quan, Q., Qian, Y., Li, X., & Li, M. Pioglitazone Reduces β Amyloid Levels via Inhibition of PPAR γ Phosphorylation in a Neuronal Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 2019, 11: 178.
 78. Deng, Y., Jiang, X., Deng, X., Chen, H., Xu, J., Zhang, Z., Liu, G., Yong, Z., Yuan, C., Sun, X., & Wang, C. Pioglitazone ameliorates neuronal damage after traumatic brain injury via the PPAR γ /NF- κ B/IL-6 signaling pathway. *Genes & diseases*, 2019, 7(2): 253–265.
 79. Sauerbeck A, Gao J, Readnower R, Liu M, Pauly JR, Bing G, Sullivan PG, Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. *Experimental neurology*, 2011a, 227:128–135.
 80. Caillaud, M., Richard, L., Vallat, J. M., Desmoulière, A., & Billet, F. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. *Neural regeneration research*, 2019, 14(1): 24–33.
 81. Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8 current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *International Review of Neurobiology*. 2009;87(C):141–172.
 82. S.W. Kemp, P.S. Cederna, R. Midha, Comparative outcome measures in peripheral regeneration studies, *Exp. Neurol.* 2017, 287: 348–357.
 83. Thomson JG. Median and ulnar nerve injuries: A meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair: Discussion. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2005;116(2):495–496.
 84. Brushart TME. The mechanical and humoral control of specificity in nerve repair. In: Gelberman RH, editor. *Operative Nerve Repair*. Philadelphia, Pa, USA: JB Lippincott; 1991, 215–230.
 85. Feinstein DL. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor agonists for neurological disease. *Diabetes technology & therapeutics*. 2003;5(1):67–73.
 86. Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci*. 2008;13:1813–1826.
 87. Maeda T, Kishioka S. Chapter 13 PPAR and Pain. In: Bagetta GCMTST, Sakurada S, editors. *International Review of Neurobiology*. Vol. 85. Academic Press; 2009. pp. 165–177.
 88. Sullivan PG, Springer JE, Hall ED, Scheff SW. Mitochondrial uncoupling as a therapeutic target following neuronal injury. *J Bioenerg Biomembr*. 2004;36:353–6.
 89. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*. 2004;25:612–628.

90. Thal SC, Heinemann M, Luh C, Pieter D, Werner C, Engelhard K. Pioglitazone reduces secondary brain damage after experimental brain trauma by PPAR-gamma-independent mechanisms. *J Neurotrauma*. 2011;28:983–93.
91. Escribano L, Simon AM, Perez-Mediavilla A, Salazar-Colocho P, Del Rio J, et al. Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer's disease mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 379: 406–410.
92. Carta AR, Frau L, Pisanu A, Wardas J, Spiga S, et al. Rosiglitazone decreases peroxisome proliferator receptor-gamma levels in microglia and inhibits TNF-alpha production: new evidences on neuroprotection in a progressive Parkinson's disease model. *Neuroscience* 2011, 194: 250–261.
93. Kiaei M, Kipiani K, Chen J, Calingasan NY, Beal MF. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist extends survival in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*, 2005, 191: 331–336.
94. Esposito E, Cuzzocrea S. Targeting the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in spinal cord injury. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15: 943–959.
95. Qi L, Jacob A, Wang P, Wu R . Peroxisome proliferator activated receptor-gamma and traumatic brain injury, *Int J Clin Exp Med*, 2010, 3: 283–292.
96. Lee CH, Park OK, Yoo KY, Byun K, Lee B, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and effects of its agonist, rosiglitazone, on transient cerebral ischemic damage. *J Neurol Sci*, 2011, 300: 120–129.
97. Nicolakakis N, Aboukassim T, Ongali B, Lecrux C, Fernandes P, Rosa-Neto P, et al. Complete rescue of cerebrovascular function in aged Alzheimer's disease transgenic mice by antioxidants and pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist. *J Neurosci*. 2008;28:9287–96.
98. Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol*. 2006;530:70–80.
99. Qiang X, Satoh J, Sagara M, Fukuzawa M, Masuda T, Sakata Y, Muto G, Muto Y, Takahashi K, Toyota T. Inhibitory effect of troglitazone on diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, 1998;41:1321–1326.
100. Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ozaki M, Kishioka S. Pioglitazone attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia in mice subjected to peripheral nerve injury. *J Pharmacol Sci*, 2008;108:341–347.
101. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*, 2000;72:653S-9S.
102. Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med*, 2013;65:244-53.

103. Cremers CM, Jakob U. Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation. *J Biol Chem*, 2013;288:26489-96.
104. Jones DP, Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples *in vivo*. *Free Radic Biol Med*, 2009;47:1329-38.
105. Prabhu A, Sarcar B, Kahali S, Yuan Z, Johnson JJ, Adam KP, *et al*. Cysteine catabolism: A novel metabolic pathway contributing to glioblastoma growth. *Cancer Res*, 2014;74:787-96.
106. Morató, L., Galino, J., Ruiz, M., Calingasan, N. Y., Starkov, A. A., Dumont, M., Naudí, A., Martínez, J. J., Aubourg, P., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Galea, E., Beal, M. F., Ferrer, I., Fourcade, S., & Pujol, A. Pioglitazone halts axonal degeneration in a mouse model of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain : a journal of neurology*, 2013, 136(Pt 8): 2432–2443.
107. Kanaya F., Firrell J. C., and Breidenbach W. C., Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration., *Plast. Reconstr. Surg.*, 1996, 98(7): 1264–71.
108. Wang, T., Ito, A., Aoyama, T., Nakahara, R., Nakahata, A., Ji, X., Zhang, J., Kawai, H., & Kuroki, H. Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: A comparison between sciatic functional index and kinematic analysis. *PLoS one*, 2018,13(12), e0208985.
109. Zhou, G., Yan, M., Guo, G., & Tong, N. Ameliorative Effect of Berberine on Neonatally Induced Type 2 Diabetic Neuropathy via Modulation of BDNF, IGF-1, PPAR- γ , and AMPK Expressions. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 2019, 17(3), 1559325819862449.
110. Murwani R, Armata P. Peripheral nerve fibroblasts as a source of IL-6, TNF α and IL-1 and their modulation by IFN γ . *J Neurol Sci*. 1998;161(2):99-109.
111. Liefner M, Siebert H, Sachse T, *et al*. The role of TNF- α during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol*. 2000;108(1-2):147-152.
112. Shubayev VI, Angert M, Dolkas J, *et al*. TNF α -induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci*, 2006;31(3):407-415.
113. Uncini A, Di Muzio A, Di Guglielmo G, *et al*. Effect of rhTNF- α injection into rat sciatic nerve. *J Neuroimmunol*. 1999;94(1-2):88-94.
114. Sripalakit, P., Neamhom, P., & Saraphanchotiwitthaya, A. High-performance liquid chromatographic method for the determination of pioglitazone in human plasma using ultraviolet detection and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2006, 843(2), 164–169.
115. Danckwerts M, Fassihi A. Implantable controlled release drug delivery systems: A review. *Drug. Dev. Ind. Pharm*, 1991; 17(11): 1465-1502.
116. Soloviev, M. Nanobiotechnology today: focus on nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology*, 2007; 5(11), 1-3.

117. Canefe K, Duman G. İlaçların Seçici Taşınması ve Hedeflendirilmesi, *Ankara Ecz. Fak Derg.* 1994; 23: 1-2.
118. Sena, S., Sumeyra, K. N., Ulkugul, G., Sema, A., Betul, K., Muge, S. B., Sayip, E. M., Muhammet, U., Cevriye, K., Mahir, M., Titu, M. A., Fikai, D., Fikai, A., & Gunduz, O. Controlled Release of Metformin Hydrochloride from Core-Shell Nanofibers with Fish Sarcoplasmic Protein. *Medicina*, 2009, 55(10), 682.
119. Kataria, K., Gupta, A., Rath, G., Mathur, R. B., & Dhakate, S. R. In vivo wound healing performance of drug loaded electrospun composite nanofibers transdermal patch. *International journal of pharmaceutics*, 2014, 469(1): 102–110.
120. Colley, H. E., Said, Z., Santocildes-Romero, M. E., Baker, S. R., D'Apice, K., Hansen, J., Madsen, L. S., Thornhill, M. H., Hatton, P. V., & Murdoch, C. Pre-clinical evaluation of novel mucoadhesive bilayer patches for local delivery of clobetasol-17-propionate to the oral mucosa. *Biomaterials*, 2018, 178: 134–146.
121. Haidar, M. K., Timur, S. S., Kazanci, A., Turkoglu, O. F., Gürsoy, R. N., Nemutlu, E., Sargon, M. F., Bodur, E., Gök, M., Ulubayram, K., Öner, L., & Eroğlu, H. Composite nanofibers incorporating alpha lipoic acid and atorvastatin provide neuroprotection after peripheral nerve injury in rats. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 2020,153: 1–13.
122. Saxena, M., Ali, D., Modi, D. R., Almarzoug, M., Hussain, S. A., & Manohrdas, S. Association of *TNF- α* Gene Expression and Release in Response to Anti-Diabetic Drugs from Human Adipocytes in vitro. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 2020, 13: 2633–2640.
123. Wang, R. C., & Jiang, D. M. PPAR- γ agonist pioglitazone affects rat gouty arthritis by regulating cytokines. *GMR*, 2014, 13(3), 6577–6581.
124. Hu, Y., Huang, L., Shen, M., Liu, Y., Liu, G., Wu, Y., Ding, F., Ma, K., Wang, W., Zhang, Y., Shao, Z., Cai, X., & Xiong, L. Pioglitazone Protects Compression-Mediated Apoptosis in Nucleus Pulposus Mesenchymal Stem Cells by Suppressing Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 4764071. Suppressing Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 4764071.
125. Beheshti F, Hosseini M, Hashemzahi M, Soukhtanloo M, Khazaei M, Shafei MN. The effects of PPAR- γ agonist pioglitazone on hippocampal cytokines, brain-derived neurotrophic factor, memory impairment, and oxidative stress status in lipopolysaccharide-treated rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2019;22(8):940-948.
126. Baghcheghi Y, Beheshti F, Salmani H, Soukhtanloo M, Hosseini M. Protective Effect of PPAR γ Agonists on Cerebellar Tissues Oxidative Damage in Hypothyroid Rats. *Neurol Res Int.*, 2016; 1952561.

127. Dobrian AD, Schriver SD, Khraibi AA, Prewitt RL. Pioglitazone prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity. *Hypertension*, 2004, 43(1):48-56.
128. McNeil SE. Unique benefits of nanotechnology to drug delivery and diagnostics. *Methods Mol Biol.* 2011;697:3-8. doi:10.1007/978-1-60327-198-1_1
129. Singh R, Lillard JW Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* 2009;86(3):215-223.
130. Şakalar Ç, İzgi K, Canatan H. Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.*, 2013; 27 (2): 105-111.
131. Bosselmann S, Williams RO. Has nanotechnology led to improved therapeutic outcomes?. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012;38(2):158-170.
132. Tüylek Z . İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim, *Bozok Tıp Derg.*, 2017; 7(3): 89-98.