



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PERİFERİK SİNİR YARALANMASI SIÇAN MODELİNDE
EKSTRASELÜLER MATRİKS VE
BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN
SİNİR REJENERASYONUNA ETKİSİNİN
STEREOLOJİK VE HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

Emine Nazlı HAYIRLI

**HİSTOLOJİ- EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Oya EVİRGEN**

**ANKARA
2017**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PERİFERİK SİNİR YARALANMASI SIÇAN MODELİNDE
EKSTRASELÜLER MATRİKS VE
BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN
SİNİR REJENERASYONUNA ETKİSİNİN
STEREOLOJİK VE HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Emine Nazlı HAYIRLI

HİSTOLOJİ- EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Oya EVİRGEN

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
15L0230008 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
2017

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Periferik Sinir Yaralanması Sıçan Modelinde Ekstraselüler Matriks ve Büyüme Faktörlerinin Sinir Rejenerasyonuna Etkisinin Stereolojik ve Histolojik Olarak İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Emine Nazlı Hayırlı

Tarih: 15.09.2017

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalında Emine Nazlı HAYIRLI tarafından hazırlanan “Periferik Sinir Yaralanması Sıçan Modelinde Ekstraselüler Matriks ve Büyüme Faktörlerinin Sinir Rejenerasyonuna Etkisinin Stereolojik ve Histolojik Olarak İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.09.2017

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiv

1. GİRİŞ

1.1. Sinir Sistemi	1
1.1.1. Sinir Sisteminin Hücreleri	1
1.2. Periferik Sinir Sistemi	2
1.2.1. Periferik Sinirlerin Sınıflandırılması	3
1.3. Periferik Sinir Sistemi Embriyolojisi	3
1.4. Periferik Sinir Histolojisi	7
1.4.1. Miyelinli Sinir Lifleri	8
1.4.2. Miyelinsiz Sinir Lifleri	10
1.4.3. Periferik Sinirin Bağ Doku Kılıfları	11
1.4.3.1. Epinöryum	12
1.4.3.2. Perinöryum	12
1.4.3.3. Endonöryum	13
1.5. Periferik Sinir Hasarı Tipleri	13
1.6. Periferik Sinir Hasarı	14
1.6.1. Wallerian Dejenerasyonu	15
1.7. Periferik Sinir Rejenerasyonunda Schwann Hücrelerinin ve Makrofajların Rolü	17
1.8. Periferik Sinir Rejenerasyonunda Plateletten Zengin Plazma	18
1.9. Sinir İyileşmesinde Kondroitin Sülfat Proteoglikanlar	20

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi	24
2.2. Cerrahi İşlemler	25
2.3. Plateletten Zengin Plazmanın (PRP) Hazırlanması	27
2.4. Kondroitinaz ABC (ChABC) Enziminin Hazırlanması	28
2.5. Değerlendirme Yöntemleri	29
2.5.1. Işık Mikroskopik Değerlendirme	29
2.5.1.1. Dokuların Elde Edilmesi ve Rutin Histolojik Doku Takibi	29
2.5.1.2. Yarı İnce Kesitlerin Değerlendirilmesi İçin Doku Takibi Prosedürü	31
2.5.1.3. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Boyama İşlemleri	31
2.5.2. Stereolojik Analiz	34
2.5.3. Yürüme Yolu Testi ve Siyatik Fonksiyon İndeksi	37
2.6. İstatistiksel Analiz	40

3. BULGULAR	
3.1. Genel Değerlendirme Bulguları	41
3.2. Işık Mikroskopik Değerlendirme Bulguları	45
3.2.1. Deney Grupları Merkez Bölgesi Işık Mikroskop Bulguları	47
3.2.2. Deney Grupları Distal Bölgesi Işık Mikroskop Bulguları	56
3.2.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Bulgular	66
3.3. Stereolojik Analiz Bulguları	69
3.4. Sinir İyileşmesinin Fonksiyonel Analiz Bulguları	71
4. TARTIşMA	73
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	79
ÖZET	80
SUMMARY	82
KAYNAKLAR	84
EKLER	88
Ek-1. Etik Kurul Raporu	88
ÖZGEÇMİş	90

ÖNSÖZ

Periferik sinirler, hasar sonrası rejenere olma kapasitesine sahip olmakla birlikte ortamda bulunan Schwann hücrelerinin, büyüme faktörlerinin ve ekstraselüler matriks elemanlarının birbiriyle etkileşimi iyileşmede önemli rol oynamaktadır. Periferik sinir kesi hasarlarının tedavisinde altın standart kesik sinir uçlarının uç uca getirilerek dikilmesidir ancak sinir iyileşmesini artırma potansiyeline sahip tedavi yöntemlerinin arayışı halen devam etmektedir. Bu amaçla çalışmamızda ekstraselüler matriks elemanlarının sinir iyileşmesini inhibe edici etkisini azaltan kondroitinaz ABC enziminin ve akson büyümesini uyaran çeşitli büyüme faktörlerini içeren plateletten zengin plazma'nın tek tek ve literatürde daha önce denenmemiş kombine uygulamalarının sinir iyileşmesine etkileri araştırıldı. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi tarafından 15L0230008 proje numarası ile desteklenmiştir.

Doktora eğitimimde ve tez çalışmalarımda bilgi birikimi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, yetişmemde büyük emekleri geçen, her konuda bana örnek ve yardımcı olan çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Oya EVİRGEN'e,

Doktora eğitimim boyunca yetişmemde çok emekleri geçen, her zaman destek ve anlayışla yaklaşan Anabilim Dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Alp CAN'a; Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Sn. Prof. Dr. Nurşen SARAÇ'a, Sn. Prof. Dr. Esra ERDEMLİ'ye, Sn. Prof. Dr. Belgin CAN'a, Sn. Prof. Dr. Bizden SABUNCUOĞLU'na, Sn. Prof. Dr. Sevim AYDIN'a, Sn. Prof. Dr. Özgür ÇINAR'a, Sn. Yrd. Doç. Dr. Deniz BİLLUR'a; Anabilim Dalımız emekli öğretim üyeleri Sn. Prof. Dr. Canan AKBAY'a ve Sn. Prof. Dr. Cengiz GÜVEN'e,

Tez çalışmalarım sırasında verdikleri destekten dolayı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniğinden Sn. Uzm.Dr. Erdal Reşit YILMAZ'a ve Doğu Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. N. İlke AKÇAY'a,

Her zaman bana destek ve yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Ferda TOPAL ÇELİKKAN'a, Arş.Gör. İrem İNANÇ'a, Arş. Gör. Rukiye KAYA'ya, Arş. Gör. Dr. Ebru ÇELİK'e, Arş. Gör. Dr. Derya ÖZDEMİR'e, Uzm. Bio. Selda KAHVECİ'ye, Bio. Ceren MUNGAN'a, Bio. Merve SUCU'ya; Anabilim dalı çalışanlarımız Serap BATI'ya, Erdoğan ÇALIŞKAN'a, Abdülkerim DİLBAZ'a ve Remzi ATA'ya,

Doktora bitse de dostluğumuzun hiç bitmeyeceği Yrd. Doç. Dr. Hilal NAKKAŞ'a, Uzm. Bio. Şule KIZIL'a, Vet. Hek. Masoud AFSHANI'ye, Arş. Gör. Pınar BAYRAM'a; can dostlarım Pınar ÖNGÜN ve Aydan YÜCELEN ÖZET'e; çok kıymetli arkadaşım sevgili Oğuzhan ÖZYOL'a

Bu günlere gelmemde her türlü emek ve sabrı gösteren, haklarımı asla ödeyemeyeceğim canım ANNEM'e, BABAM'a ve ağabeylerime,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AAD	Akut Aksonal Dejenerasyon
β	Beta
Ca^{+2}	Kalsiyum iyonu
CaCl_2	Kalsiyum klorit
CH	Kondroitinaz
ChABC	Kondroitinaz ABC
cm	Santimetre
CS	Kondroitin sülfat
CS-4	Kondroitin-4 sülfat
CS-6	Kondroitin-6 sülfat
CSPG	Kondroitin sülfat proteoglikan
δ	Delta
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
dk	Dakika
EG	Embriyonik gün
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAP-43	Growth Associated Protein 43
HE	Hematoksilin-Eozin
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HRP	Horseradish peroxidase
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-8	İnterlökin-8
ITS	Intermediate toe spread
IU	Uluslararası birim “international unit”
JAK-STAT	The Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram

Krox20	Early growth response protein-2
λ	Lamda
μm	Mikrometre
MA	Mallory Azan
MAPK	Mitojenle aktifleşen protein kinaz
mg	Miligram
mm	Milimetre
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NIF	Nörit inhibitör faktör
nm	Nanometre
NG2	Nöral glial antijen-2
OsO4	Osmiyum tetroksit
PBS	Fosfat tamponlu salin
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PG	Proteoglikan
PL	Print length
PRP	Plateletten Zengin Plazma- Platelet-Rich Plasma
PSH	Periferik sinir hasarı
PSS	Periferik sinir sistemi
rpm	Rounds per minute
SFI	Siyatik fonksiyon indeksi
Sox-10	SRY-related HMG-box 10
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TS	Toe spread
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü- β
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Nöral Plak, Nöral oluk ve Nöral katlantıların oluşumu.	4
Şekil 1.2. Nöral tüp ve nöral krestin oluşumu.	5
Şekil 1.3. Miyelinizasyon.	8
Şekil 1.4. Miyelinli sinir lifi elektron mikroskop görüntüsü.	9
Şekil 1.5. Miyelin Kılıf.	10
Şekil 1.6. Miyelinsiz Sinir Lifleri.	11
Şekil 2.1. a) Cilt kesisi yapılırken ve b) süperfisyal biceps femoris kasına kesi yapıldıktan sonraki görünüm	26
Şekil 2.2. a) Diseksiyon sonrası açığa çıkan siyatik sinirin görünümü ve b) siyatik sinire kesi yapıldıktan sonraki görünüm	26
Şekil 2.3. Kesi bölgesine PRP uygulamasının yapılışı.	27
Şekil 2.4. PRP'nin kesi bölgesine uygulama öncesi görünümü.	28
Şekil 2.5. Fraksiyonlama probu kullanılarak sayım çerçevelerinin yerleştirilmesi.	36
Şekil 2.6. Nucleator probu ile aksonda ölçümlerin yapılışı.	36
Şekil 2.7. Yürüme yolu testi düzeneği	38
Şekil 2.8. Ayak izlerinde gerçekleştirilen ölçümler	39
Şekil 2.9. Yürüme yolu testinde elde edilen ayak izlerinin görünümü. Kesi hasarı oluşturulan ayakların izleri kırmızı renkli normal ayakların izleri ise mavi renkli olarak görülmekte.	40
Şekil 3.1. 12. Haftada sol arka ekstremitede parmak kaybı.	41
Şekil 3.2. Kondroitinaz (CH) Grubu 12. hafta genel görünüm. Sol arka ekstremitede periferik sinir kesi modeli oluşturuldu, sağ tarafa ise herhangi bir cerrahi işlem yapılmadı.	42
Şekil 3.3. PRP Grubu 12. hafta genel görünüm. Sol arka ekstremitede periferik sinir kesi modeli oluşturuldu, sağ tarafa ise herhangi bir cerrahi işlem yapılmadı.	42

- Şekil 3.4.** CH+PRP Grubu 12. hafta genel görünüm. Sol arka ekstremitede periferik sinir kesi modeli oluşturuldu, sağ tarafa ise herhangi bir cerrahi işlem yapılmadı. 43
- Şekil 3.5.** 12. Hafta kontrol tarafı (sağ) siyatik sinir makroskopik görünüm. 43
- Şekil 3.6.** Deney sonrası 12. hafta sol siyatik sinir makroskopik görünüm. 44
- Şekil 3.7.** Deney sonrası 12. hafta sol siyatik sinir makroskopik görünüm. 44
- Şekil 3.8.** Kontrol dokularına ait ışık mikroskop görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesiti genel görünümü, x10, b) Ok başı: Sağlıklı aksonlar, x40, Hematoksilin-Eozin, c) Kontrol dokusuna ait Mallory Azan boyalı ışık mikroskop görüntüsü. Ok başı: Nörokeratin çatısı belirgin sağlıklı aksonlar. x1000, Mallory Azan 45
- Şekil 3.9.** Kontrol dokularına ait yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x4; b-c) Miyelinli ve miyelinsiz aksonlar, x1000. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, ok başı: miyelinli aksonlar, ince ok: miyelinsiz aksonlar, D: damar. Toluidin mavisi 46
- Şekil 3.10.** Salin (a-b), CH (b-c), PRP (d-e) ve CH+PRP (g-h) grupları merkez bölgesi ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, yıldız: dejenere akson grupları, ok: dejenere aksonlar, ok başı: bağ doku kılıf içerisinde rejenere akson filiz grupları. a, e, g) x4; b) x20; c, f, h) x10; d) x40; Hematoksilin-Eozin. 48
- Şekil 3.11.** Salin (a-b), CH (c-d), PRP (e-f) ve CH+PRP (g-h) grupları merkez bölgesi ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, yıldız: dejenere akson grupları, ok başı: bağ doku kılıf içerisinde rejenere akson filiz grupları. a, e) x4; b) x20; c) x10; d, f, g, h) x40; Mallory Azan. 49
- Şekil 3.12.** Kesi grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x4; b) Dejenere ve normal aksonlar, x40; c) Normal ve dejenere aksonlar ile endonöryumda odaksal dejenerasyon, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi. 51

- Şekil 3.13.** Salin grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü ve komşuluğunda dejenere kas lifleri (yıldız), x4; b) Sağlıklı ve dejenere aksonlar, x100; c) Perinöryumda aksonal filiz grupları, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi. 52
- Şekil 3.14.** CH grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesiti genel görünümü, x4; b) Genişlemiş endonöryum içinde küçük çaplı aksonlar, x100; c) Perinöral bağ dokusunda aksonal filiz grupları, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, En: Endonöryum, Sh: Schwann hücreleri, M: Mast hücresi, ok: dejenere aksonlar, D: damar; Toluidin mavisi. 54
- Şekil 3.15.** PRP grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) İnce miyelinli ve küçük çaplı aksonlar, x100; b) Aşırı miyelinlenmiş dejenere ve küçük çaplı sağlıklı aksonlar ile perinöryumda akson filizleri, x100. P: Perinöryum, Sh: Schwann hücreleri, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi. 55
- Şekil 3.16.** CH+PRP grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x10; b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, En: Endonöryum, Sh: Schwann hücreleri, M: Mast hücreleri, D: Damar, ok: dejenere aksonlar. Toluidin mavisi. 56
- Şekil 3.17.** Kesi (a-b), Salin (c-d) ve CH (e-f) gruplarına ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, ok: dejenere aksonlar. a, e) x20, b, d, f) x100, c) x10; Hematoksilin-Eozin. 57
- Şekil 3.18.** PRP (a-b) ve CH+PRP (c-d) gruplarına ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, ok: dejenere aksonlar. a) x10, b, d) x100, c) x20; Hematoksilin-Eozin. 58
- Şekil 3.19.** Kesi (a-b), Salin (c-d) ve CH (e-f) gruplarına ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar. a, c, d, e, f) x40, b) x100; Mallory Azan 59

- Şekil 3.20.** PRP ve CH+PRP gruplarına ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar. a-d) x40; Mallory Azan 60
- Şekil 3.21.** Kesi grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100, b) Perinöryum içerisinde rejenere akson filiz grupları, x100. P: Perinöryum, D: damar, Sh: Schwann hücresi, M: Mast hücresi, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi. 61
- Şekil 3.22.** Salin grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x4; b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar. Toluidin mavisi. 62
- Şekil 3.23.** CH grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Dejenere aksonlar, x40, b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. P: Perinöryum, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar, ince ok: endonöryumda genişleme ve vakuolizasyon; Toluidin mavisi. 63
- Şekil 3.24.** PRP grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x4, b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi. 64
- Şekil 3.25.** CH+PRP grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Dejenere aksonlar, x40, b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. D: damar, M: Mast hücresi, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi. 65
- Şekil 3.26.** anti-GAP-43 boyaması görüntüleri. a) Kesi Grubu, b) Salin Grubu, c) CH Grubu, d) PRP Grubu, e) CH+PRP Grubu, f) Negatif Kontrol. x100, Hematoksilin zıt boyama. 67
- Şekil 3.27.** anti-S-100 boyaması görüntüleri. a) Kesi Grubu, b) Salin Grubu, c) CH Grubu, d) PRP Grubu, e) CH+PRP Grubu, f) Negatif Kontrol. x100, Hematoksilin zıt boyama. 68

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Tüm gruplara ait miyelinli ve dejenere lif sayıları ortalamaları.	70
Çizelge 3.2. Tüm gruplara ait distal bölge miyelinli lif ölçüm ortalamaları.	71
Çizelge 3.3. Tüm gruplara ait Pre-op, 6. hafta ve 12. hafta SFI değerleri ortalamaları. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. * $p=0.038$, ** $p=0.035$, *** $p<0.05$.	71



1. GİRİŞ

1.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi organların ve organ sistemlerinin aktivitelerini kontrol ve entegre eder ayrıca vücudun, içinde ve dışında sürekli olarak meydana gelen değişimlere yanıt verebilmesini sağlar (Ross ve Pawlina, 2014). Sinir sistemi anatomik olarak (1) merkezi sinir sistemi (MSS) ve (2) periferik sinir sistemi (PSS) olarak ikiye ayrılır. MSS; beyin, omurilik ve gözün nöral bölümünden oluşurken PSS; periferik gangliyonlar, kranial-spinal ve periferik sinirler ile sinir sonlanmalarından meydana gelmektedir (Kierszenbaum ve Tres, 2016).

PSS fonksiyonel olarak impulsları alıp işleme için MSS'ye ileten duyuşal (afferent) bölüm ile MSS'den kaynaklanan impulsları vücut genelindeki efektör organlara ileten motor (efferent) bölüme ayrılmaktadır (Gartner, 2017).

1.1.1. Sinir Sisteminin Hücreleri

Sinir sisteminin hücreleri nöronlar ve nöroglia hücreleri olarak iki kategoride incelenebilir (Gartner, 2017).

Nöronlar sinir sisteminin fonksiyonel birimidir. Şekil ve büyüklük olarak oldukça çeşitlidirler (Ross ve Pawlina, 2014). Çoğu nöron üç belirgin bölümden oluşmaktadır; hücre gövdesi (perikaryon), çok sayıda dendrit ve bir akson. Hücre gövdesi bir nöronun çekirdek ve perinükleer sitoplazmasını içeren merkezi bölümüdür (Gartner, 2017). Perinükleer sitoplazmada bol miktarda granüllü endoplazma retikulumu ve mitokondriyon ile Golgi aygıtı, lizozomlar, mikrotübüller, nörofilamentler, transport vezikülleri ve inklüzyonlar bulunmaktadır. Bu organeller dendritlerin içine uzanabilirler ancak aksonun içine uzanmazlar (Ross ve Pawlina, 2014).

Dendritler diğer sinir hücrelerinden uyarıları alırlar. Çoğu nöron her biri hücre gövdesinden çıkan birden fazla dendrite sahiptir (Gartner, 2017). Aksonlardan daha geniş çapa sahip olan dendritler miyelinsizdirler ve dendrit ağacı adı verilen yoğun dallanmalar oluştururlar (Ross ve Pawlina, 2014).

Her nöronun yalnızca bir aksonu vardır. Hücre gövdesinden çıktıktan sonra çok uzak mesafelere uzanabilirler (Gartner, 2017). MSS'nin motor çekirdeklerindeki nöronlardan çıkan aksonlar efektör hedefleri olan kas hücrelerine erişebilmek için bir metreden fazla yol katedebilirler. Hücre gövdesinden aksonun çıktığı bölgede büyük sitoplazmik organeller bulunmaz ve bu bölgeye akson tepeciği adı verilir (Ross ve Pawlina, 2014). Akson tepeciğinden sonra aksonun ilk 20-60 µm'lik kısmına akson başlangıç segmenti adı verilir ve aksiyon potansiyelini meydana getirir (Letierrier, 2016). Aksonun esas görevi bir diğer nörona ya da kas hücresi gibi efektör bir hücreye bilgi iletmektir (Ross ve Pawlina, 2014).

Nöroglia hücreleri ise iletim yapmayan, nöronlara yakın yerleşimli destek hücreleridir. Fiziksel ve metabolik desteğin yanı sıra düzenleyici kapasiteleri de vardır. Astrositler, oligodendrositler, mikroglia hücreleri ve ependim hücreleri yalnızca MSS'de bulunurken, Schwann hücreleri, satellit hücreleri ve çeşitli organ ya da dokularla ilişkili özelleşmiş hücreler (enterik nöroglia, Müller hücreleri gibi) ise PSS'de bulunan nöroglia hücreleridir (Gartner, 2017, Ross ve Pawlina, 2014).

1.2. Periferik Sinir Sistemi

Periferik sinir sistemi periferik sinirlerden ve MSS dışında yerleşmiş olan hücre gövdelerini içeren gangliyonlardan oluşmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014, Gartner, 2017).

1.2.1. Periferik Sinirlerin Sınıflandırılması

Periferik sinirler lif tipi bileşimlerine göre genel olarak i) duyu ii) motor ve iii) karma sinirler olmak üzere üç ana kategoride sınıflandırılırlar. Bir kaç istisna dışında (VIII. kraniyal sinir ve V. kraniyal sinirin mezensefalik kökü) duyu sinirleri duyu ganglionlarının pseudounipolar nöronlarından kaynaklanırlar. Diğer yandan motor sinir lifleri merkezi sinir sisteminde yerleşik olan somatik ve otonomik motor nöronlardan çıkmaktadırlar. Somatik motor lifler doğrudan hedef iskelet kası liflerine ulaşırken, otonomik sinir lifleri orto ve para-empatik ganglionlarla sinaps yaparak hedef visseral organlara ulaşırlar (Geuna ve ark., 2009).

Duyu ve motor nöronlar çoğunlukla miyelinli sinir liflerinden oluşur. Otonomik sinir sistemine ait olan karma sinirlerin çoğu ayrıca ağrı sinyallerini taşıyan lifleri de içerirler. Duyu ve motor sinirler ile bazı ağrı taşıyan lifler miyelinliken, bazı ağrı taşıyan lifler ve otonomik lifler miyelinsizdir.

Miyelinli sinir lifleri axonlarının çaplarına göre üç ana gruba ayrılırlar ve genellikle $A\alpha$, $A\beta$ ve $A\delta$ lifleri olarak belirtilirler. Miyelinsiz sinir lifleri ise C-lifleridir. Sinir liflerinin iletim hızı aksonlarının çapı ile orantılıdır. Motor sinir lifleri $A\alpha$ gruplarına ve çoğu duyu sinirleri $A\beta$ lif tiplerine ait iken, ağrı lifleri $A\delta$ ve C gruplarına aittir (Møller, 2011)

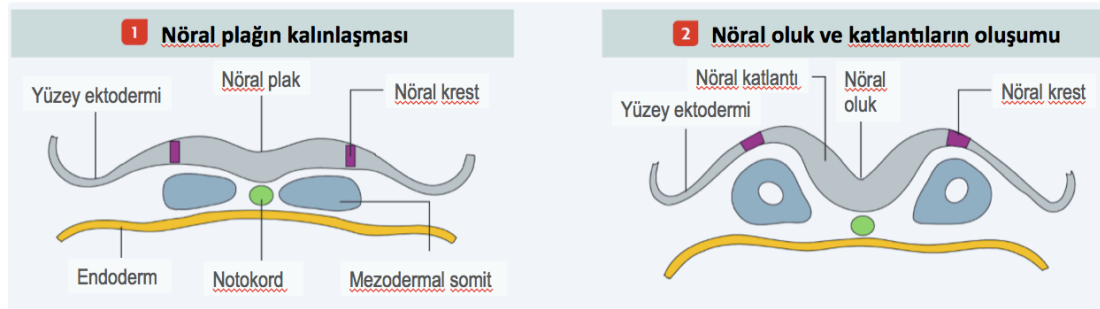
1.3. Periferik Sinir Sistemi Embriyolojisi

Periferik sinirlerin ve periferik sinirleri oluşturan morfolojik yapıların (akson, Schwann hücresi, bağ doku kılıf komponentleri) normal gelişimi vücutta kontrol ettikleri birçok doku, organ ve sistem ile bunların ilişkili olduğu çeşitli homeostatik fonksiyondan dolayı oldukça önemlidir (Kaplan ve ark., 2009).

Embriyonik gelişimin üçüncü haftasında epiblast hücrelerinin çoğalması ve embriyonun orta hattına doğru göçü sonucunda primitif çizgi oluşur. Primitif çizginin kraniyal ucunda hücre çoğalması ile primitif düğüm meydana gelir. Bu esnada primitif çizgide primitif oluk gelişir ve primitif düğümde oluşan bir çöküntü ile devam ederek primitif çukuru oluştururlar (Moore ve Persaud, 2009). Epiblasttan ayrılan hücrelerin bazıları hipoblast hücrelerinin yerini alarak embriyonik endodermi, bazıları da epiblast ile endoderm arasına yayılarak mezodermi meydana getirir. Epiblast içinde kalan hücreler de ektodermi oluşturur.

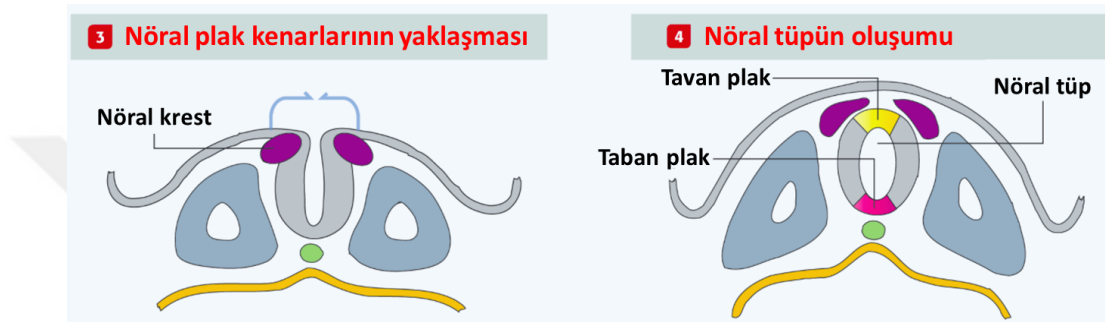
Prenotokordal hücreler notokordal plağı oluşturmak için primitif çizgiden göç ederek önce endoderme yerleşir sonra da kalıcı notokordu oluşturmak üzere endodermden ayrılırlar. Embriyonun orta hat eksenini oluşturan notokord aksiyal iskeletin çatısıdır (Sadler, 2005).

Notokord gelişirken üzerindeki embriyonik ektodermi orta hatta ve hemen kenarlarında kalınlaşmak üzere indükler ve nöral plak oluşur. Nöral plak ektoderminden (nöroektoderm) MSS gelişir (Moore ve Persaud, 2009). Yaklaşık 18. günde nöral plağın lateral kenarları yükselerek nöral katlantıları, bu katlantılar arasında kalan çukur bölüm ise nöral oluğu meydana getirir (Şekil 1.1). Nöral katlantılar en sonunda orta hatta kaynaşarak nöral tüpe dönüşür ve yüzey ektoderminden ayrılır (Moore ve Persaud, 2009, Sadler, 2005).



Şekil 1.1. Nöral Plak, Nöral oluk ve Nöral katlantıların oluşumu.

Nöral katlantılar nöral tüpü oluşturmak üzere birleşirken, her nöral katlantının iç kenarı boyunca uzanan bazı nöroektodermal hücreler epitel ile olan bağlantılarını kaybederler. Nöral tüp yüzey ektoderminden ayrıldıkça nöral krest hücreleri nöral tüp ile üzerindeki ektoderm arasında nöral krest denilen yassı bir hücre kitlesi oluşturur. Nöral krest sonra ikiye ayrılarak nöral tüpün dorsolateraline doğru yer değiştirerek burada spinal ve kraniyal sinirlerin duysal gangliyonlarını oluştururlar (Şekil 1.2) (Sadler, 2005).



Şekil 1.2. Nöral tüp ve nöral krestin oluşumu.

Daha ileri evrelerde duyu gangliyonlarının nöroblastlarından (nöroepitelyal hücrelerden köken alan öncü sinir hücreleri) iki uzantı oluşur. Merkeze doğru gelişen uzantılar nöral tüpün dorsal parçasına gömülür, ya medulla spinalisin arka boynuzunda sonlanırlar ya da marjinal tabaka içinden daha yukarı beyin merkezlerine doğru giderler. Bu uzantılara spinal sinirin dorsal duyu kökü denir (Sadler, 2005). Periferik uzantıları ise spinal sinirlerin içerisinde ilerleyerek somatik ve visseral yapılarda duysal sonlanmalar oluştururlar (Moore ve Persaud, 2009).

Medulla spinalisin bazal plaklarından köken alan motor sinir lifleri 4. haftanın sonunda görülmeye başlar ve medulla spinalisin ventrolateral yüzü boyunca uzanırlar. Lifler gelişen bir kas grubuna yönelerek ventral sinir kökünü meydana getirirler.

Dorsal sinir kökü ile ventral sinir kökü birleşerek spinal sinirini oluşturur (Moore ve Persaud, 2009). Spinal sinir oluştuktan hemen sonra dorsal ve ventral primer ramuslara bölünür. Dorsal primer ramuslar dorsal aksiyel kasları, vertebral eklemleri ve sırtın derisini innerve eder. Ventral primer ramuslar ise ekstremiteleri ve vücut ön duvarını innerve eder ayrıca ana sinir pleksuslarını (kraniyal, brakiyal ve lumbosakral) meydana getirir (Sadler, 2005).

Schwann hücreleri de nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. Nöral krest hücrelerinden Schwann hücrelerinin üretimi için Sox-10 transkripsiyon faktörü gereklidir ve Schwann hücre öncüllerinden immatür Schwann hücreleri oluşur. Bu populasyona ait hücrelerin yaklaşık yarısı büyük çaplı aksonların etrafında miyelin kılıf üretmek üzere ayrılırken diğer yarısı daha küçük çaplı aksonlarla ilişki kurarak miyelin yapmayan Schwann hücreleri haline gelirler. Schwann hücresi oluşumundaki bu son basamak hayat boyu geri dönüşümlüdür. Oluşacak soy aksondan gelen sinyallere şaşırtıcı biçimde bağımlıdır. Gelişimin erken dönemlerinde bu sinyallerin en önemlisi nöroglin-1'dir. Krox-20 transkripsiyon faktörü de Schwann hücrelerinin miyelinizasyon gerçekleştirmesi için vazgeçilmezdir (Jessen, 2004).

Nöral krest hücrelerinden immatür Schwann hücrelerinin gelişimi memeli türlerinde değişkenlik gösterir. Örneğin, ratlarda Schwann hücre öncülleri spinal sinirlerde 14./15. embriyonik günlerde (EG) görülür ve immatür Schwann hücrelerine 17./18. EG'de farklanır. Farelerde bu süreçler ratlardan 2 gün önce gerçekleşir. İnsanda ise siyatik sinirlerde ve genellikle brakial pleksusa ait olan sinirlerde in-utero 12. haftada başlar (Kaplan ve ark., 2009).

İmmatür Schwann hücreleri ile aksonlar arasındaki karşılıklı etkileşimin ilk belirtileri ratların sinirlerinde 17./18. EG'de görülürken farelerde 15./16. EG'de görülür. Daha sonra Schwann hücreleri bir grup aksona sitoplazmik uzantılar göndererek onları gittikçe fasiküller haline getirir ve radyal sınıflandırma süreci başlar. Bu süreç Schwann hücre membranındaki $\beta 1$ integrin reseptörleri ile Schwann hücre bazal laminasında yerleşik olan lamininlerin etkileşimlerine bağlıdır. Bu işlem

esnasında çapı 1µm'den büyük olan aksonların her biri seçici olarak bir immatür Schwann hücresiyle sarılır. Bu süreç büyük çaplı aksonların miyelinizasyonu için gereklidir.

Buna karşılık, miyelin yapmayan Schwann hücreleri çapları 1µm'den küçük olan aksonları çevrelerler. Sinir gelişiminin bu aşamasında akson ve Schwann hücre sayılarının eşleşmesi gereklidir, eğer bu eşleşme gerçekleşmez ise ileri embriyonik evrelerde büyük ölçüde gelişimsel nöronal ölüm gözlenir. Böylece Schwann hücrelerinin nöron sağ kalımını kontrol ettiği öne sürülmektedir. Akson izolasyonunu tamamlandıktan sonra Schwann hücreleri insanda intrauterin yaşamın 14.-16. haftalarında miyelinizasyon sürecine başlarlar (Kaplan ve ark., 2009).

1.4. Periferik Sinir Histolojisi

Periferik sinirler vücudun başından sonuna kadar hemen hemen bütün dokulara ve bütün organlara ulaşan ve onlara motor ve / veya duyuşsal innervasyon sağlayan kompleks organlardır. Parankima (aksonlar ve Schwann hücreleri) ve stroma (çeşitli bağ doku elemanlarından oluşan iskele) bölümleri ayırt edilebilir. Merkezi sinir sisteminden (MSS) çıkan periferik sinirler kranial ve spinal sinirler olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Bir çok dal bu ana gövdeden köken almaktadır ve terminal dallar vücudun her bölgesine ulaşır.

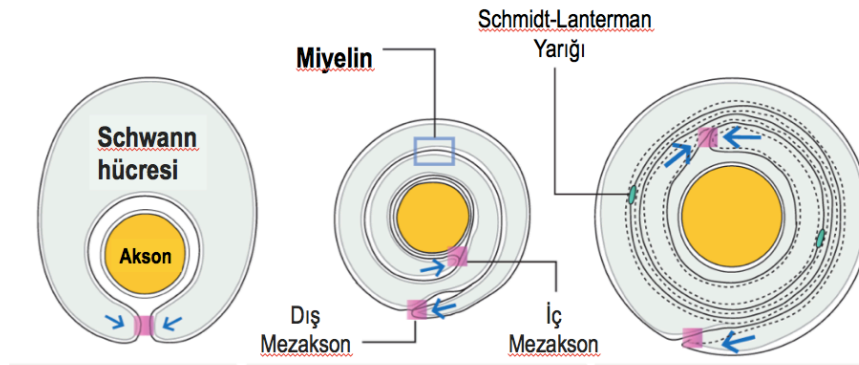
Periferik sinirlerin en küçük fonksiyonel birimi sinir lifleridir. Periferik sinir liflerinin iletim hızı, fonksiyonu, lif çapı ve diğer başka nitelikler gibi parametrelere göre değişik sınıflandırma şekilleri vardır. Anatomik olarak Schwann hücrelerinin aksonları çevrelemesi ile miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri olarak iki alt gruba ayırmak mümkündür. Memelilerde bütün büyük aksonlar miyelinlidir. Çapları 1µm'den küçük olan aksonlar ise genellikle miyelinsizdir (Geuna ve ark., 2009).

1.4.1. Miyelinli Sinir Lifleri

Miyelinli sinir lifleri her biri ayrı ayrı bir Schwann hücresi ile çevrelenmiş tek bir aksondan meydana gelmektedir. Schwann hücresi membranı çok tabakalı miyelin kılıfı oluşturmak için sinir lifinin çevresini sarmalar. Periferik sinir sisteminde (PSS) miyelin Schwann hücreleri tarafından üretilmektedir. Miyelin kılıf aksonun çevresine sarılan yassı gliyal uzantılar gibi düşünülebilir (Geuna ve ark., 2009).

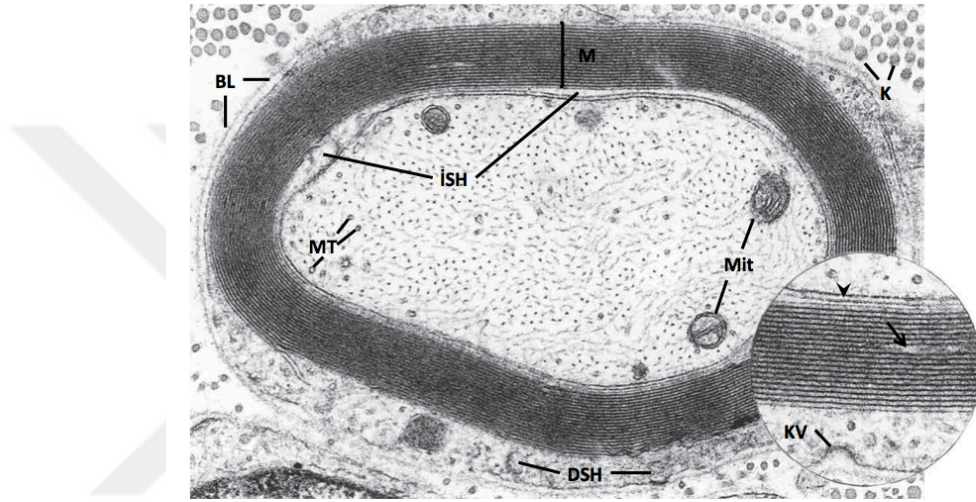
Miyelin kılıfın oluşumu (miyelinizasyon) esnasında ilk olarak akson Schwann hücresinde oluşan bir olukta uzanır. Böylelikle Schwann hücresi membranı fonksiyonel olarak iki bölgeye ayrılır; dış ortama ya da endonöryuma bakan yüzü abaksonal plazma membranı, akson ile temasta olan yüzü ise adaksonal (periaksonal) plazma membranı olarak adlandırılır. Akson tamamen sarıldığında ise bu iki membran bölgesini birbirine bağlayan çift membranlı bir yapı olan mezakson oluşur.

Miyelin kılıf oluşumu Schwann hücresinin mezaksonunun aksonu çevrelemesiyle başlar ve mezaksonun yaprak şeklinde bir uzantısı aksonu spiral hareketle sarar. İlk bir kaç tabaka sıkı düzenlenmez ve sitoplazmaları kalır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Miyelinizasyon.

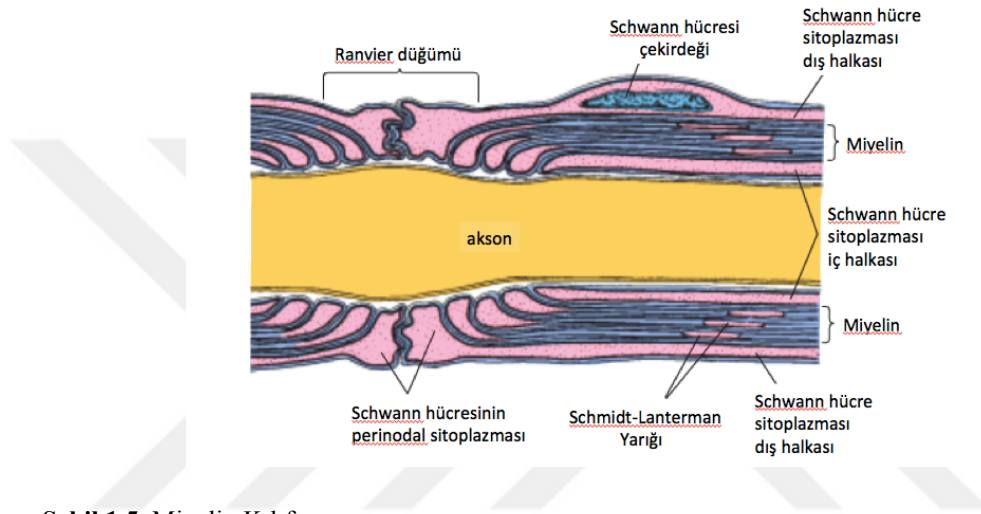
Gelişmekte olan miyelin kılıfın dışında Schwann kılıfı denilen dış perinükleer sitoplazma halkası bulunur ve Schwann hücrenin çekirdeğini ve çoğu organelini bulundurur. Schwann hücresi bazal lamina ile çevrelenmiştir (Şekil 1.4). Son tabakanın mezaksonunun kendi üzerine dönerek spirali kapatması ile bazal laminaya komşu interselüler dar bir boşluk olan dış mezakson oluşur. Mezakson membranlarının arasındaki dar interselüler alan ile adaksonal plazma membranı arasındaki bölüme ise iç mezakson denir (Ross ve Pawlina, 2014).



Şekil 1.4. Miyelinli sinir lifi elektron mikroskop görüntüsü.

Mezakson kendi etrafında spiral oluşturduktan sonra 12-14nm'lik aralıklar kaybolur ve sıkı membranlarıyla miyelin kılıf oluşur. Miyelin kılıf aksonu çevreledikçe birbirini izleyen bir seri geniş, yoğun çizgilerle birlikte daha dar, daha az yoğun çizgileri meydana getirmektedir. Transmisyon elektron mikroskobunda (TEM) gözlenen bu geniş çizgiler (3 nm genişliğinde) esas yoğun çizgiler olarak adlandırılır ve kaynaşan Schwann hücre plazma membranlarının sitoplazmik yüzeylerini temsil etmektedir. Daha dar olan intraperiyod çizgiler ise birbirlerine yaklaşan ancak kaynaşmayan Schwann hücre dış membran yaprakları tarafından oluşturulur (Gartner, 2017).

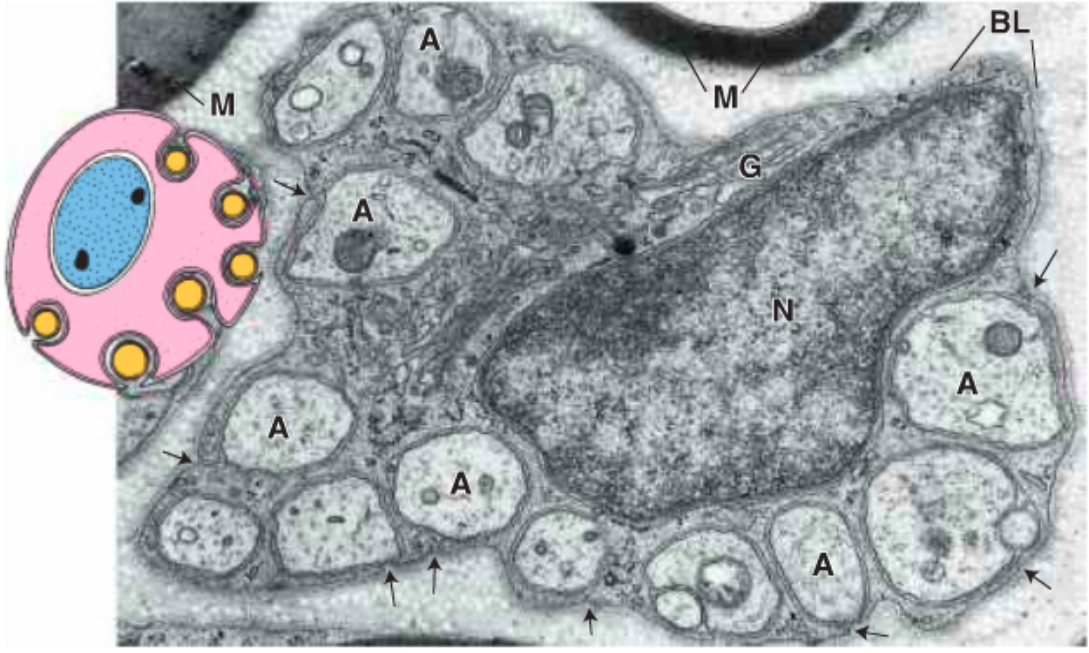
İki komşu Schwann hüresinin birleşme bölgesine Ranvier düğümü (nodu) adı verilir ve bu bölgede miyelin kılıf bulunmaz. İki Ranvier düğümü arasında kalan miyelin bölgesine ise internodal segment denilmektedir (Ross ve Pawlina, 2014). Işık mikroskopunda her internodal segmentte bir kaç tane koni biçimli yarık bulunmaktadır. Bu yarıklara Schmidt-Lanterman yarıkları adı verilir (Şekil 1.5) (Gartner, 2017). Schmidt-Lanterman yarıklarının sayısı akson çapıyla doğru orantılıdır (Ross ve Pawlina, 2014).



PSS’de miyelinizasyon genel olarak çapı 1,5 μm ’den büyük aksonlarda görülür (Geuna ve ark., 2009).

1.4.2. Miyelinsiz Sinir Lifleri

Miyelinsiz sinir lifleri tek bir Schwann hücresi tarafından kuşatılmış bir grup aksondan oluşmaktadır. Memelilerde kütanöz sinirlerde ve dorsal spinal köklerde bulunan aksonların yaklaşık %75’i miyelinsizdir. Otonomik post-gangliyonik aksonların tamamı miyelinsizdir. Miyelinsiz liflerin çapları küçüktür (0,15-2 μm) ve birbirini izleyen bir seri Schwann hücresi içerisinde gruplanırlar (Şekil 1.6) (Geuna ve ark., 2009).



Şekil 1.6. Miyelinsiz Sinir Lifleri.

PSS'de büyük Schwann hücrelerinin 20'den fazla oluğu bulunabilir ve bu olukların her birinde bir veya daha fazla akson yerleşebilir (Ross ve Pawlina, 2014).

1.4.3. Periferik Sinirin Bağ Doku Kılıfları

PSS nöronlarında aksonlar ve gliya hücreleri bağ dokudan oluşan bir yapı ile çevrenmekte ve bu yapı tarafından vücut hareketlerinden kaynaklanan basınç ve gerilmeye karşı yeterli direnci sağlaması için desteklenmektedir.

Klasik olarak sinir demetleri ister unifasiküler ister multifasiküler olsun epinöryum tarafından sarılırlar. Sinir demetini oluşturan her bir fasikül çok tabakalı perinöryum ile çevrenirken, perinöryum aksonların etrafında yerini endonöryum veya intrafasiküler bağ dokuya bırakır (Geuna ve ark., 2009).

1.4.3.1. Epinöryum

Epinöryum intranöral damar sisteminin ana iletim kanalları olan vasa nervorumları içeren destekleyici ve koruyucu bağ doku tabakasıdır. Vasa nervorumlar perinöryumdan geçerek endonöryumda bulunan arteriyoller ve venüllerden oluşan ağ ile temasa geçmektedir. Embriyolojik olarak, epinöryum mezoderm tabakasından köken almaktadır. İnsanda epinöryum, bir sinir demetinde enine kesit alanının yaklaşık % 30-70'ini oluşturmaktadır. Genel kural olarak periferik sinir ne kadar çok fasikül içeriyorsa epinöryum o kadar kalındır. Bu bağ dokusu fibroblastları, Tip I ve Tip II kollajeni ve çeşitli miktarlarda yağ hücresini içermektedir (Geuna ve ark., 2009).

1.4.3.2. Perinöryum

Perinöryum her bir fasikülü çevreleyen sıkı ve mekanik olarak kuvvetli olan tabakadır. Memeli sinir demetlerindeki fasiküllerde en fazla 15 tabaka olmakla birlikte değişen katlarda yassı poligonal hücrelerden ve kollajenden meydana gelmektedir. Her hücre tabakası bazal lamina üzerine oturmaktadır. Hücre tabakaları longitudinal olarak uzanan kapiller içeren boşluklar ile birbirinden ayrılmaktadır. Aynı boşlukta kollajen teller ve elastik teller de bulunmaktadır. Bir çok çalışmaya göre bu epitel benzeri yassı hücreler yalnızca gerçek perinöryumun iç tarafında bulunmaktadır ve perinöral kılıfın bu hücreli tabakası giderek epinöryumun bağ dokusuna katılacak olan bir dış fibröz doku ile çevrelenmektedir. Bu yassı hücreler karakteristik olarak çok sayıda pinositik veziküller ve sıklıkla mikrofilaman demetleri içermektedir. Bu bulgular ve perinöryum hücrelerinin fosforilasyon enzimlerince de zengin olmaları gerçeğinden hareketle bu tabaka metabolik olarak aktif bir difüzyon bariyeri olarak işlev görmektedir.

Perinöryumun kan-sinir bariyeri ile birlikte endonöryum içerisindeki ozmotik ortam ve sıvı basıncının korunmasında önemli görevleri vardır (Geuna ve ark., 2009).

1.4.3.3. Endonöryum

Endonöryum geniş ekstraselüler boşluklar içeren gevşek kollajen matrikstir. Matriks; fibroblastları, makrofajları, mast hücrelerini ve ekstraselüler matriks bileşenleri olan kollajen lifleri, mukopolisakkarit esas madde ile kapiller ağı içermektedir. Endonöryumun fibröz ve hücreli bileşenleri endonöryal sıvı içerisinde bulunmaktadır. Endonöryal sıvı basıncı, epinöryuma göre nispeten daha yüksektir. Sonuçta oluşan bu basınç farkının, sinir lifinin dışında bulunan toksik maddelerden kaynaklanabilecek endonöryal kontaminasyonu mümkün mertebe azalttığına inanılmaktadır. Endonöryum içerisinde bulunan hücrelerin çoğu Schwann hücreleri ve endotel hücreleridir. Fibroblastlar tüm hücrelerin yalnızca %4'lük kısmını oluşturmaktadır (Geuna ve ark., 2009). Kollajen liflerin büyük kısmı Schwann hücreleri tarafından üretilmektedir. Kollajen lifler sinir liflerine hem paralel hem de onları saracak şekilde düzenlenirler (Ross ve Pawlina, 2014).

1.5. Periferik Sinir Hasarı Tipleri

Ezilme tipi hasarlar tipik olarak sopa, ameliyat klempisi veya sinirde tam kesi oluşturmayan diğer objeler gibi küt uçlu nesnelerin sinirde akut travmatik basınç oluşturması nedeniyle meydana gelirler.

Tersine nörotmezis veya grade V sinir hasarı olarak da bilinen kesi hasarlarında ise genellikle bıçak, ateşli silah, kırık cam parçaları ve benzerleri tarafından oluşan laserasyondan dolayı sinirde tam kesinti mevcuttur.

Balistik hasarlar ise mermi çekirdeğinin geçişinden sonra şok dalgalarının dokunun içinden hareketi nedeniyle sinirde bası ve kesi hasarını birlikte verme eğiliminde olduğundan özel bir durumdur. Mermi doğrudan sinirin kendisine temas etmemekle birlikte sinir üzerinde hem gerilme hem de basınç etkisi yaratır (Menorca ve ark., 2013).

Periferik sinir sistemi (PSS) hasarları sıklıkla meydana gelirler ve sakatlıkların başlıca nedenlerindedir. PSS hasarları kasların normal hareket etme kabiliyetine ve normal duyu algısına zarar verir ve ağrılı nöropatilerle sonuçlanır. PSS hasarları travmatik, travmatik olmayan veya cerrahi esnasında oluşan şekilde sınıflandırılabilir. Travmatik sinir hasarları çarpışma, motorlu araç kazaları, ateşli silah yaralanmaları, kırıklar, laserasyonlar veya diğer delici travma tipleri sonucunda oluşurlar (Dodla ve ark., 2011).

1.6. Periferik Sinir Hasarı

Periferik sinirlerin travmatik hasarları bütün dünyada yaygın bir problemdir ve kayda değer sakatlıklara yol açmaktadır. Periferik sinir hasarlarının (PSH) etiyolojik ve epidemiyolojik faktörleri barış ve çatışma periyodlarına göre ve ayrıca toplumların gelişmişlik seviyelerine göre değişkenlik göstermektedir. Tarihsel olarak PSH'lere ait bilgiler çoğunlukla savaş zamanlarında gelişmiştir. Travmatik sinir hasarları önemli nörolojik zararlara yol açmaktadır. Barış dönemlerinde PSH'ler genellikle motorlu araç kazaları, keskin objelerle parçalanma, penetrasyon travmaları, gerilme veya bası travmaları ile kırıklar ve ateşli silah yaralanmaları sonucunda oluşurlar. PSH'nin insidansı travma popülasyonu arasında %2-%2,8 olarak eğer pleksus ve sinir kökü lezyonları da dahil edilirse %5 olarak rapor edilmiştir (Eser ve ark., 2009).

Sinir hasarı hem retrograd (hasar bölgesinin proksimalinde bulunan hücre gövdesi ve dorsal kök gangliyonunda) hem de anterograd (distal bölgede bulunan sinir unsurlarında) bölgeyi etkiler ve apoptotik hücre ölümüne neden olur. Nöronal ölümün derecesi gelişimsel yaşa (yetişkin nöronlar ölmeye daha az eğilimlidir) ve hasarın düzeyi ile tipine (dorsal kökte meydana gelen kopmalar distal segmentteki kesilmelerden daha çok tahrip edicidir) bağlıdır. Ayrıca duyu nöronları motor nöronlara göre hasardan daha fazla etkilenirler (siyatik sinir hasar modelinde %10-%30'a karşılık %0-%10 olarak görülmüştür) (Benga ve ark., 2017)

1.6.1. Wallerian Dejenerasyonu

Hasar, periferik sinirin özellikle distal bölgesindeki nöron olmayan hücrelerde güçlü bir yanıt oluşmasına yol açmaktadır. Bu dejeneratif süreç günümüzden 160 yıl kadar önce Augustus Volney Waller tarafından kurbağada glossofaringeal ve hipoglossal sinirlerde kesi sonrası meydana gelen morfolojik değişiklikleri karakterize edilmesi sonrasında Wallerian dejenerasyonu olarak adlandırılmıştır. Kopmuş (ayrılmış) olan distal aksonların intrinsik dejenerasyonu Wallerian dejenerasyonundaki anahtar olaydır ve nöron olmayan hücrelerin ardışık cevaplarını tetikleyerek periferik sinirdeki inhibitor etkili debrisin temizlenmesi ile akson yeniden büyümesini hasardan aylar sonra bile destekleyecek olan çevrenin oluşmasına yol açmaktadır (Gaudet ve ark., 2011).

Wallerian dejenerasyonu akson rejenerasyonu sürecinde inhibe edici etkili olabilecek moleküllerin ortadan kaldırılması için gerekli olan hazırlık sürecidir (Sulaiman ve Gordon, 2013).

Akson dejenerasyonu modellerinden en kolayı olan enine kesi yapılmış aksonla gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda hasar sonrası meydana gelen olaylar incelenmiş ve morfolojik olarak ayırt edilebilen en az üç evre gösterilmiştir (Wang ve ark., 2012).

Faz 1: Akut Akson Dejenerasyonu

Aksotomi yapıldıktan bir kaç dakika sonra hasar bölgesinin hemen distalindeki ve proksimalindeki akson bölümleri 5 ila 60 dakikalık bir süre içinde her iki yönde birkaç yüz mikrometre boyunca hızlıca dejenere olurlar. Hasara karşı verilen bu erken yanıt her iki kesik uçta süregelen anterograd ve retrograd taşıma nedeniyle aksoplazmik organellerin birikiminden kaynaklanan daha yavaş bir süreç olan distrofik yumruların oluşumu takip eder. Akut aksonal dejenerasyon (AAD) olarak adlandırılan bu kısa ve erken başlangıçlı dejeneratif süreç in vivo olarak hem dorsal spinal duyu sinirlerinde hem de optik sinirde gözlenmiştir (Wang ve ark., 2012).

Hücre dışı kalsiyumun kanal aracılı taşıma ile içeri alınması AAD'nin başlatılması için kritiktir. Ca^{+2} kanal blokerleri akson içi Ca^{+2} 'nin erken yükselişini önleyerek AAD ilerleyişini zayıflatmaktadır. Buna ek olarak, Ca^{+2} iyonoforlarının ilave edilmesi AAD sürecine giren hasarlı aksonların sayısını önemli ölçüde artırmaktadır. AAD'de Ca^{+2} vasıtasıyla hücre iskeleti yıkımına yol açan birincil mekanizma aksonal nörofilamanlar ile spektrin ve tübülün gibi mikrotübül ilişkili bileşenleri ayırma yeteneğindeki serin-treonin proteaz olan kalpain'in Ca^{+2} bağımlı aktivasyonudur (Wang ve ark., 2012).

Yapılan çalışmalarda spektrin artmış kalpain tarafından ayrılmasının hasardan sonra hemen 30 dakika içinde meydana geldiği ve bunun AAD süreciyle uyumlu olduğu in vivo olarak gösterilmiştir. Otofaji gibi diğer yıkıcı süreçler de ilk olarak Ca^{+2} 'nin aksotomi sonrası akson içine girişi ile tetiklenmektedir ve AAD sürecindeki akson kaybının şiddeti ve süresinde payı olabilir. Bununla birlikte, spinal kord aksonlarının ayrılmış uçlarında bu kısa mesafeli dejenerasyonun kalpainin kimyasal inhibisyonu ile tamamen ortadan kaldırılması kalpain aktivitesinin AAD'nin başlıca efektörü olduğunu göstermektedir (Wang ve ark., 2012).

Faz 2: Distal Aksonda Latent Dönem

Aksotomiden hemen birkaç saat sonra hasar bölgesinde aksoplazmik filizler oluşturmaya başlayan proksimal ucun aksine, distal aksonlar halen fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilir halde oldukları halde AAD sonrasında kısa bir yapısal sessizlik (duraksama) dönemi sergilerler. Örneğin, motor nöronların hasar görmüş aksonları aksiyon potansiyeli iletebilme kabiliyetlerini hasar sonrası 24 saate kadar sürdürebilirken, tepkisel potansiyelleri ve iletim hızları dereceli olarak azalmaktadır. Bunlara ek olarak, distal aksonda hem anterograd hem de retrograd taşıma aktiviteleri devam etmektedir (Wang ve ark., 2012).

Faz 3: Granüler Parçalanma (Fragmantasyon)

Wallerian dejenerasyonun latent dönemini aksolomma boyunca birdenbire ortaya çıkan ve birbiriyle eş zamanlı olmayan parçalanmalar takip eder. Bu süreç başladıktan sonra in vivo 22 mm/saat ve kültür ortamında 0,4 mm/saat hızda yaklaşık 1-2 saat içinde tamamlanır. İlginç biçimde aksotomi gibi fokal ve şiddetli hasarlar proksimalden distal yönüne doğru akson dejenerasyonu ile sonuçlanırken, daha kronik hasarlarda aksonlar sinaptik sonlanmadan hücre gövdesine doğru retrograd yönde dejenere olurlar (Wang ve ark., 2012).

1.7. Periferik Sinir Rejenerasyonunda Schwann Hücrelerinin ve Makrofajların Rolü

Periferik sinirde yerleşik olan Schwann hücreleri ile hasar bölgesine çağrılan monosit kökenli makrofajlar birlikte Wallerian dejenerasyonu esnasında yıkılan miyelini ortamdan temizlerler. Bununla birlikte, her iki hücre tipi de hem in vivo hem de in vitro ortamda diğerinin yardımı olmadan miyelin debrisini temizleme yeteneğindedir (Rotshenker, 2015).

Miyelin yapan Schwann hücreleri post-mitotiktir ancak hasara cevap durumunda aksonla olan bağlantılarını kaybederler ve dediferansiyasyon süreci geçirirler. Schwann hücrelerinin hasarı takip eden dediferansiyasyonu periferik sinir sistemindeki başarılı rejenerasyon için olmazsa olmazdır (Glenn ve Talbot, 2013).

Miyelin debrisinin temizlenme işleminin periferik sinirin kesilmesinden sonra üç ila dört gün içerisinde başladığı, 12-14 gün içerisinde ise tamamlandığı farelerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Monositler kendilerini hasarlı bölgeye çeken sitokinler ve kemokinlerin yerel hızlı salınımının da yardımıyla yırtılmış olan damarlardan lezyon bölgesine girerler. Yabancı tip farelerde miyelinin fragmantasyonu ışık mikroskopunda ilk olarak 2. ile 3. gün arasında tespit edilir. Monosit kökenli makrofajlar diyapedez ile (yapısal olarak sağlam olan damarlardan transmigrasyon) hasar bölgesine toplanır. Makrofajların belirgin olarak çağırılması

ikinci ve üçüncü günlerde başlar, yaklaşık yedinci günde en yüksek seviyeye ulaşır. Monosit kökenli makrofajların lezyon bölgesine çağırılmasında rol alan mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir ancak monositleri ve makrofajları kendine çeken sitokinler ve kemokinler, matriks metalloproteinazları, kompleman ve Galektin-3/MAC-2'nin hepsi rol alabilmektedir (Rotshenker, 2015)

Wallerian dejenerasyonu esnasında Schwann hücrelerinde Krox20 ve diğer miyelin genlerinin ifadesi miyelin kılıfın kendisiyle birlikte kaybolur. Bunlara ek olarak, immatür Schwann hücreleri ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin ifadesi artar. Dediferansiyasyon Schwann hücreleri rejenerasyon olan aksonların içerisinde büyüyecekleri Bungner bantları adı verilen ve eşi olmayan silindirik yapılar oluştururlar. Başarılı akson rejenerasyonu ile Schwann hücreleri aksonlarla olan bağlantılarını yeniden oluştururlar ve tekrardan miyelin yapan hücrelere farklılaşmaya başlarlar. Notch, JAK-STAT ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolları periferik sinir hasarı sonrası Schwann hücrelerinde aktifleşir (Glenn ve Talbot, 2013).

1.8. Periferik Sinir Rejenerasyonunda Plateletten Zengin Plazma

Trombositler (plateletler) kemik iliğindeki megakaryosit adı verilen büyük, poliploid hücrelerden üretilirler ve çekirdeksiz sitoplazmik parçalardır. 2-3 µm boyutunda disk şeklinde yapılar olan trombositlerin ömürleri dolaşım sistemine geçtikten sonra yaklaşık 10 gündür. Fizyolojik olarak kan damarlarının sürekli denetlenmesinde, kan pıhtısı oluşumunda ve hasarlanmış dokunun onarımında fonksiyon görmektedirler.

Yapısal olarak dört zonda incelenirler.

- (1) Periferik zon: Kalın glikokaliksle kaplı membrandan oluşmaktadır. Glikokaliks glikoproteinleri, glikozaminoglikanları ve birkaç pıhtılaşma faktörünü içermektedir.

- (2) Yapısal zon: Mikrotübüller, aktin filamentleri, miyozin ve aktin bağlayıcı proteinlerden oluşmaktadır.
- (3) Organel zonu: Trombositin merkezindedir. Mitokondriyonlar, peroksizomlar ve glikojen partikülleri ile α , δ ve λ granülleri bulunmaktadır. Alfa granüller çeşitli büyüme faktörlerini içermektedir.
- (4) Membran zonu: Açık kanaliküler sistem ve yoğun tübüler sistem adı verilen iki tip membran kanalından oluşmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

Alfa granüller trombositlerde en bol bulunan granüllerdir. İçeriğinde bulunan maddelerin koagülasyonda, inflamasyonda, antimikrobiyal konak savunmasında, anjiyogenezde ve yara iyileşmesinde rolü vardır (Blair ve Flaumenhaft, 2009).

İçeriğinde kemokinlerin, koagülasyon faktörlerinin, integrinlerin yanı sıra büyüme faktörlerinden trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-I), hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) bulundurlar. Aktive olduklarında ise bu içeriklerini serbest bırakırlar (Blair ve Flaumenhaft, 2009, Kucuk ve ark., 2014). Bu hücreler doku onarımı, vasküler düzenleme ve organ rejenerasyonu için önemli hücreler olarak tanımlanmaktadır. Doku rejenerasyonunda görev alan biyoaktif maddeler ve büyüme faktörleri trombositlerin granülleri içinde yer almaktadır (Gultekin ve ark., 2013).

Plateletten zengin plazma (Platelet Rich Plasma, PRP) küçük bir hacimdeki plazma içerisinde trombositleri ve onların ilişkili olduğu büyüme faktörlerini konsantre şekilde bulunduran preparasyondur (Malahias ve ark., 2014). PRP kandan otolog büyüme faktörlerini elde etmek için kullanılan basit, düşük maliyetli ve minimal düzeyde girişimsel bir tekniktir. Tam kan ile karşılaştırıldığında PRP 3 ila 8 kat arasında daha yüksek oranda trombosit içermektedir (Almasry ve ark., 2015).

PRP hazırlığı için sodyum sitrat antikoagülanlı tüplere alınan kan önce eritrositleri ayırmak için santrifüj edilir. Plazmanın tamamı ve beyaz kan hücreleri ile trombositleri içeren “buffy coat” tabakası temiz steril tüplere alınarak tekrar santrifüj edilir. Bu ikinci santrifüjden sonra tüpün altında trombositler toplanmış olur.

Bu iki aşamalı santrifüj işlemi için farklı döndürme hız ve süreleri kullanıldığı literatürde görülmektedir (Kim ve ark., 2014, Emel ve ark., 2011, Hapa, 2013, Giannesi ve ark., 2014).

Hazırlanan PRP sıvı olarak uygulanabileceği gibi trombosit aktivasyonu yapıldıktan sonra da tedavi edilecek bölgeye uygulama yapılabilir. PRP uygulamasından hemen önce %10'luk kalsiyum klorit (CaCl_2) veya trombin kullanılarak trombosit aktivasyonu gerçekleştirilebilir. Aktivasyon işleminden sonra trombositler hızlıca granülleri içerisindeki büyüme faktörlerini ortama bırakacağından ve PRP jel kıvamını alacağından uygulamada zamanlama önem taşımaktadır (Gultekin ve ark., 2013)

PRP ortopedi (Hapa, 2013), kozmetik, diş hekimliği, spor hekimliği, nöroşirurji (Giannesi ve ark., 2014), oftalmoloji, üroloji, deri ülserleri ve çene cerrahisi alanlarında çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmıştır (Gultekin ve ark., 2013).

1.9. Sinir İyileşmesinde Kondroitin Sülfat Proteoglikanlar

Kondroitin sülfat (CS), sülfatlı glikozaminoglikanların bir sınıfıdır ve bir merkezi proteine kovalent olarak bağlanarak proteoglikanları (PG) oluştururlar. Her bir merkezi proteine bağlanan CS sayısı, uzunluğu ve CS zincirindeki sülfatlı şekerlerin düzenlenişindeki farklılıklar kondroitin sülfat proteoglikanlarda (CSPG) büyük yapısal varyasyonlar oluşturmaktadır. CSPG'ler hücre yüzeyinde ve çeşitli dokuların ekstraselüler matriksinde bulunur ve hücre bölünmesi, pluripotensinin

sürdürülmesi, kondrogenез, miyogenez, osteogenez ve buna benzer kompleks biyolojik olaylarda önemli rol oynamaktadır (Miyata ve Kitagawa, 2015).

Periferik sinirlerde versikan, dekorin, NG2 ve nörit inhibitör faktör (NIF) isimli dört CSPG merkezi proteinleri bulunmaktadır. Bu merkezi proteinlere bağlı glikozaminoglikan yan zincirleri CS'leri içermektedir (Groves ve ark., 2005, Sabatier ve ark., 2012). CSPG'lerin glikozaminoglikanlarının büyük boyutları ve negatif yükleri nedeniyle yeni oluşan akson uzantılarının büyümeyi destekleyen matriks moleküllerine ulaşmasını engellediği ve böylece akson büyümesini inhibe ettiği düşünülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda CS'lerin transmembran protein tirozin fosfataz reseptörüne bağlanarak da rejenerasyon olmaya çalışan aksonlarda büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Sabatier ve ark., 2012).

130 ve 900 kDa ağırlığındaki iki CSPG insan siyatik sinirinden izole edilmiştir (Chernousov ve Carey, 2000). CSPG'lerin iki spesifik izotipi olan CS-6 endonöryumla ilişkili olarak bulunurken, CS-4 ise epinöryumda yerleşik olarak bulunmuştur (Gause ve ark., 2014, Muir, 2010).

Nörit inhibe eden CSPG'ler periferik sinir hasarı sonrası Schwann hücrelerinin bazal laminasını çevreleyen endonöryum dokusunda bol miktarda ve hızlıca birikmektedir. Bundan sonra sinir mikroyapısındaki herhangi bir yanlış hizalama rejenerasyon olan aksonal filizlerin distal sinir ucundaki bazal laminalara ulaşmasını şiddetli bir şekilde engelleyen bu yoğun dokuyu geçmeye zorlar (Zuo ve ark., 2002).

Lamininler büyüme konisinin desteklenmesindeki önemli rolleri iyi bilinen bir grup moleküldür ve bazal laminada en bol bulunan kollajen olmayan yapısal glikoproteinlerdir. Schwann hücrelerindeki alt tiplerinde akson büyümesini destekleyen aktivite gösterirler ancak bu aktivite sağlam sinirde CSPG'ler tarafından inhibe edilmektedir. Wallerian dejenerasyonu sırasında Schwann hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen matriks metalloproteinazları CSPG'leri parçalayarak

lamininin yeni gelişen aksonlardaki nörit destekleyici etkisini ortaya çıkarmış olur (Ovalle ve ark., 2012).

Bir çok çalışmada CSPG'lerin miyelin-inhibitör proteinlerle birlikte akson büyümesini inhibe eden molekül sınıflarından biri olduğu gösterilmiştir (Gause ve ark., 2014). Zuo ve ark. çalışmalarında kesi sonrası periferik sinirin distal ucunda CSPG'lerin yaklaşık yedi kat arttığını göstermişlerdir (Zuo ve ark., 1998).

Araştırmacılar CSPG'lerin inhibe edici etkisini azaltmak için sinir onarımı stratejilerine Kondroitinaz ABC (ChABC) adı verilen bir enzimin kullanımını da incelemişlerdir (Gause ve ark., 2014).

ChABC enzimi ilk olarak 1968 yılında Yamagata ve ark. tarafından *Proteus vulgaris*'den izole edilmiştir. Bu enzim kondroitin sülfat ve dermatan sülfatı seçici olarak yıkabilme yeteneğindedir ve merkezi proteinden CS glikozaminoglikan yan zincirlerini ayırmaktadır. Lomber intervertebral disk hernisi olan hastalarda kemonükleolizis amacıyla kullanılmaktadır (Hattori ve ark., 2008, Gause ve ark., 2014). ChABC'nin kan damarları ve sinir doku için güvenilir olduğu domuz ve hamsterda gerçekleştirilen lokal uygulamalarla gösterilmiştir (Chan ve ark., 2014).

ChABC enziminin aselüler sinir grefti kullanılarak yapılan deneysel uygulamalarda greft boyunu ve etkinliğini anlamlı düzeyde artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Ovalle ve ark., 2012). Farklı bir çalışmada ise ChABC uygulaması yapılan grupta distal uca doğru nörit büyümesinin herhangi bir enzim uygulaması yapılmayan gruba göre birkaç kat arttığı gösterilmiştir (Zuo ve ark., 2002).

Sinir yaralanmasını tedavi etmekte ideal olarak kabul edilen yöntem kesi bölgesindeki proksimal ve distal sinir uçlarının uç uca dikilmesidir. Ancak bu yöntemde de çevre dokuda oluşan yapışıklıklar sinirin iyileşmesini ve normal fonksiyonunu geri kazanmasını olumsuz etkiler. Doku yapışıklıklarının giderilmesi için çeşitli yöntemler denense de mevcut alternatiflerin pahalı ve istenen

düzyeyde iyileşme sağlamaması nedeniyle bu konuda halen, ucuz, temini ve uygulaması kolay ve yaygın kullanıma geçebilecek bir malzeme bulunmamaktadır. Bu amaçla çalışmamızda literatürde daha önce ayrı ayrı kullanılarak sinir iyileşmesine etkileri gösterilen, ekstraselüler matriks elemanlarının sinir iyileşmesini inhibe edici etkisini azaltan kondroitinaz ABC enziminin ve deneklerden elde edilecek akson büyümesini uyaran çeşitli büyüme faktörlerini (IGF-1, PDGF, TGF- β , VEGF, EGF, IL-8) içeren plateletten zengin plazma'nın (PRP) tek tek ve literatürde daha önce denenmemiş kombine uygulamaları gerçekleştirilecektir.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 11/02/2015 tarihli ve 2015-2-41 sayılı izni ile planlandı. Ayrıca bu çalışma, T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 15L0230008 proje numarası ile desteklendi.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarında gerçekleştirilen çalışmada aynı merkezde talebimiz sonrasında yetiştirilen 14 haftalık toplam 40 adet erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Hayvanların cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası bakımları da aynı merkezde gerçekleştirildi. Deney hayvanları standart fiziki şartların sağlandığı 22 ± 1 °C sıcaklığa ve 12 saat karanlık/ 12 saat aydınlık döngüsüne sahip odalarda uygun büyüklükte kafeslerde barındırıldı. Standart sıçan yemi ve su ile ad libitum beslendi. Hayvanlar her grupta 8 sıçan olacak şekilde rastgele olarak 5 gruba ayrıldı ve kafesleri gruplara uygun olarak işaretlendi. Tüm gruplarda sol taraftaki siyatik sinirlerde kesi hasarı modeli oluşturulurken, kesi yapılmayan sağ taraf siyatik sinirler kontrol dokuları olarak değerlendirildi. Kesi grubunda hasar sonrasında sinir onarımı yapılmazken diğer gruplarda sinir onarımı aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi.

Deney grupları aşağıdaki şekildeydi;

- 1) Kesi Grubu: Siyatik sinir kesi hasarı modeli oluşturulduktan sonra herhangi bir tedavi uygulanmadı.
- 2) Salin Grubu: Siyatik sinir kesi hasarı modeli oluşturuldu, sinir onarımı gerçekleştirildi ve sütür bölgesine 0,125 ml salin uygulaması topikal olarak yapıldı.

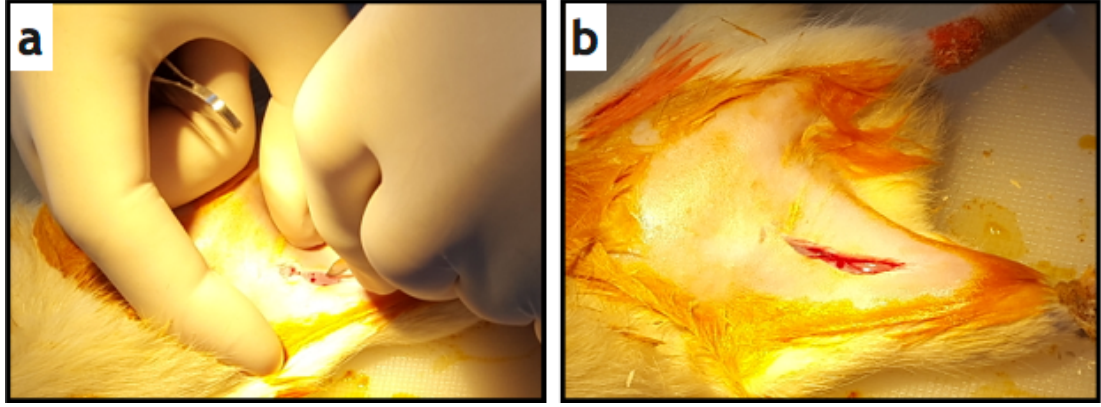
- 3) Kondroitinaz ABC Grubu: Siyatik sinir kesi hasarı modeli oluşturuldu, sinir onarımı gerçekleştirildi ve sütür bölgesine 0,125 ml kondroitinaz ABC enzimi uygulaması topikal olarak yapıldı.
- 4) PRP Grubu: Siyatik sinir kesi hasarı modeli oluşturuldu, sinir onarımı gerçekleştirildi ve sütür bölgesine 0,125 ml PRP uygulaması topikal olarak yapıldı.
- 5) Kondroitinaz ABC + PRP Grubu: Siyatik sinir kesi hasarı modeli oluşturuldu, sinir onarımı gerçekleştirildi ve sütür bölgesine 0,125 ml kondroitinaz ABC enzimi ve PRP uygulaması ard arda topikal olarak yapıldı.

2.2. Cerrahi İşlemler

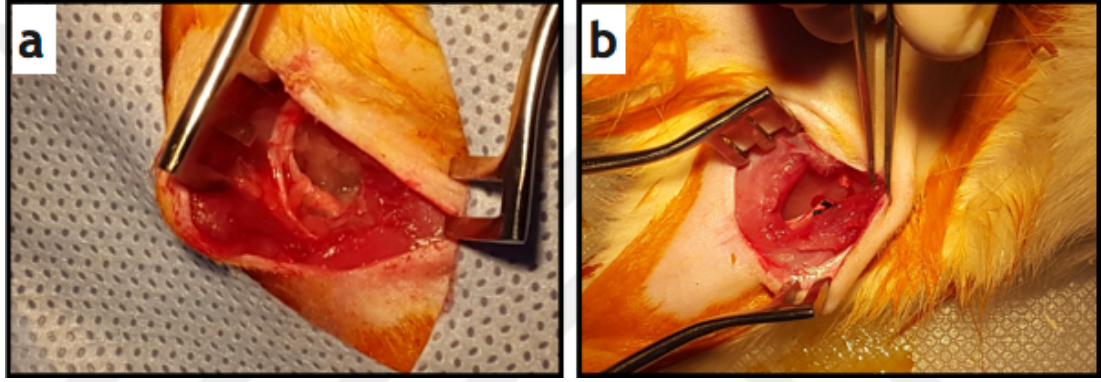
Tüm deney hayvanlarına işlem öncesi anestezi ilaç olarak Ketamin 60mg/kg dozda ve Ksilazin 10mg/kg dozda intraperitoneal olarak verildi ve deneklerin spontan solunumu sağlandı.

Anestezi kontrolü cilt ya da parmak kıstırma yanıtlarına bakılarak sağlandıktan sonra hayvanlara steril koşullarda siyatik sinir kesi hasarı modeli oluşturulabilmesi için aşağıda belirtilen işlemler uygulandı.

İlk olarak denek cerrahi istasyona yatırılıp, kesi bölgesi tıraşlandı ve antiseptik solüsyon (Betadine) ile temizlendi. Femur başından dize kadar yaklaşık 3mm'lik femura paralel cilt kesisi yapıldıktan sonra süperfisiyal biceps femoris kası da aynı doğrultuda kesildi (Şekil 2.1). Uygun makas kullanılarak açığa çıkan vastus lateralis kasına dizin kenarından küçük bir kesi yapıldı ve femura paralel olarak seyreden siyatik sinirin tibial ve peroneal sinir dalları açığa çıkana kadar nazikçe künt diseksiyon yapıldı (Şekil 2.2a).

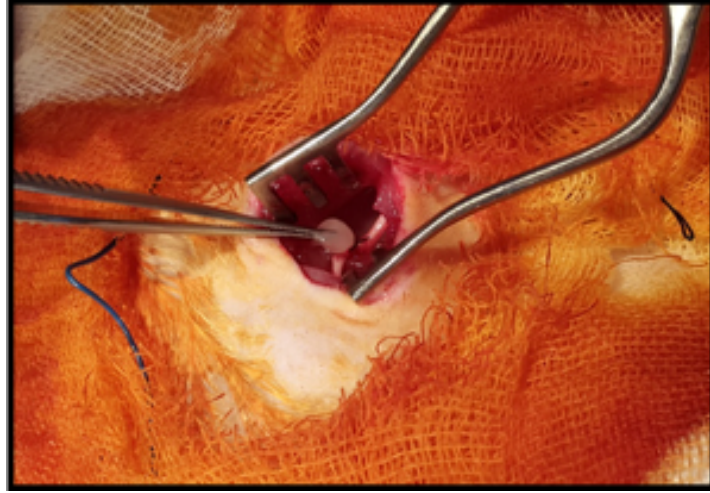


Şekil 2.1. a) Cilt kesisi yapılırken ve b) süperfisyal biceps femoris kasına kesi yapıldıktan sonraki görünüm



Şekil 2.2. a) Diseksiyon sonrası açığa çıkan siyatik sinirin görünümü ve b) siyatik sinire kesi yapıldıktan sonraki görünüm

Daha sonra dallanma bölgesinin 1 cm proksimalinden mikro makasla transvers olarak kesi yapılarak siyatik sinir kesi hasarı modeli oluşturuldu (Şekil 2.2b). Sinir onarımı aynı cerrah tarafından kesi bölgesinde epinöryum uç uca getirildikten sonra 10-0 Ethilon kullanılarak epinöral sütür tekniği ile gerçekleştirildi. Sütür bölgesine salin, PRP, ChABC enzimi ve kombine PRP+ChABC enzimi uygulamaları gerçekleştirildi (Şekil 2.3).



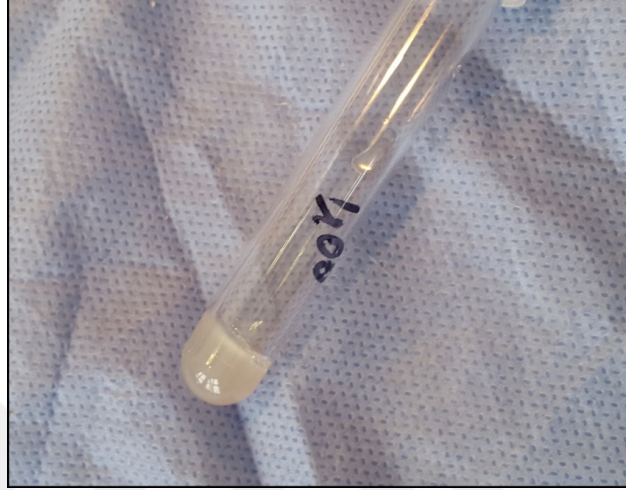
Şekil 2.3. Kesi bölgesine PRP uygulamasının yapılışı.

Sıçanların sol taraf siyatik sinirlerine cerrahi işlem uygulanırken sağ tarafları normal verilerin elde edileceği kontrol dokularını oluşturması amacıyla sağlam bırakıldı. 12. haftalık iyileşme süresi sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek her iki taraf siyatik sinirlerden doku örnekleri alındı.

2.3. Plateletten Zengin Plazmanın (PRP) Hazırlanması

İlgili deney gruplarında kullanılacak PRP'nin elde edilmesi için deney günü cerrahi işlemlere başlamadan önce her gruptan bir adet sıçandan anestezi sonrası (Ketamin 60mg/kg, Ksilazin 10mg/kg dozda, intramüsküler) kardiyak ponksiyonla 5-7 ml kan % 3,2 sodyum sitrat içeren tüplere alındı. Kan alma işleminden sonra bu sıçanlar yüksek doz anestetik verilerek sakrifiye edildi. İlk santrifüj işlemi 1500 rpm'de 15 dk. olacak şekilde gerçekleştirildi ve kanın 3 tabaka halinde ayrışması sağlandı. Bu tabakalar en altta eritrositlerden, ortada bulutsu bir görünüme sahip lökosit ve trombositlerden oluşan "buffy coat" tabakasından ve en üstte ise plateletten fakir plazmadan oluşmaktaydı. Trombositler yoğun olarak ara tabakada bulunmaktadır. Üstte kalan trombosit fakir plazma ile birlikte ara tabaka ve mümkün olan en az miktarda eritrosit antikoagülan madde içermeyen yeni tüplere alındı. İkinci santrifüj işlemi 3600 rpm'de 10 dk. süreyle uygulandı. Bu işlem sonrasında tüpün üst 2/3'lük kısmını oluşturan trombosit fakir plazma

uzaklaştırdı. En dibe çöken az miktardaki eritrosit bırakılarak alt 1/3'lük kısmı oluşturan trombositten zengin plazma yeni bir tüpe alındı. Anastomoz bölgesine uygulamadan hemen önce 8:1 oranında % 10'luk CaCl₂ ilave edilerek trombositlerin aktivasyonu sağlandı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. PRP'nin kesi bölgesine uygulama öncesi görünümü.

2.4. Kondroitinaz ABC (ChABC) Enziminin Hazırlanması

Liyofilize formda temin edilen ChABC enzimi ürün sağlayıcısının tarifine uygun olacak şekilde % 0,01'lik sığır serum albumininin sulu çözeltisinde sulandırıldı. Daha sonraki dilüsyonlar ise son konsantrasyon 2U olacak şekilde 50 mM Tris, 60 mM sodyum asetat ve % 0,02 sığır serum albumini içeren (pH: 8,00) tampon ile gerçekleştirildi.

2.5. Değerlendirme Yöntemleri

2.5.1. Işık Mikroskopik Değerlendirme

2.5.1.1. Dokuların Elde Edilmesi ve Rutin Histolojik Doku Takibi

Histolojik incelemelerin yapılacağı doku örneklerinin eldesi için öncelikle hayvanlar intraperitoneal yolla verilen 60 mg/kg dozda Ketamin ve 10 mg/kg dozda Ksilazin ile anestezi altına alındı. Anestezi kontrolü cilt ya da parmak kıştırma cevabına bakılarak sağlandıktan sonra abdominal bölgede hemen göğüs kafesinin altından 5-6 cm'lik lateral insizyon yapıldı. Karaciğer dikkatli bir biçimde diyaframdan ayrıldı ve göğüs kafesi boyunca diyafram kesilmeye devam edilerek plevral kavite açığa çıkarıldı. Kaburga kemikleri hem sağ hem de sol tarafta akciğere zarar vermeden köprücük kemiğine kadar kesildi. Sternumdan tutularak göğüs kafesi yukarı doğru kaldırıldı ve kalple bağlantılı dokular kesilerek kalp serbestleştirildi. Kalbin apeksinden kanül ile duvar geçilerek sol ventriküle girildi. Heparin içeren (100IU/100ml) % 0,9'luk serum fizyolojik ve tespit solüsyonu olarak kullanılan % 10'luk tamponlu formalin serum torbalarına dolduruldu ve hayvanın bulunduğu masadan yaklaşık 1 metre yukarı asılarak kalp atışları durduğunda yükseklikten kaynaklanan basınç yardımıyla sıvıların dolaşımı sağlandı. Önce heparinli serum fizyolojik dolaşıma verilmeye başlandı ve bu esnada hayvanın sağ atriyumuna bir kesi atılarak kanın vücut dışına çıkışı sağlandı. Karaciğerin beyazlaması gözlendikten sonra serum fizyolojik akışı kesildi ve tespit solüsyonu dolaşıma verilmeye başlandı. Organların beyazladığı ve kuyruğun sertleştiği gözlendiğinde solüsyonunun akışı kesildi. Böylece deney hayvanının tüm vücut perfüzyon fiksasyonu sağlanmış oldu.

Perfüzyon ile tespit sonrasında tüm deney hayvanlarından siyatik sinir doku örnekleri kesi modeli oluşturulan sol taraflardan sütür hattını ve distalini içerecek şekilde, sağ taraflardan ise (dallanma öncesi bölgeden) bütün olarak çıkarıldı. Alınan her doku örneğinden küçük bir parça yarı ince kesitlerin elde edilmesi amacıyla %2,5

gluteraldahit ve %2 paraformaldehit içeren tespit solüsyonuna alınırken kalan parçalar % 10 tamponlu formalin içerisinde immersiyon fiksasyon için 24 saat bekletildi. Formalin içerisine alınan dokular parafin blok hazırlığı için sırasıyla aşağıdaki işlem basamaklarından geçirildi.

- 1) İlk olarak akar su altında yıkanarak formalinin uzaklaştırılması sağlandı.
- 2) Ardından derecesi artan alkol serilerinde aşağıda belirtilen sürelerde bekletilerek dehidrate edildi.
 - %70 etanol 15 dakika
 - %90 etanol 15 dakika
 - %100 etanol 15 dakika
 - %100 etanol 15 dakika
 - %100 etanol 30 dakika
 - %100 etanol 45 dakika
- 3) Üç değişim ksilolden (20 dk., 20 dk. ve 45 dk.) geçirilerek dokuların şeffaflanması sağlandı.
- 4) 60 °C etüvde 3 saat parafin infiltrasyonuna bırakıldı.
- 5) Son aşamada parafin bloklara gömüldü.

Parafin bloklar oda sıcaklığında tamamen sertleştikten sonra buzdolabında önce +4 °C'de daha sonra -20 °C'de bekletilerek kesit alımına hazır hale getirildi. Her bir bloktan 3-4 µm kalınlığında kesitler Leica RM 2010R model mikrotom kullanılarak alındı. Histokimyasal boyamalarda kullanılacak kesitler jelatinli su banyosu kullanılarak düz lamlara alınırken immünohistokimyasal boyamalarda kullanılacak kesitler ise daha önceden poly-L-lysine kaplanmış lamlara alındı. Kesitler alındıktan sonra lamlara iyice yapışmaları ve parafinin uzaklaştırılması için 60 °C etüvde bir gece bekletildi.

2.5.1.2. Yarı İnce Kesitlerin Değerlendirilmesi İçin Doku Takibi Prosedürü

Siyatik sinir doku parçaları 0,1 M fosfat tamponu içinde % 2,5 gluteraldehit ve % 2 paraformaldehit içeren 7,2-7,4 pH'ya sahip solüsyonda +4 °C'de 2-4 saat 1. tespit işlemine alındıktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlem basamaklarından geçirildi.

- 0,1 M fosfat tamponunda 2x15 dakika rotatorda 1. yıkama yapıldı.
- 0,1 M fosfat tamponu içinde %1 OsO₄ ile rotatorda ve karanlıkta 2 saat 2. tespit işlemi gerçekleştirildi.
- 0,1 M fosfat tamponunda 3x20 dakika 2. yıkama yapıldı.
- Distile su ile yıkandı.
- %70 etanolde %0,5 uranil asetat ve %1 fosfotungustik asitle rotatorda karanlıkta 2 saat blok boyaması yapıldı.
- %70, %96, %100 alkol ve propilen oksit ile dehidrate edildi.
- 1:1 oranda propilen oksit/araldit ile rotatorda 1 saat inkübe edildi.
- Araldit ile 2 saat inkübe edildi.
- Kapsül içine konan doku parçalarının üzerine araldit eklenmesi ile bloklama işlemi yapıldı.
- Araldit blokları polimerizasyon için 80 °C etüvde 1 gece tutuldu sonrasında etüv kapatılarak bloklar kendi halinde soğumaya bırakıldı.

Bu bloklardan ultramikrotom ile yarı ince kesitler alındı ve Toluidin mavisi boyası ile boyandı.

2.5.1.3. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Boyama İşlemleri

Periferik sinir dokularının genel değerlendirmesi için hematoksilin-eozin, bağ dokusu kılıfların değerlendirilmesi için ise Mallory azan boyaları yapıldı.

İmmünohistokimyasal değerlendirmede Schwann hücreleri anti-S100 antikoruna ile, rejenerasyon olan aksonlar ise anti-GAP43 antikoruna ile işaretlendi. Kullanılan boyaların uygulama protokolleri aşağıdaki şekildeydi.

Hematoksin-Eozin (H-E) Boyama Protokolü

- Ksilen ile 2 değişim 20'şer dakika deparafinizasyon
- %100, %96 ve %75 etanol serisinden geçirilerek hidrasyon
- Suda yıkama
- Hematoksin solüsyonu, 1 dakika
- Suda yıkama
- %1 Asit Alkol solüsyonunda diferansiyasyon
- Suda yıkama
- %1 amonyaklı su solüsyonunda diferansiyasyon
- Suda yıkama
- Eozin solüsyonu, 1 dakika
- Suda yıkama
- %75, %96 ve %100'lük etanol serisinden geçirilerek dehidrasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan ile kapatma

Mallory Azan Boyama Protokolü

- Ksilen ile 2 değişim 20'şer dakika deparafinize edildi.
- %100, %96 ve %75 etanol serisinden geçirilerek hidrate edildi.
- Suda yıkandı.
- % 0,1 Azokarmin G solüsyonu, 60 °C etüvde 1 saat inkübe edildi.
- Suda yıkandı.
- %1 anilin alkolde farklandırma , %1 asetik alkolde durulama ve %5 fosfotungstik asitle mordanlama yapıldı.
- Suda yıkandı
- % 0,25 anilin mavisi- %1 orange G solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi

- Suda yıkandı.
- %75, %96 ve %100'lük etanol serisi ile dehidrate edildi.
- Ksilen ile şeffaflandırıldı.
- Entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

- Ksilen ile 2 değişim 20'şer dakika deparafinize edildi.
- %100, %96 ve %75 etanol serisinden geçirilerek hidrate edildi.
- Fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı
- Antijenlere ait epitoplara açığa çıkarılması için sitrat tamponu solusyonu (ph: 6) içerisinde düdüklü tencerede 2 dk kaynatıldı.
- Kesitler soğuduktan sonra dokular hidrofobik pap-pen ile çevrelendi ve nemli ortam kabı içerisine yerleştirildi.
- Endojen peroksidaz aktivitesine bağlı özgün olmayan arka plan boyanmasını azaltmak için % 3'lük hidrojen peroksit ile 10 dk. inkübe edildi.
- PBS ile 3 kez yıkandı.
- Özgün olmayan arka plan boyanmasını azaltmak için Ultra V Blok ile 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Primer antikor ile buzdolabında +4 °C'de bir gece inkübe edildi.
- PBS ile 3 kez yıkandı.
- Primer antikor enhancer ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- PBS ile 3 kez yıkandı.
- HRP Polimer ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- PBS ile 3 kez yıkandı.
- DAB ile 2 dk. boyandı.
- Distile su ile 3 kez yıkandı.
- Hematoksilin ile 30 saniye çekirdek boyaması yapıldı.
- %75, %96 ve %100'lük etanol serisi ile dehidrate edildi.
- Ksilen ile şeffaflandırıldı.
- Entellan ile kapatıldı.

Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü

- Kesitler ısıtıcıda kurutuldu.
- Distile su içinde %1 boraks, %1 toluidin mavisi, %1 Azur II içeren toluidin mavisi/Azur II boyasıyla 50°C- 60°C ısıtıcıda boya kuruyana kadar bekletildi.
- Distile su ile yıkandı.
- Kesitler ısıtıcıda kurutuldu.
- Soğuduktan sonra ksilene alındı.
- Entellan ile kapatıldı.

2.5.2. Stereolojik Analiz

Periferik sinirlerde yapılan geleneksel morfometrik analizlerin çoğu kendilerine özgü sınırlamalara ve dezavantajlara sahipken stereoloji alanındaki gelişmeler verimli ve tarafsız alternatifler sağlamaktadır. Stereolojik analiz yöntemlerinde sistematik rastgele örnekleme yaklaşımının kullanımı ile periferik sinirdeki her bir sinir lifine eşit örnekleme şansı tanınmakta böylece morfolojik verilerin kesin ve güvenilir olarak değerlendirilmesi mümkün olmaktadır (Canan ve ark., 2008).

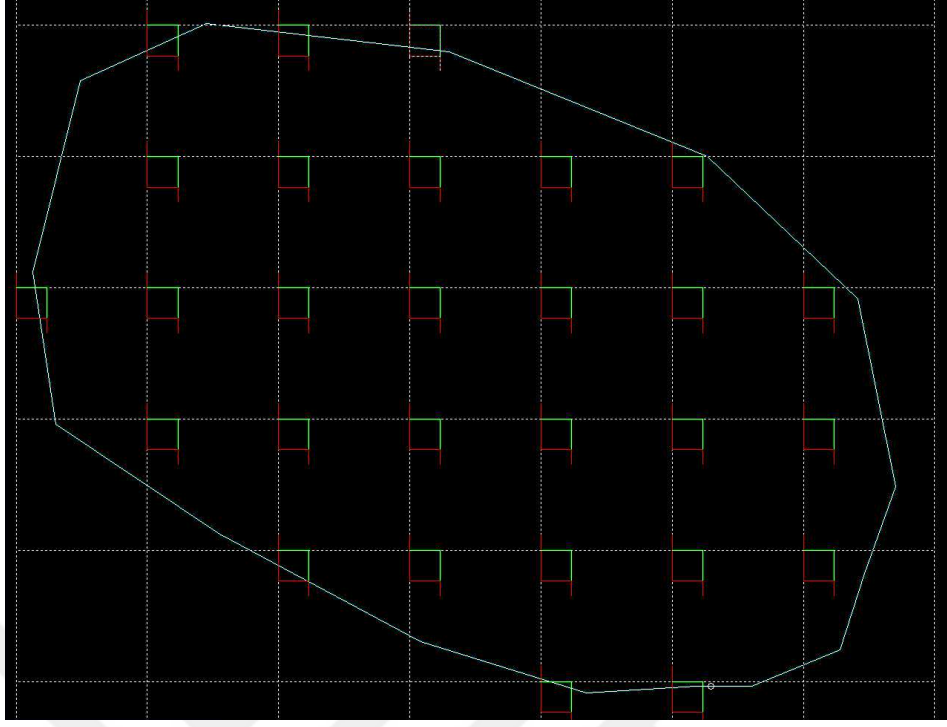
Sayım için kullanılan stereoloji sistemi; mikroskop (Leica DM3000B) üzerine takılı bilgisayar kontrollü XYZ ekseninde hareketli bir tabla (Ludl MAC6000), dijital kamera (Qimaging) ve tüm bunları kontrol eden stereoloji yazılımından (MBF Bioscience, Stereo Investigator) oluşmaktaydı.

İlk olarak Mayhew tarafından 1998 yılında rat tibial sinirinde toplam miyelinli sinir lifi sayısını belirlemek üzere tanımlanan fraksiyonlama probu (Canan ve ark., 2008) kullanılarak miyelinli akson sayısı ve hasarlı akson sayısı belirlendi.

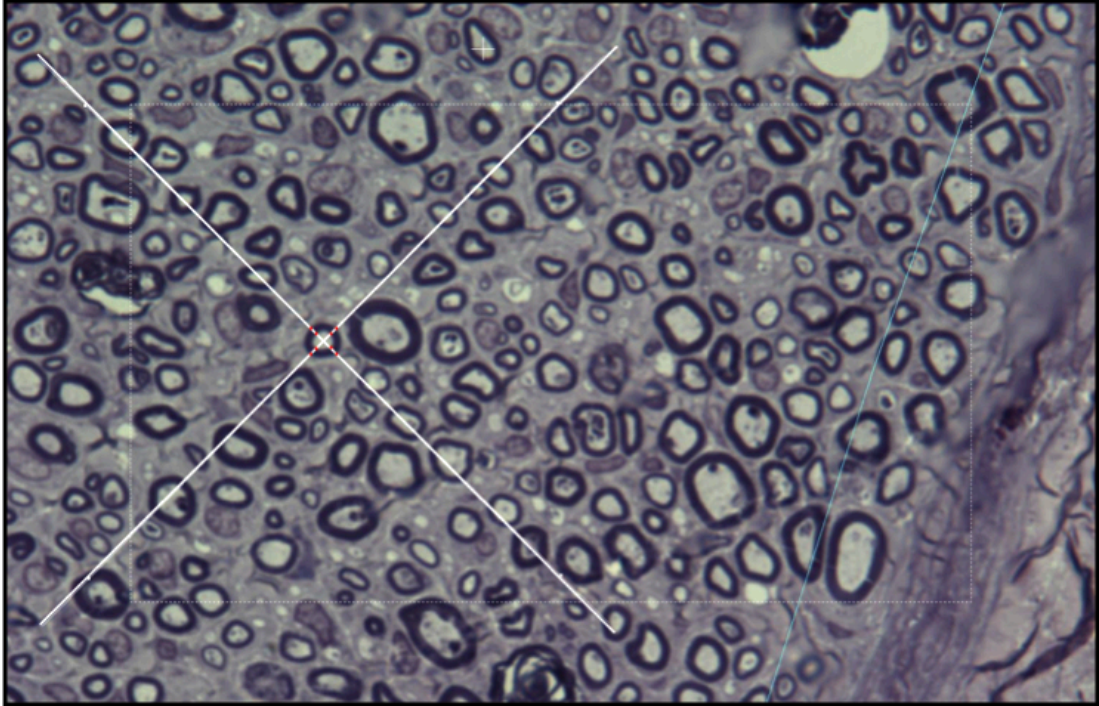
Stereolojik analizlerde kullanılmak üzere her bir araldit bloktan 5-10 adet yarı ince kesit alındı. Toluidin mavisi ile boyanan bu kesitlerden iyi boyanmış olan bir tanesi rastgele olarak seçildi. Siyatik sinirde ilgili alanın belirlenmesi ve tarafsız sayım çerçevelerinin yerleştirilmesi işlemi x4 objektif büyütmesinde (Şekil 2.5), sayımlar ise x100 objektif büyütmesinde gerçekleştirildi.

Nucleator probu kullanılarak da sayılan miyelinli aksonlarda lif alanı, akson alanı, miyelin alanı, lif çapı, akson çapı ve miyelin kalınlığı ölçümleri gerçekleştirildi (Şekil 2.6). Ayrıca bu ölçümler neticesinde elde edilen lif çapı ve akson çapı değerleri kullanılarak g-ratio (akson çapı/lif çapı) değerleri hesaplandı.

Sayımlara başlamadan önce her grupta gerçekleştirilen pilot çalışma neticesinde kullanılacak tarafsız sayım çerçevesi boyutları ve sayım çerçeveleri arasındaki adım aralığı boyutları belirlendi. Bu değerler hata katsayısı (coefficient of error=CE) 0,05'in altında olacak şekilde belirlendi. Rastgele bir başlangıç noktasından itibaren 35x35 µm boyutlarındaki tarafsız sayım çerçeveleri ($a_{\text{çerçeve}}$) tüm bir sinir enine kesiti boyunca x ve y eksenlerinde sistematik olarak 150x150 µm'lik adım aralıklarıyla ($a_{\text{örneklem}}$) yerleştirildi.



Şekil 2.5. Fraksiyonlama probu kullanılarak sayım çerçevelerinin yerleştirilmesi.



Şekil 2.6. Nucleator probu ile aksonda ölçümlerin yapılması.

Buna göre, sayım çerçeveleri adım aralıklarıyla belirli alanlara bölünmüş olan sinir enine kesitinde sabit bir bölümü kapsamaktadır. Tarafsız sayım çerçevesi alanının ($a_{\text{çerçeve}}$) adım aralıklarının belirlediği alana ($a_{\text{örneklem}}$) bölünmesiyle belirlenen bu sabit orana örnekleme oranı (sampling fraction=sf) adı verilir ve aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$sf = (a_{\text{çerçeve}}) / (a_{\text{örneklem}})$$

Sayım çerçeveleri içerisinde sayılan akson sayıları (Q) örnekleme oranının tersiyle ($1/sf$) çarpılarak toplam akson sayısı tarafsız bir şekilde hesaplanmış olur.

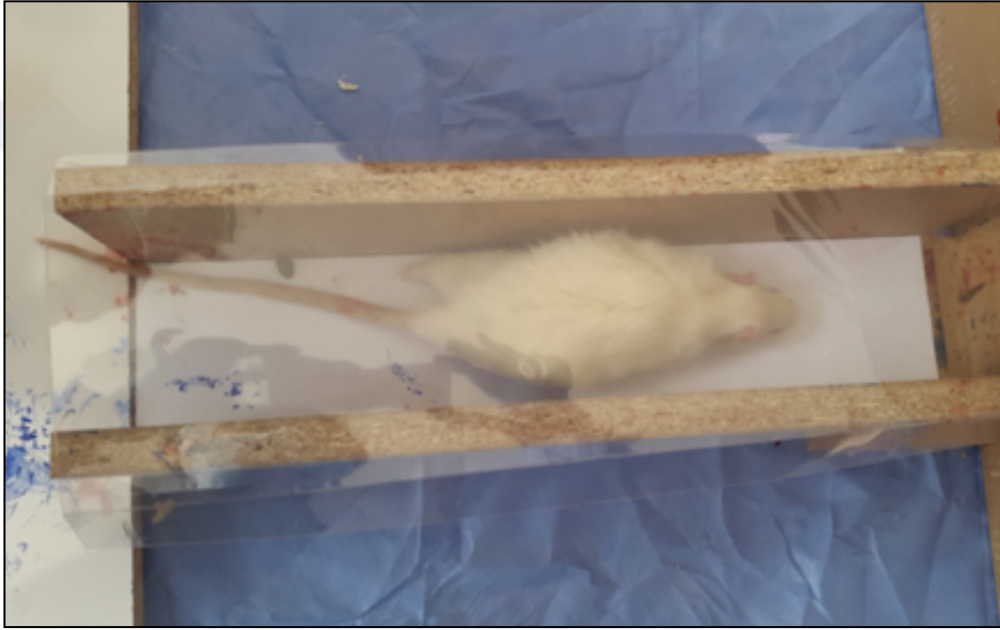
$$N = 1 / sf \cdot Q$$

Tarafsız sayım çerçevesi ilk olarak Gundersen (1978) tarafından tanımlanmış olup iki kenarı sayım harici tutulan (yasak kenarlar) kare bir sayım çerçevesinin kullanımı esasına dayanmaktadır. Buna göre yazılım içerisinde kırmızı renkle gösterilen sol ve alt kenarlar yasaklı olup bu çizgilere değen aksonlar sayıma dahil edilmezken, karenin yeşil renkle gösterilen sağ ve üst kenarlarına değen veya kare içerisinde bulunan aksonlar sayıma dahil edilmektedir.

2.5.3. Yürüme Yolu Testi ve Siyatik Fonksiyon İndeksi

Deneklerin iyileşme düzeylerinin fonksiyona olan yansımalarını değerlendirebilmek amacıyla yürüme yolu testi gerçekleştirildi. Bu test sinir iyileşmesinin zaman içerisindeki değişimin gözlenebilmesi amacıyla kesi modeli oluşturulmadan önce (Pre-op), kesi modeli oluşturulduktan 6 hafta sonra (Post-op 6. hafta) ve kesi modeli oluşturulduktan 12 hafta sonra (Post-op 12. hafta) olmak üzere 3 farklı zamanda tekrarlandı.

Test düzeneğinde 8,2 cm genişliğinde ve 42 cm uzunluğunda iki yanı kapalı bir yürüme yolu (Şekil 2.7) yürüme yolunun tabanına koyulmak üzere aynı ölçülerde beyaz kağıt ve yolun sonunda karanlık bir kutu bulunmaktaydı. Öncelikle hayvanların kesi hasarı oluşturulan sol ayakları kırmızı, hasar oluşturulmayan sağ ayakları ise lacivert mürekkepli stampalara bastırıldı. Daha sonra açık olan uçtan yürüme yoluna bırakıldı ve yolu yürüyüp kutuya girdikten hemen sonra kutudaki delik kapatılarak geri dönmeleri önlendi. Her hayvana aynı işlem yolun tabanındaki kağıt yenilerek 3'er kez tekrar ettirildi.



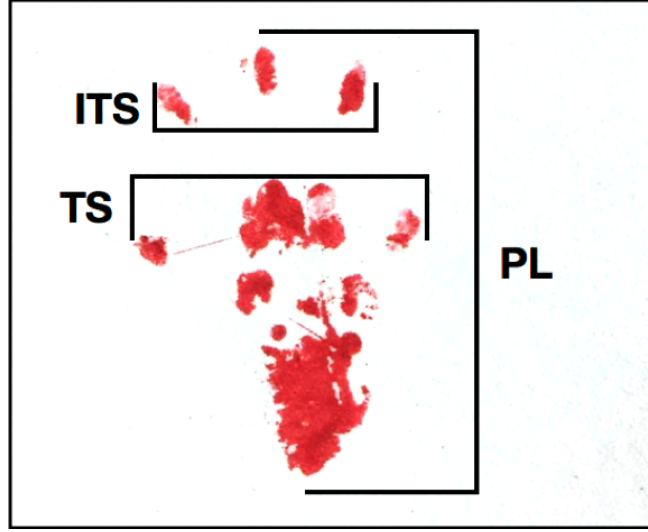
Şekil 2.7. Yürüme yolu testi düzeneği

Test sonrasında kağıt üzerine çıkan ayak izlerinde çeşitli ölçümler gerçekleştirildi (Şekil 2.8 ve Şekil 2.9).

Print length (PL): Üçüncü parmak ucundan topuğa kadar olan mesafe

Toe spread (TS): Birinci parmak ile beşinci parmak arasındaki mesafe

Intermediate toe spread (ITS): İkinci ve dördüncü parmak arasındaki mesafe



Şekil 2.8. Ayak izlerinde gerçekleştirilen ölçümler

Ölçüm sonucu elde edilen değerler aşağıda belirtilen formülde yerine koyularak siyatik fonksiyon indeksi (SFI) hesaplandı. SFI değeri 0 ile -100 arasında değişmekle birlikte, 0 normal durumu belirtirken -100 tam sakatlık durumunu göstermektedir (Bain ve ark., 1989).

$$SFI = -38,3 \left[\frac{EPL - NPL}{NPL} \right] + 109,5 \left[\frac{ETS - NTS}{NTS} \right] + 13,3 \left[\frac{EITS - NITS}{NITS} \right] - 8,8$$



Şekil 2.9. Yürüme yolu testinde elde edilen ayak izlerinin görünümü. Kesi hasarı oluşturulan ayakların izleri kırmızı renkli normal ayakların izleri ise mavi renkli olarak görülmekte.

2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın tüm istatistiksel analizleri IBM SPSS 22 paket programı kullanılarak yapıldı.

Çalışmada yer alan verilerden normal dağılım göstermeyen SFI verileri için Bağımsız Örneklemli Kruskal-Wallis testi yapılarak gruplar arasında fark olup olmadığı değerlendirildi daha sonra farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Dunn Post-hoc ikili karşılaştırma testi uygulandı.

Akson sayıları ve aksonlara ait diğer ölçüm verileri değerlendirilirken normal dağılım gösterenler için Bağımsız Örneklemli t-testi, normal dağılım göstermeyenler için ise Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Genel Değerlendirme Bulguları

Bu tez çalışmasına 5 grupta toplam 40 adet deney hayvanı dahil edildi ancak her gruptan bir hayvan PRP elde edilmesi amacıyla kullanıldı ve bu nedenle deney dışı bırakıldı. Periferik sinir kesi modeli 35 adet deney hayvanında gerçekleştirildi ve cerrahi sonrası 12 haftalık takip suresi boyunca herhangi bir denek kaybı yaşanmadı. Takip suresince cerrahi yapılan bölgede herhangi bir enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı.

Cerrahi sonrası 6. haftada tüm gruplardaki hayvanların kesi modeli oluşturulan ekstremitelelerinde paralizisi geliştiği gözlendi. Ayrıca bazı hayvanların ayaklarında kontraktür ve ayak parmaklarında kayıp olduğu izlendi (şekil 3.1).

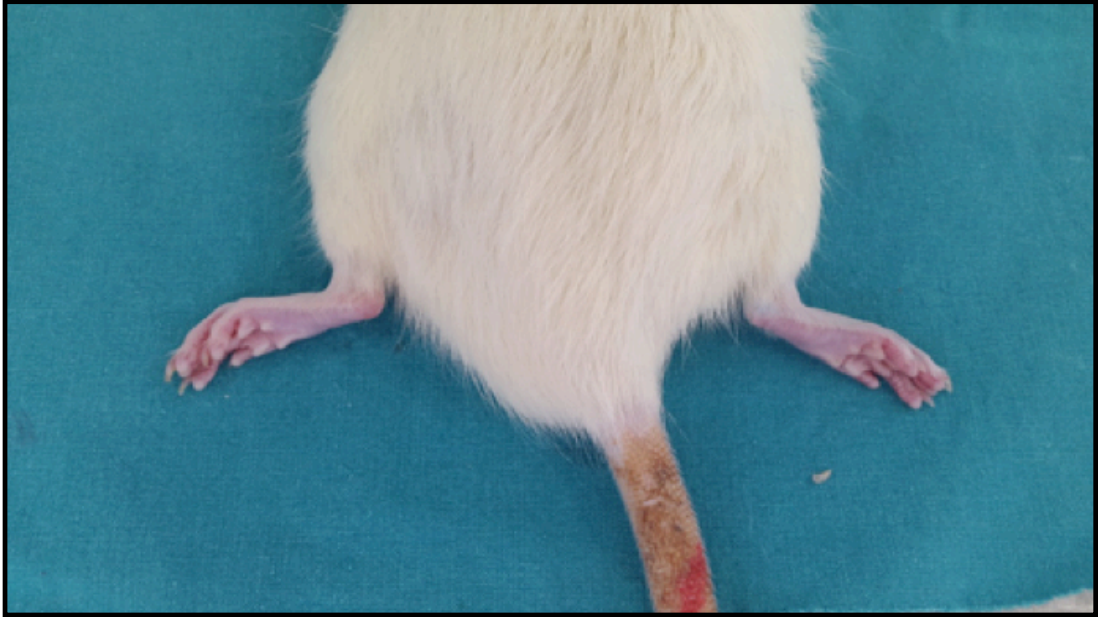


şekil 3.1. 12. Haftada sol arka ekstremitede parmak kaybı.

12. hafta sonunda paralizisi ve kontraktür oluşumu bulgularında kısmi iyileşme olduğu gözlendi (şekil 3.2, şekil 3.3, şekil 3.4).



Şekil 3.2. Kondroitinaz (CH) Grubu 12. hafta genel görünüm. Sol arka ekstremitede periferik sinir kesi modeli oluşturuldu, sağ tarafa ise herhangi bir cerrahi işlem yapılmadı.

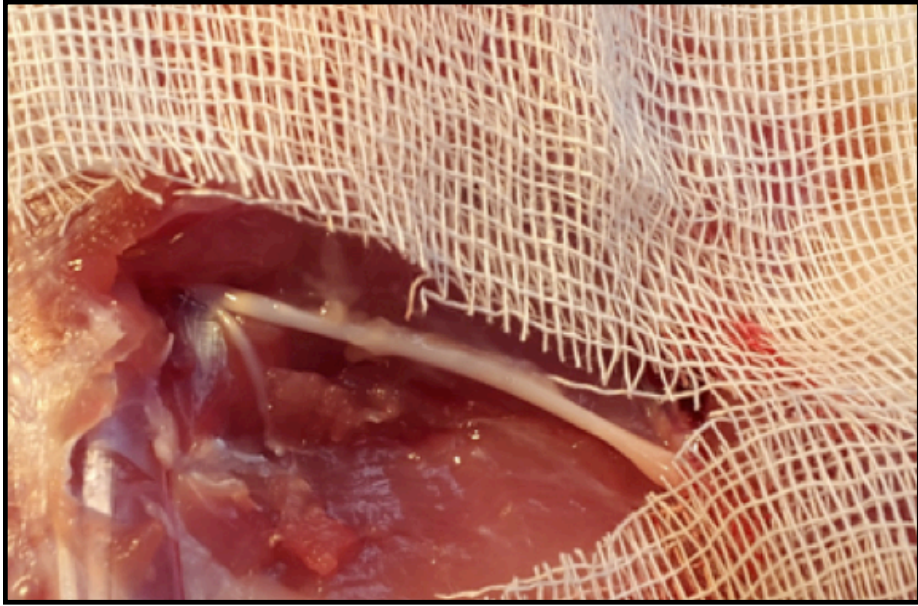


Şekil 3.3. PRP Grubu 12. hafta genel görünüm. Sol arka ekstremitede periferik sinir kesi modeli oluşturuldu, sağ tarafa ise herhangi bir cerrahi işlem yapılmadı.

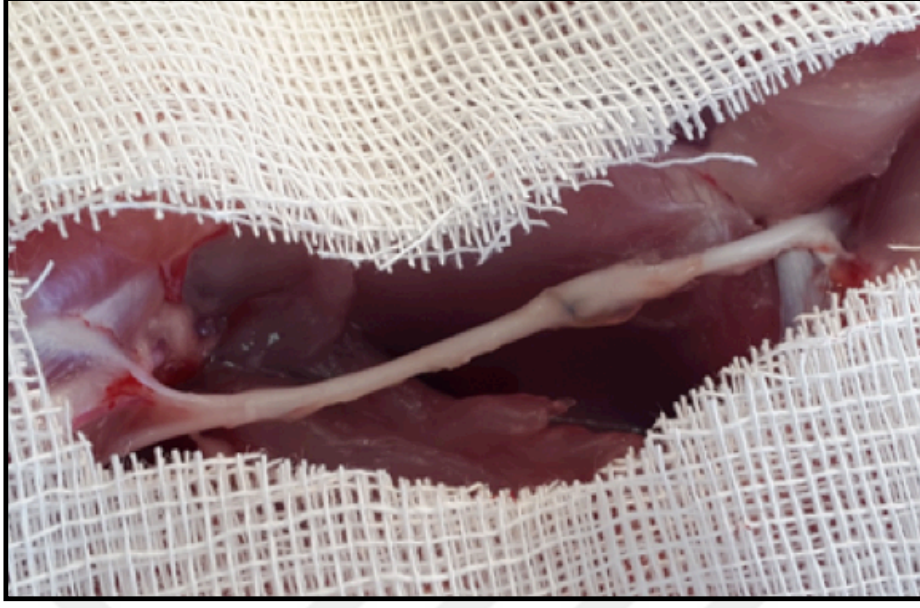


Şekil 3.4. CH+PRP Grubu 12. hafta genel görünüm. Sol arka ekstremitede periferik sinir kesi modeli oluşturuldu, sağ tarafa ise herhangi bir cerrahi işlem yapılmadı.

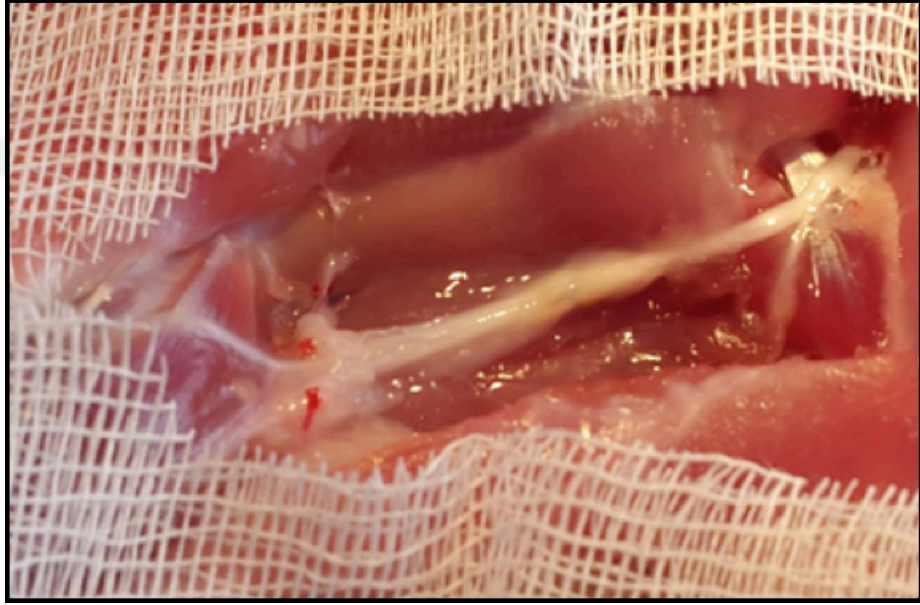
Deney sonunda doku örneklerinin alımı esnasında cilt ve cilt altı dokularının tamamen iyileştiği belirlendi. Diseksiyon sonrası makroskobik olarak periferik sinir kesi bölgesinde kontrole (Şekil 3.5) göre bazı hayvanların siyatik sinirlerinde kalınlaşma ve hafif yapışıklıklar izlendi (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).



Şekil 3.5. 12. Hafta kontrol tarafı (sağ) siyatik sinir makroskobik görünüm.



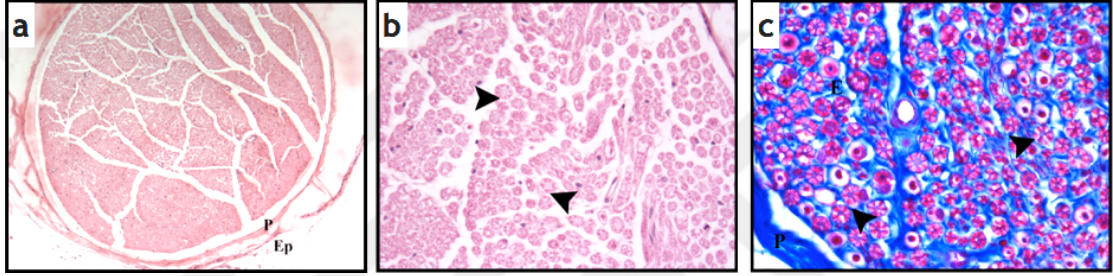
Şekil 3.6. Deney sonrası 12. hafta sol siyatik sinir makroskopik görünüm.



Şekil 3.7. Deney sonrası 12. hafta sol siyatik sinir makroskopik görünüm.

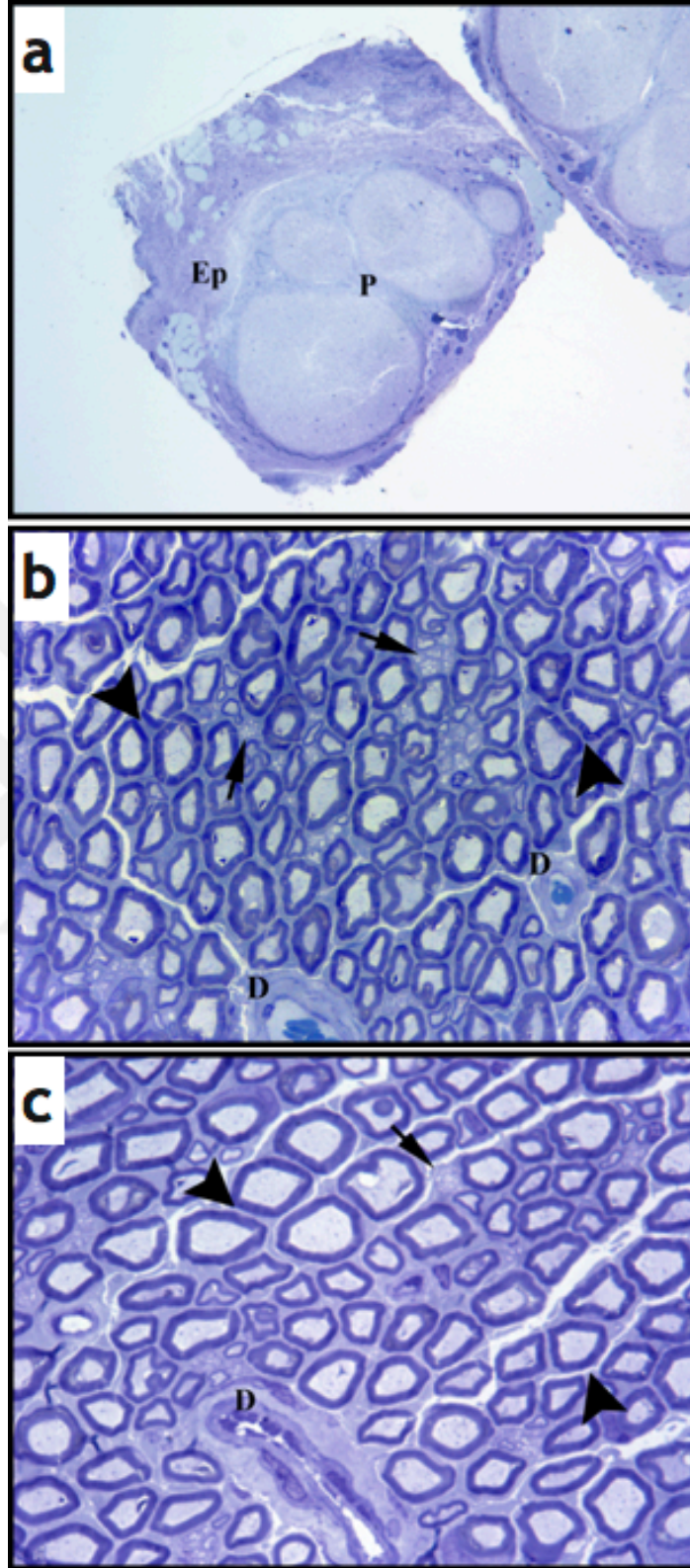
3.2. Işık Mikroskopik Değerlendirme Bulguları

Kontrol dokuları olarak deneklerin işlem yapılmayan sağ siyatik sinirlerinden alınan doku örnekleri değerlendirildi. 12. hafta sonunda Hematoksilin-Eozin (H-E) ve Mallory Azan (MA) ile boyalı kesitlerde yapılan incelemede epinöryum ve perinöryumdan oluşan bağ dokusu sinir kılıfları normal görünümdeydi. Endonöryumla çevrili aksonların etrafında bulunan ve parafin blok hazırlığı sırasında kullanılan alkol ve ksilol nedeniyle erimiş olan miyelinin tipik ışık mikroskopik nörokeratin görüntüsü izlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Kontrol dokularına ait ışık mikroskop görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesiti genel görünümü, x10, b) Ok başı: Sağlıklı aksonlar, x40, Hematoksilin-Eozin, c) Kontrol dokusuna ait Mallory Azan boyalı ışık mikroskop görüntüsü. Ok başı: Nörokeratin çatısı belirgin sağlıklı aksonlar. x100, Mallory Azan.

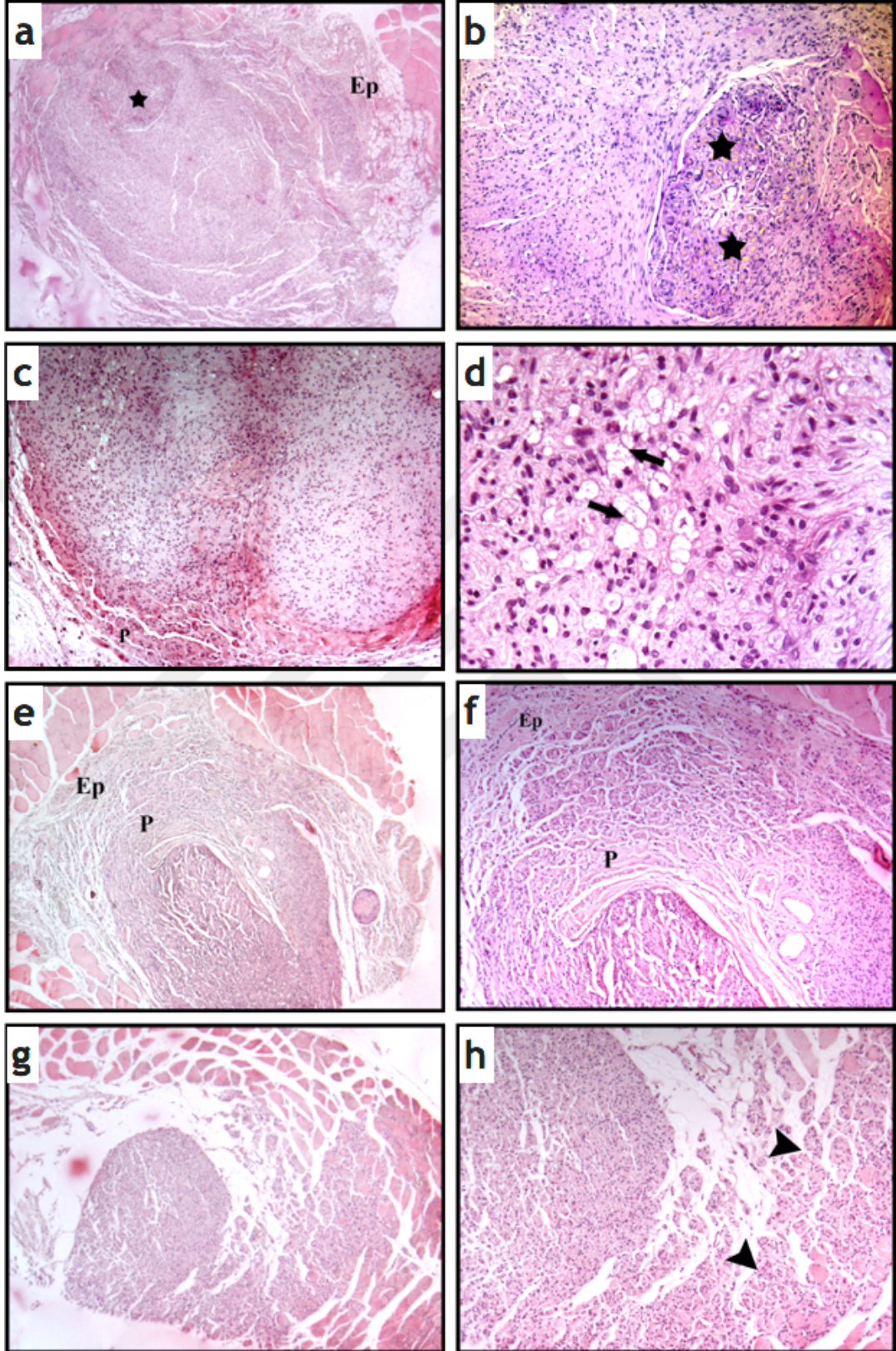
Yarı ince kesitlerde siniri çevreleyen epinöryum ve fasikülleri çevreleyen perinöryumun sağlıklı bir görünüme sahip olduğu görüldü. Değişik çaplarda miyelinli aksonlar ve aralarında bulunan miyelinsiz aksonlar izlendi. Aksonların çevresinde ökromatik çekirdekleriyle Schwann hücreleri görüldü. Miyelinli aksonlarda bu Schwann hücreleri tarafından yapılan ve aksonu çevreleyen miyelin kılıfların normal görünüme sahip oldukları izlendi. Bağ doku kılıfları içerisinde kan damarları görüldü (Şekil 3.9).



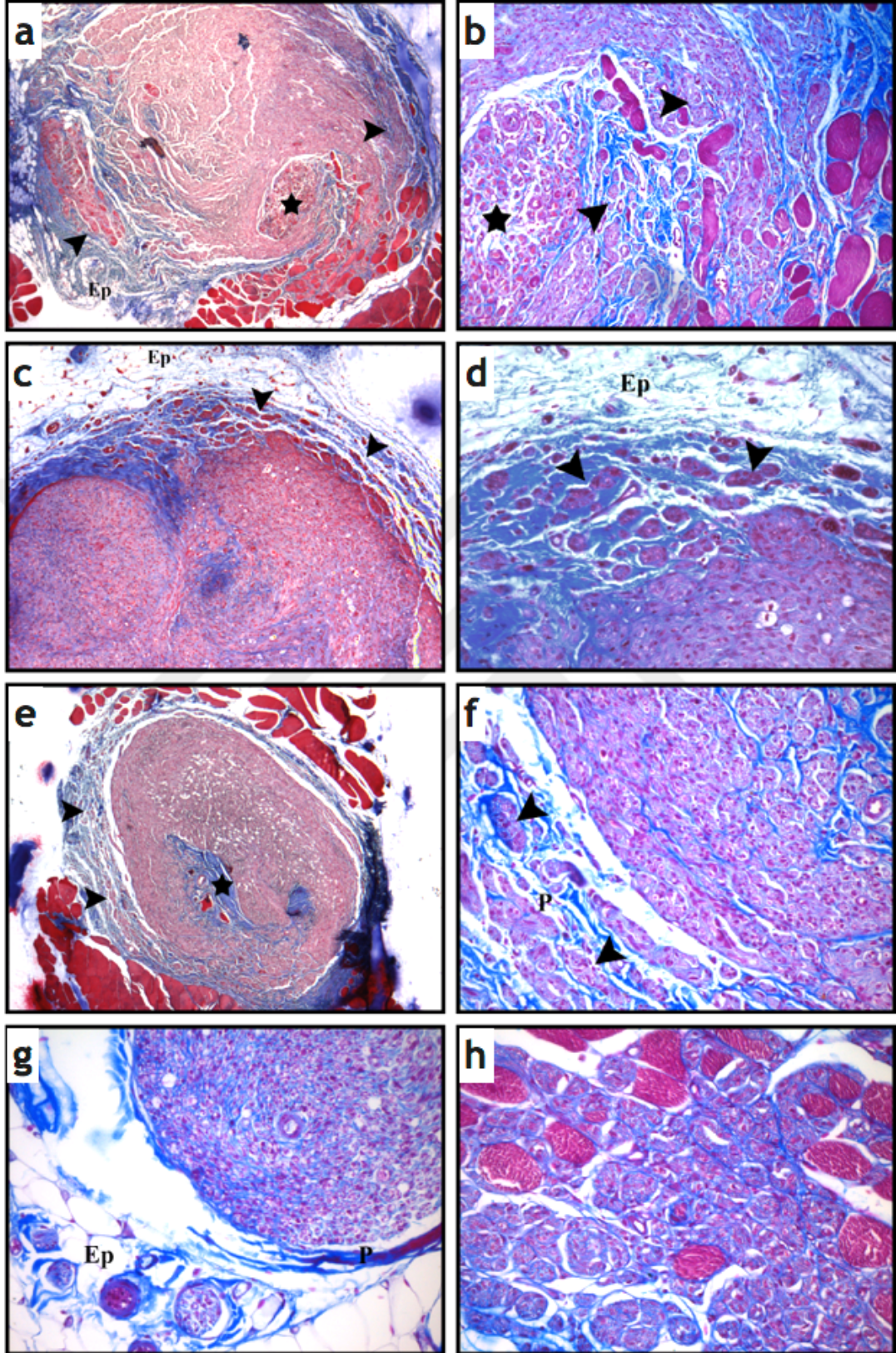
Şekil 3.9. Kontrol dokularına ait yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x4; b-c) Miyelinli ve miyelinsiz aksonlar, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, ok başı: miyelinli aksonlar, ince ok: miyelinsiz aksonlar, D: damar. Toluidin mavisi.

3.2.1. Deney Grupları Merkez Bölgesi Işık Mikroskop Bulguları

12. hafta sonunda Hematoksin-Eozin (HE) ile boyalı kesitlerde ışık mikroskopunda yapılan incelemede tüm deney gruplarında epinöryum ve perinöryumun bağ dokusu içerisinde adacıklar şeklinde akson filizleri izlendi. Sinir kesisi sonrası primer epinöral anastomoz yapılan ve ilgili gruba uygun tedavinin uygulandığı merkez bölgede en çok salin grubunda olmak üzere tüm deney gruplarında sinir lifini oluşturan aksonlarda şişme ve vakuolizasyon ile karakterize dejenerasyon bulguları izlendi. Schwann hücrelerinde tüm gruplarda proliferasyon belgindi. Bazı kesitlerde epinöral bağ dokusunun sinir lifi içerisine uzandığı gözlemlendi. Bu bulgunun primer epinöral dikiş sırasında bağ dokusunun sinir lifi içine taşındığını düşündürdü. Mallory Azan (MA) boyalı preparatlarda sinir lifi içine uzanan epinöral bağ dokusu daha belirgin olarak izlendi. Ayrıca epinöryum ve perinöryum içindeki akson filizlerinin bağ dokusu ile çevrili gruplar oluşturduğu gözlemlendi. Epinöral bağ dokusu içinde yağ hücreleri ve siniri besleyen damarlar normal görünümdeydi. Sinire komşu kas dokusunda dejenerasyon mevcuttu (Şekil 3.10, Şekil 3.11).



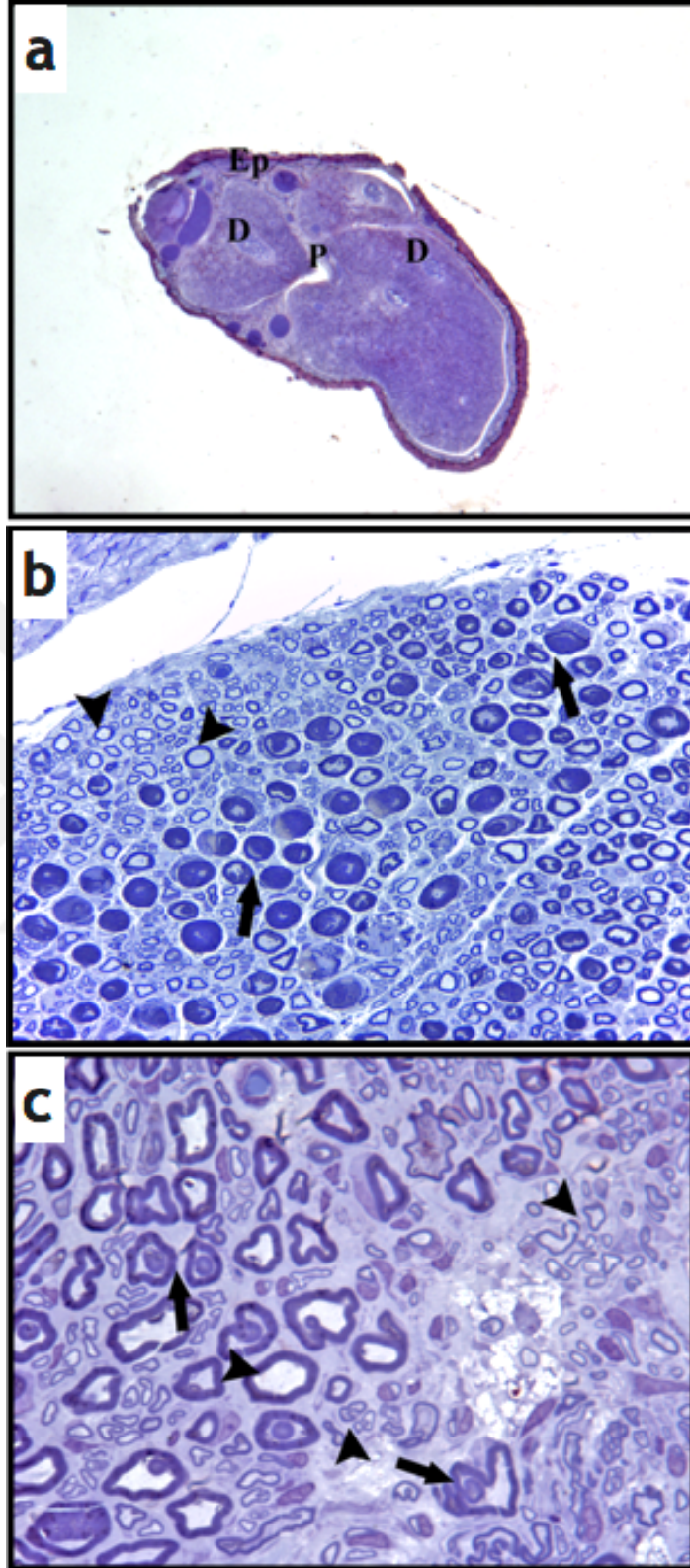
Şekil 3.10. Salin (a-b), CH (b-c), PRP (d-e) ve CH+PRP (g-h) grupları merkez bölgesi ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, yıldız: dejenere akson grupları, ok: dejenere aksonlar, ok başı: bağ doku kılıf içerisinde rejenere akson filiz grupları. a, e, g) x4; b) x20; c, f, h) x10; d) x40; Hematoksilin-Eozin.



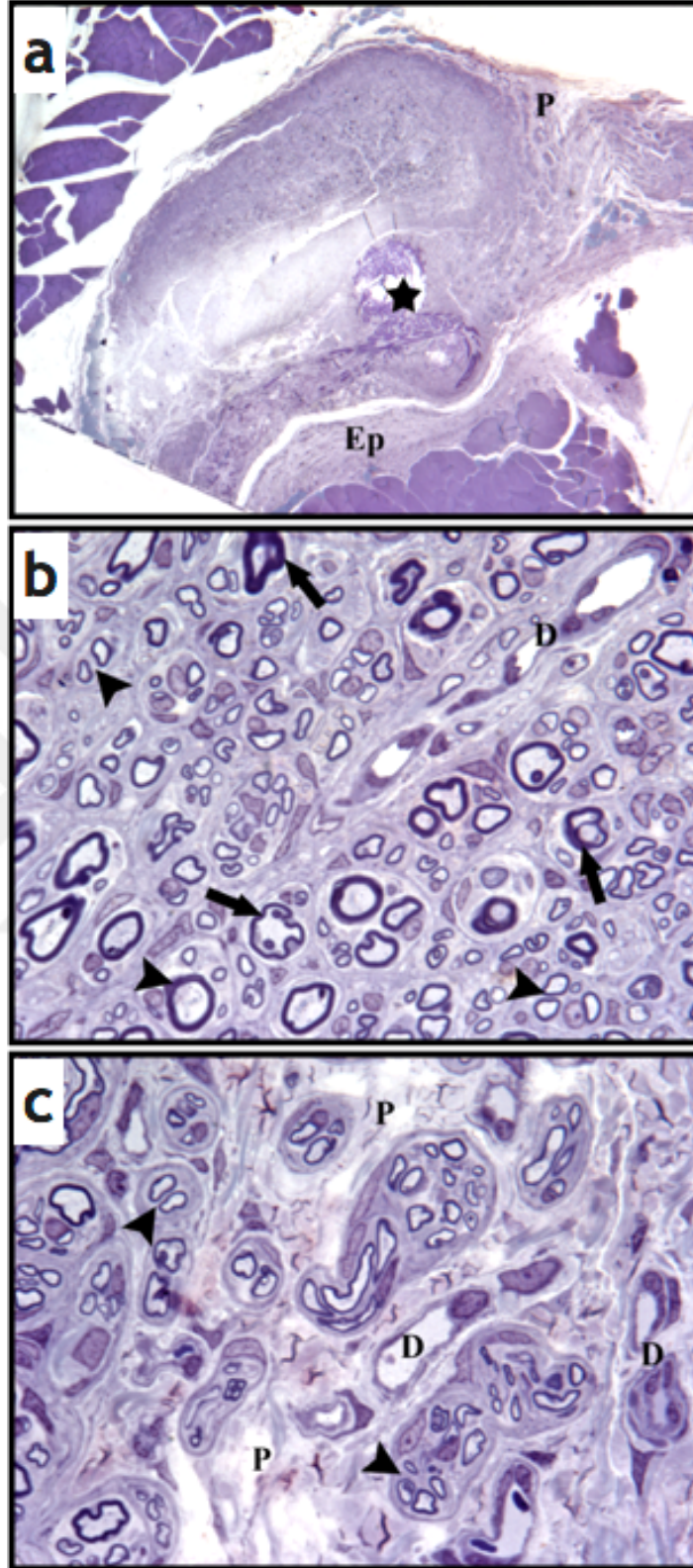
Şekil 3.11. Salin (a-b), CH (c-d), PRP (e-f) ve CH+PRP (g-h) grupları merkez bölgesi ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, yıldız: dejenere akson grupları, ok başı: bağ doku kılıf içerisinde rejenere akson filiz grupları. a, e) x4; b) x20; c) x10; d, f, g, h) x40; Mallory Azan.

12. hafta sonunda Toluidin mavisi ile boyalı yarı ince kesitlerde yapılan incelemede kesi grubunda aksonları çevreleyen miyelin kılıfında kalınlaşma, ondülasyon ve dejenerasyon mevcuttu. Endonöryumda genişleme ve odakal dejeneratif bölgeler izlendi. İnce miyelinli ve küçük çaplı aksonlar gözlendi (Şekil 3.12). Salin grubunda bunlara ek olarak perinöryumda muhtemelen Schwann hücre sitoplazmasıyla çevrili akson filizleri izlendi. Endonöryumda genişleme ve odakal dejenerasyon bu grupta da mevcuttu. Endonöryumda ve perinöryumda damar kesitleri izlendi (Şekil 3.13).





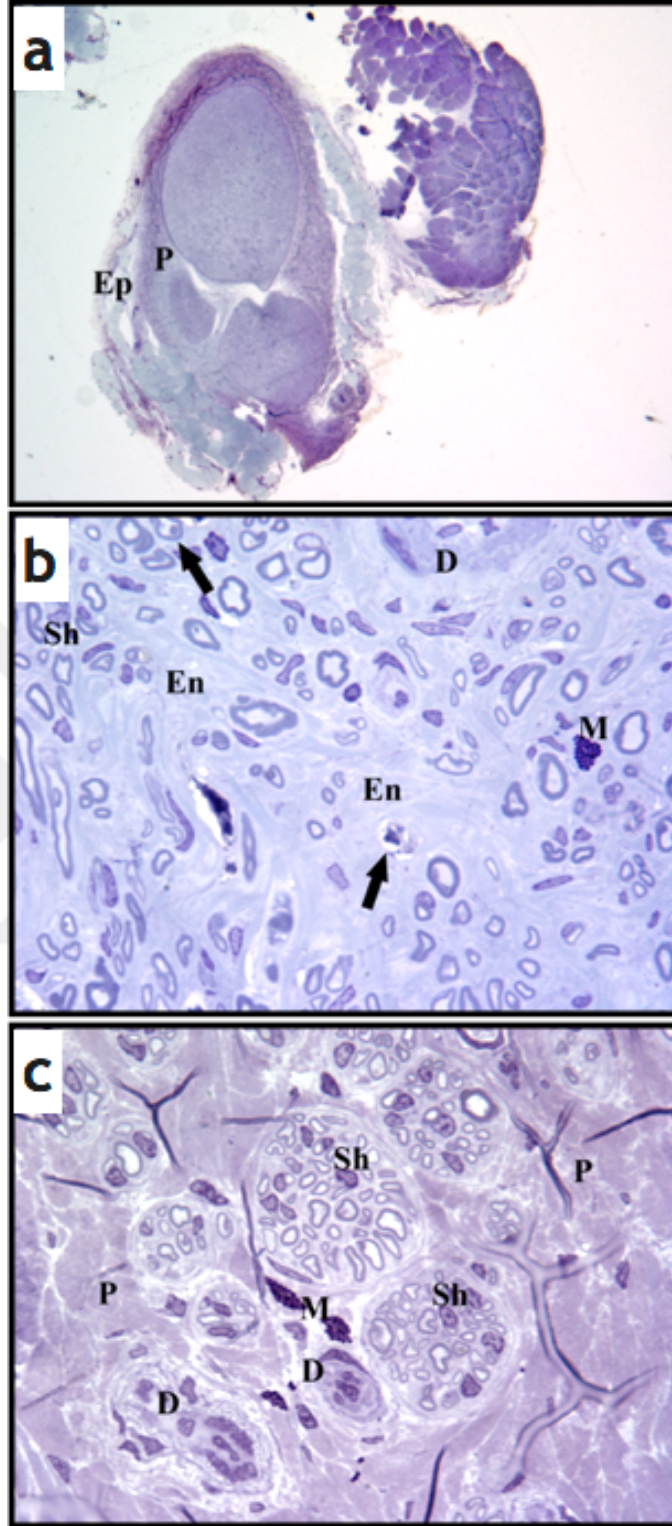
Şekil 3.12. Kesi grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x4; b) Dejenere ve normal aksonlar, x40; c) Normal ve dejenere aksonlar ile endonöryumda odaksal dejenerasyon, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi.



Şekil 3.13. Salin grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü ve komşuluğunda dejenere kas lifleri (yıldız), x4; b) Sağlıklı ve dejenere aksonlar, x100; c) Perinöryumda aksonal filiz grupları, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi.

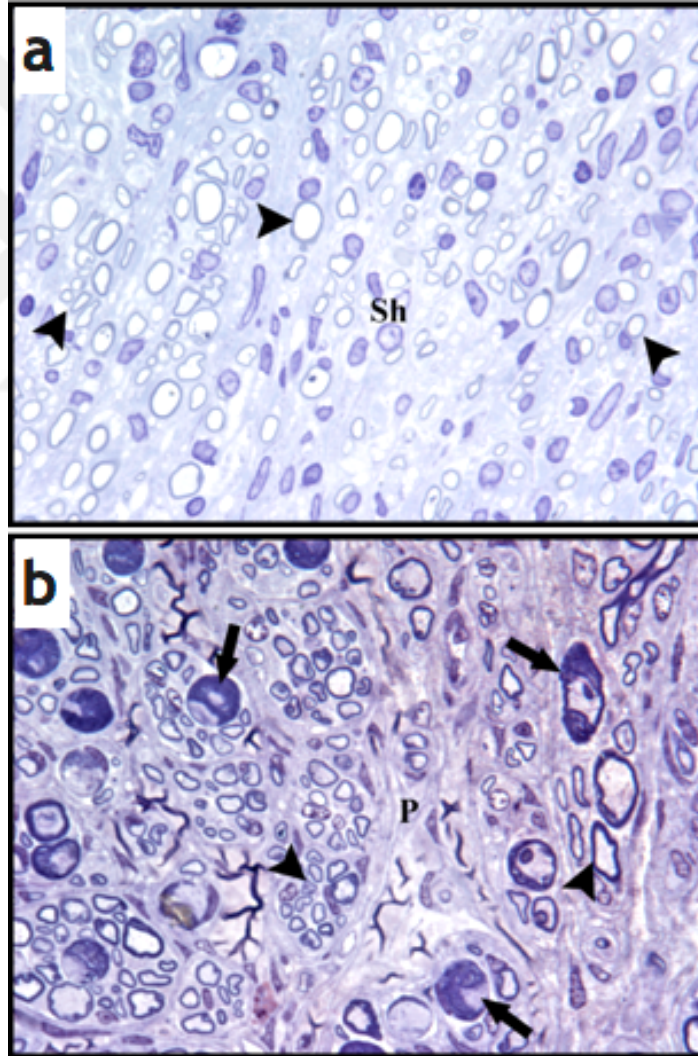
CH grubunda endonöryumda genişleme daha fazla izlendi. İnce miyelinli ve küçük çaplı aksonlar çoğunlukta idi. Perinöral bağ dokusu içerisinde etrafı çevrelenmiş aksonal filiz grupları ve aralarında damar komşuluğunda yerleşimli mast hücreleri izlendi (Şekil 3.14).



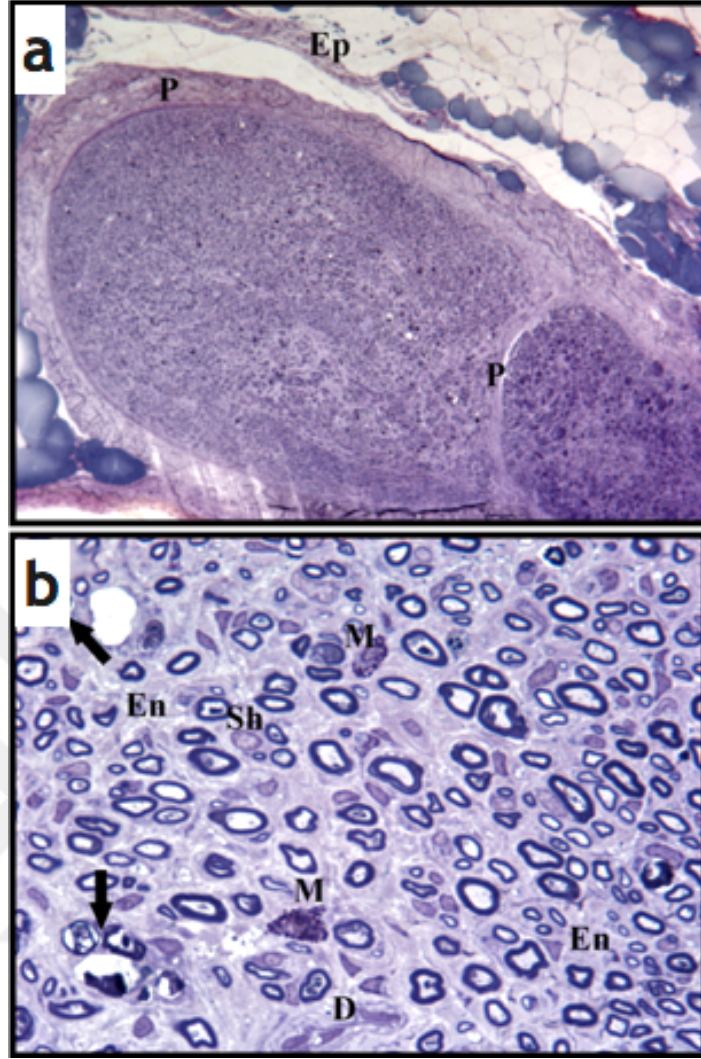


Şekil 3.14. CH grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesiti genel görünümü, x4; b) Genişlemiş endonöryum içinde küçük çaplı aksonlar, x100; c) Perinöral bağ dokusunda aksonal filiz grupları, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, En: Endonöryum, Sh: Schwann hücreleri, M: Mast hücresi, ok: dejenere aksonlar, D: damar; Toluidin mavisi.

PRP grubunda ince, düzgün miyelinli ve küçük çaplı aksonların çoğunlukta olduğu gözlemlendi. Bunların yanı sıra miyelin kılıfta kesinti ve kopmaların olduğu dejenere aksonlara da rastlandı. Bol sayıda Schwann hücre çekirdeği izlendi. Ayrıca salin ve CH grubuna benzer şekilde perinöryumda akson filiz grupları gözlemlendi (Şekil 3.15). CH+PRP grubunda küçük büyütmede fasikül içi endonöryumda odaksal genişlemeler ve endonöryumda rejenerasyon gösteren akson grupları izlendi. Düzgün miyelinli aksonların yanı sıra miyelin kılıfta kopukluklar ve dejenerasyon gösteren aksonlar ve yakın komşuluğunda mast hücreleri izlendi. Perinöryumda aksonal filiz grupları mevcuttu (Şekil 3.16).



Şekil 3.15. PRP grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) İnce miyelinli ve küçük çaplı aksonlar, x100; b) Aşırı miyelinlenmiş dejenere ve küçük çaplı sağlıklı aksonlar ile perinöryumda akson filizleri, x100. P: Perinöryum, Sh: Schwann hücreleri, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi.

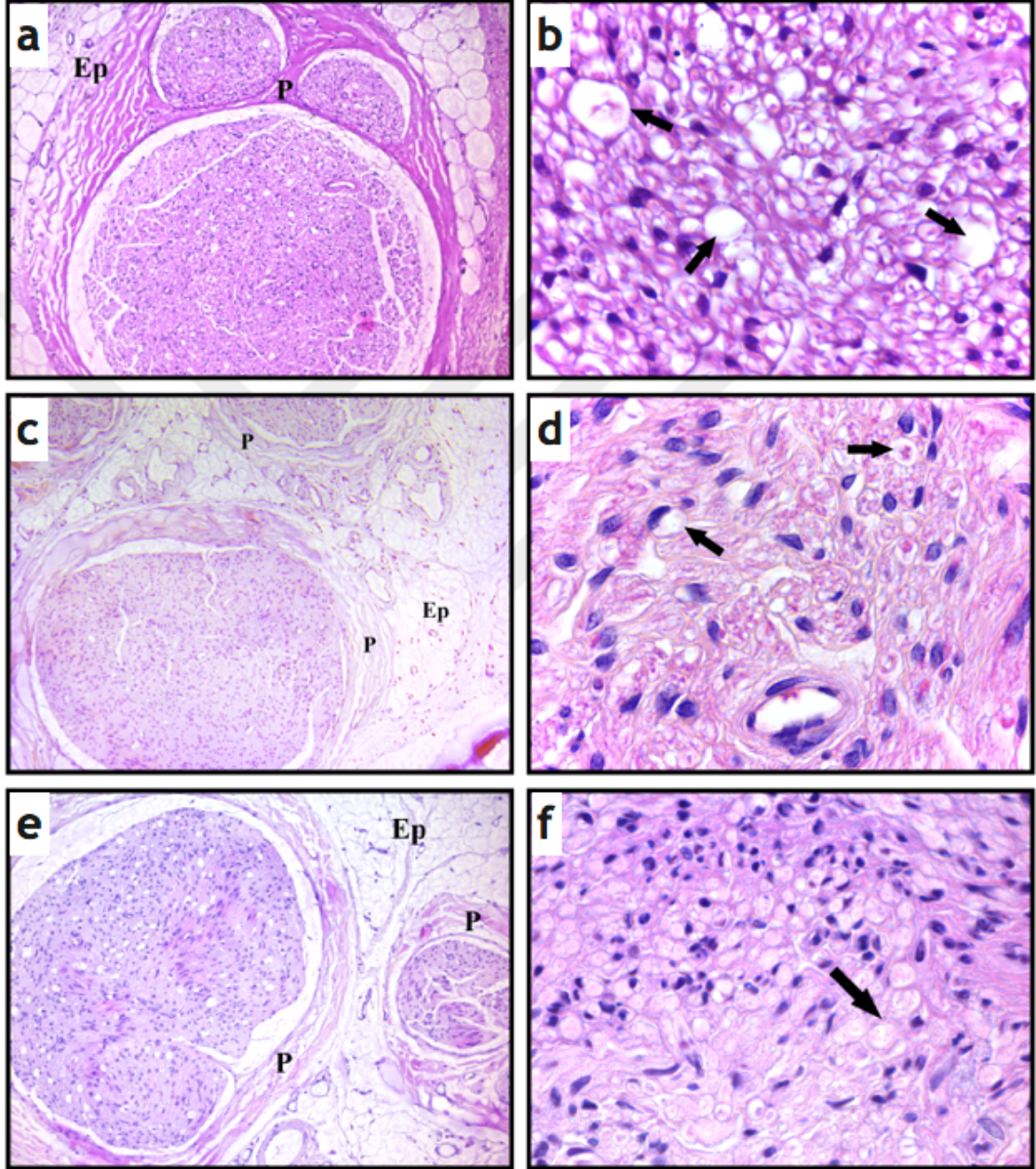


Şekil 3.16. CH+PRP grubuna ait merkez bölge yarı ince kesit görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x10; b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, En: Endonöryum, Sh: Schwann hücreleri, M: Mast hücreleri, D: Damar, ok: dejenere aksonlar. Toluidin mavisi.

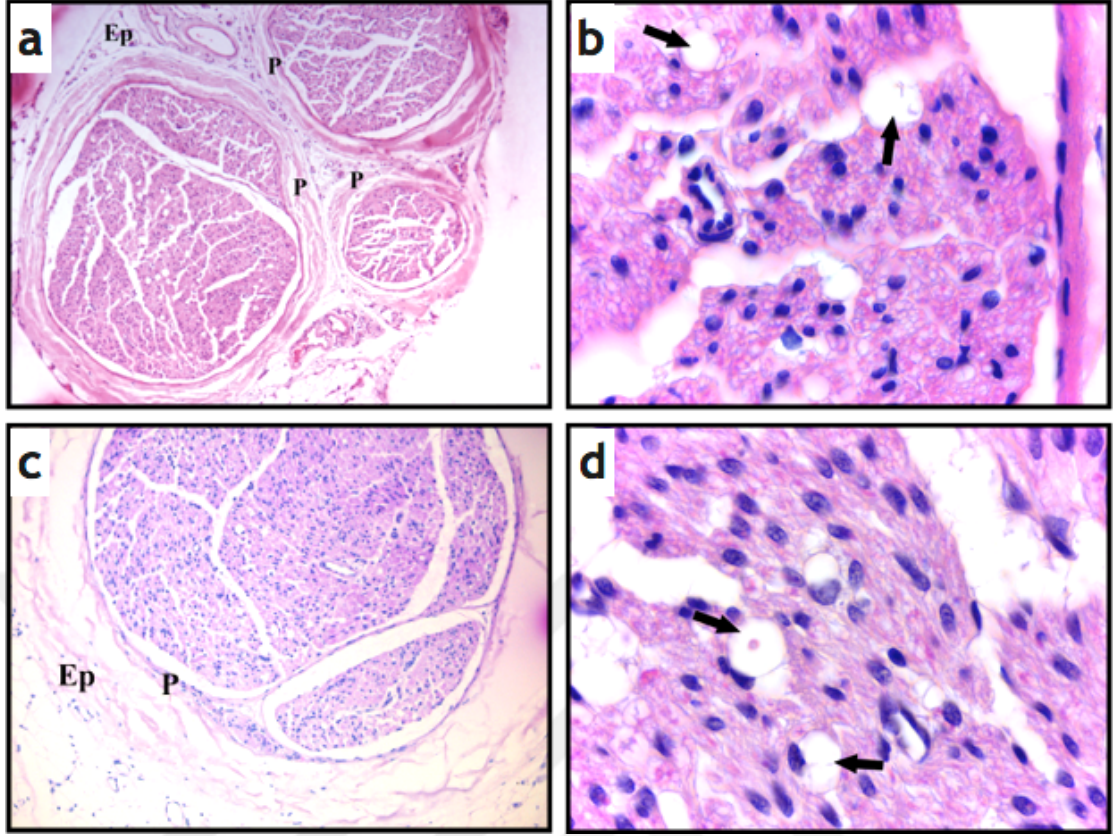
3.2.2. Deney Grupları Distal Bölgesi Işık Mikroskop Bulguları

12. hafta sonunda Hematoksilin-Eozin (HE) ile boyalı kesitlerde ışık mikroskopunda yapılan incelemede sinir kesisi ardından primer epinöral anastomoz yapılan ve ilgili gruba uygun tedavinin uygulandığı bölgenin distalinde en yoğun kesi grubunda olmak üzere tüm deney gruplarında sinir lifini oluşturan aksonlarda şişme ve vakuolizasyon ile karakterize dejenerasyon bulguları izlendi. Tüm gruplarda Schwann hücrelerinde proliferasyon gözlemlendi. Mallory Azan (MA) boyalı

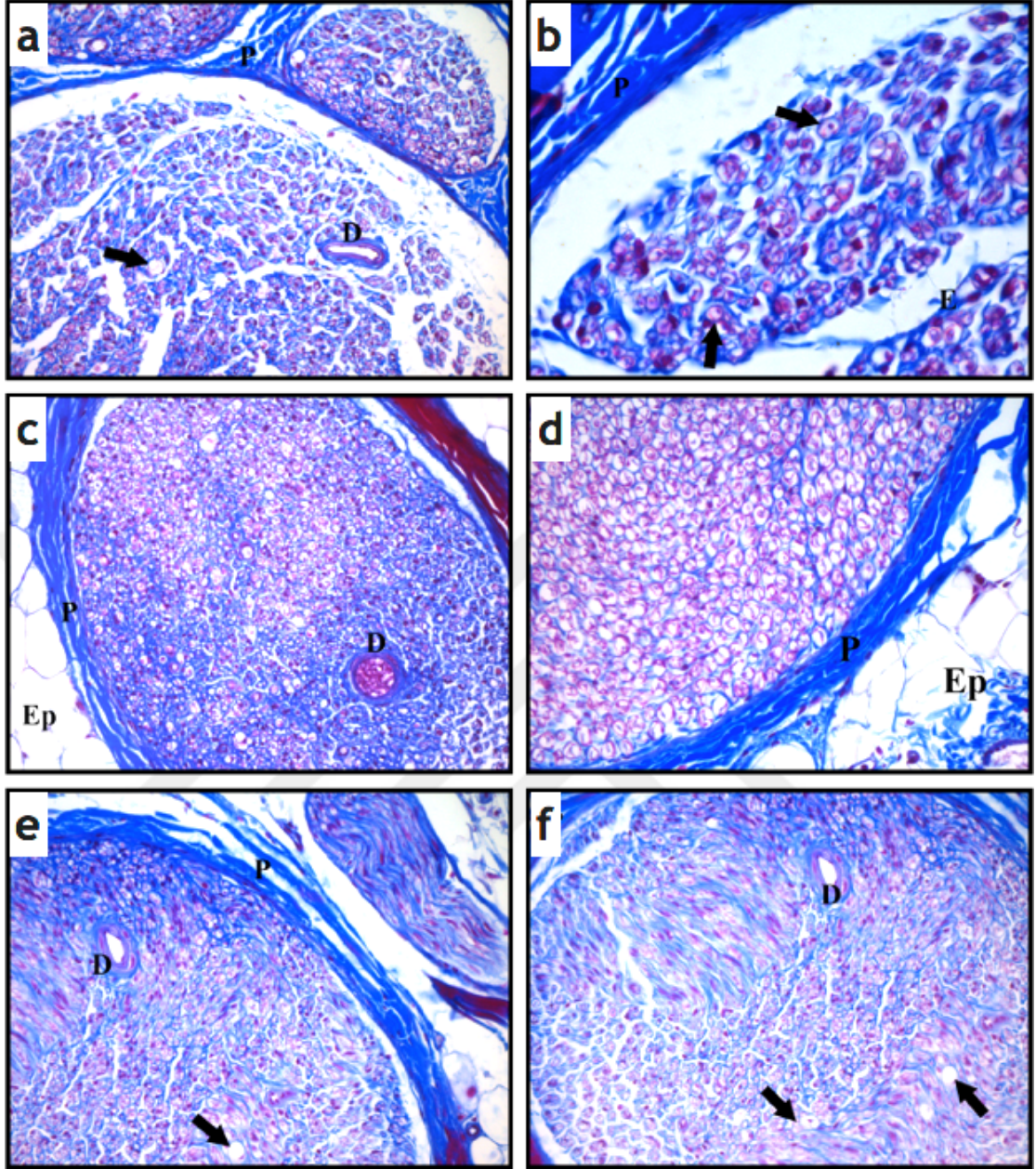
preparatlarda dejenerasyon sinir liflerinde nörokeratin çatı görüntüsünün bozulduğu görüldü. Epinöryum ve perinöryum içinde akson filizleri izlenemedi. Epinöral bağ dokusu içinde yağ hücreleri normal görünümdeydi. Bazı gruplarda kan damarlarında staz gözlemlendi. (Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20).



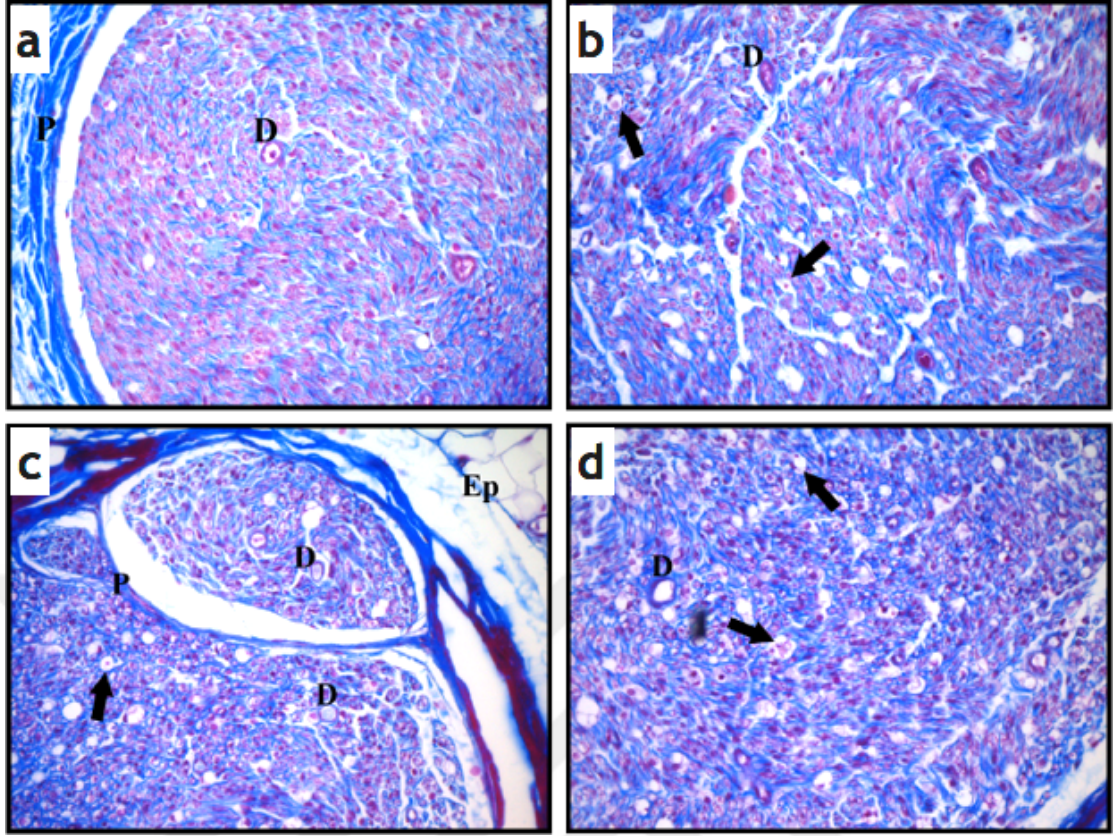
Şekil 3.17. Kesi (a-b), Salin (c-d) ve CH (e-f) gruplarına ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, ok: dejenerasyon aksonları. a, e) x20, b, d, f) x100, c) x10; Hematoksilin-Eozin.



Şekil 3.18. PRP (a-b) ve CH+PRP (c-d) gruplarına ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, ok: dejenere aksonlar. a) x10, b, d) x100, c) x20; Hematoksilin-Eozin.



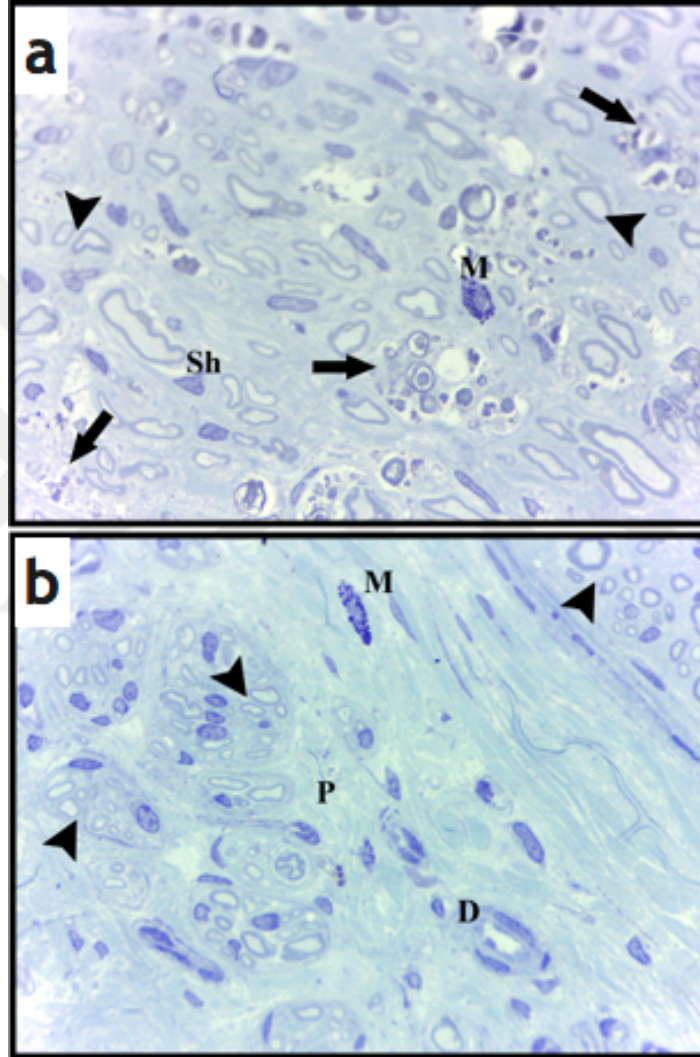
Şekil 3.19. Kesi (a-b), Salin (c-d) ve CH (e-f) gruplarına ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar. a, c, d, e, f) x40, b) x100; Mallory Azan



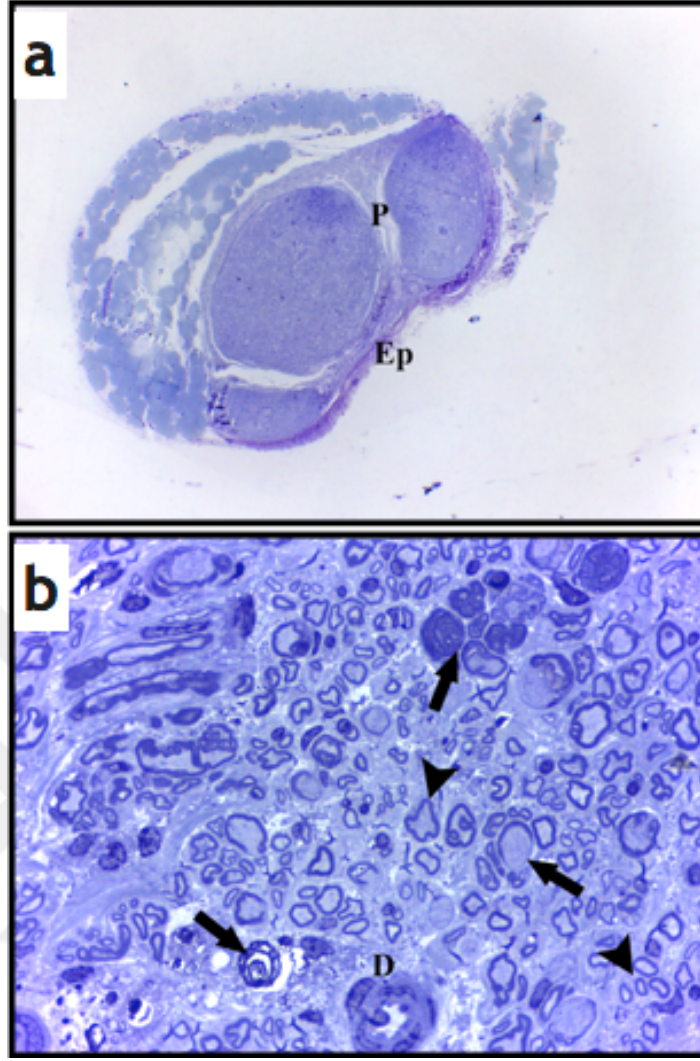
Şekil 3.20. PRP ve CH+PRP gruplarına ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar. a-d) x40; Mallory Azan

12. hafta sonunda sinir kesisi sonrası onarım yapılan bölgenin distalinden alınan ve Toluidin mavisi ile boyanan yarı ince kesitlerde yapılan incelemede kesi grubunda aksonları çevreleyen miyelin kılıfında ondülasyon ve dejenerasyon mevcuttu. Dejenere aksonları fagosite etmiş Schwann hücreleri ve makrojaflar ile yakın komşuluklarında mast hücreleri gözlemlendi. Endonöryumda genişleme ve odaksal dejeneratif bölgeler izlendi. Endonöryum içerisinde ince miyelinli ve küçük çaplı aksonlar gözlemlendi. Perinöryuma ait bağ dokusunda rejenere akson filiz grupları ve komşuluğunda mast hücreleri izlendi (Şekil 3.21). Salin grubunda bunlara ek olarak aşırı miyelinlenmiş ve miyelinde kopmaların olduğu dejenere aksonlar da gözlemlendi. Perinöral aksonal filiz grupları içerisinde daha ince ve küçük olmakla birlikte her alanda küçük çaplı ve ince miyelinli aksonlar mevcuttu. Endonöryumda ve perinöryumda damar kesitleri de izlendi (Şekil 3.22).

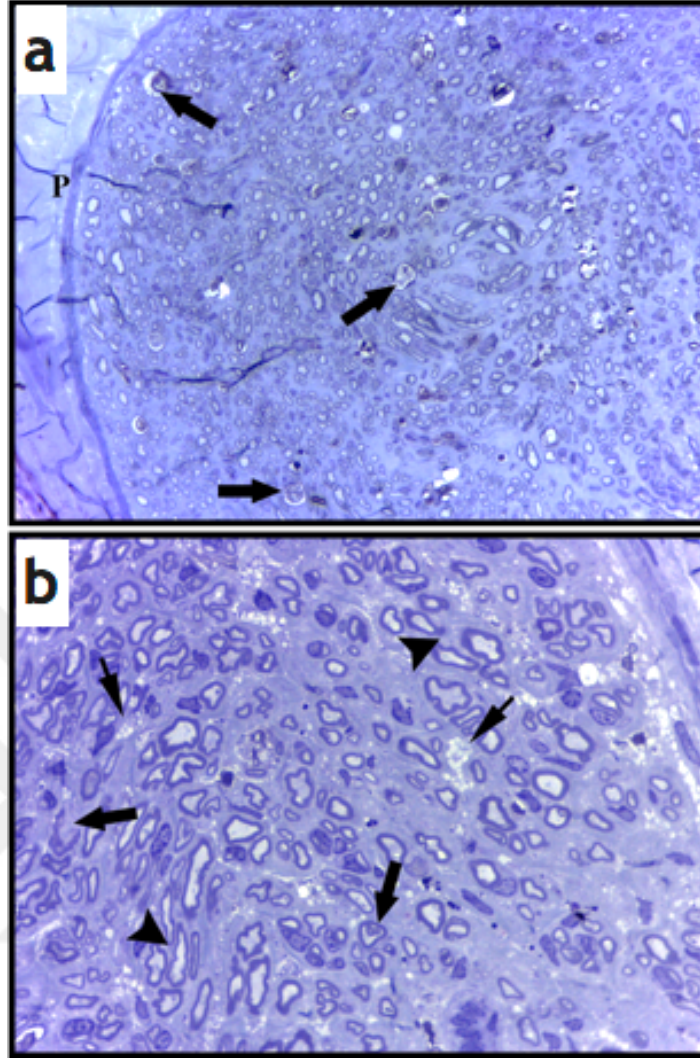
CH grubunda endonöryumda genişleme daha fazla alanda izlendi. İnce miyelinli ve küçük çaplı aksonlar çoğunlukta idi. Perinöral bağ dokusu içerisindeki akson filizleri diğer gruplara göre daha seyrek olarak izlendi. Diğer gruplarda oldukça nadir olarak gözlenen miyelinsiz lifler CH grubunda daha yoğun olarak izlendi (Şekil 3.23).



Şekil 3.21. Kesi grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100, b) Perinöryum içerisinde rejenere akson filiz grupları, x100. P: Perinöryum, D: damar, Sh: Schwann hücresi, M: Mast hücresi, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi.



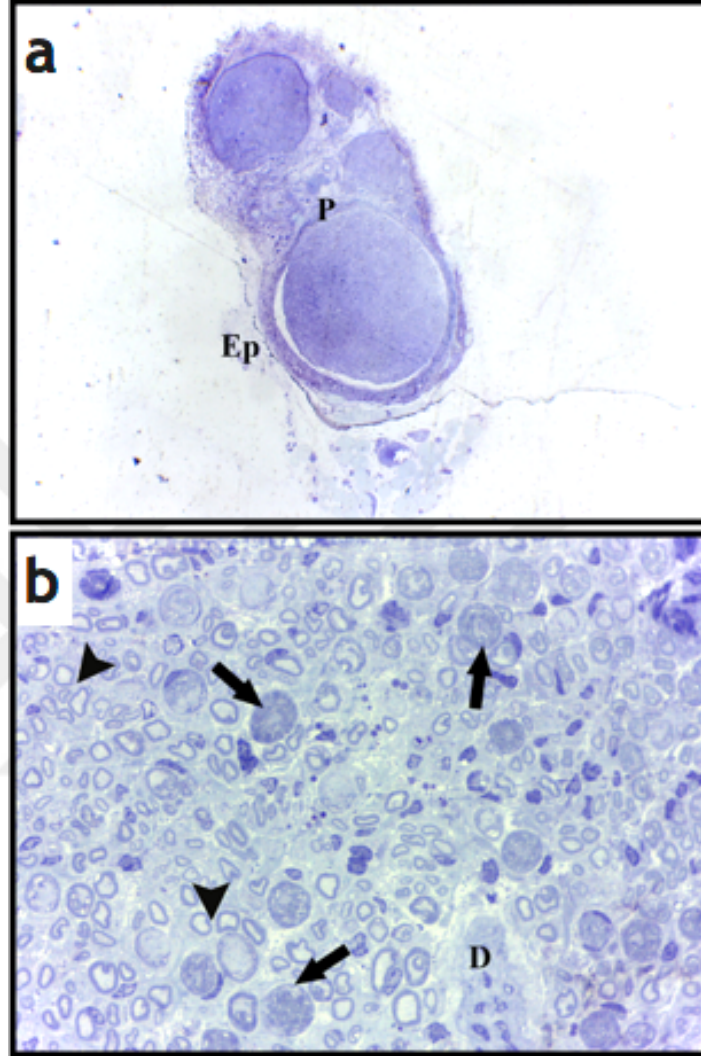
Şekil 3.22. Salin grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x4; b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar. Toluidin mavisi.



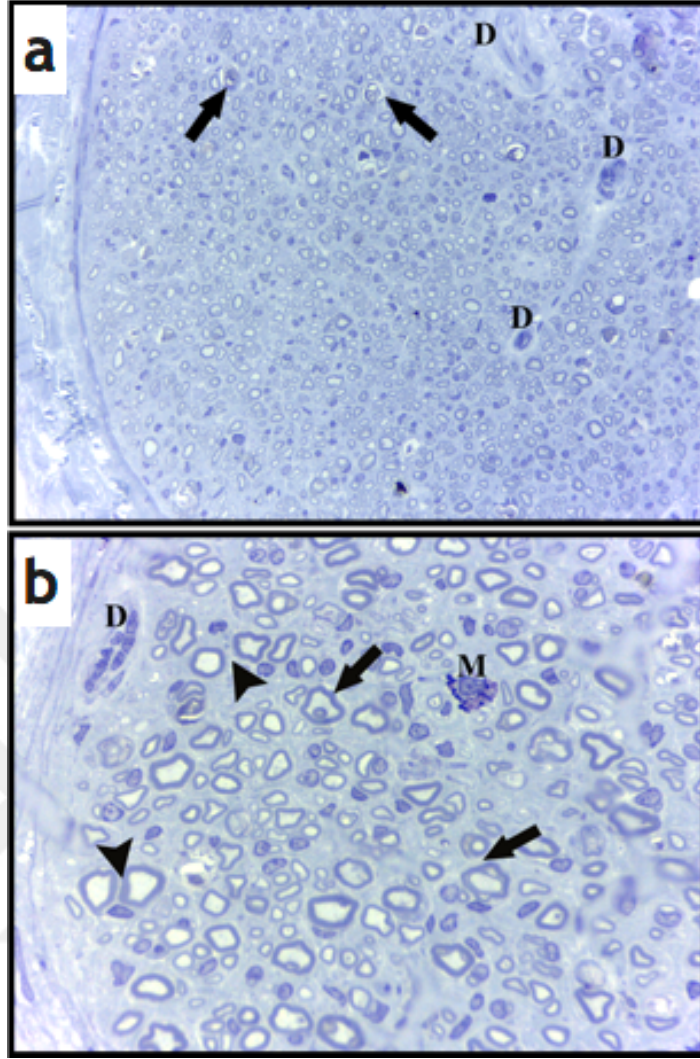
Şekil 3.23. CH grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Dejenere aksonlar, x40, b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. P: Perinöryum, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar, ince ok: endonöryumda genişleme ve vakuolizasyon; Toluidin mavisi.

PRP grubunda da CH grubuna benzer şekilde ince, düzgün miyelinli ve küçük çaplı aksonların çoğunlukta olduğu gözlemlendi. Bunların yanı sıra miyelin kılıfta kesinti ve kopmaların olduğu ve aşırı miyelinlenmiş dejenere aksonlara da rastlandı. Dejenere aksonlarla yakın ilişkide mast hücreleri görüldü. Perinöryumda akson filiz grupları daha seyrek olarak gözlemlendi. Endonöryumda odaksal dejenere alanlar izlendi (Şekil 3.24). CH+PRP grubunda endonöryumda küçük çaplı aksonlardan oluşan rejenere akson grupları izlendi. Düzgün miyelinli aksonların yanı sıra miyelin kılıfta kopukluklar, aksoplazmada miyelin ovoidleri ve dejenerasyon gösteren aksonlar ile

yakın komşuluğunda mast hücreleri izlendi. Perinöryumda aksonal filiz grupları oldukça seyrekti (Şekil 3.25).



Şekil 3.24. PRP grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Küçük büyütmede sinir enine kesitinin genel görünümü, x4, b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. Ep: Epinöryum, P: Perinöryum, D: damar, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi.



Şekil 3.25. CH+PRP grubuna ait distal bölge ışık mikroskop görüntüleri. a) Dejenere aksonlar, x40, b) Dejenere ve sağlıklı aksonlar, x100. D: damar, M: Mast hücresi, ok: dejenere aksonlar, ok başı: normal aksonlar; Toluidin mavisi.

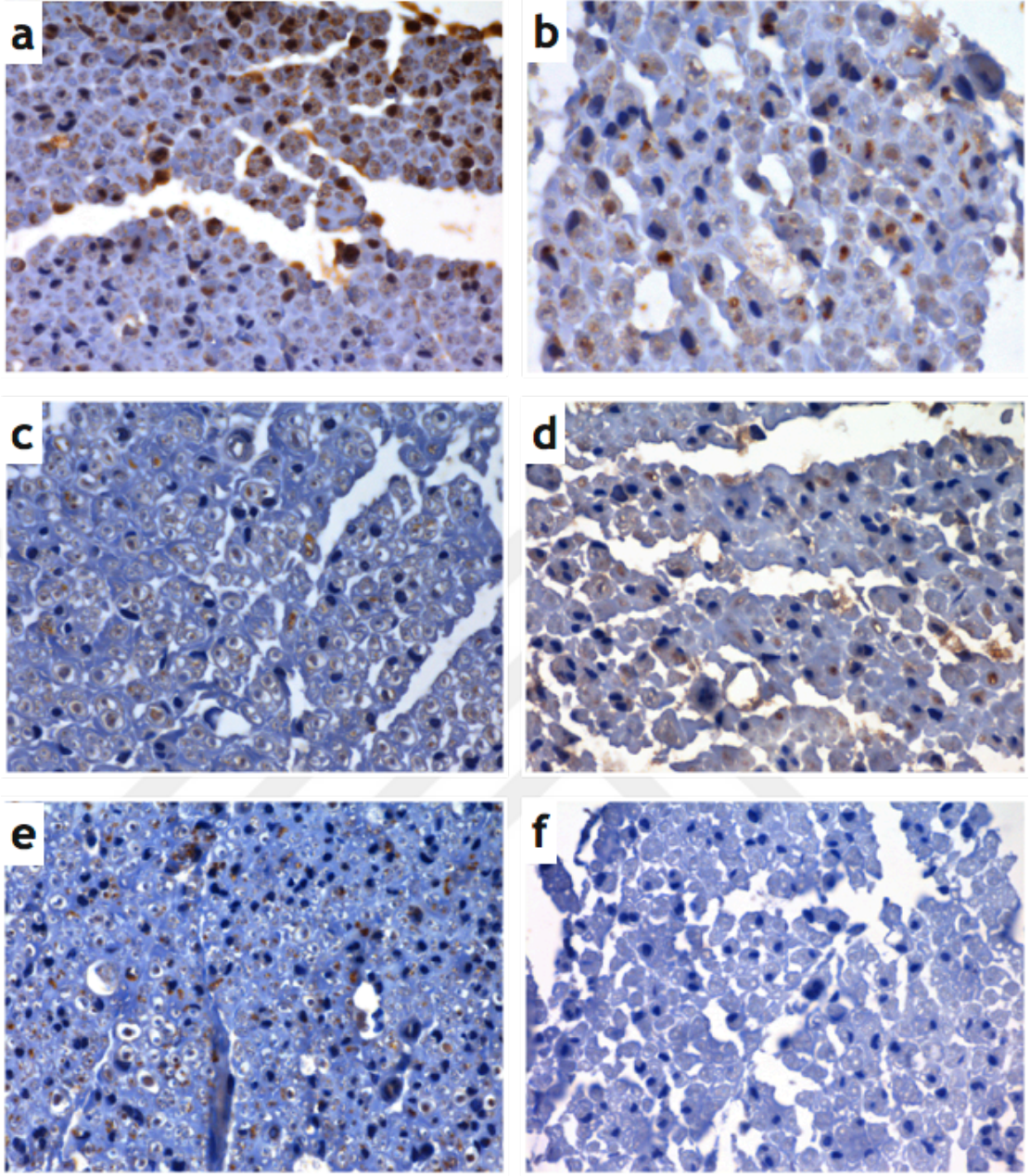
Miyelinsiz sinir lifleri yarı ince kesitlerde kontrol grubunda endonöryum içerisinde miyelinli sinir lifleri arasında sağlıklı biçimde izlenirken (Şekil 3.9) deney gruplarında her iki bölgede yapılan incelemelerde endonöryum içerisinde gözlenmedi (Şekil 3.12- 3.16 ve 3.21- 3.25).

3.2.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Bulgular

İmmünohistokimyasal değerlendirme için rejenere sinir liflerini işaretleyen anti-GAP43 (Growth associated protein-43) ve Schwann hücrelerini işaretleyen anti-S100 antikorları ile boyama yapıldı.

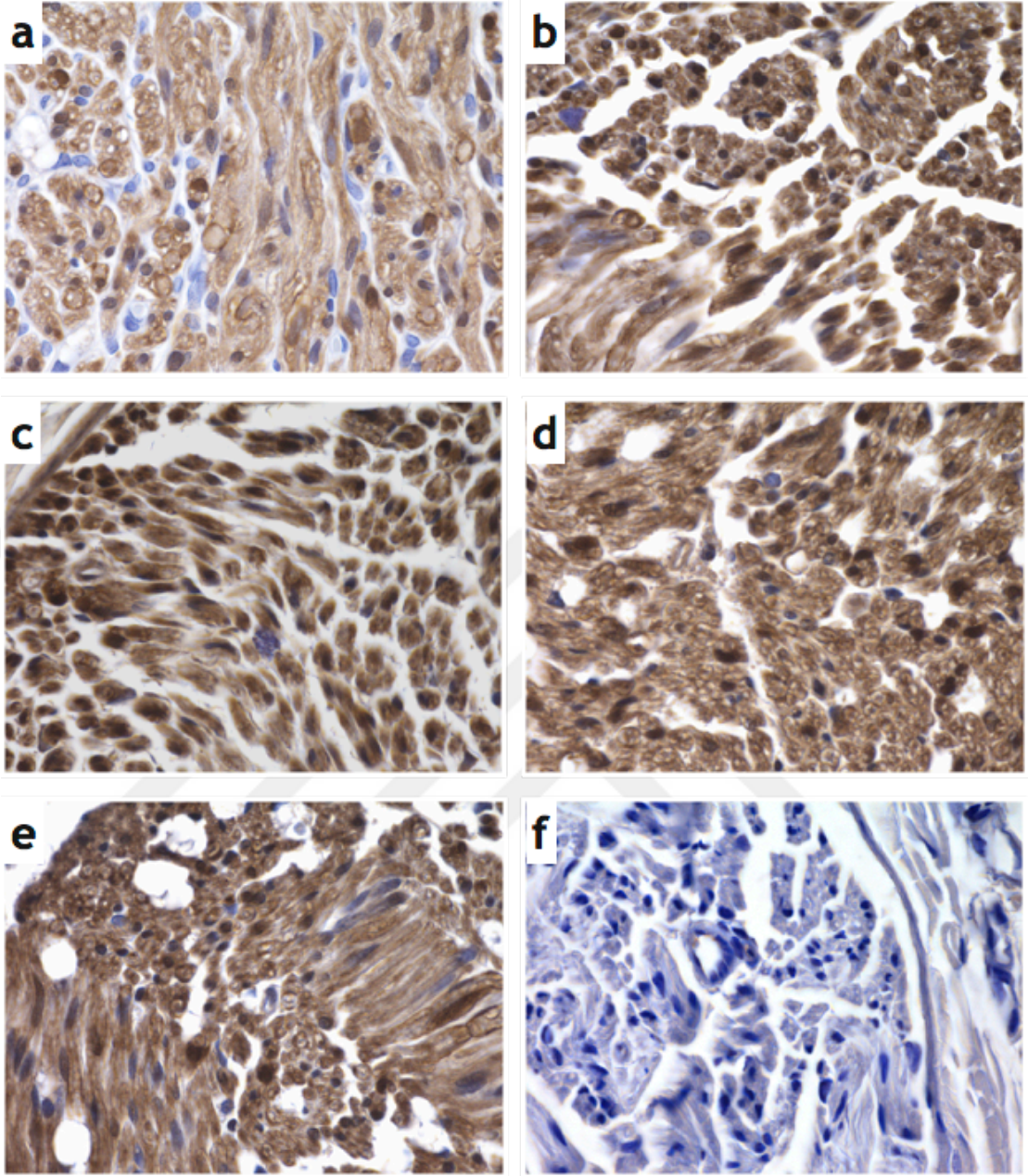
Her gruba ait siyatik sinirlerin kesi hasarı oluşturulan bölgenin distalinden alınan örneklerde anti-GAP43 işaretlemesinde pozitif boyanan rejenere aksonlar izlendi. (Şekil 3.26).





Şekil 3.26. anti-GAP-43 boyaması görüntüleri. a) Kesi Grubu, b) Salin Grubu, c) CH Grubu, d) PRP Grubu, e) CH+PRP Grubu, f) Negatif Kontrol. x100, Hematoksilin zıt boyama.

Deney gruplarında kesi hasarı oluşturulan bölgenin distalinden alınan örneklerde esas olarak Schwann hücrelerinde ifadelenen anti-S100 antikoruna ile yapılan işaretleme sonrasında kesi grubuna göre diğer deney gruplarında Schwann hücrelerinin rejenerasyon ve miyelinizasyonu sağlamak üzere artışını düşündürecek pozitif boyanma izlendi (Şekil 3.27)



Şekil 3.27. anti-S-100 boyaması görüntüleri. a) Kesi Grubu, b) Salin Grubu, c) CH Grubu, d) PRP Grubu, e) CH+PRP Grubu, f) Negatif Kontrol. x100, Hematoksilin zıt boyama.

3.3. Stereolojik Analiz Bulguları

Kontrolle kıyaslandığında miyelinli lif sayısı CH+PRP grubu merkez bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$) (Çizelge 3.1). CH+PRP grubu merkez bölgesi dışındaki diğer gruplarda miyelinli lif sayısı açısından kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Tüm deney grupları distal bölgeleri birbiriyle kıyaslandığında miyelinli lif sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken merkez bölgeleri kıyaslandığında ise yalnızca CH+PRP grubu ile kesi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. CH+PRP grubu merkez bölgesinde miyelinli lif sayısı daha fazlaydı.

Deney gruplarında akson filizlerinin merkezden distale ulaşma düzeyini değerlendirmek için her grupta distal ve merkez bölgelerde sayılan miyelinli lif sayısı karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda salin, CH ve CH+PRP gruplarında distal bölgede bulunan miyelinli lif sayısı merkeze göre daha düşük olmakla birlikte fark salin grubunda istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$) (Çizelge 3.1).

Kontrolle kıyaslandığında dejenere akson sayısı tüm deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$) (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Tüm gruplara ait miyelinli ve dejenere lif sayıları ortalamaları.

	Miyelinli Lif Sayısı (Ort ± std.sapma)	Dejenere Lif Sayısı (Ort ± std.sapma)
Kontrol	4455.91 ± 1473.03	47.76 ± 106.78
Kesi (Distal)	4233.66 ± 2091.01	1046.94 ± 545.48
Kesi (Merkez)	4062.23 ± 2460.82	676.53 ± 599.62
Salin (Distal)	3405.3 ± 1227.49	551.02 ± 115.44
Salin (Merkez)	7692.23 ± 3339.05	1653.06 ± 1043.47
CH (Distal)	4294.27 ± 2123.09	440.82 ± 363.89
CH (Merkez)	6799.57 ± 1839.27	822.86 ± 277.77
PRP (Distal)	5201.62 ± 3008	929.39 ± 453.38
PRP (Merkez)	4408.15 ± 3148.83	642.86 ± 470.61
CH+PRP (Distal)	5256.72 ± 1250.89	903.67 ± 198.84
CH+PRP (Merkez)	7582.02 ± 1959.47	973.47 ± 328.82

Tüm deney grupları distal bölgelerinde sayımı yapılan miyelinli aksonların lif alanı, akson alanı ve miyelin alanları kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olarak ölçüldü ($p<0,05$) (Çizelge 3.2).

Deney grupları birbiriyle kıyaslandığında lif alanı, akson alanı ve miyelin alanı açısından CH+PRP grubunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu görüldü ($p<0,05$) (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Tüm gruplara ait distal bölge miyelinli lif ölçüm ortalamaları

	Lif Alanı (Ort±Ss)	Akson Alanı (Ort±Ss)	Miyelin Alanı (Ort±Ss)	Lif Çapı (Ort±Ss)	Akson Çapı (Ort±Ss)	Miyelin Kalınlığı (Ort±Ss)	g-ratio (Ort±Ss)
Kontrol	39.65 ± 34.18	15.75 ± 14.39	23.91 ± 21.19	3.16 ± 1.43	1.94 ± 0.9	1.23 ± 0.65	0.62 ± 0.09
Kesi	14.38 ± 12.93	7.14 ± 9.3	7.24 ± 4.33	1.92 ± 0.66	1.23 ± 0.59	0.69 ± 0.15	0.62 ± 0.09
Salin	19.44 ± 26.01	8.33 ± 12.26	11.11 ± 14.33	2.14 ± 1.16	1.32 ± 0.81	0.81 ± 0.4	0.6 ± 0.08
CH	12.39 ± 9.47	5.02 ± 4.97	7.37 ± 5	1.82 ± 0.62	1.09 ± 0.48	0.74 ± 0.2	0.58 ± 0.08
PRP	10.69 ± 14.63	4.36 ± 10.1	6.33 ± 5.34	1.66 ± 0.6	0.97 ± 0.47	0.69 ± 0.2	0.57 ± 0.08
CH+PRP	9.94 ± 6.58	4.07 ± 3.5	5.87 ± 3.41	1.66 ± 0.49	1 ± 0.39	0.66 ± 0.16	0.59 ± 0.08

Tüm deney grupları distal bölgelerinde sayımı yapılan miyelinli aksonların lif çapı, akson çapı, miyelin kalınlığı ve g-ratio değerleri kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olarak ölçüldü ($p<0,05$) (Çizelge 3.2).

3.4. Sınır İyileşmesinin Fonksiyonel Analiz Bulguları

6. haftada TS (Toe spread) ve ITS (Intermediary toe spread) değerlerinin kesi ve kesi sonrasında tedavi uygulanan gruplarda kesi yapılmayan sağ ayak izi değerlerine göre azaldığı gözlemlendi. Buna bağlı olarak ortalama SFI değerlerinin total fonksiyon kaybını belirten -100 değerine yakın olduğu belirlendi. 12. haftada da SFI değerleri 6. haftaya yakın bulundu ve TS ve ITS değerlerinin kesi yapılmayan sağ ayak izi değerlerine göre halen düşük olduğu bulundu.

Çizelge 3.3. Tüm gruplara ait Pre-op, 6. hafta ve 12. hafta SFI değerleri ortalamaları. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. * $p=0.038$, ** $p=0.035$, *** $p<0.05$.

	Pre-op (Ort ± std.sapma)	Post-op 6. Hafta (Ort ± std.sapma)	Post-op 12. Hafta (Ort ± std.sapma)
Kesi Grubu	-11.63 ± 10.21	-89.07 ± 16.14	-90.84 ± 20.88
Salin Grubu	-9.72 ± 12.16*	-70.61 ± 30.65	-66.14 ± 28.47***
CH Grubu	3.68 ± 11.36*	-73.17 ± 22.02**	-96.59 ± 11.4***
PRP Grubu	-4.19 ± 12.97	-93.3 ± 0**	-93.3 ± 0***
CH+PRP Grubu	-7.95 ± 13.42	-85.59 ± 12.57	-106.78 ± 20.04***

SFI değerlerinin normal dağılıma uygunluk göstermemeleri nedeniyle karşılaştırma testlerinde parametrik olmayan Bağımsız Örneklemlili Kruskal-Wallis testi uygulandı.

Pre-op döneminde SFI değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.027$). Bu farklılığın hangi çiftlerde olduğunu tespit etmek amacıyla, Dunn Post-hoc ikili karşılaştırma testi uygulandı ve Salin ve CH grupları arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0.038$) (Çizelge 3.3). Pre-op dönemi için diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

Post-op 6. Hafta dönemi için yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda da gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi ($p=0.035$). Yapılan Dunn Post-hoc ikili karşılaştırma testi sonucunda ise PRP ve CH grupları arasında anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p=0.038$) (Çizelge 3.3).

Post-op 12. Hafta dönemi için de gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p<0.001$). Dunn Post-hoc testi sonucunda farklılığın salin ile CH ($p=0.012$), PRP ($p=0.021$) ve CH+PRP ($p<0.001$) grupları arasında olduğu tespit edildi (Çizelge 3.3).

Her üç dönem arasında fark olup olmadığı da değerlendirildi. Sonuçlara göre tüm deney gruplarında gruplarda post-op 6 hafta ve 12. hafta SFI değerleri pre-op döneme göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olarak bulundu ($p<0.001$) (Çizelge 3.3). Post-op 6. hafta ile 12. hafta arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

4. TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları hastalarda motor, duyuşal ve otonom fonksiyonlarda tek tek veya birlikte kayba neden olabilmektedir.

Bu fonksiyon kayıplarının geri dönüşü için uzun süreli ve yüksek maliyetli tedavi yöntemlerinin sağlık giderlerine getirdiği yük nedeniyle önemli bir sağlık problemi olarak değerlendirilmektedir.

Son 50 yılda cerrahi teknikte ufak değişiklikler yapılmakla birlikte doku kaybı olmadığı durumlarda sinir uçlarının karşı karşıya getirilerek sinir kesisinin epinöral sütün ile tedavi edilmesi halihazırda dünya genelinde altın standart olarak kabul edilmektedir (Grinsell ve Keating, 2014).

Bununla birlikte literatürde cerrahi tedaviye ek olarak sinir rejenerasyonunu artırmaya yönelik kullanılabilen çeşitli tedavi yöntemlerini araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. Günümüzde henüz sinir hasarını iyileştirmede klinik kullanıma geçmiş bir farmakolojik ajan bulunmamakla birlikte bazı hormonların, büyüme faktörlerinin ve peptitlerin kullanımı aday olarak araştırılmaktadır (Faroni ve ark., 2015). Ayrıca son yıllarda çeşitli kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin (Faroni ve ark., 2015), ekstraselüler matriks elemanlarının ((Dodla ve ark., 2011) ve ekzozomların (Ching ve Kingham, 2015) sinir rejenerasyonu üzerine etkilerini inceleyen çok sayıda yayın mevcuttur. Yapılan bütün çalışmaların ortak amacı tespit edilecek uygun biyolojik ajanlar ile hasar görmüş sinirin iyileşmesini destekleyecek bir mikroçevre oluşturmak, ortamdaki inhibitor maddeleri ortadan kaldırmak ve hedef organın fonksiyonunu geri kazanmasını sağlamaktır. Bunların yanı sıra yapılan araştırmalar sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonunun halen tam olarak ortaya konulmamış moleküler temellerini anlamamıza da yardımcı olmaktadır.

Periferik sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonunun morfolojik, fonksiyonel ve moleküler düzeyde incelenmesinde ayrıca rejenerasyonda etkili olabilecek medikal ve cerrahi tedavi yöntemlerinin etkisinin araştırılmasında sıçan siyatik sinir modeli yaygın olarak kullanılmaktadır (Irintchev, 2011).

Bu tez çalışmasında da siyatik sinir kesisi sonrası cerrahi onarıma ek olarak PRP ve ChABC enziminin tek tek ve birlikte uygulamalarının sinir rejenerasyonuna etkisi histolojik, stereolojik ve fonksiyonel olarak sıçan siyatik sinir hasarı modeli kullanılarak incelenmiştir.

Periferik sinirler hasar sonrası rejenerasyonun olabilmekle birlikte ortamda bulunan hücreler, büyüme faktörleri ve ekstraselüler matriksin birbirleriyle etkileşimi rejenerasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Ovalle ve ark., 2012).

Sinir iyileşmesi araştırmalarında son yıllarda hem büyüme faktörü kaynağı olarak hem de skar dokusu oluşumu azaltıcı etkileri nedeniyle PRP'nin kullanımı dikkat çekmektedir. Epinöral bağ dokusu akson rejenerasyonu önünde mekanik bir bariyer oluşturabileceği gibi sinirin dışında oluşan skar dokusu da sinirin çevre dokulara yapışmasına neden olabilir. PRP'nin kollajen birikimi kontrolüne katkıları konusundaki sonuçlar çelişkilidir ayrıca fibrozis üzerinde hem pozitif hem de negatif etkileri olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Giannessi ve ark., 2014). PRP içeriğinde yoğunlaştırılmış olarak bulunan trombositlerin granüllerinde kemokinlerin, koagülasyon faktörlerinin, integrinlerin yanı sıra büyüme faktörlerinden trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-I), hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) bulunur (Blair ve Flaumenhaft, 2009). Aktive olan trombositlerden salınan bu büyüme faktörleri sinir iyileşmesini bir çok açıdan etkilemektedir. VEGF aksonal büyümeyi stimüle eder ve Schwann hücre proliferasyonunu artırır, TGF- β ve PDGF rat Schwann hücreleri için mitojen

olarak etki gösterir. IGF-I ise nörotropik faktör olarak etki etmektedir (Emel ve ark., 2011).

Periferik sinir ekstraselüler matriksini oluşturan elemanlardan biri olan CSPG'lerin bir çok çalışmada miyelin-inhibitör proteinlerle birlikte akson büyümesini inhibe eden molekül sınıflarından biri olduğu gösterilmiştir (Gause ve ark., 2014). Zuo ve ark. çalışmalarında kesi sonrası periferik sinirin distal ucunda CSPG'lerin yaklaşık yedi kat arttığını göstermişlerdir (Zuo ve ark., 1998).

Lamininler akson filizi konisinin desteklenmesindeki önemli rolleri iyi bilinen bir grup moleküldür ve bazal laminada en bol bulunan kollajen olmayan yapısal glikoproteinlerdir. Schwann hücrelerindeki alt tiplerinde akson büyümesini destekleyen aktivite gösterirler ancak bu aktivite sağlam sinirde CSPG'ler tarafından inhibe edilmektedir. Wallerian dejenerasyonu sırasında Schwann hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen matriks metalloproteinazları CSPG'leri parçalayarak lamininin yeni gelişen aksonlardaki nörit destekleyici etkisini ortaya çıkarır (Ovalle ve ark., 2012).

Literatürde CSPG'lerin inhibe edici etkisini azaltmak için Kondroitinaz ABC (ChABC) adlı enzim kullanılarak yapılan araştırmalar bulunmaktadır (Gause ve ark., 2014).

Udina ve ark. periferik sinir kesisi ve tamiri sonrası ChABC'nin lokal uygulaması ile aksonlarını distal sinir ucuna doğru rejenere eden motor ve duyu nöronlarının sayısında artış olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ChABC'nin yarı ömrünün kısa olması nedeniyle tek doz uygulamanın sınırlı bir etkiye sahip olabileceğini de belirtmişlerdir (Udina ve ark., 2010).

Çalışmamızda tüm deney grupları distal bölgeleri birbiriyle kıyaslandığında miyelinli lif sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken merkez bölgeleri kıyaslandığında ise yalnızca CH+PRP grubu ile kesi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. CH+PRP grubundaki miyelinli lif sayısı daha fazlaydı.

Bu veriler CH+PRP grubu merkez bölgede uygulanan lokal tedavinin miyelinli lif sayısını artırdığını göstermekle birlikte CH ve PRP'nin birlikte kullanımının kesi bölgesinden başlayacak olan akson filizlenmesini artırdığını göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca deney gruplarında akson filizlerinin merkezden distale ulaşma düzeyini değerlendirmek için her grupta distal ve merkez bölgelerde sayılan miyelinli lif sayısı karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda salin, CH ve CH+PRP gruplarında distal bölgede bulunan miyelinli lif sayısı merkeze göre daha düşük olmakla birlikte fark salin grubunda istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$) (Çizelge 3.1). Sonuçlar primer epinöral anastomoz dışında herhangi bir tedavi almayan salin grubunda merkezde oluşan akson filizlerinin yanlış yönlenecek sinirin distal ucuna yeterli düzeyde ulaşamadıklarını düşündürdü. Bu bulgu ayrıca deney gruplarında ışık mikroskopunda incelenen yarı ince kesitlerde rejenere akson filizi gruplarının siyatik sinir kılıflarından epinöryum ve perinöryum içerisinde gözlenmesi ile de uyumluydu

Emel ve ark. siyatik sinirde anevrizma klipsi ile oluşturdukları hasar sonrasında IGF-I ve PRP'nin birden fazla kez uygulandığı çalışmalarında IGF-I uyguladıkları grupta kontrol grubuna göre fonksiyonel geri kazanımı gösteren SFI değerlerinde 1 ay sonunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde iyileşme olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca IGF-I uygulanan grupta g-ratio değerlerinin PRP ve salin uygulanan gruplara göre anlamlı şekilde yüksek olarak bulunmuştur (Emel ve ark., 2011).

Çalışmamız sonucunda SFI değerleri açısından 12 hafta sonunda anlamlı bir fonksiyonel iyileşme gözlenmedi. Tüm deney grupları distal bölgelerinde sayımı yapılan miyelinli aksonların lif alanı, akson alanı ve miyelin alanları kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olarak ölçüldü ($p<0,05$) (Çizelge 3.2).

Miyelin alanı ve miyelin kalınlığının düşük olması sinir lifinin çok sayıda ince miyelinli aksonları içerdiğini göstermekteydi. Miyelin kalınlığının kontrolden düşük olması sinir iletiminin yeterince hızlı olmadığını ya da aksonların hedef organa henüz ulaşamadıklarını düşündürdü. Bu da SFI değerlerinin 12. hafta sonunda halen düşük olmasının nedeni olabilir.

Yürüme yolu analizleri siyatik sinir hasarı sonrası iyileşmede fonksiyonel durumun belirlenmesi için kullanılan girişimsel olmayan bir yöntemdir. Ancak ototomi, kontraktür oluşumu, kuyruğun sürtünmesi ve ayak izinin yayılması gibi nedenlerle ayak izlerini her zaman doğru şekilde almak mümkün olmayabilir (Varejao ve ark., 2001). Ayrıca hem ölçümlerde kullanılan yöntemlerin farklı olması hem de ölçümleri yapan araştırmacılardan kaynaklanan farklılıklar nedeniyle bu verilerin laboratuvarlar arası karşılaştırılması mümkün olamamaktadır.

Analizlerin standardize edilmesi karşılaştırmaların sağlıklı yapılabilmesi için oldukça önemlidir (Sarıkcioglu ve ark., 2009).

Fonksiyonel analizin yanı sıra çalışmamızda stereolojik yöntemle sinir rejenerasyonun kantitatif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sinir sisteminde yapılan çalışmalarda kullanılan morfometrik tekniklerin çoğu taraflı sonuçlara neden olabilmektedir. Bu metodolojik problemlerden kaçınmak fraksiyonlama gibi stereolojik tekniklerin kullanımı ile mümkündür (Ramkumar ve ark., 2015). Stereolojik teknikte kullanılan sistematik rastgele örnekleme yaklaşımı periferik sinirdeki her bir sinir lifine eşit oranda seçilme ve analiz edilme şansı tanımaktadır (Canan ve ark., 2008).

Giannessi ve ark. rat siyatik siniri kesisi modelinde PRP membranının etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında 12 haftanın sonunda tedavi almayan grupta lif çaplarının 0 ile 5 μm arasında değişirken, tedavi alan grupta lif çaplarının kontroldeki en yüksek çap olan 12 μm 'ye yakın bir değer olan 11 μm 'ye kadar ulaştığını göstermişlerdir (Giannessi ve ark., 2014).

Çalışmamız sonucunda deney grupları distal bölgelerinde sayımı yapılan miyelinli aksonların lif çapı, akson çapı, miyelin kalınlığı ve g-ratio değerleri kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olarak lld ($p<0,05$) (izelge 3.2). Lif apı değerlerinin literatürle uyumlu olmamasının diğer çalışmalardaki ölçümlerin stereolojik teknik kullanılmadan gerçekleştirilmiş olmasın ve dolayısıyla her sinir lifine eşit değerlendirilme şansı tanınmamış olmasından kaynaklandığı dşnld.

Karma bir sinir olan siyatik sinirde duyu nöronlarının motor nöronlara göre hasardan daha fazla etkilendikleri örneğin siyatik sinir hasar modelinde duyu nöronlarında gözlenen %10-%30 oranındaki hasara karşılık motor nöronlarda %0-%10 oranında hasar gözlendiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Benga ve ark., 2017). Biz de çalışmamızda deney gruplarına ait yarı ince kesitlerde ışık mikrokobunda yaptığımız incelemeler sonucunda endonöryum içerisinde miyelinsiz sinir liflerini gzlelemedik. Kesi modeli oluşturduğumuz sol ekstremitede makroskobik olarak gözlediğimiz parmak kaybının duyu liflerini oluşturan miyelinsiz aksonların yeterince rejenere olamaması sonucu gelişen his kaybına bağlı olabileceğini düşündürdü. Bu bulgu literatürle uyumluydu.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda sıçan siyatik sinirinde kesi hasarı sonrası primer epinöral sütün ile onarım yapılan gruplarda miyelinli lif sayısının onarım yapılmayan gruba göre yüksek olduğu bulundu.

Sinir hasarı sonrası cerrahi onarıma ek olarak ChABC'nin tek başına ve PRP ile kombine uygulamasının merkez bölgede miyelinli lif sayısını artırdığı bulundu.

ChABC enziminin tek başına ve PRP ile kombine uygulandığı gruplarda sinir hasarı distal bölgesindeki miyelinli lif sayısının merkeze göre daha az olması ChABC'nin tek doz uygulanmasının kesi hattının distalinde yeterince etkili olmadığını gösterdi.

Deney gruplarında distal bölgedeki miyelinli liflerde lif alanı, akson alanı, miyelin alanı, lif çapı, akson çapı, miyelin kalınlığı ve g-ratio değerlerinin kontrole göre düşük olduğu bulundu. Bu miyelinli liflerin henüz tam olarak rejenere olamayan ince miyelinli aksonlar olduğu sonucuna varıldı.

SFI sonuçlarına göre 12 hafta sonunda tam fonksiyonel iyileşme olmadığı görüldü ve morfometrik bulgular ile SFI verilerinin birbirini desteklediği sonucuna varıldı.

Çalışmamızda fonksiyonel iyileşmenin tam gerçekleşmemesi ve morfometrik verilere göre de distal uçtaki aksonların yeterince miyelinlenmemesi nedeniyle 12. haftanın sonunda rejenerasyonun halen devam ettiği, tam iyileşmenin değerlendirilmesi için ileriki çalışmalarda deney süresinin 12 haftadan daha uzun olacak şekilde planlanması gerektiği sonucuna varıldı.

ÖZET

Periferik Sinir Yaralanması Sıçan Modelinde Ekstraselüler Matriks ve Büyüme Faktörlerinin Sinir Rejenerasyonuna Etkisinin Stereolojik ve Histolojik Olarak İncelenmesi

Periferik sinirler hasar sonrası rejener olma kapasitesine sahip olmakla birlikte ortamda bulunan Schwann hücrelerinin, büyüme faktörlerinin ve ekstraselüler matriks elemanlarının birbiriyle etkileşimi iyileşmede önemli bir rol oynamaktadır. Periferik sinir kesi hasarlarının tedavisinde altın standart kesik sinir uçlarının uç uca getirilerek dikilmesidir. Ancak sinir iyileşmesini artırma potansiyeline sahip dikişe ek olarak uygulanabilecek tedavi yöntemleri ile ilgili çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir. Biz de çalışmamızda iyi bir fonksiyonel ve morfolojik geri kazanım elde edebilmek amacıyla literatürde daha önce ayrı ayrı kullanılarak sinir iyileşmesine etkileri gösterilen, ekstraselüler matriks elemanlarının sinir iyileşmesini inhibe edici etkisini azaltan kondroitinaz ABC (ChABC) enzimi ile akson büyümesini uyarıcı çeşitli büyüme faktörlerini içeren plateletten zengin plazma'nın (PRP) tek tek ve literatürde daha önce denenmemiş kombine uygulamalarının etkilerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda 5 grup içinde toplam 40 adet 12 haftalık Wistar albino ratlar kullanıldı. Siyatik sinir hasarı bütün gruplarda sol tarafta dallanma bölgesinin 1 cm proksimalinden mikro makasla transvers kesi yapılarak oluşturuldu. Kesi grubu haricindeki gruplarda sinir onarımı aynı cerrah tarafından primer epinöral anastomoz (PEA) yapılarak gerçekleştirildi. Gruplar ve uygulamalar şu şekildeydi; Kesi grubu: PEA ile sinir onarımı yok; Salin grubu: PEA bölgesine 0,125 ml Salin uygulaması; Ch grubu: PEA bölgesine 2U/0,125ml ChABC uygulaması; PRP grubu: PEA bölgesine 0,125 ml PRP uygulaması; Ch+PRP grubu: PEA bölgesine kombine 2U/0,125 ml ChABC+ 0,125 ml PRP uygulaması. PRP uygulanan gruplara ait birer rattan cerrahi işlemden önce intrakardiyak kan alınarak iki aşamalı santrifüj işleminden geçirildi ve PRP elde edildi. Kan alınan ratlar deney dışı bırakıldı. 12 haftanın sonunda siyatik sinir dokuları perfüzyon fiksasyon ile sütür hattının merkezini ve distalini içerecek şekilde çıkarıldı. Her iki bölgeden ışık ve elektron mikroskopik inceleme için alınan örnekler %10 tamponlu formalin ve %2,5 gluteraldehit ile fikse edildikten sonra rutin takip işlemlerinden geçirildi. Sütür hattının merkezinden ve distalinden alınan parafin kesitler hematoksilin-eozin ve Mallory azan ile boyandı. Distal bölgeden alınan kesitler ayrıca Schwann hücreleri için anti-S-100 ve rejener aksonlar için anti GAP-43 antikoları kullanılarak immünohistokimyasal olarak işaretlendi. Araldit bloklardan alınan yarı ince kesitler ise Toluidin mavisi ile boyandı. Parafin ve yarı ince kesitler Leica DM 500 ışık mikroskobuna bağlı Leica ICC50HD kamera ile inceleme sonrası fotoğraflandı.

Hem distal hem de merkez bölge yarı ince kesitlerinde toplam miyelinli lif sayısı ve dejenere lif sayısı fraksiyonlama probu ile; distal bölge yarı ince kesitlerinde ise lif alanı, akson alanı, miyelin alanı, lif çapı, akson çapı ve miyelin kalınlığı nucleator probu ile stereoloji yazılımı (StereoInvestigator, MBF Bioscience) kullanılarak belirlendi. g-ratio (akson çapı/lif çapı) değerleri de hesaplandı. Fonksiyonel iyileşmeyi değerlendirmek için ratlara pre-op, post-op 6. ve 12. Haftalarda yürüme yolu testi yapıldı ve siyatik fonksiyon indeksi (SFI) belirlendi.

Elde edilen SFI değerleri ile stereolojik sayım ve ölçüm verileri istatistiksel olarak IBM SPSS 22 programı kullanılarak değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Bütün deney gruplarında epinöryum ve perinöryum içinde yanlış yönlendirilmiş rejeneratif akson filizleri ile endonöryum içinde miyelin debrisini fagosite eden makrofajlar ve Schwann hücreleri, damar komşuluğunda mast hücreleri izlendi. Kontrolle kıyaslandığında dejenere akson sayısı tüm deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekken ($p < 0,05$), deney grupları kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrolle

kıyaslandığında toplam miyelinli lif sayısı CH+PRP grubu merkez bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$). Deney gruplarının distal bölgelerindeki miyelinli aksonların lif çapı, akson çapı, miyelin kalınlığı ve g-ratio değerleri kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olarak bulundu ($p<0,05$). SFI sonuçları 6 ve 12. hafta sonunda pre-op döneme göre tüm gruplarda fonksiyon yokluğu veya azlığını ifade edecek şekilde düşüktü ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Makroskobik olarak kesi hasarı yapılan sol ekstremitede parmak kayıplarının izlenmesi tüm deney gruplarında yarı ince kesitlerde duyu liflerini oluşturan miyelinsiz aksonların gözlenmemesi nedeniyle miyelinli liflere göre duyu liflerindeki hasarın daha yoğun olduğunu düşündürdü.

Sonuç olarak bu çalışmada, cerrahi tedaviye ek olarak uygulanan ChABC ve ChABC+PRP'nin lokal uygulanmasının kesi bölgesi merkezinde akson filizlenmesini artırarak sinir rejenerasyonuna olumlu katkısı olduğu görüldü. Kesi bölgesinin distalinde ince miyelinli ve küçük çaplı aksonların varlığı ile SFI değerlerinin pre-op döneme göre düşük olmasına bağlı olarak sinir rejenerasyonunun 12. hafta sonunda hala devam ettiği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Kondroitinaz ABC, PRP, Siyatik sinir, Stereoloji

SUMMARY

Effect of Chondroitinase ABC and platelet rich plasma combination on sciatic nerve regeneration

The peripheral nerves have an intrinsic capacity for regeneration after injury. For the proper regeneration the cross interactions between Schwann cells, neurotrophic factors and extracellular matrix components play the most important role. Although end-to end anastomosis of injured nerve ends after transection is the gold standard procedure for the treatment of peripheral nerve, there are many studies targeting possible pharmacologic agents that can be applied together with anastomosis to enhance nerve regeneration.

In this study we aimed to investigate the functional and morphological effects of the chondroitinase ABC (ChABC) enzyme that reduces the inhibitory effects of the extracellular matrix components and platelet-rich plasma (PRP) which includes growth factors that applied alone and in combination to the surgical repair site after transection injury

A total of 40 Wistar rats were randomly separated into 5 groups. The transection injury was formed by transverse incision from the 1 cm proximal of the branching point on the left side in all groups. Right sciatic nerves were used as control. Except that the untreated transection group nerve repair was performed via primary epineural anastomosis (PEA). After PEA 0.125ml saline, 2U/0.125ml ChABC, 0,125 ml PRP and combined 2U/0,125 ml ChABC+0.125ml PRP were applied onto the repair site in treated groups (saline, ChABC, PRP and ChABC+PRP). For the preparation of PRP, blood was collected by cardiac puncture in a tube containing anticoagulant. After two step centrifugation the pellet was activated by 10% CaCl₂. Blood collected rats were excluded from the experiment. After 12 weeks the nerves were removed and fixed with 10% formalin and processed as routinely. The paraffin sections from distal stump and center region were stained with hematoxylin-eosin and Mallory's azan. For immunohistochemical examination the sections were stained with anti-S100 and anti-GAP43 antibodies for the visualization of Schwann cells and regenerating axons. Sections were analyzed under Leica DM500 microscope and images were captured with Leica ICC50HD camera. The nerve samples that were processed for araldite embedding and toluidine blue stained semi-thin sections were analyzed using a stereology system (StereoInvestigator, MBF Bioscience).

In both distal stump and center region of all groups the total number of myelinated and degenerated fibers was estimated using fractionator probe. The nerve fiber morphometry including fiber areas, axon areas, myelin areas, fiber diameter, axon diameter and myelin thickness in distal stump of experimental groups were evaluated using nucleator probe. The g-ratio value was calculated using the following formula: $g\text{-ratio} = \text{axon diameter} / \text{fiber diameter}$. For the functional evaluation the SFI was measured by walking track analysis preoperatively, post operatively at 6 weeks and 12 weeks. Print length, toe spread and intermediary toe spread were determined. The SFI was calculated using these measurements. The change in SFI and the data achieved by stereologic methods were analyzed using IBM SPSS 22 statistical software and the p values less than 0,05 were considered statistically significant. In all experimental groups we observed misdirected regenerating axon sprouts in the epineurium and perineurium. Endoneurium contained macrophages and Schwann cells that were fagosome myelin debris. Well defined mast cells were seen in close proximity to the endoneurial and perineurial blood vessels. Whereas the total numbers of degenerated fibers in all experimental groups were significantly higher than control group ($p < 0,05$), there were no statistically significant differences between the experimental groups. The total numbers of myelinated fibers in the CH+PRP group central region were significantly higher than control group ($p < 0,05$). In all experimental groups at the distal stump region fiber diameter, axon

diameter, myelin thickness and g-ratio values were significantly lower than control group ($p<0,05$). The SFI in rats of all experimental groups at 6 and 12 weeks after post operation decreased indicating poor or no function and the the difference between pre operative and post operative period was statistically significant ($p<0.05$) Macroscopically nearly in all groups there were finger loss on the left side where the transection injury performed suggested that unmyelinated sensory axons are more affected than myelinated motor axons. In conclusion the present study revealed that local application of ChABC and ChABC +PRP to the surgical repair site after transection injury increase the axon sprouting at the central region. Due to thinly myelinated and small caliber axon composition seen in distal region of repair site and decreased SFI indicating poor or no function at 12 weeks suggested that nerve regeneration process still going on.

Key Words: Chondroitinase ABC, PRP, Sciatic nerve, Stereology



KAYNAKLAR

- ALMASRY, S. M., SOLIMAN, H. M., EL-TARHOUNY, S. A., ALGAIDI, S. A. & RAGAB, E. M. 2015. Platelet rich plasma enhances the immunohistochemical expression of platelet derived growth factor and vascular endothelial growth factor in the synovium of the meniscectomized rat models of osteoarthritis. *Ann Anat*, 197, 38-49.
- BAIN, J. R., MACKINNON, S. E. & HUNTER, D. A. 1989. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 83, 129-38.
- BENGA, A., ZOR, F., KORKMAZ, A., MARINESCU, B. & GORANTLA, V. 2017. The neurochemistry of peripheral nerve regeneration. *Indian J Plast Surg*, 50, 5-15.
- BLAIR, P. & FLAUMENHAFT, R. 2009. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 23, 177-89.
- CANAN, S., BOZKURT, H. H., ACAR, M., VLAMINGS, R., AKTAS, A., SAHIN, B., TEMEL, Y. & KAPLAN, S. 2008. An efficient stereological sampling approach for quantitative assessment of nerve regeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34, 638-49.
- CHAN, K. M., GORDON, T., ZOCHODNE, D. W. & POWER, H. A. 2014. Improving peripheral nerve regeneration: from molecular mechanisms to potential therapeutic targets. *Exp Neurol*, 261, 826-35.
- CHERNOUSOV, M. A. & CAREY, D. J. 2000. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol Histopathol*, 15, 593-601.
- CHING, R. C. & KINGHAM, P. J. 2015. The role of exosomes in peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res*, 10, 743-7.
- DODLA, M. C., MUKHATYAR, V. J. & BELLAMKONDA, R. V. 2011. Peripheral Nerve Regeneration. 1047-1062.
- EMEL, E., ERGUN, S. S., KOTAN, D., GURSOY, E. B., PARMAN, Y., ZENGİN, A. & NURTEN, A. 2011. Effects of insulin-like growth factor-I and platelet-rich plasma on sciatic nerve crush injury in a rat model. *J Neurosurg*, 114, 522-8.
- ESER, F., AKTEKİN, L. A., BODUR, H. & ATAN, C. 2009. Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. *Neurol India*, 57, 434-7.
- FARONI, A., MOBASSERI, S. A., KINGHAM, P. J. & REID, A. J. 2015. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 82-83, 160-7.
- GARTNER, L. P. 2017. *Textbook of Histology*.

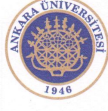
- GAUDET, A. D., POPOVICH, P. G. & RAMER, M. S. 2011. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*, 8, 110.
- GAUSE, T. M., 2ND, SIVAK, W. N. & MARRA, K. G. 2014. The role of chondroitinase as an adjuvant to peripheral nerve repair. *Cells Tissues Organs*, 200, 59-68.
- GEUNA, S., RAIMONDO, S., RONCHI, G., DI SCIPIO, F., TOS, P., CZAJA, K. & FORNARO, M. 2009. Chapter 3 Histology of the Peripheral Nerve and Changes Occurring During Nerve Regeneration. 87, 27-46.
- GIANNESSI, E., COLI, A., STORNELLI, M. R., MIRAGLIOTTA, V., PIRONE, A., LENZI, C., BURCHIELLI, S., VOZZI, G., DE MARIA, C. & GIORGETTI, M. 2014. An autologously generated platelet-rich plasma suturable membrane may enhance peripheral nerve regeneration after neurotomy in an acute injury model of sciatic nerve neurotmesis. *J Reconstr Microsurg*, 30, 617-26.
- GLENN, T. D. & TALBOT, W. S. 2013. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Curr Opin Neurobiol*, 23, 1041-8.
- GRINSELL, D. & KEATING, C. P. 2014. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed Res Int*, 2014, 698256.
- GROVES, M. L., MCKEON, R., WERNER, E., NAGARSHETH, M., MEADOR, W. & ENGLISH, A. W. 2005. Axon regeneration in peripheral nerves is enhanced by proteoglycan degradation. *Exp Neurol*, 195, 278-92.
- GULTEKIN, G., YAYLIM, I. & ISBIR, T. 2013. Plateletten Zengin Plazmanın Kullanım Alanları *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 3, 17-22.
- HAPA, O. 2013. Does platelet-rich plasma enhance microfracture treatment for chronic focal chondral defects? An in-vivo study performed in a rat model. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, 47, 201-207.
- HATTORI, T., MATSUYAMA, Y., SAKAI, Y., ISHIGURO, N., HIRATA, H. & NAKAMURA, R. 2008. Chondroitinase ABC enhances axonal regeneration across nerve gaps. *J Clin Neurosci*, 15, 185-91.
- IRINTCHEV, A. 2011. Potentials and limitations of peripheral nerve injury models in rodents with particular reference to the femoral nerve. *Ann Anat*, 193, 276-85.
- JESSEN, K. R. 2004. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 1861-7.
- KAPLAN, S., ODACI, E., UNAL, B., SAHIN, B. & FORNARO, M. 2009. Chapter 2 Development of the Peripheral Nerve. 87, 9-26.
- KIERSZENBAUM, A. L. & TRES, L. L. 2016. *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*.
- KIM, J. Y., JEON, W. J., KIM, D. H., RHYU, I. J., KIM, Y. H., YOUN, I. & PARK, J. W. 2014. An inside-out vein graft filled with platelet-rich plasma for repair of a short sciatic nerve defect in rats. *Neural Regen Res*, 9, 1351-7.

- KUCUK, L., GUNAY, H., ERBAS, O., KUCUK, U., ATAMAZ, F. & COSKUNOL, E. 2014. Effects of platelet-rich plasma on nerve regeneration in a rat model. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 48, 449-54.
- LETERRIER, C. 2016. The Axon Initial Segment, 50Years Later: A Nexus for Neuronal Organization and Function. *Curr Top Membr*, 77, 185-233.
- MALAHIAS, M. A., CHYTAS, D., BABIS, G. C. & NIKOLAOU, V. S. 2014. Platelet-rich plasma guided injections: clinical application in peripheral neuropathies. *Front Surg*, 1, 41.
- MENORCA, R. M., FUSSELL, T. S. & ELFAR, J. C. 2013. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*, 29, 317-30.
- MIYATA, S. & KITAGAWA, H. 2015. Mechanisms for modulation of neural plasticity and axon regeneration by chondroitin sulphate. *J Biochem*, 157, 13-22.
- MØLLER, A. R. 2011. Anatomy and Physiology of Peripheral Nerves. *Intraoperative Neurophysiological Monitoring*. New York, NY: Springer New York.
- MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N. 2009. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*, Nobel Tıp Kitabevleri.
- MUIR, D. 2010. The potentiation of peripheral nerve sheaths in regeneration and repair. *Exp Neurol*, 223, 102-11.
- OVALLE, F., JR., PATEL, A., POLLINS, A., DE LA TORRE, J., VASCONEZ, L., HUNT, T. R., 3RD, BUCY, R. P., SHACK, R. B. & THAYER, W. P. 2012. A simple technique for augmentation of axonal ingrowth into chondroitinase-treated acellular nerve grafts using nerve growth factor. *Ann Plast Surg*, 68, 518-24.
- RAMKUMAR, M., SHARMA, S., JACOB, T. G., BHARDWAJ, D. N., NAG, T. C. & ROY, T. S. 2015. The human trochlear and abducens nerves at different ages - a morphometric study. *Aging Dis*, 6, 6-16.
- ROSS, M. H. & PAWLINA, W. 2014. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. *In: BAYKAL, B. (ed.)*.
- ROTSHENKER, S. 2015. Traumatic Injury to Peripheral Nerves. *In: R. SHANE TUBBS, E. R., MOHAMMADALI SHOJA, MARIOS LOUKAS, ROBERT J. SPINNER AND NICHOLAS BARBARO (ed.) Nerves and Nerve Injuries*
Volume 2: Pain, Treatment, Injury, Disease, and Future Directions.
- SABATIER, M. J., TO, B. N., ROSE, S., NICOLINI, J. & ENGLISH, A. W. 2012. Chondroitinase ABC reduces time to muscle reinnervation and improves functional recovery after sciatic nerve transection in rats. *J Neurophysiol*, 107, 747-57.
- SADLER, T. W. 2005. *Langman Medikal Embriyoloji*.
- SARIKCIOGLU, L., DEMIREL, B. M. & UTUK, A. 2009. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol (Warsz)*, 68, 1-7.

- SULAIMAN, W. & GORDON, T. 2013. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *Ochsner J*, 13, 100-8.
- UDINA, E., LADAK, A., FUREY, M., BRUSHART, T., TYREMAN, N. & GORDON, T. 2010. Rolipram-induced elevation of cAMP or chondroitinase ABC breakdown of inhibitory proteoglycans in the extracellular matrix promotes peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*, 223, 143-52.
- VAREJAO, A. S., MEEK, M. F., FERREIRA, A. J., PATRICIO, J. A. & CABRITA, A. M. 2001. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*, 108, 1-9.
- WANG, J. T., MEDRESS, Z. A. & BARRES, B. A. 2012. Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J Cell Biol*, 196, 7-18.
- ZUO, J., HERNANDEZ, Y. J. & MUIR, D. 1998. Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury. *J Neurobiol*, 34, 41-54.
- ZUO, J., NEUBAUER, D., GRAHAM, J., KREKOSKI, C. A., FERGUSON, T. A. & MUIR, D. 2002. Regeneration of Axons after Nerve Transection Repair Is Enhanced by Degradation of Chondroitin Sulfate Proteoglycan. *Experimental Neurology*, 176, 221-228.

EKLER

Ek.1. Etik Kurul Raporu



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

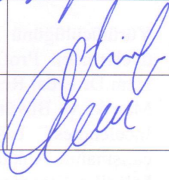
TOPLANTI TARİHİ : 11/02/2015
TOPLANTI NO : 2015-2
DOSYA NO : 2015-33
KARAR NO : 2015-2-41



Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Oya Evirgen'in yaptığı ve araştırmacı olarak Uzm.Bio.E.Nazlı Hayırlı ve Uzm.Dr.Erdal Reşit Yılmaz'ın katıldığı "Periferik Sinir Yaralanması Sıçan Modelinde Ekstraselüler Matris ve Büyüme Faktörlerinin sinir Rejenerasyonuna Etkisinin Stereolojik ve Histolojik Olarak İncelenmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 40
Geçerlilik Süresi : 01/06/2015-01/06/2017

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARIMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatın CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Emine Nazlı

Soyadı: Hayırlı

Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 10.07.1986

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Batı Sitesi Mah. Altındağ Sitesi 11/3 Batıkent Ankara,
0312 255 66 69

II- Eğitimi

2009-2011

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Yüksek Lisans Programı (Tez Başlığı: Genç ve yaşlı ratlarda tekrarlayan kontrollü ovaryum hiperstimulasyon tedavisinin genital ve endokrin sistem organları üzerindeki etkisinin morfometrik olarak incelenmesi, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oya Evirgen)

2004-2008

Ankara Üniversitesi

Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru)

Biyolog, 2008

Uzman Biyolog, 2011

IV- Mesleki Deneyimi

Araştırma Görevlisi

2013-2015

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp
Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Abd

Araştırma Görevlisi Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri
2015 Bölümü Histoloji ve Embriyoloji ABD (35. Madde ile
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesine görevlendirme)

Araştırma Görevlisi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri
2015-Halen Bölümü Histoloji ve Embriyoloji ABD (Karabük
Üniversitesi adına 35. Madde ile görevlendirme)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayımları:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. The Protective effect of Omeprazole Against Traumatic Brain Injury: An Experimental Study. Özay R, Türkoğlu ME, Gürer B, Dolgun H, Evirgen O, Ergüder Bİ, **Hayırlı N**, Gürses L, Şekerci Z. World Neurosurg. 2017 Apr 28. pii: S1878-8750(17)30644-7. doi: 10.1016/j.wneu.2017.04.136. [Epub ahead of print] PMID: 28461271
2. Does Decorin Protect Neuronal Tissue via Its Antioxidant and Antiinflammatory Activity from Traumatic Brain Injury? An Experimental Study. Özay R, Türkoğlu E, Gürer B, Dolgun H, Evirgen O, Ergüder Bİ, **Hayırlı N**, Gürses L, Şekerci Z, Yılmaz ER. World Neurosurg. 2017 Jan;97:407-415. doi: 10.1016/j.wneu.2016.09.115. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27744073
3. The effect of intra-articular levobupivacaine on shoulder cartilage at different doses-experimental study. Özcan MS, Kalem M, Özçelik M, Şahin E, Çakar S, **Hayırlı N**, Evirgen O, Ökten F. Braz J Anesthesiol. 2017 Jan - Feb;67(1):42-49. doi: 10.1016/j.bjane.2015.08.008. Epub 2016 Apr 20. PMID: 28017169
4. Potential neuroprotective effect of Anakinra in spinal cord injury in an in vivo experimental animal model. Hasturk AE, Yılmaz ER, Turkoglu E, Arıkan M, Togrul G, **Hayırlı N**, Erguder BI, Evirgen O. Neurosciences (Riyadh). 2015 Apr;20(2):124-30. doi: 10.17712/nsj.2015.2.20140483. PMID: 25864064
5. Therapeutic evaluation of interleukin 1-beta antagonist Anakinra against traumatic brain injury in rats. Hasturk AE, Yılmaz ER, Turkoglu E, Kertmen H, Horasanli B, **Hayırlı N**, Erguder IB, Evirgen O. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2015 Jan;21(1):1-8. doi: 10.5505/tjtes.2015.57894. PMID: 25779705

6. The histopathological and ultrastructural effects of the topical application of bacitracin on the cerebral cortex in rats. Yilmaz ER, Gurer B, Kertmen H, Hasturk AE, Evirgen O, **Hayirli N**, Gokturk H, Can B, Caglar YS, Sekerci Z. Turk Neurosurg. 2015;25(1):78-84. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.10175-13.1. PMID: 25640550

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. Effect of Chondroitinase ABC and platelet rich plasma combination on sciatic nerve regeneration; **Hayirli E.N.**, Evirgen O., Yilmaz E.R.; 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2017) 18-21 May 2017, Antalya, Turkey (**Poster Bildiri**)
2. Stereologic and Ultrastructural Analysis of Amniotic Membrane Covering for Sciatic Nerve Repair; Evirgen O., **Hayirli E.N.**, Yilmaz E.R., Hasturk A.E.; 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2017) 18-21 May 2017, Antalya, Turkey (**Poster Bildiri**)
3. Potential Difficulties In Transmission Electron Microscope Observations Of Respiratory Cilia Axonemal Complex; Evirgen O., Erdemli E., **Hayirli E.N.**, Ozdemir D.; 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2017) 18-21 May 2017, Antalya, Turkey (**Poster Bildiri**)
4. The Effect of The Administration of Different Single Doses Of Intraarticular Levobupivacaine on The Cartilage in The Rabbit Shoulder Joint Model; M.S. OZCAN, M. OZCELİK, O.S.CAN, M. KALEM, **E.N. HAYIRLI**, O.EVIRGEN, F. OKTEN MD, M. ARMANGIL, M. DEMIRTAS; 32nd Annual ESRA Congress, 4-7 September 2013, Glasgow, UK (**Poster Bildiri**)
5. Repeated controlled ovarian hyperstimulation(COH) treatment effects on the number of primordial and primary follicle number a stereological study; **Hayirli E.N.**, Evirgen O.; Journal of Experimental and Clinical Medicine Vol: 29, Issues: 5, p: 373; Asian and African Stereology Congress, 6-8 November 2012, Samsun, Turkey (**Poster Bildiri**)
6. Morphometric and Ultrastructural Analysis of Corpus Luteum Granulosa Cells After Repeated Gonadotropin Administration, **Hayirli EN**, Evirgen O, Göktürk H, Can B; International Journal of Experimental and Clinical Anatomy, Volume 6 Supplement, p:101; 4th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy (ISCAA); June 28-July 1 2012, Ankara, Turkey (**Poster Bildiri**)
7. Ultrastructural Effects Of Nicotine Exposure On Peripheric Nerve Repair; Aydın N, Göktürk H, **Hayirli EN**, Sargın Köse A, Çelikkan Topal F, Evirgen O, Can B; 4th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy-ISCAA; 28 June-1 July 2012 Ankara, Turkey (**Sözlü Bildiri**)

Ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler ve çeviriler

1. Temel Biyolojik Psikoloji, Bölüm adı:(Beyin Gelişimi ve Plastisitesi) (2014)., HAYIRLI EMİNE NAZLI, GÖKTÜRK HİLAL, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd. Şti, Editör: Prof.Dr.Ahmet Altındağ, Basım Sayısı:1, ISBN:978-605-133-850-7, Türkçe (Kitap Tercümesi)
2. Tıbbi Histoloji-Embriyoloji Uygulama Kılavuzu, Ankara 2014. Edit: Prof.Dr. Canan Akbay, ISBN: 978-605-4649-54-9, Akademisyen Tıp Kitabevi

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. Spinal Kord Yaralanmasında Etanercept Uygulamasının Doku Hasarını Önleme Potansiyeli; 14.Ulusal Sinirbilimleri Kongresi; 26-29 Mayıs 2016; Ankara **(Poster Sunumu)**
2. Sıçan Grasilis Kas Fleplerinde İskemi-Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Sistemik Apokinin Uygulamasının Etkinliğinin Araştırılması, XIII. Uluslararası katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan-3 Mayıs 2016; İzmir **(Poster Sunumu)**
3. Deneysel Hayvan Modelinde Oluşturulan Akut Mezenter İskeminin Erken Tanısında D-Dimer, L- Laktat, IFABP'nin Yeri ve Prognostik Değeri; XIII. Uluslararası katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan-3 Mayıs 2016; İzmir **(Poster Sunumu)**
4. Rat Amniyonik Membranının Periferik Sinir Onarımına Etkisi: Histolojik Ve Stereolojik Bir Çalışma, 13.Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015, Konya **(Poster Sunumu)**
5. Göbek Kordonu Yapısında Gebeliğe Bağlı Hipertansiyon ve İntrauterin Gelişme Geriliğinde(IUGG) Meydana Gelen Değişikliklerin Histomorfometrik Olarak İncelenmesi, XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Mayıs 2014, Ankara **(Poster Sunumu)**
6. Periferik Sinir Onarımı Üzerine Nikotin Etkisinin İnce Yapısal Düzeyde İncelenmesi; 21. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Elektron Mikroskopi Kongresi; 28-31 Mayıs 2013, Mersin **(Poster Sunumu)**
7. Lokal Basitrasın Uygulamasının Rat Serebral Korteksine Etkilerinin Histopatolojik ve İnce Yapı Düzeyinde İncelenmesi; 21.Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Elektron Mikroskopi Kongresi; 28-31 Mayıs 2013, Mersin **(Poster Sunumu)**
8. Travmatik Spinal Kord Hasarı Sonrası Etanercept Uygulamasının Beyaz Madde Akson Yapısına Etkisi; 21.Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Elektron Mikroskopi Kongresi; 28-31 Mayıs 2013 Mersin **(Poster Sunumu)**
9. Glomerül Hastalıklarının Tanısında Geçirimli (Transmisyon) Elektron Mikroskopunun (TEM) Rolü Ve Önemi, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2011, Kemer **(Poster Sunumu)**

10. İnsan Böbrek Biyopsi Örneklerinde Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Bulgularının Tanıdaki Yeri ve Önemi: AÜTF Histoloji-Embriyoloji ABD TEM Laboratuvarı Gözlemleri, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2011, Kemer **(Poster Sunumu)**
11. İmmün Baskılanma Sonrası Dalak Beyaz Pulpa Kompartımanlarında Gözlenen Morfolojik Değişiklikler, X. Ulusal Histoloji- Embriyoloji Kongresi, 2010, İzmir **(Sözlü Sunum)**
12. Rat Böbrek dokusunda İmmünespresif İlaç (FK506) Toksisitesinin Ultrastrüktürel Düzeyde İncelenmesi, 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 2009, Trabzon **(Poster Sunumu)**

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri:

1. Genç ve Yaşlı Ratlarda Tekrarlayan Kontrollü Ovaryum Hiperstimulasyon Tedavisinin Genital ve Endokrin Sistem Organları Üzerindeki Etkisinin Morfometrik Olarak İncelenmesi, Araştırmacı, Ankara Üniversitesi BAP (25/10/2010 - 30/12/2011, Proje No: 10B3330027)
2. Periferik Sinir Yaralanması Sıçan Modelinde Ekstraselüler Matriks ve Büyüme Faktörlerinin Sinir Rejenerasyonuna Etkisinin Stereolojik Ve Histolojik Olarak İncelenmesi, Araştırmacı, Ankara Üniversitesi BAP (02/06/2015 - Devam Ediyor, Proje No:15L0230008)

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri:

- Eğiticilerin Eğitimi Sertifika Programı, 2015, Ankara Üniversitesi, Ankara
- Öğretmenlik Sertifikası Programı (Pedagojik Formasyon), 2013, Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesi, Ankara
- Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası 12-23 Ekim 2009, GATA, Ankar
- Laboistatistik: Temel Laboratuvar Bilimleri İçin Biyoistatistik Kursu, 23-24 Mayıs 2015, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Ankara
- Güncel İyi Üretim Uygulamalarında (cGMP) Hücresel Tedavi Ürünleri Kalite standartları Kursu-TÜBA, 10 Nisan 2015, Antalya
- Biyoistatistik Çözümleme Kursu, 26 Mayıs 2014, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara
- Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi Kursu 30 Mayıs-01 Haziran 2014, THED, Ankara Üniversitesi-TÜBİTAK Kursu)

- Stereology Course, 9-10 November 2012, Samsun
- Mikroskopi, Görüntüleme ve Stereoloji Kursu, 14-15 Ocak 2012, Ankara
- I. Uygulamalı Temel Hücre Kültürü Teknikleri Kursu, 2-4 Şubat 2011, Denizli
- Stereoloji Kursu
- , Mayıs 2010, İzmir
- II. Temel Hücre Kültürü Kursu, 17 Ekim 2009, Ankara
- International Course on Stereotaxy, Microsurgery and Stereology, 5-7 Ekim 2009, Samsun

