



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA PERİFERİK SİNİR REJENERASYONUNDA
ALLANTOİNİN AKUT ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burcu DELİBAŞ

**Samsun
Aralık-2016**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA PERİFERİK SİNİR REJENERASYONUNDA
ALLANTOİNİN AKUT ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burcu DELİBAŞ

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER

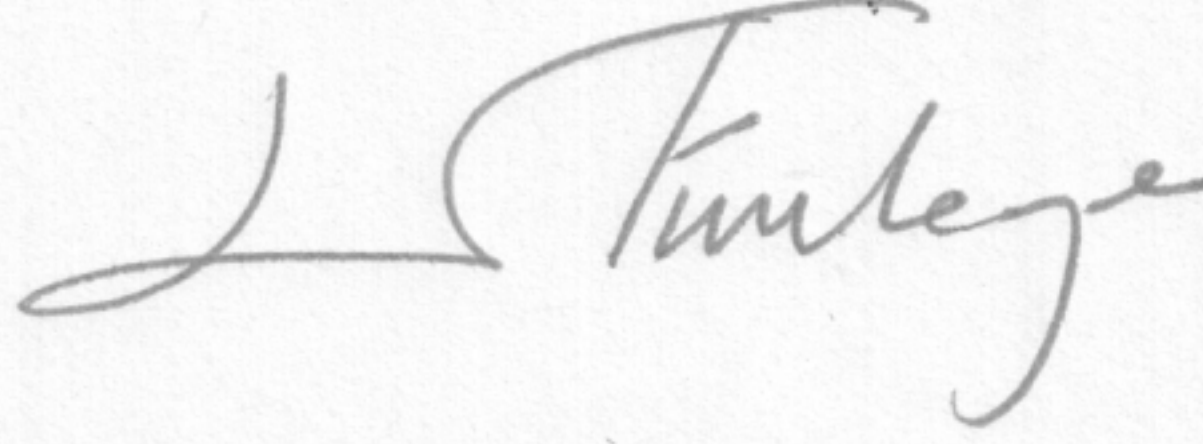
Samsun

Aralık-2016

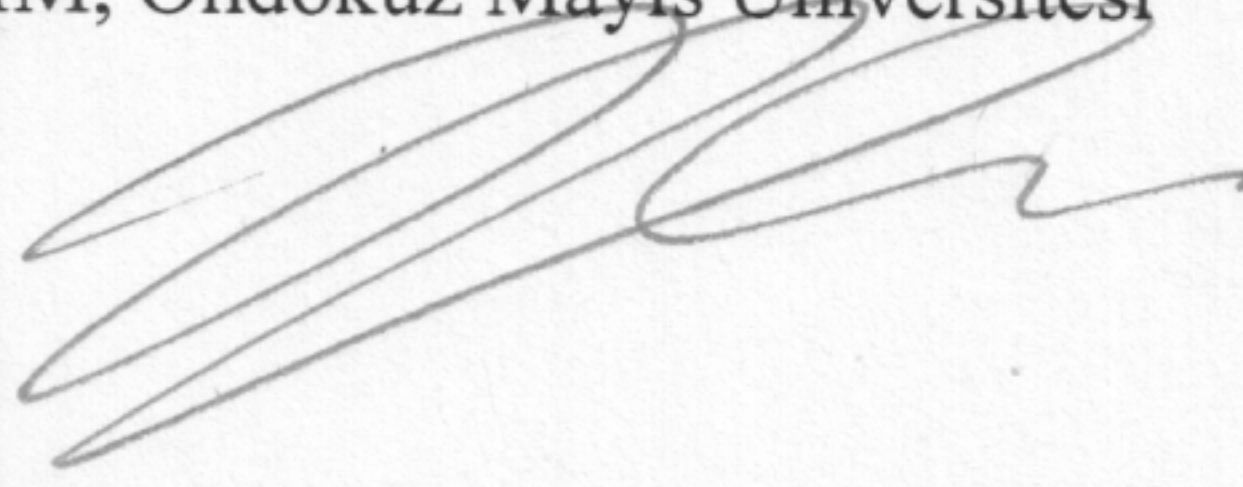
T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Burcu DELİBAŞ tarafından Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER danışmanlığında hazırlanan “Ratlarda Periferik Sinir Rejenerasyonunda Allantoinin Akut Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 23 / 12 / 2016 tarihinde yapılan sınav ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

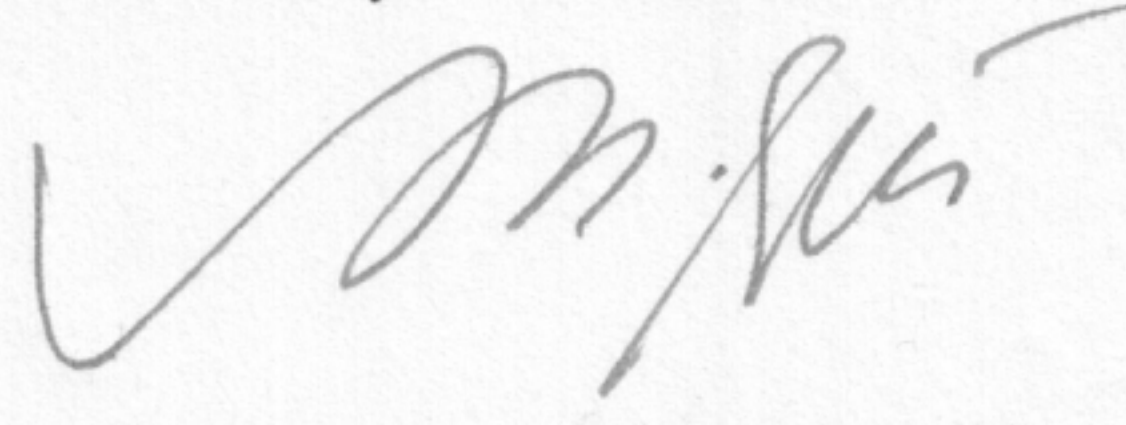
Başkan : Doç. Dr. Levent TÜMKAYA, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Aydın HİM, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca beni her konuda destekleyen, sorularına büyük bir sabır ve içtenlikle cevap veren, tecrübelerini benden esirgemeyen tez danışmanım ve hocam Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER'e,

Disiplinli çalışmanın önemini kendisinden tekrar öğrendiğim, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Başkanı Sayın Prof. Dr. Süleyman KAPLAN'a,

Tez dönemim boyunca ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan, birbirimizden saatlerimizi ve sevgimizi esirgemediğimiz, her konuda güvendiğim can arkadaşlarım Arş. Görv. Sümeyye GÜMÜŞ ve Arş. Görv. Adem KOCAMAN'a, bilgilerini ve tecrübelerini paylaşmakta tereddüt etmeyen, işine olan sevgisini örnek aldığım çok sevdiğim arkadaşım Arş. Gör. Gamze ALTUN'a, yardımlarını esirgemeyen, hep sevecen olan arkadaşım Arş. Gör. Ömür DENİZ'e, tez resimlerimde emeği geçen arkadaşım Arş. Gör. Mert NAHİR'e ve ismini yazamadığım aynı mesaiyi paylaştığım bütün arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Kendi ayaklarının üzerinde durabilen, özgür bir birey olarak yetişmemi sağlayan babam Arslan DELİBAŞ, annem Mahbube DELİBAŞ ve dedem Yusuf DELİBAŞ'a; varlığıyla beni mutlu eden her zaman yanında olacağım biricik kardeşim Yusuf DELİBAŞ'a çok çok teşekkür ederim.

Bu tez, hayatıma değer katan tüm insanlara ve bugünlere gelmemde emeği geçen tüm hocalarıma atfedilmiştir.

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından PYO.TIP.1901.15.012 nolu proje olarak desteklenmiştir.

ÖZET

RATLARDA PERİFERİK SİNİR REJENERASYONUNDA ALLANTOİNİN AKUT ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Periferik sinir hasarı sonrası; hasarın distal kısmında, akson ve miyelin dejenerasyonunun yanı sıra başta Schwann hücrelerinde olmak üzere hücre sayısında keskin bir artış gözlemlenmektedir. Çalışmada hasar alanında gerçekleşen bu reaksiyonlar üzerinde, pürin katabolizmasında görev alan ve hücre proliferasyonunda artış sağlayan allantoin maddesinin etkisi test edilmiştir. Siyatik sinir hasarı oluşturulan ratlara 30 gün boyunca intraperitoneal (i.p.) olarak allantoin verilmiştir ve oluşan periferik sinir modelindeki miyelin kılıf kalınlığına, akson çapına, sinirde meydana gelen mitotik faaliyetlere, kaslardaki fonksiyonel iyileşmelere ve sinirdeki rejenerasyon hızına olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Deney hayvanlarının sağ siyatik sinirleri görünür hale getirildikten sonra pens yardımıyla 50 Newton'luk bir kuvvet ile 5 saniye boyunca basınç uygulandı ve böylelikle deneysel siyatik sinir hasar modeli oluşturuldu. Deney grubuna 30 gün boyunca her gün düzenli olarak aynı saatlerde allantoin (10 mg/kg) i.p. olarak verildi. Hayvanlar 30 günün sonunda Elektromiyografi (EMG) ve Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFİ) tetkiklerinden sonra sakrifiye edildi. Testler sonucu elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Stereolojik değerlendirmelere göre; hasar sonrası allantoin verilmiş grup ve sadece hasar oluşturulmuş grup arasında; miyelinli akson sayısı, miyelin kılıf kalınlığı, akson çapı, miyelin kılıf kalınlığı/akson çapı parametreleri bakımından herhangi bir fark gözlemlenmezken, amplitütte anlamlı olarak artışa neden olmuştur. Buna paralel olarak SFİ testinde de allantoinin iyileştirici etkisi gözlemlenmiştir.

Sonuç: Allantoinin i.p. olarak uygulanması morfolojik olarak bir etki göstermezken fonksiyonel olarak pozitif etki göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Allantoin; Nöroprotektif; Periferik Sinir Rejenerasyonu; Rat; Stereoloji

Burcu DELİBAŞ, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Aralık-2016

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ALLANTOIN'S EFFECTS ON THE PERIPHERAL NERVE REGENERATION IN RATS

Aim: Following the peripheral nerve injury, in addition to the degeneration of axons and myelin, it is observed a sharp increase in the number of cells, especially on Schwann cells in the distal part of injury. In this study, the effect of allantoin, which has a role on purine catabolism and increase the cell proliferation was investigated on the reactions occurring in the lesion area. Throughout 30 days, allantoin was intraperitoneally (i.p.) given to the rats with sciatic nerve lesion after that myelin sheath thickness, axon diameter, mitotic activity, and functional improvement in muscles in this peripheral nerve degeneration model was investigated.

Material and Method: After the right sciatic nerve of the experimental animal models was made visible, with the help of pliers, pressure was performed with a force of 50 Newton for 5 seconds and as a result, experimental sciatic nerve injury model was formed. Allantoin was administered intraperitoneally (10 mg/kg) to the test groups for 30 days, every day on the same hours on a regular basis. Animals were sacrificed at the end of 30 days after the Electromyography (EMG) and Sciatic Function Index (SFI) tests. The results obtained from the tests, were analyzed statistically.

Results: According to stereological evaluations; there was not observed any difference between after-injury allantoin given group and non-given group in terms of myelinated axon number, myelin thickness, axon diameter and myelin thickness/axon diameter parameters, moreover it caused a significant difference in amplitude between two groups. In parallel with this statement, the curative effects of allantoin is observed in SFI test.

Conclusion: The i.p. administration of allantoin has not any morphological effect but it has positive functional effect on nerve healing.

Keywords: Allantoin; Neuroprotectan; Peripheral Nerve Regeneration; Rat; Stereology

Burcu DELİBAŞ, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University – Samsun, December-2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

DEHAM	: Denev Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
EDL	: Ekstensor Digitorium Longus
EMG	: Elektromiyografi
EHA	: Extractum cepae-Heparin-Allantoin
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HAY	: Hasarlı Ayak Yayılımı
HİU	: Hasarlı İz Uzunluğu
HPY	: Hasarlı Parmak Yayılımı
I	: İmidazolin
Ig E	: İmmunoglobulin E
IL	: İnterlökin
KİTAM	: Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi
mRNA	: Mikro Ribo Nukleik Asit
NİU	: Normal İz Uzunluğu
NAY	: Normal Ayak Yayılımı
NPY	: Normal Parmak Yayılımı
SFİ	: Siyatik Fonksiyon İndeksi

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Nöron Yapısı	2
2.2. Periferik Sinir Hasarı ve Hasara Verilen Yanıt	5
2.3. Hasara Verilen Nöronal Yanıt.....	6
2.3.1. Distal Kısım	7
2.3.2. Proksimal Kısım ve Hücre Gövdesi.....	8
2.4. Allantoin	9
2.5. Stereoloji ve Parçalama Yöntemi	10
3. MATERYAL VE METOT	12
3.2. Siyatik Fonksiyon İndeksi Testi	14
3.3. Elektrofizyolojik Analizler	16
3.4. Histolojik İşlemler	17
3.4.1. Doku Takip İşlemi	17
3.4.2. Stereolojik Analizler	19
3.5. İstatiksel Analiz	21
4. BULGULAR	22
4.1. Miyelinli Akson Sayısı	22
4.2. Miyelinli Akson Alanı	24
4.3. Miyelin Kılıf Kalınlığı.....	25
4.3. Miyelin Kılıf Kalınlığı/Akson Çapı Oranı	26
4.4. Birleşik Aksiyon Potansiyeli Latansı	27
4.5. Birleşik Aksiyon Potansiyeli Amplitüdü.....	28
4.6. SFİ Test Sonuçları	29
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	36
EKLER	40
EK 1- Etik Kurul Onayı.....	40
ÖZGEÇMİŞ	41

1.GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmaları, tedavi seçeneklerinin kısıtlılığından dolayı önemli bir klinik problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu klinik problemler, sıklıkla mekanik travmalara dayanmakla birlikte daha seyrek olarak tümör eksizyonu sırasında gerçekleşen cerrahi rezeksiyona bağlı olarak da meydana gelebilmektedir. Mekanik travmalar; ezilme, sıkışma, germe ya da kopma sonucunda sinirde tamamen ya da kısmen bozulmaya yol açacak şekilde gerçekleşebilir (Hasegawa ve Kuroda, 1989).

Periferik sinir sistemi kendi içinde bir yenilenme ve onarım yeteneğine sahip olmasına rağmen fonksiyonel ve fiziksel olarak hasar öncesi seviyesine dönmesi neredeyse imkansızdır. Sinir kopması sonucunda sinirin distal kısmı omurilikte bulunan hücre gövdesinden ayrılır ve distalde kalan gövdesiz akson kısmı 4 gün içinde glia hücreleri tarafından çevrelenerek ortamdaki uzaklaştırılır. Bu olaya "Wallerian bozulması" adı verilir. Myelin kılıf yıkımı gecikmeli olarak aksondan yıkımından sonra başlar ve ortalama 40 gün sonra tamamen biter. Schwann hücreleri dejenere olan distal bölümden ayrılır fakat ortamda bulunmaya devam eder (Hasegawa ve Kuroda, 1989).

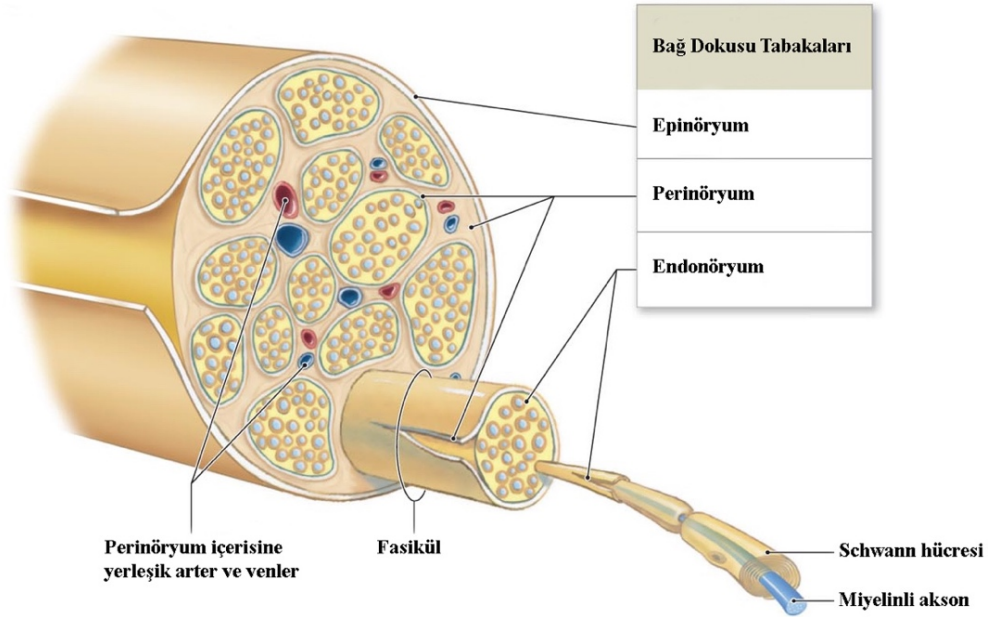
Allantoin kimyasal adıyla 5-ureidohydantoin ya da glyoxyldiureide olarak bilinen $C_3H_6N_4O_3$ formülüne sahip birçok bitki türünden elde edilebilen antioksidan ve anti-inflamatuvar etkisi ile bilinen bir maddedir. Ürik asidin non-enzimatik yollarla yıkımı sonucu açığa çıkan allantoin plazmada serbest radikallerin artmasına yol açar (Hasegawa ve Kuroda, 1989). Daha önce yapılan çalışmalarda allantoinin; oksidatif stresin artması durumunda, enzim antioksidan sistemin aktivitesini arttırdığı, bundan dolayı da ortamdaki hidrojen peroksit (H_2O_2) seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (Shestopalov ve ark., 2006). H_2O_2 'nin bir takım büyüme faktörleri için ikincil haberci olduğu ve birçok proteinin tirozinkinaz aktivitesini arttırarak çoğalmayı uyardığı bilinmektedir (Droge, 2002).

Bu çalışmada; siyatik sinirde oluşturulan ezilme tipi hasarlanma sonrasında intraperitoneal olarak uygulanan allantoinin siyatik sinir rejenerasyonu üzerindeki olası etkileri, siyatik fonksiyon indeksi (SFİ), stereolojik ve elektrofizyolojik yöntemlerle araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

Periferik sinir sistemi, özelleşmiş sinir sonlanmalarını ve merkezi sinir sisteminin dışında yer alan ganglionları içeren sinir hücre gövdelerini içerir Periferik sinir sistemi vücuttaki dokular ve merkezi sinir sistemi elemanları arasında bilgi alışverişini sağlayan duyu ve motor sinir liflerinden meydana gelir. Bu lifler bağ doku yardımıyla bir arada tutulur (Şekil 1) (Ross, 2006).

Periferik sinir sistemi çoğunlukla nöral krest hücrelerinden meydana gelir. Nöral krest hücreleri nöral plate in lateral yüzlerinden köken alırlar akabinde omuriliğin ve gelişmekte olan beyinin lateraline doğru göç ederler. Bazı kranial sinir ganglionlarında plakod adı verilen özelleşmiş epidermal hücre kümeleri de bulunur. Bunlar özellikle V., VII., VIII., IX., ve X. kranial sinirlere ait ganglionlardır. Nöral krest periferik sinirdeki hücre tiplerine ve birkaç başka yapıya öncülük eder (Crooks, 1997).



Şekil 1. Periferik sinirin genel organizasyonu ve bağ doku tabakalarını gösteren şematik çizim (Pearson education, Inc., 2011'den uyarlanmıştır)

2.1. Nöron Yapısı

Sinir sisteminin fonksiyonel ve yapısal en küçük birimi nörondur ve insan sinir sistemi 10 trilyondan fazla sinir hücresi içerir. Nöronlar birçok boyut ve şekilde

olabilmelerine rağmen duyusal nöron, motor nöron ve ara nöron olmak üzere üç genel gruba ayrılırlar (Lodish H, 2000).

Duyusal nöronlar merkezi sinir sistemine gelen uyarıların iletilmesinden sorumludurlar. Bunlar somatik aferent ve viseral aferent sinir lifleridir. Somatik aferent sinir lifleri ağrı, sıcaklık, dokunma ve basınç gibi duyuların iletiminde görev almanın yanı sıra kas, tendon, ve eklemler gibi organlardan gelen bilinçsiz hislerin beyine iletilmesinde de görev alır. Viseral aferent lifler mukozal membranlar, bezler ve kan damarları gibi iç organlardan gelen ağrı ve diğer sinyallerin iletiminde görev alır (Lodish H, 2000).

Motor nöronlar ise merkezi sinir sistemi veya ganglion kökenli sinyalleri efektör hücrelere taşırlar. Bu sinirlerin uzantıları somatik eferent ve viseral eferent lifleri içerir. Somatik eferent nöronlar iskelet kasına istemli sinyalleri iletir. Viseral eferent nöronlar ise istemli sinyalleri düz kaslara, kardiyak iletim hücrelerine (Purkinje lifleri) ve bezlere iletir (Lodish H, 2000).

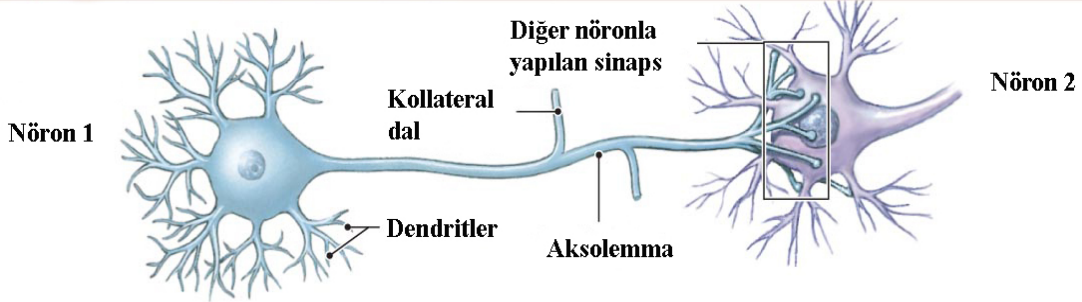
Ara nöronlar diğer adıyla interkalat nöronlar duyusal ve motor nöronlar arasındaki bağlantıdan sorumludurlar. Nöronların %99.9 unun bu gruba ait olduğu tahmin edilmektedir (Lodish H, 2000).

Bir nöronun fonksiyonel bileşenleri hücre gövdesi, akson, dendrit ve sinaptik bağlantılardır. Hücre gövdesi nukleus ve hücre içeriğindeki organelleri içerir. Nöronların hücre gövdesinden çıkan uzantılar yapısal olarak tüm nöronlara ait tek ortak özelliktir. Nöronların çoğu tek bir akson içermekle beraber aksonlar genelde nöron gövdesinden çıkan en uzun uzantı olup hücre gövdesinden gelen sinyalleri özelleşmiş bir terminale iletir. Sinaps diğer bir nöron ya da efektör hücreyle sinaps yapabilir (Ross, 2006) (Şekil 2).

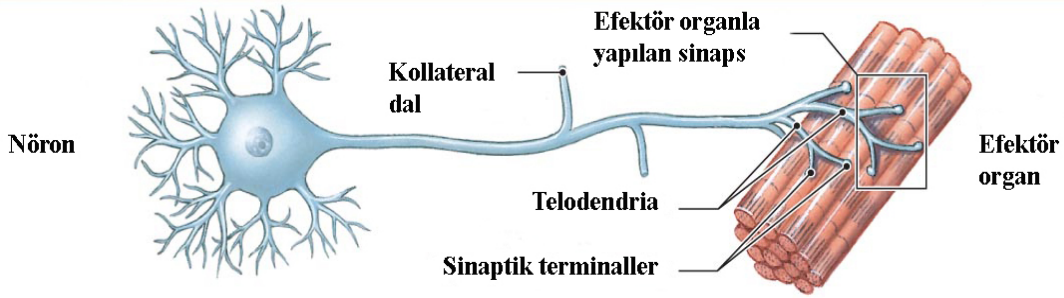
Akson hücre gövdesinden akson tepeciği adı verilen küçük bir yükseltiden köken alır. Aksonun akson tepeciğine yakın proksimal kısmı başlangıç segmenti adını alır. Aksonun sitoplazması (aksoplazma) yoğun miktarda mikrotübül ve nörofilament içerir. Hücre çatısının desteklenmesi görevine ek olarak bu yapılar akson boyunca metabolitlerin ve organellerin taşınmasında da görev alırlar. Ultrastrüktürel düzeyde aksonları dendritlerden ayıran bir özellik ise aksonların ribozom organelinden yoksun olmasıdır (Lodish H, 2000).

Sinaps Tipleri

İki nöron arasındaki sinaps



Efektör organla sinaps



Şekil 2. Değişik tipteki nöronları gösteren diagram. Pseudounipolar (unipolar) , bipolar ve postsinaptik otonomik nöronlar merkezi sinir sisteminin dışında lokalize olmuştur. Purkinje hücresi ve piramidal hücreler MSS ile sınırlandırılmıştır, birçoğu tanınmalarını kolaylaştıran dendritik uzantılar içerir (Pearson education, Inc., 2011’den uyarlanmıştır)

Dendritlerden farklı olarak aksonlar dallanma ve sonlanmadan önce çok daha uzun seyredebilirler. Örneğin; adductor hallucis kasını inerve eden sinir lifi uzun bir insanda bir metreden fazla uzunluğa erişebilir. Dendrit akson ve dendritler için besleyici bir merkez olarak görev almasına rağmen; hacimsel olarak bakıldığından toplam hücre hacminin çok küçük bir kısmını temsil etmektedir. Yüzey alanı olarak değerlendirildiğinde ise aksonun yüzey alanı hücre gövdesinden birkaç bin kat daha fazla olabilmektedir (Lodish H, 2000).

Sinir hücreleri organellerin ve makromoleküllerin akson terminalinin dışına doğru taşınmasında görev alan ayrıntılı bir iletim sistemine sahiptir. Aksonlardaki iletim her iki yönde de gerçekleşir. Hücre gövdesinden akson terminaline doğru olan taşınma “anterograde” ya da “orthograde” olarak adlandırılmakla beraber tersi yöndeki taşınım ise “retrograde” olarak adlandırılır. Anterograde aksonal iletim hızlı ve yavaş iletim olarak ikiye ayrılır. Hızlı iletimde kinesin proteininin faaliyetine bağlı olarak iletim hızı 400 mm/gün’e kadar çıkabilir (Chowdary ve ark., 2015). Bir adenosin trifosfat (ATP

az) olan kinesin proteini pipet içinde emekleyerek ileryen bir böcek gibi makromolekül içeren küçük vezikülleri ve mitokondriyi mikrotübüller boyunca taşır. Yavaş taşıma ise yapısal ve metabolik bileşenlerin hücre gövdesinden akson terminallerine taşınmasında görev alır. Yavaş taşımanın mekanizmasına ait bilgi ise çok kısıtlıdır (Duncan ve Goldstein, 2006).

Retrograde aksonal taşıma ise nöronların aksonun terminal ucundan pinositoz ya da reseptör-aracılı endositoz aracılığıyla alınan büyüme faktörü gibi sinyal moleküllerine cevap vermesinde görevlidir. Aynı zamanda bu tip taşıma aksonal terminalde görev alan moleküllerin geri dönüştürülmesinde de etkilidir. Retrograde taşımada kinesin proteininden ziyade dynein protein görev alır (Duncan ve Goldstein, 2006).

2.2. Periferik Sinir Hasarı ve Hasara Verilen Yanıt

Sinir hasarının hemen sonrasında hasarlı dokunun ortamdaki uzaklaştırılması ve onarım sürecin başlaması için hasar ortamında kompleks ve düzenli şekilde yürüyen bir olaylar zinciri başlar. Vücuttaki diğer alanlardaki onarımdan farklı olarak, periferik sinirin hasara yanıtı, mitoz ve hücre proliferasyonu şeklinde olmaz. Periferik sinir rejenerasyonu süreci hakkındaki bilgiler son zamanda sıklıkla yapılan hücresel ve moleküler biyoloji çalışmaları ışığında artış göstermiştir. Bu çalışmalar sonucunda; hasara yanıtın sadece hasar bölgesinde değil, aynı zamanda hücre gövdelerinin bulunduğu omurilik ve ganglionlarda da olduğu şeklindedir. Schwann hücreleri, makrofajlar ve inflamatuvar hücreler bu süreçte önemli rol oynamaktadır. Ayrıca; nörotropik faktörlerin süreçteki önemi de aydınlatılmıştır (Sunderland, 1990b).

Gerilmeye bağlı gelişen periferik sinir hasarları en sık karşılaşılan hasar tipidir. Periferik sinirler içeriğindeki kollajen endonöryum yapısından dolayı doğal elastik bir yapıya sahiptir, fakat ne zaman ki çekme kuvveti sinirin dayanma kapasitesini aşarsa o zaman bir hasar meydana gelir (Sunderland, 1990a). Eğer uygulanan kuvvet çok fazla ise brakial pleksus kopmalarında olduğu gibi sinir bütünlüğünde bozulma meydana gelir. Bununla birlikte, çoğu vakada sinir bütünlüğünün korunduğu görülmektedir. Bu tür hasarlar ekstremitelerde kırıklarının yakınlarındaki sinirlerde ve kemiklerde görülebilir (Örneğin; humerus kırığı yakınındaki radial sinir hasarında). %30'luk bir kısmı ağır olan bıçak yaralanmaları; sıklıkla karşılaşılan periferik sinir hasarlarından bir diğeri olarak

göze çarpmaktadır (Sunderland, 1990b).

Sıkıştırma üçüncü tip sinir hasarı tipidir. Bu tip yaralanma sonucu total duyuşal ve motor fonksiyon kaybı gerçekleşebilir. Sinire basınç uygulandığı zaman; epinöryum, sinir üzerinde stresi emici ve dağıtıcı bir rol üstlendiği için fasiküller ve bağ doku üzerindeki baskı tamponlanmış olur ve bu olay sonucunda hasarın etkisi azalır. Dolayısıyla; dokunun hasardan etkilenme oranı sinir fasiküllerini çevreleyen bağ doku miktarına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Gene bu önermeye paralel olarak fasiküllerin yoğun seyrettiği sinir bölgelerinde hasarlanma sonucu hasarın daha fazla olması beklenmektedir (Sunderland, 1990b).

2.3. Hasara Verilen Nöronal Yanıt

Rejenerasyon süreci başlamadan önce bir kısım dejenerasyon süreci tamamlanmalıdır. Rejenerasyon başarısı; hastanın yaşına, hasar mekanizmasına ve özellikle sinir hücre gövdesinin hasara olan uzaklığına bağlıdır. Birinci kademeli hasarlarda patolojik bulgular ya yoktur ya da çok zayıftır. İkinci kademeli hasarlarda (oksonotmezis) hasarın bölgesinde ya da hasarın proksimalinde birkaç küçük histolojik değişiklik gözlemlenmekle birlikte hasarın distal kısmında kalsiyum aracılı gerçekleşen “Wallerian bozulması” adlı olaylar silsilesi gerçekleşmektedir (Waller, 2008).

Wallerian bozulması akson ve miyelin kılıfın fiziksel parçalanmasıyla hasar sonrası birkaç saat içerisinde başlar. Ultrastrüktürel olarak nörotübül ve nöroflament organizasyonu bozulur ve aksonal sinir düzensizleşir. Takip eden 48. ve 96. saatler arasında aksonal devamlılık bozulur ve sinyallerin iletimi zorlaşır. Miyelin parçalanması aksonlardan daha gecikmeli olarak başlar fakat 36. ile 48. saatler arasında bozulma süreci sonlanmış olur (Chang ve ark., 2016).

Schwann hücreleri “Wallerian bozulmasında” anahtar bir rol oynar. Schwann hücreleri 24 saat içerisinde aktifleşir, nüklear ve sitoplazmik genişlemenin yanı sıra yoğun mitotik aktivite gösterirler. Bu hücreler dejenerasyon ve onarım prosesinde etkili olan molekülleri sentezleyen genlerin ekspresyonunun fazla olduğu farklılaşmamış yavru hücreler oluşturmak için hızlıca çoğalır. Schwann hücrelerinin başlangıçtaki rolü dejenere olmuş akson ve miyelin kalıntılarını makrofajlara iletmek suretiyle ortadan uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktır. Makrofajlar hematopoyetik yol yardımıyla hasar alanında geçirgenliği artmış olan kapillerlerden geçerek travmatize alana doğru göç ederler. Hasar alanının temizlenmesi sürecinde makrofajlar ve Schwann hücreleri

beraber çalışarak temizleme işlemini bir hafta ile birkaç hafta arası sürebilecek bir zaman zarfında bitirirler (Chang ve ark., 2016).

Hasarı takip eden iki hafta içerisinde endonöral mast hücreleri sayılarını arttırarak rejenerasyon sürecinde önemli rol oynarlar. Bu hücreler kapiller geçirgenliğini arttıran histamin ve serotonin salgılayarak makrofajların göçünü kolaylaştırırlar. Başlangıçtaki aşamalarda endonöral tüpler hasara yanıt olarak genişleme gösterir fakat iki hafta sonra çaplarını küçültürler. 5. ve 8. haftalar arasında dejenerasyon süreci büyük ölçüde biter ve geriye kalan tek şey endonöral kılıf içindeki Schwann hücrelerinden oluşan sinir lifi kalıntılarıdır (Chang ve ark., 2016).

2.3.1. Distal Kısım

Hasarın distalinde “Wallerian Bozulması” ikinci derece hasarlarda görülene yakın bir tablo açığa çıkartır. Önemli bir farklılık olarak intrafasikular hasar aksonal rejenerasyonu zayıflatır ve bundan dolayı endonöral tüpler uzun süreler denerve pozilyonda kalır. Bunu takiben; endonöral tüpler büzüşmeye başlar ve bu olay hasarı takip eden 3. ve 4. haftalarda maksimum boyuta ulaşır (Sunderland, 1990a). Endonöral kılıf Schwann hücrelerinin bazal membranındaki kollajen birikimiyle eş zamanlı olarak kademeli olarak kalınlaşır. Eğer endonöral tüpe erişen bir rejenerasyon aksone olmazsa, ilerleyen fibrosis en sonunda tüpü ortadan kaldırır. Siddetli hasarlarda Schwann hücre yığımları kollapsetmiş tüplerin mikroskopik olarak görülür olmasına yol açar. Oluşan bu Schwann hücre sütunları Bügner bandı olarak adlandırılır ve reinervasyon sırasında yeni filizlenen aksone için önemli rehberler olarak görev alır. Bu aşamada, Schwann hücrelerinin ikincil rolü olan aksone büyümesinin desteklenmesi devreye girer (Chang ve ark., 2016).

Dördüncü ve beşinci derece hasarlarda, şiddetli travmaya karşı lokal reaksiyon belirgindir. Endonöral tüpler ve fasiküller dağılmış durumdadır ve Schwann hücreleri ve aksone koruma alanının dışına çıkmış durumdadırlar. Aynı zamanda epinörium da hasarlıdır ve reaktif epinöral fibroblastlar 24 saat içinde hasarlı uçlarda görülmeye başlar. Bu olaya Schwann hücrelerinin, peri ve endonöral fibroblastların çoğalması eşlik eder. Hücre çoğalması bir hafta içerisinde çok hızlı bir şekilde gelişir ve maksimum düzeyine ulaşarak uzun bir süre devam eder. Orta derecedeki hasarlarda olduğu gibi muhtemelen mast hücrelerinin degranülasyonunun artması sonucu kapiller geçirgenliği artar ve bunu ödem ve makrofaj infiltrasyonu takip eder. Bu cevabın büyüklüğü sinir ve

onu çevreleyen dokulardaki hasarın büyüklüğüne bağlıdır. 4. ve 5. derece hasarlarda sinir uçları disorganize Schwann hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar ve kollajen lifler topluluğu sayesinde şişer. Rejenere olan aksonlar şişmiş proksimal uca ulaştıklarında daha ileriki düzeyde büyüme için müthiş bir engelle karşılaşır. Bu engel karşısında aksonların birçoğu bu yara dokusu içerisinde halkalar çizerler ya da proksimal kısım boyunca geriye doğru yol alırlar. Bir kısmı ise onu çevreleyen dokunun dışına çıkar. Ancak rejenere olan aksonlarda bir kısmı distal uca ulaşabilir. Bu ulaşma sürecinin başarısı orijinal hasarın şiddeti, yara dokusunun derecesi, aksonun hasar alanına ulaşmasına kadar geçen süre gibi birçok faktöre bağlıdır. Üçüncü derece hasarlarda endonöral tüpler uzun süreler boyunca boş kalır, bu da tüplerde büzülme ve fibrozise yol açar, en sonunda kollajen lifler tarafından tamamen bozulur (Chang ve ark., 2016).

2.3.2. Proksimal Kısım ve Hücre Gövdesi

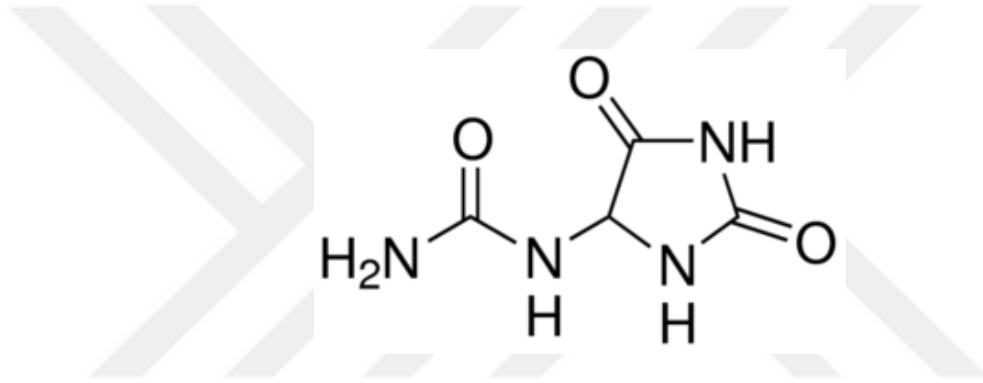
Hücre gövdesinde ve hasarın proksimal kısmında kalan liflerde meydana gelen değişiklikler hasarın şiddetine ve aynı zamanda hasarın hücre gövdesine olan uzaklığına bağlıdır. Schwann hücreleri hasarın proksimal tarafına yakın bir kısmında kaçınılmaz olarak degrade olurlar akson ve miyelinler ise çapları azalmış olarak görülürler. Proksimal kısımdaki bozulma en az düzeyde (hasardan en yakındaki ranvier noduna kadar) olabileceği gibi; hücre gövdesine kadar olan bütün kısmı kaplayacak şekilde de olabilir. Eğer hücre gövdesinde hasar meydana gelirse (şiddetli travmalar sonucu) proksimal kısmın tamamı "Wallerian bozulması" sonucunda fagositoza uğrar. Önemli yaralanmalar sonrasında özellikle uygun terminal organlarla fonksiyonel bağlantılar yeniden sağlanmamışsa hasarın proksimal kısmındaki akson çapı azalır. Buna bağlı olarak da sinir iletim hızı azalır. Rejenerasyon başladığında akson çapı artar fakat önceki haline hiç bir zaman ulaşamaz. Hasar sonrası hücre gövdesi ve akson onarımında tam bir bağımsızlık görülmektedir. Şöyle ki; hücre gövdesi fonksiyonel periferik bağlantılar sağlanmadan tamamen kesinlikle onarılmaz ve final aksonal yetenek hücre gövdesinin iyileşme derecesine bağlıdır (Burnett ve Zager, 2004).

Sinir hücre gövdesi hasara nispeten öngörülebilir bir şekilde tepki verir. Takip eden 6 saat içerisinde nükleus hücrenin periferine doğru göç eder ve Nissl granülleri aynı zamanda düz endoplazmik retikulumlar ayrılır ve dağılır. Bu olay kromatolizis olarak adlandırılır. Eş zamanlı olarak, kromatolizise benzer olarak perinöral glia hücrelerinde proliferasyon yönünde bir hareketlenme olur. Glia hücresi etkilenen

nörona doğru uzantılarını uzatır ve muhtemelen kurtarma işlemi için nöronu etrafından izole etmek adına sinaptik bağlantıları bozar (Burnett ve Zager, 2004).

2.4. Allantoin

Allantoin, 5-ureidohydantoin veya glyoxyldiureide olarak da adlandırılan $C_4H_6N_4O_3$ formülüne sahip olan bir kimyasaldır (Şekil 3). Allantoin ismi insanlar ve yüksek primatlar dışında çoğu memelilerin gelişimi sırasında oluşan amniyot embriyonik boşaltım organı olan "allantois" kelimesinden köken alır. Allantoin hakkındaki ilk çalışmalar; allantoinin ürik asidin oksidasyonu sonucu oluştuğunun gösterildiği 1838 yılına dayanır (Liebig, 2006).



Şekil 3. Allantoinin kimyasal formülü

Allantoin amniyotik sıvıda ve sağlıklı bir insanın idrarında az miktarda bulunmaktadır. Oksidatif stres çalışmaları sırasında oksidatif hasarın ürik asidin oksidasyonu sonucu oluşan allantoin maddesinin birikmesine yol açtığı gösterilmiştir. Fiziksel aktivite sonrası gelişen oksidatif stresin yanı sıra allantoin seviyesinin romatid artrit, myocardial enfarktüs ve Down sendromu vakalarında da arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda ise; allantoin seviyesinin glutatyon peroksidaz ve sisteine göre daha hassas bir oksidatif stres markırı olduğunu öne sürülmüştür (Yardim-Akaydin ve ark., 2004).

Hemen akabinde; Robinson'un allantoinin yara iyileşmesi üzerindeki pozitif etkilerini gösterdiği yayınlar sonucunda çalışmalar medikal ve farmasötik alanlara hızla uyarlanmıştır (Robinson, 1935). Bunu takiben yara iyileşmelerinde kullanılmak üzere allantoin içerikli birçok merhem cerrahi ve dermatoloji alanlarına kazandırılmış aynı zamanda zaten bu amaçla kullanılan ürünlere allantoin maddesi eklenerek etkinliğinin

arttırılması sağlanmıştır (Szczygiel, 1960; Chan ve ark., 2014). Çeşitli kökenli inatçı irinli ülserlerde, çeşitli derece ve kaynaklı yanık tedavilerinde ve sedef hastalığında %5 oranında kullanılmasının tedaviyi olumlu yönde etkilediğine dair çalışmalar mevcuttur (Margraf ve Covey, 1977; Fisher, 1981). Ayrıca; allantoin içeren formüllerin egzamada, ellerdeki kontakt dermatitis, hiperkeratozis, perionditis, ağızda ve mukoz membranda ısıya bağlı kabarcıkların iyileşmesinde de olumlu etkisi gözlemlenmiştir (Draeos, 2015).

Daha önceki yapılan çalışmalarda allantoinin enzim antioksidan sistem aktivitesini düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir. Bu durumun intraselüler H_2O_2 miktarını arttırdığı düşünülmektedir. H_2O_2 'nin bazı büyüme faktörleri için ikincil haberci olduğu ve birçok proteinin tirozin kinaz aktivitesini indükleyerek proliferasyonu arttırdığı herkes tarafından bilinmektedir. Aynı zamanda allantoinin H_2O_2 aracılı mutagenezi dengeleme ve yüksek seviyedeki H_2O_2 'nin toksik etkisini azaltma etkisi vardır. Ayrıca, ağır fiziksel aktivite sonucu insan vücudunda yüksek seviyede allantoin biriktiği gözlemlenmiştir. Bu durumun, allantoinin serbest radikal seviyesindeki artışı gösteren bir marker olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Shestopalov ve ark., 2006).

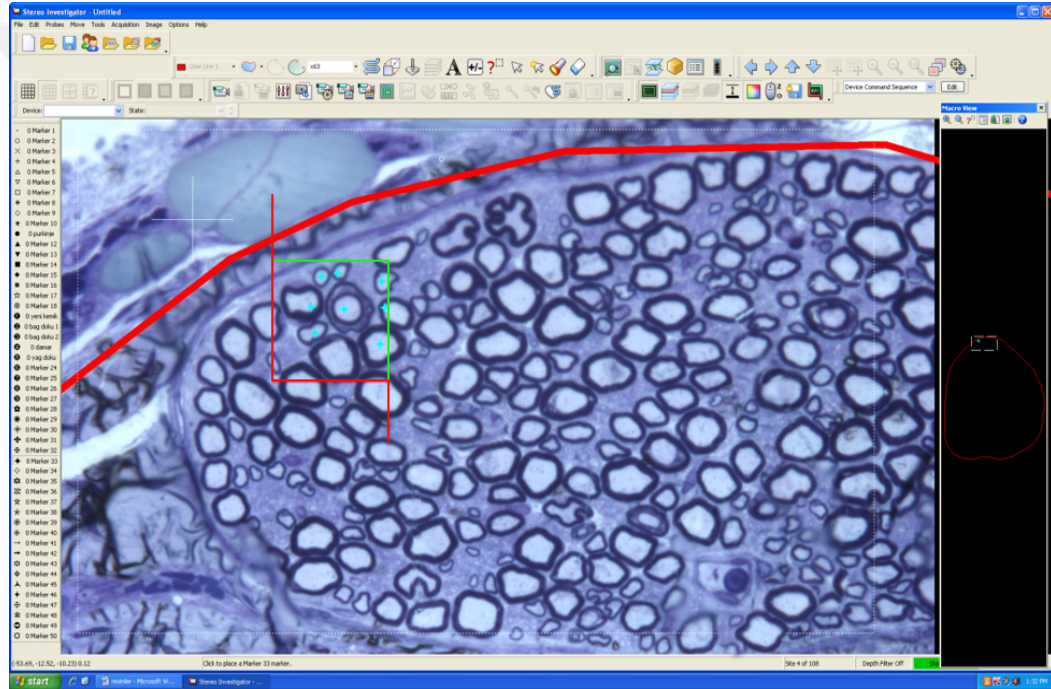
Bununla beraber; bu olgu farklı bir şekilde de yorumlanabilir. Fiziksel stres sonrasında kas hücrelerinde rejenerasyon başlar ve hücreler hipertrofiye uğrar. Bu olay da dolaylı olarak ortamda hücre çoğalmasını ve büyümesini tetikleyen aynı zamanda spesifik olmayan metabolik faktörlerin oluşmasını artırır. Daha önceki çalışmalar ışığında allantoinin üreidosüksinatın hücre zarından taşınmasında etkili olduğu ve pirimidinin biyosentetik yolağında etkili olduğu düşünülmektedir (Shestopalov ve ark., 2006).

2.5. Stereoloji ve Parçalama Yöntemi

Periferik sinir çalışmalarında toplam akson sayısı, miyelin kılıf kalınlığı, akson çapı gibi parametreler önemli bir değerlendirme kriteri olarak kullanılmaktadır. Modern plan-tabanlı (design based) stereolojinin en çok kullanılan toplam sayı hesaplama yöntemlerinden bir tanesi olan parçalama (fractinator) yöntemi bu tip çalışmalarda en çok başvurulan yöntemlerdendir. Sayı hesaplamasında bilinen en etkin ve tarafsız yöntem olmanın yanı sıra bu yöntem araştırmacıya uygulama kolaylığı sağlamaktadır.

Parçalama yöntemi, dokuya uygulanan histolojik işlemler sonucu meydana gelebilecek şişme, büzüşme gibi yapısal değişimlerden bağımsızdır. Bununla birlikte çalışılan yapıyla ilgili hiçbir ön bilgi veya kabul gerektirmez (Gundersen, 1986).

Parçalamanın temel mantığı, içerisindeki toplam tanecik sayısı bulunmak istenilen yapıyı oranları bilinen parçalara kontrollü bir şekilde ayırıp, ayrılan parçalardan sistemik rastgele örnekleme yöntemi yardımıyla seçilmiş olanlarında sayım yaparak; elde edilen sayının "parçalama katsayısı" ile çarpımı sonucu doku ya da organdaki toplam sayıya ulaşılmasına dayanır (Şekil 4). Özet olarak; örnekleme sonucu elde edilen partikül sayısı tüm yapıya oranlanır ve böylece dokudaki toplam partikül sayısı tahmin edilmeye çalışılır (Gundersen, 1986; Gundersen ve ark., 1988).



Şekil 4. Dokunun belli aralıklarla parçalara ayrılması ve her parçaya ait taneciklerin sayım çerçevesi yardımıyla sayılmasını temel alan parçalama yönteminin şematik gösterimi

Parçalama yönteminin temel olarak iki tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilki fiziksel, ikincisi ise optik parçalamadır. Her iki metot da temelde aynı mantığı içermektedir ancak uygulamada bazı farklılıklar mevcuttur (West ve ark., 1991).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 29.01.2015 tarih ve 2015/02-f-12 nolu kararı gereğince PYO.TIP.1901.15.012 koduyla desteklenmiştir. Çalışmaya başlamadan önce Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 05/11/2014 tarih ve 36 sayılı onay alınmıştır.

Çalışmada ağırlıkları ortalama 150-250 gr arasında değişmekte olan 20 adet erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Denekler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Yürüme testleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, elektrofizyolojik testler ise Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Elektron mikroskopik analizler ise Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (KİTAM) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Denekler rastgele olarak eşit sayıda 4 gruba ayrıldı. Sıçanlar altları plastik, üstü tel olan özel kafeslere yerleştirildi. Kuru pellet yemle beslendi, uygun sıcaklık ve nem ortamında 4 hafta boyunca Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAM) 'nde beslendi.

Grupların oluşturulması

Sıçanlar, rasgele seçilerek ve her grupta 5 erkek sıçan bulunacak şekilde dört alt gruba ayrılmıştır:

Kontrol (K) Grubu: Hiçbir cerrahi işleme ve madde uygulamasına tabi tutulmayan grup (n:5),

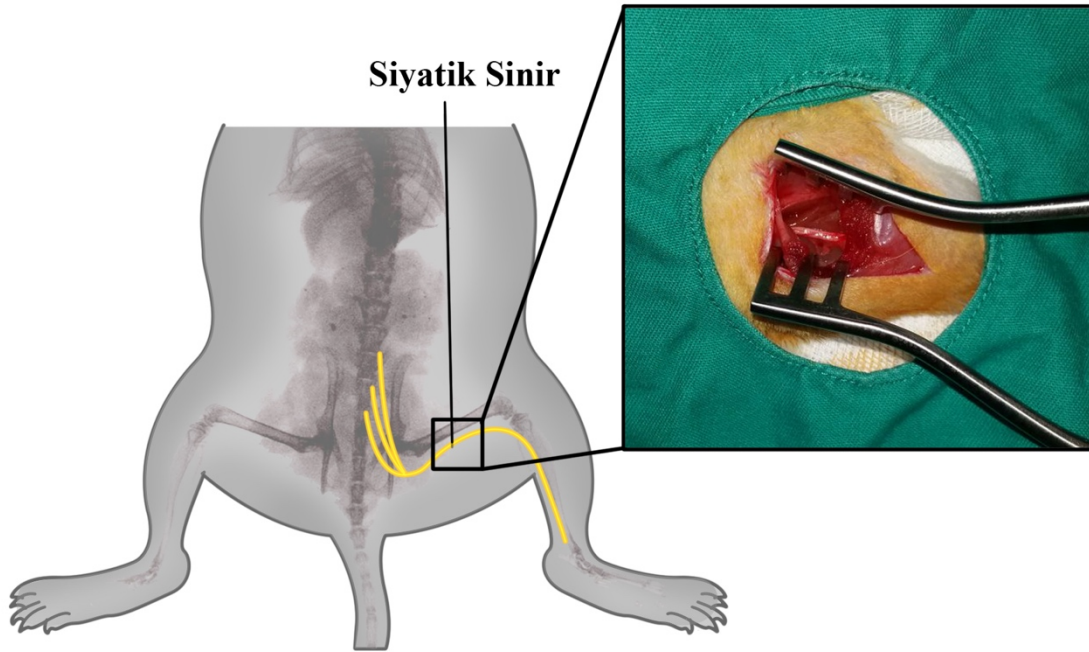
Hasar (H) Grubu: Deneysel hasar modeli oluşturulan fakat herhangi bir madde uygulamasına tabi tutulmayan grup (n:5),

Allantoin (A) Grubu: Deneysel hasar modeli oluşturulmadan sadece allantoin (10mg/kg i.p.) verilmiş grup (n:5),

Hasar+Allantoin (HA) Grubu: Deneysel hasar modeli oluşturulan ve ardından allantoin (10 mg/kg i.p.) verilmiş grup (n:5).

3.1. Cerrahi İşlemler

Çalışmadaki tüm cerrahi işlemler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Hasar oluşturulacak olan gruplara ait denekler (H, HA) ketamin-ksilazin (0,4mg/kg-0,1mg/kg (i.p.)) uygulanarak anestezi altına alındı. Sağ bacakları tıraş edilerek antiseptik solüsyonla temizlendi ve gluteal bölgeden ince bir insizyonla cilt açıldı (Şekil 5). Ardından biceps femoris kası disseke edilerek siyatik sinire ulaşıldı. Ekstensör digitorium longus (EDL) kasının 10 mm distalindeki bölgeye 5 1/2 inç'lik hemostatik forseps yardımıyla 5 saniye boyunca 50 Newton (N) basınç uygulanması yoluyla hasar oluşturulmuştur. Operasyonu takip eden 30. günde sıçanlar sakrifiye edilerek sinir rejenerasyonunun histolojik, stereolojik ve elektrofizyolojik değerlendirmeleri yapıldı.



Şekil 5. Hasarlı gruba ait ratlarda sağ siyatik sinire hasar yapılması (orijinal)

3.2. Siyatik Fonksiyon İndeksi Testi

Fonksiyonel geri kazanımın ölçülmesinde kullanılan Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFİ) testi ilk olarak Demedinaceli ve ark. (1982), tarafından bulunmuş olup, ardından Bain ve ark. (1989b), tarafından modifiye edilmiştir. SFİ'nin hesaplanması; arka bacaklara ait ayaklar ve parmaklar arasındaki çeşitli ilişkilere bağlıdır. Bu veriler, yürüme tahtası boyunca hayvanların yürütülmesi ve mürekkebe daldırılmış arka ayakların zemin üzerinde bıraktığı ayak izleri yardımıyla elde edilmektedir. Bu formülün geliştirilmesi siyatik sinir hasarı sonucunda ratlarda gelişen karakteristik yürüme modelleri baz alınarak ortaya çıkmış olup güvenilir şekilde tekrar edilebilir ve ölçülebilir olma özelliği taşımaktadır. Sinir hasarındaki geri kazanım oranı bu yürüme analiziyle tespit edilebilmektedir (Bain ve ark., 1989a).

Yürüme analizi testleri analiz aşamasındaki teknik problemlerden dolayı hantal ve rahatsız olup hataya yatkınlık göstermektedir. Ek olarak; SFİ hesaplamalar yalnızca motor fonksiyon değil duyuşal ve proprioseptif fonksiyonun da kompleks entegre bir yansımasıdır. Bundan dolayı siyatik sinir manipülasyonunu takiben kolay uygulanabilir, kantitatif alternatif değerlendirme testlerinin yapılması; onarımın hangi yöne gerçekleştiğini aydınlatması açısından tercih edilir (Bain ve ark., 1989a).

SFİ testi için hayvanların 8,7cm x 43cm boyutlarında bir ahşap yürüme tahtası üzerinde yürümeleri sağlanmıştır. Ratların arka ayakları metilen mavisi solüsyonu içerisine daldırılmış ve ahşap zemine yerşeltirilmiş beyaz kağıt üzerinde yürüyerek ayak izleri çıkarmaları sağlanmıştır (Şekil 6). Kağıt üzerindeki mürekkep izleri kurumaya bırakılmıştır ve ardından Bain ve ark., (1989a), tarafından tanımlanmış formüle göre değerlendirilmiştir. Ölçümlerde ayak izlerinden yararlanarak elde edilen normal ve hasarlı ayaklara ait veriler ve formüldeki yerleri aşağıdaki gibidir:

HPY (Hasarlı Parmak Yayılımı): Hasarlı ayağa ait birinci ve beşinci parmak izleri arasındaki mesafe,

NPY (Normal Parmak Yayılımı): Normal ayağa ait birinci ve beşinci parmak izleri arasındaki mesafe,

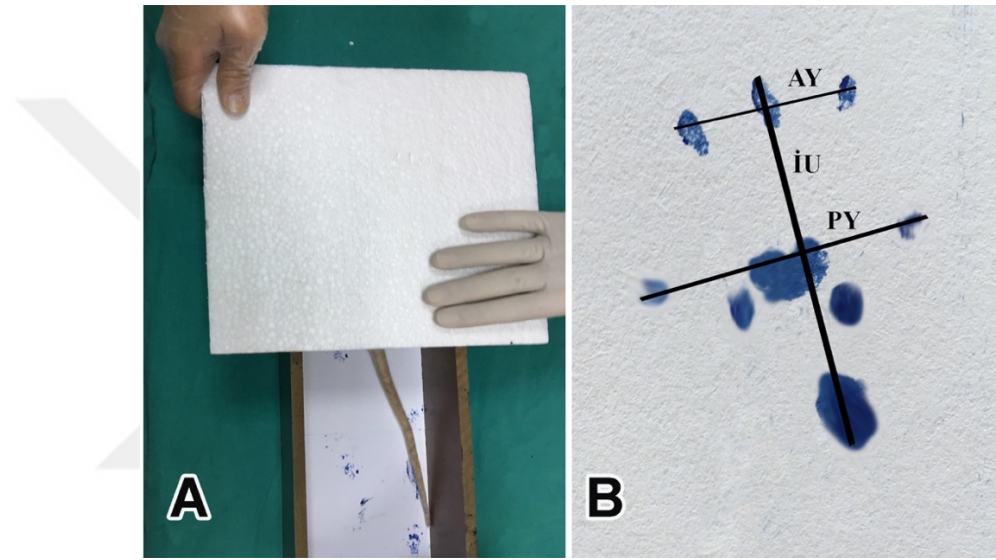
HAY (Hasarlı Ayak Yayılımı): Hasarlı ayağa ait ara parmakların yayılımı,

NAY (Normal Ayak Yayılımı): Normal ayağa ait ara parmakların yayılımı,

NİU (Normal İz Uzunluğu): Normal ayağa ait üçüncü parmak ile izin bittiği yer arasındaki uzunluk,

HİU (Hasarlı İz Uzunluğu): Hasarlı ayağa ait üçüncü parmak ile izin bittiği yer arasındaki uzunluk.

$$SFİ = -38.8 (HİU-NİU)/NİU + 109.5 (HPY-NPY) + 13.13 (HAY-NAY)/NAY - 8.8$$



Şekil 6. A. yürüme testi görüntüsü B. formülde kullanılan değerler ve nereden alındıklarını gösteren resim

SFİ testinde çıkan “0” olması fonksiyonun normal olduğunu gösterirken “-100” değeri tamamen bozulmuş fonksiyonun göstergesidir (Kanaya ve ark., 1996; Terris ve ark., 1999). Yürüme analizleri arka bacak kas fonksiyonu ile ayak izi ölçümleri arasında açık bir ilişki olduğunu göstermiştir (Reynolds ve ark., 1996).

Siyatik sinir indeksi formülü yukarıda açıklanan her bir faktörün SFİ’ye olan etkisini açık biçimde ortaya koymaktadır. Daralmış parmak izinin önemi "HPY-NPY" parametresinin katsayısı ile ortaya konulmuştur ve iz uzunluğundaki artış formüldeki negatif katsayı ile yansıtılmaktadır (Bain ve ark., 1989a; Inserra ve ark., 1998).

Bütün ölçümler manuel olarak ve milimetrik olarak yapılmıştır. Deneklere ait bazı ayak izleri deneklerin hasar sonrası anesteziye geçen ayaklarını kemirmelerinden dolayı alınamamıştır.

3.3. Elektrofizyolojik Analizler

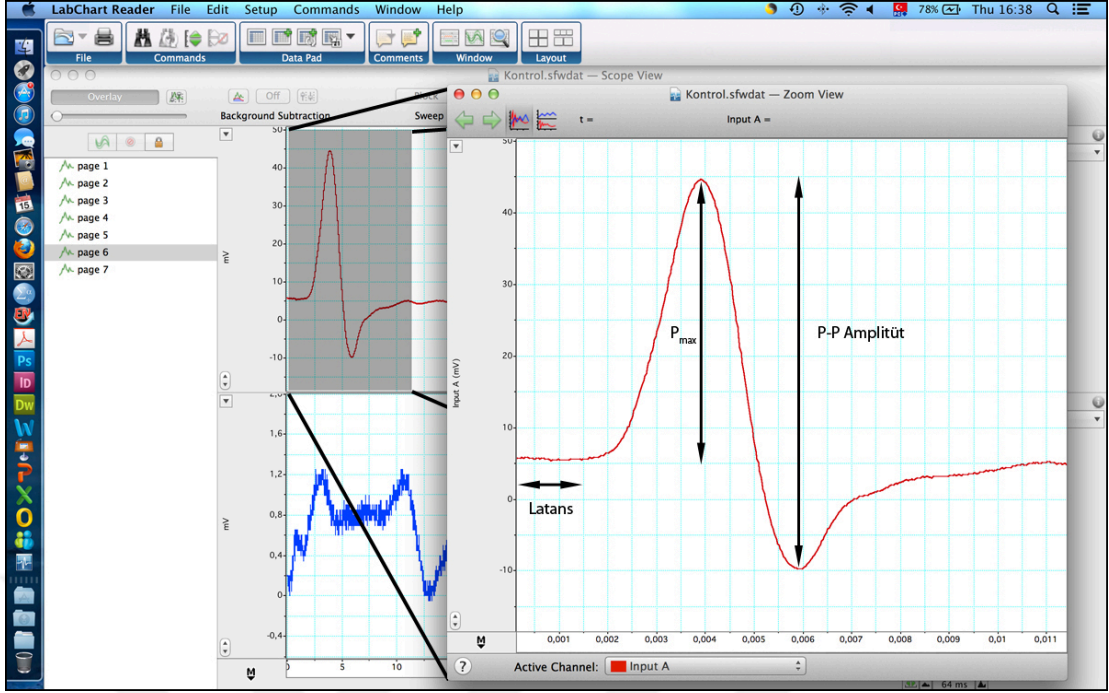
Çalışmaya ait elektrofizyolojik analizler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Elektromiyografi (EMG) testleri için PowerLab 4SP (AD Instruments, Sydney, Australia) cihazı ve Scope (ver. 3.7.2, AD Instruments) programı kullanıldı.

Denekler sakrifiye edilmeden hemen önce fizyolojik geri kazanımı elektrofizyolojik boyutta değerlendirmek adına elektromiyografi ölçümleri yapıldı. Bu amaçla anestezi altına alınan sıçanlara ait sağ siyatik sinirler, siyatik çentikten popliteal fossaya kadar diseke edilerek görünür hale getirildi. Uyarı veren tel siyatik çentikten 10 mm distal kısmına yerleştirildi ve elektrotlar ise uyarı yapan tele 2,5 cm uzaklıktaki gastrocnemius kası üzerine yerleştirildi. 0,01 mV ile 10 mV arasında uyarı voltajı uygulanarak gastrocnemius kası birleşik kas aksiyon potansiyelleri ölçüldü. Elde edilen pikler aşağıdaki parametreler açısından değerlendirildi.

Latans: Aksiyon potansiyeli eğrilerinde uyarıdan defleksiyonun başladığı zamana kadar geçen süre

p-p Amplitüt: İki tepe arasındaki mesafe

Her bir denek için üçer adet aksiyon potansiyeli eğrisi çizdirilerek ortalaması alındı ve bu değerler istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırıldı (Şekil 7).



Şekil 7. EMG kayıtlarında değerlendirilen parametreler görülmektedir (Önger, 2013)'den

3.4. Histolojik İşlemler

SFİ testi ve elektrofizyolojik testlerin ardından deneklere air sağ siyatik sinirler çıkarılıp ışık mikroskobunda incelenmek üzere doku takip ve boyama işlemlerine tabi tutuldu.

3.4.1. Doku Takip İşlemi

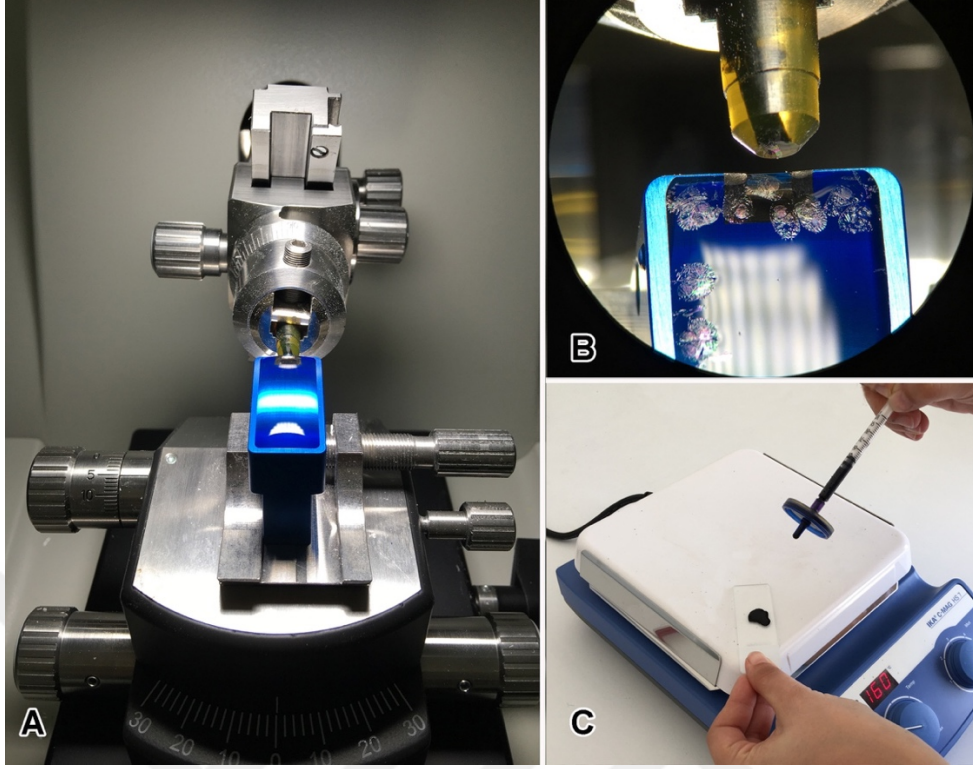
Denekler anestezi altında iken açılan siyatik sinir üzerine %5'lik gluteraldehit damlatıldı ve ardından sinir dokuları çıkarıldı. Daha sonra; aşağıdaki sıraya göre takip işlemi yapıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Elektron mikroskopik takip sırasında kullanılan kimyasallar ve muamele süreleri

% 4 lük Gluteraldehit	1 saat
0,1 M Fosfat tamponu ile yıkama	4x15 dakika
%1 'lik Osmium tetraoksit	1,5 saat (karanlık ortamda)
0,1 M Fosfat tamponu ile yıkama	4x15 dakika
%50 Aseton	15 dakika
%70 Aseton	15 dakika
%95 Aseton	15 dakika
%100 Aseton	15 dakika
%100 Aseton	15 dakika
Propilen oksitte	20 dakika
Propilen oksitte	20 dakika
%50 Propilen oksit + %50 Araldit karışımı	1 saat
%100 Araldit	1 saat

Bu süre sonunda silikon gömme kalıbı içerisinde bloklanan dokular bir gece boyunca bu kalıplar içerisinde bekletildi. Ertesi gün rezin içerisine yerleştirilmiş bloklar 45 °C'deki etüve yerleştirildi ve her 30 dakikada bir 5 °C'lik ısı artışı yapılarak 62 °C'ye ulaşıldı.

62 °C'de 48 saat bekletilerek polimerizasyonu sağlanan plastik bloklardan elmas bıçakla ultramikrotom (Leica Ultracut UCT, Leica Microsystems GmbH, Almanya) yardımı ile 0,5 µm kalınlığında cam lam üzerine alınarak %1'lik toluidin mavisi + %0,2'lik sodyum borate çözeltisi ile boyandı (Şekil 8). Boyanan yarı ince kesitlerde ışık mikroskopunda miyelinli akson sayısı, akson alanı ve miyelin kılıf kalınlığı ölçümleri stereolojik metotlar kullanılarak yapıldı.



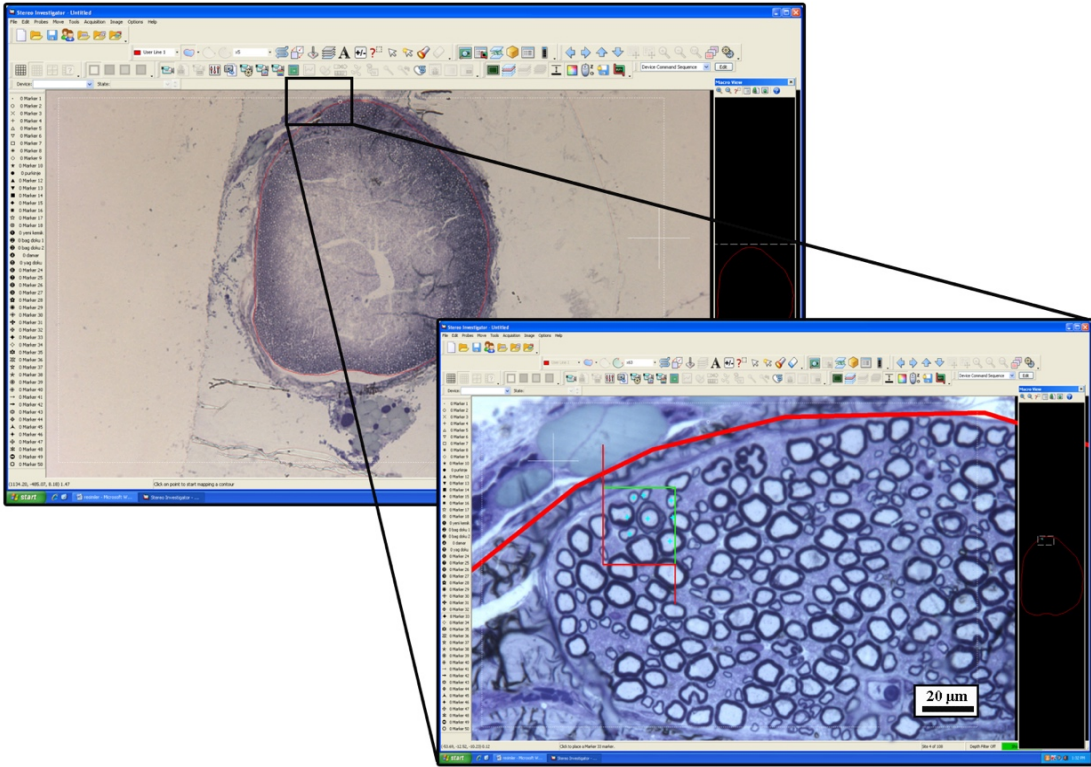
Şekil 8. Resimde kesitlerin alındığı ultramikrotom (A.) kesitlerin su üzerindeki görüntüsü (B.) toluidine mavisi ile periferik sinirin boyanması (C.) görülmektedir

3.4.2. Stereolojik Analizler

Yarı ince kesitlerin incelenmesi için kesitler toluidine mavisi boyasıyla boyandı. Toluidine mavisi asidik doku bileşenlerine karşı yüksek afinite gösteren bazik tiazin metakromatik bir boyadır (Sridharan ve Shankar, 2012). Bunun için lam üzerine yerleştirilmiş bir su damlası üzerine alınan kesitler hot plate üzerine yerleştirilip kurumaya bırakıldı. Ardından doku üzerine %1'lik toluidine mavisi ve sodyum borat karışımı (1 gr toluidine mavisi+2 gr $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ + 100 ml dH_2O) damlatılarak hot plate üzerinde 2-3 dakika boyunca bekletildi. Sürenin ardından lamlar distile suya daldırılarak dokular üzerindeki fazla boya akıtıldı. Elde edilen yarı ince kesitler ışık mikroskobu yardımıyla Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunan bilgisayar destekli stereoloji çalışma istasyonunda (Stereoinvestigator 9.0. MicroBrieldField; Colchester; USA) analiz edildi. Miyelinli akson sayımı için parçalama metodu kullanıldı. Miyelin kılıf kalınlığı ölçümü gene parçalama metodunu takiben kullanılan nükleator metodu ile yapıldı. Bu yöntemlerin uygulanabilmesi için fasikülün etrafı 5'lik büyütmede

çevrelendi. Çevrelenen alanın dahilinde; pilot çalışma sonucu elde edilen örnekleme uygun biçimde parçalama yöntemi uygulandı. Seçili alanların içerisinde 63'lük büyütmede tarafsız sayım çerçevesi yardımıyla miyelinli akson sayımı yapıldı (Şekil 9). Bunun için 60 µm x 60 µm adım aralığı ve 25 µm x 25 µm tarafsız sayım çerçevesi ölçüleri kullanıldı. Dolayısıyla parçalama metodu gereğince her 3600 µm²'lik alandan 625 µm²'lik bir alan örneklenmiş oldu. Ayrıca sayım yapılan her adımda tarafsız sayım çerçevesinin sağ üst köşesine değen en büyük çaplı aksonda nükleatör metoduyla akson alanı ve miyelin kılıf kalınlığı ölçümü yapıldı. Sayım sonucunda elde edilen değerler yardımıyla toplam miyelinli akson sayısının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Toplam miyelinli akson sayısı} = \frac{3600}{625} \times \text{Sayı} \times \text{Örneklenen Alan} \times \text{Alan}_{\text{Fasikül}} \times \sum \text{TanecikSayılan}$$



Şekil 9. Stereoinvestigator yazılımı kullanarak x5 büyütmede çevrelenmiş bir periferik sinir görüntüsü. Parçalama yönteminin uygulanması için atanmış sayım çerçevesi, çerçeve içerisinde sayılmış miyelinli aksonlar, akson alanı ve miyelin kılıf kalınlığını ölçümünü sağlayan nükleatör metodunun uygulanma şekilleri gösterilmektedir.

3.5. İstatiksel Analiz

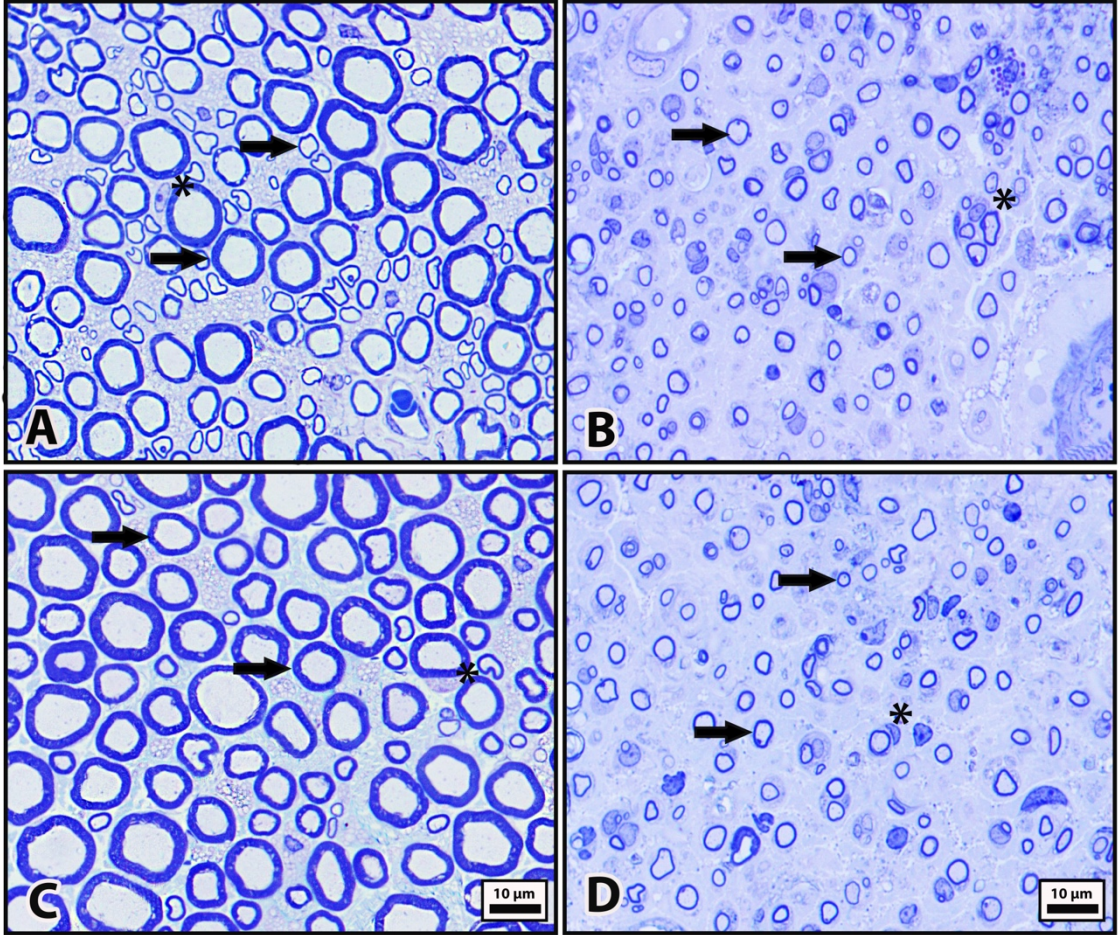
Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 21.0 for Mac (IBM Corporation) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında 0,05 anlamlılık derecesi (p) baz alınarak One Way ANOVA (Tukey Post-Hoc Test) testi kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Miyelinli Akson Sayısı

Gruplara ait periferik sinirlerin ışık mikroskobu altında toluidin mavisi ile boyanmış görüntüleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 10).

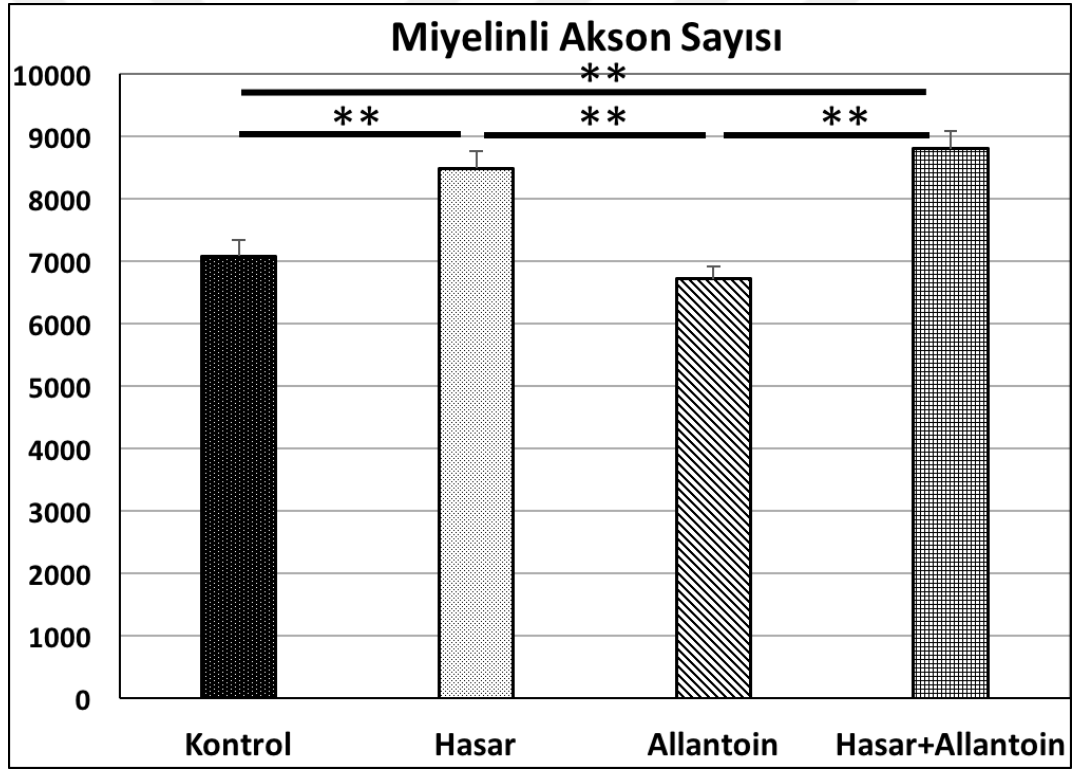


Şekil 10. (A.) Kontrol (B.) Hasar (C.) Allantoin (D.) Hasar+Allantoin, ok: miyelinli aksonları, (*): miyelini oluşturan Schwann hücrelerini göstermektedir

Miyelinli akson sayısı bakımından istatistiksel olarak; K ile HA grupları arasında ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$). H ile A grupları arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0,05$). H ile HA grupları arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p > 0,05$). K ile A grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Ayrıca; A ile HA grupları arasında da anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$) (Tablo 2) (Şekil 11).

Tablo 2. Gruplara ait miyelinli akson sayıları (OSH: Ortalama Standart Hata)

Grup	Miyelinli Akson Sayısı (Ortalama \pm OSH)	Değişim Katsayısı
Kontrol (K)	7083,52 \pm 571,16	0,07
Hasar (H)	8486,60 \pm 618,51	0,06
Allantoin (A)	6718,80 \pm 436,87	0,05
Hasar+Alantoin (HA)	8801,60 \pm 628,68	0,06



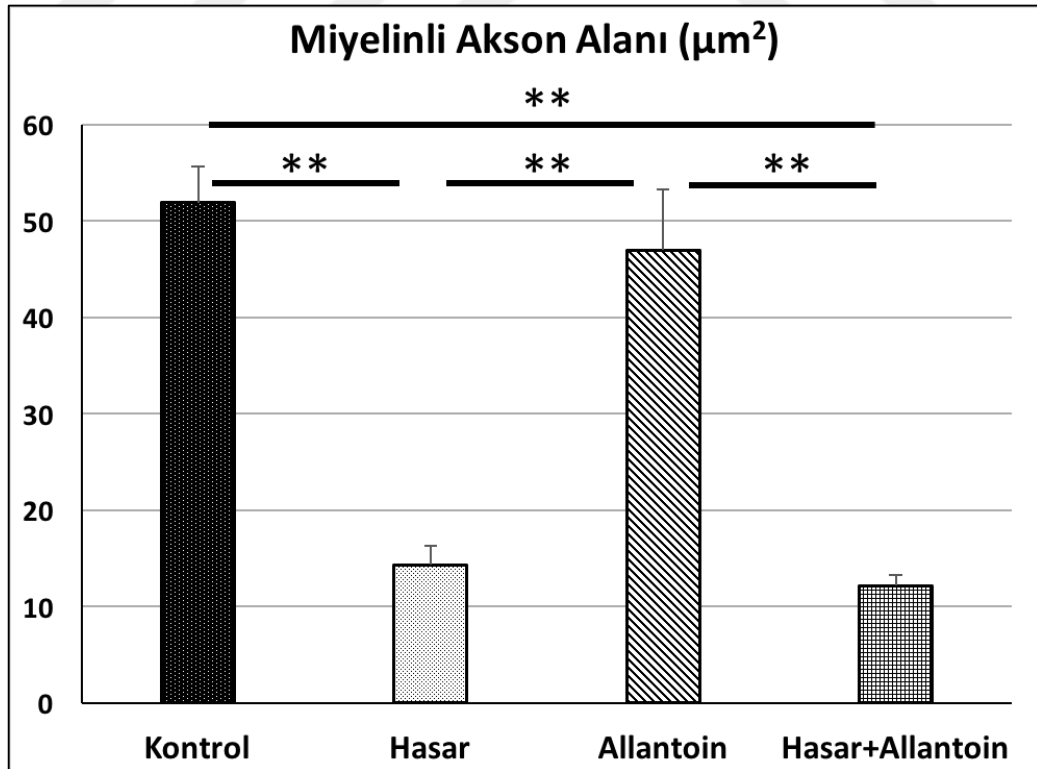
Şekil 11. Gruplara ait miyelinli akson sayısı değerleri (**) $p < 0,01$

4.2. Miyelinli Akson Alanı

Akson alanı bakımından istatistiksel olarak; K ile H grupları arasında ileri derecede ($p<0,01$) ayrıca; H ile A grupları arasında ise anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,05$). K ile A grupları arasında ve A ile HA grupları arasında da anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,01$). H ile A grupları arasında ileri derecede anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,01$). H ile HA grupları arasında ise anlamlı fark gözlemlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 3) (Şekil 12).

Tablo 3. Gruplara ait miyelinli akson alanı değerleri (OSH: Ortalama Standart Hata)

Grup	Miyelinli Akson Alanı (μm^2) (Ortalama \pm OSH)	Değişim Katsayısı
Kontrol (K)	51,88 \pm 3,79	0,06
Hasar (H)	14,32 \pm 1,91	0,11
Allantoin (A)	46,96 \pm 6,26	0,11
Hasar+Allantoin (HA)	12,16 \pm 1,09	0,08



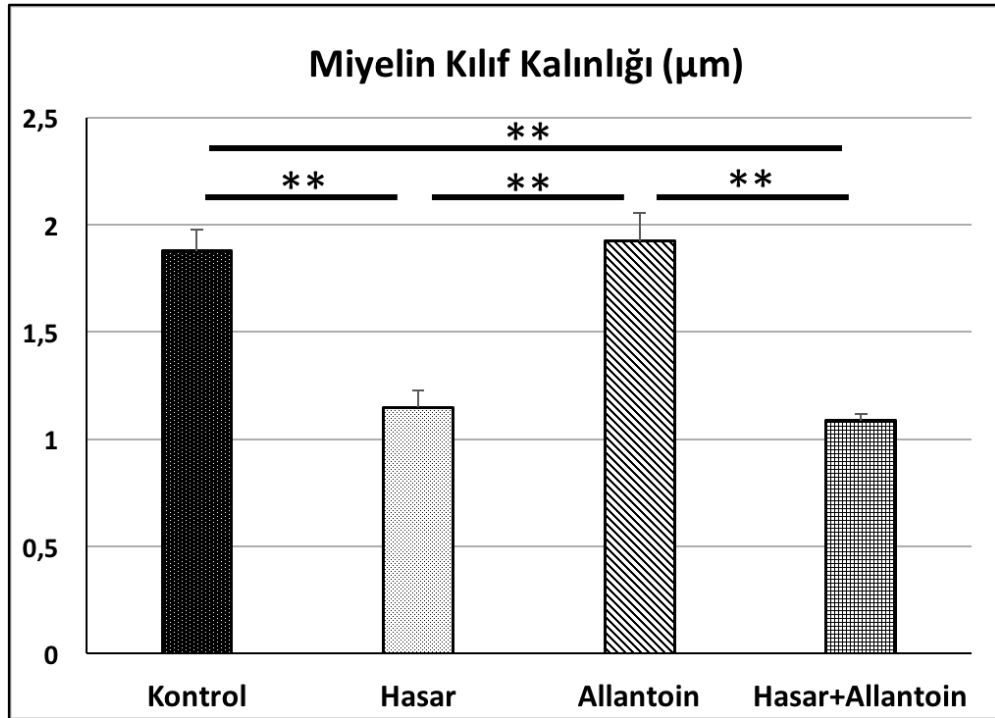
Şekil 12. Gruplara ait miyelinli akson alanı değerleri (**) $p<0,01$

4.3. Miyelin Kılıf Kalınlığı

Miyelin kılıf kalınlığı bakımından istatistiksel olarak; K ile H grupları arasında ileri derecede ($p<0,01$), ayrıca H ile A grupları arasında ise anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,05$). K ile A grupları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) A ile HA grupları arasında ise ileri derecede anlamlı fark gözlemlendi ($p>0,05$). Buna karşın; H ile A grupları arasında ileri derecede anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,01$). H ile HA grupları arasında ise anlamlı fark gözlemlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 4) (Şekil 13).

Tablo 4. Gruplara ait miyelin kılıf kalınlığı değerleri (OSH: Ortalama Standart Hata)

Grup	Miyelin Kılıf Kalınlığı (μm) (Ortalama \pm OSH)	Değişim Katsayısı
Kontrol (K)	1,87 \pm 0,1	0,04
Hasar (H)	1,14 \pm 0,08	0,06
Allantoin (A)	1,92 \pm 0,13	0,06
Hasar+Allantoin (HA)	1,08 \pm 0,03	0,03



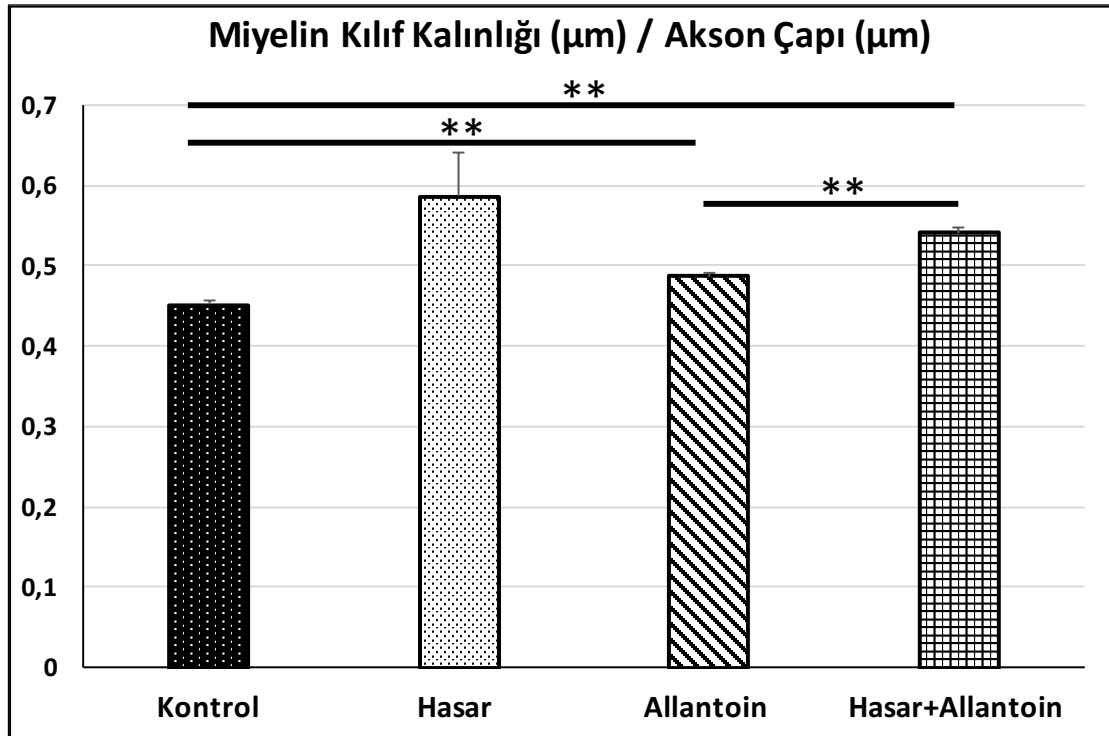
Şekil 13. Gruplara ait miyelin kılıf kalınlığı değerleri (**) $p<0,01$

4.3. Miyelin Kılıf Kalınlığı/Akson Çapı Oranı

Miyelin kılıf kalınlığının akson çapına olan oranı bakımından istatistiksel olarak; K ile A grupları arasında ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Aynı şekilde; K ile HA grupları arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,05$). Ayrıca; A ile HA grupları arasında da ileri derecede anlamlı fark tespit edildi ($p<0,01$). H ile HA grupları arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 5) (Şekil 14).

Tablo 5. Gruplara ait miyelin kılıf kalınlığı/akson çapı değerleri (OSH: Ortalama Standart Hata)

Grup	Miyelin Kılıf Kalınlığı (μm) /Akson Çapı (μm) (Ortalama \pm OSH)	Değişim Katsayısı
Kontrol (K)	0,45 \pm 0,004	0,01
Hasar (H)	0,58 \pm 0,054	0,18
Allantoin (A)	0,48 \pm 0,004	0,01
Hasar+Allantoin (HA)	0,54 \pm 0,007	0,02



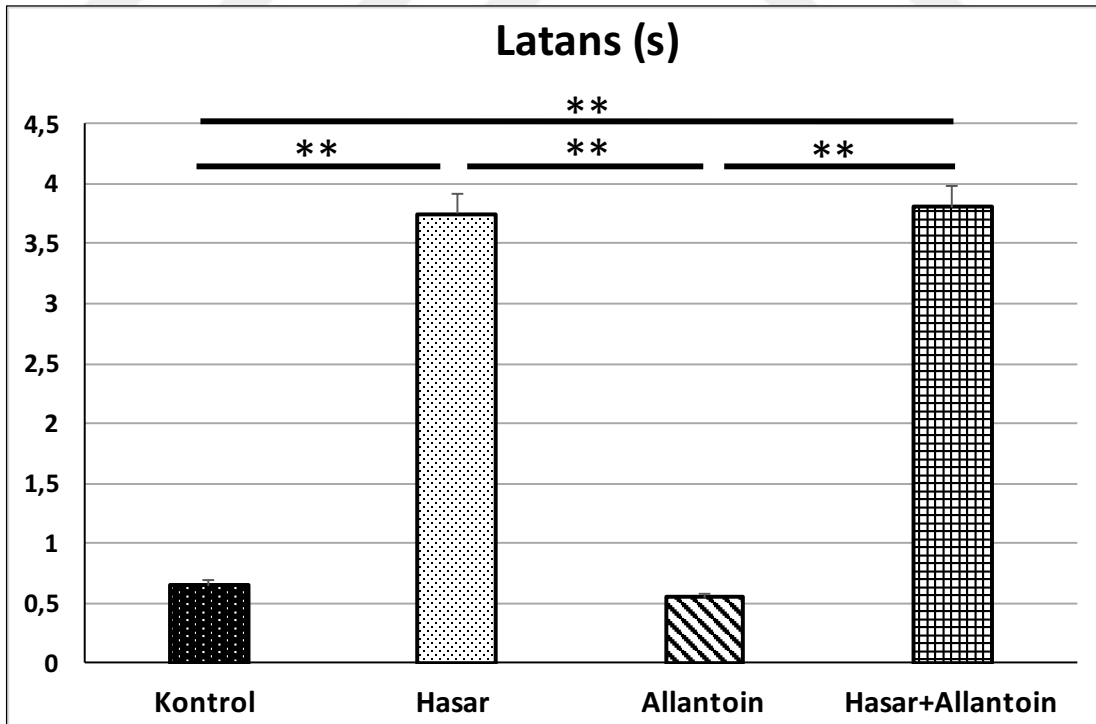
Şekil 14. Gruplara ait miyelin kılıf kalınlığı/akson çapı değerleri (**) $p<0,01$

4.4. Birleşik Aksiyon Potansiyeli Latansı

Latans değerleri bakımından istatistiksel olarak; hem K ile H grupları arasında ileri derecede anlamlı fark ($p < 0,01$), hem de H ile A grupları arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0,05$). K ile A grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken ($p > 0,05$), A ile HA grupları arasında fark gözlemlendi ($p < 0,01$). Son olarak H ile HA grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$) (Tablo 6) (Şekil 15).

Tablo 6. Gruplara ait latans değerleri (OSH: Ortalama Standart Hata)

Grup	Latans (s) (Ortalama \pm OSH)	Değişim Katsayısı
Kontrol (K)	0,64 \pm 0,04	0,14
Hasar (H)	3,75 \pm 0,16	0,08
Allantoin (A)	0,54 \pm 0,03	0,12
Hasar+Allantoin (HA)	3,80 \pm 0,17	0,09



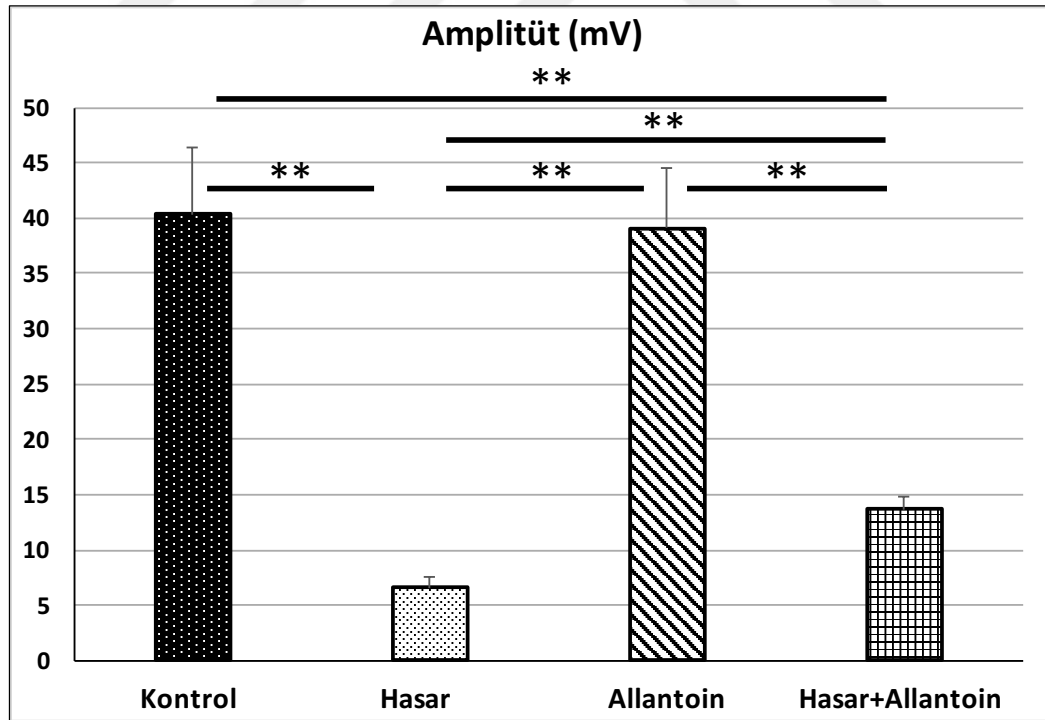
Şekil 15. Gruplara ait latans değerleri (**) $p < 0,01$

4.5. Birleşik Aksiyon Potansiyeli Amplitüdü

Amplitüt değerleri bakımından istatistiksel olarak; K ile H grupları arasında ve H ile A grupları arasında ileri derecede anlamlı fark vardı ($p<0,01$). K ile A grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Son olarak H ile HA grupları arasında da ileri derecede anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,01$) (Tablo 7) (Şekil 16).

Tablo 7. Gruplara ait amplitüt değerleri (OSH: Ortalama Standart Hata)

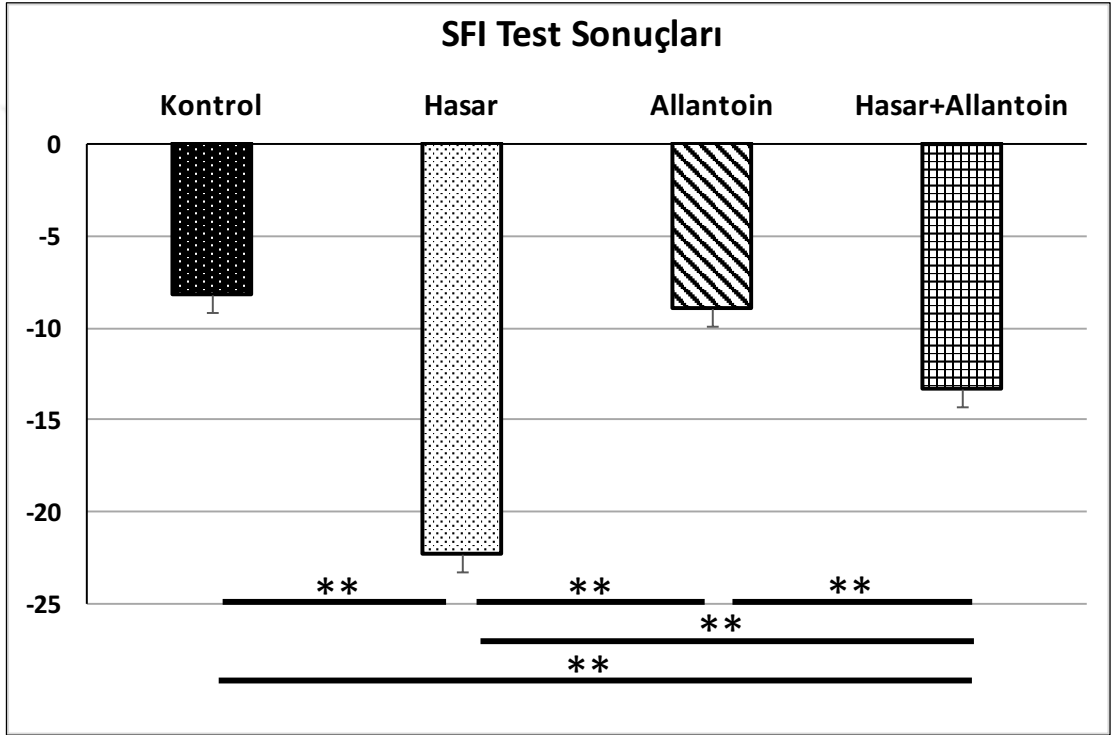
Grup	Amplitüt (Ortalama \pm OSH)	Değişim Katsayısı
Kontrol (K)	40,31 \pm 6,06	0,13
Hasar (H)	6,58 \pm 1,05	0,14
Allantoin (A)	39,05 \pm 5,48	0,12
Hasar+Allantoin (HA)	13,72 \pm 1,15	0,05



Şekil 16. Gruplara ait amplitüt değerleri (**) $p<0,01$

4.6. SFİ Test Sonuçları

SFİ değerleri bakımından istatistiksel olarak; hem K ile H grupları arasında ($p<0,01$) hem de H ile A grupları arasında anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,05$). K ile A grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Hem A ile HA grupları arasında hem de H ile A grupları arasında ileri derecede anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,01$). Son olarak H ile HA grupları arasında da ileri derecede anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p<0,01$) (Şekil 17).



Şekil 17. Gruplara ait SFİ test değerleri (**) $p<0,01$

5. TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları pratikte çoğunlukla travmaya bağlı olarak gelişmekle birlikte buna neden olan etyolojik faktörler değişkenlik göstermektedir. Bu hasarlar künt veya penetran yaralanmalara bağlı olarak açığa çıkabileceği gibi, kompresyona bağlı olarak, akut ve kronik olarak da gelişebilir. Periferik sinir yaralanmaları motor, duysal ve otonom fonksiyonlarının tek tek veya hepsinin kaybına neden olabilmektedir (Sunderland, 1974). Bununla birlikte; travmatik sinir yaralanmaları impuls iletimini bozar. Bu durum duyu sinirlerinin yaralanmalarında duyu bozuklukları hipoestezi, parestezi ve hiperestezi ile kendini gösterirken; motor sinir hasarında, çizgili kaslarda güç kaybı ve atrofi oluşur (Sunderland, 1974).

Periferik sinirin rejenerasyon yeteneği ve denerve pozisyonundaki hedefleri yeniden inerve edebildiği yüzyılı aşkın bir süredir bilinmektedir. Mikrocerrahi tekniklerinin önemli avantajlarının yanı sıra tamamen fonksiyonel geri kazanım olguları oldukça azdır ve rejenerasyon mekanizması aydınlatılamamıştır (Gordon ve ark., 2003). Sinir hasarı sonrasında “Wallerian bozulması” olarak bilinen aktif, kompleks ve multiselüler bir süreç başlar. Ortamdaki Schwann hücreleri progenitor benzeri hücelere farklılaşarak ve çoğalarak ortama çağırılmış olan makrofajlar ile beraber akson ve miyelin kalıntılarını ortamdaki uzaklaştırırlar. Bu cevap güçlü bir inflamatuvar cevabın sonucunda gerçekleşir ve bunun sayesinde çok sayıda inflamatuvar hücreler sinire giriş yapar. Bu süreç hasarın proksimal kısmında ve distal kısım boyunca gerçekleşir. Aksonlar; hasarlı alandan, bazal laminalarında kalan ve aksonları orijinal hedef dokularına doğru yönlendiren progenitor benzeri Schwann hücrelerinden oluşmuş tüpleri kullanarak, hasarın tersi yönünde yeniden büyürler (Cattin ve Lloyd, 2016).

Allantoin ürik asit metabolizmasının oksidasyon ürünü olarak ortaya çıkmanın yanı sıra birkaç bitki çeşidinde de bulunmaktadır ve son zamanlarda kimyasal olarak kolayca sentezlenebilmektedir. Nekrotik dokuyu ortadan kaldırma, hücre çoğalmasını artırma ve analjezik özelliğinden dolayı farmakolojik ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır. Ayrıca çalışmalarda, allantoinin opioid reseptörlerini ve ATP-bağımlı kapp BETA kanallarının aktivasyonu aracılığıyla antinflamatuvar ve periferik antinosiseptif etkileri olduğu bilinmektedir (Florentino ve ark., 2016).

Lee ve ark. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada astım hastalarına uygulanan allantoinin olumlu etkisi sonucunda; bronkoalveolar sıvıda, İmmunoglobulin E (Ig E)

ve İnterlökin-4 (IL-4), İnterlökin-5 (IL-5) gibi T-helper-2 tip sitokinlerin seviyesinde önemli bir azalma gösterilmiştir. Ek olarak; allantoin tedavisi görmüş hastalarda sitokin mikro Ribo Nükleik Asit (mRNA) ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla bir azalma görülmüştür.

Ayrıca bu çalışmada; allantoinin inflamatuvar hücrelerin kemotaksisini inhibe ederek ve böylece oksidatif stresten sorumlu reaktif ajanların salınmasını engelleyerek inflamatuvar cevabı dengelediği öne sürülmüştür. Başka bir çalışmada ise; allantoinin fibroblast çoğalmasını ve extraselüler matriksi attirıcı etkisine dikkat çekilmiştir (Lee ve ark., 2010).

Periferik sinir rejenerasyonu sırasında hasar bölgesinde oluşan inflamatuvar cevap rejenerasyon mekanizmasının aydınlatılması doğrultusunda birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Bizim çalışmamızda da allantoinin periferik sinir rejenerasyona olan etkisi olası anti-inflamatuvar cevabından yola çıkılarak araştırıldı.

Periferik sinir rejenerasyonunun mekanizmasının anlaşılması çalışmalarında fonksiyon, elektrofizyolojik, protein ve mRNA analiz testlerinin yanı sıra morfolojik veriler de sıklıkla tercih edilir. Bu tür çalışmalarda periferik sinir rejenerasyonu miyelinli akson sayısı, akson çapı, miyelin kılıf kalınlığı ve g-oranı gibi kriterler değerlendirilir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada periferik sinirdeki rejenerasyon kapasitesi morfolojik verilere dayalı stereolojik yöntemlerle ortaya konulmaya çalışılmıştır (Maxwell ve ark., 2015). Bununla birlikte, morfolojik çalışmalar fonksiyonel geri kazanımın anlaşılması konusunda yeterli olmadığı için stereolojik metodların yanı sıra elektrofizyoloji ve SFİ testlerinin de yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada allantoinin periferik sinir rejenerasyonuna olan etkisi stereolojik, elektrofizyolojik ve fonksiyonel testler yardımıyla ölçülmüştür.

Yapılan bir çalışmada allantoinin; imidazolin reseptörlerinin (özellikle I₂ alttipinin) agonisti olduğu gösterilmiştir (Lin ve ark., 2012). İmidazolin (I) reseptörleri I₁-I₂ ve I₃ olmak üzere en az üç alt tip olacak şekilde sınıflandırılmıştır. İmidazolin (I) reseptörlerinin aktivasyonu metabolik hastalıkları azaltmaktadır. Allantoin I₂ reseptörlerine bağlanıp glukoz seviyesinin düzenlenmesinde aktif rol almaktadır (Chen ve ark., 2012). Bu bilgiler ışında Yang ve ark. (2012), yaptıkları bir çalışmada bitkilerde ve yiyeceklerde fazla miktarda bulunan allantoinin I₁ reseptörlerini uyararak plazma kan basıncı ve yağ seviyesini azaltma etkisi olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamız miyelin

kılıf kalınlığı açısından değerlendirildiğinde; sadece hasar uygulanmış ve hasar sonrası allantoin uygulanmış olan gruplar arasında anlamlı bir fark çıkmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Allantoin uygulanmış ratlarda plazmadaki lipit ve glukoz seviyesindeki muhtemel azalma miyelin kılıf için gerekli olan yeterli protein ve lipit içeriğinin karşılanamamasına neden olduğu ve bundan dolayı miyelin kılıf onarım sürecine etki etmediği düşünülmektedir. Buna paralel olarak; çalışmamızda latans süreleri açısından H ve HA grupları arasında anlamlı bir fark çıkmaması iki grup arasında miyelin kılıf kalınlıkları açısından anlamlı bir fark olmamasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Hasar sonrasında kan - sinir bariyerinin tekrar oluşturulması ve daha sonrasında ise dejenerasyonla ilgili hücresele değişiklikler başlar. Kan-sinir bariyeri, kan beyin bariyerinde olduğu gibi penceresiz endotel hücrelerin oluşturduğu sıkı bağlantılardan oluşur ve bu yapı kandan sinir dokusuna protein, hormon, iyonlar ve toksik maddelerin geçişini kısıtlar (Olsson, 1968; Weerasuriya ve Mizisin, 2011). Kan-sinir bariyeri hasar alanında her ne kadar zarar görmüş olsa da akson dejenerasyonu başlayana kadar sinir boyunca görevini yapmaya devam eder. Dejenerasyon sonrası en az dört hafta boyunca hasarın distal kısmında bu bariyer kısmısal olarak geçirmezlik özelliğini koruyamaz (Popovich ve ark., 1996). Hasar sonrası maksimum geçirgenlik; normal sinir geçirgenliğinin iki katı kadar olup hasarın 4-7 gün sonrasında olur ve bu olay da inflamatuvar yanıtın maksimum düzeye çıkması ile sonuçlanır (Weerasuriya ve Hockman, 1992; Gray ve ark., 2007). Kan-sinir bariyerinin artan geçirgenliği; kanla taşınarak onarımı gerçekleştirebilen hücrelerin ortama girmesini kolaylaştırır. Perinöral sinir-kan bariyer geçirgenliği; hasar sonrası iki haftadan sonra azalmaya başlar ve ikinci bir artış hasardan dört hafta sonra gerçekleşir ve süreklilik gösterir. Bu ikinci artış Wallerian bozulması ardından kaybolan homeostaziye geri kazanmak için gereken değişiklikler için uygun ortam hazırlar (Mizisin ve Weerasuriya, 2011). Çalışmamızda kullanılan deneklerde beklenen rejeneratif etkinin zayıf olmasının dört hafta sonrasında gerçekleşecek olan ikinci güçlü inflamatuvar cevabın eksikliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kahraman ve Kahveci (2015), yaptığı bir çalışmada polytetrafluoroethylene ve extractum cepae-heparin- allantoin jel kullanımının periferik sinir hasar sonrası oluşan fibrotik dokunun onarımında olumlu etki gösterdiği ve fonksiyonel geri kazanımı

arttırdığı görülmüştür. Makroskobik incelemelerde ise ekstra-nöral yara dokusunun ve adhezyonun arttırmasına rağmen yara iyileşmesinde herhangi bir etkisi gözlemlenmemişken fonksiyonel geri kazanımı arttırdığı tespit edilmiştir (Beuth ve ark., 2006). Çalışmamızda da i.p. olarak uygulanan allantoinin akson sayısı, miyelin kılıf kalınlığı ve akson çapı gibi parametreler üzerinde etki göstermemesine rağmen birleşik aksiyon potansiyeli amplitüdünü arttırması ve fonksiyonel geri kazanımı sağlaması yönünden bahsedilen çalışmayı destekler sonuçlara ulaşılmıştır. Diğer bir olasılık ise kullanılan allantoin dozunun fonksiyonel iyileşme için yeterli olduğu ancak morfolojik bir etki görülmesi için yeterli doza ve iyileşme sürecine ulaşamadığı düşünülmektedir.

Hasar sonrası epinöral ve endonöral yaralanma dokusu sinirde akson rejenerasyonunun inhibe edilmesi ve iletimde tıkanıklığa yol açabilmektedir. Normal sinir dokusunda; kollajenin büyük bir kısmı epinöryumdaki fibroblastlar tarafından sentezlenir. Sinirin hasarlı alanlarında bir fibroblast birikimi olur ve buna bağlı olarak hasarlı alanda travmaya cevap olarak kollajen sentezinde artma gerçekleşir. Diğer organ sistemlerinde olduğu gibi bu kollajen oluşumu doku dayanıklılığında azalmaya ve bu da mekanik fonksiyon bozukluğuna neden olur (Beuth ve ark., 2006).

Gene aynı çalışmada fibroblast kültürleri (skar, keloid ve embriyolojik) ile ilgili yapılan çalışmada extractum cepae-heparin-allantoin (EHA) bileşenleri içeren karışımın keloid fibroblast miktarını azalttığı ve dermal fibroblastları maksimum düzeyde inhibe ettiği görülmüştür. Deneysel çalışmalarda patolojik kollajen sentez inhibisyonunun normal dokudaki kollajen üzerinde herhangi bir etkiye yol açmadığı gösterilmiştir. EHA'nın histolojik olarak kollajen polimerizasyonunu inhibe ettiği ve yara dokusunda kollajen restorasyonunu kolaylaştırdığı bulunmuştur. Yeni oluşmuş yara dokusunda kullanıldığında, kollajen yapısının güçsüzleştiği ve gereğinden fazla kollajen polimerizasyonun önlendiği görülmüştür (Beuth ve ark., 2006).

Sinirsel iletim hızı, bu çalışmada elektrofizyolojik analiz olarak kullanılmıştır. Çok fazla hasarlı akson olmasına rağmen, yeni oluşan aksonların sinir iletiminde artışa neden olabileceği düşünülmektedir. HA grubundaki amplitüt artışı bu gruptaki miyelinsiz aksonların sayılarının H grubuna göre daha fazla olabileceğini akla getirmektedir. HA grubunda amplitütte gözlenen artışın latans değerlerinde gözlenmemesi bu gruptaki miyelinizasyonun diğer grup değerlerinden farksız

olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu çalışmada, gruplar arasında miyelinizasyon açısından bir fark gözlenmemesi latans değerleri arasında fark görülmemesine neden olmuş olabilir.

Kanaya ve ark. (1996), akson sayısındaki artışın rejenerasyona olan etkisinin olumlu olarak değerlendirilebilmesi için SFİ değerleriyle örtüşmesi faktörünü değerlendirme için altın standart olarak kabul etmiştir. Bizim çalışmamızda buna ters olarak SFİ değerleri miyelinli akson sayısıyla örtüşme göstermemesine karşın SFİ değerleri elektrofizyolojik testlerle örtüşme göstermiştir. Bunun sayımda göz önünde bulundurulmayan miyelinsiz aksonların fonksiyona olan etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1-Ratlarda siyatik sinir hasarı, allantoinin deneysel sinir rejenerasyonu üzerine olan etkileri, miyelinli akson sayıları, akson alanı ve miyelin kılıf kalınlığı gibi parametreler açısından güvenilir, tarafsız ve etkin değerlendirme yöntemlerinden olan stereolojik metotlar kullanılarak ve ayrıca elektrofizyolojik testlerle değerlendirildi.

2-Çalışma sonuçlarımız göstermektedir ki; allantoin akut dönemde periferik sinir rejenerasyonuna morfolojik anlamda etki etmemekle beraber fonksiyonel bir iyileşmeye neden olabilmektedir.

3-Allantoinin morfolojik anlamda etki etmemesi, rejenerasyon için 30 günlük bir sürenin ya da kullanılan dozun (10 mg/kg) rejenerasyon için yetersiz kalmasından kaynaklanmış olabilir.

4-Sonuç olarak allantoinin daha uzun süreli deney modellerinde test edilerek periferik sinir rejenerasyonuna etkisinin araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Bain J R, Mackinnon S E, Hunter D A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989a; 83: 129-38.
- Bain J R, Mackinnon S E, Hunter D A. Functional-Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1989b; 83: 129-136.
- Beuth J, Hunzelmann N, Van Leendert R, Basten R, Noehle M, Schneider B. Safety and efficacy of local administration of contractubex to hypertrophic scars in comparison to corticosteroid treatment. Results of a multicenter, comparative epidemiological cohort study in Germany. *In Vivo* 2006; 20: 277-83.
- Burnett M G, Zager E L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* 2004; 16: E1.
- Cattin A L, Lloyd A C. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2016; 39: 38-46.
- Chan R J, Mann J, Tripcony L, Keller J, Cheuk R, Blades R, Keogh S, Poole C, Walsh C. Natural oil-based emulsion containing allantoin versus aqueous cream for managing radiation-induced skin reactions in patients with cancer: a phase 3, double-blind, randomized, controlled trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; 90: 756-64.
- Chang B, Quan Q, Lu S, Wang Y, Peng J. Molecular mechanisms in the initiation phase of Wallerian degeneration. *Eur J Neurosci* 2016.
- Chen M F, Yang T T, Yeh L R, Chung H H, Wen Y J, Lee W J, Cheng J T. Activation of imidazoline I-2B receptors by allantoin to increase glucose uptake into C(2)C(1)(2) cells. *Horm Metab Res* 2012; 44: 268-72.
- Chowdary P D, Che D L, Kaplan L, Chen O, Pu K, Bawendi M, Cui B. Nanoparticle-assisted optical tethering of endosomes reveals the cooperative function of dyneins in retrograde axonal transport. *Sci Rep* 2015; 5: 18059.
- Crooks n n. *Fundamental Neuroscience*. Vol., Place. 1997.
- Demediaceli L, Freed W J, Wyatt R J. An Index of the Functional-Condition of Rat Sciatic-Nerve Based on Measurements Made from Walking Tracks. *Experimental Neurology* 1982; 77: 634-643.
- Draeos Z D. A pilot study investigating the efficacy of botanical anti-inflammatory agents in an OTC eczema therapy. *J Cosmet Dermatol* 2015.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

- Duncan J E, Goldstein L S. The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. *PLoS Genet* 2006; 2: e124.
- Fisher A A. Allantoin: a non-sensitizing topical medicament. Therapeutic effects of the addition of 5 percent allantoin to Vaseline. *Cutis* 1981; 27: 230-1, 234, 329.
- Florentino I F, Silva D P, Galdino P M, Lino R C, Martins J L, Silva D M, de Paula J R, Tresvenzol L M, Costa E A. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice. *J Ethnopharmacol* 2016.
- Gordon T, Sulaiman O, Boyd J G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 2003; 8: 236-50.
- Gray M, Palispis W, Popovich P G, van Rooijen N, Gupta R. Macrophage depletion alters the blood-nerve barrier without affecting Schwann cell function after neural injury. *J Neurosci Res* 2007; 85: 766-77.
- Gundersen H J. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 1986; 143: 3-45.
- Gundersen H J, Bagger P, Bendtsen T F, Evans S M, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard J R, Pakkenberg B, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 857-81.
- Hasegawa T, Kuroda M. [A new role of uric acid as an antioxidant in human plasma]. *Rinsho Byori* 1989; 37: 1020-7.
- Inserra M M, Bloch D A, Terris D J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery* 1998; 18: 119-24.
- Kahraman A, Kahveci R. Evaluating the effect of polytetrafluoroethylene and extractum cepae-heparin-allantoin gel in peripheral nerve injuries in a rat model. *Plast Surg (Oakv)* 2015; 23: 9-14.
- Kanaya F, Firrell J C, Breidenbach W C. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98: 1264-71, discussion 1272-4.
- Lee M Y, Lee N H, Jung D, Lee J A, Seo C S, Lee H, Kim J H, Shin H K. Protective effects of allantoin against ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation in a murine model of asthma. *Int Immunopharmacol* 2010; 10: 474-80.
- Liebig F W v J. Untersuchungen über die Natur der Harnsäure. *Annalen der Pharmacie* 2006; 26: 241-336.
- Lin K C, Yeh L R, Chen L J, Wen Y J, Cheng K C, Cheng J T. Plasma glucose-lowering action of allantoin is induced by activation of imidazoline I-2 receptors in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metab Res* 2012; 44: 41-6.

- Lodish H B A, Zipursky. *Molecular Cell Biology*. 2000.
- Margraf H W, Covey T H, Jr. A trial of silver-zinc-allantoinate in the treatment of leg ulcers. *Arch Surg* 1977; 112: 699-704.
- Maxwell W L, Bartlett E, Morgan H. Wallerian degeneration in the optic nerve stretch-injury model of traumatic brain injury: a stereological analysis. *J Neurotrauma* 2015; 32: 780-90.
- Mizisin A P, Weerasuriya A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol* 2011; 121: 291-312.
- Olsson Y. Topographical differences in the vascular permeability of the peripheral nervous system. *Acta Neuropathol* 1968; 10: 26-33.
- Önger M, 2013. Obez ve nonobez ratlarda bazı nöroprotektif maddelerin periferik sinir rejenerasyonuna etkisi. Vol. PhD, ed.^eds. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, pp. 34.
- Popovich P G, Horner P J, Mullin B B, Stokes B T. A quantitative spatial analysis of the blood-spinal cord barrier. I. Permeability changes after experimental spinal contusion injury. *Exp Neurol* 1996; 142: 258-75.
- Reynolds J L, Urbanchek M S, Asato H, Kuzon W M, Jr. Deletion of individual muscles alters rat walking-track parameters. *J Reconstr Microsurg* 1996; 12: 461-6.
- Robinson W. Allantoin, a Constituent of Maggot Excretions, Stimulates Healing of Chronic Discharging Wounds. *The Journal of Parasitology* 1935; 21: 354-358.
- Ross M. *Histology: A text and Atlas*. Vol., Place. 2006; 867.
- Shestopalov A V, Shkurat T P, Mikashinovich Z I, Kryzhanovskaia I O, Bogacheva M A, Lomteva S V, Prokofev V P, Gus'kov E P. [Biological functions of allantoin]. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 2006: 541-5.
- Sridharan G, Shankar A A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012; 16: 251-5.
- Sunderland S. Mechanisms of cervical nerve root avulsion in injuries of the neck and shoulder. *J Neurosurg* 1974; 41: 705-14.
- Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve* 1990a; 13: 771-84.
- Sunderland S. The Anatomy and Physiology of Nerve Injury. *Muscle & Nerve* 1990b; 13: 771-784.

- Szczygiel B. [Treatment of stubborn wounds with a domestic allantoin]. *Pol Tyg Lek* 1960; 15: 1152-4.
- Terris D J, Cheng E T, Utley D S, Tarn D M, Ho P R, Verity A N. Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel, and phosphate buffered solution. *Auris Nasus Larynx* 1999; 26: 117-22.
- Waller A. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 2008; Vol. 140 (1850): 423-429.
- Weerasuriya A, Hockman C H. Perineurial permeability to sodium during Wallerian degeneration in rat sciatic nerve. *Brain Res* 1992; 581: 327-33.
- Weerasuriya A, Mizisin A P. The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* 2011; 686: 149-73.
- West M J, Slomianka L, Gundersen H J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231: 482-97.
- Yang T T, Chiu N H, Chung H H, Hsu C T, Lee W J, Cheng J T. Stimulatory effect of allantoin on imidazoline I(1) receptors in animal and cell line. *Horm Metab Res* 2012; 44: 879-84.
- Yardim-Akaydin S, Sepici A, Ozkan Y, Torun M, Simsek B, Sepici V. Oxidation of uric acid in rheumatoid arthritis: is allantoin a marker of oxidative stress? *Free Radic Res* 2004; 38: 623-8.

EKLER

EK 1- Etik Kurul Onayı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



Öğrencinin	
Adı Soyadı	: Burcu DELİBAŞ
Numarası	: 12220243
Anabilim Dalı	: Histoloji ve Embriyoloji
Tez Konusu	: Ratlarda Periferik Sinir Rejenerasyonunda Allantoin'in Akut Etkisinin Araştırılması

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Hazırladığım *Yüksek Lisans* tezimin, proje aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet ettiğimi, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, ayrıca Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 22/05/2015 tarih ve 2015/303 sayılı kararı uyarınca tez savunma sınavından önce, tez danışmanım tarafından tezin "kaynaklar" bölümü hariç tamamının intihal kontrol programında (Turnitin) tarandığını, intihal kontrol programı raporlarında benzerlik endeksinin %30'u aşmadığını, taahhüt ederim.

06 /12 /2016
Burcu DELİBAŞ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda adı soyadı, tez konusu yazılı olan, tez danışmanlığını yürüttüğüm öğrencinin tezi tamamlamış olup, tezin; tez savunma sınavı öncesinde Üniversitemiz Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nın "TURNİTİN" programında "kaynaklar" bölümü hariç tamamının tarandığını, intihal kontrol programı raporlarında benzerlik endeksinin 7...
(NEDİ#) olduğu tespit edilmiştir. TURNİTİN PROGRAMINDAN alınan rapor ekte.

06/12 /2016
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Burcu DELİBAŞ

Doğum Yeri: Altındağ/ANKARA

Doğum Tarihi: 1990

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce, İspanyolca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, 2012

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi -2012-Halen

E-posta: burcu.delibas@omu.edu.tr