

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK (TIP)
DOKTORA PROGRAMI

**REZERPİN İLE İNDÜKLENEN PARKİNSONİZM
MODELİNE BAĞLI PERİFERİK SİNİR HASARINDA DÜŞÜK
YOĞUNLUKLULU ULTRASESİN TERAPÖTİK ETKİNLİĞİ**

MEHMET MELİH PINARBAŞI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Özlem BOZKURT GİRİT

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-21009 proje numarası ile desteklenmiştir. Mehmet Melih PINARBAŞI doktora tezini YÖK 100/2000 Nörofizyoloji Doktora Programı bursiyeri olarak tamamlamıştır.

AYDIN-2024

TEŞEKKÜR

Yükseköğrenimim ve doktora tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, akademik hayatımda çok büyük katkısı olan; ilgi, yardım ve hoşgörüsü ile her konuda desteğini hissettiğim, danışmanım ADÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Özlem Bozkurt Girit'e, Yükseköğrenimim sürecinde ilgi ve desteklerini esirmeyen ADÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Dinçer Bilgin ve ADÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Mehmet Bilgen, Dr. Öğr. Üyesi Mahmut Alp Kılıç'a çok teşekkür ederim. Tez izleme komitemde yer alarak değerli görüşlerini paylaşan ADÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Abdullah Yalçın'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez savunma jürimde yer almaları ve değerli katkıları için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Murat Pehlivan ve Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serçin Özlem Çalışkan'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince, sağladıkları katkı ve yardımları için ADÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

TPF-21009 proje kodu ile çalışmama destek olan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

YÖK100/2000 Nörofizyoloji Doktora Programındaki desteğinden dolayı Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, çalışmalarımnda göstermiş oldukları emek, sabır ve özverileriyle beni motive eden sevgili annem Şöhret Pınarbaşı, sevgili babam Fahri Pınarbaşı ve sevgili kardeşim Melis Pınarbaşı'ya çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında hayatımı birleştirdiğim kıymetli eşim Kezban Yavuz Pınarbaşı'ya bu süreçteki destek ve sabrı için teşekkür ederim.

Son olarak; manevi şahsından güç aldığım, Cumhuriyetimizin 100.Yılında, Cumhuriyetimizin kurucusu Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e en derin şükran ve minnet duygularımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Sinir Sistemi	6
2.1.2. Periferik Sinir Sistemi	7
2.1.3. Sinirde İletim ve Aksiyon Potansiyeli	11
2.2. Nöropati	14
2.3. Miyelin	16
2.4. Parkinson Hastalığı ve Parkinsonizm	19
2.4.1. Parkinson Hastalığı ve Parkinsonizm Hayvan Modelleri.....	19
2.5. Veziküler monoamin taşıyıcıları (VMAT).....	20
2.6. Rezerpin.....	20
2.7. Ultrases	22
2.7.1. Ultrases Dalgalarının Biyofiziksel Etkileri.....	24
2.7.2. Ultrasesin Etki Mekanizması.....	26
2.7.3. Ultrasesin Sinir Rejenerasyonu Üzerine Olan Etkisi	28
2.7.4. Düşük Yoğunluklu Darbeli Ultrases	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Gereç.....	31
3.1.1. Cihazlar.....	31
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Çalışma Grupları	32
3.2.2. Nosiseptif Hot Plate (Isı Plakası) Testi Uygulaması	36

3.2.3. Motor Fonksiyonla İlişkili Davranış Değerlendirme Testleri	37
3.2.4. Siyatik Fonksiyon İndeksi	39
3.2.5. Elektrofizyolojik Ölçümler.....	40
3.2.6. Deneklerden Doku Örneklerinin Alınması.....	43
3.3. Western Blot	44
3.3.1. Siyatik Sinir Dokusu Homojenizasyonu	44
3.3.2. Bradford Assay ile Protein Tayini	45
3.3.3. SDS-PAGE Jel Elektrophorezi.....	47
3.4. Histopatoloji	54
3.4.1. Fiksasyon Sonrası Doku Takibi ve Parafine Gömme.....	54
3.4.2. Siyatik Sinir Dokusu Luksol Fast Blue Boyama Protokolü	55
3.4.3. Siyatik Sinir Dokusu Masson Trikrom Histokimyasal Boyama Protokolü.....	56
3.4.4. Hematoksilen & Eozin Histokimyasal Boyama Protokolü	57
3.5. İstatistiksel Analiz	57
4. BULGULAR	58
4.1. Motor Fonksiyonunun Davranış Testleriyle Değerlendirilmesi.....	58
4.2. Nöroseptif Ağrı Algısının Değerlendirilmesi.....	61
4.3. Siyatik Fonksiyon İndeksinin (SFI) Değerlendirilmesi.....	63
4.4. Elektrofizyolojik Ölçümlerin Alınması ve Analizi	65
4.5. Proinflatuvar sitokin seviyelerindeki değişimler	72
4.5.1. Protein Ekspresyon Analiz Sonuçları	75
4.6. Histopatolojik İnceleme Sonuçları	81
5. TARTIŞMA	90
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR	106
EKLER.....	126
BİLİMSEL ETİK BEYANI	130
ÖZ GEÇMİŞ	131

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum Persülfat
Bax	: Bcl-2 ilişkili X-proteini
Bcl-2	: B Hücreli lenfoma-2
BKAP	: Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli
BOS	: Beyin-Omurilik Sıvısı
DA	: Dopamin
DL	: Distal latans
DNA	: Deoksiribonukleik asit
EMG	: Elektromiyografi
ENMG	: Elektronöromiyografi
H&E	: Hematoksilen&Eozin
IL-1β	: Interlökin 1-beta
IL-6	: Interlökin 6
IPH	: İdiyopatik Parkinson Hastalığı
IPN	: İdiyopatik Periferik Nöropati
K⁺	: Potasyum iyonu
L-DOPA	: Levodopa
LFB	: Luksol Fast Blue
LİPUS	: Düşük yoğunluklu darbeli ultrases
LLLT	: Düşük Seviyeli Işık Terapisi
MAO	: Monoamin oksidaz
MPTP	: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi

MTC	: Masson Trikrom
Na⁺	: Sodyum iyonu
PH	: Parkinson Hastalığı
PL	: Proksimal latans
PN	: Periferik Nöropati
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
SDS	: Sodyum dodesil fosfat
SFI	: Siyatik Fonksiyonel Index
SN	: Substantia nigra
TBS	: Tris Buffer Saline
TD	: Tardif Diskinezi
TNF-α	: Tümör Nekroz Alfa
US	: Ultrases
VMAT-1	: veziküler monoamin taşıyıcısı-1
VMAT-2	: veziküler monoamin taşıyıcısı-2

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nöron çizimi	6
Şekil 2. Periferik sinir lifi çizimi	8
Şekil 3. Sinir sistemini oluşturan ana üyeler	9
Şekil 4. Sinir lifi demeti ve üyeleri	11
Şekil 5. Aksiyon potansiyeli evreleri	13
Şekil 6. Periferik nöropatinin vücutta temsil ettiği bölgeler	15
Şekil 7. Schwann hücrelerinin sinir liflerini yalıtma görevi	17
Şekil 8. Miyelinli bir akson boyunca sıçrayıcı ileti	18
Şekil 9. Rauwolfia serpentina	21
Şekil 10. Rezerpin, metil ester 2a,11-dimetoksi-3-(3,4,5-trimetoksibenzoiloksi)-yohimban-1-karboksilik asit	22
Şekil 11. Ultrasesin farklı frekanslarda doku içerisinde izlediği yol	25
Şekil 12. Deney planının zamansal gösterimi ve deney özeti.....	33
Şekil 13. Katalepsi şeması	38
Şekil 14. Siyatik fonksiyon indeksi ölçümünde parmak aralıklarının belirlenmesinde kullanılan formül.....	40
Şekil 15. Ratlarda siyatik sinir lokasyonu	41
Şekil 16. Elektrofizyolojik uyarım noktalarının siyatik sinir üzerinde gösterimi.....	42
Şekil 17. Bir denekten alınan elektrofizyolojik BKAP kayıt örneği ve değerlendirme parametreleri.	43
Şekil 18. Protein standart grafiği	47
Şekil 19. Blotlama için transfer sandviçinin hazırlanması.....	51
Şekil 20. G-ratio hesaplama şeması	56
Şekil 21. Kontrol, rezerpin, rezerpin enjeksiyonuyla birlikte 0.5 W/cm ² ve 1.5 W/cm ² güç yoğunluğunda darbeli ultrases uygulanan gruplara ait deney başlangıcından itibaren haftada bir uygulanan silindir testi analiz bulgularını gösteren bar grafikler	59
Şekil 22. İlk dört haftalık model oluşumu sürecinde, kontrol ve rezerpin enjeksiyonu yapılan gruplara ait haftada bir uygulanan katalepsi testinde sıçanların hareketsiz kaldığı sürelerin değişimlerini gösteren bar grafikler	60

Şekil 23. Tedavi sürecinde, kontrol, rezerpin, 0.5 W/cm ² ve 1.5 W/cm ² güç yoğunluğunda darbeli ultrases uygulanan gruplara ait kataleptik davranış sürelerinin değişimlerini gösteren bar grafikler	60
Şekil 24. Kontrol, Rezerpin enjeksiyonu uygulanan gruplara ait deney başlangıcından itibaren bir hafta ara olacak şekilde uygulanan Hotplate testlerinin analizinde model oluşumuna kadar geçen 15 enjeksiyon/4 hafta da elde edilen değerlerin değişimleri gösteren bar grafikler	62
Şekil 25. Kontrol, Rezerpin, 0.5 W/cm ² Ultrases, 1.5 W/cm ² Ultrases uygulanan gruplara ait model oluşumunu takiben bir hafta ara olacak şekilde uygulanan Hotplate testlerinin analizinde elde edilen değerlerin değişimleri gösteren bar grafikler	62
Şekil 26. Deney sürecinde tüm gruplardaki deneklerden haftalık olarak alınan ayak izlerinden elde edilmiş siyatik fonksiyonel indeks (SFI) değerlerini gösteren çizgi grafikler	65
Şekil 27. Kontrol deney grubunda siyatik sinir uyarımı ile ayak plantar kasından alınan örnek proksimal ve distal kayıtlar	66
Şekil 28. Rezerpin uygulaması olan deney grubunda siyatik sinir uyarımı ile ayak plantar kasından alınan örnek proksimal ve distal kayıtlar	66
Şekil 29. 0.5W/cm ² Ultrases uygulaması olan deney grubunda siyatik sinir uyarımı ile ayak plantar kasından alınan örnek proksimal ve distal kayıtlar	67
Şekil 30. 1.5W/cm ² Ultrases uygulaması olan deney grubunda siyatik sinir uyarımı ile ayak plantar kasından alınan örnek proksimal ve distal kayıtlar	67
Şekil 31. Siyatik sinirin uyarımı ile gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere hesaplanan sinir ileti hızı değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler	68
Şekil 32. Distal uyarımla gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere distal amplitüd değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler	68
Şekil 33. Distal uyarımla gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere distal latans değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler	69
Şekil 34. Distal uyarımla gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere distal alan (mv x ms) değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler	70

Şekil 35. Distal uyarımla gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere distal süre (ms) değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler.....	70
Şekil 36. Siyatik sinir uyarımı ile gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere Proksimal / Distal oran değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler	71
Şekil 37. Siyatik sinir doku örneklerinden IL-1 β seviyesini gösteren grafik..	73
Şekil 38. Siyatik sinir doku örneklerinden IL-6 seviyesini gösteren grafik.	74
Şekil 39. Siyatik sinir doku örneklerinden TNF- α seviyesini gösteren grafik.....	75
Şekil 40. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Bcl-2/ β -Aktin ekspresyon oranını gösteren bar grafik	76
Şekil 41. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Bax/ β -Aktin ve Bax/Bcl-2 oranını gösteren bar grafikler.....	78
Şekil 42. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Parkin/ β -Aktin oranını gösteren bar grafik	79
Şekil 43. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen aktif kaspaz/ β -Aktin ve pro-kaspaz-3/ β -Aktin oranını gösteren bar grafik.....	80
Şekil 44. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen aktif kaspaz/pro-kaspaz-3 oranını gösteren bar grafik.	81
Şekil 45. Siyatik sinir dokusundan alınan histolojik kesitlerin akson çapı, miyelin kalınlığı ve miyelinli fiber çapını gösteren bar grafik.....	89
Şekil 46. G-ratio hesaplama şeması	90
Şekil 47. Siyatik sinir kesitlerinden hesaplanan akson çapı, miyelinli lif çapı oranlarının gösterimi.....	90
Şekil 48. Protein ekspresyon analizi	126
Şekil 49. Siyatik sinirde akson çapı, miyelin kalınlığı ve miyelinli sinir lif çapının İmageJ-Win64 programında ölçülmesi.....	127

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Subkütanöz enjeksiyon yöntemiyle Rezerpin uygulaması.....	34
Resim 2. BTL5710 SONO US cihazı.....	35
Resim 3. Deneklere hot plate testi uygulaması.....	36
Resim 4. Silindir Test	37
Resim 5. Katalepsi test	38
Resim 6. Deneklere siyatik fonksiyon indeks testi uygulaması	40
Resim 7. ENMG cihazı (Neuro-MEP-Micro electronic unit)	41
Resim 8. Sonikatör cihazı ile siyatik sinir dokusunun homojenize edilmesi	45
Resim 9. SDS-PAGE jeli.....	49
Resim 10. Protein denatürasyonunda kullanılan ısı bloğu.....	50
Resim 11. SDS-PAGE Elektroforez sisteminde örneklerin yürütülmesi	50
Resim 12. Jelden membrana transfer yapılması-Blotlama.	52
Resim 13. Transfer sonrası membran görüntüsü	53
Resim 14. Görüntüleme cihazı.	53
Resim 15. Mikrotom cihazı	55
Resim 16. Sağlam ve hasta ayak izinde yukarıdaki ölçüm parametrelerin şematik gösterimi.....	64
Resim 17. Deney gruplarındaki deneklere ait örnek pençe izleri.....	64
Resim 18. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Bcl-2 ekspresyonunu (20 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β -aktin ekspresyonu (45 kDa).	76
Resim 19. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Bax ekspresyonunu gösteren membran görüntüsü.	77
Resim 20. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Parkin ekspresyonunu gösteren membran görüntüsü.	78
Resim 21. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Pro-kaspaz-3 ve Aktif-kaspaz-3 ekspresyonunu gösteren membran görüntüsü	80
Resim 22. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin LFB boyama görüntüleri	82
Resim 23. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin LFB boyama görüntüleri	83
Resim 24. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin HE boyama görüntüleri	84
Resim 25. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin HE boyama görüntüleri	85

Resim 26. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin MTC boyama görüntüleri	86
Resim 27. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin MTC boyama görüntüleri	87



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tıbbi uygulamalarda kullanılan ultrasesik yoğunluklar.....	24
Tablo 2. Ultrasesin neden olduğu doku sıcaklık değişiklikleri.....	26
Tablo 3. Bradford Assay protein tayin yöntemi için hazırlanan standart tablosu	46
Tablo 4. Bradford Assay protein tayini için 1:5 oranında örneklerin seyreltilmesi	46
Tablo 5. SDS-PAGE elektroforezi için hazırlanan tampon çözeltiler ve içerikleri	48



ÖZET

REZERPIN İLE İNDÜKLENEN PARKINSONİZM MODELİNE BAĞLI PERİFERİK SİNİR HASARINDA DÜŞÜK YOĞUNLUKLU ULTRASESİN TERAPÖTİK ETKİNLİĞİ

Pınarbaşı M.M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik (TIP) Programı Doktora Tezi, Aydın, 2024.

Amaç: Çalışmada, rezerpinle indüklenen parkinsonizm semptomlarına bağlı siyatik sinirde oluşan periferik sinir hasarının ve düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin bu hasar üzerine olan terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: 40 adet erişkin Wistar rat rastgele dört gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki deneklere parkinsonizm semptomlarının oluşumu için gün aşırı 0,1 mg/kg dozunda rezerpin enjeksiyonu 45 gün süreyle uygulandı. 4. haftadan itibaren rezerpin ile birlikte 1 MHz, 0,5W/cm² ve 1,5W/cm² güç yoğunluklarında darbeli ultrases (US) tedavileri her gün her iki bacağı 3'er dakika uygulandı. Deneklerin nosiseptif ağrı algısı, siyatik fonksiyon indeksi, katatonik davranışları ve duyuusal-motor fonksiyonları düzenli aralıklarla izlendi ve deney sonunda siyatik sinir elektrofizyolojisi değerlendirildi. Ayrıca, deneklerin plazma IL-1 β , IL-6, ve TNF- α seviyeleri ile kaspaz-3, Bax, Bcl-2 ve Parkin'in siyatik doku ekspresyon seviyeleri belirlendi ve siyatik sinir histopatolojik değerlendirmesi yapıldı.

Bulgular: Rezerpin enjeksiyonu katatonik davranışta artışa ($p \leq 0,001$); duyuusal-motor fonksiyonlarda ($p \leq 0,001$) ve siyatik sinir iletim hızında ($p \leq 0,001$) azalmaya; plazma IL-1 β , IL-6, TNF- α seviyelerinde artışa; siyatik sinir Bax, kaspaz-3 ve parkin protein ekspresyon seviyelerinde artış ile birlikte Bcl-2 ekspresyon seviyelerinde azalmaya ($p < 0,05$); akson ve miyelin çapında azalmaya neden olmuştur. Darbeli US tedavileri, özellikle 1.5 W/cm² güç yoğunluğunda uygulandığında, rezerpin enjeksiyonuna bağlı siyatik sinirde oluşan bu olumsuz etkileri kontrol düzeyine yaklaştırmada etkili olmuştur.

Sonuç: Düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavisinin rezerpin ile indüklenen parkinsonizm nedenli oluşan periferik sinir hasarında kötü prognozu iyileştirdiği ve daha ileri araştırmaların yapılması için umut vaad etmekte olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Rezerpin; Parkinsonizm semptomları; periferik nöropati; sinir ileti hızı siyatik sinir.

ABSTRACT

THERAPEUTIC EFFICACY OF LOW INTENSITY ULTRASOUND ON PERIPHERAL NERVE DAMAGE BASED ON REZERPINE-INDUCED PARKINSONISM MODEL

Pinarbasi M.M. Aydin Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Biophysics (Medicine) Program Doctorate Thesis, Aydın, 2024.

Objective: This study aims to evaluate the peripheral nerve damage provoked by reserpine-induced parkinsonism, together with the therapeutic efficacy of low-intensity pulsed ultrasound to ameliorate corresponding nerve damage on the sciatic nerve.

Materials and Methods: 40 adult Wistar rats were randomly divided into four groups. To produce parkinsonism symptoms, rats were injected with 0.1 mg/kg dose of reserpine every other day for 45 days. Starting from the fourth week of reserpine administration, daily pulsed ultrasound treatments at 1 MHz frequency 0.5W/cm² and 1.5W/cm² power densities were applied on both hind legs for 3 minutes. Nociceptive pain perception, sciatic function index, catatonic behavior and sensory-motor functions of rats were determined at regular intervals, and sciatic nerve electrophysiology was evaluated at the end. In addition, plasma IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels and sciatic tissue expression levels of caspase-3, Bax, Bcl-2, and Parkin were determined, and sciatic nerve histopathological evaluation was performed.

Results: Reserpine injection led to an increase in catatonic behavior ($p \leq 0.001$); a decrease in sensory-motor function ($p \leq 0.001$) and sciatic nerve conduction velocity ($p \leq 0.001$); an increase in plasma IL1- β , IL-6, TNF- α levels; an increase in Bax, caspase-3, parkin protein expression levels while decreasing Bcl-2 expression levels ($p < 0.05$), and a decrease in axon and myelin diameter. Pulsed ultrasound treatments, prominently at 1.5W/cm² power intensity, led to an improvement in the investigated parameters to those of control levels.

Conclusion: Low-intensity pulsed ultrasound treatment was noted to recover the poor prognosis in the peripheral nerve damage due to reseprine-induced parkinsonism, and warrants further investigations.

Keywords: Reserpine; Parkinsonism symptoms; peripheral neuropathy; nerve conduction velocity; sciatic nerve.

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), Alzhemier hastalığından sonra en sık görülen yaşa bağımlı nörodejeneratif hastalıktır (de Lau ve Breteler, 2006). Parkinson hastalığı (PH), substantia nigra (SN) ve corpus striatumda dopamin (DA) ve dopaminerjik nöronların progresif kaybıyla karakterize, ortalama başlangıç yaşı 60 olmakla birlikte nüfusun 65 yaş üzeri kesiminin %1,8'ini, 80 yaş üzeri nüfusun ise %4'ünü etkileyen nörodejeneratif bir hastalıktır (Hornykiewicz, 1986; Samii ve diğerleri, 2004a). Erkeklerde görülme oranı kadınlara göre daha yüksektir (L.V. Kalia ve Lang, 2015). PH, tremor, musküler rijidite (kas sertliği), bradikinezi (hareketlerde yavaşlama) ile şekillenen üç temel belirtinin yanı sıra, yürüme bozukluğu, yutma güçlüğü, otonom fonksiyon bozukluklarına ilişkin belirtiler (ağızda salya birikmesi, kabızlık, idrar yapma sorunları, cinsel fonksiyon bozuklukları gibi), ağrı ve duyuşsal yakınmalar, depresyon ve demans ile bireyi etkileyen çok yönlü bir hastalıktır (Hoehn ve diğerleri, 1967; Apaydın, 2001; Jankovic, 2008; Tugwell, 2008). Bu semptomlardan biri olan ağrıya karşı son dönemlerde araştırmacıların ilgisi artmış (Ford, 1996; Aydın, 2005), ağrının en çok eşzamanlı distoni varlığıyla ilişkili olduğu görülmüştür (Watson ve diğerleri, 2003). Ancak Parkinson hastalığı ile ilgili son dönem araştırmalarda tek bir fenotip göstermeyip çeşitli bulgularla görülmekte ve tüm bu fenotipler parkinsonizm şemsiyesi altında toplanmaktadır.

Parkinson hastalığı patogenezindeki nöronların kaybedilmesinin açıklanmasında günümüze kadar yapılan çalışmalarda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu (Bose ve Beal, 2016), oksidatif stres (Jenner, 2003), eksitotoksisite (Mehta ve diğerleri, 2013) ve nöroinflamasyon (Taylor ve diğerleri, 2013) gibi farklı yollar önerilmiştir. PH postmortem beyin dokuları üzerinde gerçekleştirilen incelemelerde, serbest oksijen radikallerinin oksidatif stres nedeniyle lipid, protein ve nükleik asit yapılarına zarar verdiği literatürde bildirilmiştir (Cadet ve Brannock, 1998). Reaktif mikrogliya ve aktive edilmiş kompleman bileşenlerinin histokimyasal gösterimi, Parkinson hastalığında etkilenen beyin bölgelerinde kronik inflamasyonun meydana geldiğini göstermektedir. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)'ye maruz kalan insanlardan ve maymunlardan elde edilen kanıtlar, bu inflamasyonun ilk uyaran ortadan kalktıktan sonra yıllarca devam edebileceğini göstermektedir. Kronik iltihaplanma, konakçı hücrelere zarar verebilir. Literatürdeki raporlar, antiinflamatuvar ajanların PH'nin hayvan modellerinde dopaminerjik hücre ölümünü

engellediğini göstermektedir ve kullanımlarının insanlarda PH riskini önemli ölçüde azalttığına dair bir epidemiyolojik rapor vardır. PH'de etkilenen bölgelerde tamamlayıcı proteinler ve aktive mikrogliya markerleri için mRNA seviyelerinde belirgin bir yükselme vardır. Yukarı düzenleme, iltihaplı eklemlerde bulunandan daha büyük görünmektedir. Bu veriler, kronik inflamasyonun PH'nin patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği hipotezini desteklemektedir (McGeer, 2004). TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler, inflamasyonu ve immün yanıtları güçlendirir ve sürdürür. Periferde, romatoid artrit ve inflamatuvar barsak sendromu gibi hastalıkların klinik ve patolojik belirtilerinin çoğundan birincil olarak sorumlu oldukları düşünülmektedir. Bu nedenle, Parkinson hastalarının bazal ganglionlarında ve beyin omurilik sıvılarında (BOS) artmış IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerinin bulunması ilgi çekicidir (McGeer, 2001). PH patogenezi karmaşıktır ve belirsizliğini korumaktadır, ancak artan kanıtlar mitokondriyal ve lizozomal disfonksiyonun rol oynadığını göstermektedir. Hasar görmüş mitokondriyi çıkarma işlemi olan mitofaji, Parkinson hastalarında ve modellerinde tehlikeye atılmıştır ve hızlandırılmış nörodejenerasyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Parkin dahil olmak üzere PH ile ilgili birkaç proteinin mitofajinin düzenlenmesine katıldığı bilinmektedir. Ek olarak, PH ile ilişkili birkaç gendeki mutasyonların, mitofajiyi bozarak mitokondriyal kusurlara ve nörotoksisiteye neden olduğu bilinmektedir, bu da mitofajinin PH patogenezinin kritik bir bileşeni olduğunu gösterir. Bu nedenle, PH patogenezi çalışmasında ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde bu genlerin mitokondriyal kontrol veya mitofaji düzenlemesine nasıl dahil olduğunu anlamak çok önemlidir (Liu, 2019). Parkinson hastalarının postmortem beyin dokularında dopaminerjik nöronlarındaki DNA parçalanması ve apoptotik kromatin değişikliklerinin tanımlanmasıyla apoptotik süreçlerin aktivasyonu kanıtlandığı gibi, Parkinson hastalığında nöronal kaybın ana mekanizmasının apoptoz olduğu düşünülmektedir (Tomkins ve diğerleri, 1997). Ek olarak, Parkinson hastalığının patogenezinde apoptozun rolü, substantia nigra pars compacta'da kaspaz-3'ün artmış aktivitesi ve aktif kaspaz-3'ün artmış ekspresyonunu gösteren postmortem ve *in vitro* çalışmalarda doğrulanmıştır (Mogi ve diğerleri, 2000; Viswanath ve diğerleri, 2001). Ayrıca, dopaminerjik nöronal ölüm, Parkinson hastalığının hücre modellerinde Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu ile inhibe edilir (Akao, 2002). Kaspaz inhibitörlerinin, Parkinson hastalığının hücre modellerinde nöronları ölümden kurtardığı da gösterilmiş ve apoptozun Parkinson hastalığında nöronal ölümün ana mekanizması olduğu fikrine daha fazla destek eklenmiştir (Iaccarino, 2007). Bax gibi yüksek proapoptotik protein seviyeleri, Parkinson hastalarının ölüm sonrası beyin dokusunda da görülmüştür (Tatton, 2000). Parkinson hastalığı ile ilgili olarak gerçekleştirilen çalışmalar büyük oranda merkezi sinir sisteminde

gerçekleştirilmiş, periferik sinir sistemindeki etkilerinin incelendiği çalışmalar daha sınırlı kalmıştır. Binienda ve diğerlerinin 2013 yılında yaptıkları çalışmada; bir pestisit olan rotenon enjeksiyonu ile sıçanlarda oluşturulan parkinsonizm semptomlarına bağlı periferik sinir hasarının geliştiği gözlenmiştir. Ek olarak, kronik rotenon intoksikasyonunun sıçanlarda oksidatif ve nitrozatif stresin artmasına, mitokondriyal disfonksiyona ve yapısal hasara neden olduğu; sitokrom c/kaspaz-3 sinyalleme kaskadıyla striatumda apoptotik hücre ölümüne yol açtığı ve kuyruk motor sinirlerinde nörofilament B ve miyelinin yapısal kaybıyla birlikte motor iletim hızını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada da, rezerpin ile indüklenen monoamin tükenmesiyle oluşan Parkinsonizm semptomlarının periferik sinir sisteminde oluşturduğu mitofaji ve apoptoz aktivasyonu ile inflamasyon düzeyi tespit edilmiş; ayrıca düşük frekanslı düşük yoğunluklu darbeleri ultrasesin bu işaretçiler üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Rezerpin, *Rauwolfia serpentina* bitkisinden izole edilen düzinelerce indol alkaloidinden biridir (Ramawat ve diğerleri, 1999). Rezerpin, veziküler monoamin taşıyıcıları 1 ve 2'yi (VMAT-1 ve VMAT-2) geri döndürülemez şekilde bloke eder ve presinaptik nöronlardaki veziküllerde monoamin nörotransmitterler olan noradrenalin, dopamin ve serotonin depolanmasını engelleyerek sinir terminallerindeki katekolaminlerin tükenmesine neden olur. Sinaptik terminalde nörotransmitterlerin birikmesi, bu maddelerin yıkımında rol alan monoaminoksidaz enzim aktivitesinde artışla birlikte serbest radikal oluşumu ve oksidatif strese neden olarak hücre hasarını oluşturur.

Rezerpin enjeksiyonu ile kemirgenlerde oluşan monoamin tükenmesine bağlı Parkinsonizm, Parkinson Hastalığı araştırmalarında kullanılan en eski hayvan modellerinden biridir. Parkinson Hastalığı nörokimyasının oldukça kaba bir farmakolojik taklidi olmasına rağmen, bu model Parkinson Hastalığı için hala altın standart tedavi olan Levodopa (L-DOPA)'nın terapötik etkinliğini ilk kez göstermede etkili olmuştur. Arvid Carlsson, DA antagonisti olan rezerpin maruziyeti sonucunda deneklerde ilaca bağımlı parkinsonizm geliştiğini bildirmiştir (Carlsson, 2002). Ayrıca endojen dopamin öncüsü olan L-DOPA'nın, farelerde rezerpin uygulamasının daha sonra açıklanan "sakinleştirici" etkilerini tersine çevirme yeteneğini göstermiştir (Carlsson ve diğerleri, 1957). Bu etki kısa süre sonra insanlarda yeniden özetlenmiş (Degkwitz ve diğerleri, 1960) ve rezerpin uygulanan fare veya daha yaygın olarak sıçanlar, Parkinson Hastalığında yeni ilaçların potansiyel semptomatik etkinliğinin denenmesi için sağlam bir model olarak yerleşmiştir. Hastalık perspektifinden bakıldığında, rezerpin modeli, monoamin tükenmesi ve parkinson semptomları arasındaki bağlantıyı anlamamıza da önemli katkılar sağlamıştır (Duty ve Janner, 2011). Bu çalışmada da Parkinsonizmin ilerleyici

doğasını analiz etmek için bir hayvan modeli olarak düşük dozda (0,1 mg / kg) rezerpinin tekrar tekrar uygulanmasını öneren çalışmalar (Fernandes ve diğerleri, 2012; Santos ve diğerleri, 2013) ışığında bu protokolün parkinsonizmin çeşitli moleküler ve biyokimyasal özelliklerini temsil ettiği bildirilmiştir (Leão ve diğerleri, 2015; Leal ve diğerleri 2016; Leal ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, çalışmanın amacı doğrultusunda, rezerpin ile indüklenen Parkinsonizm semptomların periferik sinir dejenerasyonunun gösterilmesi ve düşük yoğunluklu darbeleri ultrasesin terapötik etkinliğinin gösterilmesi amacıyla kullanılacak periferik sinir sistemi dejenerasyon modelinin oluşturulması için monoamin nörotransmitter tükenmesine yol açan tekrarlı rezerpin enjeksiyonu kullanılmıştır. Rezerpin ile indüklenen Parkinsonizm’de izlenecek olan parkinsonizm semptomları ile periferik sinir sistemi fonksiyonu, yapısı ve sinir iletimi incelenerek uygulamanın sinir hasarına neden olup olmayacağı incelenmiştir; ayrıca düşük frekanslı düşük yoğunluklu darbeleri ultrases tedavisinin siyatik sinirde oluşacak olumsuz etkileri tedavi etmedeki etkinliği değerlendirilmiştir.

Farklı rahatsızlıklarda tedavi amaçlı kullanılabilen biyofiziksel ajanlardan biri olan ultrasesin özellikle düşük frekanslı ve düşük şiddetli olarak uygulandığında terapötik potansiyelinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Tıpta böbrek taşlarının kırılmasında, kan pıhtılarının yok edilmesinde, diş temizlenmesi, kanal tedavisi uygulamalarında ve ultrasonik ilaç iletim sistemlerinde kullanılmakta olan düşük frekanslı düşük şiddetli ultrasesin kemik kırıklarında kemik iyileşmesini artırıcı etki gösterdiği, yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir. Son yıllarda ulnar sinir (Özkan ve diğerleri, 2015) ve ratlarda kimyasal olarak oluşturulan nöropati modellerindeki (Yıldız ve diğerleri, 2022) çalışmalarda düşük şiddetli ultrases tedavisinin sinir fonksiyonunu arttırmak ve rejenerasyonu teşvik ederek tedavi için kullanılabileceği önerilmektedir.

Parkinson hastalığı gibi tüm nörodejeneratif hastalıkların mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir. Literatürde bulunan bilgiler ışığında, ulnar sinir ve siyatik sinir üzerindeki sinir hasarı modelli çalışmalarda ultrases, elektrofizyolojik (Özkan ve diğerleri, 2015), moleküler ve hücresel olarak olumlu etki yaratmış ve ultrasesin rezerpin ile indüklenen Parkinsonizm’de görülebilecek elektrofizyolojik fonksiyon bozukluklarında, mitokondriyal disfonksiyonda, apoptoz ve otofajinin düzenlenmesi (Yıldız ve diğerleri, 2022) üzerine olumlu bir etkisi olacağı ve sinir dokusunda oluşan hasarı tedavi etmede bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Ultrases terapi uygulamasının nöropati tedavisine yönelik kullanımı ile ilgili literatürdeki çalışmalarda düşük frekanslı düşük şiddetli ultrasesin hastalarda dirsek bölgesinde oluşan ulnar nöropati tedavisinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir, moleküler ve hücresel

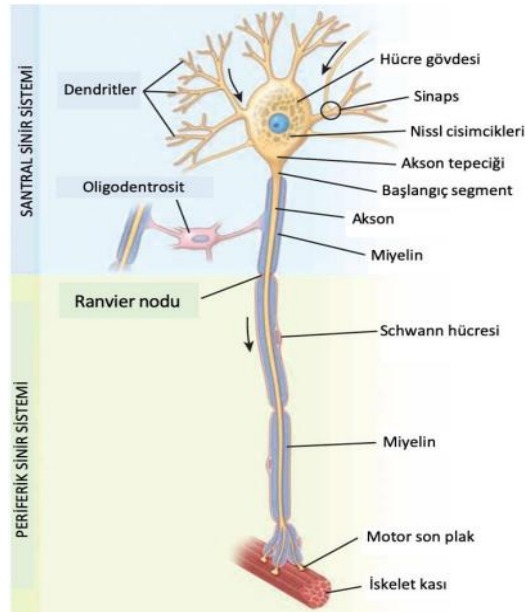
etkileri incelenmemiştir. Ayrıca bir başka çalışmada da kemoterapötik bir ajan ile nöropati modeli oluşturulan ratlarda düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavisinin moleküler ve hücresel etkileri incelenmiş ancak parkinsonizme bağlı periferik sinir disfonksiyonu yer almamıştır. Kısaca, düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin periferik sinir sistemindeki parkinsonizm nedeni oluşan sinir hasarı üzerine olan etkileri, bu etkilerin moleküler mekanizması, ultrases uygulamasının sinir doku bileşenlerinde neden olacağı yapısal ve içeriksel değişimler bu çalışma ile incelenmiş, çalışmadan elde edilen bulgular literatüre parkinsonizmin periferik sinir sistemi etkilerinin incelenmesinde katkıda bulunacaktır.

Bu bağlamda çalışmada düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin periferik sinir sistemindeki parkinsonizm nedeni oluşan periferik sistem sinir hasarı üzerine olan etkileri ve ultrases uygulamasının sinir doku bileşenlerinde neden olacağı yapısal ve içeriksel değişimler bu çalışma ile incelenmesi amaçlanmıştır. Rezerpin enjeksiyonuyla monoamin nörotransmitter geri alımının inhibe edilmesi sonucu monoamin tükenmesiyle oluşan ve parkinsonizm semptomları gösteren rat modelindeki periferik sinir hasarı motor fonksiyon değerlendirme testleri, nosiseptif hot plate testi ve histolojik incelemelerle değerlendirilerek, monoamin tükenmesinin periferik sinir sistemine olan etkileri incelenmiştir. Ayrıca, rezerpin ile indüklenen Parkinsonizm semptomlarının siyatik sinirde neden olduğu apoptotik ve mitofajik aktivasyon belirli protein ifade düzeyleriyle belirlenmiş; oksidatif stres ve inflamasyon artışı gözlenmiştir. Uygulanan farklı şiddetlerdeki düşük yoğunluklu düşük frekanslı darbeli ultrasesin rezerpin enjeksiyonuna bağlı oluşan periferik sinir hasarında siyatik sinir yapı ve fonksiyonu üzerine olan olumlu etkileri belirlenmiştir. Özetle, bu çalışmada uygulanan düşük frekanslı düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin, rezerpin ile indüklenen Parkinsonizm modelinde nosiseptif ağrı algısını ve siyatik sinir iletimini artırdığı, siyatik sinir histolojisinde akson çapı, miyelin kalınlığı ve miyelinli lif sayısında artıma neden olduğu, mitofajiyi ve apoptozu düzenlediği ve oksidatif stresle nöroinflamasyonu azaltmada etkinlik gösterdiği görülmüştür. Çalışmadan elde edilen bulgular, ileride kötü Parkinson prognozunun önüne geçilmesinde ve semptomatik tedavide kullanılabilecek olan düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin terapötik etkinliğinin gösterilmesi açısından literatüre katkı sağlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, kendine özgü iletişim ve etkileşim ağıyla organizmanın hızla etkileşime girmesini ve iç ve dış çevreye uyum sağlamasını sağlayan bir iletişim ve kontrol sistemidir. Uyguladığı kontrol fonksiyonlarının karmaşıklığı bakımından benzersiz olan sinir sistemi, özel reseptörler aracılığıyla çeşitli duyu organlarından sayısız bilgiyi alır ve bunu vücudun kendi reaksiyonlarında birleştirir. (Guyton ve Hall, 2011). Sinir sistemi bir hareket tarzına karar verir ve daha sonra seçilen davranışsal tepkiyi gerçekleştirmek için kaslar ve bezler gibi efektör organlara komutlar verir. Sinir sistemi iki ana bölümden oluşur; Merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS). MSS beyin ve omurilikten oluşurken; Periferik sinir sistemi, vücudun tüm bölümlerini sinirlendiren ve çevre ile merkezi sinir sistemi arasında bir arayüz oluşturan, küçük nöron grupları olarak da adlandırılan sinirlerden ve ganglionlardan oluşur. Merkezi ve periferik sinir sistemleri arasındaki geçiş, omurilikten çıkışlarına yakın olan dorsal ve ventral köklerde ve beyinden çıkışlarına yakın olan kranyal sinir liflerinde meydana gelir (Bern ve Levy, 2010).



Şekil 1. Nöron çizimi (Ross ve Pawlina, 2016)

Tipik bir nöron; üç ana bileşenden oluşur: perikaryon veya soma olarak da adlandırılan hücre gövdesi, dendritler ve akson (Guyton ve Hall, 2011). Hücre gövdesi, bir nöronun metabolik ve genetik merkezidir. Sinir hücresinin çekirdeğini ve nükleolusunu içerir. Aynı zamanda özel Nissl cisimcikleri, endoplazmik retikulum ve hücre zarı bileşenleri, enzimler ve sinir hücrelerinin özel işlevleri için gerekli diğer kimyasalları üreten bir Golgi aygıtı kompleksi içerir. Hücre gövdesi ayrıca mikrotübüller ve nörofilamentler de dahil olmak üzere çok sayıda mitokondri ve hücre iskeleti elemanı içerir. Hücre gövdesi aynı zamanda nöronun diğer nöronlardan elektriksel ve kimyasal sinyalleri aldığı bir bölgedir (Purves ve diğerleri, 2019). Dendritler hücre gövdesinin dallanmış ve konik uzantılarıdır ve diğer nöronlardan gelen sinyallerin doğrudan alıcılarıdır. Dendritlerdeki ana sitoplazmik organeller mikrotübüller ve nörofilamentlerdir. Akson, nöron tipine ve türün boyutuna bağlı olarak birkaç yüz mikrometreye veya daha uzağa uzanabilen, nöronal hücre gövdesinin benzersiz bir uzantısıdır. Ek olarak akson, işlevsel bütünlüğünün merkezinde yer alan ayrı bir hücre iskeletine sahiptir. Aksonun ilk kısmına başlangıç segmenti denir ve hücre gövdesini akson tepeciği adı verilen özel bir bölgede bırakır. Genel olarak her nöronun yalnızca bir aksonu vardır ve genellikle tekdüze bir çapa sahiptir. Aksonların uzunluğu ve çapı nöron tipine göre değişir. Bazı aksonlar dendrit uzunluğunun çok ötesine geçmezken, bazıları bir metre veya daha uzun olabilir. İnsan beynindeki çoğu nöronun aksonları birkaç milimetreden uzun değildir ve bazılarının hiç aksonu yoktur (Schwartz ve Westbrook, 2000; Purves ve diğerleri, 2019). Ancak projeksiyon nöronlarının aksonları uzak hedeflere projeksiyon yapar.

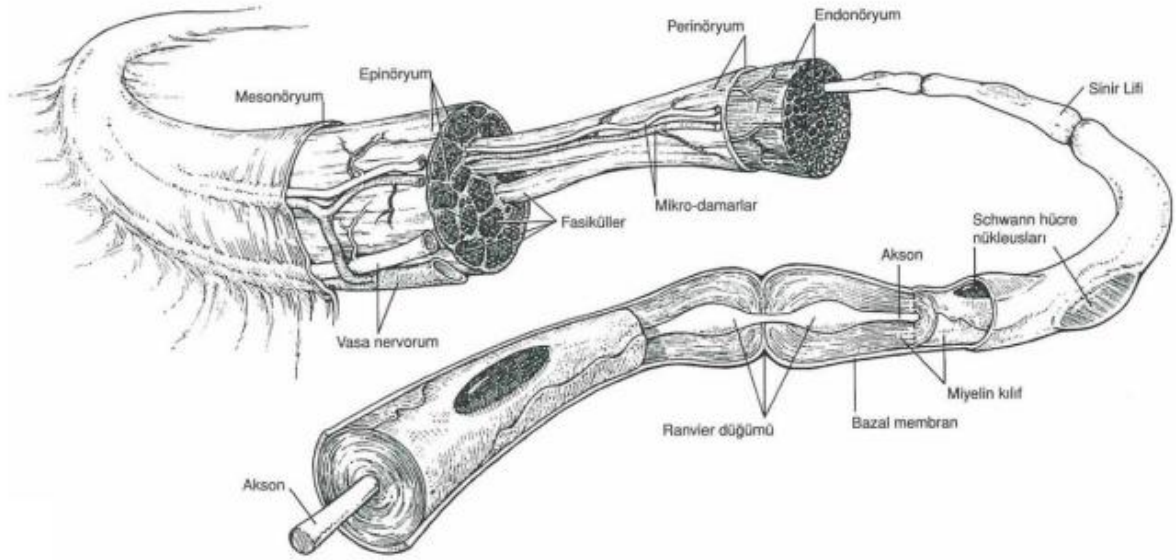
Bu mesafelere sinyal ileten elektriksel olay; akson tepeciğindeki başlangıç noktasından sinaptik hücrenin bulunduğu aksonun sonuna kadar yayılan, kendini yenileyen bir elektriksel aktivite dalgasına aksiyon potansiyeli denir. Birinci segment genellikle akson boyunca yayılan aksiyon potansiyellerinin başlatıldığı bölgedir (Bern ve Levy, 2010).

2.1.2. Periferik Sinir Sistemi

Motor, duyuşal ve otonom fonksiyonları olan ve merkezi sinir sistemi ile periferdeki hedef organlar arasında iki yönlü bilgi akışını sağlayan ve köprü görevi yapan sinir sistemidir. Sinirler, ganglionlar ve sinir sonlanmaları periferik sinirlerin ana bileşenlerini oluşturmaktadır (Folan-Curran ve Fitzgerald, 2002). Periferik sinirler merkezi sinir sistemini uzuvlara ve organlara bağlar. Periferik sinirlerin içsel rejeneratif yetenekleri olmasına rağmen onarım süreci

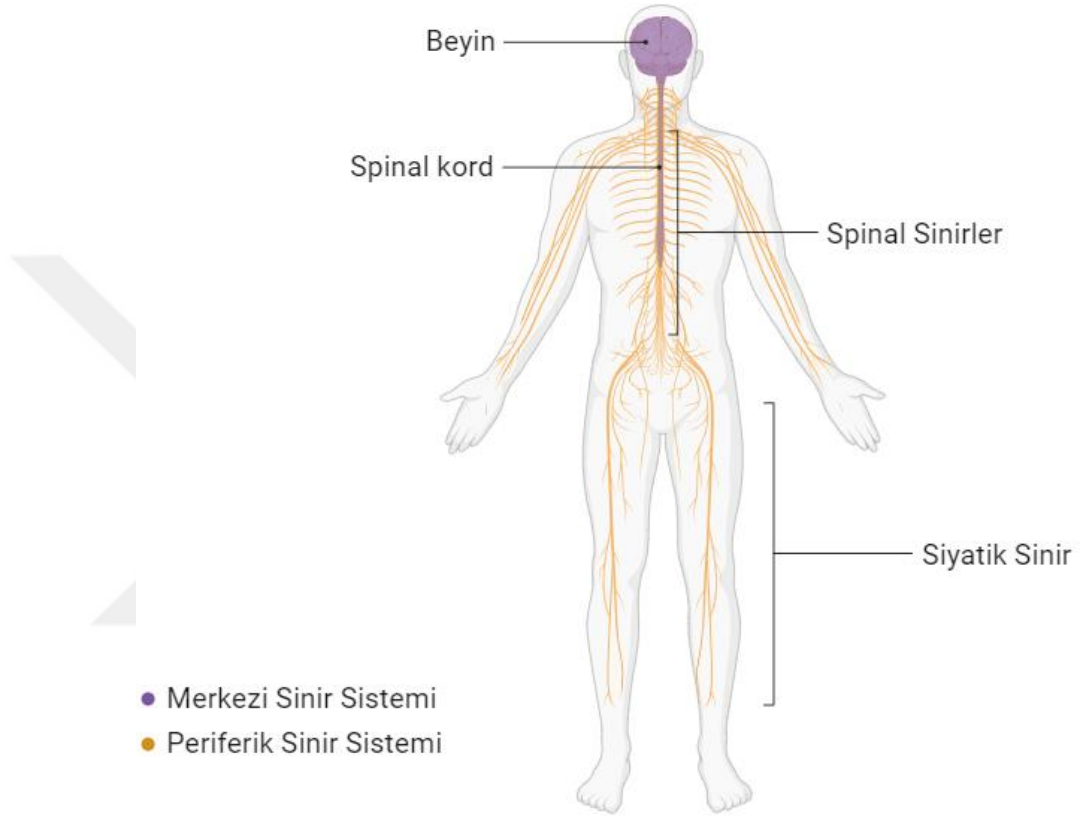
yavaştır. Çoğu durumda periferik sinir hasarı, motor bozukluklar ve duyu bozuklukları nedeniyle yaşam kalitesinin düşmesine neden olur (Yang ve diğerleri, 2011).

Merkezi sinir sisteminden gelen uyarılar, efferent lifler ile hedef dokuya taşınırken; periferde gelen uyarılar merkezi sinir sistemine afferent lifler aracılığı ile taşınmaktadır (Myers, 1998). Omuriliğin ventral kök kısmında (ön boynuz) motor nöronların gövdeleri yer alırken, dorsal kök kısmında (arka boynuz) ise duyu sinirlerinin gövdeleri bulunmaktadır. Periferik sinir sistemi, dorsal kök ve ventral kökteki motor sinirlerin ve duyu sinirlerinin birleşmesi ile meydana gelir ve fonksiyonunu gerçekleştirir. PSS'ye ait aksonların hücre gövdeleri merkezi sinir sisteminde ve ganglionlarda bulunmaktadır. Nöron gövdesi ve nörogliaların bağ dokusu ile çevrenmesi ile ganglionlar oluşur ve iki sistem arasındaki uyarıları dağıtan kısım da ganglionlardır (Abraham, 2006). Uyarıları alan afferent sinirler, bu uyarıları yorumlayan MSS ve cevabı başlatan efferent sinirler arasındaki etkileşim nöronal yolları oluşturur. Bu nöral yollar, refleks arkı denen refleks oluşumuna aracılık eder. İnsanlardaki çoğu duyu sinirleri direkt beyne geçemeyip, omurilikteki motor nöronlar ile sinapslar yaparak iletişim kurar (Ross ve Pawlina, 2014).



Şekil 2. Periferik sinir lifi çizimi (Mackinnon ve Colbert, 2014)

Periferik sinir sisteminin motor cevabın oluşturulduğu motor ünitesi fonksiyonel olarak somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olmak üzere iki bölüme ayrılmaktadır. Somatik sinir sistemi, merkezi ve periferik sinir sisteminin somatik (gövde) kısımlarından oluşur ve refleks arkı dışında, bilinçli, istemli ve kontrol altındaki fonksiyonları kontrol eder. Düz kaslar, kalp kası, iç organlar ve bezler dışında vücudun tüm bölgelerine motor ve duyu innervasyonu sağlar.

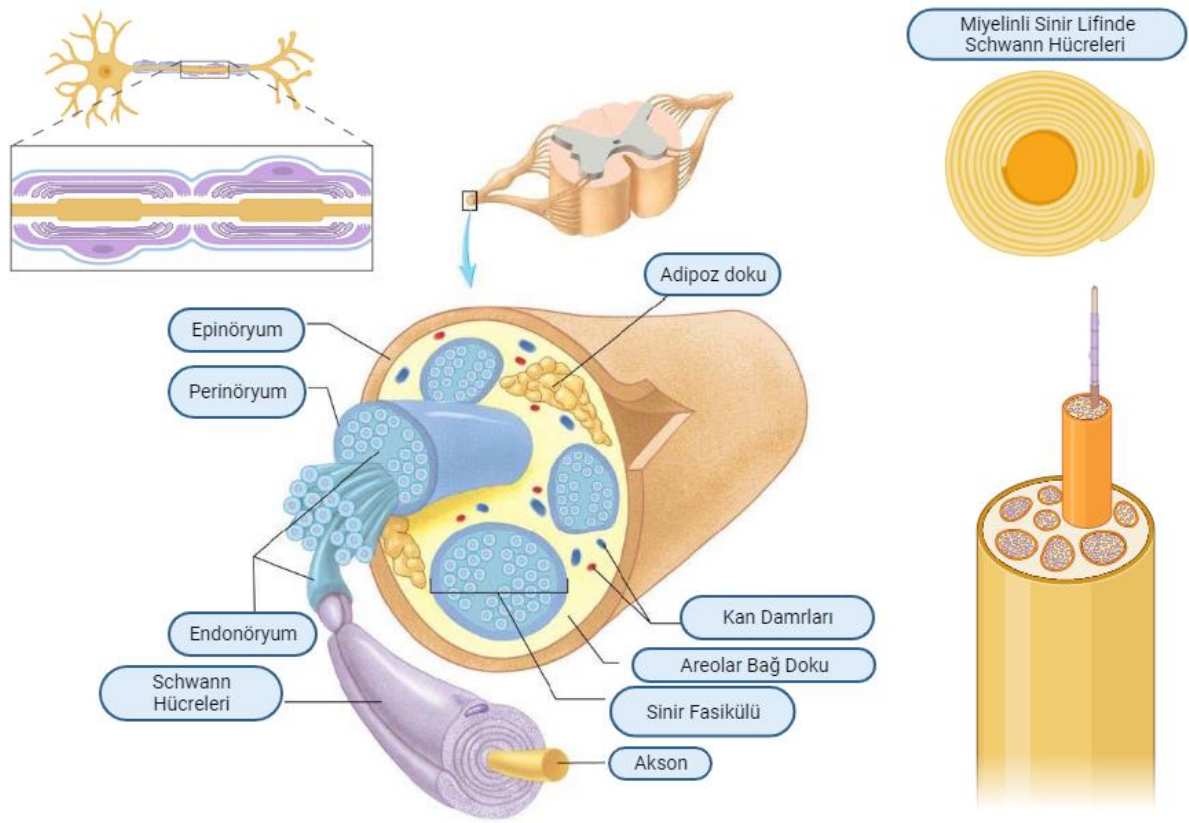


Şekil 3. Sinir sistemini oluşturan ana üyeler (BioRender’da yaratılmış ve düzenlenmiş)

Otonom sinir sistemi, merkezi ve periferik sinir sisteminin otonom kısımlarından oluşur. Kalbin iletim sistemine, düz kaslara ve bezlere istemsiz motor innervasyonu sağlar. Aynı zamanda iç organlardan otonom refleksler ve ağrı gibi duyu innervasyonu sağlar. Otonom sinir sistemi ayrıca sempatik ve parasempatik olmak üzere iki ayrı bölümden oluşmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

Periferik sinir sisteminde sinir lifleri, sinirleri oluşturmak için demetler halinde gruplar oluştururlar. Periferik sinir lifleri ve Schwann hücreleri bir araya birlikte yoğun fasikül demetlerini oluştururlar. Miyelinsiz lif içeren çok ince sinirler dışında, periferik sinirler kollajen

ve miyelin içerdikleri için parlak ve beyazımsı bir görünüme sahiptir. Aksonların ve schwann hücrelerinin hemen dış laminasında kılcak kan damarları, fibroblastlar ve retiküler liflerce zengin ince bir endonöryum tabakası bulunmaktadır. Endonöryum tabakası her bir sinir lifini çevreleyen gevşek bağ dokusudur. Sinir liflerini bir arada tutarak, demet/fasikül şeklinde bağlar. Tip I kollajen içermesi ve elastin içermemesi nedeniyle gerilmeye karşı direnç gösterir (Kline ve Hudson, 1995). Periferik sinirdeki endonöral damarlar, schwann hücrelerini ve miyelini çevreler. Endonöral sıvı basıncı çevre dokulardaki basınca göre daha yüksektir ki, bu özellik sayesinde toksik maddelerin aksone girişini engeller. Endonöryum içeren akson grupları ve schwann hücreleri, kenarları sıkı bağlantılarla birbirine geçmiş bir kılıf tarafından fasiküller olarak sarılmıştır ve bu kılıf perinöryum adını alır. Perinöryum, bir sinir demetini çevreleyen ve kan-sinir bariyerinin oluşumuna katkıda bulunan özelleşmiş bağ dokusudur. Perinöryumun, 2 ila 5 katmanlı fasikül içi difüzyonu düzenleyerek, fasikülleri hafif bir basınç altında tutar ve periferik sinirlerin elastik yapısını korur. Ayrıca sinir liflerinin mikroçevresini korumaya yardımcı olan kan-sinir bariyerini oluşturur. Perinöral hücreler, maddelerin aktif transportu için gerekli olan, reseptörleri ve enzimleri içerir. En dış tabakada periferik sinirler, fasiküller arasındaki boşluğu doldurmak için derinlemesine uzanan epinöryum adı verilen yoğun, düzensiz fibröz bir tabaka ile çevrelenmiştir. Periferik siniri besleyen kan damarları epinöryum içinde yerleşiktir ve damarlar perinöryuma doğru penetrasyon yaparken, endonöryumun damarlanması zayıftır (Yılmaz, 2023). Şekil 4'te bir sinir demetinin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 4. Sinir lifi demeti ve üyeleri (BioRender’da yaratılmış ve düzenlenmiş)

2.1.3. Sinirde İletim ve Aksiyon Potansiyeli

Nöronlar, kas lifleri ve endokrin hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre türü, elektriksel uyarı üretme kapasitesine sahiptir. Aksiyon potansiyelleri olarak bilinen bu uyarılar, hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve bilginin sayısallaştırılması için biyolojik bir mekanizma oluşturur. Aksiyon potansiyelleri hücre zarı özelliklerinin çok özel bir birleşiminden ortaya çıkar. İyon kanallarının seçici geçirgenliği ve membran proteinlerindeki voltajın neden olduğu geçişler, benzersiz özelliklere sahip hızlı voltaj değişiklikleri oluşturmak için güçlerini birleştirir. Aksiyon potansiyelleri, pasif azalan süreçler değil, büyük mesafelere yayılan dalga benzeri olaylardır (Jackson, 2006). Uyarılabilir hücrelerden olan sinir ve kas hücreleri bir uyarıyla (termal, mekanik, kimyasal, elektriksel) uyarıldığında membran potansiyelinde geçici bir değişiklik olur. Bu değişim kritik bir değeri aşarsa, hücre zarı boyunca yayılan, durdurulamaz dalga biçimindeki potansiyel değişiklik yoluyla organlar arasında hızlı bir bilgi aktarımı meydana gelir. Canlının iç ve dış ortamında meydana gelen her türlü

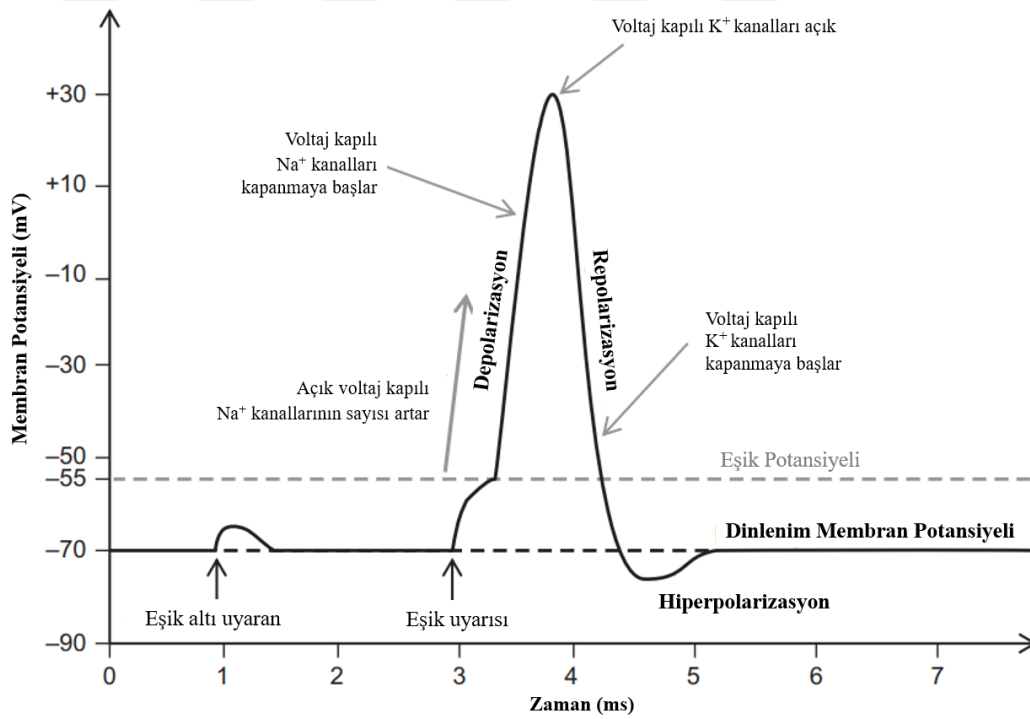
değişiklik, özel alıcılar tarafından elektrik sinyallerine dönüştürülür ve sinirler aracılığıyla beyne iletilir. Beyinde tespit edilen bu elektrik sinyalleri yorumlanarak bir kısmı depolanırken bir kısmı da emir olarak kas, bez gibi efektör organlara gönderilir. Bu emirler nöronların hücre zarlarında potansiyel bir değişiklik şeklinde hedef dokulara iletilmektedir (Pehlivan, 2017).

Nöronların ve kas hücrelerinin, dış kısmı pozitif yüklü, iç kısmı negatif yüklü ve ortadaki çift lipit tabakası nedeniyle iyi bir yalıtkan olan bu dinlenme durumu, polarize bir kapasitöre benzer (Pehlivan, 2017). Nöronlar uyarıldığında iyon kanalları hemen açılır ve hücre dışındaki konsantrasyonu sitoplazmadaki konsantrasyonundan kat kat fazla olan Na^+ iyonları hızla hücreye girerek dinlenme membran potansiyelini -65 mV 'tan $+30 \text{ mV}$ 'a yükseltir. Böylece hücre içi ortam, hücre dışı ortama göre pozitif hale gelir ve "aksiyon potansiyeli" başlar (Junqueira ve Carneiro, 2006). Aksiyon potansiyeli ile birlikte negatif değerlerde olan membran potansiyelinin $+30$ ila $+40 \text{ mV}$ 'a yükselmesine, yani dinlenme durumundaki membran potansiyelinin pozitif değerlere yükselmesine "depolarizasyon" denir. Depolarizasyon durumunda Na^+ kanalları açılır, Na^+ iyonları hücre içine geçmeye başlar ve membran potansiyeli pozitif hale gelir. Eşik değerine ulaşıldığında voltaj kapılı Na^+ kanalları açılır ve hücreye daha fazla Na^+ iyonu akar. Voltaj kapılı Na^+ kanallarının aktivasyon kapıları çok kısa sürede devre dışı bırakılır ve voltaj kapılı K^+ kanalları açılmaya başlar. Tepe değerine (yaklaşık $+35 \text{ mV}$) ulaşıldığında membran potansiyeli tekrar negatif olmaya başlar. Bu sürece "repolarizasyon" denir. Repolarizasyon işlemi sırasında Na^+ kanalları aktif olmadığı için Na^+ iyonları hücreye giremez. Bu sırada K^+ iyonları voltaj kapılı K^+ kanalları yoluyla hücrenin dışına çıkar ve membran yeniden polarize olarak dinlenme membran potansiyeli değerine tekrar yaklaşır (Guyton ve Hall, 2011; Pehlivan, 2017). Voltaj kapılı K^+ kanalları, voltaj kapılı Na^+ kanalları gibi repolarizasyondan hemen sonra kapanmadığından, membran potansiyeli bir süre dinlenme membran potansiyeline göre daha negatif olur. Bu sürece "hiperpolarizasyon" denir. Hiperpolarizasyondan sonra membran, Na^+/K^+ pompasının çalışmasıyla dinlenme durumuna geri döner. Membran depolarizasyonunun başlangıcından hiperpolarizasyonun sonuna kadar geçen sürede, membran dinlenme potansiyeline dönene kadar başka hiçbir uyarı alınamaz veya yanıt verilemez. Bu sürece "refraktör dönemi" adı verilmektedir (Gartner ve Hiat, 2007).

Aksiyon potansiyelinin yayılma hızı $1-100 \text{ m/s}$ arasında değişmektedir. Mikroelektrot teknikleri kullanılarak yapılan gözlemlere dayanarak, dinlenme membran potansiyelinin hücreden hücreye -60 mV ile -90 mV arasında değiştiği, aksiyon potansiyelinin tepe değerinin $+20 \text{ mV}$ ile $+50 \text{ mV}$ arasında değiştiği ve bekleme süresinin hücreden hücreye değiştiği bilinmektedir. Aksiyon potansiyeli $0,5 \text{ ms}$ ile $0,5 \text{ s}$ arasında değişmektedir. Aksiyon

potansiyelinin yayılma hızı miyelinli aksonlarda miyelinsiz aksonlara göre çok daha yüksektir. Aksonal iletimin belirli bir yönü olmamasına rağmen, orta kısmından uyarılan bir aksondaki aksiyon potansiyeli her iki yönde de yayılabilir (Pehlivan, 2017).

Aksiyon potansiyelinin yayılma hızı 1-100 m/s arasında değişmektedir. Mikroelektrot teknikleri kullanılarak yapılan gözlemlere dayanarak, dinlenme membran potansiyelinin hücreden hücreye -60 mV ile -90 mV arasında değiştiği, aksiyon potansiyelinin tepe değerinin +20 mV ile +50 mV arasında değiştiği ve bekleme süresinin hücreden hücreye değiştiği bilinmektedir. Aksiyon potansiyeli 0,5 ms ile 0,5 s arasında değişmektedir. Aksiyon potansiyelinin yayılma hızı miyelinli aksonlarda miyelinsiz aksonlara göre çok daha yüksektir. Aksonal iletimin belirli bir yönü olmamasına rağmen, orta kısmından uyarılan bir aksondaki aksiyon potansiyeli her iki yönde de yayılabilir (Pehlivan, 2017).

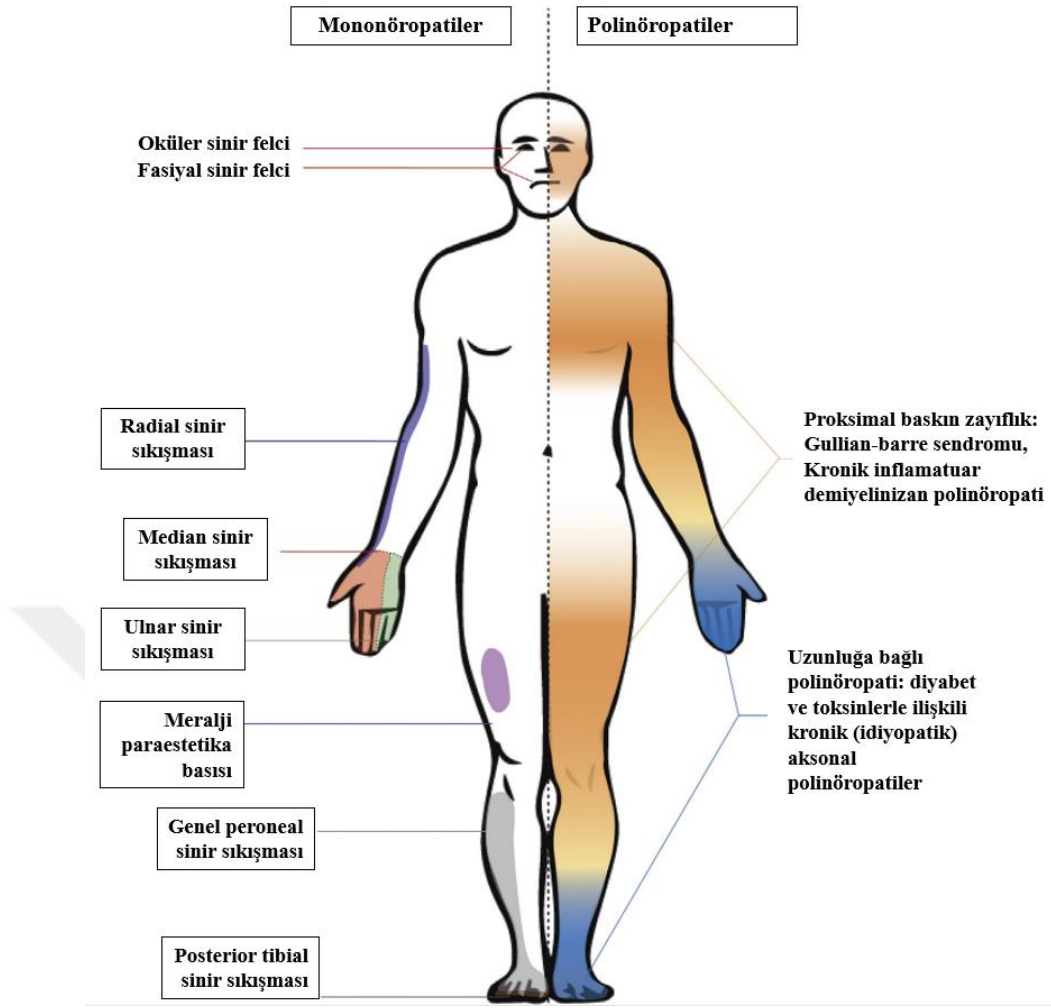


Şekil 5. Aksiyon potansiyeli evreleri (Chambers ve Matthews, 2019).

2.2. Nöropati

Santral sinir sistemiyle vücudun iletişim ağını ve elektriksel iletim sinyalizasyonunun stabilitesini bozan, sinir sisteminde ortaya çıkan dejenerasyon “Nöropati” olarak adlandırılmaktadır (Hammi ve Yeung, 2021). Periferik nöropati (PN); klinik ve patolojik tabloların birlikte değerlendirilmesiyle meydana gelen ve yaygın olarak görülen nörolojik durumdur. Ciddi şekilde hasarlanan periferik sinirlerin (duyu, motor ve otonom sinirler), dokunma ve titreşim duyusunda görevli miyelinli liflerin ($A\beta$), soğuk algısı ve termal ağrıda yer alan ince miyelinli liflerin ($A\delta$) ve sıcaklık algısı ve termal ağrı ile ilgili miyelinsiz liflerin (C lifi) disfonksiyonuna neden olmaktadır (Abraira ve diğerleri, 2013).

Nöropati, büyük çaplı miyelinli fiberler gibi motor sinirleri etkilediği gibi dokunma, sıcaklık veya ağrı duyusu örneğinde sinyallerin transportunda görev alan duyu sinirlerini ve iç organları uyaran demetler de dahil otonom sinirleri etkileyebilir. Nöropatik durumlarda semptomlar, görülen dejenerasyonun türüne ve hangi tip sinir lifinin etkilendiğine bağlı olarak önemli ölçüde değişir. Nöropati herediter ortaya çıkabildiği gibi, sistemik, metabolik, ilaç ve çevresel toksisite gibi dış etkenlerle de ortaya çıkabilmektedir. (Hammi ve Yeung, 2021).



Şekil 6. Periferik nöropatinin vücutta temsil ettiği bölgeler (Aybek, 2016).

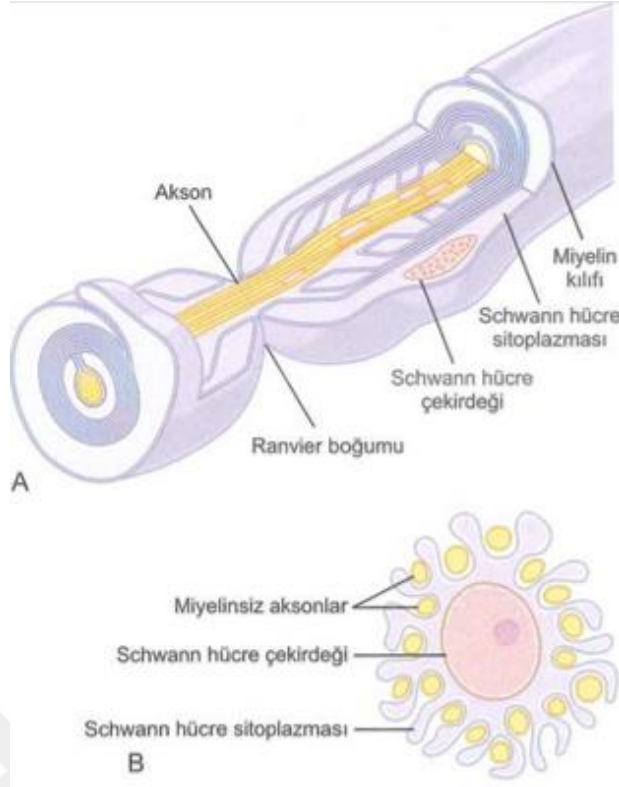
Belirli bir hastalığa bağlı olarak motor yetmezlik, ağrı, uyuşukluk, hiperaljezi/allodini ve parestezi gibi duysal anormallikler ve otonomik semptomlar veya hepsinin bir kombinasyonu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çeşitli nörolojik semptomlar, motor, duysal ve otonomik aksonların çeşitli hastalık süreçlerine karşı farklı duyarlılıklara sahip olduğunu düşündürmektedir. Birçok nöropati kronik veya akut olarak başlayabilmekte ve kademeli iyileşme süreci gösterebilmektedir (Yuki ve Hartung, 2012).

Alt ve üst ekstremitelerdeki karmaşık elektriksel sinyaller nedeniyle yanma, karıncalanma, güçsüzlük, uyuşukluk ve ağrı ile patolojik bir durumdur (Bernhardson ve diğerleri, 2007). Dokunmaya karşı aşırı hassasiyet, ağırlı normal aktiviteler, koordinasyon eksikliği ve düşme, kas zaafı, motor sinir etkilenmesine bağlı olarak felç, ısıya karşı ortaya çıkan tolerans kaybı, aşırı terleme veya terlememe, mesane, gastrointestinal sorunlar,

tansiyonda yaşanan değişiklikler, otonom sinir tutulumu ile baş ağrısı PN'nin ortaya çıkan diğer semptomlarıdır (Jones ve diğerleri, 2014; Kolb ve diğerleri, 2016; Banach ve diğerleri, 2016; Adams ve diğerleri, 2015; Molassiotis ve diğerleri, 2019; Zajaczkowska ve diğerleri, 2019). PN, sendromların görüldüğü anatomik lokasyona ve PSS'deki dağılımına göre farklılık göstermektedir. Ortaya çıkan farklılık, tek bir periferik sinirin tutulumu durumunda mononöropati, birden fazla periferik sinirin tutulumunda multifokal nöropati veya polinöropati şeklinde tanımlanır (Şekil 6). Bu kategoriler, hastalığın nedenine, akut veya kronik seyir izlemesine göre veya hasarlanmasının aksonal veya miyelin hasarına bağlı demiyelinizan oluşuna göre sınıflandırılabilir (Şekil 6). PN'ler, kimyasal ajanlarının kullanıldığı terapilerde verilen ilaçların toksisitesine bağlı iyatrojenik nedenlerle de ortaya çıkabilmektedir (Kuwabara ve diğerleri, 2013; Winer, 2014).

2.3.Miyelin

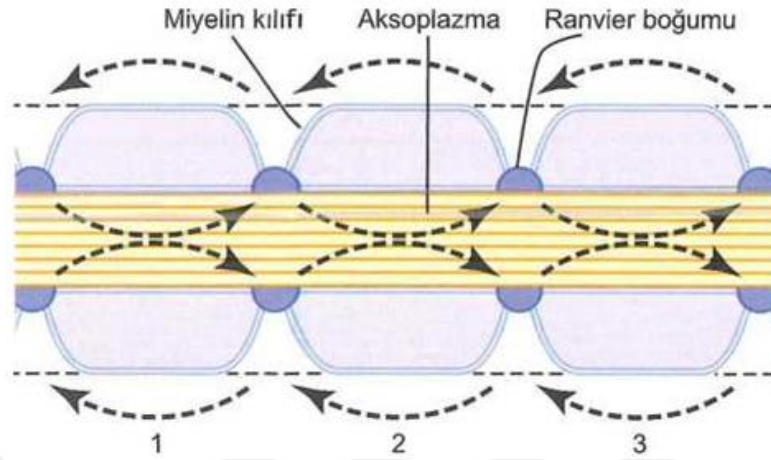
Büyük bir aksonun sağladığı hız avantajı, boyut ve enerji dezavantajına karşı ağır basmaktadır. Milyarlarca nörondan oluşan karmaşık bir sinir sisteminde, çok fazla büyük akson, sinir sistemini yönetilemeyecek kadar büyük hale getirecek ve aşırı miktarda metabolik enerji tüketecektir. Kalamar gibi omurgasızlar genellikle daha az nörona sahiptir, ancak omurgalılar çok daha karmaşık sinir sistemlerine sahiptir ve aksonal iletimi hızlandırmak için başka bir stratejiye ihtiyaç duyarlar. Bunu, membran direncini artırmak ve kapasitelerini azaltmak için aksonları saran kalın bir yalıtım kılıfı olan miyelin ile başardılar (Şekil 7). Bu, iletim hızını artırır. Bir kurbağanın 10 mm çapındaki bir sinir lifi olan miyelin, yaklaşık 20 m/s hızla iletir (Hodgkin, 1964), bu, kalamardaki 100 mm çaplı bir aksondan kabaca üç kat daha hızlıdır. Miyelin kılıflar akson yüzeyinin tamamını kaplamaz. Düzenli aralıklarla aralıklı olarak Ranvier boğumları adı verilen çıplak noktalar vardır (Şekil 8). Ranvier boğumlarında miyelin bulunmadığından iyonların membrana engelsiz erişimi vardır. Miyelinli aksonlardan alınan elektrofizyolojik kayıtlar, ranvier boğumlarının aksiyon potansiyelinin üretildiği yerler olduğunu gösterdi. Bir boğunların yakınında kaydedilen hücre dışı alanlar, aksiyon potansiyellerine aktif içe doğru akımların eşlik ettiğini gösterdi (Huxley ve Stampfli, 1949). Diğer bölgelerdeki kayıtlar yalnızca pasif dış akımları tespit etti. Aksiyon potansiyellerinin başlatılması ve yayılması için gerekli olan Na⁺ kanalları Ranvier boğumlarında yoğunlaşmıştır.



Şekil 7. Schwann hücrelerinin sinir liflerini yalıtma görevi, **A.** Bir Schwann hücre zarının, miyelinli lifin miyelin kılıfını oluşturmak için, aksonun etrafını sarması. **B.** Schwann hücre sitoplazması ve zarının çok sayıda miyelinsiz sinir liflerinin etrafını kısmen sarması (Enine kesitte gösterilmiştir) (Guyton ve Hall, 2013)

Miyelinin yüksek direnci, bu boğumların depolarizasyonun çok fazla akım kaybı olmadan büyük bir mesafeye yayılmasını sağlar. Bunu düşünmenin bir yolu, membran direncinin artırılmasının uzunluk sabitini artırmasıdır. Miyelin ayrıca kapasitansı da azaltır, böylece bir ranvier boğumuna giren yük, aksonal membranın daha büyük bir alanının voltajını değiştirebilir. Hem artan direnç hem de azaltılmış kapasitans, bir aksiyon potansiyelinin bir boğumdan diğerine hızla yayılmasını sağlayarak birlikte çalışır (Jackson, 2006). Miyelinli hücrelerdeki bu tür iletim aksonlarda saltotorik iletim denir. Saltotorik ileti; depolarizasyon sürecinin sinir lifi boyunca uzun aralarla sıçrayış göstermesi, miyelinli liflerde ileti hızını 5 ile 50 kat kadar oranlarda artırır. Saltotorik ileti aksonda enerjinin korunumuna göre avantaj sağlar, çünkü sadece boğumların depolarize edildiği normalde gözlenebilecek iyon sızıntısını belki de 100 kat azaltır. Buna bağlı olarak, membranın iki tarafı arasındaki Na^+ ve K^+ konsantrasyon farkını yeniden sağlamak için daha az enerjiye ihtiyaç duyulur. Kalın miyelinli liflerde saltotorik iletinin bir diğer avantajı ise miyelin membranının yarattığı bu mükemmel yalıtkanlık

zar kapasitansını 50 kat düşürür ve böylece repolarizasyonun çok küçük iyon transferiyle gerçekleşmesini sağlar (Guyton ve Hall, 2013).



Şekil 8. Miyelinli bir akson boyunca sıçrayıcı iletir. Bir boğumdan diğerine olan elektriksel akım iletimi oklarla gösterilmiştir (Guyton ve Hall, 2013).

PSS'nin miyelinli sinir lifi akson-schwann hücre kompleksinden oluşur. Sinir lifinin tüm uzunluğu boyunca düzenlenmiş yüzlerce Schwann hücresi, sinir lifinin miyelin kılıfını oluşturur. Sinir liflerinin miyelinasyonu embriyonik gelişim sırasında başlar ve doğum sonrasında da devam eder. Aynı zamanda bireyin yaşamı boyunca yaralanan sinir liflerinin yenilenmesi (remiyelinizasyon) sırasında da ortaya çıkar. Schwann hücreleri ve akson arasındaki ilişki, sinir lifinin iletim hızını şu şekilde doğrudan etkiler: Aksonal çaptaki bir artış, miyelin kılıfının kalınlaşmasını uyarır; bu sinirsel uyarı, internodal segmentin uzaması ve bunun sonucunda sinir liflerinin sıçramalı iletim hızında bir artışla ilişkilidir (Ugrenovic ve diğerleri, 2015). Sinir lifi çapları 2 ila 18 μm arasında değişir ve boyutlarına göre iki gruba (kümelere) ayrılabilirler: Küçük ve büyük lifler (Ugrenovic ve diğerleri, 2015). Rushton (1951), akson çapı ile miyelin kılıfının kalınlığı arasındaki ilişkiyi g oranı ($g \text{ oranı} = \text{aksonal çap} / \text{tüm sinir lifinin dış çapı}$) olarak sunan ilk kişiydi. Miyelin, sinir sinyallerinin etkili bir şekilde iletilmesini sağlamak için sinir sistemindeki aksonların etrafını saran dielektrik bir malzeme olması dolayısıyla daha büyük aksonlar ve daha kalın bir miyelin kılıfı daha hızlı iletme katkıda bulunur, ancak beyin boyutlarının dayattığı uzaysal kısıtlamalar nedeniyle akson boyutu ile miyelin kalınlığı arasında bir denge vardır. Akson boyutu ile miyelin kalınlığı arasındaki ilişki, fiberin iç (akson) dış (akson artı miyelin) çapına oranı olarak tanımlanan, miyelin g oranı adı

verilen bir parametrede yakalandığını belirten literatürde yerini almış çalışmalar mevcuttur. Maksimum iletim hızlarını sağlayan g oranının 0,6 civarında geniş bir optimal değeri vardır. Genel olarak daha büyük aksonlar daha kalın miyelin kılıflarına sahip olma eğilimindedir ancak ikisi arasındaki ilişki doğrusal değildir. Farklı omurgalı türlerinde yapılan ölçümler, doğrusal ilişkinin 5 µm'den büyük aksonlar için bozulduğunu göstermektedir. İnsan periferik sinirlerinde akson çapı beşinci yılda maksimuma ulaşır, ancak miyelin kalınlığı yaklaşık 16 yaşına kadar artar, bu da gelişim sırasında g oranının kademeli olarak azalmasına neden olur (Stikov ve diğerleri, 2015).

2.4. Parkinson Hastalığı ve Parkinsonizm

Parkinson hastalığı ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Öncelikle titreme, bradikinezi ve akinezi gibi motor semptomlarla tanımlanır ancak bilişsel gerileme, depresyon, anksiyete, uyku bozukluğu ve disotonomi gibi bir dizi motor olmayan semptom da gösterebilir. Motor semptomların tedavisi öncelikle dopaminerjik ilaçlarla gerçekleştirilmekte, son dönemde de bazı stimülasyon metotlarıyla tedavi seçenekleri araştırılmaktadır. Parkinson hastalığında çoğu hasta nörologlar tarafından tedavi edilse de, Parkinson hastalığı ilk olarak öykü ve fizik muayeneye dayalı olarak tanıyı koyabilecek birinci basamak hekimine başvurur. Bu noktada "Parkinsonizm" terimi, bradikinezi, istirahat halinde titreme, yavaş ayak sürüyerek yürüyüş ve dengesizliği içeren bir klinik sendromu ifade eder (Reich ve Savitt, 2018). Parkinsonizmin en yaygın nedeni PH'dir. Çalışmaların çoğunluğu merkezi sinir sisteminin hedeflendiği semptomlar üzerine yapılmış fakat son dönemde daha geniş yelpazede incelenen ve artık daha çok parkinsonizm terimi ile parkinsonizm şemsiyesi altında toplanan semptomların her hastada alfa sinükleinopati görülmediği ve periferik sinir sistemini de etkilediğinin görülmesi araştırmaların PSS'ye kaymasına neden olmuş, ayrıca periferik nöropatinin kötü parkinson fenotipinin bir biyobelirteci olduğunu bildirilmiştir (Merola ve diğerleri, 2017).

2.4.1. Parkinson Hastalığı ve Parkinsonizm Hayvan Modelleri

Kronik ve ilerleyici bir hareket bozukluğu ve en sık görülen ikinci nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığı (PH), pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen, yeni tedavilerin geliştirilmesine yönelik hala karşılanmamış bir klinik ihtiyaç vardır. Çünkü şu anda

yalnızca semptomatik tedaviler mevcuttur. Bu amaca ulaşmak için patolojinin aydınlatılması gerekir. İnsan PH'sini taklit etmek için girişimlerde bulunulmuş ve yıllardır çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir (Kin ve diğerleri, 2019). Her ne kadar hiçbir model patolojiyi kesin olarak özetlemese de, yine de hastalığı ve tedavi seçeneklerinin sınırlamalarının anlaşılmasında katkıda bulunan değerli bilgiler sağlamaktadırlar. İlaçlar, nörotoksinler, pestisitler, genetik değişiklikler, α -sinüklein aşılması ve viral vektör enjeksiyonları uygulanarak yaratılan parkinsonizm semptomlarına odaklanarak Parkinson araştırmaları için mevcut hayvan modelleri ile çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Dovonou ve diğerleri, 2023).

İlaç enjeksiyonu ile indüklenmiş parkinsonizm modeli, ikincil parkinsonizmin en yaygın şeklidir; bu, indüklenmiş parkinsonizm Parkinson hastalığına benzer semptomlar ürettiği anlamına gelir. İlaç ile indüklenmiş tipik semptomlar arasında koku alma bozukluğu, hareketi başlatma ve kontrol etme güçlüğü, hareket kaybı veya zayıflığı ve istirahatte titreme yer alır. Mevcut semptomlar parkinsonizm şemsiyesi altında toplanmaktadır.

2.5. Veziküler monoamin taşıyıcıları (VMAT)

Veziküler monoamin taşıyıcıları (VMAT), sitozolik monoaminlerin monoaminerjik nöronlardaki sinaptik keseciklere alınmasından sorumludur. Farklı farmakolojik özelliklere ve doku dağılımlarına sahip, birbiriyle yakından ilişkili iki VMAT karakterize edilmiştir. VMAT1 tercihen nöroendokrin hücrelerde eksprese edilir ve VMAT2 öncelikle MSS'de eksprese edilir. Çeşitli psikostimulanların nörotoksitesi ve bağımlılık yapıcı özellikleri, kısmen bunların VMAT2 işlevleri üzerinde etkili olmasına bağlanmıştır. PET taramasıyla VMAT2 yoğunluğunun niceliksel değerlendirmesi, Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının ve uyuşturucu bağımlılığının erken teşhisi ve ilerlemesinin izlenmesi için klinik olarak yararlı olmuştur (Wimalasena, 2011).

2.6. Rezerpin

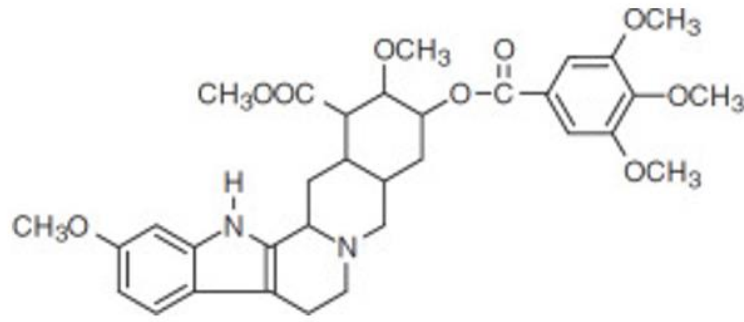
Rezerpin, *Rauwolfia serpentina* bitkisinden izole edilen düzinelerce indol alkaloidinden biridir (Ramawat ve diğerleri, 1999).



Şekil 9. *Rauvolfia serpentina* (Sharma ve diğerleri, 2022)

Rezerpin, adrenerjik alım inhibitörü olarak hareket ederek sempatotik bir ajan olarak işlev görür. Rezerpin, VMAT-1 ve VMAT-2'yi geri döndürülemez şekilde bloke eder ve presinaptik nöronlardaki veziküllerde noradrenalin, dopamin ve serotonin depolanmasını engeller. Bu tıkanma, monoaminlerin vezikül içine depolanmasını engeller ve bu da sinir terminallerindeki katekolaminlerin tükenmesine neden olur. Bu monoamin kaybı hipolokomasyona ve kas sertliğine yol açar. Hücrel monoamin içeriğini tüketme kapasitesi nedeniyle ilk olarak antihipertansif ilaç olarak kullanılan rezerpinin klinik uygulaması, hastalarda uyuşukluk, depresyon ve motor diskinezi gelişmesiyle sonuçlanmaktadır (Dovonou ve diğerleri, 2023). Sinaptik terminalde nörotransmitterlerin birikmesi, bu maddelerin metabolizmasında monoaminoksidaz tarafından artışa neden olur, serbest radikaller ve artan oksidatif stresle hücrel hasar oluşturur. Monoamin nörotransmitter miktarını etkilediği için anksiyete, depresyon veya psikoz tedavisi için kullanılabilir (John, 2011). Rezerpin yağda çözünür, dolayısıyla kan-beyin bariyerini geçebilir ve sinir sisteminin aktivitesini yavaşlatabilir (Zhu ve diğerleri, 2019). Rezerpin, büyük ölçüde inaktif bileşiklere metabolize edilir. Yavaş yavaş idrar ve dışkı yoluyla atılır. Yüksek dozlarda (0,5 mg veya daha yüksek) merkezi sinir sistemi etkileri uyuşukluk, baş dönmesi, kabuslar, Parkinsonizm, genel halsizlik ve yorgunluğu içerir (Barcelos ve diğerleri, 2010). Sıçanlarda, rezerpin uygulaması Parkinson

hastalığında olduğu gibi motor performansta cinsel açıdan dimorfik bozukluklara neden olur. Ayrıca hafıza eksikliklerinin yanı sıra, rezerpin aynı zamanda PH'nin klinik öncesi belirtileriyle (uyku anormallikleri, anksiyete, depresif benzeri davranış ve gastrointestinal fonksiyon bozukluğu) ilgili çeşitli motor dışı özellikler de üretir. Doz konsantrasyonunu ve uygulamayı ayarlama olanağı, PH semptomatolojisine ilişkin birden fazla metot ile çalışmaya olanak tanır. Bu nedenle rezerpin, Parkinson hastalığının ilerlemesini ve nörokimyasal özelliklerini incelemek için bir model olarak kullanılabilir. (Dovonou ve diğerleri, 2023).



Şekil 10. Rezerpin, metil ester 2a,11-dimetoksi-3-(3,4,5-trimetoksibenzoiloksi)-yohimban-1-karboksilik asit

2.7. Ultrases

Ultrases, teşhis ve tedavi amaçlı olarak deri altı akustik enerjinin uygulandığı bir yöntemdir. Piezoelektrik kristal tarafından üretilen ses dalgaları, doku iyileşmesinde rol oynayan bir dizi fizyolojik değişikliği tetiklemek için çeşitli vücut dokuları aracılığıyla iletilir (Mundi ve diğerleri, 2019). Belirli bir doku tarafından emilen ses dalgalarının oranı, o doku yoğunluğuyla doğrudan ilişkilidir. Ultrases, insan kulağının duyamayacağı, frekansı 20 kHz'in üzerinde olan bir ses dalgasıdır. Ultrases, bir malzemenin parçacıklarının veya moleküllerinin mekanik titreşiminden oluşur. Her parçacık dinlenme konumundan küçük mesafeler uzağa hareket etse de, titreşim enerjisi malzeme boyunca parçacıktan parçacığa bir dalga olarak yayılır. Ses dalgaları, her bir parçacığın titreşiminin yayılma yönüne paralel veya enine olmasına bağlı olarak boyuna veya enine dalgalar olarak sınıflandırılır (Ziskin, 1992).

Ultrases tedavisinin tıpta yeni uygulamalarla dolu uzun bir geçmişi vardır. Doku ısıtmak için kullanılan yüksek yoğunluklu ultrasesle karşılaştırıldığında, düşük yoğunluklu ultrases, biyolojik olarak önemli sıcaklık artışı olmadan terapötik değişiklikleri tetikleme kabiliyeti nedeniyle son zamanlarda artan ilgi çekmektedir. Düşük yoğunluklu darbeleri ultrases (LIPUS), düşük yoğunlukta dağıtım yapan ve darbeleri dalgalar modunda çıktı veren özel bir ultrases türüdür. Terapötik uygulamalar için noninvaziv fiziksel uyarı sağlayabilen, akustik enerjinin hedef dokuya iletimini korurken minimum termal etkiye sahiptir. LIPUS'un hem hayvan hem de klinik çalışmalarda yeni kırık, kaynamama ve gecikmiş kaynamanın iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Yumuşak doku rejenerasyonu ve inflamatuvar yanıtların engellenmesi uygulamalarında LIPUS'un etkinliği de deneysel olarak araştırılmıştır. Ek olarak araştırmalar, LIPUS'un nöromodülasyon için umut verici bir yöntem olduğunu göstermiştir (Jiang ve diğerleri, 2019).

Ultrasesik dalga parametreleri; frekans, basınç, dalga boyu, hız, güç ve yoğunluk. Frekans, her bir parçacığın saniyede geçirdiği salınımların sayısıdır. Tanısal ultrases (US) uygulamalarında kullanılan frekanslar 1 ila 30 MHz ve daha yüksek arasında değişir. Genel olarak frekans ne kadar yüksek olursa ışın sapması o kadar küçük olur ve ışın genişliği de o kadar dar olur. İyi yanal çözünürlük için küçük ışın genişlikleri gereklidir. Düşük yoğunluklu ultrases, orta frekanslı ultrasese (1-3 MHz) sahip termojenik olmayan ve tahribatsız sürekli bir dalgadır ve düşük yoğunlukta iletilir. Düşük yoğunluklu US'nin frekansı ses dalgasının 1 ila 2 cm'den (1 MHz) 3-5 cm'ye (3 MHz) kadar biyolojik dokulara nüfuz etmesine izin verir (Takebe ve diğerleri, 2014). Güç ve yoğunluk, bir ultrases dalgasının “gücünün” ölçüm birimleridir. Güç, birim zaman başına bir yüzeyden akan toplam enerji miktarıdır ve watt cinsinden ifade edilir. Yoğunluk, birim zaman başına enerji konsantrasyonudur, yani birim zaman başına birim alan başına enerjidir ve santimetre kare başına watt cinsinden ifade edilir. Yoğunluk, ultrases ışınının genişliğine bağlı olarak değişir. Bu nedenle, odaklanmış ses ışınları için yoğunluk, ışın genişliğinin en dar olduğu odak noktasında en yüksektir. Darbeleri ultrases ışınları için en yüksek yoğunluk değeri darbe sırasında oluşur ve darbeler arasında sıfırdır. Bu nedenle akustik yoğunlukların zamansal ortalamalar mı yoksa zamansal zirveler mi olduğuna ve uzaysal ortalamalar mı yoksa uzaysal zirveler mi olduğuna göre belirtilmesi gerekir. Çeşitli tıbbi uygulamalar için uzaysal tepe ve zamansal ortalama yoğunluk değerleri Tablo 1'de listelenmiştir (Ziskin, 1993). Düşük şiddetli darbeleri ultrasesin sinir hasar modellerinde rejenerasyonu hızlandırdığı, schwann hücrelerinin proliferasyonu ile nöral soya ait çeşitli gen ve protein ekspresyonlarını arttırdığı rapor edilmektedir (Akhlaghi ve diğerleri, 2012; Jiang ve diğerleri, 2016; Daeschler ve diğerleri, 2018). Bunların yanında ultrasesin, sinirde meydana

gelen anormalliklerin, demiyelinizan hasar ve immun aracılı nöropatilerin tedavisinde (Argyriou ve diğerleri, 2013), ve nöropatik ağrının tedavisinde (Hsieh ve diğerleri, 2017) kullanılabilecek bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Düşük şiddetli darbeli (1 MHz, 1 W/cm²) ultrasesin tip 2 diyabet hastalarındaki karpal tunnel sendromu üzerine (Ahmed ve diğerleri, 2017), ve düşük frekanslı sürekli ultrasesin (1 MHz 1.5 W/cm²) ulnar nöropati tedavisinde olumlu etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Ozkan ve diğerleri, 2015).

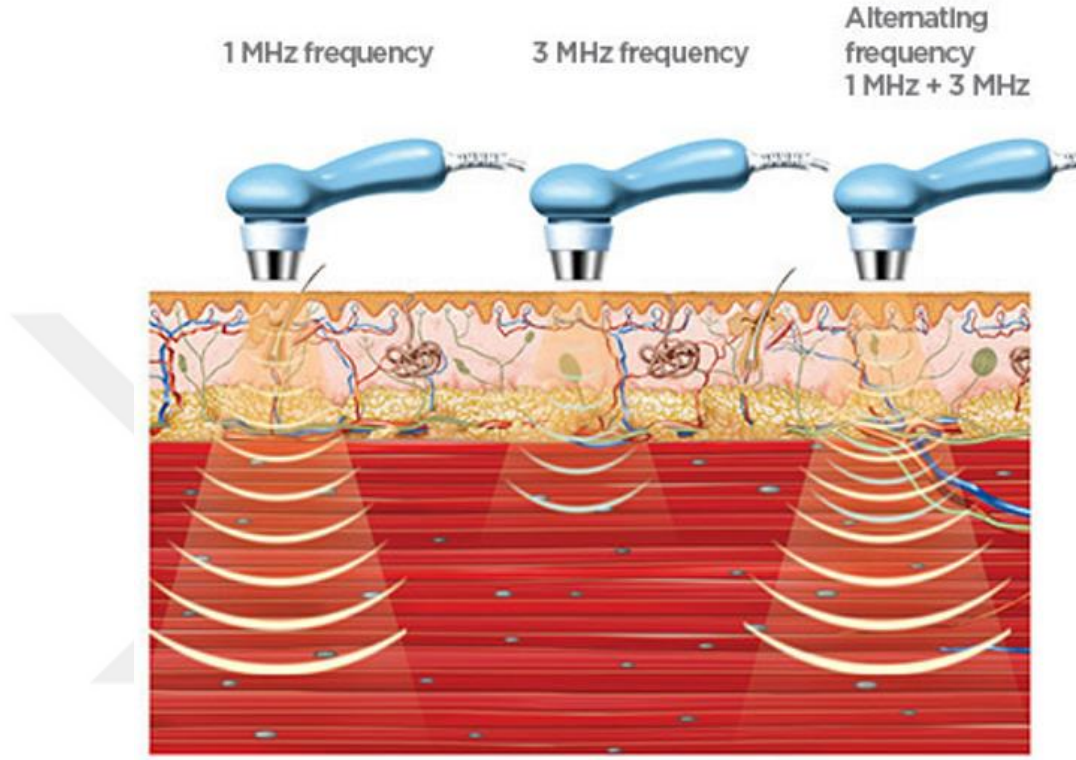
Tablo 1. Tıbbi uygulamalarda kullanılan ultrasesik yoğunluklar (Ziskin, 1993)

Uygulama	Yoğunluk (W/cm ²)
Cerrahi	>10
Terapötik	1-3
Tanısal Görüntüleme	< 0.1
Doppler	< 1.0

2.7.1. Ultrases Dalgalarının Biyofiziksel Etkileri

Ultrasesin biyolojik dokular üzerine termal ve nontermal olmak üzere iki tür etkisi bulunmaktadır (O'Brien, 2007). Termal etkide ultrases dalgasının taşıdığı enerji hedef doku içinde yayılırken sıcaklık artışına neden olur ve ağrının hafifletilmesi gibi fonksiyonel etkiler gösterir. Nontermal etkide akustik enerji, doku sıvısında ilerlemesi sırasında meydana gelen basınç değişimlerinden kaynaklanan mikroskobik baloncukları ifade eden kavitasyonla hücrelere etkir (O'Brien, 2007). Nontermal etki, ultrasesik kavitasyon ile birlikte serbest radikaller, singlet oksijen, ultrasese bağlı apoptoz ve pek çok mekanizmanın birleşmesinin etkili olduğu durumlar şeklinde açıklanabilir. Ultrasesin kavitasyon etkisinden özellikle kanser hücre ölümünü sağlamak amacıyla faydalanılmaktadır. Canlılara uygulanan düşük stres seviyelerinin (oksidatif stres, ısı şoku, hipoksi, kalori kısıtlaması, sitotoksik ajanlar gibi) hormetik mekanizmalar ile ömrü uzattığına ve tedavi edici etkiler oluşturduğuna dair görüşler mevcuttur (Blagosklonny, 2011). Literatürde düşük doz radyasyonun hormetik bir uyarım ile adaptif korunma yollarını aktive ederek olumlu etkiler yaptığına (Feinendegen, 2005), ve düşük seviyeli ışık terapisinin (LLLT) hormetik doz-cevap eğrilerine benzer bir etkiye neden olarak iskelet kası oksidatif metabolizması (Hayworth ve diğerleri, 2010) ve sinir sistemi ile göz

(Rojas ve Gonzales-Lima, 2011) ve yara iyileşmesi (Calabrese ve diğerleri, 2013) üzerine olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle, parkinsonizme bağlı olarak oluşan periferik sinir hasarında uygulanacak ultrasesin tedavi edici etkisini hücre uyarımı yoluyla gerçekleştirecek hormezis sonucu oluşturacağı düşünülmektedir.



Şekil 11. Ultrasesin farklı frekanslarda doku içerisinde izlediği yol

Isı, nekroz ve apoptoz, anormal hücre göçü, değiştirilmiş gen ekspresyonu ve membran disfonksiyonu gibi çok çeşitli doku hasarı üretir. Termal maruziyetin, nöronal dokuda miyelinizasyonda ve hücre hasarında olumsuz değişiklikler ürettiği gösterilmiştir (Miller ve Ziskin 1989). Ultrases, ışının odak alanındaki sıcaklığı artırır ve bu nedenle dokuda termal değişikliklere neden olma potansiyeline sahiptir. Ultrases frekansı, odaklanma, darbe süresi, maruz kalma süresi ve absorpsiyon katsayısı, ultrases maruz kalma sırasında sıcaklık artışının birincil belirleyicileridir. Sıcaklıkta böyle bir artış, ultrasesle indüklenen ısı üretimi oranı doku perfüzyonu yoluyla ısı dağılımını aşarsa meydana gelir. Hiçbir ısı kaybı olmadığı varsayıldığında, maksimum sıcaklık artışı doğrudan birim hacim başına ısı üretim hızı ve maruz kalma süresi ile ilgilidir (Shankar ve Pagel, 2011).

Tablo 2. Ultrasesin neden olduğu doku sıcaklık değişiklikleri (Shankar ve Pagel, 2011)

Ultrases Parametreleri	Doku Karakteristikleri
Darbe süresi	Termal iletkenlik
Frekans	Zayıflama
Odaklanma	Soğurma katsayısı
Darbe Tekrar Sayısı	Akustik empedans

2.7.2. Ultrasesin Etki Mekanizması

US'nin uygulanmasında ortaya çıkaracağı etkiler; artan kan akımı, doku metabolizmasında artma, aksonal fonksiyonda değişme, konnektif dokunun elastikiyetinin artması ve membranların permeabilitesinin artışıdır.

a) Termal Etkileri: Çeşitli fiziksel enerjiler biyolojik süreçleri etkileyebilir. Bu enerji türlerinden biri de ısı enerjisidir. US uygulaması sonucu oluşan ısı enerjisi dokularda sıcaklığın artmasına neden olur. US dalgaları yağ dokusunda aşırı ısı oluşturmada ve çok fazla enerji kaybetmeden derin dokulara ulaşır ve aşağıdaki etkiler gözlenir (Karamehmetoğlu, 2002; Wilder ve diğerleri, 2007; Basford ve diğerleri, 2005; Kalyon, 2001). Hem arterlerde hem de diğer damar yapılarında genişlemeye neden olarak periferik kan akışında artışa neden olur. Doku metabolizmasında artış yaratır. Hücre zarlarındaki geçirgenliği artırır. Kas spazmını azaltır. Kollajen dokunun uzayabilirliğini artırır. Terapötik dozlarda kemik üzerinde zararlı etkisi yoktur. Ancak yüksek dozlarda kemik nekrozuna neden olabilir ve bu da patolojik kırıklara yol açabilir. Kemik gelişimini geciktirir. Gözde termal ve termal olmayan etkilerle katarakt oluşturur.

b) Isıl olmayan etkiler: Isıl olmayan etkilerin US'nin ortamda yarattığı basınç farklılıklarına bağlı olduğu belirtilmektedir (Karamehmetoğlu, 2002; Wilder ve diğerleri, 2007; Basford ve diğerleri, 2005; Kalyon, 2001). Membranda dalgalı bir hareket oluşturan US enerjisinin etkisi, biyolojik membranların geçirgenliğini artırır ve termal etkisine katkıda bulunur (Wilder ve diğerleri, 2007; Basford ve diğerleri, 2005; Kalyon, 2001). En iyi bilinen termal olmayan etki kavitasyon etkisidir. Kavitasyon, ses alanının kabarcık oluşturma süreci, bu kabarcıkların

çeşitli hareketleri ve bu hareketlerin neden olduğu fiziksel etkiler olarak tanımlanmaktadır. US dalgaları bir ortamdan geçerken emilim nedeniyle enerjilerinin bir kısmını kaybederler. Emilen US enerjisi kısmen ısı enerjisine dönüştürülür. Bu US'nin arzu edilen bir etkisidir. Ancak US'nin etkisi altında parçacıklar sırasıyla sıkıştırılır ve gevşetilir. Bu olay çok kısa bir mesafede gerçekleşir. Bu nedenle biyolojik ortamda çözünen gazlar gevşeme aşamasında serbest hale gelerek küçük kavitasyonlar oluşturur. Kavitasyonlar, sıkıştırma aşamasında ortadan kaybolmazsa, yavaş yavaş büyük boyutlara ulaşarak canlı dokuya zarar verebilir hale gelebilir. Bu reaksiyonun canlı organizmadaki sonucu hücresel yıkım ve peteşiyal kanama ile karakterizedir (Karamehmetoğlu, 2002; Wilder ve diğerleri, 2007; Kalyon, 2001). US'nin aralıklı uygulamasında termal olmayan etki ön planda iken sürekli dalga uygulamasında derin ısı etkisi ön plandadır (Kramer, 1984).

Ultrasesin enerjisi güçlü metot olarak biyolojik etkileri ortaya çıkarmakta etkilidir. Terapötik etki için ultrases yalnızca ısıtma yoluyla değil, aynı zamanda ultrases kavitasyonu, mekanik yükleme veya termal olmayan mekanizmalar yoluyla da etkilidir (Nyborg ve diğerleri, 2002). Biyolojik etkiler açısından artan frekans, doğrusal olmayan akustik bozulmalar veya darbe uzunluğu ısınmayı artırabilir. Radyasyon kuvveti gibi bazı termal olmayan mekanizmaları güçlendirebilir. Frekansın azalması kavitasyon olasılığını artırır. Potansiyel veya yoğunluktaki bir artış, herhangi bir biyolojik etki mekanizmasının olasılığını ve kapsamını artırma eğilimindedir. Terapötik ultrases cihazları, dokuya etkili ultrases enerjisi iletmek için kısa darbeler veya sürekli dalgalar kullanabilir. Bazı cihazlar daha yüksek genlikte çalışır ve bu nedenle şok dalgaları üretme eğilimindedir (Fowlkes ve diğerleri, 2008).

Ultrases dokunun ısınması yolu ile canlı dokular üzerindeki etkisini göstermektedir. Ultrases nedenli ısınma dokularda iki farklı mekanizma ile meydana gelir. Enerji dokular tarafından absorbe edilir ve ısıya dönüştürülür. Ortamların sahip oldukları farklı akustik empedans değerleri enerjinin dönüştüğü ısınmanın düzeyini etkiler. Akustik empedans ortamlarda farklılık göstermektedir; hava en küçük empedansa sahiptir ve sırasıyla yağ, kas, kemik ve su olarak sıralanabilir. Ultrases dalgaları dokulardan geçerken emilir ve ısı enerjisine dönüştürülür. İkinci mekanizma ise komşu dokuların temas yüzeylerinde kompresyon ve ekspansiyon hareketleri yaratarak mikromasaj etkisi yaratmaktır. Böylece bölgesel kan temini artar (Vykhodtseva ve diğerleri, 2001) ve ağrıya olan etkiside de etkili mekanizma ilk mekanizmadır. Endorfini artıran ısının ağrı üzerinde etkisi olabilir (Fowlkes ve diğerleri, 2008).

Ultrases meydana gelen sıcaklık artışının %70'i, ultrasesin uygulama alanındaki ilk dakikalarda ortaya çıkar, ancak ultrases maruziyeti uzadıkça ortam sıcaklığı yükselmeye devam

etmektedir. Uygulanan ultrasesin yoğunluğu ile sıcaklık artışı doğru orantı göstermektedir (Carstensen ve diğerleri, 1990; Doody ve diğerleri, 1999). Ultrases yoğunluğu ve maruz kalma oranı doku sıcaklığının artımını sağlamaktayken, geniş etki bölgesi, mevcut ultrases enerjisinin daha geniş kanlanma bölgesine dağılımını sağlayarak sıcaklık artışının hızında ve derecesinde azalmayı sağlamaktadır (Shankar ve diğerleri, 2011).

Sinir sisteminin ana elemanları olan nöronlar ultrasesin olumsuz etkilerine karşı hassastır. Beynin yüksek yoğunluklu (150-1,500 W/cm²) ultrasese doğrudan maruz bırakılmasıyla da nörol apoptozun gösterdiği gibi termal ve kavitasyon etkileri ürettiği sonucuna varıldı (Vykhodtseva ve diğerleri, 2001). Ek olarak ultrasesin apoptozu tetikleme yeteneği vardır. Hücre ölümünü içeren apoptotik süreçlerin temel moleküler bileşenlerinin ifadesini modüle etmek ilginç bir antineoplastik yaklaşımdır. Apoptoz modüle edici tedavilerin klinik öncesi hayvan modellerinde etkili olduğu gösterildi ve daha sonra insan klinik deneylerine geçildi (Nicholson, 2000).

2.7.3. Ultrasesin Sinir Rejenerasyonu Üzerine Olan Etkisi

Periferik sinir sistemini oluşturan sinirler çoğunlukla gerilim, basınç, ezilme veya parçaya bölünmesi ile hasarlanır ve yeni nesil tekniklerin uygulanmasına rağmen denervasyon frekansı, hasarlanmış fiberlerin tipi ve çapı, yaş ve başka bireysel değişkenlerin etkisinde çok az olasılıkla tamamlanır (Ogard ve Stockert, 1994; Azze ve Mattar, 2000). Manyetik alan, ultrases ve elektriksel faktörler gibi fiziksel argümanların cilt, kemik, kas ve tendonlarda ve periferik sinirlerin farklı hasarlanmaların iyileşmesinde etkili olduğu literatürdeki çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Shen ve Zhu, 1995; Mendonca ve diğerleri, 2003).

Ultrasesin tedavi amaçlı kullanımı ile ilgili araştırmalarda ilk olarak; ulnar ve radial sinirlerin duyu dalları ile ilgili duyu sinir iletim hızlarındaki tetiklenmiş değişimler değerlendirilmiş ve ultrasesin farklı güç yoğunlukları ve sürelerde uygulanmasıyla iletim hızlarındaki bu değişimin arttığı veya azaldığı gözlemlenmiştir. (Madsen ve Gerten, 1961; Zankel, 1966). Ultrasesin bu tedavi edici etkisi sinir sistemini oluşturan sinir liflerinin rejenerasyonunu destekleyerek umut verici terapi yöntemi olması olasıdır. (Crisci ve Ferreira, 2002; Ni ve diğerleri, 2017). US yoğunluğu, klinikte periferik sinir rejenerasyonunun tespit edilmesinde US parametrelerini optimum hale getirmek ve ultrasesin sözü edilen etkilerini gerçekleştiren mekanizmayı göstermek gerekmektedir. Bu bağlamda en önemli parametrelerden birisi olarak US yoğunluğu değerlendirilmelidir. Bu parametreler

düşünüldüğünde periferik sinir lifi rejenerasyonunu sağlayan US yoğunluğunu tespit eden çalışma çok nadiren karşımıza çıkmaktadır. (Hong ve diğerleri, 1988; Akhlaghi ve diğerleri, 2012). US uygulaması sırasında periferik sinirlerin seçici olarak ısılarının arttığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada sürekli 1,5W/cm² dozunda US'nin sinir iletim hızını arttırdığı, periyodik olarak 1,5W/cm² uygulamasının ve plasebo uygulamasının ise sinir iletim hızını azalttığı bulunmuştur. Bu azalmanın nedeninin akuasonik US jelinin subkütanöz sıcaklığı düşürmesinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Kramer, 1984). US'nin sinir iletim hızına etkisi kısa sürelidir. Tedavi sonrasında vücut ısısı normale döndüğünde sinir iletim hızları da normal değerlere döner. Farklı sinir lifleri US'e karşı farklı hassasiyet gösterir. Çeşitli çalışmalar hasar görmüş periferik sinirlerin ve küçük çaplı sinir liflerinin US'ye daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Karamehmetoğlu, 2002; Basford ve diğerleri, 2005).

2.7.4. Düşük Yoğunluklu Darbeli Ultrases

US terapisinin tıpta bir çok yeni uygulama metoduyla dolu geçmişi vardır. Dokuları ısıtmak için kullanılan yüksek yoğunluklu US ile karşılaştırıldığında, düşük yoğunluklu US, biyolojik olarak önemli sıcaklık artışı olmadan terapötik değişiklikleri tetikleme yeteneği nedeniyle son yıllarda ilgi çekmektedir. Düşük yoğunluklu darbeleri ultrases (LIPUS), düşük yoğunlukta yayılımı olan ve darbeleri dalgalar modunda çıktı veren özel bir US türüdür. Terapötik uygulamalar için non-invaziv fiziksel uyarı ortaya çıkarabilen, akustik enerjinin hedef dokuya iletimini korurken minimum termal etkiye sahiptir (Miller ve diğerleri, 2012; Jiang ve diğerleri, 2019). LIPUS'un hem hayvan hem de klinik çalışmalarda yeni kırık, kaynamama ve gecikmiş kaynamanın iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Yumuşak doku rejenerasyonu ve inflamatuvar yanıtların engellenmesi uygulamalarında LIPUS'un etkinliği de deneysel olarak araştırılmıştır. Ek olarak araştırmalar, LIPUS'un nöromodülasyon için umut verici bir yöntem olduğunu göstermiştir (Jiang ve diğerleri, 2019). LIPUS çoğunlukla elektrik enerjisini mekanik kuvvete dönüştüren piezoelektrik sensör tarafından üretilmekte ve bu periyodik akustik dalgalar, ortam iletkenliği ile hedef dokuda titreşime ve çarpışmaya neden olabilir (Khanna ve diğerleri, 2009; Jiang ve diğerleri, 2019). Bu özellikleriyle US hedeflenen dokuda minimum termal ve non-termal etkilerle etkisini göstermektedir (Baker ve diğerleri, 2001). Süreçte, LIPUS'un non-termal etkilerinden olan kavitasyon, akustik akış ve mekanik uyarım, sonuçlara ulaşmak için mikro kabarcıklar ve mikro jetler üretir (Lin ve diğerleri, 2016). Bu termal olmayan mekanizma aynı zamanda LIPUS'un doku üzerindeki etkisi sırasında akustik akışın etkisiyle de açıklanabilir. Bu akustik akış, US maruziyeti sonrasında hücrelerin potasyum ve

kalsiyum kompozisyonunu etkileyerek hücrelerin yerel mikro ortamını değiştirebilir (Tanaka ve diğerleri, 2015). LIPUS aynı zamanda yumuşak doku rejenerasyonunda etkili mekanik gücü de sağlayarak (Lai ve diğerleri, 2021), inflamasyonu ve nöromodülasyonu da sağlamaktadır (Xu ve diğerleri, 2021; Sung ve diğerleri, 2022). Bu yönleriyle US'nin uygulamalar için invaziv olmayan bir fiziksel uyarıcı olduğu gösterilmiştir. US, insanın işitme sınırı olan 20 kHz'in üzerindeki frekanslarda bir akustik enerji biçimi olduğundan, düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin kullanımı genellikle 1-3 MHz frekans aralığındadır. Düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavilerinin diğer parametreleri olan US yoğunluğu ve terapi süresine bakıldığında, uzaysal ortalamada 0,02-1 W/cm² aralığında bir ultrases yoğunluğu ve günde 5-20 dakikalık bir tedavi sürecini içermektedir (Awad ve diğerleri, 2012; Fontes-Pereira ve diğerleri, 2013; Savchenko 2017). Düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin terapötik uygulamaları hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak araştırılmıştır ve umut verici sonuçlar, klinik deneylerde daha ileri araştırmalar için bir yol açmıştır. LIPUS tarafından üretilen yüksek frekanslı basınç dalgaları, hedeflenen dokuda mekanik uyarı üretebilir ve doku iyileşmesi ve yenilenmesi için biyokimyasal olayları tetikleyebilir. LIPUS ile uyarılan doku iyileşmesine ilişkin terapötik mekanizmalar tam olarak açıklanmamıştır. Bununla birlikte, LIPUS'un biyofiziksel etkilerinden mekanik stres ve/veya sıvı mikroakışkanların sorumlu olması muhtemeldir (Tanaka ve diğerleri, 2015). Ve bu olaylar hücre plazma zarını etkilediğinde, hücre içi sinyal iletimini ve ardından gen transkripsiyonunu tetikler. Elde edilen sonuçlar, düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin faydalı etkilerini ve kemik iyileşmesini sağlamak, yumuşak doku rejenerasyonunu hızlandırmak, ortaya çıkabilecek olan fizyolojik inflamatuvar yanıtları inhibe etmek ve nöromodülasyon gibi alanlar dahil olmak üzere geniş uygulama potansiyelini gösterdi (Jiang ve diğerleri, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

BTL5710 SONO US cihazı (BTL Medical Technologies, Çekya), buzdolabı (Bosch, KDN56NW20N, Almanya) ve -80°C derin dondurucu (MELING, Çin), hassas terazi (Denver Instruments, SI-234, Almanya), buz makinesi (Scotsman AF80, İtalya), damıtılmış su cihazı (Nuve, ND12, Türkiye), masaüstü santrifüj (Isolab, MCZ001267, Almanya), vortex (Yellowline IKA TTS2, ABD), ısı bloğu (Termo Mikser, TS100, Türkiye), spektrofotometre (Epoch, Biotek, ABD), çalkalayıcı (Hangzhou miu instruments TS-300, Çin), manyetik karıştırıcı (Nüve, MK 318), Türkiye), Western blot Seti (Biorad Mini PROTEAN Tetra Cell, 552BR, ABD), otoklav (HMC Hirayama, Japonya), pH metre (HANNA Instruments, ABD), sonikatör (Bandelin Ultrasesic HD2200, Almanya), soğutmalı santrifüj (Hettich zentrifugen MIKRO 200r, Almanya), mikropipet seti (Clever Scientific, İngiltere), görüntüleme cihazı (G:Box Syngene, DR4V/1309, İngiltere), elektronöromiyografi (ENMG) cihazı (Neurosoft-Neuro-MEP Micro Electronic Unit, Russia), siyatik fonksiyonel indeks (SFI) yürüme platformu, ışık mikroskobu (Olympus CX21, Japonya), mikrotom cihazı (Leica, RM 2135, Almanya), parafin cihazı (Leica, EG 1110, Almanya), çoklu boyama aparatı (Biogen, ABD).

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Proteaz inhibitör kokteyli (BioVision, USA, K297), Bradford assay kiti (ABY Bioscience, P010A, USA), Tris-Base (Sigma Life Science, T1503, USA), glisin (Sigma-Aldrich, 15527, China), RIPA lizis tamponu 10X (EMD Millipore, 20-188, Germany), metanol (Merck), sodyum klorür (Sigma Life Science, S3014, Germany), sodyum dodesil sülfat (Multicell, 800-100-EG, USA), Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379, France), 2-merkaptotanol (Biotech, UN2966, USA), amonyum persülfat (Sigma Life Science, A3678, Japan), akrilamid (Sigma Life Science, A3553, China), bisakrilamid, TEMED (Sigma Life Science, T9281, China), loading Dye-SDS-Page (Pagesta, 5x SDS-PAGE sample buffer, 751-00, Korea), yağsız

süt tozu (Evka), filtre kağıdı-Whatman kağıdı (Cytiva, 1001-125, China), PVDF membran (Bio-Rad, D9160172A), protein marker (GeneDirex-BLUeye Prestained Protein Ladder, PM007-0500, USA), Bcl-2 mouse monoklonal antikor (Bioss, bsm-3304M, USA), beta-aktin mouse monoklonal antikor (Santa cruz, sc-47778, USA), anti-mouse IgG, HRP-linked antikor (Cell Signaling, 7076S, Netherlands), Bax mouse monoklonal antikor (Bioss, bsm-33283M, USA), Parkin mouse monoklonal antikor (Cell signaling, 4211S, Netherlands), ECL (Clarity Western ECL Substrate Biorad, 170-5060, USA), luksol fast blue boyama kiti (Atom Scientific, RRSK345-100, UK), Masson trikrom boyama kiti (Atom Scientific, RRSK20-100, UK), hematoksilen (RRSP67-E) & eozin (RRSP35-E) boyama kiti (Atom Scientific, UK), krezil viyole (Atom Scientific, RRSP251-A, UK), etanol (İsolab, %96, UN1170, Germany), ksilol (Merck, 108297, Germany), parafin (56-58°C Tekkim, 8002-74-2, Turkey), entellan (Merck, HX90503161, Germany).

3.2. Yöntem

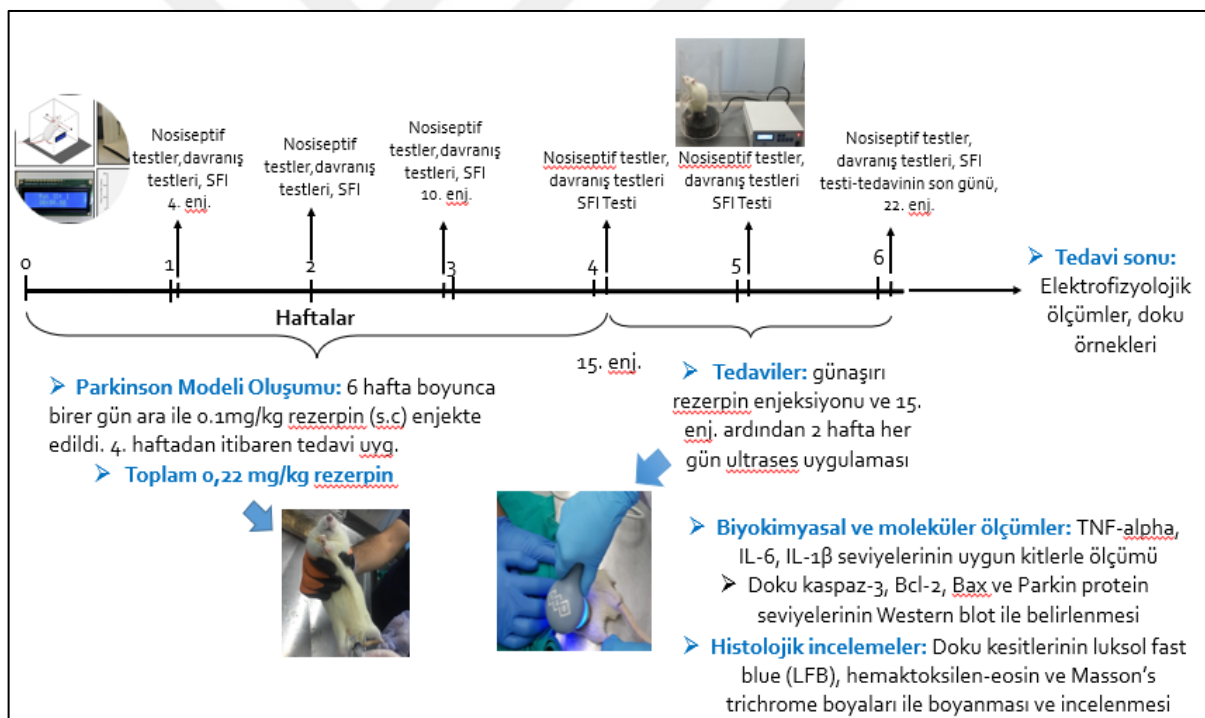
3.2.1. Çalışma Grupları

Çalışmada yer alan hayvan deneyleri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Üretim Merkezi ve Araştırma Laboratuvarı'nda Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Ek 1: Etik kurul kararı no:64583101/2020/119). Araştırmada Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Üretim Merkezi'nden temin edilen 250-300 g ağırlığında 40 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Araştırmada kullanılan tüm deney hayvanları, 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık, $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %45-60 bağıl nem ve isteğe bağlı beslenme koşulları sağlanan standart yarı iklimlendirilmiş laboratuvar koşullarında tutuldu. Çalışmada her grupta 10 deney hayvanı olacak şekilde 4 deney grubu oluşturuldu. Deneyde kullanılan hayvanlara uygulanacak bütün prosedürler etik kurallara uygun şekilde gerçekleştirildi.

1. Grup (Kontrol): Bu gruptaki ratlara rezerpinin çözücüsü olan % 0.5 buzlu glasiyel asetik asit ve distile su karışımı 1 gün ara ile 45 gün sürede 22 defa subkutanöz olarak enjekte edildi.

2. Grup (Rezerpin): Bu gruptaki ratlara buzlu glasiyel asetik asit içinde çözüldükten sonra damıtılmış su ile doğru konsantrasyona seyreltilen rezerpin 0.1 mg/kg dozunda olacak şekilde 1 gün ara ile 45 gün sürede 22 defa subkutan olarak enjekte edildi.

4. Grup (Rezerpin+Ultrases, 1 MHz 1.5 W/cm²): Bu gruptaki ratlara buzlu glasiyel asetik asit içinde çözüldükten sonra damıtılmış su ile doğru konsantrasyona seyreltilmiş olan rezerpin 0.1 mg/kg dozunda olacak şekilde 1 gün ara ile 45 gün sürede 22 defa subkutan olarak enjekte edildi. Ve 15. enjeksiyonun ardından (30. gün sonrasında) her iki siyatik sinir üzerine 14 gün boyunca her gün 1 MHz frekansında 1.5 W/cm² güç yoğunluğunda düşük yoğunluklu darbeleri ultrases uygulaması gerçekleştirildi.



Şekil 12. Deney planının zamansal gösterimi ve deney özeti

3.2.1.1. Sinir Sistemi Dejenerasyon Modelinin Oluşturulması ve Rezerpin Uygulaması

Rezerpin enjeksiyonu ile oluşan Parkinsonizm, PH araştırmalarında kullanılan en eski hayvan modellerindendir. Parkinson Hastalığı nörokimyasının oldukça kaba bir farmakolojik taklidi olmasına rağmen, bu model Parkinson Hastalığı için hala altın standart tedavi olan L-DOPA'nın terapötik etkinliğini ilk kez göstermede etkili olması ile endojen dopamin öncüsü olan L-DOPA'nın, farelerde rezerpin maruziyeti ile ortaya çıkan semptomları tersine çevirme yeteneğini göstermiştir (Carlsson ve diğerleri, 1957). Bu bağlamda rezerpin modeli, neden olduğu monoamin tükenmesi ve parkinsonizm arasındaki ilişkinin anlaşılmasında önemli katkılar sağlamıştır (Duty ve Janner, 2011).

Parkinsonizmin ilerleyici doğasını analiz etmek için bir hayvan modeli olarak düşük dozda (0,1 mg / kg) rezerpinin tekrar tekrar uygulanmasını öneren alışmalar (Fernandes ve diğerleri, 2012; Santos ve diğerleri, 2013) ışığında bu protokolün parkinsonizmin çeşitli moleküler ve biyokimyasal özelliklerini temsil ettiği bildirilmiştir (Leão ve diğerleri, 2015; Leal ve diğerleri 2016; Leal ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, çalışmanın amacı doğrultusunda, rezerpin ile indüklenen Parkinsonizm semptomların periferik sinir dejenerasyonunun gösterilmesi ve düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin terapötik etkinliğinin gösterilmesi amacıyla kullanılacak periferik sinir sistemi dejenerasyon modelinin oluşturulması için monoamin nörotransmitter tükenmesine yol açan tekrarlı rezerpin enjeksiyonu kullanılmıştır.



Resim 1. Subkütanöz enjeksiyon yöntemiyle rezerpin uygulaması

Rezerpin enjeksiyonu yapılan gruplarda buzlu glasiyel asetik asit içinde çözüldükten sonra damıtılmış su ile doğru konsantrasyona seyreltilmiş olan rezerpin, her enjeksiyonda 0.1 mg/kg dozunda olacak şekilde ayarlanarak 1 gün ara ile 45 gün boyunca (toplam 22 defa) subkutan olarak enjekte edildi. Uygulanan bu protokol literatür ışığında seçilmiş ve tüm enjeksiyonların sonunda deneklerin almış olduğu kümülatif rezerpin dozu 0.22 mg/kg olarak belirlendi (Leal ve diğerleri, 2019).

3.2.1.2. Ultrases Tedavisi

Düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavisi, Rezerpin enjeksiyonu ile indüklenmiş parkinsonizme bağlı olarak periferik sinir dejenerasyonuna sahip Wistar albino ratlara BTL5710 SONO US cihazı (BTL Medical Technologies, Çekya) kullanılarak uygulandı. Ultrases tedavisi, rezerpinin 15. enjeksiyonundan sonra (rezerpin enjeksiyonunun 30. gününden itibaren) uygulandı. Uygulama için sıçanlar prone pozisyonda tutuldu ve sakinleşmeleri amacıyla başları kapatılarak 3 dakika boyunca aynı pozisyonda sabit kalmaları sağlandı. US, arka ekstremitenin dorsolateral bölgesinde, her iki bacakta da femur lateralinde siyatik sinirin üzerinde yaklaşık 5 cm²'lik bir cilt alanına 3 dakika süreyle uygulandı. US tedavisi her iki bacağı (sağ ve sol bacak) 1 MHz frekansta ve 0,5 W/cm² ve 1,5 W/cm² güç yoğunluğunda darbeli modda %20 görev döngüsünde 15 gün süreyle her gün uygulandı. Ultrases tedavisi sırasında deneklere gün aşırı rezerpin enjeksiyonuna devam edildi.

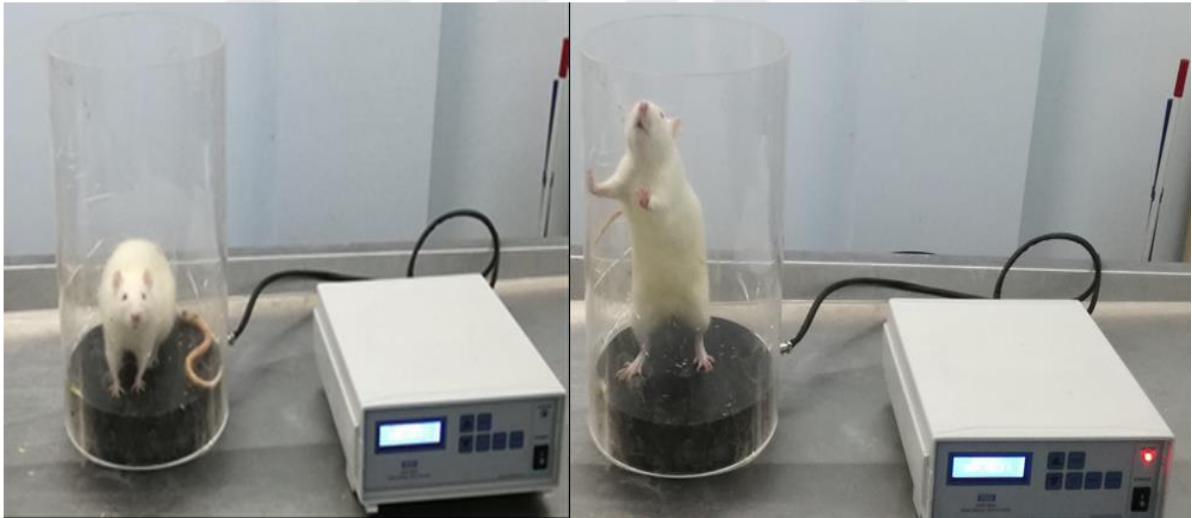


Resim 2. BTL5710 SONO US cihazı (BTL Medical Technologies, Çekya)

3.2.2. Nosiseptif Hot Plate (Isı Plakası) Testi Uygulaması

Rezerpin ile oluşturulan sinir sistemi dejenerasyonunun ve düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin oluşturulan bu nörodejenerasyonda termal ağrı algısı üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla nosiseptif ısı plakası testi altı hafta boyunca, haftada bir defa uygulandı.

Hot plate testi uygulamasında, daire şeklinde metal düz yüzeyi bulunan ve uygulamadan önce $55\pm0,3^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılan hot plate platformu (May Tic., Ankara) kullanıldı. Deneklerin ısıtılmış cihazın üzerine konulmasından sonra arka ayaklarını yalama, idrar yapma, defakasyon ve sıçrama gibi reaksiyonlarının süresi termal uyarıya cevap olarak değerlendirildi. Deney hayvanlarında cihazdaki ısıdan kaynaklı oluşabilecek hasarı önlemek amacıyla, deney hayvanının platformda kalacağı en uzun süre (cut-off değeri) 15 sn olarak belirlenip, bu süreye ulaşılması veya aşılması durumunda deney hayvanı gözlemci tarafından platformdan alındı.



Resim 3. Deneklere hot plate testi uygulaması

3.2.3. Motor Fonksiyonla İlişkili Davranış Değerlendirme Testleri

3.2.3.1. Silindir Testi

Silindir testi, kemirgenin kendiliğinden ön ayak kullanımını ölçer; bu, ön ayak kullanım asimetrisine neden olan bir dizi yaralanma modelinde duyu-motor fonksiyonunu değerlendirmek için kullanılabilir (Schallert ve diğerleri, 2000). Silindir testi, literatürde kontralateral pençenin fonksiyonel iyileşmesine dayalı antiparkinson terapötik müdahalelerin klinik öncesi taramasını değerlendirmek için kullanılmıştır (Kriks ve diğerleri, 2011; Francardo ve diğerleri, 2014; Fischer ve diğerleri, 2017; Magno ve diğerleri, 2019). Silindir testinde sıçan 25 cm cam silindir beher içerisine yerleştirildi ve 120 saniye süre içerisinde arka ayakları üzerinde kalkarak cam çeperlere ön ayaklarını sağ-sol olarak ayrı ayrı ve çift ayak olarak birlikte toplam temas sayısı değerlendirilmiştir. Test altı haftalık hayvan deneyleri boyunca haftada bir kere gerçekleştirildi, her hafta ölçümünde de 30 dakika ara ile 2 defa tekrar edildi. Silindir testinin gerçekleştirilmesinin kolay olduğu ve diğer davranışsal testlerin tespit edemediği motor bozuklukları tespit etmede hassas olduğu bildirilmektedir (Lundblad ve diğerleri, 2002).



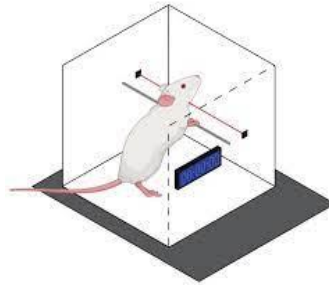
Resim 4. Silindir test

3.2.3.2. Katalepsi Testi

Katalepsi, kas sertliğinin davranışsal bir durumudur (Alvarez-Cervera ve diğerleri, 2005). Katalepsi aynı zamanda Parkinson hastalığındaki (Alam ve Schmidt, 2002) ve katatonik şizofrenideki (Sanberg ve diğerleri, 1988) semptomlarla da benzerlik göstermektedir. Kemirgenlerde anormal bir pozisyona yerleştirildiğinde ve uzun süre bu pozisyonda kaldıklarında katalepsi görülebilmektedir (Banasikowski ve Beninger, 2012). Çalışmalar, katalepsinin postsinaptik D2 reseptörlerinde DA iletiminin azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Wadenberg ve diğerleri, 2000).



Resim 5. Katalepsi test

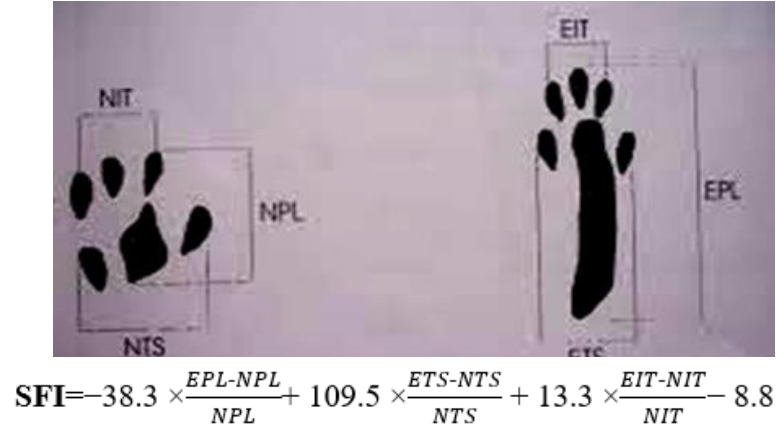


Şekil 13. Katalepsi şeması (Luciani ve diğerleri, 2020)

Katalepsi testinde yerden 12 cm yüksekliğe genişçe bir çubuk yerleştirilen platformda; sıçanlar, ön ayakları çubuğa ve diğer bacakları aparatın zeminine temas edecek şekilde konumlandırıldı. Sıçanların bu duruşu düzeltmesi için kaydedilen süre, katalepsi yoğunluğunun bir göstergesi olarak kaydedildi. Literatürde bildirildiği üzere, katalepsili bir sıçan uzun bir süre çubuğu tutmaya devam ederken, normal bir sıçan saniyeler içinde pozisyonunu değiştirdiği (Sanberg ve diğerleri, 1988) gözlemlendi. Gerçekleştirilen bu testte, konumlandırma anında kronometre tutularak sıçanın her iki pençesini de çubuktan çıkarmak için gereken süre ile sıçanın kaskatı kaldığı süre not edildi ve buna bağlı olarak gruplar arası değerlendirme yapıldı.

3.2.4. Siyatik Fonksiyon İndeksi

Tüm gruplardaki denekler, 6 hafta boyunca devam eden hayvan deneyleri süresinde haftada bir defa arka ayakları mürekkebe batırıldıktan sonra dar bir zemin üzerinde yürütülerek beyaz kağıt üzerine ayak izleri alındı ve bu izlerin incelenmesine dayanan siyatik fonksiyon indeks (SFI) testi gerçekleştirildi (Resim 6). SFI hesaplamaları yapılırken sağlam ayak değerleri olarak deney öncesinde parkinsonizm modeli oluşmadan her bir denek ayak izlerinden yapılan ölçümler, hasarlı ayak değerleri olarak da uygulamalar başladıktan sonra haftalık alınan izlerdeki ölçümler karşılaştırılarak hesaplama gerçekleştirildi. Deneklerin ayak izleri incelenirken sağlam ayakta 3. parmak-topuk arası (NPL), sağlam ayakta 1-5. parmaklar arası (NTS), sağlam ayakta 2-4. parmaklar arası (NITS) ve hasarlı ayakta 3. parmak-topuk arası (EPL), hasarlı ayakta 1-5. parmaklar arası (ETS), hasarlı ayakta 2-4. parmaklar arası (EITS) mesafeler ölçüldü. Ayak izi fotoğrafları ImageJ-Win64 programında incelenerek ölçümler gerçekleştirildi. Mesafeleri ölçülen parmak aralıklarını gösteren şema ve hesaplamada kullanılan “multiple lineer regresyon formülü” Şekil 14’te verilmiştir. SFI, Bain ve diğerleri tarafından 1989’da önerilen ayak izi parametrelerini ölçüm ve hesaplamaları literatüre uygun olarak gerçekleştirildi (Oliveira ve diğerleri, 2001; Mendonca ve diğerleri, 2003).



Şekil 14. Siyatik fonksiyon indeksi ölçümünde parmak aralıklarının belirlenmesinde kullanılan formül (Bain ve diğerleri, 1989)



Resim 6. Deneklere siyatik fonksiyon indeksi testi uygulaması

3.2.5. Elektrofizyolojik Ölçümler

Elektrofizyolojik ölçümler için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı Elektrofizyoloji Laboratuvarı'nda bulunan ve elektromiyografi incelemeleri için kullanılan ENMG cihazı (Neuro-MEP-Micro electronic unit, Russia) kullanıldı (Resim 7).



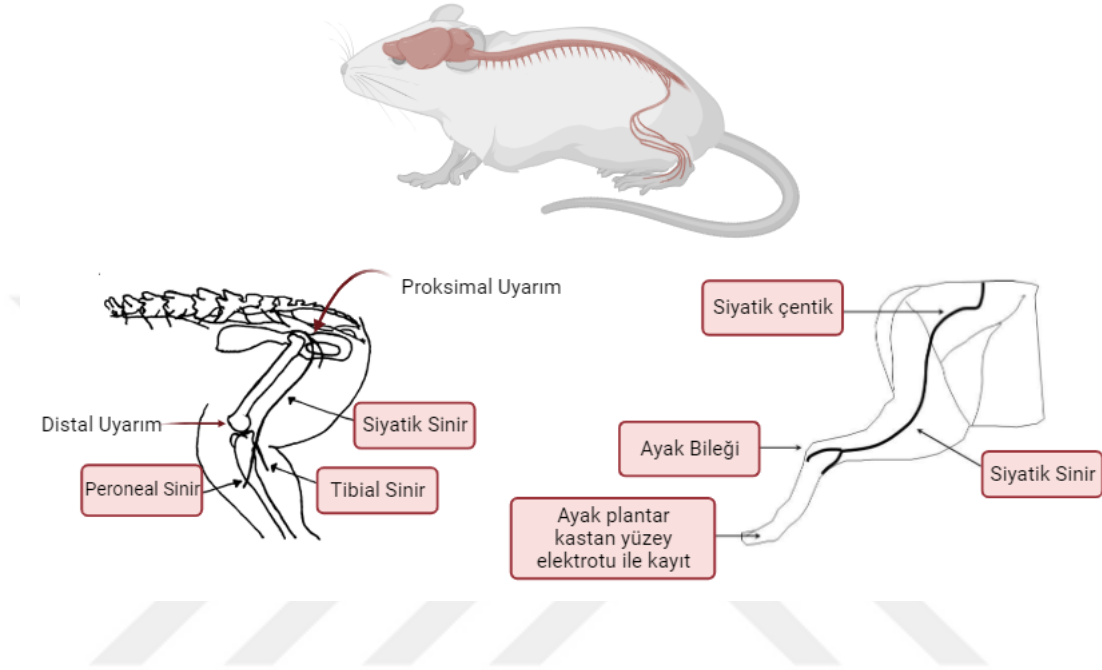
Resim 7. ENMG cihazı (Neuro-MEP-Micro electronic unit)

Elektrofizyolojik ölçümleri gerçekleştirmek için deneklere intraperitoneal olarak ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) karışımı enjekte edildi ve anestezi uygulandı. Sinir iletim hızı soğuktan etkilendiği için denekler vücut sıcaklığının sabit kalması için termal su dolu bir torba üzerine yerleştirildi. Ölçüm alanı olan, kalça eklemindeki femur seviyesinden diz ekleminin arkasındaki femurun ucuna kadar olan bölge (Şekil 15) tıraş edildi, yüzde yetmiş etanol ile temizlendi ve kurutuldu. Elektrofizyolojik kayıt için çok kullanımlık yüzeyel elektrotlar iletken pasta jel (Ten20, Natus Medical Inc., CA, USA) ile kaplandı. Aktif elektrot deney hayvanının ayağının plantar yüzeyini tam ortalayacak şekilde merkezi kısma; referans elektrot topuk kısmına ve toprak elektrot ise kuyruğun başladığı kısma gelecek şekilde yerleştirildi.



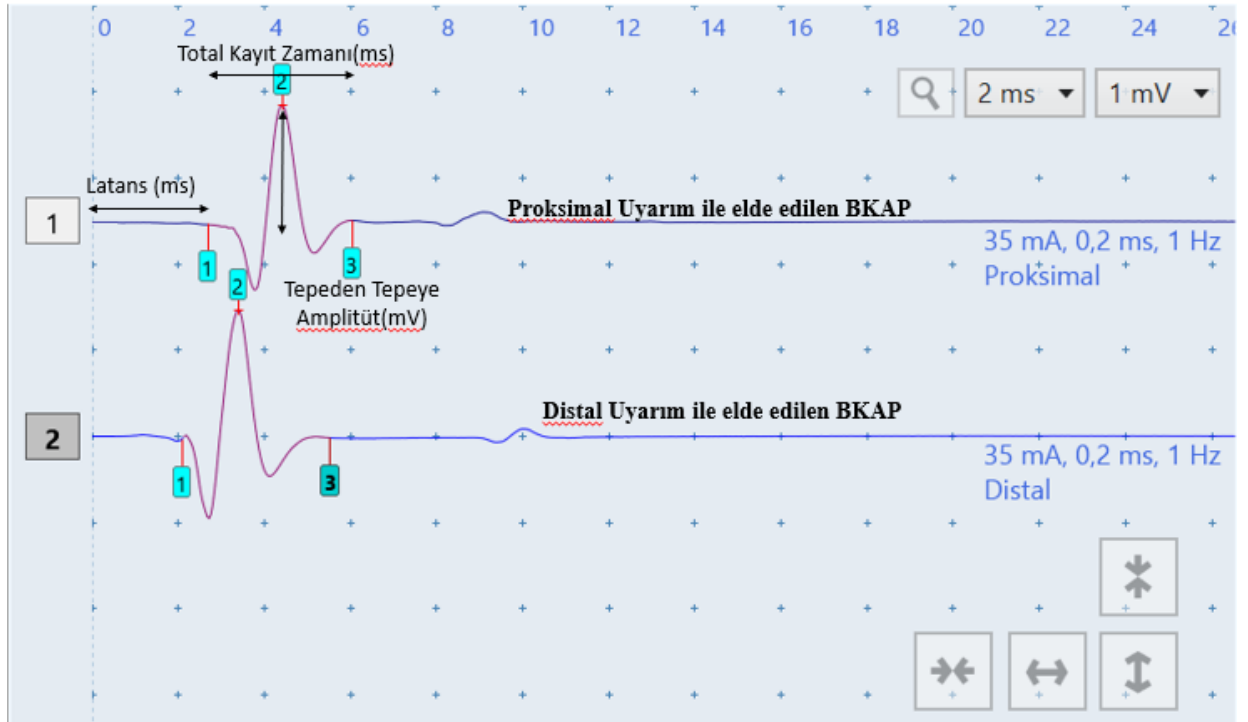
Şekil 15. Ratlarda siyatik sinir lokasyonu

Uyarı için küçük bipolar yüzey elektrodu (Natus Medical Incorporated, Pleasanton, CA, USA) ultrases jeli (Aqua Ultrasound Gel, Turkey) ile kaplandıktan sonra proksimal ve distal uyarım noktalarından elektriksel uyarım verildi. Proksimal uyarı, femurun kalça ucuna gelen hizasından; distal uyarı femurun diz ekleminin arkasına denk gelen ucundan verildi (Şekil 16).



Şekil 16. Elektrofizyolojik uyarım noktalarının siyatik sinir üzerinde gösterimi (Landstrom, 1994; Shankarappa, 2010'dan app.biorender ile uyarlanmıştır)

ENMG cihazı ayarları ve amplifikatör filtre ayarları 10 Hz–10 kHz, tarama hızı 1 ms, stimülasyon süresi 0,5 ms, kazanç 2 mV olarak ayarlandı. Elektrik stimülasyonları, karşılık gelen elektroda dik açılarda rastgele aralıklarla manuel olarak uygulandı. Proksimal ve distal uyarıya yanıt olarak her denekte her bacak için toplam üç bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) kaydı yapıldı ve bunların ortalaması hesaplamalara dahil edildi. BKAP kayıtlarının proksimal ve distal gecikme süresi (latans, ms) ile distal BKAP kaydı üzerinden tepeden tepeye genlik (amplitüd, mV), bu eğri altındaki alan (mV.ms) ve toplam BKAP kayıt süresi (ms), Neuro-MEP_NETomega yazılım programı kullanılarak analiz edildi ve değerlendirildi.



Şekil 17. Bir denekten alınan elektrofizyolojik BKAP kayıt örneği ve değerlendirme parametreleri.

Siyatik sinir motor sinir ileti hızı; proksimal ve distal uyarım noktaları arasındaki mesafenin, proksimal ve distal latans arasındaki farka bölünmesiyle hesaplandı.

İletim hızları,

ΔLatans : Proksimal latans – distal latans (s)

ΔMesafe : Proksimal mesafe- distal mesafe (m)

İletim hızı: $\Delta\text{Mesafe} / \Delta\text{Latans}$ (m/s) bağıntıları kullanılarak hesaplandı.

3.2.6. Deneklerden Doku Örneklerinin Alınması

Elektrofizyolojik ölçümlerin tamamlanmasının ardından denekler ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezi uygulaması altında servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Servikal dislokasyon öncesinde inflamasyon işaretçilerinin tespit edilmesi amacıyla kalpten kan alındı ve sakrifiye işleminin ardından tüm deneklerin siyatik sinir dokusu çıkarıldı.

Siyatik sinir dokusunun yarısı Western blot analizi için sıvı azot içerisinde donduruldu ve -80°C’de saklandı. Dokuların diğer yarısı ise histopatolojik analizler için %10’luk formaldehit içerisinde konuldu.

3.3. Western Blot

Bu yöntem, hücre ve doku homojenatından protein izolasyon yöntemi ile elde edilen protein ekstraktı içeriğindeki spesifik proteinlerin ekspresyon miktarlarının karşılaştırmalı olarak tanımlanması yöntemidir (Towbin ve diğerleri, 1979).

3.3.1. Siyatik Sinir Dokusu Homojenizasyonu

DeneySEL çalışmanın sonlanmasıyla deneklerden alınan siyatik sinir dokusu örnekleri, protein tayininin yapılabilmesi için homojenize edildi. Homojenizasyon için siyatik sinir dokuları buz aküsü üzerinde serum fizyolojik ile yıkanarak, artık doku kalıntılarından kurtarıldı. Filtre kağıdı ile dokuda kalan serum fizyolojik içeriği çekilerek hassas terazi ile doku tartımı yapıldı. Tartım işleminin ardından ependorflara alınan dokuların üzerine, doku ağırlığının beş katı (μ l) olacak şekilde, %10 oranında RİPA lizis tamponu-10X (Merck, Germany, 20-188) ve %90 oranında proteaz inhibitör kokteyl (BioVision, USA, K297, 100 kokteyl solüsyonu elde etmek için vial, 100 ml dH₂O içinde çözüldü) içeren tampon karışımı eklendi. Doku-lizis tamponu karışımı eklenen ependorflar buz ile dolu beher içerisinde tutularak sonikatör cihazı (Bandelin SONOPULS, HD2200, Germany) kullanımıyla dokular homojenize edildi (Resim 8). Bu işlem için, cihazın döngüsel ayarı döngü 3, döngü 4 ve döngü 5’e kademeli olarak çıkarılarak 3 sn parçalama, 30 sn buz üzerinde bekletme ve sonrasında 1 dakika buz üzerinde bekletme şeklinde 3’er kez tekrarlandı ve doku homojen hale gelene kadar parçalandı. Homojen hale gelen dokular buz içerisinde 10 dk bekletildikten sonra +4°C’ye soğutulmuş santrifüj cihazında 16000 RCF değerinde 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak, pellet atıldı. Doku homojenizasyonu gerçekleştirildikten sonra Bradford Assay yöntemiyle homojenat içerisindeki protein miktarı belirlendi.



Resim 8. Sonikatör cihazı ile siyatik sinir dokusunun homojenize edilmesi

3.3.2. Bradford Assay ile Protein Tayini

Kolorimetrik protein tayin yöntemlerinden biri olan Bradford Assay; tayin edilecek proteine Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının bağlanarak mavi renk vermesi ve bu renk yoğunluğunun spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçüm alınması ile protein miktarının hesaplanabilmesine dayanan bir yöntemidir (Bradford, 1976). Protein tayininin yapılabilmesi için buz aküsü üzerinde, belirli miktarlarda artan konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı (Tablo 3). Standart hazırlama işleminin ardından, buz aküsü üzerinde örnekler 1:5 oranında distile su ile (dH_2O) seyreltildi (Tablo 4).

Tablo 3. Bradford Assay protein tayin yöntemi için hazırlanan standart tablosu

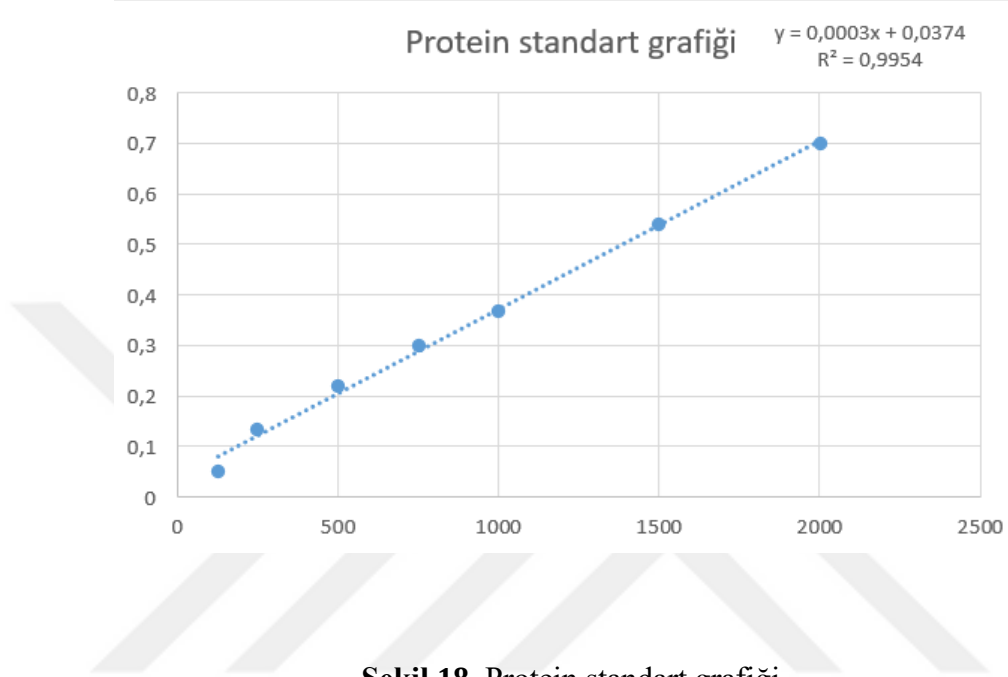
Sıra	dH ₂ O	BSA (µl)	Konsantrasyon (µg/µl)
A	0	300 Stok	2000
B	125	375 Stok	1500
C	325	325 Stok	1000
D	175	B'den 175	750
E	325	C'den 325	500
F	325	E'den 325	250
G	325	F'den 325	125
H	400	G'den 100	25
I	400	0	0

Tablo 4. Bradford Assay protein tayini için 1:5 oranında örneklerin seyreltilmesi

Gruplar	Protein (µl)	dH ₂ O (µl)
Kontrol	3	12
Rezerpin	3	12
Ultrases (0.5W/cm ²)	3	12
Ultrases (1.5W/cm ²)	3	12

Spektrofotometrede yapılacak ölçümler için, hazırlanan örnek ve standartlardan 96'lık well plate kuyucuklarına iki tekrarlı olacak şekilde 5 µl konuldu ve üzerine 200 µl çalışma solüsyonundan eklendi. Well plate kapağı kapatılıp alüminyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçümler alındı ve okunan değerler için hesaplama yapıldı. Örnekler ve standartlardan iki tekrar olacak şekilde well plate üzerine yükleme yapıldığı için değerlerin ortalaması alındı. Alınan ortalama değerlerden dH₂O absorbansı, blank olarak kullanıldığı için çıkarıldı. Excel programında standart değerleri ve konsantrasyon değerleri için dağılım grafiği çizildi. Grafikte elde edilen “R²” değerinde, örneklerin ortalamaları “y” değerine yazılarak, her bir örnek için

“x” değeri hesaplandı. Örnekler 1:5 oranında seyreltildiği için değerler 5 ile çarpıldı ve örneklerin konsantrasyonu hesaplandı. Konsantrasyon değerleri 1000’e bölündü ve protein konsantrasyonları $\mu\text{l/ml}$ ’ye çevrildi. Elde edilen son değerler 50’ye bölünerek örneklerin jele yüklenmesi sırasında her kuyucukta 40 μg protein olması sağlandı.



3.3.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

SDS-PAGE elektroforezi için kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışı tabloda belirtilmiştir.

Tablo 5. SDS-PAGE elektroforezi için hazırlanan tampon çözeltiler ve içerikleri

Solüsyon ismi	İçeriğindeki bileşenler
Yürütme (Running) Tamponu (10X)	30,3 gr Tris Base 144 gr Glisin 10 gr SDS 1 lt dH ₂ O' da çözülür.
Yürütme Tamponu (1X)	100 ml Running Buffer 900 ml dH ₂ O
Transfer Tamponu	3,03 gr Tris-Base 14,4 gr Glisin 200 ml Metanol 2 ml SDS (%10)
Yıkama (Wash) Tamponu / TBST	1000 ml TBS 1 ml Tween 20
Tris Buffer Saline (TBS)	6,05 gr Tris-Hcl 8,76 gr NaCl 1lt dH ₂ O, pH: 7,6
Bloklama (Blocking) Solüsyonu	5 gr süt tozu (%5) 100 ml TBS
Sıyırma (Stripping) Tamponu	%2 SDS 62,5 mM Tris, pH:6,7 100 mM β-Merkaptoetanol
Amonyum Persülfat (APS)	0,1 gr APS 1 ml dH ₂ O
Akrilamid–Bisakrilamid	30 gr Akrilamid 0,8 gr Bisakrilamid 100 ml dH ₂ O
Tris (1M) tamponu	60,55 gr Tris-Base 500 ml dH ₂ O, pH: 6,7
Tris (1,5M) tamponu	90,08 gr Tris-Base 500 ml dH ₂ O, pH: 8,8
Sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu	10 gr SDS 100 ml dH ₂ O

3.3.3.1. Jel Elektroforezinde Kullanılan Jel

Jel elektroforezi için Biorad 10% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (10-well, 50 µl, Biorad, ABD) temin edilerek kullanım protokolüne uygun şekilde Western blot incelemelerinde kullanılmıştır.



Resim 9. SDS-PAGE jeli

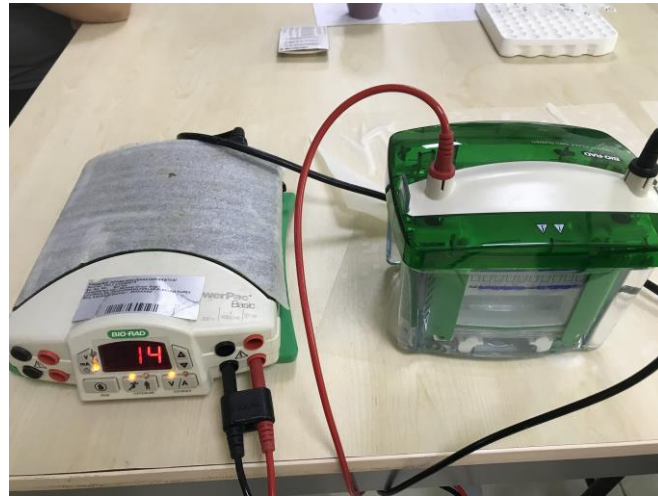
3.3.3.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezinde Örneklerin Hazırlanması ve Jele Yüklenmesi

Önceden Bradford Assay protein tayin yöntemi ile jele yüklenecek örneklerin miktarı hesaplandı. -80°C'den çıkarılan ependorf içerisindeki örnekler yükleme öncesinde 13000 rpm'de 5 dk tekrar santrifüj edildi. Süpernatant alınarak her örneğin üzerinde 6 µl loading dye (Pagesta, 5x SDS-PAGE sample buffer, 751-00, Korea) eklendi ve 10 sn vorteks yapılarak 96°C'de 5 dk, ısı bloğu kullanılarak proteinlerin denatürasyonu sağlandı (Resim 10). Örnekler denatürasyon sonrası tekrar vorteks yapıldı ve jele yüklenecek hale gelmesi sağlandı. İlk kuyucuğa 3 µl protein marker (Blueye Prestained Protein Ladder, PM007-0500, USA) ve diğer kuyucuklara örnekler grup sırasıyla yüklendi. Elektroforez 90 V'da başlatıldı ve üst jeli geçene

kadar (15-20 dk) yürütüldü. Elektroforezin alt jele gelmesiyle 100 V'da ve 1,5-2 saat yürütüldü (Resim 11).



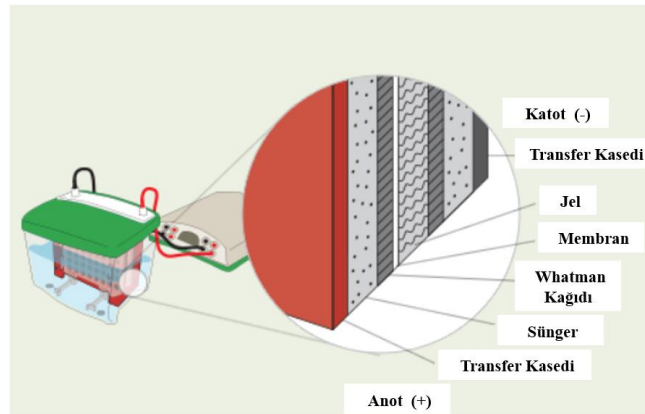
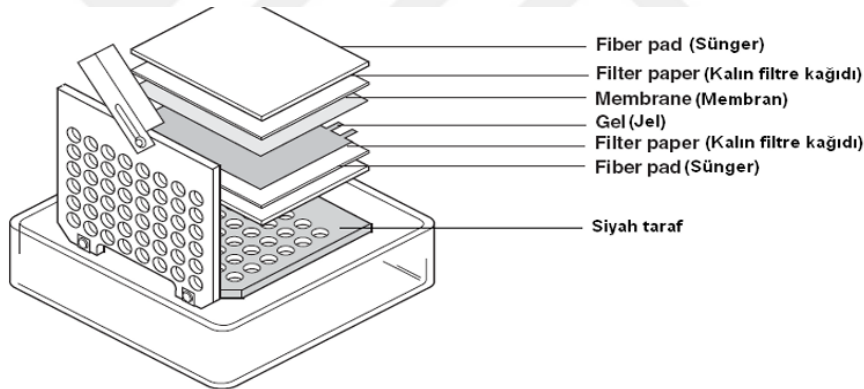
Resim 10. Protein denatürasyonunda kullanılan ısı bloğu.



Resim 11. SDS-PAGE Elektroforez sisteminde örneklerin yürütülmesi

3.3.3.3. SDS-PAGE Jelin Membrana Transfer Edilmesi, Blotlama

Jelden PVDF-nitroselüloz membrana transfer işleminin yapılabilmesi için transfer sandviçi hazırlandı (Şekil 19). Transfer havuzu içerisine transfer buffer eklendi. Havuzun içerisinde, transfer sandviçinin siyah yüzü altta kalacak şekilde yerleştirildi ve sırasıyla üzerine sünger, whatman kağıdı (filtre kağıdı), jel, PVDF-nitroselüloz membran (Bio-Rad, D9160172A, USA. Membran, %100 metanolle 5 dk bekletilerek aktifleşmesi sağlandı), whatman kağıdı (Cytiva 1001-125, China) ve sünger yerleştirildi ve bu aşamaların her birinde rulo aparatı kullanılarak hava kabarcığı oluşumunun engellenmesi sağlandı. Son olarak da transfer sandviçinin gri yüzü üste gelecek şekilde kapatılarak kilitlendi ve sandviğin siyah yüzü transfer kasedinin siyah yüzüne gelecek şekilde yerleştirildi. Kaset tank içerisine yerleştirilirken “+” ve “-” yönlerine dikkat edildi. Tankın içerisine transfer buffer ve buz aküsü eklendi, +4⁰C’de, 70V’da, 2 saat transfer işlemi gerçekleştirildi (Resim 12, 13).



Şekil 19. Blotlama için transfer sandviçinin hazırlanması (Bio-rad).

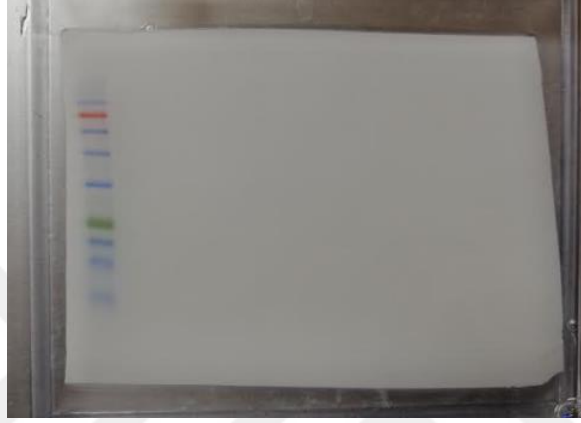


Resim 12. Jelden membrana transfer yapılması-Blotlama.

3.3.3.4. Membranın Primer ve Sekonder Antikor ile Etkileşim ve Görüntüleme

Membrana transfer işlemi gerçekleştiikten sonra, membran özel Western blot kabına alındı ve üzerine taze hazırlanmış 10 ml bloklama solüsyonu eklenerek, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat bekletildi. Bloklama solüsyonu üzerine primer antikor Bcl-2 (Bioss, bsm-3304M, USA), Bax (Bioss, bsm-33283M, USA), Parkin (Cell signaling, 4211S, Netherlands) (1:1000) eklenerek, çalkalayıcı üzerinde 1 gece +4⁰C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında membran, yıkama tamponu (wash buffer, TBST) ile 5 dk boyunca 6 defa çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Membran üzerine tekrar taze 10 ml bloklama solüsyonu ile anti-mouse IgG, HRP-linked sekonder antikor (1:5000, Cell Signaling, 7076S, Netherlands) eklendi ve çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membran, yıkama solüsyonu ile 5 dk boyunca 6 defa çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Yıkama sonrası membran üzerine ECL solüsyonundan (1:1, Biorad, ABD) 500 µl eklenerek 3 dk beklendi ve Western blot görüntüleme cihazında (G:Box Syngene, DR4V/1309, UK) görüntü alındı (Resim 14). Görüntüleme sonrasında referans (housekeeping) protein olarak kullanılan beta aktin görüntüsü almak için membran, sıyırma tamponu ile 30 dk, oda sıcaklığında inkübe edildi ve yıkama tamponu ile yıkama işlemi tekrar edilip, bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Bloklama solüsyonu üzerine Beta aktin antikor (1:5000) (Santa cruz,sc-47778, ABD) eklenerek, 1 gece +4⁰C’de inkübe edildi. İnkübasyon

sonrası membran tekrar yıkama tamponu ile yıkandı ve tekrar bloklama solüsyonu eklenip, üzerine sekonder anti-mouse IgG, HRP-linked antikor (1:5000) (Cell Signaling, 7076S, Netherlands) ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı ve membran üzerine ECL solüsyonu eklenerek görüntü alındı. Ek 1’de ImageJ-Win64 programında, elde edilen bant görüntülerinin protein ekspresyon analizi ve ölçümü gösterilmiştir.



Resim 13. Transfer sonrası membran görüntüsü



Resim 14. Görüntüleme cihazı.

3.4. Histopatoloji

3.4.1. Fiksasyon Sonrası Doku Takibi ve Parafine Gömme

Siyatik sinir dokusunun fiksasyonu sağlandıktan sonra dokuların içerisine nüfuz eden formaldehitin uzaklaştırılması için dokular 12 saat boyunca, akan çeşme suyu altında bırakıldı. Dokulardan uzaklaştırılan formaldehitin yerini su almış oldu ve dokuların içerisine nüfuz eden suyu uzaklaştırmak için dokular sırasıyla %70, %80, %95 oranlarında etil alkol serisinde (İsolab, Germany, %96, UN1170) 1'er saat, %100 absolute alkolde (İsolab, Germany, %99, Ekstra pure, UN1170) 3 saat bekletildi. Böylelikle dokuların içerisindeki suyun yerini alkol almış oldu. Dokuların şeffaflaştırılması ve alkolün uzaklaştırılması için önce %100 etil alkol-ksilol karışımında 30 dk bekletildikten sonra; 1 saat oda sıcaklığındaki ksilolde, 1 saat de önceden 60°C'ye ısıtılmış etüv içerisindeki ksilolde (Merck, Germany, 108297) bekletildi. Dokunun içerisine nüfuz eden ksilolü uzaklaştırmak ve dokuya parafin emdirmek için dokular 60°C'lik parafinde (Tekkim, Boncuk parafin 56-58°C, Turkey, 8002-74-2) 3 saat bekletildi. Emdirme işleminin ardından dokular metal plaka içerisinde parafin bloklara gömüldü. Bir gece oda sıcaklığında metal plaka içerisinde bekletildikten sonra, parafin bloklar metal tabakadan çıkarıldı. Parafin blokların kademeli olarak soğutulması için 24 saat +4°C'de bekletildi ve devamında -20°C'ye kaldırıldı. Mikrotom cihazıyla kesit alma işlemine kadar -20°C'de saklandı.

Parafine gömülmüş her doku bloğundan, her birinden 6 ayrı blok olacak şekilde, döner mikrotom (Leica, RM 2265, Almanya) cihazı kullanılarak mikrotom bıçağı (Thermo Fisher MX35 Premier, Singapur, 3051835) kullanılarak 5 µm kalınlığında ardışık kesitler alındı. Alınan kesitlere Hematoksilen (RRSP67-E) ve Eosin (RRSP35-E) (Atom Scientific, Birleşik Krallık), Luxol Fast Blue (Atom Scientific, Birleşik Krallık, RRSK345-100), Masson Trichrome (Atom Scientific, Birleşik Krallık, RRSK20-100) histokimyasal boyamaları gerçekleştirildi.

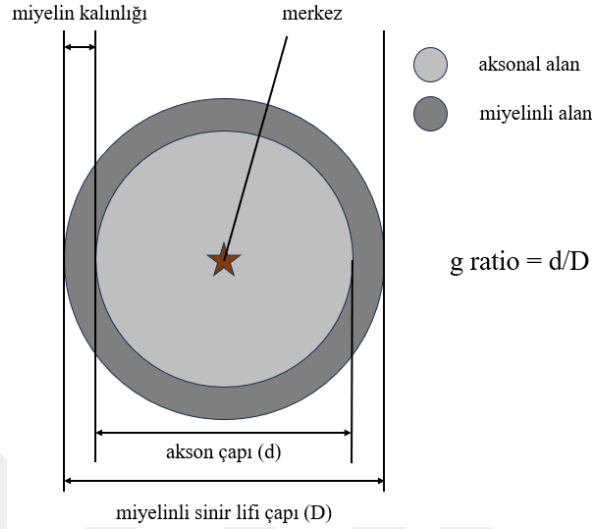


Resim 15. Mikrotom cihazı

3.4.2. Siyatik Sinir Dokusu Luksol Fast Blue Boyama Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'de etüvde bekletildikten sonra kesitler, %95'lik etil alkolde 3 dk bekletildi ve Luxol fast blue solüsyonun içerisine daldırılarak 1 gece oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kesitlerin üzerine %70'lik denatüre alkol damlatılıp 3 sn beklendi ve çeşme suyunda yıkama yapıldı. Ardından krezil viyole solüsyonu damlatılarak 1 dk beklendi, tekrar çeşme suyu ile yıkandı. Krezil viyole diferentiyatörü damlatılarak 5 sn beklendi ve tekrar çeşme suyunda yıkandı. Devamında parlatma ve dehidratasyon işlemi için 1 dk %80'lik etil alkol, 1 dk %96'lık etil alkol, artan alkol serisinde ve 10 dk ksilolde bekletildi. Dokunun üzerine entellan damlatılarak kapatma yapıldı. Kesitler ışık mikroskobu altında 10X ve 40X büyütmede görüntülendi. Elde edilen görüntüler ImageJ-Win64 programına yüklendi. Gruplara ait kesit görüntülerinden akson çapı (μm), miyelin kalınlığı (μm) ve miyelinli sinir lif çapı (μm) değerleri ölçüldü. Ek 2'de siyatik sinir dokusundan elde edilen görüntülerden akson çapı, miyelin kalınlığı ve miyelinli sinir lif çapının Imagej-Win64 programında ölçüm ve analizi gösterilmiştir.

Ayrıca, kesit görüntüleri kullanılarak örneklerdeki g oranı da hesaplandı. Miyelin kılıf kalınlığı miyelin oranı (g oranı), miyelin kılıfının iç (d) ve dış (D) çapı arasındaki oran olarak hesaplanır (Şekil 20): $g \text{ oranı} = d/D$. G-oranı, bireysel akson liflerinin miyelin kılıf kalınlığının indeksindeki yapının bir fonksiyonu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.



Şekil 20. G-ratio hesaplama şemasında her bir miyelinli lif için ağırlık merkezi, akson ve miyelin alanları, akson çapı, miyelinli lif çapı, miyelin kalınlığı ve miyelin g oranı hesaplanır (Zaimi ve diğerleri, 2016).

3.4.3. Siyatik Sinir Dokusu Masson Trikrom Histokimyasal Boyama Protokolü

Deparafinizasyon işlemi için öncelikle, lam üzerine alınan kesitler 1 gece 60°C’de etüvde bekletildi. Devamında kesitler sırasıyla 10 dk ksilol, 2 dk %96’lık etil alkol, 2 dk %80’lik etil alkol serisinden geçirildikten sonra 5 dk dH₂O ile yıkandı. Weigert Hematoksilen A ve Weigert Hematoksilen B solüsyonları falkon tüp içerisinde eşit oranda karıştırıldı. Hazırlanan karışım kesitlere damlatıldı ve karanlık ortamda, oda sıcaklığında 20 dk beklendi. Çeşme suyunda yıkama yapıldı. %1’lik asit alkol içerisine daldırılıp çıkarılarak diferensiyasyon yapıldı. Tekrar çeşme suyunda yıkandı. Ponceau fuksin damlatılarak karanlık ortamda, oda sıcaklığında 5 dk beklendi. dH₂O ile yıkama yapıldı. Fosfotungustik asit damlatılarak, karanlık ortamda, oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Kurulama kağıdı ile dokuların etrafındaki su çekildi ve bu aşamada su ile yıkama yapılmadı. Metilen mavisi damlatılarak, oda sıcaklığında, karanlık ortamda 10 dk bekletildi. dH₂O ile yıkama yapıldı, dokunun etrafındaki su kurutma kağıdı ile

çekildi. Absolute alkolde 1 dk bekletilerek dehidratasyon yapıldı. Parlatma işlemi için ksilolde 10 dk bekletildi ve entellan ile kapatma yapıldı ve görüntüler toplanarak değerlendirme yapıldı.

3.4.4. Hematoksilen & Eozin Histokimyasal Boyama Protokolü

Deparafinizasyon işlemi için öncelikle, lam üzerine alınan kesitler 1 gece 60°C'de etüvde bekletildi. Devamında kesitler sırasıyla Aseton ve 96°-70°C'lik etil alkollerden geçirildi ve su ile yıkandı. Yıkanan preperatlar Hematoksilen boyasında 5 dakika bekletildi ve suda yıkandıktan sonra asit alkolde boya fazlası alındı. Ardından %4'lük amonyaklı suda morartıldı ve tekrar suda yıkandı. Kesitler Eozin boyasında 1 dakika bekletildi ve tekrar suda yıkandı. Bir sonraki adımda 70°-96°C'lik etil alkollerden geçirildi ve asetondan geçirilen preperatlar filtre kağıdının üzerine alındı. Kuruyan lamlar ksilenle dolu şaleye yerleştirildikten sonra ksilen maruziyetine bırakılan lamlar ksilenden çıkartıldı entellan ve lamel ile kapatıldı. Görüntüler toplanarak değerlendirme yapıldı.

3.5. İstatistiksel Analiz

Araştırmada elde edilen tüm veriler istatistik programıyla analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığını test etmek için Kolmogorov-Smirnov normallik testi kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. yalnızca iki grubun karşılaştırıldığı durumlarda normal dağılıma uyan veriler student t-test ile, uymayan veriler Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Çoklu grup karşılaştırmalarında ise normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile, uymayanlar Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Homojen bir şekilde dağıtılmış veriler için bir son test olarak art test Tukey; Homojen dağılım göstermeyen veriler için art test Tamhane testleri uygulandı. Verilerin arasındaki farklılıklar, p değerinin 0,05'ten küçük olduğu ($p < 0,05$) durumlarda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Motor Fonksiyonunun Davranış Testleriyle Değerlendirilmesi

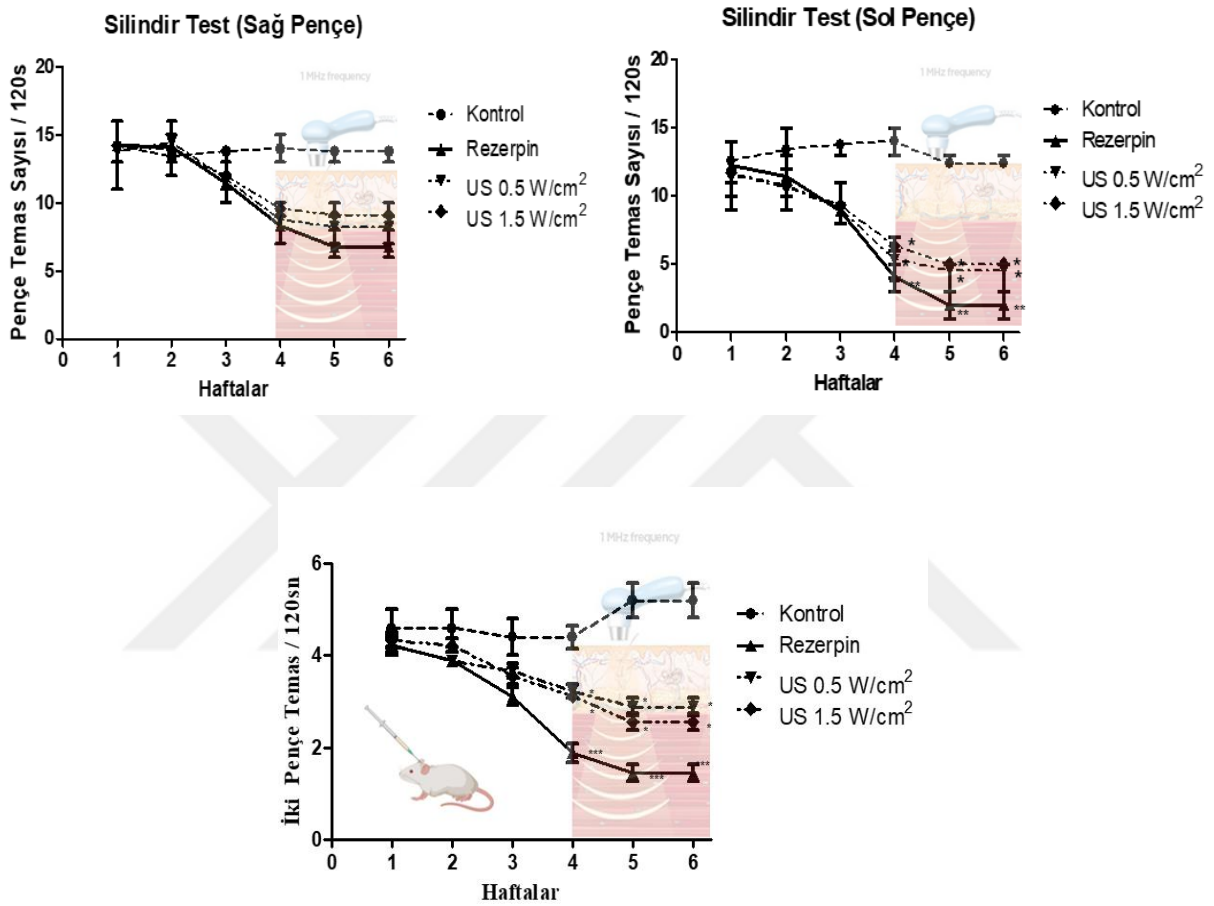
Motor değerlendirme fonksiyon testleri hayvan deneyleri boyunca, hem sadece rezerpin enjeksiyonunun uygulandığı ilk 30 günlük bölümde hem de rezerpin enjeksiyonuyla birlikte uygulanan düşük yoğunluklu darbeleri ultrases tedavisinin uygulandığı 15 günlük bölümde, haftada bir kere gerçekleştirildi ve değerlendirme yapıldı.

4.1.1. Silindir testi (cylinder test) bulguları

Silindir testinde sıçanlar 25 cm cam silindir beher içerisine yerleştirildikten sonra 120 saniye süre içerisinde arka ayakları üzerinde kalkarak cam çeperlere ön ayaklarını sağ veya sol olarak ayrı ayrı ve çift pençe olarak birlikte toplam temas sayısının skorlamaları yapılmıştır. Denemeler 30 dakika ara ile 2 defa tekrar edilmiş ve bu denemelere ait skorlamaların ortalaması kullanılmıştır. Silindir testi sonucunda gerçekleştirilen skorlama bulgularına ait çizgi grafikler Şekil 21’de görülmektedir.

Silindir testi sonuçlarına göre, Rezerpin enjeksiyonu uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla 1. haftadan itibaren belirginleşerek ilerleyen ve 4. haftadan itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde deneklerin pençe temas sayılarının belirgin azalım gösterdiği görülmüştür ($p<0,001$). Model oluşumu için geçen, sadece rezerpin enjeksiyonunun yapıldığı 4 haftalık sürede rezerpin uygulanan deneklerde pençe temas sayılarının özellikle sol pençe ve çift pençe temas sayılarının uygulamanın ilk haftasından itibaren azaldığı; 4. haftada ise kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu ($p<0.001^{***}$) görülmüştür. Rezerpin uygulanan gruplarda, ilk dört haftalık model oluşturma süresince sağ pençe temas sayısındaki azalmanı ise ikinci haftadan itibaren belirginleştiği gözlenmiştir. Silindir testi, spontan ön ayak kullanımıyla duyuşal ve motor fonksiyonu değerlendirmede ve kemirgenlerde hasara bağlı ön ayak kullanım asimetrisini belirlemede kullanılan bir yöntemdir (Schallert ve diğerleri, 2000). İlk dört haftalık dönemde elde edilen bulgular, rezerpin enjeksiyonunun deneklerde duyuşal ve motor fonksiyon kaybına neden olduğu, bu açıdan da parkinsonizm semptomlarını indüklediği görülmüştür. Düşük yoğunluklu darbeleri ultrases tedavilerinin ise deneklerin hem sağ hem sol hem de çift pençe temas sayısını kontrole yaklaştırdığı; ve bu etkinin özellikle sol pençe ve çift

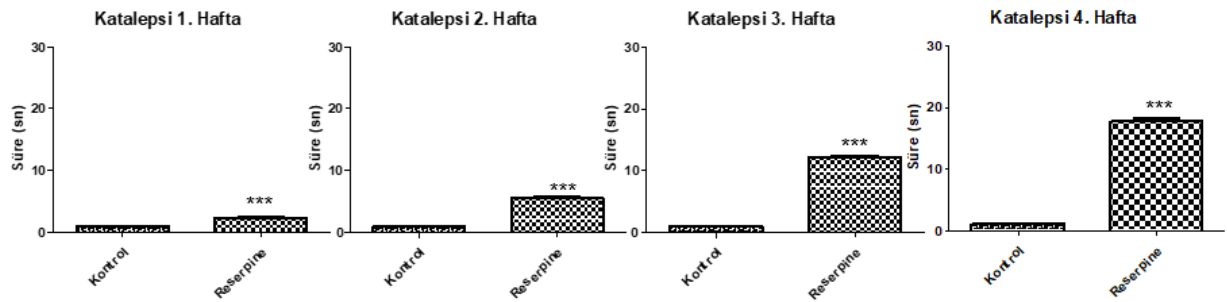
pençe temas sayılarında daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Temelde çalışmada bu testin uygulanma nedeni parkinsonizmin periferik semptomatik modelinin oluşumunun test edilmesi olsa da, tedavi sürecinde elde edilen pençe temas sayısının azalım göstermemesi düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin oluşan duyuşal ve motor fonksiyon kaybı üzerine olumlu bir etkisinin olduğunu göstermektedir.



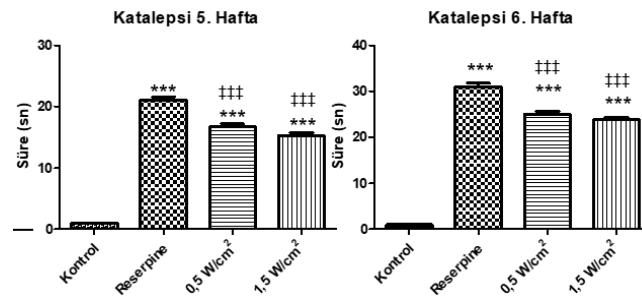
Şekil 21. Kontrol, rezerpin, rezerpin enjeksiyonuyla birlikte 0.5 W/cm² ve 1.5 W/cm² güç yoğunluğunda darbeli ultrases uygulanan gruplara ait deney başlangıcından itibaren haftada bir uygulanan silindir testi analiz bulgularını gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir. (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001)

4.1.2. Katalepsi Testi Bulguları

Katalepsi testinde yerden 12 cm yüksekliğe genişçe bir çubuk yerleştirilen platformda; sıçanlar, ön ayakları çubuğa ve arka ayakları aparatın zeminine temas edecek şekilde konumlandırıldıktan sonra kronometreyle sıçanın her iki pençesini de çubuktan çıkarmak için gereken süre not edilerek gruplar arası değerlendirme yapılmıştır. İlk dört haftalık model oluşum sürecindeki bulgular Şekil 22’de, tedavinin uygulandığı 5 ve 6. haftaya ait bulgular ise Şekil 23’te görülmektedir.



Şekil 22. İlk dört haftalık model oluşumu sürecinde, kontrol ve rezerpin enjeksiyonu yapılan gruplara ait haftada bir uygulanan katalepsi testinde sıçanların hareketsiz kaldığı sürelerin değişimlerini gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler student t-test ile karşılaştırıldı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile gösterilmiştir. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)



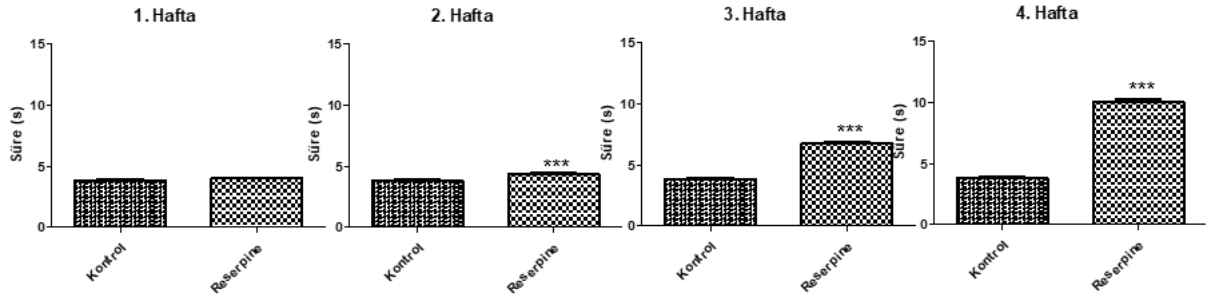
Şekil 23. Tedavi sürecinde, kontrol, rezerpin, 0.5 W/cm² ve 1.5 W/cm² güç yoğunluğunda darbeli ultrases uygulanan gruplara ait kataleptik davranış sürelerinin değişimlerini gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı.

Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir. (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001)

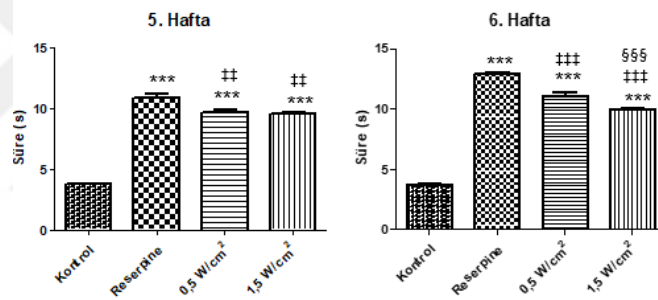
Katalepsi testi sonuçlarına göre, rezerpin enjeksiyonunun ilk haftadan itibaren deneklerde kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı şekilde katatonik davranışı indüklediği (p<0.001) ve sıçanların hareketsiz kalma sürelerinin rezerpin enjeksiyonu devam ettiği süre boyunca artarak altıncı hafta sonunda yaklaşık 30 sn hareketsiz kaldıkları gözlenmiştir. Katatonik davranışın rezerpin uygulaması ile artımı, deneklerde oluşan motor fonksiyon kaybını yansıtmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre; rezerpin uygulamasının katalepsi süresinde belirgin uzamaya neden olurken her iki güç yoğunluğunda da düşük yoğunluklu darbeli ultrases uygulamasının bu sürenin artışı yavaşlattığı ve rezerpin uygulanan gruba nazaran anlamlı azalmaya (p<0.001) neden olduğu görülmüştür.

4.2. Nosiseptif Ağrı Algısının Değerlendirilmesi

Ultrasesin, rezerpin ile indüklenen parkinsonizm semptomlarına sekonder gelişmesi beklenen periferik sinir hasarında üzerindeki nosiseptif etkisinin incelenmesi amacıyla uygulamalar boyunca haftada bir termal allodini yanıtının belirlenebilmesi için hot plate testi uygulanmıştır. Sıçanların ısıtılmış cihazın üzerine konmalarından sonra arka ayaklarını çekme-yalama süresi termal uyarıya cevap olarak değerlendirilmiştir. Şekil 24'te ilk dört haftalık model oluşturma sürecinde kontrol ve rezerpin enjekte edilen deneklerin termal uyarana verdikleri yanıt sürelerinin değişimi görülmektedir. Şekil 25'te ise tedavi sürecinde kontrol, rezerpin ve rezerpin enjeksiyonuyla birlikte iki farklı güç yoğunluğunda darbeli ultrases uygulanan deneklerin termal uyarana verdikleri yanıt sürelerinin değişimi görülmektedir.



Şekil 24. Kontrol, Rezerpin enjeksiyonu uygulanan gruplara ait deney başlangıcından itibaren bir hafta ara olacak şekilde uygulanan Hot plate testlerinin analizinde model oluşumuna kadar geçen 15 enjeksiyon/4 hafta da elde edilen değerlerin değişimleri gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler student t-test ile karşılaştırıldı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile gösterilmiştir. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)



Şekil 25. Kontrol, Rezerpin, 0.5 W/cm² Ultrases, 1.5 W/cm² Ultrases uygulanan gruplara ait model oluşumunu takiben bir hafta ara olacak şekilde uygulanan Hot plate testlerinin analizinde elde edilen değerlerin değişimleri gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık † işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

Hot plate testi sonuçlarına göre, ilk dört haftalık model oluşum sürecinde ve iki haftalık tedavi sürecinde rezerpin enjeksiyonunun termal uyarana verilen cevap süresini, enjeksiyonların ikinci haftasından itibaren kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) şekilde artırdığı ve kümülatif alınan rezerpin dozu arttıkça termal uyarana yanıt

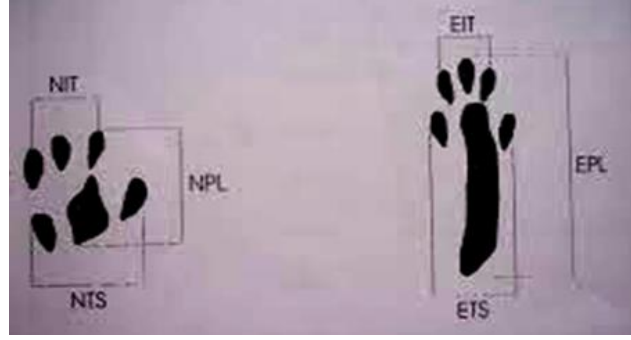
süresinin kademeli olarak uzadığı görülmüştür. Bu bulgular, rezerpin uygulamasının nosiseptif ağrı algısında azalmaya neden olduğunu göstermekte, katalepsi ve silindir testi bulgularında gözlenen duyuusal-motor fonksiyonlardaki azalmayı desteklemektedir. İki haftalık tedavi süreci sonunda, rezerpin ile birlikte uygulanan düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin ise, özellikle 1.5 W/cm² güç yoğunluğunda uygulandığında termal uyarana verilen yanıt süresini kontrol grubuna yaklaştırdığı ve sadece rezerpin uygulanan gruba nazaran nosiseptif ağrı algısında bir artıma neden olduğu (p<0.001) gözlenmiştir.

4.3. Siyatik Fonksiyon İndeksinin (SFI) Değerlendirilmesi

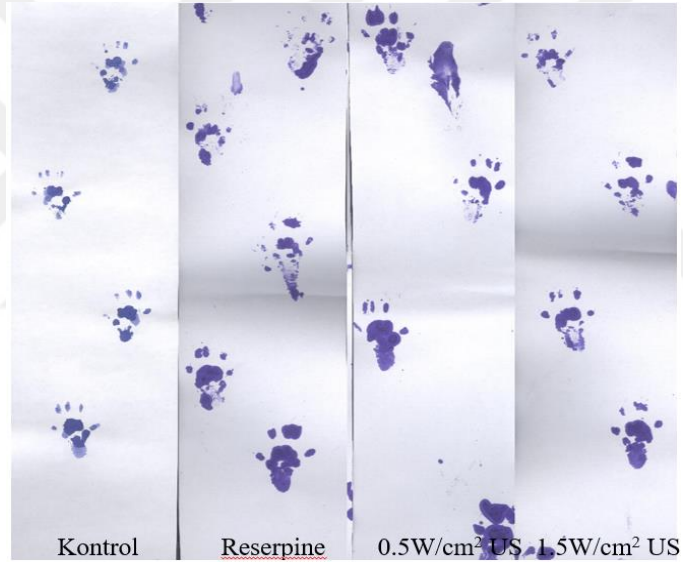
Tüm gruplardaki denekler, deneye başlamadan önce bir defa ve deney sırasında 6 hafta boyunca haftada bir defa olmak üzere, arka ayakları mürekkebe batırılarak dar bir platformda yürütülmüş ve elde edilen ayak izlerinin incelenmesiyle SFI değerleri hesaplanmıştır. SFI hesaplamaları yapılırken sağlam ayak değerleri olarak deney başlamadan önceki izlerden alınan ölçümler, hasarlı ayak değerleri olarak da uygulamalar başladıktan sonra haftalık alınan izlerdeki ölçümler kullanılmış ve her deneğin deney başlamadan alınan kendi izlerindeki ölçümler ile karşılaştırılarak hesaplama yapılmıştır. Resim 17’de tüm gruplara ait örnek ayak izleri görülmektedir. Sıçan ayak izleri incelenirken sağlam ayakta 3. parmak-topuk arası (NPL), sağlam ayakta 1-5. parmaklar arası (NTS), sağlam ayakta 2-4. parmaklar arası (NITS) ve hasarlı ayakta 3. parmak-topuk arası (EPL), hasarlı ayakta 1-5. parmaklar arası (ETS), hasarlı ayakta 2-4. parmaklar arası (EITS) mesafeler ölçülmüştür. Ölçülen bu değerler kullanılarak, aşağıda verilen ve Bain-Mackinnon-Hunter (1989) tarafından geliştirilmiş olan multiple lineer regresyon formülü yardımıyla fonksiyonel siyatik indeks verileri hesaplanmıştır.



$$SFI = -38.3 \times \frac{EPL-NPL}{NPL} + 109.5 \times \frac{ETS-NTS}{NTS} + 13.3 \times \frac{EIT-NIT}{NIT} - 8.8$$

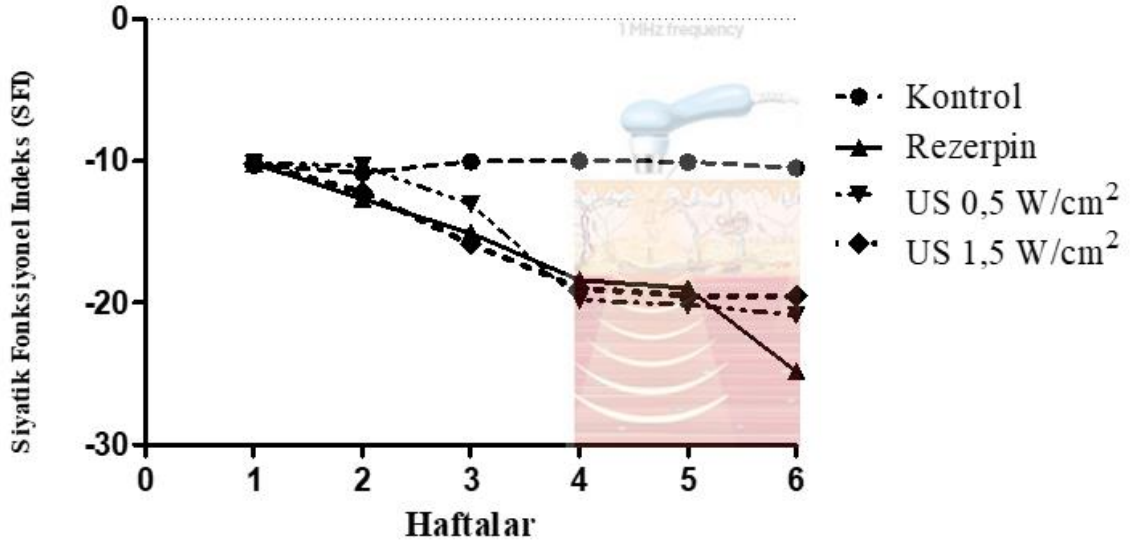


Resim 16. Sağlam ve hasta ayak izinde yukarıdaki ölçüm parametrelerinin şematik gösterimi.



Resim 17. Deney gruplarındaki deneklere ait örnek pençe izleri

Şekil 26'da, deney gruplarına ait SFI değerlerinin haftalık değişimi görülmektedir.



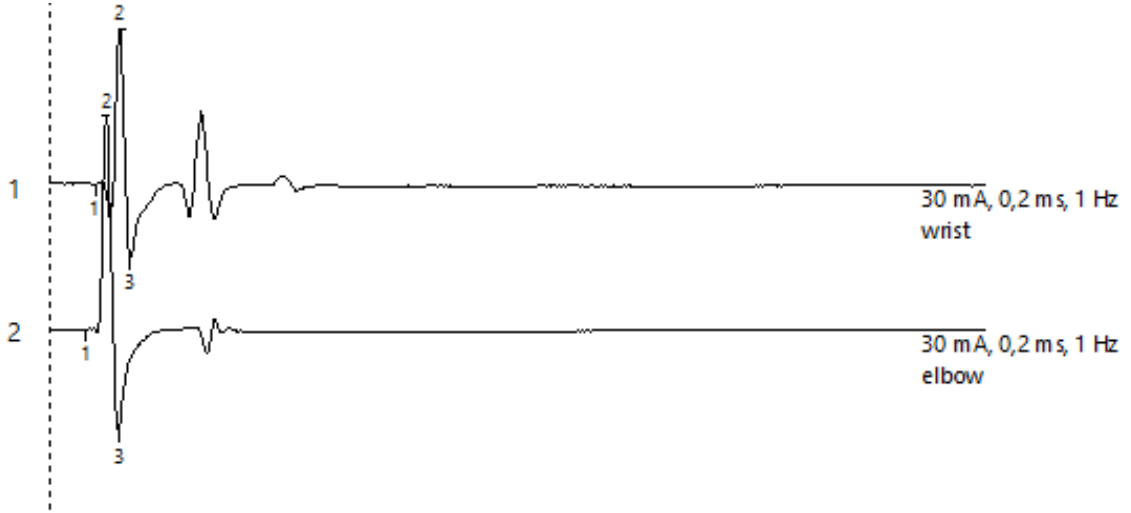
Şekil 26. Deney sürecinde tüm gruplardaki deneklerden haftalık olarak alınan ayak izlerinden elde edilmiş siyatik fonksiyonel indeks (SFI) değerlerini gösteren çizgi grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir. (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001)

Deney sürecinde (6 hafta boyunca) haftalık alınan ölçümlerde, kontrol grubuna kıyasla rezerpin uygulanan deneklerin siyatik fonksiyon indeksi (SFI) değerlerinde ikinci haftadan itibaren giderek belirginleşen bir azalma görülmüştür. Düşük yoğunluklu darbeleri ultrases tedavilerinin uygulandığı 5. ve 6. Haftada ise, US 0,5W/cm² ve US 1,5W/cm² gruplarında tedavi sürecinde SFI değerlerinin sabit kaldığı gözlenmiştir. SFI değerlerinde görülen bu değişimler gruplararası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, rezerpin uygulamasının siyatik sinir fonksiyonunu azaltmaya eğilimli olduğu ve uygulanan ultrases tedavilerinin bu azalma eğilimini sabit tuttuğu söylenebilir.

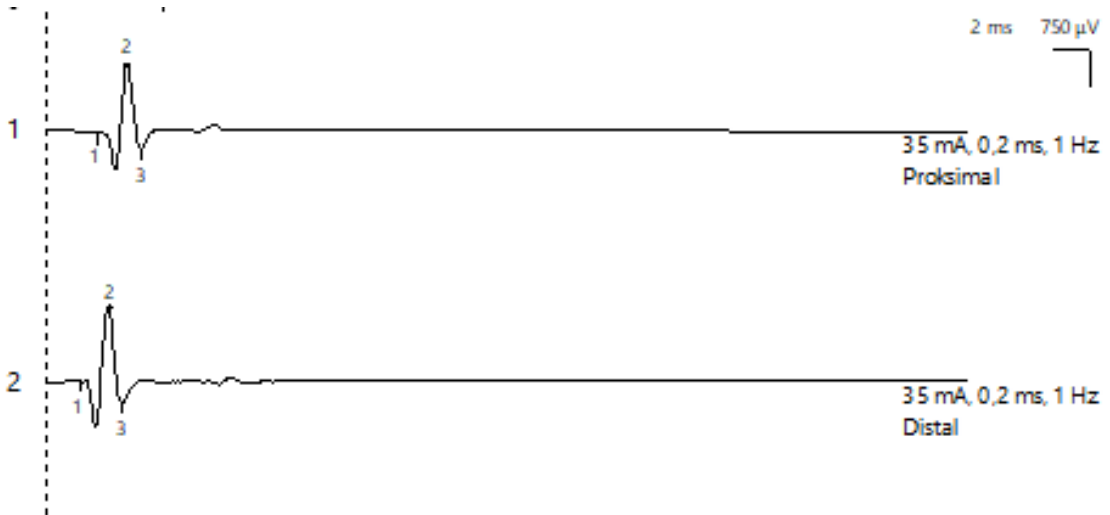
4.4. Elektrofizyolojik Ölçümlerin Alınması ve Analizi

Deney sonunda sıçanlar kurbanıye edilmeden önce anestezi altında siyatik sinir motor fonksiyonunun değerlendirilmesi amacıyla elektrofizyolojik ölçümler (elektronörogram, ENMG) gerçekleştirilmiş ve bu ölçümler analiz edilerek değerlendirilmiştir.

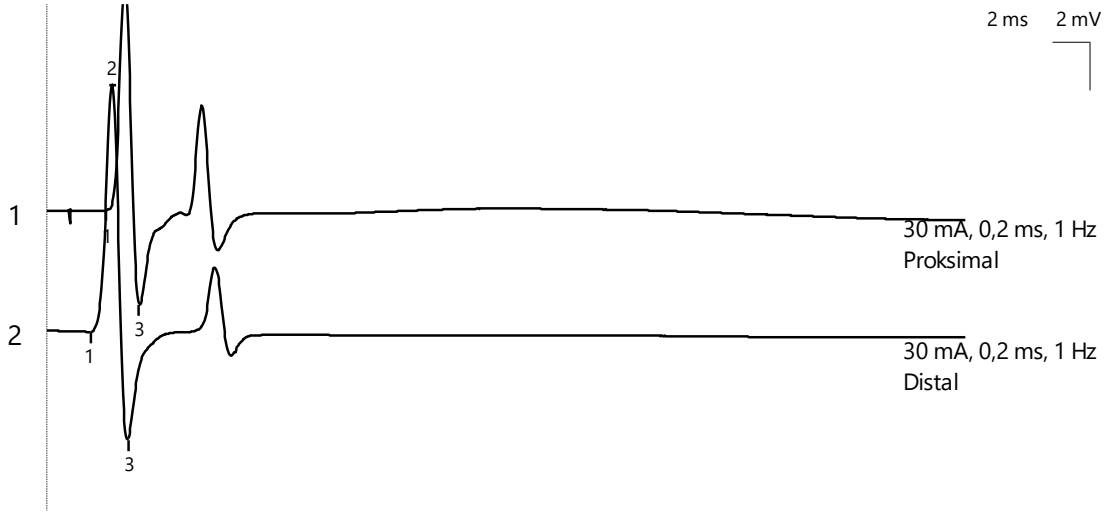
ENMG ölçümlerinde, siyatik sinir iletim hızının değerlendirilebilmesi için; uygun elektrotlarla siyatik sinir distal ve proksimal bölgelerden yüzeyden uyarıldıktan sonra ayaktaki plantar kaslar üzerinden kayıt elektrotlarıyla BKAP kaydedilerek analiz edilmiştir. Deney gruplarından elde edilmiş olan örnek BKAP traseleri Şekil 27-30'da görülmektedir.



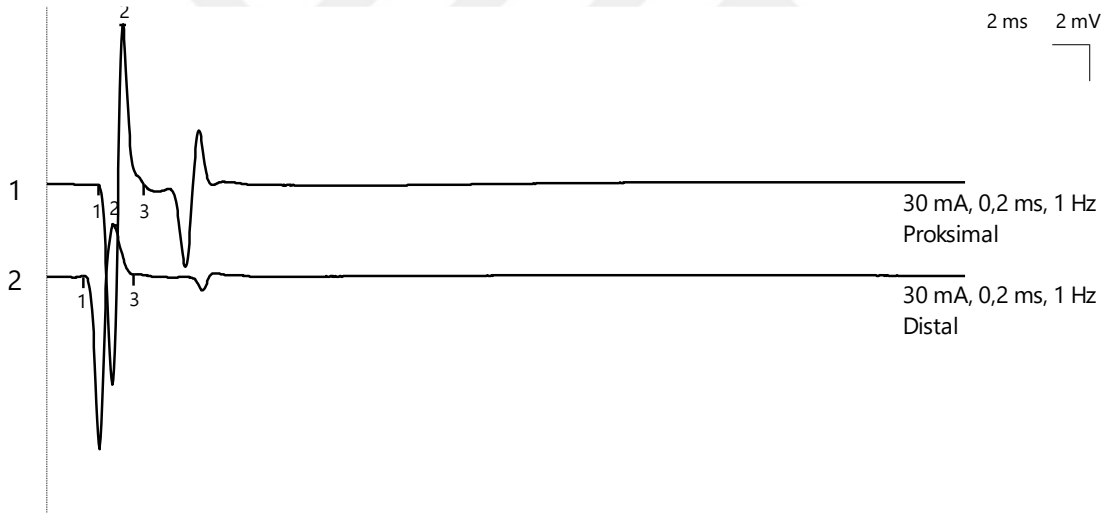
Şekil 27. Kontrol deney grubunda siyatik sinir uyarımı ile ayak plantar kasından alınan örnek proksimal ve distal kayıtlar



Şekil 28. Rezerpin uygulaması olan deney grubunda siyatik sinir uyarımı ile ayak plantar kasından alınan örnek proksimal ve distal kayıtlar

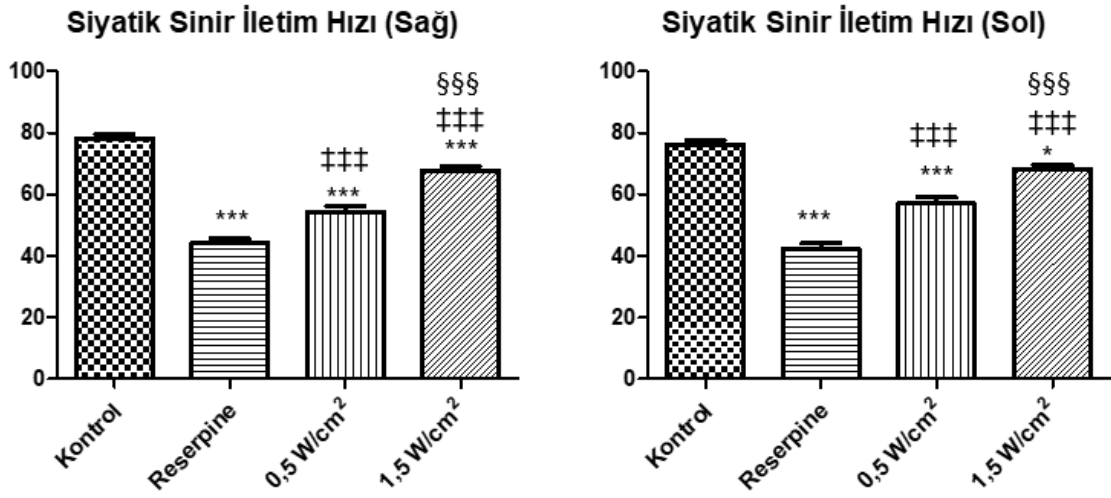


Şekil 29. $0.5W/cm^2$ Ultrases uygulaması olan deney grubunda siyatik sinir uyarımı ile ayak plantar kasından alınan örnek proksimal ve distal kayıtlar

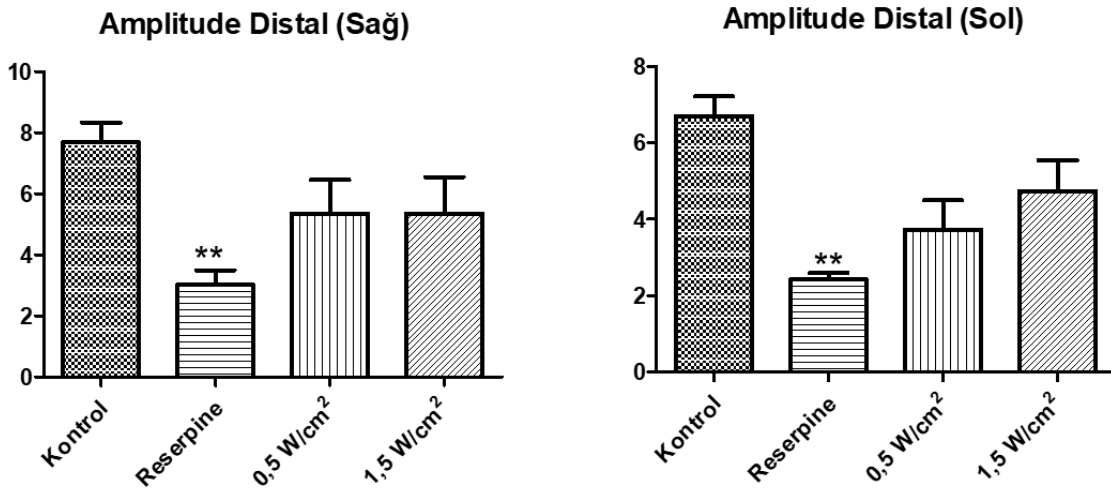


Şekil 30. $1.5W/cm^2$ Ultrases uygulaması olan deney grubunda siyatik sinir uyarımı ile ayak plantar kasından alınan örnek proksimal ve distal kayıtlar

Elektrofizyolojik incelemelerde elde edilen BKAP traselerinde proksimal ve distal latans değerleri belirlendikten sonra proksimal/distal latans oranı ile sinir ileti hızı hesaplanmış, ayrıca distal BKAP traselerindeki genlik (amplitüt), tepeden tepeye yanıt eğrisi altında kalan alan, toplam kayıt süresi hesaplanarak gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Hem sağ hem sol siyatik sinirin uyarımıyla elde edilen bu verilere ait bulgular Şekil 31-36’da görülmektedir.

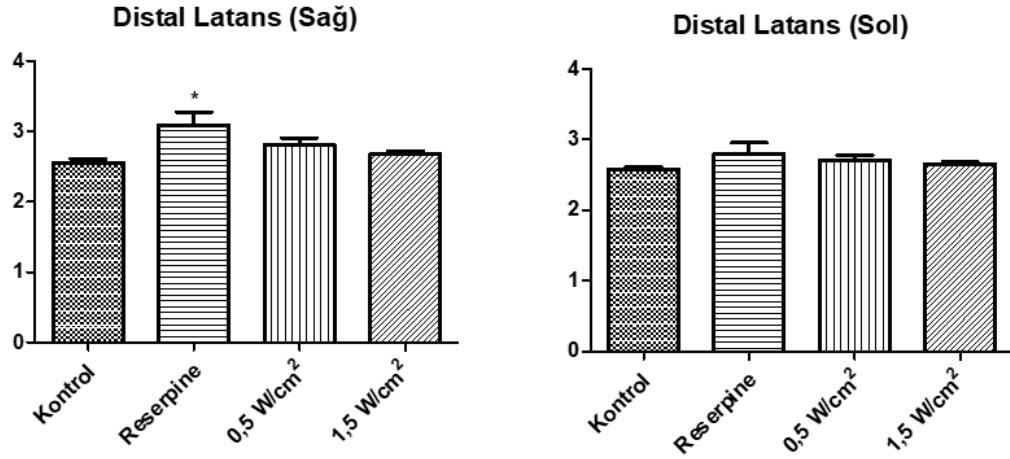


Şekil 31. Siyatik sinirin uyarımı ile gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere hesaplanan sinir ileti hızı değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezepin grubuna göre anlamlılık † işareti ile, US 0,5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

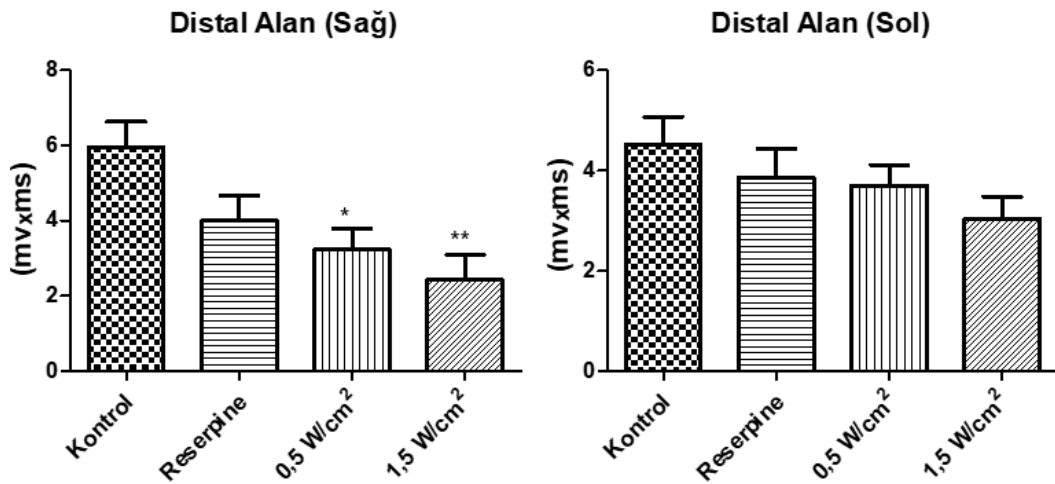


Şekil 32. Distal uyarımla gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere distal amplitüd değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü

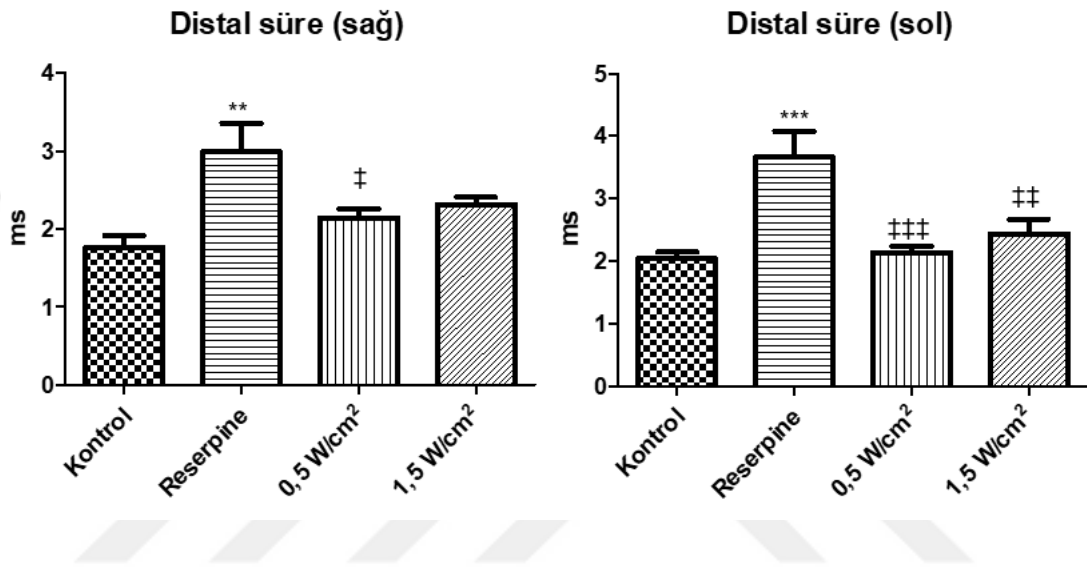
varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir. (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001)



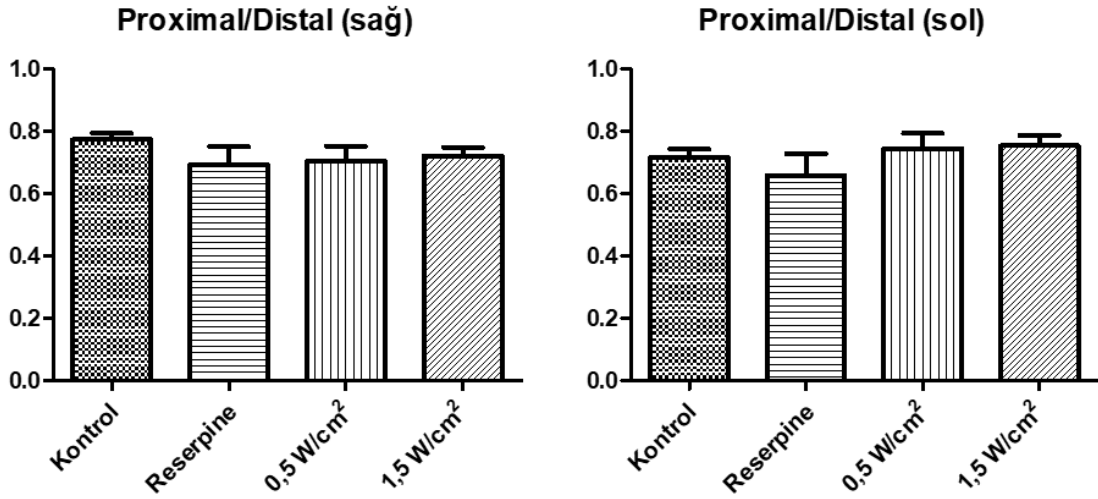
Şekil 33. Distal uyarımla gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere distal latans değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir. (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001)



Şekil 34. Distal uyarımla gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere distal alan (mv x ms) değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).



Şekil 35. Distal uyarımla gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere distal süre (ms) değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir. (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).



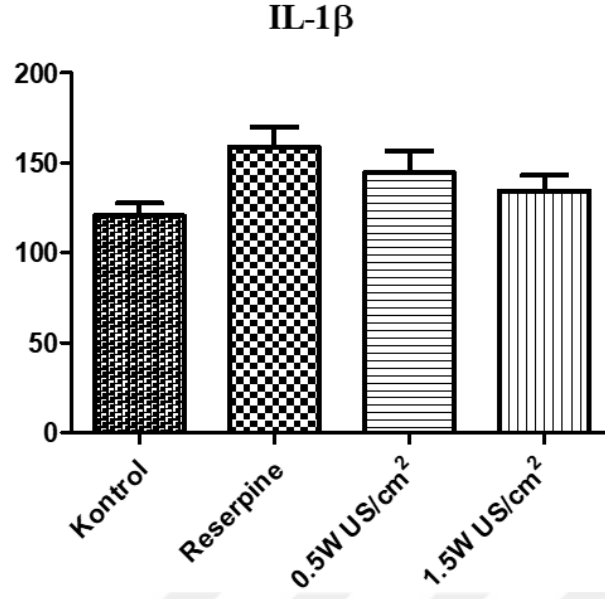
Şekil 36. Siyatik sinir uyarımı ile gerçekleştirilen elektrofizyolojik ölçümlerde elde edilen sağ ve sol bacak ayrı ayrı olmak üzere Proksimal / Distal oran değerlerindeki değişimleri gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezepin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

Siyatik sinir ileti hızı ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde hem sağ hem de sol bacdant alınan kayıtlarda kontrol grubuna kıyasla, rezepin enjeksiyonu yapılan gruplarda sinir iletim hızında anlamlı bir düşüş ($p<0,01$) görölmektedir. Uygulanan ultrases tedavilerinin ise, sinir ileti hızında rezepin uygulanan gruba nazaran anlamlı bir artışa neden olduğu ($p<0,001$) ve bu artışın 1.5 W/cm² güç yoğunluğunda darbeli ultrases uygulanan grupta daha belirgin olduğu görölmüştür. 1.5W/cm² ultrases uygulanan grubun sinir ileti hızlarının 0.5W/cm² grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu görölmektedir ($p<0,05$). Rezerpin uygulanan gruplardaki sinir iletim hızındaki düşüş, deney modelinde elde edilen monoamin tükenmesine bağılı periferik sinir hasarının oluştuğuna işaret etmektedir. Elektrik uyarısı verilmeye başlandığı andan BKAP'nin başlangıç noktasına kadar geçen süre latans süresi olarak adlandırılır. Latans süresi olarak tanımlanan süre içinde sinir iletim süresi, nöromusküler ileti zamanı ve kas membranında elektriksel ileti zamanını da içermektedir (Kunchok ve diğeri, 2019). Distal latans değerlerinin sağ siyatik sinir uyarımında rezepin uygulamasıyla kontrole nazaran anlamlı şekilde arttığı ($p<0,05$), ultrases tedavileriyle ise kontrole yaklaştığı görölmüştür. Proksimal latans ve distal latans oranlarında (P/D), rezepin grubunda diğeri gruplara kıyasla

anlamli olmayan azalma görülmekle birlikte tedavi gruplari ile rezerpin uygulanan grup arasında anlamli bir farklilik gözlenmemiştir. Uyarıya cevaben kaydedilen BKAP toplam kayıt süreleri değerlendirildiğinde, rezerpin uygulanan grupta bu sürenin kontrole nazaran anlamli bir şekilde azaldığı ($p<0.001$) görülürken, ultrases uygulanan gruplarda da rezerpin grubuna göre anlamli bir azalma ($p<0,05$) görülmüştür. Distal amplitüt (tepeden tepeye (P-P))  l  m sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla rezerpin uygulanan grupta amplitüt değerinin anlamli şekilde azaldığı ($p<0.01$), her iki g    yoğunluğunda ultrases uygulanan gruplarda ise distal amplitüt değerinin kontrole yaklaştığı gözlenmiştir. Bu bulgu, rezerpin enjeksiyonunun siyatik sinirde aksonal hasara neden olmuş olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, rezerpin uygulanan grupta distal BKAP süresinin uzaması ve latansın artımı da siyatik sinirde demiyelinizan ve hücresel hasar olabileceğini düşündürmektedir. Uygulanan tedaviler ise bu hasarı kontrole yaklaştırmıştır.

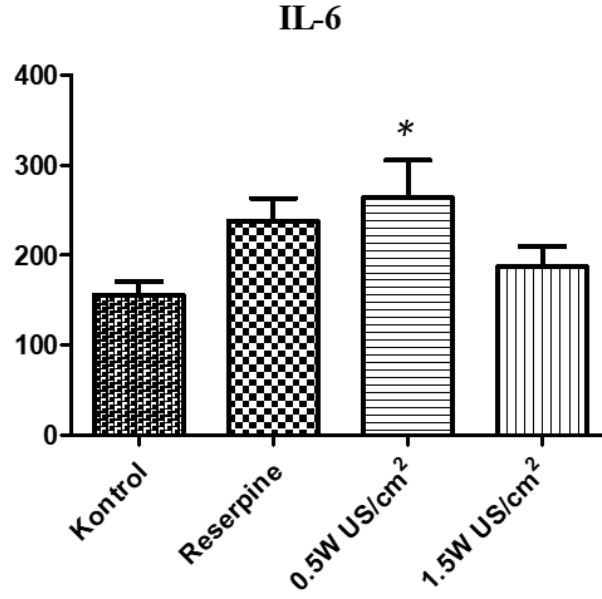
4.5. Proinflatuvar sitokin seviyelerindeki değişimler

Uygulanan tedaviler sonrasında deneklere ait serum TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyeleri incelenmiş olup gruplar arasında bu pro-inflatuvar sitokin seviyelerindeki değişimler şekil 37-39’da gösterilmektedir. Deneklerin serum örneklerine ait IL-1 β seviyeleri incelendiğinde rezerpin enjeksiyonu uygulanan grubun serum IL-1 β seviyelerinin kontrol grubu ve tedavi uygulanan gruplardan daha yüksek seviyede olduğu görülürken, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli bir farklilik görülmemiştir. Ultrases ile tedavi edilen gruplardaki seviyeler incelendiğinde, 1.5W/cm² ultrases tedavi grubu serum IL-1 β seviyelerinin rezerpin grubundan ve 0.5W/cm² ultrases tedavi grubundan daha düşük seviyede olduğu g r lmektedir. Fakat değişimler istatistiksel olarak anlamli bulunmamıştır.



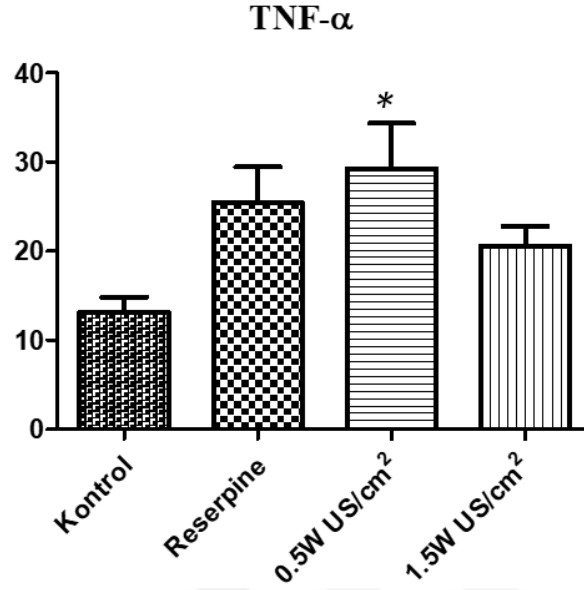
Şekil 37. Siyatik sinir doku örneklerinden IL-1 β seviyesini gösteren grafik. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezepin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

Deneklerin serum IL-6 seviyeleri incelendiğinde, rezepin enjeksiyonunun serum IL-6 seviyesini kontrole nazaran anlamlı olmayan bir şekilde artırdığı görülmüştür. Ultrases ile tedavi edilen gruplar incelendiğinde ise, 1.5W/cm² ultrases tedavi grubuna ait serum IL-6 seviyesinin kontrol grubuna yakın ve rezepin grubundan düşük olduğu, 0.5W/cm² ultrases tedavi grubunda ise IL-6 seviyesinin kontrole nazaran anlamlı şekilde yüksek olduğu (p<0.05) görüldü.



Şekil 38. Siyatik sinir doku örneklerinden IL-6 seviyesini gösteren grafik. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

Deneklerin serum TNF- α seviyeleri incelendiğinde ise benzer şekilde, rezerpin enjeksiyonu uygulanan grupta serum TNF- α seviyesinin kontrol grubuna nazaran anlamlı olmayan bir şekilde artmış olduğu tespit edildi. Ultrases ile tedavi edilen gruplar incelendiğinde ise, 1.5W/cm² ultrases tedavi grubu serum TNF- α seviyelerinin rezerpin grubundan düşük seviyede olduğu ve kontrol grubuna yaklaştığı, 0.5W/cm² ultrases tedavi grubunda ise IL-6 seviyesinin kontrol grubuna nazaran anlamlı şekilde artmış olduğu (p<0.05) görülmüştür.



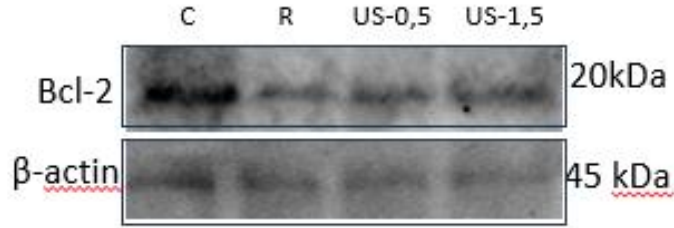
Şekil 39. Siyatik sinir doku örneklerinden TNF- α seviyesini gösteren grafik. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezepin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

4.5.1. Protein Ekspresyon Analiz Sonuçları

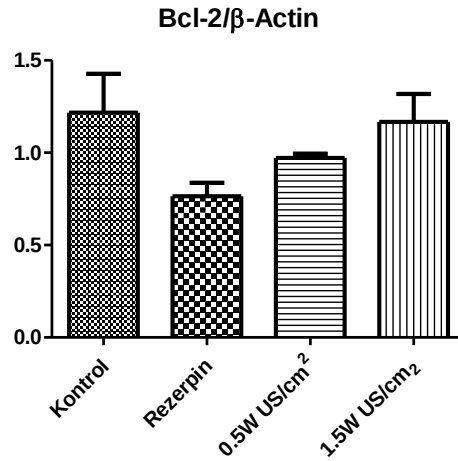
Western blot analizi için deneklerden elde edilen protein ekstraktlarında Bcl-2, Bax, kaspaz-3 ve Parkin protein ekspresyon seviyeleri belirlendi ve bu ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak için referans (housekeeping) protein olarak β -aktin protein ekspresyonu belirlendi. Elde edilen veriler ImageJ programı ile değerlendirildi ve ortaya çıkan bant yoğunlukları β -aktin ile normalize edildi ve % değerleri olarak grafiksel olarak ifade edildi. Grupların siyatik sinir örneklerinde apoptotik ve anti-apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu hakkında bilgi edinmek için kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı ve mitofajik sinyal yolu aktivasyonu hakkında bilgi edinmek için Parkin protein ekspresyon düzeyi belirlendi.

Resim 18’de siyatik sinir doku örneklerinden Western blot yöntemiyle elde edilen Bcl-2 protein ekspresyon düzeyi örnek jel görüntüsü görülmektedir. Şekil 40’da ise Bcl-2/ β -aktin protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasındaki değişimini gösteren bar grafik verilmiştir.

Bcl-2 protein ekspresyonunun rezerpin uygulanan grupta kontrole nazaran anlamlı olmayan şekilde azaldığı, uygulanan ultrases tedavilerinin ise Bcl-2 protein ifade seviyesini artırdığı, 1.5W/cm² ultrases uygulanan grupta Bcl-2 ifade seviyesinin kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür. Fakat, gruplara ait siyatik sinir Bcl-2 protein ifade seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.



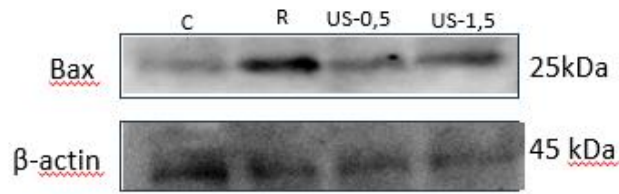
Resim 18. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Bcl-2 ekspresyonunu (20 kDa) gösteren membran görüntüsü ve aynı membranda gözlenen β-aktin ekspresyonu (45 kDa).



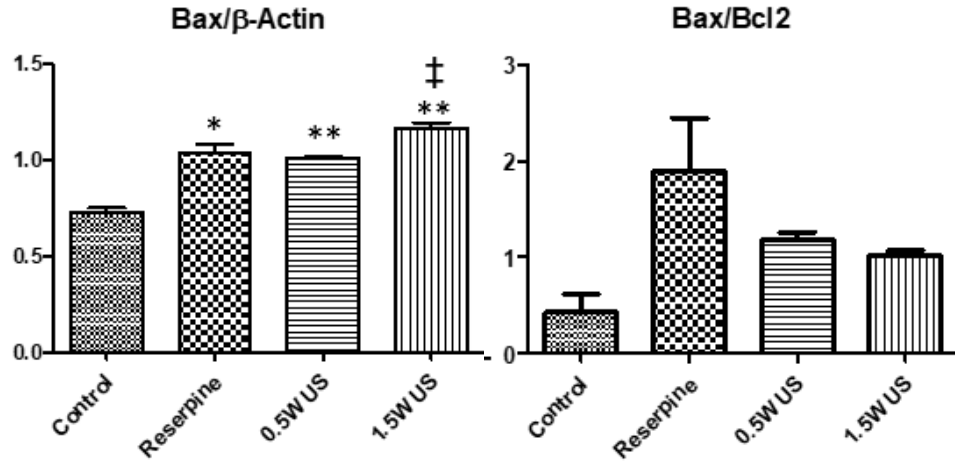
Şekil 40. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Bcl-2/β-Aktin ekspresyon oranını gösteren bar grafik. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre

anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

Resim 19’da gruplara ait siyatik sinir doku örneklerinden Western blot yöntemiyle elde edilen Bax protein ekspresyon düzeyi örnek jel görüntüsü görülmektedir. Şekil 41’de ise pro-apoptotik yolda yer alan ve apoptotik yola aktivasyon derecesini gösteren Bax proteinin ekspresyon seviyesinin β -aktin protein ekspresyon seviyesine oranı görülmektedir. Rezerpin uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla Bax/ β -aktin protein ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış (p<0,05) görülmüştür. Bax ekspresyonunda gözlenen artış rezerpin uygulama dozu ve süresinin apoptotik yola aktivasyonunu başlattığını göstermektedir. Tedavi gruplarından 0.5W/cm² ultrases uygulanan grupta Bax protein ekspresyon seviyesinin rezerpin uygulanan gruba göre pek değişmediği, 1.5W/cm² ultrases uygulanan grupta ise arttığı görülmüştür. Ayrıca Bax/Bcl-2 oranı incelendiğinde, rezerpin enjeksiyonu yapılan grupta bu oranın artmış olduğu; ultrases tedavileriyle, özellikle 1.5W/cm² ultrases uygulamasıyla Bax/Bcl-2 ekspresyon oranının azaldığı görülmüştür, fakat gözlenen değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Resim 19. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Bax ekspresyonunu gösteren membran görüntüsü.

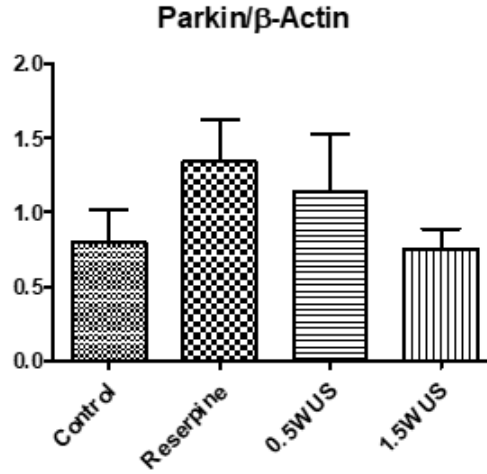


Şekil 41. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Bax/ β -Aktin ve Bax/Bcl-2 oranını gösteren bar grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık † işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

Resim 20’de gruplara ait siyatik sinir doku örneklerinden Western blot yöntemiyle elde edilen Parkin protein ekspresyon düzeyi örnek jel görüntüsü görülmektedir. Şekil 42’de ise Parkin/ β -aktin protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasındaki değişimini gösteren bar grafik verilmiştir. Protein ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, rezerpin uygulamasıyla Parkin protein ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artış olduğu ve ultrases uygulamasının, özellikle 1.5W/cm² ultrases grubunda bu durumu kontrol grubuna yaklaştırdığı görülmüştür. Parkin protein ifade seviyesinde görülen değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

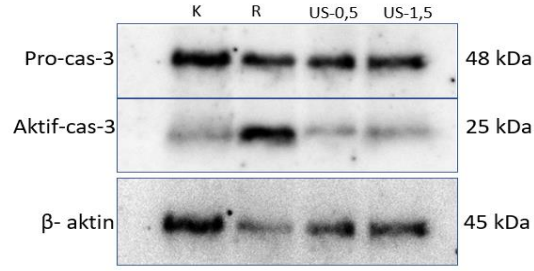


Resim 20. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Parkin ekspresyonunu gösteren membran görüntüsü.

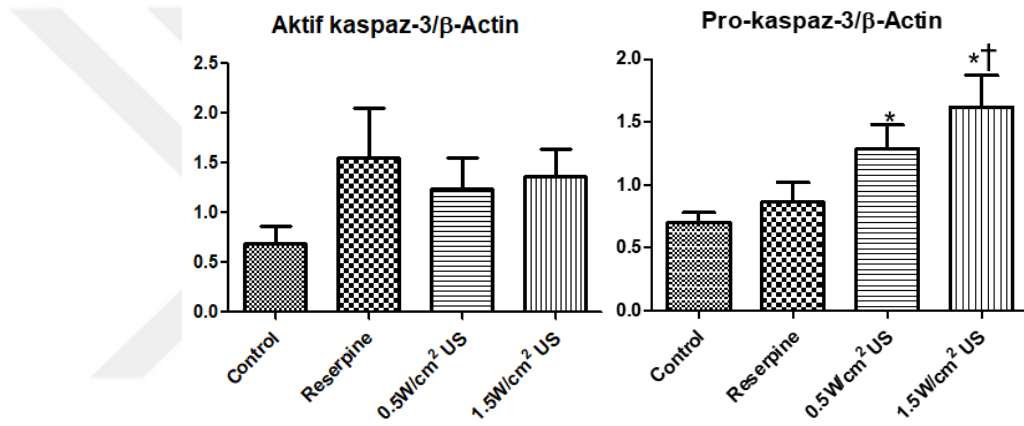


Şekil 42. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Parkin/β-Aktin oranını gösteren bar grafik. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

Resim 21’de gruplara ait siyatik sinir doku örneklerinden Western blot yöntemiyle elde edilen Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyi örnek jel görüntüsü görülmektedir. Proteinin aktifleşmemiş öncül hali 48 kDa moleküler ağırlığında (pro-kaspaz-3), proteolitik olarak kesilerek aktifleşmiş hali ise 25 kDa moleküler ağırlığında (aktif-kaspaz-3) görülen bantlarla tespit edilmiştir. Şekil 43’te de aktif-kaspaz-3 ve pro-kaspaz-3 ifade seviyelerinin β-aktin ifade seviyesine oranlanmasıyla elde edilen protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasındaki değişimini gösteren bar grafikler görülmektedir. Bu proteinlere ait ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, rezerpin uygulamasıyla aktif-kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artım olduğu ve ultrases uygulamasının bu durumu bir miktar azalttığı görülmüştür. Pro-kaspaz-3 ifade seviyesinin ise rezerpin uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir miktar artmış olduğu ve ultrases tedavi gruplarında, özellikle 1.5 W/cm² ultrases uygulanan grupta rezerpin uygulanan gruba göre pro-kaspaz-3 protein ifadesinin artmış olduğu (p<0.05) görülmüştür.



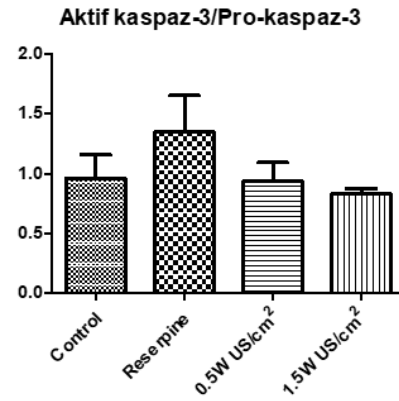
Resim 21. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen Pro-kaspaz-3 ve Aktif-kaspaz-3 ekspresyonunu gösteren membran görüntüsü



Şekil 43. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen aktif kaspaz/β-Aktin ve pro-kaspaz-3/β-Aktin oranını gösteren bar grafik. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile, uymayanlar Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezepin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Kaspaz-3, apoptoz veya programlanmış hücre ölümü sürecinde önemli bir oyuncudur. Kaspaz-3 öncülü olarak da bilinen pro-kaspaz-3, kaspaz-3 enziminin aktif olmayan formudur. Pro-kaspaz-3, hücreler içinde sentezlenir ve belirli koşullar altında proteolitik kesilme yoluyla aktifleşerek aktif-kaspaz-3'e dönüştürülür. Bu bağlamda pro-kaspaz-3'ün aktivasyonu apoptotik yolda kritik bir adımdır. Tipik olarak bu aktivasyon, pro-kaspaz-3'ün belirli bölgelerde diğer kaspazlar veya proteazlar tarafından bölünmesini içerir. Kaspaz-3 aktive edildikten sonra

uygulayıcı (executer) kaspaz haline gelir ve apoptoz sırasında hücrenin parçalanmasında merkezi bir rol oynar. Çalışmada kullanılan kaspaz-3 antikoru, aynı jel üzerinde yürüyen proteinlerden hem pro-kaspaz-3 (48 kDa) hem aktif-kaspaz-3 (25 kDa) proteinlerine bağlanabilme özelliği gösterdiğinden, referans protein β -aktin'e oranlamaya gerek duyulmadan aktif kaspaz-3 / pro-kaspaz-3 ifade seviyesi belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 44'te gösterilmiştir. Bu oran, rezepin uygulanan grupta kontrole nazaran anlamlı olmayan şekilde artmış ve ultrases tedavileriyle kontrol düzeyine yaklaşmıştır. Bu bulgu, aktif kaspaz-3 ifade seviyesinin pro-kaspaz-3 ifade seviyesine nazaran rezepin uygulamasıyla artma eğiliminde olduğunu, yani rezepin uygulamasının apoptotik yolda aktivasyona neden olduğunu, ve ultrases tedavilerinin siyatik sinirdeki apoptotik yola aktivasyonunu baskılama eğiliminde olduğunu göstermektedir.



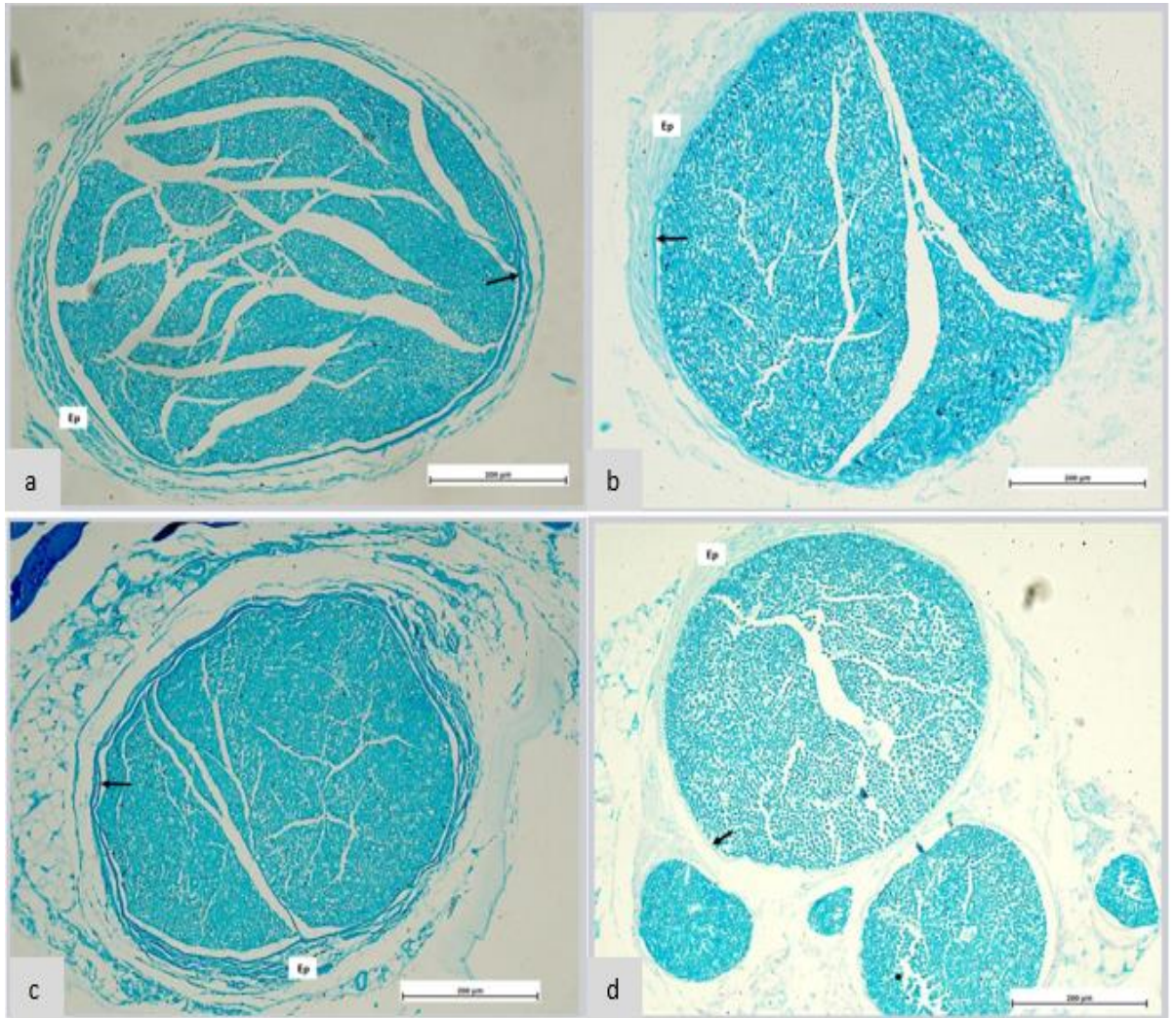
Şekil 44. Siyatik sinir dokusunda Western blot yöntemiyle elde edilen aktif kaspaz/pro-kaspaz-3 oranını gösteren bar grafik. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezepin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

4.6. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

Deneklerden alınan siyatik sinir doku örnekleri parafine gömüldükten sonra alınan kesitler, dokunun genel yapısının incelenmesi ve nükleus-sitoplazma ayrımı için hematoksilin-eozin boyasıyla; miyelin kılıf ve akson yapısının incelenmesi için luksol fast blue boyasıyla;

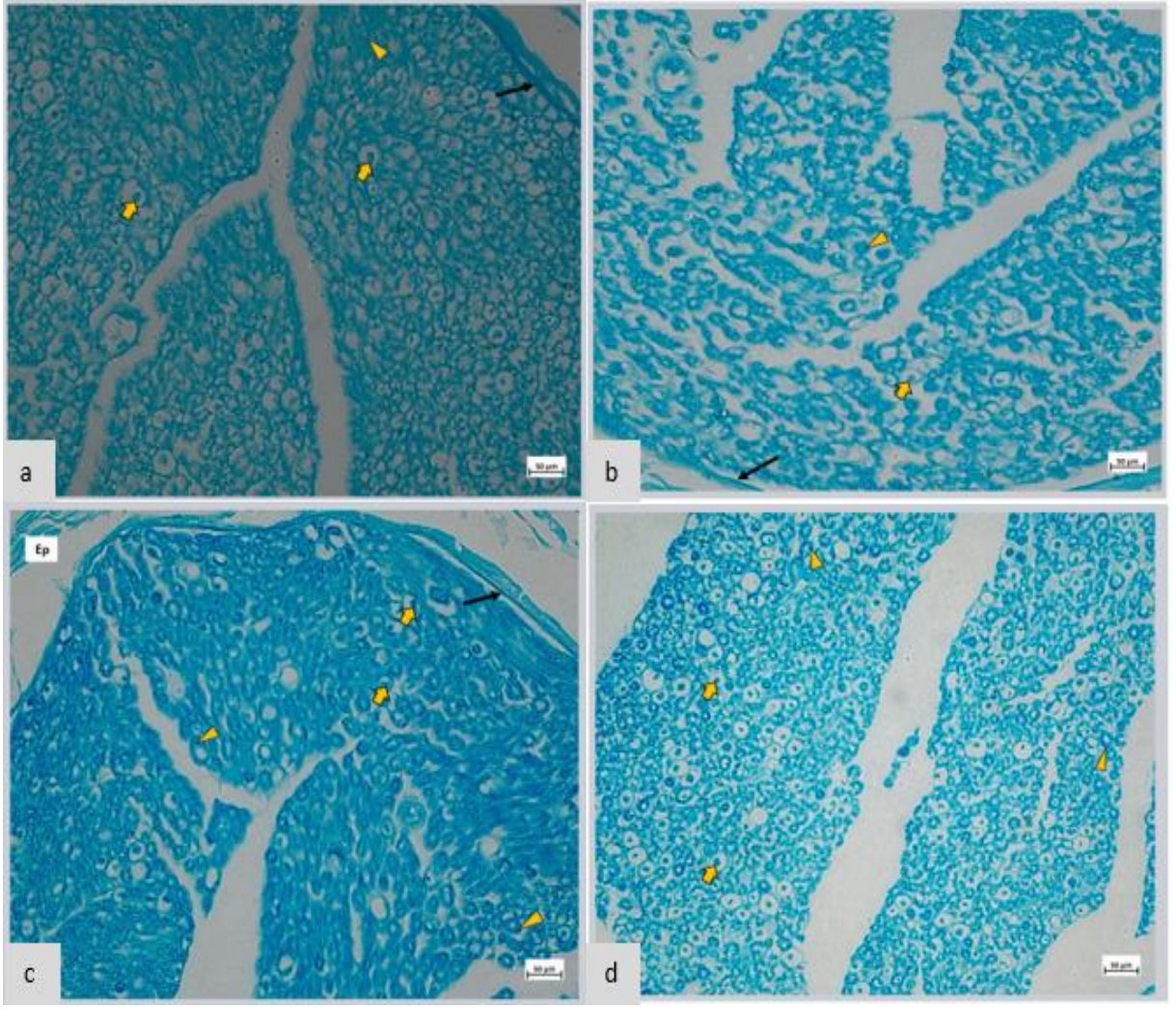
sinir dokusunun içeriğinde bulunan ve kılıf olarak etrafını saran bağ dokusunun yapısının incelenmesi için masson trichrome boyasıyla boyanarak histokimyasal incelemeler yapılmıştır.

Deney gruplarına ait siyatik sinir kesitlerinin Luxol fast blue (LFB) boyaması görüntüleri, Resim 22’de 10X büyütmede; Resim 23’de 40X büyütmede gösterilmiştir. Gruplara ait siyatik sinir kesitlerinin Hematoksilen-eozin (HE) boyaması görüntüleri, Resim 24’te 10X büyütmede; Resim 25’de 40X büyütmede gösterilmiştir. Gruplara ait siyatik sinir kesitlerinin Masson trichrome (MTC) boyaması görüntüleri, Resim 26’da 10X büyütmede; Resim 27’de 40X büyütmede gösterilmiştir.



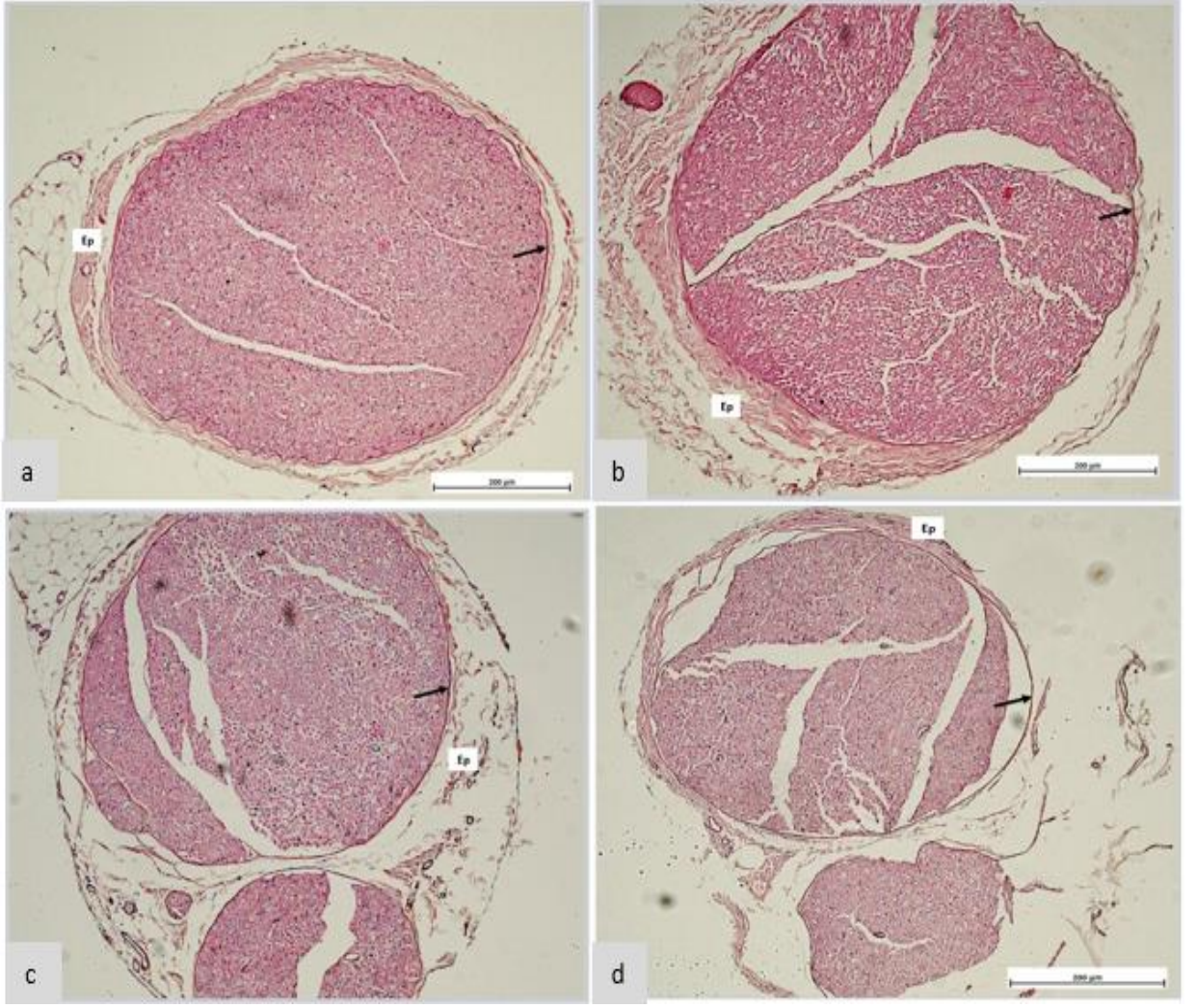
Resim 22. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin LFB boyama görüntüleri; Kontrol grubu (a), Rezerpin grubu (b), US 0.5W/cm² (c), US 1,5W/cm² grubu (d). 10X, Ölçüm barı: 100 µm.

Epinöryum (Ep), Perinöryum (P)



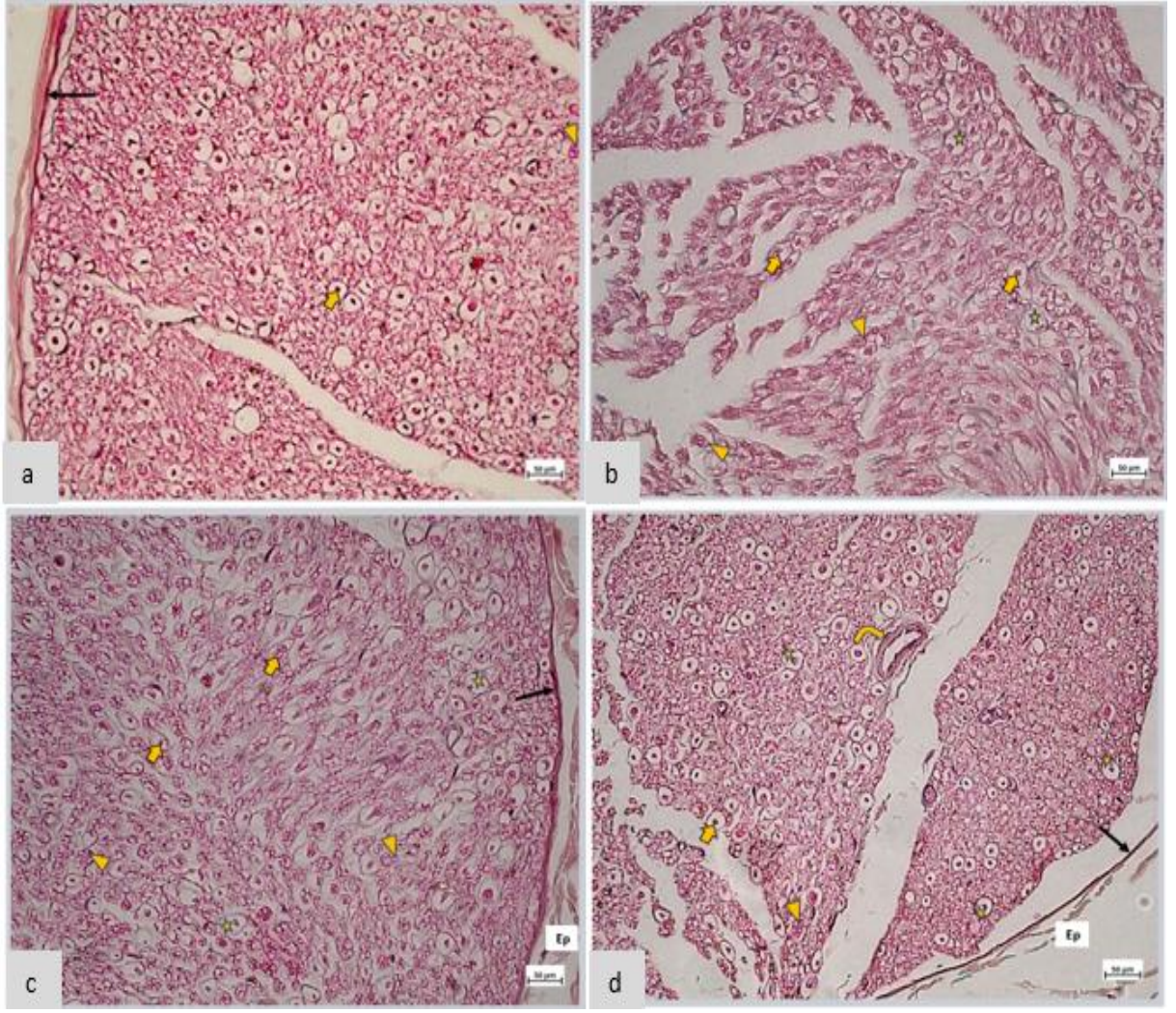
Resim 23. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin LFB boyama görüntüleri; Kontrol grubu (a), Rezerpin grubu (b), US 0.5W/cm² (c), US 1,5W/cm² grubu (d). 40X, Ölçüm barı: 50 µm.

Epinöryum (Ep), Perinöryum (↑), Akson (↑), Miyelin (▲)



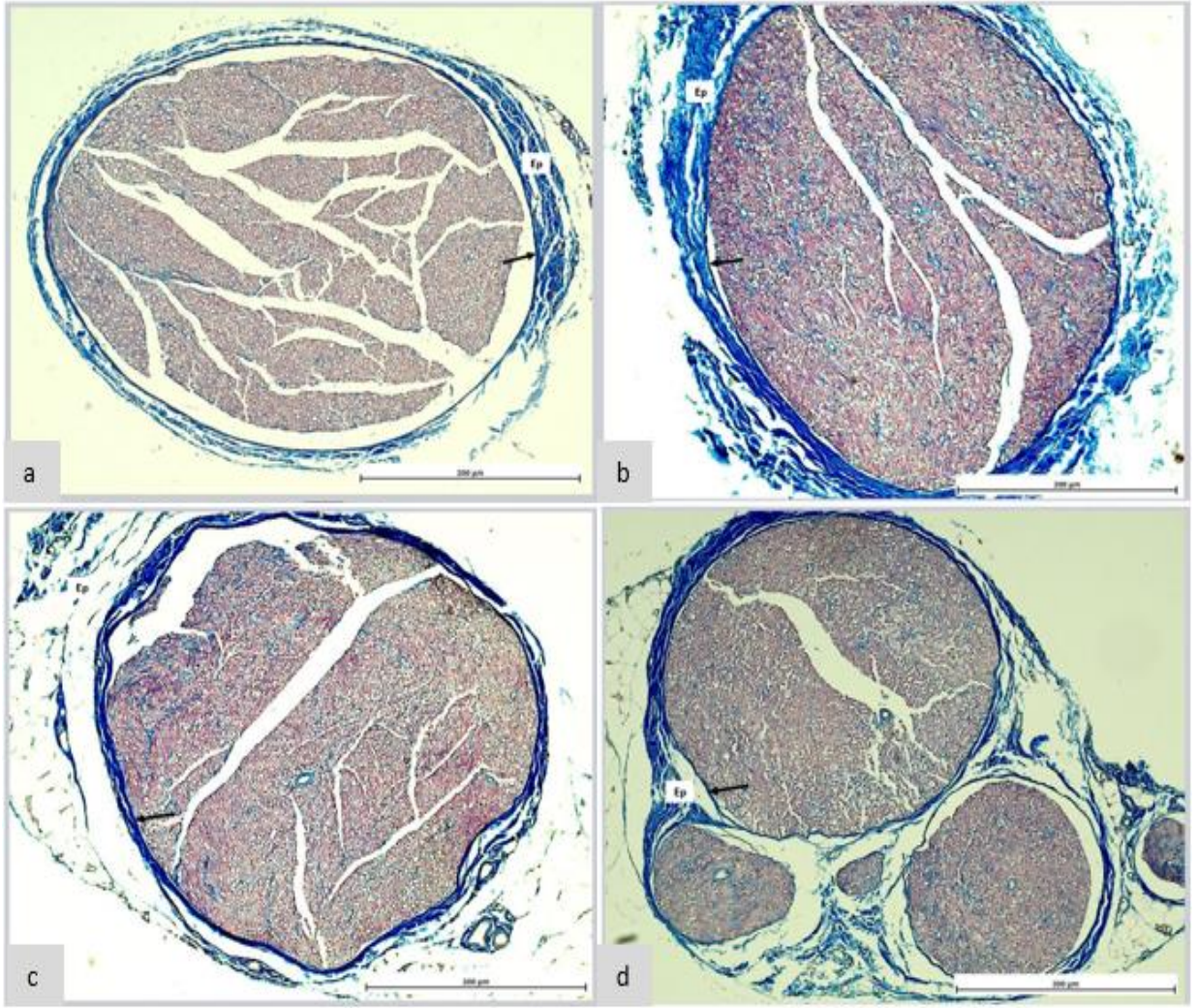
Resim 24. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin HE boyama görüntüleri; Kontrol grubu (a), Rezerpin grubu (b), US 0.5W/cm² (c), US 1,5W/cm² grubu (d). 10X, Ölçüm barı: 100 µm.

Epinöryum (Ep), Perinöryum (↑)



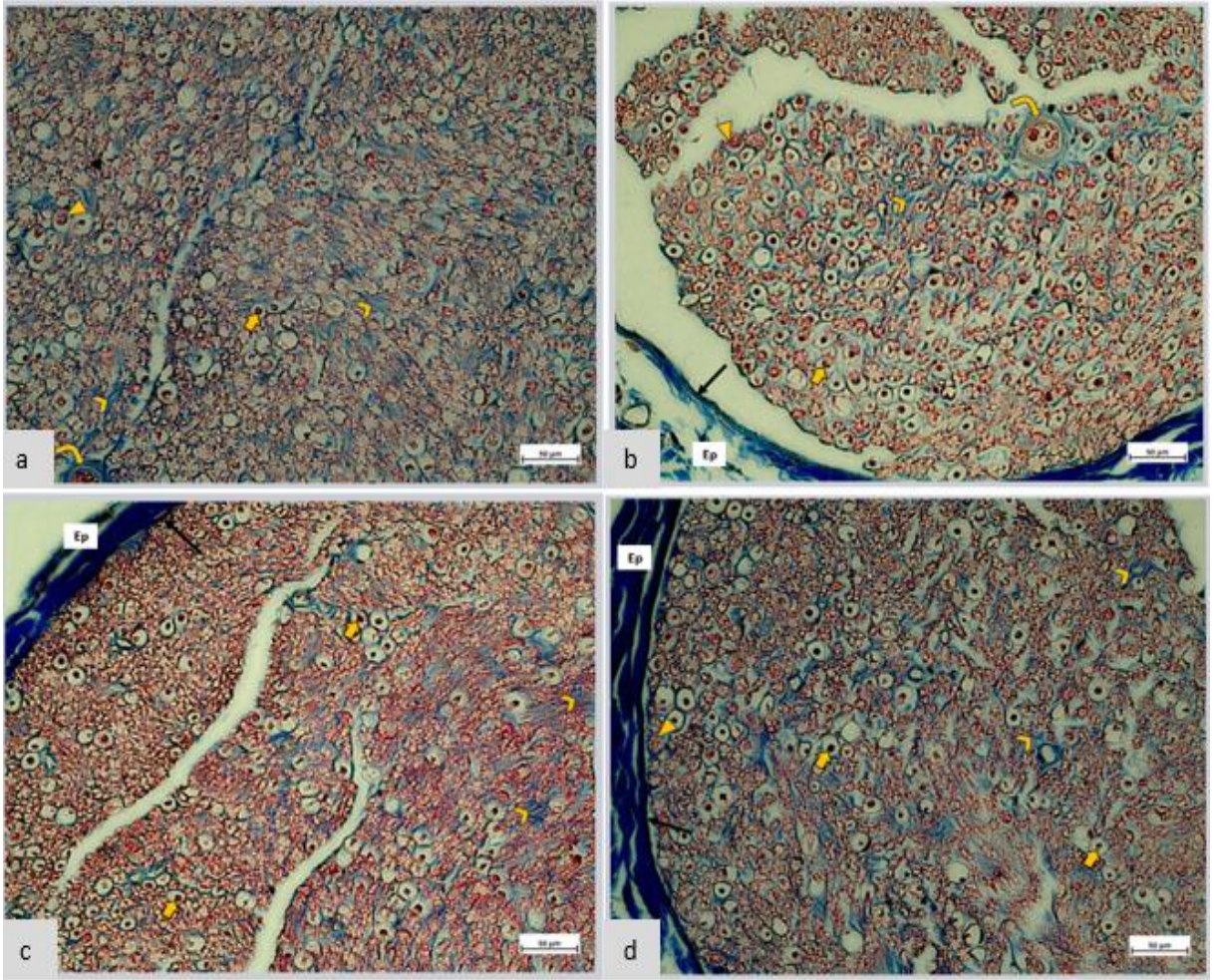
Resim 25. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin HE boyama görüntüleri; Kontrol grubu (a), Rezerpin grubu (b), US 0.5W/cm² (c), US 1,5W/cm² grubu (d). 40X, Ölçüm barı: 50 µm.

Epinöryum (Ep), Perinöryum (↑), Akson (↑), Miyelin (▲), Kollajen lifler (➤), Kan damarı (↪), Aksonal şişme (★)



Resim 26. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin MTC boyama görüntüleri; Kontrol grubu (a), Rezerpin grubu (b), US 0.5W/cm² (c), US 1,5W/cm² grubu (d). 10X, Ölçüm barı: 100 µm.

Epinöryum (Ep), Perinöryum (↑)



Resim 27. Siyatik sinir dokusu kesitlerinin MTC boyama görüntüleri; Kontrol grubu (a), Rezerpin grubu (b), US 0.5W/cm² (c), US 1,5W/cm² grubu (d). 40X, Ölçüm barı: 50 µm.

Epinöryum (Ep), Perinöryum (↑), Akson (↑), Miyelin (▲), Kollajen lifler (➤), Kan damarı (↪), Aksonal şişme (★)

Siyatik sinir dokusunda yapılan masson trikrom histokimyasal boyaması ile siyatik sinire ait bir sinir lif demetindeki bağ dokusu ve kollajen lif yapısı; hematoksilin&eozi boyaması ile de genel histoloji değerlendirilmiştir.

Kontrol grubunda; boydan boya sinir lif demetinin düzenli perinöryum tabakası ile çevrelediği ve bu tabakayı da düzenli vasküler yapıların eşlik ettiği epinöryum tabakasının çevrelediği gözlemlenmiştir. Perinöryum tabakasının çevrelediği sinir lif demeti içinde aksonal ve miyelinizan alanlar arasında düzenli endonöral bölgeler yoğun kollajen lifler ile birlikte görülmüştür. Ayrıca, boydan boya sinir lif demeti incelendiğinde aksonal yerleşimin merkezi eksentrik yerleşimli ve çevresini miyelin kılıfın çevrelediği gözlemlenmiştir. Miyelinli sinir

lifleri sinir lif demeti içinde yoğun olarak bulunmaktadır. Vaskülerizasyonun normal olduğu gözlemlenmiştir.

Rezerpin grubunda; boydan boya sinir lif demetinin düzenli perinöryum tabakası ile çevrelendiği ve bu tabakayı da düzenli vasküler yapıların eşlik ettiği epinöryum tabakasının çevrelediği gözlemlenmiştir. Perinöryum tabakasının çevrelediği sinir lif demeti içinde aksonal ve miyelinizan alanlar arasında düzensiz endonöral bölgeler, hafif endonöral kayıpla ve yer yer yoğun kollajen lifler ile birlikte görülmüştür. Ayrıca, boydan boya sinir lif demeti incelendiğinde aksonal yerleşimin merkezi eksentrik yerleşimli ve çevresini miyelin kılıfın çevrelediği gözlemlenmekle birlikte, genellikle aksonal atrofi, miyelin kaybının eşlik ettiği aksonal şişme gözlemlenmiştir. Miyelinli sinir lifleri sinir lif demeti içinde atrofik ve kontrol grubuna kıyasla sayıca az bulunmaktadır. Vaskülerizasyonun normal olduğu gözlemlenmiştir.

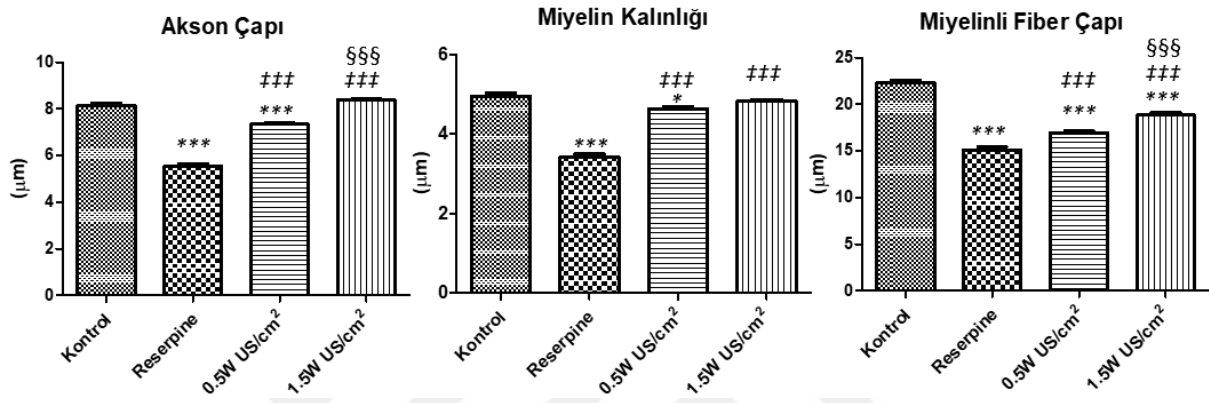
0.5W US/cm² grubunda; boydan boya sinir lif demetinin düzenli perinöryum tabakası ile çevrelendiği ve bu tabakayı da düzenli vasküler yapıların eşlik ettiği epinöryum tabakasının çevrelediği gözlemlenmiştir. Perinöryum tabakasının çevrelediği sinir lif demeti içinde aksonal ve miyelinizan alanlar arasında düzenli endonöral bölgeler yoğun kollajen lifler ile birlikte görülmüştür. Ayrıca, boydan boya sinir lif demeti incelendiğinde aksonal yerleşimin merkezi eksentrik yerleşimli ve çevresini miyelin kılıfın çevrelediği gözlemlenmiştir. Miyelinli sinir lifleri sinir lif demeti içinde atrofik ve kontrol grubuna kıyasla sayıca az bulunmaktadır.

1.5W US/cm² grubunda; boydan boya sinir lif demetinin düzenli perinöryum tabakası ile çevrelendiği ve bu tabakayı da düzenli vasküler yapıların eşlik ettiği epinöryum tabakasının çevrelediği gözlemlenmiştir. Perinöryum tabakasının çevrelediği sinir lif demeti içinde aksonal ve miyelinizan alanlar arasında düzenli endonöral bölgeler yoğun kollajen lifler ile birlikte görülmüştür. Ayrıca, boydan boya sinir lif demeti incelendiğinde aksonal yerleşimin merkezi eksentrik yerleşimli ve çevresini miyelin kılıfın çevrelediği gözlemlenmiştir. Miyelinli sinir lifleri sinir lif demeti içinde atrofik ve kontrol grubuna kıyasla sayıca az bulunmaktadır.

Bu görüntülemelerden 40X büyütmede alınan LFB boyama görüntülerinin ImageJ programı yardımıyla gerçekleştirilen analizinde kesitlerdeki akson çapı, miyelin kalınlığı ve miyelinli sinir lifi çapı ölçülmüş, veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı ve homojen bir şekilde dağıtılmış veriler için bir son test olarak art test Tukey testi uygulandı. Bu ölçümlere ait veriler şekil 45'te gösterilmiştir.

Şekil 45'te görüldüğü üzere, rezerpin uygulamasının siyatik sinire ait sinir lif demetlerindeki akson çapında, miyelin kılıf kalınlığında ve miyelinli sinir lifi çapında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu ($p<0,001$) görülmüştür. Uygulanan ultrases tedavilerinin her iki güç yoğunluğunda da siyatik sinire ait sinir lif

demetlerinde akson çapında, miyelin kılıf kalınlığında ve miyelinli sinir lifi çapında rezerpin uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artışa ($p<0,001$) neden olduğu ve değerleri kontrol grubuna yaklaştırdığı gözlenmiştir. Ayrıca tedavilerden, $1.5W\text{ US/cm}^2$ güç yoğunluğunda darbeli ultrases uygulamasının incelenen parametrelerde $0.5W\text{ US/cm}^2$ güç yoğunluğundaki ultrases uygulamasına nazaran daha anlamlı bir değişime neden olduğu gözlenmiştir.

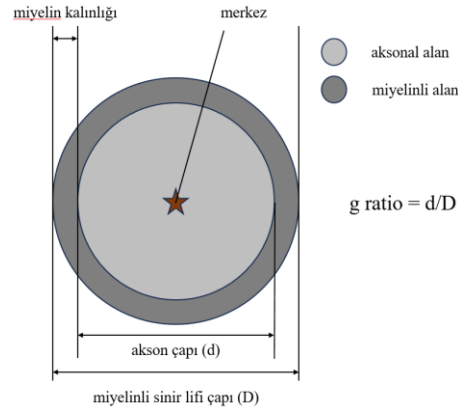


Şekil 45. Siyatik sinir dokusundan alınan histolojik kesitlerin akson çapı, miyelin kalınlığı ve miyelinli fiber çapını gösteren bar grafik. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile, US $0.5W/cm^2$ grubuna göre anlamlılık § işareti ile gösterilmiştir (* $p<0,05$,** $p<0,01$,*** $p<0,001$).

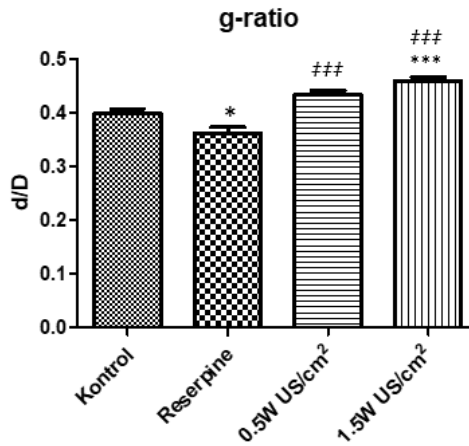
Miyelin kılıf kalınlığındaki değişimi daha net görebilmek için kullanılan g oranı veya miyelin oranı, miyelin kılıfının iç (d) ve dış (D) çapı değerlerinin oranlanmasıyla ($g\text{ oranı}=d/D$) hesaplanmakta ve bireysel akson liflerinin miyelin kılıf kalınlığının indeksindeki alan yapısının bir fonksiyonu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda g oranı Zaimi ve diğerlerinin (2016) çalışması referans alınarak Şekil 46'da görüldüğü gibi hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar şekil 47'de yer alan grafikte verilmiştir. Buna göre, veziküler monoamin transport inhibitörü olan rezerpin enjeksiyonu g-oranında kontrole nazaran anlamlı azalmaya neden olmuş ($p<0.05$), uygulanan ultases tedavileri ise özellikle $1.5W/cm^2$ güç yoğunluğunda rezerpin enjekte edilen gruba nazaran g-oranında anlamlı bir artıma ($p<0.001$) neden olmuştur. G-ratio değerleri literatürde yer alan

çalışmalarda optimum 0.6 düzeylerinde karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda tüm gruplarda bu oran, 0.6'dan daha düşük değerlerde görülmüştür. Bu durumun temel nedeninin, rezerpin enjeksiyonu ile indüklenen parkinsonizm semptomlarının oluşturulmasında yaşlı deneklerin kullanım zorunluluğu olduğu düşünülmektedir.



Şekil 46. G-ratio hesaplama şemasında her bir miyelinli lif için ağırlık merkezi, akson ve miyelin alanları, akson çapı, miyelinli lif çapı, miyelin kalınlığı ve miyelin g oranı hesaplanır (Zaimi ve diğerleri, 2016).



Şekil 47. Siyatik sinir kesitlerinden hesaplanan akson çapı, miyelinli lif çapı oranlarının gösterimi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile karşılaştırıldı. Art test Tukey uygulandı. Kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, rezerpin grubuna göre anlamlılık † işareti ile, US 0.5W/cm² grubuna göre anlamlılık ‡ işareti ile gösterilmiştir (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001).

5. TARTIŞMA

Parkinson hastalığı (PH) günümüzde henüz etkili ve radikal bir tedavisi olmayan nörodejeneratif bir hastalıktır. PH; Alzheimer, Huntington, ALS, ve diyabet gibi başka nörodejeneratif hastalıklarla birlikte belirli bir proteinin katlanma bozukluğunun görülmesi sebebiyle proteinopati olarak isimlendirilen hastalıklar grubuna dahil edilmektedir. PH'de çökelediği görülen nöronal α -sinuklein agregatlarının MSS'nin yanı sıra periferik sinir sisteminde (PSS) de tutulum gösterdiği, sempatik ganglionlar, enterik sinir sistemi, kardiyak ve pelvik pleksuslar, submandibuler bez, adrenal medulla ve deri dahil olmak üzere sinir sistemi boyunca dağıldığı gözlenmiştir. Ancak tüm hastalarda proteinopatinin görülmediği ve bu nedenle farklı tiplerde oluşan PH patolojisi günümüzde parkinsonizm şemsiyesi altında toplanmıştır. Bu hastalıkta MSS ve PSS'nin bölgelerinde patolojik değişiklikler meydana gelmekte ve oluşan patolojik süreç, PSS ve MSS'yi aynı anda hedeflemektedir (Wakabayashi ve diğerleri, 2010). Parkinson hastalarında %55'e kadar yükselebilen bir oranda polinöropati görülebildiği ve görülen nöropatinin kötü Parkinson fenotipinin bir işaretçisi olabileceği bildirilmiştir (Merola ve diğerleri, 2017). İdiyopatik Parkinson hastalığı (IPH), beynin çeşitli bölgelerinde ilerleyici dopaminerjik innervasyon kaybını içeren çoklu sistem hastalığıdır. İPH; katılık, yürüme ve denge sorunları, bradikinezi ve titreme gibi motor semptomların yanı sıra bilişsel, otonomik ve duyuşal bozukluklar gibi motor olmayan semptomlarla da kendini gösterir (Müller ve diğerleri, 2013). PH'de yakın zamanda gözlemlenen "kapalı" ilaç tedavisi sırasında duyuşal bozuklukların varlığı, PN'nin de hastalıkta olası patolojik katılımına işaret etmektedir (Müller ve diğerleri, 2013).

Hastalıkta oluşan periferik sinir hasarı progresif şekilde ilerleyerek hasta refahını olumsuz etkilemekte, halihazırda mobilite sorunları olan Parkinson hastaları için, eşzamanlı bir periferik nöropati; hareketsizliğe, düşme riskine ve otonomik disfonksiyona, ayrıca duyuşal fenomen, distal uzuv zayıflığı ve ağrı dahil yeni semptomların gelişmesine katkıda bulunabilmektedir.

Periferik nöropati (PN), periferik motor, duyu ve otonomik sinirlerin işlev bozukluğu olarak tanımlanan yaygın bir nörolojik sorundur (Zis P ve diğerleri, 2017; England, 2004; Simon, 2009). PN, sinir lifleri içindeki akson veya miyelin hastalığı olarak ayrı ayrı kendini gösterdiği gibi aynı anda aksonal ve miyelin hasar da görülebilir (Wolfe GI ve diğerleri, 2009). PN semptomlarına motor bozukluklardan önce gelen duyuşal bozukluklar neden olabilir. Bununla birlikte, kronik inflamatuvar demiyelinizan nöropati gibi diğer nöropatilerde, baskın

semptomlar olarak motor bozukluklar da bulunabilir (Latov, 2002). PN'nin metabolik ve endokrin bozukluklar, genetik hastalıklar, HIV, enfeksiyon hastalıkları ve tiroid hastalığı gibi bir çok farklı etiyojisi vardır. Son yıllarda, Parkinson hastalığına sahip kişilerde ilk olarak tespit edilen Parkin geni gibi gen mutasyonları ile B12, folat, B6 ve B1 gibi vitamin eksikliklerinin de PN semptomlarına katkıda bulunduğu önerilmektedir (Notermans ve diğerleri, 1994; Müller ve diğerleri, 2013; Rajabally ve diğerleri, 2013). İdiyopatik periferik nöropati (IPN) çok yavaş bir ilerleme hızına sahiptir ve sıklıkla yaşlı popülasyonda görülür (Notermans ve diğerleri, 1994).

Başta nigrostriatal yol olmak üzere dopaminerjik sistem değişiklikleri, anormal hareketlerle ilişkili olan PH ve tardif diskinezi (TD) gibi çeşitli nörolojik bozukluklarla ilişkilidir (Andreassen ve diğerleri, 2003; Lotharius ve Brundin 2002). PH'nin 60 yaşın üzerindeki nüfusun %1 ila 2'sini etkilediği bu hastalıkların prevalansı yüksektir (Lewitt, 2008). Tipik antipsikotik kullanan hastalarda TD prevalansı %20-25 olup, 50 yaşın üzerindeki hastalarda prevalans %50'ye çıkmaktadır (Andreassen ve Jorgensen, 2000). Bu bağlamda hareket bozukluklarının patofizyolojisini incelemek için farklı hayvan modelleri kullanılmıştır (Abílio ve diğerleri, 2003; Castro ve diğerleri, 2006; Fachinetti ve diğerleri, 2007a, b; Salamone ve diğerleri, 2008). Parkinsonizm ve TD ile ilişkili ekstrapiramidal semptomları incelemek amacıyla deneysel bir model oluşturulması için sıklıkla başvurulmuş ajanlardan birisi rezerpindir (Busanello ve diğerleri, 2011; Dutra ve diğerleri, 2002; Neisewander ve diğerleri, 1991, 1994; Reckziegel ve diğerleri, 2013; Reis ve diğerleri, 2013; Salamone ve Baskin 1996). VMAT-1 ve VMAT-2'yi geri dönüşümsüz ve seçici olmayan bir şekilde bloke eden rezerpin, monoaminlerin hücre içi keseciklerde depolanmasına müdahale ederek sinir terminallerinde monoamin tükenmesine neden olur (Henry ve diğerleri, 1998). Bu nedenle hücre içi monoamin düzeylerinde artış ve monoamin oksidaz (MAO) metabolizmalarında artış meydana gelir ve bu da nörotoksik metabolitlerin aşırı üretimine neden olabilir (Caudle ve diğerleri, 2008; Lotharius ve Brundin, 2002). Literatürde yer alan çalışmalarla, bu veziküler taşıyıcının hareket bozukluklarındaki kritik rolü gösterilmiş ve geri dönüşümlü olarak seçici bir VMAT-2 inhibitörü olan tetrabenazinin sıçanlarda titreyen çene hareketlerine neden olduğu ve hareket kabiliyetini baskıladığı rapor edilmiştir (Podurgiel ve diğerleri, 2013). Bu bileşiğin uygulanması, DARPP-32'nin ekspresyonunu D1 ve D2 reseptör sinyallemedeki azalmayla tutarlı bir şekilde değiştirir (Nunes ve diğerleri, 2013). Rezerpin, deney hayvanlarında dopaminerjik değişimlerle ilişkili olarak hipolokomosyon, katalepsi, kas sertliği (Dutra ve diğerleri, 2002; Gerlach ve Riederer, 1996) ve boş çiğneme hareketleri gibi motor değişikliklere neden olur (Burger ve diğerleri, 2004; Busanello ve diğerleri, 2011; Faria ve diğerleri, 2005;

Neisewander ve diğerleri, 1991, 1994; Reckziegel ve diğerleri, 2013). Rezerpin, literatürde anormal hareketler ve motor bozuklukların yeni tedavi alanlarını keşfetmek için büyük ölçüde kullanılan bir model olmasına karşın (Barcelos ve diğerleri, 2010; Burger ve diğerleri, 2004; Busanello ve diğerleri, 2011; Faria ve diğerleri, 2005; Pereira ve diğerleri, 2011; Reckziegel ve diğerleri, 2013; Tadaiesky ve diğerleri, 2006); rezerpinin spesifik dopaminerjik moleküler hedefleri hayvan modellerinde yeterince detaylı olarak çalışılmamıştır.

PH'nin merkezi sinir sistemindeki etkileri ve yarattığı olumsuzluklar detaylı şekilde incelenmiş olmasına karşın, literatürde Parkinson hastalarında hastalığın PSS üzerine olan etkisi, PN oluşum mekanizmaları veya oluşan nöropati için etkili bir tedavi önerilmesiyle ilişkili çalışmalar son derece sınırlıdır. Bu nedenle, bu çalışmada rezerpin ile indüklenen parkinsonizm semptomlarına bağlı olarak periferik sistem siyatik sinirde oluşan sinir hasarının belirlenmesi ve ultrasesin sözü edilen periferik sinir hasarındaki terapötik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ultrases tanısal ve tedavi edici özellikleriyle tıp alanında kendine çok önemli yer bulmuş biyofiziksel etki gösteren bir ajandır. Düşük frekanslı ultrasesin frekans aralığı 20–100 kHz olarak belirlenirken, tanısal ultrasesin frekans aralığı 3–10 MHz olarak tanımlanmıştır. Bu yöntem, yumuşak dokunun görüntülenmesine olanak sağladığından ve iyonize edici etkisi olmadığından tanısal kullanıma çok uygun bir yöntemdir (Miller, 2007). Ultrasesin farklı yoğunluklarda uygulamasının hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyararak doku onarım süreçlerinde iyileştirici etkisi olduğu literatürdeki çalışmalarda yerini almıştır (Tsuang ve diğerleri, 2010). Düşük yoğunluklu darbeli ultrases klinik çalışmalarda tedavi seçenekleri arasında yer almakta olup psödoartroz, kemik kırıkları ve yumuşak doku iyileşmesinde düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin etkin olabileceği bildirilmiştir. Son yıllarda, düşük yoğunluklu darbeli ultrasesin sinir rejenerasyonunu hızlandırdığı, periferik sinir sisteminde miyelin yapımındaki öncül hücre olan Schwann hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı ve nöron türevli farklı gen ve proteinlerin ifadelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Tsuang ve diğerleri, 2010; Oliveira ve diğerleri, 2012; Wood ve Segal, 2015). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, ultrasesin sinir rejenerasyonu ve fonksiyonu üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmalarda yanıtların değişkenlik gösterebildiği, bunun temel sebebinin ise uygulanan ultrases güç yoğunluğu, frekans ve uygulama süresi hakkında literatürde bir fikir birliği bulunmadığı ve bu parametrelerin uygulanmasında farklılıklar olduğu görülmektedir (Oliveira ve diğerleri, 2012). Örneğin, ultrasesin nöropatik ağrı üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmalarda 1 MHz frekansta ve üç farklı güç yoğunluğunda uygulanan darbeli ultrasesin (250, 500 ve 750 mW/cm²) (Jiang ve diğerleri, 2016), ve periferik nöropati sıçan modelinde uygulanan 1 MHz

frekans ve $0,4 \text{ W/cm}^2$ güç yoğunluğunda ultrases terapisinin (Miceli ve diğerleri, 2017) nöropatik ağrının azaltılmasında etkili olduğu raporlanmıştır. Xie ve arkadaşları (2017) ultrasesin dokudaki bilinen etkilerinden termal etki nedeniyle akustik dalgaların dokuda moleküler titreşimlere neden olduğunu ve meydana çıkan ısı sonucunda nöropatik ağrının azaldığını gözlemlemişlerdir. Literatür incelendiğinde sinir rejenerasyonu, nöropatik ağrı ve sinir hasarı üzerinde ultrases etkilerini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Xie ve diğerleri, 2017; Bertolini ve diğerleri, 2017). Ayrıca, düşük frekanslı düşük yoğunluklu ultrasesin hastalarda dirsek bölgesinde ortaya çıkan ulnar sinir nöropatisinin tedavisinde sinir rejenerasyonun sağlanmasında olumlu etkisi olduğunu bildirmektedir (Özkan ve diğerleri, 2015). Bunun yanı sıra, sisplatin nedenli oluşan periferik kimyasal nöropatinin tedavisinde düşük yoğunluklu darbeleri ultrasesin olumlu etkileri de rapor edilmiştir (Bilir-Yildiz ve diğerleri, 2022). Bu çalışmada da, rezerpin enjeksiyonu ile indüklenen parkinsonizm semptomlarına bağlı olarak oluşan ve kötü parkinson fenotipinin biyobelirteci olan (Merola ve diğerleri, 2017) periferik sinir hasarı ve dejenerasyonunda farklı güç yoğunluklarında uygulanan düşük yoğunluklu darbeleri ultrasesin siyatik sinirdeki tedavi etkinliği literatürde ilk defa araştırılmıştır.

Parkinsonizm çalışmalarında, rezerpin enjeksiyonu ile oluşturulan hayvan modelleri, hastalığın araştırılması ve tedavi etkinliğinin belirlenmesinde kullanılan hayvan modellemelerinden biridir. Bu model Parkinson Hastalığı için hala altın standart tedavi olarak kabul edilen L-DOPA'nın terapötik etkinliğinin ilk kez gösterildiği model olması açısından önemlidir. Hastalık perspektifinden bakıldığında, rezerpin modeli, monoamin tükenmesi ve parkinson semptomları arasındaki bağlantıyı anlaşılır kılmıştır (Duty ve Janner, 2011). Deneysel çalışmalarda sıçanlarda düşük dozda ($0,1 \text{ mg/kg}$) rezerpin ile tekrarlanan uygulamanın, katalepsi davranışıyla değerlendirilen motor belirtilerin kademeli olarak ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir (Fernandes ve diğerleri, 2012). Davranışsal olarak rezerpin; sıçanlarda, tavşanlarda, kobaylarda, kedilerde ve maymunlarda akinezi ve arka bacak sertliğini indükler (Grandi ve diğerleri, 2018). Rezerpin uygulamasının yaşa bağlı etkileriyle ilgili nörokimyasal çalışmalarda, yaşlı sıçanların genç deneklere kıyasla azalmış DA dönüşümüne sahip oldukları ve DA iyileşmesinin azalmasına bir eğilim gösterdikleri bildirilmiştir (Leão ve diğerleri, 2015). Çalışmamızda oluşturulan parkinsonizm modelinde, Fernandes ve diğerlerinin (2012) gerçekleştirdikleri çalışma referans alınarak, modelin oluşması için 0.1 mg/kg dozunda rezerpin subkutan olarak gün aşırı 45 gün süreyle uygulanmış ve modelin gelişimi davranışsal olarak test edilmiştir. VMAT-1 ve VMAT-2'nin geri döndürülemez şekilde bloke edilmesiyle presinaptik nöronlardaki veziküllerde noradrenalin, dopamin ve serotonin depolanmasının engellenmesi yoluyla oluşan monoamin tükenmesinin

oluşturduğu parkinsonizm semptomlarının alınan rezerpin dozuna bağlı olarak aşamalı şekilde geliştiği nosiseptif incelemeler ve motor değerlendirme ile gözlemlenmiştir. Herhangi bir tedavi almamış olan rezerpin grubunda termal uyaranlara karşı verilen yanıtların latanslarında uzama ve nosiseptif ağrı algısında azalma tespit edilmiştir. Bu bulgu duyuşal sinir iletiminde aksaklıklar oluştuğuna işaret etmektedir. Nosiseptif ağrı algısının yanı sıra, deneklerde rezerpin enjeksiyonuna bağlı oluşun duyuşal-motor fonksiyon değışimlerinin değerdendirilmesinde silindir testi ve katalepsi testi uygulanmıştır. Katalepsi testinde değerdendirilen katatonik davranışın rezerpinin artan dozuna bağlı olarak kademeli olarak arttığı görülmüştür. Silindir testinde de deneklerin sağ-sol olarak tek ve çift pençe ile silindir duvarına temas sayıları rezerpinin artan dozlarına bağlı olarak azalmıştır. Mevcut bulgular parkinsonizm semptomlarının kademeli olarak alınan rezerpin dozuna bağlı olarak oluştuğuna işaret etmektedir. Sıçanlarda düşük dozda (0,1 mg/kg) rezerpinin tekrarlanan uygulamasının, katalepsi davranışıyla değerdendirilen motor belirtilerin kademeli olarak ortaya çıkmasına neden olduğu literatürde de bildirilmiştir (Leão ve diğerleri, 2015), bu açıdan sonuçlar literatürle paralellik göstermiştir. Uygulanan düşük yoğunluklu darbeleri ultrases tedavileri her iki güç yoğunluğunda da rezerpin enjeksiyonuyla oluşun nosiseptif ağrı algısındaki ve duyuşal-motor fonksiyonundaki azalma üzerine olumlu etki ederek değerdeleri kontrol düzeyine bir miktar yaklaştırmış, fakat tam kontrol seviyesine getirememiştir. Uygulanan ultrases tedavisinin lokal olarak siyatik sinir üzerine uygulandığı düşünöldüğünde, katalepsi ve silindir test sonuçlarına belirgin bir etki yapması deney başında da beklenmemekteydi. Bu testler daha çok model oluşumunun izlenmesi için gerçekleştirilmiştir. Yine de, elde edilen sonuçlara göre ultrases tedavisi alan gruplarda katatonik davranışta görölen azalma ve pençe temasındaki artımın ultrases tedavisi ile hasar derecesi azalan siyatik sinirin etkisiyle postürel düzelmeden kaynaklanmış olabileceği söylenebilir.

Periferik sinir rejenerasyonu ile ilgili araştırmaların çoğu histolojik, morfometrik ve elektrofizyolojik çalışmalara dayanmaktadır; her ne kadar gerekli olsa da, bu yöntemler gerçek fonksiyonel iyileşme hakkında yeterli kanıt sunmamaktadır. Öte yandan hayvanlarda fonksiyonel değerdendirme, bariz nedenlerden dolayı her zaman zordur, ancak De Medinaceli ve diğerleri (1982, 1984) tarafından ilk kez tanımlanan ve diğer bilim insanlarınca geliştirilerek (Carlton ve Goldberg, 1986; Bain ve diğerleri, 1989) siyatik sinir fonksiyonu değerdendirmesinde rutin olarak kullanılan siyatik fonksiyonel indeks, sıçanların siyatik sinirdeki fonksiyonel iyileşmenin oldukça doğru bir niceliksel değerdendirmesine izin verir. Bu test ile elde edilen sonuçların histolojik ve elektrofizyolojik çalışmanın sonuçlarıyla açıkça ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Oliveira ve diğerleri, 2001, 2003; Mendonca ve diğerleri, 2003).

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, rezerpin enjeksiyonu üçüncü haftadan itibaren alınan rezerpin dozuna bağlı kademeli olarak artan şekilde siyatik fonksiyonunda gerilemeye neden olduğu görülmüştür. Literatürde de farklı dozlarda uygulanan rezerpinin motor aktiviteyi yavaşlattığı ve enjeksiyon durdurulduktan sonra bile motor aktivitenin azalmış şekilde kaldığı gözlemlenmiştir (Nammi ve diğerleri, 2005). Uygulanan düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavilerinin özellikle uygulamanın son haftasında rezerpin nedeniyle oluşan bu fonksiyon kaybını durdurmuş olduğu görülmüştür.

Siyatik fonksiyonel indeks ile deney sürecince takip edilen siyatik fonksiyonunun incelemesi, deneysel sürecin sonunda sinir ileti hızı, distal amplitüt, distal latans, alan ve birleşik kas aksiyon potansiyellerinin süresinin değerlendirilmesiyle de teyit edilmiştir. Sinir ileti hızı ölçüm sonuçlarına göre, rezerpin enjeksiyonu uygulanan gruptaki sinir ileti hızının diğer deney gruplarına göre oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir (44 m/s, $p<0.001$). İki farklı güç yoğunluğunda uygulanan ultrases tedavisinin ise siyatik sinir ileti hızında rezerpin grubuna göre anlamlı bir artışa ($p<0.001$) neden olduğu; sinir ileti hızının 0.5 W/cm² güç yoğunluğunda uygulanan ultrases tedavi grubunda 54 m/s, 1.5W/cm² güç yoğunluğunda uygulanan ultrases tedavi grubunda ise 67 m/s değerine çıktığı görülmüştür. Ayrıca, rezerpin enjeksiyonu uygulanan grupta distal amplitüt değerinin azaldığı ($p<0.01$), ultrases tedavi gruplarında ise amplitüt değerlerinin artarak kontrole yaklaştığı görülmüştür. BKAP toplam yanıt süresinin rezerpin enjeksiyonu yapılan deney grubunda oldukça yüksek olduğu ($p<0.001$) görülürken uygulanan ultrases tedavisinin özellikle 0.5 W/cm² güç yoğunluğunda BKAP yanıt süresini azalttığı ($p<0.001$) görülmüştür. Bunun yanı sıra, rezerpin enjeksiyonunun distal latans değerlerini uzattığı ($p<0.05$), ultrases tedavilerinin distal latansta istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir ($p=0.34$). Rezerpin uygulamasının BKAP tepeden tepeye alan değerlerini kontrol gruna göre azalttığı, iki farklı yoğunlukta uygulanan ultrases tedavilerinin ise rezerpin enjeksiyonu grubuna göre alan değerlerini daha da azalttığı ($p<0.05$) görülmüştür. Ratlarda siyatik sinir yaralanmasında BKAP amplitüt değerlerinin, siyatik sinir iletim hızı ve akson sayısının kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı bildirilmiştir (Kızılay ve diğerleri, 2018). Pollari ve diğerleri (2018), ratlarda sinir hasarıyla oluşan nöropatide distal amplitüt değerinin azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca, sinir hasar modelinde aksonal disfonksiyon oluşması nedeniyle amplitüt azalımının ortaya çıktığı (Büyükakıllı ve diğerleri, 2011); periferik ezilme hasarında sinyal iletideki aksama nedeniyle distal alan değerinin azaldığı ve distal latans değerinin arttığı (Büyükakıllı ve diğerleri, 2007) bildirilmiştir. Çalışmamızda rezerpin enjeksiyonu alan grupta siyatik sinir ileti hızındaki azalmayla birlikte elektrofizyolojik incelemelerde tespit edilen BKAP genlik düşmesi, distal

latansın uzaması ve BKAP süresinin uzaması, literatürdeki bilgiler ışığında, akson kaybı ve demiyelinizasyonu işaret etmektedir (Büyükakıllı ve diğerleri., 2011; Tankisi ve diğerleri, 2012; Pollari ve diğerleri, 2018). Uygulanan ultrases tedavleri ise, elektrofizyolojik parametrelerde rezerpin enjeksiyonuna bağlı görülen bu değişimleri kontrol grubuna yaklaştırmakta etkili olmuştur. Literatürde farklı güç yoğunluklarında uygulanan ultrasesin, sisplatin ile indüklenen nöropatide toplam BKAP kayıt süresini kısalttığı, siyatik sinir ileti hızını artırdığı ve BKAP genlik değerini artırdığı (Bilir-Yıldız ve diğerleri, 2022); ayrıca ultrasesin sinir liflerinde rejenerasyon sürecini hızlandırabileceği (Mourad ve diğerleri, 2001) gösterilmiştir.

Literatürde, sinir hasarı ve nöropati oluşumuyla ilgili önerilen mekanizmalar arasında oksidatif stres artışı ve inflamasyon yolağının aktivasyonu da yer almaktadır. Periferik sinir hücrelerinin oksidatif stres ve inflamasyona karşı duyarlı oldukları ve oluşan oksidatif stres ile inflamasyonun miyelin kılıf kaybına yol açabileceği bildirilmiştir (Areti ve diğerleri, 2004; Bilir-Yıldız ve diğerleri, 2022). Çalışmamızda, rezerpin uygulanan grupların siyatik sinirlerindeki proinflamatuvar TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokin seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artım olduğu, düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavi gruplarından özellikle 1 MHz 1.5W/cm² ultrases tedavi grubunda söz konusu proinflamatuvar sitokin seviyelerinin kontrol grubuna yaklaşmış olduğu görülmüştür. 0.5W/cm² güç yoğunluğunda uygulanan ultrases tedavisinin ise, özellikle TNF- α ve IL-6 sitokin seviyelerini azaltmaya yetmediği; bu bağlamda 1.5W/cm² güç yoğunluğunda uygulanan ultrases tedavisinin inflamasyonu azaltmada daha etkin olabileceği gözlenmiştir. Proinflamatuvar sitokin ailesi üyelerinden olan IL-1 β ve IL-6, inflamatuvar farklılaşmanın gerçekleşmesinde, hızlı immün cevap oluşumunda görev alırlar. Literatür incelendiğinde; rezerpin kaynaklı hiperaljezi ve depresyon komorbiditesi rat modelinde serum TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu (Zhao ve diğerleri, 2022); rezerpin ile indüklenen depresyon modelinde serum inflamasyon sitokinleri seviyelerinden IL-6, IL-1 β seviyesinin artış gösterdiği (Zong ve diğerleri, 2020) gözlemlenmiştir. Ayrıca, ratlarda kimyasal ajanlarla indüklenen nöropatide uygulanan düşük şiddetli düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavilerinin nöropati oluşumuyla yükselen serum IL-6 ve IL-1 β seviyelerini düşürmede etkili olduğu bildirilmiştir (Nakamura ve diğerleri, 2011; Bilir-Yıldız ve diğerleri, 2022). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile incelemiş olduğumuz referans çalışmalar birbiriyle uyum içersindedir.

Programlanmış hücre ölümü olarak ifade edilen apoptoz, hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin regülasyonunda ve farklı uyaranlara yanıtlarda hasar almış veya faaliyetlerinin istenmediği hücrelerin kontrollü bir sürece bağlı olarak ortadan kaldırılmasında görevli, enerji

tüketen bir fizyolojik mekanizmadır (Kroemer ve Reed, 2000; Danial ve Korsmeyer, 2004). Mitokondri aracılı yolun anlaşılmasında, dış mitokondriyal membran permeabilitesi ve peşisıra çeşitli pro-apoptotik ve anti-apoptotik etkenlerin sitoplazmik alana salınması önemli yer almaktadır (Kroemer ve diğerleri, 2007). Proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin Bcl-2 ailesinin üyeleri, apoptoza karşı mitokondriyal hassasiyeti regüle eder. Bu bağlamda değerlendirilmesi gerçekleşen apoptoz mekanizmasının regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanmaktadır. Hedef proteinlerde uygulayıcı (executor) kaspaz proteinleri içerisinde yer alan kaspaz-3 proteini de bulunmaktadır (Avrutsky ve Troy, 2021). Kaspaz-3, hem intrinsek hem de ekstrinsek apoptotik yollarda etkinliğini ortaya çıkararak hücrede nihai apoptozun gerçekleşmesinde görev alır (McIlwain ve diğerleri, 2015). Öncül pro-kaspaz-3 proteini (48 kDa) apoptotik yolağın ilerleyebilmesi için proteolitik olarak kesilerek 25 kDa büyüklüğündeki aktif-kaspaz-3 halini almaktadır. Aktif-kaspaz-3 yolaktaki diğer proteinlerle etkileşerek apoptozun gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Bcl-2, temel olarak Bax ve/veya Bak içeren proteinler arasındaki etkileşimi önleyerek mitokondri aracılı apoptotik yolağın indüksiyonunu inhibe eder (Adams ve Cory, 2007; Levine ve diğerleri, 2008). Bu nedenle, Bax/Bcl-2 ekspresyon oranı literatürde, apoptotik aktivasyon derecesinin belirlenmesinde önemli bir faktör olarak nitelendirilmiştir (Wei ve diğerleri., 2005; Li ve diğerleri, 2013). Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax (pro-apoptotik) proteinleri, mitokondrial membranda permeabilite özellikleri azalabilir. Mitokondri, kontrollü hücre ölümü ve hücresel enerjinin dengesi olarak bilinen homeostazı düzenleyen temel organelidir. Bu bağlamda, hem hücre iskeletine hem de çözünebilme özelliğine sahip proteinler olması sebebiyle mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur (Germain ve Shore, 2003). Aynı zamanda, antiapoptotik Bcl-2 aile üyeleri, eksternal mitokondriyal membrana konumlanmıştır. Bcl-2 proteinlerinin primer görevi, mitokondride farklı stres sinyallerinin ortaya çıkardığı apoptozu tetikleyen önemli bir olay olan membran permeabilitesine karşı korumaktır. Normalde hücre sitoplazmasında konumlanan Bax ve eksternal mitokondriyal membran ile ilintili işlevlerde Bak'ın konformasyonunda meydana gelen farklılaşmalar, membranda mitokondriyal geçirgenlik geçiş porlarının ortaya çıkmasına neden olur. Ve ortaya çıkan bu porlar, kaspaz aktive edici proteinlerin ve sitokrom c gibi diğer hücre ölümü araçlarının ortama salınmasını sağlar. Bcl-2, Bax ve/veya Bak ihtiva eden proteinler arasındaki ilişkinin önlenmesiyle mitokondri aracılı apoptotik yolağın indüksiyonunu inhibe edilmiş olur (Yi ve diğerleri, 2003; Adams ve Cory, 2007; Danial, 2007; Levine ve diğerleri, 2008). Mitofajinin nörodejeneratif hastalıklar ve iskemi veya kimyasal etmenlere dayalı doku hasarında önemli görevler aldığı literatürdeki yerini almıştır. Mitofaji mekanizmasında down regülasyon toksisitenin artmasına ve sonuç

olarak da nöron ölümüne yol açmaktadır. Mitofajinin up regülasyonunda rol oynayan proteinler arasında Parkin proteini de yer almaktadır (Okatsu ve diğerleri, 2015). Parkinsonizm semptomlarından olan periferik sinir nöropatisinin indüklendiği çalışmamızda deney grupları arası apoptoz hakkında bilgi sağlayan Bcl-2, bax, kaspaz-3, ve mitofaji hakkında bilgi veren parkin protein ifadeleri incelenmiş, sonuçlar referans protein olarak kullanılan β -aktin protein ifadesine oranlanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre subkutan rezerpin enjeksiyonu yapılan gruptaki deneklerin siyatik sinirlerinde, antiapoptotik Bcl-2 protein ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma olduğu ($p=0.14$) tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, proapoptotik Bax protein ifadesinin rezerpin uygulanan grupta arttığı ($p<0.05$) ve Bax/Bcl-2 oranında kontrole nazaran anlamlı olmayan bir artım olduğu görülmüştür. Uygulanan ultrases tedavilerinin rezerpin enjeksiyonu ile azalan Bcl-2 protein ifade oranını kontrole yaklaştırdığı; fakat artan Bax protein ifade seviyesini azaltmadığı görülmüştür. Sinir sistemi hasar modeli ile benzer bir çalışmada da, medulla spinalis hasarı sonrasında Bax/Bcl-2 oranında dramatik bir artış elde edilmiştir (Su ve diğerleri, 2023). Proapoptotik protein düzeylerindeki bu artım ve antiapoptotik protein miktarının azalması apoptotik bir aktivasyonun meydana geldiğine işaret eder (Faubel ve diğerleri, 2004). Bax proteini ile başlatılan apoptotik süreç, apoptotik uygulayıcı kaspazların etkinleşmesine, bu da aktif kaspaz proteinlerinin kesilerek ortaya çıkmasına veya diğer enzimlerin etkinleştirilmesine yol açarak birden fazla basamaklı apoptotik yolağın aktivasyonuna neden olur. Bu açıdan bakıldığında sözü edilen bu enzimler ve kaspaz proteinleri hücrede bir geri besleme mekanizması ile kontrol edilebilir bir süreç yaratılmış olur. Çalışmamızda rezerpin enjeksiyonu ile gözlenen proapoptotik protein ifadesi artımının işaret ettiği apoptotik aktivasyonun daha iyi irdelenebilmesi için aktif-kaspaz-3 ve pro-kaspaz-3 protein ifade seviyeleri de incelenmiştir. Rezerpin enjeksiyonunun aktif-kaspaz-3 seviyesinde daha belirgin olmak üzere hem aktif-kaspaz-3 hem de pro-kaspaz-3 seviyelerinde bir miktar artıma neden olduğu görülmüştür. Tedavi gruplarında aktif-kaspaz-3 ekspresyonunun azalması ise uygulanan ultrases tedavisi ile apoptotik sürecin yavaşladığına işaret etmektedir. Ayrıca, çalışmamızda siyatik sinir aktif kaspaz-3 / pro-kaspaz-3 ifade seviyelerinin rezerpin uygulanan grupta artma eğiliminde olduğu, ultrases tedavisiyle ise kontrole yaklaştığı görülmüştür. Tüm bu bulgular, rezerpin enjeksiyonunun periferik siyatik sinir hücrelerinde apoptotik yolak aktivasyonuna neden olduğunu ve uygulanan ultrases tedavilerinin apoptotik yolak aktivasyonunu azaltmada etkin olabileceğine işaret etmektedir. Literatür incelendiğinde, düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavisinin sisplatin ile indüklenen periferik nöropatide artan apoptotik yolak aktivasyonunu baskılamada etkili olabileceği gösterilmiştir (Bilir-Yıldız ve diğerleri, 2022). Düşük yoğunluklu

darbeli ultrases tedavisinin, periferik sinir sisteminde farklı nedenlerle oluşan apoptotik yolak aktivasyonunu baskılamadaki etkinliği ileriki çalışmalarla da teyit edilmelidir.

Mitofaji, mitokondriyal sistemin hasarlanması durumunda otofaji yoluyla seçici olarak uzaklaştırılmasıdır. Hücresel dengenin sağlanabilmesi yani homeostaz için mitokondrilerin korunmasında rolü büyüktür (Kanki ve diğerleri, 2009; Itakura ve diğerleri, 2012). Mitofaji mekanizmasının baskılanması (aşağı regülasyonu) toksisitenin artmasına ve nihai olarak nöron ölümüne yol açmaktadır. Mitofaji yolağı, PINK1 proteinine bağlı, ubiquitin bağımsız ve Parkin bağımsız olmak üzere üç farklı yolla başlatılabilmektedir (Doblado, 2021), ve bunlardan ilki aktifleşmiş PINK1 proteini tarafından fosforile edilerek aktifleştirilen Parkin proteininin mitokondriyal proteinlerin yubikünitasyonuna ve mitokondrinin otofajik yok edilmesine yol açmaktadır (Okatsu ve diğerleri., 2015; Doblado, 2021). Dolayısıyla, PINK-1-Parkin yolağı, otofaji mekanizmasının tetiklenmesini sağlayabilir ve hasarlı mitokondrinin otofagozomlara yutulmasını kolaylaştırabilir (Nguyen ve diğerleri, 2016; Pickles ve diğerleri, 2018). Mitofajinin bozulması durumunda yaşlanma, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi patolojik durumlarla karşılaşılabilir (Palikaras ve diğerleri, 2017). Parkin mutasyonları Parkinson hastalığının en yaygın otozomal resesif formuna neden olur. Bugüne kadar parkin geninde 100'den fazla hastalığa neden olduğu iddia edilen mutasyon rapor edilmiştir; bunların çoğu proteinin fonksiyon kaybına yol açmakta ve genellikle erken başlangıçlı Parkinson hastalığına neden olmaktadır (Blandini ve Armentero, 2012). Çalışmamızda, rezerpin ile indüklenen parkinsonizm semptomlarına bağlı periferik sinir sisteminde görülen hasarda, rezerpin grubunda parkin protein ifadesinin artmış olduğu, iki farklı güç yoğunluğunda uygulanan ultrases tedavilerinin ise bu değeri azaltarak kontrol grubuna yaklaştırmış olduğu görülmüş, ancak gruplar arasında anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p=0.41$). İleriki çalışmalarla ultrases tedavisinin, periferik sinir sisteminde mitofajik yolak aktivasyonu üzerine olan etkilerinin ve mitokondriyal disfonksiyon üzerindeki etkilerinin daha ileri düzeyde deneyler ile derinlemesine incelenmesi gerekmektedir.

Periferik sinir sisteminde kimyasal ajanlar ile indüklenen siyatik sinir disfonksiyonu çalışmalarında elde edilen verilerin çoğunda sinir iletim hızında düşüş, termal ağrı algısında azalma, siyatik fonksiyonel indeks değerinde azalma olarak bildirildiğini görmekteyiz. Rapor edilen bu durumların, bir sinir lifinin yapısının temelinde yer alan akson ve miyelin kılıfında meydana gelen geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz dejenerasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızda, rezerpin enjeksiyonunun ve dördüncü haftadan itibaren uygulanan düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavilerinin siyatik sinir histolojisinde yol açtıkları değişimler incelenmiştir. Luksol-fast blue (LFB) histokimyasal boyama incelemeleri

bulgularına göre, rezepin uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla akson çapının, miyelin kalınlığının ve miyelinli sinir lif çapının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ($p<0,001$), ultrases tedavileri sonrasında ise bu parametrelerin arttığı görülmüştür. Elde etmiş olduğumuz sonuçlar bu anlamda siyatik sinirin disfonksiyonu ile ilişkili daha önceki çalışmalar ile uyum içerisindedir. Rezerpin uygulanan grubun miyelin kılıf kalınlığının, akson ve miyelin çapının azalması nosiseptif test sonuçlarında meydana gelen uzamış süre ile ilişkilendirilebilir. Çalışmamızda rezepin uygulanan deneklerde siyatik sinir elektronörofizyolojisinde görülen düşük sinir ileti hızları, düşük distal amplitüt ve uzamış distal latans değerleri ile siyatik sinirlerdeki azalmış akson, miyelin ve miyelinli sinir lifi çapı değerleri rezepinin subkutan enjeksiyonu ile indüklenen parkinsonizm semptomlarının aynı zamanda siyatik sinirde ortaya çıkardığı nöropatinin kanıtı olarak ilişkilendirilebilir. Ayrıca, rezepin grubundaki aksonal ve demiyelinizan hasarlanma bu çalışmadan elde edilen nosiseptif ağrı algısındaki azalmayı da destekler niteliktedir. Farklı dozlarda uygulanan düşük yoğunluklu darbeli ultrases tedavilerinin ise, miyelin kılıf kalınlığı, miyelin ve akson çapının artmasına, nosiseptif ağrı algısında ve sinir iletim hızında iyileşmeye; dolayısıyla aksonal iyileşmeye neden oldukları görülmüştür. Bilir ve diğerleri (2022) de, sisplatin ile indüklenen kimyasal nöropatinin ratlarda siyatik sinirde akson çapı, miyelin kalınlığı ve miyelinli lif sayısında azalma olduğunu ve farklı güç yoğunluklarında uygulanan ultrases terapisinin bu değerleri artırdığını bildirmişlerdir.

Miyelinizasyon, akson ve çevresindeki dokuların yapısı ve fizyolojisi üzerinde çarpıcı bir etkiye sahip olabilen eşsiz bir hücresel süreçtir. Örneğin, bir aksona daha fazla miyelin eklendikçe kılıf kalınlaşır ve çevredeki lif hacminin artan bir kısmını kaplamaya başlar, aksonal fonksiyonu tanımlayan biyofiziksel özellikler değişir. G oranının (iç aksonal çapın toplam dış çapa oranı) aksonal miyelinizasyonun değerlendirilmesinde oldukça güvenilir bir oran olduğu yaygın olarak kabul edilen bir görüştür. Bizim çalışmamızda da rezepin enjeksiyonu uyguladığımız grupta g oranı değerlerinin optimal değerlerinden düşük çıkmış olması, demiyelinizasyon ve aksonal hasarlanmayı destekler niteliktedir. Ayrıca, miyelinli bir aksonun g oranının, maksimum verimlilik ve fizyolojik optimizasyon elde etmek için düzenlendiğine genel olarak inanılmaktadır. Bu kavram, demiyelinizan hastalıktan iyileşme süreci sırasında, merkezi aksonların başlangıçta bir hiper-remiyelinasyon periyoduna maruz kaldığı ve çapın arttığı ve daha sonra sonunda normal g oranına döndüğü gözlemleriyle desteklenmektedir (Chomiak ve diğerleri, 2009). Ultrasesin farklı güç yoğunluklarında uygulanması g oranını tedavi almayan gruba kıyasla optimal değerlere ulaştırmıştır. G oranı ile iletim hızı arasındaki sıkı ampirik ilişki, g oranının aksonal anatomi ve fonksiyon arasında temel bir ilişkiyi temsil edebileceğini düşündürmektedir. Bölgeye özgü değişim oranı, nöro gelişim sırasında

tanımlanmıştır (Bertholdetal, 1983) ve aynı zamanda bir dizi nörolojik durumda hassas bir patoloji belirtici sağlayabilir (Albert ve diğerleri, 2007). G oranının, demiyelinizasyon, remiyelinizasyon ve aksonal dejenerasyonun karmaşık etkileşimini nörofizyolojik anormallikler ve dolayısıyla klinik semptomlarla ilişkilendirilmesi beklenir. Özellikle, g-oranı nöronal iletim hızını değiştirebildiğinden, muhtemelen yaşlanmayla ortaya çıkan hafif oran değişiminin bile yaşa bağlı bilişsel gerilemeye aracılık edebileceği düşünülebilir (Cercignani ve diğerleri, 2017). Klinik ve deneysel çalışmalar, yaşlanmanın kas gücünde azalma, ardından dokunma, termal ve titreşim duyarlılığında azalma ve önemli otonomik fonksiyon bozuklukları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Ugrenovic ve diğerleri, 2015). Senil nöropati olarak adlandırılan duruma çoğunlukla miyelinli sinir liflerinin sayısında ve yoğunluğunda bir azalma ve miyelin kılıfındaki çok sayıda düzensizlik eşlik eder. Miyelinli sinir liflerinin senil atrofisini az çok başarılı bir rejenerasyon takip eder ve bunun sonucu çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu nedenle, merkezi sinir sisteminde PSS'ye karşı, kraniyal ve omurilik sinirlerinde ve farklı omurilik sinirleri arasında tezahürü farklı olabilir. Kontrol grubunda elde edilen değerlerin optimal değerden bir miktar düşük olması parkinsonizm odaklı olan çalışmamızdaki yer alan deneklerin yaşlı olmaları ile ilişkili olarak bu çalışmaya özgü optimal değerler olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca ultrases terapisi uygulanan gruplarda elde edilen değerlerin literatürde rapor edilen optimal değerlere yaklaştığı olması metabolik yaşlanma sürecinde optimal değerlerden uzaklaşan g oranı değerlerinin ultrases terapisi ile bu değerlere yaklaşabileceği sonucuna varılmıştır.

Elde edilen tüm bu bulgular, farklı iki güç yoğunluğunda, düşük yoğunluklu düşük frekanslı darbeleri ultrases uygulanarak tedavi ettiğimiz deney gruplarında sinir iletim hızlarının rezerpin grubuna göre artım göstermiş olması motor sinir fonksiyonunun iyileştiğinin, termal uyarıya verilen yanıtın süresi olan latenstaki artımın rezerpin grubuna göre sınırlı kalmış olması nosiseptif ağrı algısında artma olduğunu ve demiyelinizasyonda azalma olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir (Boehmerle ve diğerleri, 2014; Huang ve diğerleri, 2016). Rezerpin uygulaması ile ortaya çıkan monoaminlerinde tükenmesine neden olmuş ve böylece ortaya çıkan parkinsonizm semptomlarının ve monoamin tükenmesinin merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemini aynı anda hedeflediği tezini de destekler niteliktedir (Wakabayashi ve diğerleri, 2010). Düşük yoğunluklu darbeleri ultrases tedavisi rezerpin enjeksiyonunun neden olduğu bu olumsuz etkileri kontrol düzeyine yaklaştırmada etkili olmuştur. Bu açıdan bakıldığında, periferik sinir hasarı tedavisinde umut vaad eden bir tedavi alternatifi olma potansiyeline sahiptir. Ultrasesin terapötik etkinliği altında yatan mekanizmaların daha detaylı olarak açıklanabilmesi için ileri çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, monoamin transport inhibitörü olarak etkisini gösteren rezerpinin sinir terminallerinde ketakoleminlerin tükenmesine neden olarak parkinsonizm fenomeninin yaratılması olarak modellenen deneklerde modelin varlığının motor ve duyuşsal yanıtların davranışsal olarak gözlemlendiğı testler olan katalepsi ve silindir testleri ile belirlenerek parkinsonizme eş periferik nöropati oluşturmalarıyla meydana getirdiğı periferik sinir disfonksiyonunda düşük frekanslı düşük yoğunluklu darbeleri ultrasesin terapötik etkinliğinin; fonksiyonel, motor ve duyuşsal yanıtlar ile nosiseptif, elektrofizyolojik, moleküler, biyokimyasal ve histolojik metotlar ile incelenerek karşılaştırmalı olarak araştırılmış ve aşığıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1) Gerçekleştirilen nosiseptif incelemeler, katalepsi ve silindir testleri sonucunda rezerpin uygulanan grubun termal uyarana geç yanıt verdiğı, kataleptik davranışın oluştugu ve silindir testlerinde çepere yapılan temas sayısının azaldığı gözlemlenerek parkinsonizm modelinin oluştugu tespit edilmiştir. Deney sürecinin devamında uygulanan farklı güç yoğunluklarında düşük frekanslı düşük yoğunluklu darbeleri ultrases tedavi gruplarının ise anlamlı şekilde termal uyarılara hızlı yanıt verdiğı görülmüş, kataleptik davranış ve silindir test bulguları değerlendirildiğinde de sürecin stabil kalmasını sağladığı görülmüştür.

2) Deney sonunda alınan elektrofizyolojik ölçüm bulgularından sinir iletim hızının rezerpin enjeksiyonu gerçekleştirilerek ortaya çıkarılan parkinsonizm fenomeni görülen gruplardan salt rezerpin uygulanan nöropati grubunda düşük olduğı görülmürken farklı düşük yoğunluklu olarak ultrases uygulanan gruplarda iletim hızının nöropati grubuna göre daha yüksek olduğı gözlemlenmiştir. 1.5 W/cm² US tedavi grubunda kontrol grubuna yakın bir sinir iletim hızı elde edilmiştir. Elektrofizyolojik ölçüm parametrelerinden olan Distal Amplitüd (P-P) bulgularına göre 1.5 W/cm² US tedavi grubunda en yüksek elde edilmiştir. Parkinsonizm modelinin oluşması için subkutan enjeksiyonu gerçekleştirilen rezerpin grubunda amplitüd değerlerinde azalma meydana gelmiştir. Elde edilen bu bulgu; aksonal kayıp, sinir hasarı ile birlikte amplitüd azalmasını göstermektedir. Tedavi gruplarında amplitüd seviyesinin artımı uygulanan düşük yoğunluklu darbeleri ultrases terapisinin periferik sinir sisteminde ortaya çıkan hasarın prognozunda olumlu etkili bir tedavi yöntemi olduğunu göstermiştir.

- 3) Plazmada gerçekleştirilen nöroinflamasyon biyomarkerlarının belirlenmesine yönelik testler uygun kitler ile ELISA yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyeleri ile ölçülmüştür. Rezerpin grubunda nöroinflamasyon işaretçilerinin yüksek olması inflamasyon varlığına işaret etmektedir. US tedavi gruplarında ise inflamasyonun azaldığı görülmüştür.
- 4) Siyatik fonksiyonel indeks (SFI) sonuçlarına göre, rezerpin uygulamasının siyatik fonksiyonel indeks değerini düşürdüğü ve parkinsonizm modelinin oluşumunda periferik nöropatinin tespitinde kullanılabileceği gibi US terapisi ile SFI prognozunu stabil kaldığı ve kötüye gidişi engellediği gözlemlenmiştir.
- 5) Monoamin transport inhibisyonu yoluyla etkisini göstererek oluşan parkinsonizm semptomları ve periferik sinir sisteminde ortaya çıkardığı periferik nöropatide apoptoz mekanizmasının aktivitesi Bcl-2 ve Bax ekspresyonu ile, mitokondriyal disfonksiyon ise Parkin ekspresyonu ile incelenmiştir. Bu bağlamda subkutan olarak uygulanan rezerpinin pro-apoptotik Bax protein ekspresyonunda artım ile etkisi görülürken, anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunu baskı altına aldığı gözlemlenmiştir. Rezerpin enjeksiyonu ile parkinsonizm semptomlarının modellendiği ve periferik nöropatiye karşı uygulanan düşük yoğunluklu darbeli ultrases gruplarından 0.5W/cm² US uygulamasının Bax protein ekspresyonunun bir miktar baskıladığı ve her iki yoğunluktaki US uygulamalarının 1.5W/cm² US'te belirgin olmak üzere Bcl-2 protein ekspresyonunu aktive ettiği gözlemlenmiştir. Parkin protein ekspresyon seviyelerinin incelenmesiyle mitofajik yolk aktivasyonunun değerlendirilmesinde gruplar arasında ekspresyon seviyesinde farklılıklar görülmekteyken bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Dolayısıyla siyatik sinirde veziküler monoamin transport inhibisyonu ile indüklenen periferik nöropati tablosunda apoptotik yolk aktivasyonunun katkı sağladığı, mitofajik yolk etkinliğinin oldukça sınırlı düzeyde kaldığı sonucuna varılmıştır.
- 6) Histopatolojik incelemeler sonucunda, rezerpin uygulaması ile siyatik sinirde akson çapı ve miyelin kılıf kalınlığını azalması dejenerasyon varlığına işaret etmektedir. Ölçülen bu parametrelerin kontrol grubuna göre azalması parkinsonizmin modellendiği deneklerde bir dejenerasyon olduğunu göstermektedir. Bu durum aynı zamanda sinir iletim hızında gözlenen azalmayı, motor davranış özelliklerini ve nosiseptif ağrı algısındaki azalmayı meydana getirmiş olabilir. Farklı güç yoğunluklarında uygulanan düşük yoğunluklu darbeli US tedavisinin, özellikle 1 MHz 1.5 W/cm² US tedavisi, miyelin çapı, akson çapı ve miyelin kalınlığında bir artıma neden olarak dejenerasyon prognozunu olumlu şekilde etkilediği gözlemlenmiştir. Sinir dejenerasyonunda gözlenen bu iyileşme, ultrases tedavisinde elde edilen bulgularda azalan inflamasyon, periferik sinir fonksiyonundaki kötü prognoz ortadan kaldırılması ve artan sinir iletim hızı bulguları ile uyumludur.

7) Histopatolojik incelemeler dahilinde hesaplanan G-ratio bulguları ile akson ve miyelin çapındaki azalmanın elde edilen matematiksel oranı histopatolojik incelemeler ve çalışmamızdaki diğer sonuçlar ile korelasyon göstermektedir. Literatürde sağlıklı değerin optimum 0.6 civarında olması gerektiği belirtilmiş ancak çalışmamızda elde edilen bulgularımız 0.6'nın altında kalmıştır. Bu değer g-ratio değerinin geriatrik popülasyonda azalımı ile kendine karşılık bulmuştur.

Çalışmanın sonucunda elde ettiğimiz bu bulgular ve daha önceden yapılan araştırmaların bulgularının bir bütün olarak değerlendirilmesi ile ultrases tedavisinin rezerpin ile indüklenmiş olan parkinsonizm fenomeni ile merkezi sinir sistemi ile eşzamanlı etkilenen periferik sinir sisteminde ortaya çıkan nöropatik hasarının tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Düşük yoğunluklu düşük frekanslı darbeli ultrases uygulamalarının insanlığın hizmetine sunulmasından önce in vitro ve in vivo ortamda farklı güç yoğunluklarında ultrases uygulanmasının etkileri araştırılmalı, ultrases tedavisinin moleküler etkileri daha detaylı olarak incelenmelidir. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda elde edilen bulgular, diğer biyofiziksel ajanların terapötik olarak kullanılmasıyla ortaya çıkan bulgular ile kıyaslanarak etkinliği değerlendirilebilir. Elde edilecek olan elektrofizyolojik sinyaller, artefakt ve benzeri fenomenlere karşı daha iyi filtre edilmeli ve daha ileri nonlinear analizler veya wavelet analizi gibi metodlarda irdelenmelidir. Ultrasesin etki potansiyelinin belirlenebilmesi adına başka yolların terapötik potansiyellerinin araştırılması için moleküler etki mekanizmalarının ortaya konulduğu ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılacak çalışmalarda protein ekspresyon seviyesindeki sonuçlar daha yüksek n sayısı ile gerçekleştirilerek; moleküler yollar ve etki mekanizmasının daha iyi aydınlatılabilmesi için incelenmelidir. Ayrıca oksidatif stres seviyeleri gibi biyokimyasal parametreler de değerlendirilmelidir. Ayrıca mitokondriyel disfonksiyonun nicel olarak ortaya konulması için gerekli araştırmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abílio VC, Araujo CC, BergamoM, Calvente PR, D'Almeida V, Ribeiro Rde A, Frussa-Filho R (2003). Vitamin E attenuates reserpineinduced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:109–114
- Abraham, L. (2006). Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. Çev: Demir, R. Pame yayıncılık.
- Abraira, V. E., & Ginty, D. D. (2013). The sensory neurons of touch. *Neuron*, 79(4), 618-639.
- Adams JM, Cory S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. Feb 26;26(9):1324-37. doi: 10.1038/sj.onc.1210220.
- Adams, S. C., Schondorf, R., Benoit, J., & Kilgour, R. D. (2015). Impact of cancer and chemotherapy on autonomic nervous system function and cardiovascular reactivity in young adults with cancer: a case-controlled feasibility study. *BMC cancer*, 15, 1-13.
- Ahmad, N., Subhan, F., Islam, N.U., Shahid, M., Rahman, F.U., Sewell, R.D.E (2017). Gabapentin and its salicylaldehyde derivative alleviate allodynia and hypoalgesia in a cisplatin-induced neuropathic pain model. *European Journal of Pharmacology*, 814, 302–312.
- Akao, Y., Maruyama, W., Yi, H., Shamoto-Nagai, M., Youdim, M. B., & Naoi, M. An anti-parkinson's disease drug, n-propargyl-1(r)-aminoindan (rasagiline), enhances expression of anti-apoptotic bcl-2 in human dopaminergic sh-sy5y cells. *Neuroscience letters*. 2002; 326 (2): 105-108.
- Akhlaghi, Z., Mobarakeh, JI., Mokhtari, M., Behnam, H., Rahimi, AA., Khajeh, Hosseini MS. (2012) .The effects of altered ultrasound parameters on the recovery of sciatic nerve injury. *Iran Biomed J*. 16 (2):107–112.
- Alam M, Schmidt WJ (2002) Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* 136:317–324.
- Albert, M., Antel, J., Bruck, W., Stadelmann, C., (2007). Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 17, 129–138. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.2006.00043.x>.

- Alvarez-Cervera FJ, Villanueva-Toledo J, Moo-Puc RE, Heredia- López FJ, Alvarez-Cervera M, Pineda JC, Góngora-Alfaro JL (2005). A novel automated rat catalepsy bar test system based on a RISC microcontroller. *J Neurosci Methods* 146:76–83.
- Andreassen OA, Ferrante JR, Aamo TO, Beal MF, Jorgensen HA. (2003). Oral dyskinesias and histopathological alterations in substantia nigra after long-term haloperidol treatment of old rats. *Neuroscience* 122: 717–725
- Andreassen OA, Jorgensen HA. (2000). Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? *Prog Neurobiol* 61:525–541
- Apaydın H. Parkinson hastalığının klinik özellikleri. (2001). *Parkinson Hastalığı ve Hareket Bozuklukları Dergisi*. 4(2):114-24.
- Argyriou, A.A., Cavaletti, G., Briani, C., Velasco, R., Bruna, J., Campagnolo, M., Alberti, P., Bergamo, F., Cortinovis, D., Cazzaniga, M. (2013). Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: A prospective study in 170 patients with colorectal cancer. *Cancer*, 119, 438–444.
- Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review, *Food Res. Int.*, vol. 48, no. 2, 410–427.
- Avrutsky, M., Troy, C. M. (2021). “Caspase-9: A Multimodal Therapeutic Target With Diverse Cellular Expression in Human Disease”, *Front. Pharmacol.*, 12, 701301. Doi: 10.3389/fphar.2021.701301
- Aybek, S., & Vuilleumier, P. (2016). Imaging studies of functional neurologic disorders. *Handbook of clinical neurology*, 139, 73-84.
- Aydınlı, I. (2005). Ağrının Patofizyolojisi. *Türk Fiz. Tıp Rehab. Derg.*, 51 (özel ek B), 8-13.
- Azze, RJ., Mattar, Jr. R. (2000). Lesões dos Nervos Periféricos. In: Pardini Jr. AG, editor. *Traumatismos da mão, third ed.*, Rio de Janeiro, Medsi, 2000.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg. Jan*;83(1):129-38. doi: 10.1097/00006534-198901000-00024. PMID: 2909054.
- Baker, KG., Robertson, VJ., Duck, FA. (2001). A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther*, 81:1351-8
- Banach, M., Juranek, J. K., & Zygulska, A. L. (2017). Chemotherapy-induced neuropathies—a growing problem for patients and health care providers. *Brain and behavior*, 7(1), e00558.

- Banasikowski TJ, Beninger RJ (2012) Haloperidol conditioned catalepsy in rats: a possible role for D1-like receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:1525–1534.
- Barcelos, R. C. S.; Benvegnú, D. M.; Boufleur, N.; Pase, C.; Teixeira, A. L. M.; Reckziegel, P. C.; Emanuelli, T.; Da Rocha, J. O. B. T.; Bürger, M. E. (2010). "Short Term Dietary Fish Oil Supplementation Improves Motor Deficiencies Related to Reserpine-Induced Parkinsonism in Rats". *Lipids*. 46 (2): 143–149. doi:10.1007/s11745-010-3514-0
- Basford JR. (2005). Therapeutic Physical Agents. In: Delisa JA. *Physical Medicine & Rehabilitation Principles and Practice*, 3th Ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:251–270.
- Bernhardson, B.M., Tishelman, C., Rutqvist, L.E. (2007). Chemosensory changes experienced by patients undergoing cancer chemotherapy: A qualitative interview study. *J. Pain Symptom Manag.*, 34, 403–412.
- Bertolini, G.R.F., Karvat, J., Kakihata, C.M.M., Ribeiro, L.F.C., Brancalhão, R.M.C. (2017). Therapeutic ultrasound after sciatic nerve compression of Wistar rats. *Neurological Research*, vol. 39, NO. 9, 837–844
- Bilir-Yildiz, B., Sunay, F.B., Yilmaz, H.F. et al. (2022). Low-intensity low-frequency pulsed ultrasound ameliorates sciatic nerve dysfunction in a rat model of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *Sci Rep* 12, 8125. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11978-z>
- Binienda Zbigniew K., Sarkar Sumit, Mohammed-Saeed Lamya, Gough Bobby, Beaudoin Michael A., Ali Syed F., Paule Merle G., Imam Syed Z. (2013) Chronic exposure to rotenone, a dopaminergic toxin, results in peripheral neuropathy associated with dopaminergic damage, *Neuroscience Letters*, Volume 541, Pages 233-237, doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.047
- Blagosklonny MV. (2011). Hormesis does not make sense except in the light of TOR-driven aging. *Aging (Albany NY)*. 2011 Nov;3(11):1051-62. doi: 10.18632/aging.100411. PMID: 22166724; PMCID: PMC3249451.
- Blandini F, Armentero MT. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*. Apr;279(7):1156-66. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x.
- Boehmerle, W., Huehnchen, P., Peruzzaro, S., Balkaya, M., Endres, M. (2014). Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Scientific Reports* 4:6370.

- Bose, A., & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction in parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2016; 139 Suppl 1: 216-231.
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bricker B, Sampson D, Ablordeppey SY (2014) Evaluation of the potential of antipsychotic agents to induce catalepsy in rats: assessment of a new, commercially available, semi-automated instrument. *Pharmacol Biochem Behav* 120:109–116.
- Burger M, Fachinetto R, Calegari L, Paixão MW, Braga AL, Rocha JB. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. *Brain Res Bull*. 2004;64(4):339-345.
- Busanello A, Barbosa NB, Peroza LR, Farias LE, Burger ME, Barreto KP, Fachinetto R (2011). Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice. *Behav Pharmacol* 22:71–75
- Büyükakıllı, B., Atıcı, A., Büyükdereli, Z., Taşdelen, B., Güneş, S., Turhan, A.H. (2011). Protective Effects of Platelet-Activating Factor Antagonist ABT-491 on the Peripheral Nerves in Hypoxic Ischemia-Induced Neonatal Rat Model. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*,31(5):1179-85
- Büyükakilli B, Taşdelen B, Güneş S. (2007). Effects of low dose trapidil on electrical properties of a rat peripheral nerve after crush injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2007 Jul;13(3):173-9.
- Cadet, J. L., & Brannock, C. (1998). Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry international*. 32 (2): 117-131.
- Calabrese E, Iavicoli I, Calabrese V. (2013). Hormesis: Its impact on medicine and health. *Human & Experimental Toxicology*. 2013;32(2):120-152. doi:10.1177/0960327112455069
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*. 180(4596):1200. doi: 10.1038/1801200a0. PMID: 13483658.
- Carstensen, EL., Child, SZ., Norton, S., Nyborg, W. (1990). Ultrasonic heating of the skull. *J Acoust Soc Am*; 87:1310 –7
- Castro JP, Frussa-Filho R, Fukushima DF, Silva RH, Medrano WA, Ribeiro Rde A, Abílio VC (2006). Effects of baclofen on reserpineinduced vacuous chewing movements in mice.

- Caudle WM, Colebrooke RE, Emson PC, Miller GW (2008). Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. *Trends Neurosci* 31:303–308
- Chomiak T, Hu B (2009) What Is the Optimal Value of the g-Ratio for Myelinated Fibers in the Rat CNS? A Theoretical Approach. *PLoS ONE* 4(11): e7754. doi:10.1371/journal.pone.0007754
- Costall B, Hui SC, Naylor RJ (1978) Correlation between multitest and single test catalepsy assessment. *Neuropharmacology* 17:761–764.
- Crisci, AR., Ferreira, AL. (2002). Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. *Ultrasound Med Biol*, 28(10):1335–1341.
- Doblado L, Lueck C, Rey C, Samhan-Arias AK, Prieto I, Stacchiotti A, Monsalve M. (2021) Mitophagy in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 9;22(8):3903. doi: 10.3390/ijms22083903. PMID: 33918863; PMCID: PMC8069949.
- Daeschler, S. C., Harhaus, L., Schoenle, P., Boecker, A., Kneser, U., and Bergmeister, K. D. (2018). Ultrasound and shock-wave stimulation to promote axonal regeneration following nerve surgery: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Sci. Rep.* 8 (1), 3168. doi:10.1038/s41598-018-21540-5
- Danial, NN. (2007). BCL-2 family proteins: Critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res*, 13:7254–7263.
- Danial, NN., Korsmeyer, SJ. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205–219
- de Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 5 (6): 525-535. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9
- De Medinaceli L, Derenzo E, Wyatt RJ. (1984). Rat sciatic functional index data management system with digitized input. *Comput Biomed Res* 1984;17:185–92.
- De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurement made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77:634–43.
- Degkwitz R, Frowein R, Kulenkampff C, Mohs U. (1960). On the effects of L-dopa in man and their modification by reserpine, chlorpromazine, iproniazid and vitamin B6. *Klin Wochenschr.* 1;38:120-3. German. doi: 10.1007/BF02189076.
- Doody, C., Porter, H., Duck, FA., Humphrey, VF. (1999). In vitro heating of human fetal vertebra by pulsed diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 25:1289 –94.

- Dovonou, A., Bolduc, C., Soto Linan, V. et al. (2023). Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. *Transl Neurodegener* 12, 36 <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00368-8>
- Dutra, R.C., Audreazza, A.P., Adreatini, R., Tufik, S., and Vital, M.A. (2002). Behavioral effects of MK-801 on reserpine-treated mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 26: 487– 495.
- Duty S, Jenner P. (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*. 164(4):1357-91. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x.
- England JD, Asbury AK (2004) Peripheral neuropathy. *Lancet* 363: 2151–2161 3.
- Fachinetto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Puntel RL, Paixão MW, Al B, Calixto JB, Rocha JB, Ferreira J (2007b). Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 194: 423–432
- Fachinetto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Avila DS, Burger ME, Calixto JB, Rocha JB, Ferreira J (2007a). Valeriana officinalis does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1478–1486
- Faria RR, Abílio VC, Grassl C, Chinen CC, Negrão LT, de Castro JP, Fukushima DF, Rodrigues MS, Gomes PH, Registro S, de Carvalho RC, D'Almeida V, Silva RH, Ribeiro Rde A, Frussa-Filho R. (2005). Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity. *Neuropharmacology* 48:993–1001
- Faubel, S., Ljubanovic, D., Reznikov, L., Somerset, H., Dinarello, C. A., & Edelstein, C. L. (2004). Caspase-1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney international*, 66(6), 2202-2213.
- Feinendegen LE. (2005). Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br J Radiol*. 78(925):3-7. doi: 10.1259/bjr/63353075.
- Fernandes VS, Santos JR, Leão AH, Medeiros AM, Melo TG, Izídio GS, Cabral A, Ribeiro RA, Abílio VC, Ribeiro AM, Silva RH. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research* 2012;231:154–63.

- Fischer, D. L., Manfredsson, F. P., Kemp, C. J., Cole-Strauss, A., Lipton, J. W., Duffy, M. F., Polinski, N. K., Steece-Collier, K., Collier, T. J., Gombash, S. E., Buhlinger, D. J. and Sortwell, C. E. (2017). Subthalamic nucleus deep brain stimulation does not modify the functional deficits or axonopathy induced by nigrostriatal α -synuclein overexpression. *Sci Rep* 7(1): 16356.
- FitzGerald, M. J. T., & Folan-Curran, J. (2002). *Clinical neuroanatomy and related neuroscience*. WB Saunders Company.
- Fontes-Pereira, A.J., Teixeira, R. C., Oliveira, A. J. B., Pontes, R. W. F., de Barros, R. S. M., Negrao J. N. C. (2013). The effect of lowintensity therapeutic ultrasound in induced fracture of rat tibiae. *Acta. Ortop. Bras*, vol. 21, no. 1, 18–22.
- Ford B, Louis ED, Greene P, Fahn S. Oral and genital pain syndromes in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1996;11(4):421-6.
- Fowlkes JB. (2008). Bioeffects Committee of the American Institute of Ultrasound in Medicine. American Institute of Ultrasound in Medicine consensus report on potential bioeffects of diagnostic ultrasound: executive summary. *J Ultrasound Med*. 27:503–515.
- Francardo, V., Bez, F., Wieloch, T., Nissbrandt, H., Ruscher, K. and Cenci, M. A. (2014). Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain* 137(Pt 7): 1998-2014.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2007). Color textbook of histology, editors LP Gartner. *JL Hiatt, third edition Saunders elsevier*.
- Gerlach M, Riederer P (1996). Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of disease in man. *J Neural Transm* 103:987–1041
- Germain, M., Shore, GC. (2003). Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. *Sci STKE*, (173):10.
- Grandi Laura Clara, Giovanni Giuseppe Di, Galati Salvatore. (2018). Animal models of early-stage Parkinson's disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms, *Journal of Neuroscience Methods*, Volume 308, Pages 205-218, ISSN 0165-0270, doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.08.012.
- Guyton and Hall. (2013). *Medical Physiology*, 13. baskı. 57-72, 565-580.
- Hall, J. E. (2011). *Guyton y hall*. Elsevier Health Sciences Spain.
- Hammi, C., & Yeung, B. (2022). Neuropathy. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

- Hayworth, C.R., Rojas, J.C., Padilla, E., Holmes, G.M., Sheridan, E.C. and Gonzalez-Lima, F. (2010), In Vivo Low-level Light Therapy Increases Cytochrome Oxidase in Skeletal Muscle. *Photochemistry and Photobiology*, 86: 673-680. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00732.x>
- Henry JP, Sagne C, Botton D, Isambert MF, Gasnier B (1998). Molecular pharmacology of the vesicular monoamine transporter. *Adv Pharmacol* 42:236–239
- Hodgkin, A. L. (1964). *The Conduction of Nervous Impulse*. Springfield, IL: Charles Thomas.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: Onset, progression and mortality. *Neurology*. 1967;17:427-42.
- Hong CZ, Liu HH, Yu J. (1988). Ultrasound thermotherapy effect on the recovery of nerve conduction in experimental compression neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil Jun*;69(6):410–4
- Hornykiewicz, O. Biochemical pathophysiology of parkinson's disease. *Parkinson's disease. Advances in Neurology*. 1986; 45: 19-34.
- Hsieh, Y.L., Chen, H.Y., Yang, C.H., Yang, C.C. (2017). Analgesic Effects of Transcutaneous Ultrasound Nerve Stimulation In A Rat Model of Oxaliplatin-Induced Mechanical Hyperalgesia and Cold Allodynia. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 1-10.
- Huang, Y., Hu, B., Zhu, J. (2016). Study on the use of quantitative ultrasound evaluation of 94
- Huxley, A. F. and Staˆmpfli, R. (1949). Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *J. Physiol.*, 108, 315–339.
- Iaccarino, C., Crosio, C., Vitale, C., Sanna, G., Carri, M. T., & Barone, P. (2007). Apoptotic mechanisms in mutant lrrk2-mediated cell death. *Human molecular genetics*. 16 (11): 1319-1326.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Mizushima, N. (2012). Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *J Cell Sci*, 125: 1488–99.
- Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79:368–376.
- Jenner, P. Oxidative stress in parkinson's disease. *Annals of neurology*. 2003; 53 Suppl 3: S26-36; discussion S36-28.
- Jiang, W., Wang, Y., Tang, J., Peng, J., Wang, Y., Guo, O, Guo, Z., Li, P., Xiao, B., Zhang, J. (2016). Low-intensity pulsed ultrasound treatment improved the rate of autograft peripheral nerve regeneration in rat. *Sci Rep.*, 6: 22773.

- Jiang, X., Savchenko, O., Li, Y., Oi, S, Yang, T., Zhang, W., Chen, J. (2019). A Review of Low-Intensity Pulsed Ultrasound for Therapeutic Applications. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 66, 10, 2704- 2718.
- Jones, D., Zhao, F., Brell, J., Lewis, M. A., Loprinzi, C. L., Weiss, M., & Fisch, M. J. (2015). Neuropathic symptoms, quality of life, and clinician perception of patient care in medical oncology outpatients with colorectal, breast, lung, and prostate cancer. *Journal of Cancer Survivorship*, 9, 1-10.
- Junqueira, I. E., Carneiro, J., & Kelley, R. O. (2016). Basic Histology Text and Atlas, Fouteenth Edition.
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* (London, England). 386 (9996): 896-912.
- Kalia, L. V., Brochie, J. M., & Fox, S. H. Novel nondopaminergic targets for motor features of parkinson's disease: Review of recent trials. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 2013; 28 (2): 131-144.
- Kalyon TA. (2001). Ultrason. Ed. Tuna N. Elektroterapi, 2. baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001:129–140.
- Kanki, T., Wang, K., Baba, M. (2009). A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Mol Biol Cell*, 20: 4730–38.
- Karamehmetoğlu ŞS. (2002). Derin ısıtıcılar. Ed. Sarı H. Hareket Sistemi Hastalıklarında Fiziksel Tıp Yöntemleri, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 51–60.
- Khanna, A., Nelmes, R.T.C., Gougoulas, N., Maffulli, N., Gray, J. (2009). The effects of 96
- Kızılay, Z., Aktaş, S., Çetin, K.N., İlhan-Bakay, D., Ersoy, G., Erken, A.H. (2018). Effect of Systemic Application of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Healing of Peripheral Nerve Injury in an Experimental Sciatic Nerve Injury Model. *Turk Neurosurg* 28(4):654-662.
- Kin, Kyohei, Takao Yasuhara, Masahiro Kameda, and Isao Date. (2019). "Animal Models for Parkinson's Disease Research: Trends in the 2000s" *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 21: 5402. <https://doi.org/10.3390/ijms20215402>
- Kline D. G. and Hudson A. R. (1995) P Richards, Nerve injuries. Operative results for major nerve injuries, entrapments and tumors.. 265 × 187 mm. Pp. 611. Illustrated. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders., *British Journal of Surgery*, Volume 83, Issue 5, May 1996, Page 716, <https://doi.org/10.1002/bjs.1800830542>

- Kolb, N. A., Smith, A. G., Singleton, J. R., Beck, S. L., Stoddard, G. J., Brown, S., & Mooney, K. (2016). The association of chemotherapy-induced peripheral neuropathy symptoms and the risk of falling. *JAMA neurology*, 73(7), 860-866.
- Kramer JF. (1984). Ultrasound: evaluation of its mechanical and thermal effects. *Arch Phys Med Rehabil* 65(5):223–7.
- Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L., Beal, M. F., Surmeier, D. J., Kordower, J. H., Tabar, V. and Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480(7378): 547-551.
- Kroemer, G., Reed, JC. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 6(5), 513–519
- Kuwabara, S., & Yuki, N. (2013). Axonal Guillain-Barré syndrome: concepts and controversies. *The Lancet Neurology*, 12(12), 1180-1188.
- Lai, W. C., Iglesias, B. C., Mark, B. J., and Wang, D. (2021). Low-intensity pulsed ultrasound augments tendon, ligament, and bone-soft tissue healing in preclinical animal models: A systematic review. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg. Official Publ. Arthrosc. Assoc. N. Am. Int. Arthrosc. Assoc.* 37 (7), 2318–2333.e3. doi:10.1016/j.arthro. 2021.02.019
- Landstrom, Aria. (1994) “Nerve Regeneration Induced by Collagen-GAG Matrix in Collagen Tubes.”MS Thesis, MIT.
- Latov N (2002) Diagnosis of CIDP. *Neurology* 59(12):S2–S6
- Leal, P. C., Lins, L. C. R. F., de Gois, A. M., Marchioro, M., Santos, J. R. 2016. Commentary: Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Front Neurosci*, 10, 283. <http://doi.org/10.3389/fnins.2016.00283>
- Leal, P.C., Bispo, J.M.M., Engelberth, R.C.G.J., Silva, K.D.A., Meurer, Y.R., Ribeiro, A.M., Silva, R.H., Marchioro, M., Santos, J.R. 2019. Serotonergic dysfunction in a model of parkinsonism induced by reserpine. *J Chem Neuroanat.* 96, 73-78. doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.12.011
- Leão, A.H., Sarmiento-Silva, A.J., Santos, J.R., Ribeiro, A.M., Silva, R.H., 2015. Molecular, Neurochemical and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. *Brain Pathol.* 25(4): 377-90. Doi: 10.1111/bpa.12253.
- Levine, B., Sinha, S., Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4:600–606.

- Lewitt PA (2008). Levodopa for the treatment of Parkinson's disease. *N England Journal of Medicine*, 359:2468–2476
- Li, H., Wang, B., Zhu, C., Feng, Y., Wang, S., Shahzad, M., Hu, C., Mo, M., Du, F., Yu, X. 2013. “17 β -estradiol impedes Bax-involved mitochondrial apoptosis of retinal nerve cells induced by oxidative damage via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway”, *J Mol Neurosci.*, 50(3), 482-93. doi: 10.1007/s12031-013-9968-9.
- Li, L., Ye, X. P., Lu, A. Z., Zhou, S. Q., Liu, H., Liu, Z. J., Jiang, S., Xu, S. Y. 2013. “Hyperglycemia Magnifies Bupivacaine-Induced Cell Apoptosis Triggered by Mitochondria Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress”, *Journal of Neuroscience Research*, 91:786–798.
- Lin, G., Reed-Maldonado, A. B., Lin, M., Xin, Z., and Lue, T. F. (2016). Effects and mechanisms of low-intensity pulsed ultrasound for chronic prostatitis and chronic pelvic pain syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (7), E1057. doi:10.3390/ijms17071057
- Liu et al., *Mitophagy in Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Treatment*, 2019.
- Lotharius J, Brundin P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nat Rev Neurosci* 3:932–942
- Luciani Karling R., Frie Jude A., Khokhar Jibrán Y.. (2020). An Open Source Automated Bar Test for Measuring Catalepsy in Rats, 7 (3) *ENEURO*.0488-19.2020; DOI: 10.1523/ENEURO.0488-19.2020
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N. and Cenci, M. A. (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15(1): 120-132.
- Mackinnon SE, Colbert SH. Principles and techniques of peripheral nerve repair, grafts, and transfers. Thorne C, editor. *Grabb and smith's plastic surgery*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/ Lippincott Williams&Wilkins; 2014.
- Madsen, PW., Gerten, JW. (1961). The effect of ultrasound on conduction velocity of peripheral nerve. *Arch Phys Med Rehab*;42:645–9
- Magno, L. A. V., Tenza-Ferrer, H., Collodetti, M., Aguiar, M. F. G., Rodrigues, A. P. C., da Silva, R. S., Silva, J. D. P., Nicolau, N. F., Rosa, D. V. F., Birbrair, A., Miranda, D. M. and Romano-Silva, M. A. (2019). Optogenetic stimulation of the M2 cortex reverts motor dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 39(17): 3234-3248.
- Mara Cercignani, Giovanni Giulietti, Nick G. Dowell, Matt Gabel, Rebecca Broad, P. Nigel Leigh, Neil A. Harrison, Marco Bozzali (2017). Characterizing axonal myelination within

- the healthy population: a tract-by-tract mapping of effects of age and gender on the fiber g-ratio, *Neurobiology of Aging*, Volume 49, Pages 109-118
- McGeer Patrick L., McGeer Edith G., Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease, *Parkinsonism and Related Disorders* 10 (2004) S3–S7
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. (2015). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Apr 1;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656. Erratum in: *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Apr;7(4). pii: a026716. doi: 10.1101/cshperspect.a026716.
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., & Sharma, P. L. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European journal of pharmacology.* 2013; 698 (1-3): 6-18.
- Mendonca, AC., Barbieri, CH., Mazzer, N. (2003). Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *J Neurosci Meth*;129:183–90.
- Merola A, Rosso M, Romagnolo A, Comi C, Fasano A, Zibetti M, Lopez-Castellanos JR, Cocito D, Lopiano L, Espay AJ. (2017). Peripheral neuropathy as marker of severe Parkinson's disease phenotype. *Mov Disord.* Aug;32(8):1256-1258. doi: 10.1002/mds.27025. Epub 2017 May 8. PMID: 28582598.
- Meyer Jackson B. 2006. Molecular and cellular biophysics.
- Micheli L, Di Cesare Mannelli L, Lucarini E, Cialdai F, Vignali L, Ghelardini C, Monici M. (2017). Photobiomodulation therapy by NIR laser in persistent pain: an analytical study in the rat. *Lasers Med Sci.* 2017 Nov;32(8):1835-1846. doi: 10.1007/s10103-017-2284-9.
- Miller, D. L. (2007). Overview of experimental studies of biological effects of medical ultrasound caused by gas body activation and inertial cavitation. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3), 314-330.
- Miller, D. L., Smith, N. B., Bailey, M. R., Czarnota, G. J., Hynynen, K., Makin, I. R. S. (2012). Bioeffects Committee of the American Institute of Ultrasound in Medicine, Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *J. Ultrasound Med*, vol. 31, no. 4, 623–634.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., . . . Nagatsu, T. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor r1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996).* 2000; 107 (3): 335-341.
- Molassiotis, A., Cheng, H. L., Lopez, V., Au, J. S., Chan, A., Bandla, A., ... & Sundar, R.

- (2019). Are we mis-estimating chemotherapy-induced peripheral neuropathy? Analysis of assessment methodologies from a prospective, multinational, longitudinal cohort study of patients receiving neurotoxic chemotherapy. *BMC cancer*, 19(1), 1-19.
- Mourad, PD., Lazar, DA., Curra, FP., Mohr, BC., Andrus, KC., Avelino, AM. (2001). Ultrasound accelerates functional recovery after peripheral nerve damage. *Neurosurgery*;48(5):1136–40.
- Muller T, Van Laar T, Cornblath DR et al (2013) Peripheral neuropathy in Parkinson's disease: levodopa exposure and implications for duodenal delivery. *Parkinsonism Relat Disord* 19:501–507
- Mundi R, Petis S, Kaloty R, Shetty V, Bhandari M. (2009). Low-intensity pulsed ultrasound: Fracture healing. *Indian J Orthop*. 43(2):132-40. doi: 10.4103/0019-5413.50847. PMID: 19838361; PMCID: PMC2762261.
- Myers, R. R. (1998). Morphology of the peripheral nervous system and its relationship to neuropathic pain. *Anesthesia: biologic foundations*, 483-513.
- Nakamura, T., Fujihara, S., Yamamoto-Nagata, K. (2011). Low intensity pulsed ultrasound reduces the inflammatory activity of synovitis. *Ann Biomed Eng*, 39:2964-71.
- Nammi, S., Boini, K.M., Kilari, E.K., and Sreemantula, S. (2004). Pharmacological evidence for lack of central effects of reserpine methonitrate: a novel quaternary analogue of reserpine. *Therapy*, 1: 231–239.
- Neisewander JL, Castañeda E, Davis DA. (1994). Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology (Berl)* 116:79–84
- Neisewander JL, Lucki I, McGonigle P. (1991). Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment. *Brain Res* 558:27–35
- Neisewander, J.L., Castaneda, E., and Davis, D.A. (1994). Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology(Berl)* 116, 79–84. doi:10.1007/BF02244874
- Nguyen, TN., Padman, BS., Lazarou, M. (2016). Deciphering the molecular signals of PINK1/Parkin mitophagy. *Trends Cell Biol*, 26: 733–44.
- Ni, XJ., Wang, XD., Zhao, YH., Sun, HL., Hu, YM., Yao, J. (2017). The Effect of Low-Intensity Ultrasound on Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in a Rat Sciatic Nerve Crushed Injury Model. *Ultrasound Med Biol*; 43(2):461–468.

- Nicholson, D. W. (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407, 810–816
- Nikola Stikov, Jennifer S.W. Campbell, Thomas Stroh, Mariette Lavelée, Stephen Frey, Jennifer Novek, Stephen Nuara, Ming-Kai Ho, Barry J. Bedell, Robert F. Dougherty, Ilana R. Leppert, Mathieu Boudreau, Sridar Narayanan, Tanguy Duval, Julien Cohen-Adad, Paul-Alexandre Picard, Alicja Gasecka, Daniel Côté, G. Bruce Pike. (2015). In vivo histology of the myelin g-ratio with magnetic resonance imaging, *NeuroImage*, Volume 118, Pages 397-405, doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.05.023.
- Notermans NC, Wokke JH, van der Graaf Y, Franssen H, van Dijk GW, Jennekens FG. Chronic idiopathic axonal polyneuropathy: a five year follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Dec;57(12):1525-7. doi: 10.1136/jnnp.57.12.1525. PMID: 7798984; PMCID: PMC1073236.
- Nunes EJ, Randall PA, Hart EE, Freeland C, Yohn SE, Baqi Y, Muller CE, López-Cruz L, Correa M, Salamone JD. (2013). Effort-related motivational effects of the VMAT-2 inhibitor tetrabenazine: implications for animal models of the motivational symptoms of depression. *J Neurosci* 33:19120–19130
- Nyborg, WL., Carson, PL., Carstensen, EL., Dunn, F., Miller, MW., Miller, DL., Thompson, HE., Ziskin, MC. (2002). Exposure Criteria for Medical Diagnostic Ultrasound: II. Criteria Based on All Known Mechanisms. National Council on Radiation Protection and Measurements; *Bethesda Md*: Report No. 140
- O'Brien WD. (2007) Ultrasound-biophysics mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1–3), 212–255.
- Ogard, WK., Stockert, BW. (1994). Neuropatias Periféricas. In: Umphred DA, editor. *Fisioterapia neurológica, second ed, São Paulo, Manole*.
- Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2015). Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *Journal of Cell Biology*, 209(1), 111-128.
- Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. (2001). Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg* 17(1):69–75
- Oliveira, F.B., Pereira, M.D., Trindade, A.P., Shimano, A.C., Gabriel, R.E.C., Borges, A.P.O. (2012). Action of Therapeutic Laser and Ultrasound in Peripheral Nerve Regeneration. *Acta Ortop Bras*, 20(1):98-103.

- Ozkan Unlu, F., Saygı Karadag, E., Senol, S., Kapcı, S., Aydeniz, B., Aktas, I., Gozke, E. (2015). New treatment alternatives in the ulnar neuropathy at the elbow: ultrasound and low-level laser therapy. *Acta Neurol Belg*, 115:355–360.
- Palikaras, K., Daskalaki, I., Markaki, M., Tavernarakis, N. (2017). Mitophagy and age-related 102 pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. *Pharmacol Ther*, 178: 157–74.
- Pehlivan, F. (2017), Biyofizik. Pelikan Kitabevi.
- Pickles, S., Vigie, P., Youle, RJ. (2018). Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr Biol*, 28: R170–85
- Podurgiel SJ, Nunes EJ, Yohn SE, Barber J, Thompson A, Milligan M, Lee CA, López-Cruz L, Pardo M, Valverde O, Lendent C, Baqi Y, Muller CE, Correa M, Salamone JD (2013). The vesicular monoamine transporter (VMAT-2) inhibitor tetrabenazine induces tremulous jaw movements in rodents: implications for pharmacological models of parkinsonian tremor. *Neuroscience* 250:507–519
- Pollari, E., Prior, R., Robberecht, W., Van, Damme., P, Van Den Bosch., L. (2018). In Vivo Electrophysiological Measurement of Compound Muscle Action Potential from the Forelimbs in Mouse Models of Motor Neuron Degeneration. *J. Vis. Exp*, (136), e57741.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A. S., & White, L. (2019). *Neurosciences*. De Boeck Supérieur.
- Rajabally YA, Martey J (2013) Levodopa, vitamins, ageing and the neuropathy of Parkinson's disease. *J Neurol* 260:2844–2848
- Ramawat et al, 1999. Ramawat KG; Rachnana Sharma; Suri SS (2007-01-01). Ramawat, KG.; Merillon, JM. (eds.). *Medicinal Plants in Biotechnology- Secondary metabolites* 2nd edition 2007. Oxford and IBH, India. pp. 66–367. ISBN 978-1-57808-428-9.
- Reckziegel P, Peroza LR, Schaffer LF, FerrariMC, de FreitasCM, Bürger ME, Fachinetto R (2013). Gallic acid decreases vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 104:132–137
- Reich, S. G., & Savitt, J. M. (2018). Parkinson Disease. *Medical Clinics of North America*. doi:10.1016/j.mcna.2018.10.014
- Reis EM, Schreiner Neto FW, Cattani VB, Peroza LR, Busanello A, Leal CQ, Boligon AA, Lehmen TF, Libardoni M, Athayde ML, Fachinetto R (2014). Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in rats. *Biomed Res Int*. doi:10.1155/2014/958209

- Rojas, J.C. and Gonzalez-Lima, F. (2011). Low-Level Light Therapy of the Eye and Brain. *Eye and Brain*, 3, 49-67.
- Ross MH, Pawlina W. *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2016.
- Rushton WA (1951) A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J Physiol* 115(1):101–122
- Salamone J, Baskin P (1996). Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: possible model of parkinsonian tremor. *Pharmacol Biochem Behav* 53:179–183
- Salamone JD, Ishiwari K, Betz AJ, Farrar AM, Mingote SM, Font L, Hockemeyer J, Müller CE, Correa M (2008). Dopamine/adenosine interactions related to locomotion and tremor in animal models: possible relevance to parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 14(Suppl2):S130–S134
- Samii, A., Nutt, J. G., & Ransom, B. R. Parkinson's disease. *Lancet* (London, England). 2004a; 363 (9423): 1783-1793. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16305-8
- Sanberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman AB (1988) The catalepsy test: its ups and downs. *Behav Neurosci* 102:748–759.
- Santos J.R / *Behavioural Brain Research* 253 (2013) 68– 77.
- Santos José R., Cunha João A.S., Dierschnabel Aline L., Campêlo Clarissa L.C., Leão Anderson H.F.F., Silva Anatildes F., Engelberth Rovená C.G.J., Izídio Geison S., Cavalcante Jeferson S., Abílio Vanessa C., Ribeiro Alessandra M., Silva Regina H. (2013). Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine, *Behavioural Brain Research*, Volume 253, Pages 68-77, ISSN 0166-4328, doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.031.
- Savchenko, O. (2017). Application of low intensity pulsed ultrasound for microbial cell stimulation in bioprocesses and development of carbonbased silver covered filters for microbial cells removal in water systems. Ph.D. dissertation, Dept. Biomed. Eng., Univ. Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- Schallert, T., Fleming, S. M., Leasure, J. L., Tillerson, J. L. and Bland, S. T. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39(5): 777-787.
- Schwartz, J. H., & Westbrook, G. L. (2000). The cytology of neurons. *Principles of neural science*, 67-87.

- Shankar H, Pagel PS. (2011) Potential adverse ultrasound-related biological effects: a critical review. *Anesthesiology*. 115(5):1109-24. doi: 10.1097/ALN.0b013e31822fd1f1.
- Shankar, H., Pagel, P.S. (2011). Potential Adverse Ultrasound-related Biological Effects. The American Society of Anesthesiologists, Inc. Lippincott Williams & Wilkins. *Anesthesiology*, 115:1109–24
- Shankarappa, Sahadev A. (2010). "Forced-Exercise Alleviates Neuropathic Pain in Experimental Diabetes: Effects on Voltage-Gated Calcium Channels" Dissertations. Paper 187.
- Shen, N., Zhu, J. (1995). Experimental study using a direct current electrical field to promote peripheral nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*;11(3):189–93.
- Simon C (2009) Peripheral neuropathy. *InnovAIT* 2(9):538–545
- Su X, Jing X, Jiang W, Li M, Liu K, Teng M, Wang D, Meng L, Zhang Y, Ji W. (2023) Curcumin-Containing polyphosphazene nanodrug for Anti-Inflammation and nerve regeneration to improve functional recovery after spinal cord injury. *Int J Pharm*. 2023 Jul 25;642:123197. doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.123197. Epub 2023 Jul 4. PMID: 37406950.
- Sung Chen-Yu, Chiang Pai-Kai, Tsai Che-Wen, Yang Feng-Yi. (2022). Low-Intensity Pulsed Ultrasound Enhances Neurotrophic Factors and Alleviates Neuroinflammation in a Rat Model of Parkinson's Disease, *Cerebral Cortex*, Volume 32, Issue 1, Pages 176–185, doi.org/10.1093/cercor/bhab201
- Tadaiesky MT, Andreatini R, Vital MABF (2006). Different effects of 7- nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. *Eur J Pharmacol* 535:199–207
- Takebe, H., Nakanishi, Y., Hirose, Y., and Ochi, M. (2014). Effect of low intensity pulsed ultrasound stimulation on sinus augmentation in rabbits. *Clin. Oral Implants Res*. 25, 735–741. doi: 10.1111/clr.12136
- Tanaka, E., Kuroda, S., Horiuchi, S., Tabata, A., and El-Bialy, T. (2015). Low-intensity pulsed ultrasound in dentofacial tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng*. 43 (4), 871–886. doi:10.1007/s10439-015-1274-y
- Tankisi H, Otto M, Pugdahl K, Johnsen B, Fuglsang-Frederiksen A. (2012) Correlation between compound muscle action potential amplitude and duration in axonal and demyelinating polyneuropathy. *Clin Neurophysiol*. Oct;123(10):2099-105. doi: 10.1016/j.clinph.2012.04.002. Epub 2012 May 3. PMID: 22560637.

- Tatton NA. (2000). Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurology*. 2000 Nov;166(1):29-43. doi: 10.1006/exnr.2000.7489.
- Taylor, J. M., Main, B. S., & Crack, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: Coconspirators in the pathology of parkinson's disease. *Neurochemistry international*. 2013; 62 (5): 803-819.
- Tompkins, M. M., Basgall, E. J., Zamrini, E., & Hill, W. D. Apoptotic-like changes in lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons. *The American journal of pathology*. 1997; 150 (1): 119-131.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350. PMID: 388439; PMCID: PMC411572.
- Tsuang, Y.H., Liao, L.W., Chao, Y.H., Sun, J.S., Cheng, K., Chen, M.H., Weng, P.W. (2010). Effects of Low Intensity Pulsed Ultrasound on Rat Schwann Cells Metabolism. *Artificial Organs Wiley Periodicals, Inc*, 35(4):373–383.
- Tugwell C. Parkinson's Disease on Focus. 2008. Page 7-8.
- Ugrenović, S., Jovanović, I., Vasović, L. et al. (2016). Morphometric analysis of the diameter and g-ratio of the myelinated nerve fibers of the human sciatic nerve during the aging process. *Anatomical Science International*. 91, 238–245. doi.org/10.1007/s12565-015-0287-9
- Viswanath Veena, Wu Yongqin, Boonplueang Rapee, Chen Sylvia, Stevenson Fang Feng, Yantiri Ferda, Yang Lichuan, Beal M. Flint, Andersen Julie K. (2001). Caspase-9 Activation Results in Downstream Caspase-8 Activation and Bid Cleavage in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced. *Parkinson's Disease Journal of Neuroscience*, 21 (24) 9519-9528; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-24-09519.2001
- Vykhodtseva, N., McDannold, N., Martin, H., Bronson, RT., Hynynen, K. (2001). Apoptosis in ultrasound-produced threshold lesions in the rabbit brain. *Ultrasound Med Biol*. 27:111–7.
- Wadenberg ML, Kapur S, Soliman A, Jones C, Vaccarino F (2000) Dopamine D2 receptor occupancy predicts catalepsy and the suppression of conditioned avoidance response behavior in rats. *Psychopharmacology* 150:422–429.

- Wakabayashi Koichi, Fumiaki Mori, Kunikazu Tanji, Satoshi Orimo, Hitoshi Takahashi. Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathol* (2010) 120:1–12.
- Watson JC, Gordon LB, Stermac L, Kalogerakos F, Steckley P. (2003). Comparing the effectiveness of process-experiential with cognitive-behavioral psychotherapy in the treatment of depression. *J Consult Clin Psychology*. 71(4):773-81. doi: 10.1037/0022-006x.71.4.773
- Wei, L., Cui, L., Snider, B. J., Rivkin, M., Steven, S. Y., Lee, C. S., ... & Choi, D. W. (2005). Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia. *Neurobiology of disease*, 19(1-2), 183-193.
- Wilder RP, Jenkins J, Seto C. (2007). Treatment Techniques and special equipment. In: Braddom RL ed. *Physical Medicine & Rehabilitation*, 3th ed, Philadelphia- USA: Saunders Elsevier Inc, 413–436.
- Wimalasena K. (2011). Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. *Med Res Rev*. Jul;31(4):483-519. doi: 10.1002/med.20187. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20135628; PMCID: PMC3019297.
- Winer, J. B. (2014). An update in guillain-barré syndrome. *Autoimmune diseases*.
- Wolfe GI, Baker NS, Amato AA, Jackson CE, Nations SP, Saperstein DS, Cha CH, Katz JS, Bryan WW, Barohn RJ (1999) Chronic cryptogenic sensory polyneuropathy: clinical and laboratory characteristics. *Arch Neurol* 56(5):540–547
- Wood, A.K.W., Sehgal, C.M. (2015). A Review of Low Intensity Ultrasound for Cancer Therapy. *Ultrasound Med Biol*, 41(4): 905–928.
- Xu, J., Guan, Z., Wang, X., Sun, D., Li, Y., Pei, B., Zhang, X. (2021). Network pharmacology and experimental evidence identify the mechanism of astragaloside IV in oxaliplatin neurotoxicity. *Drug Design, Development and Therapy*, 99-110.
- Yang M, Rawson JL, Zhang EW, Arnold PB, Lineaweaver W, Zhang F. Comparisons of outcomes from repair of median nerve and ulnar nerve defect with nerve graft and tubulization: a meta-analysis. *J Reconstr Microsurg*. 2011;27(8):451–460. 10.1055/s-0031-1281526.
- Yi, X., Yin, XM., Dong, Z. (2003). Inhibition of Bid-induced apoptosis by Bcl-2. tBid insertion Bax translocation and Bax/Bak oligomerization suppressed. *J Biol Chem*, 278:16992–16999.

- Yilmaz, H. F. (2023). *Sıçanlarda metotreksat kullanımının neden olduğu sinir sistemi dejenerasyonuna agmatinin etkisi*. Doktora Tezi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
- Yuki, N., & Hartung, H. P. (2012). Guillain–barré syndrome. *New England Journal of Medicine*, 366(24), 2294-2304.
- Zaimi A, Duval T, Gasecka A, Côté D, Stikov N and Cohen-Adad J (2016) AxonSeg: Open Source Software for Axon and Myelin Segmentation and Morphometric Analysis. *Front. Neuroinform.* 10:37. doi: 10.3389/fninf.2016.00037
- Zajączkowska, R., Kocot-Kępska, M., Leppert, W., Wrzosek, A., Mika, J., & Wordliczek, J. (2019). Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1451.
- Zankel, HT. (1966). Effect of physical agents on motor conduction velocity of the ulnar nerve. *Arch Phys Med Rehab*; 49:787–92.
- Zhao, J., Shi, W., Lu, Y. et al. (2022). Alterations of monoamine neurotransmitters, HPA-axis hormones, and inflammation cytokines in reserpine-induced hyperalgesia and depression comorbidity rat model. *BMC Psychiatry* 22, 419 <https://doi.org/10.1186/s12888-022-04065-0>
- Zhu G-H, Sun X-P, Li J, et al. (2019) No association between low-dose reserpine use and depression in older hypertensive patient: Result of a multicenter, cross-sectional study. *J Geriatric Cardiol* 16: 608–613.
- Zhu, L., Hao, J., Cheng, M., Zhang, C., Huo, C., Liu, Y., Du, W., Zhang, X. (2018). Hyperglycemia-induced Bcl-2/Bax-mediated apoptosis of Schwann cells via 112 mTORC1/S6K1 inhibition in diabetic peripheral neuropathy. *Experimental Cell Research*, 367,186–195
- Zis P, Grünewald RA, Chaudhuri RK, Hadjivassiliou M (2017) Peripheral neuropathy in idiopathic Parkinson’s disease: a systematic review. *J Neurol Sci* 378:204–209
- Ziskin, MC. (1992). Lewin PA. Ultrasonic exposime try. Boca Raton, Fla: CRC.
- Ziskin, MC. (1993). Fundamental Physics of Ultrasound and Its Propagation in Tissue. *RadioGraphics*; 13:705-709.
- Zong Yang, Chen Ting, Dong Hongli, Zhu Lijing, Ju Wenzheng. (2020). Si-Ni-San Prevents Reserpine-Induced Depression by Inhibiting Inflammation and Regulating CYP450 Enzymatic Activity. *Frontiers in Pharmacology* 10 DOI=10.3389/fphar.2019.01518