

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NONSTEROİDAL ANTIİNFLAMATUAR İLACA PRENATAL  
MARUZ KALMANIN PERİFERİK SİNİR GELİŞİMİ  
ÜZERİNDEKİ OLUMSUZ ETKİLERİNE KARŞI  
MELATONİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN  
MORFOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**İlknur KESKİN**

**DOKTORA TEZİ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof.Dr. Serpil KALKAN**

**2. Danışman**

**Prof.Dr. Süleyman KAPLAN**

KONYA-2011

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NONSTEROİDAL ANTIİNFLAMATUAR İLACA PRENATAL  
MARUZ KALMANIN PERİFERİK SİNİR GELİŞİMİ  
ÜZERİNDEKİ OLUMSUZ ETKİLERİNE KARŞI  
MELATONİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**İlknur KESKİN**

**DOKTORA TEZİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof.Dr. Serpil KALKAN**

**2. Danışman**

**Prof.Dr. Süleyman KAPLAN**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10102002 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2011**

## i. ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İlknur KESKİN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Hasan CÜCE  
Selçuk Üniversitesi



Danışman:

Prof.Dr. Serpil KALKAN  
Selçuk Üniversitesi



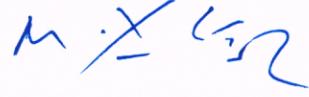
Üye:

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Muzaffer ŞEKER  
Konya Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN  
Selçuk Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tefvik TEKELİ  
Enstitü Müdürü

## ii. ÖNSÖZ

2005 yılında başladığım doktora eğitimim döneminde eğitimime katkıda bulunan ve tez danışmanlığımı yürüten Prof. Dr. Serpil KALKAN'a, Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Hasan CÜCE'ye, bölümümüz öğretim üyeleri ve uzmanlarına, eğitimimim son altı ayında birlikte çalışma şansı yakaladığım Prof. Dr. Ender ERDOĞAN'a ve bu süreçte güzel anılar paylaştığım mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

2007 yılında katıldığım bir kursta beni stereolojiyle tanıştıran ve bu konuda her türlü desteği sağlayan, tez konumun belirlenme aşamasından itibaren tüm aşamalarda yanımda olan, aynı zamanda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde okurken hocam olan Prof. Dr. Süleyman KAPLAN'a ve çalışmalarımın stereolojik kısmını yürüttüğüm Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'da kendimi evimde hissettiren değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamın bir bölümünü gerçekleştirmem için bana laboratuvarlarını açan İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD Başkanı Prof. Dr. Hakan Bozkurt ve ekibine teşekkür ederim.

Araştırmanın yapılabilmesi için gerekli maddi desteği -10102002 nolu proje ile- sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşlerime, sevgili eşim Doç. Dr. Mustafa KESKİN' e ve her şeyden önce bir anne olmamı sağlayan ve hayatıma en büyük anlamı katan canım oğullarım Utku ve Arda'ya teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR.....	v
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Periferik Sinir Yapısı.....	1
1.1.1. Nöronlar.....	2
1.1.2. Schwann Hücreleri ve Miyelin Kılıf.....	4
1.1.3. Periferik Sinirin Bağ Dokusu Tabakaları.....	7
Epinörium.....	7
Perinörium.....	8
Endonörium.....	8
1.2. Periferik Sinir Embriyolojisi.....	10
1.3. Sıçan Siyatik Sinir.....	11
1.4. Melatonin.....	14
1.4.1. Melatonin Sentez ve Metabolizması.....	15
1.4.2. Melatoninin Antioksidan Özellikleri.....	17
1.4.3. Melatoninin İmmünite Üzerine Etkileri.....	18
1.4.4. İnsanda Melatonin Üretimi.....	19
1.4.5. Klinikte İlaç Olarak Melatonin Kullanımı.....	20
1.4.6. Melatoninin Periferik Sinir Üzerine Etkisi.....	21
1.5. Non-Steroidale Anti İnflamatuar İlaçlar.....	24
1.5.1. COX İzofomları.....	25
1.5.2. NSAİ İlaçların Gebelikte Kullanımı.....	27
1.5.3. Gebelikte Kullanılan NSAİ İlaçların Yan Etkileri.....	27
1.5.4. NSAİ İlaçların Periferik Sinirler Üzerine Etkileri.....	28
1.6. Stereoloji.....	28

1.7. Amaç.....	31
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
2.1. Deney Hayvanlarının Seçilmesi ve Çiftleştirilmesi.....	32
2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	34
2.3. Dokuların Histolojik Değerlendirme İçin Hazırlanması.....	36
2.4. Histolojik Takip ve Boyama.....	38
2.4.1. Gerekli Solüsyonların Hazırlanması.....	38
Tamponlu Formaldehit Solüsyonu.....	38
%2,5'luk Gluteraldehit Tespit Solüsyonu.....	39
Toluidine Blue.....	39
2.4.2. Dokuların Fiksasyon ve Boyama İşlemi.....	39
2.5. Stereolojik Analiz.....	40
2.6. İstatistiksel Analiz.....	45
3. BULGULAR.....	46
3.1. Genel Değerlendirme Bulguları.....	46
3.2. Histolojik Bulgular .....	47
3.2.1. Dört Haftalık Gruplar.....	48
Kontrol Grubu.....	48
SF (SHAM) Grubu.....	50
DS Grubu.....	52
DS+MLT-10 Grubu.....	54
DS+MLT-50 Grubu.....	56
MLT-10 Grubu.....	58
MLT-50 Grubu.....	60
3.2.2. Yirmi Haftalık Gruplar.....	62

Kontrol Grubu.....	62
SF (SHAM) Grubu.....	64
DS Grubu.....	66
DS+MLT-10 Grubu.....	68
DS+MLT-50 Grubu.....	70
MLT-10 Grubu.....	72
MLT-50 Grubu.....	74
3.3. Stereolojik Değerlendirme Bulguları.....	76
4. TARTIŞMA.....	84
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	87
6. ÖZET .....	88
7. SUMMARY .....	89
8. KAYNAKLAR.....	90
9. EKLER.....	94
10. ÖZGEÇMİŞ.....	95

#### **iv. SİMGE VE KISALTMALAR**

6-HMS:6- Hidroksimelatonin sülfat

a: Akson

AA: Araşidonik Asit

AANAT: N-asetil transferaz

bFGF: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

COX: Siklooksijenaz

CNS: Santral Sinir Sistemi

d: Dendrit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DS: Diklofenak Sodyum

eM: Eksternal Mesoakson

En: Endonöriyum

Ep: Epinöriyum

ER: Endoplazmik Retikulum

F: Fasikül

Fc: Yağ hücresi

g: Glia

I/R: İskemi/Reperfüzyon

iM: İnternal Mesoakson

KONT: Kontrol

m: Mitokondri

M: Mesoakson

Mc: Mast hücresi

MLT: Melatonin  
µm : Mikronmetre  
µm<sup>2</sup>: Mikronmetre kare  
Ms: Miyelin kılıf  
n: Nukleus  
N: Nissl cisimciği  
nl: Nukleolus  
NO: Nitrik Oksit  
NOS: Nitrik Oksit Sentetaz  
nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentetaz  
NSAİ: Non Steroidal Anti İnflamatuar  
NSC: Neuronal Stem Cell (Nöral Kök Hücreleri)  
OH: Hidroksil  
P: Perinöriyum  
PG: Prostaglandin  
PNS: Periferik Sinir Sistemi  
R: Ranvier Boğumu  
RGH: Retinal Gangliyon Hücresi  
s: Sinaps  
Sc: Schwann hücresi  
SF: Serum Fizyolojik  
SL: Schmidt Lanterman Yarığı  
SOD: Super Oksit Dismutaz  
TGF: Dönüştürücü Büyüme Faktörü  
v: Damar

# 1. GİRİŞ

Nonsteroidal antiinflamatuvar (NSAİ) ilaçlar ağrı, ateş ve enflamasyon tedavisinde tercih edilen ilaçlardır. Etkilerini siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe edip, araşidonik asit (AA) salınımını azaltarak gösterirler. COX tepkimesi, AA'den prostaglandin (PG) sentezini etkileyen en önemli basamaktır. NSAİ ilaçlar gebelik döneminde çeşitli ağrıların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bu ilaçlar 1. ve 2. trimesterde insan plasentasından geçebilmektedirler. NSAİ ilaçların periferik sinirlerin gelişimindeki etkileri fazla bilinmemektedir. Daha önceki çalışmalarda NSAİ ilaçların hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, hücre siklusunu durduğu ve hücrelerde apoptozise neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca doza bağımlı olarak nöral kök hücreleri (NSC)'nin proliferasyonunu ve nöronlara farklılaşmasını inhibe ettiği bildirilmektedir (Kudo ve ark 2003).

Melatonin olarak bilinen N-asetil-5-metoksitriptamin pineal bezden salgılanan bir nöroendokrin hormondur. Bu hormon, lipid çözünürlüğünden dolayı hücre membranını kolaylıkla geçer ve tüm hücre organellerine nüfuz edebilir. Melatonin, fizyolojik olarak en güçlü serbest radikal temizleyicisidir ve DNA üzerine koruyucu etkisi vardır. Bu hormon, serbest radikallere doğrudan etkisinin yanında, glutatyon peroksidazı aktive ederek glutatyon üzerinden de antioksidan etki göstermektedir. Glutatyon peroksidaz enzimi antioksidan savunma sisteminin bir elemanı olarak özellikle nöral dokuda önemli rol oynar. Enzim aktivitesi ile doku melatonin konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır (Hardeland 2005). Spinal kord ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda melatoninin 1-50mg/kg dozlarında nöroprotektif etkisi olduğu bildirilmektedir. Melatonin doza bağımlı olarak NSC'in proliferasyonunu ve nöronlara farklılaşmasını uyarmaktadır (Fujimoto ve ark 2000).

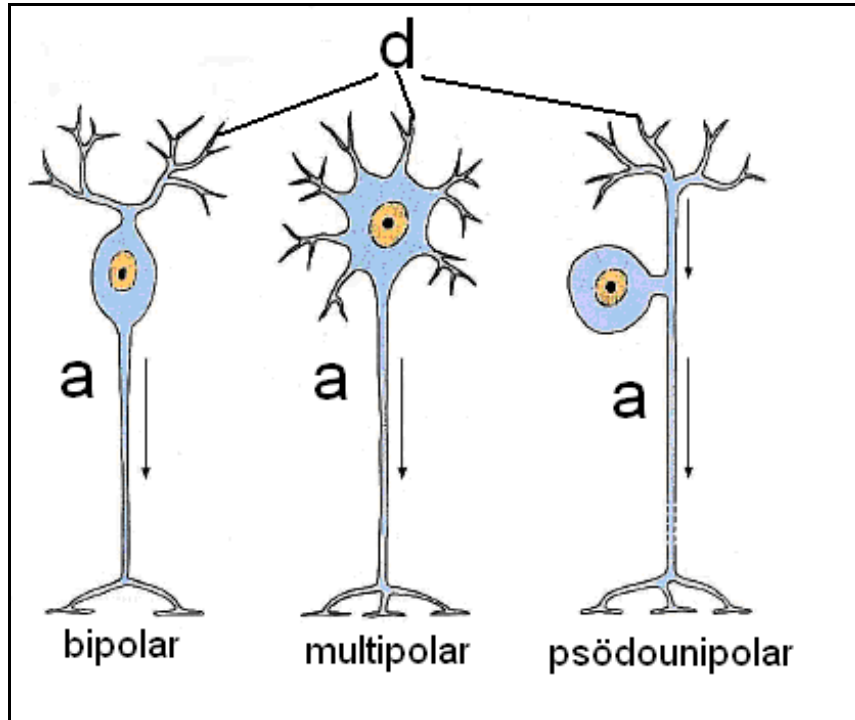
## 1.1. Periferik Sinirin Yapısı

Anatomik olarak sinir sistemi, beyin ve spinal korttan oluşan santral sinir sistemi (CNS) ile periferik sinir sisteminden (PNS) oluşur. Golgi ve Cajal 1906'da sinir sisteminin fonksiyonel bağlantılarla birbirine geçmiş sinir hücrelerinden oluşan bir şebekeden oluştuğunu açıklayan çalışmalarıyla Nobel ödülünü almışlardır (Glickstein 2006). PNS periferik hedef organlar ile CNS arasında köprü görevi görür

ve çift yönlü uyarı iletimi sağlar. PNS'in ana bileşenleri sinirler, gangliyonlar ve sinir uçlarıdır (Folan-Curran ve Fitzgerald 2002).

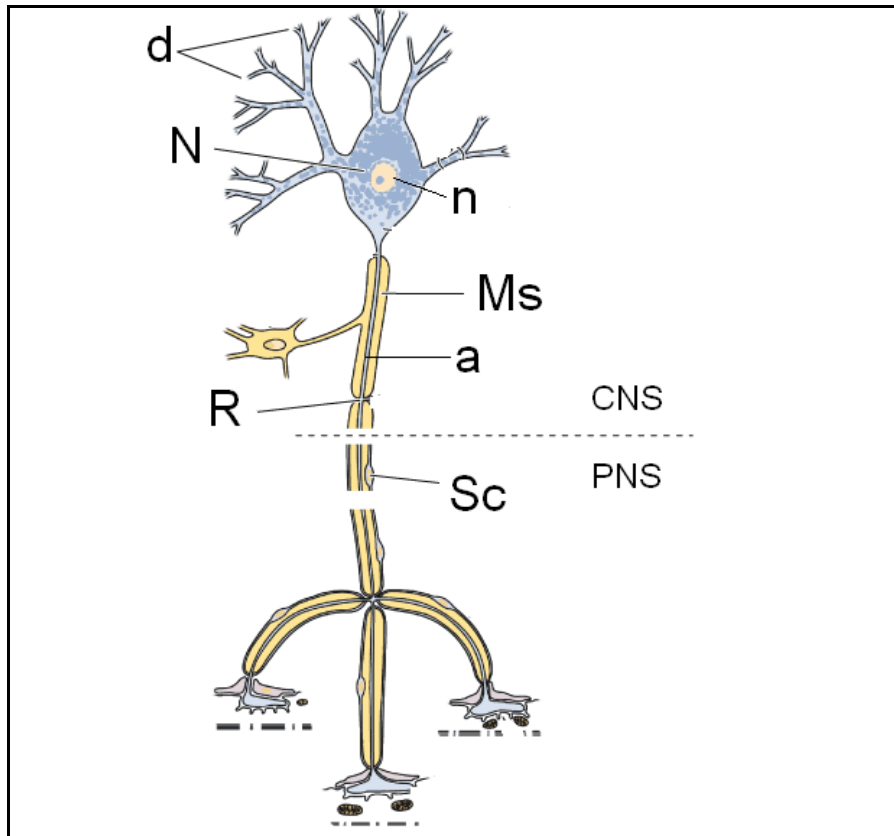
### 1.1.1. Nöronlar

Sinir sisteminin fonksiyonel ünitesi nöronlardır. Diğer tüm yapılar nöronlara bağlıdır. Nöronlar uyarıları almak, iletmek, belli hücrel aktiviteyi başlatmak, nörotransmitterleri ve diğer bilgi moleküllerini salgılamaktan sorumludurlar. Nöronlar fonksiyonel rollerine göre motor (efferent) nöronlar, duyu (afferent) nöronlar ve inter nöronlar olmak üzere üçe ayrılır. Nöron, medulla spinalisin ön boynuzunda (motor) ya da dorsal kök ganglionunda (duyu) yer alan bir gövde (soma) ile periferdeki hedef organa kadar uzanan çok uzun bir akson ve nöronların birbiri ile iletişimini sağlayan dendritlerden meydana gelir. Nöronlar uzantılarının şekil ve büyüklüğüne göre çoğunlukla üç kategoriye ayrılır: Multipolar (çok kutuplu) nöronların ikiden fazla uzantısı vardır. Bunlardan biri aksonken diğerleri dendrittir. Motor ve inter nöronlar daha çok multipolardır. Bipolar nöronlarda ise bir akson bir dendrit bulunur. Psödounipolar nöronlarda perikaryondan tek bir uzantı çıkar ve kısa bir süre sonra bu uzantı ikiye ayrılır; biri akson diğeri dendrit olur (Junqueira ve Carneiro 2009) (Şekil 1.1).



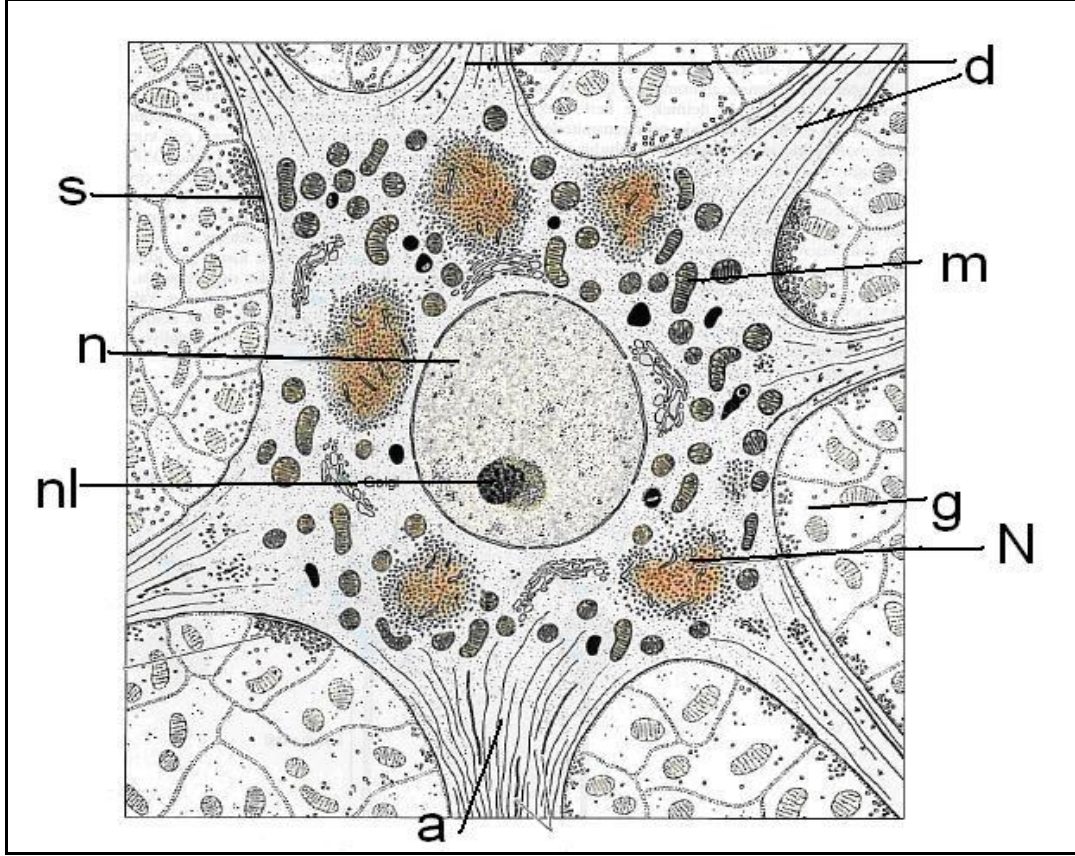
Şekil 1.1. Başlıca nöron tipleri (Junqueira ve Carneiro 2009)

Aksonun çıktığı akson tepesi hariç, nöronun tüm yüzeyi sinaptik terminallerle doludur. Nöronlar yuvarlak, oldukça büyük ve ökromatik belirgin bir tek çekirdek taşır. Golgi cisimciği ve mitokondri belirgin yapılardır. Bunlar sinir duyusu iletimi için enerji desteği ve deposu olarak görev yaparlar. Akson, nöronun tipine göre değişen uzunluk ve çapta silindirik bir yapıdır. Genellikle standart bir yapıya sahip olan aksonların çapları 1-24  $\mu\text{m}$  arasında değişirken, uzunlukları da 50  $\mu\text{m}$ 'den birkaç metreye kadar uzayabilmektedir. Perikaryon ve dendritte bulunan granüllü endoplazmik retikulum (ER) (Nissl cisimcikleri) ve ribozomlar akson tepesinde yoktur. Akson ile akson tepesinin birleştiği bölgeye *başlangıç segmenti* denir. Başlangıç segmenti kısa, dar ve miyelinsiz bir bölgedir. Burası nörona gelen değişik eksitator ve inhibitör uyarıların değerlendirildiği ve bir aksiyon potansiyelinin ya da sinir impulsunun üretilip üretilmeyeceğinin belirlendiği yerdir. Akson tepesinden sonra akson miyelinleşir, çapını artırır ve sonlanacağı hedef organa kadar aynı çapta devam eder (Junqueira ve Carneiro 2009) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Nöron yapısı (Junqueira ve Carneiro 2009)

Aksonal sitoplazma (aksoplazma) birkaç mitokondri, mikrotübül, nörofilaman ve granülsüz ER sisternaları içerir. Poliribozomların ve granüllü ER gibi protein üretiminden sorumlu organellerin bulunmaması, aksonun ihtiyaçları için perikaryona bağımlı olduğunu gösterir (Kierszenbaum 2006) (Şekil 1.3).

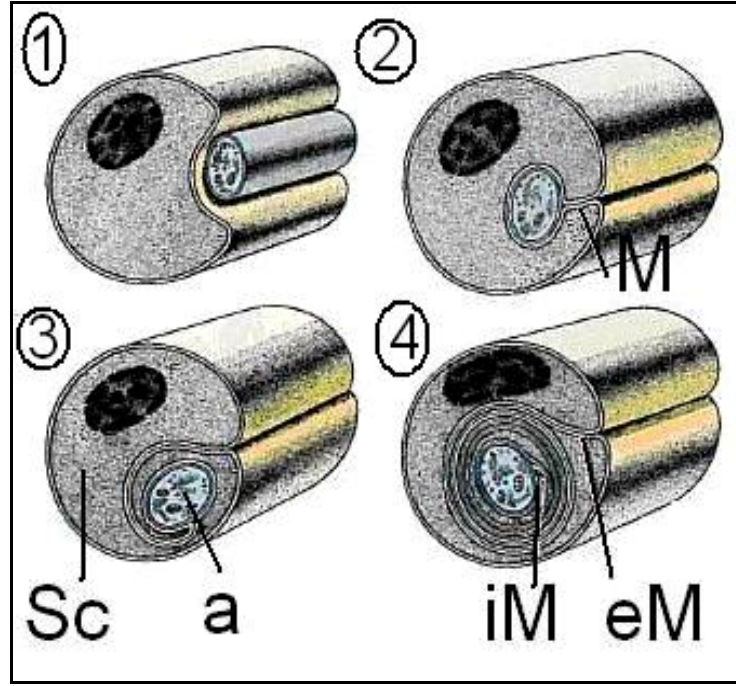


Şekil 1.3. Nöron gövdesi (soma) (Kierszenbaum 2006)

### 1.1.2. Schwann Hücreleri ve Miyelin Kılıf

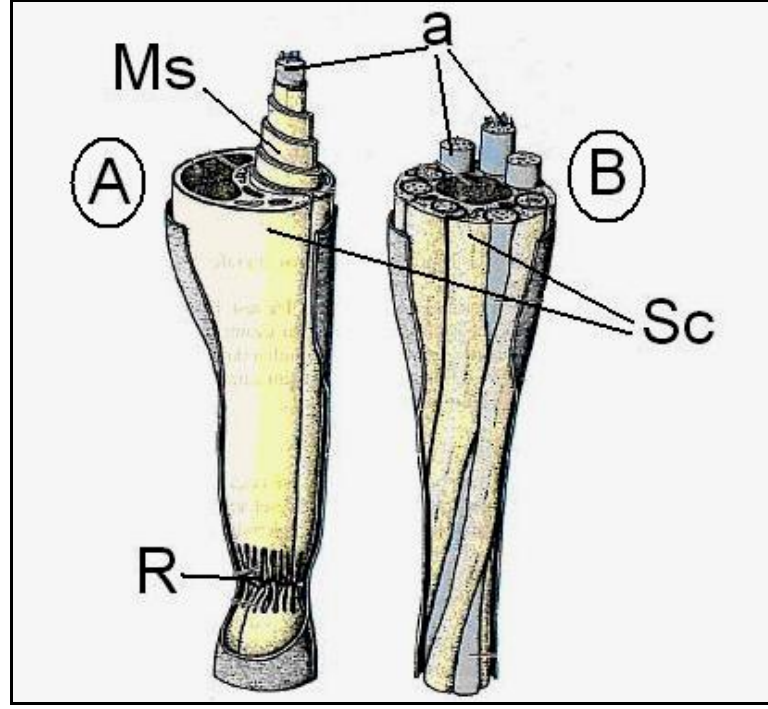
Aksonun çevresinde aksonal yapının hayatiyeti için mutlak gerekli olan Schwann hücresi yer alır. Schwann hücreleri periferik sinir sisteminde, tüm aksonları değişik oranlarda çevreleyen, dışında bir bazal lamina tabakası bulunan ve miyelin üreten hücrelerdir. Nöronlardan farklı olarak nöroektoderm kökenlidirler (Terzis ve Smith 1990). Schwann hücresinin varlığı aksondan gelen trofik faktörlerin etkisi altındadır. Bir Schwann hücresinin membranı ilk olarak aksonu sarar, daha sonra hücre akson etrafında birçok defa dönerek sfingomiyelin ve lipid içeren hücre membranı ile çok sayıda kat oluşturur (Şekil 1.4). *Miyelin kılıf* adı verilen bu madde birçok iyonun akımını engelleyen mükemmel bir yalıtıcıdır ve membranın iyon akışına direncini 5000 kat artırır, membran kapasitesini 50 kat düşürür (Thanos ve

ark 1998). Karşı karşıya gelen Schwann hücre membranları çift tabakalı Schwann bazal membranı oluşturur ve *mesoakson* adını alır (Junqueira ve Carneiro 2009).



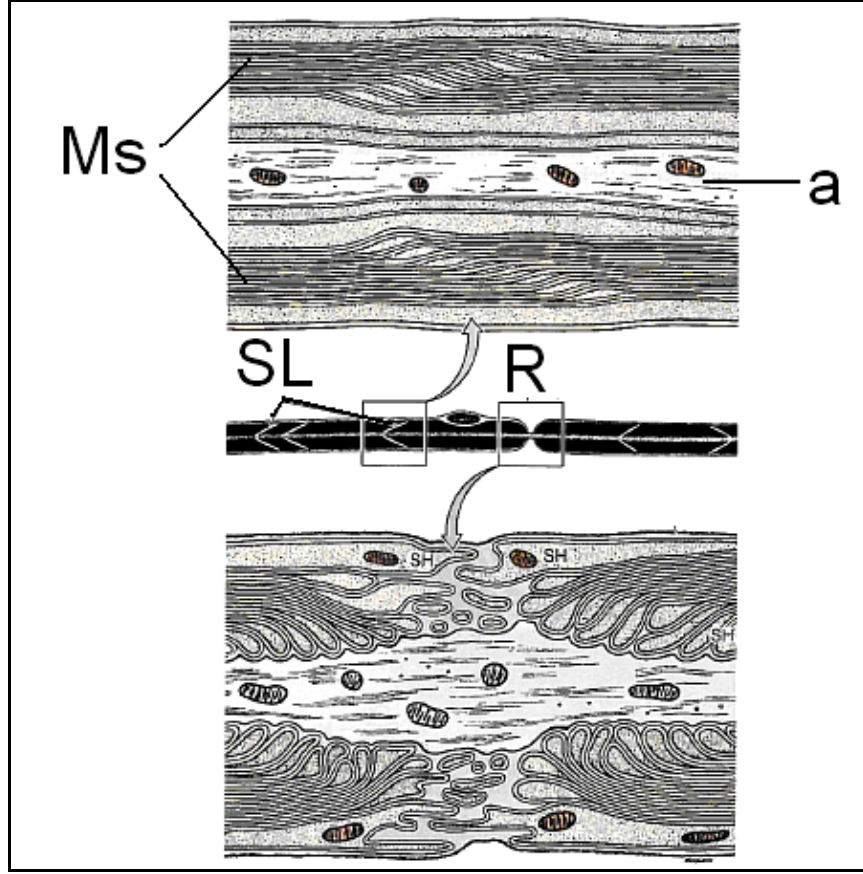
**Şekil 1.4.** Schwann hüresinin miyelin kılıfı oluşturma (Junqueira ve Carneiro 2009)

Bazı sinir lifleri ise miyelinsizdir. Çok sayıda akson Schwann hüresinin sitoplazmasına gömülerek yerleşir. Bu şekildeki yerleşim ile Schwann hücresi aksonların etrafında miyelin kılıfı oluşturmaz (Şekil 1.5). Sinir liflerinin neye göre miyelinleştiği belirsizdir. Schwann hücreleri ve bazal lamina tabakası miyelinsiz sinirlerde de aynen miyelinli sinirlerde olduğu gibi dizilidir (Luse 1956, Rustemeyer ve Dicke 2010). Akson çapı, sinirin miyelinleşmesinde önemli bir etkidir. Küçük çaplı aksonlar, genelde miyelinsiz lifleri oluştururlar. Miyelinsiz sinirlerin insanlarda 0,5-3,5  $\mu\text{m}$  arasında kalınlığa sahip olduğu ve bu sinirlerde iletim hızının 0,5-2 m/sn arasında değiştiği tespit edilmiştir. Miyelin tabakasının kalınlığı, sardığı aksonun çapına göre değişkenlik gösterir. Daha yeni liflerin miyelin tabakası daha kalın olmaktadır. Ayrıca aynı çapta aksona sahip motor nöronların miyelin tabakası duyu nöronlarına göre daha kalındır (Junqueira ve Carneiro 2009 ).



**Şekil 1.5.** Miyelinli (A) ve miyelinsiz (B) aksonlar (Junqueira ve Carneiro 2009)

Miyelinli aksonlarda akson boyunca, yanyana iki Schwann hücresi arasında, belli aralıklarla (0,08-6mm), ekstrasellüler sıvı ile akson arasında iyonların kolayca akabileceği izole edilmemiş küçük bir alan kalır. Bu alana *Ranvier Boğumu* adı verilir. İki boğum arasında kalan miyeline *Internodal Segment* denir. Miyelin segmentlerini birbirinden ayıran sirküler ya da oblik aralıklar da *Schmidt-Lantermann Yarıkları* diye adlandırılır (Şekil 1.6). Bazal lamina tabakası Ranvier boğumlarında da Schwann hücrelerinin dış tabakasını kesintiye uğramadan sarar (Junqueira ve Carneiro 2009). Miyelinli liflerde iyonlar miyelin kılıflarından geçemezken Ranvier boğumlarından kolayca geçerler. Bu nedenle aksiyon potansiyeli ancak bu boğumlarda gelişir ve bir boğumdan diğerine iletilir. Buna *sıçrayıcı (saltator) ileti* adı verilir. Sıçrayıcı iletinin iki yönden önemi büyüktür. İlki, depolarizasyon olayının sinir lifinin eksenı boyunca uzun aralarla sıçraması, miyelinli liflerde ileti hızını 5-7 kat artırır. İkinci olarak, aksonda enerjinin korunmasını sağlar. Çünkü yalnız boğumları depolarize ederek iyon kaybını 100 kat azaltır. Aksi takdirde bir seri impulstan sonra membranda sodyum ve potasyum farkını tekrar sağlamak için çok daha fazla enerji gerekecektir (Junqueira ve Carneiro 2009).

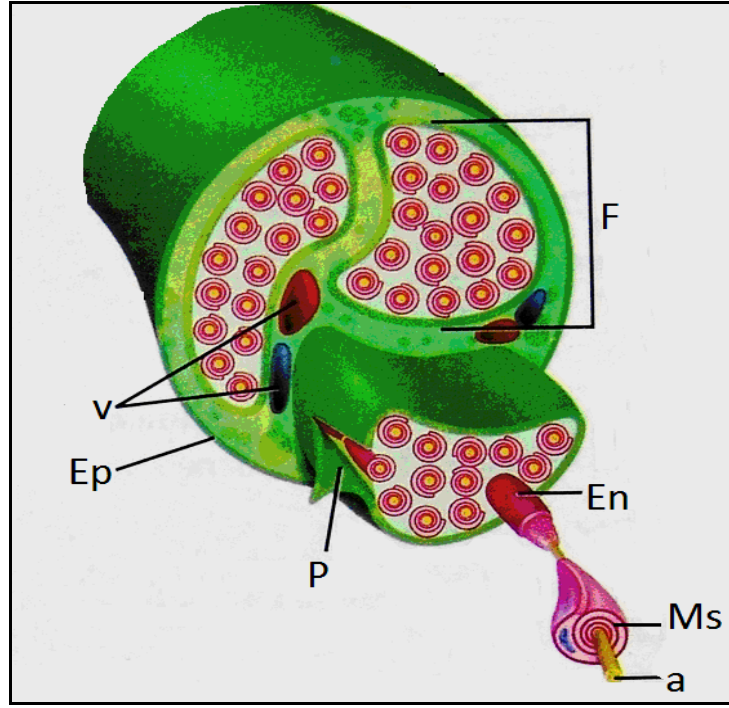


**Şekil 1.6.** Schmidt Lanterman Yarığı (SL) ve Ranvier Boğumu (R) (Junqueira ve Carneiro 2009)

### 1.1.3. Periferik Sinirin Bağ Dokusu Tabakaları

Periferik sinirlerin çevresi koruyucu tabakalarla çevrilidir. Bu tabakalara *bağ dokusu* adı verilir ve periferik sinirin % 21-81'ini oluştururlar (Kline ve Hudson 1995). Eklem bölgelerinde bu oranın arttığı bilinmektedir. Bağ dokusunun görevi periferik siniri korumak ve beslemektir. Periferik sinirleri çevreleyen bağ dokusu *epinöriyum*, *perinöriyum* ve *endonöriyum* adı verilen üç farklı destek doku kılıfından oluşur (Hunt 2002) (Şekil 1.7). Bu yapıların birçok mekanik ve fizyolojik görevleri vardır. Periferik sinir lifleri ve Schwann hücreleri bir araya gelerek *fasikül* denen yoğun bir demet oluştururlar. Sinir lifleri fasikülde kollajen ve retikulin lifleri ile birlikte mukopolisakkaritten oluşan temel maddenin (ground substance) içinde bulunurlar. Bu yapının temel hücresi fibroblastlardır ve kollajen üretiminden sorumludurlar. Hücreler, kollajen, retikulin ve temel maddenin oluşturduğu yapıya

*endonöryum* denir. Endonöryum içinde bulunan makrofajlar ve mast hücreleri muhtemelen hematojen kaynaklıdır (Kline ve Hudson 1995).



Şekil 1.7. Periferik sinir bağ dokusu tabakaları (Eroshenko 2001)

### **Epinöryum:**

Epinöryum gevşek bağ dokusudur. Sinir boyunca, boyuna yerleşimli kollajen ve elastik liflerden oluşur. Fasikül grupları epinöryum tabakası tarafından çevrelenmektedir (Landers ve Altenburger 2003). Eksternal epinöryum siniri mekanik etkilerden koruyan en dış tabaka, internal epinöryum ise perifasiküler ve interfasiküler bölgelerin arasını dolduran ve fasikülleri ayırarak birbiri üzerinde kaymasına izin veren tabakadır (Burnstock ve Milner 1995, Lawrence 2000). Mezodermden köken alan epinöryum periferik sinir kesitinin % 30-70'ini oluşturur. Bir periferik sinirde ne kadar fasikül varsa epinöryum o kadar kalındır. Epinöryum, bölgesel lenf nodlarına açılan lenf kanalları içerir (Burnstock ve Milner 1995). Epinöryum, sinirin kapiller pleksusunu besleyen kanı taşıdığından vasküler bir dokudur. Sinir kesilerinden sonra oluşan skar dokusunun çoğu yine epinöryumda bulunan fibroblastların proliferasyonundan kaynaklanır. Sinir lifinde perinöryumun cerrahi olarak disseke edilmesi sinir iletimini bozarken, epinöryumun disseke edilmesinin böyle olumsuz bir etkisi yoktur (Brushart 1999).

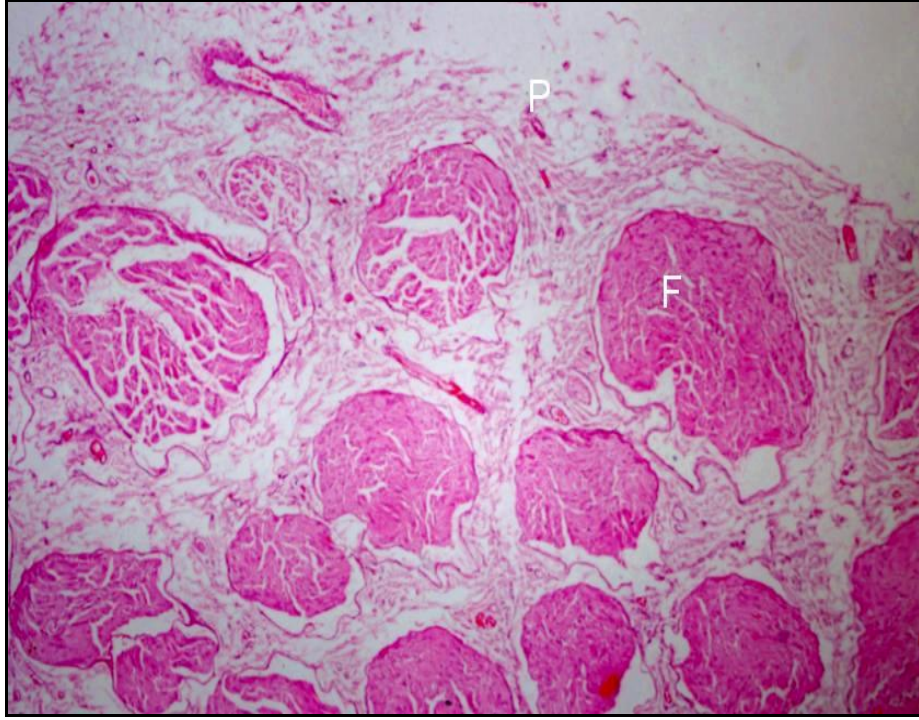
### **Perinöriyum:**

Sinir liflerinin bir araya gelmesiyle *fasikül* adı verilen yapılar meydana gelmektedir (Resim 1.1). Fasikül cerrahi olarak manipüle edilebilir en küçük sinir yapısıdır. Fasiküller sağlam bir yapıya sahip olan perinöriyum tabakası ile çevrilidir. Bu tabaka endonöriyumdan daha organizedir ve iç tabakasında çok katlı ve lamelli hücreler, dış tabakasında ise dairesel, boyuna ve çapraz paternli yoğun kollajen lifler içerir. Bir damar-sinir bariyeri olduğundan sinir lifinin iç dengesinin korunmasında çok önemli rol oynar (Burnstock ve Milner 1995, Lawrence 2000). Perinöriyum, fasikülleri hafif bir basınç altında tutar. Perinöriyum sağlam olduğu sürece sinirin elastikliği ve bütünlüğü korunur. Sinir kesildiğinde fasiküller yumuşak ve jölemsi bir doku halinde perinöriyumun ağzından taşarlar (Lawrence 2000).

### **Endonöriyum:**

Endonöriyum, her sinir lifinin bazal zarını saran hassas bir bağ dokusu tabakasıdır (Hunter ve ark 2007). Endonöriyum, akson ve bunu çevreleyen Schwann hücreleri, kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve kapiller sistemden oluşur (Mills 2007). Yapısında elastin bulunmamaktadır (Burnstock ve Milner 1995, Hunt 2002, Hunter ve ark 2007). İçerdiği uzun yerleşimli tip I kollajen sayesinde gerilmeye karşı kuvvetli bir yapı haline gelir. Sinirde bulunan endonöral damarlar, Schwann hücrelerini ve miyelini sarar. Morfolojik olarak dalgalı bir yapıya sahiptir ve bu sayede uzamaya karşı uyumludur. Endonöriyumun fibröz ve hücreli komponentleri endonöral sıvı ile çevrilidir. Endonöral sıvı basıncı, çevre doku basınçlarına göre daha yüksektir. Bu fark sayesinde aksone zarar verecek toksik maddeler uzak tutulur (Burnstock ve Milner 1995).

Bir sinir boyunca ve kişiden kişiye fasikül sayıları değişkenlik gösterir. Fasiküller bir sinir boyunca birbirine paralel uzanan bağımsız akson dizilimleri değildirler. Seyir boyunca fasiküller birbirlerine sayısız dallar ile bağlıdır ve bir tür intranöral pleksus oluştururlar. Pleksiform yapı nedeni ile bir fasikülden diğerine dallanmalar olması sonucunda, trase boyunca trunkusun içerdiği fasikül sayısı ve fasiküllerin içerdiği akson sayısı değişkenlik göstermektedir. Bu durumda sinir trasesi boyunca alınan kesitlerde farklı morfolojik yapılar görülür (Schmalbruch 1986).



**Resim 1.1.** Periferik sinir fasikül ve bağ dokusu

## 1.2. Periferik Sinir Embriyolojisi

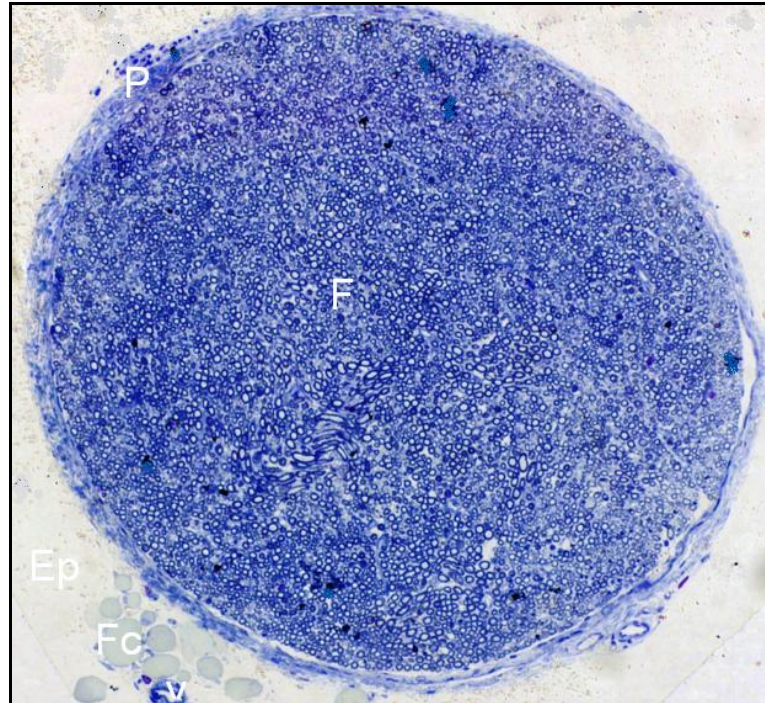
Spinal kordun ön boynuz sinir hücrelerinden köken alan motor sinir hücreleri, gelişimin 4. haftasında ortaya çıkarlar. Demetler halinde bir araya geldiklerinde *ventral sinir kökleri* adını alırlar. *Dorsal sinir kökleri* ise dorsal kök gangliyonlarındaki hücrelerden çıkan lif demetleridir. Bu gangliyonlardan çıkan merkezi çıkıntılar demetler halinde spinal kord içine doğru arka boynuzların aksi yönünde büyürler. Distal çıkıntılar, ventral sinir kökleriyle birleşerek spinal sinirleri oluştururlar. Hemen ardından spinal sinir dorsal ve ventral primer ramuslara bölünür. Ventral primer ramuslar ekstremiteleri ve vücut ön duvarını innerve ederler ve major sinir pleksuslarını oluştururlar (Song ve ark 1999).

Periferik sinir miyelinizasyonu Schwann hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Nöral krestten kaynaklanan bu hücreler, perifere doğru göç ederek aksonların çevresini sararlar ve *nörilemma* kılıfını oluştururlar. Fetal yaşamın 4. ayının başında sinir liflerinin çoğu, Schwann hücresi membranının akson üzerinde birçok defa kıvrılması sonucu oluşan miyelinin birikmesiyle beyazımsı bir görünüme bürünürler. Her ne kadar spinal kord içindeki sinir liflerinin miyelinizasyonu intrauterin yaşamın yaklaşık 4. ayında başlarsa da yüksek beyin merkezlerinden spinal korda inen motor

liflerin bazıları miyelinizasyonunu ancak postnatal birinci yaşta tamamlar (Song ve ark 1999, Kaplan ve ark 2009).

### 1.3. Sıçan Siyatik Siniri

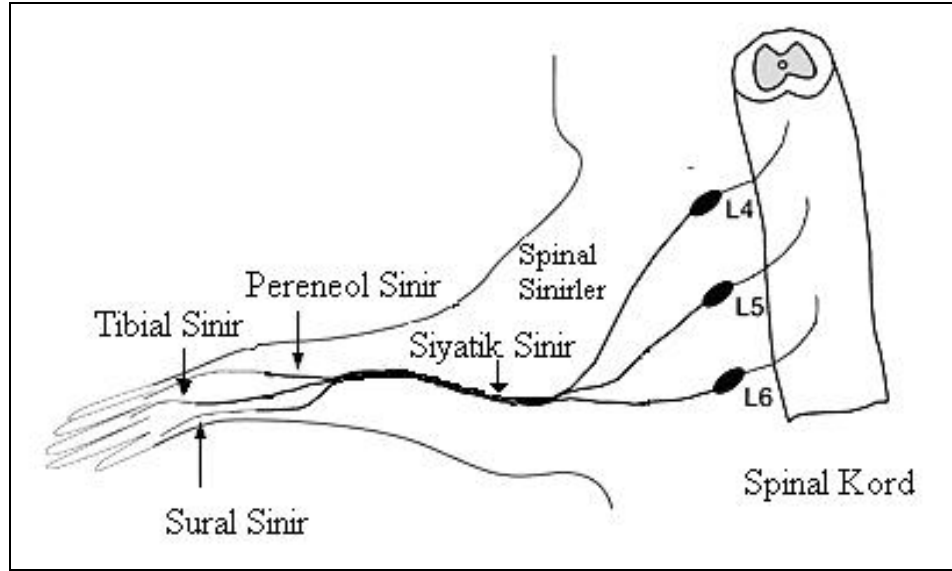
Sıçan siyatik siniri, deneysel sinir cerrahisinde ve sinir rejenerasyonu çalışmalarında en sık kullanılan sinirdir. Normal sıçan siyatik sinirinin daha çok L4, L5 ve L6'da, az bir kısmı ise L3'de bulunan toplam  $2005 \pm 89$  motor nöronu ve yaklaşık 10500 tane dorsal kök gangliyon nöronu vardır (Swett ve ark 1991). Sinirin uylukta, büyük trokanterin distalinde toplam 23700-27000 arasında aksonu bulunmaktadır. Bunların yaklaşık 7800 tanesi miyelinlidir. Miyelinli aksonlardan 4500 tanesi tibial, 1900 tanesi peroneal, 1050 tanesi sural ve 350 tanesi kutanöz sinire ait bulunmuştur. Miyelin kılıfının çapı 1,5-12,5  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir (Swett ve ark 1986). Miyelinsiz akson sayısı ise 19400'dür (Schmalbruch 1986). Siyatik sinir pelvisten çıktıktan sonra gluteal ve hamstring kaslara küçük dallar verir ve daha sonra büyük trokanter etrafında döner. Bu safhada sinir unifasikülerdir (Schmalbruch 1986) (Resim 1.2).



**Resim 1.2.** Sıçan siyatik siniri (unifasiküler)

Büyük trokanterin 3-5 mm distalinde sinirin ilerde ana dallarını bölen septum görülmeye başlanır. Hemen hemen aynı seviyede sinirin peroneal kısmından bir dal

çıkarak. Bu dal biceps femorisi ve uyluğun proksimal-lateral yüzeyinin cildini innerve eder. Bu dalı verdikten 2 cm sonra popliteal bölgede sinir 4 dala ayrılır. Sural sinir daha yüzeysel ilerleyerek bir damar eşliğinde gastrokinemius kasının dorsal yüzeyinde seyrederek. Tibial sinir popliteal fossanın derininde seyrederken gastrokinemius kasının başları arasında kaybolur ve fleksör kasları innerve eder. Peroneal sinir daha yüzeysel ve lateral seyrederek anterior kas grubunun içine girer. (Şekil 1.8). Sinirin çapı 0.9-1.1 mm arasında değişmektedir. Sıçan siyatik siniri memeli hayvanlar arasında, elektron mikroskopi düzeyinde bile insan sinir dokusundan ayırt edilemeyen hücresel detaylara sahip, ucuz ve temini kolay bir sinir dokusu kaynağıdır (Mackinnon ve ark 1985).



Şekil 1.8. Sıçan siyatik siniri ve dalları (Asato ve ark 2000)

#### 1.4. Melatonin

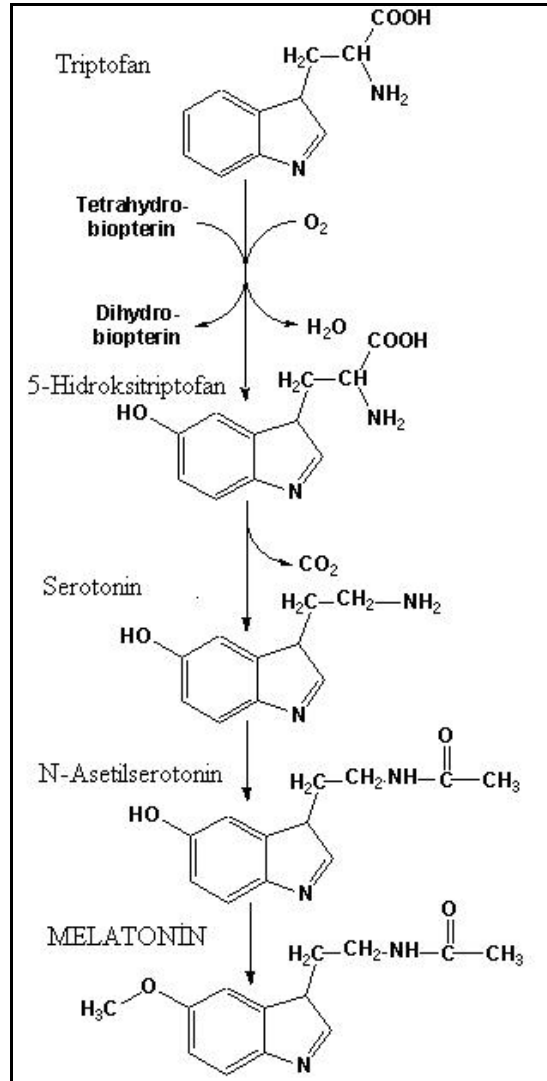
Melatonin (N-asetil 5-metoksitriptamin), doğada yaygın olarak bulunan 232 molekül ağırlığında bir moleküldür. Yunanca siyah anlamına gelen “melas” ve iş anlamına gelen “tosos” kelimelerinin birleşmesiyle bu maddeye “melatonin” adı verilmiştir. Amerikalı dermatolog Lerner ve ark (1958) tarafından kurbağa ve balıkların melanositlerinde bulunan bir renk pigmenti olarak tanımlanmış ancak daha sonra melatoninin bütün memeli hayvanlarda bulunan, pineal bezden salınan ve canlıların biyolojik ritmini düzenleyen bir hormon olduğu gösterilmiştir (Lerner ve ark 1958). 1996 yılından sonra omurgasızlar ve protozoalar da dahil olmak üzere pek çok canlının yapısında varlığı ispatlanmıştır. Birçok organizmada, bitkilerde,

omurgalı ve omurgasız türlerde bulunmaktadır. Bazı bitkilerde melatonin çok yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. İyi bir serbest radikal karşıtı ve redoks aktivitesinden sorumlu enzimler için iyi bir regülatördür. Hayvanlarda ve insanlarda önemli fizyolojik etkileri olan bir molekül olarak tanımlanır (Çam ve Erdoğan 2003). Omurgalılarda endojen melatonin çoğunlukla epifiz bezinden (pineal bezden) salgılanır (Zhdanova ve Wurtman 2005). Bunun yanı sıra diffüz nöroendokrin sistem ve hematopoetik sistem hücrelerinin (retina, kemik iliği hücreleri, trombositler, gastrointestinal sistem, cilt ve lenfositler) de önemli melatonin sentez yerleri olduğu gösterilmiştir (Pandi-Perumal 2006). Son yıllarda melatoninin uykusuzluğun ve üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde, yaşlanma sürecinin geciktirilmesinde ve serbest radikallerin toksik etkisinin önlenmesinde etkili olduğu kabul edilmiş, hatta ABD’de marketlerde düşük dozlarda reçetesiz olarak satılmaya başlanmıştır (Zhdanova ve Tucci 2003).

#### **1.4.1. Melatonin Sentez ve Metabolizması**

Melatoninin pinealositlerdeki enzimatik biyosentezi, ilk olarak Julius Axelrod tarafından bulunmuştur. Melatonin bir indolamindir (Lynch ve ark 1973, Lynch ve ark 1981). Dolaşımdan hücre içine alınan triptofan, triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksi-triptofana, bu da aromatik amino asit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) aracılığı ile 5-hidroksitriptamine (5-HT, seratonin) dönüştürülür. Seratonin, N-asetiltransferaz ve hidroksi indol O-metil transferazın birbirini takip eden aktiviteleri ile son ürün melatonine (5-metoksi-N-asetiltriptamin) dönüştürülür (Zhdanova ve Wurtman 2005, Arendt 2006) (Şekil 1.9). Pinealositlerde üretilen melatonin çok hızlı bir şekilde bu hücrelerin komşuluğunda yer alan kapillere bırakılarak sistemik kan dolaşımına karışmaktadır. Sistemik kan dolaşımı, pineal bez, serebrospinal sıvı, idrar ve hücre içindeki melatonin konsantrasyonu geceleri, gündüz ölçülen melatonin düzeyinin 10 katına kadar ulaşabilen bir artış göstermektedir. Melatonin büyük ölçüde karaciğerde hidroksilasyonla 6-hidroksimelatonin’e hızla metabolize olur. Yarılanma süresi yaklaşık 10-40 dakikadır. İnsanlarda ekzojen melatoninin 20-60 dakika ile kısa bir metabolik yarı ömrü ve büyük bir hepatik geçiş etkisi vardır (Lane ve Moss 1985). 50-100mg/kg dozlarda ölüme kadar yol açabilen komaya sebep olabilir (Amstrong ve Redman 1991). Bunun nedeni melatoninin lipofilik ve bir miktar da hidrofilik özelliği nedeniyle hücre membranını kolaylıkla geçmesi ve vücutta depolanmadan vücuttaki tüm dokulara ve sıvılara

dağılılabilmektedir. Melatonin üretildikten sonra yaklaşık 20–90 dakika civarında kan dolaşımında bulunur. Melatonin plazmada proteinlere bağlı olarak bulunur. Sudaki çözünürlüğü  $5 \times 10^{-3}$  M olarak tespit edilmiştir. Melatonin, bu özelliği sayesinde kan-beyin bariyeri gibi bütün fizyolojik bariyerleri de kolayca geçer (Zhdanova ve Wurtman 2005, Arendt 2006) . Reppert ve ark (1978) primatlarda ve ratlarda yaptıkları iki ayrı çalışmada anneye verilen melatoninin plasenta yoluyla fetüse ve anne sütü yoluyla yenidoğana geçtiğini göstermişlerdir.



**Şekil 1.9:** Melatonin sentez basamakları (Arendt 2006).

Melatoninin fizyolojik etkilerini hem özgün reseptörler aracılığıyla, hem de reseptörden bağımsız olarak gösterebildiği bildirilmiştir (Altun ve ark 2001, Bediz ve ark 2002). Son yıllarda beyinde, suprakiazmatik nukleusta ve periferik immün hücrelerde melatonine ait membran reseptörleri belirlenmiştir. İnsanda Mel-1a

(MT1), Mel-1b (MT2) ve Mel-1c (MT3) adlı üç melatonin reseptörü vardır (Poza ve ark 1994). MT1 reseptör geni insan kromozomunda 4q35.1 lokalizasyonunda kodlanmıştır. Sirkadiyen ve reproduktif etkilerinin bu reseptör aracılığı ile gerçekleştiği düşünülür. MT2 reseptör geni insan kromozomunda 11q21-22 bölgesinde kodlanmıştır. Beyin ve retina da eksprese olur ve her iki bölgede de dopaminerjik fonksiyonlar ile ilişkili olduğu düşünülür (Dubocovich ve ark 2003, Dubocovich ve Markowska 2005). cAMP üretiminin inhibisyonu melatonin reseptörlerinin genel bir özelliğidir (Weaver ve ark 1993). Melatoninin reseptörden bağımsız etkileri de vardır. Bu etkilerinde aracı olarak kalmodulin kullanılır ve  $Ca^{+2}$  ile ilişkili olan hücre içi olaylar değişikliğe uğrar (Huerto-Delgadillo ve ark 1994). Ramelteon, Agomelatine ve Tasimelteon son yıllarda geliştirilen MT1/MT2 reseptör agonistleridir. Luzindole ve Afobazole ise tanımlanmış özgün antagonistlerdir (Dubocovich ve Markowska 2005).

#### **1.4.2. Melatoninin Antioksidan Özellikleri**

Melatoninin, endojen antioksidan olduğu ilk kez Tan ve ark (1993) tarafından bildirilmiştir. Melatoninin DNA'yı serbest radikallerin hasarından koruyucu etkisi takip eden yıllarda birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Anisimov ve ark 2006). Reiter ve ark (2002), melatoninin direkt olarak serbest oksijen radikal süpürücüsü ve indirekt olarak da antioksidan etkisiyle birçok ilacın toksisitesini azalttığını bildirmişlerdir.

Melatonin oldukça etkin bir serbest radikal temizleyici antioksidandır. Mitokondrileri oksidasyon hasarından koruyabilmektedir. Serbest radikal baskılayıcı etkisi reseptör içermez (Korkmaz ve ark 2008). Bu hormonun antioksidan etkisi, diğer hidroksil radikali temizleyicileri olan glutatyondan beş, mannitolden ise onbeş kat daha güçlüdür. Melatonin, hidrojen peroksiti direk olarak ortamdaki temizler, pekçok koruyucu enzimin gen ekspresyonlarını düzenler ve lipid peroksidasyonunu azaltır. Bu hormon, hidroksili (OH) nötralize ederken kendi elektronlarından birini vererek radikale dönüşür. Toksik etkisi çok düşük olan bu radikale *indolil katyon radikali* adı verilir. İndolil oluştuktan sonra ikinci basamakta  $O_2$  (süperoksit) radikali etkisiz hale getirilir ve N-asetil 5-metoksikinüramin oluşur. Diğer tüm düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan farklı olarak birkez okside olduktan sonra indirgenmez. Bu özelliği ile molekül otooksidatif radikal oluşumu ve toksik redoks döngüsüne

karşı korunur. Melatonin antioksidan olarak nükleer DNA, membran lipidleri ve hücre içi proteinleri oksidatif hasarlara karşı korur.

Melatonin süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glukoz 6 fosfat dehidrojenaz ve nitrik oksit sentaz enzim aktivitelerinde değişikliğe neden olur (Pierrefiche ve ark 1993, Reiter ve ark 1993, Reiter ve ark 1995). Melatoninin glutatyon peroksidaz üzerine etkisi vardır. Bu enzim antioksidan savunma sisteminin bir elemanı olarak özellikle nöral dokuda önemli rol oynar. Sıçana eksojen melatonin uygulanmasına bağlı olarak beyin glutatyon peroksidaz aktivitesi 30 dakika sonra iki katına çıkar. Enzim aktivitesi ile doku melatonin konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon vardır (Barlow-Walden ve ark 1995). Melatoninin etkilediği başka bir enzim ise 5-lipooksijenaz'dır. Bu enzim allerjik olaylarda ve inflamasyon reaksiyonlarında anahtar rol oynayan lökotrienlerin sentezinde görev alır. Melatoninin 5-lipooksijenaz aktivitesini inhibe ederek enflamasyonu ve sonuçta serbest radikal hasarını azalttığı düşünülmektedir (Michiels ve ark 1994).

Melatoninin indirekt antioksidan bir madde olduğunun keşfi ve nöroprotektif etkisi, bu maddenin hem deneysel hem de klinik uygulamalarda kullanılmasının uygun olup olmayacağı konusunu gündeme getirmiştir (Reiter 1995, Reiter ve ark 1997).

### **1.4.3. Melatoninin İmmünite Üzerine Etkileri**

Melatoninin immün sistemi, özellikle hücresel bağışıklığı hem direkt hem de indirekt yollarla etkilediği ileri sürülmektedir. Melatoninin interlökin-2 ve interferon-gama gibi sitokinlerin salgısını artırarak, immün sistemin en önemli komponentlerinden olan yardımcı T lenfositlerin aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Pierpaoli 1993). Melatoninin immün sistem üzerinde bahsedilen bütün etkilerinde "çinko" temel bir aracı olarak görülmektedir (Bediz ve ark 2002). Bunun yanında özellikle kansere karşı savunmada önemli bir immün sistem hücresi olan doğal öldürücü hücrelerinde de artışa yol açtığı bildirilmiştir (Mocchegiani ve ark 1994). Ayrıca granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör'ün (GM-CSF) salgısını artırdığı, interlökin-1 (IL-1), tümör nekroze edici faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (transforming growth factor, TGF- $\beta$ ) ve kök hücre faktörü gibi sitokinlerin gen ekspresyonlarını kontrol ettiği ve immün hücrelerin apoptozisinin

güçlü bir inhibitörü olduğu ortaya konmuştur (Topal ve ark 2009). Buradan yola çıkarak melatoninin başta viral hastalıklar olmak üzere, bakteriyel enfeksiyonlar ve kanser tedavisinde kullanılabileceği önerilmektedir. Melatoninin oksiradikalleri ve peroksinitritleri engelleyerek septik şokta ve hemorajik şokta da etkili olduğu önerilmektedir (Dağlıoğlu ve ark 2009).

#### **1.4.4. İnsanda Melatonin Üretimi**

Melatonin salgılanma hızını belirleyen en önemli faktör çevrenin ışık düzeyidir. İnsanlarda melatonin normal olarak gece salgılanır. Göze gelen fotik stimülasyon sonucu retinohipotalamik traktuslar ile hipotalamustaki suprakiazmatik nükleus aktive olmaktadır. Uyarılar buradan torasik spinal kordun intermediolateral kolonuna, buradan da superior servikal gangliona ulaşır. Daha sonra postgangliyonik sinirlerle pineal beze iletilir (Zhdanova ve Wurtman 2005). Bez içindeki postgangliyonik sinir uçlarından salınan norepinefrin ile pinealosit membranındaki alfa-1 ve beta-1 adrenerjik reseptörleri uyarılarak hücre içi cAMP yapımı artar (Cavallo ve Ristchell 1996). İkinci mesajcı olarak cAMP aracılığıyla N-asetil transferaz aktivitesini artırır. Bu da melatonin yapım hızını düzenleyen N-asetil transferaz (AANAT) aktivitesini artırır. Plazma melatonin düzeyi gün içinde 30-200 pg/ml arasında değişir. Melatoninin %70'i albumine bağlı olarak bulunur. Melatoninin kandaki yarı ömrü yaklaşık 10-40 dakika civarındadır (insanda ortalama 28,4 dakika). Hormonun %90'ı karaciğerde hidrosillenir ve kandan tüm vücut sıvılarına nakledilir. Atılımı, 6-hidroksimelatonin ve kinüraminlerin glikuronid ve sülfat bileşikleri şeklinde %20 feçesle, %70 idrarla olur (Arendt 1988). Serbest melatonin halinde %1'i ve 5-metoksi indol asetik asit olarak %0,5'i geçmemek üzere idrarda bulunabilir. Başlıca metaboliti olan 6-hidroksimelatonin sülfatın (6-HMS) maksimum plazma konsantrasyonu 80-100 pg/ml arasındadır (Zhdanova ve Wurtman 2005). Plazma melatonin konsantrasyonu gece saat 02:00-04:00 arasında pik değerlerine ulaşır. Erişkinde sekresyon genelde saat 21:00-22:00 arası başlar, saat 07:00-09:00 arası sona erer. 6-HMS'nin ortaya çıkış ve pik düzeye ulaşma zamanı bu sürelerden 1-2 saat, sabah düşüşü ise 3-4 saat geç olur (Zhdanova ve Tucci 2003). Birey içerisinde değişmezliğe rağmen bireyler arasında ritmin amplitüdü açısından çok büyük bir değişkenlik vardır. Doğumdan kısa süre sonra vücut sıvılarında çok az melatonin ya da 6-HMS ölçülebilmektedir. Melatonin ritmi hayatın 6.-8. haftasında

ortaya çıkmakta (Gitto ve ark 2011) ve plazma konsantrasyonu ilerleyen yaşla hızlı artar ve ortalama 3-5 yaş civarında pike ulaşır. Artış gece daha yüksek olur ve puberteden önce belirgin bir düşüş gözlenir. Otuz - kırk yaşlarına kadar bu değerler rölatif olarak değişmeden kalır ve ileri yaşlarda amplitüdde nihai bir düşüş olur (Iguchi ve ark 1982).

Çocuklarda ve ergenlerde görülen noktürnal melatonin düşüşünün vücut ağırlığıyla ve vücut yüzey alanı ile korelasyon içinde olduğu fakat daha ileri yaşlarda bu korelasyonun devam etmediği saptanmıştır (Waldhauser ve ark 1988). İleri yaşlardaki düşüşün diğer faktörlere bağlı olduğu düşünülmüştür (Reiter 1994).

#### **1.4.5. Klinikte İlaç Olarak Melatonin Kullanımı**

Melatonin, Amerikan İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration) tarafından vitamin ve takviye olarak kullanılan (supplements) ilaçlar grubu içinde sınıflanmaktadır (Lee ve Dugoua 2011). Türkiye'de ise henüz ruhsat almamıştır. Salınımı sirkadiyen varyasyon gösterdiğinden, ilaç olarak günün hangi saatinde kullanılacağı önem taşımaktadır. Melatoninin literatürde, yüksek doz olarak bilinen farmakolojik dozlarda (100 µg/kg) ve düşük doz olarak bilinen fizyolojik dozlarda (0,1 µg/kg) iki farklı etki mekanizması ortaya çıkmaktadır. Farmakolojik dozda (yüksek dozda) antioksidan etki, fizyolojik dozda (düşük dozda) ise periferik kan akımını artırıcı etkisi görülmektedir (Tan ve ark 1993, Altun ve ark 2002).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda melatonine ait olduğu gösterilen ya da düşünülen fonksiyonlar şu şekilde sıralanabilir:

- Melatoninin insan dışındaki memelilerde mevsimsel üreme fizyolojisi üzerinde etkin olduğu görülmüştür (Cagnacci ve Volpe 1996).
- Salgılanmasındaki sirküler ritimden dolayı bu pineal hormon suprakiazmatik nükleus üzerine etki ederek 24 saatlik siklusların düzenlenmesinde rol oynar. Melatoninin uyutucu etkisi ve uzun uçak yolculuklarının yarattığı fizyolojik düzensizliğin tedavisinde kullanılması biyolojik saat olarak da tanımlanan suprakiazmatik nükleusla etkileşiminin bir sonucudur (Underwood 1990).
- Potansiyel antikanser bir madde olduğuna inanılmaktadır (Vijayalaxmi ve ark 2002).

- Antioksidan aktivitesi oldukça önemlidir (Tan ve ark 1993, Hardeland 2005) .
- Rejenerasyonu stimüle edici, osteoblastik aktiviteyi hızlandırıcı ve anti epileptik etkileri vardır (Sirotkin ve Schaeffer 1997).
- İnsanda melatonin düzeylerinin yüksekliği, vücut ısısında azalma (hipotermi), artmış ısı kaybı, azalmış kalp debisi ve artmış immün duyarlılık ile birlikte dir (Altun ve ark 2002).

#### **1.4.6. Melatoninin Periferik Sinir Üzerine Etkisi**

Çok sayıdaki çalışmada, melatoninin nöroprotektif etkisi olduğu ve sinir rejenerasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Odacı ve Kaplan 2009, Kaplan ve ark 2011). Melatonin, her şeyden önce hem merkezi hem de periferik sinir sisteminde antioksidan etki gösterir. Tan ve ark (1993) serbest radikaller aracılığı ile DNA üzerinde oluşturulan hasarın, Chen ve ark (1995) ise in vitro olarak retinal lipid peroksidasyonunun melatoninin antioksidan etkisi ile doz bağımlı olarak engellendiğini göstermişlerdir. Nöral dokuda antioksidan savunma sisteminin çok önemli bir elemanı olan glutatyon peroksidaz enzimi melatonin tarafından stimüle edilir (Hardeland 2005). Reiter ve ark (2000) çalışmalarında melatoninin nöral dokuda glutatyon peroksidazı belirgin olarak arttırdığını ve glutatyon peroksidazın da hidrojen peroksidi suya metabolize ederek hidroksi radikal formasyonunun oluşmasını engellediğini göstermişlerdir. Kaptanoğlu ve ark (2000), spinal kord yaralanması modelinde melatoninin antioksidan etkisini ve melatoninin nöronlarda intrasitoplazmik ödemi azalttığını göstermişlerdir. Melatoninin miyelin üzerindeki koruyucu etkisinin dışında nüklear, aksonal ve mitokondrial korumada da iyi olduğunu bildirmişler, ayrıca melatoninin nöron koruyucu etkisinin zedelenmeden bir saat sonraya göre 48 saatte daha belirgin olduğunu işaret etmişlerdir.

Melatonin periferik sinirlerde görülebilen elektrofizyolojik dejenerasyonu azaltmaktadır. Overektomili ratlarda melatonin uygulanmasının periferik sinir fonksiyonuna olan etkisinin incelendiği çalışmada, ortalama distal latensler melatonin ile tedavi edilmiş grupta kontrol grubuna göre daha kısa bulunurken, sinir iletim hızları melatonin ile tedavi edilmiş gruplarda anlamlı olarak daha büyük bulunmuştur (Ek ve ark 2007). Yazarlar bu verilerden yola çıkarak postmenapozal periferik sinir dejenerasyonunun tedavisinde melatoninin yeri olabileceğini savunmaktadırlar.

Sinir hasarı sonrası melatonin uygulanmasının çeşitli katmanlarda faydası olduğu gösterilmiştir. Sıçan siyatik sinirinde sütürle onarım sonrası eksojen olarak verilen melatoninin sinir onarım bölgesinde nöroma oluşumunu ve kollajen birikimini azalttığı ve sinir rejenerasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Turgut ve ark 2005, 2007). Siyatik sinirde anastomoz bölgesinde transforming büyüme faktörü (TGF-1) ve temel fibroblast büyüme faktörü'nün (bFGF) immunohistokimyasal profili incelendiğinde; pinealektomili ratlarda TGF-1 ve bFGF ekspresyonu artmakta iken, melatonin uygulandığında bu faktörlerin miktarının azaldığı görülmektedir. TGF ve bFGF maddelerinin fibroblastlar ve Schwann hücreleri tarafından kollajen üretiminde önemli rol oynadığı dikkate alınır, melatoninin sinir bölgesinde nasıl nöroma oluşumunu azalttığı açıklanabilmektedir. Shokouhi ve ark (2008) künt siyatik sinir hasarı sonrası, lipid peroksidasyonu ve sinir lifi hasarında melatoninin düşük doz (10 mg/kg) ve yüksek dozlardaki (50 mg/kg) nöroprotektif etkisini araştırdıkları çalışmalarında, düşük doz melatoninin de faydası olmakla birlikte esasen yüksek doz melatonin ile ultrastrüktürel değişikliklerin tamamına yakın nötralize olduğunu göstermişlerdir. Fujimoto ve ark (2000) spinal kord travmasında, melatoninin lipid peroksidasyonu üzerine etkisini incelemişler ve melatoninin spinal kord hasarından koruyucu etkisini göstermişlerdir.

Yenidoğan sıçan motor nöronları siyatik sinir kesilerine çok hassastırlar. Memelilerin periferik ve santral sinir sisteminde, sinir hasarını takiben nitrik oksit sentaz (NOS) eksprese olur. Normalde nöronlar NOS aktivitesinden yoksundur, muhtemelen sinir hasarını takiben NOS aktivitesi ortaya çıkmaktadır (Chang ve ark 2000). Yenidoğan sıçanlarda siyatik sinir kesisi sonrasında motor nöron ölümünün NOS'un bir izoformu olan nöronal NOS (nNOS) aracılığıyla olduğu öne sürülmektedir (Pozo ve ark 1994, Ando ve ark 1996). Yaralanmanın indüklediği NOS enziminin ekspresyonu, nitrik oksit seviyesinin nörotoksik düzeylere çıkmasına neden olmaktadır (Yu 1997, Estevez ve ark 1998). Son zamanlarda, spinal motor nöronlarda aksonal hasar sonrasında antioksidan ajan ve nNOS inhibitörü olarak melatoninin kullanılması önerilmektedir (Rogerio ve ark 2002). Melatonin santral sinir sisteminde reaktif oksijen radikallerinin zararlı etkilerini, serbest radikal temizleyici etkisi ve NOS aktivitesini azaltıcı etkisi ile ortadan kaldırmaktadır (Reiter ve ark 2000).

Melatoninin NO'in dahil olduğu oksidatif hasarın azalmasında etkin olduğundan yola çıkarak Chang ve ark (2000) hipoglossal sinirin periferik dalını kestikten sonra melatoninin nöroprotektif etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmanın verilerine göre, melatonin hipoglossal motor nöronlarda hasarın indüklediği NADPH-d ve nöronal NOS ekspresyonunu etkili bir şekilde azaltmaktadır. Yazarlar periferik sinir injurisi sonrası meydana gelen oksidatif stresin azaltılmasında melatoninin etkili olduğu ve rejenerasyon üzerine olumlu yönde etki edebileceği sonucuna vardılar. Chang ve ark (2008) daha sonra, periferik sinir injurisi sonrası superoksit dismutaz (SOD) aktivitesini korumada melatoninin olası katkılarını inceledikleri çalışmalarını yayınladılar. Bu çalışmalarında yazarlar hipoglossal sinir kesisine maruz bıraktıkları erişkin sıçanlara daha sonra intraperitoneal melatonin enjeksiyonu gerçekleştirdiler. Çalışmalarının verileri doğrultusunda melatoninin SOD aktivitesini korumada ve böylece periferik sinir injurisine bağlı oksidatif hasarın azaltılmasında etkili bir tedavi yöntemi olduğu sonucuna vardılar.

Reiter (1998) melatoninin hem santral sinir sisteminde, hem de periferik aksonotomi sonrası periferik sinir sisteminde apoptotik nöronal hücre ölümünü azalttığını göstermiştir. Optik sinirin gözün posterior kutbunda kesilmesi beyin ödemi, sekonder iskemi ve lokal kanama olmaksızın nöronal dejenerasyona neden olmaktadır. Erişkin hayvanlarda optik sinir aksonlarının hücre cismine yakın yerden kesilmesi, retinal gangliyon hücrelerinin (RGH) ölümüne apoptotik süreçle neden olmaktadır (Garcia-Valenzuela ve ark 1994). Apoptotik süreç kaspaz-3 aktivasyonu ile ilişkilidir (Isenmann ve ark 1997, Kermer ve ark 1998). Deneysel çalışmalarda RGH aksotomi modeli, CNS nöronlarının dejenerasyon mekanizmasını ve nöroprotektif maddelerin etkisini incelemek için sıklıkla kullanılır. Kılıç ve ark (2002) pinealektomi sonrası optik sinir kesisi meydana getirdikleri ratlarda retrograd RHG dejenerasyonunda intraperitoneal melatoninin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada pinealektomili grupta RGH sayısı anlamlı derecede daha az iken, pinealektominin bu olumsuz etkisi melatonin uygulaması ile geri dönmektedir. Diğer taraftan melatonin uygulaması pinealektomi olmamış grupta RGH sayısında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Yazarlar endojen melatoninin santral sinir sisteminde nöronların geç dönemde dejenerasyonunu önlediği ve melatonin eksikliğinde de eksojen melatoninin nöronları koruyucu etkisi olabileceği sonucuna ulaşmaktadırlar.

Periferik sinirlerde iskemi reperfüzyon (I/R) hasarı çeşitli çalışmalar ile incelenmiş bir konudur. I/R çeşitli klinik durumlarda sık karşılaşılan ciddi bir sorun olup endonöral ödem, segmental demiyelizasyon, aksonal dejenerasyon ve sinir lifi kaybı ile sonuçlanabilmektedir (Bağdatoğlu ve ark 2002). Diğer dokulardaki I/R ihhasarında ortaya çıkan değişikliklere karşı melatoninin etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Cervantes ve ark 2008, Genade ve ark 2008, Kim ve Lee 2008, Nagai ve ark 2008). Periferik sinirlerdeki I/R hasarında melatoninin etkisi ise Sayan ve ark (2004) tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada siyatik sinirde 2 saat iskemiye takiben 3 saatlik reperfüzyonda melatoninin koruyucu etkileri araştırılmış ve hem önceden melatonin uygulanmasının hem de hasar sonrası melatonin uygulamasının I/R hasarı etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Vakuolizasyon ve lamellar ayrışma daha az görülmüş, miyelin yıkımı azalmıştır.

### **1.5. Non-Steroidale Anti İnflamatuar İlaçlar**

Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkili NSAİ ilaçlar, gastrointestinal hasar ve trombosit disfonksiyonu gibi çok bilinen iki önemli yan etkisi bulunmasına rağmen yıllardır ağrı, ateş ve inflamasyon tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Hem farmakolojik etkileri, hem de yapıları açısından steroid yapıda olmamaları nedeniyle non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar olarak adlandırılırlar. NSAİ ilaçlar prostaglandin (PG) sentezini önleyerek inflamasyonu azaltırlar, ateş yükselmesine engel olurlar ve ağrı kesici etki gösterirler. PG vücudun her organ ve sisteminde bulunan ve hem normal hem de patolojik fonksiyonlara katılan önemli birer kimyasal mediatördürler. Enflamasyon sırasında PG oluşumu önemli rol oynar.

Çoğu NSAİ ilaç zayıf asidiktir ve pKa'ları 3-5 aralığındadır. Mide ve bağırsak mukozasından iyi emilirler. Plazma proteinlerine çok yüksek oranda bağlanırlar (tipik olarak >95%). Genellikle albümine bağlanarak taşınırlar, bu nedenle dağılım hacimleri plazma hacmine çok yakın değerdedir. NSAİ ilaçlar karaciğerde oksidasyon ve konjugasyon ile inaktif metabolitlerine metabolize olurlar ve tipik olarak idrarla atılırlar. Hastalık durumlarında metabolizma anormalleşebilir ve normal dozda dahi vücutta birikim olabilir.

NSAİ ilaçlar kimyasal yapılarına göre dokuz gruba ayrılırlar:

1. Salisilatlar (aspirin ve sodyum salisilat)
2. Para-aminofenol türevleri (parasetamol)
3. Pirazolon türevi ilaçlar (aminopirin, propifenazon, dipiron, fenilbutazon, oksifenbutazon)
4. Profenler (ibuprofen, naproksen, fenbufen, tiaprofenik asit, ketoprofen, fenoprofen kalsiyum)
5. Fenilasetik asit türevleri (diklofenak sodyum, nabumeton)
6. İndolasetik asit türevleri (indometasin, tolmetin, ketorolak trometamin, sulindak)
7. Fenamik asit türevleri (mefenamik asit, flufenamik asit, etofenamit, sodyum meklofenamat)
8. Oksikamlar (piroksikam, tenoksikam)
9. Diğerleri (Prokuazon, Azopropazon, metotrimeprazin) (Kayaalp 1995).

### **1.5.1. COX izoformları**

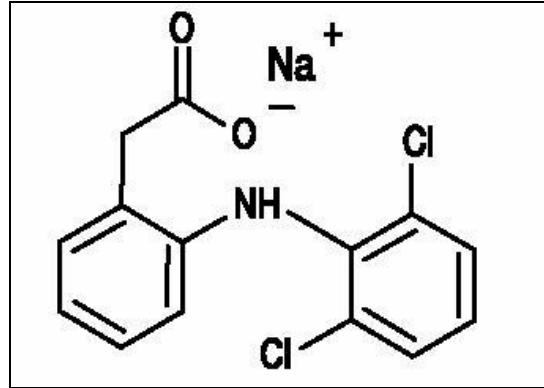
İlk defa Vane (1971) NSAİ ilaçların teröpatik etki ve toksisitesinin PG sentezinin ilk basamağı olan siklooksijenaz (COX) enziminin inhibisyonu yolu ile olduğunu öne sürmüştür . Bundan yaklaşık 20 yıl sonra da iki COX izoformu olduğu saptanmıştır. 1991 yılında çeşitli çalışmalar ile iki gen tarafından kodlanan iki ayrı COX izoformu (COX-1 ve COX-2) olduğu doğrulanmıştır (Kujubu ve ark 1991, Dinchuk ve ark 1995).

Fosfolipaz A<sub>2</sub> ile membran fosfolipidleri araşidonik aside (AA) parçalanırlar. Araşidonik asit ise COX ve lipooksijenaz enzim aktiviteleri ile PG ya da lökotrienlere dönüşür. COX, AA'ten tromboksan ve PG yapımında katalizör görevi görür.

COX-1 birçok organ ve hücrede yapısal olarak bulunur ve gastrik mukozal savunma, trombosit agregasyonu gibi fizyolojik fonksiyonları düzenleyen PG'leri sentezler. COX-2 ise bazı dokularda yapısal olarak bulunmasına karşın COX-1'den farklı olarak bakteriyel endotoksinler, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından indüklenerek pro-inflamatuar PG'lerin sentezini katalize eder. COX-1 ve COX-2 knock-out farelerde ve bu enzimlerin spesifik inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda her iki enzimin fizyolojik fonksiyonlardaki rollerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Bazı fonksiyonlarda her bir izoform ayrı ayrı yer alır. Trombosit agregasyonunda yer alan tromboksan A<sub>2</sub>'nin sentezi sadece COX-1 aracılığı ile olabilmektedir. COX-1 knock-out farelerde araşidonik asit (AA) ile agregasyon oluşmaması, COX-2'nin bu olayda COX-1'in eksikliğini kompanse edemediğini gösterir (Langenbach 1995). Ovulasyon için ise COX-2 enzimi gerekli olup, COX-2 eksik olan farelerin infertil oldukları gözlenmiştir (Dinchuk ve ark 1995). Karsinogenez ve inflamasyonda her iki enzim koordine şekilde fonksiyon gösterirken, doğum ve duktus arteriyozusun remodelingi sırasında birbirlerinin eksikliklerini kompanse edebilirler. COX-3 ise COX-1'in varyantı olup bazı kaynaklarda COX-1b olarak adlandırılmaktadır. NSAİ ilaçlar COX-1 ve COX-2 izoenzimlerinin her ikisini de inhibe ederler.

Diklofenak (2,6-dikloranilino fenil asetik asit) bir NSAİ ilaç olup düşük moleküler ağırlığı ile karakterizedir ve genelde sodyum (Na) tuzu ile birlikte sunulur (Şekil 1.10).



Şekil 1.10: DS moleküler yapısı

Diklofenak Sodyum (DS) COX-2 enzimi üzerine daha yüksek spesifiklik göstermesinden dolayı 1980'lerin başından beri sıklıkla kullanılmaktadır. DS, piyasada Voltaren®, Diklomec®, Dikloron®, Cataflam® ve Miyadren® gibi ticari adlar ile enflamasyonu azaltmak ve ağrıyı dindirmek için kullanılan bir ilaçtır. DS'un insan plasentasından birinci ve ikinci trimesterde fetusa geçtiği gösterilmiştir (Ostensen 1998). Yarı ömrü 2-3 saat kadar kısa bir süredir.

### 1.5.2. NSAİ İlaçların Gebelikte Kullanımı

NSAİ ilaçların sık kullanım alanlarından biri de kadın doğum hastalıklarıdır. Özellikle erken doğumu, semptomatik polihidroamniyozu ve preeklampsiyi

önlemede, primer dismenorede, rahim içi araçlardan doğan dismenore ve menorajileri tedavi etmekte kullanılmaktadır (Schoenfeld ve ark 1992, Simon 1994, Gökçimen ve ark 2003). Kadınlardaki bu sık kullanım alanları nedeniyle bu ilaçların fetal fizyolojiyi ne şekilde etkilediği önem kazanmaktadır. NSAİ ilaçlar, plasenta engelini geçip fetal dolaşıma girerek toksik etkilerini çeşitli organ ve dokularda gösterirler.

### **1.5.3. Gebelikte Kullanılan NSAİ İlaçların Yan Etkileri**

NSAİ ilaçların gebelikte uzun süreli kullanımının fetüste ve yeni doğanda bildirilmiş yan etkileri:

- duktus arteriosus konstrüksiyonu
- renal disfonksiyon
- oligohidroamnios
- hidrops fetalis
- ileal perforasyon
- beyinde kistik lezyonlar
- karaciğerde parankimal dejenerasyon
- kaburga deformiteleri

NSAİ ilaçların gebelikte uzun süreli kullanımının gebelerde bildirilmiş etkileri:

- gebelik süresinin uzaması
- doğum eyleminin uzaması
- servikal heparan sülfat düzeyinin azalması
- blastosist implantasyonunun engellenmesi (Momma ve ark 1984, Vermillion ve ark 1997, Gökçimen ve ark 2001, Cook ve ark 2003).

### **1.5.4. NSAİ İlaçların Periferik Sinirler Üzerine Etkileri**

NSAİ ilaçların periferik sinirlerde lokal etkilerinin olduğu ve bazı koşullarda sinir liflerinin ortalama impuls sıklığını azalttıkları gösterilmiştir (Acosta ve ark

2007). NSAİ ilaçların gelişmekte olan periferik sinir sistemi üzerine olan etkileri çok az bilinmektedir. Canan ve ark (2008) yaptıkları çalışmada, gebelik sürecinde hamile sıçanlara 15 gün boyunca uygulanan DS'un yenidoğan sıçanların en büyük periferik siniri olan siyatik sinirin morfolojisi üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermişlerdir. Bu etkiler azalmış akson sayısı ve daha küçük akson çapı olarak bildirilmektedir. Bu çalışma, prenatal DS maruziyetinin santral sinir sistemi üzerinde görülen olumsuz yan etkilerini inceleyen diğer çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir (Gökçimen ve ark 2007, Rağbetli ve ark 2007, Özyurt ve ark 2011). Bu etkileri açıklamak için öne sürülen hipoteze göre NSAİ ilaçlar omurilikte ve dorsal gangliyonda hücre siklus regülatörlerini etkileyerek hücre proliferasyonunu süprese etmektedirler. Yapılan diğer çalışmalar ile DS'un NSC'in nörona farklılaşmasını sınırladığı ve apoptozisi indükleyerek hücre proliferasyonunu baskıladıkları gösterilmiştir (Andreasson ve ark 2001, Kudo ve ark 2003).

## **1.6. Stereoloji**

Stereoloji, yapılardan elde edilen görüntülerden onların özelliklerini bulmayı sağlayan bir yöntem bilimidir. Histolojik kesitlerin mikroskop altında izlenebilen ya da bu kesitlerden değişik şekillerde elde edilen görüntülerinden o yapılar hakkında güvenilir veriler elde etmek için kullanılan bir dizi yöntemi içerir. Bu yöntemlerle yapıların iki boyutlu görüntülerinden yola çıkılarak; hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi üç boyutlu geometrik özellikleri hakkında önemli sayısal değerlere ulaşılabilmektedir. Biyolojik yapılarla ilgili çalışmalarda, sayısal verilerin önemi büyüktür (Canan ve ark 2002). Özellikle hücre, çekirdek, mitokondri gibi doku bileşenlerinin sayısı, karşılaştırmalı çalışmalar, toksikoloji ve gelişim biyolojisi başta olmak üzere, yapısal nicelik ile fonksiyon arasındaki ilişkilerin incelendiği tüm dallarda önemli veriler sağlar (Gundersen 1986).

1984 yılında Sterio tarafından, stereolojik yöntemlerden disektör yöntemi bulunmuş ve önceki yöntemlere ek olarak daha tarafsız ve etkin sayım yöntemi olarak tanımlanmıştır. Böylece mikroskopik çalışmalarda yeni bir dönem başlamıştır. Stereolojik metotların sağladığı avantaj kısa zamanda, güvenilir ve doğru ölçümler yapmayı mümkün kılmaktır.

Bir yapının veya organın hacim ve yüzey alanı gibi değerlerinin hesaplanması, yapı içerisinde bulunan farklı bileşenlerin birbirlerine göre hacim, uzunluk ve alan gibi yoğunluklarının bulunması ve bir yapıdaki toplam tanecik (hücre vb) sayısının ortaya çıkarılması gibi çalışmalar morfometrinin önemli konularını oluştururlar. Biyolojik yapılara ilişkin bu tip sayısal verilerin elde edilmesinde kullanılacak birçok yöntemin var olması, bu yöntemler arasından en uygun ve güvenilir olanının seçilmesi sorununu da beraberinde getirmektedir. Önemli olan, herhangi bir niceliği hesaplar veya ölçerken, yapıdan mümkün olduğunca tarafsız (yani gerçek değerden sistematik bir sapma göstermeyen) sonuçların elde edilmesini sağlayabilecek bir yöntemin tercih edilmesidir. Stereolojik yöntemlerin birçoğu, ilgilenilen yapının sistematik-tekdüze-rastgele olarak elde edilmiş örnekleri üzerinde ölçümler yaparak, o yapıdaki söz konusu sayısal niceliğin belli ve istatistiksel olarak kabul edilebilir bir hata payı dahilinde hesaplanmasına dayanır (Ünal ve ark 2002). Çoğu zaman, çalışılan yapılarda ilgilenilen nicelik (örneğin bir organdaki hücre sayısı) büyük olduğundan, belli oranda bir örnekleme yapmak kaçınılmazdır. Bu örnekleme sonucunda elde edilecek verilerin güvenilirliği ise, pratikte geçilen uygulama aşamalarında gösterilecek özenle doğrudan ilişkilidir. Birçok durumda makroskobik bir yapının paralel dilim veya kesitlere ayrılması, bu kesitlerin mikroskopta incelenmesi, bu inceleme sırasında belli büyüklükte adımlamalarla ilgilenilen doku bileşenlerinin taranması ve mikroskop görüntü alanlarında büyüklüğü belli olan örnekleme alanlarının belirlenmesi, bu alanların ardışık görüntü alanları boyunca karşılaştırılması ve kesit kalınlığının ölçülmesi gibi dikkat gerektiren basamaklar karşımıza çıkar. Bu basamakları dikkatli ve kurallara uygun bir biçimde gerçekleştirdiğimiz takdirde, güvenilir sonuçlara ulaşmamız için herhangi bir neden kalmaz. Makroskobik örnekleri mikroskop altında inceleyebilmek için çoğunlukla bu parçalardan küçük örnekler almak gerekir. Örnekler, inceleme amacına uygun büyüklüklerde alındıklarında tüm yapının ancak çok küçük bir miktarını temsil edebilirler. Stereolojik yöntemlerin birçoğunda, eğer alınan örnekler sistematik rastgele örnekleme kurallarına göre elde edilmişse, ana yapının bu şekilde seçilmiş çok küçük parçalarından istenilen niceliğin güvenilir bir hesaplamasını elde etmek mümkün olabilmektedir. Hacim hesaplaması için kullanılan Cavalieri yöntemi ve fiziksel parçalama gibi bazı hesaplama yöntemleri için, makroskobik bir organı çoğu kez paralel dilimlere ayırmamız gerekmektedir. Cavalieri metodu, canlı organizmalarda

ilgilenilen herhangi bir yapı ya da organın hacminin hesaplanması amacıyla son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış bir yöntemdir (Odacı ve ark 2005). Bu yöntem ile önce hacmi hesaplanacak yapı dilimlere ayrılır (dilimleme işlemi manyetik rezonans görüntüleme veya bilgisayarlı tomografi ile de yapılabilir), her bir dilimin kesit yüzey alanı bulunup kesit kalınlığı ile çarpılarak ilgili dilimin hacmi hesaplanır ve nihayet dilimlerin hacimleri toplanarak ilgilenilen yapının toplam hacmi hesaplanır.

Stereolojik metotların temelini “Sistemik Rastgele Örneklem” stratejisi oluşturmaktadır. Bu örneklem biçiminin temel özelliği, çalışılacak olan yapıdan örnekler alınması gerektiği durumlarda, yapının her noktasının eşit örneklenme şansına sahip olmasının sağlanmasıdır. Biyolojik yapılar, genellikle içerdikleri ve araştırmacı için inceleme konusu olan bileşenlerine göre (hücre, çekirdek, vezikül vb) çok büyük olduklarından, yapıdan elde edilen tüm kesitlerin çalışmaya dahil edilerek değerlendirilmesi pratik olarak imkansızdır. Örneğin, insan neokorteksindeki toplam nöron sayısını tespit etmeye yönelik bir çalışma için, çalışılacak beyinlerden alınacak onbinlerce histolojik kesit tek tek incelenemez. Bu durumda elde edilecek muhtemel örnekler (kesitler) arasından belli oranlarda bir seçim yapılması gerekecektir. Bu seçim yapılırken, seçilen örneklerin söz konusu yapıyı en iyi biçimde temsil edebilmesi için yapının her bir noktasının eşit örneklenme şansına sahip olması istatistiksel bir zorunluluktur. Bu şartı sağlamak üzere, rastgele seçimler yapmak da tam olarak sorunu çözememektedir. Sistemik rastgele örneklemenin önemi burada ortaya çıkmaktadır. Sistemik rastgele örneklem, önceden belirlenmiş sabit bir örneklem aralığı boyunca, ilk aralık içinden rastgele bir noktadan başlanarak suretiyle, ilgilenilen yapının tamamının örneklenmesini içerir. Önceden belirlenen örneklem aralığı (örneğin her onuncu kesiti veya parçayı seçmeye karar verildiğinde ilk on kesitlik seri) örneklemenin sistemik kısmını, ilk aralık içinde rastgele bir noktadan başlanması (örneğin ilk on kesit içinden herhangi birinin başlangıç olarak seçilerek, bu kesitten sonra gelen her onuncu kesitin örnek olarak seçilmesi) ise örneklemenin rastgelelik özelliğini sağlar. İstatistiksel bakış açısıyla, bu tip bir örneklem, ne kadar çok örnek üzerinde uygulanırsa, yapının her noktasına eşit örneklem şansı tanıdığı için, homojen ve verimli bir örneklem elde etme şansı da o kadar artar (Geuna 2000).

Stereolojik analizlerle uğraşırken, genellikle sayım yapmak için kullanılan büyük büyütmelelerde, çalışılan alan üzerindeki lokalizasyonun kaybedilmesi ya da görüntü alanlarını adım adım tararken, uygun bir yöntemle tam belirlenen adım aralığı kadar ilerlenmesindeki zorluklar önemli problemler olarak ortaya çıkar. Bunun yanında, ölçümlerde kullanılan çeşitli ölçüm cetvelleri (tarafsız sayım çerçeveleri, çizgi ya da sikloid cetveller gibi) ve bunların boyutları da rutin olarak stereoloji çalışılan laboratuarlarda üzerine zaman harcanmasını gerektirecek ve dikkatli olunmadığında hatalara neden olabilecek bir husustur. Stereolojik görüntü analiz sistemi paketleri, bu gibi gereklilikleri bir dizi donanım ve bilgisayar kontrolü sayesinde otomatikleştirerek, zamandan önemli ölçüde tasarruf sağlarken işlemlerin mümkün olan en doğru şekilde yapılmasına imkân verirler. Stereolojik analiz sistemlerin en çekici özelliği, bilgisayar için oldukça uygun bir iş olan rasgele alanlar belirleme, bu alanlarda adımlar boyu ilerleme, veri depolama ve analiz etme, görüntü alma, işleme gibi zaman alıcı işleri, bilgisayar hızıyla otomatize etmeleridir (Canan ve ark 2004).

### **1.7. Amaç**

Gebelik döneminde sıklıkla kullanılan bir NSAİ ilaç olan DS'un gebelik sürecinde kullanımının yenidoğan sıçanların periferik sinirlerinde meydana getirdiği olumsuz etkilerin, eş zamanlı olarak verilen melatoninin antioksidan ve nöroprotektif etkisinden dolayı azalıp azalmadığını sıçan modelinde deneysel olarak saptamak ve olası tedavi edici etkisiyle klinikte kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Deney Hayvanlarının Seçilmesi ve Çiftleştirilmesi

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (SÜDAM) Hayvan Etik Kurulu'nun 17/07/2009 tarihli ve 2009/42 sayılı izni ile planlandı. Çalışmada "Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi İlkeleri"ne uyuldu. Bu çalışma, T.C. Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 10102002 proje numarası ile desteklendi.

Deney hayvanlarının seçimi, gebe bırakılma ve gebelik sonrası bakım şekli, enjeksiyon yapılış biçimi ve saati, doğumdan sonra yavruların bakımı ve grupların oluşturulması, 4 ve 20 haftalık grupların oluşturulması, bu süreler sonunda uygulanan anestezi ve sakrifikasyon yöntemi, histolojik protokol ve devamında yapılan ölçümler birçok çalışmada aynı şekilde uygulanmıştır.

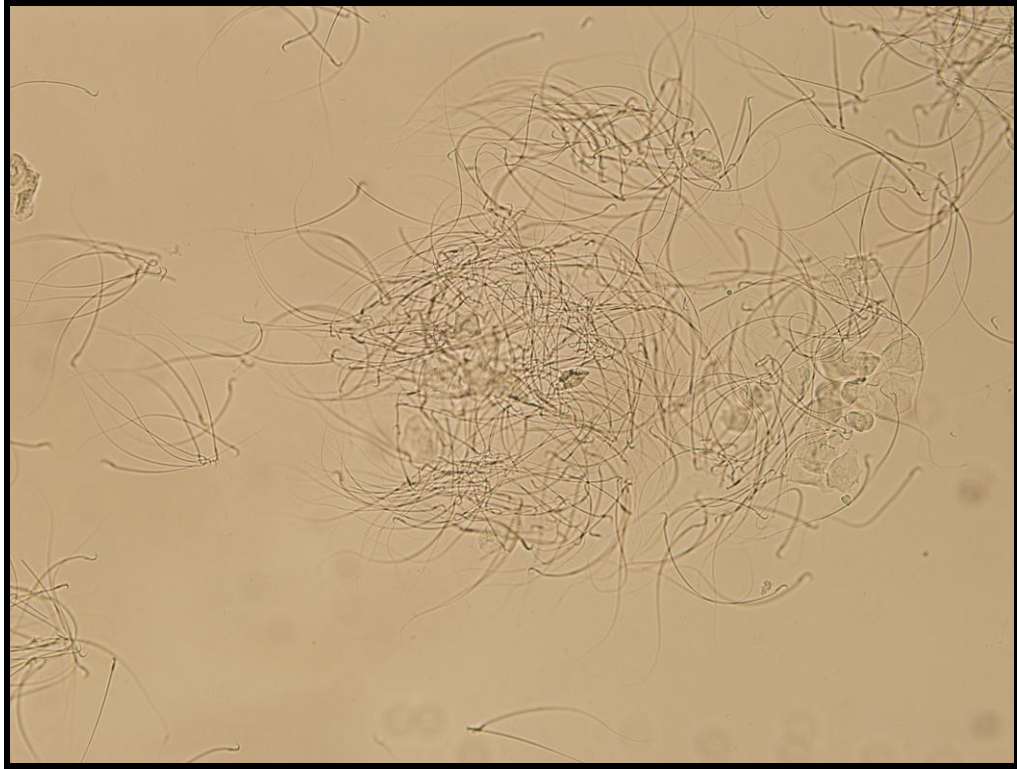
SÜDAM'da gerçekleştirilen bu çalışmada aynı merkezde üretilen biyolojik ve fizyolojik özellikleri aynı, ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen, 140 adet erişkin dişi Wistar Albino sıçan (*Rattus Norvegicus*) her dört dişi sıçana bir erkek sıçan düşecek şekilde bir gece aynı kafeste tutularak çiftleşmeleri sağlandı (Resim 2.1). Çiftleşmenin ardından ertesi sabah vajinal plak bulunan ve yapılan vajinal smearda sperm gözlenen dişi sıçanlar gebe kabul edildi (Resim 2.2). Vajinal smear için bir pastör pipetine 0,5 ml SF çekildi ve yardımcı bir kişi tarafından dişi sıçan karnı yukarı bakacak şekilde sıkıca tutuldu. Bazı dişi sıçanlarda vajinal plak gözlendi ve gebe kabul edildi. Vajinal plak gözlenmeyen dişi sıçanlarda pipet ucu vajinaya yerleştirildi ve serum fizyolojik içeriye püskürtüldü. Pipet ucu dışarı çıkartılmadan püskürtülen sıvı negatif basınçla tekrar pipet içine çekildi. Alınan sıvı temiz bir lamın üzerine alınıp boyama işlemi yapılmaksızın doğrudan lamelle kapatılarak mikroskop altında incelendi. Hamile kabul edilen 84 dişi sıçan standart kafeslere alınarak ad libitumda bakıldı.

Hayvanların preoperatif ve postoperatif bakımları da aynı merkez tarafından yapıldı. Deney hayvanlarının tamamı standart fiziki şartların sağlandığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık, 22±1°C sıcaklıkta, % 50±5 nem oranında ve saatte 15 defa

hava değişiminin yapıldığı odalarda, rahatça ulaşabildikleri su ve standart rat diyetinin bulunduğu uygun büyüklükteki kafeslerde barındırıldı.



**Resim 2.1.** Erkek ve dişi sıçanların çiftleştirilmesi



**Resim 2.2.** Vajinal smearda spermilerin görüntüsü ( $\times 60$  büyütme)

## 2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Gruplar: Gebe sıçanlar rastgele 7 gruba bölündü (Çizelge 2.1):

**1. Grup** (12 adet): Kontrol grubu; hiçbir müdahale yapılmadı.

**2. Grup** (12 adet): Diklofenak sodyum (DS) grubu; gebeliğın 5. günü ile 15. günü arası her gün intraperitoneal 1mg/kg/gün DS (Voltaren 75 mg/3 ml, Novartis) enjekte edildi.

**3. Grup** (12 adet): DS+ Melatonin-10 grubu; 2. gruptaki işlemlerin aynısı yapıldı ayrıca aynı günlerde saat 16:00 ve 17:00 arasında 10 mg/kg (300 gr rata 3 mg) dozunda intraperitoneal melatonin enjekte edildi.

**4. Grup** (12 adet): DS+ Melatonin-50 grubu: 2. gruptaki işlemlerin aynısı yapıldı ayrıca aynı günlerde saat 16:00 ve 17:00 arası 50 mg/kg (300 gr rata 5 mg) dozunda intraperitoneal melatonin enjekte edildi.

**5. Grup** (12 adet): Melatonin-10 grubu; gebeliğın 5. günü ile 15. günü arası her gün saat 16:00 ve 17:00 arası 10 mg/kg (300 gr sıçana 3 mg) dozunda intraperitoneal melatonin enjekte edildi.

**6. Grup** (12 adet): Melatonin-50 grubu; gebeliğın 5. günü ile 15. günü arası her gün saat 16:00 ve 17:00 arası 50 mg/kg (300 gr sıçana 5 mg) dozunda intraperitoneal melatonin enjekte edildi.

**7. Grup** (12 adet): Serum Fizyolojik (SF, sham) grubu; gebeliğın 5. günü ile 15. günü arası her gün saat 16:00 ve 17:00 arası intraperitoneal 1 ml SF (%0,9 NaCl) enjekte edildi.

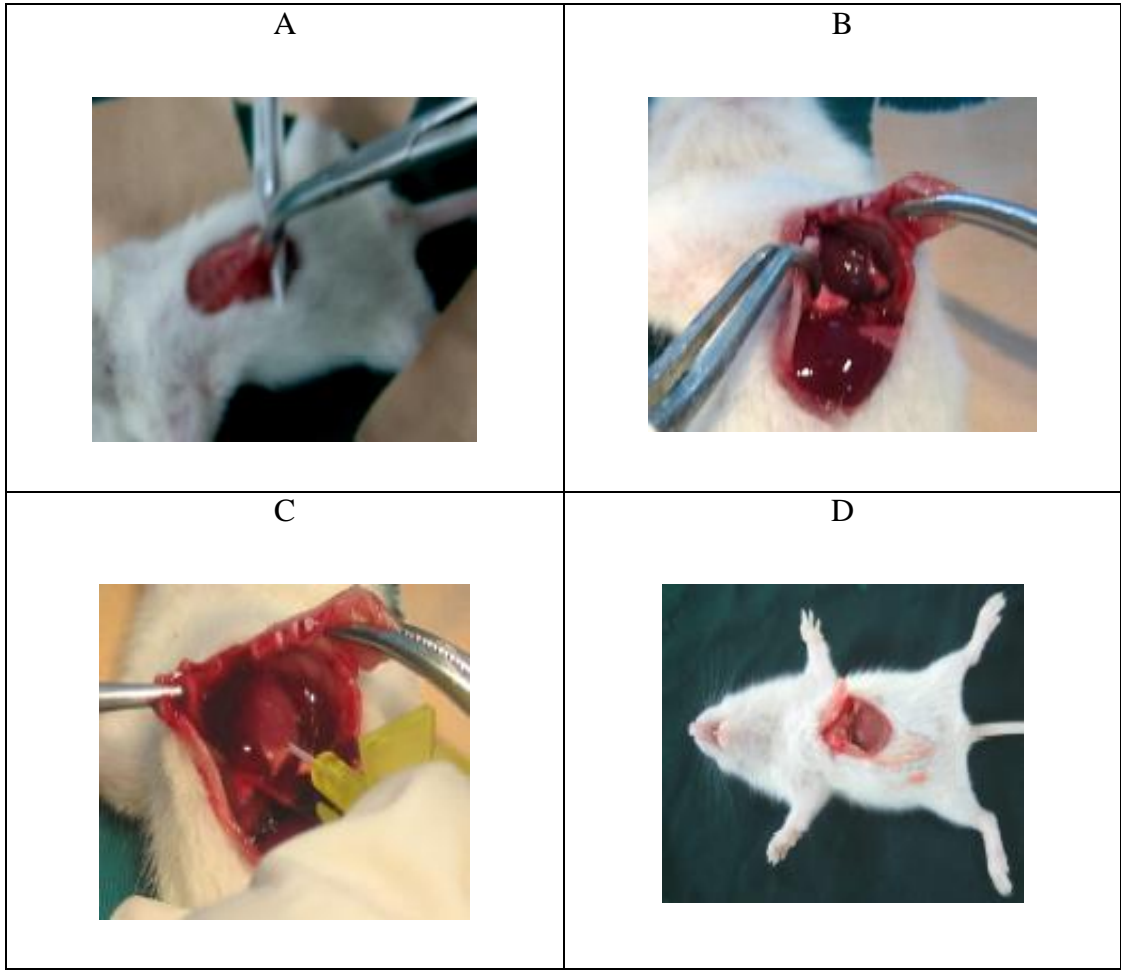
Stok solüsyonunun hazırlanabilmesi için ilk olarak melatonin saf etanol (100 mg/ml) içerisinde çözdürüldü. 10 ve 50 mg/kg konsantrasyonlarında hazırlanan melatonin solüsyonları % 0,9'luk NaCl içerisinde seyreltikten sonra DS+MLT-10, DS+MLT-50, MLT-10 ve MLT-50 gruplarındaki sıçanlara 10 gün süreyle her gün günde bir kez olmak üzere intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Bu melatonin dozlarının hazırlandığı son solüsyonda etanol konsantrasyonu %5 dir.

Çizelge 2.1. Deney grupları



### 2.3. Dokuların Histolojik Değerlendirme İçin Hazırlanması

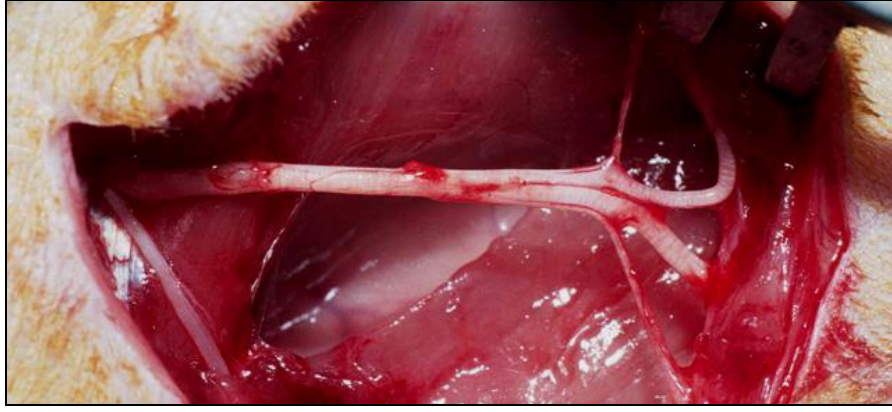
21-28 günlük gebelik sürecinin ardından doğan sıçanlar dört haftalık oluncaya kadar (sütten kesilinceye kadar) annelerinden ayrılmadı. 4 haftalık olan sıçanlar cinsiyetlerine göre erkek ve dişi olarak ayrıldı. Dişi sıçanlar menstrasyon dönemlerinde meydana gelebilecek değişiklikler nedeniyle çalışmaya dahil edilmedi. Erkek sıçanlar gruplarına göre takip edildi. Dördüncü ve 20. haftalarda her gruptan 6 adet sıçana yüksek doz anestezi amacıyla 50 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşi) ve 10 mg/kg xylazin (Rompun-Bayer-İstanbul/Türkiye) karışımı intraperitoneal olarak verildi. Takiben deri, deri altı, fasya kaldırıldı. Processus xphoideus belirlenerek yukarı kaldırılıp diafragma görüldü. Diafragma disseke edilerek toraksa girildi ve kalbe ulaşıldı. Sol ventrikül içine apeksin yanından branül ile girildi. Hazırlanan % 2 formaldehit + glutaraldehit karışımı 0,1 M fosfat ile tamponize 150 ml sıvı intrakardiyak olarak perfüze edildi ve 1-2 saniye sonra sağ atrium enjektör ucuyla delinerek dolaşım kanının dışarı çıkması sağlanarak dokuların tespiti sağlandı (Resim 2.3). Perfüzyon fiksasyonundan sonra sıçanların sağ siyatik sinirlerin gluteal çentikten çıktığı yer ile bifurkasyon bölgesi arasındaki kısmı ekspoze edildi (Resim 2.4 ve Resim 2.5). Açıkta kalan sinir segmenti üzerine glutaraldehit solüsyonu damlatıldı, 1-2 dakika beklendi ve devamında sinir segmenti total olarak çıkartıldı. Daha sonra sinir segmentleri ışık mikroskopik ve stereolojik analiz için hazırlandı.



**Resim 2.3.** İnttrakardiyak nötral formalin perfüzyonu. A; deri, deri altı fasya kaldırıldı. B; diafragma disseke edilerek toraksa girildi ve kalbe ulaşıldı. C; sol ventrikül içine apeksin branül ile girildi. D; tüm dokuların eşit tespiti sağlandı.



**Resim 2.4.** Siyatik sinirin ekspozite edilmesi



**Resim 2.5.** Siyatik sinir

## **2.4. Histolojik Takip ve Boyama**

Periferik sinir takibinde miyelinli aksonları iyi fiske ettiği için altın standart kabul edilen osmium tetroksit ile fiksasyona ve toluidin blue ile boyamaya literatür araştırması sonucu karar verildi (Di Scipio ve ark 2008, Feirabend ve ark 1998).

### **2.4.1. Gerekli Solüsyonların Hazırlanması**

#### **Tamponlu Formaldehit Solüsyonu**

%37-40 Formol ..... 100 ml

Distile su .....900 ml

Sodyum fosfat monobazik (Merk 4072973) .....4 gr

Sodyum fosfat dibazik (Merk 6386229).....6,5 gr karıştırıldı ve oda ısısında saklandı.

#### **%2,5'luk Gluteraldehit Tespit Solüsyonu**

A Solüsyonu hazırlanır:

- 3,628 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 400 ml distile su

Hazırlanan solüsyon, manyetik karıştırıcı ile çözülünceye kadar karıştırılır.

B Solüsyonu hazırlanır:

- 4,744 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 400 ml distile su

Hazırlanan solüsyon, manyetik karıştırıcı ile çözülünceye kadar karıştırılır.

A solüsyonundan 20 ml, B solüsyonundan 80 ml ölçülerek 0.1 M fosfat tampon solüsyonu hazırlanır. 92 ml A+B solüsyonu içerisine 8 ml %25'lik glutraldehit solüsyonu eklenir. Hazırlanan solüsyon +4 °C 'de saklanır.

### **Toluidine Blue**

Toluidin blue.....1 gr

Sodyum tetraborata (borax).....1 gr

Distile su.....100 cc

100 cc distile su içinde 1 gr borax eritildi. İçine 1 gr toluidin blue konularak iyice çalkalandı. Tamamen eritildikten sonra filtre kağıdı ile süzülerek kullanıldı. Bu solüsyon normal oda ısısında birkaç ay stabildir (Bancroft ve ark 1990).

### **2.4.2. Dokuların Fiksasyonu ve Boyama İşlemi**

Sinir segmenti bir plastik zemin üzerinde iki ucu iğne ile tespit edilip, gergin kalması sağlandı. Sinir bu şekli ile 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,4) hazırlanmış %2.5 glutraldehit solüsyonu içinde 4°C'de 4-6 saat süreyle fikse edildi. Doku örnekleri 0,1 M fosfat tamponunda beşer dakika olmak üzere iki defa yıkandı ve örnekler %1 osmium tetroksit solüsyonunda 2 saat postfikse edildi. Dehidratasyon işlemi artan (%50-%100 etil alkol) konsantrasyonlardaki etil alkol solüsyonlarında gerçekleştirildi. Örnekler 16 dakika propilen oksit içine konuldu. Doku örnekleri en son araldit CY212 + 2-dodekensüsinik asit anhidrit (DDSA) + benzil dimetilamin and dibutil fitalat karışımı konulmuş Epon gömme kalıplarında (Fluka Chemie Gmbh, Switsherland) 60°C'de 48 saat polimerizasyonun tamamlanması için bekletildi. Doku kalıplarından ultramikrotom (Super Nova Reichert-Yung, Austria) kullanılarak alınan 1µm kalınlığındaki yarı ince kesitler toludin mavisi ile boyandı.

Boyama işlemi için, alınan kesitler cam bıçak havuzundan suyla beraber temiz lamaların üzerine alınıp 60 °C' de ısıtma tablasında veya benzen alevinde tahminen 1 dakika (kaynamaması lazım) ısıtıldı. Üzerine dokuyu kaplayacak şekilde toluidin blue damlatıldı. Isıtma tablasının üzerinde boyanın kenarlarında renk halesi oluşuncaya kadar bekletildi. Lamalar dikkatlice saf su içine birkaç kez batırılarak kesitler üzerindeki fazla boya akıtılıp iyice yıkandı. Isıtma tablası üzerinde üstünde su kalmayacak şekilde kurutuldu. Daha sonra doku üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.

## 2.5. Stereolojik Analiz

Siyatik sınırlardan elde edilen kesitlerin analizi CCD dijital kamera, görüntü yakalama kartı (Flash Point 3D) ve tabla kontrol ünitesi (Prior) içeren bir masaüstü bilgisayar, bilgisayar kontrollü mikroskop tabla motoru (Prior), mikrokator (Heidenhein) ve ışık mikroskopundan oluşan bir Stereolojik Görüntü Analiz Sistemi ile gerçekleştirildi. Bu sistemde yapılan stereolojik ölçümler, belirtilen birimleri kontrol eden ve yeni stereolojik ölçüm araçlarını içeren bir yazılım Stereo Investigator-MicroBrightField ve CAST Grid-Olympus ile yapıldı (Resim 2.6).



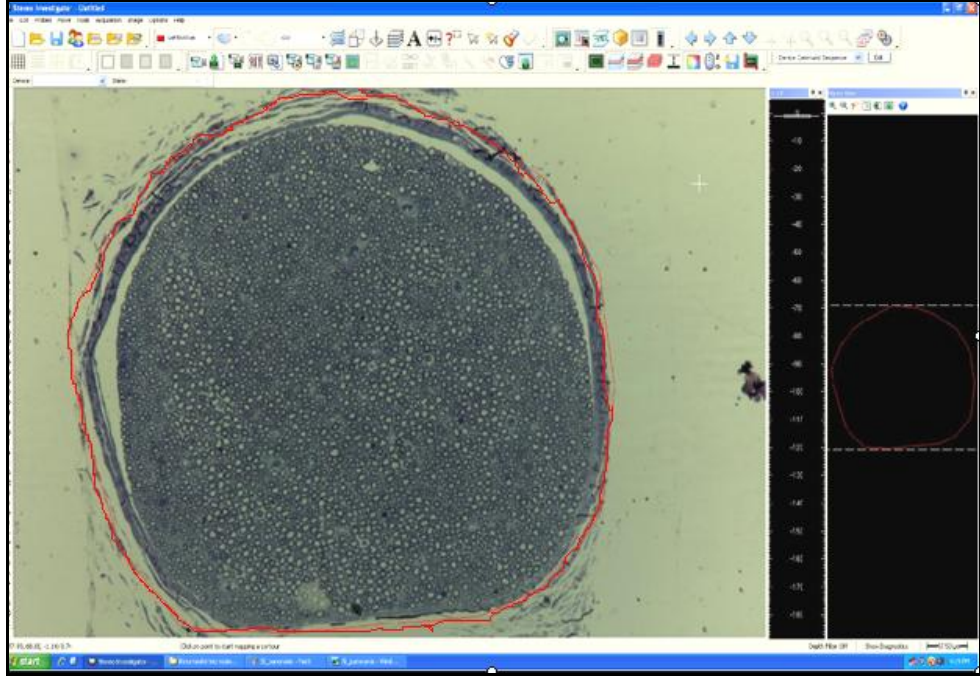
**Resim 2.6.** CAST Grid-Olympus, Stereo Investigator-MicroBrightField

Siyatik sinir kesitleri, 10 x (NA=1,4; son büyütme=509x) büyütmede görüntülendi ve aksonları içeren tüm sinir kesiti perimetrik olarak sınırlandırıldı (Resim 2.7). Ardından immersiyon yağı damlatılarak görüntü 100 x (NA =1,35; son büyütme=5090x) büyütme ile netleştirildi ve ekrana 30×30 (900  $\mu\text{m}^2$ ) alana sahip bir

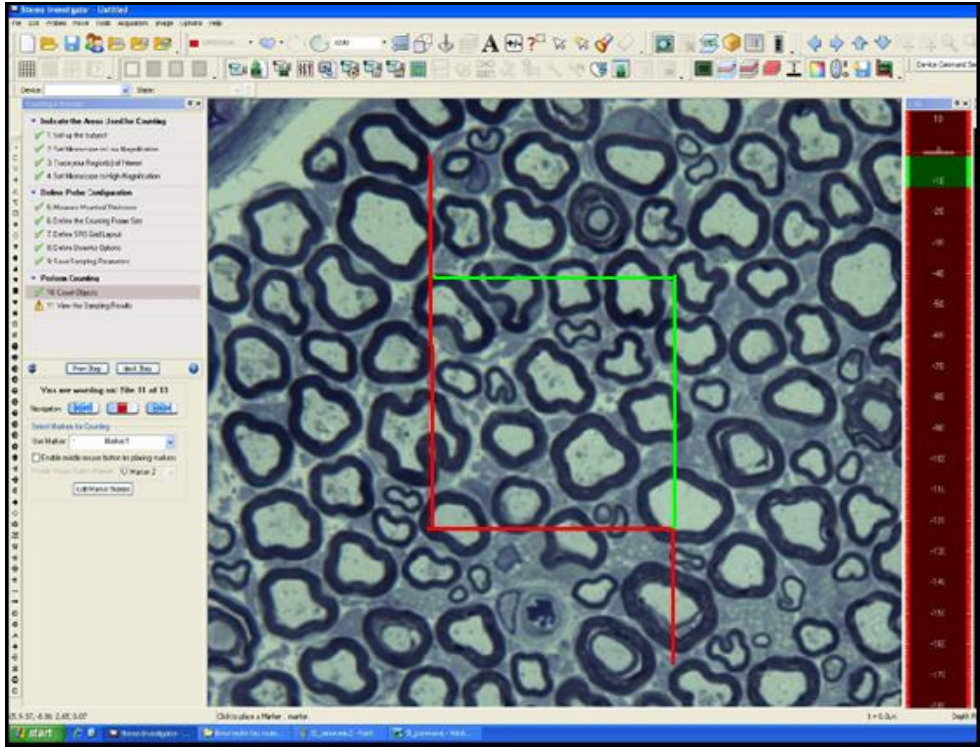
tarafsız sayım çerçevesi yerleştirildi (Resim 2.8). Çerçeve konumlandırıldıktan sonra alan örnekleme (meander sampling) 70 x 70 µm'lik adımların sistematik rastgele örnekleme şemasına göre doku kesiti üzerine yerleştirilmesi ile gerçekleştirildi ve her adımda tarafsız sayım çerçevesinin kurallarına uygun olarak, tarafsız sayım çerçevesinin içine denk gelen ve serbest kenarlarına değen miyelinli akson kesitleri sayıldı (Resim 2.9). Tarafsız sayım çerçevesinin dışına denk gelen ve yasak kenarlarına değen miyelinli akson kesitleri sayıma dahil edilmedi (Resim2.9). Program sayılan miyelinli akson sayılarını ileriki hesaplamalarda kullanılmak üzere kaydetti (Resim 2.10).

Kesitlerde bulunan toplam akson sayısına ulaşmak için, sayılan akson izdüşümü sayısı, yazılım tarafından hesaplanan sistematik rasgele örnekleme fraksiyonu ile çarpıldı. Bu işlem sonucunda sinirde bulunan toplam akson sayısının tarafsız bir hesaplaması elde edilmiş oldu.

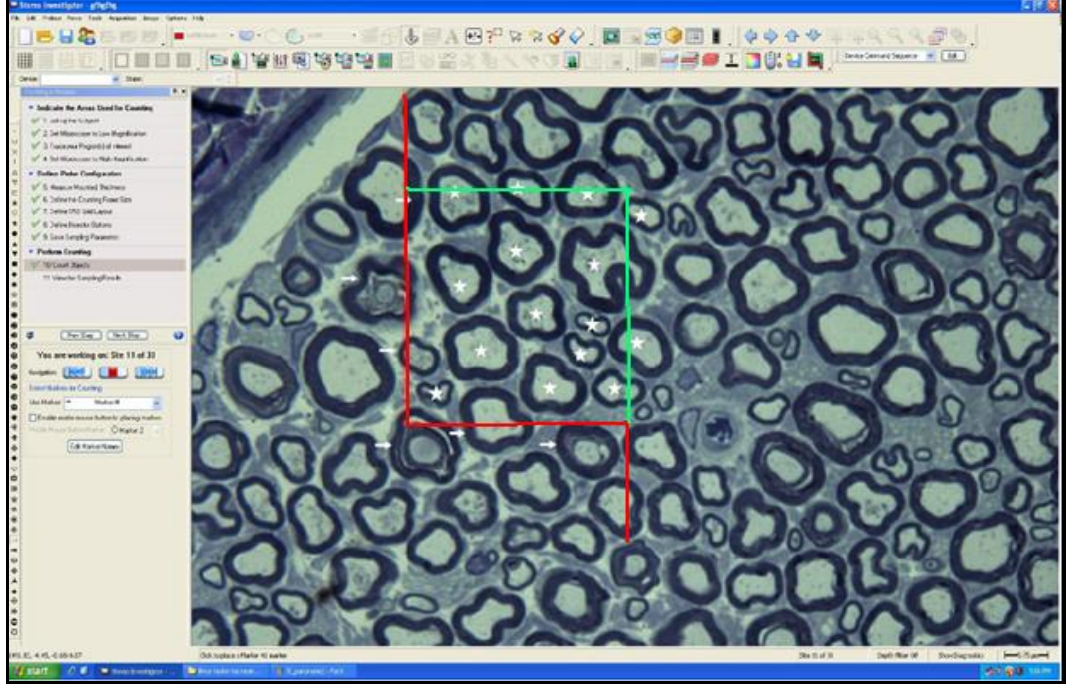
Ayrıca sayım çerçevesinin sağ üst köşesine en yakın aksonun çapı ölçüldü (Resim 2.11) ve sistem otomatik olarak akson alanını bize verirken, yine aynı aksonun çevresindeki miyelinin rastgele dört ayrı noktadan kalınlığı da aynı sistem kullanılarak ölçüldü ve sistem bu dört değerin ortalamasını verdi (Resim 2.11). Her adımda elde edilen sayım değerleri kullanılan yazılım içindeki veri dosyasına kaydedilerek, daha ileri hesaplamalar bu kayıtlı dosyalar üzerinden gerçekleştirildi (Resim 2.12).



**Resim 2.7.** Perimetrik olarak sınırlanmış sinir kesiti (X10 büyütme).



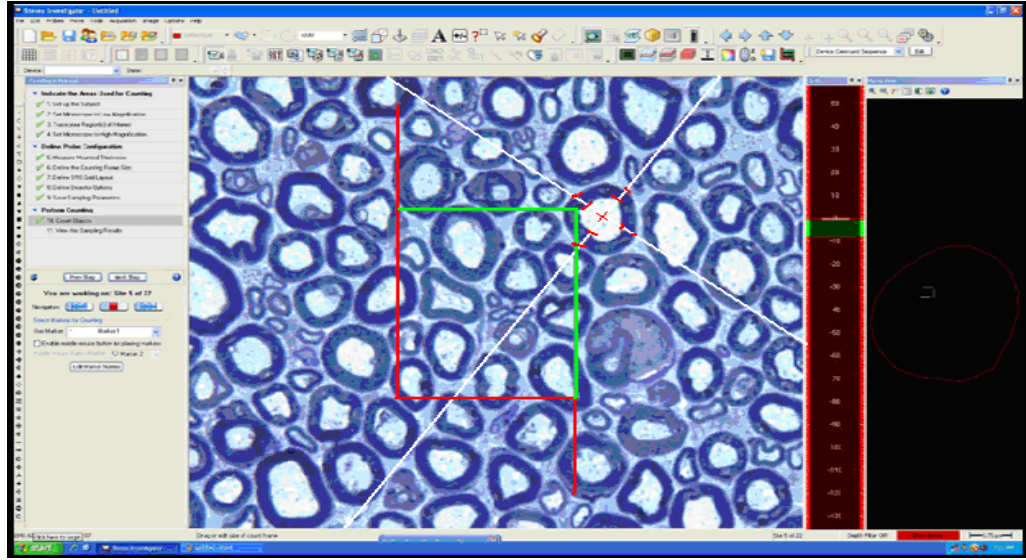
**Resim 2.8.** Tarafsız sayım çerçevesi (X100 büyütme).



**Resim 2.9.** Tarafsız sayım çerçevesi sayım kurallarına göre sayılan (yıldız) ve sayılmayan (ok) miyelinli akson kesitleri.

Microsoft Excel - df-1													
Dosya Düzen Görünüm Ekle Biçim Araçlar Veri Pencere Yardım													
B2 Marker 16													
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Data File	Marker	Total Markers Counted	Number of Sections	Region	Number of Sampling Sites	Estimated Population using Fractionator	Coefficient of Error (Gundersen), m=0 [1]	Coefficient of Error (Gundersen), m=1 [1]	1st Estimate of CE (Schmitz-Hof)	2nd Estimate of CE (Schmitz-Hof)	Counting Frame Area (XY) ( $\mu\text{m}^2$ )	Sampling Grid Area (XY) ( $\mu\text{m}^2$ )	
1													
2	Marker 16	991	1	User Line 1	82	5395,44	0,50	0,12	0,058	0,032	900,0	4900,0	
3													
4													
5													

**Resim 2.10.** Sayılan miyelinli aksonların Sterio-İnvestigator programınca hesaplanmış ve kaydedilmiş hali.



**Resim 2.11.** Miyelinli akson alanı ve miyelinin kalınlığı ölçümü. Tarafsız sayım çerçevesinin sağ üst köşesine en yakın olan miyelinli aksonun alanı ve miyelin kalınlığı ölçümü yapıldı.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
585	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,893777			
586	CAST1 Live	2DNucleat	5075	100x/1.35					15,62624		
587	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,529661			
588	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,735537			
589	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,767655			
590	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,762944			
591	CAST1 Live	2DNucleat	5075	100x/1.35					12,18973		
592	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,107125			
593	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,353819			
594	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				0,893777			
595	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				0,983471			
596	CAST1 Live	2DNucleat	5075	100x/1.35					35,32551		
597	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,111046			
598	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,14876			
599	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,51708			
600	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,561983			
601	CAST1 Live	2DNucleat	5075	100x/1.35					34,03957		
602	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,66138			
603	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,902675			
604	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,094075			
605	CAST1 Live	Length	5075	100x/1.35				1,102942			
606							ortalama	1,630246	24,65648		

**Resim 2.12.** Ölçülen akson alanı ve miyelin kalınlığından programca hesaplanan ortalama miyelin kalınlığı ve ortalama akson alanı.

## 2.6. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki ortalama miyelinli akson sayıları, ortalama miyelinli akson alanları ve ortalama miyelin kalınlıkları farklılıklarının değerlendirmesinde en az iki grup arasında herhangi bir farklılığın olup olmadığını test etmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi uygulanmış olup, en az iki grup arasında anlamlı bir farklılığın tespit edildiği değerlerde post hoc test olarak Tukey HSD kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS version 13.0 (Inc, Chicago, Illinois, USA)'da yapıldı. Elde edilen sonuçlar  $p < 0,05$  olduğu durumda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sayısal değerler aritmetik ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Genel Değerlendirme Bulguları

Doğumdan sonra yenidoğan sıçanlar dört hafta anneleriyle aynı kafeste bırakılarak anne sütü almaları sağlandı. Bu dönemde anne ve yavruların bakımları uygun şartlar altında devam etti. dört haftalık olan yavrular gruplarına göre erkek ve dişi olarak ayrıldı. dört haftalık olan erkek sıçanlardan her gruptan altışar sıçan gruptan ayrıldı ve sakrifiye edilmeden önce kiloları bir terazi yardımıyla ölçülüp kaydedildi. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu dört haftalık erkek sıçanlarda gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ( $p>0,05$ ). Aynı işlem 20 haftalık olan sıçanlarda da tekrarlandı. Yirmi haftalık gruplarda da gruplar arasında kilo açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ( $p>0,05$ ). (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1:** Dört ve 20 haftalık sıçanların sakrifiye edilmeden önceki ortalama ağırlıkları (ortalama ağırlık $\pm$ SEM)

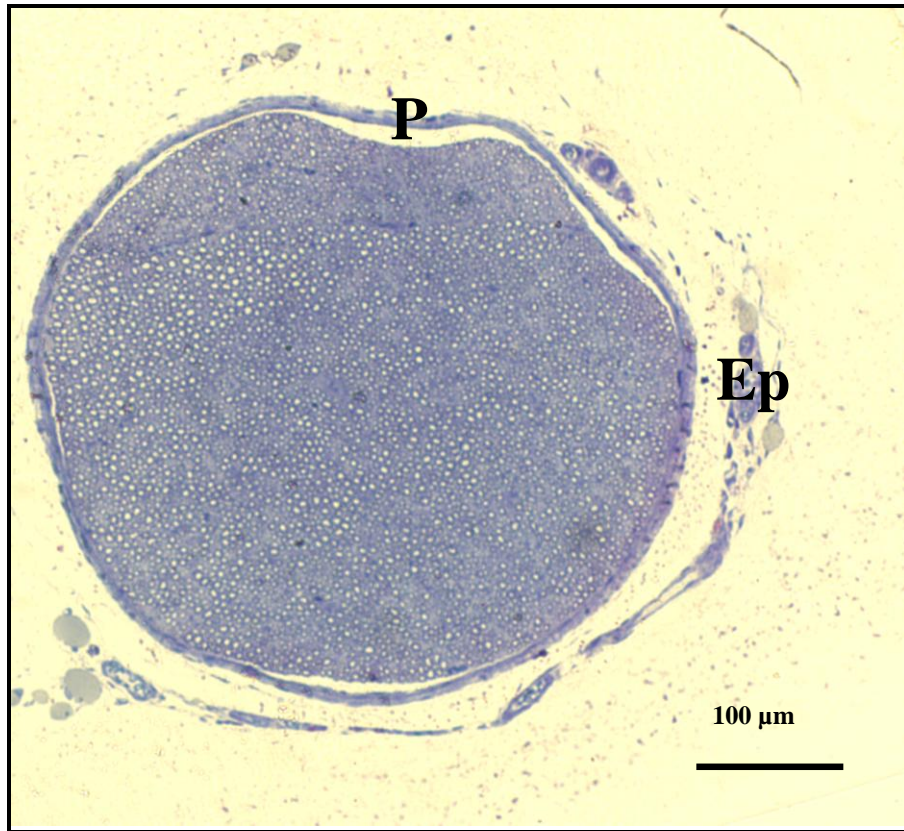
GRUPLAR	4 HAFTA ORTALAMA AĞIRLIK (gr)	20 HAFTA ORTALAMA AĞIRLIK (gr)
KONTROL	82,83 $\pm$ 1,82	394,50 $\pm$ 3,00
SF (SHAM)	81,33 $\pm$ 1,58	386,83 $\pm$ 4,01
DS	80,50 $\pm$ 1,28	381,50 $\pm$ 2,77
DS+MLT-10	81,50 $\pm$ 1,06	381,00 $\pm$ 2,52
DS+MLT-50	81,50 $\pm$ 1,06	389,50 $\pm$ 3,66
MLT-10	80,83 $\pm$ 2,27	384,00 $\pm$ 3,29
MLT-50	81,50 $\pm$ 1,18	386,17 $\pm$ 3,06

### 3.2.Histolojik Değerlendirme Bulguları

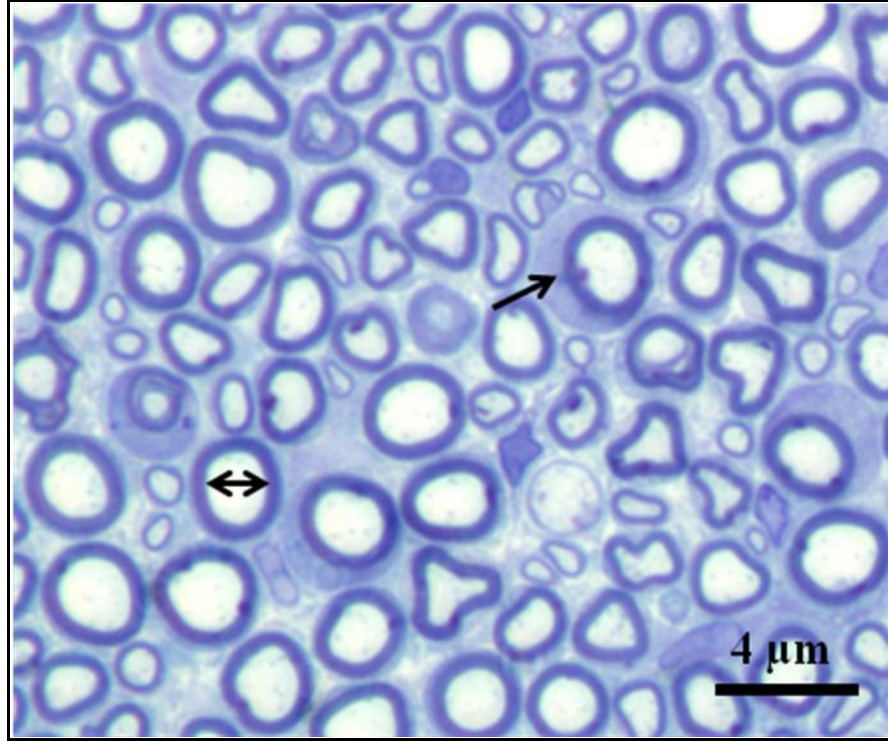
#### 3.2.1.Dört haftalık gruplar

##### Kontrol grubu

Kontrol grubuna ait hayvanların siyatik sinir yarı ince kesitlerinin toluidin mavisi ile boyanmasından elde edilen kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinir kesitinin literatürle uyumlu olarak unifasiküler olduğu izlendi (Resim3.1). Sinirin en dışta fibröz bir bağ dokudan oluşan epinöriyum ile çevrili olduğu, epinöriyumda fibröz bağ dokusu dışında kan damarlarının ve çevrede yağ hücrelerinin varlığı gözlemlendi. Epinöriyumun altında daha ince ve düzgün şekilde perinöriyum ayırt edildi. Sinir fasikülünde miyelinli aksonlar dikkati çekti. Aksonları saran Schwann hücreleri, yer yer oval ya da yuvarlak çekirdekleri ile ayırt edildi. Aksonlar, Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülmüş halde, soluk renkli olarak izlendi. Miyelinli aksonlarda, Schwann hücreleri tarafından yapılan ve aksonun etrafında yerleşmiş olan miyelin kılıfın varlığı görüldü (Resim 3.2).



**Resim 3.1.** Kontrol grubuna ait siyatik sinir kesiti.

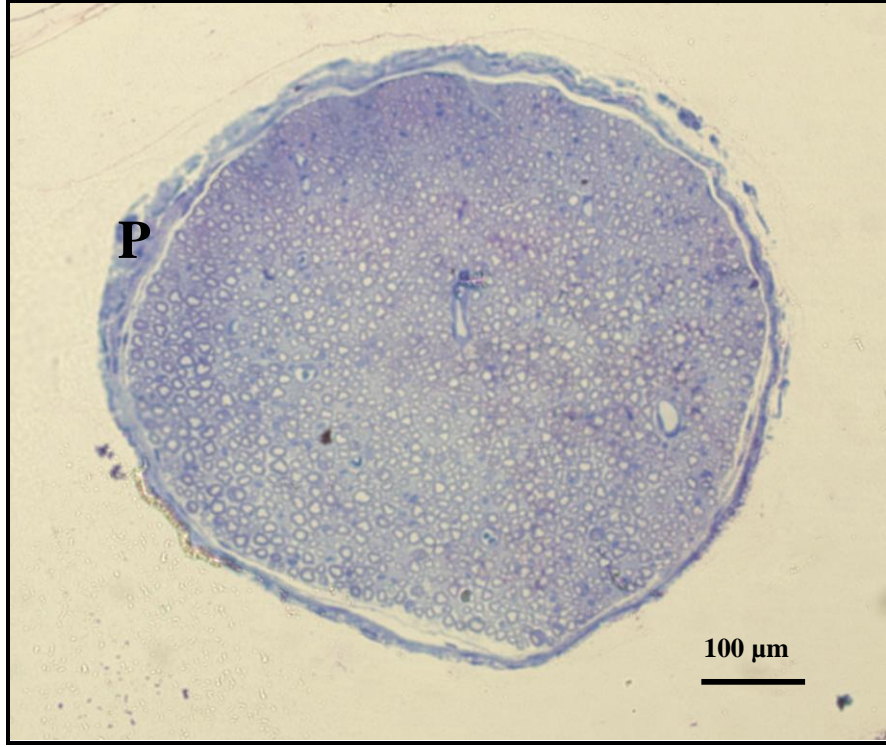


**Resim 3.2.** Kontrol grubuna ait siyatik sinir kesiti, çift taraflı ok normal miyelinli akson, ok schwann hücresi ile birlikte miyelinli akson görülmektedir.

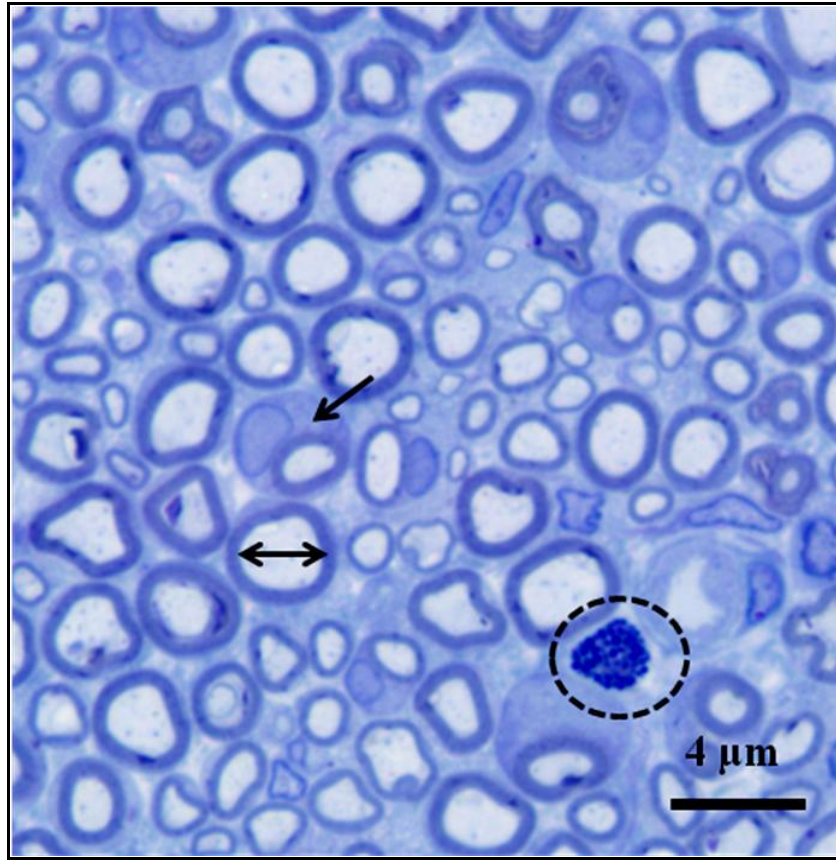
### **SF (SHAM) grubu**

SF (sham) grubuna ait sıçanların siyatik sinir yarı ince kesitlerinin toluidin mavisi ile boyanmasından elde edilen kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinir kesitinin unifasiküler olduğu izlendi. Sinirin en dışta fibröz bir bağ dokudan oluşan epinörium ile çevrili olduğu görüldü. Epinöriumda fibröz bağ dokusu dışında kan damarlarının ve çevrede yağ hücrelerinin varlığı da gözlemlendi (Resim 3.3).

Sinir fasikülünde miyelinli aksonlar dikkati çekti. Kapiller damarlar aksonların arasında dağılmıştı. Aksonları saran Schwann hücreleri, yer yer oval ya da yuvarlak çekirdekleri ile ayırt edildi. Aksonlar, Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülmüş halde, soluk renkli olarak izlendi. Miyelinli sinir liflerinde, Schwann hücreleri tarafından yapılan ve aksonun etrafında yerleşmiş olan miyelin kılıfın varlığı görüldü. Yer yer mast hücrelerine rastlandı (Resim 3.4).



**Resim 3.3.** SF (sham) grubu grubuna ait siyatik sinir kesiti.

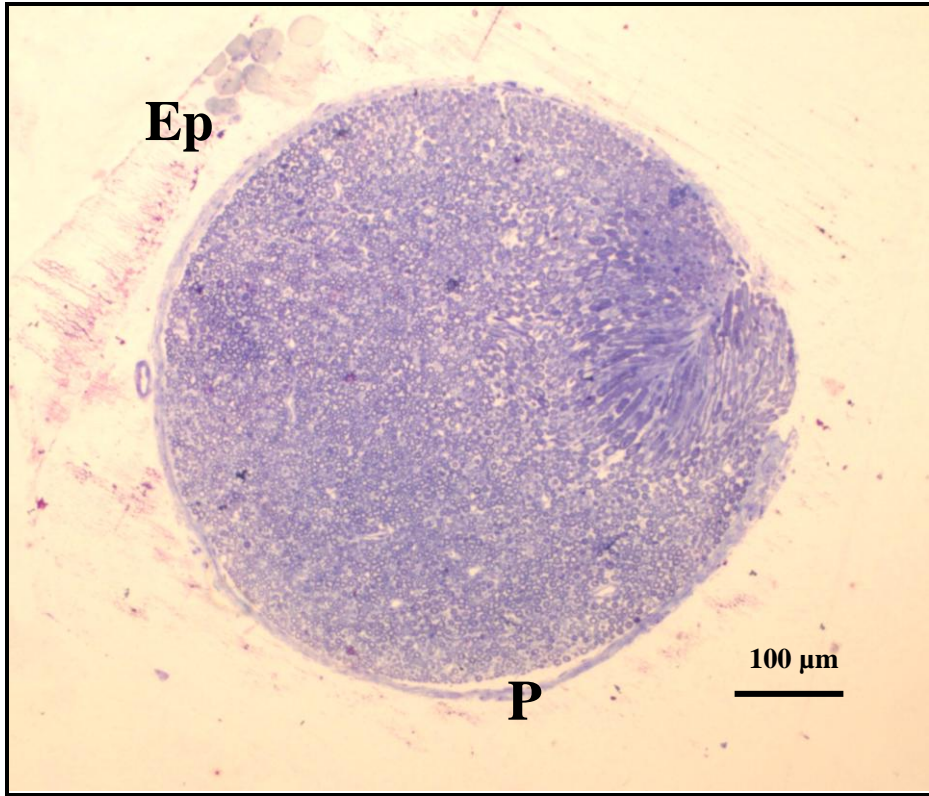


**Resim 3.4.** SF (sham) grubuna ait siyatik sinir kesiti, çift taraflı ok normal miyelinli akson, ok schwann hücresi ile birlikte miyelinli akson, kesik çizgili daire içinde Mast hücresi görülmektedir.

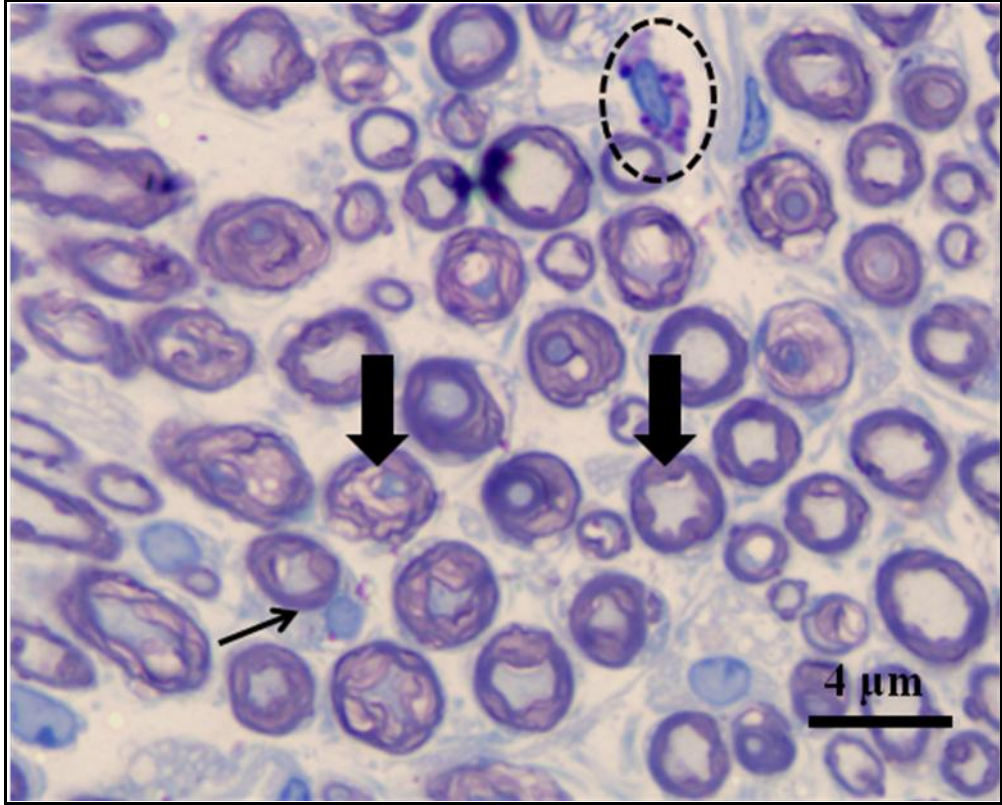
## DS grubu

DS grubundan elde edilen siyatik sinir yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan fibröz bir bağ dokudan oluşan epinörium ile çevrili olduğu izlendi. Epinöriumun altında, içerisinde aksonların bulunduğu perinörium ile çevrili sinir fasikülü ayırt edildi (Resim 3.5). Perinöriumun yer yer bütünlüğünü kaybettiği izlendi.

Büyük büyütmelelerde miyelinli aksonların çoğunluğunda aksonun ve miyelin kılıfın dejenere olduğu, miyelin kılıfın normal konsantrik lamellar yapısının yer yer bozulduğu ve kılıf lamellerinin birbirlerinden ayrıldıkları izlendi. Aksonun büzüştüğü, akson ile miyelin kılıf arasında çeşitli büyüklüklerde vakuollerin meydana geldiği, miyelin kılıfın yer yer akson içerisine doğru invajine olduğu, bazı miyelinli sinir liflerinde ise miyelin kılıfın sinir lifi dışına doğru çıkıntı oluşturduğu ve bazı aksonların tamamen dejenere olduğu dikkati çekti. Miyelin kılıf dejenerasyonunun belirgin olduğu sinir liflerinde, aksonlarda da belirgin yapısal değişiklikler izlendi. Miyelinli aksonların aralarında sitoplazmalarında mast hücreleri ve kapiller damarların varlığı gözlemlendi (Resim 3.6).



**Resim 3.5.** DS grubu grubuna ait siyatik sinir kesiti.

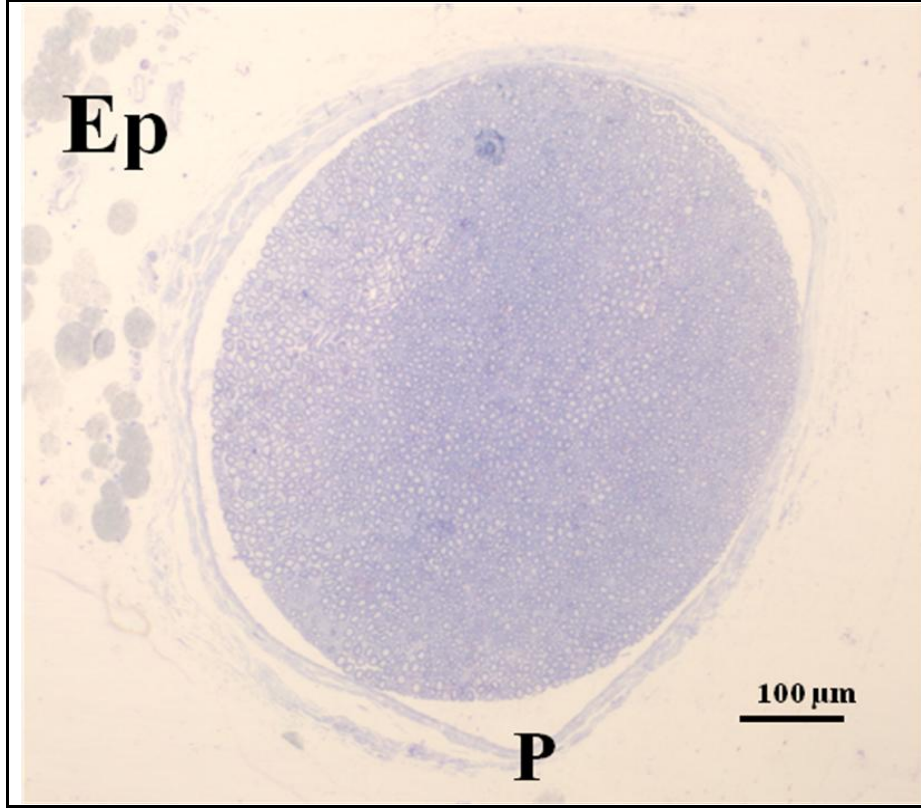


**Resim 3.6.** DS grubuna ait siyatik sinir kesiti, kalın oklar dejenere miyelin kılıf, ok schwann hücresi ile birlikte miyelinli akson, kesik çizgili daire içinde Mast hücresi gözlenmektedir.

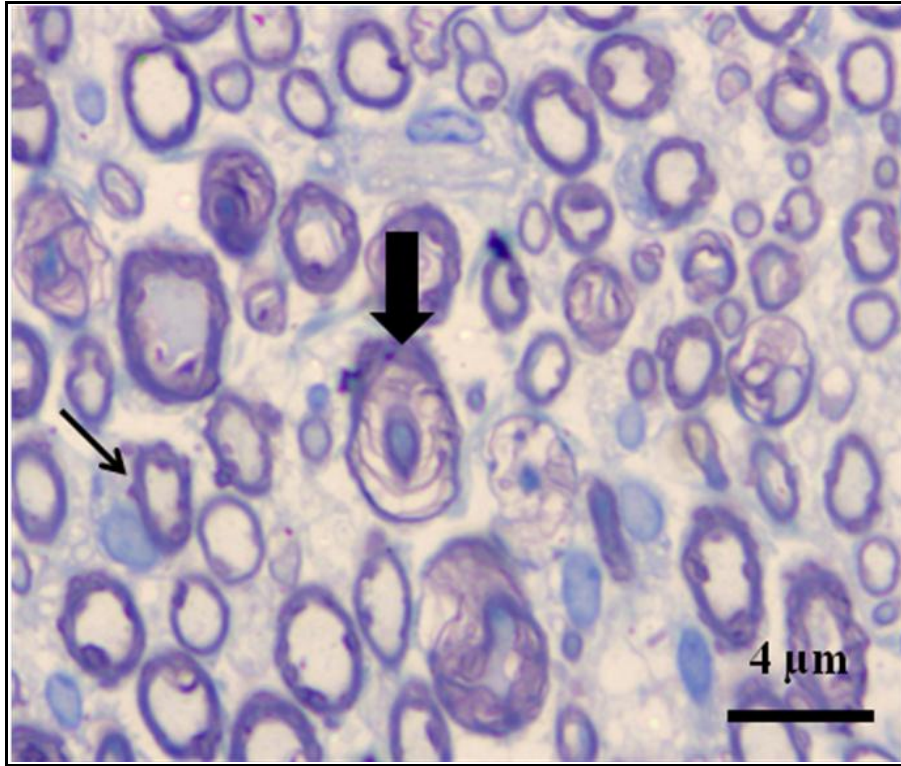
### **DS+MLT-10 grubu**

Gruba ait siyatik sinirin yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan epinöriyum ile çevrili olduğu izlendi. Epinöriyumda fibröz bağ dokusu dışında kan damarları ve yağ hücrelerinin varlığı da gözlemlendi. Epinöriyumun altında, perinöriyum ile çevrili unifasiküler sinir ayırt edildi (Resim 3.7).

Fasikülde miyelinli sinir aksonları izlendi. Miyelinli aksonların bazı alanlarda akson ve miyelin kılıf yapıları ile birlikte normal görünümde oldukları kaydedildi. Bununla beraber çoğu miyelinli akson etrafında yer alan miyelin kılıfın normal yapısının bozulduğu, miyelin kılıf ve aksonun dejenere oldukları gözlemlendi. Miyelinli aksonlarda bazı alanlarda miyelin lamellerinde hafif ayrışma izlendi. Dejenere miyelinli sinir liflerinin bulunduğu alanlara yakın yerleşimli mast hücrelerinin varlığına bu grupta da rastlandı. (Resim 3.8).



**Resim 3.7.** DS+MLT-10 grubu grubuna ait siyatik sinir kesiti.

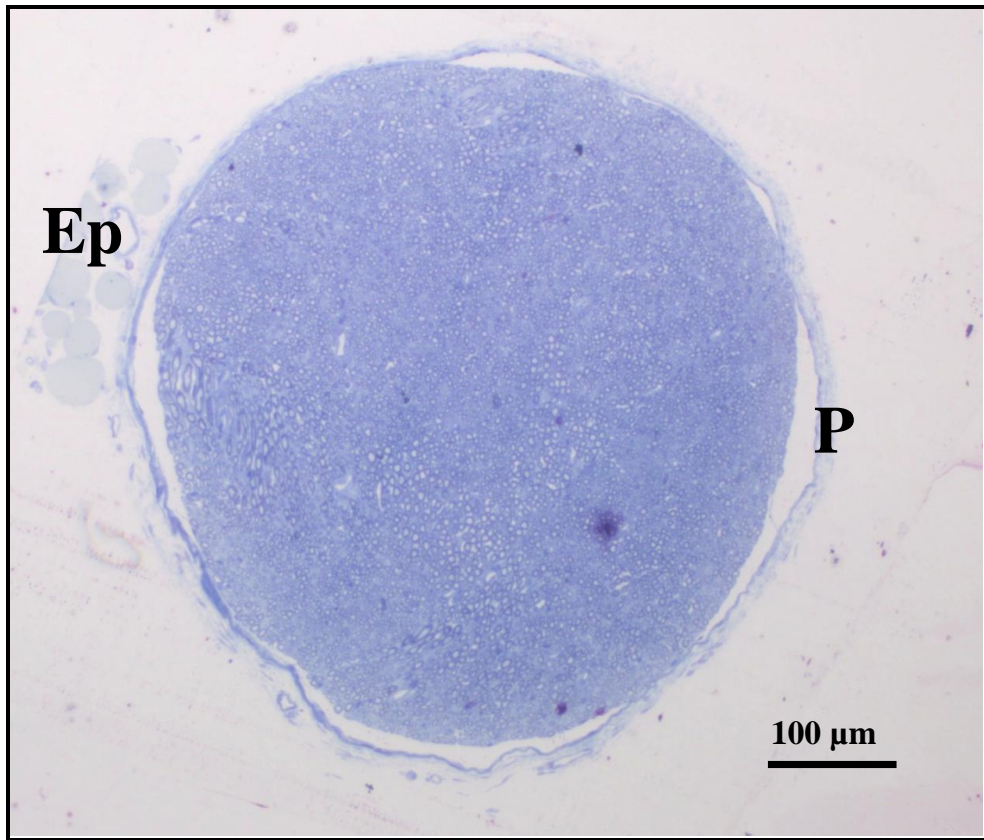


**Resim 3.8.** DS+MLT-10 Grubuna ait siyatik sinir kesiti, kalın oklar dejenere miyelin kılıf, ok Schwann hücresi ile birlikte miyelinli akson gözlenmektedir.

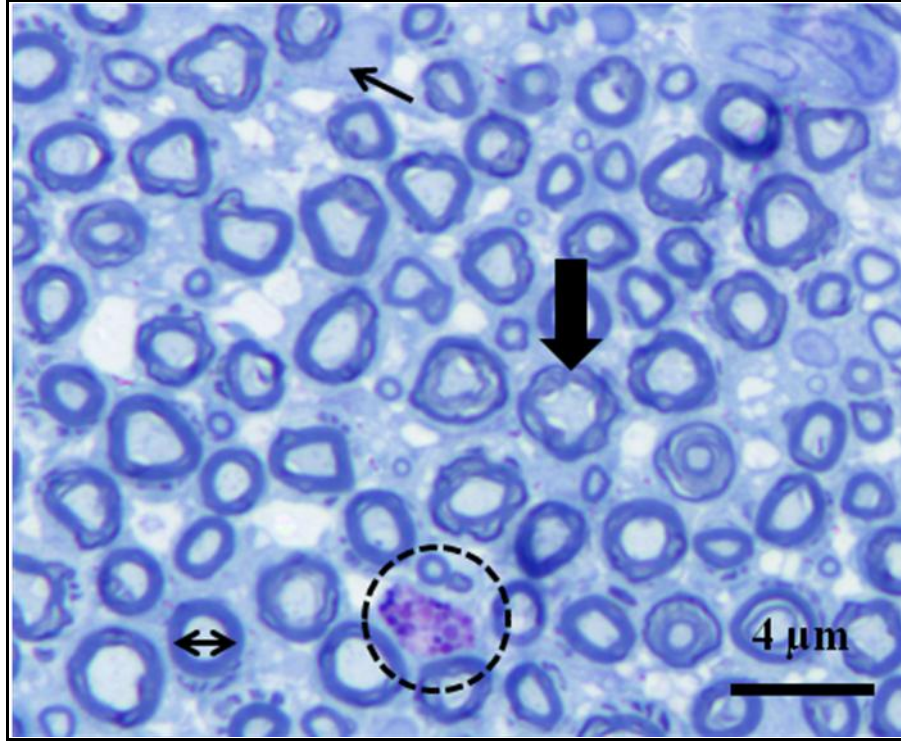
### DS+MLT-50 grubu

Bu gruba ait siyatik sinir yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan epinörium ile çevrili olduğu ve epinöryumda fibröz bağ dokusu dışında kan damarları ve yağ hücrelerinin varlığı da gözlemlendi. Epinöriumun altında, perinörium ile çevrili unifasiküler sinir ayırt edildi (Resim 3.9).

Fasikülde miyelinli sinir aksonları belirgin olarak izlendi. Miyelinli aksonların akson ve miyelin kılıf yapıları ile birlikte yaygın olarak normal görünümde oldukları kaydedildi. Bununla beraber bazı alanlarda miyelinli akson etrafında yer alan miyelin kılıfın normal yapısının bozulduğu, miyelin kılıf ve aksonun dejenere oldukları gözlemlendi. Vakuolizasyon ve lamellar ayrışma daha az görülmüş, miyelin yıkımı azalmıştır. Miyelinli aksonlarda akson etrafında yer alan miyelin kılıfın bazı alanlarda miyelin lamellerinde hafif ayrışma izlendi (Resim 3.10).



**Resim 3.9.** DS+MLT-50 grubuna ait siyatik sinir kesiti.

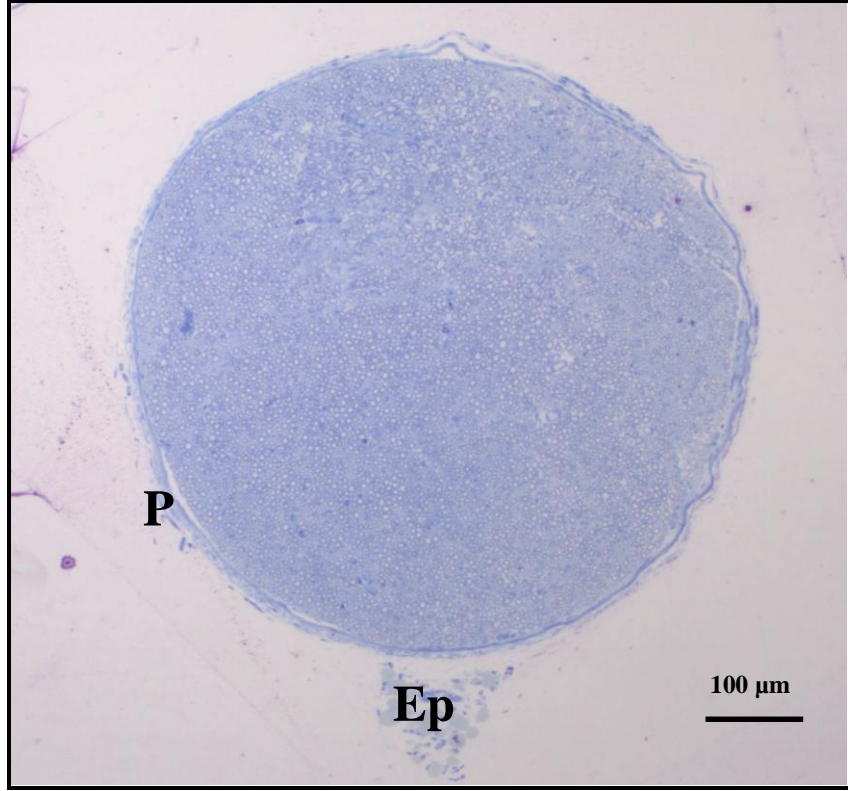


**Resim 3.10.** DS+MLT-50 grubuna ait siyatik sinir kesiti, kalın oklar dejenere miyelin kılıf, ok Schwann hücresi ile birlikte miyelinli akson, çift taraflı ok normal miyelinli akson, kesik çizgili daire içinde Mast hücresi gözlenmektedir.

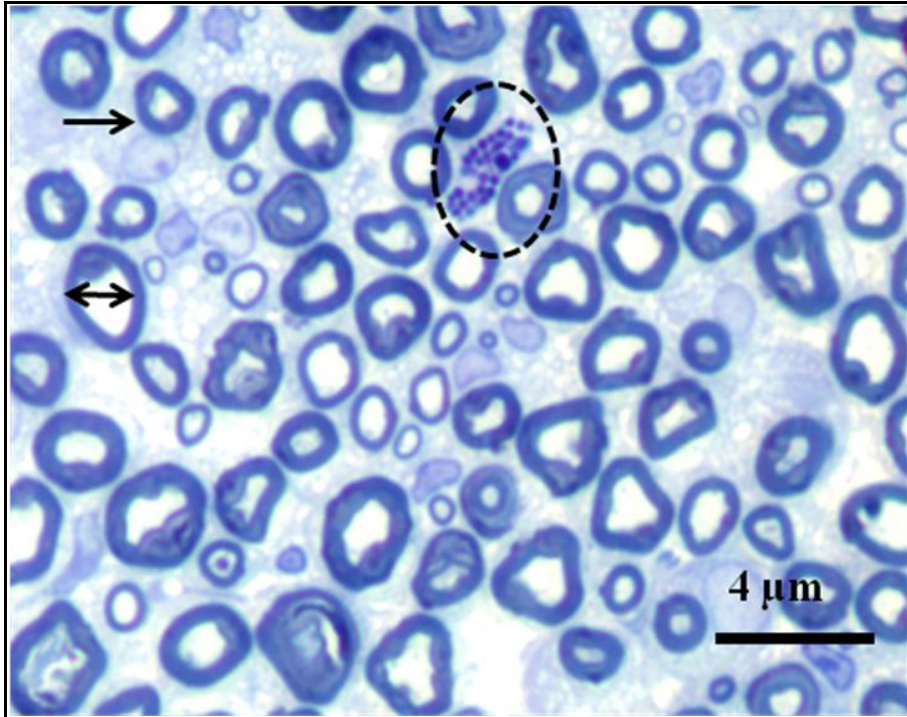
### **MLT-10 grubu**

MLT-10 grubuna ait siyatik sinirin yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan fibröz bir bağ dokudan oluşan epinöriyum ve onun altında daha ince ve düzenli perinöriyum ile çevrili olduğu gözlemlendi (Resim 3.11).

Siyatik sinir kesitinin daha büyük büyütmesinde miyelinli aksonların etrafında belirgin miyelin kılıf içerdikleri ayırt edildi. Miyelinli aksonlar, akson ve miyelin kılıf yapıları ile birlikte normal olarak değerlendirildi. Yer yer mast hücreleri bu grupta da görüldü. Schwann hücreleri yuvarlak veya oval çekirdekleri ile ayırt edildi. Bununla beraber özellikle küçük çaplı sinir liflerinde histolojik yapının nispeten korunduğu gözlemlendi (Resim 3.12).



**Resim 3.11.** MLT-10 grubuna ait siyatik sinir kesiti.



**Resim 3.12.** MLT-10 grubuna ait siyatik sinir kesiti, ok Schwann hücresi ile birlikte miyelinli akson, çift taraflı ok normal miyelinli akson, kesik çizgili daire içinde Mast hücresi gözlenmektedir.

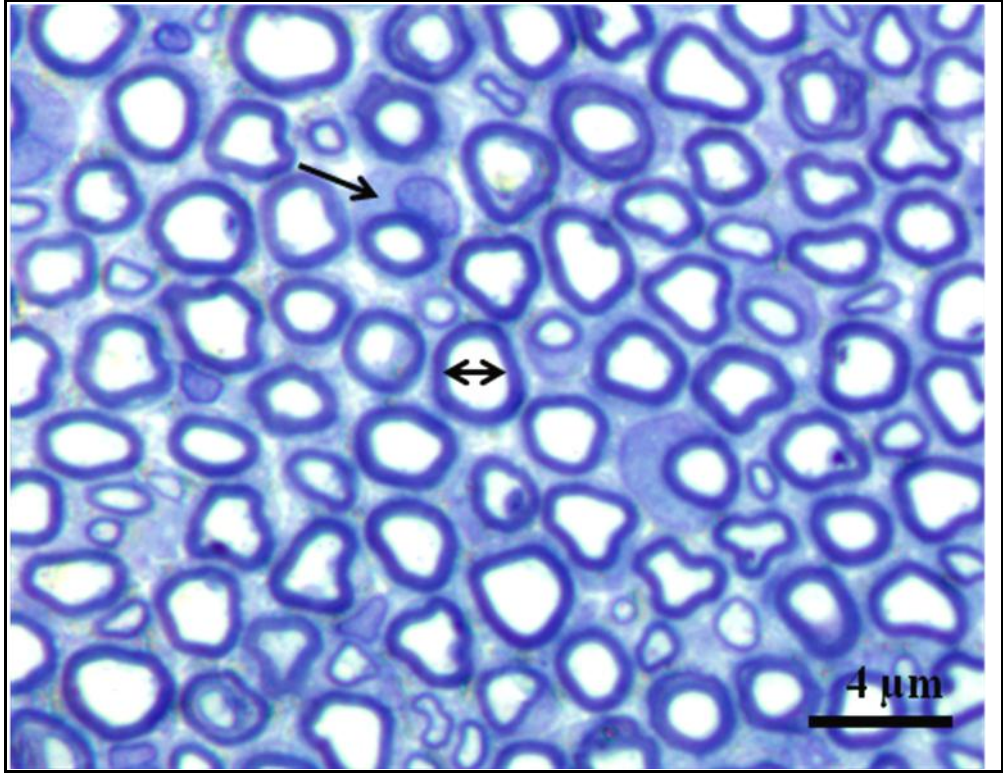
### MLT-50 grubu

MLT-50 uygulanan gruba ait siyatik sinirin yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan epinörium adı verilen kalın fibröz bir bağ dokusu ile çevrili olduğu izlendi. Epinöriumun altında sinir fasikülünün daha ince bir bağ dokusu olan perinöriumla çevrili olduğu görüldü (Resim 3.13).

Perinörium ile sarılı fasikül içerisinde aksonlar, Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülmüş halde, soluk renkli olarak izlendi. Miyelinli aksonlarda, Schwann hücreleri tarafından yapılan ve aksonu çevreleyen miyelin kılıf, belirgin olarak izlendi. Schwann hücreleri yuvarlak veya oval çekirdekleri ile ayırt edildi. Akson ve miyelin kılıf yapıları ile birlikte normale yakın görünümde miyelinli aksonların aralarında kan damarları da ayırt edildi (Resim 3.14).



**Resim 3.13.** MLT-50 grubuna ait siyatik sinir kesiti.



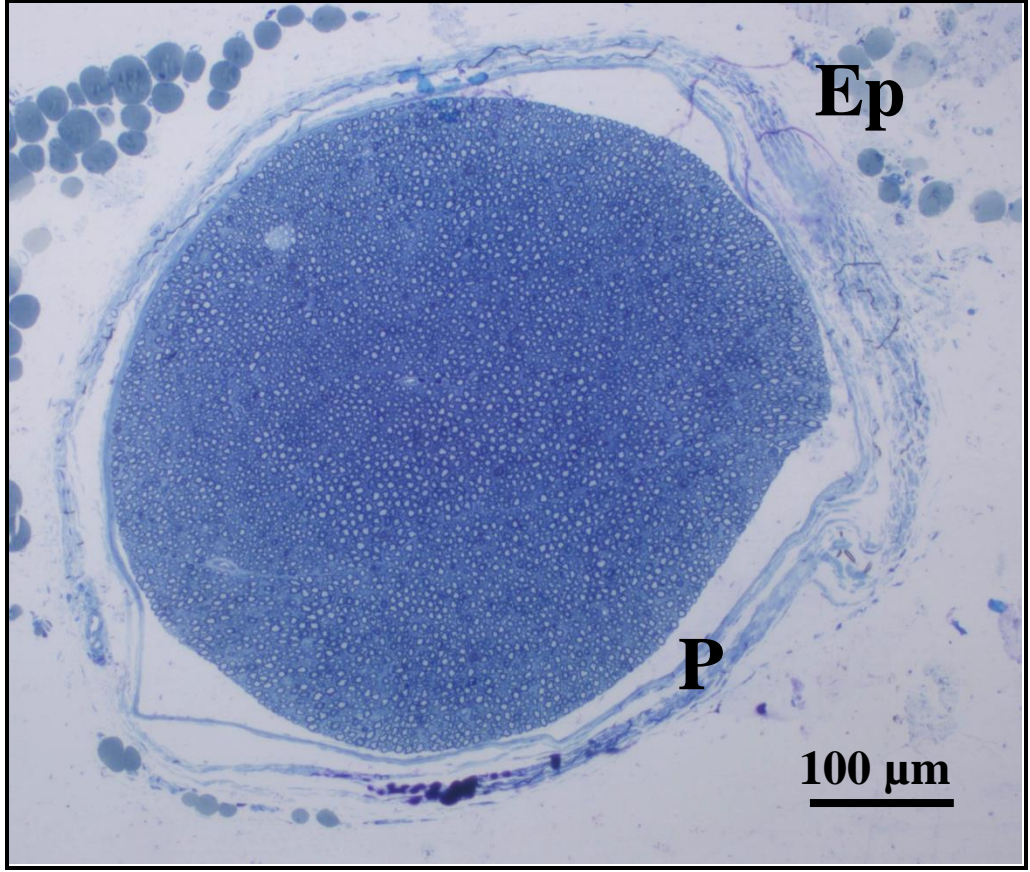
**Resim 3.14.** MLT-50 grubuna ait siyatik sinir kesiti, ok Schwann hücresi ile birlikte miyelinli akson, çift taraflı ok normal miyelinli aksonu göstermektedir.

### 3.2.2. Yirmi haftalık gruplar

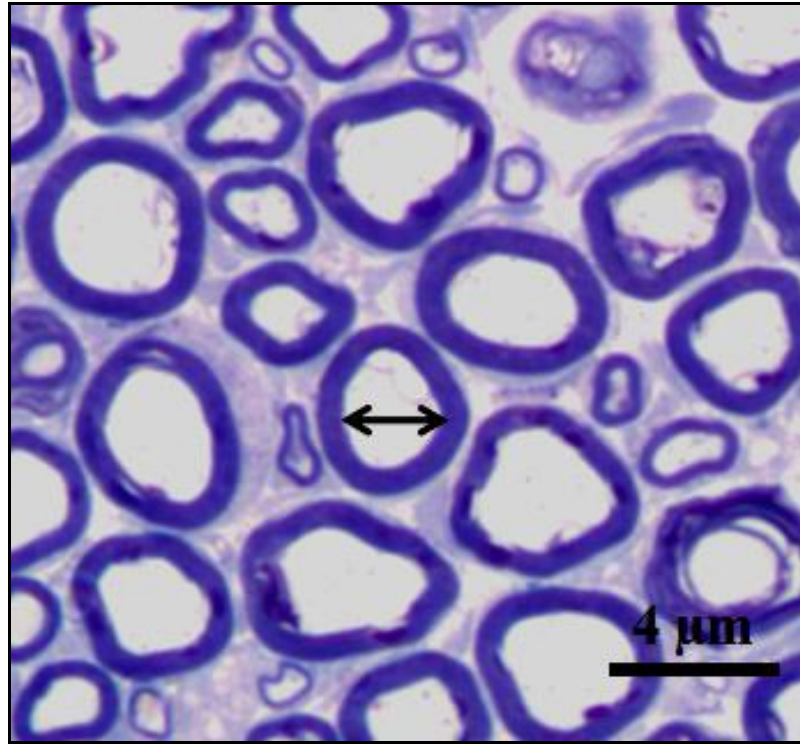
#### Kontrol grubu

Kontrol grubuna ait hayvanların siyatik sinir yarı ince kesitlerinin toluidin mavisi ile boyanmasından elde edilen kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin en dışta fibröz bir bağ dokudan oluşan epinörium ile çevrili olduğu görüldü. Epinöriumda fibröz bağ dokusu dışında kan damarlarının ve çevrede yağ hücrelerinin varlığı da gözlemlendi. Sinir kesitinde unifasiküler olduğu gözlenen siyatik sinir daha ince bir bağ dokusu olan perinörium ile çevriliydi (Resim 3.15).

Fasikül içinde miyelinli aksonlar dikkati çekti. Aksonları saran Schwann hücreleri, yer yer oval ya da yuvarlak çekirdekleri ile ayırt edildi. Aksonlar, Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülmüş halde, soluk renkli olarak izlendi. Miyelinli aksonlarda Schwann hücreleri tarafından yapılan ve aksonun etrafında yerleşmiş olan miyelin kılıfın varlığı görüldü (Resim3.16).



**Resim 3.15.** Kontrol grubuna ait siyatik sinir kesiti.

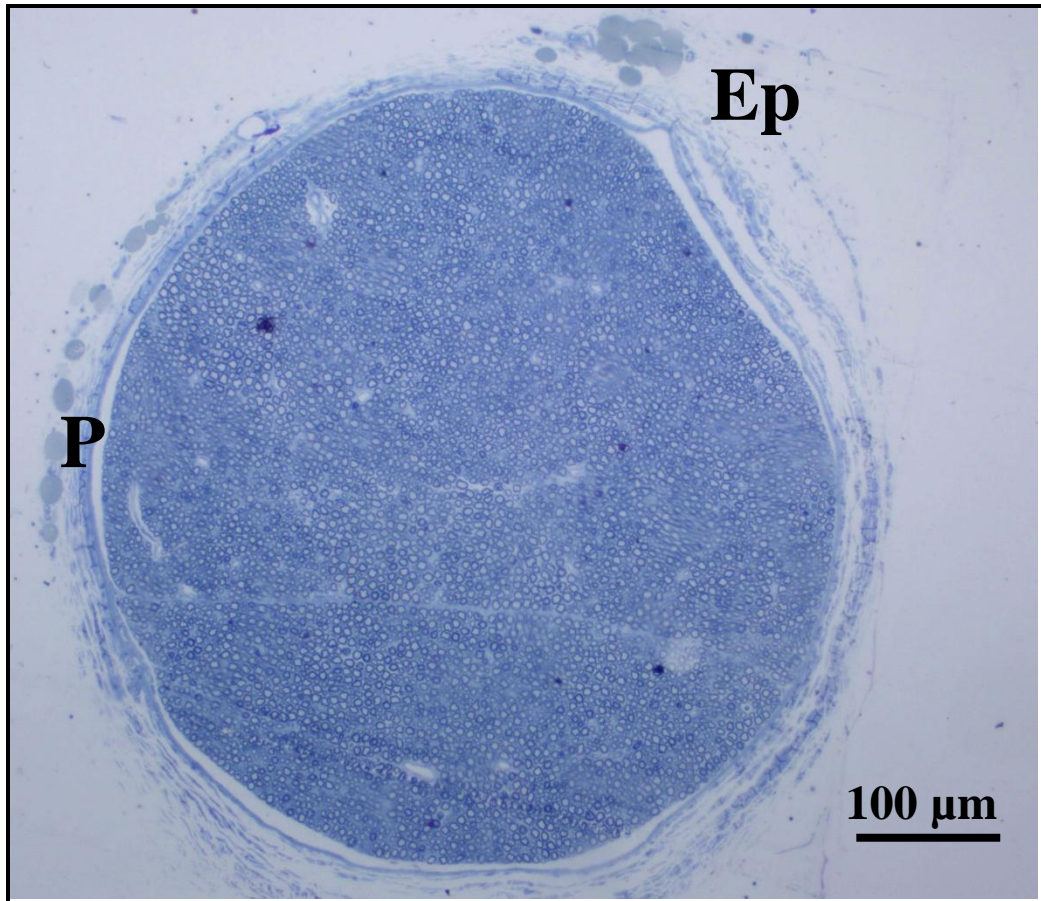


**Resim 3.16.** Kontrol grubuna ait siyatik sinir kesiti, çift taraflı ok normal miyelinli aksonu göstermektedir.

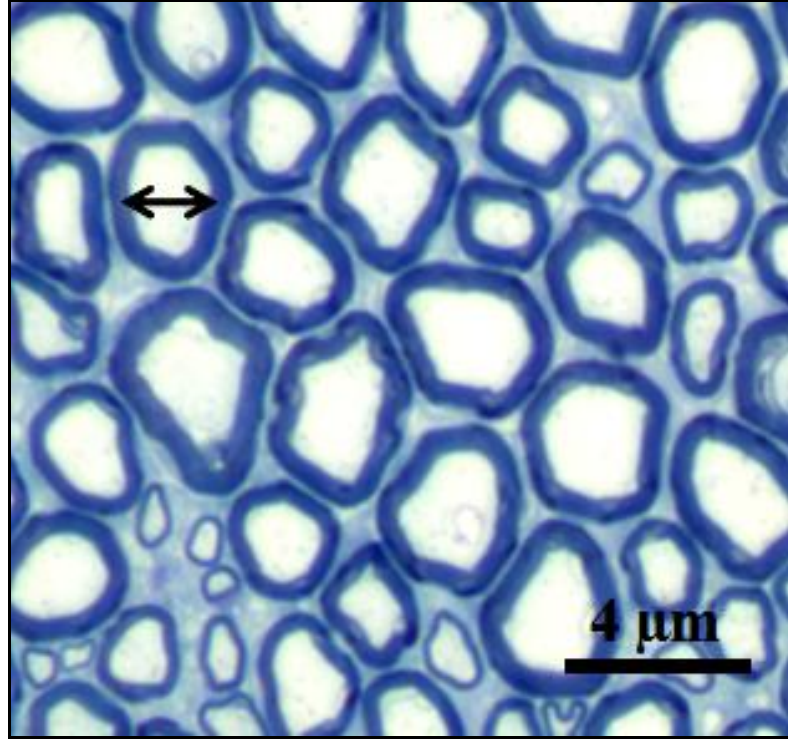
### SF (SHAM) grubu

SF (sham) grubuna ait hayvanların siyatik sinir yarı ince kesitlerinin toluidin mavisi ile boyanmasından elde edilen kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin en dışta fibröz bir bağ dokudan oluşan epinöriyum ile çevrili olduğu görüldü. Sinir kesitinde unifasiküler olduğu gözlenen siyatik sinir daha ince bağ dokusu olan perinöriyum ile çevriliydi (Resim 3.17).

Perinöriyum ile sarılı sinir fasikülünde miyelinli aksonlar dikkati çekti. Ayrıca yaygın olarak kapiller damarlar yer almaktaydı. Aksonları saran Schwann hücreleri, yer yer oval ya da yuvarlak çekirdekleri ile ayırt edildi. Aksonlar, Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülmüş halde, soluk renkli olarak izlendi. Miyelinli aksonlarda Schwann hücreleri tarafından yapılan ve aksonun etrafında yerleşmiş olan miyelin kılıfın varlığı görüldü (Resim 3.18).



**Resim 3.17.** SF (sham) grubu grubuna ait siyatik sinir kesiti.

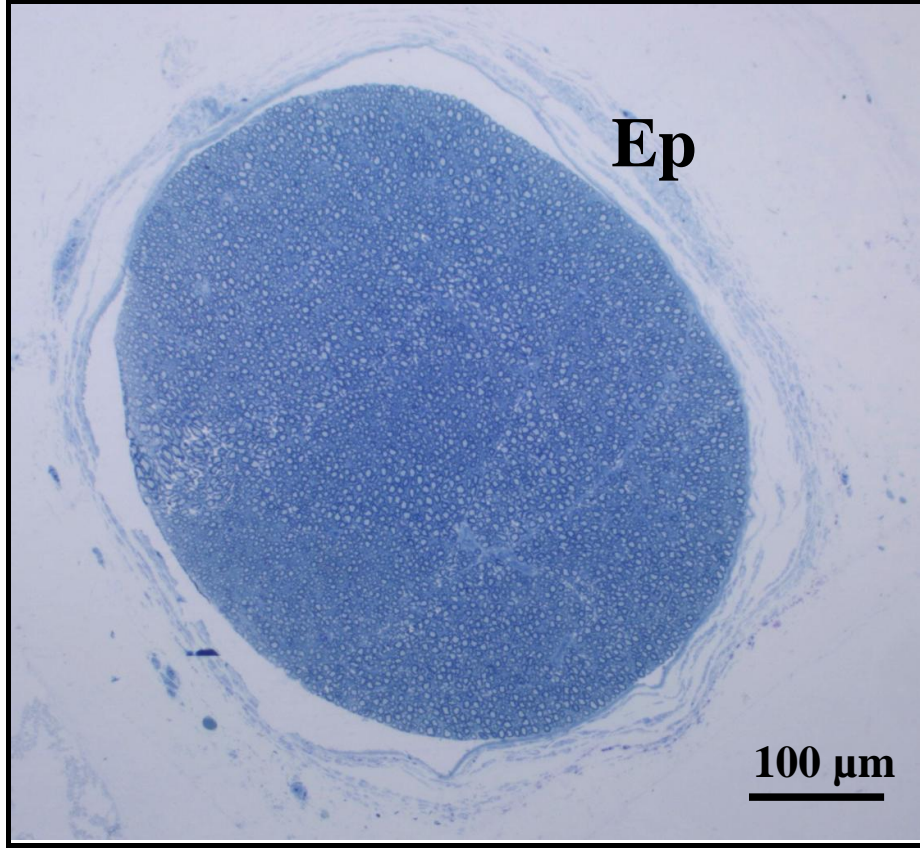


**Resim 3.18.** SF (sham) grubua ait siyatik sinir kesiti, çift taraflı ok normal miyelinli aksonu göstermektedir.

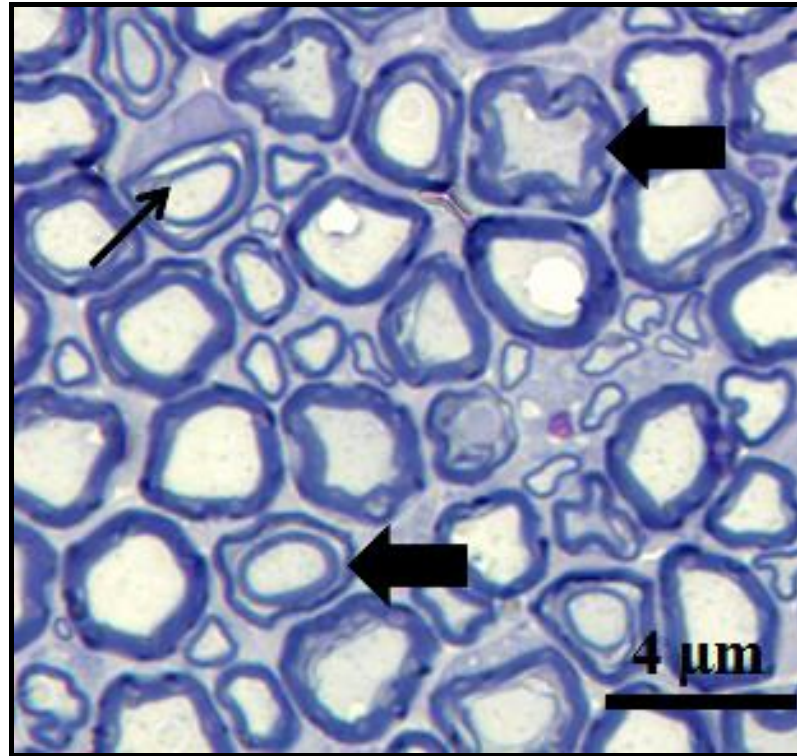
### **DS grubu**

DS grubundan elde edilen siyatik sinir yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin en dıştan epinörium ve altında daha ince perinörium çevrili olduğu izlendi. Epinöriumda fibröz bağ dokusu dışında kan damarları ve yağ hücrelerinin varlığı gözlemlendi (Resim 3.19).

Perinöriumun altında, içerisinde miyelinli aksonların belirgin olarak gözlemlendiği sinir fasikülü ayırt edildi. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında aksonun ve miyelin kılıfın dejenere olduğu, miyelin kılıfın normal konsantrik lamellar yapısının yer yer bozulduğu, miyelin kılıf lamellerinin birbirlerinden ayrıldıkları ve akson içerisine doğru invajine olduğu, bazı miyelinli aksonlarda ise miyelin kılıfın sinir lifi dışına doğru çıkıntı oluşturduğu görüldü. Aksonun büzüştüğü, akson ile miyelin kılıf arasında çeşitli büyüklüklerde vakuollerin meydana geldiği ve bazı aksonların ise tamamen dejenere olduğu dikkati çekti. Dejenerasyonun belirgin olduğu alanlarda miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfın aşırı şekilde kalınlaştığı görüldü. Miyelin kılıf dejenerasyonunun belirgin olduğu aksonlarda yapısal değişiklikler daha belirgin izlendi (Resim 3.20).



**Resim 3.19.** DS grubuna ait siyatik sinir kesiti (Ep:Epinöriyum).

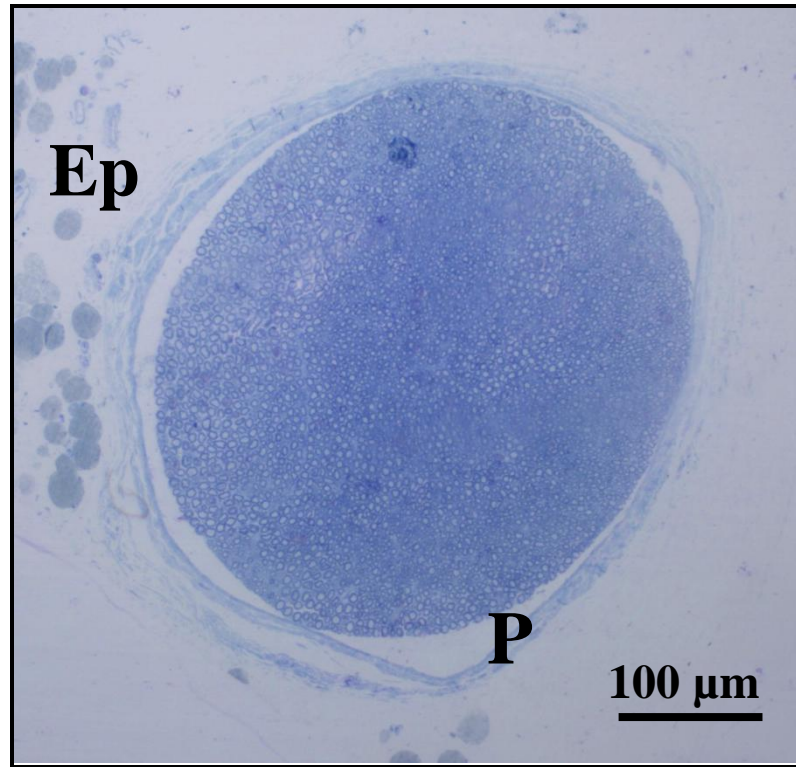


**Resim 3.20.** DS grubuna ait siyatik sinir kesiti, kalın oklar dejenere miyelin kılıfı, ok Schwann hücresi ile birlikte miyelinli aksonu göstermektedir.

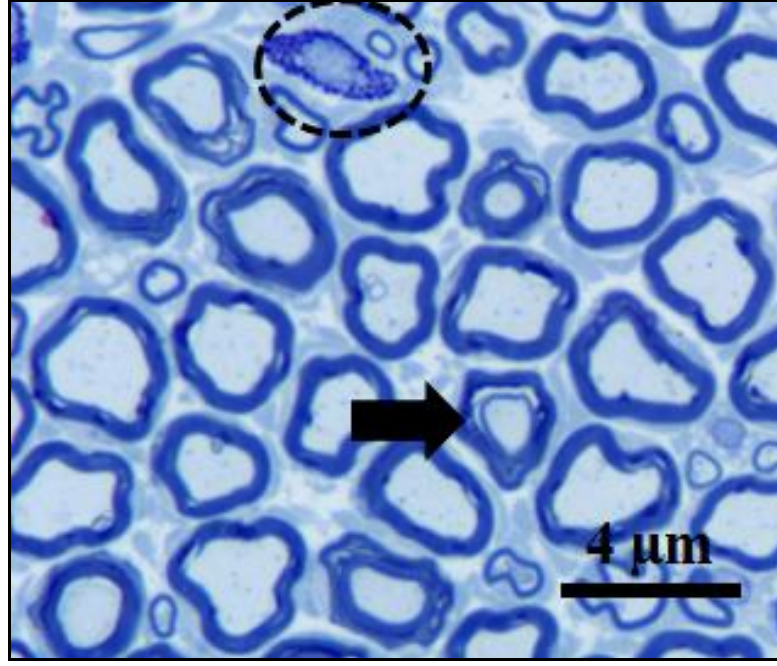
### **DS+MLT-10 grubu**

Bu gruba ait siyatik sinir yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan epinöriyum ve perinöriyum ile çevrili olduğu izlendi. Epinöriyumda fibröz bağ dokusu dışında kan damarları ve yağ hücrelerinin varlığı da gözlemlendi. Epinöriyumun altında, içerisinde sinir liflerinin bulunduğu unifasiküler sinir fasikülü ayırt edildi (Resim 3.21).

Miyelinli aksonların bazı alanlarda akson ve miyelin kılıf yapıları ile birlikte normal görünümde oldukları kaydedildi. Bununla beraber birçok miyelinli aksonda, akson etrafında yer alan miyelin kılıfın normal yapısının bozulduğu, miyelin kılıf ve aksonun dejenere oldukları gözlemlendi. Bazı alanlarda miyelinli sinir liflerinde hafif miyelin kılıf bozuklukları, bazı aksonlarda yapısal değişiklikler, Schwann hücrelerinde sitoplazmik vakuolizasyon gözlemlendi (Resim3.22).



**Resim 3.21.** DS+MLT-10 grubuna ait siyatik sinir kesiti.

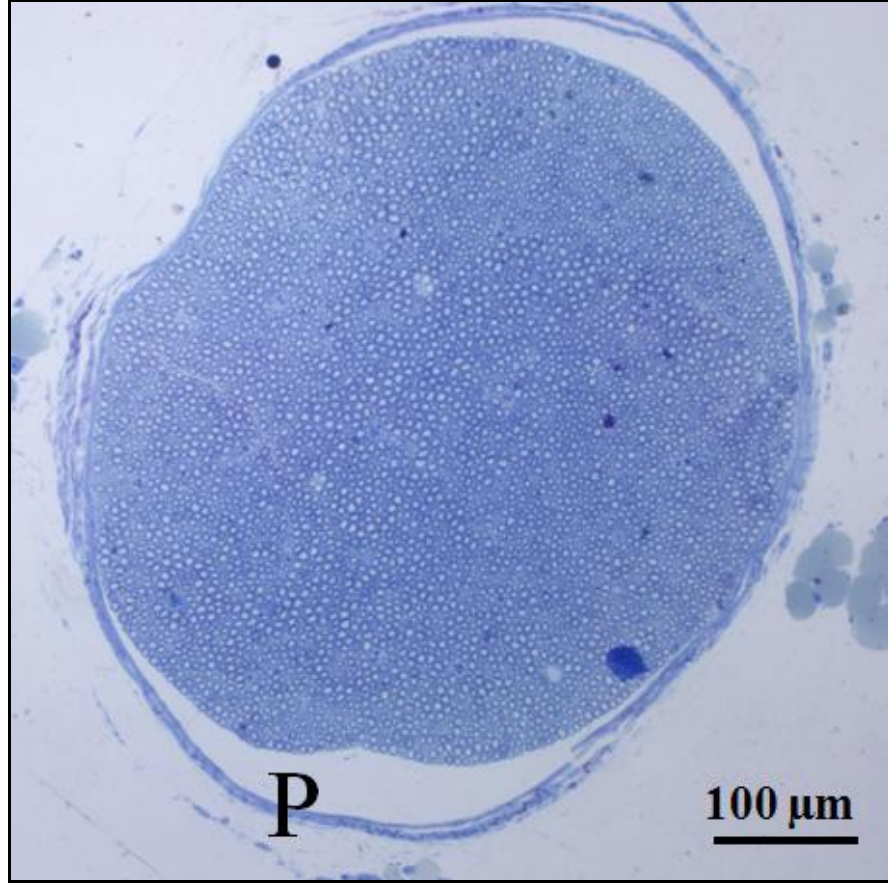


**Resim 3.22.** DS+MLT-10 grubuna ait siyatik sinir kesiti, kalın oklar dejenere miyelin kılıf, kesik çizgili daire içinde Mast hücresi görülmektedir.

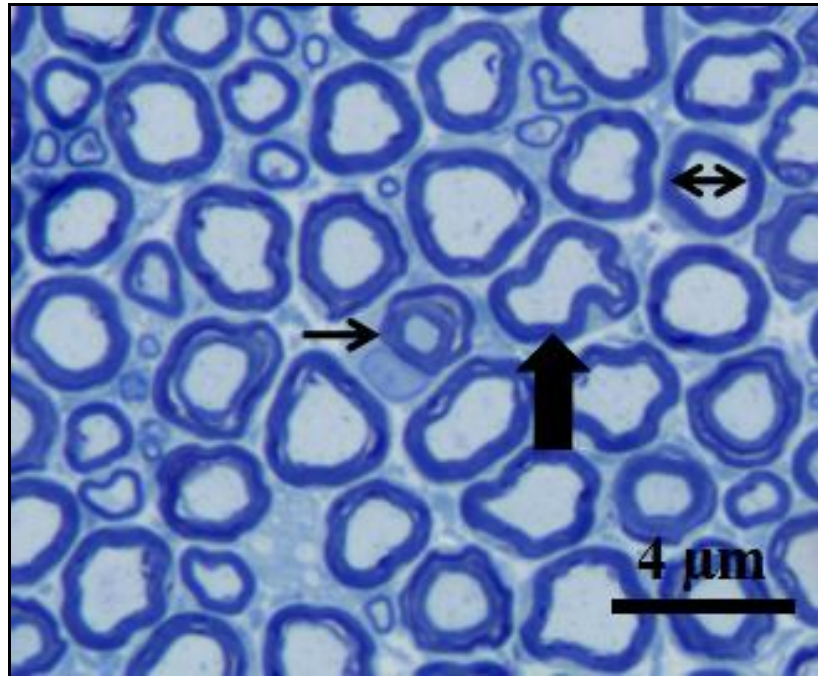
### **DS+MLT-50 grubu**

Bu gruba ait siyatik sinirin yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan fibröz bir bağ dokudan oluşan epinörium ve perinörium ile çevrili olduğu gözlemlendi. Epinöriumda fibröz bağ dokusu dışında kan damarları ve yağ hücrelerinin varlığı da gözlemlendi. Epinöriumun altında, içerisinde sinir liflerinin bulunduğu unifasiküler sinir fasikülü ayırt edildi (Resim 3.23).

Miyelinli sinir aksonlarının akson etrafında bir miyelin kılıf içerdikleri ayırt edildi. Bazı alanlarda miyelinli aksonlarda akson ve miyelin kılıfın dejenere oldukları görüldü. Miyelinli aksonlarda kısmi miyelin kılıf hasarları izlenmekle birlikte, çoğu alanlarda Schwann hücreleri ve aksonların normal yapılarını korudukları dikkati çekti. Dejenerasyonun belirgin olduğu alanlarda miyelinli aksonlarda miyelin kılıfın akson içerisine doğru invajinasyon oluşturduğu, aksonun büzüştüğü görüldü. Çoğu alanda miyelinli aksonlar, akson ve miyelin kılıf yapıları ile birlikte normal olarak değerlendirildi, özellikle küçük çaplı aksonlarda histolojik yapının nispeten korunduğu gözlemlendi (Resim 3.24).



**Resim 3.23.** DS+MLT-50 grubuna ait siyatik sinir kesiti.

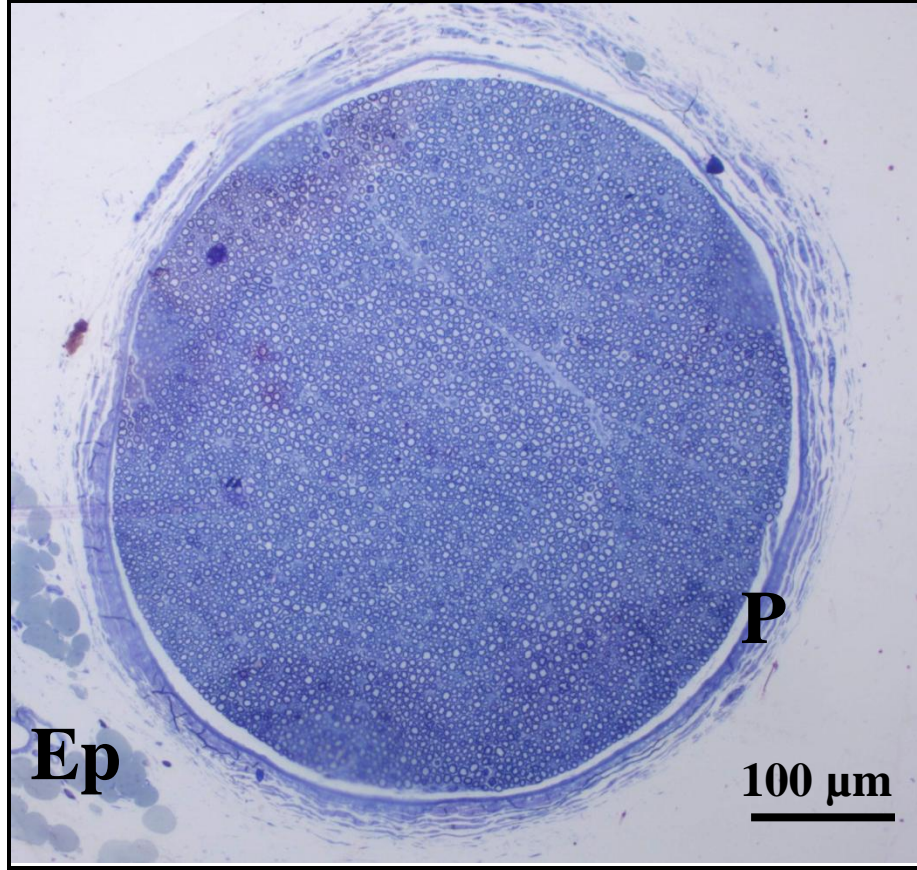


**Resim 3.24.** DS+MLT-50 grubuna ait siyatik sinir kesiti, kalın oklar dejenere miyelin kılıfı, ok Schwann hücresi ile birlikte miyelinli akson, çift taraflı ok normal miyelinli aksonu göstermektedir.

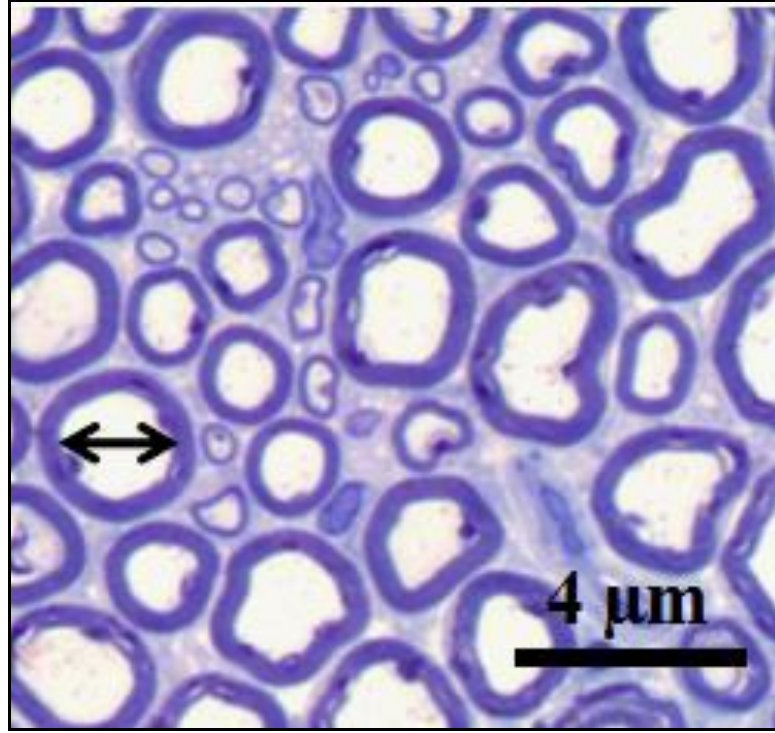
### MLT-10 grubu

MLT-10 verilen gruba ait sinirin yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan epinörium ve perinörium ile çevrili olduğu ve unifasiküler olduğu gözlemlendi (Resim 3.25).

Miyelinli aksonların akson etrafında bir miyelin kılıf içerdikleri ayırt edildi. Miyelinli sinir lifleri, akson ve miyelin kılıf yapıları ile birlikte normal olarak değerlendirildi. Çoğu alanda Schwann hücreleri ve aksonların normal yapılarını korudukları dikkati çekti. Özellikle küçük çaplı aksonlarda histolojik yapının korunduğu gözlemlendi. Miyelinli aksonlarda çoğu alanlarda, miyelin lamellerinin normal yapılarını korudukları izlendi (Resim 3.26).



**Resim 3.25.** MLT-10 grubuna ait siyatik sinir kesiti.

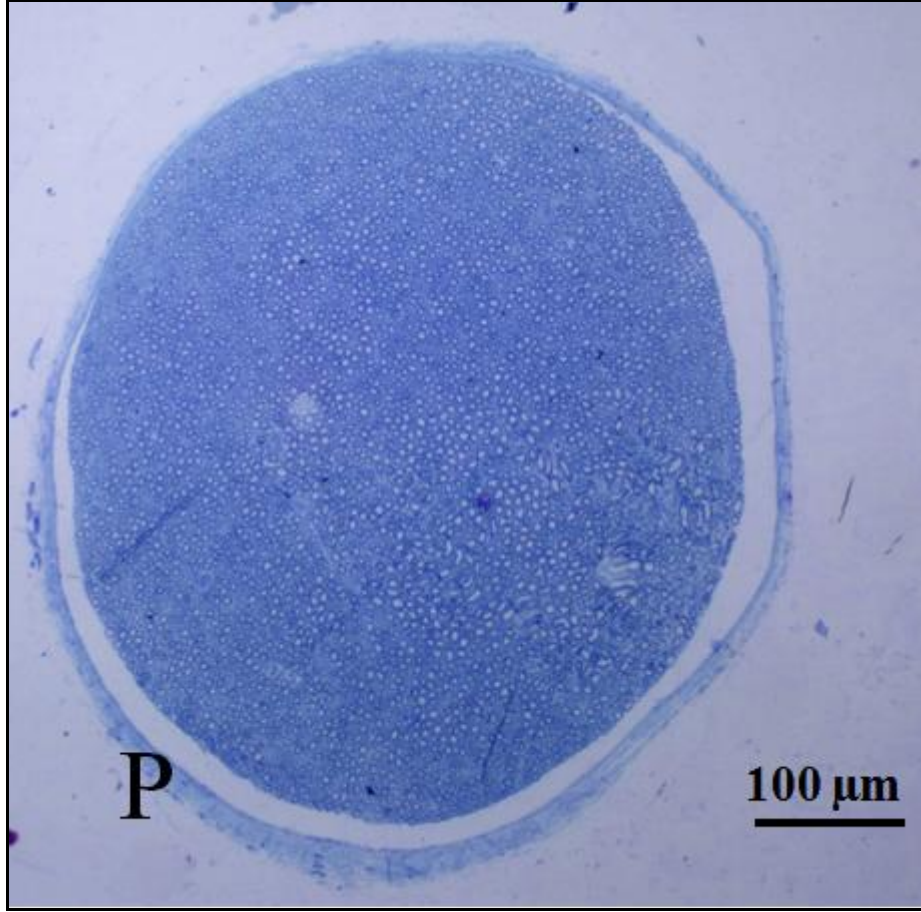


**Resim 3.26.** MLT-10 grubuna ait siyatik sinir kesiti, çift taraflı ok normal miyelinli aksonu göstermektedir.

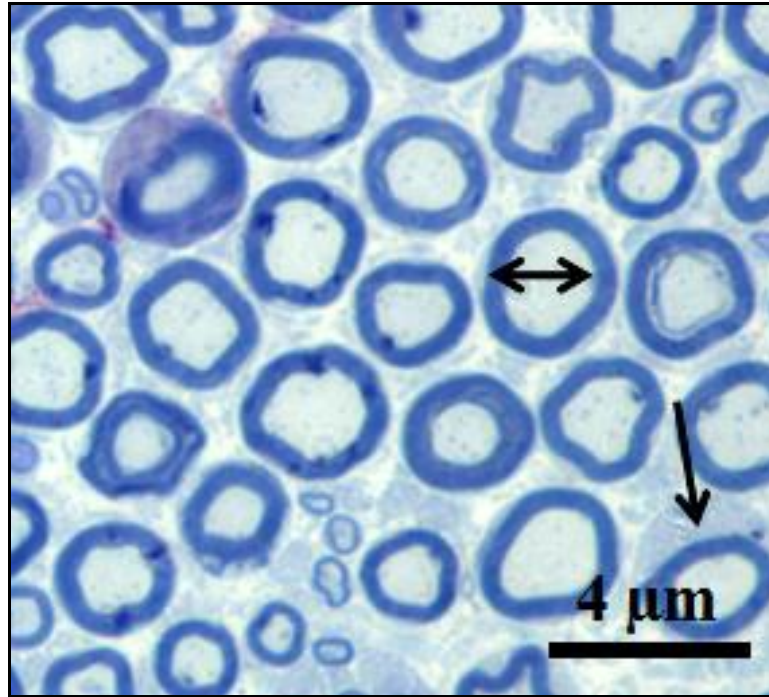
### **MLT-50 grubu**

MLT-50 uygulanan gruba ait siyatik sinirin yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan epinöryum adı verilen kalın fibröz bir bağ dokusu ve altında daha ince perinöryum ile çevrili olduğu izlendi (Resim 3.27).

Perinöryumdan kaynaklanan ince bir bağ dokusunun içerisinde aksonlar, Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülmüş halde, soluk renkli olarak izlendi. Miyelinli aksonlarda, Schwann hücreleri tarafından yapılan ve aksonu çevreleyen miyelin kılıf belirgin olarak izlendi. Miyelinli aksonların aralarında kan damarları da ayırt edildi (Resim 3.28).



**Resim 3.27.** MLT-50 grubuna ait siyatik sinir kesiti.



**Resim 3.28.** MLT-50 grubuna ait siyatik sinir kesiti, çift taraflı ok normal miyelinli akson, ok Schwann hücresi ile birlikte miyelinli aksonu göstermektedir.

Özetle; tüm histolojik bulgular değerlendirildiğinde, gebe dişi albino sıçanlarda klinik konsantrasyonlarda DS kullanımında, bu annelerden doğan yavruların periferik sinirlerinde ortaya çıkabilecek olası etkilerin araştırılması için yapılan çalışmalarda, DS kullanımına bağlı olarak miyelinli akson sayısının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düştüğü saptanmış ve bu olumsuz etkiler nedeniyle klinik uygulamalarda dikkat edilmesi gereken bir konu olduğu ortaya konmuştur. Bizim çalışmamız da daha önceki çalışmalar ile uyumlu sonuçlar vermiş ve literatürü desteklemiştir. Bu olumsuz etkileri azaltması beklentisi ile DS ile aynı dönemde uygulanan melatoninin de beklendiği gibi DS'un olumsuz etkilerini tamamen engellemese bile dikkate alınacak şekilde ortadan kaldırdığı gözlenmiştir. Melatonin bu olumlu etkisini DS ile kombine kullanıldığı gruplarda gösterirken tek başına kullanıldığı gruplarda kontrol grubu ile bir fark yaratmamıştır.

Çalışmamızda DS'a bağlı görülen bu olumsuz etkilerin gebelik döneminde enjeksiyona bağlı yaratılan stresden kaynaklanmadığı yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında ve oluşturduğumuz SF (SHAM) grubu ile ortaya konmuştur.

Çalışmamızda tespit ettiğimiz siyatik sinir üzerinde DS'un olumsuz etkilerine bağlı bulgular bu konuda daha önceden yapılmış çalışmalar ile paralellik göstermiştir. DS ile birlikte Melatonin uyguladığımız gruplardaki düzelmeler de bu iki grubun birlikte çalışıldığı ilk çalışma olması nedeni ile literatür ile karşılaştırılamasa da farklı ajanların periferik sinir üzerindeki olumsuz etkilerini önlemek amacıyla melatoninin kullanıldığı bir çok çalışma ile uyumlu çıkmıştır.

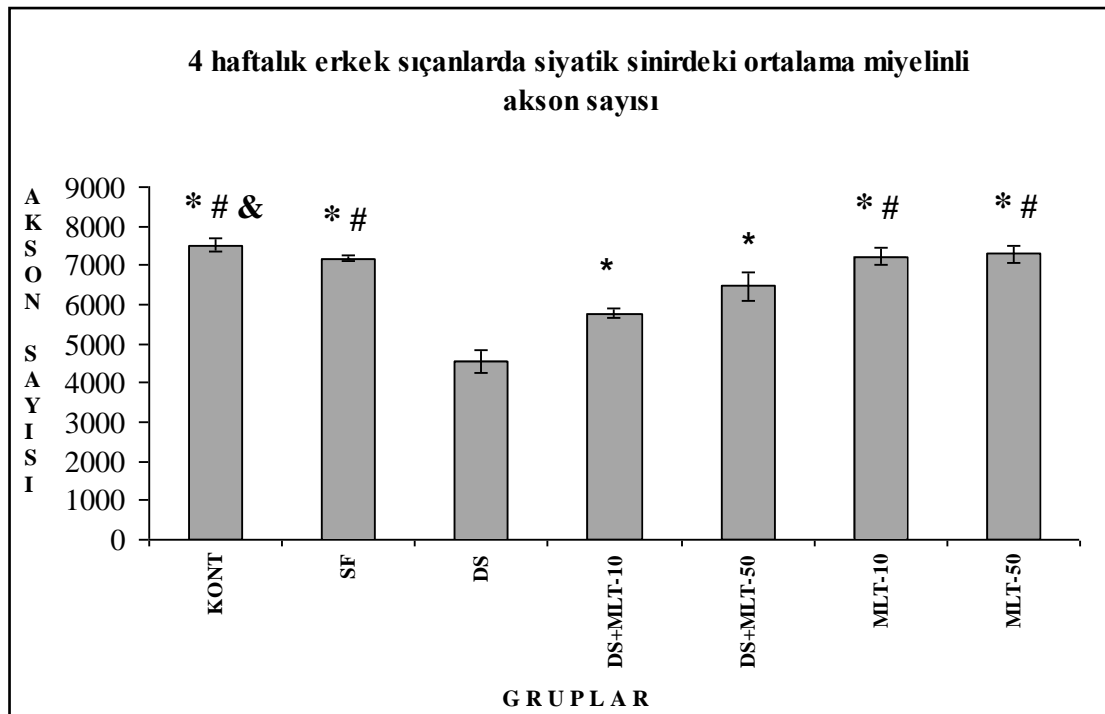
Işık mikroskop incelemelerine göre DS'dan kaynaklanan perinöral bariyerlerin dağılması, endonöral ödem formasyonu, aksonal dejenerasyon ve demyelinizasyon gibi morfolojik bulguların çoğu bizim çalışmamızda da görülmüştür. Özellikle bizim takip ve boyama yöntemimiz ile ışık mikroskopunda rahatça görünür hale gelen miyelinli aksonlardaki harabiyet dikkat çekicidir. Buna karşın DS ile birlikte Melatonin uygulanan gruplarda doza bağımlı olarak bu hasarların daha az ortaya çıktığı gözlenmiştir.

Diğer çalışmalarda görülen çok sayıda dejenerasyona uğramış miyelinli akson bizim çalışmamızda da gözlenmiş ve özellikle büyük çaplı miyelinli aksonlarda dejenerasyon meydana geldiği saptanmıştır.

### 3.3. Stereolojik Değerlendirme Bulguları

Dört haftalık sıçanların ortalama miyelinli akson sayıları, ortalama miyelinli akson alanı ve ortalama miyelin kılıf kalınlıkları grafikler ile verilmiştir.

Dört haftalık gruplardan elde edilen ortalama miyelinli akson sayısı kontrol grubunda;  $7520 \pm 165$ , SF (sham) grubunda;  $7180 \pm 69$ , DS grubunda;  $4537 \pm 278$ , DS+MLT-10 grubunda;  $5777 \pm 136$ , DS+MLT-50 grubunda;  $6479 \pm 366$ , MLT-10 grubunda;  $7221 \pm 225$ , ve MLT-50 grubunda;  $7288 \pm 235$  olarak bulundu (Grafik 3.1).

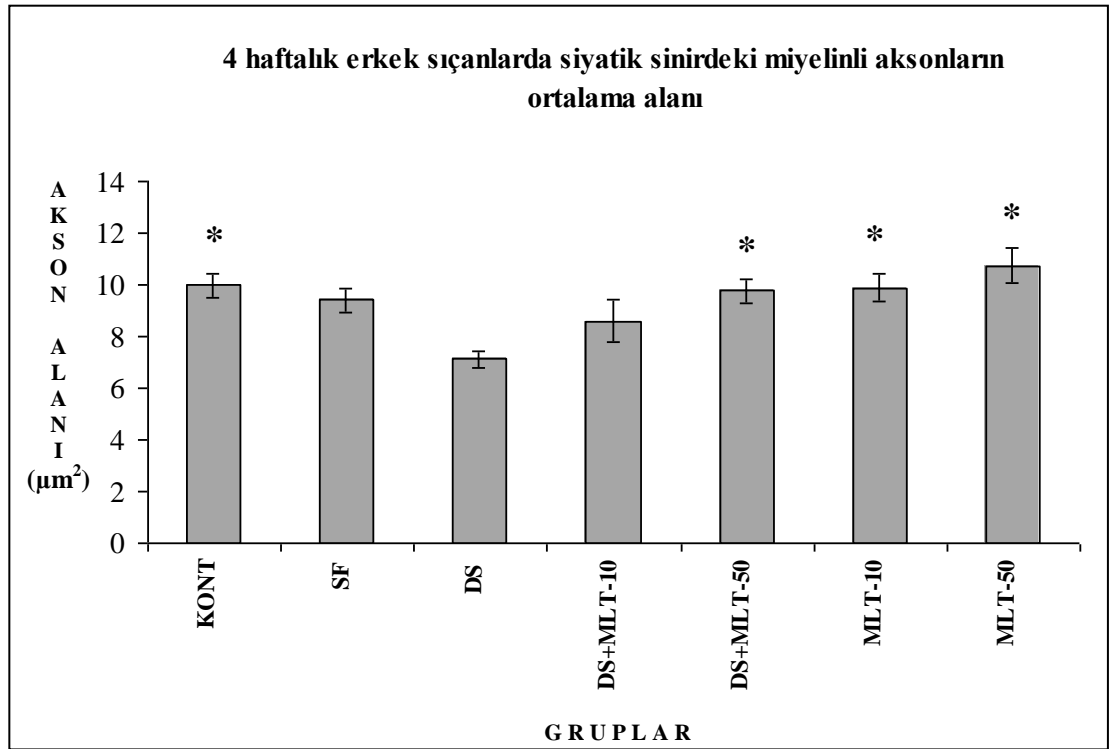


**Grafik 3.1.** Dört haftalık erkek sıçanların siyatik sinirlerindeki ortalama miyelinli akson sayıları. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiş. \* DS uygulanan grup ile Kontrol, SF, DS+MLT-10, DS+MLT-50, MLT-10 ve MLT-50 grupları arasındaki fark anlamlı ( $p < 0,05$ ) # DS+MLT-10 uygulanan grup ile Kontrol, SF, MLT-10 ve MLT-50 grupları arasındaki fark anlamlı ( $p < 0,05$ ) & DS+MLT-50 uygulanan grup ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ( $p < 0,05$ ).

Buna göre DS uygulanan grupta miyelinli akson sayısı Kontrol, SF (sham), DS+MLT-10, DS+MLT-50, MLT-10 ve MLT-50 gruplarına göre anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0,05$ ). DS+MLT-10 uygulanan grupta miyelinli akson sayısı DS uygulanan gruba göre anlamlı derecede artmış olmasına rağmen ( $p < 0,05$ ) Kontrol, SF, MLT-10 ve MLT-50 gruplarına göre hala anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0,05$ ). DS+MLT-50 uygulanan grupta miyelinli akson sayısı DS uygulanan gruba göre

anlamli derecede artmiş bulundu ( $p<0,05$ ) ama kontrol grubuna göre sayı hala anlamli derecede düşüktü ( $p<0,05$ ).

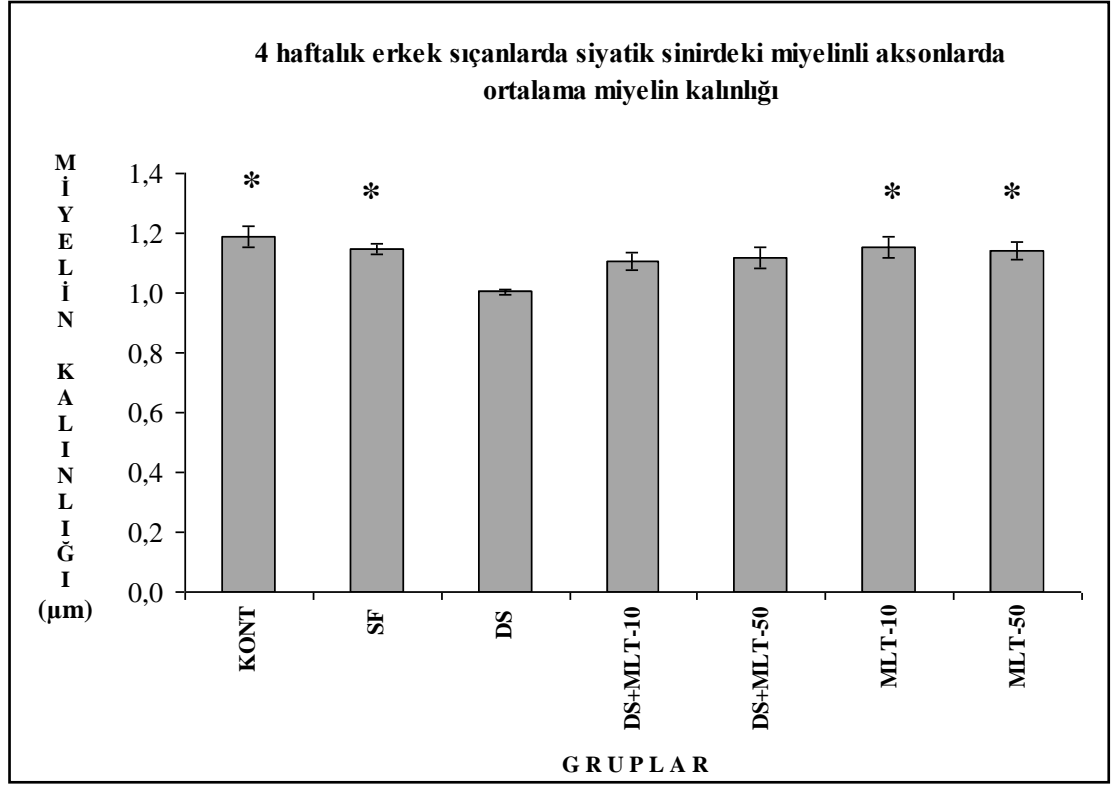
Dört haftalık gruplardan elde edilen ortalama miyelinli akson alanı kontrol grubunda;  $9,98\pm 0,47$ , SF (sham) grubunda;  $9,42\pm 0,47$ , DS grubunda;  $7,11\pm 0,32$ , DS+MLT-10 grubunda;  $8,60\pm 0,84$ , DS+MLT-50 grubunda;  $9,76\pm 0,47$ , MLT-10 grubunda;  $9,88\pm 0,52$ , ve MLT-50 grubunda;  $10,75\pm 0,71$  olarak bulundu (Grafik 3.2). DS uygulanan gruba ait siyatik sinirlerdeki miyelinli aksonların ortalama alanı Kontrol, DS+MLT-50, MLT-10 ve MLT-50 gruplarına göre anlamli derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ).



**Grafik 3.2.** Dört haftalık erkek sıçanların siyatik sinirlerindeki miyelinli aksonların ortalama alanları. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiş. \* DS uygulanan grup ile Kontrol, DS+MLT-50, MLT-10 ve MLT-50 grupları arasındaki fark anlamli ( $p<0,05$ )

Dört haftalık gruplardan elde edilen ortalama miyelin kılıf kalınlığı kontrol grubunda;  $1,19\pm 0,04$ , SF (sham) grubunda;  $1,15\pm 0,02$ , DS grubunda;  $1,00\pm 0,01$ , DS+MLT-10 grubunda;  $1,11\pm 0,03$ , DS+MLT-50 grubunda;  $1,12\pm 0,03$ , MLT-10 grubunda;  $1,15\pm 0,04$ , ve MLT-50 grubunda;  $1,14\pm 0,03$  olarak bulundu (Grafik 3.3). DS uygulanan gruba ait siyatik sinirlerdeki miyelinli aksonlara ait ortalama miyelin

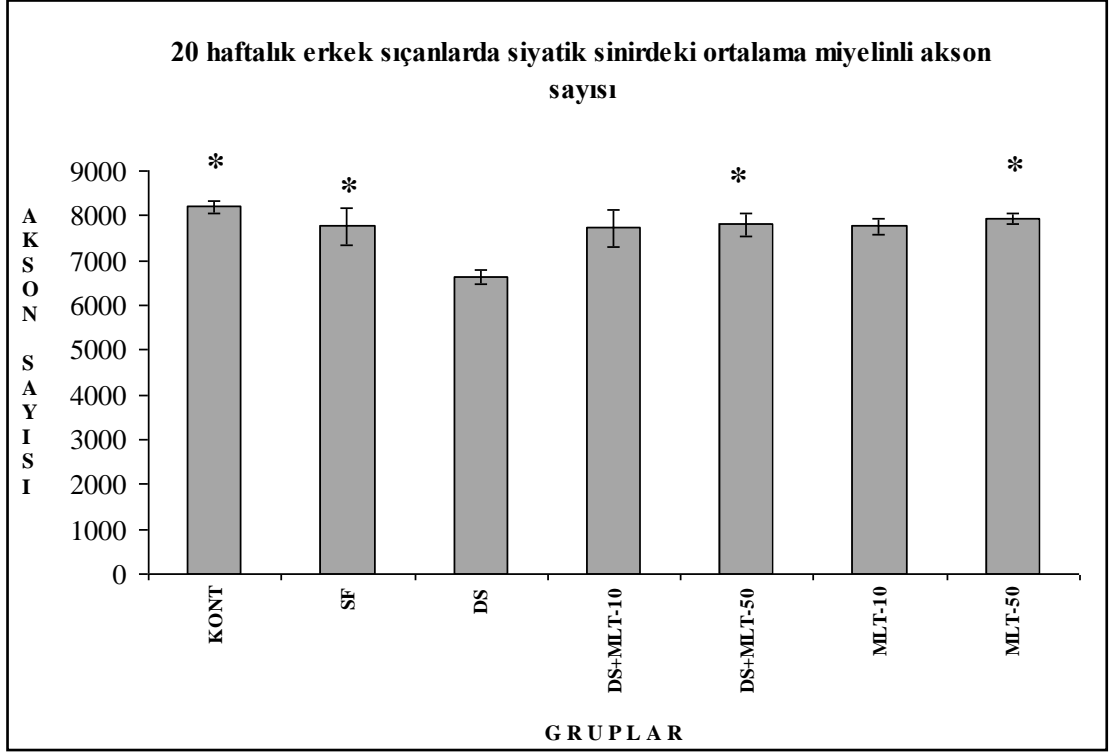
kalınlığı Kontrol, SF, MLT-10 ve MLT-50 gruplarına ait ortalama miyelin kalınlığından anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ).



**Grafik 3.3.** Dört haftalık erkek sıçanların siyatik sinirlerindeki miyelinli aksonların ortalama miyelin kalınlıkları. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiş. \* DS uygulanan grup ile Kontrol, SF, MLT-10 ve MLT-50 grupları arasındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ).

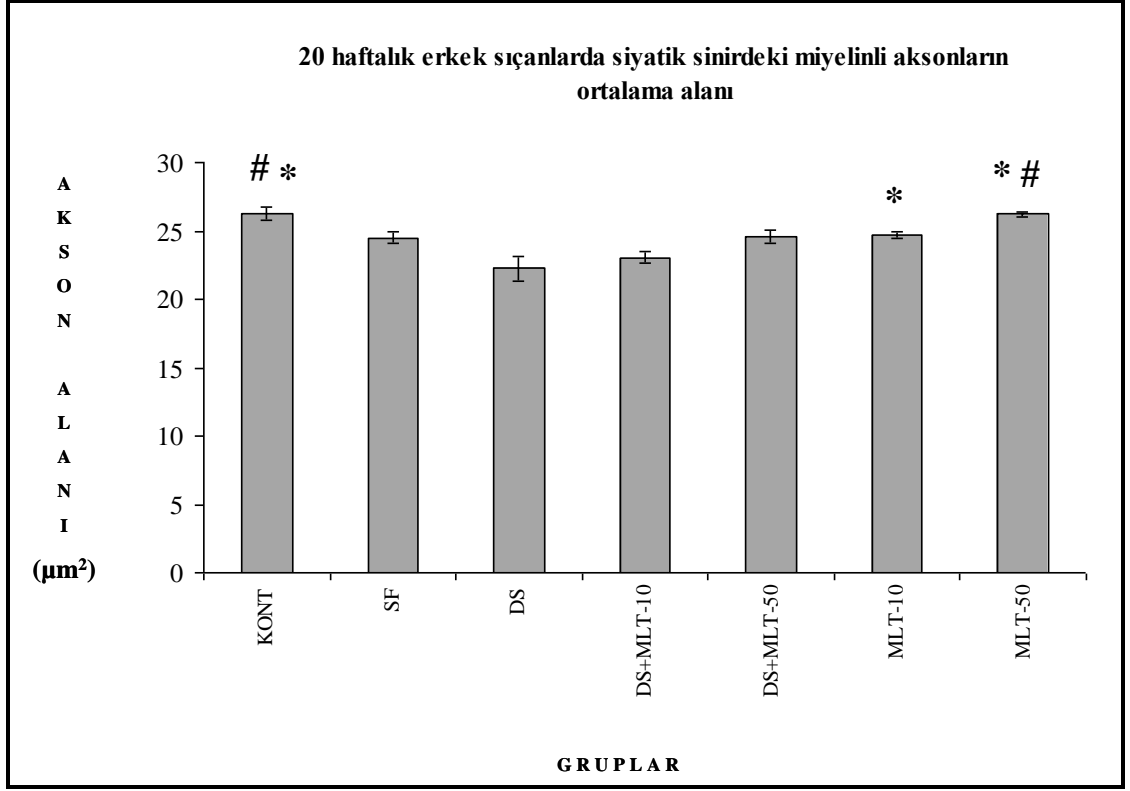
Yirmi haftalık sıçanların ortalama miyelinli akson sayıları, ortalama miyelinli akson alanı ve ortalama miyelin kılıf kalınlıkları grafikler ile gösterilmiştir.

Yirmi haftalık gruplardan elde edilen ortalama miyelinli akson sayısı kontrol grubunda;  $8199\pm128$ , SF (sham) grubunda;  $7758\pm414$ , DS grubunda;  $6636\pm147$ , DS+MLT-10 grubunda;  $7727\pm405$ , DS+MLT-50 grubunda;  $7802\pm249$ , MLT-10 grubunda;  $7763\pm189$ , ve MLT-50 grubunda;  $7918\pm121$  olarak bulundu (Grafik 3.4). DS uygulanan gruba ait siyatik sinirlerdeki ortalama miyelinli akson sayısı Kontrol, SF (sham), DS+MLT-50 ve MLT-50 gruplarındaki ortalama miyelinli akson sayısından anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ).



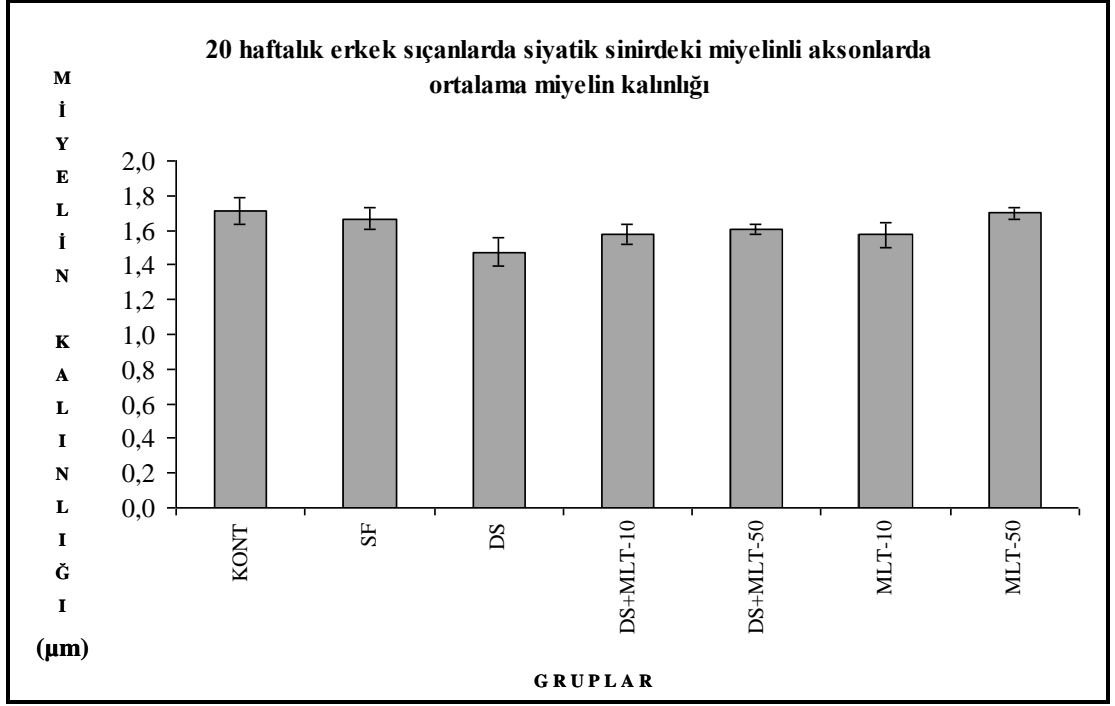
**Grafik 3.4.** Yirmi haftalık erkek sıçanların siyatik sinirlerindeki ortalama miyelinli akson sayıları. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiş. \* DS uygulanan grup ile Kontrol, SF, DS+MLT-50 ve MLT-50 grupları arasındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ).

Yirmi haftalık gruplardan elde edilen ortalama miyelinli akson alanı kontrol grubunda;  $26,26\pm 0,48$ , SF (sham) grubunda;  $24,51\pm 0,48$ , DS grubunda;  $22,26\pm 0,93$ , DS+MLT-10 grubunda;  $23,05\pm 0,43$ , DS+MLT-50 grubunda;  $24,57\pm 0,48$ , MLT-10 grubunda;  $24,70\pm 0,29$ , ve MLT-50 grubunda;  $26,21\pm 0,21$  olarak bulundu (Grafik 3.5). DS uygulanan gruba ait siyatik sinirdeki miyelinli aksonların ortalama alanı Kontrol, MLT-10 ve MLT-50 gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Aynı zamanda DS+MLT-10 gruba ait siyatik sinirdeki miyelinli aksonların ortalama alanı Kontrol ve MLT-50 gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ).



**Grafik 3.5.** Yirmi haftalık erkek sıçanların siyatik sinirlerindeki miyelinli aksonların ortalama alanları. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiş. \* DS uygulanan grup ile Kontrol, MLT-10 ve MLT-50 grupları arasındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ). # DS+MLT-10 grubu ile Kontrol ve MLT-50 grupları arasındaki fark anlamlı ( $p<0,05$ ).

Yirmi haftalık gruplardan elde edilen ortalama miyelin kılıf kalınlığı kontrol grubunda;  $1,71\pm 0,08$ , SF (sham) grubunda;  $1,67\pm 0,06$ , DS grubunda;  $1,48\pm 0,08$ , DS+MLT-10 grubunda;  $1,57\pm 0,06$ , DS+MLT-50 grubunda;  $1,61\pm 0,03$ , MLT-10 grubunda;  $1,57\pm 0,07$ , ve MLT-50 grubunda;  $1,70\pm 0,03$  olarak bulundu (Grafik 3.6). Gruplar arasında ortalama miyelin kalınlığı açısından anlamlı bir fark bulunmadı.



**Grafik 3.6.** Yirmi haftalık erkek ratların siyatik sinirlerindeki miyelinli aksonların ortalama miyelin kalınlıklarının karşılaştırılması. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiş.

#### 4. TARTIŞMA

Yeni kullanıma sunulan bir ilaç için hamile ya da emziren annelerde ilaç çalışmaları yapılamamaktadır. Bu yüzden gebelikte ve emziren annelerde ilaçların güvenli kullanım çalışmaları sadece deneysel ve prelinik hayvan çalışmaları ile gerçekleştirilmektedir. İnsanlardan elde edilen deneyimler ise sadece ilacın farkında olunmadan kullanımı sonrası yaşanan tecrübelerle sınırlıdır. Diğer önemli bir husus ise bir ilaca prenatal maruz kalmanın etkisinin hayatın ileri dönemlerinde ortaya çıkabilmesidir. Deneysel hayvan çalışmalarında prenatal – antenatal ilaca maruz kalmanın uzun dönemli etkilerini incelemek ise her zaman mümkün olmamaktadır.

NSAİ ilaçlara maruz kalmanın ovulasyona etkileri ve potansiyel mutojenik ve teratojenik etkileri konusunda bilgi ve deneyimler diğer ilaçlar ile kıyaslandığında nispeten daha fazladır. Danimarka'dan vaka kontrol çalışması NSAİ ilaç kullanımı ile düşük arasında bir ilişki olduğunu rapor etmektedir (Nielsen ve ark 2001). Bu etkiye neden olarak NSAİ ilaçların implantasyona ve plasental dolaşıma olan olumsuz etkileri gösterilmektedir. Carp ve ark (1988) DS'un sıçanlarda implantasyona ve embriyonik gelişmeye olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında yüksek dozlarda DS'un embriyolar için toksik olduğunu, 3mg/kg dozunda DS'un blastosist implantasyonunu engellediğini göstermişlerdir. DS 4mg/kg dozda sıçanlara, 1-4 mg/kg dozda farelere uygulandığında, fetüs kaburgalarında defekt geliştiği bildirilmiştir (Needs ve Brooks 1985).

NSAİ ilaçların gebelikte uzun süreli kullanımı gebelik ve doğum süresini uzatmaktadır. Normal doğumun gerçekleşmesi için uterusun servikal maturasyonunu tamamlaması gerekir. Glikozaminoglikanlar özellikle PGE2 ve eikosanoidlerce etkilenecek servikal olgunlaşmaya iştirak ederler. PGE2 servikal heparan sülfat konsantrasyonunu artırır. DS, siklooksijenazı inhibe ederek heparan sülfat konsantrasyonunu azaltır. Bunun sonucu olarak da gebelik süresi ve doğum eyleminin uzamasına neden olur. Deneysel çalışmalarda sıçanların normal gebelik süresi NSAİ ilaçlar ile 21-23 günden 28-29 güne kadar uzamaktadır (Dawood 1993).

Ostensen (1998) DS'un insan plasentasından fetusa birinci ve ikinci trimesterde geçtiğini ilk gözlemleyen araştırmacıdır. DS'a prenatal maruziyetin

yenidoğan ratların santral sinir sistemi üzerine olumsuz etkileri ilk olarak Gökçimen ve ark (2007) tarafından gösterilmiştir. Gökçimen ve ark (2007) yaptıkları çalışmada prenatal DS uygulamasının hipokampus piramidal ve granüler hücreleri için nörotoksik olduğunu göstermişlerdir. Rağbetli ve ark (2007) DS'un erkek serebellum Purkinje hücrelerinde nörotoksik etki gösterdiğini bulmuşlardır. Kusuhara ve ark (1998) NSAİ ilaçların hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, hücre siklusunu durdurduğunu ve apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir.

Kudo ve ark (2003)' nın çalışmasında DS'un in vitro şartlarda NSC üzerindeki etkisini inceleyen önemli bir çalışmadır. NSC'ler multipotent ve kendilerini yenileyebilen progenitör hücrelerdir. Bu hücreler uygun şartlarda nöronlara ve glia hücrelerine diferansiye olurlar. Sadece gelişmekte olan sinir sistemlerinde değil ayrıca erişkin sinir sisteminde de bulunurlar. Yazarlar bu çalışmada sadece DS'un doza bağımlı olarak NSC'lerin nöronlara diferansiyasyonunu engellediğini, apoptozisi indükleyerek proliferasyonunu engellediğini gözlemlediler. İbuprofen, naproksen, aspirin ve indometesin gibi diğer NSAİ ilaçların benzer etkiye sahip olmadığını gözlemlediler. DS'un NSC apoptozisini indüklemesi kaspaz kaskatın aktivasyonu ile olmaktadır. Özellikle kaspaz kaskatın en önemli proteolitik enzimi olan kaspaz -3 aktive olmaktadır. DS'un diğer NSAİ ilaçlar ile gözlenmeyen bu etkilerinin olası nedeni olarak yazarlar DS'un diğer NSAİ ilaçlara nazaran COX-3 inhibisyonunun daha fazla olmasını göstermektedirler. Diğer olası mekanizması ise diğer NSAİ ilaçların sadece COX inhibisyonu yaparak AA'i lipooksijenaz (LOX) yoluna yönlendirerek prostaglandin seviyelerini azaltırken lökotrien seviyelerini artırmalarıdır (Rao ve Knaus 2008). DS ise hem COX hem de LOX yollarını inhibe ederek hem prostaglandin hem de lökotrien seviyelerini azaltmaktadır. Lökotrienler hücre yaşamı için gerekli sinyalleri indüklemektedirler. DS lökotrien seviyelerini azaltarak NSC için gerekli sinyallerin oluşmasını engellemektedir (Kudo ve ark 2003). Bu bulgular DS'un gelişmekte olan sinir sistemi üzerinde teratojenik etkisi olabileceğini işaret etmekte olup, DS'un NSC'ler üzerindeki olumsuz etkilerini daha net açıklanmaya gerek bulunmaktadır.

Kudo ve ark (2003)'nın çalışmasından yola çıkarak Canan ve ark (2008) gebelik boyunca tüketilen DS'un gelişmekte olan periferik sinirler üzerinde etkisi olup olmadığını inceleyen çalışmalarını yayınladılar. Bu çalışmalarında postnatal

yaşamın 5. Gününden doğuma kadar (21.gün) gebe sıçanlara günde 1mg/kg DS enjeksiyonu gerçekleştirdiler. Daha sonra yenidoğan sıçanların siyatik sinirlerinin histolojik yapılarını yaşamlarının dördüncü haftasında kontrol grupları ile kıyasladılar. Yazarlar DS'a prenatal maruziyetin akson sayısını ve akson çapını kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalttığını gösterdiler.

DS'un NSC'lerin apoptozisine neden olup diferansiye olmalarını engellediği gösterilirken diğer taraftan başka araştırmacılar ise melatoninin tam tersi etki göstererek NSC apoptozisini engellediğini ve nöronlara diferansiye olmalarını uyardığını göstermişlerdir. Melatoninin bu etkisi ilk olarak Moriya ve ark (2007) tarafından yayınlanmıştır. Yazarlar in vitro şartlarda melatoninin farmakolojik dozlarda (1–100 µM) uygulama süresi ile doğru orantılı olarak NSC proliferasyonunu ve nöral diferansiyasyonu artırdığını bildirmişlerdir. Daha sonra Sothibundhu ve ark (2010) erişkin sıçanların NSC'lerinde de melatoninin aynı etkiyi gösterdiğini ve bu etkinin melatonin reseptör antagonisti luzindole ile engellendiğini gösteren bulgularını yayınladılar. Luzindol ile melatoninin NSC üzerindeki etkilerinin azalması, melatoninin NSC üzerindeki etkilerinin MT-1 reseptörü üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektedir. Fu ve ark (2011) ise hipoksik bırakılmış sıçanlarda azalan NSC miktarının melatonin uygulanması ile tekrar normal seviyelere geldiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada yazarlar ayrıca melatonin uygulamasının Bcl-2/Bax oranında anlamlı artışa neden olduğunu ve kaspaz -3 aktivasyonunu inhibe ettiğini de göstermiş ve apoptozis insidansının azaldığını vurgulamışlardır.

Canan ve ark (2008) prenatal DS maruziyeti sonrası gelişmekte olan fetüsün periferik sinir sisteminde akson sayısının ve çapının azaldığını göstermeleri üzerine, bu maruziyete kalmış sıçanların periferik sinir sistemlerinde meydana gelen etkileri azaltmak için, nöroprotektif etkileri ispatlanmış olan melatoninin kullanılması bu çalışmanın incelemek istediği esas amaç olmuştur. Mevcut çalışma DS maruziyetinin sıçanlarda akson sayısını ve akson çapını azalttığını ve etkilerin melatonin profilaksisi ile engellendiğini stereolojik analiz ile göstermektedir. Buna neden olan mekanizma kanımızca DS'un embriyonik NSC'ler üzerinde neden olduğu apoptozisin ve engellediği nöronal diferansiyasyonun, her türlü vücut sıvısına rahatlıkla geçen melatonin tarafından geri kazandırılması ya da baştan

engellenmesidir. Bu sürecin işleyiş biçiminin moleküler yollarını ortaya çıkarmak başka bir çalışmanın hedefi olacaktır. Ama melatoninin Bcl-2/Bax oranını artırması, kaspaz -3 aktivasyonunu inhibe etmesi, apoptosisi önleyici etkisi, nöronal lipid peroksidasyonunu antioksidan etkisi ile engellemesi, glutatyon peroksidaz enzimini stimüle etmesi, nNOS aktivitesini inhibe etmesi, iskemi reperfüzyon injurisini azaltması kısaca melatoninin ispatlanmış tüm nöroprotektif etkileri etkili olmuş olabilir.

## **5. SONUÇ VE ÖNERİLER**

- NSC aktivitesini regüle eden moleküllerin tanımlanması hem doğuştan hem de sonradan kazanılan sinir hastalıklarının tedavisinde yeni yaklaşımların kazanılmasına neden olabilir.
- Melatonin bu alanda umut vaat eden bir moleküldür.
- DS'un gebeliğin ilk trimesterinde kullanımında çok dikkat edilmelidir.

## 6. ÖZET

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### Nonsteroidal Antiinflatuar İlaça Prenatal Maruz Kalmanın Periferik Sinir Gelişimi Üzerindeki Olumsuz Etkilerine Karşı Melatoninin Nöroprotektif Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Dr. İlknur KESKİN

Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2011

Bu çalışmada, gebelik döneminde kullanılan diklofenak sodyum'un (DS) fetal periferik sinir sistemi gelişimindeki olumsuz etkilerini engellemek ya da azaltmak amacı ile kullanılan melatoninin nöroprotektif etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

84 gebe dişi sıçan 12 rattan oluşan 7 gruba rastgele dağıtılarak sırası ile kontrol grubu, 1mg/kg/gün DS (Voltaren 75 mg/3 ml.) uygulanan grup, DS ve düşük doz (10 mg/kg ) melatonin grubu, DS ve yüksek doz (50 mg/kg) melatonin grubu, sadece düşük doz (10 mg/kg ) melatonin grubu, sadece yüksek doz (50 mg/kg) melatonin grubu ve sadece serum fizyolojik uygulanan grup oluşturuldu. 21-28 günlük gebelik sürecinin ardından sadece erkek yenidoğan sıçanlar takip edildi. Her gruptan 4 haftalık büyüklüğe erişmiş 6 sıçan (toplam 42 sıçan) ve daha sonra 20 haftalık olmuş her gruptan 6 sıçan (toplam 42 sıçan) sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen sıçanların siyatik sinirlerinden alınan segmentler ışık mikroskopi ve stereolojik analiz için hazırlandı. Sistemik rastgele örnekleme ile grupların ortalama akson sayıları, miyelinli aksonların alanları ve miyelin kalınlıkları ölçüldü.

Hem dört haftalık hem de yirmi haftalık sıçanlarda DS uygulanması akson sayılarını, miyelinli aksonların alanlarını ve miyelin kalınlığını kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttı ( $p<0,05$ ). Dört haftalık sıçanlarda DS ile birlikte melatonin uygulandığında her iki dozda da akson sayısı sadece DS uygulanan sıçanlara göre anlamlı olacak şekilde arttı ( $p<0,05$ ). Dördüncü haftada DS ile yüksek dozda melatonin uygulanan grupta ölçülen miyelinli akson alanı sadece DS uygulanan sıçanlara göre anlamlı derecede fazla idi ( $p<0,05$ ). Düşük doz melatonin ile bu şekilde bir artış sağlanmadı ( $p>0,05$ ). Her iki dozda melatonin uygulanması DS'un azalttığı miyelin kalınlığını anlamlı derecede artırmadı ( $p>0,05$ ). Yirminci hafta ratlarında DS ile melatonin uygulamasının elde ettiği düzelme miktarları sadece DS uygulamasına göre yeteri kadar anlamlı olmadı ( $p>0,05$ ).

Mevcut çalışma DS maruziyetinin sıçanlarda akson sayısını ve akson alanını azalttığını ve etkilerin melatonin profilaksisi ile engellendiğini stereolojik analiz ile göstermektedir. Buna neden olan mekanizma kanımızca DS'un embriyonik NSC'ler üzerinde neden olduğu apoptozisin ve engellediği nöronal diferansiyonun, melatonin tarafından geri kazandırılması ya da baştan engellenmesidir. Bu sürecin işleyiş biçiminin moleküler yollarını ortaya çıkarmak başka bir çalışmanın hedefi olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** sinir lifi; melatonin; diklofenak; yenidoğan

## 7. SUMMARY

### **An Evaluation of Neuroprotective Effects of Melatonin Against Adverse Effects of Prenatal Exposure to a Non-Steroidal Anti Inflammatory Drug During the Peripheral Nerve Development**

In the present study, neuroprotective effect of melatonin was investigated to prevent or decrease the impairment of fetal peripheral nerve system due to maternal consumption of diclofenac sodium (DS) during pregnancy

Eighty four pregnant rats were randomly divided to 7 groups, each containing 12 rats. Groups were assigned as control group, DS 1mg/kg/day (Voltaren 75 mg/3 ml) administered group, DS with low dose (10 mg/kg ) melatonin administered group, DS with high dose (50 mg/kg ) melatonin administered group, only low dose melatonin administered group, only high dose melatonin administered group and saline administered group. After pregnancy period of 21 to 28 days only male new born rats were included to the study. Six rats that reached to 4 weeks of age from each group and later six other rats from each group that reached to 20 weeks of age were sacrificed. Sciatic nerves of these rats were harvested for further light microscopy and stereological analysis. With systemic random sampling approach mean axon numbers, myelinated axon diameter, and myelin thicknesses were measured.

Both four weeks old and twenty weeks old rats that prenatal DS exposure had significantly low axon number, myelin axon diameter and myelin thickness compared to control groups ( $p < 0,05$ ). When melatonin was administered in low or high doses with DS the number of axons had significantly increased compared only DS administered rats ( $p < 0,05$ ). Four weeks old rat that had DS administration with high dose melatonin had significant increase in myelinated axon diameter compared to only DS administered group ( $p < 0,05$ ). Low dose melatonin administration did not have similar effect ( $p > 0,05$ ). Melatonin administration either with low or high doses did not increased the effect of DS on myelin thickness ( $p > 0,05$ ). In 20 weeks old rats did not had significant improvement with melatonin administration compared to only DS administered group ( $p > 0,05$ ).

Current study proves with stereological analysis that the prenatal exposure to DS decreases axon number and axon diameter and these effects can be reversed with melatonin prophylaxis in rats. The mechanisms for such effect are believed to be by the apoptotic effect and inhibition of differentiation of DS on embryonic NSC's is either prevented from the beginning or reversed afterwards. The molecular pathway of such process is going to be the aim of the upcoming studies.

**Key Words:** nerve fiber; melatonin; diclofenak; new born

## 8. KAYNAKLAR

1. Acosta MC, Luna C, Graff G, Meseguer VM, Viana F, Gallar J, Belmonte C. Comparative effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nepafenac on corneal sensory nerve fibers responding to chemical irritation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:182-8.
2. Altun A, Vardar A, Altun BU. Melatonin and the cardiovascular system. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2001;1:283-8.
3. Altun A, Yaprak M, Aktoz M, Vardar A, Betul UA, Ozbay G. Impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with cardiac syndrome X. *Neurosci Lett.* 2002;327:143-5.
4. Ando A, Domodo T, Tsumori T, Yasui Y. Changes of NADPH-diaphorase activity in the lumbosacral intermediolateral neurons of the rat after pelvic axotomy. *Brain Res Bull.* 1996;40:37-42.
5. Andreasson KI, Savonenko A, Vidensky S, Goellner JJ, Zhang Y, Shaffer A, Kaufmann WE, Worley PF, Isakson P, Markowska AL. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J Neurosci.* 2001;15:8198-209.
6. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:573-89.
7. Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrinol.* 1988;29:205-29.
8. Arendt J. Melatonin and human rhythms. *Chronobiol Int.* 2006;23(1-2):21-37.
9. Armstrong SM, Redman JR. Melatonin: a chronobiotic with anti-aging properties? *Med Hypotheses.* 1991;34:300-9.
10. Asato F, Butler M, Blomberg H, Gordh T. Variation in sciatic nerve anatomy: implications for a rat model of neuropathic pain. *J Peripher Nerv Syst.* 2000;5:19-21.
11. Bağdatoğlu C, Saray A, Sürücü HS, Öztürk H, Tamer L. Effect of trapidil in ischemia-reperfusion injury of peripheral nerves. *Neurosurgery.* 2002;51:212-20.
12. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques.* Fifth Edition. Churchill Livingstone, Elsevier 2002.
13. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.* 1995;26:497-502.
14. Bediz CŞ, Baltacı AK, Moğulkoç R, Ateş A. Ratlarda çinko eksikliği ve takviyesinin plazma melatonin düzeylerine etkisi. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2002;22:101-4.
15. Brushart TM. *Nerve repair and grafting. Operative Hand Surgery.* Green DP(ed) Churchill Livingstone. New York. 1999:1381-1403.
16. Burnstock G, Milner P. *Nervous System 38th edition.* Churchill Livingstone. NY. 1995:902-1327.
17. Cagnacci A, Volpe A. Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. *J Endocrinol Invest.* 1996;19:382-411.
18. Canan S, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Toplam Hacim, Hacim Yoğunluğu ve Hacim Oranlarının Hesaplanmasında Kullanılan Bir Stereolojik Yöntem: Cavalieri Prensibi. *Türk Hekimler Birliği Vakfı Türkiye Klinikleri Tıp bilimleri Dergisi Özel Sayısı; Stereolojide Temel Kavram ve Yöntemler.* 2002;22(1-Ek):7-14.
19. Canan S, Bahadır A, Yıldırım S, Odacı E, Şahin B, Baş O, Çolakoğlu S, Bilgiç S, Kaplan S. Stereolojik uygulamalarda kullanılan pratik gereçler ve bilgisayar destekli stereolojik analiz cihazları. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2004;24:672-80.
20. Canan S, Aktaş A, Ulkay MB, Colakoglu S, Ragbetli MC, Ayyildiz M, Geuna S, Kaplan S. Prenatal exposure to a non-steroidal anti-inflammatory drug or saline solution impairs sciatic nerve morphology: a stereological and histological study. *Int J Dev Neurosci.* 2008; 6:733-8.
21. Carp HJ, Fein A, Nebel L. Effect of diclofenac on implantation and embryonic development in the rat. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1988;28:273-7.
22. Cavallo A, Ristchel WA. Pharmacokinetics of melatonin in human sexual maturation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:1221-5.
23. Cervantes M, Moralı G, Letechipta-Vallejo G. Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain. *J Pineal Res.* 2008;45:1-7.
24. Chang HM, Ling EA, Lue JH, Wen CY, Shieh JY. Melatonin attenuates neuronal NADPH-d/NOS expression in the hypoglossal nucleus of adult rats following peripheral nerve injury. *Brain Res* 2000;873:243-51.

25. Chang HM, Huang YL, Lan CT, Wu UI, Hu ME, Youn SC. Melatonin preserves superoxide dismutase activity in hypoglossal motoneurons of adult rats following peripheral nerve injury. *J Pineal Res.* 2008;44:172-80.
26. Chen LD, Melchiorri D, Sewerynek E. Retinal lipid peroxidation in vitro is inhibited by melatonin. *Neuro Res Comm.* 1995;17:151-8.
27. Cook JC, Jacobson CF, Gao F, Tassinari MS, Hurtt ME, DeSesso JM. Analysis of the nonsteroidal anti-inflammatory drug literature for potential developmental toxicity in rats and rabbits. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2003;68:5-26.
28. Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 2003;56:103-112
29. Dağlioğlu E, Serdar Dike M, Kiliç K, Erdoğan D, Take G, Ergüngör F, Okay O, Bıyıklı Z. Neuroprotective effect of melatonin on experimental peripheral nerve injury: an electron microscopic and biochemical study. *Cen Eur Neurosurg.* 2009;70:109-14
30. Dawood MY. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and reproduction. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169:1255-65.
31. Di Scipio F, Raimondo S, Tos P, Geuna S. A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microsc Res Tech.* 2008;71:497-502.
32. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature.* 1995;378:406-9.
33. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci.* 2003;8:d1093-108.
34. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 2005;27:101-10.
35. Ek RO, Zencirci SG, Dost T, Birincioğlu M, Bilgin MD. Effects of melatonin supplementary on the sciatic nerve conduction velocity in the ovariectomized-aged rat. *Neuro Endocrinol Lett.* 2007;28:666-70.
36. Eroshenko PV. di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. Tercüme: Demir R. di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. Ankara. Palme Yayıncılık, 2001.
37. Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, Beckman JS. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci.* 1998;18:923-31.
38. Feirabend HK, Choufoer H, Ploeger S. Preservation and staining of myelinated nerve fibers. *Methods.* 1998;15:123-31.
39. Folan-Curran J., Fitzgerald M.J.T. *Clinical Neuroanatomy and Related Neuroscience.* Saunders (W.B.) Co Ltd, 2002.
40. Fu J, Zhao SD, Liu HJ, Yuan QH, Liu SM, Zhang YM, Ling EA, Hao AJ. Melatonin promotes proliferation and differentiation of neural stem cells subjected to hypoxia in vitro. *J Pineal Res.* 2011 Feb 1. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00867.x.
41. Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, Takagi K. Potent protective effects of melatonin on experimental spinal cord injury. *Spine.* 2000;25:769-75.
42. Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC. Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J Neurobiol.* 1994;25:431-38.
43. Genade S, Genis A, Ytrehus K, Huisamen B, Lochner A. Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury: Role of its anti-adrenergic actions. *J Pineal Res.* 2008;45:449-58.
44. Geuna S. Appreciating the difference between design-based and model-based sampling strategies in quantitative morphology of the nervous system. *J Comp Neurol.* 2000;20:333-9.
45. Gitto E, Aversa S, Reiter RJ, Barberi I, Pellegrino S. Update on the use of melatonin in pediatrics. *J Pineal Res.* 2011;50:21-8.
46. Glickstein M. Golgi and Cajal: The neuron doctrine and the 100th anniversary of the 1906 Nobel Prize. *Current Biology.* 2006;147-151.
47. Gökçimen A, Aydın G, Karaöz E, Malas MA. Effects of diclofenac sodium administration during pregnancy in the postnatal period. *Fetal Diagn Ther.* 2001;16:417-22.
48. Gökçimen A, Malas MA. Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların gebelikteki toksisiteleeri ile ilgili literatürlerin gözden geçirilmesi. *SDÜ Tıp Fak Derg.* 2003;10:50-2.
49. Gökçimen A, Rağbetli MC, Baş O, Tunç AT, Aslan H, Yazıcı AC, Kaplan S. Effect of prenatal exposure to an anti-inflammatory drug on neuron number in cornu ammonis and dentate gyrus of the rat hippocampus: a stereological study. *Brain Res.* 2007;1127:185-92.





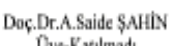
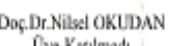





50. Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc.* 1986;143:3-45.
51. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 2005;27:119-30.
52. Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benítez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res.* 1994;17:55-62.
53. Hunt CG. Peripheral Nerve Biomechanics: Application to neuromobilization approaches. *Phys Ther.* 2002;7:111-21.
54. Hunter DA, Moradzadeh A, Whitlock EL, Brenner MJ, Myckatyn TM, Wei CH, Tung TH, Mackinnon SE. Binary imaging analysis for comprehensive quantitative histomorphometry of peripheral nerve. *J Neurosci Methods.* 2007;166:116-24.
55. Iguchi M, Kato K, Ibayashi M. Age dependent reduction in serum melatonin concentration in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;55:27-9.
56. Isenmann S, Wahl C, Krajewski S, Reed JC, Bahr M. Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *Eur J Neurosci.* 1997;9:1763-72.
57. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text & Atlas. Tercüme: Aytakin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri, 2009.
58. Kaplan S, Odacı E, Ünal B, Şahin B, Fornaro M. Chapter 2: Development of the peripheral nerve. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:9-26.
59. Kaplan S, Pişkin A, Ayyıldız M, Aktaş A, Köksal B, Ülkay MB, Türkmen AP, Bakan F, Geuna S. The effect of melatonin and platelet gel on sciatic nerve repair: An electrophysiological and stereological study. *Microsurg.* 2011;31:306-13.
60. Kaptanoğlu E, Tuncel M, Palaoglu S, Konan A, Demirpençe E, Kiliñç K. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg.* 2000;93:77-84.
61. Kayaalp OS. Narkotik olmayan analjezikler. *Tıbbi Farmakoloji* 7. baskı, 1995:1967-93.
62. Kermer P, Klocker N, Labes M, Bahr M. Inhibitor of CPP-32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary death in vivo. *J. Neurosci.* 1998;18:4656-62.
63. Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. Tercüme: Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş. Ankara. Palme Yayıncılık. 2006.
64. Kilic E, Hermann DM, Isenmann S, Bahr M. Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice. *J Pineal Res.* 2002;32:106-11.
65. Kim SH, Lee SM. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res.* 2008;44:165-71.
66. Kline DG, Hudson AR. Vertebral artery compression. *J Neurosurg.* 1995;83:759
67. Korkmaz A, Oyar EO, Kardeş O, Ömeroğlu S. Effects of melatonin on ischemic spinal cord injury caused by aortic cross clamping in rabbits. *Curr Neurovasc Res.* 2008;5:46-51.
68. Kudo C, Kori M, Matsuzaki K, Yamai K, Nakajima A, Shibuya A, Niwa H, Kamisaki Y, Wada K. Diclofenac inhibits proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:289-95.
69. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 1991;266:12866-72.
70. Kusuhara H, Matsuyuki H, Matsuura M, Imayoshi T, Okumoto T, Matsui H. Induction of apoptotic DNA fragmentation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cultured rat gastric mucosal cells. *Eur J Pharmacol.* 1998;360:273-80.
71. Luse SA. Formation of myelin in the central nervous system of mice and rats, as studied with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol.* 1956;2:777-84.
72. Landers M, Altenburger P. Peripheral nerve injury, *Advances in Physiotherapy.* 2003;5:67-82
73. Lane EA, Moss HB. Pharmacokinetics of melatonin in man: First pass hepatic metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;61:1214-6.
74. Langenbach R, Morham SG, Tian HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS, Smithies O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell.* 1995;83:483-92.
75. Lawrence RR. Traumatic injury to peripheral nerve. *Muscle Nerve.* 2000;23:863-73.

76. Lee T, Dugoua JJ. Nutritional supplements and their effect on glucose control. *Curr Diab Rep.* 2011;11:142-8.
77. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin the pineal gland factors that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 1958;80:2587.
78. Lynch HJ, Eng JP, Wurtman RJ. Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70:1704-7.
79. Lynch HJ, Rivest RW, Ronsheim PM, Wurtman RJ. Light intensity and the control of melatonin secretion in rats. *Neuroendocrinology.* 1981;33:181-5.
80. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic Assessment of Nerve regeneration in the Rat. *Plast Reconstr Surg.* 1985;75:384-88.
81. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1994;17:235-48.
82. Mills SE. *Histology for pathologists*, 3rd edition. Lipincott Williams & Wilkins. 2007:244-6.
83. Mocchegiani E, Bulian D, Santarelli L, Tibaldi A, Muzzioli M, Lesnikov V, Pierpaoli W, Fabris N. The immuno-reconstituting effect of melatonin or pineal grafting and its relation to zinc pool in aging mice. *J Neuroimmunol.* 1994;53:189-201.
84. Momma K, Hagiwara H, Konishi T. Constriction of fetal ductus arteriosus by non-steroidal anti-inflammatory drugs: study of additional 34 drugs. *Prostaglandins.* 1984;28:527-36.
85. Moriya T, Horie N, Mitome M, Shinohara K. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res.* 2007;42:411-8.
86. Nagai R, Watanabe K, Wakatsuki A, Hamada F, Shinohara K, Hayashi Y, Imamura R, Fukaya T. Melatonin preserves fetal growth in rats by protecting against ischemia/ reperfusion-induced oxidative/nitrosative mitochondrial damage in the placenta. *J Pineal Res.* 2008;45:271-6.
87. Needs CJ, Brooks PM. Antirheumatic medication in pregnancy. *Br J Rheumatol.* 1985;24:282-90.
88. Nielsen GL, Sorensen HT, Larsen H, Pedersen L. Risk of adverse birth outcome and miscarriage in pregnant users of NSAIDs: Population based observational study and case control study. *Br Med J.* 2001;322:266-70.
89. Odacı E, Bahadır A, Yıldırım Ş, Şahin B, Canan S, Baş O, Bilgiç S, Kaplan S. Cavalieri prensibi kullanılarak bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleri üzerinden hacim hesaplanması ve klinik kullanımı. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2005;25:421-8
90. Odacı E, Kaplan S. Chapter 16: Melatonin and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:317-35
91. Ostensen M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1998;107:128-32.
92. Özyurt B, Kesici H, Alıcı SK, Yılmaz S, Odacı E, Aslan H, Rağbetli MÇ, Kaplan S. Prenatal exposure to diclofenac sodium changes the morphology of the male rat cervical spinal cord: A stereological and histopathological study. *Neurotoxicol Teratol.* 2011;33:282-7.
93. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 2006;273:2813-38.
94. Pierpaoli W. Pineal grafting and melatonin induce immunocompetence in nude (a thymic) mice. *Int J Neurosci.* 1993; 68:123-31.
95. Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriët I, Laborit H. Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993;80:211-23.
96. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 1994;55:455-60.
97. Rağbetli MC, Özyurt B, Aslan H, Odacı E, Gökcimen A, Şahin B, Kaplan S. Effect of prenatal exposure to diclofenac sodium on purkinje cell numbers in rat cerebellum: a stereological study. *Brain Res.* 2007;1174:130-5.
98. Rao P, Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* 2008;11:81-110.
99. Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett.* 1993;15:103-16.
100. Reiter RJ: Pineal function during aging: Attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp.* 1994;54:31-9.
101. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B. A review of the evidence supporting melatonin role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 1995;18:1-11.
102. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* 1997;29:363-72.

- 103.Reiter, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* 1998;56:359-84.
104. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci.* 2000;7:444-58.
- 105.Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 2000;9:160-71.
- 106.Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM, Mayo JC, Lopez-Burillo S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2002 ;54:1299-321.
- 107.Reppert SM, Klein DC. Transport of maternal melatonin to suckling and the fate of melatonin in the neonatal rat. *Endocrinology.* 1978;102:582-8.
- 108.Robinson G, Gray T. Electron microscopy 2: practical procedures. In: Theory and practice of histological techniques. Bancroft JD, Stevens A, editors. New York: Churchill Livingstone. 1996;585-626.
- 109.Rogério F, de Souza L, Teixeira SA, Oliveria AL, de Nucci G, Langone F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. *Brain Res.* 2002;926:33-41.
- 110.Rustemeyer J, Dicke U. Prefabricated nerve conduits advance histomorphological and functional outcomes in nerve regeneration of the sciatic nerve of the rat. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39:889-96.
- 111.Sayan H, Özacmak VH, Ozen OA, Coskun O, Arslan SO, Sezen SC, Aktas RG. Beneficial effects of melatonin on reperfusion injury in rat sciatic nerve. *J Pineal Res.* 2004;37:143-8.
- 112.Schmalbruch H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec.* 1986, 215:71-81.
- 113.Schoenfeld A, Bar Y, Merlob P. NSAIDs: maternal and fetal considerations. *Am J Reprod Immunol.* 1992;28:141-7.
- 114.Shokouhi G, Tubbs RS, Shoja MM, Hadidchi S, Ghorbanihaghjo A, Roshangar L, Farahani RM, Mesgari M, Oakes WJ. Neuroprotective effects of high-dose vs low-dose melatonin after blunt sciatic nerve injury. *Childs Nerv Syst.* 2008;24:111-7.
- 115.Simon LS. Actions and toxic effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheumatol.* 1994;6:457-8.
- 116.Sirotkin AV, Schaeffer HJ. Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *J Endocrinol.* 1997;154:1-5.
- 117.Song A, Tracey DJ, Ashwell KW. Development of the rat phrenic nerve and the terminal distribution of phrenic afferents in the cervical cord. *Anat Embryol.* 1999;200:625-43.
- 118.Sotthibundhu A, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J Pineal Res.* 2010;49:291-300.
- 119.SPSS version 13.0 Inc, Chicago, Illinois, USA (Deneme sürümü)
- 120.Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.* 1984;134:127-36.
- 121.Swett JE, Wikholm RP, Blanks RH, Swett AL, Conley LC. Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* 1986;93:227-52.
- 122.Swett JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa CM, Miller PG. Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* 1991;114:82-103.
- 123.Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 1993;70:65-71.
- 124.Terzis JK, Smith KL. Repair and grafting of the peripheral nerve: Plastic Surgery. McCarthy JG (ed), WB Saunders, Philadelphia.1990;630-97.
- 125.Thanos PK, Okajima S, Terzis JK. Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 1998;14:423-36.
- 126.Topal T, Öter Ş, KorkmazA. Melatonin ve kanser. *Genel Tıp Derg.* 2009;19:137-43.
- 127.Turgut M, Uyanıkgil Y, Baka M, Tunc AT, Yavaşoğlu A, Yurtseven ME, Kaplan S. Pinealectomy exaggerates and melatonin treatment suppresses neuroma formation of transected sciatic nerve in rats: Gross morphological, histological and stereological analysis. *J Pineal Res.* 2005;38:284-91.
- 128.Turgut M, Oktem G, Uysal A, Yurtseven ME. Immunohistochemical profile of transforming growth factor-beta 1 and basic fibroblast growth factor in sciatic nerve anastomosis following pinealectomy and exogenous melatonin administration in rats. *J Clin Neuroscience.* 2006;13:753-8.

129. Turgut M, Erdogan S, Ergin K, Serter M. Melatonin ameliorates blood-brain barrier permeability, glutathione, and nitric oxide levels in the choroid plexus of the infantile rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Res.* 2007;1175:117-25.
130. Underwood H. The pineal and melatonin: Regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia.* 1990;46:120-8.
131. Ünal B, Canan S, Aslan H, Şahin B, Çataloluk O, Kaplan S. Doku örneklerindeki objelerin sayılarının hesaplanmasında tarafsız stereolojik metodlar: Fiziksel disektör. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2002;22:S 15-24.
132. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 1971;231:232-5.
133. Vermillion ST, Scardo JA, Lashus AG, Wiles HB. The effect of indomethacin tocolysis on fetal ductus arteriosus constriction with advancing gestational age. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177:256-9.
134. Vijayalaxmi B, Thomas CRJ, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol.* 2002;20:2575-601.
135. Waldhauser F, Weiszenbacher G, Tatzler E, Gisinger B, Waldhauser M. Alternations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol & Metab.* 1988;66:648-52.
136. Weaver DR, Stehle JH, Stopa EG, Reppert SM. Melatonin Receptors in human hypothalamus and pituitary: Implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76:295-301.
137. Yu WHA. Regulation of nitric oxide synthase expression in motoneurons following nerve injury. *Dev Neurosci.* 1997;19:247-54.
138. Zhdanova IV, Tucci V. Melatonin, circadian rhythms and sleep. *Curr Treat Options Neurol.* 2003;5:225-9.
139. Zhdanova IV, Wurtman RJ. The Pineal Hormone (Melatonin). *Endocrinology.* 2005;255-65.

## 9.EKLER

T.C. SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARLARI			
Karar Sayısı: 2009/42	Karar Tarihi: 17/07/2009		
<p>Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalından Prof.Dr.Serpil KALKAN, Dr.İlknur KESKİN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalından Prof.Dr.Süleyman KAPLAN ve Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalından Dr.Mustafa SÜTÇÜ tarafından sunulan "Nonsteroidal antiinflatuar ilaca prenatal maruz kalmanın periferik sinir gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerine karşı melatoninin nöroprotektif etkinliğinin morfolojik olarak değerlendirilmesi" başlıklı tez projesi yedi üyenin katılımı ile değerlendirildi.</p> <p>Projede toplam yedi grupta seksendört gebe sıçandan elde edilen yavruların kullanılacağı ve belirtilen süre sonunda hayvanların yüksek doz anestezi ile sakrifiye edileceği belirtilmiştir</p> <p>Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deneysel Hayvanları Etik Kurul Yönergesinin 6ncı maddesinde belirtilen "etik kurallara uygunluk esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.</p> <p>Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deneysel Hayvanları Etik Kurul Yönergesinde "Başvuru Sahibinin Sorumlulukları" başlığı altında yer alan kurallar ve madde 6da belirtilen "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "uygun" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.</p>			
 Doç.Dr.K.Esra ATALIK Başkan	 Prof.Dr.Lemih TAVLI Üye	 Prof.Dr.Said BODUR Üye	 Prof.Dr.Abdulkadir ŞENGÜN Üye-İznilî
 Doç.Dr.A.Saide ŞAHİN Üye-Katılmadı	 Doç.Dr.Nilsel OKUDAN Üye-Katılmadı	 Doç.Dr.H.Serdar GERGERLİOĞLU Üye	 Doç.Dr.Mehmet GÜL Üye
 Dr.M.Mehmet ŞENER Üye	 Mehmet ÖZ Üye	 Mustafa ŞİRİN Üye-Katılmadı	

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Niksar'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Niksar'da tamamladıktan sonra 1992 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girdi. 1999 yılında mezun olduktan sonra 2000-2002 yılları arasında Samsun Merkez 14 Nolu Sağlık Ocağı hekimi olarak çalıştı. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi bünyesinde Kurum Hekimi olarak çalışmaya başladı. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Evli ve iki erkek çocuk annesidir.