

TC
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL SIÇAN SİYATİK SİNİR
EZİLME TARZI YARALANMA MODELİNDE
SİNİR REJENERASYONUNDA
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN ETKİLERİ

Dr. Aliye Ceyla ÖZBAYOĞLU

Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2008

TC
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL SIÇAN SİYATİK SİNİR
EZİLME TARZI YARALANMA MODELİNDE
SİNİR REJENERASYONUNDA
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN ETKİLERİ

Dr. Aliye Ceyla ÖZBAYOĞLU

Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Cengiz ÇETİN

ESKİŞEHİR
2008

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Aliye Ceyla ÖZBAYOĞLU'na ait "Deneyssel sıçan sıyatik sinir ezilme tarzı yaralanma modelinde sinir rejenerasyonunda trombositte zengin plazmanın etkileri" adlı çalışma jürimiz tarafından Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:06.08.2008

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Cengiz ÇETİN Plastik Rek. ve Estetik Cer. A.D	İmza
Üye	Doç. Dr. A. Aydan KÖSE Plastik Rek. ve Estetik Cer. A.D	İmza
Üye	Yrd. Doç. Dr. Yakup KARABAĞLI Plastik Rek. ve Estetik Cer. A.D	İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun/...../2008
Tarih ve/..... Sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum tez çalışmam süresince, desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Cengiz ÇETİN'e, örneklerin değerlendirilmesinde destek ve yardımlarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK'e ve Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Neşe TUNCEL'e teşekkür ederim. Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimlerini aktararak yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Cengiz ÇETİN, Doç. Dr. A. Aydan KÖSE ve Yrd. Doç. Dr. Yakup KARABAĞLI'ya; birlikte çalışmaktan keyif duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

ÖZBAYOĞLU A.C. Deneysel Sıçan Siyatik Sinir Ezilme Tarzı Yaralanma Modelinde Sinir Rejenerasyonunda Trombositten Zengin Plazmanın Etkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2008. Trombositten zengin plazma (TZP) trombosit içeriği normal kan seviyesinden daha yüksek olan ve özel tekniklerle hazırlanan otolog plazma olup, pek çok biyoaktif maddeyi yoğun şekilde içerir. Özellikle yara iyileşmesi üzerine etkileri iyi bilinen TZP'nın, bu çalışmada sinir rejenerasyonu üzerine etkisinin araştırılması planlandı. 40 adet Wistar cinsi sıçan 4 gruba ayrıldı. Uygun anestezi altında siyatik sinirde 54 newton sabit basınç uygulayan klemp ile ezilme tarzı hasar oluşturuldu. Grup 1'de (n=10), sadece sinir diseksiyonu yapıldı, hasar oluşturulmadı. Grup 2'de (n=10), sinir diseksiyonunu takiben ezilme hasarı yapıldı, ezilme zonuna bir işlem yapılmadı. Grup 3'te (n=10), sinir diseksiyonunu takiben ezilme hasarı yapıldı, ezilme zonuna TZP uygulandı. Grup 4'te (n=10), sinir diseksiyonunu takiben ezilme hasarı yapıldı, ezilme zonuna trombositten fakir plazma uygulandı. TZP ve TZP'yı aktive etmek için kullanılan trombin solusyonu FDA onaylı Harvest SmartPreP-2 cihazı, otolog trombin kiti ve TZP işlem kiti kullanılarak hazırlandı. Sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için, deney sonrası 7, 14, 21 ve 30. günlerde siyatik fonksiyonel indeks (SFİ) ve ayak geri çekme refleksleri (WRL) ölçüldü. Deney sonrası 30. günde anestezi altında elektrofizyolojik testler yapıldı aksiyon potansiyeli eğrilerinde latans değerleri, tepe-tepe amplitüdü ve maksimal pozitif yöndeki pik değerleri ölçüldü. Histomorfometrik olarak hasar öncesi ve sonrası bölgelerde ortalama sinir lifi çapı ve dejenere sinir lifi yüzdesi ile birim alanda bulunan toplam Schwann hücre çekirdek sayısı ve dejenere Schwann hücre çekirdek sayısı değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizi ile TZP uygulanmış olan grup 3'te SFİ ve WRL değerlerinin daha hızlı düzeldiği ve bu düzelmenin elektrofizyolojik ve histomorfometrik bulgularla uyum içinde olduğu saptandı. Sonuç olarak ezilme tarzı sinir hasarında, diğer gruplara göre, tek doz uygulanan TZP ile daha hızlı ve kaliteli bir rejenerasyon elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Trombositten zengin plazma (TZP), siyatik sinir, ezilme tarzı hasar

ABSTRACT

OZBAYOGLU A.C. The Effects of Platelet Rich Plasma on Sciatic Nerve Regeneration in Experimental Rat Crushed Sciatic Nerve Injury Model. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery, Eskişehir, 2008.

Platelet rich plasma (PRP) is an autologous plasma that contains higher platelet levels than normal blood. Due to the high platelet concentration it contains high levels of bioactive molecules. In this study it is planned to show the effects of PRP on nerve regeneration. Forty Wistar rat divided into 4 groups. Under general anesthesia sciatic nerve crush injury was performed with a clamp which had a constant pressure of 54 newton. Groups were planned as follows: In group 1 (n=10) only nerve dissection was performed and no crush injury was produced; in group 2 (n=10) after nerve dissection only crush injury was performed and no other treatment was given; in group 3 (n=10) after the dissection of nerve, crush injury was performed and PRP was given over the crush zone; in group 4 (n=10) after the dissection of nerve, crush injury was performed and platelet poor plasma (PPP) was given over the crush zone. PRP and the thrombin solution (which was used to activate the PRP) were prepared by Harvest SmartPREP system, which has FDA permission. Before the beginning of experiment and after 7th, 14th, 21th and 30th days sciatic functional index (SFI) and withdrawal reflex (WRL) were measured for each group. At 30th day under general anesthesia electrophysiologic tests were performed. Latance, peak to peak amplitude and maximum positive peaks were measured. For histomorphometric analysis, samples were taken before and after the crushed segment separately, and nerve fiber diameter, mean degenerated nerve fiber percentage, Schwann cell nucleus number and Schwann cell degenerated nucleus number percentages were calculated. After the statistical analyses of the data, it is found out that in group 3 by using PRP, the SFI and WRL values were better than the other groups and this regenerative data were supported by electrophysiologic and histomorphometric data. In conclusion, single application of PRP can improve nerve healing in rats due to the growth factors that PRP contains.

Key Words: Platelet rich plasma (PRP), sciatic nerve, crush injury

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Periferik Sinir Anatomisi.....	5
2.2.1. Sinir Hücresi (Nöron).....	6
2.2.2. Akson	8
2.2.3. Aksonal İletim	8
2.2.4. Schwann Hücreleri ve Myelin Kılıf.....	9
2.2.5. Bağ Doku Yapısı.....	10
2.2.6. Sinir Vasküler Yapısı.....	12
2.3. Periferik Sinir Yaralanmaları.....	14
2.3.1. Seddon Sınıflaması.....	14
2.3.2. Sunderland Sınıflaması	16
2.4. Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu	18
2.4.1. Sinir Hücre Gövdesi	18
2.4.2. Proksimal Segment.....	19
2.4.3. Distal Segment	20
2.4.4. Sinir İyileşmesinde Makrofaj ve Schwann Hücrelerinin Rolü.....	23
2.5. Sinir İyileşmesinde Büyüme Faktörlerinin Rolü.....	25
2.5.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)	25
2.5.2. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF).....	26
2.5.3. Nörotrofin-3 (NT-3).....	27
2.5.4. Nörotrofin-4/5 (NT-4/5)	27

2.5.5. Nörotrofin-6 (NT-6).....	28
2.5.6. Siliyer Nörotrofik Faktör (CNTF).....	28
2.5.7. Lökemi İnhibitör Faktör (LİF)	29
2.5.8. Glia Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF)	29
2.6. Trombositler	30
2.7. Trombositten Zengin Plazma (TZP)	32
2.7.1. TZP Hazırlanışı	33
2.7.2. TZP Çalışma Prensibi	34
2.7.3. TZP Kullanım Alanları	35
2.7.4. TZP İçersinde Bulunan Büyüme Faktörleri.....	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
3.1. Sıçan Siyatik Sinir Anatomisi.....	46
3.2. Deney ve Kontrol Grupları.....	47
3.3. TZP Elde Edilişi.....	48
3.4. Cerrahi İşlem	50
3.5. Değerlendirme Yöntemleri	55
3.5.1. Genel Değerlendirme	55
3.5.2. Fonksiyonel Değerlendirme	55
3.5.3. Elektrofizyolojik Testler.....	58
3.5.4. Histomorfometrik Değerlendirme	60
3.5.5. İstatistiksel Değerlendirme	61
4. BULGULAR.....	63
4.1. Genel Değerlendirme Bulguları	63
4.2. Fonksiyonel Değerlendirme Bulguları.....	64
4.2.1. Yürüyüş Yolu ve SFİ Bulguları	64
4.2.2. WRL Bulguları	69
4.3. Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları.....	71
4.4. Histomorfometrik Değerlendirme Bulguları	76
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ.....	100
7. KAYNAKLAR	101

KISALTMALAR VE SİMGELER

ADP	Adenozin difosfat
Ark	Arkadaşları
ATP	Adenozin trifosfat
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CMAP	Bileşik kas aksiyon potansiyeli
CNTF	Siliyer nörotrofik faktör
D	Deney
ECGF	Epitelyal hücre büyüme faktörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EMG	Elektromyografi
FDA	Food and drug administration
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAP	Büyüme ile ilişkili proteinler
GDNF	Glial kökenli büyüme faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1	İnterlökin 1
IL-6	İnterlökin 6
ITS	Adım ortası genişliği
kDA	Kilodalton
LIF	Lökemi inhibitor faktör
M	Medyan
m/sn	Metre/saniye
mm	Milimetre
MAG	Myelin ilişkili glikoprotein
NGF	Sinir büyüme faktörü
NT-3	Nörotrofin 3
NT-4/5	Nörotrofin 4/5
NT-6	Nörotrofin 6
Oc	Osteokalsin
On	Osteonektin
OSH	Ortalama standart hata

PAF	Trombosit aktive edici faktör
PDAF	Trombosit kökenli anjiogenetik faktör
PDEGF	Trombosit kökenli endoteliyal büyüme faktörü
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
PF-4	Trombosit faktörü 4
P-max	Maximum pik değeri
PMP 22	Periferik myelin protein 22 kDa
Po	Protein zero
P-P mesafesi	Pozitif ve negatif pikler arası mesafe
S	Sağlam
SFİ	Siyatik fonksiyonel indeks
TFP	Trombositten fakir plazma
TGF- β	Transforming büyüme faktörü-beta
TİCAM	Tıbbi ve cerrahi araştırma merkezi
TNF	Tümör nekroz faktörü
Trk	Tirozin kinaz reseptörü
TS	Adım genişliği
TSP-1	Trombospondin -1
TZP	Trombositten zengin plazma
VEGF	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
Vn	Vitronektin
VWF	Von Willebrand faktör
WRL	Ayak geri çekme refleksi
μm	Mikrometre
α	Alfa
δ	Delta
γ	Lambda

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa	
Şekil 2.1.	Periferik sinir duyu ve motor köklerin şematik çizimi	6
Şekil 2.2.	Sinir hücre anatomisi	7
Şekil 2.3.	A: Sinir kılıfları şematik çizimi, B: Sinir kılıfları elektron mikroskop görüntüsü	10
Şekil 2.4.	Periferik sinirlerin fasiküler yapılarına göre sınıflandırılması	12
Şekil 2.5.	Periferik sinir yaralanmalarının sınıflandırılması	17
Şekil 2.6.	Periferik sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu	22
Şekil 2.7.	Trombositin şematik yapısı	31
Şekil 2.8.	Santrifüj işlemi sonrası kanın tabakalara ayrılmış görünümü	34
Şekil 3.1.	Sıçan siyatik sinir anatomisi	47
Şekil 3.2.	Harvest Smart PReP-2 santrifüj cihazı	48
Şekil 3.3.	Harvest Smart PReP-2 trombin kiti	49
Şekil 3.4.	Harvest Smart PReP-2 TZP işlem kiti	49
Şekil 3.5.	Harvest Smart PReP-2 hazırlama kitinde aplikatöre TZP ve otolog trombinin yerleştirilerek kullanıma hazır şekli	50
Şekil 3.6.	Sol uyluk posteriorundan yapılan oblik insizyon	51
Şekil 3.7.	Biceps femoris kası künt diseksiyonu, siyatik sinire ulaşılması	51
Şekil 3.8.	Siyatik sinirin siyatik çentikten dallanma bölgesine kadar serbestlenmesi	52
Şekil 3.9.	Sinir ezilme hasarı oluşturulması için özel tasarlanan ve Newton basın uygulayan cerrahi klemp	54
Şekil 3.10.	Sinir ezilme hasarının oluşturulması	53
Şekil 3.11.	Sinir ezilme hasarının görünümü	53
Şekil 3.12.	Sinir ezilme bölgesi üzerine TZP'nin uygulanması	54
Şekil 3.13.	A: Kas dokularının dikilmesi, B: Cildin dikilmesi	55
Şekil 3.14.	Yürüyüş yolu analizi yapılan yürüme kulvarı	56
Şekil 3.15.	SFİ hesaplaması için ayak izlerinde bakılan parametreler	57
Şekil 3.16.	SFİ hesaplaması için kullanılan Bain ve ark.'nın geliştirdikleri formül	57

Şekil 3.17.	Geri çekme reflekslerini değerlendirmede kullanılan ısı test cihazı	58
Şekil 3.18.	A ve B: EMG cihazı elektrofizyolojik kayıtların alınması	59
Şekil 3.19.	EMG kaydında değerlendirilen parametreler	60
Şekil 4.1.	A ve B: Deneklerde sinir hasarı oluşturulan ayaklarda gözlenen otonibalizasyon	63
Şekil 4.2.	SFİ ölçümlerinde kullanılan 1. hafta ayak izlerinden örnekler	64
Şekil 4.3.	SFİ ölçümlerinde kullanılan 2. hafta ayak izlerinden örnekler	65
Şekil 4.4.	SFİ ölçümlerinde kullanılan 3. hafta ayak izlerinden örnekler	65
Şekil 4.5.	SFİ ölçümlerinde kullanılan 4. hafta ayak izlerinden örnekler	66
Şekil 4.6.	SFİ değerlerinin haftalara göre gruplar arasında karşılaştırılması	66
Şekil 4.7.	SFİ değerlerinin ardışık ölçümlerinin her grup içerisinde karşılaştırılması	68
Şekil 4.8.	WRL değerlerinin haftalara göre gruplar arasında karşılaştırılması	69
Şekil 4.9.	WRL değerlerinin ardışık ölçümlerinin her grup içerisinde karşılaştırılması	69
Şekil 4.10.	Farklı guruplardan alınan EMG kayıt örnekleri	72
Şekil 4.11.	Latans sürelerinin sağlam ve deney tarafında birbirleri ile karşılaştırılması. A: gruplar içinde, B: gruplar arasında	73
Şekil 4.12.	Pozitif ve negatif pikler arasındaki mesafenin sağlam ve deney tarafında birbirleriyle karşılaştırılması. A: gruplar içinde, B: gruplar arasında	74
Şekil 4.13.	Maksimum pozitif pik değerlerinin sağlam ve deney tarafında birbirleriyle karşılaştırılması. A: gruplar içinde, B: gruplar arasında	75
Şekil 4.14.	Hasar öncesi ve sonrası lif çaplarının gruplar arasında karşılaştırılması	77
Şekil 4.15.	Hasar öncesi ve sonrası bölgelerde dejenere liflerin yüzde değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması	78

Şekil 4.16.	Hasar öncesi ve sonrası bölgelerde toplam schwann hücre çekirdek sayılarının gruplar arasında karşılaştırılması	79
Şekil 4.17.	Hasar öncesi ve sonrası bölgelerde dejenere schwann hücre çekirdeklerinin yüzde değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması	81
Şekil 4.18.	Hasar öncesi sinir liflerinin görünümü	82
Şekil 4.19.	Hasar sonrası sinir liflerinin görünümü	83

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 2.1.	Üst ekstremitede sinir hasar bölgesine göre rejenerasyon hızları	21
Tablo 4.1.	SFİ değerlerinin ardışık ölçümlerinin her grup içinde ve gruplar arasında karşılaştırılması	67
Tablo 4.2.	WRL değerlerinin deney tarafında ardışık ölçümlerinin her grup içinde ve grupla arasında karşılaştırılması	70
Tablo 4.3.	Sağlam ve latans sürelerinin gruplar arasında ve her grup içinde birbirleriyle karşılaştırılması	73
Tablo 4.4.	Sağlam ve deney tarafında pozitif ve negatif pikler arasındaki mesafenin gruplar arasında ve her grup içinde birbirleri ile karşılaştırılması	74
Tablo 4.5.	Sağlam ve deney tarafında maksimum pozitif pik değerlerinin gruplar arasında ve her grup içinde birbirleriyle karşılaştırılması	75
Tablo 4.6.	Hasar öncesi ve sonrası lif çaplarının gruplar arasında ve her grup içinde karşılaştırılması	76
Tablo 4.7.	Hasar öncesi ve sonrası dejenere lif sayılarının yüzde değerlerinin gruplar arasında ve her grup içinde karşılaştırılması	78
Tablo 4.8.	Hasar öncesi ve sonrası toplam schwann hücre çekirdek sayılarının gruplar arasında ve her grup içinde karşılaştırılması	79
Tablo 4.9.	Hasar öncesi ve sonrası schwann hücre dejenere çekirdeklerinin toplam çekirdek sayısına oranının yüzde değerlerinin gruplar arasında ve her grup içinde karşılaştırılması	80
Tablo 5.1.	Sinir iyileşmesinin farklı aşamaları için kullanılabilir farklı tedavi seçenekleri	87
Tablo 5.2.	TZP içerisinde bulunan bazı büyüme faktörleri ve sinir rejenerasyonu üzerine etkileri	88

1.GİRİŞ

Periferik sinirler, omurilik ön boynuzdaki motor nöronların, dorsal ganglionlardaki duyuşal nöronların ve sempatik ganglionlardaki sempatik nöronların destek bağ doku ile çevrili aksonal uzantılarından oluşan ve sonlandıkları hedef organa göre motor, duyu ya da otonomik fonksiyonları olan yapılarıdır (1, 2).

Periferik sinir yaralanmaları, akut penetran travmalardan kronik kompresyon nöropatileri, doğum travması gibi iatrojenik nedenlere uzanan çok geniş bir spektrumda karşımıza çıkabilirler. Bu nedenle periferik sinir yaralanmalarında detaylı bir hikaye ve dikkatli bir fizik muayene, hasarın doğru anatomik yerleşimi ve patofizyolojisi hakkında bilgi sahibi olunmasına yardımcı olur ve tedaviyi doğru şekilde yönlendirmeyi sağlar. Sinir yaralanmalarına yaklaşımda, Seddon ve Sunderland tarafından hazırlanmış olan periferik sinir hasar sınıflamaları tedaviye yön vermek ve prognozu tahmin etmek için sıklıkla kullanılan sınıflamalardır (1, 3).

Yeni teknolojilerin gelişimi, cerrahi mikroskop kullanımının yaygınlaşması, epinöral ya da perinöral dikişler ile gerilimsiz ve anatomik olarak sinir uçlarının karşılıklı sütüre edilebilmeleri, sinir dejenerasyon ve rejenerasyon işlemlerinin moleküler mekanizmalarının aydınlanmaya başlaması ile sinir cerrahisi alanında daha başarılı sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Buna karşın, bugün halen sinir hasarı sonrası sinir iyileşmesinin, duyuşal ve fonksiyonel olarak hasar öncesi dönem ile aynı olmasını sağlayabilecek bir tedavi şekli tanımlanamamıştır (1, 4, 5, 6).

Periferik sinir hasarından sonra hasarlı dokuyu ortamdaki uzaklaştırmak, onarım işlemini başlatmak için bir dizi karmaşık olay meydana gelir. Periferik sinirler hasarlandıktan sonra, hasar bölgesi distalindeki tüm myelinli ve myelinsiz sinir lifleri önce Wallerian dejenerasyonu adı verilen bir dejenerasyon sürecine girerler. Bu dejenerasyon sürecini, hücreyel onarım mekanizmalarının rol aldığı bir rejenerasyon süreci takip eder ve sinir onarılmaya çalışılır. Sinir hücreleri, vücudun diğer yerlerindeki hücreyel onarım cevabı olan hücreyel proliferasyon ve mitoz yeteneklerine sahip değillerdir. Buna karşın, sahip oldukları özel hücreyel onarım mekanizmaları ile (tomurcuklanma) orijinal aksoplazmik hacimlerini tekrar sağlamaya çalışırlar. Ancak bazı durumlarda akson rejenerasyonu kusursuz seyretse de, yaralanmaya sekonder gelişen sinir hücrelerinde ölüm, denervasyonda uzamaya

bağlı uç organ atrofisi ya da uygun olmayan yanlış yönlendirilmiş aksonal büyüme nedeniyle onarım gerçekleşemez ya da yetersiz gerçekleşebilir. Özellikle hasar alanında rejenerasyon olan aksonların yanlış yöne doğru hareket etmeleri, onarımı sekteye uğratan ana problemlerden biridir. Bu da ilgiyi, aksonal büyümeyi ve büyüme yönünü düzenleyen mikroçevresel faktörlerin önemi üzerine çekmektedir (3, 4, 7, 8).

Yaralanmanın etyolojik nedeninden bağımsız olarak, sinir dokusunda iyileşmenin tam olmaması veya sinirin uygun olmayan rejenerasyonu, sıklıkla fonksiyonel kayıp ve ağrı ile sonuçlanır. Bu nedenle periferik sinir yaralanmalarından sonra tedavideki asıl amaç, sinir bütünlüğünün tekrar sağlanarak iletimin geri dönüşünü ve dolayısıyla kaybolan motor ve duyu fonksiyonlarının restorasyonunu sağlamaktır. Fonksiyonların maksimum şekilde geri dönüşünü sağlayabilmek için, aksonların uygun doğrultuda distal güdüğe yönlendirmeleri gereklidir (2, 9, 10).

Sinir hücrelerinin gövdelerinde bazı hayati fonksiyonların sürdürülebilmesi ve sinir hasarı sonrasında oluşan dejenerasyon ve rejenerasyon süreci için hücreler ile iletişime ve bu iletişimde düzenleyici rolleri olan nörotrofik faktörlere ihtiyaç vardır. Bu faktörler, hedef organlarda ya da Schwann hücrelerinde sentezlenerek retrograd olarak akson tarafından hücre gövdesine taşınırlar ve burada fonksiyonlarını gerçekleştirirler. İlk ve en iyi tanımlanmış olan nörotrofik faktör sinir büyüme faktörüdür (Nerve growth factor, NGF) ve sinir hücresinin yaşayabilirliği üzerine olumlu etkilere sahiptir. Daha sonra, sinir hücreleri üzerine olumlu etki gösteren pek çok nörotrofik faktör ve büyüme faktörü tanımlanmıştır (3, 4, 9).

Nörotrofik faktörler ve büyüme faktörleri, sinir hücrelerinin yaşayabilirliklerini desteklemenin yanı sıra, aksonal büyümeyi de stimüle ederler. Deneysel olarak, yaralanma sonrası sinir hücre ölümünü azaltmak ve sinir iyileşmesini desteklemek için bu faktörlerle yaygın bir şekilde çalışmalar yapılmasına karşın, henüz klinik kullanıma girmiş bir faktör mevcut değildir (6, 10, 11, 12).

Trombositten zengin plazma (TZP), son yıllarda klinik kullanıma giren ve özellikle kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri nedeniyle maksillofasiyal cerrahide geniş kullanım alanı bulan biyolojik bir üründür. Trombositlerin küçük bir plazma hacmi içerisinde konsantre edilip, içerdikleri çok sayıda büyüme

faktörlerinin bu şekilde yoğunlaştırılmaları ve uygulandıkları bölgede bu faktörleri salmaları için aktive edilmeleri esasına dayanır. Hastanın kendi kanından otolog olarak hazırlanır ve uygulama sonrasında ortama salınan büyüme faktörleri, bölgede oluşan fibrin pıhtı içerisinde kalarak lokal etkilerini uzun süre gösterirler. TZP içerisinde başlıca trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet derived growth factor, PDGF), fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor, FGF), insülin benzeri büyüme faktörleri (Insulin-like growth factor, IGF-1 ve 2), transforming büyüme faktörü (Transforming growth factor, TGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor, VEGF) olmak üzere pek çok büyüme faktörü bulunur (13, 14, 15). Bu faktörlerin, sinir rejenerasyonunun değişik aşamalarında olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (6, 11, 16, 17, 18, 19, 20).

Bu çalışmada, yüksek oranda büyüme faktörü içeriğine sahip olan trombosit zengin plazmanın, sıçan siyatik sinir ezilme tarzı yaralanma modelinde sinir iyileşmesi üzerine olabilecek olumlu etkilerinin araştırılması planlanmıştır. TZP kullanımı ile daha hızlı ve daha kaliteli bir sinir rejenerasyon sürecinin gerçekleştirileceği ön görülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Periferik sinir sistemine ait ilk tanımlamalar Hippokrat'a (MÖ 460–370) ait olmasına karşın, periferik sinir yaralanmaları üzerine ilk çalışmaları Galen (MS 130–200) yaparak, bazı sinirlerin kesilmesi sonrası his duyusunda, bazılarında ise kas gücünde azalma olduğunu saptamıştır. Bu yıllarda sinirin iyileşemeyeceği düşünülmekteydi ve bu düşünce 18. yüzyıla kadar hakimiyetini korudu. Periferik sinir sütürasyonuna ait ilk kayıtlar 13. yüzyılda William Saliceto'ya aittir. Sinir sistemi ile ilgili detaylı bilgiler ise 16. ve 17. yüzyıllardan sonra elde edilmeye başlamıştır. Glisson (1597–1677) uyarılabilir doğalarını keşfetmiş, Van Leewenhoek (1632–1723) ise mikroskopik yapılarını tanımlamıştır. Fontana (1730–1805) akson ve myelin kılıf yapısını detaylandırmıştır. Fonksiyonel yapıya yönelik en erken çalışmalardan biri Galvani'ye (1737–1798) aittir. Galvani yaptığı kurbağa deneylerinde, sinir liflerinin elektrik stimülasyonuna yanıt verdiğini saptamıştır. Anatomik organizasyonlarının ve sinir hücreleri ile ilgili detayların tanımlanması, 18. yüzyılın başlarında Bell, Magendie, Remark ve Von Purkinje gibi çeşitli araştırmacılar ile sağlanmıştır. Schwann isimli araştırmacı 1839'da Schwann hücrelerini tanımlayarak kendi adını vermiştir (21).

Sinirin primer onarımı ile ilgili en erken kayıtlardan biri Paget'ye aittir. Paget, 1847 yılında 11 yaşında bir hastanın median sinir kesisini primer onarmış ve fonksiyonel geri dönüşün tam olduğunu göstermiştir (1).

Waller, 1850 yılında sinir hasarını anlamaya yönelik çalışmalar yapmış ve bu çalışmalar sonucunda, aksonların hasar alanı distalinde dejenere, proksimalinde ise rejenere olmaya başladıklarını saptamıştır. Aynı yıllarda Bernard, kürar ile nöromusküler blokaj konusunda yaptığı çalışmalar ile sinir iletiminin biyokimyasal temelleri hakkında ilk bilgileri ortaya koymuştur (21).

Golgi ve Cajal, 1906 yılında sinir sisteminin birbirine fonksiyonel olarak bağlı sinir hücrelerinden oluşan bir ağdan ibaret olduğunu açıklayan çalışmaları ile Nobel ödülünü almışlardır. Sherrington ise, 1906 yılında sinaps adı verilen sinir hücrelerinin fonksiyonel bağlantı noktalarını tanımlamıştır. Bir başka Nobel ödülünü ise Erlanger ve Gasser, 1944 yılında her bir sinir hücrelerinin ve bağlantılarının

farklılaşmış fonksiyonları olduğunu tanımlayarak ve bunların fonksiyonlarını açıklayan elektrofizyolojik çalışmalar yaparak almışlardır. Bu bilgileri kullanarak 1948 yılında Hodes, Larrabee ve German isimli araştırmacılar klinikte uygulanabilir elektrofizyolojik sinir testlerini geliştirmişlerdir (21).

Periferik sinir cerrahisinde, bugün modern sinir cerrahisinin temelini oluşturan ilk bilimsel çalışmalar Seddon tarafından 1948 yılında yapılmıştır. Seddon, sinir hasar mekanizmalarının, yaralanma derecelerinin, takip ve tedavi seçeneklerinin üzerine çalışmalar yapmış ve sinir hasar derecesini belirtmek için Seddon sınıflamasını geliştirmiştir. Sunderland, 1945 ile 1968 yılları arasında yaptığı pek çok çalışmada, sinir hasar mekanizmalarını daha da detaylandırmış ve çeşitli onarım tekniklerini geliştirmiştir. Ek olarak periferik sinir internal topografik anatomisi üzerine de incelemeler yapmıştır (21).

Periferik sinir cerrahisinin gelişimine, Millesi sinir onarımında gerginliğin olumsuz etkilerini vurgulayarak; Terzis ise tedavi tekniklerini geliştirip çeşitlendirerek önemli katkılarda bulunmuşlardır (21).

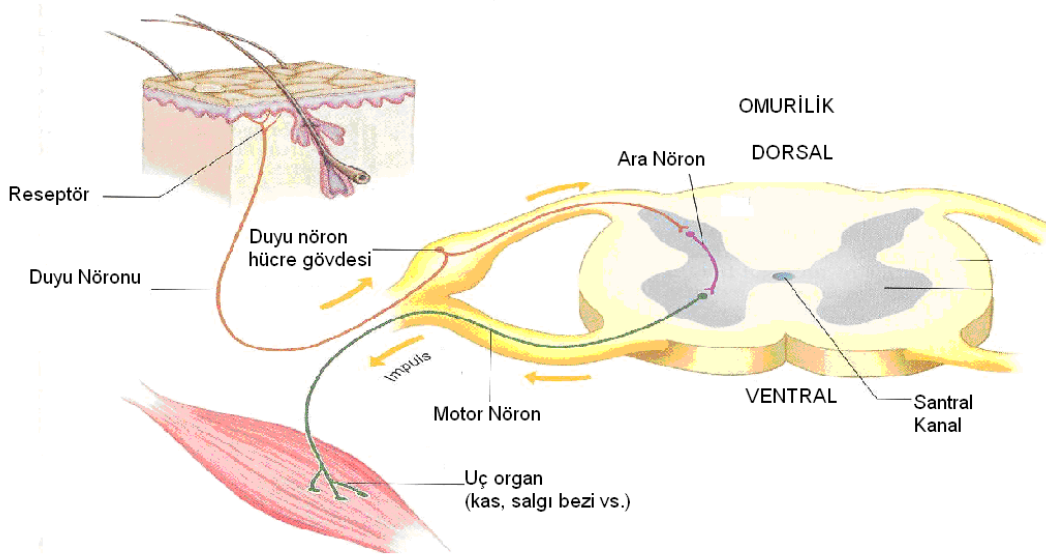
2.2. Periferik Sinir Anatomisi

Periferik sinir sistemi sinir hücrelerinin, destek bağ dokunun, hücresel elemanların ve uç organların birlikte hareket ettiği karmaşık bir yapıdır. Çevreden merkezi sinir sistemine verileri taşıyacak şekilde dizayn edilmiş olup, sempatik ve otonomik yollarla çevresel değişiklikleri yönlendirir. Merkezi sinir sistemi bu şekilde periferdeki dokularla ilişkidir; afferent liflerle alınan duyu mesajları arka kök ganglionlarına gelir ve motor iletiler omurilik ön boynuz hücrelerinden perifere uzanır. Nöronlar birbirleri ile dendrit denen pek çok sitoplazmik uzantılar ile ilişki kurarlar ve her bir nöron genelde perifere tek bir aksoplazmik uzantı gönderir (21).

Periferik sinir embriyolojik olarak ektodermal tabakadan gelişir. Embryonik hayatın 3–4. haftalarında nöroektoderm içerisinde nöral krest hücreleri şekillenir ve mezoderm içersine göç ederler. Burada arka kök ganglionları, Schwann hücreleri ve diğer nöroblastik hücrelerin büyümeleri ve farklılaşmaları başlar. Schwann hücreleri tarafından gerçekleştirilen myelinizasyon fetal hayatın 4. ayından itibaren başlar (1).

Periferik sinir duyusal, motor ve sempatik liflerden oluşur. Motor sinirlerin hücre gövdeleri medulla spinalis ön boynuzunda, duyu sinirlerinin hücre gövdeleri

dorsal spinal arka kökler içerisinde yerleşmiştir. Duyu ve motor lifleri içeren periferik sinirler, dorsal ve ventral spinal köklerin birleşmesinden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Otonom sinir sistemine ait nöronlar ise, merkezi sinir sistemi içinde ve dışında bulunan nükleus ve ganglionlarda toplanmışlardır (1).

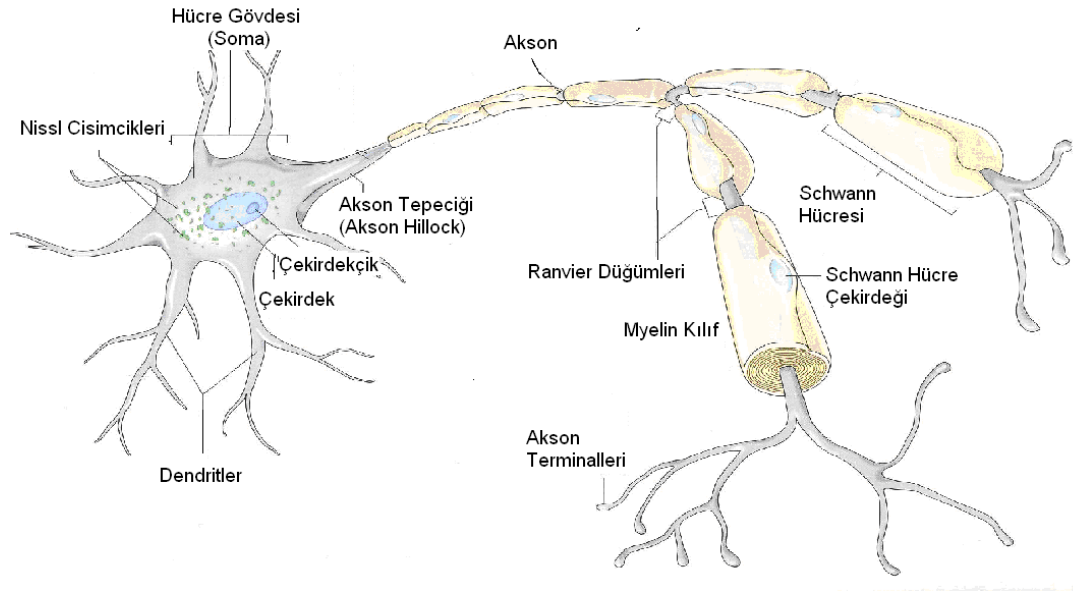


Şekil 2.1. Periferik sinir duyu ve motor köklerin şematik çizimi (Shier D, Butler J, Lewis R. Hole's Essentials of human anatomy and physiology. 9th ed. New York: McGraw Hill, 2006: 393' den çevrilerek alınmıştır)(22).

2.2.1. Sinir Hücresi (Nöron)

Sinir sistemini fonksiyonel ünitesi sinir hücresidir (nöron). Her bir sinir hücresi hücre gövdesi (perikaryon, soma), dendrit ve akson olmak üzere 3 kısımdan oluşur (Şekil 2.2). Motor sinirlerin hücre gövdeleri omurilik ön boynuzda, duyu sinirlerinininki ise arka kök ganglionlarında yerleşiktir. Hücre gövdesinde yerleşik reseptör fonksiyonu gören çok sayıda sitoplazmik çıkıntı dendrit olarak adlandırılır. Dendritler, çevreden gelen uyarıları hücre gövdesine iletirler ve nöronlar arasındaki iletişimi sağlarlar. Sinir hücrelerinin perifer ile iletişimini sağlayan uzantı ise aksondur. Sıklıkla her bir sinir hücresinin pek çok dendriti olmasına karşın, tek bir aksonu vardır. Aksonlar, orijinal hücre gövde çapının binlerce katı kadar uzunlukta perifere uzanım gösterebilirler. Sinir hücresinde metabolik olaylar, hücre gövdesinde gerçekleşir; bu nedenle sinirin fonksiyonunu yapabilmesi için, periferik

aksonal uzantılar ile sinir gövdesinin devamlılık göstermesi gerekir. Aksonun gövde ile ilişkisi herhangi bir nedenle kesintiye uğrarsa, aksonda sinir fonksiyonunun devamlılığı için gereken metabolik olaylar gerçekleşemediği için, distal kısımları dejenerasyona uğrar (4, 21).



Şekil 2.2. Sinir hücre anatomisi (Shier D, Butler J, Lewis R. Hole's Essentials of human anatomy and physiology. 9th ed. New York: McGraw Hill, 2006: 393' den çevrilerek alınmıştır.)(22)

Her bir sinir hücresi içerisinde tek bir çekirdek ve birden fazla çekirdekçik bulunur. En belirgin sitoplazmik organeller golgi cisimcikleri ve mitokondrilerdir. Bu organeller nöronal uyarı iletiminde enerji kaynakları olarak görev yaparlar. Bazofilik Nissl cisimcikleri ve granüllü endoplazmik retikulum da gövdede mevcuttur ve bu yapılar, sinir rejenerasyonu gibi metabolik hızın arttığı durumlarda sayıca artış gösterirler (21).

Nöronlar içerdikleri akson ve dendritlerin sayısı, uzunluk ve şekillerine göre unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar.

2.2.2. Akson

Hücre gövdesinden huni şeklinde bir genişleme (akson tepeciği, akson hillock) ile çıkan sinir uzantısıdır. Akson boyunca devamlılık gösteren, yüksek fosfolipid içeriği olan ve istirahat potansiyelinin devamlılığını sağlayabilecek özelliklere sahip üç katlı aksolemma adı verilen bir zarla çevrilidir (21).

Hücre sitoplazmasının akson içerisindeki eş değeri aksoplazmadır. Aksoplazmada, çeşitli proteinler, hücre iskeletini oluşturan mikrotübüller ve nörofilamanlar bulunur. Bunlar yapısal bütünlüğün devamının sağlanmasında ve aksonal iletimde önem taşırlar. Aksonlar, myelinli ya da myelinsiz olabilirler. Myelin kılıf periferik sinir sisteminde Schwann hücreleri tarafından yapılır (1).

Aksoplazma içerisinde mitokondri, düz endoplazmik retikulum, lizozom ve veziküller gibi organellerin bulunmasına karşın, protein sentezi yapabilen golgi cisimcikleri ya da granüllü endoplazmik retikulumlar yoktur. Bu nedenle canlılıklarını koruyabilmek için hücre gövdesi ile devamlılıklarının korunması gerekir (21).

Sinirin akson terminalinde, başka bir sinir hücresi, kas ya da salgı bezi ile yaptığı bağlantıya sinaps adı verilir. Sinaps ile, sinir üzerinde ilerleyen uyarı hedef organa iletilmiş olur (1).

2.2.3. Aksonal İletim

Aksonal iletim sistemi, Ca-Mg ATPaz ile sağlanan ATP'ye bağımlıdır. Aksonal taşıma iki yönlüdür. Anterograd (somatofugal) taşıma ile sinir hücre gövdesinde sentezlenen pek çok madde farklı hızlarda akson boyunca taşınır. İki farklı hızda anterograd taşıma vardır:

- 1) Yavaş taşıma: 1–6 mm/gün hız ile aksonların sitoskeletal elemanları taşınır. Aktin, tübülün gibi mikrotübül proteinleri, nörofilaman ve mikrofilamanlar bu yolla taşınırlar.
- 2) Hızlı taşıma: Yaklaşık 400 mm/gün hız ile glikoprotein, lipid gibi hücre zarı bileşenleri, çeşitli enzimler ve nörotransmitter içeren veziküller taşınır.

Retrograd (somatopedal) taşıma, akson terminalinden hücre gövdesine doğru olan taşıma sistemidir. Ortalama hız 240 mm/gün kadardır. Retrograd taşıma ile nörotransmitter veziküllerinin ve intra-aksonal proteinlerin geri dönüşümü sağlanır.

Ayrıca akson terminalindeki ya da kesilmiş akson ucundaki sinir büyüme faktörü gibi nörotrofik faktörler ve herpes simpleks, polio gibi virüsler de geriye doğru taşınabilirler (4, 5, 21).

2.2.4. Schwann Hücreleri ve Myelin Kılıf

Schwann hücreleri, akson etrafında yer alan, iyon dengesinin sağlanmasına, nörotransmitterlerin dağılımına ve aksolemma boyunca sodyum kanallarının yerleşimine katkıda bulunan hücrelerdir. Nöroektodermal kökenli bu hücreler, periferik sinir sisteminin uydu hücreleridir ve akson çevresinde konsantrik karakterde fosfolipid bir tabaka olan myelin kılıfını sentezlerler. Myelinli ya da myelinsiz olsun, her sinir lifinde aksonlar ucuca dizilmiş Schwann hücreleri ile sarılmışlardır. Myelinli liflerde her bir Schwann hücresi tek bir aksonu çevrelerken, myelinsiz liflerde bir Schwann hücresi birden fazla aksonu çevrelemektedir. Ayrıca Schwann hücreleri tip 4 kollajen ve lamininden oluşan bir bazal membran üretirler ve bu da sinir lifini çevreler. Bu bazal membranın sinir rejenerasyonundaki rolü çok önemlidir, özellikle sinir rejenerasyonu sırasında, yeni büyümekte olan aksonal tomurcukların distal sinir güdüğüne uzanımları sırasında rehberlik görevi görür (21).

Myelin yapısı diğer hücre zarlarına benzemesine karşın içeriği farklıdır. Biyokimyasal olarak %75 lipid ve %25 proteinden meydana gelir. Myelin tabaka içerisinde bulunan lipidlerin %20 ila %30'unu oluşturan kolesterol, multilamellar yapının stabilizasyonunu sağlamaktadır. Myelin içeriğindeki diğer lipidler, glikolipid yapısında olan galaktoserebrozid, sülfatid ve gangliosiddir. Myelin kılıfının %25'ini oluşturan proteinler ise glikoprotein yapısında olup; bunların başlıcaları protein zero (Po), periferik myelin protein 22 kDa (PMP 22), myelin ilişkili glikoprotein (MAG), epiteliyal kadherin ve periaksindir (23).

Büyük çaplı sinirlerin hemen hepsi myelinli iken, çapı 1 mikrometreden (μm) küçük aksonlar genellikle myelinsizdir. Memelilerde dorsal spinal köklerin ve kutanöz sinirlerin yaklaşık %75'i, kasa giden liflerin %50'si ve postganglionik otonomik liflerin tamamına yakını myelinsizdir. Myelinli aksonların da myelinsiz kısımları vardır. Bu kısımlar, iki Schwann hücresi arasında kalan bölge olan Ranvier düğümleri ve akson çıkış bölgesi olan akson tepeciğidir. Bu bölgeler sinir ileti hızı

açısından önem taşır. Ranvier düğümleri, uyarının sıçrayıcı (saltatuar) şekilde iletimi ile çok hızlı taşınmasını sağlar (1, 21).

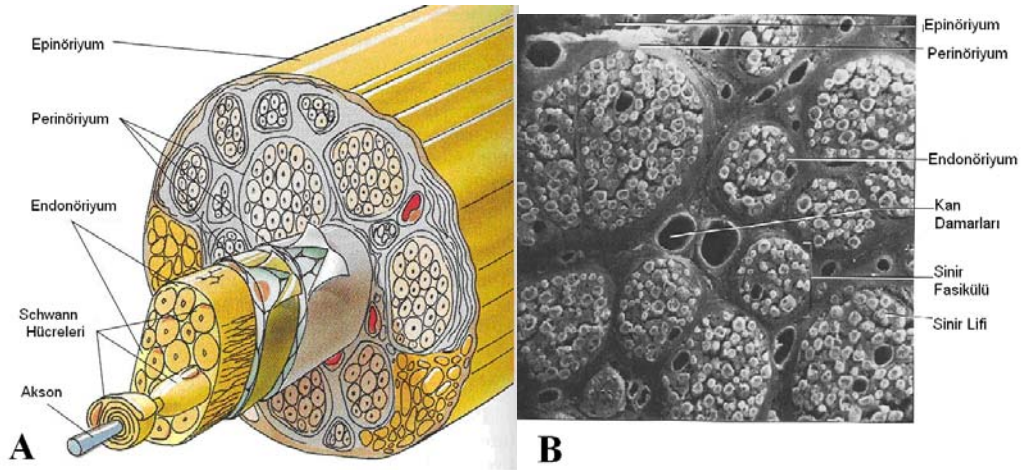
Bir sinirin myelinli olması aksiyon potansiyelinin iletim hızını arttırmaktadır. Myelin kılıfın kalınlığı da iletim hızını etkiler. Myelinsiz liflerde çap 0.2–1.5 μm ve iletim hızı 0.4–2.0 m/sn (metre/saniye) iken; kalın myelinli sinirlerde çap 12–20 μm ve iletim 72–120 m/sn gibi yüksek hızlardadır (1).

Sinir lifleri iletim hızları ve çaplarına göre 3 gruba ayrılır (21):

- A grubu lifler: Myelinli somatik afferent ve efferent liflerdir. Çapları 2.5–22 μm , ileti hızları 15–100 m/sn arasındadır.
- B grubu lifler: Myelinli otonomik preganglionik liflerdir. Çapları 3 μm , ileti hızları 3–15 m/sn kadardır.
- C grubu lifler: Myelinsiz somatik ve visseral afferent lifler ile postganglionik liflerdir. Çapları 0.2–1.5 μm , ileti hızları 0.3–1.6 m/sn kadardır.

2.2.5. Bağ Doku Yapısı

Periferik sinirler birbirinden bağımsız 3 farklı destek doku ile çevrelenmiştir: epinöriyum, perinöriyum, endonöriyum (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. A: Sinir kılıfları şematik çizim (Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2001: 204'ten çevrilerek alınmıştır.)(24) **B:** Sinir kılıfları elektron mikroskop görüntüsü (Shier D, Butler J, Lewis R. Hole's Essentials of human anatomy and physiology. 9th ed. New York: McGraw Hill, 2006: 393'ten çevrilerek alınmıştır.)(22)

Her bir sinir lifi, en içte endonörium denen mezoderm kaynaklı bir bağ doku ile çevrelenmiştir. Endonörium, mukopolisakkarit ana madde içerisinde yer alan kollajen ve retiküler liflerden, fibroblast, makrofaj, mast hücreleri gibi hücrelerden ve kapiller sistemden oluşan bir bağ dokudur; elastin içermez ve sinir lifi boyunca uzunlamasına organize olmuştur. Endonöriumun çevrelediği alan içerisindeki bölge sinir işlevleri için uygun bir ortam sağlar (5, 21).

Myelinli ve myelinsiz sinir liflerinin bir araya gelerek oluşturduğu yapı fasiküldür. Her fasikülü çevreleyen bağ dokuya perinörium adı verilir. Yassı perinöral hücreler tarafından oluşturulmuş çok katlı bir tabaka olup, travmalara karşı asıl koruyuculuğu üstlenir. Bu koruyucu fonksiyonun yanı sıra, kan-sinir bariyerini oluşturur. Perinöral kılıf sinirin distaline doğru gidildikçe incelik ve en distalde hücre tabakası tek kat kalır. Perinörium, epinöral damarlar ile endonöral damarları birleştiren anastomotik arteriol ve venüllerle delinir (5).

Kan-sinir bariyeri, perinöral hücreler ile endonöriumdaki endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı noktalarından meydana gelir. Bu bariyer, endonörium içindeki aksonal çevre ile vücuttaki ekstrasellüler boşluğu ayıran bir difüzyon bariyeri olup, aksonlar için uygun fizikokimyasal mikroçevreyi sağlar. Travmaya ve iskemiyeye karşı oldukça dirençlidir. Bu bariyer bir şekilde zarar görürse, periferik sinir sistemi zararlı maddelere karşı savunmasız kalır ve endonöral ödem gelişir. Ezilme tarzı sinir yaralanmalarında kan-sinir bariyerinin bozulduğu ve yaklaşık yedinci günde aşamalı olarak tekrar düzeldiği gözlenmiştir (25).

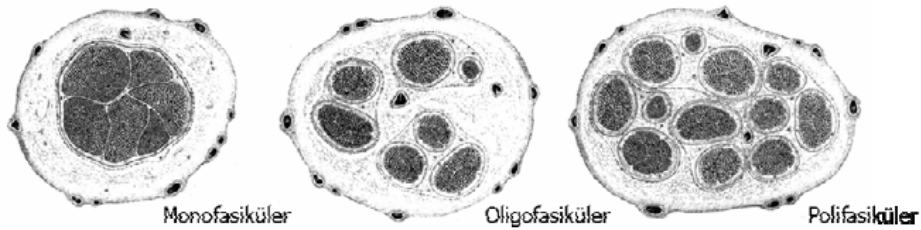
Sinir kılıfının en dış tabakası epinöriumdur. Epinörium tip 1 ve tip 3 kollajen liflerden, elastik liflerden, fibroblastlardan ve değişen oranlarda yağ dokudan meydana gelir. Esas görevi, fasikülleri ekstremitelerin hareketi esnasında travmalara karşı korumaktır. Bu nedenle özellikle eklem bölgelerinde oldukça kalındır (4, 5). Fonksiyonel olarak epinörium iki tabakadan oluşur. Derin tabaka internal (interfasiküler) epinörium olup, fasikülleri tek tek sarar ve bunları gevşek şekilde bir arada tutar. Eksternal (epifasiküler) epinörium, en dışta yer alan ve fasiküllerin üzerinden kolaylıkla sıyrılabilen bağ doku yapısıdır. Epinöriumun kalınlığı kişiden kişiye, sinirden sinire ve sinir kesitinin alındığı bölgeye göre kesit alanının %25-%75'i arasında değişir. Ekstremitelerde yüzeysel seyreden ya da

eklemleri geçen sinir kısımlarında bağ doku daha kalındır, bunun nedeni de tekrarlayan travmalara karşı koruyuculuğu arttırmaktır (5, 21, 26, 27).

Epinöriyumda sinirin beslenmesini sağlayan vasküler bir ağ bulunmaktadır. Lenfatik yapılar da yine bu tabaka içinde uzanır (21).

Periferik sinirler fasikül yapılarına (Şekil 2.4) göre 3 gruptur (1, 5):

- 1) Monofasiküler sinir: Birçok sinir lifi içeren tek bir fasikül
- 2) Oligofasiküler sinir: Birkaç büyük fasikülden oluşan sinir
- 3) Polifasiküler sinir: Çok sayıda fasikülden oluşan sinir



Şekil 2.4. Periferik sinirlerin fasikül yapılarına göre sınıflandırılması (Lundborg G. The nerve trunk. Nerve injury and repair. New York: Churchill Livingstone, 1988'den çevrilerek alınmıştır.)(28)

2.2.6. Sinir Vasküler Yapısı

Periferik sinirlerin vasküler yapısı ile ilgili ilk çalışma, 1768 yılında Isenflamm ve Doerffler tarafından yapılmıştır ve bu araştırmacılar renkli balmumunun yardımıyla, sinirlerin etrafında bir vasküler ağ olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra bu damarlanma hakkındaki detaylar, 1878 yılında Ranvier ve 1890 yılında Quenu ile Lejars isimli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. İnsanların çeşitli sinirlerinde vasküler yapıların detayları, Sunderland tarafından incelenmiştir. Vital mikroskopik yöntemlerin günümüzde gelişmesi ile deneysel hayvan modellerinde, in vivo olarak intranöral mikrovasküler yapının ve fonksiyonlarının incelenmesi mümkün olmuştur (29).

Sinir hücrelerinde, normal fonksiyonların devamlılığının sağlanabilmesi için yeterli oksijen desteği ile aerobik metabolizmalarının korunması önem taşır. Periferik sinirlerde uyarı iletimi ve aksonal taşıma için gerekli olan enerji, epinöriyum,

perinöriyum ve endonöriyum tabakalarında bulunan ve birbiri ile yakın bağlantılı olan bir vasküler ağ sayesinde sağlanır (2).

Periferik sinirlerde oldukça zengin bir damarlanma mevcuttur. Ekstrensik ve intrensik olmak üzere, birbiriyle bütünleşmiş çalışan, ancak fonksiyonel olarak birbirinden bağımsız iki ayrı sistem bulunmaktadır. Ekstrensik sistem, sinirin dış yüzeyindeki gevşek bağ doku içerisinde bulunan damarlardan oluşur. Bu bölgeye vaza nervorum denir ve bu dallar mezonöriyum denen gevşek bağ doku kılıfı içerisinde uzanırlar. Vaza nervorumlar sinirlere yandaş seyreden damarlardan gelen besleyici dallardan oluşur. Ayrıca kasa giden perforan damarlar ve periosteal damarlar da bu sisteme katkıda bulunurlar. Bu sistem sempatik uyarılar ve lokal ilaçlardan etkilenir. Mezonöriyumda uzunlamasına seyreden damarlar mezonöriyumu yer yer delerek, intrensik sistemle anastomozlar yaparlar. İntrensik sistem, epinöriyum, perinöriyum ve endonöriyum içerisinde yer alan vasküler pleksuslardan meydana gelir. Bu sistem metabolik olaylardan, sempatik uyarılardan ve lokal ilaçlardan etkilenmez. Bu iki sistem arasındaki dengeleyici bazı mekanizmalar, siniri vasküler problemlere karşı korur (2, 4, 21, 29).

Epinöriyumun derin ve yüzeysel katları içerisinde uzanım gösteren epinöral damarlar, her fasiküle besleyici dallar gönderirken, değişik seviyelerde perinöral vasküler pleksuslarla da anastomozlar yaparlar. Uzunlamasına seyreden perinöral damarlar, birçok alanda oblik olarak perinöriyumun iç tabakasını delerek endonöral aralığa geçerler ve endonöral vasküler pleksusu oluştururlar. Endonöral vasküler yatak, fasiküller boyunca devamlı anastomotik ağlar oluşturur ve bu sayede sabit bir fasiküler kan akımı sağlanır. Bu bölgedeki dolaşım, perinöriyumun daha dış tabakalarında geçerli olan sempatik innervasyonun aksine, lokal perfüzyon basıncı ile dengede tutulmaktadır (2, 4, 5).

Periferik sinirlerdeki damarlar, sinüzoidal ve kıvrımlı bir yapıya sahiptirler. Bu sinüzoidal ve kıvrımlı yapısal özellikleri sayesinde, vasküler sistem gerilme tipi travmalarda hasardan korunur (2, 5, 21).

Periferik sinirlerde klasik bir lenfatik sistem yoktur; ancak perinöriyum dışında ve endonöriyum içinde lenfatiklere benzer taşıma görevi yapan kanalların olduğu bilinmektedir. Endonöral boşlukta klasik bir lenfatik sistem olmadığı için, travma sonrasında oluşan ödem erken dönemde fasikül içerisindeki basıncı arttırarak,

sinirin normal fonksiyonunun devamı için gereken mikroçevreyi bozar. İleri evrede ise fibrozis ve skar oluşumu ile problem yaratır. Normalde endonöral damarlar geçirgen değildir, ancak travma sonucu geçirgenliklerinin artması ile oluşan endonöral ödem, yine endonöral mikrodolaşım ile temizlenir (27, 29).

2.3. Periferik Sinir Yaralanmaları

Periferik sinirler pek çok değişik travma şekli ile yaralanabilirler. Periferik sinir hasarına neden olan en sık yaralanma şekli, gerilim tipi yaralanmalardır. Periferik sinirler, kollajen içeren endonöriyumları sayesinde belli bir elastikiyete sahiptirler; ancak traksiyon kuvveti sinirin esneme kapasitesini aşarsa bu tip hasar meydana gelir. İkinci sıklıkta laserasyonlar gelir ve bu tip yaralanma sıklıkla bıçak gibi penetran bir aletle oluşur. Tam kesi oluşabileceği gibi, sıklıkla sinir elemanlarından bazılarında devamlılığın korunduğu tarzda görülür. Kompresyon tipi yaralanmalar ise yine sık görülür. Sinir devamlılığının korunmuş olmasına karşın, hem duyu hem de motor kayıp oluşabilir. Patofizyolojisi tam açıklanamamıştır, ancak muhtemel mekanizma mekanik kompresyon sonucunda oluşan iskemidir (3).

Yaralanma şekli ne olursa olsun, oluşan sinir hasarının onarımı ve fonksiyonların tam geri kazanımı cerrahi bir problem olmaya devam etmektedir. Travmanın şeklinin yanı sıra, sinir içyapısında oluşan hasar derecesi de elde edilecek iyileşme düzeyi ile yakın ilişkilidir (4, 9).

Periferik sinir yaralanmaları ile ilgili ilk sınıflama, Seddon tarafından 1948 yılında yapılmıştır. Bu sınıflamada 3 tip sinir hasarı tanımlanmıştır: nöropraksi, aksonotomezis, nörotomezis. Sunderland, 1951 yılında bu sınıflamayı detaylandırarak, 1 ile 5 arasında değişen 5 grup sinir yaralanma tipi tanımlamıştır. 1988 yılında Mackinnon birkaç tip sinir hasarını bir arada içeren 6. derece sinir hasarını bu sınıflamaya dahil etmiştir (5, 21, 30).

2.3.1. Seddon Sınıflaması (1948)

Nöropraksi: Geçici segmental iletim bloğu ile karakterize olup, anatomik bütünlük ve aksonal devamlılık korunmuştur (26, 31). Spontan iyileşir ve iyileşme tam olur, ancak iyileşme zamanı 5 gün ila 3 ay arasında değişir (ortalama 6–8 hafta). Histolojik olarak en sık demyelinizasyon görülür (5). Sinir yapısı ve yaralanma

distalindeki kasların uyarılabilirliği korunduğu için dejenerasyon görülmez (4). Geçici kompresyon, traksiyon ve künt travma ile oluşabilir. Örnek olarak turnike paralizisi ve cumartesi gecesi paralizisi (Saturday night palsy) gösterilebilir. Aksonal bir hasar olmadığı için, sinir tomurcuklanmasını (rejenerasyonu) gösteren Tinel bulgusu yoktur (5).

Aksonotomezis: Ciddi kompresyon veya gerilim tipi yaralanmalarda, aksonal devamlılıkta bozulma oluşabilir. Sadece myelin kılıf ve akson devamlılığında bir kesinti vardır; Schwann hücreleri bazal membranı, endonörium, perinörium ve epinörium sağlamdır. Böyle bir yaralanma sonrası eğer sinir hücresi ölmezse, lezyon seviyesi distalinde Wallerian dejenerasyon, proksimalinde ise aksonal tomurcuklanma görülür. Endonöral doku ve bazal membran, Schwann hücreleri için kılavuz tüp görevi görerek proliferasyon olmalarını sağlar (32). Destek bağ dokular sağlam olduğu için prognoz iyidir ve fonksiyonel geri dönüş tamdır. İyileşme süresi hastanın yaşına, uç organa, lezyon ile uç organ arası mesafeye ve rejenerasyon hızına bağlı olarak değişmektedir. Rejenerasyon günde 1–2 mm hızla olur, ancak iyileşme süresince uyarılmayan kaslarda denervasyon atrofi gelişebilir (21, 26, 31, 32).

Endonöral kılıf bütünlüğü korunduğu için aksonlarda yanlış yöne büyüme olmaz. Spontan rejenerasyon beklenen bu tip yaralanmada Tinel bulgusu vardır ve aksonal rejenerasyon ilerledikçe, bu bulgu da distale doğru ilerler (5).

Nörotomezis: En ciddi yaralanmalardır. Anatomik olarak sinirde ciddi hasarlanma vardır. Distalde daha fazla olmak üzere, hem distalde hem de proksimalde dejenerasyon vardır. Sinir elemanlarının bazılarının ya da tamamının devamlılığı bozulmuştur. Endonörium, perinörium ve epinörium hasarlanmıştır. Sunderland bu gruptaki lezyonları, kılıfların katılımlarına göre 3., 4., 5. tip hasarlar olmak üzere ayrı ayrı sınıflamıştır. Spontan rejenerasyon mümkün olmadığı için cerrahi onarım şarttır (4, 21).

Lezyon distalinde denervasyona bağlı tüm fonksiyonlarda kayıp izlenir. Etyolojik faktör tam kat bir kesi olabileceği gibi, iletimi engelleyen ya da siniri infiltre eden bir tümör veya skar dokusu da olabilir (30).

Sinir devamlılığı bazı durumlarda görülebilirse de, sinirin içyapısındaki bozulma nedeniyle sinirde fonksiyon yoktur. Sinir fasikülünün iç yapısı, aksonlardaki yıkım ve Wallerian dejenerasyon nedeniyle bozulur. Endonöral kılıf

bütünlüğü de çeşitli derecelerde bozulur ve ek olarak kanama, ödem, inflamatuvar reaksiyonlar sonucu fibrozis kaçınılmaz hale gelir (26).

2.3.2. Sunderland Sınıflaması (1951)

1. derece hasar: Seddon sınıflamasındaki nöropraksiye eşdeğerdir. Akson ve sinir kılıf yapıları sağlamdır; ancak travma alanındaki sinir segmentinde iletim kaybı ve demyelinizasyon vardır. Spontan iyileşir (5, 26).

2. derece hasar: Seddon sınıflamasında aksonotimezise karşılık gelir. Sinir kılıf yapıları sağlamdır; ancak akson bütünlüğü kesintiye uğramıştır. Distal segmentte Wallerian dejenerasyon gelişir. Schwann hücre bazal membranı ve endonöral kılıf sağlam olduğu için prognoz iyidir ve spontan iyileşir (5, 26, 30).

3. derece hasar: Epinöriyum ve perinöriyum sağlamdır, ancak Schwann hücre kılıfı, endonöriyum ve akson devamlılığı bozulmuştur. Akson distalinde Wallerian dejenerasyon izlenir. Endonöriyum ve Schwann hücre kılıfı hasarlandığı için iyileşme tam olmaz (5, 26).

Bu grup yaralanmalar Seddon sınıflamasındaki aksonotimezis ve nörotimezisin bir karışımı olarak kabul edilirler. İlimli bir 3. derece hasar intrafasiküler alanda minimal fibrozis ve iyi derecede rejenerasyonla iyileşebilir ki, bu tarz lezyonlar aksonotimezise karşılık gelir. Buna karşın şiddetli bir 3. derece hasarda, rejenerasyonu engelleyecek şekilde fibrozis oluşabileceği için, böyle bir yaralanma nörotimezis olarak kabul edilir (30).

Rejenerasyon, ayda yaklaşık 1 cm ilerler ve bu klinikte ilerleyen Tinel bulgusu ile takip edilebilir. Rejenerasyon sırasında nörom oluşumu ya da motor ve duyu liflerin yanlış eşleşmeleri kötü fonksiyonel sonuçlara neden olabilir (21, 26).

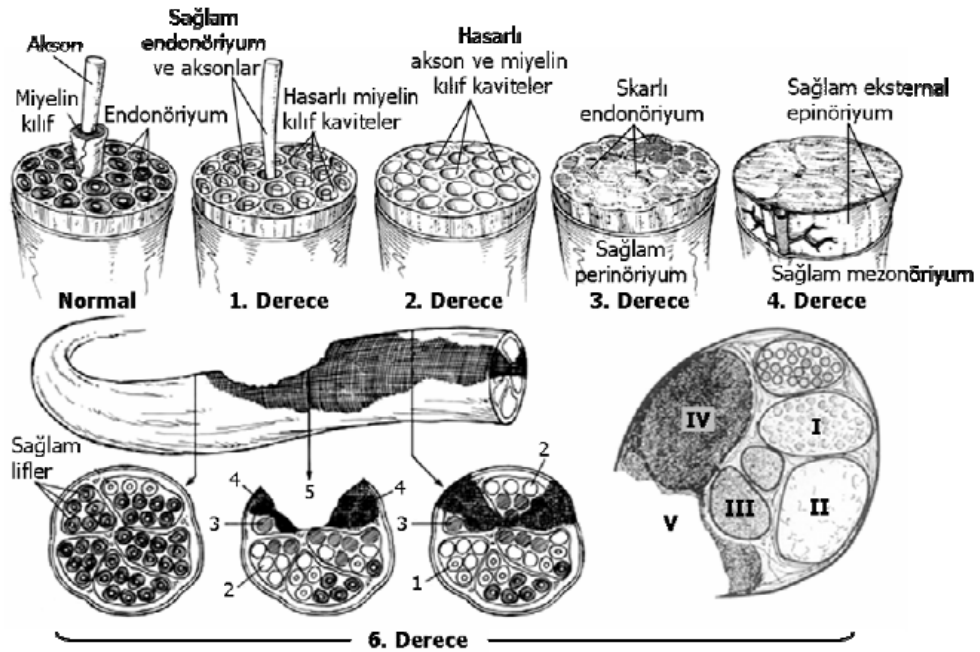
4. derece hasar: Epinöriyum dışındaki tüm tabakaların devamlılığı bozulmuştur. Fiziksel olarak sinir bütünlüğü devam etmekle birlikte, oluşacak skar dokusunun yaratacağı blok sinir rejenerasyonunu engeller ve hasar bölgesinde nörinom oluşumuna neden olur. Spontan iyileşme görülebilmemesine karşın oldukça nadir olduğu için cerrahi onarım önerilir. Bu tip hasarlanmada, hasarlı kısmın eksizite edilerek sinir uçlarına cerrahi olarak ucuca sütüre edilmeleri gerekir (21, 26).

Tinel bulgusu hasar bölgesinde mevcuttur, ancak rejenerasyon skar dokusu ile engellendiğinden distale ilerlemez. Lezyon distalinde Wallerian dejenerasyon vardır.

Bu tip hasar sıklıkla gerilim, traksiyon, ezilme, koter yaralanması veya sinire yapılan yanlış enjeksiyon sonucu meydana gelir (5).

5. derece hasar: Epinöriyum da dahil sinir devamlılığı tam olarak kaybolmuştur ve cerrahi onarım şarttır. Cerrahi onarım olmaksızın iyileşme mümkün değildir. Sıklıkla penetran travmalar ile meydana gelir (5, 21).

Mackinnon bu sınıflamaya 6. derece sinir hasarı şeklinde bir ekleme yapmıştır. Mikst tip sinir hasarı denen bu grupta, sinir boyunca değişik seviyelerde ve farklı derecelerde sinir hasarları bir aradadır. Özellikle ezici tip yaralanmalarla meydana gelir. Bazı fasiküller normaldir, bazılarında spontan iyileşme beklenir, ancak 4. ve 5. derecede hasarlanmış fasiküllerde rejenerasyon mümkün değildir. Tedavisinde intranöral nöroliz ile sağlam fasiküllere zarar vermeden, 4. ve 5. derece hasarlı fasiküllerin cerrahi onarımları gerekir (5, 30). Sinir hasar tipleri Şekil 2.5'te özetlenmiştir.



Şekil 2.5. Periferik sinir yaralanmalarının sınıflandırılması (Brandt KE, Mackinnon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM, editors. Grabb and Smith' plastic surgery. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: 82'den çevrilerek alınmıştır.) (33)

2.4. Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu

Biyolojik açıdan, sinir yaralanması ve onarımından sonra fizyolojik sonuçları etkileyen faktörler; hasar sonrası sağlam kalan sinir hücrelerinin sayısı, aksonal büyümenin hızı ve kalitesi, rejenere olan aksonların uygun şekilde düzenlenmeleri, uç-organların durumu, beyin somatosensoriyal ve motor korteksinde kortikal reorganizasyon işlemidir. Klinik olarak iyileşme sıklıkla tam olmaz ve en sık zayıf ya da anormal duyu, motor fonksiyonlarda kayıp, soğuk intoleransı, ağrı gibi hastanın sosyal hayatını ve iş hayatını etkileyen olumsuz belirtilerle seyreder (6).

Periferik sinir yaralanmalarında, yaralanma bölgesinin yanı sıra, yaralanma bölgesinin proksimalinde, distalinde ve sinir hücresinin gövdesinde bir takım yapısal ve işlevsel değişiklikler meydana gelir. Hasar distalindeki tüm myelinli veya myelinsiz lifler Wallerian dejenerasyona uğrar (7)

2.4.1. Sinir Hücre Gövdesi

Aksonal yaralanma sonrasında, altı saat içerisinde sinir hücre gövdesinde hacim artar, hücre çekirdeği perifere doğru yer değiştirir, nissl cisimcikleri ve granüllü endoplazmik retikulumlar yıkılır ve sitoplazmanın yapısı değişir. Bu değişikliklerin tümüne birden 'kromatoliz' denir. Bu reaksiyonel değişiklikler hasar sonrası 2 ila 3. haftalarda en yüksek değerine ulaşır. Bu değişikliklerin amacı kaybolan aksoplazmik hacmi yerine koyabilmektir. RNA içeren yapılarda, protein sentezindeki hızlanmayı yansıtacak şekilde bir artış olur (3, 4). Rejenere olan akson tomurcuklarının oluşturdukları büyüme konisinin ana komponenti olan aktin, tubulin ve akson büyümesi için gereken yapısal proteinlerin (growth-associated proteins; GAPs) sentezi artarken, transport fonksiyonunda rolü olan nörofilaman proteinlerinin sentezi azalır. Özellikle GAP 43, akson boyunca taşınan bir fosfoproteindir ve rejenere olmakta olan aksonlardaki büyüme konilerinde, akson hasarı sonrası miktarı yaklaşık 100 kat artar, rejenerasyon tamamlandıktan sonra normal düzeyine döner (9, 31). Sinir hasarı sonrasında ortaya çıkan kromatoliz, temel olarak rejenerasyonu göstermekle birlikte, aynı zamanda sinir hücresinin travmadan ne şiddetle etkilendiğinin de bir göstergesidir ve geniş aksoplazmik hacim kayıplarında oluşan kromatoliz ile hücre onarım mekanizmaları başlasa bile, hücre ölümü meydana gelebilir (6).

Sinir hücresinde oluşan bu değişikliklerin derecesi, hasarın şiddeti ve yaralanmanın ne kadar proksimalde olduğu ile ilişkilidir. Hücre gövdesine çok yakın yaralanmalar hücre ölümüne neden olabilir (3, 21, 31). Maggie ve ark.'nın (5) rat siyatik sinir kesisi ile yaptıkları çalışmada, hasar proksimalde yerleşirse nöron kayıp oranı %27 saptanırken, hasar distalde olduğunda nöron kaybı %7'lere kadar düşmektedir.

Hücre ölümü duyu nöronları için daha tipiktir. Duyu hücre gövdelerinde gerçekleşen hücre ölümünün, hasar sonrası ilk 24 saat içinde gerçekleştiğine dair çeşitli bilgiler vardır ve bu bilgiler ışığında tedavinin ilk 24 saat içerisinde başlaması gerekmektedir. Motor nöronlarda duyu nöronları ile kıyaslandığında hücre ölümü daha az gerçekleşmektedir (9). Dorsal kök ganglionlarında aksonotomezis tipi yaralanmalar sonrasında, apopitozis ilişkili hücre ölümü insidansı %20 ile %50 arasında değişmektedir (6).

2.4.2. Proksimal Segment

Aksonal yaralanma seviyesinin proksimalinde, birkaç internodal segment boyunca ilerleyen ve distal segmenttekine benzer bir dejenerasyon görülür. 24 saatlik bir latent period sonrası, proksimal kesik uçta terminal ve kollateral aksonal tomurcuklanmalar meydana gelir. Anterograd ilerleyen bu büyümede, kollateral tomurcuklar aksonun sağlam olduğu Ranvier düğümlerinden köken alırken, terminal tomurcuklar zedelene aksonun proksimal ucundan çıkar. Hasarlanmış sinirde akson ucundan tomurcuklanma ilk 6 saat içinde başlamasına karşın, bu ilk tomurcuklar genelde rezorbe olurlar. İnternal sitoskeletal yapıları olan kalıcı tomurcuklar, genelde ilk 24 saatin sonunda belirmeye başlarlar. Bu şekilde uzanan her bir tomurcuğa 'rejenerasyon ünitesi' denir. Her bir tomurcuğun ucundaki kısma ise 'büyüme konisi' denir (4, 21, 31).

Büyüme konisi, düz endoplazmik retikulum, mikrotübül, mikrofilaman, mitokondri, lizozom ve diğer veziküler yapılardan zengindir. Aktin filamanları ve myozin içerir. Bu yapılar, büyüme konisinin filapoid çıkıntılar yaparak hareketli olmasını sağlar. Distal sinir segmentindeki Schwann hücre kolonları (Büngner bantları) ve Schwann hücrelerinin bazal laminaları, büyüme konisinin ilerlemesi için uygun ortam sağlarlar. Büyüme konisinin, Schwann hücre bazal laminasında bulunan

fibronektin ve laminine affinitesi vardır ve aksonal tomurcukların büyüme yönünü belirleyen faktörlerden biri de bu affinitedir (5, 21).

Periferik sinir rejenerasyon kapasitesini, ilk kez Cajal isimli araştırmacı 1928 yılında kedilerin omuriliklerinde yaptığı çalışmalarda göstermiştir. Aksotomiye takiben proksimal uçta pek çok tomurcuğun oluştuğunu ve bunların distale uzanarak rejenerasyonu sağladığını saptamıştır. Cajal ayrıca rejenere olan aksonların, diğer dokulardan ziyade distal sinir segmentine doğru tercih edilir bir büyüme patterni gösterdiklerini de ortaya koymuştur (nörotropizm) (6, 31).

Aksonal tomurcukların sayısı zamanla azalır, bazıları distal segment ile bağlantı yaparken; diğerleri regrese olur. Bağlantıyı yapabilenler mature olurlar. Uç organlardan salgılanan trofik maddeler bu yönlendirmeyi düzenlerler (4).

2.4.3. Distal Segment

Distal sinir segmentinde akson ve myelin kılıfta meydana gelen hücresel dejeneratif değişikliklere 'Wallerian dejenerasyon' denir. İlk kez 1850 yılında Waller isimli araştırmacı kurbağa hipoglossal sinirinde, sinirin kesilmesi sonrasında distal segmentte oluşan değişiklikleri gözlemlemiş ve bu dejeneratif sürece Wallerian dejenerasyon ismini vermiştir. Wallerian dejenerasyon ile akson ve myelin kökenli maddelerin temizlenmesi sağlanırken, rejenere olan aksonun büyümesi için uygun ortam oluşturulur. Prolifere ve diferansiye olan pluripotent Schwann hücreleri, bazal lamina boyunca dizilerek Büngner bantlarını oluştururlar. Ortada oluşan içi boş tüp yapısına endonöral tüp denir (8, 9, 31).

Aksoplazmik hücresel iskelet, proteolitik enzimler ile yıkılır. Bu işlem kalsiyum bağımlıdır. Aksoplazmada nörofilaman yıkımı, kalsiyum ile aktive olan proteolitik enzimlerle meydana gelir. Myelin, Schwann hücreleri ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bu fiziksel değişikliklerin büyük bir kısmı ilk birkaç hafta içerisinde tamamlanır, ancak tüm debrisin temizlenmesi birkaç ayı bulur (4, 9).

Özel radyografik tekniklerle, Schwann hücre proliferasyonunun üçüncü günde en yüksek değerlere ulaştığı ve hasar sonrası ikinci haftanın sonuna dek azalarak devam ettiği gösterilmiştir (4, 31). Endonöral tüp kılıfı, Schwann hücre bazal laminalarında kollajen birikimine sekonder kalınlaşmaya başlar ve giderek distal segmentte endonöral tüpün genişliği azalır. Eğer endonöral tüp rejenere olan

akson ile penetre olamazsa, ilerleyici fibrozis sonucunda tüp tamamen oblitere olur. Endonöral tüpler, hasarlanma sonrası ilk 3 ay içinde orijinal çaplarının %10-20'si kadar bir oranda daralırlar (3).

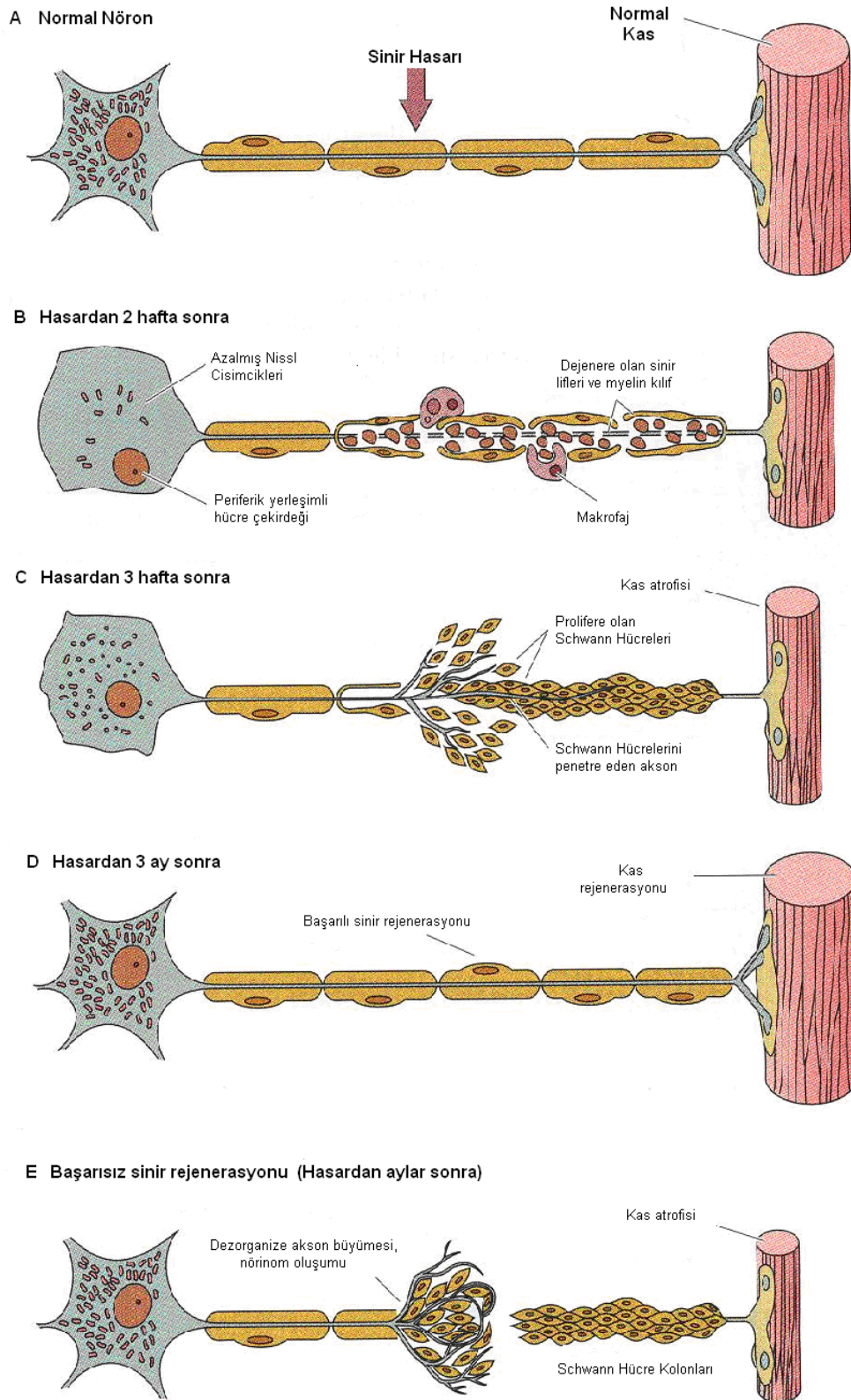
Tomurcuklar proksimal sinir güdüğünden distale doğru ilerlerler. Bu hareketlenme sinir iyileşmesinin başarısını etkileyen en önemli olaydır. Bazı tomurcuklar bağ doku içersine doğru uzanabilirler ki, bu nörinom oluşumu ile sonuçlanır. Tomurcuklar Büngner bantlarını takip ederek, perifere doğru uzanıp hedeflerini bulurlar. Başlangıçta proksimal segmentteki tomurcuklanan akson sayısı, distal segmentteki mevcut akson sayısından daha fazladır, ancak zaman içerisinde periferik bağlantıyı yapamayan tomurcuklar dejenere olur ve akson sayıları eşitlenir (3, 4). Sinir dejenerasyon ve rejenerasyon süreci Şekil 2.6'da özetlenmiştir.

Hayvan deneylerinde distal segmentin rejenerasyon hızının nörotomezis tipi yaralanma sonrası 2.0–3.5 mm/gün, aksonotomezis tipi yaralanma sonrası 3.0–4.5 mm/gün olduğu saptanmıştır. İnsanlarda ise ortalama aksonal rejenerasyon hızı günde 1–2 mm'dir (4). Proksimalden distale doğru ilerledikçe rejenerasyon hızı azalmaktadır. Rejenerasyon hızı, hasar alanının sinir hücre gövdesine uzaklığı ile ters orantılıdır (Tablo 2.1)(21).

Tablo 2.1. Üst ekstremitede sinir hasar bölgesine göre rejenerasyon hızları

Sinir hasar bölgesi	Günlük rejenerasyon hızı
Üst kol	8.5 mm/gün
Proksimal ön kol	6 mm/gün
El bilek	1–2 mm/gün
El	1–1.5 mm/gün

Distal sinir segmentinin vasküler ağı da yaralanmaya cevap olarak, önce vazokonstrükte olur, daha sonra vazodilate olur, ama en başarılı aksonal rejenerasyondan sonra bile orijinal kan akımının ancak %60-80'ine ulaşabilir (33).



Şekil 2.6. Periferik sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu (Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2001:216'dan çevrilerek alınmıştır.)(24)

2.4.4. Sinir İyileşmesinde Makrofaj ve Schwann Hücrelerinin Rolü

Normal bir periferik sinirde, makrofajlar, normal endonöral hücre topluluğunun %5'inden azını oluşturmaktadır. Sinirin kesi ya da ezilme şeklinde hasarlanmasından sonra endonöral hücre içeriği hızla artar. Bu hücrelerin bir kısmı Schwann hücreleri, fibroblast ve endotel hücreleri iken, bir kısmı da distal güdükte hasar alanına infiltre olan myelomonositik hücrelerdir (7).

Hasar sonrası proliferen olan Schwann hücreleri, farklılaşarak bazal lamina üzerinde dizilirler ve Büngner bantlarını oluştururlar. Schwann hücre proliferasyonu ile makrofajların bölgeye toplanması eş zamanlı seyrederek; bu da Schwann hücre proliferasyonunda makrofajların tetikleyici bir rolü olduğunu göstermektedir. Normal periferik sinirde NGF ve NGF reseptörü çok az bulunur, ancak makrofaj göçü ile interlökin-1 (IL-1) seviyesi artar; bu da Schwann hücresinde NGF transkripsiyonunu ve NGF reseptör dansitesini artırır. NGF reseptör ekspresyonu, aksonal kontakt ile kontrol edilmekte olup; distal güdük ile temas sağlandığında Schwann hücrelerindeki reseptör sayıları azalmaktadır. Ek olarak myelini sindiren makrofajların, Schwann hücreleri için mitojenik olan PDGF ve FGF sentezledikleri de saptanmıştır (6, 8, 9).

Nöral rejenerasyonda rol alan nörotrofinler; NGF, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain derived neurotrophic factor, BDNF), nörotrofin-3, nörotrofin-4, epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF), IGF-1 ve 2, glial kökenli nörotrofik faktör (Glial derived neurotrophic factor, GDNF), Schwann hücreleri tarafından aksonal hasara cevap olarak salınırlar ve NGF reseptörlerine bağlanırlar. Bu şekilde aksonun büyüme konisinde rejenerasyonu desteklerler (5).

Aksonal rejenerasyon, sinir elemanları dışındaki diğer bağ doku yapılarından ziyade, akson distal güdüğüne doğru tercih edilir bir büyüme gerçekleştirir, ki bu olay 'nörotropizm' olarak adlandırılır. Bu aksonlarca tercih edilir büyüme yönü, salınan çeşitli nörotrofik faktörler ve Schwann hücrelerinin migrasyonu ile sağlanır (9). Aksotomiden sonra, distal sinir güdüğündeki Schwann hücrelerinde hücresel adezyon molekülleri artmaktadır. Özellikle glikoprotein L-1, nöral hücre adezyon molekülü ve N-kaderin artmakta ve bunlar da akson tomurcuklarının nörotropizmini desteklemektedir (5). Ayrıca NGF reseptörlerinin de hücre yüzey adezyon molekülü olarak etki ettiği, NGF'ün ise akson üzerinde oluşan NGF reseptörleri ve Schwann

hücreleri arasında köprü oluşturarak sinir hücrelerine destek verdiği düşünülmektedir (8). Sinir hasarı sonrası, Schwann hücreleri NGF dışında IGF-1, silier nörotrofik faktör (Ciliary neurotrophic factor, CNTF) ve BDNF gibi büyüme faktörleri de oluşturarak büyümeye katkı sağlarlar (6).

Makrofajlar profesyonel fagositik hücrelerdir ve sinir hasarı sonrası primer görevleri myelin debrisin temizlenmesidir. Deneysel çalışmalarda, makrofajların endonöriyuma infiltrasyonu engellendiğinde, dejenerasyon evresinin akut fazında Schwann hücreleri tarafından myelinin yıkımı gerçekleşmemekte ve debrisin temizlenmesi oldukça yavaş olmaktadır. Benzer şekilde, deneysel olarak Schwann hücrelerinin bölünmeleri bloke edilirse, yine sinir dejenerasyonu ve takip eden rejenerasyon oldukça yavaş seyreder (7).

Makrofajlar kadar etkin olmamakla beraber, Schwann hücreleri de fagositik etkili davranarak myelin yıkımına yardım ederler. Schwann hücrelerinin hasar sonrası major histokompatibilite antijeni (MHC) klas 2 pozitif hale gelerek, myelinin bazı komponentlerini makrofajlara sunup, makrofajları daha da etkin hale getirdikleri saptanmıştır. Benzer şekilde myelin debrisi fagosit eden makrofajlar da, myelin kökenli ürünleri Schwann hücrelerine sunarak, bu hücelere mitojenik etki ederler ve bu artıkların remyelinizasyonda kullanımını sağlarlar (7, 8).

Aktive makrofajlar ayrıca hasar alanına endotel hücre migrasyonunu da arttırmırlar. Tümör nekrozis faktör (TNF) gibi kapiller endoteliyal hücrelerin davranışlarını etkileyen bazı büyüme faktörlerinin sentez ve sekresyonunu uyararak anjiogenezisi desteklerler (7).

Büngner bantlarının bazal laminaları, diğer bazal laminalar gibi bol miktarda laminin ve fibronektin içerir. Bu iki molekül, kültürlerde akson tomurcuklarının büyümesinde oldukça etkili faktörler olarak saptanmışlardır (6, 8).

Sonuç olarak Schwann hücreleri rejenerasyonu üç farklı yolla destekler. Birincisi hücre yüzey adezyon moleküllerinin sentezinin arttırılması, ikincisi laminin, fibronektin, heparan sülfat gibi ekstrasellüler matriks proteinlerini içeren bazal membranın oluşturulması ve üçüncüsü sinir büyümesini destekleyen pek çok büyüme faktörü ve reseptörlerinin üretimini arttırılmasıdır (11).

2.5. Sinir İyileşmesinde Nörotrofik Faktörlerin Rolü

Son yıllarda sinir iyileşmesinde nörotrofik faktörlerin önemi üzerinde sıklıkla durulmaya başlanmıştır. Hasarlanmış sinirde ve hedef organlarda bu faktörler, travma sonrası ortaya çıkarak ve akson boyunca retrograd taşınıp sinir rejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Pek çok deneysel çalışmada, bu faktörlerin sinir hasarında kullanımıyla, sinir hücre yaşayabilirliğinde ve aksonal büyümede artış saptanmıştır (6, 10).

Yaralanma sonrasında aksonların canlılıklarını sürdürmelerinde ve aksonal büyümede etkili olan endojen kaynaklı çok sayıda faktör tanımlanmıştır. Akson ile Schwann hücreleri arasındaki ilişkinin bozulması, bu faktörlerin sentez ve salınımında artışa neden olmaktadır. Nörotrofik faktörler reseptörlerine göre 2 gruptur. Birinci grubu oluşturan nörotrofinler, NGF, BDNF, nörotrofin-3, nörotrofin-4/5 ve son yıllarda bulunan nörotrofin-6'dır. İkinci grup ise nöropoetik sitokinler olarak anılır ve bu grupta CNTF, lökemi inhibitör faktör (Leukemia inhibitory factor, LIF) ve interlökin-6 (IL-6) bulunmaktadır. Bunların yanı sıra, sinir rejenerasyonunun değişik aşamalarında etkili olan, FGF, IGF-1 ve 2, TGF, GDNF, TNF, VEGF, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörleri de vardır (6, 11, 34).

Nörotrofinler 'trk' olarak adlandırılan yüksek affiniteli tirozin kinaz reseptörlerine ve 'p75' olarak adlandırılan düşük affiniteli NGF reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler. Reseptörlerle etkileşim sonucu hücre içi sinyaller iletilir ve hücre cevabı oluşur. Farklı nörotrofinlere spesifik olan, üç farklı trk reseptörü saptanmıştır. Sadece yüksek affiniteli reseptör içeren (trkA) nöronlar NGF'e yanıt verebilir. Motor nöronlarda trkB ve trkC reseptörleri bulunduğu ve trkA reseptörü olmadığı için NGF motor nöronlar üzerinde etkili değildir. BDNF, trkB ve trkC üzerinden, NT-3, trkC üzerinden ve NT-4/5, trkB üzerinden etkilerini gösterir (6, 10, 32).

2.5.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

Levi-Montalcini ve Hamburger tarafından 1951 yılında ilk tanımlanmış nörotrofik faktördür. Glikozillenmemiş, 26 kDa ağırlığında, homodimerik bir polipeptittir. İlk olarak erkek fare tükrük bezinden elde edilmiş olan NGF, sinir

sistemi üzerinde pek çok değişik etkiye sahiptir. Sinir hasarı sonrası makrofaj, Schwann hücreleri ve fibroblastlardan sentezlenerek ortama salınmaktadır. Yapılan deneylerde, NGF kullanımı ile doğal ya da deneysel olarak indüklenmiş hücre ölümünü sempatik ve duyuşal nöronlarda geri döndüğü ve ek olarak anti-NGF antikollarının, in vivo olarak sempatik sinir gelişimini bloke ettiği gösterilmiştir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında, NGF ile aksonal tomurcukların büyüme yönünün de etkilendiği saptanmıştır. Sempatik ve duyuşal nöronlar, normal gelişimleri için de NGF'e ihtiyaç duyarlar, ancak parasempatik ve motor nöronlara etkisi yoktur (11, 34, 35, 36).

NGF mRNA, normalde erişkin sıçan sıyatik sinirinde çok düşük düzeylerde bulunur; ancak deneysel sinir hasarı sonrası düzeyi hızla artar. Bu artışta, aktive olup siniri infiltre eden makrofajların ortamda arttırdığı IL-1 seviyeleri mediatör olarak etkilidir (11).

Zhuk ve ark. (37), NGF uygulaması ile aksotomilerden sonra görülen santral kromatoliz ve hasarlı nöron ölümünde azalma, protein sentezi, fosforilasyonu ve kollateral lif tomurcuklanmasında artış saptamışlardır. Kesilmiş sıyatik sinir distal segmentinde, NGF'de keskin bir artış oluşarak sinir rejenerasyonunu hızlandırmaktadır. Lee ve ark.'nın (38) sıçan sıyatik sinirinde yaptıkları çalışmada, kontrollü NGF salınımının aksonal rejenerasyonu doz bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür.

Sinir ezilme yaralanması ya da aksotomilerden sonra, NGF uygulanması ile myelinize akson sayısında ve myelin kalınlığında artış ve nöral internal organizasyonun daha düzgün olduğu ve sinir rejenerasyonunu hızlandırdığı, pek çok deneysel çalışmada gösterilmiştir (12, 39, 40, 41, 42, 43, 44).

Duyuşal arka kök ganglionlarının yaşayabilirliği üzerindeki etkisi kanıtlanmış olan NGF, fibronektin ile beraber kullanıldığında motor nöronlar üzerinde de etkili olabildiği gösterilmiştir (39, 45).

2.5.2. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)

İlk kez 1982 yılında bulunmasına karşın, moleküler tekniklerle karakterize edilmesi uzun yıllar almıştır. NGF ile benzer bir moleküler yapıya sahip, 120 aminoasitli bir polipeptittir. Daha çok trkB olmak üzere, hem trkB hem de trkC

reseptörlerine bağlanabilir. Sinir hasarı sonrası, Schwann hücrelerinde ve hedef organ olan kasta miktarı artar, retrograd olarak sinir hücre gövdesine taşınır (11, 45, 46).

Yapılan çalışmalarda, aksotomi sonrası omurilik ön boynuzda yerleşik motor sinir hücre ölümünü azalttığı, periferik sinir rejenerasyonunu ve remyelinizasyonunu arttırdığı, ek olarak hücre kültürü çalışmalarında da, motor nöronların yaşayabilirliğini arttırdığı saptanmıştır (47, 48).

Zhang ve ark.'nın (49) sıçanlarda periferik sinir hasarı oluşturdukları deneysel çalışmalarında, BDNF ile periferik sinir rejenerasyonu ve remyelinizasyonunda oluşan düzelmeyi, anti-BDNF antikoru verildiğinde bloke olduğu görülmüş ve sinir rejenerasyonu için endojen BDNF'ün gerekli olduğu ortaya konmuştur.

Boyd ve ark. (50), BDNF'ün periferik sinir rejenerasyonu üzerine etkisinin doza bağımlı bifazik olduğunu öne sürmüşlerdir. Düşük dozlarda (0,5–2 µg/gün) uygulandığında motor akson rejenerasyonunu hızlandırmasına karşın, yüksek dozlarda (12–20 µg/gün) rejenerasyonu inhibe ettiği görülmüştür. Ancak bu doz bağımlı mekanizma henüz net olarak çözülememiştir.

2.5.3. Nörotrofin-3 (NT-3)

BDNF ve NGF ile yapısal benzerlik gösteren 119 aminoasitli dimerik yapılı bir polipeptit olup, hem santral sinir sisteminde, hem de periferik sinir sisteminde bolca bulunur. Tercihen trkC reseptörlerine bağlanır. Duyusal ve parasempatik nöronlarda yaşayabilirliği ve diferansiyasyon destekler. İnvitro motor nöron yaşayabilirliği üzerine güçlü etkileri vardır. Nöromusküler eşik fonksiyonlarını düzenler. Motor nöronları doğal hücre ölümünden korur. Ayrıca periferik sinir rejenerasyonunda da etkileri vardır. Spinal kord yaralanmalarında, NT-3 enjeksiyonu ile kortikospinal yollarda rejeneratif tomurcuklanmada artış olduğu gösterilmiştir (10, 45, 46).

2.5.4. Nörotrofin-4/5 (NT-4/5)

NGF ile yapısal benzerlik gösteren, 130 aminoasitli dimerik bir polipeptittir. Tercihen trkB reseptörlerine bağlanır. Hasarlanmış retinal ganglion hücrelerinin

yaşayabilirliğini desteklediği, motor nöron yaşayabilirliği için güçlü destekleyici etkilerinin olduğu, motor nöronların iskelet kası innervasyon kapasitelerini arttırdığı saptanmıştır (45). Yin ve ark.'nın (51), fibrin yapıştırıcının NT-4/5 için taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı sıçan siyatik sinir kesi modelinde, aksotomi sonrası periferik sinir rejenerasyonunda NT-4/5'in etkili olduğu gösterilmiştir.

2.5.5. Nörotrofin-6 (NT-6)

Nörotrofin ailesinin en son bulunmuş olan üyesi olup, bu da NGF ile yapısal benzerlik gösterir. Henüz yeterli deneysel çalışma yapılmamıştır; ancak sınırlı sayıdaki deneylerde sempatik ve duyuşal nöronlarda etkili olduğu görülmüştür. Motor nöronlardaki etkisi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır (45).

2.5.6. Silier Nörotrofik Faktör (CNTF)

Sağlıklı periferik sinirlerde Schwann hücrelerinde ve santral sinir sisteminde astrositlerde bol miktarda bulunan ve yapısal olarak NGF'den farklı yapıda bir nöroaktif sitokindir. CNTF, motor ve duyuşal nöronlarda artmış metabolik aktivite ile beraber, her iki tip sinirde de aksonal tomurcuklanmayı artırır. Aksotomilerden sonra, distal güdükte CNTF mRNA seviyeleri hızla düşer ve akson tekrar rejenere olana kadar bir artış görülmez. Sinir rejenerasyonuna CNTF'de artış eşlik eder ve CNTF seviyelerinin devamlılığı için, aksonların glial hücrelerle temas etmesinin kritik önemi olduğuna işaret eder. CNTF ile in vitro olarak, aksotomilerden sonra motor nöronların yaşayabilirliğin de artış saptanmış olmasına karşın, trofik desteği henüz açıklığa kavuşmamıştır. Hasara yanıt olarak glial hücrelerden salındığı düşünülmektedir. CNTF aynı zamanda, nöron kaynaklı bir myojenik faktör olarak da düşünülmektedir. Tedavi amacıyla uygulandığında, kaslarda denervasyona bağlı gelişen atrofiyi azaltmakta ve kas gücünün yeniden kazanılmasına yardımcı olmaktadır (10, 11).

CNTF'ün, bazik FGF, BDNF ve NGF ile sinerjistik etki gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. McCallister ve ark.'nın (52), sıçan periferik sinirinde yaptıkları çalışmada aksotomi sonrası CNTF ve NGF beraber uygulandığında, aksonal rejenerasyonda artış olduğu görülmüştür.

2.5.7. Lökemi İnhibitör Faktör (LIF)

Yamamori ve ark. tarafından 1989 yılında bulunan, periferik sinirlerin yaşayabilirliğini destekleyen bir diğer büyüme faktörüdür. İn vitro çalışmalarda, sempatik nöronlardaki aktivitesinin CNTF ile oldukça benzer olduğu ve CNTF ile benzer sinyal yollarını kullandığı saptanmıştır. Diğer nörotrofik faktörler gibi retrograd taşınarak, arka kök ganglionlarındaki nöronları etkiler. Sinir hasarı sonrasında retrograd bu taşınma işlemi, CNTF ile beraber artar. Schwann hücreleri tarafından üretildiği düşünülmektedir. Aksotomize sinirlere LIF uygulandığında, sinir rejenerasyonunun ve myelinizasyonunun artmasının yanı sıra, kas kitlesinde ve kasılma gücünde de artış olduğu saptanmıştır (10).

Kurek ve ark. (53) tarafından LIF üretimi baskılanmış farelerle yapılan deneyde, kas rejenerasyonunun belirgin şekilde azaldığı, ancak bu durumun LIF infüzyonu ile düzeldiği gözlenmiştir. Sıçanlarda, omurilik hasarı sonrasında kullanımı ile akson rejenerasyonunda artış ve lökomotor fonksiyonlarda düzelme olduğu saptanmıştır (54).

2.5.8. Glia Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF)

İlk kez 1993 yılında bulunduğu dopaminerjik nöronlarda etkili olduğu düşünülmüş, ancak sonradan yapılan çalışmalarda pek çok nöron popülasyonunda potent bir nörotrofik faktör olduğu saptanmıştır. Embryonik sıçan omurilik motor nöronlarından elde edilebilir. Bunların kolinerjik maturasyonunu desteklerken, hem duyuşsal hem de motor nöronların, doğal ya da travmaya bağlı hücre ölümünü azaltır. Schwann hücreleri tarafından sentezlenir ve bu hücreler üzerine güçlü trofik etkisi ile periferik sinir iyileşmesinde de rol alır. Özellikle kronik periferik sinir hasarında, GDNF düzeylerinde daha belirgin bir artış olduğu saptanmıştır. Deneysel olarak, sıçan siyatik sinir hasarında kullanılmış ve rejenerasyonun arttığı saptanmıştır (11).

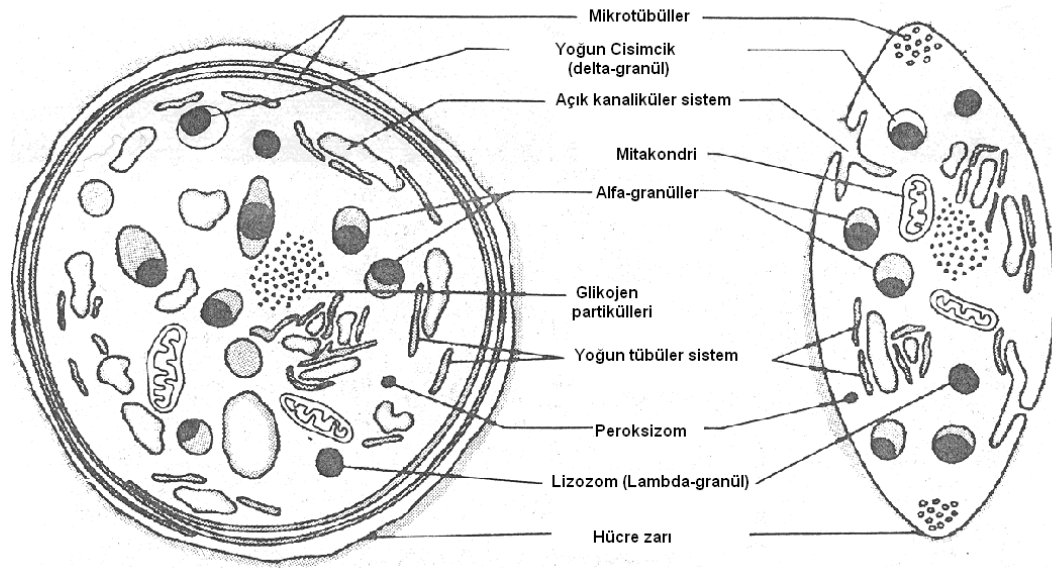
Periferik sinir hasarı sonrası iskelet kasında da düzeyleri artar ve retrograd olarak motor nöronlara taşınır; hem in vivo hem de in vitro olarak motor nöronların yaşayabilirliği üzerindeki etkisi gösterilmiştir (10).

Sinir rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri bulunan diğer büyüme faktörlerinden (FGF, PDGF, TGF- β , EGF, VEGF, IGF) detaylı olarak trombosit zengin plazma kısmında bahsedilecektir (bkz. sayfa 37–44).

2.6. Trombositler

Trombositler, megakaryositlerin sitoplazmik parçalarıdır. Beyaz kan hücreleri olup kemik iliğinde oluşurlar. En küçük kan hücreleridir ve yuvarlak ya da oval şekilli olabilirler. Ortalama çapları 2 µm'dir. Fosfolipid iki tabaka arasında glikoprotein, glikolipit ve kolesterolden oluşan üçüncü bir tabakayı içeren, trilaminar bir hücre zarları vardır. Hücre zarının en dış yüzeyinde glikoprotein, glikolipit ve mukopolisakkaritlerden oluşan ve 'glikokaliks' adı verilen bir yapı mevcuttur. Bu yapı trombosit adezyon ve agregasyonunda rol alır. Sitoplazmalarında mitokondri, mikrotübül, granüller (alfa, delta, lambda) gibi organeller içermelerine karşın, hücre çekirdekleri yoktur. Sitoplazmalarında bulunan glikojen partikülleri, trombosit metabolizması için önem taşır. Trombositlerin hücre zarı, sitoplazma içerisinde parmak şeklinde uzantılardan oluşan ve 'açık kanaliküler sistem' adı verilen bir kanal sistemine sahiptir. Bu sistem, sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmalarını sağlayan fonksiyonel bir yapıdır. Diğer bir sistem olan 'yoğun tübüler sistem' ise, kapalı bir kanaliküler sistem olup, trombosit aktivasyonu için gereken kalsiyum iyonlarını depolar. Ayrıca tromboksan gibi prostoglandinlerin sentezinde rol alır (Şekil 2.7) (13, 14, 55).

Trombosit hücre iskeletinin %20-%30 kadarını, hücre zarına yakın yerleşim gösteren aktin mikrofilamanları oluşturur. Trombositler aktive olduklarında, hücre iskeleti yapısında değişiklikler meydana gelir; aktin mikrofilamanları hücre hareketi ve agregasyonu sağlayan, 'filapod' adı verilen yüzey çıkıntılarını oluştururlar. Hücre iskeletinde bulunan bir diğer protein yapı mikrotubüllerdir ve aktivasyon sırasında oluşan trombosit şekil değişikliklerinden sorumludurlar (13, 14, 55).



Şekil 2.7. Trombositin şematik yapısı (Stenberg PE, Hill RJ. Platelets and megakaryocytes. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors. Wintrobe's clinical hematology. 10th ed. Egypt, 1999. Volume 1: 618'den çevrilerek alınmıştır.) (55)

Trombositlerin sitoplazmalarında, çoğu alfa (α) granül olmak üzere, delta (δ) ve lambda (λ) granüller bulunur. Bu granüllerin içerikleri ve işlevleri birbirlerinden farklıdır. Her bir trombositte, ortalama 50–80 adet α -granül mevcuttur. Alfa granüller 300–500 nm çapında olup, çoğu hemostaz ve doku iyileşmesinde kritik önemi olan, otuzdan fazla biyoaktif protein ve büyüme faktörü içerirler. Delta (δ) granüller, 250–300 nm çapa sahip olup elektron mikroskopta ışığı yoğun olarak absorbe etmeleri nedeniyle dens görünürler ve bu nedenle 'yoğun cisimler' olarak da adlandırılırlar. Kalsiyum iyonları, pirofosfat, ATP, ADP gibi protein olmayan moleküllerin yanı sıra, normal plazma konsantrasyonunun 100 katı kadar fazla serotonin içerirler. Lambda (λ) granüller, lizozomlar olup, çapları 175–250 nm arasında değişen ve lizozomal enzimleri içeren veziküllerdir. Bu granüllerin bakterisidal etkilerinin yanı sıra, pıhtılaşma sürecinde oluşan fazla pıhtıyı da eritici rolleri vardır (55).

Alfa granüllerinde, önceden sentezlenip depolanmış olan büyüme faktörleri, trombositlerin aktive olmaları sonucu degranülasyon ile ortama salınarak, hedef hücrelerdeki reseptörlerine bağlanıp hücre içine sinyal iletimi ile fonksiyonlarını gerçekleştirirler (13, 14, 15, 56).

Trombositlerin α -granüllerinde bulunan biyoaktif proteinler (13,14): PDGF, TGF, platelet faktör 4 (PF-4), IL-1, trombosit kökenli anjiogenetik faktör (PDAF), VEGF, EGF, trombosit kökenli endotelial büyüme faktörü (PDEGF), epiteliyal hücre büyüme faktörü (ECGF), IGF.

Trombositlerin alfa granüllerinde büyüme faktörü olmayan komponentler de vardır. Osteokalsin (Oc), osteonektin (On), vitronektin (Vn), trombospondin-1 (TSP-1), adenosin difosfat (ADP), trombosit aktive edici faktör (PAF), Von Willibrand faktör (VWF), serotonin gibi bu komponentlerin trombosit adezyonu, aktivasyonu ve fibroblast proliferasyonunda çeşitli rolleri vardır (55, 57).

Trombositler dalakta yüksek oranda bulunurlar. Kandaki ortalama değerleri ise, milimetreküpte 140.000 ila 400.000 arasında değişir. Dolaşımında yaklaşık 10 gün kadar kalırlar ve daha sonra retikuloendotelial sistem makrofajları tarafından dolaşımdan temizlenirler (13, 14).

Trombositlerin en önemli fonksiyonları, hemostaz ve yara iyileşmesi üzerinedir. Doku hasar alanında trombositler agregre olup aktive olarak, subendotelial ve kapiller bazal membranındaki kollajene bağlanırlar. ADP ve trombin ile agregasyon artar ve sonuçta trombosit tıkaç meydana gelir. Ekstrensik ve intrensik koagülasyon kaskadı ile kan pıhtısı oluşarak kanamanın durması sağlanır (13, 14).

Yara iyileşmesinde ise, trombosit aktivasyonu sonucu ortama salınan büyüme faktörleri, hücre göçünü, proliferasyonu, farklılaşmayı ve matriks sentezini artırır. Yara iyileşmesinin tüm fazlarında (inflamasyon, proliferasyon, remodelling ve skar dokusu oluşumu) trombositlerin etkileri vardır (13, 14, 56).

2. 7. Trombositten Zengin Plazma (TZP)

TZP, bazal değerlerden daha yüksek seviyelerde trombosit içeren otolog plazma kısmıdır (13, 14, 15, 56). Bu küçük miktarlardaki plazmanın içerisinde trombositler, kandaki diğer hücrel elemanlardan ayrılarak konsantre şekilde bulunurlar. TZP, bazal plazma değerlerinden 3 ila 5 kat fazla trombosit içermektedir. Normal kan trombosit sayısı milimetreküpte 150.000–400.000'dir. Hazırlanma tekniği ve kullanılan cihazlara göre değişkenlik göstermekle birlikte, TZP için standart istenilen trombosit değeri milimetreküpte 1.000.000'dur (13, 14, 57). TZP

içerdiği bu yüksek miktardaki trombosit içeriğine bağlı olarak, pıhtılaşma faktörlerinin tümünü ve büyüme faktörlerini konsantre bir şekilde içerir (14).

Büyüme faktörü olarak başlıca PDGF, TGF- β , VEGF, EGF ve IGF içermektedir (1, 4, 22). TZP'nın etkisi, içerdiği bu büyüme faktörlerinin sinerjistik bir etkisi şeklinde ortaya çıkmaktadır (57).

TZP içerisinde mevcut büyüme faktörü dışındaki bazı maddelerin de, onarım işlevi gören hücreler üzerinde etkili olduğu ortaya konmuştur. Örneğin, serotonin, fibroblastik hücre bölünmesinde etkiliyken; fibrin ve trombin onarım işlevi gören hücrelerin proliferasyonunu ve migrasyonunu arttırmaktadır (57).

Hayvan çalışmalarında, özellikle küçük hayvanlarda, TZP hazırlamak için gereken kanı aynı hayvandan almak mümkün olamamaktadır; dolayısıyla böyle deneylerde kullanılan TZP, otolog değil homolog hazırlanmaktadır. Bu nedenle oluşabilecek immün reaksiyonlara bağlı olarak, deneylerde yanlış-negatif sonuçlar oluşabilir. Gerçek TZP mutlaka otolog hazırlanmalıdır (56).

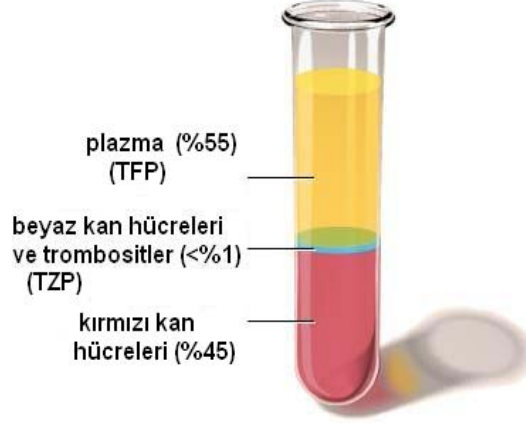
TZP uygun şekilde hazırlanıp antikoagülanlarla muamele edildikten sonra, içerisindeki trombositler 8 saat canlılıklarını koruyabilirler. TZP içerisindeki trombositlerin etkin olabilmeleri için, kullanım esnasında ya da kullanımdan hemen önce aktive edilmeleri gerekir. Bu amaçla en sık kullanılanlar sığır trombinini ve kalsiyumdur (13, 14, 56).

2.7.1. TZP Hazırlanışı:

Antikoagüle edilmiş kan santrifüj edildiğinde 3 tabaka ortaya çıkmaktadır. En altta kırmızı kan hücrelerinden zengin tabaka (dansite 1.09), ortada trombositler ve beyaz kürelerden oluşan tabaka (TZP) (dansite 1.06) ve en üstte plazma (trombositten fakir plazma- TFP) (dansite 1.03) şeklinde katmanlar ayırt edilir (Şekil 2.8.) (13, 14).

Santrifüj sırasında trombosit parçalanması önlenmeli ve trombosit zarının bütünlüğü korunmalıdır. Aksi takdirde trombositler aktive olarak büyüme faktörlerini salgırlar ve biyolojik olarak inaktif bir TZP elde edilmiş olur. Standart laboratuvar santrifüj makineleri ile TZP hazırlamak mümkün olmasına karşın, bu teknikte birkaç santrifüj işlemi ve çoklu transfer gerekir ki, bu işlemde trombosit fragmentasyonunu engellemek, steriliteyi sağlamak ve elde edilen plazmadaki trombosit miktarını

belirlemek güçtür. TZP hazırlamak için geliştirilmiş ve kullanılmakta olan çeşitli standart hücre ayırıcı aletler mevcuttur (13, 14, 56, 58, 59).



Şekil 2.8. Santrifüj işlemi sonrası kanın tabakalara ayrılmış görünümü

2.7.2. TZP Çalışma Prensibi

Trombosit α -granüllerindeki önceden sentezlenip depolanmış büyüme faktörleri, trombositlerin aktive olması sonucu degranülasyon ile ortama salınır. Bu salınım işlemi pıhtılaşma sırasında ilk 10 dakika içinde başlar ve ilk 1 saat içinde sentezlenmiş bu büyüme faktörlerinin %95'ten fazlası salınır. Bu ilk deşarj sonrasında, trombositler hayat döngüleri olan 7 gün boyunca ek büyüme faktörü sentezine ve salınımına devam ederler (15, 56).

Büyüme faktörleri, hedef hücrelerdeki (mezenkimal hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri, epidermal hücreler vs.) reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyal iletimi ile fonksiyonlarını gerçekleştirirler. TZP içindeki büyüme faktörleri hücre içine ya da çekirdeğe girmezler. Normal metabolik olayların akışını değiştirmeyip, sadece hızlandırır. TZP direkt hücre farklılaşması yaratmaz, ancak kök hücreler ve öncü hücrelerde hücre farklılaşmasını sağlayan morfogenez faktörlere cevabı artırır (56, 57).

Otojen olarak hazırlandığı için, hastalık geçirme ve reaksiyon oluşturma riski yoktur. Aktive edilmesi için kullanılan sığır trombinine karşı alerji riski olmasına karşın, çok küçük dozlarda kullanıldığı için (yaklaşık 200 ünite), sistemik dolaşıma

geçmeden uygulama yerinde tüketilip makrofajlarca artıkları temizlenir. Ayrıca pH'sı (6.5–6.7) normal pıhtınınkinden (7.0–7.2) daha düşük olduğu için bakteriyel kontaminasyona da dirençlidir (56, 57).

2.7.3. TZP Kullanım Alanları

TZP, ilk kez Whitman ve ark.(60) tarafından, osteointegre titanyum implantlar ile yapılan maksillofasiyal rekonstrüksiyon ameliyatlarında kullanılmıştır. Takip eden çalışmalarda özellikle kemik ve yara iyileşmesi üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur.

— Periodontal, oral cerrahi ve kemik iyileşmesi: TZP'nin olumlu etkileri ilk olarak kemik rejenerasyonu üzerindeki saptanmış olup, maksillofasiyal ve çene cerrahisi alanlarında klinik kullanıma girmiştir. TZP, in vitro ortamda fetal osteoblast benzeri hücrelerin rejenerasyonunu ve fonksiyonel aktivitelerini arttırmanın yanı sıra, mezenkimal kök hücrelerin bölgeye migrasyonunu da sağlamaktadır. Maksillofasiyal bölgede geniş tümör rezeksiyonlarında, mandibula rekonstrüksiyonlarında, alveolar yarık cerrahi onarımında ve yarık dudak-damak ilişkili oro-nazal fistüllerin onarımında, osseointegre implantların yerleştirilmesinde ve maksiller sinus kaldırma ameliyatlarında başarıyla kullanılmaktadır (60, 61, 62).

Ayrıca in vitro çalışmalarda, TZP içerisinde bulunan PDGF ile insan trabeküler kemik hücrelerinde ve osteoblast benzeri hücrelerde proliferasyonun stimüle olduğu gösterilmiştir (63). Robiony ve ark.'nın (64) atrofik mandibulada yaptıkları çalışmada, mandibulanın osteogenez distraksiyonunda kemik greft ile birlikte uygulanan TZP'nin, kemik biçimlenme hızını arttırdığı saptanmış olup, bunu TZP içerisindeki aktive olmuş trombositlerden salınan PDGF ve TGF- β gibi büyüme faktörleri aracılığı ile sağladığı bildirilmiştir. Ek olarak, antikoagülan tedavi almakta olan hastalarda diş çekimi sonrası kanama kontrolü sağlamak amacıyla kullanılmış, hemostazı başarılı bir şekilde sağladığı görülmüştür (65).

— Plastik ve kozmetik cerrahi: TZP'nin özellikle adeziv ve hemostatik etkileri göz önüne alınarak, yüz germe operasyonlarında, üst ve alt göz kapağı blefaroplastilerinde, cilt greftlerinde, kemik greft donör alanlarında, kemik rekonstrüksiyonunda ve insizyonların dikişsiz kapatılmasında kullanımı mevcuttur. Lazer ile yüz gençleştirme sonrası biyolojik pansuman olarak kullanıldığında, daha

hızlı iyileşme ve eritemde daha hızlı azalma gözlenmiştir. Yağ greftlerine TZP eklendiğinde, emilmeden daha uzun süre kontur revizyonu sağladığı saptanmıştır (66, 67). Jackson'ın (68) yaptığı bir çalışmada, abdominoplasti sonrası flep altlarına TZP enjekte edilmiş ve bu uygulama ile seroma oluşumunda belirgin azalmanın yanı sıra, daha kaliteli ve hızlı yara iyileşmesi elde edilmiştir. Man ve ark. (69) estetik amaçlı cerrahilerde TZP ve fibrin yapıştırıcının kombine kullanımı ile operasyon süresinde kısalma, diren gereksiniminin ortadan kalkması, kapalı pansuman ihtiyacının azalması, ameliyat sonrası dönemde ağrı ve ödem şikayetlerinde azalma gibi avantajlar sağladığını bildirmişlerdir.

— Spinal cerrahi: Spinal füzyon ameliyatlarında titanyum implantlar etrafına uygulanan TZP ile kemik rejenerasyonunda artış olduğu görülmüştür (70). Lowery ve ark. (71) büyüme faktörlerinden zengin TZP kullanımı ile lomber omurilik bölgesinde kemik füzyonunda erken maturasyon elde etmişlerdir.

— By-pass cerrahisi: Del Rossi ve ark. (72), kardiyo-pulmoner by-pass cerrahisi sonrası otolog TZP infüzyonu ile postoperatif dönemde daha kolay kanama kontrolü ve hematolojik parametrelerde düzelme sağlanabileceğini bildirmişlerdir.

— Yara iyileşmesi: TZP ile muamele edilen yaralarda epiteliyal diferansiasyon, dermal matrikste organizasyon daha düzgün olmakta ve vasküler büyüme, fibroblast proliferasyonu, kollajen üretimi artarak epitelizasyon daha hızlı gerçekleşmektedir (73, 74, 75, 76). Kimura ve ark. (77), deneysel kutanöz insizyonel yara modelinde TZP kullanımını ile epitelizasyonda hızlanma ile beraber, yara gerilim gücünde de artış olduğu görülmüştür.

Kronik yaralarda, özellikle diyabetik yaralarda, yara iyileşmesindeki etkinliği kanıtlanmıştır. Crovetti ve ark.'nın (78) kronik yaraları olan 24 hasta ile yaptıkları çalışmalarında, TZP kullanımı ile yara iyileşmesinin tüm fazlarında hızlanma saptamışlardır.

— Ligaman ve tendon iyileşmesi: TZP içerisinde bulunan büyüme faktörlerinden PDGF ile yapılan tendon ve ligaman iyileşmesi üzerine çeşitli deneysel çalışmalar mevcuttur ve bu büyüme faktörünün ligaman ve tendon onarımını desteklediği gözlenmiştir. Bu gözlemden yola çıkarak Aspenberg ve ark.'nın (79) sıçanların aşıl tendonlarında yaptıkları çalışmada, aşıl tendon rüptürünün onarımında TZP ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

— Sinir iyileşmesi: Sinir iyileşmesi üzerine TZP kullanılarak yapılmış fazla çalışma mevcut değildir. Özellikle PDGF'ün nörotrofik aktivitesi gösterildikten sonra, TZP'nin sinir iyileşmesinde de etkili olabileceği üzerinde durulmaya başlanmıştır. Farrag ve ark.'nın (80) sıçan fasiyal sinir rejenerasyonu modelinde, kesi ve onarım hattına TZP uygulanmış ve takip sonucu TZP uygulanan grupta fonksiyonel sonuçların daha iyi olduğu gözlenmiştir. Sarıgüney'in tez çalışmasında ise (81), sıçan siyatik sinirin kesilip epinöral onarım yapılan alanına, TZP tek doz şeklinde uygulanmış ve sinir rejenerasyonunun olumlu yönde etkilendiği saptanmıştır.

2.7.4. TZP İçerisinde Bulunan Büyüme Faktörleri

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

Disülfid bağı ile birbirine bağlı, 30–32 kDa ağırlığında, A ve B zinciri olarak adlandırılan iki polipeptitten oluşur. A ve B zincirlerinin olgun formları yaklaşık 100 aminoasit içerir ve bu aminoasitlerin 50 kadarı birbiri ile aynıdır. İlk olarak fibroblast ve düz kas hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinden dolayı 'trombosit kaynaklı mitojen' olarak tanımlanmıştır. Asıl kaynak trombositler olmasına karşın, makrofajlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve epidermal keratinositler gibi pek çok farklı hücre tarafından da sentezlenebilir. Özellikle doku hasarı sonrasında aktive olup degranüle olan trombositlerden ortama salınır. A ve B polipeptit zincirlerinin oluşturdukları homo ve heterodimerlere göre, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB olmak üzere 3 farklı izoformu vardır. İki adet tanımlanmış tirozin kinaz reseptörü vardır; alfa (α) ve beta (β). Reseptörlerden α -reseptör A ve B zincirlerini bağlarken, β -reseptör sadece B zincirini yüksek affinite ile bağlar. Klasik hedef hücreleri, her iki reseptörü de içeren fibroblastlar ve düz kas hücreleri olmasına karşın, glial öncü hücreleri, trombositleri ve endotel hücrelerini de etkiler. İn vivo olarak embriyonik gelişimde, santral sinir sistemi gelişiminde, vasküler sistem gelişiminde, doku homeostazında ve yara iyileşmesinde çeşitli görevleri vardır (82, 83).

PDGF, fibroblast ve düz kas hücrelerine güçlü mitojenik etkisinin yanı sıra, nötrofil ve makrofajların kemotaksisini artırır. Fibronektin, proteoglikan, hyaluronik asit gibi ekstra-sellüler matriks proteinlerinin üretimini de uyarır (84, 85, 86).

PDGF, yara iyileşmesine cevapta en erken ortaya çıkan faktördür. Pek çok deneysel çalışmada PDGF ile granülasyon dokusunun, epitelizasyonun ve neovaskularizasyonun arttığı, yara iyileşme sürecinin değişmeksizin, iyileşme hızının arttığı ortaya konmuştur (87, 88). Kronik yaralarda, nöropatik ve diyabetik ülserlerde etkinliği gösterilmiş ve bu alanda FDA onayı almış tek büyüme faktörü preparatıdır (87).

Bağ doku hücrelerinde büyümeyi düzenleyici, kemotaktik ve proliferatif etkileri olan PDGF, ayrıca nöral krest kökenli hücrelerin gelişiminde de büyümeyi düzenleyen bir faktör olarak önem taşır. Santral sinir sistemi nöronları PDGF sentezlerler ve hasar sonrası bu nöronlarda PDGF reseptör sayısı artar. PDGF'ün hem in vivo hem de in vitro olarak nöronal düzenlenmede etkili nörotrofik bir faktör olduğu gözlenmiştir (90, 91).

Santral sinir sisteminde PDGF etkinliği üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur (91, 92, 93, 94, 95). Ohno ve ark. (92), yeni doğan sıçanlarda beyin iskemisinden sonra PDGF-B miktarının arttığını ve bu artışın nöroprotektif etkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Allomargot ve ark. (93), sıçan beynine tek doz PDGF mikroenjeksiyonu ile oligodendrositlerin stimülasyonuna bağlı olarak in vivo remiyelinizasyonda artış olduğunu saptamışlardır.

Periferik sinir sisteminde de PDGF etkilerini incelemek için yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Özellikle sinir hasarı sonrası Schwann hücrelerinde, hem PDGF reseptörleri, hem de PDGF miktarı artmaktadır ve Schwann hücrelerinin yaşayabilirliğini desteklediği, aksonal rejenerasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir (17, 90, 96, 97). Oya ve ark. (90), sıçan siyatik sinirinde ezilme tarzı yaralanma ile oluşturdukları periferik sinir hasarında, PDGF-B zincir mRNA'sında hem proksimal hem de distal segmentte artış olduğunu ve bu artışın da Schwann hücre kaynaklı olduğunu saptamışlardır. Schwann hücresi sitoplazmasında artan PDGF miktarının, akson büyümesi ilerledikçe muhtemelen kullanıma bağlı azaldığını ve akson ile Schwann hücresi arasındaki ilişkinin rejenerasyonda çok önemli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Transforming Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β)

İlk olarak 1983 yılında plasenta kaynaklı elde edilmiş ve kültür ortamında fibroblast proliferasyonunu sağladığı görülmüştür. Asidik yapılı, 25 kDa ağırlığında bir büyüme faktörü olup, orijinal olarak normal hücreleri malign hücrelere çevirdiği düşünüldüğü için bu isim konmuştur; ancak daha sonra malign dönüşüm etkisi olmadığı anlaşılmıştır. TGF- β vücutta trombosit, makrofaj, lenfosit, fibroblast, kemik hücreleri ve keratinositler gibi pek çok farklı hücreden sentezlenebilir ve hemen hemen tüm hücrelerin duyarlı oldukları bir faktördür; ancak her hücre tipinin bu faktöre yanıtı farklılık gösterir. Trombositlerin granüllerinde yüksek oranda bulunur ve doku hasarı anında degranülasyon ile ortama salınır. Makrofajlardan kendi salınımını regüle ederken, monositleri FGF, PDGF gibi diğer büyüme faktörlerinin salınımı için uyarır. Yara iyileşmesinin geç fazı olan güçlenme ve remodeling fazında da etkileri vardır (83, 84, 85).

İnflamatuvar hücre kemotaksisini, ekstra-sellüler matriks sentezini, fibroblastlarda fibronektin ve kollajen üretimini stimüle eder. Özellikle yara iyileşmesinde esas görevi olan hücrelerin proliferasyonu, diferansiasyonu ve gen ekspresyonunu etkileyerek, bazı fibrotik hastalıkların da patogeneğinde rol alır. Ekstra-sellüler matrikse mitojenik, kemotaktik ve anabolik etkileri olup, inflamatuvar ve immun cevabın hem hücresel hem de hümorale basamaklarında rol alır (83).

Yapılan hayvan çalışmalarında, atların ekstremitte distallerinde yerleşik kısmi ya da tam kalınlıklı yaralarda, sıçanlarda timpanik zar perforasyonlarında etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca kronik ülser, hipertrofik skar ve farelerde intestinal mukozal ülserlerin iyileşmesinde olumlu etkileri görülmüştür (83, 86, 88, 98). Sıçan dorsal cilt insizyon modeli ile yapılan başka bir çalışmada ise, PDGF ile sinerjistik etki göstererek yara iyileşmesini hızlandırdığı ve yara gerilim kuvvetini arttırdığı saptanmıştır (84).

TGF- β hücre tipine, büyüme koşullarına ve ortamda bulunan diğer büyüme faktörlerine göre, çeşitli hücrelere stimülatör ya da inhibitör etkiler gösterebilir. Bu grup içinden TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin, in vitro sıçan Schwann hücreleri için güçlü etkili mitojenik ajanlar olduğu ortaya konmuştur. TGF- β 1, adenilat siklazı uyaran forskolin ile sinerjistik etki göstererek, Schwann hücrelerindeki mitojenik etkisini ortaya koyar (19).

Sinir hasarından sonra ortama gelen makrofajlar ve Schwann hücrelerinden salınır. Kendi nörotrofik etkisinin yanı sıra, pek çok nörotrofik faktörün, özellikle de motor nöronlar için potent bir nörotrofik faktör olan GDNF'ün, fonksiyonlarını gösterebilmesi için TGF- β 'ya ihtiyaç duyduğu gözlenmiştir. Sulaiman ve ark. (99), kronik denervasyonda dışardan TGF- β verilmesi ile *in vivo* olarak Schwann hücre proliferasyonunda ölçülebilir bir artış saptamışlardır.

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Tümör anjiogenezisi üzerindeki etkisi nedeniyle, 1983 yılında tanımlanmış bir faktördür. Tümör hücrelerince salınan VEGF vasküler endotel hücre geçirgenliğini arttırarak, hücreler arası mesafe ve vücut boşluklarında sıvı birikimine neden olmaktadır ve bu nedenle 'vasküler permeabilite faktörü' olarak tanımlanmıştır (100).

Homodimerik yapıda, 34–46 kDa ağırlığına, glikoprotein yapıda bir faktör olup, plasental büyüme faktörü ve PDGF ile yapısal benzerlik gösterir. Endotel hücreleri için, spesifik mitojenite ve kemoatraktivite ile *in vivo* güçlü anjiogenik etki gösterir. Endotel hücreleri, tümör hücreleri, makrofaj, perisit, düz kas hücreleri, lenfosit, granülosit, monosit ve megakaryosit gibi pek çok farklı hücrede sentezlenebilir. İnsanlarda, yara ve kırık iyileşmesi sırasında normal olarak salınmaktadır. Direkt VEGF uygulaması ile endotel hücrelerinde permeabilite, büyüme ve migrasyon artar ve yara iyileşmesi sırasında endotel hücrelerinin ekstrasellüler matrikse migrasyonunu uyarak, anjiogenezini önemli ölçüde arttırır (83).

Yaralanma sonrası hasar bölgesinde, VEGF ve VEGF mRNA hızla artar ve bu artıştan birincil olarak nötrofil ve fibroblastlar sorumludur. Yaralanma alanında vasküler zedelenmeye bağlı oksijen miktarı azalır; oluşan hipoksi VEGF mRNA'sını güçlü şekilde stimüle eder. VEGF'ün, tavşan kulağında oluşturulan dermal yaralarda ve sıçan cildinde granülasyon dokusu birikimini ve iyileşmeyi hızlandırdığı gözlenmiştir (83).

Sinir sisteminde de, VEGF'ün beyinin kapillerlerce zengin alanlarındaki nöronlarda ve hipoksi sonrası retina glial hücrelerinde mevcut olduğu gözlenmiştir. Spinal kord hasarı sonrası, astrositlerde VEGF sentezi artmaktadır. VEGF yüksek affinite ile fetal karaciğer kinaz reseptörlerine (flk-1) bağlanmaktadır ve bu

reseptörlerin, nöronlar ile Schwann hücrelerinde de mevcut olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla VEGF, flk-1 reseptörleri aracılığı ile, sinir sisteminde hasar sonrası çeşitli olumlu etkiler göstermektedir. (101, 102).

Mariann ve ark.'nın (20) yaptıkları sinir kültürü çalışmasında, ortama VEGF eklenmesi ile aksonal büyümede, Schwann hücre yaşayabilirliği ve diferansiasyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Hobson ve ark. (103), sıçan sferiferik sinirinde oluşturdukları boşluğa VEGF içeren silikon çember yerleştirmişler ve doz bağımlı olarak VEGF ile vaskularizasyonun ve buna bağlı olarak da sinir rejenerasyonunun hızlandığını gözlemlemişlerdir.

Fibroblast Büyüme Faktörü 1 ve 2 (FGF-1 ve FGF-2)

İlk olarak sığır hipofiz bezinden elde edilmiştir. Aminoasitleri benzer, ancak izoelektrik potansiyelleri farklı olan iki proteini içerir: FGF-1 asidik fibroblast büyüme faktörü, FGF-2 bazik fibroblast büyüme faktörü. Endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, nöral hücreler ve keratinositler tarafından üretilebilirler ve ikisi de mezoderm ve nöroektoderm kökenli hücreler için kuvvetli mitojenik etkilidir. Yara iyileşmesinde rolü olan endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, epitel hücreleri, kondrositler ve myoblastlar gibi pek çok hücrede, proliferasyonu ve migrasyonu stimüle ederler. Kollajen, fibronektin, proteoglikan sentezini arttırlar (83).

Çeşitli hayvan çalışmalarında, her iki faktörün de hücre migrasyonunu, neovaskularizasyonu, granülasyon dokusu oluşumunu, yara gerilim kuvvetini arttırdığı ve epitelizasyonu hızlandırdığı görülmüştür (85, 86). FGF-2, FGF-1' den 10 kat daha güçlü olacak şekilde anjiogenezisi uyarırken; FGF-1'in de periferik sinir rejenerasyonunu desteklediği saptanmıştır (83).

FGF-1 ve FGF-2'nin mezodermal ve nöroektodermal dokuların büyüme ve gelişmelerinde, özellikle anjiogenez ve Schwann hücre proliferasyonunda önemli düzenleyici rolleri vardır. Her iki faktör de, nöral dokularda bol miktarda bulunur ve sinir sisteminin gelişiminde, fonksiyonlarında, nöronal büyüme ve farklılaşmada rolleri vardır (16, 104).

Davis ve ark.'nın (17) yaptıkları, her iki faktörün de ayrı ayrı kullanıldığı sıçan Schwann hücre kültürü çalışmasında, FGF-2'nin daha güçlü olmakla beraber,

her iki faktörün de in vitro olarak Schwann hücre mitozunu arttırdıkları gözlenmiştir. Bu artış, ortama adenilat siklazı aktive eden forsokolin eklenmesi ile daha da belirgin hale gelmektedir.

FGF-1, nöron gövdesinde sentezlenir ve akson boyunca anterograd taşınır, bu nedenle aksotomiden sonra dejenerasyona giden distal güdükte, FGF-1 seviyelerinde ilerleyici bir düşme meydana gelir. FGF-1, santral ve periferik nöronlarda yaşayabilirliği ve diferansiasyonu destekler. İn vivo FGF-1 uygulaması sonrasında hem periferik sinirlerde hem de omurilikte, aksotomi sonrası aksonal rejenerasyonda hızlanma gözlenmiştir (46, 105).

FGF-2, nöral hücreler için güçlü etkili bir nörotrofik faktördür. Santral sinir sistemi ve periferik sinir sisteminin farklı bölgelerinden alınan nöronlardan yapılan hücre kültürlerinde, nöron yaşayabilirliğini ve aksonal tomurcukların uzanımlarını desteklediği gözlenmiştir. Ayrıca bu faktör astrosit, oligodendrosit ve Schwann hücrelerinin de proliferasyonunu uyarıcı etkilere sahiptir. Ekzojen uygulanan FGF-2, Schwann hücre bazal laminaına bağlanır ve bazal lamina boyunca rejenerasyon olan aksonların büyümelerini hızlandırır (106, 107).

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 ve 2 (IGF-1 ve IGF-2)

Aminoasit dizilimleri insan proinsülinine benzediğinden dolayı bu ismi almışlardır. Somatomedinler olarak da anılırlar. Primer olarak karaciğerde üretilmelerine karşın, otokrin uyarı ile tüm vücut dokularında üretilirler. Doku büyümesi, gelişimi ve rejenerasyonunda etkileri vardır. Büyüme hormonu etkisini IGF-1 üzerinden göstermektedir. IGF-1'in hücresele seviyedeki anabolik etkileri, sadece protein sentezini arttırmak değildir; aynı zamanda periferik hücrelerde glikoz içe alımını, glikojen sentezini, nöron yaşayabilirliğini, myelin sentezini artırır ve kemik iyileşmesinde de olumlu etkileri vardır. Embriyonel gelişimde ise IGF-2 daha etkin olarak rol oynar (83, 86).

Deneyisel olarak diyabetik hayvanlarda, steroid kullanımı ile inflamatuvar yanıtı baskılanmış hayvanlarda ve yanık yaralarında olumlu etkileri olduğu görülmüştür (83). PDGF ve IGF-1 beraber kullanıldıklarında sinerjistik etki ile yara iyileşmesini desteklemektedirler (108).

Santral, periferik ve otonom sinir sistemi gelişiminde önemli rol oynamalarının yanı sıra, sıçanlarda siyatik sinir yaralanma modellerinde, periferik sinir rejenerasyonunu destekleyici etkileri de ortaya konmuştur. Reaktif Schwann hücrelerinin IGF-1 ve IGF-2 için temel kaynak olduğu düşünülmektedir. IGF için spesifik reseptörler (tip 1 IGF reseptörleri), Schwann hücreleri, büyüme konileri ve motor nöron aksonları boyunca bulunmaktadır (109).

IGF-1 sağlıklı sinirlerde düşük düzeylerde bulunmasına karşın, sinir hasarı sonrası 2. haftada Schwann hücrelerinde pik değerlere ulaşmaktadır. SjAlberg ve ark.'nın (110) sıçan siyatik sinir donma hasarı modelinde, lokal IGF-1 infüzyonu ile aksonal tomurcukların büyümelerinin uyarıldığı ve rejenerasyonun hızlandığı gösterilmiştir. Kanje ve ark. (111) ise sıçan siyatik sinir ezilme tarzı yaralanma modelinde, miniozmotik pompalar ile IGF-1 lokal olarak uygulanmış ve sinir rejenerasyonunda artış gözlenmiştir. Bu artış IGF-1'i bloke eden spesifik antikorlar kullanıldığında inhibe olmuştur.

IGF-2 erişkin sıçanlarda beyin ve omurilikte bol miktarda bulunmaktadır. Kaslarda IGF-2 gen ekspresyonu, nöromusküler sinaps gelişimi ve rejenerasyonla yakın ilişkili olmasının yanı sıra, kültüre nöroblastlarda, duyuşal, sempatik ve motor nöronlarda, aksonal tomurcukların büyümelerini de desteklemektedir. Near ve ark.'nın (18), motor akson rejenerasyonunu inceledikleri sıçan siyatik sinir ezilme tarzı yaralanma modelinde, motor akson rejenerasyonunda artış olduğu saptanmıştır ve bu artış anti-IGF-2 anti-serumu ile baskılanmıştır. Benzer şekilde Pu ve ark.'nın (112) yaptığı çalışmada, neonatal sıçanlarda siyatik sinire aksotomi yapılmasından sonra IGF-2 uygulandığında, motor nöron ölümü azalırken, bu koruyucu etkinin anti-IGF anti-serumu ile ortadan kalktığı saptanmıştır.

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

İlk kez 1962 yılında Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibuler bezinden izole edilmiştir. Birçok memeli türünün doku ve vücut sıvılarında bulunan mitojenik etkili bir polipeptittir. Endotel hücreleri, fibroblastlar ve sinir sistemi destek doku hücreleri için mitojeniktir (83, 113).

Primer olarak trombositlerde üretilir, ancak makrofaj ve monositlerde de bulunur. Tükürük bezleri, duodenal bezler, böbreklerde, idrar ve sütte bolca bulunur.

Yara iyileşmesinin erken fazında yüksek konsantrasyonlara ulaşır. EGF reseptörlerinin uyarımı ile hücre adezyonu, matris düzenleyici proteinazların ekspresyonu ve hücre hareketleri artar. EGF, yaraya keratinositlerin migrasyonunu arttırarak epitelizasyonu hızlandırırken, yaranın fazla kontraksiyonunu da engelleyerek skar oluşumunu azaltır. Tavşanlarda oluşturulan tam kalınlıklı cilt defektlerinde EGF kullanılmış ve daha hızlı iyileşme ile beraber nerdeyse normal dermal histolojik yapılanma gözlenmiştir. EGF ayrıca vasküler düz kas hücrelerine de mitojenik etkili olup, anjiogeneziste de rol alır (83).

Sinir iyileşmesi sırasında ortamda artan EGF miktarı, bu faktörün sinir iyileşmesinde de etkili olabileceğini göstermektedir. Santral sinir sistemi nöronlarını içeren doku kültüründe, EGF uygulaması ile aksonal rejenerasyonda artış saptanmıştır (114). Sinir rejenerasyonunu destekleyebileceği yönündeki olumlu çalışmaların yanı sıra; Dubuisson ve ark.'nın (115) yaptıkları çalışmada oluşturulan sinir defektine dışardan uygulanan EGF'ün, sinir iyileşmesinde etkisi olmadığı görülmüştür.

Tüm bu faktörleri, çeşitli kombinasyonlarda kullanılarak yapılan bazı sinir çalışmaları da mevcuttur. Welch ve ark. (116) IGF-1 ve PDGF kombinasyonunu, sıçan siyatik sinirini kesip ucuca suture ettikten sonra tek doz olarak kullanmışlar, ancak 6 haftalık takip sonucunda rejenerasyonda bir artış saptayamamışlardır ve bunu ucuca temas eden sinirlerde trofik etkinin baskılanmasına bağlamışlardır. Buna karşın Oudega ve ark. (117), aynı kombinasyonu sıçan omuriliğinde kullanmışlar ve rejenerasyon olan aksonlarda, aksonal rejenerasyonu etkilemediğini ancak myelinizasyonu arttırdığını tespit etmişlerdir. Wells ve ark.'larının (118) yaptıkları başka bir çalışmada ise, sıçan siyatik sinirinde oluşturulan 8 milimetrelik defekte, yine aynı faktörleri içeren farklı biyolojik yapılarda tüpler yerleştirilmiş ve aksonal rejenerasyonun ölçülebilir şekilde hızlandığı saptanmıştır.

Meier ve ark. (119) kesilmiş sıçan siyatik sinirinde yaptıkları çalışmada, Schwann hücrelerinin yaşamlarını ve trofik aktivitelerini devam ettirebilmek için çeşitli büyüme faktörlerine ihtiyaç duyduklarını öne sürmüş; IGF, NT-3 ve PDGF-BB desteği ile artış saptadıkları etkinliklerde, bu faktörlerin bloke edilmesi ile akson rejenerasyonu ve Schwann hücre yaşayabilirliğinde ciddi azalma gözlemlemişlerdir.

Hücre dışı matriks proteinleri, rejenerasyon sırasında hücreler arası ilişkinin sağlanabilmesi için gereken glikoproteinlerdir. Fibronektin ve laminin gibi matriks proteinleri Schwann hücrelerinin bazal membran yapısında bulunan ve aksonal tomurcukların oluşumunda ve büyümesinde önemli görevleri olan glikoproteinlerdir. Bu glikoproteinlerin de, deneysel çalışmalarda lokal uygulanmaları sonrasında aksonal büyümeyi destekledikleri bilinmektedir. Rejenere olan aksonların, laminin ve fibronektin içeren bazal laminaya affiniteleri vardır (6, 120, 121). Fibronektin ayrıca Schwann hücre adezyonunu ve migrasyonunu uyararak, bu hücrelerin proliferasyonunu da desteklemektedir (39).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinde (TİCAM) gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun ve Deney Hayvanları Araştırmaları Alt Komisyonunun onayı alındı (12.09.2007 tarih ve 07 numaralı karar). Bu çalışma, T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun 2007/11030 numaralı kararı ile desteklendi.

Çalışmada, 200–250 gram ağırlığında, 1 yaş civarında Wistar cinsi 40 adet dişi ve 5 adet erkek beyaz sıçan kullanıldı. Bu hayvanlardan 5 erkek sıçan, TZP elde edilebilmesi için donör olarak kullanıldı. Cerrahi işlemler diğer 40 dişi sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma süresince tüm sıçanlar tek olarak ayrı kafeslerde barındırıldı. Gece gündüz döngüsüne maruz bırakıldı. Sınırsız standart yiyecek (kuru pellet) ve içme suyu sağlandı.

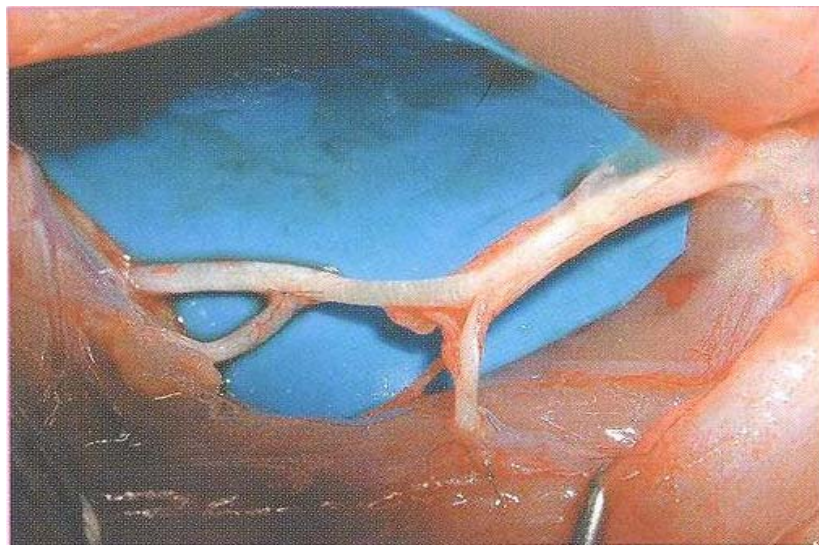
Kan alınması ve diğer cerrahi işlemler, intraperitoneal 100 mg/kg Ketamin-HCl (Ketalar®, Pfizer) ve 5 mg/kg Ksilazin-HCl (Rompun®, Bayer) ile sağlanan anestezi altında gerçekleştirildi. TZP için gereken kan erkek sıçanlardan intrakardiyak yolla elde edildi. Takip süresi sonunda anestezi altında elektrofizyolojik kayıtlar ve histolojik incelemeler için sinir biopsileri alındıktan sonra, sıçanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildiler.

Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından uygulandı. Disseksiyon esnasında siyatik sinire zarar vermemek için, cerrahi işlemler 3.5 kat büyütme loop ile gerçekleştirildi. Hayvanlar uygun çalışma ortamının sağlanabilmesi için, yüz üstü pozisyonda tespit tahtaları üzerine yerleştirildi. Tüm sıçanlarda sağ taraf siyatik sinir deney için kullanılırken, sol taraf siyatik sinir kontrol grubu olarak belirlendi.

3.1. Sıçan Siyatik Sinir Anatomisi

Lumbosakral trunkustan çıkan siyatik sinir varyasyon gösterebilmekle beraber sıklıkla 4., 5. ve 6. lomber spinal sinirlerin füzyonu ile oluşur ve en kalın periferik sinirdir. Pelvis minör içinde siyatik sinir adını alarak iskiyum dorsal kenarı ile kuyruk sokumu arasındaki derin olukta ilerler. Siyatik çentikten çıktıktan sonra

piriform kasın ventralinde seyrederek ve uyluk arkasına ilerler. Sırt derisinin yarıya yakın kısmını ve arka bacak kaslarının çoğunu innerve eder. İlk önce biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kaslarını innerve eden ince bir motor dal verir. Daha sonra diz ekleminin yaklaşık yarım santimetre proksimalinde tibial, peroneal (fibular) ve bunlardan hemen önce sural olarak 3 dala ayrılır. Peroneal sinir tibialis anterior ve ekstensör digitorum longus kaslarını innerve ederken, tibial sinir plantar fleksörleri, ayak parmak fleksörlerini ve tibialis posterior kasını innerve eder (122). (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Sıçan siyatik sinir anatomisi (Bayramiçli M. Deneysel mikrocerrahi. Temel araştırma, doku ve organ nakil modelleri. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ, 2005: 343)(122)

3.2. Deney ve Kontrol Grupları

Sıçanlar dört gruba ayrıldı (n=10)

Grup 1 (n=10): sham grubu, siyatik sinir diseksiyonu yapılan, ancak sinir hasarı oluşturulmayan grup

Grup 2 (n=10): kontrol grubu, siyatik sinir diseksiyonunu takiben, ezilme hasarının oluşturulup, ezilme zonuna herhangi bir işlem yapılmayan grup

Grup 3 (n=10): deney grubu 1, siyatik sinir diseksiyonunu takiben, ezilme hasarının oluşturulup, ezilme zonuna TZP verilen grup

Grup 4 (n=10): deney grubu 2, siyatik sinir diseksiyonunu takiben, ezilme hasarının oluşturulup, ezilme zonuna trombositlerden fakir plazma (TFP) verilen grup

3.3. TZP Elde Edilişi

Kan almak için ayrılan 5 erkek sıçanın, ggs kılırları traş edildikten sonra povidon iyodin ile bölgenin antisepsisi sağlandı. Kan 19 gauge iğne ucu olan kelebek set yardımı ile intrakardiak olarak alındı. Hazırlık aşamasında tüm işlemler steril olarak yapıldı. Hemolizi ya da trombosit aktivasyonunu engellemek için fazla g uygulamasından kaçınıldı. TZP ve TZP'yı aktive etmek için kullanılan trombin solusyonu FDA onaylı Harvest SmartPreP-2 cihazı, trombin kiti ve TZP işlem kiti kullanılarak hazırlandı (şekil 3.2, 3.3, 3.4, 3.5).



şekil 3.2. Harvest SmartPreP-2 santrifüj cihazı



Şekil 3.3. Harvest SmartPREP-2 trombin kiti



Şekil 3.4. Harvest SmartPREP-2 T2P işlem kiti



Şekil 3.5. Harvest SmartPRep-2 hazırlama kitinde aplikatöre TZP ve otolog trombinin yerleştirilerek kullanıma hazır şekli. (Bu aplikatör seti standart olarak TZP ve trombinini üçe bir oranında karıştırarak bölgeye tatbik etmede kolaylık sağlar.)

3.4. Cerrahi İşlem

Tüm cerrahi işlemler steril koşullarda gerçekleştirildi. İntraperitoneal anesteziyi takiben, sıçanların glutea ve uyluk bölgeleri traş edildi. Yüz üstü pozisyonda tespit tahtasına yerleştirildikten sonra povidon iyodin ile cerrahi alan antisepsisi sağlandı. Girişim yapılacak cerrahi alan açık kalacak şekilde sıçanlar steril örtü ile örtüldü. Sol uyluk posteriorundan yapılan oblik insizyonla cilt açıldı ve biceps femoris kası künt diseksiyonla açılıp siyatik sinire ulaşıldı (Şekil 3.6 ve 3.7).



Şekil 3.6. Sol uyluk posteriorundan yapılan oblik insizyon



Şekil 3.7. Biceps femoris kası künt diseksiyonu, siyatik sinire ulaşılması

Daha sonra sinir mikrocerrahi penset ve mikrocerrahi makas yardımı ile siyatik çentikten sinir dallanma bölgesine kadar dikkatli bir şekilde zarar vermeden etraf dokulardan serbestlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Siyatik sinirin siyatik çentikten dallanma bölgesine kadar serbestlenmesi

Sinir ezilme hasarı oluşturulması için, Luis ve ark.'nın (123) kullandıklarına benzer, özel tasarlanan ve 54 newton sabit basınç uygulayan bir cerrahi klemp kullanıldı (Şekil 3.9). Böylece şekilde siyatik sinir hasarı standardize edilmeye çalışıldı.



Şekil 3.9. Sinir ezilme hasarı oluşturulması için özel tasarlanan ve 54 newton basınç uygulayan cerrahi klemp

Siyatik sinir trifukasyonundan 10 mm yukarisından 3 mm uzunluğunda bir segmente 30 saniye süre ile bu klemp yardımı ile basınç uygulanarak ezilme hasarı oluşturuldu. Başlangıçta yaklaşık 1 mm olan sinir çapı, ezilme hasarı tamamlandıktan sonra 2 mm olacak şekilde düzleştiği gözlemlendi (Şekil 3.10 ve 3.11). Deney süresince sinirler 37 derece salin solusyonu ile sıcak ve nemli tutuldu.



Şekil 3.10. Sinir ezilme hasarının oluşturulması



Şekil 3.11. Sinir ezilme hasarının görünümü

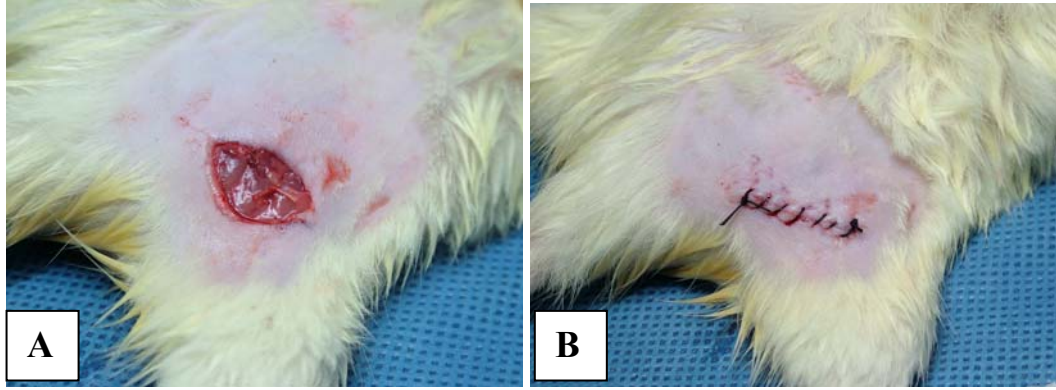
Siyatik sinir ortaya konduktan ve etraf dokulardan serbestlendikten sonra gruplara göre farklı işlemler uygulandı:

- Grup 1, sham grubu (n=10): Siyatik sinir etraf dokulardan serbestlendikten sonra ek bir işlem yapılmadı.
- Grup 2, kontrol grubu (n=10): Siyatik sinir etraf dokulardan serbestlendikten sonra ezilme tarzı hasar oluşturulup, ek işlem yapılmadı.
- Grup 3, deney grubu 1 (n=10): Siyatik sinir etraf dokulardan serbestlendikten sonra ezilme tarzı hasar oluşturuldu. Takiben ezilme bölgesine 0.4 ml TZP uygulandı (Şekil 3.12).
- Grup 4, deney grubu 2 (n=10): Siyatik sinir etraf dokulardan serbestlendikten sonra ezilme tarzı hasar oluşturuldu. Takiben ezilme bölgesine 0.4 ml TFP uygulandı.



Şekil 3.12. Sinir ezilme bölgesi üzerine TZP'nin uygulanması

Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra, kas dokusu 5/0 vicryl, cilt 5/0 ipek ile devamlı dikiş tekniği ile kapatıldı (Şekil 3.13 a ve b).



Şekil 3.13. A: Kas dokularının dikilmesi, B: Cildin dikilmesi

İnsizyon alanına povidon iyodin ile pansuman yapıp OpSite® sprej (Smith & Nephew) sıkıldı. Vücut ısıları korunarak anesteziden uyanmaları beklendi. Ameliyat sonrası dönemde insizyon alanlarına epitelizasyon tamamlanana kadar günlük povidon iyodin ile pansumana devam edildi. Sağ ayaklarda otokanibalizasyonu engellemek için deneyin süresi olan 30 gün boyunca her gün iritan tadı olan oje (Trind® anti-bite nail repair, Ned ilaç kozmetik) sürüldü.

3.5. Değerlendirme Yöntemleri

3.5.1. Genel Değerlendirme

Değerlendirilmeye alınan hayvanlarda 1 aylık takip süresince oluşan genel değişiklikler belirlendi.

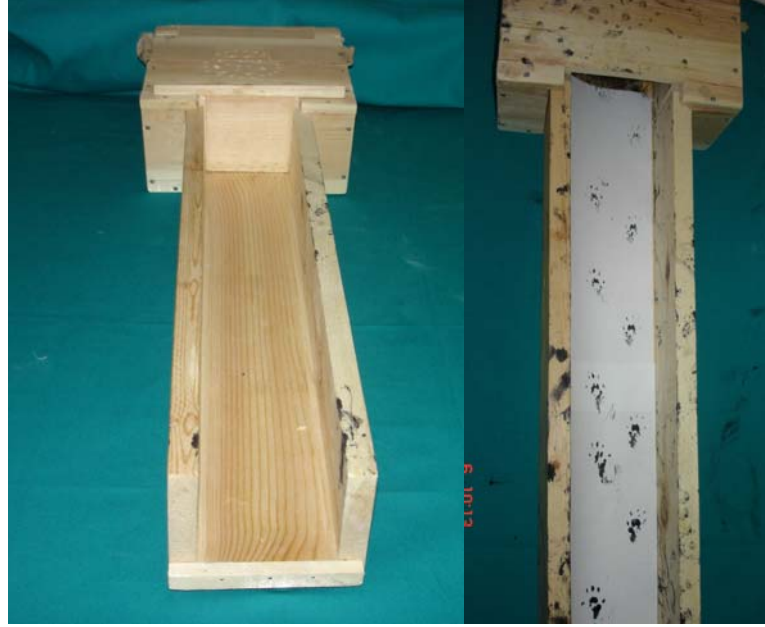
3.5.2. Fonksiyonel Değerlendirme

Deneye başlamadan önce ve deney sonrası 7, 14, 21 ve 30. günlerde değerlendirme için yürüyüş yolu analizleri ('walking track') ve ayak geri çekme refleksleri ('withdrawal reflex, WRL') değerlendirildi.

Yürüyüş Yolu Analizi ve Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ)

Motor fonksiyon değerlendirmesi için kullanıldı. Sıçanların aynı doğrultuda yürümelerini sağlamak için 8.2 cm eninde 42 cm uzunluğunda, kenarları 12 cm

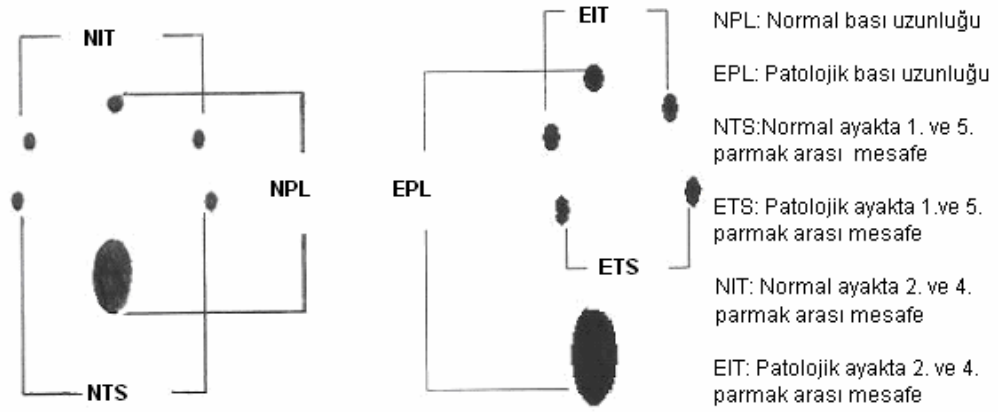
yükseklikte olan ve karanlık oda ile sonlanan bir yürüyüş yolu düzeneği hazırlandı (Şekil 3.14) (124, 125, 126).



Şekil 3.14. Yürüyüş yolu analizi yapılan yürüme kulvarı

Yürüme kulvarı içine kulvar ile aynı boyutta kesilerek hazırlanan beyaz dosya kağıtları yerleştirildi. Sıçanların her iki arka ayakları siyah mürekkep emdirilmiş ıstampaya bastırıldı ve hazırlanan kulvarda yürütülerek ayak izleri alındı (127). Kayıtlar alınmadan önce hayvanlar birkaç kez yürüyüş yolunda eğitim amaçlı yürütüldü ve hayvanlar net bir şekilde kapalı barınağa doğru yürümeyi öğrendikten sonra ayak izleri alındı. Genellikle belirgin ve temiz bir ayak izi elde edilebilmesi için birkaç kez örnekleme yapılması gerekti.

Kağıt şeritlerdeki en uygun ayak izleri kullanılarak, topuk ve parmak ucu arasındaki mesafe-bası uzunluğu (print length (PL)), birinci ve beşinci parmaklar arası mesafe-adım genişliği (toe spread (TS)), ikinci ve dördüncü parmaklar arası mesafe- adım ortası genişlik (intermediate toe spread (ITS)) milimetrik cetvel yardımı ile ölçüldü (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. SFİ hesaplaması için ayak izlerinde bakılan parametreler, deneysel (E), normal (N)

Ölçümler ile elde edilen değerler De Medinacelli tarafından geliştirilen ve daha sonra Bain ve ark.(128) tarafından modifiye edilen formüle yerleştirilerek SFİ hesaplandı(Şekil 3.16). Sıfır ile -100 arası elde edilen değerlerde, sıfır normal fonksiyonu gösterirken, -100 tam fonksiyon kaybına işaret etmektedir. Elde edilen SFİ değerlerinde gruplar arası fark olup olmadığı istatistiksel olarak araştırıldı.

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

Şekil 3.16. SFİ hesaplamasında kullanılan Bain ve ark.'nın geliştirdikleri formül (128)

Ayak Geri Çekme Refleksi ('WRL')

Duyu fonksiyonu değerlendirilmesi için planlandı. Nosiseptif WRL için sıcak plaka testi uygulandı. Masters ve ark.'nın (129) 56 dereceye ısıtılmış plakaya arka ayakların temas ettirilmesi şeklinde tanımladıkları çalışma dizaynı kullanıldı (Şekil 3.17) . WRL sıcak plakaya temas ile arka ayak geri çekilmesi arasında geçen süre olarak tanımlandı ve bu bir kronometre yardımı ile ölçüldü. Normal sıçanlar ayaklarını bu sıcak plakadan 4 saniye ya da daha az sürede çekmektedirler (130).

Etkilenen bacaklar sensitizasyonu engellemek için iki dakika ara ile 3 kez test edildiler ve her 3 latans değerinin ortalaması alınarak WRL kayıtları yapıldı (131). Cilt hasarını engellemek için sıcak uyarının sonlandırılma zamanı Varejao ve ark.'nın belirttikleri gibi 12 saniye olarak kabul edildi ve 12 saniye sonuna dek WRL alınamayan sıçanların testleri sona erdirilerek WRL değerleri 12 saniye olarak kaydedildi (132, 133, 134).



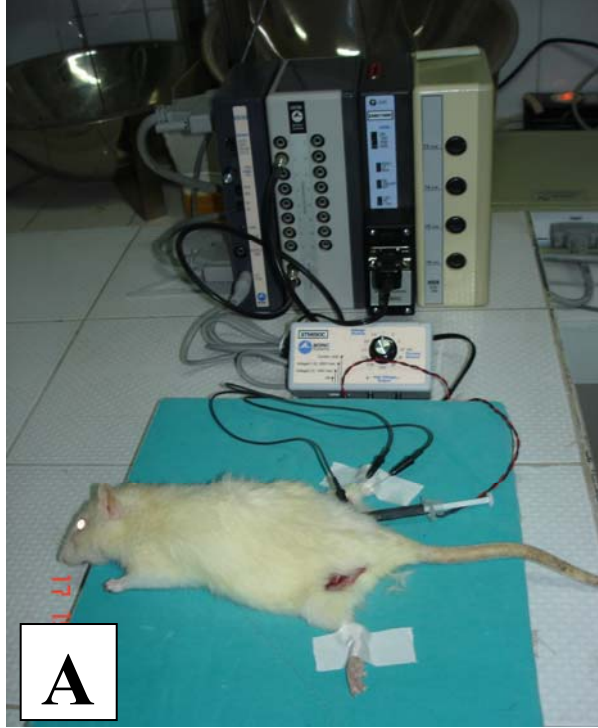
Şekil 3.17. Geri çekme reflekslerini değerlendirmede kullanılan ısı test cihazı

3.5.3. Elektrofizyolojik Testler

Deney sonrası 30. günde ratlara anestezi altında rejenerasyonun değerlendirilmesi için elektrofizyolojik testler planlandı. Elektrofizyolojik ölçümler bilgisayar destekli MP100 sinir ileti hızı ölçüm kiti (Biopac systems, Inc., USA) kullanılarak yapıldı (Şekil 3.18A ve B). Disseksiyon tahtası üzerine sıcak örtü konularak deney süresince hayvanların vücut ısıları korunmaya çalışıldı.

İntraperitoneal yapılan anestezi altında, hem deney hem de sağlam taraf siyatik sinirler siyatik çentikten trifukasyon bölgesine kadar disseke edilerek etraf dokudan serbestlendi. Hayvanın sakral bölgesine cilt altına topraklama için iğne elektrot yerleştirildi. Uyarı veren kanca şeklindeki elektrot siyatik çentikten yaklaşık 10 mm distale ve ezilme hasarı oluşturulan alanın 5 mm proksimaline yerleştirildi.

Kayıt elektrotları olan iğne elektrotlar ise, gastroknemius kasının orta kısmına ve insersiyosuna cilt üzerinden geçilecek şekilde yerleştirildi.



Şekil 3.18 A ve B: EMG cihazı ve elektrofizyolojik kayıtların alınması

EMG kayıtları, 1 miliamper akım aralığında, %0 ile %100 arasında akım hızı arttırıp azaltılarak her bir hayvan için supramaksimal uyarı eşikleri bulunduğundan sonra alındı. Bu şekilde gastroknemius kası birleşik kas aksiyon potansiyelleri

öncesi ve sonrası bölümlerini aynı preparat üzerinde görebilmek amacıyla yatay gömme uygulandı. Bu şekilde hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında ardışık seri kesitler alındı. Bu şekilde her bir spesmanden bloğun farklı seviyelerinden alınmış dörder lam elde edildi. Kesitler Hematoksilin-Eozin ile boyandı ve genel histopatolojik inceleme için ışık mikroskobunda değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

Stereolojik ölçümler için, her bir hayvanın dokusundan farklı derinliklerden dörder lam elde edildi. Aynı kesit üzerinde hasar öncesi ve hasar sonrası bölgeler izlendi. Her bir lamdan standart olarak 40X büyütmele objektif ile hasar öncesi ve hasar sonrası bölgelerden ayrı ayrı olmak üzere rasgele birer alanın fotoğrafı çekildi. Bu şekilde her hayvanın dokusundan, dördü hasar öncesi diğer dördü de hasar sonrası bölgelerden olmak üzere standart boyutta toplam sekiz adet görüntü alındı. Görüntüler binoküler mikroskoba monte edilmiş Olympus DP-70 yüksek çözünürlüklü dijital kamera ile elde edildi. Görüntüler Bab200 adlı morfometrik analiz bilgisayar programı ile analiz edildi. Her bir görüntü üzerinde 25 adet rasgele işaretlenen sinir liflerinin çapları ölçüldü. Böylece her bir hayvana ait hasar öncesi bölgeden $4 \times 25 = 100$ ve hasar sonrası bölgeden de $4 \times 25 = 100$ olmak üzere toplam 200 adet sinir lifinin çapı ölçülmüş oldu. Çapı ölçülen her bir sinir lifinin dejenere olup olmadığı belirlendi. Takiben her bir görüntü üzerindeki Schwann hücrelerinin çekirdekleri sayılarak bunlardan kaçının dejenere olduğu saptandı.

Sonuç olarak, hasar öncesi ve hasar sonrası bölgeler için ayrı olmak üzere

- 1- Ortalama sinir lifi çapı,
 - 2- Ortalama dejenere sinir liflerin yüzdesi,
 - 3- Birim alanda bulunan ortalama Schwann hücresi çekirdek sayısı,
 - 4- Birim alanda bulunan ortalama dejenere Schwann hücresi çekirdek sayısı
- hesaplandı.

3.5.5. İstatistiksel Değerlendirme

Yürüş yolu analizinde elde edilen SFİ değerleri, WRL değerleri ve histomorfometrik analizlerle elde edilen bulgular, gruplar arasında non-parametrik Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi yöntemi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel fark

saptanan ($p<0.05$) gruplar içerisindeki çoklu karşılaştırmalar ise, non-parametrik çoklu karşılaştırma testi olan Student-Newman-Keuls metodu ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler, medyan (%25-%75 persentil) biçiminde gösterildi.

Elektromyografik ölçümlerle elde edilen değerler ise gruplar arasında parametrik tek yönlü varyans analizi testi ile karşılaştırılırken, her gruptaki sağlam ve deney tarafında elde edilen değerler birbirleri ile parametrik paired t-testi ile karşılaştırıldı, $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Tanımlayıcı istatistikler, ortalama \pm standart sapma biçiminde gösterildi.

Tüm istatistiksel analizler SPSS 13.0 istatistiksel analiz programı ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Genel Değerlendirme Bulguları

Deney süresince kontrol grubunda 2 hayvanda, deney grubu 1 ve 2’de birer hayvanda sol ayaklarda kısmi otokanibalizasyon gözlemlendi ve bunlar deney dışı bırakıldı (Şekil 4.1A ve B). Deney grubu 2’de ve kontrol grubunda ikişer hayvanda, parmakların ekstansör yüzlerinde yine otokanibalizasyona bağlı olarak abrazyonlar gözlemlendi, ancak bunlar SFİ ölçümüne engel teşkil etmedikleri için deney dışı bırakılmadılar. Deney grubu 1’de bir ve sham grubunda iki hayvanda deney dışı nedenlerle hayvan kaybı yaşandı. Bu nedenlerden dolayı, gruplar arası sayıyı eşitleyebilmek için deney grubu 2’den bir hayvan deney dışı bırakılarak, tüm gruplarda sekizer hayvan üzerinden bulgular değerlendirilip istatistiksel analizler yapıldı.



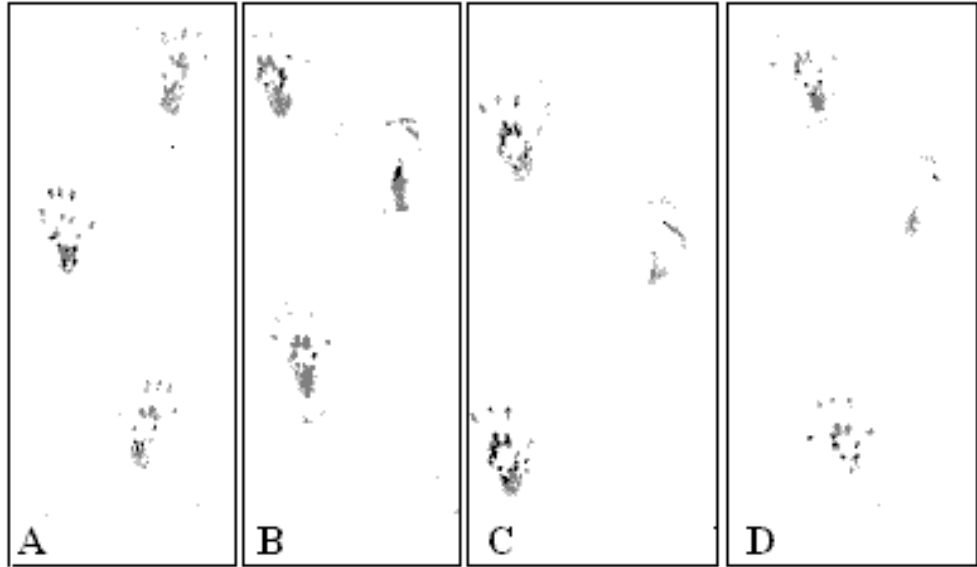
Şekil 4.1. A ve B: Deneklerde sinir hasarı oluşturulan ayaklarda gözlenen otokanibalizasyon

Klemple oluşturulan ezilme tipi yaralanma sonrasında, sinirlerin hasarlanmış kısımlarında yassılaşıma gözlemlendi, ama sinir devamlılığı korunmuştu. Ameliyat sonrası dönemde, ezilme tarzı sinir yaralanması oluşturulan tüm bacaklarda tam flask paralizi hali gözlemlendi.

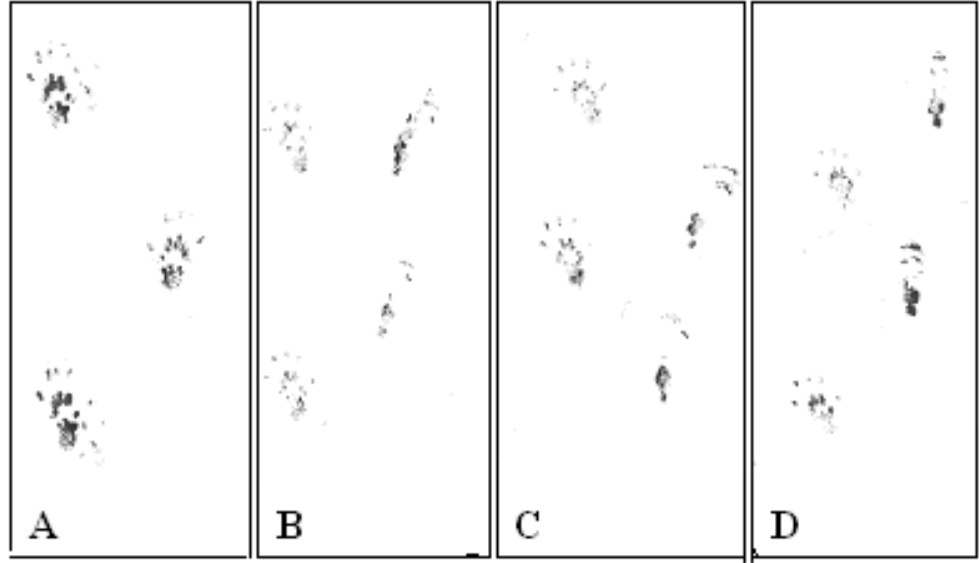
4.2. Fonksiyonel Değerlendirme Bulguları

4.2.1. Yürüyüş Yolu ve SFİ Bulguları

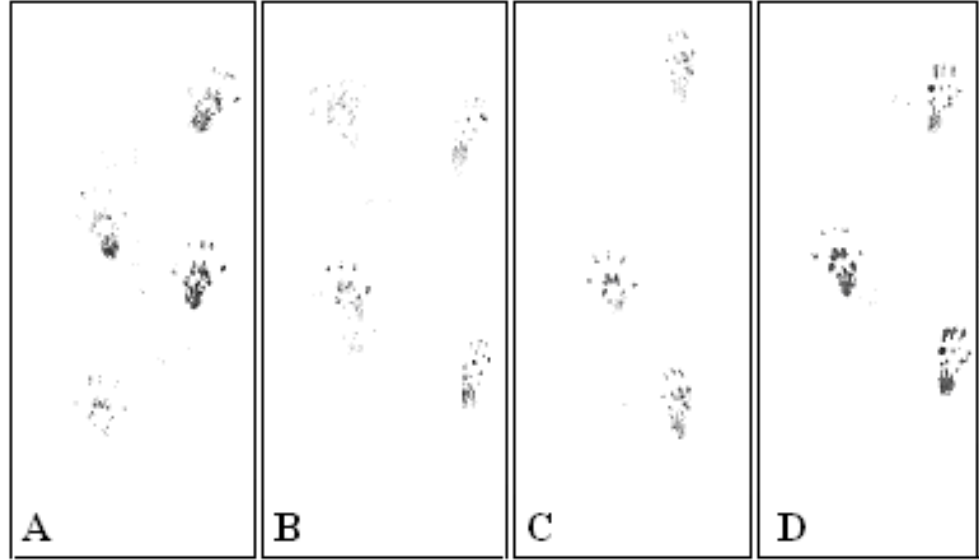
Tüm gruplar deney öncesi yürüyüş yolunda yürütülerek 0. gün değerleri kaydedildi. Tüm gruplarda ortalama deney öncesi SFİ değeri (SFİ0) $-5.60 (\pm 3.90)$ olarak saptandı. Gruplar arasında SFİ0 ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Haftalara göre gruplardan alınan ayak izi örnekleri şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'te karşılaştırmalı şekilde gösterilmektedir.



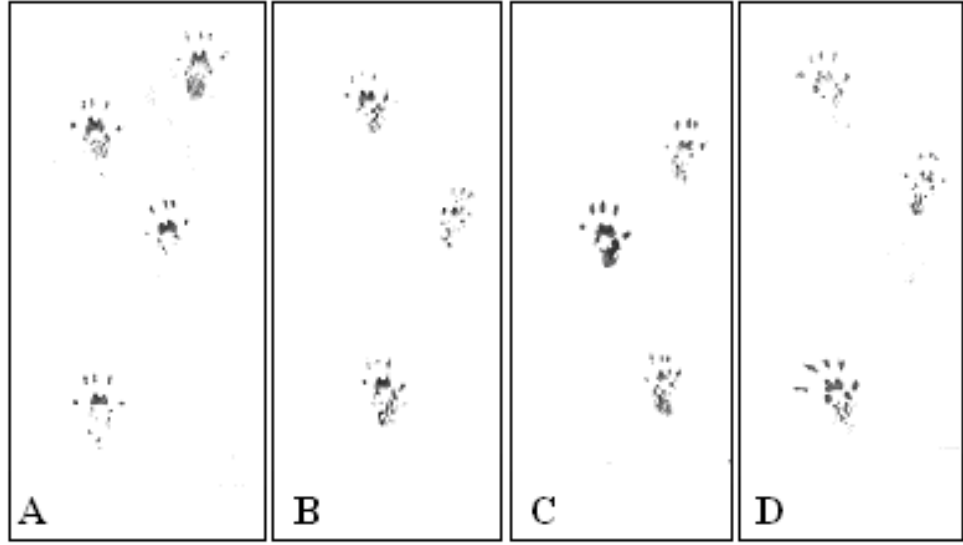
Şekil 4.2. SFİ ölçümlerinde kullanılan 1. hafta ayak izlerinden örnekler. A: 1. grup (Sham), B: 2. grup (Kontrol), C: 3. grup (Deney grubu 1, TZP), D: 4. grup (Deney grubu 2, TFP)



Şekil 4.3. SFİ ölçümlerinde kullanılan 2. hafta ayak izlerinden örnekler. A: 1. grup (Sham), B: 2. grup (Kontrol), C: 3. grup (Deney grubu 1, TZP), D: 4. grup (Deney grubu 2, TFP)

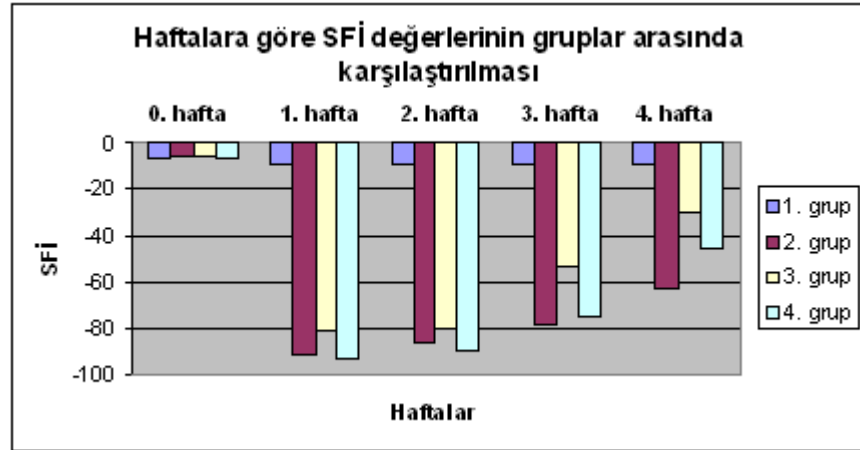


Şekil 4.4. SFİ ölçümlerinde kullanılan 3. hafta ayak izlerinden örnekler. A: 1. grup (Sham), B: 2. grup (Kontrol), C: 3. grup (Deney grubu 1, TZP), D: 4. grup (Deney grubu 2, TFP)



Şekil 4.5. SFİ ölçümlerinde kullanılan 4. hafta ayak izlerinden örnekler. A: 1. grup (Sham), B: 2. grup (Kontrol), C: 3. grup (Deney grubu 1, TZP), D: 4. grup (Deney grubu 2, TFP)

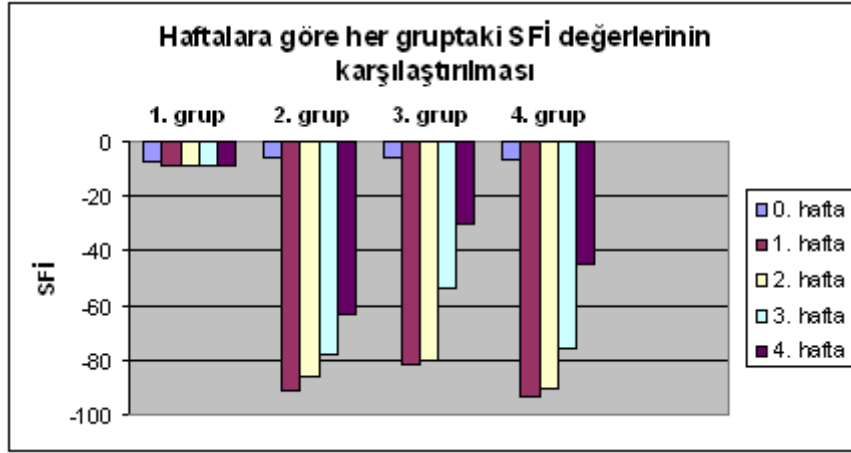
Daha sonra 7 gün ara ile yapılan SFİ ölçümleri gruplar arasında birbirleri ile karşılaştırıldı. Sonuçlar tablo 4.1 ve şekil 4.6 ile 4.7’de gösterilmektedir.



Şekil 4.6. SFİ değerlerinin haftalara göre gruplar arasında karşılaştırılması

Tablo 4.1.1. SFİ değerlerinin ardışık ölçümlerinin her grup içinde ve gruplar arasında karşılaştırılması (SFİ0 işlem öncesi değerler, SFİ1 7. gün, SFİ2 14. gün, SFİ3 21. gün, SFİ4 30. gün ölçümleri) (M medyan değer, %25 25. persentil, %75 75. persentil)

	SFİ0			SFİ1			SFİ2			SFİ3			SFİ4			<i>p</i>
	M	%25	%75	M	%25	%75	M	%25	%75	M	%25	%75	M	%25	%75	
1.Grup	-6.70	-9.60	-4.75	-8.80	-9.36	-6.41	-8.80	-8.80	-7.97	-8.80	-10.24	-8.37	-8.80	-9.96	-7.18	0.360
2.Grup	-5.55	-7.35	-0.75	-91.40	-93.05	-85.67	-85.99	-89.77	-82.67	-77.88	-79.89	-69.67	-62.70	-71.38	-53.25	<0.001
3.Grup	-5.50	-9.20	-0.92	-81.52	-84.36	-80.37	-80.03	-82.35	-75.76	-53.46	-61.54	-41.06	-30.12	-36.81	-24.99	<0.001
4.Grup	-6.29	-9.40	-0.74	-92.91	-95.57	-87.50	-89.87	-91.79	-83.81	-75.44	-79.63	-70.22	-44.98	-47.15	-39.32	<0.001
<i>p</i>	0.722			<0.001			<0.001			<0.001			<0.001			



Şekil 4.7. SFİ değerlerinin ardışık ölçümlerinin her grup içerisinde karşılaştırılması

SFİ değerlerinin istatistiksel analizleri ile elde edilen bulgular:

- SFİ1 (7. gün), SFİ2 (14. gün), SFİ3 (21.gün) ölçümleri: 4 grup arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$). Sham grubu olan 1. gruptaki değerler her üç gruptan da istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı. Ek olarak TZP verilen 3. grupta bulunan diğer ezilme hasarı yapılmış olan 2. ve 4. gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunurken, kontrol grubu olan 2. grup ve TFP verilmiş olan 4. grup arasında fark yoktu.

-SFİ4 (30. gün ölçümleri): 4 grup arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$). Sham grubu olan 1. gruptaki değerler her üç gruptan da istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı. TZP uygulanmış olan 3. gruptaki değerler diğer ezilme hasarı yapılmış 2. ve 4. gruptakilerden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunurken, kontrol grubu olan 2. grup ve TFP verilmiş olan 4. grup arasında da anlamlı istatistiksel farkın olduğu saptandı.

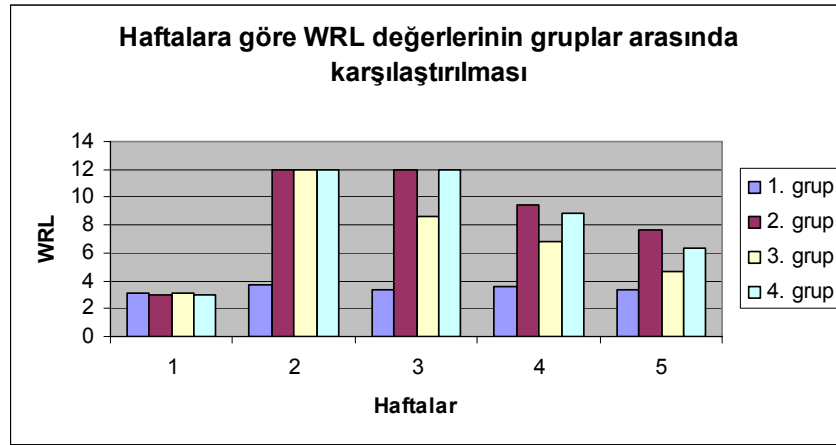
Her bir grubun kendi içinde ardışık yapılan ölçümlerinin değerlendirmesinde elde edilen verilere göre;

- 1. grupta haftalık alınan seri ölçüm değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$)
- Diğer ezilme hasarı yapılmış olan üç grupta, sinir rejenerasyonunu destekler şekilde, her bir grubun kendi içinde, haftalık alınan seri ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$)

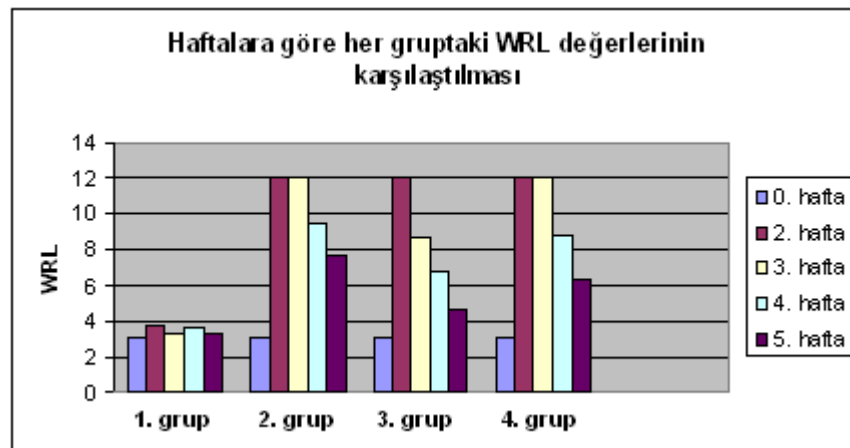
4.2.2. WRL Bulguları

Deney öncesi tüm hayvanların sağ ve sol bacaklarından 0. gün değerleri ölçülerek kaydedildi. Ortalama WRL süresi sol bacaklarda $3.15 (\pm 0.25)$ saniye, sağ bacaklarda ise $3.15 (\pm 0.29)$ saniye olarak saptandı ve iki taraf bacak arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (WRL0 S $p>0.05$, WRL0 D $p>0.05$).

Daha sonra 7 gün ara ile hem deney hem de kontrol tarafı ayaklardan alınan WRL ölçümleri gruplar arasında birbirleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar tablo 4.2 ve şekil 4.8 ile 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4.8. WRL değerlerinin haftalara göre gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 4.9. WRL değerlerinin ardışık ölçümlerinin her grup içerisinde karşılaştırılması

Tablo 4.2. WRL değerlerinin deney tarafında ardışık ölçümlerinin her grup içinde ve gruplar arasında karşılaştırılması (WRL0 işlem öncesi değerler, WRL1 7. gün, WRL2 14. gün, WRL3 21. gün, WRL4 30. gün ölçümleri) (M medyan değer, %25 25. persentil, %75 75. persentil)

	WRL0			WRL1			WRL2			WRL3			WRL4			P
	M	%25	%75	M	%25	%75	M	%25	%75	M	%25	%75	M	%25	%75	
1.Grup	3.17	3.00	3.33	3.67	3.33	3.67	3.33	3.17	3.67	3.61	3.33	3.75	3.33	3.17	3.67	0.116
2.Grup	3.00	3.00	3.28	12.00	12.00	12.00	12.00	10.84	12.00	9.50	9.17	11.00	7.67	6.84	8.17	<0.001
3.Grup	3.17	3.00	3.55	12.00	12.00	12.00	8.67	8.00	9.00	6.84	6.67	7.50	4.67	4.17	5.67	<0.001
4.Grup	3.00	3.00	3.27	12.00	12.00	12.00	12.00	9.50	12.00	8.84	7.84	12.00	6.34	5.50	7.67	<0.001
P	0.548			<0.001			<0.001			<0.001			<0.001			

Deney tarafından elde edilen WRL değerlerinin istatistiksel analizi ile elde edilen sonuçlar:

- WRL1 (7. gün): 1. grup dışında ezilme hasarı yapılan diğer üç grupta hiçbir denekte yanıt alınmadığı için, 1. grup ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

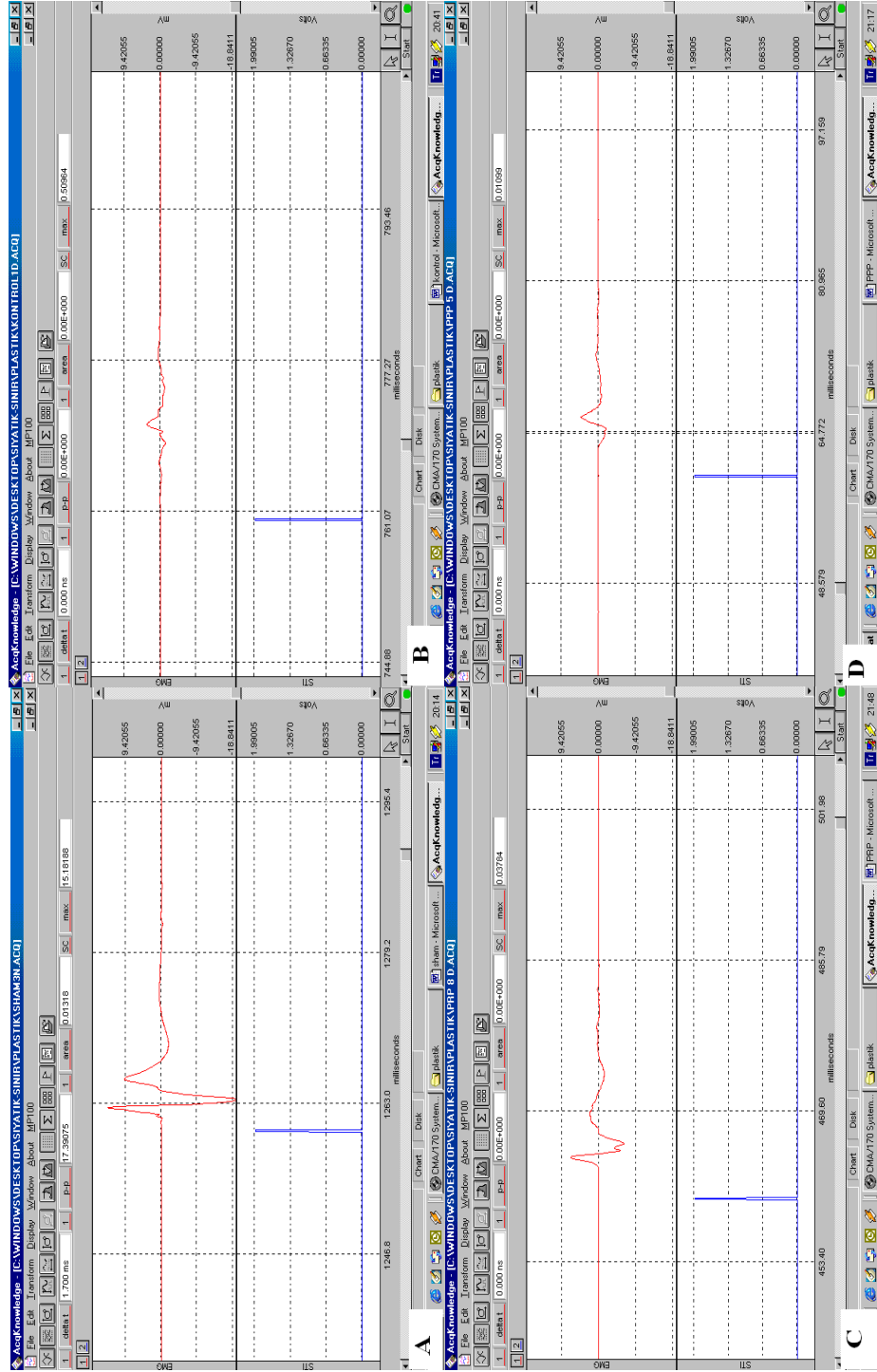
- WRL2 (14. gün), WRL3 (21. gün): 1. grup diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu. WRL2 değerlerinde, ezilme hasarı yapılan gruplardan TZP verilen 3. grupta, deneklerde geri çekme refleksinin geri dönmeye başlaması ile kontrol grubu olan 2. grup ve TFP uygulanan 4. gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptandı. WRL3 değerlerinde tüm gruplarda değişik derecelerde geri çekme reflekslerinde geri dönüş olduğu gözlemlendi, ancak 3. gruptaki süre, diğer ezilme hasarı yapılmış olan 2 ve 4. gruplardakine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısa olarak izlendi. 2 ve 4. gruplar arasında her iki ölçümlerde de istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

- WRL4 (30. gün): Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptandı.

Her bir grubun kendi içinde ardışık yapılan ölçümlerinin değerlendirmesinde 0. gün ölçümleri hariç bırakıldığında, 2., 3. ve 4. gruplarda takip eden ardışık ölçümlerde elde edilen düzelme değerleri istatistiksel olarak her grupta anlamlı derecede farklı olarak saptandı ($p<0.001$).

4.3. Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları

Latans süresi, pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) ve maksimum pozitif pik (p-max) değerleri gruplar arasında parametrik tek yönlü varyans analizi yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Her bir grup içerisinde ise sağlam ve deney tarafından alınan ölçümler birbirleri ile paired t-testi ile karşılaştırıldı. Farklı gruplardan elde edilen EMG kayıtlarına ilişkin örnekler şekil 4.10'da gösterilmektedir.

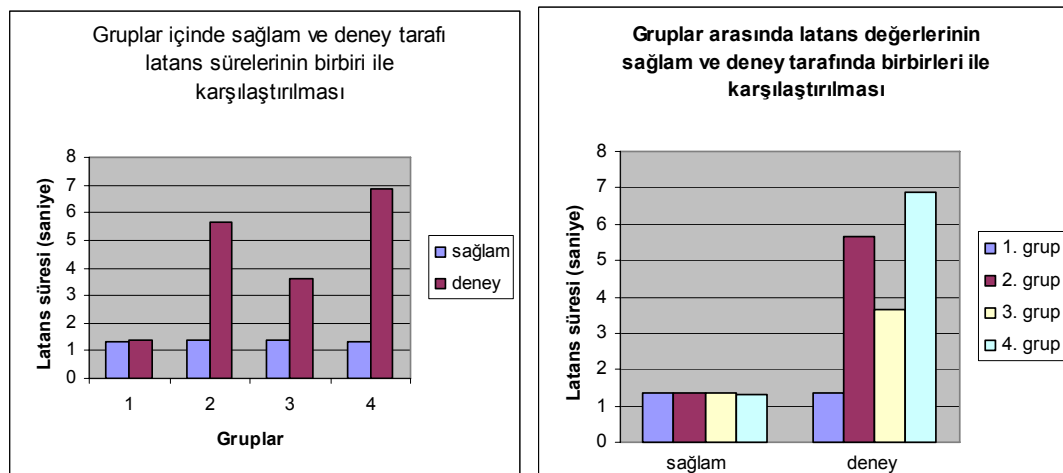


Şekil 4.10. Farklı gruplardan alınan EMG kayıt örnekleri. A: 1. grup (Sham), B: 2.grup (Kontrol), C: 3. grup (Deney grubu 1, TZP), D: 4. grup (Deney grubu 2, TFP)

Latans değerlerinde sağlam taraf ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmazken ($p>0.05$), deney tarafında anlamlı fark mevcuttur ($p<0.001$). Sham grubu olan 1. grup ve TZP uygulanmış olan 3. grup deney taraflarındaki latans değerlerinde diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanırken ($p<0.001$), 2. ve 4. gruplar arasında fark yoktu ($p>0.05$). Latans değerlerine ait bulgular tablo 4.3 ve şekil 4.11A ile 4.11B’de gösterilmektedir.

Tablo 4.3. Sağlam (S) ve deney (D) tarafında latans sürelerinin gruplar arasında ve her grup içinde birbirleri ile karşılaştırılması

	Latans S		Latans D		P
	Ortalama	OSH	Ortalama	OSH	
1. Grup	1.351	± 0.055	1.359	± 0.091	<i>0.670</i>
2. Grup	1.354	± 0.033	5.680	± 1.404	<i>< 0.001</i>
3. Grup	1.357	± 0.035	3.627	± 0.867	<i>< 0.001</i>
4. Grup	1.339	± 0.042	6.860	± 1.338	<i>< 0.001</i>
P	<i>0.548</i>		<i>< 0.001</i>		

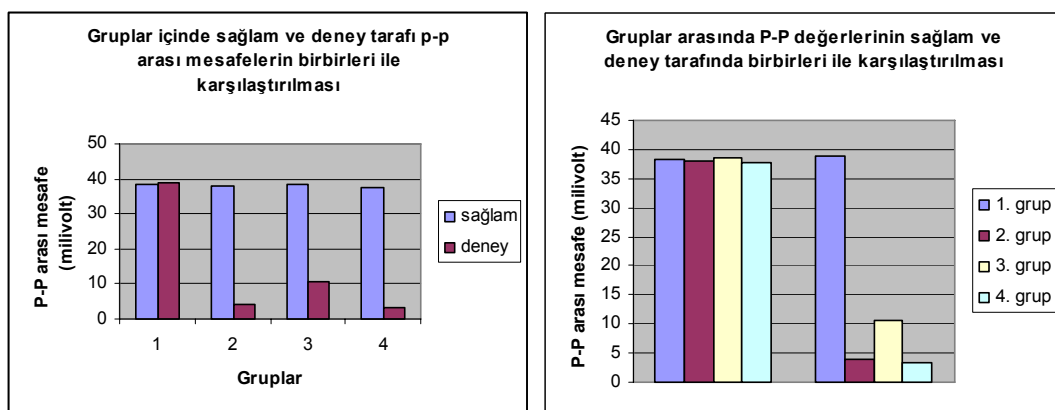


Şekil 4.11. Latans sürelerinin sağlam ve deney tarafında birbirleri ile karşılaştırılması. **A:** Gruplar içinde, **B:** Gruplar arasında

Pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) değerlerinde sağlam taraf ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmazken ($p>0.05$), deney tarafında fark mevcuttu ($p<0.001$). Sham grubu olan 1. grup ve TZP uygulanmış olan 3. grup deney taraflarındaki değerlerde diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanırken ($p<0.001$), 2. ve 4. gruplar arasında fark yoktu ($p>0.05$). Elde edilen bulgular tablo 4.4 ve şekil 4.12A ve 4.12B’de gösterilmektedir.

Tablo 4.4. Sağlam (S) ve deney (D) tarafında pozitif ve negatif pikler arasındaki mesafenin (P-P arası mesafe) gruplar arasında ve her grup içinde birbirleri ile karşılaştırılması

	P-P arası mesafe S		P-P arası mesafe D		P
	Ortalama	OSH	Ortalama	OSH	
1. Grup	38.250	± 0.831	38.868	± 0.787	<i>0.169</i>
2. Grup	38.088	± 1.287	3.948	± 1.955	<i>< 0.001</i>
3. Grup	38.450	± 1.395	10.496	± 5.724	<i>< 0.001</i>
4. Grup	37.713	± 1.005	3.216	± 1.304	<i>< 0.001</i>
<i>P</i>	<i>0.628</i>		<i>< 0.001</i>		

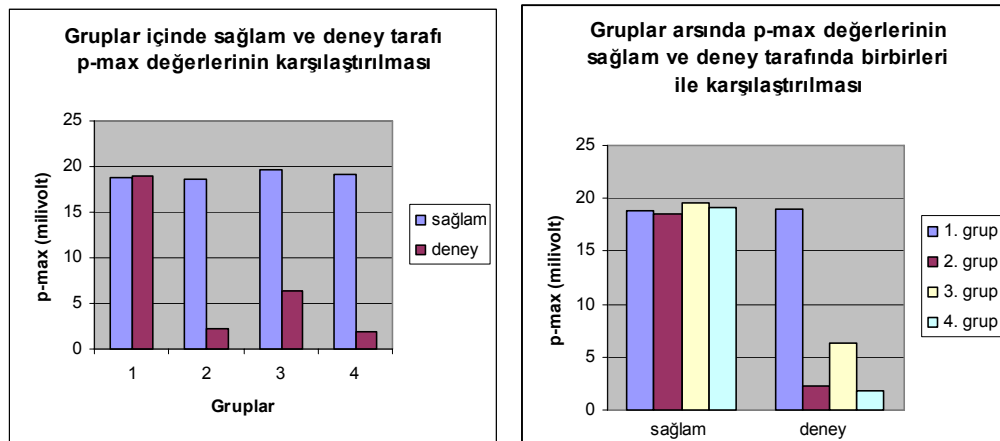


Şekil 4.12. Pozitif ve negatif pikler arasındaki mesafenin (P-P arası mesafe) sağlam ve deney tarafında birbirleri ile karşılaştırılması. **A:** Gruplar içinde, **B:** Gruplar arasında

Maksimum pozitif pik (p-max) değerlerinde sağlam taraf ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmazken ($p>0.05$), deney tarafında fark mevcuttu ($p<0.001$). Sham grubu olan 1. grup ve TZP uygulanmış olan 3. grup deney taraflarındaki maksimum pozitif pik değerlerinde diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanırken ($p<0.001$), 2. ve 4. gruplar arasında fark yoktu ($p>0.05$). Elde edilen bulgular tablo 4.5 ve şekil 4.13A ve 4.13B’de gösterilmektedir.

Tablo 4.5. Sağlam (S) ve deney (D) tarafında maksimum pozitif pik (p-max) değerlerinin gruplar arasında ve her grup içinde birbirleri ile karşılaştırılması

	P-max S		P-max D		P
	Ortalama	OSH	Ortalama	OSH	
1. Grup	18.788	± 0.735	18.978	± 0.878	0.448
2. Grup	18.579	± 1.290	2.194	± 1.220	< 0.001
3. Grup	19.577	± 0.908	6.365	± 4.486	< 0.001
4. Grup	19.158	± 1.086	1.869	± 1.332	< 0.001
P	0.245		< 0.001		



Şekil 4.13. Maksimum pozitif pik (p-max) değerlerinin sağlam ve deney tarafında birbirleri ile karşılaştırılması. **A:** Gruplar içinde, **B:** Gruplar arasında

Her grubun kendi içinde sağlam ve deney tarafından elde edilen latans süresi, pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) ve maksimum pozitif pik (p-

max) değerlerinin karşılaştırılmasında, 1. grupta istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Diğer üç grupta ise, sağlam ve deney tarafında tüm parametrelerde elde edilen verilerin karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

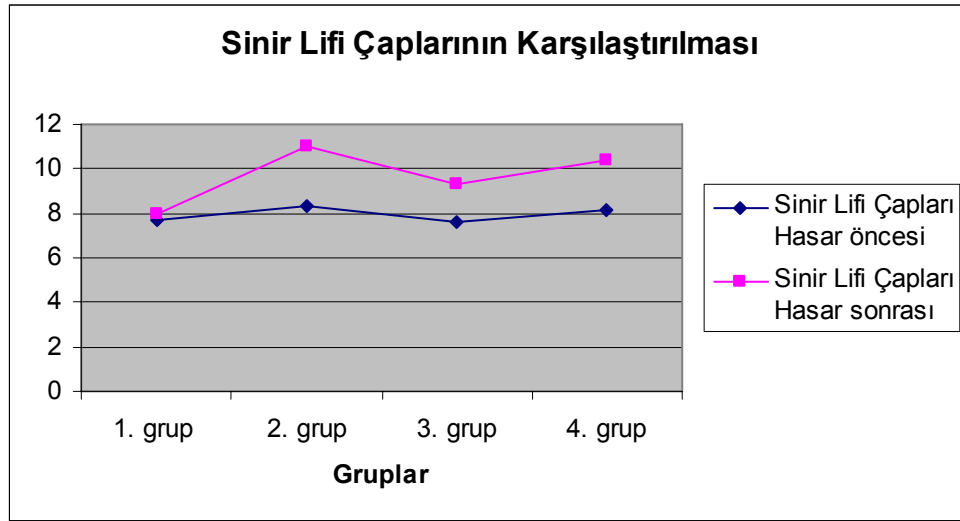
4.4. Histomorfometrik Değerlendirme Bulguları

Stereolojik inceleme için her gruba ait hasar öncesi ve sonrası lif çapları istatistiksel olarak analiz edildi. Ayrıca gruplar da hasar öncesi ve sonrası çap değişiklikleri açısından birbirleri ile karşılaştırıldı.

Hasar öncesine göre hasar sonrası bölgelerde tüm gruplarda lif çaplarında artış gözlenmiş olup, 1. ve 3. gruplarda lif çapları birbirlerine oldukça yakın değerlerde saptanmıştır. Hasar öncesi ve sonrası lif çapları karşılaştırıldığında, 1. grupta bir değişiklik gözlenmezken, diğer 3 grupta, istatistiksel olarak anlamlı derecede çaplar artmış olarak izlendi ($p<0.05$). Çap artışı, 3. grup olan TZP verilen grupta daha az olarak izlenmesine karşın, diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Hasar öncesi lif çapları birbirine benzer değerlerde saptandı ve istatistiksel fark yoktu. Lif çapları ile ilgili bulgular tablo 4.6 ve şekil 4.14'te gösterilmektedir.

Tablo 4.6. Hasar öncesi ve sonrası lif çaplarının gruplar arasında ve her grup içinde karşılaştırılması (M medyan değer, %25 25. persentil, %75 75. persentil)

	Hasar öncesi lif çapı			Hasar sonrası lif çapı			P
	M	%25	%75	M	%25	%75	
1. Grup	7.73	7.58	8.02	7.99	7.59	8.62	<i>0.208</i>
2. Grup	8.31	7.97	8.92	11.03	10.17	12.49	<i><0.05</i>
3. Grup	7.61	7.39	8.20	9.29	8.95	10.71	<i><0.05</i>
4. Grup	8.19	7.71	8.99	10.42	9.07	11.90	<i><0.05</i>
P	<i>0.133</i>			<i><0.05</i>			



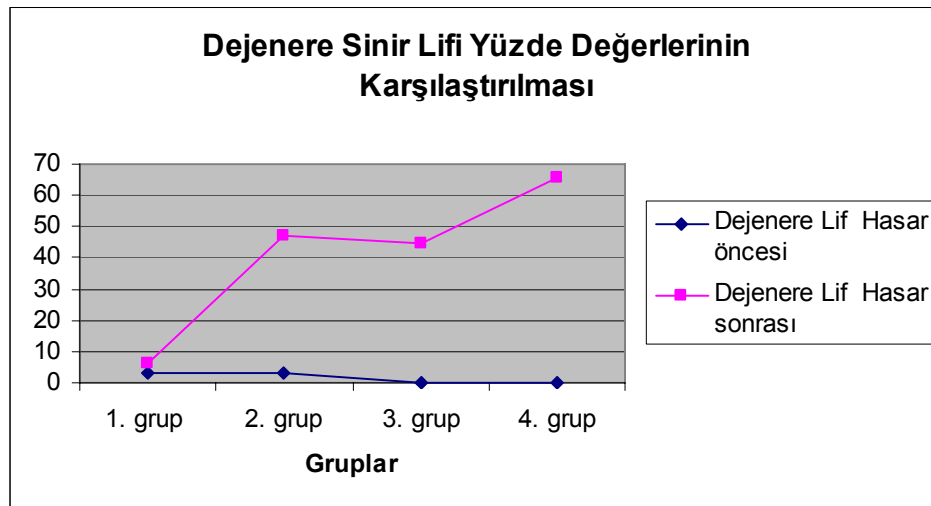
Şekil 4.14. Hasar öncesi ve sonrası lif çaplarının gruplar arasında karşılaştırılması

Hasar alanından önceki kesitlerin analizinde, dejenere sinir liflerinin yüzdeleri açısından gruplar arasında istatistiksel fark saptanmadı. Hasar yapılan alanın distal kesitleri incelendiğinde, 1. grup hariç, sinirde ezilme tipi hasar oluşturulan diğer üç grupta, dejenere lif yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu saptandı ($p < 0.001$). 1. grup olan sham grubuna kıyasla, diğer 3 grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla dejenere lif mevcut olup, dejenere lif yüzdesi 4. grup olan TFP grubunda daha fazlaydı. Buna karşın TFP uygulanan 4. grup, TZP uygulanan 3. grup ve kontrol olan 2. gruptan istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ezilme uygulanan grupların, hasar öncesi ve sonrası dejenere lif yüzdeleri karşılaştırıldığında, hasar sonrası bölgelerde dejenere lif yüzdesinde belirgin olarak artış saptandı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$).

Her hayvanda sayılan hasar öncesi ve hasar sonrası bölgesindeki dejenere sinir liflerinin toplam sinir liflerine oranları tablo 4.7 ve şekil 4.15'te gösterilmektedir.

Tablo 4.7. Hasar öncesi ve sonrası dejenere lif sayılarının yüzde değerlerinin gruplar arasında ve her grup içinde karşılaştırılması (M medyan değer, %25 25. persentil, %75 75. persentil)

	Dejenere lif (önce)			Dejenere lif (sonra)			P
	M	%25	%75	M	%25	%75	
1. Grup	3	0	13.5	6	0	14	<i>0.317</i>
2. Grup	3	0.3	13.5	47	32.8	67.5	<i><0.05</i>
3. Grup	0	0	0.8	44.5	40.8	59.5	<i><0.05</i>
4. Grup	0	0	0	65.5	57.3	94.8	<i><0.05</i>
<i>P</i>	<i>0.431</i>			<i><0.001</i>			



Şekil 4.15. Hasar öncesi ve sonrası bölgelerde dejenere liflerin yüzde değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

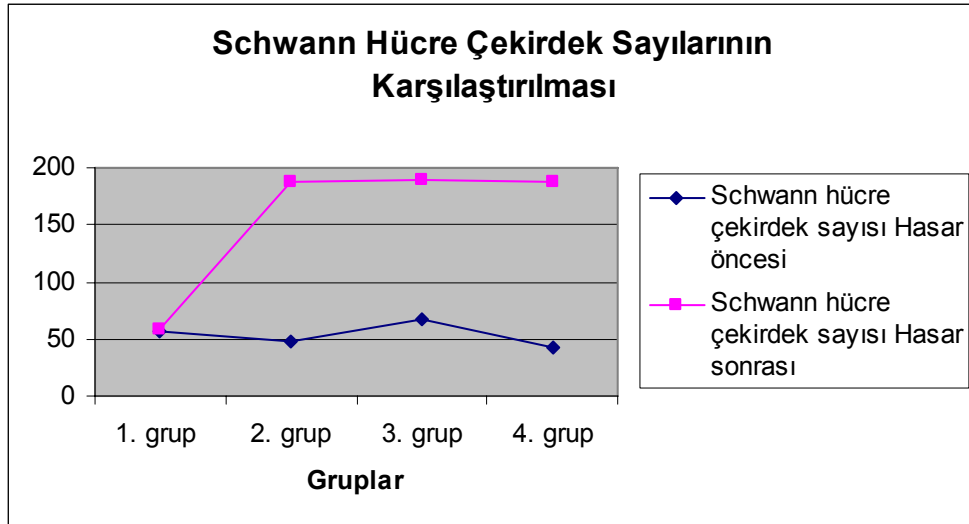
Toplam Schwann hücre çekirdek sayısı, 1. grup hariç diğer 3 grupta rejenerasyonu gösterecek şekilde hasar sonrası artmış olarak izlendi ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Hasar proksimalindeki kesitler incelendiğinde, TFP uygulanmış olan 4. grupta, toplam Schwann hücre çekirdek sayısı diğer 3 gruptan daha düşük sayıda izlendi ve bu fark 3. grup olan TZP grubu ve 1. grup olan sham grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Hasar sonrası kesitlerde, 1. gruba kıyasla ezilme hasarı yapılan diğer 3

grupta Schwann hücre çekirdeklerindeki sayı artışı oldukça belirgin olup, bu fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0.001$), ancak bu 3 grup arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p > 0.05$).

Toplam Schwann hücre çekirdek sayısı yüzde değerleri tablo 4.8 ve şekil 4.16'da özetlenmiştir.

Tablo 4.8. Hasar öncesi ve sonrası toplam Schwann hücre çekirdek sayılarının gruplar arasında ve her grup içinde karşılaştırılması (M medyan değer, %25 25. persentil, %75 75. persentil)

	Toplam Schwann çekirdek sayısı (önce)			Toplam Schwann çekirdek sayısı (sonra)			P
	M	%25	%75	M	%25	%75	
1. Grup	57	53	68	59	54	68	<i>0.317</i>
2. Grup	47	28	69	188	159	233	<i><0.05</i>
3. Grup	67	52	76	189	171	230	<i><0.05</i>
4. Grup	43	34	48	188	172	210	<i><0.05</i>
<i>P</i>	<i><0.05</i>			<i><0.001</i>			

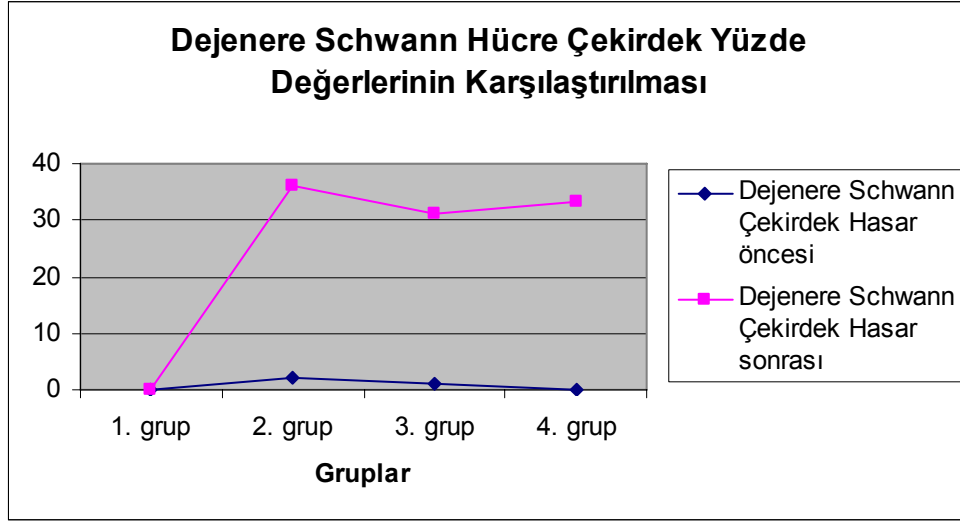


Şekil 4.16. Hasar öncesi ve sonrası bölgelerde toplam Schwann hücre çekirdek sayılarının gruplar arasında karşılaştırılması

Dejenere Schwann hücre çekirdeklerinin yüzde değerleri, hasar öncesi ve sonrası bölgelerde karşılaştırıldığında, 1. grup hariç ezilme hasarı uygulanan diğer 3 grupta istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ($p < 0.05$), ancak bu 3 grup arasında istatistiksel fark yoktu ($p > 0.05$). Dejenere Schwann hücre çekirdek yüzdesi, diğer üç gruptan farklı ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek izlendi ($p < 0.05$). Hasar sonrasında ise, 1. gruptaki dejenere çekirdeklerin yüzde değeri, diğer 3 gruptan istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı şekilde düşük bulunmuş olup ($p < 0.001$), diğer 3 grup arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p > 0.05$). Dejenere çekirdekli Schwann hücrelerinin yüzde değerleri tablo 4.9 ve şekil 4.17’de özetlenmiştir.

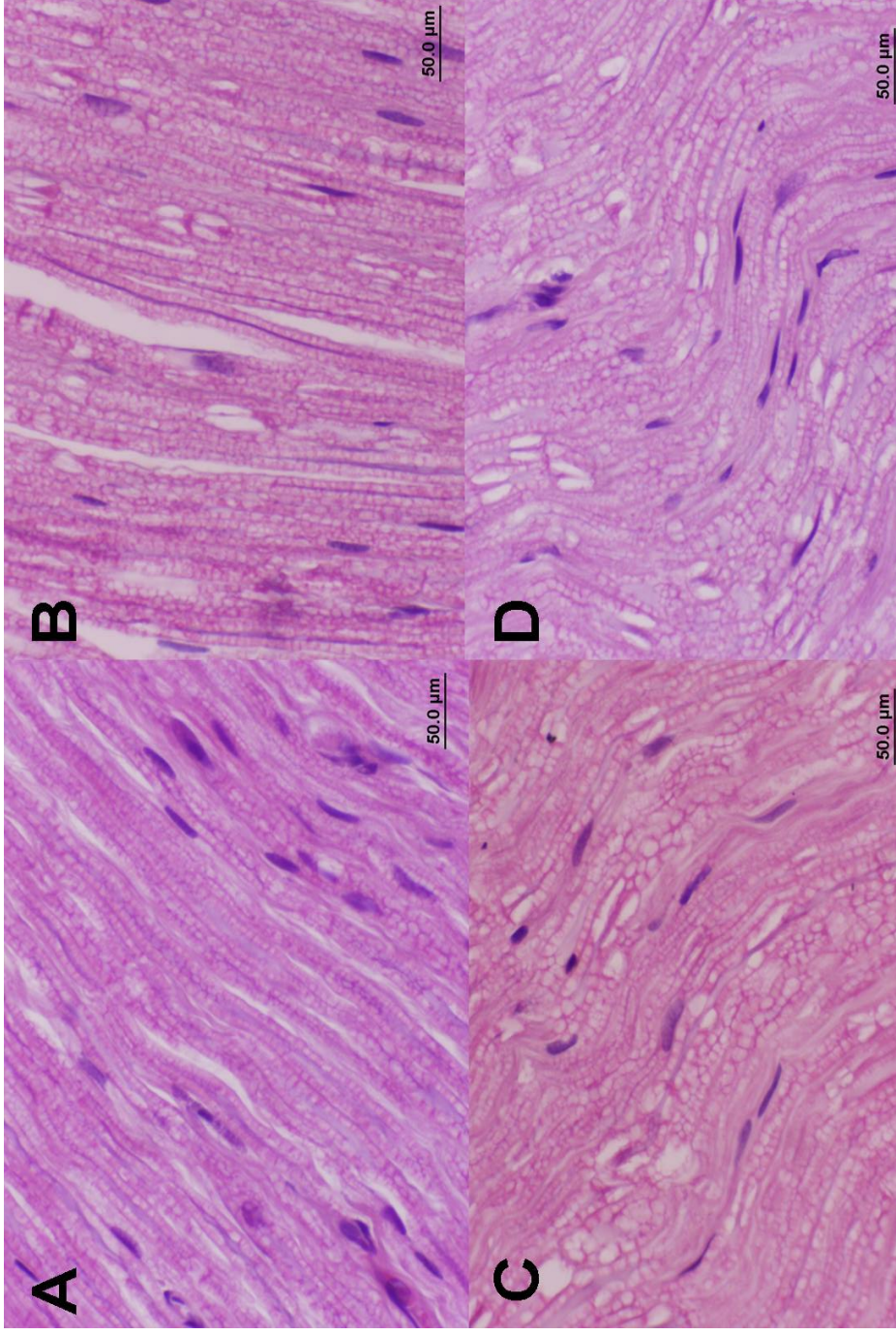
Tablo 4.9. Hasar öncesi ve sonrası Schwann hücre dejenere çekirdeklerinin toplam çekirdek sayısına oranının yüzde değerlerinin gruplar arasında ve her grup içinde karşılaştırılması (M medyan değer, %25 25. persentil, %75 75. persentil)

	Dejenere Schwann çekirdek sayısı (önce)			Dejenere Schwann çekirdek sayısı (sonra)			P
	M	%25	%75	M	%25	%75	
1. Grup	0	0	0	0	0	1.3	<i>0.317</i>
2. Grup	2.2	0.4	4.9	36	28.4	40.2	<i><0.05</i>
3. Grup	0.9	0	3	31	29.5	34.0	<i><0.05</i>
4. Grup	0	0	0	33.4	30.8	38.9	<i><0.05</i>
<i>P</i>	<i><0.05</i>			<i><0.001</i>			

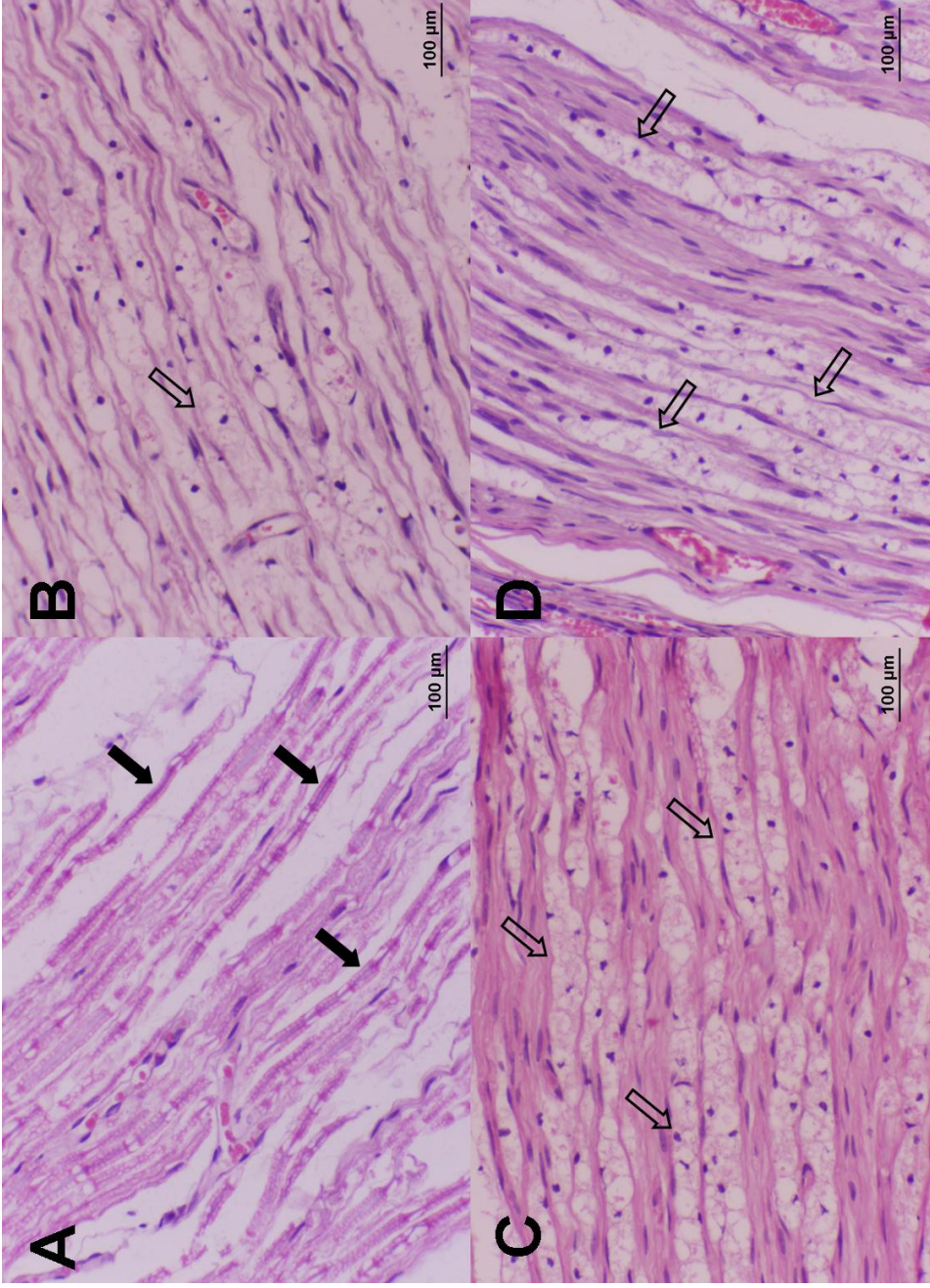



Şekil 4.17. Hasar öncesi ve sonrası bölgelerde dejenere Schwann hücre çekirdeklerinin yüzde değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Histomorfometrik analizlere ait gruplar arasındaki karşılaştırmalı görüntüler, hasar öncesi ve hasar sonrası bölgelerde ayrı ayrı olarak şekil 4.18 ve şekil 4.19’te gösterilmektedir.



Şekil 4.18. Hasar öncesi sinir liflerinin görünümü. A: 1. grup (Sham), B: 2.grup (Kontrol), C: 3. grup (Deney grubu 1, TZP), D: 4. grup (Deney grubu 2, TFP).



Şekil 4.19. Hasar sonrası sinir liflerinin görünümü. A: 1. grup (Sham), B: 2. grup (Kontrol), C: 3. grup (Deney grubu 1, TZP), D: 4. grup (Deney grubu 2, TFP). Siyah oklar () rejenerasyon lifleri, içi boş oklar () dejenerasyon lifleri göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda, sinir iyileşmesi üzerine yapılan çalışmaların yardımıyla periferik sinir yaralanmalarındaki patofizyolojik mekanizmalar ve moleküler düzeydeki değişimler aydınlanmaya başlamıştır. Sinir iyileşmesi konusunda yapılan tüm araştırmalara rağmen, ciddi yaralanmalar sonrasında halen istenilen boyutlarda sinir iyileşmesi elde edilememektedir. Pek çok farklı nedenlerle oluşabilen periferik sinir yaralanmalarında tedavideki asıl amaç, sinir bütünlüğünün, dolayısı ile iletinin tekrar sağlanması ve sinirin bağlantılı olduğu uç organ fonksiyonlarının en az kayıpla yerine konulabilmesidir. Başarılı bir sinir rejenerasyonu, aksonal tomurcuklanma, büyüme, uç organ reinnervasyonu ve santral sinir sistemi ile rejenere olan liflerin integrasyonu gibi pek çok aşamanın tamamlanması gereken karmaşık bir süreçtir (124, 135).

Periferik sinir rejenerasyonunu değerlendirmede, sıçan sıklıkla kullanılan bir hayvandır. Kolay elde edilebilirliği, ucuz olması ve sinir trunkuslarının insanlardakine benzerliği, bu hayvanların sık kullanılmasının nedenleri arasında sayılabilir. Özellikle sıçan siyatik siniri, uzun seyri, orta uyluk bölgesinde kolay diseksiyona izin vermesi ve maniplasyon için uygun bir alana sahip olması, bu siniri sinir çalışmalarında vazgeçilmez kılmaktadır. İnsanlarda siyatik sinir yaralanmaları nadir olmasına karşın, deneysel modellerde bu sinirin tercih edilmesindeki bir diğer neden de, polifasiküler mikst tip bir sinir olması ve farklı boyut ve tiplerde aksonları içermesi nedeniyle kapsamlı bir araştırma olanağı sağlamasıdır. Bu şekilde, hem duyu hem de motor fonksiyonları aynı anda değerlendirmeye olanak tanır (123, 125, 126, 136).

Ezilme yaralanmaları sonucu, sinirde genellikle aksonotomezis tipinde yaralanma meydana gelir. Aksonotomezis tipi sinir hasarında endonöral kılıf bütünlüğü korunmuşken, akson yıkımı ve distalde Wallerian dejenerasyon ile seyreder. Bu tip yaralanmalar sonrasında distal sinir güdüğüne spontan rejenerasyon ile iyi fonksiyonel geri dönüş beklenebilir (123, 126). Ancak yaralanmaya sekonder gelişen sinir hücrelerinde ölüm, denervasyonda uzamaya bağlı uç organ atrofisi ya da uygun olmayan yanlış yönlendirilmiş aksonal büyüme nedeniyle, spontan rejenerasyon beklenen bu tip yaralanmalarda da başarısız sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca sinirin

hasara uğrayan bölgesinde gelişen skar dokusu da aksonal büyüme mekanik olarak bloke ederek iyileşmeyi olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu çalışmada, ezilme tipi hasar oluşturulmuş sıçan siyatik sinirine tek doz TZP uygulanarak, sinir dokusunda daha hızlı ve daha kaliteli bir rejenerasyon elde edilmeye çalışılmıştır.

Periferik sinir araştırmalarında sıklıkla aksonotomezis hasar modeli için, sıçan siyatik sinir ezilme tarzı yaralanma modeli kullanılır. Ezilme tarzı sinir yaralanma modeli, periferik sinir rejenerasyonunun hücresel ve moleküler mekanizmalarını ve rejenerasyon süreci üzerine farklı faktörlerin etkilerini incelemek için oldukça uygun bir modeldir. Ayrıca sinir ezilme modelleri, deneysel rejenerasyon modelleri içinde oldukça iyi tanımlanmış bir model olup, bu model üzerinde farklı farmakolojik ajanlarla yapılmış pek çok çalışma mevcuttur.

Deneysel olarak periferik sinirlerde ezilme tarzı yaralanması oluşturmak için tanımlanmış pek çok teknik vardır. Bu tip deneysel çalışmalarda temel sorun hasar miktarının standardize edilememesidir. Sabit bir basınç uygulanmış olsa bile, bazı sinir lifleri etkilenmeden devamlılıklarını koruyabilecekleri için, özellikle elektrofizyolojik ölçümlerde yanılmalara neden olabilir. Bu problemi en aza indirmek için Luis ve ark.'nın (123) deneysel modellerinde tanımladıkları 54 newtonluk basınç uygulayan klempin bir benzeri bu çalışma için özel olarak hazırlatılarak kullanıldı. Varejeo ve ark. (126), bu basınç altında yapılan ezilme hasarı ile komplet fonksiyonel defisit oluştuğunu ve normal değerlerin en erken 7. haftada geri döndüğünü çalışmalarında göstermişlerdir. Çeşitli çalışmalarda saptanan farklı fonksiyonel rejenerasyon zamanları, muhtemelen farklı basınçların sinir üzerinde oluşturdukları farklı ezilme hasarı derecelerine bağlıdır (123, 126, 135, 137, 138). Bu çalışmada kullanılan özel klemp yardımı ile, siyatik sinirlerin hemen hepsinde, benzer şekilde ve benzer derecede sinir hasarı oluşturulmaya çalışıldı. Tüm deneklerde klemp ile yapılan ezilme hasarı sonrasında tam fonksiyonel ve duyu kaybı gözlemlendi. Deneklerin takiplerinde de rejenerasyon dereceleri gruplar içerisinde uyumlu olarak gözlemlendi.

Aksonotomezis sonrası siyatik sinir rejenerasyonunu inceleyen pek çok çalışmada, operasyon sonrası takip süreleri 4 ila 8 hafta arasında değişmektedir. Bu sürenin sonunda sıklıkla fonksiyonel geri dönüş tam olmaktadır. Bu durum yürüyüş yolu analizleri ile sıklıkla desteklenmiştir (123). Vogelaar ve ark. (139) forseps ile

oluşturdukları ezilme tarzı sinir hasarı sonrasında, duyu ve motor fonksiyonların yaklaşık 24. günden itibaren ileri derecede geri döndüğünü ve 30. günde hem siyatik fonksiyonel indeksin hem de geri çekme refleksinin normale yakın değerlere geldiğini gözlemlemişlerdir. Hadlock ve ark. (138) ise, siyatik sinir ortalama onarım hızının 2.26 mm/gün olduğunu saptayarak, ezilme hasarının şiddetine göre siyatik sinir fonksiyonunun 14 ila 34. günlerde geri döndüğünü öne sürmüşlerdir. Bir diğer çalışmada da Wolthers ve ark. (135), ezilme tarzı yaralanma sonrasında yaklaşık 30. günde siyatik fonksiyonel indeks değerlerinde tama yakın düzelme elde etmişlerdir (-27 ± -4). Bu çalışmada, aksonotomezis tipi sinir hasarı oluşturulduğu için ve TZP kullanımı ile daha hızlı bir rejenerasyon elde edilebileceği ön görülerek çalışma süresi 4 hafta olarak belirlenmiştir.

Sinir iyileşmesini desteklemek için farklı ilaç, hormon ya da biyolojik ürünlerin kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. İnsan amniyon sıvısı (82, 140), hyaluronik asit (81, 141), lokal tiroid hormon enjeksiyonu (142), topikal steroid tedavisi (143), immunsupresif bir ajan olan FK506 (144), fibrin yapıştırıcı (145, 146, 147, 148), asetil salisilik asit (149), trapidil (150, 151), hiperbarik oksijen tedavisi (152), lazer uygulaması (153) bunlardan bir kaçıdır. Bu kapsamdaki çalışmaların ortak noktası, dışardan eklenen farklı biyolojik maddeler ile travmaya uğramış akson etrafındaki mikroçevrenin ve buna bağlı olarak sinir rejenerasyonunun hücresel düzeyde değiştirilmesidir. Henüz hiç birinin rutin klinik kullanımda yeri olmamasına karşın, sinir iyileşmesi üzerine değişik derecelerde olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yapılan tüm bu çalışmalar, sinir rejenerasyon mekanizmalarının moleküler düzeydeki temellerine de ışık tutmada yardımcı olmuştur.

Sinir rejenerasyonuna yönelik çalışmalarda, hasar alanında miktarları artan; sinir dokusunun yaşayabilirliği ve rejenerasyon kapasitesi üzerine etkileri olan pek çok peptit tanımlanmıştır. Nörotrofik faktörler olarak anılan bu faktörlerin, deneysel çalışmalarda tek ya da kombine olarak kullanımlarıyla sinir rejenerasyonunun farklı aşamalarını olumlu yönde etkileyebildikleri gösterilmiştir. Özellikle sinir hücre ölümünü engelleyen, aksonal tomurcukların büyümesini stimüle eden ve nöropatik ağrıyı azaltan NGF ve GDNF ailelerine ait nörotrofinler ile yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Kollajen, laminin ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks moleküllerinin de, periferik sinir yaralanmalarında deneysel kullanımları vardır ve aksonal

rejenerasyonu arttırdıkları gözlenmiştir (154). Farklı tedavi seçenekleri ve olası beklenen faydalar tablo 5.1’de özetlenmiştir.

Tablo 5.1. Sinir iyileşmesinin farklı aşamaları için kullanılabilecek farklı tedavi seçenekleri (Abrams M, Widenfalk J’den (154) çevrilerek alınmıştır.)

Strateji	Amaç / açıklama	Tedavi
Kortikal reorganizasyonu arttırmak	Yanlış yönlendirilmiş sinirlere göre beyni tekrar eğitmek	Egzersizler
Ganglionlarda ve spinal korda hücre ölümünü engellemek	Hasara bağlı oluşan nöron ölümünü azaltmak	Trofik faktörler Antioksidanlar Anti-apoptotik ajanlar
Hasar alanında rejenerasyonu arttırmak	Rejenerasyon hızı ve yönünü düzeltmek	Uygun sütürasyon Silikon çemberler Allograflar Nörotrofik faktörler FK506 Elektrik stimülasyonu
Aksonal uzama hızını arttırmak	Distal güdüğe doğru aksonal uzamayı hızlandırmak	Nörotrofik faktörler FK506
Uzamış denervasyonun etkilerini gidermek	Uzamış denervasyonda Schwann hücrelerinin akson rejenerasyonu için destekleyici etkilerini güçlendirmek	Nörotrofik faktörler Kök hücre tedavisi
Myelinizasyonu desteklemek	Uygun miktarda myelinizasyonu sağlamak	Nörotrofik faktörler Kök hücre tedavisi
Hedef bulmayı destekleme (nörotropizm)	Doğru hedef organ innervasyonunun desteklenmesi	Nörotrofik faktörler

TZP, normal kandaki değerlerden daha yüksek trombosit sayısı içeren otolog plazma parçasıdır. İçerdiği yüksek miktarlardaki trombositlere bağlı olarak, pıhtılaşma faktörlerinin tümünü ve pek çok büyüme faktörünü de konsantre şekilde barındırır. Büyüme faktörü olarak başlıca PDGF, TGF- β , VEGF, EGF ve IGF içermektedir. TZP’nin etkisi, içerdiği bu büyüme faktörlerinin sinerjistik bir etkisi şeklinde ortaya çıkmaktadır (13, 14, 15, 56, 57). TZP uygulandığı bölgede içerisindeki trombositlerin trombin ile aktive edilmesi sonucu fibrin pıhtı oluşturur ve biyoaktif özelliğinin uzun

bir süre korur. Fibrin pıhtı içerisinde TZP'nın bölgede kalış süresi oldukça uzar. Aspenberg ve ark. (79) sıçan aşıl tendonu üzerinde yaptıkları bir çalışmada, tek doz uygulama sonrasında 4 hafta süre ile uygulama bölgesinde etkisinin devam ettiğini bildirmişlerdir. TZP içerisinde bulunan bu büyüme faktörleri ve sinir rejenerasyonu üzerine etkilerine genel bilgiler bölümünde detaylı olarak değinilmiştir (bkz. sayfa 37–44). TZP içerisinde bulunan belli başlı büyüme faktörleri ve sinir rejenerasyonu üzerine etkileri tablo 5.2'de özetlenmektedir.

Tablo 5.2. TZP içerisinde bulunan bazı büyüme faktörleri ve sinir rejenerasyonu üzerine etkileri

Büyüme Faktörleri	Periferik Sinir Rejenerasyonuna Etkileri	Kaynaklar
PDGF	Schwann hücre mitojeni Aksonal rejenerasyonun hızlanması Myelinizasyonun artması	90, 96, 97, 117, 118
TGF- β	Schwann hücre mitojeni, proliferatif etki Aksonal büyüme indüksiyonu	19, 99
FGF	Schwann hücre mitojeni, yaşayabilirlik, diferansiyasyon ve proliferasyonlarının desteklenmesi Aksonal büyüme indüksiyonu	17, 105, 106, 107
IGF	Aksonal büyüme indüksiyonu, Myelinizasyonun artması	18, 110, 111, 112, 117, 118
VEGF	Schwann hücre mitojeni, yaşayabilirlik ve diferansiyasyonlarının desteklenmesi Aksonal büyüme indüksiyonu	20, 103
EGF	Sinir rejenerasyonunu desteklediği ya da hiç etkili olmadığını ortaya koyan çalışmalar	114, 115
Fibronektin	Schwann hücre adezyonu ve migrasyonunun arttırılması, Aksonal büyümenin desteklenmesi	6, 120, 121

TZP elde edilmesinde tanımlanmış pek çok farklı yöntem mevcuttur. Standart laboratuvar santrifüj makineleri ile TZP hazırlamak mümkün olmasına karşın, birkaç santrifüj işlemi ve çoklu transfer gerekir. Ayrıca bu teknikte trombosit fragmantasyonunu engellemek, sterilitiyi sağlamak ve elde edilen plazmadaki trombosit miktarını belirlemek güçtür. Santrifüj sırasında trombosit fragmantasyonu önlenmeli ve trombosit zarının bütünlüğü korunmalıdır. Aksi takdirde trombositler aktive olarak büyüme faktörlerini salgırlar ve biyolojik olarak inaktif bir TZP elde edilmiş olur. TZP hazırlamak için geliştirilmiş ve kullanılmakta olan çeşitli standart hücre ayırıcı aletler mevcuttur(13, 14, 56, 58, 59). Bu çalışmada FDA onayı almış olan SmartPReP (Harvest Technologies Corp, Norwell, Mass.) cihazı TZP elde edilmesi için kullanılmıştır.

TZP otolog hazırlandığı için, hastalık geçirme ve reaksiyon oluşturma riski yoktur. Aktive edilmesi için kullanılan sığır trombinine karşı alerji riski olmasına karşın, çok küçük dozlarda kullanıldığı için (yaklaşık 200 ünite), sistemik dolaşıma geçmeden uygulama yerinde tüketilip, makrofajlarca artıkları temizlenir (13, 14). Yeni teknolojilerin gelişmesi ile son yıllarda, trombin solusyonu da otolog olarak hazırlanmaya başlamıştır. Hayvan çalışmalarında, özellikle küçük hayvanlarda, TZP ve trombin hazırlamak için gereken kanı aynı hayvandan almak mümkün olamamaktadır, dolayısıyla böyle deneylerde kullanılan TZP ve trombin otolog değil homolog hazırlanmaktadır. Bu nedenle oluşabilecek immün reaksiyonlara bağlı, deneylerde yanlış-negatif sonuçlar oluşabileceği de hatırd tutulmalıdır (56).

Periferik sinir rejenerasyonunu inceleyen deneysel araştırmalarda hem fonksiyonel hem de morfolojik incelemelerin yapılması önerilmektedir (123, 155). Yürüyüş yolu analizlerinin, elektrofizyolojik testlerin ve histomorfometrik incelemelerin hiç biri aslında total sinir fonksiyonunu gösterememektedir. Her bir parametre sinir rejenerasyonunun farklı bir aşaması hakkında bilgi verir. Ayrıca bu parametreler arasında sıklıkla uyumsuzluklar da göze çarpmaktadır (124). Deneysel modellerde sinir hasar sonrası iyileşmeyi gösterecek en iyi test henüz tanımlanamamıştır, bu nedenle farklı yazarlar çalışmalarında farklı parametreleri kullanarak, sinir rejenerasyonunun farklı aşamalarını test ederler. Bu çalışmada sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için, fonksiyonel testler (yürüyüş yolu analizi, ayak

geri çekme refleksi), elektrofizyolojik ölçümler ve histomorfometrik incelemeler kullanılmıştır.

Siyatik sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için sık kullanılan siyatik fonksiyonel indeks dışında farklı fonksiyonel değerlendirme testleri de geliştirilmiştir (156). Bunlardan bazıları: ayak bileği duruş açısı (ankle stance angle)(157), ayak parmak duruş açısı (toe out angle) (133), yürüyüş analizi (gait analysis)(158), ayak bileği kinematiği (ankle kinematics) (132), ekstansör postural duruş (extensor postural thrust) (159).

Fonksiyonel geri dönüşü değerlendirmek için en sık kullanılan yöntem yürüyüş yolu analizleridir. Siyatik fonksiyonel indeks De Medinacelli tarafından 1982 yılında tanımlanmış ve sonrasında çeşitli araştırmacılar tarafından modifiye edilmiştir. Burada elde edilen ayak izleri üzerinden çeşitli ölçümler yapılarak sinir fonksiyonel geri dönüşü hakkında bilgi edinilmeye çalışılır. Bu basit ve girişimsel olmayan teknik aynı hayvan üzerinde farklı zamanlarda tekrar edilebilirliği ve hem duyu hem de motor geri dönüşüye bağlı oluşan koordine bir hareketi değerlendirdiği için, sık kullanılan bir değerlendirme yöntemidir (123). SFİ ile elde edilen değerler tek başına motor, duyu ya da proprioseptif fonksiyonlardan ziyade, karmaşık bütünleşmiş fonksiyonun bir göstergesidir (159). Yürüyüş patternlerinde spesifik sinir hasarına bağlı bazı değişiklikler meydana gelir. Ayak izi uzunluğu (PL), adım genişliği (TS) ve adım orta genişliği (ITS) değerlendirilerek spesifik sinir hasarı hakkında kabaca fikir sahibi olunabilir. Örneğin siyatik sinir arazi ve posterior tibial sinir arazında PL uzarken, TS ve ITS daralır. Buna karşın peroneal sinir arazında PL kısalırken, yine TS ve ITS daralmış şekilde izlenir (160). Kanaya ve ark. (124), teorik nedenlerle sinir rejenerasyonunun en son basamağının adımlama olması ve yürümenin kortikal duyuşal geri dönüşlerle koordine edilen karmaşık bir motor ünite reinnervasyonu ile gerçekleşmesinden ötürü, sinir rejenerasyonunu değerlendirmede en iyi yöntemin SFİ olduğunu öne sürmektedirler. Bu çalışmada Bain ve ark.'nın (128) modifiye ettikleri SFİ formülü kullanılarak ölçümler yapılmıştır.

SFİ ölçümlerinin en büyük dezavantajı, ölçüm tekniği ve araştırmacının hassasiyetine göre değişkenlik gösterip, yanılma ya da yanlış ölçüm yapılma ihtimalinin yüksek olmasıdır (123). Hayvanların yürüyüş yolunda ayak izleri alınmadan önce belli bir süre eğitimden geçmeleri gerekir. Yine yanlış verilere neden

olabilecek bir diğ er sorun da, etkilenen ekstremitede geliş en istenmeyen kontraktürlerdir. Bu durumda kaslarda reinnervasyon gerçekleş se bile, eklemlerdeki hareket kaybı ve kontraktürler nedeniyle dü zğ ün bir adımlama görülemeyebilir (124). Ayrıca eklem kontraktürlerinin yanı sıra otokanibalizasyon, sü rtünme artefaktları, kuyruk ile izin kontaminasyonu da sağ lıklı ayak izlerinin elde edilmesini güç leştirebilmektedir (125, 136, 157, 158). Kontraktürleri engellemek için literatürde tanımlanmış çeş itli fizik tedavi yöntemleri mevcuttur. Aynı şekilde otokanibalizasyonu önlemek için de kötü tatlı maddelerin lokal kullanımı ve trisiklik antidepressan uygulamaları gibi çeş itli önlemlerle, bu sorunun engellenebileceğ i çeş itli çalış malarda gösterilmiştir (125, 126). Bu çalış mada hayvanların hiç birinde ayak izi ölçümüne engel oluşturacak bir eklem kontraktürü ile karşı laş ılmamış olup, otokanibalizasyonu engellemek için hayvanların deney yapılan ayaklarına günlük olarak acı tadı olan oje sürülerek, bu irritan madde ile otokanibalizasyon azaltılmaya çalış ılmış tır. Sekiz hayvanda değ iş ik derecelerde otokanibalizasyon izlendi ve bunlardan ayak izi alınamayacak derecede ciddi boyutlarda olan dört hayvan çalış ma dı ş ı bırakıldı.

Otokanibalizasyon insidansı sinir hasar tipi ile yakın iliş kili olup tam sinir kesilerinde daha fazla görülürken, ezilme tarzı yaralanmalarda daha az ve hafif düzeylerde (136). Hiperaleji ya da nöropatik ağ rı, sinir rejenerasyonu sırasında geliş en ve asıl nedeni bilinmeyen bir durumdur. Pek çok deneysel sinir yaralanma modelinde nöropatik ağ rı oluş umu göz lenmiştir ve muhtemel nedenin geniş sinirlerde hasar sonrası oluş an kollateral tomurcuklanma olduğ u düşünölmektedir (150). Hiperalejiden sorumlu olabileceğ i düşünölen bir diğ er neden ise, sinir ezilme alanında oluş an iskemidir. İskemiye bağ lı olarak sinirde ödem, endonöral sıvıda basınç artışı ve biyokimyasal bazı değ iş ikliklere neden olan fagositlerin bölgede toplanmasına bağ lı olarak hiperalejinin olabileceğ i öne sürölmüş tır (161). Shir ve ark. (131), sıç anlarda sıyatik sinir hasar sonrasında taktıl uyarılara ve sıcak temasa karşı oluş an hiperalejinin sıç anlarda genetik türler arasında farklılık gösterdiğ ini saptamış lardır. Hayvanlarda görölen otokanibalizasyondan de bu mekanizmaların sorumlu olduğunu ortaya koymuş lardır. Bu deneyde kullanılan sıç anlar orta düzeyde otokanibalizasyon beklenen Wistar cinsi sıç anlar olup, diğ i sıç anlarda otokanibalizasyon eğ ilimi daha az göröldüğ ü için tüm deneklerin diğ i olmaları tercih

edildi. Hayvanların az bir kısmında değişik derecelerde otokanibalizasyonlar alınan önlemlere karşı gözlemlendi, ancak hiçbir denekte hiperaljezi düşündürecek bir davranış değişikliği gözlenmedi. Tüm hayvanlarda sıcak plaka testi ile yapılan geri çekme refleksi değerlendirmelerinde, hayvanların hiçbirinde standart değer olan 3 saniyenin altında bir değer kaydedilmedi.

SFİ'in her bir grubun kendi içinde ardışık yapılan ölçümlerinin değerlendirmesinde, 1. grup olan sham grubunda haftalık alınan seri ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$). Diğer ezilme hasarı yapılmış olan üç grupta, sinir rejenerasyonunu destekler şekilde, her bir grubun kendi içinde, haftalık alınan seri ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$). Haftalara göre gruplar arasında yapılan karşılaştırmada, sham grubu beklenildiği gibi diğer 3 gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olup ($p < 0.001$), normal değerlere yakın değerler izlendi. TZP verilen 3. grup, diğer ezilme hasarı yapılmış olan 2. ve 4. gruplarla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi sonuçlar ve daha hızlı rejenerasyon olduğu saptandı. Bu fark özellikle 3. haftada oldukça belirgindi. Kontrol grubu olan 2. grup ve TFP verilmiş olan 4. grup arasında, 4. hafta kayıtları dışında istatistiksel fark yoktu. Bu bulgular TZP ile sinir rejenerasyonunun hızlandığına işaret etmektedir.

Ayak geri çekme refleksi (WRL), gerçek bir refleks olup spinal seviyede santral sinir sistemini içerir. Ağrılı bir uyarana karşı hayvanın arka ayağını geri çekerek yanıt vermesidir (162). Bu fleksiyon refleksinin oluşabilmesi için kalça, diz ve ayak bilek fleksör kaslarının kasılmaları gerekir. Geri çekme refleksinin latans, amplitüt ve süresi uyarının şiddeti ile ilişkilidir (163).

Yaralanma sonrası yaklaşık üçüncü haftada termal ağrılı uyarana karşı geri çekme refleksi görülmeye başlar ve dördüncü haftanın sonunda sıklıkla normale döner (126). Geri çekme refleksi değerlendirilirken dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta, ısı kaynağına ayağın bastırılmamasına dikkat etmektir. Aksi takdirde, basıya bağlı mekanoreseptörlerin uyarımı ile duyuşal geri dönüş tam olmadan da geri çekme refleksi görülebilir. Bu da test sonuçlarında yanlış değerlendirmelere neden olabilir (123, 126).

Hu ve ark.(130), safen sinir afferentlerinin stimülasyonunu engellemek için ayak lateral plantar tarafının stimülasyonunun tercih edilmesi gerektiğini öne

sürmüşlerdir. Genel kabul edilmiş bir kural olarak, femoral sinirin bir dalı olan safen sinir ayak medial kısımlarının innervasyonunu sağlar. Bu nedenle siyatik sinir innervasyon alanını değerlendirmek için topuk, lateral plantar bölge ve ayak parmakların dorsal yüzleri test için önerilen bölgelerdir (162, 163, 164). Bu çalışmada uygulanan sıcak plaka testinde, bu bilgiler ışığında sıcak yüzey deneklerin arka ayak lateral kısımlarına temas ettirilerek uygulanmış ve ayağın sıcak plaka üzerine bastırılarak istenmeyen mekanoreseptör uyarımından kaçınılmıştır.

Ayak geri çekme reflekslerinin değerlendirilmesinde, her grubun kendi içinde ardışık yapılan ölçümlerinde 1. grup olan sham grubu hariç, ezilme hasarı yapılan diğer 3 grupta ardışık ölçümlerde elde edilen düzelme değerleri, istatistiksel olarak her grupta anlamlı derecede farklı olarak saptandı ($p<0.001$). Birinci hafta sonunda yapılan ilk ölçümlerde, sham grubu dışında ezilme hasarı yapılan diğer üç grupta hiçbir denekte yanıt alınamadığı için 1. grup ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$). İkinci ölçümlerin yapıldığı 14. günden itibaren TZP uygulanmış olan 3. grupta, deneklerde geri çekme refleksinin geri dönmeye başlaması ile kontrol grubu olan 2. grup ve TFP uygulanan 4. gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede fark saptandı. Üçüncü hafta ölçümlerinde ise, tüm gruplarda değişik derecelerde geri çekme refleksinde geri dönüş olduğu gözlemlendi, ancak TZP uygulanmış olan 3. gruptaki süre, diğer ezilme hasarı yapılmış olan gruplardakine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısa olarak izlendi. Dördüncü hafta ölçümlerinde, ezilme hasarı uygulanmış olan 3 grupta da refleks sürelerinde belirgin kısalma olduğu izlenmekle beraber, normale en yakın değerler yine TZP verilmiş olan 3. grupta gözlemlendi. Bu bulgular TZP kullanımı ile daha erken dönemde etkin bir sinir rejenerasyonunun gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Elektrofizyolojik testler periferik sinir rejenerasyonunu değerlendirmede sıkça kullanılmırlar. Sinir liflerinin kas liflerini uyarmaları ile oluşan aksiyon potansiyellerinin, bir amplifikatör aracılığı ile büyütülerek incelenmesi esasına dayanır. Elde edilen aksiyon potansiyelleri bileşik kas aksiyon potansiyelleri olup, bunların üzerinden çeşitli parametreler ölçülerek değerlendirilmede kullanılabilir. Elektrofizyolojik testler, sinir onarım hattını geçen aksonlarla ilgili bilgi vermesine karşın, bu aksonların yeterli sayıda distal bağlantı yapıp yapamadıkları hakkında

bilgi veremeyebilir. Pik aksiyon potansiyel amplitüdü, myelinli aksonlarca oluşturulan elektrik akımını gösterir. Tüm sinir liflerindeki aktiviteyi göstermekte yetersiz kalır; en hızlı ve en çok myelinize olmuş olan sinir lifi popülasyonu hakkında bilgi verir. Yani bu parametre de total sinir fonksiyonunu göstermede yetersizdir (124). Varejao ve ark.'nın (126) belirttiklerine göre, Cragg ve Thomas isimli araştırmacıların 1964 yılında yapmış oldukları ezilme hasarı sonrası uzun dönem takipli çalışmalarında, rejenere olan liflerin elektrofizyolojik ölçümlerinin hiçbir zaman tam olarak normale dönemediğini ortaya koymuşlardır. Zaten elektrofizyolojik ölçümlerin total sinir fonksiyonunu ölçmekten ziyade, lif çapı ve myelinizasyon derecesi ile ilişkili olarak, en hızlı sinir liflerinin fonksiyonları hakkında bilgi verebildiği sonuçlar yorumlanırken akılda tutulması gereken bir noktadır.

Supramaksimal uyarım ile elde edilen bileşik kas aksiyon potansiyel eğrilerinde amplitüt olarak pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) ölçülür (165). Bu ölçüm ile uyarıya yanıt veren motor lif popülasyonu, bunların cevaplarının senkronizasyonu ve akson tarafından innerve olan motor ünitenin boyutu hakkında bilgi sahibi olunabilir. Aksonal rejenerasyon arttıkça ve remyelinizasyon ilerledikçe, daha fazla lifte oluşan değişim ile cevabın senkronizasyonu ve amplitüt artmaktadır. Tomurcuklanma sonucu rejenere olan aksonlar ile reinnerve olan motor ünite sayısı arttıkça, bileşik kas aksiyon potansiyeli amplitüdü de artar (135).

Rupp ve ark. (166), siyatik sinir çalışmalarında elektrofizyolojik kayıtların ideal olarak interosseöz kaslardan alınması gerektiğini öne sürmektedirler. Bunun nedeni, gastroknemius kasının büyük kaslar ile olan komşuluğu nedeniyle kayıtlarda yanılmalara neden olabilmesidir. Özellikle biceps femoris kası başta olmak üzere, semitendinosus ve semimembranosus gibi büyük kaslarda kayıt esnasında gelişen istenmeyen kontraksiyonlar, bileşik kas aksiyon potansiyel eğrilerinde daha büyük bir aksiyon potansiyeli oluşumuna neden olabilir. Kronik denerve gastroknemius kasında elektriksel aktivite, etraf denervasyondan etkilenmemiş olan büyük kasların kontraksiyonundan etkilenebilir ve bu kaslardan yayılan impuls ile direkt ya da indirekt olarak kasılabilir. Ayrıca siyatik sinir hasarlanmış olsa bile, çoğunlukla muskulokutan sinir sağlam kaldığı için, siyatik sinir rejenerasyonu yeterli düzeyde

olmasa da, gastroknemius kasından düzgün bir aksiyon potansiyel eğrisi elde edilebilir. İnterosseöz kaslarda ise böyle sorunlar yoktur (166). Buna karşın, interosseöz kasların perkutan origo ve insersiyoyu saptamak oldukça güç olduğu için, tüm sayılan dezavantajlarına karşın elektrofizyolojik ölçümler gastroknemius kasından yapılmıştır. Değerlendirmede ise bu dezavantajlar hatırdta tutulmuştur.

Bu çalışmada elde edilen bileşik kas aksiyon potansiyel eğrilerinden latans süresi, pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) ve maksimum pozitif pik (p-max) değerleri gruplar arasında ve her grupta sağlam taraf deney tarafı arasında karşılaştırıldı. Tüm deneklerde bakılan bu parametrelerde sağlam taraf ölçümlerde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmazken ($p>0.05$), deney tarafında fark mevcuttu ($p<0.001$). Sham grubu olan 1. grup ve TZP uygulanmış olan 3. grup deney taraflarındaki değerler diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı saptanırken ($p<0.001$), 2. ve 4. gruplar arasında fark yoktu ($p>0.05$). Her ne kadar TZP uygulanmış olan 3. gruba ait elektrofizyolojik kayıtlarda, diğer ezilme hasarı uygulanmış 2 gruptan daha yüksek sayısal değerler izlense de, sham grubuna göre belirgin bir aksiyon potansiyel eğrisi çok az denekte elde edilebildi. Bu da rejenerasyonun henüz tamamlanmadığına ve reinnerve olan motor son plakların yeterli sayıya ulaşmadığına işaret etmektedir. Buna karşın 2. ve 4. gruplarda deneklerin çoğunda fibriler dalgalar şeklinde izlenen kayıtlara kıyasla, TZP verilmiş olan 3. grupta aksiyon potansiyel eğrileri çok daha belirgin olarak izlendi ve bu da, bu grupta rejenerasyonun daha hızlı olduğuna işaret etmektedir.

Morfometrik ölçümler sıklıkla fonksiyonel geri dönüş ile korele olmamaktadır. Luis ve ark.'nın (123) yaptıkları çalışmada, ezilme tarzı siyatik sinir yaralanma modelinde, 12 haftalık takipten sonra fonksiyonel geri dönüş tama yakın olmasına karşın, alınan sinir biopsilerinde yapılan morfometrik ölçümler tatminkar olmamıştır ve sinir boyutlarının normal tarafa göre halen küçük olduğu gözlenmiştir.

Histomorfometrik incelemelerde sağlıklı verilere ulaşabilmek için örnekleme tekniği büyük önem taşır. Geuna ve arkadaşlarına göre histomorfometrik analizlerde altın kural tüm sinir liflerinin örnek içerisinde bulunması ve değerlendirilmede benzer fırsat eşitliğine sahip olmalarıdır (equal opportunity rule). Sinir lifleri genellikle kesit alanında heterojen bir dağılım gösterir, yani bir alanda oldukça yoğun bulunurlarken, başka bir alanda seyrek olarak izlenebilirler. Ek olarak, alanlar arasında aynı sinir

fasikülünde de değişken çaplarda lifler bulunabilmektedir. Sonuç olarak, histolojik olarak incelenen örnekleme alanına göre sonuçlar çok farklı bulunabilir. Bu nedenle histomorfometrik analiz yapılacak bölgeler ve her bir örnekleme alanı içerisinde bulunan sinir lifleri titizlikle seçilmelidir (167).

Akson apı sadece sinir maturasyonu hakkında bilgi verir, bu parametreye bakılarak sinirin fonksiyonu hakkında bilgi sahibi olmak mümkün olmaz. Sinir ezilme modelinde tüm liflerde yapısal olarak hasarlanma olamayabileceği, bazı liflerin sadece Sunderland tip 1 sinir hasarı ile yapısal bozulma olmadan, geçici bir fonksiyonel kayıp yaşıyabileceği akılda tutulmalıdır. Standartize klemp modellerinin kullanımı ile bu sorun bir miktar giderilebilmektedir (126).

Akson sayısı sadece kesit alanındaki total sayı hakkında bilgi verirken, total sinir fonksiyonunu göstermede yetersiz kalır. Çok sayıda ama hedef organa ulaşılamamış aksonların olabileceği hatırd a tutulmalıdır. Myelinizasyon derecesi ise yine akson maturitesi ile ilişkilidir. Aksonlar uç organlara ulaşmadan da myelinize olabilecekleri için bu parametre de fonksiyonu değerlendirmede yetersiz kalmaktadır. Sonuç olarak histomorfometrik parametreler rejenere olan aksonların sayısı ve kalitesi hakkında bilgi verirken, fonksiyonel geri dönüşü göstermede yetersiz kalmaktadırlar (124).

Bu çalışmada incelenen sinir kesitlerinde, hasar öncesine göre hasar sonrası bölgede tüm gruplarda lif çaplarında artış gözlenmiş olup, 1. grup olan sham grubu ve TZP uygulanan 3. grupta lif çapları birbirlerine oldukça yakın değerlerde saptanmıştır. Hasar ncesi ve sonrası lif çapları karşılaştırıldığında 1. grupta bir değişiklik gözlenmezken, diğer 3 grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede çaplar artmış olarak izlendi ($p < 0.05$). ap artışı 3. grup olan TZP verilen grupta daha az olarak izlenmesine karşın, diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü. ap artışı sinir liflerindeki dejenerasyona bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Burada TZP verilen grupta çap artışı diğer ezilme hasarı yapılmış olan diğer 2 gruba kıyasla daha az olarak gözlenmiştir. Bu da her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmese de, bu grupta rejenerasyonun daha kaliteli olduğuna işaret etmektedir. Hasar yapılan alanın distal kesitlerinde, 1. grup hariç sinirde ezilme tipi hasar oluşturulan diğer uç grupta dejenere lif yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu saptandı (< 0.001). TZP uygulanmış olan 3. grupta çap artışının

en az olması daha iyi rejenerasyona işaret etmesine karşın, dejenere lif yüzdelerinde gruplar arasında belirgin fark saptanmamıştır.

Schwann hücreleri sinir rejenerasyonunda anahtar rol oynayan hücrelerdir. Bu hücreler olmadan sinir rejenerasyonu mümkün olmaz. Hasar sonrası proliferen olan Schwann hücreleri, diferensiyasyon olarak bazal lamina üzerine dizilip Büngner bantlarını oluştururlar. Bu bantlar yeni büyüyen aksonlar için kılavuz tüp görevi görmektedir. Ayrıca bu hücreler, çeşitli nörotrofik faktörler de sekrete ederek rejenerasyona destek sağlarlar (8, 11). Bu çalışmada histolojik olarak bakılan bir diğer parametre de bu hücrelere ait çekirdeklerin sayısı ve dejenere olup olmadıklarıdır. Bu şekilde sinir rejenerasyon kalitesi hakkında fikir sahibi olmak amaçlanmıştır. Ezilme hasarı oluşturulan 3 grupta da, hasar sonrası bölgelerde Schwann hücre çekirdeklerinin sayısında bu hücrelerdeki proliferasyonu gösterir şekilde belirgin bir artış saptanmış olup, bu değerler birbirine oldukça yakındır. Ancak hasar öncesi bölgelere bakıldığında TZP uygulanmış olan 3. grupta çekirdek sayısı 1. grup olan sham grubundaki sayıya yakın bir değerdir ve diğer 2 gruptan daha fazla sayıda olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). Yine istatistiksel fark saptanmamış olmasına karşın, hasar sonrası bölgelerde dejenere çekirdek yüzdelerinde, 3. grupta daha az dejenere çekirdek olduğu izlenmiştir. Tüm bu bulgular, TZP uygulaması ile muhtemelen içerdiği trofik faktörlere bağlı olarak, özellikle hasar öncesi bölgelerde Schwann hücre ölümünü engellediği ve proliferasyonu destekleyerek sinir rejenerasyonuna katkı sağladığı söylenebilir.

Siyatik fonksiyonel geri dönüşü inceleyen pek çok çalışmada kullanılan parametreler arasında (fonksiyonel testler, elektrofizyolojik ve histomorfometrik incelemeler) belirgin bir korelasyon olmadığı saptanmıştır (132, 135, 136, 137, 165, 166). Sinir rejenerasyonunu değerlendirmede belirleyici olan, elektrofizyolojik ve histomorfometrik incelemelerde sıklıkla beklenen korelasyon saptanamamaktadır (158). Bu çalışmada da elde edilen SFİ ve ayak geri çekme reflekslerindeki anlamlı derecede düzelme, elektrofizyolojik ve histomorfometrik analizlerle yeterli derecede desteklenememiştir.

Farklı araştırmacılar farklı morfolojik parametreler ile SFİ arasında korelasyon saptamışlardır. Kanaya ve ark. (124) sinir rejenerasyon parametrelerini inceledikleri fonksiyonel, histomorfometrik ve elektrofizyolojik 11 parametre içinde

myelin kalınlığının akson çapına oranı ve sinir ileti hızı ile SFİ arasında pozitif bir korelasyon olduğunu saptamışlardır. Buna karşın Oliveira ve ark. (168) benzer bir korelasyonu sinir lifi dansitesi ve SFİ arasında saptamışlardır. Ayrıca Sergio ve ark. (136) da lif çapı, myelin kalınlığı ve akson çapı ile SFİ arasında, lif çapı ile iletim hızı arasında ve lif sayısı ile amplitüt arasında pozitif bir korelasyon olduğunu saptamışlardır. Wolthers ve ark. (135) ise SFİ ile amplitüt arasında bir pozitif korelasyon izlemişlerdir. Munro ve ark. (169), sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için kullanılan parametreler arasında bir korelasyon olup olmadığını saptamak için 16 parametreyi inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Bu parametrelerin ikisi yürüyüş yolu analizi, beşi elektrofizyolojik parametre ve dokuzu histomorfometrik parametredir. Sonuç olarak bu parametreler arasında herhangi bir korelasyon olmadığını saptamışlardır. Bu nedenle sinir çalışmalarında araştırmacıların aradığı sonuca yönelik testleri seçmesi önerilir. Örneğin amacı fonksiyonel geri dönüşü değerlendirmek ise yürüyüş yolu analizi ve SFİ ölçümü, sinir rejenerasyon derecesini saptamak ise elektrofizyolojik ya da histomorfometrik incelemeler kullanılması önerilir (169).

Bu çalışmada amaç, hem sinir iyileşme hızının hem de iyileşme kalitesinin değerlendirilmesi olduğu için, fonksiyonel ve elektrofizyolojik testlerin yanında histomorfometrik değerlendirme yapılması da gerekmiştir. Tüm veriler incelendiğinde TZP uygulanmış olan 3. grupta diğer ezilme hasarı yapılmış olan 2. ve 4. gruplara kıyasla daha erken dönemde SFİ bulgularında düzelme kaydedilmeye başlanmış olup, geri çekme reflekslerinin de hızla geri döndüğu gözlenmiştir. Ayrıca 4. hafta sonunda yapılan elektrofizyolojik kayıtlarda 1. gruba kıyasla 3 grupta da veriler yeterli rejenerasyonu göstermemekle birlikte, ezilme hasarı uygulanmış gruplar içerisinde en iyi elektriksel aktivite yine 3. grupta gözlenmiştir. Benzer şekilde, aksonal dizilimlerin daha düzgün ve rejenerasyonun da daha kaliteli olduğu histomorfometrik analizlerle de gözlenmiştir. Ancak fonksiyonel değerlerle kıyaslandığında elde edilen histomorfometrik bulgular beklenen düzeylerde izlenememiştir. Ayrıca bu çalışmada bu 3 grup parametreyi karşılaştırmak (fonksiyonel, elektrofizyolojik, histomorfometrik) ve korelasyon olup olmadığını değerlendirmek için ek istatistiksel incelemeler de yapılmamıştır.

Sonuç olarak, sinir rejenerasyonu üzerine etkileri olduğu bilinen çok sayıda büyüme faktörü mevcuttur. Değişik alanlarda etkinliği incelenmiş olan TZP'nin, sinir rejenerasyonunu üzerine olan etkilerini gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, ezilme tipi sinir yaralanmaları sonrasında TZP'nin tek doz kullanımı ile sinir rejenerasyonunu olumlu yönde desteklediğini ve rejenerasyonu hızlandırarak, daha kaliteli iyileşme sağladığını göstermektedir. Rekombinan tekniklerle hazırlanan büyüme faktörlerine kıyasla daha ucuz olması, standart hücre ayırıcı sistemlerle daha basit ve hızlı bir şekilde elde edilebilmesi ve otolog bir ürün olması TZP'nin avantajları arasında sayılabilir. TZP'nin etkisi, içerdiği büyüme faktörlerinin birbirleri ile ilişkisi ve muhtemelen sinerjik etkileri ile ortaya çıkmaktadır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, sıçanlarda ezilme tarzı sinir yaralanma modelinde, hasar alanına tek doz TZP uygulaması sonrasında, sinir rejenerasyonu değerlendirildi. Sinir rejenerasyonu, fonksiyonel olarak (SFİ, WRL), elektrofizyolojik olarak ve histomorfometrik olarak test edildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri sonucunda, TZP uygulanmış olan 3. grupta özellikle SFİ ve WRL ölçümlerinde, kontrol ve TFP uygulanmış gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha hızlı fonksiyonel geri dönüş saptandı ($p<0.001$). Fonksiyonel testlerle gözlemlenen bu düzelmenin, elektrofizyolojik ve histomorfometrik bulgularla da uyum içinde olduğu gözlemlendi.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, ezilme tipi sinir yaralanmaları sonrasında tek doz TZP kullanımının sinir rejenerasyonunu olumlu yönde desteklediği ve rejenerasyonu hızlandırarak, daha kaliteli iyileşme sağladığı göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Shenaq SM, Kim JYS. Repair and grafting of peripheral nevre. In: Mathes SJ, editor. Plastic surgery. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. Volume 1, p: 719–43
2. Winograd JM, Mackinnon SE. Peripheral nevre injuries: Repair and reconstruction. In: Mathes SJ, editor. Plastic surgery. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. Volume 7, p: 47–514
3. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: A brief review. *Neurosurg Focus*. 2004;15:16(5) E1.
4. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand*. 1987;58(2):145–69.
5. Maggi SP, Lowe JB 3rd, Mackinnon SE. Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg*. 2003;30(2):109–26
6. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg [Am]*. 2000;25(3):391–414.
7. Hall SM. Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1989;15(6):513–29.
8. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 1990;13:43–60.
9. Dahlin LB. The biology of nevre injury and repair. *J Am Surg Hand*. 2004;4(3):143–55
10. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 1999;194(Pt 1):1–14.
11. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998;18(7):397–405.
12. Jubran M, Widenfalk J. Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors. *Exp Neurol*. 2003;181(2):204–12.

13. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: Biology and new technology. *J Craniofac Surg.* 2005;16(6):1043–54.
14. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: A review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(6):147e-159e.
15. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225–8.
16. Rydel RE, Greene LA. Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells. *J Neurosci.* 1987;7(11):3639–53.
17. Davis JB, Stroobant P. Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol.* 1990;110(4):1353–60
18. Near SL, Whalen LR, Miller JA, Ishii DN. Insulin-like growth factor II stimulates motor nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):11716–20
19. Ridley AJ, Davis JB, Stroobant P, Land H. Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol.* 1989;109(6 Pt 2):3419–24
20. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci.* 1999;19(14):5731–40.
21. Terzis JK, Smith KL. Repair and grafting of the peripheral nerve. McCarthy JG, May JW, Litter WJ, editors. *Plastic surgery.* Philadelphia: WB Saunders; 1990. Volume 1, p: 630–97
22. Shier D, Butler J, Lewis R. *Hole's Essentials of human anatomy and physiology.* 9th ed. New York: McGraw Hill; 2006. p: 202–42
23. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000;61(3):267–304.

24. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2001. p: 183–217
25. Hirakawa H, Okajima S, Nagaoka T, Takamatsu T, Oyamada M. Loss and recovery of the blood-nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins. *Exp Cell Res.* 2003;284(2):196–210.
26. Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve.* 1990;13(9):771–84.
27. Rempel D, Dahlin L, Lundborg G. Pathophysiology of nerve compression syndromes: Response of peripheral nerves to loading. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81(11):1600–10.
28. Lundborg G. The nerve trunk. *Nerve injury and repair.* New York: Churchill Livingstone, 1988. p:32–63
29. Lundborg G. Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. *J Bone Joint Surg Am.* 1975;57(7):938–48.
30. Dvali L, Mackinnon S. Peripheral nerve repair and transfers. In McCarthy JG, Galiano RD, Boutros SG, editors. *Current therapy in plastic surgery.* Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p: 568-73.
31. Brushart TM. Nerve repair and grafting. In. Green DP, Hotchkiss RN, Pederson WC, editors. *Green's operative hand surgery.* 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1999. Volume 2; p: 1381- 403.
32. Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1990;13(9):785–800.
33. Brandt KE, Mackinnon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM, editors. *Grabb and Smith's plastic surgery.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p: 79-90.
34. Berg DK. New neuronal growth factors. *Annu Rev Neurosci.* 1984;7: 149–70.

35. Verge VM, Riopelle RJ, Richardson PM. Nerve growth factor receptors on normal and injured sensory neurons. *J Neurosci*. 1989;9(3):914–22.
36. Renno WM, Saleh F, Klepacek I, Al-Awadi F. Talin immunogold density increases in sciatic nerve of diabetic rats after nerve growth factor treatment. *Medicina (Kaunas)*. 2006;42(2):147–63.
37. Zhuk ON, Kalyunov VN. Effect of nerve growth factor on the regeneration of fibers in the rat sciatic nerve. *Neurosci Behav Physiol*. 1997;27(5):541–4
38. Lee AC, Yu VM, Lowe JB 3rd, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2003;184(1):295–303.
39. Whitworth IH, Brown RA, Doré CJ, Anand P, Green CJ, Terenghi G. Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. *J Hand Surg [Br]*. 1996;21(4):514–22.
40. Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Local administration of neurotrophic growth factor in subcutaneous silicon chambers enhances the regeneration of the sensory component of the rat sciatic nerve. *Microsurgery*. 1999;19(6):275–80
41. Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Regeneration of the motor component of the rat sciatic nerve with local administration of neurotrophic growth factor in silicone chambers. *J Reconstr Microsurg*. 1999;15(3):207–13
42. Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: An experimental study. *Microsurgery*. 2004;24(5):408–15
43. Menderes A, Yılmaz M, Vayvada H, Özer E, Barutçu A. Effects of nerve growth factor on the neurotization of denervated muscles. *Ann Plast Surg*. 2002;48(4):415–22.
44. Gold BG, Mobley WC, Matheson SF. Regulation of axonal caliber, neurofilament content, and nuclear localization in mature sensory neurons by nerve growth factor. *J Neurosci*. 1991;11(4):943–55

45. Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg [Br]*. 1998;23(4):433–7.
46. Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg*. 2003;99(3):555–65.
47. Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol*. 1992;119(1):45–54
48. Novikov L, Novikova L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience*. 1997;79(3):765–74.
49. Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci*. 2000;12(12):4171–80.
50. Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci*. 2002;15(4):613–26.
51. Yin Q, Kemp GJ, Yu LG, Wagstaff SC, Frostick SP. Neurotrophin-4 delivered by fibrin glue promotes peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 2001;24(3):345–51.
52. McCallister WV, Tang P, Smith J, Trumble T. Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in an end-to-side model. *J Hand Surg [Am]*. 2001;26(3):478–88.
53. Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M, Austin L. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*. 1997;20(7):815–22
54. Zang DW, Cheema SS. Leukemia inhibitory factor promotes recovery of locomotor function following spinal cord injury in the mouse. *J Neurotrauma* 2003;20(11):1215–22

55. Stenberg PE, Hill RJ. Platelets and megakaryocytes. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors. *Wintrobe's clinical hematology*. 10th ed. Egypt, 1999. Volume 1, p: 615–60
56. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(4):489–96.
57. Haynesworth S. Platelet-rich plasma stimulates stem cell chemotaxis, proliferation and potentiates osteogenic differentiation. *The Spine Journal*. 2006;2(5):68-72
58. Woodell-May JE, Ridderman DN, Swift MJ, Higgins J. Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting. *J Craniofac Surg*. 2005;16(5):749–56, discussion 757–9.
59. Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, Höcker P, Körmöczki GF, Buchta C. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: A comparison of four different systems. *Vox Sang*. 2006;91(2):135–9.
60. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55(11):1294–9.
61. Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Thorwarth M, Wiltfang J, Schlegel KA. Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. An explorative study. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(3):312–20.
62. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Jul;14(4):529–35.
63. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*. 2006;24(5):227–34.

64. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: Preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(6):630–5.
65. Della Valle A, Sammartino G, Marenzi G, Tia M, Espedito di Lauro A, Ferrari F, Lo Muzio L. Prevention of postoperative bleeding in anticoagulated patients undergoing oral surgery: Use of platelet-rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(11):1275–8.
66. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2002;18(1):27–33.
67. Welsh WJ. Autologous platelet gel-Clinical function and usage in plastic surgery. *Cosmetic Dermatol.* 2000;7(6):13–19
68. Jackson RF. Using platelet-rich plasma to promote healing and prevent seroma formation in abdominoplasty procedures. *Am J Cosmetic Surg.* 2003;20(4):185–94
69. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(1):229–37.
70. Bose B, Balzarini MA. Bone graft gel: Autologous growth factors used with autograft bone for lumbar spine fusions. *Adv Ther.* 2002;19(4):170–5.
71. Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone.* 1999;25(2 Suppl):47S-50S.
72. DelRossi AJ, Cernaianu AC, Vertrees RA, Wacker CJ, Fuller SJ, Cilley JH, Baldino WA. Platelet-rich plasma reduces postoperative blood loss after cardiopulmonary bypass. *J Thorac and Cardiovasc Surg,* 1990;100: 281–286
73. Carter CA, Jolly DG, Worden CE Sr, Hendren DG, Kane CJ. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol.* 2003;74(3):244–55.
74. Henderson JL, Cupp CL, Ross EV, Shick PC, Keefe MA, Wester DC, Hannon T, McConnell D. The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear Nose Throat J.* 2003;82(8):598–602.

75. Dugrillon A, Klüter H. Topical application of platelets for improved wound healing. *Blood Therapies Med.* 2002; 3(1):21–26
76. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(6):1502–8
77. Kimura A, Ogata H, Yazawa M, Watanabe N, Mori T, Nakajima T. The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats. *J Dermatol Sci.* 2005;40(3):205–8.
78. Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M, Carabelli A. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci.* 2004;30(2):145–51.
79. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.* 2004;75(1):93–9.
80. Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byrne PJ. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope.* 2007;117(1):157–65
81. Sarıgüney Y. Periferik sinir yaralanmalarının onarımında trombosit zengin plazmanın sinir rejenerasyonu üzerine etkisi, Uzmanlık tezi, Ankara, 2006.
82. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1283–316.
83. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, Abdullah KM. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc).* 2003;39(10):787–800.
84. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol.* 1989;109(1):429–40.
85. Rudkin GH, Miller TA. Growth factors in surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1996;97(2):469–76.

86. Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma*. 1996;41(1):159–67.
87. Chan RK, Liu PH, Pietramaggiore G, Ibrahim SI, Hechtman HB, Orgill DP. Effect of recombinant platelet-derived growth factor (Regranex) on wound closure in genetically diabetic mice. *J Burn Care Res*. 2006;27(2):202–5.
88. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care*. 2004;17(1):24–35.
89. Brown DM, Hong SP, Farrell CL, Pierce GF, Khouri RK. Platelet-derived growth factor BB induces functional vascular anastomoses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(13):5920–4.
90. Oya T, Zhao YL, Takagawa K, Kawaguchi M, Shirakawa K, Yamauchi T, Sasahara M. Platelet-derived growth factor-b expression induced after rat peripheral nerve injuries. *Glia*. 2002;38(4):303–12.
91. Sasahara M, Fries JW, Raines EW, Gown AM, Westrum LE, Frosch MP, Bonthron DT, Ross R, Collins T. PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. *Cell*. 1991;64(1):217–27.
92. Ohno M, Sasahara M, Narumiya S, Tanaka N, Yamano T, Shimada M, Hazama F. Expression of platelet-derived growth factor B-chain and beta-receptor in hypoxic/ischemic encephalopathy of neonatal rats. *Neuroscience*. 1999;90(2):643–51
93. Allamargot C, Pouplard-Barthelaix A, Fressinaud C. A single intracerebral microinjection of platelet-derived growth factor (PDGF) accelerates the rate of remyelination in vivo. *Brain Res*. 2001;918(1–2):28–39
94. Smiths A, Kato M, Westermark B, Nistér M, Heldin CH, Funa K. Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF): Rat neuronal cells possess functional PDGF beta-type receptors and respond to PDGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(18):8159–63.

95. Iihara K, Hashimoto N, Tsukahara T, Sakata M, Yanamoto H and Taniguchi T. Platelet-derived growth factor-BB, but not -AA, prevents delayed neuronal death after forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:1097–106
96. Lobsiger CS, Schweitzer B, Taylor V, Suter U. Platelet-derived growth factor-BB supports the survival of cultured rat Schwann cell precursors in synergy with neurotrophin-3. *Glia.* 2000;30(3):290–300.
97. Eccleston PA, Funa K, Heldin CH. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF alpha- and beta-receptors in the peripheral nervous system: an analysis of sciatic nerve and dorsal root ganglia. *Dev Biol.* 1993;155(2):459–70.
98. Carter CA, Jolly DG, Worden CE Sr, Hendren DG, Kane CJ. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol.* 2003;74(3):244–55
99. Sulaiman OA, Gordon T. Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. *Glia.* 2002;37(3):206–18
100. Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg.* 1999;134(2):200–5
101. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4–25.
102. Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: A critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2004;113(1):14–8.
103. Hobson MI, Green CJ, Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat.* 2000;197(4):591–605.
104. Engele J, Bohn MC. The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia. *J Neurosci.* 1991;11(10):3070–8. Erratum in: *J Neurosci* 1992;12(3):685.

105. Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J, Madison R. Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83(6):1013–9
106. Fujimoto E, Mizoguchi A, Hanada K, Yajima M, Ide C. Basic fibroblast growth factor promotes extension of regenerating axons of peripheral nerve. In vivo experiments using a Schwann cell basal lamina tube model. *J Neurocytol.* 1997;26(8):511–28.
107. Aebischer P, Salessiotis AN, Winn SR. Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps. *J Neurosci Res.* 1989;23(3):282–9.
108. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(21):7696–700.
109. Lutz BS, Wei FC, Ma SF, Chuang DC. Effects of insulin-like growth factor-1 in motor nerve regeneration after nerve transection and repair vs. nerve crushing injury in the rat. *Acta Neurochir (Wien).* 1999;141(10):1101–6.
110. Sjalberg J, Kanje M. Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1989;485(1):102–8.
111. Kanje M, Skottner A, Sjalberg J, Lundborg G. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1989;486(2):396–8.
112. Pu SF, Zhuang HX, Marsh DJ, Ishii DN. Insulin-like growth factor-II increases and IGF is required for postnatal rat spinal motorneuron survival following sciatic nerve axotomy. *J Neurosci Res.* 1999;55(1):9–16.
113. Şimşek BM. Farklı formlardaki epidermal büyüme faktörü (EGF)'nün yara iyileşmesi üzerine etkisinin histopatolojik olarak araştırılması. Doktora tezi, Ankara, 1998

114. Wildering WC, Hermann PM, Bulloch AG. Lymnaea epidermal growth factor promotes axonal regeneration in CNS organ culture. *J Neurosci.* 2001;21(23):9345–54.
115. Dubuisson AS, Beuermann RW, Kline DG. Sciatic nerve regeneration across gaps within collagen chambers: The influence of epidermal growth factor. *J Reconstr Microsurg.* 1993;9(5):341–6
116. Welch JA, Kraus KH, Wells MR, Blunt DG, Weremowitz J. Effect of combined administration of insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor on the regeneration of transected and anastomosed sciatic nerve in rats. *Am J Vet Res.* 1997;58(9):1033–7.
117. Oudega M, Xu XM, Guénard V, Kleitman N, Bunge MB. A combination of insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor enhances myelination but diminishes axonal regeneration into Schwann cell grafts in the adult rat spinal cord. *Glia.* 1997;19(3):247–58.
118. Wells MR, Kraus K, Batter DK, Blunt DG, Weremowitz J, Lynch SE, Antoniades HN, Hansson HA. Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: A comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. *Exp Neurol.* 1997;146(2):395–402
119. Meier C, Parmantier E, Brennan A, Mirsky R, Jessen KR. Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci.* 1999;19(10):3847–59.
120. Özgenel GY. Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery.* 2003;23(6):575–81.
121. Özgenel GY, Filiz G. Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *J Neurosurg.* 2003;98(2):371–7.
122. Bayramiçli M. Deneysel mikrocerrahi. Temel araştırma, doku ve organ nakil modelleri. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ. 2005, p: 342–43

123. Luís AL, Amado S, Geuna S, Rodrigues JM, Simões MJ, Santos JD, Fregnan F, Raimondo S, Veloso AP, Ferreira AJ, Armada-da-Silva PA, Varejão AS, Maurício AC. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurosci Methods*. 2007;163(1):92–104.
124. Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98(7):1264–71, discussion 1272–4.
125. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: Walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001;108(1):1–9.
126. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*. 2004;21(11):1652–70.
127. Ozmen S, Ayhan S, Latifoğlu O, Siemionow M. Stamp and paper method: a superior technique for the walking track analysis. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(5):1760–1.
128. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989;83(1):129–38.
129. Masters DB, Berde CB, Dutta SK, Griggs CT, Hu D, Kupsky W, Langer R. Prolonged regional nerve blockade by controlled release of local anesthetic from a biodegradable polymer matrix. *Anesthesiology*. 1993;79(2):340–6.
130. Hu D, Hu R, Berde CB. Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade. *Anesthesiology*. 1997;86(4):957–65.
131. Shir Y, Zeltser R, Vatine JJ, Carmi G, Belfer I, Zangen A, Overstreet D, Raber P, Seltzer Z. Correlation of intact sensibility and neuropathic pain-related behaviors in eight inbred and outbred rat strains and selection lines. *Pain*. 2001;90(1–2):75–82.

132. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Filipe VM, Gabriel RC, Ferreira AJ, Geuna S, Winter DA. Ankle kinematics to evaluate functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve*. 2003;27(6):706–14.
133. Varejão AS, Cabrita AM, Geuna S, Melo-Pinto P, Filipe VM, Gramsbergen A, Meek MF. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. *Exp Neurol*. 2003;183(2):695–9
134. Varejão AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res*. 2004;26(2):186–94.
135. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalbruch H, Krarup C. Comparative electrophysiological, functional and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005;25(6):508–19.
136. Martins RS, Siqueira MG, da Silva CF, Plese JP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006;64(3B):750–6.
137. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: Walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*. 2000;96(2):89–96.
138. Hadlock TA, Heaton J, Cheney M, Mackinnon SE. Functional recovery after facial and sciatic nerve crush injury in the rat. *Arch Facial Plast Surg*. 2005;7(1):17–20
139. Vogelaar CF, Vrinten DH, Hoekman MF, Brakkee JH, Burbach JP, Hamers FP. Sciatic nerve regeneration in mice and rats: Recovery of sensory innervation is followed by a slowly retreating neuropathic pain-like syndrome. *Brain Res*. 2004;1027(1–2):67–72.
140. Özgenel GY, Filiz G. Combined application of human amniotic membrane wrapping and hyaluronic acid injection in epineurectomized rat sciatic nerve. *J Reconstr Microsurg*. 2004;20(2):153–7.

141. Wang KK, Nemeth IR, Seckel BR, Chakalis-Haley DP, Swann DA, Kuo JW, Bryan DJ, Cetrulo CL Jr. Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery*. 1998;18(4):270–5.
142. Voinesco F, Glauser L, Kraftsik R, Barakat-Walter I. Local administration of thyroid hormones in silicone chamber increases regeneration of rat transected sciatic nerve. *Exp Neurol*. 1998;150(1):69–81
143. Galloway EB 3rd, Jensen RL, Dailey AT, Thompson BG, Shelton C. Role of topical steroids in reducing dysfunction after nerve injury. *Laryngoscope*. 2000;110(11):1907–10.
144. Lee M, Doolabh VB, Mackinnon SE, Jost S. FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve*. 2000;23(4):633–40
145. Cruz NI, Debs N, Fiol RE. Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs. *Plast Reconstr Surg*. 1986;78(3):369–73.
146. Narakas A. The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *Orthop Clin North Am*. 1988;19(1):187–99.
147. Palazzi S, Vila-Torres J, Lorenzo JC. Fibrin glue is a sealant and not a nerve barrier. *J Reconstr Microsurg*. 1995;11(2):135–9.
148. Smahel J, Meyer VE, Bachem U. Glueing of peripheral nerves with fibrin: Experimental studies. *J Reconstr Microsurg*. 1987;3(3):211–20
149. Subbanna PK, Prasanna CG, Gunale BK, Tyagi MG. Acetyl salicylic acid augments functional recovery following sciatic nerve crush in mice. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2007;4(2):3.
150. Kurtoğlu Z, Öztürk AH, Bağdatoğlu C, Polat G, Aktekin M, Uzmansel D, Çamdeviren H, Bağdatoğlu O, Sargon M. Effects of trapidil after crush injury in peripheral nerve. *Acta Med Okayama*. 2005;59(2):37–44.
151. Kurtoğlu Z, Öztürk AH, Bağdatoğlu C, Turaç A, Çamdeviren H, Uzmansel C, Aktekin M. Effect of trapidil on sciatic nerve with crush injury: a light microscopic study. *Neuroanatomy*. 2004; 3(1): 54–58.

152. Haapaniemi T, Nylander G, Kanje M, Dahlin L. Hyperbaric oxygen treatment enhances regeneration of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol*. 1998;149(2):433–8
153. Menovsky T, Beek JF. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological, and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg*. 2001;95(4):694–9
154. Abrams M, Widenfalk J. Emerging strategies to promote improved functional outcome after peripheral nerve injury. *Restor Neurol Neurosci*. 2005;23(5–6):367–82.
155. Pu LL, Syed SA, Reid M, Patwa H, Goldstein JM, Forman DL, Thomson JG. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104(5):1379–85.
156. Nichols CM, Myckatyn TM, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: A comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res*. 2005;163(2):143–58.
157. Tetik C, Erol B, Çabukoğlu C, Ünsal M. Comparison of the functional evaluation methods in rat sciatic nerve model by a new system. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2000 34: 523–7
158. Varejão AS, Cabrita AM, Patrício JA, Bulas-Cruz J, Gabriel RC, Melo-Pinto P, Couto PA, Meek MF. Functional assessment of peripheral nerve recovery in the rat: Gait kinematics. *Microsurgery*. 2001;21(8):383–8.
159. Koka R, Hadlock TA. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. *Exp Neurol*. 2001;168(1):192–5
160. Inserra MM, Bloch DA, Terris DJ. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery*. 1998;18(2):119–24.
161. Myers RR, Yamamoto T, Yaksh TL, Powell HC. The role of focal nerve ischemia and Wallerian degeneration in peripheral nerve injury producing hyperesthesia. *Anesthesiology*. 1993;78(2):308–16.
162. Rupp A, Dornseifer U, Rodenacker K, Fichter A, Jütting U, Gais P, Papadopoulos N, Matiasek K. Temporal progression and extent of the return of

- sensation in the foot provided by the saphenous nerve after sciatic nerve transection and repair in the rat - implications for nociceptive assessments. *Somatosens Mot Res.* 2007;24(1–2):1–13.
163. Thalhammer JG, Vladimirova M, Bershsky B, Strichartz GR. Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine. *Anesthesiology.* 1995;82(4):1013–25.
164. Puigdellívol-Sánchez A, Prats-Galino A, Molander C. On regenerative and collateral sprouting to hind limb digits after sciatic nerve injury in the rat. *Restor Neurol Neurosci.* 2005;23(2):97–107.
165. Chung MS, Baek GH, Oh JH, Lee YH, Bin SW, Gong HS. The effect of muscle length and excursion on muscle contracture after tendon injury: A study in rabbit soleus muscles. *Injury.* 2007;38(10):1139–45.
166. Rupp A, Dornseifer U, Fischer A, Schmahl W, Rodenacker K, Jütting U, Gais P, Biemer E, Papadopoulos N, Matiassek K. Electrophysiologic assessment of sciatic nerve regeneration in the rat: Surrounding limb muscles feature strongly in recordings from the gastrocnemius muscle. *J Neurosci Methods.* 2007;166(2):266–77.
167. Geuna S, Gigo-Benato D, Rodrigues Ade C. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. *Microsurgery.* 2004;24(1):72–6.
168. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: Experimental study. *J Reconstr Microsurg.* 2001;17(1):69–75.
169. Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1998;21(8):1095–7