

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SIÇANLARDA VİNKRİSTİN İLE OLUŞTURULAN
PERİFERİK NÖROPATİ MODELİNDE TAXİFOLİN
TEDAVİSİNİN ROLÜ:
NLRP3 ARACILI ETKİLER

Dr. Barış BULUT

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2025

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SIÇANLARDA VİNKRİSTİN İLE OLUŞTURULAN
PERİFERİK NÖROPATİ MODELİNDE TAXİFOLİN
TEDAVİSİNİN ROLÜ:
NLRP3 ARACILI ETKİLER

Dr. Barış BULUT

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŐMAN
Prof. Dr. Semra YİĞİTASLAN

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi Tarafından TTU-2024-3122 kodlu proje kapsamında
desteklenmiştir.

ESKİŞEHİR
2025

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sıçanlarda vinkristin ile oluşturulan periferik nöropati modelinde taxifolin tedavisinin rolü: NLRP3 aracı etkiler” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değçrlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından, 03.07.2025 tarihinde, 993-2 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Barış BULUT

Tarih:

İmza:

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Barış BULUT 'a ait “Sıçanlarda vinkristin ile oluşturulan periferik nöropati modelinde taxifolin tedavisinin rolü: NLRP3 aracı etkiler” adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:.....

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Başar SIRMAGÜL
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Semra YİĞİTASLAN
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun

Tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atilla Özcan ÖZDEMİR

Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresi boyunca kıymetli bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ'a, Prof. Dr. Başar SIRMAGÜL'e, Prof Dr. Engin YILDIRIM'a, Prof. Dr. Bilgin KAYGISIZ'a, Doç. Dr. Mahmut ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürler eder, saygılarımı sunarım. Bu sürecin en başından beri desteklerini esirgemeyen ve her konuda yardımcı olan tez danışmanım Prof. Dr. Semra YİĞİTASLAN'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca süreç boyunca yardımlarını eksik etmeyen Arş. Gör. Çiğdem ÇENGELLİ ÜNEL, Dr. Nuşin HARMANCI, Uzm. Dr. Elif ERDOĞAN ERDEN'e, Arş. Gör. Dr. Selin KANDEMİR, Arş. Gör. Dr. Serkan ÇELİK, Arş. Gör. Dr. Umut Barış SARAL ve anabilim dalında görevli personelimiz Özgül ÖZCAN ve anabilim dalı sekreterimiz Zeynep ARSLAN'a teşekkür ederim. Ayrıca bu projeye maddi anlamda destek veren Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

ÖZET

Bulut, B. Sıçanlarda vinkristin ile oluşturulan periferik nöropati modelinde taxifolin tedavisinin rolü: NLRP3 aracı etkiler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2025. Vinkristin özellikle pediatrik onkolojide sıklıkla kullanılan ve periferik nöropati yan etkisi sebebiyle tedavide aksaklıklara, hastaların yaşam kalitesinde azalmaya yol açan kemoterapötik bir ajandır. Yürüttüğümüz çalışmada vinkristinin sebep olduğu periferik nöropatiye ilişkin mekanizmalardan biri olan NLRP3 yolağı üzerinde taxifolinin etkilerini araştırmayı amaçladık. 32 adet Wistar albino erkek sıçan 8'erli 4 gruba ayrılmıştır. 1. grup kontrol grubu, 2. grup vinkristin (VCR) grubu, 3. grup vinkristin+taxifolin 25 mg/kg (VCR+TAX25) grubu, 4. grup vinkristin+taxifolin 50 mg/kg (VCR+TAX50) grubu olarak düzenlenmiştir. Bu gruplara belirlenen doz ve periyotta ilaç ve madde uygulamaları yapıldı. Çalışmamızda davranış testleri olarak mekanik allodini, termal hiperaljezi ve soğuk allodini testleri yapıldı. Motor fonksiyon ve koordinasyon değerlendirmeleri amaçlı ise aktivitemetre testi, rotarod testi ve ayak izi testi uygulandı. Motor iletim hızı değerlendirme amaçlı ise elektromiyografi (EMG) ölçümleri yapıldı. İmmünohistokimyasal olarak siyatik sinirde ve dorsal kök gangliyonlarında CD68, IL-1 β , IL-18, NF-kB, NLRP3, Kaspaz-1 immünreaktivitesi değerlendirilmiştir. Ayrıca siyatik sinir, dorsal kök gangliyonları, karaciğer ve böbrekte histopatolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Davranış deneyleri, motor koordinasyon deneyleri ve EMG'ye ait değerlendirmelerde VCR+TAX50 grubunda VCR grubuna göre anlamlı değişiklikler elde edilip kontrol grubuna benzerlik gösterirken, VCR+TAX25 grubunda oluşan modelde ise bu düzeyde etki görülmemiştir. Her iki grupta da bulgular siyatik sinire ait immünohistokimyasal değerlendirmelerle desteklenmiştir. Elde edilen tüm verilerle, kullandığımız yüksek doz taxifolinin analjezik ve antiallodinik etki gösterdiği ve bu etkilerin NLRP3 aracılı antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkisine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: taxifolin, NLRP3, periferik nöropati, vinkristin

Destekleyen Kurumlar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma

Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Bulut, B. The role of taxifolin treatment in a peripheral neuropathy model induced by vincristine in rats: NLRP3-mediated effects Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine Department of Medical Pharmacology, Medical Specialization Thesis, Eskişehir, 2025. Vincristine is a chemotherapeutic agent frequently used in pediatric oncology, which causes treatment delays and a decrease in patients' quality of life due to its peripheral neuropathy side effect. In our study, we aimed to investigate the effects of taxifolin on the NLRP3 pathway, one of the mechanisms involved in the peripheral neuropathy caused by vincristine. Thirty-two male Wistar albino rats were divided into four groups of eight. Group 1 was the control group, group 2 was the vincristine (VCR) group, group 3 was the vincristine+taxifolin 25 mg/kg (VCR+TAX25) group, and group 4 was the vincristine+taxifolin 50 mg/kg (VCR+TAX50) group. The drugs and substances were administered to these groups at the specified doses and intervals. In our study, mechanical allodynia, thermal hyperalgesia, and cold allodynia were performed as behavioral tests. The activity meter test, rotarod test, and paw print test were performed to evaluate motor function and coordination. Electromyography (EMG) measurements were performed to evaluate motor conduction velocity. Immunohistochemically, CD68, IL-1 β , IL-18, NF-kB, NLRP3, and Caspase-1 immunoreactivity were evaluated in the sciatic nerve and dorsal root ganglia. In addition, histopathological evaluations were performed on the sciatic nerve, dorsal root ganglia, liver, and kidney. Behavioral tests, motor coordination tests, and EMG assessments revealed significant changes in the VCR+TAX50 group compared to the VCR group, showing similarity to the control group, while no effect of this magnitude was observed in the model formed in the VCR+TAX25 group. Findings in both groups were supported by immunohistochemical assessments of the sciatic nerve. Based on all the data obtained, it is thought that the high dose of taxifolin we used exhibits analgesic and antiallodynic effects, and that these effects may be related to its NLRP3-mediated anti-inflammatory and neuroprotective effects.

Key Words: taxifolin, NLRP3, peripheral neuropathy, vincristine

Supporting Institutions: Supported by the Scientific Research Projects

Coordination Office of Eskişehir Osmangazi University.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Vinka Alkoloidleri	3
2.2. Vinkristinin Yapısı	3
2.3. Vinkristinin Etki Mekanizması	4
2.4. Vinkristinin Farmakokinetik Özellikleri	5
2.5. Vinkristinin Klinik Tedavide Kullanımı	7
2.6. Vinkristin İlişkili Yan Etkiler	8
2.7. Vinkristinle İlişkili Periferik Nöropati	8
2.7.1. Klinik Çalışmalar	10
2.7.2. Preklinik Çalışmalar	11
2.8. Vinkristin İlişkili Periferik Nöropati Mekanizmaları	12
2.8.1. Aksonal Hasar	12
2.8.2. Değişmiş İyon Kanal Aktivitesi	12
2.8.3. Oksidatif Stres	14
2.8.4. İmmün Yanıt	14
2.8.5. Glial Hücre Aktivasyonu	15
2.8.6. Sitokinler ve Kemokinler	15
2.9. NLRP3 İnflamazomu ve Nöropatide Etki Mekanizması	16
2.10. NLRP3 İnflamazomu ve Flavanoidler	20

	Sayfa
2.11. Taxifolin ve Etkileri	21
2.12. Taxifolin ve NLRP3 İnflamazomu	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Deney Hayvanları	25
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar	26
3.3. Deney Grupları	26
3.4. Vinkristin ile İndüklenen Periferik Nöropati Modeli	26
3.5. Vücut Ağırlık Ölçümleri	27
3.6. Davranış Testleri	27
3.6.1. Mekanik Allodini Değerlendirmesi	27
3.6.2. Termal Hiperaleji Değerlendirmesi	29
3.6.3. Soğuk Allodini Değerlendirmesi	30
3.7. Motor Koordinasyon ve Motor Performans Testleri	31
3.7.1. Lokomotor Aktivitenin Değerlendirilmesi	31
3.7.2. Rotarod Testi	31
3.7.3. Ayak İzi (footprint) Analizi	32
3.8. Motor İletim Hızının Değerlendirilmesi	33
3.9. İmmünohistokimyasal ve Histopatolojik Değerlendirmeler	34
3.10. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	Akut Miyeloid Lösemi
ASCO	Amerikan Klinik Onkoloji Derneği
ASC	Apoptozla ilişkili benek benzeri protein
ATP	Adenozin trifosfat
BAK-PLO	Baklofen, amitriptilin hidroklorür, ketamin, pluronik lesitin organojel
CHOP	Siklofosfamid, Doksorubisin, Vinkristin and Prednizon
CAV	Voltaj Kapılı Kalsiyum kanalları
CYP	Sitokrom P
COX-2	Siklooksijenaz-2
CD8	Sitotoksik T Hücreleri
DAMP	Hasarla İlişkili Moleküler Kalıplar
DRG	Dorsal Kök Gangliyonu
DMSO	Dimetilsülfoksit
ER	Endoplazmik Retikulum
G	Gram
GTP	Guanozin-5'-trifosfat
GSDMD	Gasdermin D
HO-1	Hem Oksijenaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IFN- γ	İnterferon Gama
IL	İnterlökin
IL-1 β	İnterlökin-1Beta
İNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
İP	İntraperitoneal
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KİPN	Kemoterapi İlişkili Periferik Nöropati
KV	Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
LPS	Lipopolisakkarit
L/KG	Litre/Kilogram

MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazlar
ML/DK	Mililitre/Dakika
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTDNA	Mitokondriyel deoksiribonükleik asit
MTROS	Mitokondriyel reaktif oksijen türleri
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NAV	Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NLRP3	Nükleotid oligomerizasyon alanı benzeri reseptör pyrin alanı içeren 3
NF-KB	Nükleer Faktör Kappa B
PAMP	Patojenle İlişkili Moleküler Kalıplar
PGE2	Prostaglandin E2
PO	Gavaj, per oral
P-GP	P-glikoprotein
R-CHOP	Rituksimab, Siklofosfamid, Doksorubisin, Vinkristin and Prednizon
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
S	Saniye
SFI	Siyatik Sinir Fonksiyon İndeksi
TLR4	Toll like benzeri reseptör 4
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör alfa
TRP	Transient Reseptör Potansiyelleri
TRPV 1	Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid Kanalı 1
VCR	Vinkristin
VİPN	Vinkristin İlişkili Periferik Nöropati

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Vinkristinin kimyasal yapısı	3
2.2. Vinkristinin etki mekanizması	4
2.3. Vinkristin ilişkili periferik nöropatide patogeneze	14
2.4. NLRP3 inflamazom aktivasyonu	18
3.1. Deney protokolü-1	25
3.2. Deney protokolü-2	26
3.3. Mekanik allodini değerlendirmesi	28
3.4. Termal hiperaljezi değerlendirmesi	29
3.5. Soğuk allodini değerlendirmesi	30
3.6. Lokomotor aktivitemetre sistemi	31
3.7. Rotarod test cihazı	32
3.8. Ayakizi (footprint) görüntüsü	33
3.9. Motor iletim hızının değerlendirilmesi	33
4.1. Vücut ağırlığı bulguları	37
4.2. Mekanik allodini bulguları	38
4.3. Termal hiperaljezi bulguları	40
4.4 Soğuk allodini bulguları	41
4.5. Rotarod testi bulguları	43
4.6. Lokomotor aktivite bulguları	44
4.7. Ayakizi analizi bulguları	45
4.8. EMG bulguları	46
4.9. Siyatik sinirde CD68 immünreaktivitesi	47
4.10. Siyatik sinirde Kaspaz-1 immünreaktivitesi	48
4.11. Siyatik sinirde NLRP3 yüzde immünreaktivitesi	49
4.12. Siyatik sinirde NF-kB immünreaktivitesi	50
4.13. Siyatik sinirde IL-1 β immünreaktivitesi	51
4.14. Siyatik sinirde IL-18 immünreaktivitesi	52
4.15. Siyatik sinirde H&E, Luxol fast, Toluidine blue boyaması	53
4.16. Dorsak kök gangliyonu H&E, Luxol fast, Toluidine blue boyaması	54
4.17. Böbrek ve karaciğer H&E boyaması	55

TABLÖLAR

	Sayfa
4.1. CD68 H skorlarının medyan değeri	47
4.2. Kaspaz-1 H skorlarının medyan değeri	48
4.3. NLRP3 yüzde H skorlarının medyan değeri	49
4.4. NF-kB H-skorlarının medyan değeri	50
4.5. IL-1 β H skorlarının medyan değeri	51
4.6. IL-18 H skorlarının medyan değeri	52



1. GİRİŞ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) en yaygın çocukluk çağı malignitesi olup, çocuklarda ve gençlerde (<19 yaş) hastalıktan ölümün önde gelen bir nedenidir(1). Pediatrik ALL için kombinasyon kemoterapi tedavisinin kritik bir bileşeni olan vinkristin (VCR), vinkristine bağlı periferik nöropatiye (VİPN) yol açabilir. VCR tedavisi gören birçok çocukta duysal, motor ve otonom sinirleri etkileyen VİPN görülür. Orta ile şiddetli VİPN gelişmesi VCR dozunun azaltılmasını gerektirir ve bu da kanser tedavisinin etkinliğini etkileyebilir. Ayrıca VİPN zamanla düzelmeyebilir, bu da tedavinin tamamlanmasından sonraki yıllar boyunca fonksiyonu ve yaşam kalitesini olumsuz etkiler(2).

VCR sitotoksik etkilerini mikrotübül oluşumu ve mitotik iğ dinamikleri ile etkileşim, hücre içi taşımanın bozulması ve tümör kan akışının azalması yoluyla gösterir. VCR aracılı hücrel bozulmanın nihai sonucu apoptozdur(3). Kanıtlar VİPN mekanizmalarının mikrotübül bozulması, bozulmuş aksonal taşıma, aksonal dejenerasyon ve mitokondriyel fonksiyonun bozulmasını içerebileceğini göstermektedir. Ek olarak, kemirgen çalışmalarından elde edilen son kanıtlar, VİPN'nin nöroinflamatuvar mekanizmalar tarafından yönlendirildiğine dair güçlü veriler sunmaktadır. Bu mekanizmalar içerisinde VCR monosit/makrofajlarda Nod benzeri reseptör 3 (NLRP3) inflamazomunu aktive ederek kaspaz-1'in aktivasyonuna ve ardından sinir duyarlılaştırıcı interlökin-1 β 'nın (IL-1 β) salınmasına yol açması mevcuttur(4).

Taxifolin çeşitli tıbbi bitkilerde bol miktarda bulunan bir flavonoid olup kemoterapinin neden olduğu toksisitelere karşı sitoproteksiyonda çok yönlü rolü nedeniyle dikkat çekmiştir. Dihidroquercetin olarak da bilinen taxifolin soğan, devedikeni, Fransız deniz çamı kabuğu gibi bitkilerde doğal olarak bulunmakta olup antioksidan, antiinflamatuvar ve antiproliferatif aktiviteler gibi önemli farmakolojik özelliklere sahip umut verici bir doğal bileşik olarak ortaya çıkmış ve diyabet, kanser, nörodejeneratif, kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalık türlerinde de araştırılmıştır(5). Yapılan çalışmalar taxifolinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve NLRP3 yolağının aktivasyonunu önleyerek antiinflamatuvar ve antioksidan

etkileri olabileceğini göstermiştir(6). Başka çalışma ise taxifolinin NLRP3, Kaspaz-1, IL-1 β sinyal yolağınının aktivasyonunu inhibe edebileceğini göstermiştir(7).

Pediyatrik ALL'nin en sık görülen çocukluk çağı malignitesi olması ve VCR'nin pediyatrik ALL tedavisi modalitelerinde sıklıkla kullanılmasıyla yan etki olarak görülen VİPN tedavinin etkinliği ve devamlılığı açısından önemli bir problem oluşturmaktadır. VİPN'ye dair mekanizmaların içerisinde yer alan NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve taxifolin isimli flavonoidin NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunu önlediği gösterilen çalışmalar, VİPN'de taxifolinin NLRP3 inflamazomu üzerinden koruyucu etkili olabileceğini düşündürmektedir. Tüm bu sebeplerle VİPN'de NLRP3 inflamazomuna taxifolinin koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladık.



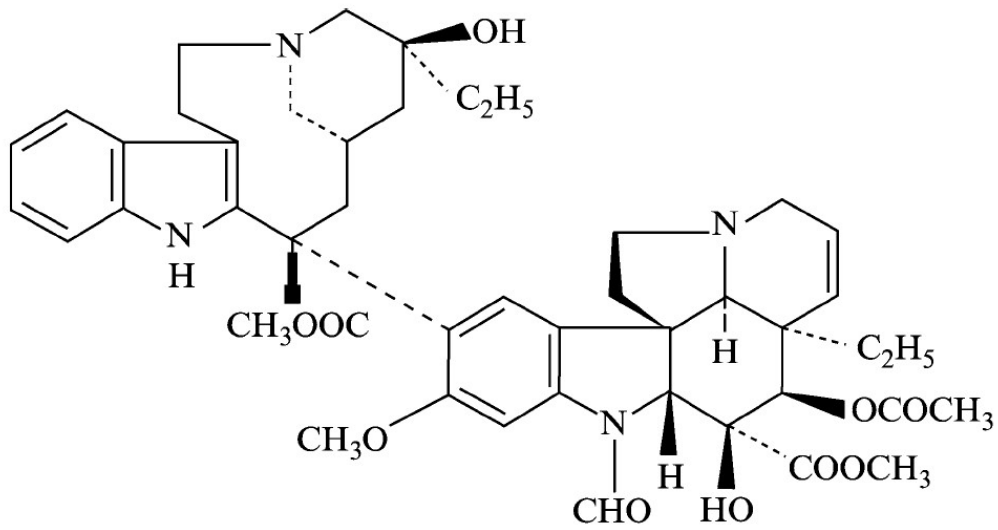
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vinka Alkaloidleri

VCR, vinblastin, vindesin, vinorelbin ve vinflunini içeren vinka alkaloidleri, çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bileşiklerdir. Vinka alkaloidleri, hematolojik ve lenfatik neoplazmların tedavisi için üretilen ve onaylanan ilk mikrotübül hedefleyici ajanlardandır. Catharanthus roseus'tan elde edilen birinci nesil (VCR, vinblastin), ikinci nesil yarı sentetik türevler (vinorelbin, vindesin) ve üçüncü nesil (vinflunin) vinka alkaloidleri genellikle hidrojen, oksijen, karbon ve nitrojenle oluşan bir organik bileşik sınıfıdır. VCR, vinblastin, vinorelbin, vindesin klinik kullanımda olan dört ana vinka alkaloididir(8).

2.2. Vinkristinin Yapısı

VCR'nin moleküler yapısı asimetrik ve dimerik olup, bir karbon-karbon bağı ile bir indol çekirdeği olan katarantine bağlı bir dihidroindol çekirdeği olan vindolinden oluşur. VCR sülfat, Catharanthus roseus'tan elde edilen alkaloidin 1:1 sülfat tuzudur. VCR sülfatın ampirik formülü $C_{46}H_{56}N_4O_{10}H_2SO_4$ 'tür. Molekül ağırlığı 923.1 kilodalton'dur. Vinblastinin oksitlenmiş bir türevi olan VCR ilk kez 1963 yılında sentezlenmiştir(8,9).

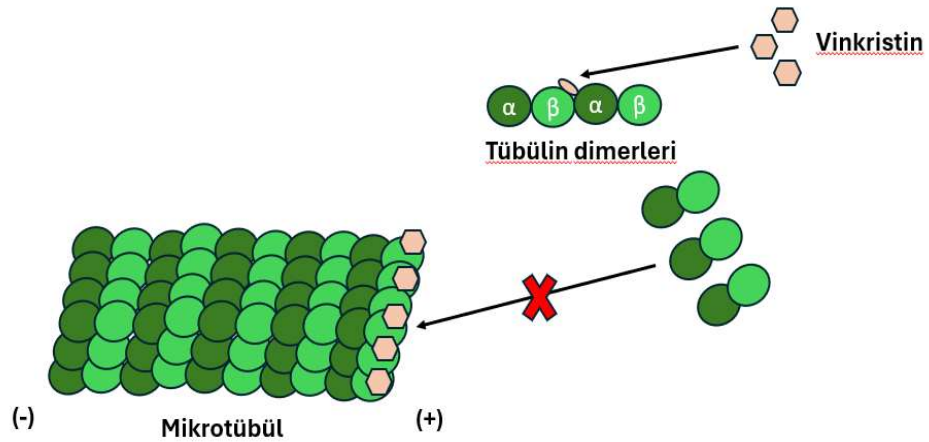


Şekil 2.1. Vinkristinin Kimyasal Yapısı (10)

2.3. Vinkristinin Etki Mekanizması

VCR, mikrotübül fonksiyonuna müdahale dahil olmak üzere çeşitli mekanizmaları kullanarak hücreler üzerinde birçok etki gösterir. Bu etkilerden bazıları antitümör etkisine katkıda bulunur. VCR'nin tümör büyümesini inhibe ettiği en yerleşik mekanizma, mitozun inhibisyonu ile sonuçlanan mitotik iğ mikrotübülleri ile etkileşimidir. Mikrotübüller üzerindeki etkisini tübülün veya mikrotübüllere bağlanarak gösterir. VCR, bu bağlanmayla mitotik iğ mikrotübüllerinin polimerizasyonunu inhibe eder(9).

Mikrotübüller hücre içi madde taşınması, hücre bölünmesi sırasında kromozom ayırımına rehberlik edilmesi ve hücre polaritesini ve morfogenezini kontrol edilmesi gibi çok çeşitli hücresel fizyolojik olaylar için gerekli olan oldukça dinamik polimerlerdir. Nöronlarda mikrotübül stabilitesinin korunmasının nörogelişim, dejenerasyon ve rejenerasyon gibi temel hücresel ve gelişimsel süreçler için hayati öneme sahip olduğu kanıtlanmıştır(11).



Şekil 2.2. Vinkristinin etki mekanizması (12)

Mikrotübüller, mikrofilamentler ve ara filamentler ile birlikte ökaryotik hücrelerin hücre iskeletini oluşturan hücre içi proteinlerdir. Bunlar alfa (α) tübülün ve beta (β) tübülün adı verilen iki temel alt birimden oluşan negatif ve pozitif uçlara sahip polarize silindirik yapılardır. Tübülün ailesinin üçüncü bir üyesi olan gama (γ) tübülün,

mikrotübül çekirdeklenmesi ve birleşmesinde rol oynar. Mikrotübüller, (+) uca tübülün ekleyerek ve (-) uçtan çıkararak hücre içinde sürekli olarak polimerize olur ve depolimerize olur. Bu sürekli birleşme süreci hücre bölünmesi de dahil olmak üzere çok sayıda hayati hücre işlevi için gerekli olan guanozin-5'-trifosfat (GTP) hidrolizi yoluyla gerçekleşir. Mitoz sırasında mikrotübüller bir araya gelerek kromozomların çoğalmasını ve ayrılmasını sağlayan mitotik iği oluşturur. VCR, mikrotübüllerin ve dolayısıyla mitotik iğin oluşumunu engelleyen tübülünlere bağlanarak hücre bölünmesini engeller ve hücre ölür(13).

VCR konsantrasyona bağlı bir ilişki içinde iğ yapısına zarar vererek mikrotübül bozulmasına neden olur. VCR etki gösterirken hücre proliferasyonunu inhibe eden en düşük VCR konsantrasyonunun, iğ mikrotübüllerini düzensizleştirmeden veya bozmadan mitotik iğ fonksiyonunu inhibe eden bir konsantrasyon olduğu bulunmuştur. Düşük konsantrasyonlarda mitotik iği stabilize eder ve kromozomların ayrılamamasına yol açarak metafazın durmasına ve mitozun engellenmesine neden olur. Daha yüksek konsantrasyonlarda mikrotübüllerin bozulması ve tamamen depolimerizasyonu gözlenebilir. Kısa süreli düşük VCR konsantrasyonları metafaz durmasına ve ardından anormal hücre döngüsü ilerlemesine ve potansiyel olarak ölümcül olmayan ancak antiproliferatif etkilere neden olabilirken uzun süreli maruziyet ve yüksek konsantrasyonlar ölümcül sitotoksiste ile sonuçlanır. İn vitro olarak tümör hücrelerinde apoptozu indükleyen VCR, deneysel tümör taşıyan farelerde tümör kan akışını azaltarak tümör hücresi nekrozuna yol açtığı gösterilmiştir. Bu mekanizmada mikrotübüllerin rolü bilinmemektedir(9).

2.4. Vinkristinin Farmakokinetik Özellikleri

VCR intravenöz yolla kullanılan ve kanda albümin, lipoproteinler ve α 1-asit glikoprotein dahil olmak üzere plazma proteinlerine güçlü bir şekilde bağlanan bir ajandır. Serum için birincil bağlayıcı protein, albüminden yaklaşık 10 kat daha yüksek affiniteye sahip α 1-asit glikoproteindir. Serum proteinlerine bağlanmasına ek olarak, intravenöz infüzyondan sonra trombositlere ve lenfositlere de hızla bağlanır. Trombositlere bağlı ilaç, kana bağlı ilacın yaklaşık %80'ini oluşturur. İlacın trombositlere ve lenfositlere dağılımı VCR için 3 saattir. İlacın trombositlere bağlanması geri dönüşümlü bir süreçtir(14).

VCR, yetişkinlerde 2,3 ila 8 litre/kilogram (L/kg) ve çocuklarda 1,5 ila 4,9 L/kg arasında değişen önemli bir dağılım hacmine sahiptir(15).

Radyoaktif ilaçlar kullanılarak yapılan hayvan çalışmalarında, intravenöz uygulamayı takiben vücutta hızla ve yaygın olarak dağılan VCR'nin dalak, karaciğer, böbrek, lenf düğümleri ve timusta yoğunlaştığı, akciğer, kalp ve iskelet kasında orta düzeyde bulunduğu, beyin ve yağ dokularında düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir. Lipofilitesi yüksek olmasına rağmen yoğun lenfosit, trombosit ve protein bağlanması kan beyin bariyerini (KBB) geçmesini engeller ve merkezi sinir sistemine (MSS) penetrasyonu zayıftır. Ayrıca permeabilite glikoproteini (P-gp) için substrat olduğundan KBB'yi geçiş sonrası beyin dokusundan aktif olarak uzaklaştırılır(14).

VCR karaciğerde, sitokrom P450 (CYP) enzim sistemiyle, özellikle CYP3A4 ve CYP3A5 olmak üzere aracılık ettiği, kapsamlı bir metabolizmaya uğrar. Birincil metabolit, spesifik antitümör aktiviteye sahip olan ancak ana ilaçtan önemli ölçüde daha az güçlü olan 4-O-desasetil-vinkristindir. Diğer minör metabolitler arasında N-deformil-vinkristin, N-deformil-4-O-desasetil-vinkristin ve 4-O-desasetil-N-deformil-vinkristin bulunur. VCR metabolizması, CYP3A4 ve CYP3A5 enzimlerinin genetik polimorfizmlerinin yanı sıra bu enzimlerin inhibitörlerini veya indükleyicilerini içeren ilaç etkileşimlerinden etkilenir. CYP3A'nın ilacın metabolizmasındaki önemi, fenitoin ve karbamazepin gibi CYP3A'yı indükleyen ilaçlarla birlikte kullanıldığında ilacın klerensinin arttığının ve itrakonazol gibi CYP3A inhibitörleriyle toksisitenin arttığının gözlemlenmesidir(15).

VCR öncelikle safra ve feçeste metabolitler halinde elimine edilir. İlacın sadece %20'si idrarla değişmeden atılır, bu da nispeten küçük bir miktardır. VCR eliminasyon yarı ömrü, yaklaşık 5 dakika süren bir başlangıç hızlı fazı ve yetişkinlerde yaklaşık 85 dakika ve çocuklarda 25 dakika süren daha yavaş bir terminal faz ile bifazik bir model izler. VCR, bireyler arasında önemli ölçüde değişebilen ve yaş, vücut ağırlığı, karaciğer fonksiyonu, böbrek fonksiyonu ve eşzamanlı ilaç kullanımı gibi faktörlerden etkilenen yaklaşık 146 mililitre/dakika (mL / dk) bir klirens oranı sergiler. VCR'nin eliminasyon yarı ömrü tipik olarak 10 ila 155 saat arasında değişir. Bileşiklerin hepatobiliyer sistem yoluyla elimine edilmesinin bir sonucu olarak, karaciğer metastazları veya karaciğer sirozu gibi karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalarda ekstra dikkat gösterilmelidir(14,15).

2.5. Vinkristinin Klinik Tedavide Kullanımı

VCR ALL, Hodgkin hastalığı, Hodgkin dışı malign lenfomalar, rabdomiyosarkom, nöroblastom ve Wilms tümörü tedavisi dahil olmak üzere çeşitli anti-tümör tedavi şemalarına dahil edilmiştir(16).

VCR, ilk olarak 1960'larda steroidler, metotreksat, merkaptopürin ve alkile edici ajanlardan oluşan konvansiyonel tedaviye dirençli hale gelen hastalarda klinik uygulamada tek başına kullanılmıştır. Bu kullanımda genel olarak, çocuklardaki yanıt oranları yüksek olup hematolojik malignitelerde yanıt solid tümörlerden daha iyi bulunmuştur. Ancak tedavi yanıtları sıklıkla tam olmayıp remisyonlar çoğunlukla kısa süreli olmuştur. Tek başına bir ajan olarak VCR çeşitli pediatrik ve yetişkin malignitelere karşı geniş bir klinik aktivite spektrumu göstermiştir; pediatrik malignitelerde görülen klinik yanıt, solid tümörlerde %40'tan hematolojik malignitelerde >%75'e (çoğunlukla ALL) kadar değişmektedir. Kombinasyon kemoterapisinin yanıt ve remisyon oranlarını ve özellikle remisyon sürelerini iyileştirmesinden sonra çoğu hematolojik veya solid maligniteler için çoklu ajan veya multimodalite stratejisinin bir parçası haline gelmiştir. VCR, çocukluk çağı ALL ve Hodgkin dışı lenfomada kullanılan rejimlerin temel bir bileşenidir ancak akut miyeloid lösemide (AML) kullanılmaz(9,17).

VCR içeren en iyi bilinen ilaç kombinasyonu, siklofosfamid, doksorubisin hidroklorür, VCR sülfat ve prednizon veya prednizolon kullanan antikanser kemoterapisi olan CHOP'tur. Bu ilaçların kombinasyonu uzun zamandır Hodgkin dışı lenfoma tedavisinde standart rejim olarak kabul edilmektedir. Şu anda CHOP, rituksimab (R-CHOP) ile kombinasyon halinde daha sık kullanılmaktadır(12).

Erişkinlerde ise diğer ajanlarla birlikte, yeni teşhis konmuş yetişkin ALL'nin başlangıç tedavisinde önemli bir ilaçtır. Erişkinlerde Ewing sarkomu, ileri progresif timoma, multipl miyelom, MSS primer lenfoması, gestasyonel trofoblastik tümörler, over tümörleri kanseri ve MSS malignitelerinde endikasyon dışı kullanımı mevcuttur(8,17).

ALL'li çocuklarda remisyon oranı, moleküler biyolojinin anlaşılmasındaki ilerlemeler, risk değerlendirmesine dayalı kemoterapi rejimlerinin optimizasyonu ve yeni hedefli ajanların kullanımı sayesinde son otuz yılda yaklaşık %80'e ulaşarak önemli ölçüde iyileşmiştir. Ancak yetişkin ALL'de iyileşme oranı %30-40 olarak

kalmakta ve dirençli/tekrarlayan ALL için standart bir tedavi bulunmamaktadır. Yetişkin malignitelerde, VCR için bildirilen yanıt oranı $<10\%$ ile 50% arasında değişmektedir. VCR, yetişkinlere göre pediatrik onkolojide daha sık ve daha etkili bir şekilde kullanılabilmesinin nedeni, pediatrik tümörlerin VCR'ye karşı daha yüksek duyarlılık düzeyi ve çocukların nispeten daha yüksek VCR dozlarına daha iyi tolerans göstermesi olabilir(9,17).

2.6. Vinkristin İlişkili Yan Etkiler

VCR yan etkileri arasında lökopeni ve anemiyle birlikte hafif ve kolayca geri dönüşümlü miyelosupresyon, trombositoz bildirilmiştir. Özellikle aşırı dozda ciddi miyelosupresyon etkisi de bildirilmiştir. VCR'e ait hematolojik toksisiteler nadirdir. Bunların dışında yaygın olarak değişken şiddette alopesi bildirilmiş olsa da bu oran doz ve tedavi süresine göre değişkenlik göstermektedir. Ayrıca tedavi ile ilişkili olarak ekstrasvazyon sonrası doku nekrozu, selülit bildirimleri de olmuştur. Diğer nadir yan etkiler arasında ateş, gastrointestinal ülserasyon ve perforasyonlu nekroz, miyokard enfarktüsü ve deri döküntüsü vardır. Kilo kaybı da yan etkiler arasındadır. Bunların dışında hayvan çalışmalarında fertilite üzerinde olumsuz etkiler bildirilmiş olsa da, insanlarda fertilite üzerinde kalıcı geç etkiler bildirilmemiştir(9). VCR KBB'den MSS'ye düşük oranda geçmesine rağmen pitozis, oftalmopleji, renkli görme defisiti, körlük ve bulanık görme, diplopi, şaşılık, oküler kas parezisi, çene ve yüz kaslarının sınırlı hareketliliği, işitme kaybı ve ototoksisite, dil hareketlerinde azalma, stridor ve inatçı öksürük, antidiüretik hormonun uygunsuz salgılanması sendromu ve nöbetler/disoryantasyon/afazi/hemipleji ile seyreden ensefalopati gibi merkezi sinir sistemi ve kranial sinir toksisiteleri tanımlanmıştır. Güvenlik profiliyle ilgili endişelere rağmen, VCR yerleşik tedavi protokollerinin etkili bir bileşeni olmaya devam etmekte ve sıklıkla steroidler, metotreksat ve diğer ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır(13,18).

2.7. Vinkristin İlişkili Periferik Nöropati

VCR, pediatrik malignitelerde en çok kullanılan vinka alkaloidlerinden biri olmasına rağmen nörotoksisite VCR'nin ciddi ve doz sınırlayıcı bir yan etkisidir ve tedavinin gecikmesine veya kesilmesine neden olabilir. VIPN, VCR kemoterapisinin

dozunun azaltılmasına, gecikmesine veya kesilmesine neden olabileceği gibi, aynı zamanda ağrı ve sakatlığa da yol açarak hastaların yaşam kalitesini düşürebilir ve tıbbi maliyetleri artırabilir. VİPN insidansı pediatrik hastalarda klinik olarak önemlidir; bazı çalışmalarda %86,5'e kadar varan insidans bildirilmiştir. VCR mikrotübül yapısını bozması, inflamatuvar süreçler ve aksonal taşınma ve nöronal salgılanmada disfonksiyon nedeniyle periferik, progresif ve simetrik nöronal hasara neden olabilir(13,19).

VİPN klinik paternleri üç kategoriye ayrılabilir:

- 1- Duyusal nöropati: parestezi, uyuşma, dokunma hassasiyeti, sıcaklık tanıma titreşim bozukluğu, nöropatik ağrı, çene ağrısı
- 2- Motor nöropati: ekstremitelerdeki güçsüzlüğü, yürüme güçlüğü, reflekslerde ve ince motor becerilerde bozulma, denge bozukluğu, kas krampları
- 3- Otonom nöropati: kabızlık, paralitik ileus, inkontinans, üriner retansiyon, ortostatik hipotansiyon

Klinik pratikte, VCR ile tedavi edilen hastalarda VİPN farklı derecelerde gelişir ve bu durum antineoplastik tedaviye yanıtta ve ilaçla ilişkili toksik etkilere duyarlılıkta bireyler arası bir fark olduğunu kanıtlamaktadır. Ancak, hastanın belirli bir ilaç tedavisine yanıtını ve VİPN geliştirme riskini ve şiddet derecesini tahmin etmek kolay değildir. Genel olarak, kemoterapi ilişkili periferik nöropati (KİPN) için en önemli risk faktörünün ilaç kümülatif dozundan oluşmasının yanı sıra, hastaları buna yatkın hale getirebilecek başka klinik yönler de vardır. Bunlar arasında, önceden var olan periferik nöropati (örn. diyabetik veya alkolik nöropati), diğer ilaçlarla birlikte uygulama, sigara alışkanlığı, hipertansiyon ve ayrıca hastanın yaşı, cinsiyeti ve ırkı da söz konusu olabilir. Dahası, KİPN şiddetindeki bireyler arası değişkenliğin bir kısmı, yan etkilere duyarlılığı etkileyen hastalar arasındaki genetik farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir(20).

Vinka alkaloidleri farklı toksisite profillerine sahiptir; bunlar arasında en nörotoksik ilaç VCR'dir (VCR > vinblastin > vinorelbin > vinflunin). VCR ile tedavi edilen hastalarda periferik nöropati insidansı %30-%40'tır. VCR tedavisi alan hastalar yüksek nöropatik ağrı riskine sahip olmaları nedeniyle VİPN için uygun koruyucu ve tedavi edici yaklaşımlar özellikle önemlidir. Önleme ve tedavinin amacı VİPN insidansını ve şiddetini en aza indirmektir. Bugüne kadar ilaçlar, vitaminler,

akupunktur ve elektrik stimölasyon terapisi dahil olmak üzere bir dizi önleyici ve tedavi edici yol test edilmiştir(21).

2.7.1. Klinik Çalışmalar

Bugüne kadar, glutamik asit, B grubu vitaminler ve amitriptilin dahil olmak üzere ağrıyı önleyebilecek çeşitli ilaçlar randomize, çift kör, plasebo kontrollü çalışmalarda VİPN'nin önlenmesi için değerlendirilmiştir. Ancak VİPN'den muzdarip VCR ile tedavi edilen hastalarda kesin etki gösteren herhangi bir ilaç bulunmamaktadır. Ayrıca, yetişkin sağ kalanlarda KİPN'nin önlenmesi ve yönetimine ilişkin yeni güncellenen Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (ASCO) kılavuzları, KİPN'nin önlenmesi için hiçbir ajanın önerilmediğini yeniden teyit etmiştir. Bu nedenle, VİPN'nin önlenmesi için klinisyenler, altta yatan nöropatisi ve diyabet gibi nöropatiye yatkınlık yaratan durumları olan hastalarda VCR'nin risklerini ve faydalarını değerlendirmelidir(21).

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bir faz III klinik çalışmanın olumlu sonuçlarına dayanarak duloksetin ASCO tarafından KİPN yaşayan kanser hastaları için klinik uygulama kılavuzlarında önerilen tek ilaçtır. Daha sonra, Japon araştırmacılar VCR, paklitaksel ve oksaliptatin ile indüklenen KİPN tedavisinde randomize, açık etiketli, çapraz geçişli bir duloksetin çalışması yürütmüşlerdir. Sonuçlar, duloksetinin KİPN üzerinde terapötik bir etkiye sahip olduğunu doğrulamıştır. Glutamin ve 10 mg baklofen, 40 mg amitriptilin hidroklorür ve 20 mg ketamin içeren bir pluronik lesitin organojelin (BAK-PLO) VİPN'nin klinik semptomlarını hafiflettiği ve hastanın yaşam kalitesini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, ASCO klinik kılavuzlarında BAK-PLO kullanımı konusunda herhangi bir öneride bulunulmamış olsa da panel, mevcut veriler göz önüne alındığında, bu ajanın KİPN'li bazı seçilmiş hastalar için denenebilecek makul bir seçenek olduğunu düşünmüştür. Bir opioid analjezik olan metadon, diğer güçlü analjezikler başarısız olduğunda veya advers reaksiyonlara neden olduğunda VİPN'yi yönetmek için alternatif bir strateji olarak kullanılabilir(21).

Akupunktur gibi farmakolojik olmayan tedaviler de KİPN semptomlarını hafifletmede etkilidir. Akupunktur ile ilgili üç klinik çalışma, yakın zamanda yayınlanan bir sistematik derlemede analiz edilmiştir(21).

2.7.2. Preklinik Çalışmalar

Geniş spektrumlu bir tetrasiklin antibiyotik olan minosiklinin, VIPN fare modellerinde Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ekspresyonunu düzenleyerek mekanik allodini ve immün hücre infiltrasyonunu etkili bir şekilde önleyebileceği çalışmalarda gösterilmiştir. Deksmetomidin ve ulinastatin, dorsal kök gangliyonu (DRG) interlökin-10 (IL) ekspresyonunun upregülasyonu ve α 2-adrenerjik reseptörün aktivasyonu yoluyla VIPN tedavisinde sinerjik bir etkileşime sahiptir(21).

İncirden (*Ficus carica*) izole edilen morin, nöroprotektif etkileri yoluyla nöropatik ağrıyı hafifletmiş ve sıçan VIPN modellerinde IL-6 ekspresyonunu azaltmak için nükleer faktör kappa B (NF-kB) yolunu inhibe etmiştir. Eski zamanlardan beri gastrodin çeşitli ağrı türlerini tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan geleneksel Çin ilacı *Gastrodia elata* Blume'un ana aktif bileşeni olan gastrodin, inflamatuvar faktörlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu azaltmak için mikrogliya aktivasyonunu ve P38 mitojenle aktive protein kinaz (P38/MAPK) sinyal yolunu inhibe ederek VCR ile antitümör tedavisinin neden olduğu periferik nöropatiyi hafifletmiştir. *Aegle marmelos* 'tan elde edilen flavonoidler ve sumatriptan inflamatuvar aracıları (tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), IL-6 ve IL-1 β) azaltarak VIPN semptomlarını hafifletmiştir. *Tribulus terrestris* 'ten elde edilen saponinler, inflamatuvar aracıları azaltarak, periferik sinir hasarını tersine çevirerek ve nosiseptif eşiği artırarak VCR tarafından indüklenen nöropatik ağrıyı hafifletmiştir. Bir hem oksijenaz (HO-1) indükleyicisinin intraperitoneal enjeksiyonu HO-1 ekspresyonunu artırmış ve omurilikteki glial aktivasyonu ve inflamasyonu etkili bir şekilde azaltarak bir fare modelinde VIPN'yi hafifletmiştir(21).

Bir koenzim Q türevi olan mitokinon, mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirerek oksidatif stresi ve apoptozu inhibe etmiş, böylece VCR kaynaklı mekanik allodiniyi hafifletmiştir. *Sophora alopecuroides* L.'nin (Leguminosae) önemli bir bileşeni olan Matrine, VCR kaynaklı oksidatif stresi ve inflamasyonu (TNF- α , IL-6 ve IL-10) iyileştirerek VCR kaynaklı ağrılı nöropatiyi iyileştirebilir. Bergapten, intraperitoneal VCR uygulaması ile oluşturulan kemirgen VIPN modelinde proinflamatuvar sitokinleri azaltarak ve NF-kB, siklooksijenaz 2 (COX-2) ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu inhibe ederek oksidatif stres ve anti-inflamatuvar etkilere atfedilebilecek mekanik allodiniyi hafifletmiştir(21).

Endojen bir B12 vitamini olan metilkobalamin, nöronal iletimi iyileştirmede olağanüstü bir etkiye sahiptir. Preklinik bir deneyde metilkobalaminin VIPN üzerindeki önleyici etkisi araştırılmış ve sonuçlar metilkobalaminin bir sıçan VIPN modelinde mitokondriyal hasarı ve intraepidermal sinir lifi kaybını inhibe ederek mekanik allodini ve termal hiperaljeziyi iyileştirebileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu araştırma, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz ve aşağı akış NF-kB yolu aktivitesinin inhibe edilmesinin de VIPN'nin önlenmesiyle ilişkili olabileceğini ve bu inhibisyonun spinal dorsal boynuzdaki proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinleri yeniden dengelediğini göstermiştir. Tetrahidrokurkuminin güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir ve bir çalışma antiinflamatuvar, antioksidan, antinosiseptif, kalsiyum baskılayıcı ve nöroprotektif etkileri nedeniyle VIPN'nin önlenmesi için umut verici bir aday olabileceğini göstermiştir(21).

2.8. Vinkristin İlişkili Periferik Nöropati Mekanizmaları

2.8.1. Aksonal Hasar

VCR, miyelinli sinirlerde akson mikrotübül miktarının azalması ve düzensizliğinin yanı sıra miyelinsiz duyuşal aksonlarda aksonal şişme ve mikrotübül yönelim bozukluğu gibi bir dizi yan etkiye neden olur. Ayrıca, VCR proksimal aksonlarda ve hücre gövdelerinde nörofilamentlerin birikmesine ve büyük çaplı duyuşal nöronların şişmesine neden olarak spinal ganglionda anterograd aksonal transportu bozar. Nosiseptörler anormal termal, mekanik ve kimyasal uyarılar da dahil olmak üzere nosiseptif uyarıları algılayabilen ve iletebilen DRG ve trigeminal gangliyonlardaki primer duyuşal nöronların periferik kısımlarıdır. C lifi nosiseptörleri eşik üstü mekanik stimülasyona önemli ölçüde aşırı duyarlıdır ve VCR ile tedavi edilen sıçanlarda A liflerinin ve C liflerinin ortalama iletim hızları belirgin şekilde yavaşlamıştır (21).

2.8.2. Değişmiş İyon Kanal Aktivitesi

Çeşitli iyon kanallarındaki bozukluklar, VIPN hastalarında duyuşal nöronların aşırı uyarılma yeteneğine ve DRG ve dorsal boynuz duyuşal nöronlarının plazma membranında diğer olumsuz reaksiyonlara yol açar(21).

Voltaj kapılı sodyum kanalları (Nav) temel olarak uyarıcı aksiyon potansiyellerinin oluşumundan sorumludur ve çeşitli alt tiplere sahiptir. Nav1.7 ve Nav1.8 alt tipleri çoğunlukla periferik duyuşal nöronlarda ifade edilir. Son yıllarda, periferik ağrı işlemede ve inflamasyon ve doku hasarı ile ilişkili artan ağrı duyarlılığının gelişiminde rol oynayan anahtar moleküller olarak Nav alt birimlerine yoğun ilgi gösterilmiştir(21).

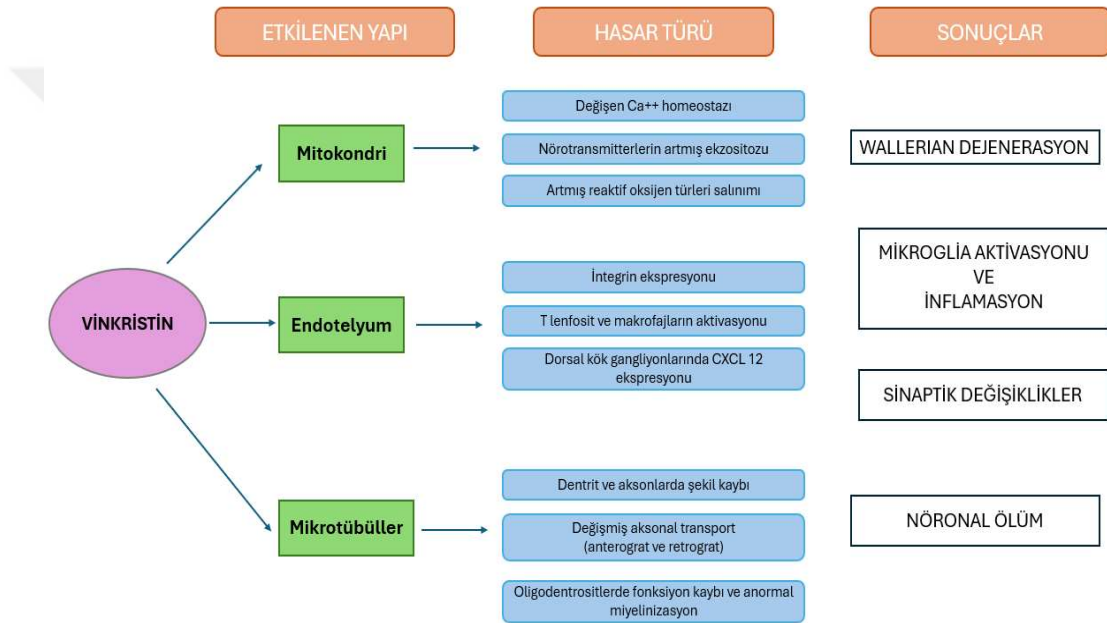
Ca^{+2} bozulmuş regülasyonu VİPN aracılı ağrı sendromundan kısmen sorumludur. Voltaj kapılı kalsiyum kanalları (Cav), nöronal uyarılabilirlik gibi çeşitli fizyolojik tepkileri düzenler. Cav3.2 T tipi kalsiyum kanallarının inhibisyonu, VCR'nin neden olduğu nöropatik ağrıyı önemli ölçüde hafifletebilir. Toplam Ca^{+2} seviyesi, VCR'nin intraperitoneal uygulamasından sonra sıçan spinal sinirlerinde önemli ölçüde artmıştır. VCR tedavisine bağlı olarak hücresel Ca^{+2} homeostazının bozulması mekanohiperaleji ve mekanohiperaleji ile sonuçlanmıştır; ancak kalsiyum kanal blokerleri VİPN semptomlarını hafifletebilmiştir. Nav ve Cav'ın yanı sıra potasyum kanalları da VİPN olaylarıyla ilişkilidir(21).

Voltaj kapılı potasyum (Kv) kanalları, nosiseptif nöronlar da dahil olmak üzere uyarılabilir dokulardaki membran potansiyellerinin önemli fizyolojik düzenleyicileridir. Kv kanallarının açılması hücre zarı depolarizasyonunu ve/veya aksiyon potansiyeli oluşumunu engelleyerek duyuşal nöronların uyarılabilirliğini azaltır. Bu nedenle, KCNQ (Kv7) gibi çeşitli Kv alt tipleri, nöropatik ağrının tedavisi için yeni hedefler olarak kapsamlı bir şekilde test edilmiştir(21).

Transient reseptör potansiyel (TRP) kanalları, DRG nöronları da dahil olmak üzere çeşitli periferik duyuşal nöronlarda ifade edilir. Altı kanalın tümü, termal, kimyasal ve mekanik uyarım sinyalleri için kimyasal ve fiziksel sensörler olarak hareket ederek patolojik ağrıya neden oldukları nosiseptörlerde ifade edilmiştir. Önceki çalışmalar transient reseptör potansiyel vanilloid kanalı 1 (TRPV1) tüm DRG nöronlarının yaklaşık %35-%50'sinde ifade edildiğini doğrulamıştır. TRPV1 ifadesi, VCR tedavisinden sonra sıçan DRG nöronlarında önemli ölçüde artmıştır ve TRPV1 antagonisti uygulaması, VCR kaynaklı mekanik allodini ve hiperalejide önemli ölçüde etkili olmuştur(21).

2.8.3. Oksidatif Stres

Birçok çalışma oksidatif stresin VİPN'de rol oynadığını kanıtlamıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, VCR tedavisinin farelerin omurilik örneklerinde ROS üretiminde, hidrojen peroksit (H₂O₂) seviyelerinde, NADPH oksidaz aktivitesinde ve malondialdehit seviyelerinde önemli bir artışa yol açtığını göstermiştir. COX ve nitrik oksit sentaz (NOS) üretimi, VİPN'de ağrı sinyallerinin iletilmesine katkıda bulunmuştur ve COX veya NOS inhibitörleri, VCR'nin neden olduğu hiperaljeziyi önemli ölçüde azaltmıştır(21).



Şekil 2.3. Vinkristin İlişkili Periferik Nöropatide Patogenez(13)

2.8.4. İmmün Yanıt

Makrofajlar, genellikle periferik sinirlerde ve DRG'de aktivitesini artıran sitotoksik ajanlara karşı oldukça hassastır ve sayıları VİPN fare modellerinde siyatik sinir ve DRG'de önemli ölçüde artmıştır. Naif bir dendritik hücre hattı olan Langerhans hücreleri, nöropatik ağrının oluşumunu veya sürdürülmesini hafifletebilir. VCR, antijen sunan Langerhans hücrelerini aktive etmiş ve ardından PGP9.5-pozitif Langerhans hücrelerini upregüle ederek nöropatik ağrıyı uyarmıştır(22). KİPN üzerine yapılan çalışmalar, bazı kemoterapötik ajanların DRG'de adaptif immün yanıtı

tetikleyerek antiinflamatuvar T hücrelerini ve B hücrelerini azalttığını ve sitotoksik T hücrelerini (CD8+) artırdığını göstermiştir(21).

2.8.5. Glial Hücre Aktivasyonu

Schwann hücreleri ve satellit glial hücreler, sırasıyla DRG'deki nöronal hücre gövdelerini ve nöral kök aksonunu kaplayan iki tip glial hücrelerdir. Periferik sinir hasarından sonra, satellit glial hücreler fenotipik değişikliklere uğrar ve düzenleyici maddeler üretir ve salıverir. Daha önce yapılan bir çalışmada, artan dozlarda VCR uygulanması ardından Schwann hücrelerindeki ultrastrüktürel değişikliklerin transmisyon elektron mikroskobu ile incelenmesi, VCR'nin Schwann hücrelerinde doza bağlı ultrastrüktür hasarına neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, miyelinli sinir liflerindeki Schwann hücrelerindeki hasar miyelinsiz sinir liflerindekienden daha ciddi olmuştur(23). Birçok çalışma VCR'nin mikrogliya ve astrositlerin aktivasyonunu indükleyebildiğini doğrulamıştır(21).

2.8.6. Sitokinler ve Kemokinler

VCR mikrotübülleri hedef alan ve bozulmuş retrograd ve anterograd transport, duyuşal nöron fonksiyonunun değişmesine yol açan bir mekanizma olarak öne sürülse de, çeşitli ajanların neden olduğu KİPN önemli nöroinflamatuvar bileşenler içerdiğine dair kanıtlar artmaktadır. Artan kanıtlarla birlikte, sitokinlerin ve kemokinlerin sentezinin ve salıverilmesinin VİPN'de açıkça değiştiğini ortaya koymaktadır. Önceki çalışmalar, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin upregülasyonunun VİPN'de nöroinflamasyona ve nöronal duyarlılığa yol açtığını, antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-10 gibi) downregülasyonunun ise muhtemelen inflamasyon üzerindeki inhibitör etkiyi zayıflattığını doğrulamıştır(21,24).

Özellikle VCR, DRG inflamatuvar genlerinin çarpıcı bir şekilde upregülasyonuna neden olur ve IL-1 β , TNF α , IL-6 ve CC kemokin ligandı dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımı VİPN gelişiminde rol oynar. Makrofajlarda mevcut olan bir inflamatuvar yolak, IL-1 β ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açan NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunu içerir. Yapılan bir çalışmada VCR kaspaz-1 bağımlı, kanonik NLRP3 sinyal yolu aracılığıyla insan ve mürin makrofajlarından IL-1 β salınımını ortaya

çıkarmış ve IL-1 reseptörü ve IL-1 β eksikliği olan farelerde VIPN'nin gelişmediğini göstermiştir. Bu çalışma NLRP3 sinyal yolu bileşenlerinden yoksun knockout farelerde veya NLRP3 inhibitörü MCC950 ile tedaviden sonra mekanik allodini ve yürüme bozukluklarının önemli ölçüde azaldığını göstermiştir(24).

NLRP3'ün transkripsiyonel upregülasyonuna yol açan hazırlama sinyallerine maruz kalmanın ardından, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu, nosiseptörleri hassaslaştırdığı bilinen proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β 'nin salınmasını sağlar(24).

2.9. NLRP3 İnflamazomu Ve Nöropatide Etki Mekanizması

İnflamazom bir tür sitozolik multiprotein kompleksidir ve doğal bağışıklıkta önemli bir rol oynar. İnflamazom kavramı ilk olarak 2002 yılında Tschopp ve meslektaşları tarafından ortaya atılmıştır. NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NLRC4 ve AIM2 dahil olmak üzere altı farklı multikompleks inflamazom mevcuttur. NLRP3 inflamazomu tüm inflamazomlar arasında en iyi karakterize edilmiştir ve makrofajlar, mast hücreleri, nötrofiller, dendritik hücreler, mikroglialar gibi immun sistem hücreleri, DRG ve duyu sinirleri tarafından eksprese edilir. Bu kompleks patojen veya hasarla ilişkili moleküler kalıpları (PAMP'ler ve DAMP'ler) tanıyarak inflamatuvar yanıtları aktive eder. Nöropatik ağrı, inflamatuvar ağrı, hiperaljezi dahil olmak üzere farklı kronik ağrı durumlarında inflamazomun etkileri bildirilmiştir(25,26).

NLRP3 inflamazomu sensör protein NLRP3, CARD (kaspaz aktivasyonu ve dahil edilme domaini) içeren adaptör protein olan apoptozla ilişkili benek benzeri protein (ASC) ve efektör protein (bir sistein proteaz olan pro-kaspaz-1) içerir. Bu üç protein, NLRP3 inflamazomunun işlevini düzenlemek için yakın etkileşime girer. NLRP3 yabancı patojen moleküllerini veya içsel tehlike sinyallerini tanıdığı anda, aktive olur ve oligomerizasyona uğrar. Daha sonra NLRP3, adaptör protein ASC'nin pyrin domain (PYD) domainine bağlanır ve NLRP3 inflamazomunu oluşturmak için proteaz prokaspaz-1'i dahil eder, bu da prokaspaz-1'i otokataliz yoluyla aktive kaspaz-1'e böler. Bir inflamazom efektör proteini olarak aktive Kaspaz-1, inaktif proinflamatuvar sitokinler pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i sırasıyla IL-1 β ve IL-18'in aktif formlarına ayırabilir. Nihayetinde IL-1 β ve IL-18, çeşitli spesifik olmayan inflamatuvar roller oynamak üzere hücre dışına salınır. Buna ek olarak, aktive olmuş Kaspaz-1,

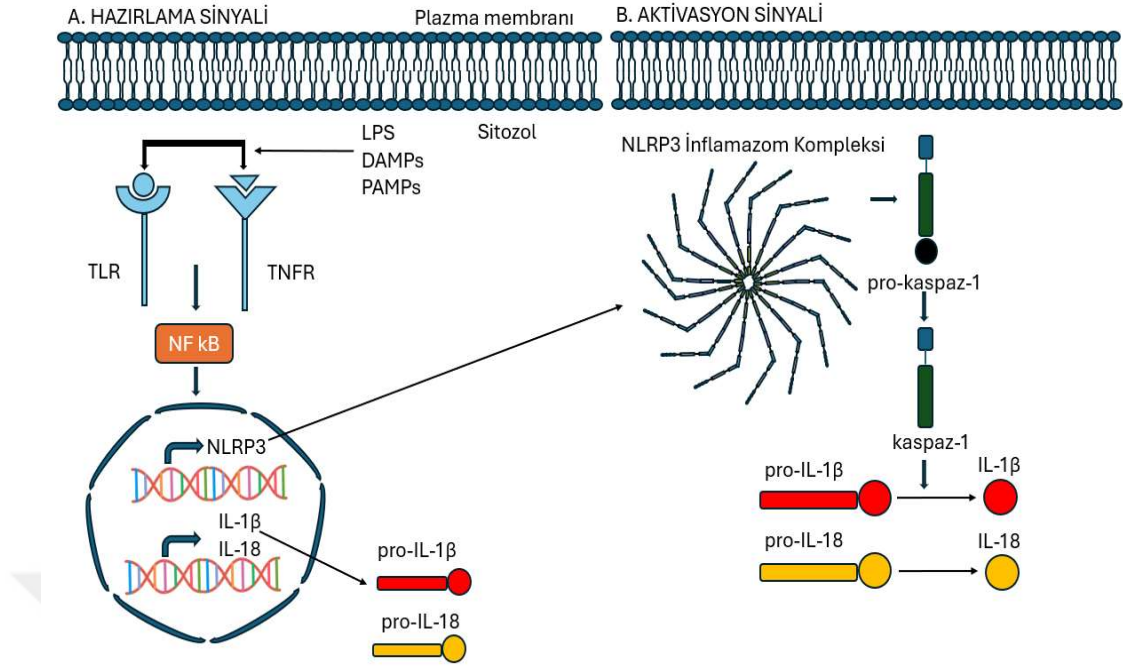
piroptoz adı verilen bir tür inflamasyonla ilişkili programlı hücre ölümüne de aracılık edebilir. Hücre piroptozundan sonra salınan büyük miktarda inflamatuvar madde, güçlü bir inflamatuvar yanıtı tetikleyecektir(27).

Güncel araştırmalar NLRP3 inflamazomunun aktivasyonundan sorumlu olan iki ana tip sinyal yolağı olduğunu göstermiştir. Bunlardan biri prokaspaz-1 dahil edilmesi ve Kaspaz-1 aktivasyonunu içeren kanonik sinyal yolu, diğeri ise esas olarak lipopolisakkarit (LPS) tarafından indüklenen fare kaspaz-11 veya insan kaspaz-4 ve kaspaz-5 aktivasyonu ile ilgili olan kanonik olmayan sinyal yoludur(27).

Bilindiği kadarıyla, kanonik NLRP3 inflamazom aktivasyonu genellikle hazırlama sinyali ve aktivasyon sinyali olmak üzere iki adım gerektirir. Genel olarak, hücrelerin dinlenme durumunda, NLRP3 ve IL-1 β 'nın bazal seviyelerinin inflamazomu aktive etmek için yetersiz olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, bir hazırlama aşaması bu hedeflerin transkripsiyonunu başlatır(27).

Hazırlama sinyali (sinyal 1): NLRP3 tehlike sinyalleri (TLR4 agonistleri veya endojen moleküller gibi) tarafından uyarılır ve NLRP3, IL-1 β ve IL-18 genlerinin transkripsiyonunu upregüle eden NF-kB ekspresyonunu indükleyerek NLRP3, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in protein ekspresyonunun artmasına neden olur(27).

Aktivasyon sinyali (sinyal 2): İkinci aktivasyon adımı genellikle PAMP'lar veya DAMP'lar (viral ribonükleit asit (RNA), alüminyum tuzu, ATP, A β , potasyum akışı vb. gibi) tarafından tetiklenir ve NLRP3 inflamazomunun birleşme adımını tamamlamasını sağlar. Birleşmeyle birlikte kümelenmiş pro-kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18'in aktive formlarını oluşturmak üzere pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i parçalayan aktive Kaspaz-1'i oluşturmak için otokatalize ve otokleave olur. Aynı zamanda, aktive Kaspaz-1, gasdermin D'nin (GSDMD) parçalanması yoluyla piroptozu başlatabilir(27).



Şekil 2.4. NLRP3 inflamazom aktivasyonu(26)

Özetle, tipik NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu, NLRP3 inflamazomuyla ilişkili bileşenlerin ekspresyonunun upregülasyonu bir hazırlama sinyali ve NLRP3 inflamazom bileşenlerinin toplanmasına ve aktivasyonuna aracılık eden bir aktive edici sinyal gerektirir (28).

Kanonik olmayan aktivasyon yolunda, NLRP3 inflamazomu esas olarak insanlarda kaspaz-4 ve kaspaz-5'in homoloğu olan farelerde kaspaz-11'e dayanır. Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen LPS sitozole girer ve farelerde kaspaz-11'e bağlanabilir, böylece oligomerizasyonunu ve aktivasyonunu tetikler. Aktive olan kaspaz-11 piroptozu indükleyebilir ve proinflamatuvar sitokinler üretebilir(27).

NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunda rol oynayan ana mekanizmalar arasında K^+ akışı, lizozomal degradasyondan sonra salınan katepsin B, hücre dışı Ca^{+2} homeostazının değişmesi ve ROS üretimi yer almaktadır. Ca^{+2} 'nın NLRP3 inflamazom aktivasyonunda önemli bir rol oynadığı genel olarak kabul edilmektedir. Endoplazmik retikulum (ER), hücrelerdeki ana Ca^{+2} rezervuarıdır. ER'den mitokondriye sürekli Ca^{+2} transferi, mitokondriyal Ca^{+2} aşırı yüklenmesi ve disfonksiyonu ile sonuçlanacak, bu da kardiyolipin ve mitokondriyel deoksiribonükleik asit (mtDNA) salınımını teşvik edecektir. Mitokondriyal işlev bozukluğunda mtDNA, adenozin trifosfat (ATP), ısı şoku proteini 60, mitokondriyal

transkripsiyon faktörü A, kardiyolipin, sitokrom c salınması gibi olaylar mitokondriyal parçalanmanın artmasına neden olur. Bu maddeler NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunu indüklemek için DAMP olarak düşünülebilir. Bununla birlikte, son yıllarda, NLRP3 inflamazom aktivasyonuna katılmak için çeşitli doğrudan veya dolaylı yollar bildirilmiştir. Son çalışmalar, mitokondrinin NLRP3 işlevinin merkezi düzenleyicisi olduğunu göstermiştir. Mitokondriyal reaktif oksijen türleri (mtROS) üretimi, mtDNA salınımı, mitokondriyal aracılı apoptoz, mitokondriyal kalsiyum aşırı yüklenmesi ve NLRP3'ün lokalizasyonunda mitokondriyal katılımın tümü NLRP3 aktivitesinin düzenlenmesiyle ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda NLRP3 inflamazomlarının nöroinflamasyon, apoptoz, piroptoz, proinflamatuvar sitokin salınımı, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres yollarıyla nöropatik ağrıya yol açtığı belirtilmiştir(26,27).

Mitokondride meydana gelen değişikliklerin VIPN ve nöropatik ağrı gelişimi ile ilişkili olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. 2006 yılında Siau ve meslektaşları, sıçanlarda belirgin bir mekanik allodini ve mekanik hiperaljezi olan VIPN ağrının farklı Ca^{+2} düzenleyiciler tarafından önemli ölçüde iyileştirildiğini göstermiştir. Aslında, VCR mitokondriyal membrandan Ca^{+2} hareketini etkileyebildiği, Ca^{+2} alımının hem miktarını hem de hızını azalttığı ve Ca^{+2} çıkışını azalttığı gösterilmiştir. Mitokondriyal Ca^{+2} alımındaki değişiklikler, Ca^{+2} konsantrasyonunun uzay-zamansal değişikliklerini etkileyecek, Ca^{+2} sinyalini, Ca^{+2} sinyallerini değiştirecek ve nörotransmitterlerin artan ekzositozu gibi Ca^{+2} bağımlı süreçleri düzenleyecektir. Bu değişiklikler nöronal uyarılabilirliğin ve glial fonksiyonun bozulmasına yol açabilir ve mevcut durum organelin periferinde lokalize olan bozulmuş krista ile şişmiş ve vakuolleşmiş mitokondrilerin büyük bir insidansını bildiren morfolojik gözlemle de desteklenmektedir. VCR, DRG nöronal mitokondriyal membranı boyunca kalsiyum hareketini etkileyerek mitokondriyal homeostazı değiştirerek anormal nöronal uyarılabilirliğe yol açabilir(29).

Çok sayıda çalışma, NLRP3'ün nöropatik ağrı, serebral iskemi-reperfüzyon hasarı, hafıza ve bilişsel bozukluk, depresyon, diyabetle ilişkili nöroinflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar gibi sinir sisteminin çeşitli inflamatuvar yanıtlarında rol oynadığını bulmuştur. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, siyatik sinir hasarı fare modelinde, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunun, IL-1 β , IL-18, ASC, kaspaz-1 ve

NLRP3 gibi inflamazomla ilişkili faktörlerin artan seviyeleriyle birlikte yüksek oranda arttığını kanıtlamıştır. Ayrıca, NLRP3 knockout farelerde SFI (siyatik sinir fonksiyon indeksi) analizi ile yansıtılan daha iyi motor iyileşme ile daha düşük inflamatuvar yanıt gözlenmiştir. Ayrıca, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunun nöropatik ağrıyı ve nöropatik ağrıyla birlikte görülen anksiyete ve depresyon benzeri davranışları arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, nöroinflamatuvar ağrı ve yaralanmada rol oynayan NLRP3 inflamazomunun mekanizması ve potansiyel terapötik etkisi üzerine yapılan teorik araştırmalar büyük klinik değer taşımaktadır(28).

2.10. NLRP3 İnflamazomu Ve Flavonoidler

Giderek artan sayıda kanıt, NLRP3 inflamazomunun çeşitli otoinflamatuvar sendromların (örn. kriyopirin ilişkili otoinflamatuvar sendromlar), nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların (örn. Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz, amiyotrofik lateral skleroz gibi hastalıkların nöroinflamasyon ve nörodejenerasyon süreçleri ve majör depresif bozukluk), metabolik bozukluklar (örn. obezite ve tip 2 diyabet) ve kronik inflamatuvar hastalıklar (örn. artrit ve bağırsak inflamasyonu) patofizyolojisiyle ilişkili olduğunu vurgulamaktadır. Koruyucu etki, terapötik etki ve remisyonun sürdürülmesi açısından fitokimyasalların terapötik potansiyeline olan ilgi göz önüne alındığında, NLRP3 yolaklarını hedef alan doğal bileşiklerin nörolojik, metabolik ve inflamatuvar hastalıklardaki etkilerini karakterize etmek için yoğun çaba sarf edilmektedir. Flavonoidlerin farmakolojik aktivitelerinin ve terapötik potansiyellerinin çeşitliliği hidroksilasyon derecelerine, yapısal sınıflarına, diğer sübstitüsyon ve konjugasyonlarına, polimerizasyon derecelerine ve ayrıca metal şelasyon aktivitelerine bağlanmaktadır. Antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser ve kardiyoprotektif özellikler gibi birçok farmakolojik aktivite flavonoidlerle ilişkilendirilmektedir. Bu bağlamda, çeşitli çalışmalar, polifenoller ve glukozinolatlar dahil olmak üzere çeşitli fitokimyasalların, NLRP3 sinyalinin inhibisyonu yoluyla deneysel hastalık modellerinde nöroinflamasyonu, metabolik değişiklikleri ve immün/inflamatuvar yanıtları önlediğini göstermiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, NLRP3 yolunu hedef alan ilaçların çok çeşitli hastalıkların tedavisi için uygun terapötik seçenekleri temsil edebileceği giderek daha fazla çalışılmaktadır(30,31).

Fitokimyasallar tarafından NLRP3 blokajının altında yatan ana moleküler mekanizmalar:

- 1- ROS üretiminin bastırılmasıyla yukarı akışta NLRP3 aktivasyonunun engellenmesi
- 2- NF-kB aracılı transkripsiyon adımlarının ve/veya NLRP3 oligomerizasyonunun doğrudan engellenmesi
- 3- AMPK/SIRT1/PGC-1 alfa dahil olmak üzere antiinflamatuvar yolların aktive edilmesi olarak tanımlanabilir.

Bu yollar aracılığıyla ROS-detoksifiye edici enzimlerin ekspresyonu artırabilir ve doğrudan NLRP3 birleşmesi inhibe edebilir(30).

2.11. Taxifolin Ve Etkileri

Taxifolin, flavonoid ailesinde bir izoflavanon olan flavanonollerin bir alt sınıfıdır. Taxifolin (3,5,7,3,4-pentahidroksi flavanon veya dihidroquercetin) ilk olarak Douglas göknarın kabuğundan izole edilmiş olup devediken, soğan, ve Fransız deniz çamı kabuğunda yaygın olarak bulunan bir flavonoiddir. Dihidroquercetin olarak da bilinen flavonoid taxifolin, diğer flavonoidlere benzer farmakolojik etkilere sahiptir. Taxifolin, birbirlerine göre meta ve para pozisyonunda iki fenolik grup (-OH) içeren iki aromatik halkadan oluşur. Bu fenolik grup, güçlü antioksidan aktivitesine karşılık gelir. Bir molekülün antioksidan aktivitesi, aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarının sayısının artmasıyla artar. Bu özellikle birlikte antioksidan kapasitesi yaygın flavonoidlerden daha üstündür ve bu nedenle tıbbi değeri giderek kabul görmektedir. Uygulamada, nadiren tek başına kullanılır, ancak genellikle silimarin gibi preparatlarda silibin A, silibin B, izosilibin A ile birlikte kullanılır. Taxifolinin antioksidan kapasitesi ilk olarak Kolhir ve meslektaşları tarafından kapiller koruyucu etkisiyle rapor edilmiştir(31–33).

Farmakokinetik açıdan değerlendirildiği bir çalışmada erkek sıçanlara 12,5, 25 veya 50 mg/kg doz düzeyinde tek oral uygulama veya 50 mg/kg intravenöz uygulama yoluyla taxifolin uygulanmış ve uygulamadan sonra 24 saate kadar kan plazması, böbrek, karaciğer, kalp, dalak, beyin, iskelet kasları ve akciğerlerde en yüksek taxifolin konsantrasyonu tespit edilmiştir. Özetle, taxifolinin sıçanın gastrointestinal kanalından hızlı bir şekilde emildiğini ve kan plazması, karaciğer, kalp, dalak, beyin, iskelet

kasları, akciğerler ve böbreklere dağıldığını ve daha sonra metabolize olduğunu ve idrar yoluyla atıldığını göstermiştir(33).

Çalışmalar, taxifolinin antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antibakteriyel, antikanser ve nöroprotektif aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğunu göstermektedir; ayrıca, taxifolinin ROS üretimini önlediği bilinmektedir(34).

Taxifolin, yapılan bir çalışmada antioksidan aktivitesi nedeniyle sıçan kortikal hücrelerinde oksidatif nöronal hasarları inhibe ederek nöroprotektif bir etki göstermiştir. Wang ve meslektaşları ise çalışmasında taxifolinin serebral iskemi-reperfüzyon hasarı olan sıçanlarda NF-kB'nin artmış aktivitesini inhibe ettiğini bulmuş ve bunun taxifolinin antioksidan etkisinden kaynaklandığını göstermiştir(32). Taxifolinin hem in vivo hem de in vitro olarak antioksidan, antiinflamatuvar, hepatoprotektif ve Anti-Alzheimer farmakolojik etkilere sahip olduğu çalışmalarla gösterilmiştir(33).

Taxifolinin inflamatuvar yanıtı modüle etmedeki rolü, Raw 264.7 hücreleri ve LPS endotoksinine maruz bırakılan fareler kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlara göre, taxifolin tedavisi Raw 264.7 hücrelerinde TNF- α , interferon gama (IFN- γ), IL-10 ve TLR4 transkripsiyonunu önemli ölçüde azaltmıştır(31).

Yapılan bir çalışmada taxifolinin 100 mg/kg dozunda α -tokoferol ile benzer bir antioksidan aktivite profiline sahip olduğu, süperoksit anyon üretimini inhibe ettiği, mitokondriyi peroksil radikal hasarından koruduğu ve mikrozomal lipid peroksidasyonu ile indüklenen NADPH bağımlı sitokrom P450 redüktaz aktivasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur(35).

COVID-19 hastalarında, serum prostoglandin E2 (PGE2) seviyeleri önemli ölçüde yükselmiş ve hastalık şiddeti ile pozitif korelasyon göstermiştir. Yapılan bir çalışmada taxifolinin SARS-CoV-2 ile indüklenen PGE2 üretimini azaltabileceği belirtilmiştir. Taxifolin ayrıca Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Shigella ve Salmonella'ya karşı güçlü antibakteriyel özelliklere sahip bir flavonoiddir. Staphylococcus aureus enfeksiyonuna karşı taxifolin mekanizmasında yeni gelişmeler kaydedilmiş, taxifolinin enfeksiyon sırasında ilaca dirençli Staphylococcus aureus suşlarının gelişimini de önleyebileceği kanıtlanmış ve in vivo deneyler taxifolinin

fareleri metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kaynaklı pnömoninin ölümcül etkilerinden koruduğunu göstermiştir(31).

Lee ve meslektaşlarına göre taxifolin, kanserle ilişkili genler de dahil olmak üzere hepatik detoksifikasyon, antioksidasyon, hücre döngüsü ve hücre büyümesinde rol oynayan genleri düzenler. Taxifolin birçok kanser türünde antikanser aktivite dolayısıyla çalışma konusu olmuştur. Taxifolinin yüksek derecede agresif meme kanserinin tedavisine nasıl katkıda bulunduğu ve altta yatan mekanizmaların neler olduğu bilinmemektedir. Li ve meslektaşlarına göre, taxifolin agresif meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu inhibe eder ve doza bağımlı olarak inhibe eder(31).

Taxifolinin akciğer, kolorektal, meme, karaciğer, prostat, kemik ve cilt kanserlerinde de kemoterapötik aktivitesi olduğu çalışmalarla gösterilmiştir(33).

2.12. Taxifolin Ve NLRP3 İnflamazomu

Flavonoidlerin NLRP3 inflamazomu ile ilişkisi birçok çalışmada gösterilmiş olup, flavonoidlerden biri olan taxifolinin de NLRP3 inflamazomuyla ilişkisini araştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan birisi taxifolinin spinal kord hasarı sonrası PI3K/Akt sinyal yolağı aracılığı mikrogial piropitoz ve nöroinflamasyon üzerine etkileriyle ilgilidir. Çalışmada taxifolin, oksidatif stresin aracılık ettiği mikrogial aktivasyonu belirgin şekilde azaltmış ve immünofloresan boyama ve Western blot analizleri ile gösterildiği üzere, siyatik sinir hasarı sonrası piropitoz ile ilişkili proteinlerin (NLRP3, GSDMD, ASC ve Kaspaz-1) ve inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve IL-18) ekspresyonunu inhibe etmiştir. Buna ek olarak, taxifolin aksonal rejenerasyonu teşvik etmiş, nöroinflamasyonu hafifletmiş ve siyatik sinir hasarı sonrası fonksiyonel iyileşmeyi artırmıştır. Yapılan bir başka çalışmada ise taxifolinin H9C2 hücrelerini oksidatif hasardan koruyabileceği ve AIM2, NLRP3 ve NLRC4 inflamazomunun inhibisyonu yoluyla hidrojen peroksit ile indüklenen H9C2 hücre piropitozunu baskılayabileceği belirtilmiştir(36,37).

NLRP3 inflamazomu ve taxifolin ilişkisini araştıran bir başka çalışmada ise taxifolinin diyabetik nefropatide ROS ve NLRP3 baskılayıcı etkisiyle renoprotektif etkileri incelenmiştir.

Yapılan çalışmaya ilişkin elde edilen sonuçlarda, modelle oluşturulan yüksek glukoz stimülasyonunun HBZY-1 ve HK2 hücrelerinde hücre proliferasyonunu, aşırı ROS üretimini, aktive NLRP3 inflamazomunu ve ekstraselüler protein ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir. Çalışmada NLRP3 inflamazom tarafından indüklenen Kaspaz-1 aktivasyonu, IL-1 β salgılanmasını ve ardından renal inflamatuvar sitokinezi teşvik eder. Taxifolin ise ROS ve NLRP3 inflamazomunun yanı sıra hücre proliferasyonunu ve ekstraselüler matriks proteinlerinin ekspresyonunu baskılayarak diyabetik nefropatinin ilerlemesini azaltabilir ve koruyucu etki gösterebilir(6).

Tüm bu bilgiler ışığında birçok vücut sağlığını koruyucu etkiye sahip olan, taxifolin tedavi modalitelerinde yaygın olarak kullanılan VCR kullanımında ortaya çıkan önemli bir yan etki olan VIPN etkisinin önlenmesine dair yapılacak çalışmalar için faydalı olabilir. VIPN önde gelen sebeplerinden biri olan inflamasyon ve patogeneizde yer alan NLRP3 inflamazom yolağının üzerinde çalışılması bilimsel açıdan katkılar sağlayabilir. Bu nedenle VCR tedavisi sonrası VIPN oluşan Wistar Albino sıçanlarda meydana gelen davranışsal, histopatolojik değişikliklerin incelenmesi ve taxifolinin olası koruyucu etkilerinde NLRP3 rolünü araştırmayı amaçladık.

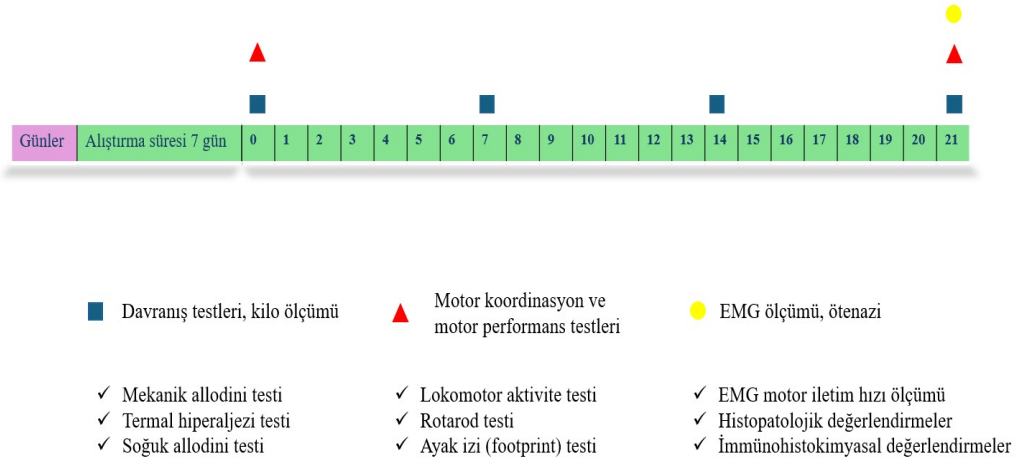
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Deneyler için 200-250 gram (g) ağırlığında 32 adet erkek Wistar albino türünde sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 12 saatlik aydınlık 12 saatlik karanlık döngüleri olan ve standart neme sahip sabit sıcaklıktaki ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) odalarda barındırılmıştır. Beslenme olarak erişimleri serbest şekilde standart hayvan yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. Davranış deneyleri 10:00-15:00 saatleri arasında yapılırken, intraperitoneal (ip) ve ağızdan gavaj (po) uygulamaları davranış deneyleri sonrası gerçekleştirilmiştir. Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 03.07.2025 tarihli 993-2/2025 kayıt numaralı karar ile onaylanmıştır.

GÜNLER		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
U Y G U L A M A	KONTROL GRUBU																					
	VINKRİSTİN GRUBU																					
	VINKRİSTİN + TAXİFOLİN 25 GRUBU																					
	VINKRİSTİN + TAXİFOLİN 50 GRUBU																					
		1:5 oranında DMSO:Distile su po																				
		%0.9 serum fizyolojik ip																				
		Vinkristin; 0.1mg/kg dozunda ip																				
		Taxifolin 25 mg/kg po																				
		Taxifolin 50 mg/kg po																				

Şekil 3.1. Deney protokolü-1



Şekil 3.2. Deney protokolü-2

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve ilaçlar: Vinkristin (Koçak Farma, Türkiye), Taxifolin (Sigma, ABD), DMSO (Tokyo Chemical Industry(TCI)/Japonya).

3.3. Deney Grupları

Deneyimizi gerçekleştirmek için 32 adet Wistar albino erkek sıçan her grupta 8 adet sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

1. grup; KONTROL: 1:5 oranında DMSO:Distile su po, %0.9 serum fizyolojik ip
2. grup; VİNKRİSTİN: Vinkristin; 0.1mg/kg dozunda ip + 1:5 oranında DMSO:Distile su po
3. grup; VİNKRİSTİN+TAXİFOLİN 25: Vinkristin 0.1mg/kg dozunda ip + Taxifolin 25 mg/kg po
4. grup; VİNKRİSTİN+TAXİFOLİN 50: Vinkristin 0.1mg/kg dozunda ip + Taxifolin 50 mg/kg po

3.4. Vinkristin ile İndüklenen Periferik Nöropati Modeli

Çalışmamızda vinkristin periferik nöropati modelini oluşturmak için kontrol grubu dışındaki gruplara %0.9'luk serum fizyolojikle dilüe edilmiş vinkristin etken maddeli ilaç 5 gün boyunca ip olarak 0.1 miligram/ kilogram (mg/kg) dozunda

uygulandı. Daha sonrasında 2 günlük ara verildikten sonra bu uygulamaya 5 gün daha aynı şekilde devam edildi. Taxifolin ise önce dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde 1:5 oranında çözdürüldükten sonra distile su ile dilüe edilerek gruplardan 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarında po olarak uygulandı(38,39).

3.5. Vücut Ağırlık Ölçümleri

Sıçanlara ait vücut ağırlıkları (VA) 0, 7, 14, ve 21. günde tartılarak gram cinsinden kaydedilmiştir. Kaydedilen değerlere göre yapılacak ip ve po uygulama dozları da revize edilerek etkin uygulama yapılmıştır. Ayrıca tüm gruplara ait vücut ağırlığı değişimleri yüzde değişim formülüyle hesaplanmıştır.

$$\text{Vücut ağırlığı \% değişim} = \frac{(\text{Deney sonu VA} - \text{Başlangıç VA}) \times 100}{\text{Başlangıç VA}}$$

3.6. Davranış Testleri

Nöropatik ağrının değerlendirilmesi için deneye ait davranış testleri olarak mekanik allodini, termal hiperaljezi ve soğuk allodini testleri uygulanmıştır. Testler tek gözlemci tarafından 0, 7, 14, ve 21. günlerde toplam 4 kez 10:00 15:00 saatleri arasında yapılmış olup, kayıt altına alınmıştır (38,39).

3.6.1. Mekanik Allodini Değerlendirmesi

Mekanik allodininin değerlendirilmesi için Dinamik Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile S.R.L. 37400-002, İtalya) isimli elektronik dinamik plantar test cihazı kullanılmıştır. Her ölçüm öncesi cihaz kalibrasyonu kontrol edilip, deney hayvanlarında pençe hasarını önlemek için 20 saniye (s) süre cut-off değeri olarak belirlenmiştir. Sıçanlar zemini tel örgülü pleksiglas bölmelere yerleştirildikten sonra ortama alışmaları amacıyla 30 dakika (dk) beklenilmiş ve sonrasında test aşamasına geçilmiştir. Ölçüm yapılırken esteziyometrenin 0.5 milimetre (mm) olan iğne şeklindeki ucu sıçanların arka pençelerinin plantar yüzeylerinin ortasına denk gelecek şekilde giderek artan mekanik kuvvet uygulanmıştır. Bu uygulamaya ait veriler sıçanın pençesini çektiği süre olan latens, saniye cinsinden eşik değer olarak kaydedilmiştir.

Yapılan ölçümler 5 dk ara ile her sıçana 3'er kez yapılmış olup elde edilen ortalama değer istatistiksel değerlendirmeye alınmıştır(38,39).



Şekil 3.3. Mekanik allodini değerlendirmesi A: Dinamik plantar test cihazı B: Dinamik plantar cihazında ölçüm alınması

3.6.2. Termal Hiperaleji Değerlendirmesi

Termal hiperalejinin değerlendirilmesi için termal plantar test cihazı (Commat, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Ölçüm öncesinde sıçanlar cam tabanlı zemine sahip bölmelere yerleştirilerek ölçüm öncesinde 30 dk ortama alışma için bekletilmiştir. Ölçüm aşamasında pençe çekme latensi, sıçanın arka pençesinin plantar yüzeyinin ortasına denk gelecek şekilde radyan ısı uygulanması ve bu uygulamanın başlamasıyla sıçanın ayağını çekme süresi saniye cinsinden kaydedilmiştir. Bu ölçümler 5 dk ara ile her sıçana 3'er kez yapılmış olup elde edilen ortalama değer istatistiksel değerlendirmeye alınmıştır. Sıçanlarda oluşabilecek doku hasarını önlemek amacıyla 20 sn cut-off süresi olarak belirlenmiştir(38,39).



Şekil 3.4. Termal hiperaleji değerlendirilmesi A: Termal plantar test cihazı B: Termal plantar test cihazında radyal ısı uygulanması

3.6.3. Soğuk Allodini Değerlendirmesi

Soğuk allodininin değerlendirilmesi amacıyla iğne uçsuz insülin enjektörü vasıtasıyla aseton uygulaması şeklinde yapılan aseton drop testi uygulanmıştır. Sıçanlar zemini tel örgülü pleksiglas bölmelere yerleştirildikten sonra ortama alışmaları amacıyla 30 dk bekletilmiş ve sonrasında test aşamasına geçilmiştir. Ölçüm aşamasında sıçanın arka pençesinin plantar yüzeyinin ortasına denk gelecek şekilde yaklaşık 0.1-0.2 mililitre (mL) miktarında aseton enjektör pistonu itilerek püskürtülmüş olup arka pençeyi çekme ve yalama davranışları pençe çekme latensi olarak kaydedilmiştir. Bu ölçümler 5 dk ara ile her sıçana 3'er kez yapılmış olup elde edilen ortalama değer istatistiksel değerlendirmeye alınmıştır. Sıçanların pençe çekme latensinde 20 s cut-off değeri olarak belirlenmiştir(38,39).



Şekil 3.5. Soğuk allodini değerlendirilmesi A: Soğuk allodini için test düzeneği B:

Aseton drop yöntemiyle soğuk allodini değerlendirilmesi

3.7. Motor Koordinasyon ve Motor Performans Testleri

Sıçanlarda motor koordinasyon ve motor performansı değerlendirmek amacıyla aktivitemetre testi, rotarod testi ve ayak izi testi 0 ve 21. günlerde uygulanmıştır.

3.7.1. Lokomotor Aktivitenin Değerlendirilmesi

Lokomotor aktiviteyi değerlendirmek amacıyla kare şeklinde plastik kenarlara sahip, kenarlarında kızılötesi ışık kaynağı içeren) lokomotor aktivitemetre cihaz sistemi (MAY Commat, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Sıçan platform içerisine yerleştirildikten sonra sessiz bir ortamda cihaz tarafından kaydedilen horizontal, vertikal, ambulator hareketlere ait parametreler kayıt altına alınmıştır. Cihaz prensip olarak sıçanın hareketine bağlı olarak kızılötesi ışınların kesilmesini sensörler aracılığıyla algılayıp daha sonrasında bunları bilgisayara aktarmaktadır. Cihaza ait ölçüm süresi ise 5 dk olup ve bu süre bitiminde otomatik olarak kayıt durmaktadır.



Şekil 3.6. Lokomotor aktivitemetre sistemi

3.7.2. Rotarod Testi

Motor fonksiyon ve koordinasyonun değerlendirilmesi amacıyla rotarod testi (MAY 972-A Rota Rod; Commat, Ankara, Türkiye) uygulanmıştır. Rotarod testinin değerlendirme ölçümlerinden önce sıçanların düzeneğe alışması amacıyla 3 günlük

5'er dakikalık alıştırma uygulanmıştır. Rotarod testine silindir hızı 20 rpm olarak belirlenmiş olup silindirin üzerinde yürümeye başladıkları andan itibaren silindir üzerinde kalarak yürüme süreleri saniye cinsinden kaydedilmiştir. Teste ait süre olarak 5 dk cut-off değeri olarak alınmıştır(39).



şekil 3.7. Rotarod test cihazı

3.7.3. Ayak İzi (footprint) Analizi

Motor koordinasyona ait bozuklukların değerlendirilmesi amacıyla ayak izi (footprint) analizi uygulanmıştır. Ayak izi analizi için 100 santimetre (cm) uzunluğunda 9 cm genişliğinde beyaz kağıtlar kullanılmıştır. Kağıtların kartondan bir koridora yerleştirilmesinin ardından sıçanların ön penęelerinin plantar yüzeyleri kırmızı renkte arka penęelerinin plantar yüzeyleri ise mavi renkli toksik olmayan gıda boyası ile boyanarak koridor boyunca serbest yürümeye bırakılmıştır. Daha sonrasında ise sıçanların penęeleri arasındaki adım mesafeleri renklerine uygun olarak cm cinsinden kaydedilmiştir.



Şekil 3.8. Ayak izi (footprint) görüntüsü

3.8. Motor İletim Hızının Değerlendirilmesi

Motor iletim hızının değerlendirilmesi için elektromiyografi (EMG) cihazı (Powerlab 8/30 ML870 AD Instruments, Avustralya) kullanılmıştır. EMG ölçüm değerlendirmeleri 21. günde sakrifikasyon öncesi, siyatik sinire uyan trase tüylerden temizlenerek siyah ve kırmızı elektrotlar, kuyruk bölgesine ise yeşil elektrot yerleştirilerek bilgisayar ortamına yansıyan traseler üzerinden anestezi altında yapılmıştır. Elde edilen veriler 30 tekrarlı uyarılar verilerek 3,56 volt dalga yüksekliği, 0,201 milisaniye dalga genişliğiyle kaydedilmiştir. Uyarı sonrası motor sinir iletim hızı sinir stimülasyon noktası arasındaki mesafeyi gecikme süresi farkına bölünerek hesaplandı(38).



Şekil 3.9. Motor iletim hızının değerlendirilmesi

3.9. İmmünohistokimyasal ve Histopatolojik Değerlendirmeler

Siyatik sinir ve DRG doku örnekleri Hemotoksilen&eoizin (H&E), Luxol Fast Blue, Toludin Blue ile boyanarak histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır. İmmünohistokimyasal olarak Kaspaz-1, IL-18, IL-1 β , NF-kB, NLRP3, CD68 çalışılmıştır. Karaciğer ve böbrek dokuları VCR toksisitesi değerlendirmesi için ışık mikroskobu altında H&E boyama yöntemiyle incelenmiştir.

Çalışmada, sıçanlardan elde edilen siyatik sinir ve DRG dokuları kullanılmıştır. Doku örnekleri alındıktan hemen sonra %10 tamponlanmış formalin solüsyonunda fikse edilmiştir. Fiksasyonu takiben doku örnekleri yıkanmış, artan sıvıdan arındırılarak rutin doku takip işlemine alınmış ve parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan 5 μ m kalınlığında seri kesitler hazırlanmıştır.

H&E ile boyanan kesitler, Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus America, ABD) kullanılarak incelenmiştir. Toluidin mavisi ile boyama için DRG ve siyatik sinir dokuları %2 osmiyum tetroksitte 2 saat inkübe edilmiştir. Asetonla dehidratasyon sonrası epoksi reçine içerisine gömülmüştür (Sigma Aldrich, ABD). Ultramikrotom (RMC Products, ABD) ile 8 μ m kalınlığında kesitler alınmış ve %1 toluidin mavisi ile 30 saniye boyanmıştır. Boyama sonrası kesitler deiyonize suyla yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kesitler Olympus BX51 mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

Luxol Fast Blue boyaması, parafin gömülü sinir dokusu kesitlerinde miyelin kılıfın değerlendirilmesi amacıyla uygulanmıştır. Kesitler önce deparafinizasyon ve rehidrasyondan geçirilmiş, ardından 56–60 °C’de 18–24 saat boyunca %0.1 Luxol Fast Blue çözeltisinde boyanmıştır. Boyama sonrası, lityum karbonat ve %70 etanol çözeltisinde diferansiyasyon yapılarak spesifik miyelin boyanması sağlanmıştır. Kesitler, etanol serilerinde dehidrate edilip ksilen ile temizlendikten sonra entellan ile kalıcı olarak kaplanmış ve Olympus BX51 ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir.

Spinal sinir değerlendirilmesinde miyelin kılıf kaybı (solma, incelme, silinme), miyelinli sinir liflerinde sayı azalması, düzensizlik, miyelin artıkları (debris, miyelin ovoidleri), makrofaj infiltrasyonu (CD68+), aksonal korunma ya da aksonal dejenerasyon, Schwann hücresi hiperplazisi histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Karaciğer değerlendirmesinde hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu, vakuolizasyon, steatoz (yağlanma), apoptotik cisimcikler (Councilman

cisimleri) sinüzoidlerde genişleme, konjesyon, kupffer hücre aktivasyonu, portal alan inflamatuvar hücre infiltrasyonu (özellikle lenfosit ve makrofajlar), safra kanalında hasar, santral ven çevresi (zone 3) nekroz, koagülasyon nekrozu perisinüzoidal ve portal fibroz histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Böbrek değerlendirmesinde proksimal tübüllerde vakuolizasyon, sitoplazmada granüler dejenerasyon, epitel dökülmesi, tübül lümeninde hücre artıkları, glomerüller kapiller çökme, mezangial proliferasyon, bazal membranda kalınlaşma, interstisyumda interstisyel ödem, lenfosit/makrofaj infiltrasyonu, endotel hasarı, perivasküler inflamasyon, tübüler nekroz histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Her bir histopatolojik özellik, 0–4 arasında derecelendirilmiştir: (0) belirgin hasar yok, (1) %25'ten azını etkileyen minimal hasar, (2) %26–50'yi etkileyen hafif hasar, (3) %51–75'i etkileyen orta derecede hasar, (4) %75'ten fazlasını etkileyen şiddetli hasar olarak derece almıştır. Tüm değerlendirmeler, gruplardan habersiz bir patolog tarafından yapılmıştır. Deneysel gruplara ait dorsal root ganglion (DRG) dokularında inflamasyon, apoptoz ve nörotrofik yanıt ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla immünohistokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla NF-kB (Boster-Amerika Birleşik Devletleri), CD68 (Thermo Scientific-Amerika Birleşik Devletleri), Kaspaz-1, NLRP3, IL-18 ve IL-1 β (Biorbyt-Birleşik Krallık) antikorları kullanılmıştır. Parafine gömülü DRG bloklarından alınan 5 μ m kalınlığındaki kesitler polilizin kaplı lamalar üzerine alınmıştır. Kesitler 60 °C'de 1 gece bekletildikten sonra ksilen ve alkol serileriyle deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri uygulanmıştır. Antijen geri kazanımı, sitrat tamponu (pH 6,0) içerisinde mikrodalga yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit ile bloke edilmiştir. Ardından kesitler %5 normal serum ile bloklanıp, primer antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Uygun biyotinilize sekonder antikorlar ve streptavidin-peroksidaz kompleksi ile işlem devam ettirilmiştir. İmmünreaktivite, DAB (diaminobenzidin) kromojen kullanılarak ortaya kondu ve Mayer's hematoksilen ile karşı boyama yapılmıştır. Kesitler ardından su ile yıkanıp, alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek kapatılmıştır. Her boyama için negatif kontroller de eş zamanlı olarak değerlendirilmiştir. İmmün boyanma derecesi, Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus America, ABD) kullanılarak incelenmiştir ve her marker için H-skoru yöntemiyle yarı kantitatif olarak değerlendirilmiştir. H-

skoru, boyanan hücre yüzdesi ve boyanma şiddetine göre $H=(1 \times \text{zayıf boyanma yüzdesi}) + (2 \times \text{orta boyanma yüzdesi}) + (3 \times \text{güçlü boyanma yüzdesi})$ formülüyle 0–300 aralığında hesaplanmıştır. Her örnekten en az üç alan rastgele seçilerek analiz edilmiş ve gruplar arası karşılaştırmalar yapılmıştır(40).

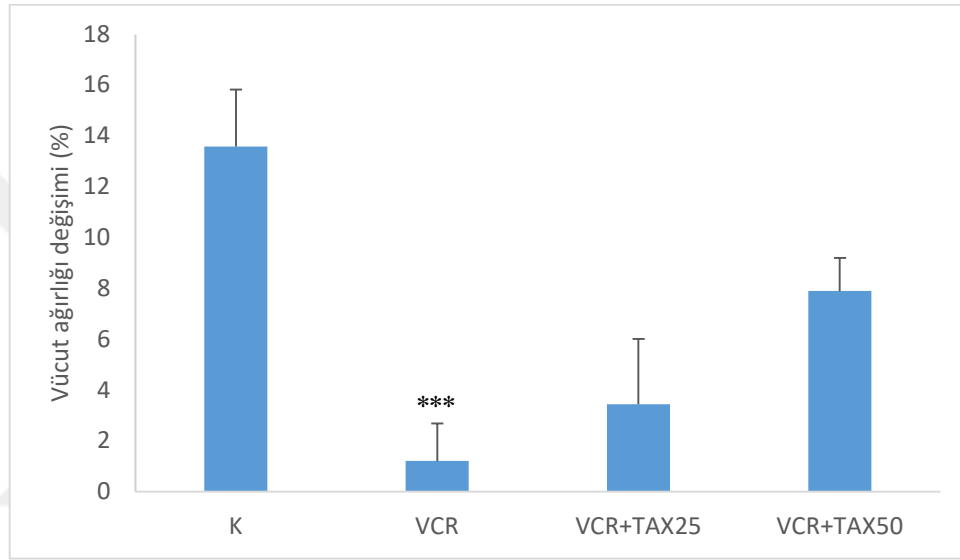
3.10. İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM SPSS, Türkiye) ve Sigma STAT 3.5 programları kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılan veriler için parametrik test olan tek yönlü varyans analizi, çoklu karşılaştırma testi olarak da Tukey's testi kullanılmıştır. Normal dağılmayan veriler için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Mekanik allodini, termal hiperaljezi, soğuk allodini testi, rotarod testi, ayak izi analizi ve EMG testlerinde hem gruplar arası farklılığı hem de ölçüm zamanları arasındaki farklılıkları değerlendirmek için iki yönlü varyans analizi uygulanmıştır. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey's testi uygulanmıştır. Değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikler normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama $\pm$ standart hata, normal dağılım göstermeyen değişkenler için medyan (%25-%75 persantil) şeklinde verilmiştir. Anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı Bulguları

Vücut ağırlığı ölçümleri 0, 7, 14, ve 21. günlerde yapılmış olup % değişim formülüyle hesaplama yapılmıştır. Yapılan hesaplamayla elde edilen veriyle, deneyin 0. gün ve 21. gün arasındaki vücut ağırlıkları arasında farkın yüzde değişimi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



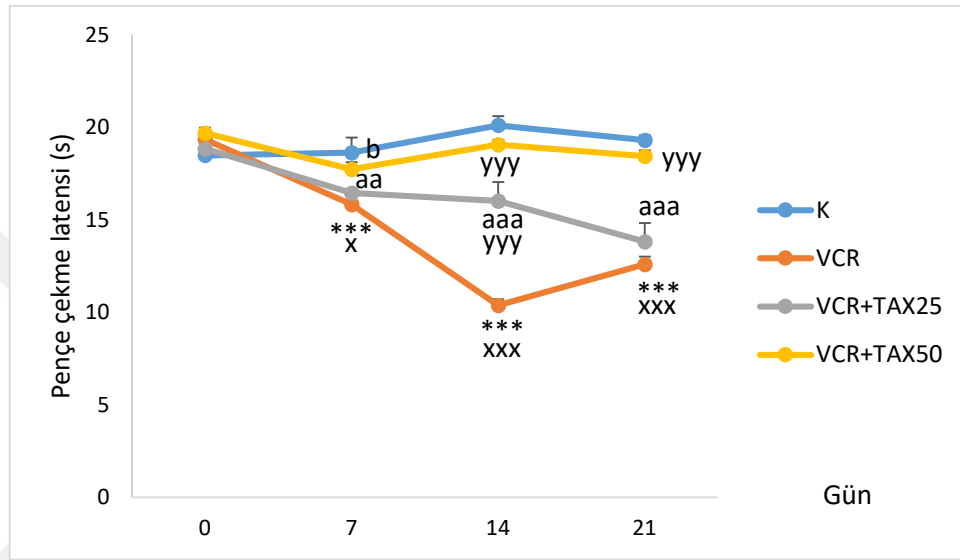
Şekil 4.1. Vücut ağırlığının 0. gün ve 21.gün arasındaki yüzde değişimi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmektedir.
(*** $p < 0,001$ kontrol grubu ve VCR grubu arasında)

Vücut ağırlığı değişimi grafiğinde bütün gruplarda vücut ağırlığı artışı olduğu görülürken, VCR grubunda kontrole göre yüzde artışı daha az olup aralarında anlamlı fark ($p < 0,001$) bulunmuştur. VCR+TAX50 grubunda vücut ağırlığı yüzde değişimi açısından kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunamamıştır. VCR+TAX50 grubundaki vücut ağırlığı yüzde artışı VCR grubuna göre daha fazla olsa da istatistiksel olarak bu anlamlı fark bulunamamıştır ($p = 0,076$).

4.2. Davranış Testi Bulguları

4.2.1. Mekanik Allodini

Mekanik allodini değerlendirmesi dinamik plantar test cihazında ölçümü yapılan pençe çekme latensi değerlendirilerek yapılmıştır. Elde edilen bulgular gruplara göre ve ölçüm zamanlarına göre karşılaştırmalı olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



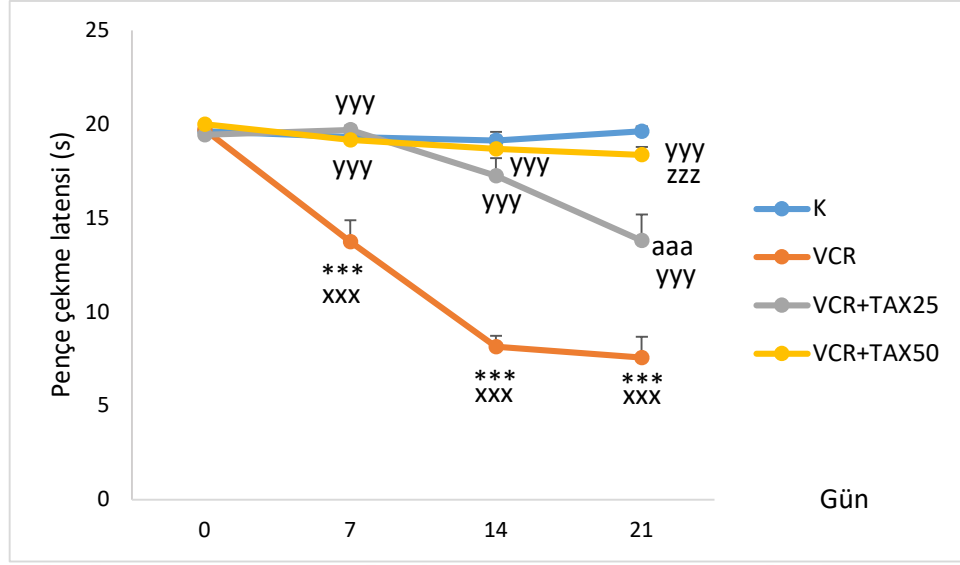
Şekil 4.2. Mekanik allodini pençe çekme latensi karşılaştırılması. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmektedir. (*** $p < 0,001$ 0. gün ve 7, 14, 21. günler arasında VCR grubu; aa $p = 0,001$ 0. gün ve 7. gün arasında VCR+TAX25 grubu; aaa $p < 0,001$ 0. gün ve 14, 21. günler arasında VCR+TAX25 grubu; b $p = 0,036$ 0. gün ve 7. gün arasında VCR+TAX50 grubu; x $p = 0,028$ 7. günde kontrol grubu ve VCR grubu arasında; xxx $p < 0,001$ 14. günde kontrol grubu ve VCR grubu arasında, 21.günde kontrol grubu ve VCR grubu arasında; yyy $p < 0,001$ 14. günde VCR+TAX25 grubu ve VCR grubu arasında, 14. günde VCR+TAX50 grubu ve VCR grubu arasında, 21.günde VCR+TAX50 grubu ve VCR grubu arasında)

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde tüm gruplar arasında 0. güne ait ölçümler arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Kontrol grubunun 0, 7, 14 ve 21. güne ait ölçümleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır. VCR grubunun 0. güne ait

ölçümüne göre 7, 14 ve 21. günde pençe çekme latens süreleri anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,001$). VCR+TAX25 grubunun 0. güne ait ölçümüne göre 7. günde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p=0,001$). VCR+TAX25 grubunun 0. güne ait ölçümüne göre 14 ve 21. günde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p<0,001$). VCR+TAX50 grubunun 0. güne ait ölçümüne göre 7. günde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p=0,036$). Kontrol grubu ve VCR grubu ölçümleri arasında 7. günde anlamlı fark ($p=0,028$) bulunmuştur. Kontrol grubu ve VCR grubu 14. gün ve 21. gün ölçümleri arasında anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur. VCR+TAX25 grubu ve VCR grubu 14. gün ölçümleri anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur. VCR+TAX50 grubu ve VCR grubu 14. gün ölçümleri arasında anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur. VCR+TAX50 grubu ve VCR grubu 21. gün ölçümleri anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur.

4.2.2. Termal Hiperaleji

Termal hiperaleji değerlendirmesi termal plantar test cihazında ölçümü yapılan pençe çekme latensi değerlendirilerek yapılmıştır. Elde edilen bulgular gruplara göre ve ölçüm zamanlarına göre karşılaştırmalı olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



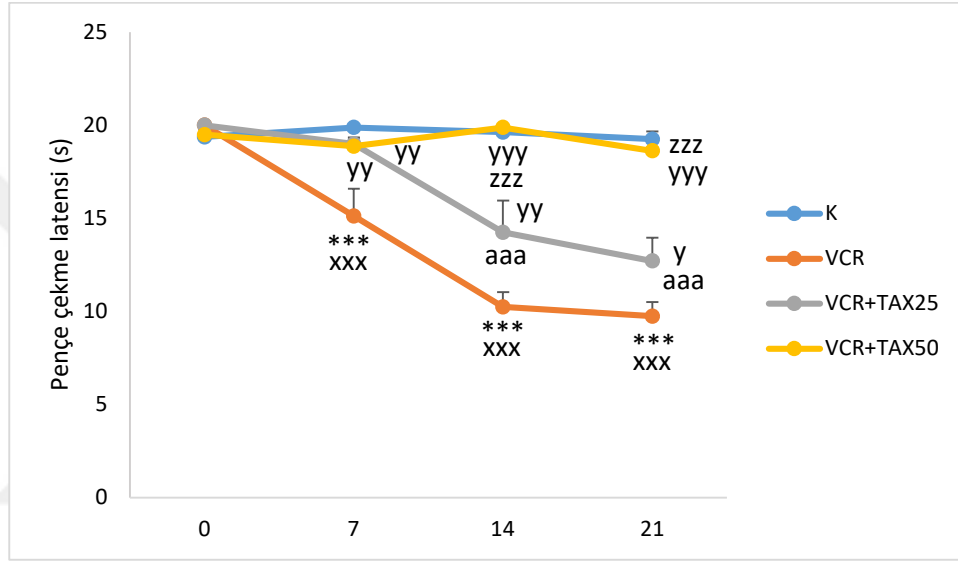
Şekil 4.3. Termal hiperaljezi pençe çekme latensi karşılaştırması. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmektedir. (*** $p < 0,001$ 0. gün ve 7, 14, 21. günler arasında VCR grubu; xxx $p < 0,001$ 7, 14 ve 21.günlerde kontrol grubu ve VCR grubu arasında; yyy $p < 0,001$ 7, 14 ve 21. günlerde VCR+TAX25 grubu ve VCR grupları arasında; 7, 14 ve 21. günlerde VCR+TAX50 ve VCR grupları arasında; aaa $p < 0,001$ 0. gün ve 21. gün arasında VCR+TAX25 grubu; zzz $p < 0,001$ 21. günde VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında)

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde tüm grupların 0. güne ait ölçümlerle ilgili anlamlı fark bulunamamıştır. Kontrol grubuna ait 0, 7, 14 ve 21. güne ait ölçümlerle ilgili anlamlı fark bulunamamıştır. VCR grubunun 0. güne ait ölçümüne göre 7, 14 ve 21. günlerde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p < 0,001$). VCR+TAX25 grubunun 0. güne ait ölçümüne göre 21. günde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p < 0,001$). VCR+TAX50 grubuna ait 0, 7, 14 ve 21. güne ait ölçümlerle ilgili anlamlı fark bulunamamıştır. Kontrol grubu ve VCR grubu arasında 7, 14 ve 21. gün ölçümleri arasında anlamlı fark ($p < 0,001$) bulunmuştur. VCR+TAX25 grubuna göre VCR grubunun 7. 14. ve 21. gününde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p < 0,001$). VCR+TAX50 grubuna göre VCR grubunun 7, 14 ve 21. gününde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür

($p<0,001$). VCR+TAX25 grubuna göre VCR+TAX50 grubunda 21. günde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p<0,001$).

4.2.3. Soğuk Allodini

Soğuk allodini değerlendirmesi aseton drop yöntemiyle yapılan pençe çekme latensi değerlendirilerek yapılmıştır. Elde edilen bulgular gruplara göre ve ölçüm zamanlarına göre karşılaştırmalı olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



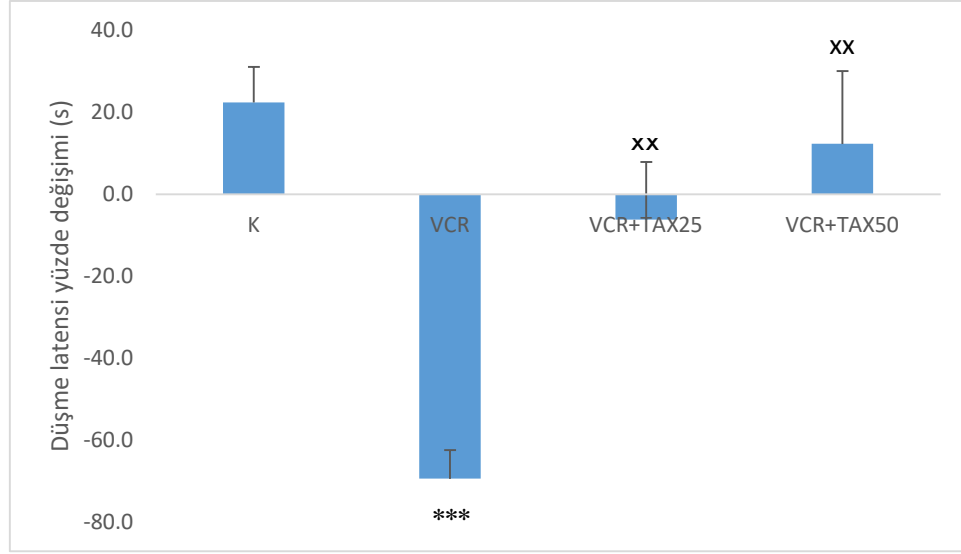
Şekil 4.4. Soğuk allodini pençe çekme latensi karşılaştırması. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmektedir. (***) $p<0,001$ 0. gün ve 7, 14, 21. gün arasında VCR grubu; xxx $p<0,001$ 7, 14 ve 21. günde kontrol grubu ve VCR grubu arasında; yy $p=0,004$ 7. günde VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında; yy $p=0,005$ 7. günde VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında; yy $p=0,003$ 14.günde VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında; aaa $p<0,001$ 0. gün ve 14, 21. gün arasında VCR+TAX25 grubu; yyy $p<0,001$ 14. günde VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında, 21. günde VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında; zzz $p<0,001$ 14. günde VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında, 21. günde VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında; y $p=0,039$ 21. günde VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında)

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde tüm grupların 0. güne ait ölçümleriyle ilgili anlamlı fark bulunamamıştır. Kontrol grubuna ait 0, 7, 14 ve 21. güne ait ölçümlerle ilgili anlamlı fark bulunamamıştır. VCR grubunun 0. güne ait ölçümüne göre 7, 14 ve 21. günlerde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p<0,001$). VCR+TAX25 grubunun 0. güne ait ölçümüne göre 14 ve 21. günde pençe çekme latens süresinde anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p<0,001$). VCR+TAX50 grubuna ait 0, 7, 14 ve 21. güne ait ölçümlerle ilgili anlamlı fark bulunamamıştır. Kontrol grubu ve VCR grubunun 7, 14 ve 21. gün ölçümleri arasında fark ($p<0,001$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında 14. gün ölçümünde anlamlı fark ($p=0,003$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX50 grubunun 14. güne ait ölçümleri arasında anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX50 grubunun 21. güne ait ölçümleri arasında anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur. VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubunun 14. güne ait ölçümleri arasında anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur. VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubunun 21. güne ait ölçümleri arasında anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu 21. güne ait ölçümleri arasında anlamlı fark ($p=0,039$) bulunmuştur.

4.3. Motor Koordinasyon ve Motor Performans Testleri

4.3.1. Rotarod Testi

Motor fonksiyon ve koordinasyon değerlendirmesi rotarod testiyle yapılan düşme latensi yüzde değişimi hesaplanarak yapılmıştır. Elde edilen bulgular gruplara göre karşılaştırmalı olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

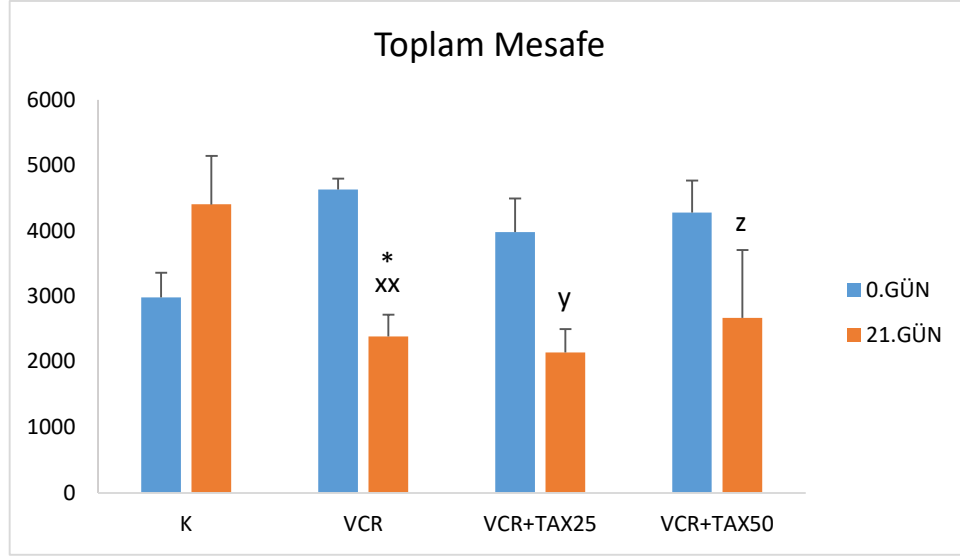


Şekil 4.5. Rotarod testi düşme latensi yüzde değişimi karşılaştırması. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmektedir. (***) $p < 0,001$ kontrol grubu ve VCR grubu arasında; xx $p = 0,007$ VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında, $p = 0,001$ VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında)

Yapılan istatistiksel değerlendirmede VCR grubunun rotarod testi düşme latensinde azalma olup, yüzde değişim ölçümleri açısından VCR grubu ve kontrol grubunun arasında anlamlı fark ($p < 0,001$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında anlamlı farklılık ($p = 0,007$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu ölçümleri arasında anlamlı farklılık ($p = 0,001$) bulunmuştur.

4.3.2. Lokomotor Aktivite Testi

Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesinde aktivitemetre cihazı kullanılarak horizontal, vertikal, ambulatuar hareketlere ait bulgular değerlendirilerek yapılmıştır. Elde edilen hareket bulgularından sadece toplam mesafeye ait anlamlı farklar bulunmuş olup gruplara göre ve ölçüm zamanlarına göre karşılaştırmalı olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



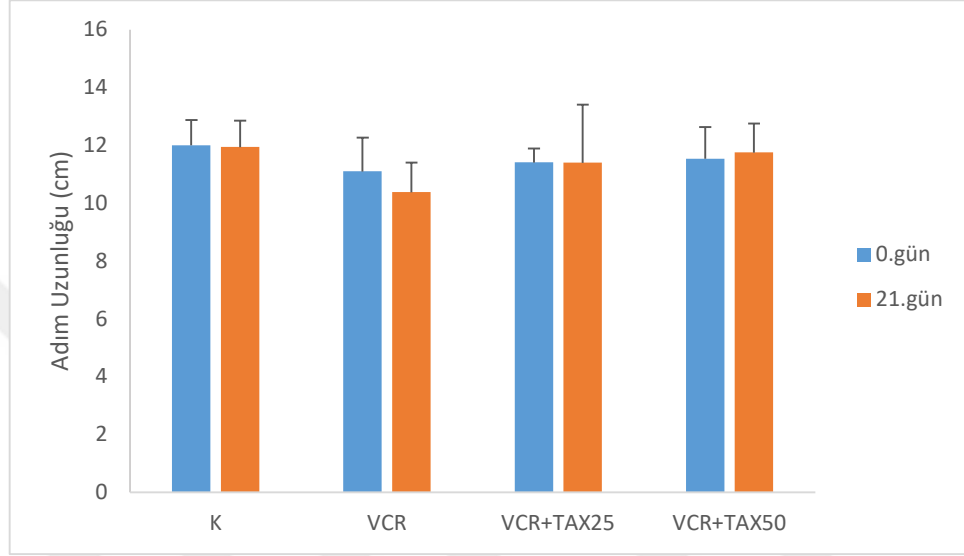
Şekil 4.6. Lokomotor aktivite testi 0. ve 21. gün toplam mesafe karşılaştırması.

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmektedir. (* $p=0,018$ 21. günde kontrol grubu ile VCR grubu arasında; xx $p=0,006$ 0. gün ve 21. gün arasında VCR grubu; y $p=0,021$ 0. gün ve 21. gün arasında VCR+TAX25 grubu; z $p=0,041$ 0. gün ve 21. gün arasında VCR+TAX50)

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde tüm grupların 0. güne ait ölçümlerle ilgili anlamlı fark bulunamamıştır. 21. günde kontrol grubu ve VCR grubu arasında ($p=0,018$) anlamlı fark bulunmuştur. VCR grubunun 0. gün ve 21. gün ölçümleri arasında anlamlı fark ($p=0,006$) bulunmuştur. VCR+TAX25 grubunun 0. gün ve 21. gün ölçümleri arasında anlamlı fark ($p=0,021$) bulunmuştur. VCR+TAX50 grubunun 0. gün ve 21. gün ölçümleri arasında anlamlı fark ($p=0,041$) bulunmuştur.

4.3.3. Ayak izi Analizi

Motor koordinasyona ait bozuklukları değerlendirmek için ayak izi analiziyle adım uzunluğu bulguları değerlendirilerek yapılmıştır. Elde edilen bulgular gruplara göre ve ölçüm zamanlarına göre karşılaştırmalı olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



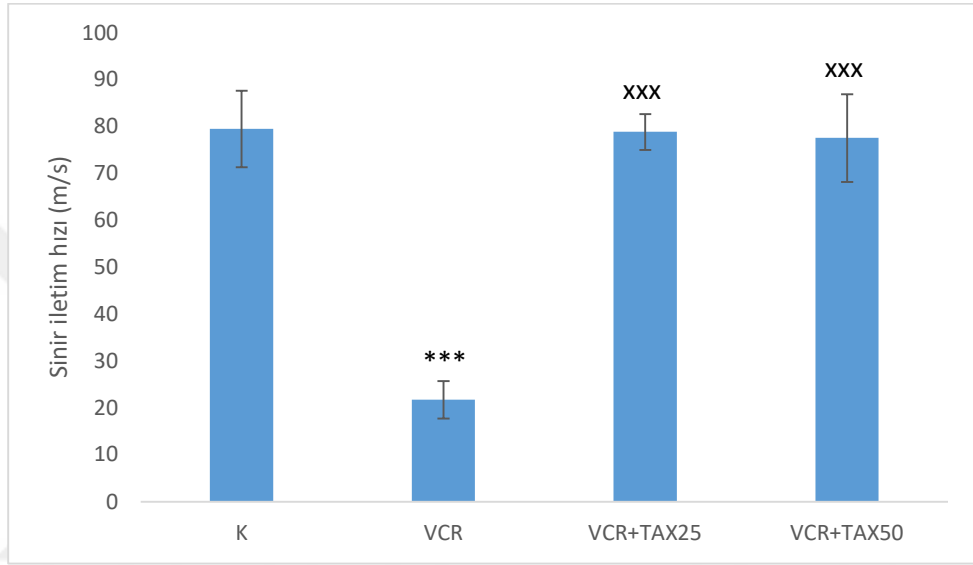
Şekil 4.7. Ayak izi analizinde 0. ve 21. gün adım uzunluğu karşılaştırması

Ayak izi analizinde adım uzunlukları açısından gruplar arasında ve her grupta 0. ve 21. gün bulgularının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

4.4. Motor İletim Hızının Değerlendirilmesi

4.4.1. EMG

Motor iletim hızının değerlendirilmesi için elektromiyografi (EMG) cihazı kullanılarak uyarı sonrası tepki süreleri ölçümlerinin elektrotlar arası mesafeye bölünerek elde edilen hız verileri değerlendirilerek yapılmıştır. Elde edilen bulgular gruplara göre karşılaştırmalı olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



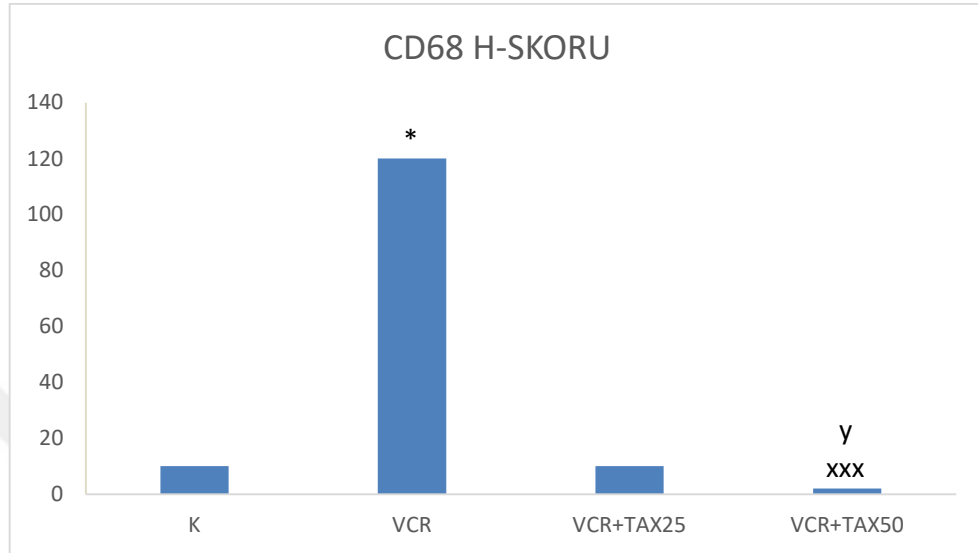
Şekil 4.8. EMG motor iletim hızlarının karşılaştırılması. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmektedir. (***) $p < 0,001$ kontrol grubu ve VCR grubu arasında; xxx $p < 0,001$ VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında, VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında ölçümlerin karşılaştırılması)

Yapılan istatistiksel değerlendirmede VCR grubunun kontrol grubuna göre motor iletim hızında anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p < 0,001$). VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında anlamlı fark ($p < 0,001$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında anlamlı fark ($p < 0,001$) bulunmuştur.

4.5. İmmünohistokimyasal ve Histopatolojik Bulgular

4.5.1 Siyatik Sinirlerin Değerlendirmesi

CD68 İmmünreaktivitesi



Şekil 4.9. CD68 H-skorlaması düzeyleri. Veriler medyan (%25-75) olarak gösterilmektedir. (* $p < 0,05$ kontrol grubu ve VCR grubu arasında; xxx $p < 0,001$ VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında; y $p < 0,05$ VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında)

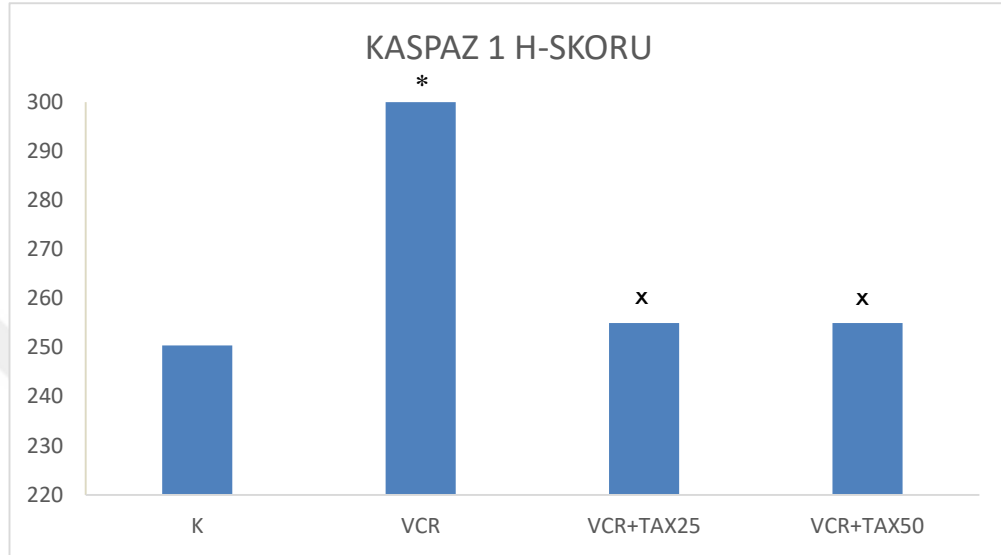
Tablo 4.1. CD68 H-skorlarının medyan değerleri

GRUPLAR	Ortalama $\pm$ SH	Medyan (%25-%75)	p	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
K	15,625 $\pm$ 5,70	10(5-25)	<0,001	K-VCR*, VCR-VCR+TAX50***, VCR+TAX25-VCR+TAX50*
VCR	132,50 $\pm$ 26,1	120(80-167,5)		
VCR+TAX25	13,75 $\pm$ 1,83	10 (10-20)		
VCR+TAX50	1,75 $\pm$ 0,16	2 (1,25-2)		

Yapılan istatistiksel değerlendirmede CD68 H skorlarına göre VCR grubunda artış görülmekte olup kontrol grubu ve VCR grubu arasında anlamlı fark ($p < 0,05$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında anlamlı fark ($p < 0,001$)

bulunmuştur. VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunmuştur.

Kaspaz-1 İmmünreaktivitesi



Şekil 4.10. Kaspaz-1 H-skorlaması düzeyleri. Veriler medyan (%25-75) olarak gösterilmektedir. (* $p<0,05$ kontrol grubu ve VCR grubu arasında; x $p<0,05$ VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında, VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında)

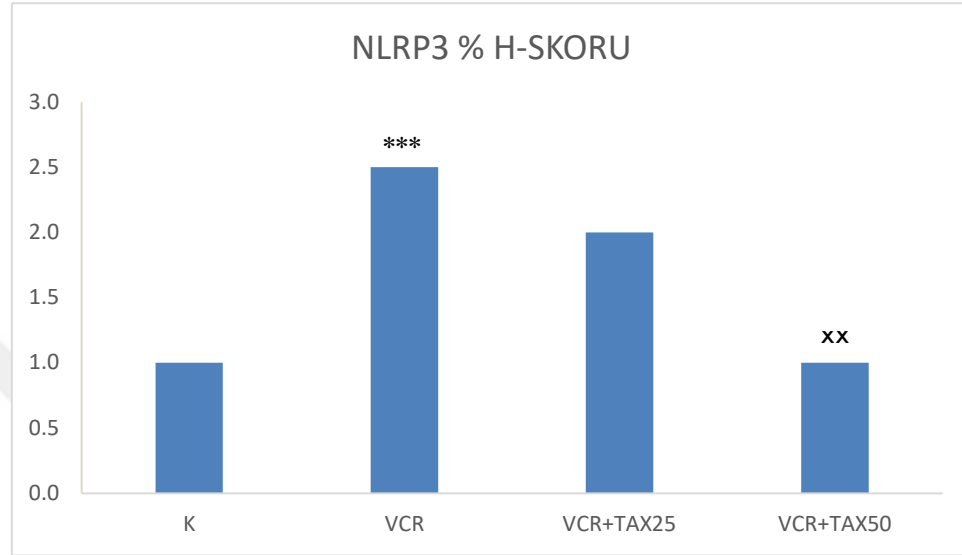
Tablo 4.2. Kaspaz-1 H-skorlarının medyan değerleri

GRUPLAR	Ortalama $\pm$ SH	Medyan (%25-%75)	p	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR $p<0,05$
K	254,03 $\pm$ 5,28	250,4 (240,3-267,5)	0.007	K-VCR *, VCR-VCR+TAX25*, VCR-VCR+TAX50*,
VCR	296,25 $\pm$ 3,75	300 (300-300)		
VCR+TAX25	258,125 $\pm$ 8,66	255 (240-277,5)		
VCR+TAX50	257,5 $\pm$ 7,26	255 (240-267,5)		

Yapılan istatistiksel değerlendirmede Kaspaz-1 skorlarının VCR grubunda arttığı gözlenmiş olup kontrol grubu ve VCR grubu arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX25 grubu arasında anlamlı fark ($p<0,05$)

bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunmuştur.

NLRP3 % İmmünreaktivitesi



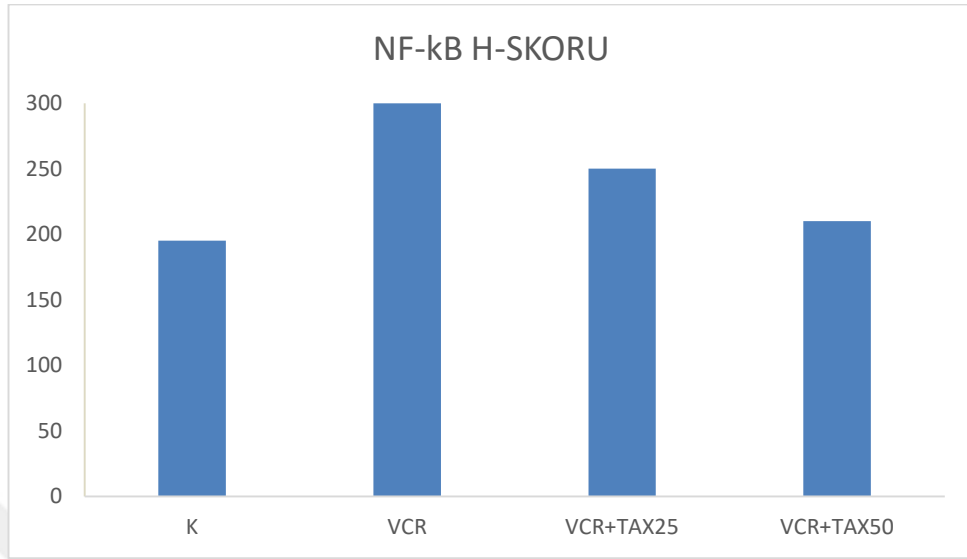
Şekil 4.11. NLRP3 % H-skorlaması düzeyleri. Veriler medyan (%25-75) olarak gösterilmektedir. (***) $p<0,001$ kontrol grubu ve VCR grubu arasında; xx $p=0,005$ VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında)

Tablo 4.3. NLRP3 % H-skorlarının medyan değerleri

GRUPLAR	Ortalama $\pm$ SH	Medyan (%25-%75)	p	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
K	0,94 $\pm$ 0,1	1 (1-1)	p<0,001	K-VCR ***, VCR-VCR+TAX50 **
VCR	2,5 $\pm$ 0,2	2,5 (2-3)		
VCR+TAX25	1,88 $\pm$ 0,1	2 (2-2)		
VCR+TAX50	1,25 $\pm$ 0,2	1 (1-1,75)		

Yapılan istatistiksel değerlendirmede NLRP3 % skorları için VCR grubunda artış eğilimi görülmüş olup kontrol grubu ve VCR grubu arasında anlamlı fark ($p<0,001$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında anlamlı fark ($p=0,005$) bulunmuştur.

NF-kB İmmünreaktivitesi

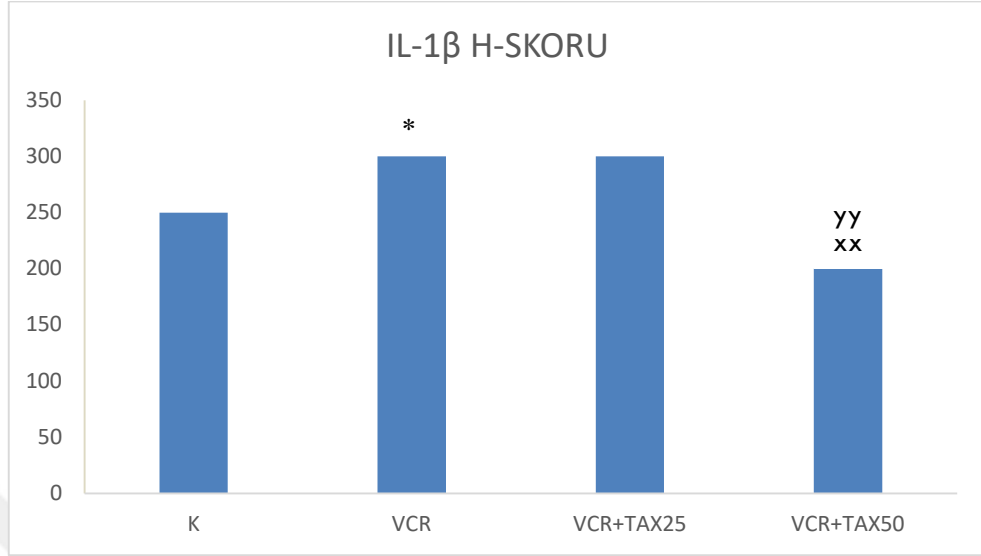


Şekil 4.12. NF-kB H-skoruması düzeyleri. Veriler medyan (%25-75) olarak gösterilmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede VCR grubunda artış eğilimi VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubunda VCR grubuna göre azalma eğilimi görülmüş olsa da herhangi bir anlamlı fark bulunamamıştır.

Tablo 4.4. NF-kB H-skorumalarının medyan değerleri

GRUPLAR	Ortalama±SH	Medyan (%25-%75)	p	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
K	217,5±26,44	195(150-300)	p=0,345	-
VCR	262,5±24,55	300(187,5-300)		
VCR+TAX25	231,2±26,62	250(150-300)		
VCR+TAX50	215±18,32	210(185-267,5)		

IL-1 β İmmünreaktivitesi



Şekil 4.13. IL-1 β H-skorlaması düzeyleri. Veriler medyan (%25-75) olarak gösterilmektedir.

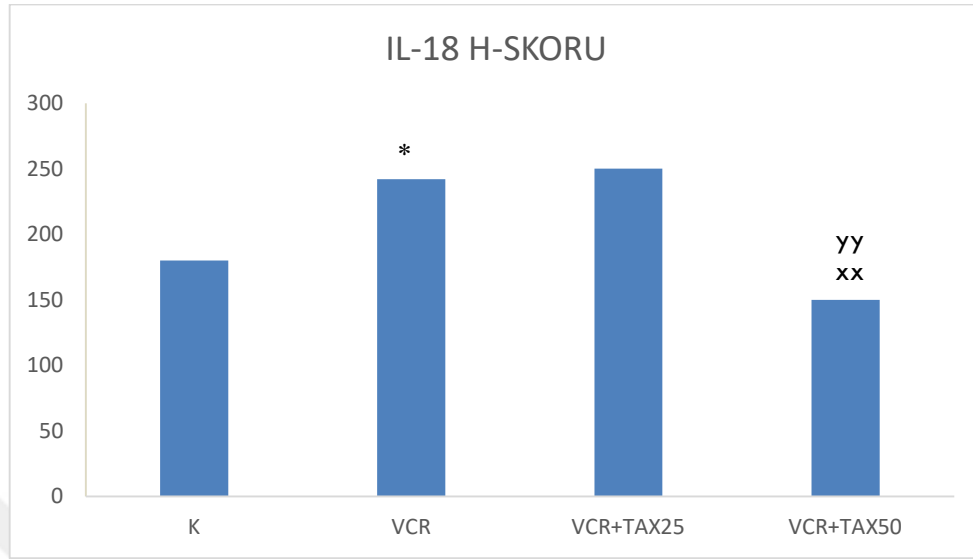
(* $p < 0,05$ kontrol grubu ve VCR grubu arasında; xx $p < 0,01$ VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında; yy $p < 0,01$ VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında)

Tablo 4.5. IL-1 β H-skorlarının medyan değerleri

GRUPLAR	Ortalama $\pm$ SH	Medyan (%25-%75)	p	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
K	237,5 $\pm$ 16,66	250 (185-280)	$p < 0,001$	K-VCR *, VCR-VCR+TAX50 **, VCR+TAX25-VCR+TAX50 **
VCR	295 $\pm$ 3,27	300 (285-300)		
VCR+TAX25	280 $\pm$ 13,09	300 (240-300)		
VCR+TAX50	195 $\pm$ 11,34	200 (165-215)		

Yapılan istatistiksel değerlendirmede IL-1 β H-skor düzeylerinde VCR grubunda artış eğilimi olup kontrol grubu ve VCR grubu arasında anlamlı fark ($p < 0,05$) bulunmuştur. VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında anlamlı fark ($p < 0,01$) bulunmuştur. Ayrıca VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında anlamlı fark ($p < 0,01$) bulunmuştur.

IL-18 İmmünreaktivitesi

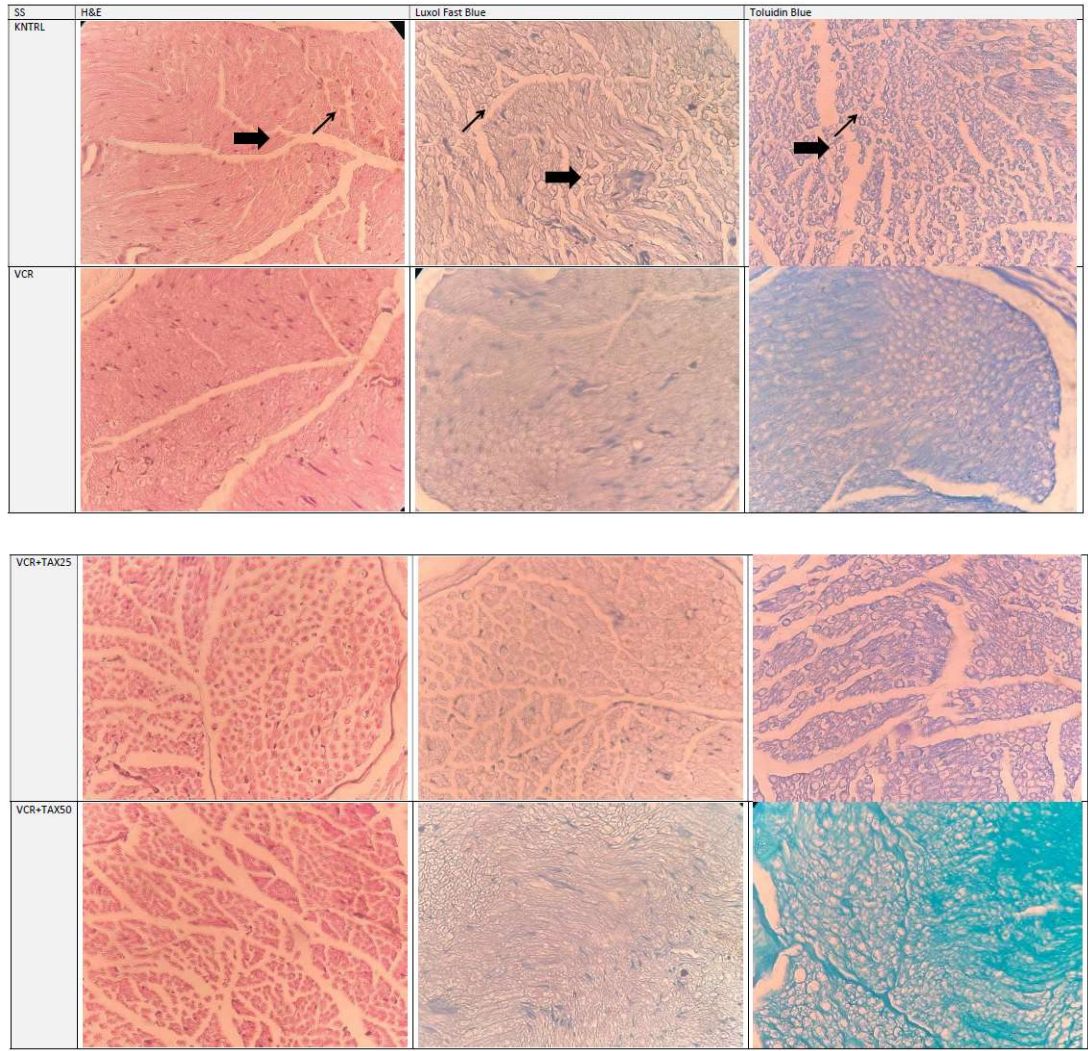


Şekil 4.14. IL-18 H-skorlaması düzeyleri. Veriler medyan (%25-75) olarak gösterilmektedir. (* $p<0,05$ kontrol grubu ve VCR grubu arasında; xx $p<0,01$ VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında; yy $p<0,01$ VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında)

Tablo 4.6. IL18 H-skorlarının medyan değerleri

GRUPLAR	Ortalama $\pm$ SH	Medyan (%25-%75)	p	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
K	171,4 $\pm$ 10,72	180,0 (136,6-197,5)	p<0,001	K-VCR *, VCR-VCR+TAX50 **, VCR+TAX25-VCR+TAX50**
VCR	244,2 $\pm$ 12,23	242,1 (210-272,5)		
VCR+TAX25	241,2 $\pm$ 13,15	250,0 (205-272,5)		
VCR+TAX50	157,5 $\pm$ 8,40	150,0 (150-175)		

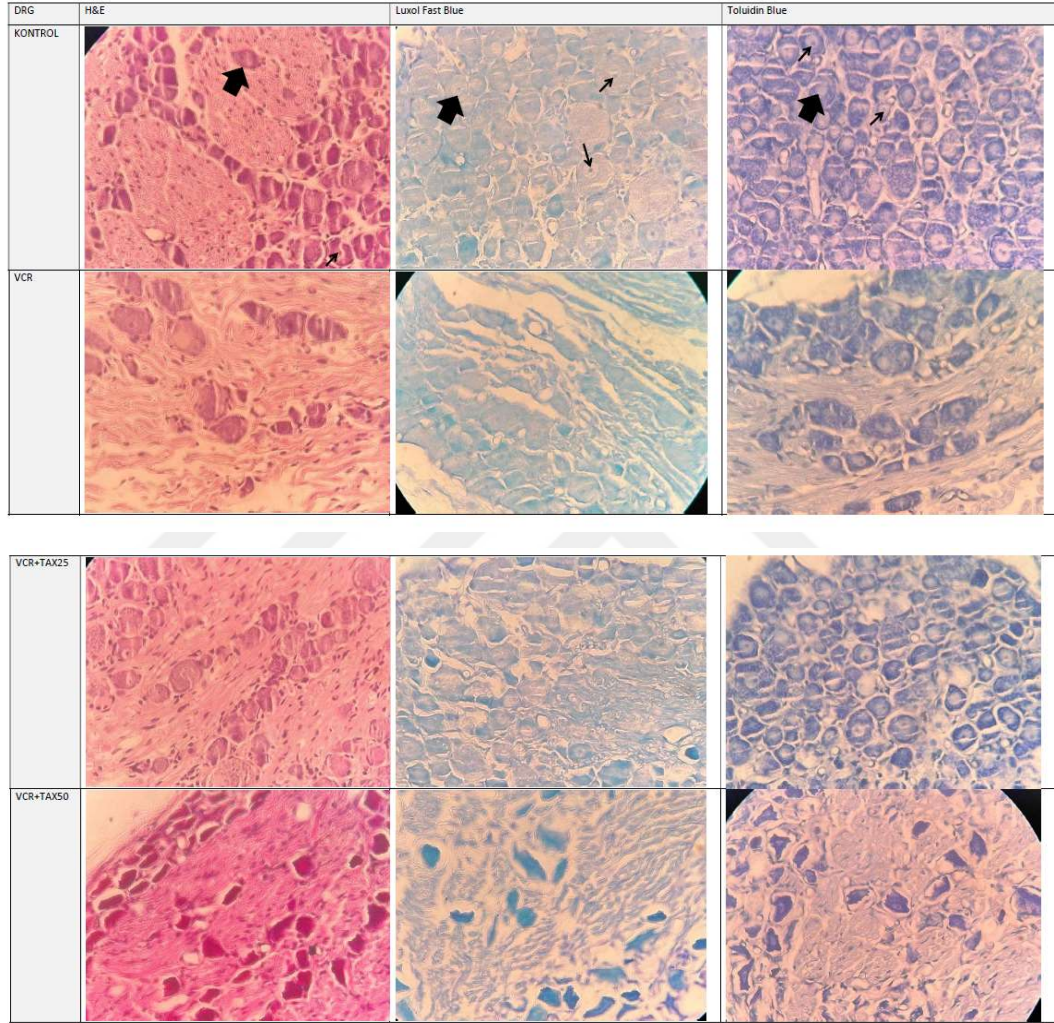
Yapılan istatistiksel değerlendirmede IL18 H-skorları için VCR grubunda artış görülmüş olup kontrol grubu ve VCR grubu arasında anlamlı fark ($p<0,05$) bulunmuştur. Ayrıca VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında anlamlı fark ($p<0,01$) bulunmuştur. Bunların dışında VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında anlamlı fark ($p<0,01$) bulunmuştur.



Şekil 4.15. Siyatik sinir dokularından elde edilen kesitler, myelin kılıf (siyah kalın ok) , akson (siyah ince ok) histopatolojik değişimlerin değerlendirilmesi amacıyla H&E (40x), Luxol fast blue (40x) ve Toluidin blue (40x) histokimyasal boyaları ile incelenmiştir. Kontrol grubu, vinkristin uygulanan grup (VCR) ve tedavi uygulanan gruplar (VCR+TAX25, VCR+TAX50) karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde histopatolojik olarak morfolojiye yansıyan anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir.

4.5.2. Dorsal Kök Gangliyonlarının Değerlendirilmesi

Her ne kadar siyatik sinir immünohistokimyasal değerlendirmelerinde anlamlı bulgular elde edilmiş olsa da dorsal kök gangliyonlarının değerlendirilmesi sonrasında elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı sonuç vermemiş olup, gruplar arasında herhangi bir farklı bulgu elde edilememiştir.

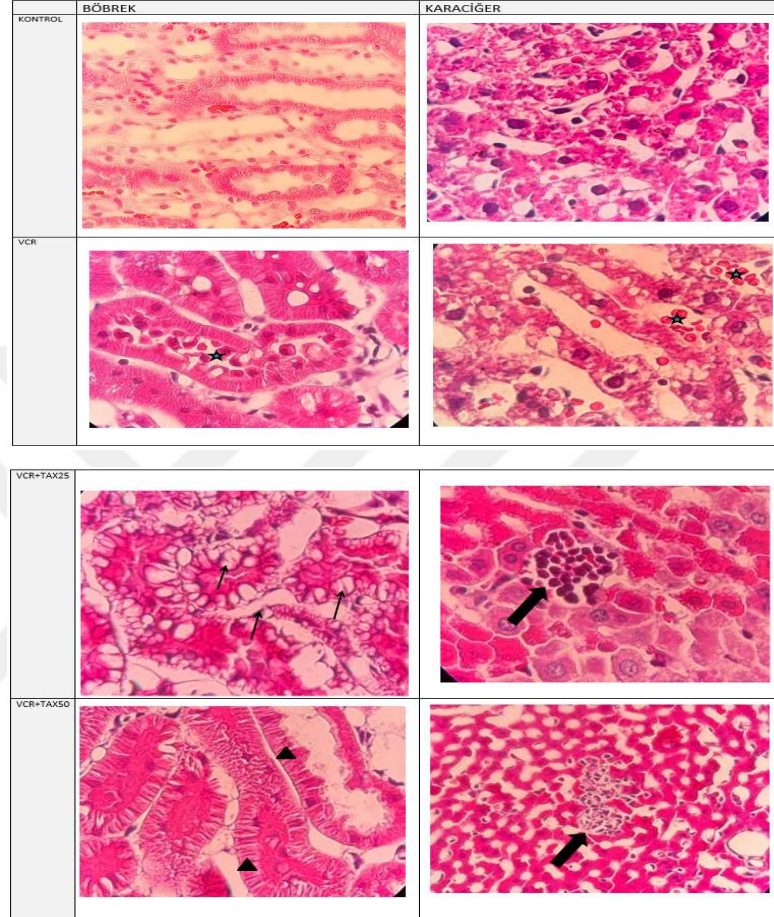


Şekil 4.16. DRG dokularına ait kesitler ganglion hücrelerinin nükleusu (siyah kalın ok), nükleolusu (siyah ince ok), sitoplazma özellikleri morfolojik ve histopatolojik değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla H&E (40x), Luxol fast blue (40x) ve Toluidin blue (40x) histokimyasal boyaları ile boyanarak incelenmiştir. Kontrol grubu, vinkristin uygulanan grup (VCR) ve tedavi grupları (VCR+TAX25, VCR+TAX50) arasında karşılaştırmalı analiz yapılmıştır.

Yapılan değerlendirmelerde histopatolojik olarak morfolojiye yansıyan anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir.

4.5.3. Karaciğer Böbrek Toksisitesinin Değerlendirilmesi

Karaciğer ve böbrek dokularının histopatolojik değerlendirilmesi sonrasında elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı sonuç vermemiş olup, gruplar arasında herhangi bir farklı bulgu elde edilememiştir.



Şekil 4.17. Böbrek dokusunda elde edilen kesitlerde, proksimal tübül hücrelerinde vakuolizasyon (ince ok), sitoplazmada granüler dejenerasyon (üçgen), epitel dökülmesi, tübül lümeninde hücre artıkları (yıldız) histopatolojik değişimleri ve karaciğer dokusunda elde edilen kesitler, sinüzoidal genişleme (yıldız), konjesyon, eritrositler, hepatositler arasında apoptotik cisimcikler, portal alanda hepatositler arasında inflamatuvar hücre infiltrasyonu (kalın ok) gibi histopatolojik değişimlerin değerlendirilmesi amacıyla H&E (100x), boyası ile incelenmiştir.

Kontrol, vinkristin uygulanan grup (VCR) ve tedavi uygulanan grupları (VCR+TAX25, VCR+TAX50) karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde histopatolojik olarak morfolojiye yansıyan anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Deneyisel çalışmamızda VCR'nin nörotoksik etkisiyle oluşturduğumuz VİPN modelinde taxifolinin nöronlar üzerinde olası koruyucu etkilerini; davranış testleri, histopatolojik değişimler, immunohistokimyasal boyamalar ile NLRP3 aracılı etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Öncesinde literatürde yapılan bir çalışmada VCR'yle meydana gelen nöropatide NLRP3 aktivasyonu ile ilişkisi incelenmiş olup bunun yanında taxifoline ait nöroinflamasyonda NLRP3 aracılı etkileri inceleyen çalışmalar da mevcuttur, ancak taxifolinin VİPN üzerindeki NLRP3 aracılı etkilerini incelemek üzere yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır(24,36,37).

Sıçanlarda vücut ağırlığı değişimine bakıldığında deney süresince vücut ağırlıklarında artış açısından çeşitli farklılıklar gözlenmiştir. Kontrol grubu ve VCR+TAX50 grubundaki sıçanların tamamında kilo artışı görülmüş olup, VCR grubu ve VCR+TAX25 grubundaki sıçanların bazılarında artış, bazılarında ise bazale göre azalma olduğu gözlenmiştir. Yüzde değişim açısından bakıldığında kontrol grubuyla VCR grubu arasında bulunan anlamlı fark VCR'nin literatürde bildirilen vücut ağırlığı değişimi üzerindeki etkisi ile uyumlu görünmektedir (41). Yapılan çalışmalar VCR'nin vücut ağırlığı artışını ve beslenmeyi azalttığı ortaya koymuştur. VCR etkisiyle gastrik motor fonksiyonda bozukluk nedeniyle ortaya çıkan gastrik hipomotilite, ince ve kalın barsak duvarlarında görülen yapısal bozulmalarla birlikte inflamasyon, myenterik nöronal ağda değişiklikler vücut ağırlığının azalmasına sebep olan faktörler arasında gösterilmektedir. Kilo kaybı birçok kemoterapötik ajan kullanımında bilinen ortak bir advers etki olsa da tüm ajanlarda görülmemekte ve kayba sebep olan faktörler değişkenlik gösterebilmektedir(41,42). Çalışmamızda beslenme açısından herhangi bir sınırlama getirilmemiş olup grupların beslenme düzeyi takip edilmemiştir. Beslenme açısından miktarla kısıtlanmış takip, vücut ağırlığı değişimlerine ait veriler açısından daha net bilgiler sağlayabilir.

VCR+TAX50 grubuna ait vücut ağırlığı artışı, VCR'nin sebep olduğu intestinal inflamasyon üzerinde taxifolinin antiinflamatuvar etki göstermesiyle ilişkili olabilir. Literatürde kolit modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında taxifolinin NF-kB sinyal yolağı üzerindeki inhibitör etkisinin araştırıldığı çalışmada inflamasyonun azalması,

NF-kB yolağının NLRP3 inflamazomu oluşumundaki katkısı sebebiyle taxifolinin yüksek dozunda vücut ağırlığı artışı açısından elde ettiğimiz bulguların kontrol grubuyla benzer olmasını açıklıyor olabilir(43). Ayrıca yapılan bir başka çalışmada taxifolinin inflamatuvar sitokinlerin mRNA düzeylerindeki yaptığı değişiklik ve intestinal floradaki faydalı bakterilerde yaptığı değişiklik intestinal mukozal bariyerdeki etkilerine aracılık ediyor olabilir(44). Çalışmamızda vücut ağırlığı değişimi açısından elde ettiğimiz bulgularla birlikte kemoterapinin sebep olduğu kilo kaybında, taxifolinin etkin dozlarına ilişkin ek çalışmalar yapılması gerekebileceği ve bu dozlarla akılcı ilaç kullanımına da daha uygun bir yaklaşım olabileceği düşünülmüştür.

Mekanik allodini testlerinde grupların tamamının bazal ölçümleri arasında fark bulunmamış olması grupların bazal homojenliğine ait bilgi sunarken kontrol grubunun 0, 7, 14 ve 21. günler arasında anlamlı fark bulunmamış olması ölçümlerin karşılaştırılabilmesi için uygun durumu ortaya çıkarmıştır. Kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda VCR uygulaması sonrası bazale göre 7. günde pençe çekme latens sürelerinin azalmasıyla anlamlı farklılıklar saptanmış olup bu bulgular bize literatürdeki diğer çalışmalarda olduğu gibi VCR ile mekanik allodininin oluştuğunu düşündürmüştür(45,46). 21. günde VCR+TAX25 grubuna göre VCR grubuyla anlamlı bir farklılığa sahip olmaması kronik VCR uygulamasında taxifolinin düşük dozunun, doz açısından yetersiz olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür(47). VCR+TAX50 grubunun kontrol grubuyla anlamlı farklılık göstermemesi nöroprotektif etki açısından bu dozun koruyucu olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda önemli olan noktalardan biri ise kullandığımız düşük dozdaki taxifolinin mekanik allodini üzerine yeterli etki göstermemesidir. Siyatik sinir hasarı modeli ile yapılan bir çalışmada 20 mg/kg dozunda taxifolin NLRP3, GSDMD, ASC ve Kaspaz-1 ve inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve IL-18) ekspresyonunu inhibe etmiş olsa da VIPN hayvan modelinin farklı bir mekanizma ile olması ve ayrıca tek bir travmatik uygulama yapılan diğer modelin aksine VCR bazlı modelde VCR'nin modelin oluşma aşamasında ve ilerleyen dönemlerinde bir toksisite oluşturması 25 mg/kg taksifolin uygulamasında nöropati önleyici etkinin ortaya çıkmamasına neden olmuş olabilir(36,47).

Termal hiperaljezi testlerinde ise grupların tamamının bazal ölçümleri arasında fark bulunmamış olması grupların bazal homojenliğine ait bilgi sunarken kontrol grubunun 0, 7, 14 ve 21. günler arasındaki anlamlı fark bulunmamış olması ölçümlerin karşılaştırılabilmesi için uygun durumu ortaya çıkarmıştır. 7, 14 ve 21. günde VCR grubuna göre kontrol grubu, VCR+TAX25 ve VCR+TAX50 grupları arasında anlamlı farklılıklar mevcuttur. 7. günde VCR grubunda görülen latens süresindeki azalma termal hiperaljezinin oluştuğunu düşündürmektedir(38). VCR+TAX25 ve VCR+TAX50 gruplarında 7. günde görülmeyen fakat TAX25+VCR grubunun 21. gününde görülen anlamlı farklılık, kullandığımız düşük doz taxifolinin modelin oluşması sonrası ilerleyen dönemlerinde koruyucu olamayabileceğini düşündürürken kullandığımız yüksek doz taxifolinin etkili bir koruyucu rolü olduğu düşünülmüştür(47). Bunun dışında TAX50+VCR grubunun 0, 7, 14 ve 21. günlerdeki ölçümlerinin arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Buradaki bulunmayan fark bir yanıyla kullandığımız yüksek doz taxifolinin termal hiperaljezide daha etkin bir önleyici rolü olabileceğini düşündürmüştür. Öte yandan da cihazın kullanımına ilişkin subjektifliğin ve cihaza ait teknik sebeplerin etkili olabileceği de düşünülmüştür. Literatüre bakıldığında termal hiperaljeziye ait ısı uyaranları ise C lifleri ve Aδ lifleri aracılığıyla iletilir. Isı uyaranlarına nöronal tepkinin verilmesini sağlayan anahtar iletici ise TRPV1'dir(48). Elde ettiğimiz sonuçlar açısından taxifolinin bu lifler ve iletici yollar üzerindeki etkilerinin de çalışılması bize daha detaylı bilgiler sağlayabilir.

Soğuk allodini testlerinde grupların tamamının bazal ölçümleri arasında fark bulunmamış olması grupların bazal homojenliğine ait bilgi sunarken kontrol grubunun 0, 7, 14 ve 21. günler arasındaki anlamlı fark bulunmamış olması ölçümlerin karşılaştırılabilmesi için uygun durumu ortaya çıkarmıştır. 7. günde VCR grubunda görülen pençe çekme latens süresindeki azalma soğuk allodiniyi destekleyen bir bulgu olarak düşünülmüştür(38). VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 grubunda 7. günde görülmeyen fakat VCR+TAX25 grubunun 14 ve 21. gününde görülen anlamlı farklılık, kullandığımız düşük doz taxifolinin modelin oluşma aşamasında koruyucu etki gösterse de modelin oluşması sonrası ilerleyen dönemlerinde koruyucu olamayabileceğini düşündürürken kullandığımız yüksek doz taxifolinin modelin oluşma aşaması ve ilerleyen dönemlerinde etkili bir koruyucu rolü olabileceği düşünülmüştür(47). Bunun dışında TAX50+VCR grubunun 0, 7, 14 ve 21. günlerdeki

ölçümlerinin arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Buradaki bulunmayan fark bir yanıyla kullandığımız yüksek doz taxifolinin termal hiperaljezide olduğu gibi soğuk allodinide de daha etkin bir önleyici rolü olabileceğini düşündürmüştür. Öte yandan da aseton uygulaması esnasında kafes telleri arasından asetonun ulaşımı arasındaki muhtemel değişkenliğin de bu farkı ortaya koymuş olabileceği düşünülmüştür.

Davranış deneyleri için kullandığımız mekanik allodini, termal hiperaljezi ve soğuk allodini testleri kemirgenlerde “ağrı benzeri” davranışları değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan ve iyi bilinen hayvan davranış değerlendirme testleridir. Bu davranışlar, hastalarda gözlenen KİPN'nin klinik semptomlarına çok benzese de laboratuvarlar arasında ve hatta aynı laboratuvarlar içinde hayvan davranış sonuçlarının karşılaştırılabilirliğini etkileyen faktörler olabilir(49). Çalışmamızda farklılığı ortaya çıkarabilecek beslenme, gürültü, ışık, ısı gibi faktörler tüm gruplar için benzer düzeyde tutulmaya çalışılmıştır. Ancak çalışmamızda biası önlemek adına bu davranış deneylerinin gruplardan habersiz bir araştırmacı tarafından ölçülmesi elde ettiğimiz sonuçları daha sağlıklı kılabilir. Ayrıca KİPN modelleri kanser olmayan sağlıklı hayvanlarda yapılmasıyla kanserin klinik etkilerinin de davranış deneylerine ait değerlendirmeleri de farklılaştırabilme ihtimali mevcuttur.

Çalışmamızda VİPN’de meydana gelen periferik nöral dejenerasyon ve bununla birlikte motor fonksiyonda meydana gelen değişimleri incelemek için kullanılan testlerden biri rotarod testidir. Rotarod testi düşme latensi yüzde değişimi açısından VCR grubunda kontrol grubuna göre görülen anlamlı farklılık VCR’e ait etkilerin literatürde olduğu gibi periferik sinir motor fonksiyonlarında bozulmaya etki ettiğini düşündürmüştür(50).

Klinik çalışmalarda VİPN sıklıkla görülen semptomlar olan alt ve üst ekstremitelerdeki distal kas gücünde azalma, kaba ve ince motor becerilerde bozukluk (özellikle ellerde) veya koordinasyon bozukluğu, ALL’si olan çocuk hastaların motor beceri gerektiren işlerini yapmakta zorlanmasına sebep olmakta ve hayat kalitelerinde ciddi düşüşler ortaya çıkarmaktadır(51). Bu bağlamda koruyucu etki gösterebilecek ajanların kullanımı hastalar açısından önem arz etmektedir. Çalışmamızda VCR grubu ile VCR+TAX25 grubu arasında anlamlı farklılık görülse de, VCR+TAX25 yüzde değişim açısından 0. güne göre 21. günde azalarak negatif düzeyde kalmış olup bu

dozun yeterli olmayabileceğini düşündürmüştür. VCR ve VCR+TAX50 arasındaki görülen anlamlı farklılık ise bu dozun motor fonksiyon üzerinde koruyucu etkisi olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızdaki lokomotor aktivite ölçümlerinde stereotipik hareketler, ambulatuvar hareketler, vertikal hareketler, horizontal hareketlerin kontrol grubu, VCR grubu, VCR+TAX25 grubu ve VCR+TAX50 gruplarının 0 ve 21. gün ölçümlerinin kendi içlerinde ve gruplar arasında karşılaştırılmasında anlamlı fark bulunamamıştır. 0. güne ait karşılaştırmada fark olmaması grupların değerlendirilmesi açısından homojeniteyi sağlamıştır. VIPN oluşturularak yapılan diğer çalışmalarda da lokomotor aktivite değişikliği gözlenmemesiyle çalışmamız benzerlik göstermektedir(52,53). VCR'ye ait yan etkiler arasında anksiyete olmasa da depresyon sayılmakta olup ancak bu etkinin nasıl, ne zaman ve ne sıklıkta olabileceği ile ilgili net bilgi bulunmamaktadır(9). Locomotor aktiviteye yansıyacak nörotoksisite ilişkili yan etkilerin doz ve tedavi süresi ile ilişkili olması nedeniyle, lokomotor aktivite açısından fark olmayabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan çalışmamızda kontrol grubuna göre VCR grubunda azalmış olan toplam mesafe ölçümünün karşılaştırılmasıyla elde edilen anlamlı farklılık, gruplarda oluşan ağırlı nöropatiyle hareket isteğini azaltmasıyla ilişkili olabilir. VCR+TAX25 ve VCR+TAX50 gruplarında toplam mesafedeki azalmaların rotarod testi düşme latensinde azalma gösteren sebeplerle ilişkili olabileceği, bu sebeplerin de toplam yürüme mesafesini azaltabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda ayak izi analizi açısından grupların 0. güne ait ölçümleri ve 21. güne ait ölçümleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Her ne kadar adım uzunlukları açısından VCR grubunda 0. güne göre 21. günde azalma eğilimi görülse de bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Ayak analizi açısından anlamlı farklılıkların elde edilmemesinde hayvanların platform kenarına ve geriye yönelen hareketleri, bekleme durumlarının boyayı tek bir yerde bırakıp değerlendirme zorluklarına ve eksikliklere sebep olması, ayaklarını tam basmamalarının etkili olmuş olabileceği düşünülmüştür. Analiz açısından yaşanan bu kısıtlılıkların video bazlı kızıl ötesi ışınların ayak temasını değerlendirdiği yazılım aracılı ayak izi analizi metodunun kullanılmasıyla farklı parametreler açısından da incelenmesinin daha doğru veriler sağlayabileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu yöntemler sadece ayak izi analizi değil yürüme paternlerine ilişkin de bilgiler sağlayabilmesiyle daha avantajlıdır(54,55).

Motor iletim hızı değerlendirilmesi için yapılan EMG’de kontrol grubuna göre VCR grubunda iletim hızında azalmanın olduğu, VCR+TAX25 ve VCR+TAX50 gruplarında ise kontrol grubuna yakın düzeylerde iletim hızına sahip olduğu görülmüştür. Kontrole göre VCR grubunda görülen iletim hızındaki düşüş olması literatürdeki çalışmalarla benzer bulunmuştur (56,57).

Periferik sinir disfonksiyonunda etkilenen sinirlere bağlı olarak, iskelet kasında atrofi veya duyu bozuklukları (ağrı algısı, ısı algısı değişiklikleri) meydana gelebilir. Sinir iletim testleri, insanlarda hem nöron gövdesinin hem de miyelin kılıfın fonksiyonel durumunu ölçerek hem sinir sistemi hem de iskelet kası hastalıklarını teşhis etmek için yaygın olarak kullanılır. Sinir iletim testleri miyelin kılıfı ve aksonal değişikliklere duyarlı olduğu için, periferik sinir sisteminin işlevini ölçmek için mükemmel bir ölçüttür(58). Periferik nöropatide meydana gelen motor-duysal bozukluklar hastaların hayat kalitesinde ciddi düşüslere sebep olmaktadır ve kanser hastalarının %30-60’ını etkileyebilmesinin yanında tedavinin kesilmesine neden olarak önemli bir sorun haline gelmektedir. KİPN’de meydana gelen nörotoksisite sadece motor ya da sadece duysal değil mix olarak da meydana gelebilmektedir. Motor nöronların iletiminde meydana gelen rejenarasyon ve iyileşme süreçleri duysal nöronlarda da meydana gelebileceği için çoklu yönlerden fayda elde edilmesi klinik açıdan önemlidir. Vinka alkaloidleriyle tedavide erken evrede duysal nöropati görülse de VCR için ayrıca motor nöropatiye neden olabildiği ve bu durumun alt ekstremitelerde simetrik distal güçsüzlük ile kendini gösterip bilateral ayak düşmesine ilerleyebileceği belirtilmiştir(59). Ayrıca kanser hastası olup VCR’le tedavi edilen 52 çocuk/adölesanın kontrol grubuna göre yürüyüş paternlerinin incelendiği bir çalışmada VİPN’li hastaların adım hızı ve uzunluğunun anlamlı derecede azaldığı görülmüştür(60). Tüm bu sebeplerle nöropatinin önlenmesi hastalar açısından önemli ve gereklidir. Mekanik allodini, termal hiperaljezi, soğuk allodini değerlendirmelerinde elde ettiğimiz bulgularla birlikte taxifolin gruplarının motor iletim hızındaki iyileşmeler umut vaat edici olup taxifolinin klinik açıdan motor ve duysal bozukluklara karşı kapsayıcı faydaları olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda siyatik sinirlerin immünreaktivitesi immünohistokimyasal boyamalarla değerlendirilmiş olup anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. İlk olarak CD68 düzeylerinin VCR grubundaki görülen artışı, inflamasyonda rol alan makrofajların

infiltrasyonu açısından beklenen bulguların başında gelmektedir. Makrofajlara özgü bir protein olan CD68, esas olarak mikroglia'nın lizozomal zarında eksprese edilir(61). Makrofajlar gibi nöronal olmayan hücrelerin periferik nöropatide önemli rolü olduğu artık kabul edilmektedir ve birçok çalışma, periferik sinirlerde makrofaj infiltrasyonunun artması ile deney hayvanlarında ağrı benzeri davranışların ortaya çıkması arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Özellikle KİPN'de aktive olan makrofajlar IL-1 β , TNF- α , IL-6, CCL2 ve CXC ailesi üyeleri gibi proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler salgıladıkları gösterilmiştir(52). Ayrıca VİPN gelişiminde, makrofajlarda yer alan inflamatuvar yolların proinflamatuvar sitokin salınımıyla birlikte inflamazom aktivasyonuna da sebep olduğu gösterilmiştir(24). Çalışmamızda VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan fark davranış deneyleriyle benzer olup bu dozun antiinflamatuvar açıdan etkin doz olabileceğini düşündürmüştür. Diğer gruplara bakıldığında ise VCR+TAX25 grubu ve VCR grubu arasında fark bulunamasa da kontrol grubuyla benzer düzeylerde elde edilen sonuç doz üzerinde ek çalışmaların yapılabilmesini ve ileri istatistiksel yöntemlerin kullanılabileceğini düşündürmüştür. Burada elde ettiğimiz sonuçlar inflamasyonun başlangıcında rol alan makrofajların tetiklediği yolların aktivitesinin önlenmesinin sonraki sinyal yollarında da önleyici etkisi olabilmesi açısından ayrıca önemlidir.

Çalışmamızda Kaspaz-1 değerlendirmeleri açısından kontrol grubu ve VCR grubu arasında görülen istatistiksel anlamlı farklılık beklenen bulgulardan biri olarak karşımıza çıkmıştır. Kaspaz-1 NLRP3 inflamazom kompleksi oluşumu sonrası çok önemli bir rol üstlenmekte olup çekirdekte sentezlenen pro-IL-18 ve pro-IL-1'in aktif formları olan IL-18 ve IL-1'e dönüşümü açısından gereklidir(26). Kaspaz-1 düzeylerine baktığımızda hem VCR grubu ile VCR+TAX25 grubu ile hem de VCR grubu ve VCR+TAX50 grubu arasında görülen anlamlı farklılık ve bu düzeylerin kontrol grubuna yakın olması her iki dozda da etkinlik gösterebileceğini düşündürmüştür. Özellikle VCR+TAX25 grubuna ait dozun etkinliğine ilişkin bakıldığında ise pro-kaspaz-1'in aktif formu olan Kaspaz-1'e dönüşümünde sadece NLRP3 rol almayıp NLRP1, NLRP6 gibi inflamazom kompleksleri de rol oynamaktadır(62). Bu sebeplerle VCR+TAX25 dozu için NLRP1 ve NLRP6 üzerindeki etkinliğinin araştırılması için ileri çalışmalar yapılabilmesi ve bu

çalışmalarla VCR+TAX25 ve VCR+TAX50 grupları arasında farklılık olup olmayacağı konusunda daha net bilgiler elde edilebileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda NLRP3 yüzde düzeyleri açısından elde edilen sonuçlarda VCR grubundaki artış ve kontrol grubu ile arasındaki istatistiksel önemli farklılık araştırmayı hedeflediğimiz yolak açısından önemlidir. NLRP3 hazırlama sinyaliyle çekirdeğe ulaşan sinyaller sonrası genetik upregülasyona uğrar ve kompleks oluşumu için sitozole salındığında nöroinflamasyon için esas elemanlardan biridir. NLRP3'ün prokaspaz-1'i kaspaz-1'e dönüşmesi için tetiklemesi sonrasında inflamatuvar sitokinlerin salınması apoptotik ve piroptotik yolları açığa çıkarır (63). Paklitakselle indüklenen periferik nöropatiyi araştıran bir çalışmada NLRP3'ün mRNA ve protein düzeyi artışı gözlenmiş olup Kaspaz-1 ve IL-1 β 'de de artışlar gözlenmiştir. Tedavi amaçlı verilen ROS inhibitörleri hem NLRP3 hem de kaspaz-1 ve IL-1 β ekspresyon düzeylerinde azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca ROS inhibitörleri uygulaması sonrası mekanik allodinide iyileşme göstermiştir(64). Bunun dışında VIPN araştıran bir başka çalışmada da NLRP3 aktivasyonu ve IL-1 β düzeylerinde artışlar gözlenmiş olup, NLRP3 inhibitörü olan MCC950 kullanımında ve NLRP3 knockout farelerde mekanik allodini ve yürüyüş paternlerinde bozulma gelişmediği kaydedilmiştir(24). Bu sebeplerle NLRP3 ve aracı olduğu etkiler KIPN için önem arz etmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatürde NLRP3 ve taxifolin ilişkisini inceleyen çalışmalarla uyumlu görünmektedir(6,36,65). Diğer bulgulara olduğu gibi kontrol grubuna göre VCR grubunda artış ve anlamlı fark mevcuttur. VCR+TAX25 grubunun NLRP3 düzeyleri VCR grubuna yakın düzeylerde olup aralarında anlamlı fark olmaması dozun yeterli olmadığını düşündürmüştür. Davranış deneyleri olan mekanik allodini, termal hiperaljezi ve soğuk allodinide elde ettiğimiz nörosensöriyel bulgularımızla uyumlu olarak VCR grubu ile VCR+TAX50 grupları arasında anlamlı fark olup yüksek doz taxifolinin koruyucu etkisini düşündürmüştür.

Çalışmamızda NF-kB için yapılan immünohistokimyasal değerlendirmenin sonuçlarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark görülememiştir. Kemoterapötik ajanlar NF-kB aktivasyonuna sebep olarak proinflamatuvar sitokinlerin artışıyla nöroinflamasyona sebep olmaktadır. Bu etki kemoterapötik ajan grubuna göre farklı yollar üzerinden olmakla birlikte özellikle TNF- α 'nın aktivasyonu NF-kB için önemlidir. Vinka alkaloidlerindeki bu yolda makrofaj artışı ve TNF- α artışı, reaktif

oksijen radikallerinin artışı inflamasyon açısından önemli etkenlerdendir(66). Çalışmalarla NF-kB'nin periferik nöropatide önemli sinyal yollarından olduğu gösterilmekle birlikte NF-kB'ye ait sinyal aksının inflamatuvar gen ekspresyonunda rol aldığı belirtilmiştir. Araştırdığımız NLRP3 aracılı etkilerin ortaya çıkması açısından aktivasyon sonrası NF-kB'nin nükleer translokasyonu, hem NLRP3 gen ekspresyon artışı hem de IL-1 β ve IL-18 gen artışı yönünden gereken bir basamaktır (26,67). Taxifolinin yapılan birçok çalışmada farklı hastalık modellerinde NF-kB sinyal yolağı üzerinden antiinflamatuvar etkisi olabileceği gösterilmiş olup bu etkiler arasında nöroprotektif etki de mevcuttur(68–70). Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızdaki NLRP3 aracılı antiinflamatuvar etkiler için, nöropatinin daha erken basamaklarında NF-kB aktivasyonuna sebep olan faktörlerin taxifolinle ilişkisinin detaylıca incelenmesi faydalı olabileceği düşünülmüştür. Ancak her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiş olsa da gruplardaki NF-kB düzeylerinin seyrine bakıldığında VCR grubuna ait NF-Kb immünreaktivitesinde kontrol grubuna göre artış görülmüşken VCR+TAX25 grubunda VCR grubuna göre azalmayla birlikte VCR+TAX50 grubunda kontrol grubuna benzer düzeylerde sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar sonrası ileri istatistiksel yöntemlerle ve NF-kB'nin mRNA ekspresyon düzeyinde incelenmesi çalışma adına daha net bilgiler sağlayabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda IL-1 β immünreaktivitesi açısından değerlendirildiğinde VCR grubunda artmış olan düzeyler kontrol grubu ile anlamlı farklılık göstermektedir. VCR'e dair artan IL-1 β düzeyleri literatürde yapılan çalışma verileriyle desteklenmektedir(71,72). IL-1 β ekspresyon düzeylerinde artış birçok akut ve kronik nörolojik hastalıktaki hasarla ilişkilendirilmiştir(73). IL-1 β akut ve kronik inflamasyonda rol alan, doğuştan ve adaptif immün yanıt arasında köprü görevi gören, enfeksiyonlara karşı konak savunmasında rol alan, karsinogenezde rol oynayan bir molekül olarak yer tutmasıyla birlikte santral sinir sistemi hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve gastrointestinal hastalıklarda rol oynamaktadır. Ayrıca anakinra, rilonacept, canakinumab gibi kendisine karşı geliştirilmiş tedavi ajanları mevcuttur(73,74). Çalışmamızda artan-azalan IL-1 β düzeyleri kaskad öncesi yer alan IL-1 β 'nin genetik upregülasyonunda yer NF-kB artış-azalışı, daha sonrasında Kaspaz-1 ve NLRP3 düzeylerindeki artış-azalışlarda IL-1 β 'nın aktif formuna dönüşmeden önceki basamaklarda üretimini artıracak-azaltacak etkilerle olabileceği

düşünülmüştür. Özellikle NLRP3 aracılı etkileri araştırdığımız bu çalışmamızda NLRP3 düzeylerinin VCR grubunda artışının Kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1 β 'nın aktif formuna dönüşümünde önemli rol oynadığı düşünülmüştür. Bu sebeplerle kontrol grubu ve VCR grubu arasında NF-kB, NLRP3, Kaspaz-1 ve IL-1 β düzeyleri arasında korelasyon görülmüş olması muhtemeldir. VCR+TAX25 grubunda da kontrol grubuna göre bir artış gözlenmiş olup VCR grubuna benzer düzeylerde immünreaktivite görülmüştür. Bu düzeyler VCR+TAX25 grubundaki taxifolin dozunun etkili olmadığını düşündürmüştür. Elde ettiğimiz bu bulgu davranış deneyleri olan mekanik allodini, termal hiperaljezi, soğuk allodinideki klinik prezentasyonun göstergesi olabilir. VCR+TAX50 grubunda ise IL-1 β düzeylerinde düşme mevcut olup hem VCR grubu hem de VCR+TAX25 grubuna göre anlamlı farklılığa sahiptir. Elde edilen bu farklılıklar VCR+TAX50 grubunun diğer verilerle benzerlik gösteren bir şekilde etkili doz olabileceğini düşündürmüştür. Taxifoline ilişkin yapılan çalışmalarda yapılmış çalışmalarda da taxifolinin IL-1 β düzeylerini azalttığı ve bu azalmanın doz artışına bağımlı daha da fazla olduğu yapılan çalışmalarla göstermiştir(68,75,76). Tüm bu sebeplerle VCR+TAX50 grubundaki taxifolin dozunun etkili doz olabileceği düşünülmüştür. Bir kısıtlılık olarak daha 50mg/kg'dan daha yüksek dozların da denenmesi çalışma adına elde etmek istediğimiz etkiler açısından daha aydınlatıcı olabilir.

Çalışmamızda IL-18 immünreaktivitesi açısından değerlendirildiğinde VCR grubunda artmış olan düzeyler kontrol grubu ile anlamlı farklılık göstermektedir. Bu durum daha önce yapılan kemoterapiyle indüklenmiş ve siyatik sinir hasarıyla oluşturulmuş periferik nöropatiye ilişkin çalışmalarla benzerlik göstermiştir(77,78). IL-18, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivitesini destekleyen 11 üyeden oluşan bir grup olan IL-1 sitokin ailesine ait olup hem doğuştan gelen bağışıklık hem de edinilmiş bağışıklık tepkilerini uyaran güçlü bir proinflamatuvar sitokindir. IL-18'in oynadığı en önemli rol NK hücreleri aktivasyonu için olsa da makrofajların aktivasyonu için de gerekli ve önemli bir sitokindir. IL-18 özellikle otoinflamatuvar hastalıkları patofizyolojisinde rol almakta olup nörovasküler patolojilerde de rol aldığı gösterilmiştir(79). IL-18'in bir dizi kaskad sonrası nöronal hasar ve hücre ölümünde de rol oynamaktadır. Ayrıca IL-18'in artmış düzeyleri santral sinir sistemine ait enfeksiyon, beyin hasarı ve nörodejenerasyon süreçlerinde arttığı gözlenmiştir(80–

82). Bu sebeplerle tıpkı IL-1 β gibi IL-18 de nöroinflamasyonda önemli bir yer tutuyor olup nöropatinin önlenmesi ve tedavi edilmesi açısından hedef alınabilecek bir sitokindir.

Çalışmamızda artan-azalan IL-18 düzeyleri kaskad öncesi yer alan IL-18'in genetik upregülasyonuna yol açan NF-kB artış-azalışı, daha sonrasında Kaspaz-1 ve NLRP3 düzeylerindeki artış-azalışların, IL-18'in aktif formuna dönüşmeden önceki basamaklarda üretimini artıracak-azaltacak etkilerle olabileceği düşünülmüştür. Özellikle NLRP3 aracılı etkileri araştırdığımız bu çalışmamızda NLRP3 düzeylerinin VCR grubunda artışının Kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-18'in aktif formuna dönüşümünde önemli rol oynadığı düşünülmüştür. Bu sebeplerle kontrol grubu ve VCR grubu arasında NF-kB, NLRP3, Kaspaz-1 ve IL-18 düzeyleri arasında korelasyon görülmüş olması muhtemeldir. VCR+TAX25 grubunda da kontrol göre bir artış gözlenmiş ve anlamlı farklılık olup VCR grubuna benzer düzeylerde immünreaktivite görülmüştür ve VCR grubu ile aralarında anlamlı bir farklılık yoktur. Bu düzeyler VCR+TAX25 grubundaki taxifolin dozunun etkili olmadığını düşündürmüştür. Elde ettiğimiz bu bulgu IL-1 β için muhtemel olan ve IL-18 için de benzer şekilde düşünülen davranış deneylerinden mekanik allodini, termal hiperaljezi, soğuk allodini testlerindeki klinik prezentasyonun göstergesi olabilir. VCR+TAX50 grubunda ise IL-18 düzeylerinde azalma mevcut olup hem VCR grubu hem de VCR+TAX25 grubuna göre anlamlı farklılığa sahiptir. Elde edilen bu farklılıklar VCR+TAX50 grubunun diğer verilerle benzerlik gösteren bir şekilde etkili doz olabileceğini düşündürmüştür. Siyatik sinir hasarıyla oluşturulmuş periferik nöropati modeliyle yapılan bir çalışmada, taxifolin tedavisiyle in vivo IL-18 düzeylerinin azaldığı gözlenmiş olup verilen dozun 20 mg/kg olmasıyla birlikte çalışmamızda bu düzeylerde herhangi bir azalma elde edilmemiş olmaması model farklılığından ve sıçan cinsi farklılığından (Sprague–Dawley) kaynaklanmış olabilir. Ayrıca bu çalışmanın içinde yürütülen in vitro değerlendirmelerde de taxifolinin hücre kültüründe IL-18 düzeylerini artan dozla birlikte daha fazla azalttığı gözlenmiştir (36). Tüm bu bilgilerin ışığında taxifolin IL-1 β ve IL-18 üzerinde dual etki gösterebilme potansiyeli de ek araştırmalara ihtiyaç duymaktadır.

Çalışmamızda DRG dokusu immünohistokimyasal değerlendirmeleri açısından anlamlı sonuçlar elde edilmemişken, bu sonuçların doku izolasyonu

sırasında yapılmış olabilecek istenmeyen travmalara bağılı gelişmiş olabileceğı düşünölmüştür. Zira anatomik ve histolojik olarak DRG siyatik sinire göre daha hassas ve ulaşılması zor bir dokudur.

Çalışmamızda DRG ve siyatik sinirlerin ışık mikroskopisi altında histopatolojik boyamalarına yansıyan anlamlı morfolojik değışimler elde edilememiştir. Daha önce yapılmış bir derlemede VCR ile oluşan nörotoksik etkinin önce mitokondriyal düzeyde başlayıp ardından sinir iletimi ve sinaptik etkileşim gibi fonksiyonel bozulmalarla seyrettiğı, akson dejenerasyonu ve myelin kaybı gibi morfolojik değışikliklerin en son aşamada göröldüğü bildirilmiştir(83). Ayrıca ışık mikroskopisi yerine elektron mikroskopisinin kullanılmasının histopatolojik açıdan değerdendirmelerimize daha fazla katkı sunabileceğı düşünölmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde biyolojik ajanlarla birlikte kanser tedavisinin her geçen gün tedavi seçenekleri artsa da konvansiyonel kemoterapi modaliteleri tedavinin ilk basamaklarında hala önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle pediatrik gruptaki kanserlerin tedavisi sonrası gelişen advers etkiler bu hastaların yaşam kalitesini bozmakta ve fonksiyonelliğini kısıtlamaktadır. Kemoterapi sonrası gelişen periferik nöropati tedavinin kesilmesine de sebep olabilecek bir advers etki olmasıyla önemli bir sorun olup daha etkili daha güvenli bir şekilde önlenmesi veya tedavi edilmesi amacıyla araştırılması, hastalar için gereklidir.

Taxifolinin antioksidan, antiinflamatuvar ve nöroprotektif aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğunu gösteren birçok çalışma olması bu flavonid açısından umut vadedicidir. Taxifoline ait antiinflamatuvar, antioksidan özelliklerin varlığıyla birlikte VCR kullanımını sonrası oluşan VİPN'de inflamasyonun ve NLRP3 inflamazomunun rol alması bu konuda etkili bir seçenek olma ihtimalini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; VCR ile oluşturulmuş VİPN modelinde kullandığımız yüksek doz taxifolinin mekanik allodini, termal hiperaljezi ve soğuk allodini oluşumunu önlemiştir. Taxifolinin motor fonksiyon için yapılan testlerde de iletim hızında koruyucu etkisinin olabileceği düşündürse de motor koordinasyon ve performans testlerinde görülen sonuçlarla birlikte nörosensöriyal etkilerinin daha belirgin olduğu görülmüştür. Çalışmamızda siyatik sinirlerin immünohistokimyasal boyamalarında elde ettiğimiz CD68, NF-kB, NLRP3, Kaspaz-1, IL-1 β , IL-18 immünreaktivite düzeyleri VCR grubunda artmışken taxifolinin bu düzeylerin artmasını önlediği ve antiinflamatuvar etkisini gösterdiği düşünülmüştür. Çalışmamızda anlamlı sonuçlar elde edilmekle birlikte bazı kısıtlılıklar bulunmaktadır. Kullandığımız yöntemler açısından Western-blot, ELISA gibi analiz yöntemleri, ileri istatistiksel değerlendirmeler, spesifik NLRP3 inhibitörü MCC950 kullanılması, ara dozların çalışılması ve sağlıklı hayvanlar yerine onkolojik modellerin kullanılması sonuçlar açısından daha faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Elde ettiğimiz sonuçlarla taxifolinin yüksek dozlarında VCR sonrası oluşan VİPN'de özellikle nörosensöriyel etkiler açısından ön planda olmak üzere koruyucu

rolü olabileceği düşünölmüştür. Çalışmamız kısıtlılıkların karşısında VIPN, NLRP3 inflamazomu ve taxifolin ilişkisini araştıran ilk çalışma olmasıyla literatür açısından faydalıdır. Bu çalışma kanser hastaları açısından önemli sorun haline gelen periferik nöropatide taxifolinin rolü adına yapılacak ileri çalışmalar için yol gösterici olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Pagliaro L, Chen SJ, Herranz D, Mecucci C, Harrison CJ, Mullighan CG, et al. Acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2024 Dec 1;10(1).
2. Lavoie Smith EM, Li L, Chiang C, Thomas K, Hutchinson RJ, Wells EM, et al. Patterns and severity of vincristine-induced peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2015 Mar 1;20(1):37–46.
3. Moore A, Pinkerton R. Vincristine: Can its therapeutic index be enhanced? Vol. 53, *Pediatric Blood and Cancer*. 2009. p. 1180–7.
4. Starobova H, McCalmont H, Shatunova S, Tay N, Smith CM, Robertson A, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome using MCC950 reduces vincristine-induced adverse effects in an acute lymphoblastic leukemia patient-derived xenograft model. *Hemasphere*. 2025 Mar 1;9(3).
5. Sarg NH, Hersi FH, Zaher DM, Hamouda AO, Ibrahim SI, El-Seedi HR, et al. Unveiling the therapeutic potential of Taxifolin in Cancer: From molecular mechanisms to immune modulation and synergistic combinations. Vol. 133, *Phytomedicine*. Elsevier GmbH; 2024.
6. Ding T, Wang S, Zhang X, Zai W, Fan J, Chen W, et al. Kidney protection effects of dihydroquercetin on diabetic nephropathy through suppressing ROS and NLRP3 inflammasome. *Phytomedicine*. 2018 Mar 1;41:45–53.
7. Zhao Y, Ding Q, He Q, Zu T, Rong Z, Wu Y, et al. Reno protective potential of taxifolin liposomes modified by chitosan in diabetic mice. *Int J Biol Macromol*. 2025 May 1;306.
8. Banyal A, Tiwari S, Sharma A, Chanana I, Patel SKS, Kulshrestha S, et al. Vinca alkaloids as a potential cancer therapeutics: recent update and future challenges. Vol. 13, 3 *Biotech*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023.
9. Gidding CEM, Kellie SJ, Kamps WA, De Graaf SSN. PII: S1040-8428(98)00023-7. Vol. 29, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1999.

10. Wheeler JJ, Palmer L, Ossanlou M, Maclachlan I, Graham RW, Zhang YP, et al. Stabilized plasmid-lipid particles: Construction and characterization. Vol. 42, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999.
11. Huang L, Peng Y, Tao X, Ding X, Li R, Jiang Y, et al. Microtubule Organization Is Essential for Maintaining Cellular Morphology and Function. Vol. 2022, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Hindawi Limited; 2022.
12. Škubník J, Pavlíčková VS, Ruml T, Rimpelová S. Vincristine in combination therapy of cancer: Emerging trends in clinics. Vol. 10, *Biology.* MDPI; 2021.
13. Triarico S, Romano A, Attinà G, Capozza MA, Maurizi P, Mastrangelo S, et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy (Vipn) in pediatric tumors: Mechanisms, risk factors, strategies of prevention and treatment. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI; 2021.
14. Coufal N, Farnaes L. The Vinca Alkaloids. In: *Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures.* 2011.
15. Awosika OA, Below Jameshia, Das MJ. Vincristine. 2023 [cited 2025 Apr 12]. Vincristine. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537122/>
16. Wu CY, Li GT, Chu CC, Guo HL, Fang WR, Li T, et al. Proactive therapeutic drug monitoring of vincristine in pediatric and adult cancer patients: current supporting evidence and future efforts. Vol. 97, *Archives of Toxicology.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023. p. 377–92.
17. Said R, Tsimberidou AM. Pharmacokinetic evaluation of vincristine for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014 Mar;10(3):483–94.
18. Ahmed HS, Thrishulamurthy CJ. Vincristine-induced ptosis in pediatric patients: a systematic review and practice recommendations. Vol. 184, *European Journal of Pediatrics.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2025.
19. Tay SY, Foster J, Heczey A, Sitton M. Pediatric Oncology Patients With Vincristine-Induced Recurrent Laryngeal Nerve Palsy: Two Case Reports and a Brief Review of Literature. Vol. 100, *Ear, Nose and Throat Journal.* SAGE Publications Ltd; 2021. p. NP459–63.

20. Pozzi E, Fumagalli G, Chiorazzi A, Canta A, Cavaletti G. Genetic factors influencing the development of vincristine-induced neurotoxicity. Vol. 17, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 215–26.
21. Li G zhou, Hu Y hui, Li D yi, Zhang Y, Guo H li, Li Y man, et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy: A mini-review. Vol. 81, *NeuroToxicology*. Elsevier B.V.; 2020. p. 161–71.
22. Siau C, Xiao W, Bennett GJ. Paclitaxel-and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: Loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells.
23. Djaldetti R, Hart J, Alexandrova S, Cohen S, Beilin BZ, Djaldetti M, et al. Vincristine-induced alterations in Schwann cells of mouse peripheral nerve. *Am J Hematol*. 1996;52(4):254–7.
24. Starobova H, Monteleone M, Adolphe C, Batoon L, Sandrock CJ, Tay B, et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy is driven by canonical NLRP3 activation and IL-1 β release. *Journal of Experimental Medicine*. 2021 May 3;218(5).
25. Martinon F, Burns K, Rg Tschopp J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-1 β -that they possess several distinct protein/protein inter-action domains which are used to assemble large multi-component complexes. Apaf-1, for example, contains an N-terminal CARD followed by a NBS/self-oligomer-ization domain and a C-terminal WD-40 repeat (Jaro. Vol. 10, *Molecular Cell*. 2002.
26. Basu P, Maier C, Averitt DL, Basu A. NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasomes and peripheral neuropathic pain - Emphasis on microRNAs (miRNAs) as important regulators. Vol. 955, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V.; 2023.
27. Liang T, Zhang Y, Wu S, Chen Q, Wang L. The Role of NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease and Potential Therapeutic Targets. Vol. 13, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2022.

28. Li W, Liang J, Li S, Wang L, Xu S, Jiang S, et al. Research progress of targeting NLRP3 inflammasome in peripheral nerve injury and pain. Vol. 110, *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V.; 2022.
29. Canta A, Pozzi E, Carozzi VA. Mitochondrial dysfunction in chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). Vol. 3, *Toxics*. MDPI AG; 2015. p. 198–223.
30. Pellegrini C, Fornai M, Antonioli L, Blandizzi C, Calderone V. Phytochemicals as novel therapeutic strategies for nlrp3 inflammasome-related neurological, metabolic, and inflammatory diseases. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
31. Liu Y, Shi X, Tian Y, Zhai S, Liu Y, Xiong Z, et al. An insight into novel therapeutic potentials of taxifolin. Vol. 14, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
32. Sunil C, Xu B. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). Vol. 166, *Phytochemistry*. Elsevier Ltd; 2019.
33. Das A, Baidya R, Chakraborty T, Samanta AK, Roy S. Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. Vol. 142, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2021.
34. Ince S, Ozer M, Kadioglu BG, Kuzucu M, Ozkaraca M, Gezer A, et al. The effect of taxifolin on oxidative ovarian damage and reproductive dysfunctions induced by antipsychotic drugs in female rats. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2021 Jun 1;47(6):2140–8.
35. Weidmann AE. Dihydroquercetin: More than just an impurity? Vol. 684, *European Journal of Pharmacology*. 2012. p. 19–26.
36. Hu Z, Xuan L, Wu T, Jiang N, Liu X, Chang J, et al. Taxifolin attenuates neuroinflammation and microglial pyroptosis via the PI3K/Akt signaling pathway after spinal cord injury. *Int Immunopharmacol*. 2023 Jan 1;114.
37. Ye Y, Wang X, Cai Q, Zhuang J, Tan X, He W, et al. Protective effect of taxifolin on H₂O₂-induced H9C2 cell pyroptosis. *Journal of Central South University (Medical Sciences)*. 2017 Dec 1;42(12):1367–74.

38. Yang CC, Wang MH, Soung HS, Tseng HC, Lin FH, Chang KC, et al. Through Its Powerful Antioxidative Properties, L-Theanine Ameliorates Vincristine-Induced Neuropathy in Rats. *Antioxidants*. 2023 Apr 1;12(4).
39. Abd Elaleem WS, Ghaiad HR, Abd Elmawla MA, Shaheen AA. Attenuation of p38 MAPK/NF- κ B/TRPV1/CGRP is involved in the antinociceptive effect of hesperidin methyl chalcone and taxifolin in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *BioFactors*. 2024 Jan 1;
40. Wen Z, Luo D, Wang S, Rong R, Evers BM, Jia L, et al. Deep Learning–Based H-Score Quantification of Immunohistochemistry-Stained Images. *Modern Pathology*. 2024 Feb 1;37(2).
41. López-Tofiño Y, de Sosa F, Vera G, López-Gómez L, Herradón E, López-Miranda V, et al. Effects of vincristine and monosodium glutamate on gastrointestinal motility and visceral sensitivity. *Neurogastroenterology and Motility*. 2024 Jan 1;36(1).
42. López-Gómez L, Díaz-Ruano S, Girón R, López-Pérez AE, Vera G, Herradón Pliego E, et al. Preclinical evaluation of the effects on the gastrointestinal tract of the antineoplastic drug vincristine repeatedly administered to rats. *Neurogastroenterology and Motility*. 2018 Nov 1;30(11).
43. Li W, Zhang L, Xu Q, Yang W, Zhao J, Ren Y, et al. Taxifolin Alleviates DSS-Induced Ulcerative Colitis by Acting on Gut Microbiome to Produce Butyric Acid. *Nutrients*. 2022 Mar 1;14(5).
44. Liu G, Fang Y, Zhang Y, Zhu M. Dihydroquercetin improves the proliferation of porcine intestinal epithelial cells via the Wnt/ β -catenin pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024 Nov 19;734.
45. Jiang K, Shi J, Shi J. Morin Alleviates Vincristine-Induced Neuropathic Pain via Nerve protective Effect and Inhibition of NF- κ B Pathway in Rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2019 Aug 1;39(6):799–808.
46. Xie H, Chen Y, Wu W, Feng X, Du K. *Gastrodia elata* Blume Polysaccharides Attenuate Vincristine-Evoked Neuropathic Pain through the Inhibition of Neuroinflammation. *Mediators Inflamm*. 2021;2021.
47. Smith EML, Kuisell C, Cho Y, Kanzawa-Lee GA, Gilchrist LS, Park SB, et al. Characteristics and patterns of pediatric chemotherapy-induced peripheral

- neuropathy: A systematic review. Vol. 28, *Cancer Treatment and Research Communications*. Elsevier Ltd; 2021.
48. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms [Internet]. Vol. 13. 2014. Available from: www.thelancet.com/neurology
 49. Chen X, Gan Y, Au NPB, Ma CHE. Current understanding of the molecular mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Vol. 17, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media SA; 2024.
 50. Golchin L, Shabani M, Harandi S, Razavinasab M. Pistachio supplementation attenuates motor and cognition impairments induced by cisplatin or vincristine in rats. *Adv Biomed Res*. 2015;4(1):92.
 51. Sabarre CL, Rassekh SR, Zwicker JG. Vincristine and fine motor function of children with acute lymphoblastic leukemia. *Canadian Journal of Occupational Therapy*. 2014 Oct 24;81(4):256–64.
 52. Moschetti G, Amodeo G, Paladini MS, Molteni R, Balboni G, Panerai A, et al. Prokineticin 2 promotes and sustains neuroinflammation in vincristine treated mice: Focus on pain and emotional like behavior. *Brain Behav Immun*. 2019 Nov 1;82:422–31.
 53. da Motta KP, Martins CC, da Rocha VME, Soares MP, Mesko MF, Luchese C, et al. Insights into Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy in Aged Rats: Wallerian Degeneration, Oxidative Damage, and Alterations in ATPase Enzymes. *ACS Chem Neurosci*. 2024 Nov 6;15(21):3954–69.
 54. Török DG, Fekécs Z, Pajer K, Pintér S, Nógrádi A. The use of a detailed video-based locomotor pattern analysis system to assess the functional reinnervation of denervated hind limb muscles. *J Neurosci Methods*. 2022 Jan 1;365.
 55. Bervar M. Video analysis of standing-an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve [Internet]. Vol. 102, *Journal of Neuroscience Methods*. 2000. Available from: www.elsevier.com/locate/jneumeth
 56. Shayesteh S, Khalilzadeh M, Takzaree N, Dehpour AR. Dapsone improves the vincristine-induced neuropathic nociception by modulating neuroinflammation

- and oxidative stress. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022 Dec 1;30(2):303–10.
57. Greeshma N, Prasanth KG, Balaji B. Tetrahydrocurcumin exerts protective effect on vincristine induced neuropathy: Behavioral, biochemical, neurophysiological and histological evidence. *Chem Biol Interact*. 2015 Jun 26;238:118–28.
 58. Walsh ME, Sloane LB, Fischer KE, Austad SN, Richardson A, Van Remmen H. Use of Nerve Conduction Velocity to Assess Peripheral Nerve Health in Aging Mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2015 Nov 1;70(11):1312–9.
 59. Zhang S. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and rehabilitation: A review. Vol. 48, *Seminars in Oncology*. W.B. Saunders; 2021. p. 193–207.
 60. Gilchrist L, Tanner L. Gait Patterns in Children with Cancer and Vincristine Neuropathy. *Pediatric Physical Therapy*. 2016;28(1):16–22.
 61. Yang Y, Zhao X, Zhu Z, Zhang L. Vascular dementia: A microglia's perspective. Vol. 81, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2022.
 62. Khanna S, Kumar S, Sharma P, Daksh R, Nandakumar K, Shenoy RR. Flavonoids regulating NLRP3 inflammasome: a promising approach in alleviating diabetic peripheral neuropathy. Vol. 33, *Inflammopharmacology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2025. p. 2231–62.
 63. Cui M, Liang J, Xu D, Zhao L, Zhang X, Zhang L, et al. NLRP3 inflammasome is involved in nerve recovery after sciatic nerve injury. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jul 1;84.
 64. Jia M, Wu C, Gao F, Xiang H, Sun N, Peng P, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in peripheral nerve contributes to paclitaxel-induced neuropathic pain. *Mol Pain*. 2017 Jul 1;13.
 65. Kabel AM, Salama SA, Borg HM, Ali DA, Abd Elmaaboud MA. Targeting p-AKT/mTOR/MAP kinase signaling, NLRP3 inflammasome and apoptosis by fluvastatin with or without taxifolin mitigates gonadal dysfunction induced by bisphenol-A in male rats. *Hum Exp Toxicol*. 2022 Apr 1;41.

66. Gupta P, Makkar TK, Goel L, Pahuja M. Role of inflammation and oxidative stress in chemotherapy-induced neurotoxicity. Vol. 70, *Immunologic Research*. Springer; 2022. p. 725–41.
67. Khan A, Shal B, Ullah Khan A, Ullah Shah K, Saniya Zahra S, ul Haq I, et al. Neuroprotective mechanism of Ajugarin-I against Vincristine-Induced neuropathic pain via regulation of Nrf2/NF- κ B and Bcl2 signalling. *Int Immunopharmacol*. 2023 May 1;118.
68. Hou J, Hu M, Zhang L, Gao Y, Ma L, Xu Q. Dietary Taxifolin Protects Against Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis via NF- κ B Signaling, Enhancing Intestinal Barrier and Modulating Gut Microbiota. *Front Immunol*. 2021 Feb 16;11.
69. Okkay U, Ferah Okkay I, Cicek B, Aydin IC, Ozkaraca M. Hepatoprotective and neuroprotective effect of taxifolin on hepatic encephalopathy in rats. *Metab Brain Dis*. 2022 Jun 1;37(5):1541–56.
70. Kim A, Nam YJ, Lee CS. Taxifolin reduces the cholesterol oxidation product-induced neuronal apoptosis by suppressing the Akt and NF- κ B activation-mediated cell death. *Brain Res Bull*. 2017 Sep 1;134:63–71.
71. Doglio A, Shaw A, Sonthonnax S, Limouse M, Schaffar L. Stimulation of Human Interleukin 1 Production and Specific mRNA Expression by Microtubule-Disrupting Drugs. Vol. 131, *CELLULAR IMMUNOLOGY*. 1990.
72. Khodaei M, Mehri S, Pour SR, Mahdavi S, Yarmohammadi F, Hayes AW, et al. The protective effect of chemical and natural compounds against vincristine-induced peripheral neuropathy (VIPN). Vol. 395, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 907–19.
73. Fogal B, Hewett SJ. Interleukin-1 β : A bridge between inflammation and excitotoxicity? Vol. 106, *Journal of Neurochemistry*. 2008. p. 1–23.
74. Galozzi P, Bindoli S, Doria A, Sfriso P. The revisited role of interleukin-1 alpha and beta in autoimmune and inflammatory disorders and in comorbidities. Vol. 20, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2021.

75. Zhang X, Lian X, Li H, Zhao W, Li X, Zhou F, et al. Taxifolin attenuates inflammation via suppressing MAPK signal pathway in vitro and in silico analysis. *Chin Herb Med*. 2022 Oct 1;14(4):554–62.
76. Bayramoglu Z, Mokhtare B, Mendil AS, Coban TA, Mammadov R, Bulut S, et al. Effect of taxifolin on methotrexate-induced oxidative and inflammatory oral mucositis in rats: biochemical and histopathological evaluation. *Journal of Applied Oral Science*. 2022;30.
77. Vasudeva K, Vodovotz Y, Azhar N, Barclay D, Janjic JM, Pollock JA. In vivo and systems biology studies implicate IL-18 as a central mediator in chronic pain. *J Neuroimmunol*. 2015 Jun 15;283:43–9.
78. Lin T, Hu L, Hu F, Li K, Wang CY, Zong LJ, et al. NET-Triggered NLRP3 Activation and IL18 Release Drive Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *Cancer Immunol Res*. 2022;10(12):1542–58.
79. Ihim SA, Abubakar SD, Zian Z, Sasaki T, Saffarioun M, Maleknia S, et al. Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
80. Heneka MT, McManus RM, Latz E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. Vol. 19, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2018. p. 610–21.
81. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. Vol. 14, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 463–77.
82. Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, van Loo G. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Mol Med*. 2019 Jun;11(6).
83. Starobova H, Vetter I. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Vol. 10, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2017.

