

Lityum Yükl nmiŐ Hyaluronik Asit Hidrojellerinin Siyatik Sinir Hasarına Etkisi

Tayfun Şengel

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Mayıs 2016

Effect of Hyaluronic Acid Hydrogel with Lithium on Sciatic Nerve Defects

Tayfun Sengel

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

May 2016

Lityum Yükl nmiŐ Hyaluronik Asit Hidrojellerinin Siyatik Sinir Hasarına Etkisi

Tayfun Şengel

Eskişehir Osmangazi  niversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. İlknur DAĞ

Bu Tez TÜBİTAK tarafında SBAG 215S839 no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Mayıs 2016

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Tayfun Şengel'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Lityum Yüklenmiş Hyaluronik Asit Hidrojellerinin Siyatik Sinir Hasarına Etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. İlknur DAĞ

İkinci Danışman : Yrd. Doç. Dr. A. Emre KOÇMAN

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. İlknur DAĞ

Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Emre KOÇMAN

Üye : Prof. Dr. Cengiz ÇETİN

Üye : Prof. Dr. İbrahim DEMİRKAN

Üye : Doç. Dr. Hakan ŞENTRÜK

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. İlknur DAĞ danışmanlığında hazırlamış olduğum “Lityum Yüklenmiş Hyaluronik Asit Hidrojelinin Siyatik Sinir Hasarına Etkisi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 12 / 05 / 2016

Tayfun Şengel

İmza

ÖZET

Periferik sinir hasarları motor, duysal ve otonom fonksiyonlara zarar veren; aynı zamanda da yaşam kalitesini azaltarak önemli mali kayıplara yol açan yaralanmalardır. Özellikle motorlu araç kazalarına bağlı travmalarda ve daha az sıklıkla da derin travmalarda, düşmelerde ve endüstriyel kazalarda görülmektedirler. Büyük sinir boşlukları, proksimal lezyonlar ya da kronik sinir yaralanmalarında iyileşme oldukça zordur. Merkezi sinir sisteminin aksine periferik sinir sistemi önemli bir yenilenme kapasitesine sahiptir ancak bu rejenerasyon tam olarak gerçekleşmemekte ve yaralanma öncesi duruma kıyasla fonksiyonel iyileşme çok nadir görülmektedir.

Çalışmamızda hyaluronik asitin biyobozunur bir hidrojeli yapılarak bu hidrojele lityum yüklenmesi gerçekleştirilmiştir. Rat siyatik siniri üzerinde periferik sinir hasarı modeli oluşturularak; oluşan sinir boşluğuna silikon konduit yerleştirilmiş ve konduit lümenine de bu hidrojeller enjekte edilmiştir. 12 haftalık bekleme süreci sonunda denekler disekte edilerek rejenerasyonun ultrayapısal boyuttaki değerlendirilmeleri yapılmıştır. Sonuçta hem lityum hem lityum yüklenmiş hyaluronik asit hidrojellerinin siyatik sinir rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Periferik sinir hasarı, Lityum, Hyaluronik asit, Hidrojel, Rejenerasyon

SUMMARY

Peripheral nerve injury damages motor, sensorial and autonomous functions, at the same time as reducing quality of life and causing significant financial losses. It is observed especially in trauma linked to motor vehicle accidents and less frequently with deep trauma, falls and industrial accidents. With large nerve gaps, proximal lesions or chronic nerve injuries, healing is very difficult. Contrary to the central nervous system, the peripheral nervous system has a significant capacity for renewal, however this regeneration is not fully complete and improvement is rarely observed compared to the situation before injury. For example, while a wide and externally directed neuronal development is required for proximal lesions, a weak regenerative environment at the distal tips is formed in chronically injured nerves. The regeneration mechanism of damaged nerves is based on many interactions between both cellular elements and extracellular matrix.

In the present study a biodegradable hydrogel were constructed from hyaluronic acid and loaded with lithium. A defective peripheral nerve injury were made on rat sciatic nerve and bridged with a silicone conduit filled with the prepared hydrogels. In conclusion both lithium and lithium loaded groups were demonstrated positive effects on peripheral nerve regeneration.

Keywords: Peripheral nevre injury, Lithium, Hyaluronic acid, Hydrogel, Regeneration

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince gösterdikleri yakın ilgiyle, sabırla, anlayışla, değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım danışman hocalarım Doç. Dr. İlknur DAĞ ve Yrd. Doç. Dr. Atacan Emre KOÇMAN' a

Deneysel çalışmalarının ilgili kısımlarını gerçekleştirebilmem için laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren ve çalışmalarım süresince hiçbir yardımı ve desteği esirgemeyen Uzm. Dr. Erdem SÖZTUTAR ve Uzm. Kim. Arslan TEKER'e

Tüm eğitim hayatımda maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TUBİTAK-SBAG tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Sinir Sistemi.....	3
2.1.1. Periferik sinir anatomisi	3
2.1.1.1. <u>Sinir hücresi (nöron)</u>	4
2.1.1.2. <u>Schwann hücreleri ve myelin kılıf</u>	6
2.2. Periferik Sinir Yaralanmaları	8
2.2.1. Dejenerasyon ve rejenerasyon.....	10
2.2.1.1. <u>Proksimal uç dejenerasyonu</u>	11
2.2.1.2. <u>Distal uç dejenerasyonu (Wallerian dejenerasyon)</u>	12
2.2.2. Seddon ve Sunderland sınıflaması.....	13
2.3. Periferik Sinir Yaralanmalarındaki Klinik Yaklaşımlar	14
2.3.1. Primer onarım	17
2.3.1.1. <u>Epinöral onarım (nörorafi)</u>	17
2.3.1.2. <u>Grup fasiküler onarım</u>	17
2.3.1.4. <u>Otolog sinir grefti ile onarım</u>	18
2.3.1.5. <u>Diğer otolog dokuların kullanımı</u>	19
2.3.1.6. <u>Nonotolog Doku ve Aselüler Greftler</u>	19
2.3.1.7. <u>Sentetik greftler</u>	19
2.3.1.8. <u>Doğal bazlı materyaller</u>	20
2.3.1.9. <u>Dolgu maddeleri</u>	21
2.4. Sinir İyilemesinde Mikroçevrenin Restorasyonu ve Büyüme Faktörlerinin Etkileri	21
2.4.1. Sinir iyilemesinde Schwann hücrelerinin rolü	22
2.4.2. Büyüme faktörleri	23
2.4.3. Nörotrofik faktörler (Nörotrofinler)	23
2.4.3.1. <u>Sinir büyüme faktörü (NGF)</u>	23
2.4.3.2. <u>Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF)</u>	24
2.4.3.3. <u>Nörotrofin-3 (NT-3)</u>	24
2.4.3.4. <u>Nörotrofin-4/5 (NT-4/5)</u>	25
2.4.3.5. <u>Nörotrofin-6 (NT-6)</u>	25
2.5. Periferik Sinir Tedavisinde Doku Mühendisliği Yaklaşımları	25
2.5.1. Enjekte edilebilen sistemler.....	26
2.5.2. Periferik sinir yaralanmalarında doğal biyomateryal hidrojelieri	27
2.5.2.1. <u>Kollajen</u>	27
2.5.2.2. <u>Aljinat</u>	27
2.5.2.3. <u>Kitosan</u>	28
2.5.2.4. <u>İpek</u>	28
2.5.2.5. <u>Hyaluronik asit (HA)</u>	28

İÇİNDEKİLER (devam)

2.5.3. Hyaluronik asit ve sinir iyileşmesindeki rolü	29
2.5.4. Lityum ve sinir iyileşmesindeki rolü	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	35
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.3. Kullanılan Cihazlar	37
3.4. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	37
3.4.1. Lityum klorür çözeltisi hazırlanması	37
3.4.2. Hyaluronik asit hidrojelinin hazırlanması	37
3.4.3. Lityum yüklü hyaluronik asit hidrojeli hazırlanışı.....	39
3.4.4. Uranil asetat boyasının hazırlanışı.....	39
3.4.5. Reynold's kurşun boyasının hazırlanışı.....	39
3.4.6. Fosfat tamponunun hazırlanışı	40
3.4.7. Toluidin mavisi boyasının hazırlanışı.....	40
3.5. Hayvanlara Uygulanan Cerrahi İşlemler	40
3.6. Hayvanların Öldürülmesi ve Biyopsilerin Alınması.....	41
3.7. Biyopsilerden Işık ve Elektron Mikroskopi Takibi ve İncelemesi.....	42
3.8. Histomorfolojik Değerlendirme	43
3.9. İstatistiksel Değerlendirme	43
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	44
4.1. Deney Gruplarının Işık Mikroskobik Verileri	44
4.2. Deney Gruplarının Elektron Mikroskobik İncelenmesi	56
4.3. Deney Gruplarının Histometrik İncelenmesi	66
4.4. Literatür Işığında Bulguların Tartışılması	68
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Periferik sinir yapısı.....	4
2.2. Seddon ve Sunderland sınıflandırması	14
2.3. Periferik sinir onarımında kullanılan konduit tipleri	16
2.4. Periferik sinir rejenerasyonunda enjekte edilebilir hidrojel kullanım stratejileri	27
2.5. Hyaluronik asitin yapısal formülü	29
3.1. Deney gruplarının şematik gösterimi A) Sinir otograftı B) Boş silikon tüp C) Boş silikon tüp içine lityum klorür uygulaması D) Boş silikon tüp içine hyaluronik asit hidrojel uygulaması, E) Boş silikon tüp içine lityum yüklü hyaluronik asit hidrojel uygulaması	36
3.2. Hyaluronik asit hidrojelinin taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmesi (Bar: 10 µm)	38
3.3. Siyatik sinirin proksimal ve distal uçlarının silikon tüp içine yerleştirilmesi. SL, SH ve SHL gruplarında benzer uygulama yapıldıktan sonra proksimalden enjektör yardımıyla silikon tüp içerisine enjeksiyon saplanmıştır.	41
4.1. SHAM grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, Normal nöral morfoloji gösteren aksonlar (ok ile gösterilmiştir), skala bar:10µm b) 40x büyütme, Normal nöral morfoloji gösteren aksonlar (ok ile gösterilmiştir), skala bar:10µm.....	45
4.2. OSG - rejenere grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm b) 40x büyütme, skala bar:10µm	46
4.3. OSG - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) Aksonal dejenerasyon (siyah oklar) ve kan damarları (siyah yıldız) gösterilmektedir, 20x büyütme, skala bar:10µm b) Aksonal dejenerasyon (siyah oklar) ve kan damarları (siyah yıldız) gösterilmektedir,40x büyütme, skala bar:10µm	47
4.4. ST - rejenere grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) Bağ dokusu (BD), miyelinli aksonlar (siyah oklar) ve miyelinsiz aksonlar (beyaz yıldız) gösterilmektedir. 20x büyütme, skala bar: 20µm b) Miyelinli aksonlar (siyah oklar), miyelinsiz aksonlar (beyaz yıldız) ve bazı dejenerasyon bulguları (kırmızı oklar) gösterilmektedir. (40x büyütme, skala bar:10µm	48
4.5. ST - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:20µm b) 40x büyütme, skala bar:10µm	49
4.6. SL – rejenere grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm b) 40x büyütme, skala bar:10µm	50
4.7. SL - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm b) 40x büyütme, skala bar:10µm	51
4.8. SH - rejenere grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm b) 40x büyütme, skala bar:10µm	52

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9. SH - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm b) 40x büyütme, skala bar:10µm	53
4.10. SHL - rejenere grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm b) Aksonal dejenerasyon bulgusu (siyah ok başı) gösterilmiştir. 40x büyütme, skala bar:10µm	54
4.11. SHL - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) Bağ doku (BD), aksonal dejenerasyon (kırmızı ok) ve aksonal kopmalar (beyaz ok) gösterilmiştir. 20x büyütme, skala bar:10µm b) Aksonal kopmalar (beyaz ok) gösterilmiştir 40x büyütme, skala bar:10µm	55
4.12. SHAM grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Schwann hücreleri (SH) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 1 µm, B) Schwann hücreleri (SH) ve miyelinsiz aksonlar (UA) gösterilmiştir Bar: 1 µm.....	56
4.13. OSG - rejenere grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 2 µm B) Bar: 1 µm.....	57
4.14. OSG - distal grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 2 µm B) Bar: 1 µm.....	58
4.15. ST - rejenere grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 1 µm B) Bar: 500 nm.....	59
4.16. ST - distal grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 500 nm B) Aksonal çökmeler yıldız ile gösterilmiştir. Bar: 500 nm.....	60
4.17. SL - rejenere grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 1 µm B) Aksonal çökmeleri yıldız ile gösterilmiştir. Bar: 1 µm	61
4.18. SL - distal grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 1 µm B) Aksonal çökmeler yıldız ile gösterilmiştir. Bar: 1 µm	62
4.19. SH - rejenere grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 2 µm B) Bar: 1 µm ...	63
4.20. SH - distal grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 2 µm B) Bar: 2 µm.....	64
4.21. SHL - rejenere grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 500 nm B) Bar: 500 nm.....	65
4.22. SHL - distal grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 500nm B) Bar: 1 µm ..	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrad derece
µm	Mikrometre
gr	Gram
Kg	kilogram
L	Litre
M	Molar
mEq	Miliekivalan
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
Rpm	Dakikada dönüş hızı

Acıklama

Kısaltmalar

Bcl-2	B hücre lenfoma-2
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
CNTF	Siliar nörotrofik faktör
CREB	Siklik adenzin monofosfat (cAMP) cevap elementi bağlayıcı protein
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GGF	Gliyal büyüme faktörü
GSK-3B	Glikojen sentez kinaz 3 beta
HA	Hyaluronik asit
HSF-1	Isı şok transkripsiyon faktörü-1
IL-1	İnterlökin-1
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz

Acıklama

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
NFκB	Aktive olan b hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir güçlendiricisi
NGF	Sinir büyüme faktörü
NMDA	N-metil-D-aspartat
NT-3	Nörotrofin 3
p53	Tümör protein 53
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PGA	Poliglikolik asit
PI3K/Akt	Fosfoinositit 3-Kinaz/ Protein Kinaz B
PS	Periferik sinir
PSS	Periferik sinir sistemi
SH	Schwann hücre
SSS	Santral sinir sistemi
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TrkB	Tropomiyozin reseptör kinaz B
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WNT	Wingless-ilişkili bağlantı bölgesi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinirlerin travmatik yaralanması çok yaygın görülen bir durum olup, motor ya da duyu fonksiyonlarda kayıplara yol açarlar. Hasar sonrası oluşan sinir boşlukları küçükse ayrılmış sinir aksonlarının proksimal ve distal uçları tekrar birleşebilir. Çünkü merkezi sinir sisteminin aksine periferik sinir sistemi önemli bir rejenerasyon yeteneğine sahiptir. Sinir boşlukları daha büyük olduğunda ise sıklıkla cerrahi müdahale gerekir. Ancak mikrocerrahi tekniklerdeki yeniliklere rağmen, sinir onarımı sonrası fonksiyonel iyileşme nadiren görülür.

Hasarlı periferik sinirin rejenerasyonu, uygulanan mikrocerrahi prosedüre bağlıdır. Genellikle tedavi iki sinir ucunun direk bağlanması yoluyla ya da biyolojik/sentetik sinir konduitlerini içeren otograftların bu alana yerleştirilmesiyle sağlanır. Uç uca sinir onarımı sonrası en sık rastlanan sorun, bu bölgede meydana gelen skar oluşumudur. Epinöral skar oluşumu, aksonal rejenerasyon için mekanik bir bariyer oluşturur; ekstranöronal skar oluşumu da sinirin bitişik dokuya bağlanmasına yol açar. Bu da sinirin hareketini önleyerek iskemiye ve geri dönüşümsüz sinir hasarına yol açar. Skar oluşumunu azaltmak için kullanılan çeşitli farmakolojik ajanlar mevcuttur ancak klinik olarak henüz onaylanmamıştır.

Hyaluronik asit (HA) tüm canlı organizmalarda doğal olarak bulunan, mukopolisakkarit yapıda bir karbonhidrattır. Mükemmel biyolojik özellikler gösterir; biyoyumlu, biyobozunur ve immünonötraldir. Yapılan çalışmalarda, HA uygulamasının hasarlı periferik sinir rejenerasyonunu uyarabildiği; böylece göç, yapışma, damarlanma ve nöronal yayılma gibi hücre sinyal olaylarını arttırdığı rapor edilmektedir. Topikal olarak uygulanmakta ve periferik sinir onarım alanındaki fibroblast proliferasyonunu baskılayarak, skar oluşumunu azaltmaktadır. Sinir hasarı tamirinde miyelin kılıfın oluşumu, etkin bir tedavi için çok önemlidir. Miyelin gen ekspresyonunu düzenleyen çok az hücrel sinyal bilinmektedir. Wnt/ β -catenin sinyal yolağı miyelin gen ekspresyonunun direkt yönlendiricisidir. Wnt aktivasyonu glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK-3 β) enzimini inhibe eder ve β -catenin yıkılmasını önler. GSK-3 β enziminin aktivitesindeki artış proapoptotik etkilere yol açarken, inhibe olması durumunda apoptoz azalır ya da önlenir.

Lityum, GSK-3 β enziminin bir inhibitörüdür ve Wnt/ β -catenin sinyal yolağını taklit eder. Aynı zamanda da tıpta psikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklarda antiapoptotik ve nöroprotektif amaçlarla da kullanılmaktadır.

Bu araştırma, periferik sinir hasarının tedavisinde lityum yüklenmiş HA hidrojellerinin etkilerini araştırmaktadır. Verilerimiz ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerle desteklenmiştir. Çalışmada rejenerasyonu geliştirmeye yönelik, vücutta daha stabil kalabilen ve etkinliği daha uzun sürebilecek bir materyal geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu sayede hem konduitin rejenerasyon sürecinde sinir çevresini sınırlaması ve aksonun gelişmesine öncülük etmesi sağlanmaya çalışılmış; hem de biyouyumlu bir materyal kullanımı suretiyle iskelet yapısının optimize edilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Sinir Sistemi

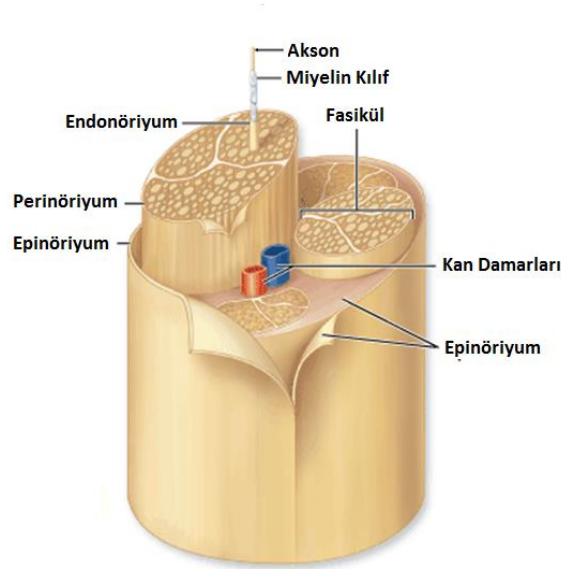
Sinir sistemi vücuttaki en kompleks sistem olup işleyiş ve etkileri eşsizdir. Bir dakika içinde farklı duyu sinirleri sayesinde milyonlarca bilgiyi vücut içinde taşır. Sinir sisteminin en önemli görevi bilgi akışını sağlayarak vücuttaki aktiviteleri kontrol etmektir. Yapısındaki bez ve kaslar efektör görevi görerek bu kontrolü sağlamada önemli görev alır.

Sinir sistemi yapısal olarak merkezi sinir sistemi (SSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki kısımda incelenir. Santral sinir sistemi beyin, omurilik, optik, koku ve işitme sinirlerini kapsarken, PSS kraniyal sinirler, duysal sinir demetleri ve spinal sinirleri içerir. Periferik sinir sistemi, SSS ile periferik hedef organlar arasında çift yönlü uyarı iletimini sağlayan, bu sayede motor, duyu ve otonomik fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir sistemdir.

2.1.1. Periferik sinir anatomisi

Periferik sinir sistemi, vücut boyunca kompleks ve organize bir ağ oluşturan periferik sinirlerden oluşur. Periferik sinirler (PS), santral sinir sistemini motor ve duysal yollar aracılığı ile hedef organlara bağlar. Santral sinir sisteminden çıkan bu sinirler oldukça özelleşmiş yapılardır ve anatomik olarak kranial ve spinal sinirlerden oluşurlar. Koku alma ve optik sinirler haricinde, nispeten basit bir histolojik yapıları vardır (Carriell vd., 2014). Periferik sinirlere yapısal olarak bakıldığında, en dışta sinir fasikülleri ve kan damarlarını gevşek fibrokollojen bir yapı ile saran epinörium; bu yapının iç kısmında aksonlardan oluşan fasikülleri saran kollojen yapıda ve fibroblast gibi hücrelerden oluşan perinörium ve en iç kısımda ise bireysel aksonlar ve aksonların Schwann hücre (SH) kılıfları ile bu yapıları saran kollojen yapıdan oluşan endonörium tabakaları bulunur (Schmidt ve Leach, 2003).

PS'ler histolojik olarak iki ana komponent içerirler: Fonksiyonel bir birim olan parenşima ve stroma. Parenşima, aksonlar ve onu çevreleyen SHleri tarafından oluşturulan sinir liflerinden meydana gelir. Stroma ise özelleşmiş bir bağ dokudan oluşur. SHleri, miyelinli sinir lifini oluşturan tek bir aksonla etkileşime girebilir ya da tek bir SHsi miyelinsiz sinir liflerini oluşturan birkaç aksonla etkileşime geçebilir. Stromada ise, bu organların bölümlere ayrılmasını düzenleyen vaskülarize bir yapı vardır. Miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin oranı ya da sinir demetlerinin sayısı organlar arasında büyük farklılıklar gösterir. Sinir lifleri, fonksiyonlarına ve kompozisyonlarına göre duysal, motor ve karma sinirler olmak üzere üçe ayrılırlar. PSS aynı zamanda somatik ve otonom sinir sistemi olmak üzere iki kısma ayrılır. Bu organların yapı ve fonksiyonları çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Ancak yapısal tahribat sonrası PSSnin, SSSne göre daha iyi bir rejenerasyon kapasitesi vardır (Geuna vd., 2009).



Şekil 2.1. Periferik sinir yapısı (Mesher, 2013)

2.1.1.1. Sinir hücresi (nöron)

Sinir sisteminin temel görevi impulsların elektrokimyasal iletimi olup sinyal oluşturma yeteneğine sahip olan temel elementler nöronlardır. Nöronlar bağımsız hücreler olup çevreden aldıkları sinyalleri birleştirir, işler ve bu mesajı diğer nöronlara iletirler. Temel çalışma prensipleri aynı olmasına rağmen boyutları, şekilleri ya da kimyasal nörotransmitterleri farklılık gösterebilir (Kandel vd., 2013).

Gangliyonlar periferik sistemdeki hücre gövdesi gruplarını oluştururken, aksonlar ise sinirler olarak bilinir. PSler genel olarak duyu ve motor nöronlardan oluşurlar. Duyu nöronları somatosensöri sistemden bilgi alırlar. Motor nöronlar ise sinyalleri kas, bez ya da iç organlar gibi efektör organlara gönderirler. (Kandel vd., 2013)

Bir nöronun dört morfolojik bölgesi vardır:

- 1- Hücre gövdesi
- 2- Dendritler
- 3- Akson
- 4- Terminal son uç

Nöronlar elektriksel iletimde özelleşecek şekilde dallanmışlardır. Bu dallanma başlıca hücre gövdesinden çıkan dendritlerle sağlanır. Yüksek oranda ve ribozom ve spesifik hücre iskeleti proteini içeren dendritler çevreden ya da diğer nöronlardan gelen mesajları alır ve birleştirirler. Bu fonksiyon dendritleri sinaptik giriş için primer bir hedef yapar. Nöronların bazıları ise dendrit içermez. Bir dendritin bulunuşu nöronun gelen mesajı alma yeteneğini belirler. Alınan mesajlar nöronal hücreden bir genişleme yoluyla aksonun başlangıç noktasında birleştirilir ve sinyal iletimi için özelleşir. Aksonların boyutu nöronun tipi ve boyutuna bağlı olarak birkaç yüz mikrometreye ulaşabilir. Ayrıca akson eşsiz bir hücre iskeleti yapısına sahiptir.

SSSde insan beyinindeki aksonların bazıları birkaç milimetre genişlikte akson içerebilirken bazıları hiç akson içermez (Augustin vd., 2004). PSSdeki sinir yapısı SSSden farklı olarak sinir lifi demetleri içerir. Bu lifler bağ doku ile çevrilidir.

Siniri dıştan fibröz bir kılıf ile saran, kollajen tip 1 ve tip 3, fibroblastlar ve yağ dokusundan oluşan yapı epinörium olarak adlandırılır. PSin kalınlığı ile doğru orantılı olarak epinöriumun kalınlığında da artış meydana gelir. Epinöriumun içinde yer alan hücresel, vasküler ve lenfatik yapılar sinirin travmaya olan cevabını etkiler. PSden kesit alındığında, epinöriumun kalınlığı, sinir tipi ve bireyler arasında farklılık gösterir (Akbay, 2005). Fasikülleri ekstremitte hareketleri sırasında travmalardan korumak epinöriumun görevidir (Maggi vd., 2003; Danyemez ve Seçer, 2010).

Epinöryumun iç kısmında aksonlardan oluşan fasikülleri saran kollojen yapıda ve fibroblast gibi hücrelerden oluşan perinöryum ve en iç kısımda ise bireysel aksonlar ve aksonların SH kılıfları ile bu yapıları saran kollojen yapıdan oluşan endonöryum tabakaları bulunur (Schmidt ve Leach, 2003).

PSS ve SSS aksonlarca iletilen nöral impulsları işler. Bu aksonların çoğu miyelin olarak adlandırılan bir yapı ile çevrilmiştir ve her nöronun etrafında bir izolasyon sağlarlar. Spinal sinirler çok spesifik yapıdaki spinal kordun her iki tarafından çıkarılır. Bunlar dorsal ve ventral boynuzları oluşturur (Schmidt ve Leach, 2003).

Nöronlar fonksiyonel olarak ise üçe ayrılır.

- 1- Duyu nöronları
- 2- Motor Nöronları
- 3- Aracı nöronlar

Duyu nöronları aferent nöronlar olarak geçer ve mesajları duyu reseptörlerinden santral sinir sistemine bırakırlar. Spinal kordun arkası dorsal bölümdür ve yapının şişkin kısmı da ventral parça olarak bilinir. Ventral bölgenin görevi sinyalleri efferent fonksiyon yapan kaslara ve bezlere göndermektir (Rhoades ve Bell, 2009). Yani bilgi santral sinir sisteminden uzaklara gider. Ventral bölgenin fonksiyonu 'motor'dur. İskelet sisteminin hareketinden sorumludur. Dorsal bölge ise bilgiyi SSSne doğru taşır ve fonksiyonu aferent olarak tanımlanır. Duyu bilgisi aferent bölge ile sağlanır ve bu bilgi iç organ bez ve kaslara iletilir.

2.1.1.2. Schwann hücreleri ve myelin kılıf

Periferik sinir sisteminin destekleyicisi rolüne sahip olan (Mesher, 2013; Frostick vd., 1998; Mirajullah ve Xinya, 2002; Ross ve Pawlina, 2006) ve nöral krestten gelişen SHnin en önemli fonksiyonu miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerini desteklemektir. SHleri ekstrasellüler matriks proteinlerini salgılayarak çevre düzenini sağlarlar. Bu salgılar ince bazal lamina tabakasını oluştururlar. SHleri ve bazal lamina birlikte Büngner bandı olarak adlandırılır ve rejenere olan aksonlar için nörotropik destek ve fiziksel rehber oluşturur (Bain vd., 1989). Bunun yanı sıra SHleri PSSndeki yıkıntıları temizler ve

yaralanma ya da kesilme sonrası aksonların yeniden büyümesini sağlarlar. (Frostick vd., 1998; Mirajullah ve Xinya, 2002; Burnett ve Zager, 2004; Kazuho ve Masaru, 2002; Anselin vd., 1998; Makwana ve Raivich, 2005) Miyelin kılıf, PSSnde akson boyunca art arda dizilen SHleri tarafından meydana getirilir ve bu nedenle segmental bir görünüme sahiptir. (Meshher, 2013; Ross ve Pawlina, 2006)

Myelin, SSSde oligodendrositler, PSSde ise SHleri tarafından yapılır. Miyelinli liflerde her akson tek bir SH tarafından sarılırken, miyelinsiz liflerde bir SH birden fazla aksonu çevreleyebilmektedir. SHlerinden üretilen ve temel olarak ekstraselüler matriks proteinlerinden (kollojen tip IV ve laminin) oluşan bir bazal membran sinir lifini çevrelemektedir ve bu yapının rejenerasyon için önemi büyüktür (Dahlin, 2004). SHleri, iyon dengesinin sağlanmasına, nörotransmitterlerin dağılımına ve aksolomma boyunca sodyum kanallarının yerleşimine katkıda bulunan, nöroektodermal kökenli, PSSnin uydu hücreleridir ve akson çevresinde konsantrik karakterde fosfolipid bir tabaka olan miyelin kılıfını sentezlerler (Jessen ve Mirsky, 2005; Jahn vd, 2009; McCarthy vd., 1990). SHleri akson etrafında ekstrasellüler matriks ve diğer hücreler arasında iletişim sağlamak için Tip IV ve Tip V kollajen, entaktin, heparin sülfat, proteoglikan ve fibronektin salgılamaktadır. Ancak SHleri miyelin kılıf üretebilmesi için içeriden akson ile dışarıdan ise ekstrasellüler matriksle ilişkide bulunması gerekmektedir (Bain vd.,1989).

Miyelin yapısı hücre zar yapısına benzemekle beraber, %75 lipid ve %25 protein içermesiyle farklılık gösterir. Lipidlerin %20 ila %30'unu oluşturan kolesterol, multilamellar yapının stabilizasyonunu sağlar. Proteinler ise glikoprotein yapısında olup; başlıcaları protein sıfır, periferik miyelin protein 22 kDa, miyelin ilişkili glikoprotein, epitelyal kadherin ve periaksindir (Jessen ve Mirsky, 2005; Jahn vd, 2009). Memelilerde dorsal spinal köklerin ve kutanöz sinirlerin yaklaşık %75'i, kasa giden liflerin %50'si ve postganglionik otonomik liflerin tamamına yakını miyelinsizdir (Maggi vd., 2003).

Bir sinirin miyelinli olması ve miyelin kalınlığı iletim hızını etkiler. Miyelinsiz liflerde çap 0.2–1.5 µm ve iletim hızı 0.4–2.0 m/sn (metre/saniye) iken; kalın miyelinli sinirlerde çap 12–20 µm ve iletim 72–120 m/sn gibi yüksek hızlardadır. Sinir lifleri iletim hızları ve çaplarına göre 3 gruba ayrılır:

A grubu lifler: Çapları 2.5–22 μm , miyelinli somatik afferent ve efferent liflerdir, ileti hızları 15–100 m/sn arasındadır.

B grubu lifler: Çapları 3 μm , miyelinli otonomik preganglionik liflerdir, ileti hızları 3–15 m/sn kadardır.

C grubu lifler: Çapları 0.2–1.5 μm , en ince çaplı ve en yavaş iletim sağlayan liflerdir. Miyelinsiz somatik ve visseral afferent lifler ile postganglionik liflerdir, ileti hızları 0.3–1.6 m/sn kadardır (Okutan ve Solaroğlu, 2010).

2.2. Periferik Sinir Yaralanmaları

PSler termal, kimyasal, mekanik nedenlerle hasar görebilir. Bu organların büyük ve uzayan yapıda olmaları onları travmatik yaralanmalara karşı çok hassas bir hale getirmektedir. En sık yaralanma nedeni travmadır. Motorlu araç kazaları, özellikle de motosiklet kazaları, ateşli silah yaralanmaları, kesici delici alet yaralanmaları etyolojik faktörler arasındadır. PSS yaralanmalarının insidansı oldukça yüksektir ve genellikle bu hastalarda önemli fiziksel ve fizyolojik sonuçlara yol açar (Dahlin, 2008). Hasar sonrası hastanın aktivitelerinde azalmaya, iş gücü ve ekonomik kayıplara neden olurlar.

Periferik sinir içerisindeki tüm sinir lifleri aynı derecede yaralanmaya uğrayabileceği gibi yaralanmanın şiddetine ya da tipine göre aynı sinir içerisindeki farklı lifler farklı derecede yaralanmaya da uğrayabilir. Periferik sinir tamiri sonucu iyileşmenin zamanı ve başarısı yaralanmanın derecesine bağlıdır. Klinik olarak kullanılabilir hasar derecelendirme sistemi sinir yaralanması sonrası sinirde gelişen mikroskopik değişiklikler ve hastanın kliniği ile ilişkilidir.

Klinik uygulamalarda karşılaşılan temel yaralanma şekilleri aşağıda verilmiştir:

1. Gerilmeye bağlı yaralanmalar: En sık karşılaşılan yaralanma tipidir. Elastik yapıda olan periferik sinirlerin gerilme kuvveti sinirin gerilme kapasitesinin üzerinde olursa yaralanma oluşur. Çoğunlukla sinirin devamlılığı koruduğu bu tip yaralanmalarda sadece sinir lezyonu olabildiği gibi, sinirin kemiğe çok yakın olduğu yerlerde ekstremitte kırıkları ile birlikte görülebilir (Robinson, 2000; Winograd ve Mackinnon, 2006; Belkas vd., 2005).

2. Bıçak ve benzeri kesici cisimlerle olan sinir yaralanması: Bu yaralanma sinirin tam kesilmesine neden olabileceği gibi, çoğunlukla bir miktar sinir dokusu devamlılığını korumaktadır. Uygulama kolaylığından dolayı birçok hayvan modelinde bu tip periferik sinir yaralanması modeli çalışılmış; sinir dejenerasyon ve rejenerasyonu bu tip yaralanmalarda incelenmiştir. (Belkas vd., 2005; Burnett ve Zager, 2004)

3. Kompresyon yaralanmaları: Bu grup yaralanmalar, sinirde ayrılma ve kopmanın olmadığı ancak sinirde sıkışmanın olduğu durumlardır. Motor ve duyu fonksiyonlarında tam kayıplar olabilir (Lewis vd., 1931).

Yaralanma şekli ne olursa olsun, oluşan sinir hasarının onarımı ve fonksiyonların tam geri kazanımı cerrahi bir problem olmaya devam etmektedir. Travmanın şeklinin yanı sıra, sinir içyapısında oluşan hasar derecesi de elde edilecek iyileşme düzeyi ile yakın ilişkilidir (Mathes, 2006 ; Burnett ve Zager, 2004). Erken dönemde müdahale yapıldığında başarı ihtimali daha yüksektir (Sunderland, 1991; Bowden ve Gutmann, 1944)

Proliferasyon yaralanmanın 2 -3. gününde maksimum seviyeye ulaşır. Makrofajlar demyelinize segmentleri fagosite etmenin yanında aksonun üzerinde ilerleyeceği substratı oluşturur (Richardson ve Jessen, 2001). Myelin parçalarını fagosite eden makrofajların sayısı hasarın birinci haftasında maksimum seviyeye ulaşır ve büyük çoğunluğu bölgeye sistemik dolaşımdan gelir.

Lenfositler hasarlı bölgeye en son ulaşan bağışıklık sistemi hücreleridir. Üçüncü günden itibaren hasarlı bölgede görülmeye başlarlar ve başlıca görevi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler salgılayarak makrofaj fonksiyonunu düzenlemektir (London vd., 1998).

İnflamasyon sinir iyileşmesi için hayattır. Wallerian dejenerasyonun başlıca hücreleri SHleri ve makrofajlardır. Fagositozis ve büyüme faktörlerinin salınımı, distal güdüğün aksonal rejenerasyonu süresinde devam eder. Aksonal rejenerasyon süresince SHleri diğer sinirlerin bazal lamina tüplerine Büngner bantlarını üreterek bağlanırlar (Napoli vd., 2012).

2.2.1. Dejenerasyon ve rejenerasyon

Periferik sinir yaralanması sonrasında aksonda hem proksimal hem de distal yönde dejenerasyon gelişir. Bu değişiklikler hücre proliferasyonundan ziyade tek bir sinir kompleksinin yapısını ve iletim işlevini korumak amaçlıdır (Burnett ve Zager, 2004). Aksonal yaralanmada nükleus perifere yerleşir ve sitoplazma yapısında değişimler fark edilir. Hücrenin kendisi, çekirdek ve çekirdekçik büyür. Nissl cisimcikleri hücrenin periferine göç eder ve endoplazmik retikulum yapısı bozulur. Bu olaylar zincirine kromatolizis denir. Daha sonra hasarlı aksonun tamiri için gerekli nörotransmitterler salgılanır. Bu süreçte RNA, protein komponentleri, lipidler, glikoz 6-fosfat dehidrojenaz ve hidrolitik enzimler artar (Ducker vd., 1969; Lieberman, 1971).

Yaralanma sonrası distal uçta meydana gelen değişikliklere Wallerian dejenerasyon adı verilir ve yaralanma distalinde kalan aksonun tamamını etkiler. Aksonal dejenerasyon miyelin yıkımı ve destek glial hücre proliferasyonundan oluşan bir süreçtir. Önce akson ve ardından çevresindeki myelin kılıf dejenere olur. SHleri Wallerian dejenerasyonda kilit rol oynar. Yaralanmadan sonraki 24 saat içerisinde aktive olurlar. Nükleus ve sitoplazmalarında genişleme mitoz hızlarında artış olur. SHlerinin ilk baştaki rolü dejenere akson ve myelinlerin temizlenmesi ve bunların makrofajlara geçişlerine yardım etmektir. Wallerian dejenerasyonda ilk olarak oluşan histopatolojik değişiklik, yaralanmadan sonraki saatler içinde oluşan aksonlarda ve myelinlerdeki fiziksel parçalanmadır. Yapısal olarak tüm nörotübülüs ve nöroflamanlarda düzensizlik oluşur ve aksonların kenarları genişlemiş kabarcıklar gibi düzensiz bir hal alır. Yaralanmadan 48 ile 96 saat sonra aksonal devamlılık kaybolur ve impulsa iletiminin devamı olanaksız hale gelir. Bundan sonra inflamatuvar araçların rol aldığı karmaşık bir moleküler haberleşme mekanizması dejenerasyonun tamamlanmasını ve sonunda gelişecek rejenerasyonu düzenler (Karanth vd., 2006; Stoll vd., 2002)

Yapılan çalışmalar yaralanma sonrası hücrelerin yaşamını sürdürmesinde SHlerinin önemli rol oynadığını göstermektedir. SHleri yaralanma bölgesinin yanında proksimal segment boyunca azalır, aksonlar ve myelin kılıfların çapı görülebilecek düzeyde küçülür. Rejenerasyon döneminde aksonal çapta artış olur ancak hiçbir zaman

hasarlanmadan önceki boyutlarına erişmez (Demircan ve Zileli, 2008; Richardson vd., 1980).

Ekstraselüler matrikste bulunan nöron kaynaklı mitojenler farklılaşır ve sayıca artar. SHleri sıra halinde dizilirler ve etraflarını bazal lamina sarar, bu yapıya endonöral tüp veya Büngner bantları adı verilir. Wallerian dejenerasyon sırasında iki ana protein salgılanır: Sinir büyüme faktörü (NGF) ve Laminin. Kesiden sonra mRNA düzeyinde belirgin artma olur. Makrofaj tarafından salınan interlökin-1 (IL-1), NGF sentezini uyarır. NGF reseptör kontrolü SHlerinde aksonal kontakt ile sağlanmakta kontakt olmazsa sayıda artış, kontak kurulursa sayıda azalma görülmektedir (Vajero vd., 2001). Bu iletişim büyüme konisini harekete geçirir ve hücre gövdesine yönlendirmesini sağlar. Böylece rejenerasyon için ilk adım atılmış olur. İn vitro çalışmalarda NGF'nün tersine büyüyen bir aksonu kendi yönüne çevirebildiği gösterilmiştir. Ayrıca distal uçta bulunan SHlerinin NGF salgıladığı ve bu maddenin de nörotropik etkisi olduğu gösterilmiştir.

IL-1 ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) inflamatuvar sürecin başlamasında ve devam etmesinde, myelin debrisin ortadan kaldırılmasında merkezi bir rol oynamaktadır. (Pineau ve Lacroix, 2007; Stubgen, 2008; Siebert ve Bruck, 2003; Leskovaar vd., 2000)

Sonuç olarak, proksimal sinir ucunun rejenerasyon sırasında distal uçtan salınan nöronotrofik faktörler tarafından uyarıldığı, desteklendiği ve yönlendirildiği anlaşılmaktadır.

2.2.1.1. Proksimal uç dejenerasyonu

Yirmi dört saatlik bir durağan dönem sonrası, proksimal kesik uçta terminal ve kollateral aksonal tomurcuklanmalar meydana gelir. Anterograd ilerleyen bu büyümede, kollateral tomurcuklar aksonun sağlam olduğu Ranvier düğümlerinden köken alırken, terminal tomurcuklar zedelene aksonun proksimal ucundan çıkar. Kalıcı tomurcuklar, genelde ilk yirmi dört saatin sonunda belirmeye başlarlar. Bu şekilde uzanan her bir tomurcuğa 'rejenerasyon ünitesi' denir. Her bir tomurcuğun ucundaki kısma ise 'büyüme konisi' denir (McCarthy vd., 1990; Mathes, 2006). Büyüme konisi, düz endoplazmik retikulum, mikrotübül, mikrofilaman, mitokondri, lizozom ve diğer veziküler yapılardan zengindir. Aktin filamanları ve myozin içerir.

Distal sinir segmentindeki SH kolonları (Büngner bantları) ve SH bazal laminaları, büyüme konisinin ilerlemesi için uygun ortam sağlarlar. Büyüme konisinin, SH bazal laminasında bulunan fibronektin ve laminine affinitesi vardır ve aksonal tomurcukların büyüme yönünü belirleyen faktörlerden biri de bu affinitedir (McCarthy vd., 1990; Lundborg, 1987). Aksonal tomurcukların sayısı zamanla azalır, bazıları distal segment ile bağlantı yaparken; diğerleri regrese olur. Bağlantıyı yapabilenler mature olurlar. Uç organlardan salgılanan trofik maddeler bu yönelmeyi düzenlerler (Mathes, 2006).

2.2.1.2. Distal uç dejenerasyonu (Wallerian dejenerasyon)

Distal sinir segmentinde akson ve myelin kılıfta meydana gelen hücresel dejeneratif değişikliklere ‘Wallerian dejenerasyon’ denir. Wallerian dejenerasyon ile akson ve myelin kökenli maddelerin temizlenmesi sağlanırken, rejenere olan aksonun büyümesi için uygun ortam oluşturulur. Prolifere ve diferansiye olan pluripotent SH, bazal lamina boyunca dizilerek Büngner bantlarını oluştururlar. Ortada oluşan içi boş tüp yapısına endonöral tüp denir (Burnett ve Zager, 2004, Eppley vd., 2004).

Aksoplazmada nörofilaman yıkımı, kalsiyum ile aktive olan proteolitik enzimlerle meydana gelir. Myelin, SHleri ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. SH proliferasyonunun üçüncü günde en yüksek değerlere ulaştığı ve hasar sonrası ikinci haftanın sonuna dek azalarak devam ettiği gösterilmiştir (Mathes, 2006). Endonöral tüpler, hasarlanma sonrası ilk 3 ay içinde orijinal çaplarının %10-20’si kadar bir oranda daralır (Winograd ve Mackinnon, 2006). Tomurcuklar proksimal sinir güdüğünden distale doğru ilerlerler. Bu hareketlenme sinir iyileşmesinin başarısını etkileyen en önemli olaydır. Tomurcuklar Büngner bantlarını takip ederek, periferik doğru uzanıp hedeflerini bulurlar. Başlangıçta proksimal segmentteki tomurcuklanan akson sayısı, distal segmentteki mevcut akson sayısından daha fazladır, ancak zaman içerisinde periferik bağlantıyı yapamayan tomurcuklar dejenere olur ve akson sayıları eşitlenir (Mathes, 2006; Winograd ve Mackinnon, 2006).

Hayvan deneylerinde distal segmentin rejenerasyon hızının nörotomezis tipi yaralanma sonrası 2.0–3.5 mm/gün, aksonomezis tipi yaralanma sonrası 3.0–4.5 mm/gün

olduğu saptanmıştır. İnsanlarda ise ortalama aksonal rejenerasyon hızı günde 1–2 mm'dir (Mathes, 2006). Proksimalden distale doğru ilerledikçe rejenerasyon hızı azalmaktadır.

2.2.2. Seddon ve Sunderland sınıflaması

Seddon ve/veya Sunderland periferik sinir hasarlarını oluşturdukları yapısal hasar ya da fonksiyon kaybına gore beş sınıfta derecelendirmişlerdir (Barton vd., 2014).

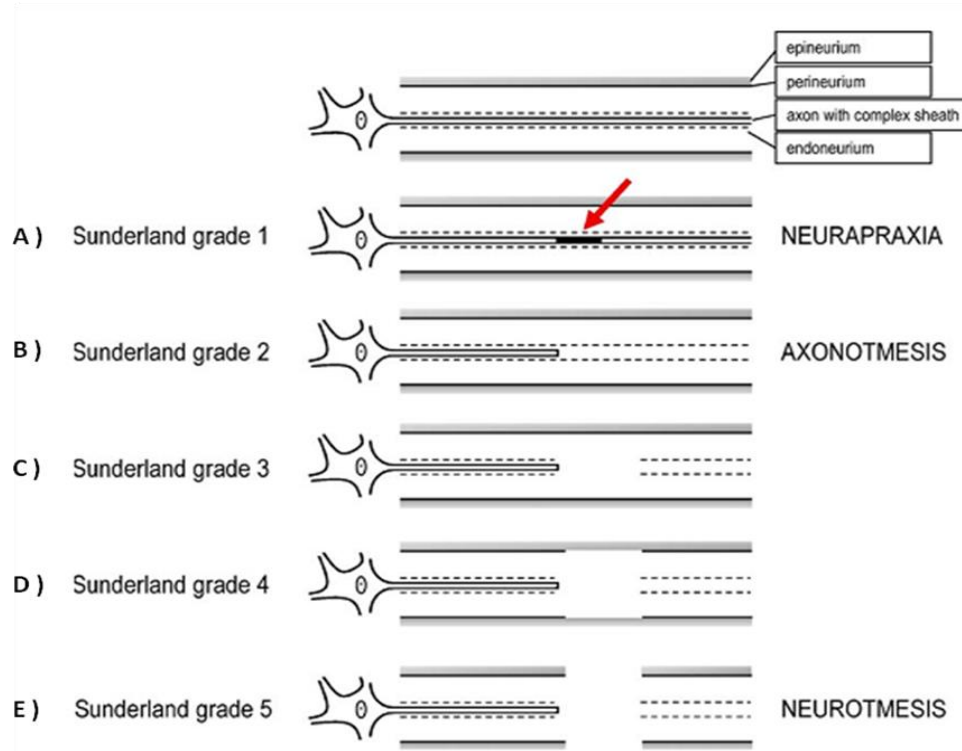
a) **Birinci derece hasar:** Geçici iletim engeli oluşur. Wallerian dejenerasyonu yoktur ve intranoral yapılar korunmuştur.

b) **İkinci derece hasar:** Aksonal harabiyet vardır ancak SHleri, endonoriyum, perinoriyum ve epinoriyum yapısal butunlugunu korur. Lezyonun distalinde Wallerian dejenerasyonu olabilir ve iletim hızı etkilenmiştir.

c) **Üçüncü derece hasar:** Endonoriyumun yapısal butunlugu kaybolmuş; epinoriyum ve perinoriyum sağlamdır. Muhtemel fibroz yapı ile birlikte Wallerian ya da retrograde degenerasyon olabilir. Genellikle sıkışmaya bağlı yaralanmalardır.

d) **Dorduncü derece hasar:** Yalnızca epinoriyumun yapısal butunlugu tamdır ve kalan tum intranoral yapılar hasarlıdır. Genellikle kut transeksiyon yaralanmaları sonucu oluşur.

e) **Beşinci derece hasar:** Yaralanma sonucu oluşan tam sinir kesilmesi durumudur (Barton vd., 2014; Deumens vd., 2010a). şekil 2.2'de bu sınıflandırma şematize edilmiştir.



Şekil 2.2. Seddon ve Sunderland sınıflandırması (Deumens vd., 2010b)

2.3. Periferik Sinir Yaralanmalarındaki Klinik Yaklaşımlar

Periferik sinir yaralanmalarında tedavi genel olarak iki şekilde uygulanır :

- 1) Hasarlı sinir uçlarının direkt ucuca eklenmesi
- 2) Otolog bir sinir greftinin kullanılması

İki sinir ucunun dikilmesi sinirdeki küçük defektlerin ya da boşlukların onarımını sağlar. Ancak daha uzun sinir boşluklarında bu uygulama yeterli olmamakta ve vücudun başka bir bölgesinden alınana otolog sinir grefti yaralı bölgeyi bağlama da kullanılır. Ancak bu yöntemin donör bölgesindeki fonksiyon kaybı ve çoklu cerrahi müdahalelere ihtiyacı olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Schmidt ve Leach 2003).

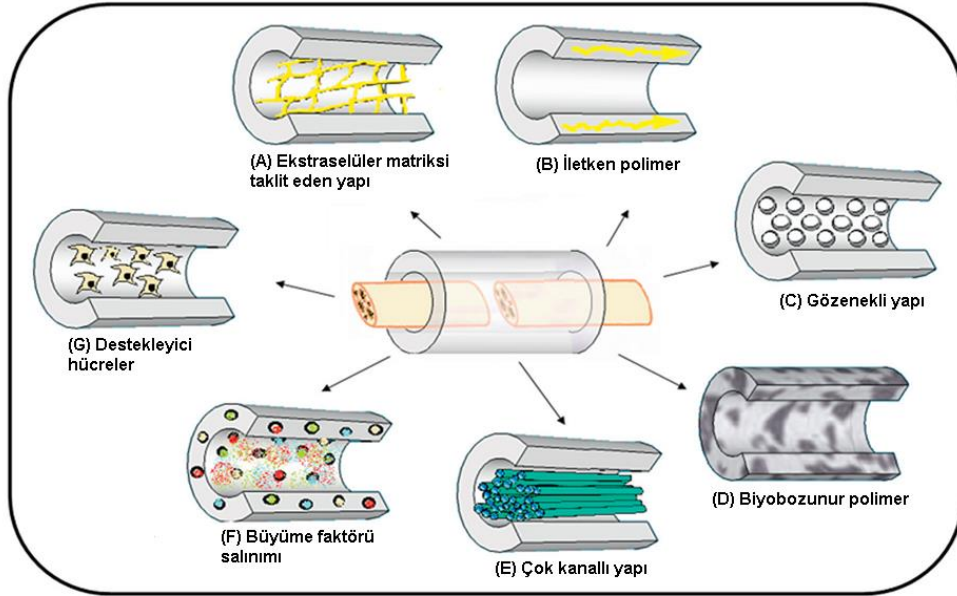
Periferik sinir sistemi yaralanmalarında günümüzdeki yaklaşım, hastadan dokunun alınması ve cerrahiye elimine eden otolog sinir greftine bir alternatif bulmaktır. Ayrıca otolog sinir grefti kullanılarak tedavi edilen sinir yaralanmalarında fonksiyonel iyileşme sadece %80'lerde kalmaktadır. Bu yüzden sinir greftine alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine odaklanılmaktadır.

Periferik sinir onarımında altın standart olarak kabul edilen uygulamada hasarlı bölgeye otograflar yerleştirilir. Uygun koşullarda motor sinirlerdeki rejenerasyon oranı %80, karma sinirlerde ise %50-60 civarındadır. Yaş, sinirin çapı ve uzunluğu, kullanılan materyal ve teknik de iyileşme oranlarını etkileyen faktörlerdendir (Kim vd., 2008; Lin ve Marra, 2012). Ducic vd. (2012) daha önceki çalışmalarına dayanarak periferik sinir rekonstrüksiyonu için bir algoritma geliştirmişlerdir. Bu yaklaşım ile özellikle hasarın boyutu ve yapılandırılmış sinirin fonksiyonel önemine göre uygulanacak tedavi seçeneklerini şematize etmişlerdir. Buna göre:

- Sinir hasarı sırasında oluşan boşluk 0–5 mm arasında ise mikrosütur ya da doku yapıştırıcıları ile primer tedavi uygulanması
- 5–15 mm arası sinir kesilerinde konduit kullanılması
- 1–5 cm arasındaki sinir kesilerinde allograft kullanılması
- 5 cm'den büyük yaralanmalarda ise otograflar kullanımının uygun olduğunu belirtmişlerdir (Ducic vd., 2012).

Günümüzde altın standart olarak kabul edilen otograflar uygulamasını takiben bile hastaların çok az bir kısmı fonksiyonlarını geri kazanabilmektedir. Bu yüzden pek çok araştırmacı çalışmalarını sentetik ya da biyolojik materyallerin ya da sinir konduitleri gibi hücresel olmayan graft materyallerinin kullanımı üzerine yoğunlaştırmaktadırlar (Kim vd., 2008; Lin ve Marra, 2012).

Kullanılacak sinir konduitleri akson rejenerasyonu için bir iskele görevi görmeli, uygulanan materyal biyouyumlu olmalı, inflamasyonu uyarıcı bir etki yapmamalı ve aksonal uzamayı uyarmalıdır. Silikon, bu amaçla kullanılan ilk sentetik konduitlerden biridir ve çalışmalarda anlamlı fonksiyonel iyileşmeler göstermiştir. Sahip olduğu mekanik özellikler sayesinde hareket süresince bozulmaz ve esnek kalabilir (Huseyinoglu vd., 2012). Yapay sinir konduitleri tek başına kullanıldığında, hücreler ve gelişim faktörleri arasındaki etkileşimi sağlayamaz. Bu yüzden fonksiyonel iyileşmeye ulaşmak çok zordur. Bu yüzden özellikle uzun boşlukların onarımında otografların etkisini arttırmak için, sinir konduitinin içerisine kanallar eklenebilir, kollajen vb. lifler yerleştirilebilir ya da hidrojel gibi yumuşak bir materyal ile tüp içinin doldurulması sağlanabilir (Biazar vd., 2010; Nie vd., 2014). Son yıllarda geliştirilen konduit tipleri Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Periferik sinir onarımında kullanılan konduit tipleri (Segadathi vd., 2014)

Periferik sinir hasarında Seddon sınıflandırmasında belirtilen nörotmezis tipi yaralanmalarda ve Sunderland sınıflandırmasında belirtilen üçüncü, dördüncü ve beşinci derece yaralanmalarda cerrahi tedavi uygulanabilmektedir.

Cerrahi tedavide zamanlama büyük önem taşımaktadır. Yaralanma sonrası ilk 72 saat içinde yapılan sinir onarımı akut tedavidir. Bu tedavi şeklinde hasarlanma en az düzeyde olduğu için başarı oranı da daha yüksektir. Periferik sinir hasarında myelin yenilenmesi 8-12 haftalık süreçte tamamlanır. Bu süreç içerisinde düzelme olmaması akson hasarına işaret etmektedir. Akson hasarı sonucu oluşan denervasyon nedeniyle kas atrofisi gelişmesi ise 12-18 aylık bir süreçte olmaktadır (Campell, 2008).

Periferik sinir hasarında uygulanan tipik tedavi yöntemi, boşlukların ucuca getirilerek birleştirilmesi ya da kapatılamayacak kadar büyük hasarlarda sinir otograftı veya greftleme ile boşluğun kapatılmasıdır. (Archibald vd., 1995; Lundborg vd., 1997; Niu vd., 2014; Daly vd., 2012; Deumens vd., 2010b). Sinir onarımında amaç proksimalde bulunan sinir liflerinin başarılı bir şekilde distale doğru rejenerasyonunu sağlamak ve dikiş hattında en az sinir lifi kaybını sağlamaktır. Sinir fasiküllerinin devamlılığının sağlanması bu yapıların birbirlerine doğru konumlarda karşılıklı getirilmesiyle mümkün olacaktır (Matsuyama vd., 2000; Raimondo vd., 2011). Yaralanma sonrası etkilenen sinir liflerinde

retraksiyon görüleceğinden onarım ne kadar geç yapılırsa iyileşme de o kadar güçleşmektedir.

2.3.1. Primer onarım

Bu teknikte bütünlüğü bozulmuş olan sinir uçlarının ortaya konulması ve yaklaştırılarak onarılması söz konusudur. Primer onarım için yaranın taze, temiz ve düzgün olması önemlidir. Genelde kesici alet yaralanmaları sonucu oluşan sinir hasarından hemen sonra ilk 72 saat içerisinde yapılmaktadır (Campbell, 2008).

Primer onarım epinöral onarım, grup fasiküler onarım ve fasiküler onarım olarak üçe ayrılmaktadır.

2.3.1.1. Epinöral onarım (nörorafi)

Sıklıkla kullanılan bir onarım tekniğidir. Dikiş proksimal ve distal uçlardaki epinöryumdan geçer ve gerginlik oluşturmadan sinir uçlarının anatomik olarak uygun pozisyonda olmaları prensibine dayanmaktadır (Matsuyama vd., 2000). Sinir uçlarının karşı karşıya gelmesini sağlamak için uzunlamasına seyreden kan damarları kılavuz olarak kullanılabilir. Dikiş sayısı sinir uçlarını yakınlaştıracak ve gerginlik yaratmayacak şekilde, mümkün olan en az sayıda olmalı ve fasiküller dikiş aralarından çıkmamalıdır.(Wilgis, 1982) Sütürün perinöryuma geçmemesine oldukça dikkat edilmelidir (Aksoy, 2005). Epinöral onarımın basit ve kısa sürmesi en önemli avantajıdır. Ayrıca fasikül yapılarına zarar verilmez ve sinir içerisinde skar oluşumuna neden olabilecek dikiş materyali bulunmaz. (Aston vd., 1997)

2.3.1.2. Grup fasiküler onarım

En iyi eşleşmeyi sağlamak için proksimal ve distal sinir uçlarındaki fasiküllerin birbirine dikilmesi tekniğidir (Bora, 1967). Bu onarım şeklinde fasiküller tek tek ya da grup halinde dikilirler. Epinöral onarım tekniğine kıyasla daha pratik ve daha uygun eşleşme sağlayan bir yöntemdir. (Berg, 1984; Aksoy, 2005). Bu yöntemin en önemli

avantajı anatomik olarak fasiküllerin karşılıklı gelmesinin daha iyi olmasıdır (Matsuyama vd., 2000).

2.3.1.3. Fasiküler onarım

Proksimal ve distal sinir uçlarındaki eş fasiküllerin birbirlerine dikilmesiyle en uygun eşleşmeyi sağlamayı amaçlayan tekniktir. Fasikülleri ortaya çıkarmak için bir miktar fasiküller arası epinöryum dokusunun proksimal ve distale doğru disekte edilmesi gerekir. Her fasikülün birkaç dikiş ile birbirine tutturulması genellikle yeterli olmaktadır. Bu sayede fasiküllerin hatalı yönelmesi engellenmektedir. Fasiküler onarımın avantajı yalnızca hasarlı fasiküllerin onarımına imkan vermesidir. Ayrıca fasiküllerin karşılıklı olarak dikilmesi en iyi yönelime ve iyileşmeye neden olmaktadır. Tekniğin en önemli dezavantajları ise sinir içerisine konulan dikiş materyalinin oluşturabileceği yabancı cisim reaksiyonu ile ek diseksiyonlar sonucu oluşabilecek fibrozis riskidir. (Vekris ve Soucasos, 2006; Abreu, 1997)

2.3.1.4. Otolog sinir grefti ile onarım

Anatomik ve fonksiyonel devamlılığını yitirmiş ve sinir uçlarının cerrahi olarak birleştirilemeyeceği durumlarda greft kullanılır. Greftin uzunluğu ve çapı sonucu etkiler; çapı 5 mm'den daha büyük olan greftlerin orta kısımlarındaki damar gelişimi yetersiz olacağından santral nekroz gelişebilir. İdeal greft çapı 2-3 mm'dir (Schmidt ve Leach 2003).

Sinir greftleri distal sinir ucu gibi davranır. Bir süre sonra sinir greftinde Wallerian dejenerasyon olur, geriye aksonal rejenerasyon için gerekli bağ dokusu iskeleti kalır. Greft içerisindeki aksonlar dejenere olur ancak SHlerinin bazı greftlerde yaşayabildiği gösterilmiştir. SHleri aksonal rejenerasyon için gerekli sitokinleri salgırlar (Schmidt ve Leach, 2003; Kehoe vd., 2012; Milessi, 2000)

2.3.1.5. Diğer otolog dokuların kullanımı

Periferik sinir yaralanmalarında primer onarımın mümkün olmadığı durumlarda otogreft kullanımı ilk tercih edilen yöntemdir. Sinir otogrefti vücudun bir parçasında mevcut olan sinirin başka bir yere taşınması ile yapılmaktadır (Battiston vd., 2007). Tipik olarak kutanöz sinirlerden türevlenirler ve 40 cm'ye kadar uzunlukta ve 2-3 cm çapındadırlar. Günümüze kadar venler, arterler, kaslar ve tendonlar otogreft olarak kullanılmıştır. Bugün artık bu amaçla otolog sinir greftleri kullanılmaktadır ve greft kullanmayı gerektiren sinir onarımlarında otolog sinir greftleri altın standart olarak değerlendirilmektedir. Doğal materyaller olan bu greftler yapay materyallere göre daha biyouyumlu ve daha az toksik olup hücre adezyonu ve göçünü uyaran yapısal bir destek sağlarlar (Battiston vd., 2007; Barcelos vd., 2003; Strauch vd., 1996; Hall,1997)

2.3.1.6. Nonotolog Doku ve Aselüler Greftler

Otolog dokuların kullanımındaki sınırlamalar sonucunda, nonotolog doku ve ekstrasellüler matriks bazlı materyaller önem kazanmıştır. Allojenik ve ksenojenik dokular bu gruptadır ve daha büyük olmaları bir avantajdır. Ancak hastalık geçişi gibi bir riske de sahiptirler.

2.3.1.7. Sentetik greftler

Sentetik materyaller sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı dikkat çekmektedirler. Porozite, degradasyon oranı ve mekanik dayanıklılık gibi bu özellikler belirli uygulamalar için optimize edilebilirler. Ancak vücudun inflamatuvar cevabı bir materyalden diğerine önemli ölçüde değişebildiğinden sentetik materyallerin biyouyumluluğu konusunda güçlükler yaşanmaktadır. Ayrıca vücut immün sistemi tarafından tolere edilen bazı sentetik materyaller hücre adezyonu ya da doku takibinde uyumsuz olabilir. Bu materyaller daha sıklıkla hücre dostu olarak adlandırılır.

Uygun bir sentetik materyal konduit içine arzulan boyutlarda oluşturulabilmeli, sterilize edilebilmeli, yırtılmaya dirençli olabilmeli, uygulanması ve dikilmesi kolay olmalıdır.

Pek çok organik olmayan materyal sinir grefti olarak araştırılmıştır. Bunların arasında en popüler olanları silikon, cam lif yapılı greftler, poliglikolik asit (PGA), poly(D,L-lactide-ε-caprolactone), poly(2-hydroxyethylmethacrylate-co-methylmethacrylate) (pHEMA) ve trimetilenkarbonat-kaprolakton en çok bilinenleridir. Değişen derecelerde yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaları ve artmış inflamatuvar yanıtı yoluyla fibrozis ile sinir rejenerasyonunu engelleyebildikleri gösterilmiştir. Greftte karşı immün cevap gelişmesi ve toksisitesi de dezavantajdır (Schmidt ve Leach, 2003; Battiston vd., 2007; Wang ve Cai, 2010)

Silikon bir prospektif klinik çalışmada mikroşirurjik sinir onarımı ile karşılaştırılmıştır. Beş yıllık takip sonrasında tüp ile yapılan tedavide soğuk intoleransının daha kötü olması dışında aralarında anlamlı fark bulunmamıştır. Başka bir randomize prospektif çalışmada ise PGA tüpleri dijital sinirlerde kullanılmış, iki nokta ayırımı testi ile yapılan takiplerde 4 mm'den küçük defektlerde daha belirgin olmak üzere standart sinir onarımına göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Yine de bu materyaller ile insan üzerinde yapılmış klinik çalışma sayısı oldukça azdır (Weber vd., 2000).

2.3.1.8. Doğal bazlı materyaller

Bu sınıfta canlı organizmalarda bulunan maddeler yer alır. Bu grubun en önemli üyeleri arasında kollajen (fibröz yapısal protein), jelatin (kollajenden elde edilir), kitosan (polisakkarit), aljinat (polisakkarit), polihidroksibutirat (bakteriyel polyester) ve bunun kopolimerleri bulunmaktadır (Hudson vd., 2000)

Araştırmaların büyük bir bölümü de saflaştırılmış ekstraselüler matriks proteinlerinin ve glikozaminoglikanların sinir konduiti olarak kullanım potansiyellerine odaklanmıştır. ekstraselüler matriks proteini olarak en çok araştırılan moleküller; laminin, kollajen ve fibronektindir. Bu moleküllerin vücutta aksonal gelişim ve onarımda rol oynayabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca ekstraselüler matriksin diğer proteoglikanları ve glikozaminoglikanlarının da nöral aktiviteyi ve nörit gelişimini uyardığı belirlenmiştir.

Sinir onarımı uygulamalarında araştırılan diğer doğal bazlı moleküller HA, fibrinojen, fibrin jelleri, aljinatlar, agaroz ve kitosanı içermektedir.

2.3.1.9. Dolgu maddeleri

Periferik sinir onarımında yapay greftlerin kullanılması ile birlikte bu tüplerin içlerinin doldurulması kavramı da ortaya çıkmıştır. Bu mekanik anlamda uzun greftlerde gerekli olmaktadır.

Kök hücre, in vitro yönlendirilmiş kök hücre ve fibroblastlar üzerinde yoğun araştırma yapılmaktadır. Yine doğal yapısal maddeler olarak kollajen, fibrin, laminin, agaroz, sentetik maddeler olarak poliamidler, catgüt ve poliglaktan bu amaçla kullanılmakta ve araştırılmaktadır. Sinir rejenerasyonunun doğal sürecinde kesin mekanizmaları ortaya konulmamış olsa da önemli rolleri olduğu bugün artık bilinen nörotropik maddeler olan NGF (sinir büyüme faktörü), FGF (fibroblast büyüme faktörü), GGF (gliyal büyüme faktörü), CNTF (siliar nörotrofik faktör), VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü), BDNF (beyin kökenli nörotrofik faktör), NT-3 (nörotrofin 3) greft tüplerinde dolgu malzemesi olarak araştırılmaktadır (Chen vd., 2006).

2.4. Sinir İyilemesinde Mikroçevrenin Restorasyonu ve Büyüme Faktörlerinin Etkileri

Sinir rejenerasyonunda optimal iyileşme için mikroçevrenin restorasyonu önem taşır. Bu noktada iki sinir ucu arasındaki mesafeye dikkat edilir. Distal sinir ucu, uzayan aksonlar için onlara yol gösterici kemotaktik bir çekim oluşturur. Bu tropizm defekt uzunluğu ile ters orantılıdır ve 0.8 – 1.0 cm den fazla olan aralıklarda rejenerasyon aksonlarda etkili olamamaktadır. Konduitlerde SHleri, proksimal sinir ucundan distal sinir ucuna doğru göç etmektedir. Ancak daha uzun sinir defektlerinde, SH göçü ve sonuçta oluşan myelinizasyon sınırlıdır.

2.4.1. Sinir iyileşmesinde Schwann hücrelerinin rolü

Normal sinir hücrelerinde SHleri heterokromatinden yoğun çekirdeğe ve elektronca yoğun bir sitoplazmaya sahiptirler (Evans, 2000). SHleri aksonlarda sinir impulslarının hızlı iletimi için özel bir yapı olan myelin kılıflarını üretirler. Bu hücreler sadece myelin kılıfı üretmek için değil, yaralanma sonucu oluşan myelin kılıf hasarında gelişimsel plastisitesini de sağlamaktadır (Hung vd., 2015, Jessen ve Mirsky, 2016).

Sinir hasarı sonrası SHleri progenitör benzeri hücelere dönüşürler. Bu hücreler çeşitli nörotrofik faktörler ve yapısal ekstraselüler matris proteinleri ile hücre adezyon molekülleri ve reseptörlerini de üreterek akson rejenerasyonu için gerekli ortamı yaratırlar (Lundborg, 1987; Evans, 2000; Wakatsuki vd., 2014).

Aksonal rejenerasyon, sinir elemanları dışındaki diğer bağ doku yapılarından ziyade, akson distal güdüğüne doğru tercih edilir bir büyüme gerçekleştirir, ki bu olay 'nörotropizm' olarak adlandırılır. Bu aksonlarca tercih edilir büyüme yönü, salınan çeşitli nörotrofik faktörler ve SHlerinin migrasyonu ile sağlanır (Winograd ve Mackinnon, 2006). Aksotomiden sonra, distal sinir güdüğündeki SHlerinde hücresel adezyon molekülleri artmaktadır.

SHlerinin hasar sonrası major histokompatibilite antijeni (MHC) klas 2 pozitif hale gelerek, myelinin bazı komponentlerini makrofajlara sunup, makrofajları daha da etkin hale getirdikleri saptanmıştır. Benzer şekilde myelin debris fagosite eden makrofajlar da, myelin kökenli ürünleri SHlerine sunarak, bu hücelere mitojenik etki ederler ve bu artıkların remyelinizasyonda kullanımını sağlarlar (Eppley vd., 2004, Hall, 1989). Aktive makrofajlar ayrıca hasar alanına endotel hücre migrasyonunu da arttırırlar.

Sonuç olarak SHleri rejenerasyonu üç farklı yolla destekler. Birincisi hücre yüzey adezyon moleküllerinin sentezinin arttırılması, ikincisi laminin, fibronektin, heparan sülfat gibi ekstraselüler matris proteinlerini içeren bazal membranın oluşturulması ve üçüncüsü sinir büyümesini destekleyen pek çok büyüme faktörü ve reseptörlerinin üretimini arttırılmasıdır (Terenghi, 1999).

2.4.2. Büyüme faktörleri

Büyüme faktörleri hücrel proliferasyon ve farklılaşmayı düzenleyen ve hücre tarafından üretilen çeşitli protein ve polipeptitleri kapsar. Sinir rejenerasyonu hücreler, ekstraselüler matriks molekülleri ve büyüme faktörleri arasındaki pek çok kompleks etkileşim ile uyarıldığı için yara bölgesinde büyüme faktörlerinin lokal olarak bulunuşu hayati bir önem taşır. Bu etkileşimler sinir rejenerasyonunda çeşitli hücre tiplerinin sağ kalımı, poliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşmasını kontrol ederler.

2.4.3. Nörotrofik faktörler (Nörotrofinler)

Büyüme faktörlerinin önemli bir sınıfını oluşturan nörotrofik faktörler nörojenezi uarmaya ve kontrol etmeye yardım ederler. Doku mühendisliğinde kullanımları oldukça dikkat çeker. Bazen nörotrofin terimi de bu anlamda kullanılsa da nörotrofinler sadece 4 yapısal faktörü içerir. NGF, BDNF, NT-3 ve NT-4/5 dir.

Nörotrofinler hücre yüzeyi üzerine spesifik reseptörlerin bağlanması ile nöral cevabı uyarırlar. P75 ve tirozin kinaz reseptörleri ailesi olarak ikiye ayrılırlar

2.4.3.1. Sinir büyüme faktörü (NGF)

NGF, duyuusal ve sempatik nöronların farklılaşmasında ve sağ kalımında rol oynayan ve ilk keşfedilen nöronal gelişim faktörüdür. Hedef organlar tarafından üretilen NGF, retrograde aksonal transport yoluyla nöronal hücre cisimciklerine bırakılır ve spesifik reseptörlere bağlanarak sinir uçlarına taşınır. Sinir rejenerasyonu sırasında SHlerine etki ederek bunların göç etmelerini ve aksonal çıkıntılara yapışmalarını sağlar. Sağlıklı sinirde düşük seviyelerde ifade edilirken, hasarlı sinirin distalinde yüksek seviyelerde ifade edilmektedir.(So ve Xu, 2015.) Ayrıca ortamda yeterli düzeyde NGF bulunmadığında makrofajlar tarafından gerçekleştirilen miyelin fagositozu azalarak rejenerasyon olumsuz yönde etkilenir.

Lee vd.'nın (2003) sıçan siyatik sinirinde yaptıkları çalışmada, kontrollü NGF salınımının aksonal rejenerasyonu doz bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür. Sinir ezilme

yaralanması ya da aksotomilerden sonra, NGF uygulanması ile myelinize akson sayısında ve myelin kalınlığında artış venöral internal organizasyonun daha düzgün olduğu ve sinir rejenerasyonunu hızlandığı, pek çok deneysel çalışmada gösterilmiştir (Jubran ve Widenfalk, 2003; Whitworth vd., 1996).

2.4.3.2. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF)

Nörotrofin ailesinin diğer bir üyesi olan BDNF, beyindeki nöronal sinapsların oluşumu ve korunmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Kortikal nöron boyutu ve dendrit yapısını korumaya da yardımcı olmaktadır (Takemura vd., 2012). BDNF'in aksonal rejenerasyonu arttırdığı in vitro çalışmalarla da desteklenmiştir.

Nörotrofik faktörler SH göçünü uyarmak suretiyle distal sinir uçlarındaki SHlerini etkilerler. BDNF salgılanmasıyla SHleri aksonal yayılmayı uyarırlar. BDNF ayrıca nöropatik ağrıda mikroglia ve nöronlar arasındaki temel sinyal molekülüdür. Ancak BDNF'in PS rejenerasyonundaki temel hücre kaynağı ve klinik kullanılabilirliği ile sinir hasarı sonrası rejenerasyon ve BDNF yetersizliği arasındaki ilişkisi henüz tam açıklanamamıştır.

BDNF'in sinir hasarı sonrası rejenerasyon ve remiyelinizasyon için gerekli olduğu, BDNF antikor ile tedavi edilen hayvanlarda gösterilmiştir (Yin vd., 1998). Bununla beraber BDNF'in PS rejenerasyonunu uyarıcı etkilerini araştıran çalışmalarda sonuçlar farklılıklar göstermektedir.

2.4.3.3. Nörotrofin-3 (NT-3)

NT-3 nöronların gelişimi, farklılaşması ve sağ kalımını destekleyerek nöronal sinaps oluşumunu teşvik eder. PS onarımında NT-3 uygulanmasını araştıran çalışmalarda miyelinli akson sayılarında belirgin bir artış saptanmıştır (So ve Xu, 2015). Yapılan çalışmalarda spinal kord yaralanmalarında NT-3 uygulanmasının rejeneratif tomurcuklanmayı arttırdığı gösterilmiştir (Terenghi, 1999; Yin vd., 1998).

2.4.3.4. Nörotrofin-4/5 (NT-4/5)

NT-4/5 motor ve duysal nöronların sağ kalımında görev almaktadır. Yin vd. (1998)'nin yaptığı bir çalışma da rat siyatik sinirinin yaralı bölgesine NT-4 içeren fibrin bir yapıştırıcı uygulandığında rejenere akson sayısı, aksonal çap, myelin kalınlığı ve rejenerasyon mesafesinde önemli bir artış saptamışlardır. Buna paralel olarak siyatik fonksiyon indeksleri anlamlı bir artış göstermiştir. Hasarlanmış retinal ganglion hücrelerinin yaşayabilirliğini desteklediği, motor nöron yaşayabilirliği için güçlü destekleyici etkilerinin olduğu, motor nöronların iskelet kası innervasyon kapasitelerini arttırdığı saptanmıştır (Yin vd., 1998).

2.4.3.5. Nörotrofin-6 (NT-6)

Nörotrofin ailesinin en son bulunmuş olan üyesi olup, bu da NGF ile yapısal benzerlik gösterir. Henüz yeterli deneysel çalışma yapılmamıştır; ancak sınırlı sayıdaki deneylerde sempatik ve duysal nöronlarda etkili olduğu görülmüştür. Motor nöronlardaki etkisi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır (Yin vd., 1998).

Yukarıda bahsedilen nörotrofinlere ilave olarak nörotrofik fonksiyonları sebebiyle Periferik sinir rejenerasyonunda etkileri bulunan diğer gelişim faktörleride bulunmaktadır. Glia kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), silier nörotrofik faktör (CNTF), fibroblast büyüme faktörleri (FGFs) ya da sitokinler sayılabilir.

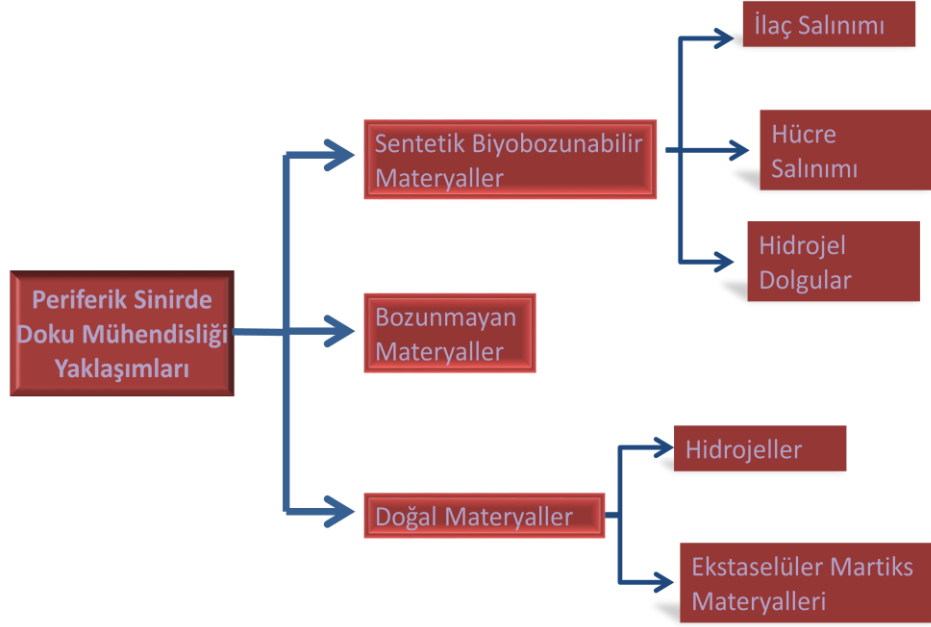
2.5. Periferik Sinir Tedavisinde Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Son yıllarda sinir tedavisi çalışmalarında doku mühendisliği ile ilgili yaklaşımlar büyük dikkat çekmektedir. Günümüzde altın standart olarak kabul edilen otograft uygulamasını takiben bile hastaların çok az bir kısmı fonksiyonlarını geri kazanabilmektedir. Bu yüzden pek çok araştırmacı çalışmalarını sentetik ya da biyolojik materyallerin ya da sinir konduitleri gibi hücreyel olmayan graft materyallerinin kullanımı üzerine yoğunlaştırmaktadırlar (Kim vd., 2008; Lin ve Marra, 2012).

Kullanılacak sinir guideları akson rejenerasyonu için bir iskele görevi görmeli, yarı geçirgen olmalı ve uygun hızda degrade olabilmelidir. Ayrıca istenilen biyomateryal biyouyumlu olmalı, inflamasyonu uyarıcı bir etki yapmamalı ve aksonal uzamayı uarmalıdır. Bu gereksinimler araştırıcıları daha etkili sistemlerin geliştirilmesine yöneltmiştir.

2.5.1. Enjekte edilebilen sistemler

Enjekte edilebilir biyomateryaller potansiyel bir klinik tedavi yöntemi olarak önerilmektedir. Hidrojeller yüksek su içerikli likit-jel sınıfı biyomateryallerdir. Tipik olarak çapraz bağlı, üç boyutlu ve hidrofilik yapıdaki polimer ağlarıdır. Biyouyumlulukların iyi oluşu, esneklikleri, çok çeşitli kompozisyonlarda kullanılabilmesi gibi avantajları sayesinde biyomedikal uygulamalarda sıkça kullanılmaktadırlar. Hidrojeller hücrelerle tek başına ya da kombine olarak uygulanabilmektedir (Li vd., 2012; Wang ve Cai, 2010). Doku mühendisliğinde üç boyutlu bir yapı sağlayan ve iskele görevi görebilen hidrojeller ilaç ya da gen taşınmasına, hücre enkapsülasyonuna, doku ya da materyal yüzeyleri arasında bir yapıştırıcı ya da engel olarak kullanıma ya da hücre yapışmasının geri dönüşümlü kontrolüne hizmet etmede hücre kılıfı olarak görev alabilirler(Li vd., 2012). şekil 2.4’de Periferik sinir rejenerasyonunda kullanılan enjekte edilebilen hidrojel kullanım stratejileri özetlenmiştir. Hidrojeller doğal polimerler, sentetik polimerler, fizyolojik yapı ve elektrik yükleri baz alınarak bir çok gruba ayrılmaktadırlar. Biyobozunur polimerik hidrojeller doku mühendisliği uygulamalarında sıkça kullanılmaktadır. Çünkü yüksek su içerikleri ve doku benzeri özellikleri olumlu sonuçlar vermektedir.



Şekil 2.4. Periferik sinir rejenerasyonunda enjekte edilebilir hidrojel kullanım stratejileri

2.5.2. Periferik sinir yaralanmalarında doğal biyomateryal hidrojelleri

2.5.2.1. Kollajen

Kollajen memelilerin temel ekstraselüler matriks proteinidir. Bu sebeple hasarlı doku ve organlar için yapay bir biyomateryal olarak kullanımı uygundur. Kollajen aynı zamanda hem hücre adezyonu hem de proliferasyonu uyarır. Sentetik materyallerin kullanıldığı çalışmalarla karşılaştırıldığında kollajen gibi doğal materyallerin kullanımı önerilmektedir. Özellikle 10mm'lik rat siyatik sinir hasarında kollajen kullanımı aksonal rejenerasyonu, myelinasyonu ve vaskülerizasyonu artırır (Lin ve Marra, 2012). Kollajen kullanılarak olumlu sonuç alınan diğer çalışmalarda mevcuttur. Bununla beraber kollajen gibi biyomateryaller nispeten kısa sinir boşluklarının tedavisinde yeterli olmaktadır.

2.5.2.2. Aljinat

Sinir rejenerasyonunda etkileri incelenen bir diğer biyomateryal aljinattır. Biyoyumluluğu ve hidrofilitesi sebebiyle hücre yapışması proliferasyon ve farklılaşma

da olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak tahmin edilemeyen degradasyon oranları klinikte kullanımına engel olmaktadır (Sufan vd., 2001)

2.5.2.3. Kitosan

Karides ya da diğer Crustaceae üyelerinin kabuklarından türevlerinden bir polisakkarittir. Kitosan membran ve fiberleri özellikle SHleri ile mükemmel bir nöroglial hücre afinitesi gösterir. Bu sebeple sinir rejenerasyonunda ilgi çekici bir biyomateryaldir (So ve Xu, 2015)

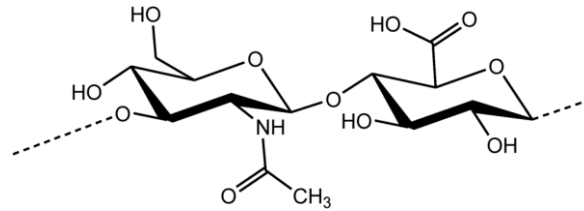
2.5.2.4. İpek

Yavaş degradasyon oranı, güçlü mekanik direnç ve nörobiyoyumluluğu sayesinde hasarlı Periferik sinirin iyileşmesinde olumlu etkileri gösterilen diğer bir doğal biyomateryal ise ipektir. Özellikle dorsal kök gangliyonları ile iyi bir uyumluluk oluşturmakta ve SHlerinin sağ kalınımı yararlı etkileri üzerine çalışmalar mevcuttur . (Yang vd., 2007; So ve Xu, 2015)

2.5.2.5. Hyaluronik asit (HA)

HA, tüm ekstraselüler doku aralıklarında yaygın olarak bulunan yüksek zincir uzunluğuna sahip negatif yüklü bir glikozaminoglikandır. Glukuronik asit ve N-asetil-glikozamin birimlerinden oluşur (Şekil 2.5). Memeli sinir sisteminin bir bileşeni olarak sinir yaralanmalarının onarımında sıkça kullanılmaktadırlar. Biyoyumlu olmaları, ticari olarak sterilize formlarının oluşu ve istenen özelliklere göre modifiye edilebilmeleri nedeniyle kullanımları kolaydır. Son yıllarda, deneysel modeller üzerinde HA bazlı materyallerin PS hasarı ve spinal kord yaralanması üzerine etkileri araştırılmaktadır (Huseyinoglu vd., 2012). HA uygulaması sonrası, yaralanmış periferik sinir rejenerasyonu uyarılabilmektedir. Çünkü HAIN sahip olduğu özellikler göç, yapışma, damarlanma yada nöronal filizlenme gibi kompleks sinyal olaylarını indüklemektedir. Yapılan araştırmalarda hasarlı sinirin onarımı ve skar oluşumu üzerine HAIN anlamlı derecede olumlu etkileri gözlenmiştir (Ozgenel, 2003; Zor vd., 2014). Zor vd.(2014) yaptıkları çalışmada karboksimetilselüloz ve HA kullanarak elde ettikleri filmi konduit olarak kullanmışlar daha

sonra vasüler endotelial büyüme faktörü (VEGF) genini klonlayarak konduit içerisine enjekte etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar elektrofizyolojik, histomorfolojik ve elektron mikroskopik olarak değerlendirmeye alınmıştır. Çalışma sonuçları, kombine HA konduiti ile VEGF gen terapisi uygulamasının etkin tedavi için kullanılabilirliğini gösterilmiştir (Zor vd., 2014). Özaydın vd. (2014), silikon konduit ve HA uygulamasının deneysel siyatik sinir hasarına etkilerini araştırmışlardır. Değerlendirme aşamasında hem otuz hem de altmış günlük tedavi periyotları karşılaştırılmış ve sonuçta silikon tüp içerisine ticari HA enjeksiyonu yapılmıştır. Altmış günlük deney grubunda, miyelin kalınlığı ve akson alanlarının arttığı, miyelin dejenerasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Silikon ve HA'nın altmış günlük uygulamasının pozitif etkileri olduğu rapor edilmiştir (Özaydın vd, 2014). Barreiros vd. (2014) siyatik sinir hasarı üzerine HA hidrojeli ve doğal lateksden saflaştırılan bir proteinin tek başlarına ve kombine etkilerini araştırmışlardır. En etkili sonuçlar her iki maddenin bir arada kullanıldığı durumda alınmıştır. Araştırmacılar böyle bir materyalin periferik sinir sinir sistemi lezyonları için umut verici bir tedavi seçeneği olduğunu rapor etmişlerdir (Barreiros vd., 2014).



Şekil 2.5. Hyaluronik asitin yapısal formülü

2.5.3. Hyaluronik asit ve sinir iyileşmesindeki rolü

İlk kez 1930'lu yıllarda Karl Meyer'in laboratuvarında tanımlanan HA, D-glukoronik asit ve D-N-asetilglukozamin yapılarından oluşan polimerik bir disakkarittir. Biyobozunabilir ve biyouyumlu olmasının yanı sıra toksik, immünojenik ve inflamatuvar etki göstermeyen bir biyomaterial olup, bazı medikal uygulamalarda da kullanılmaktadır.

HA canlıların tüm doku ve vücut sıvılarında bulunabilir ve en çok bulunduğu yer yumuşak bağ dokudur. Yetişkin bir insandaki toplam HA miktarının 11-17 gr civarında olduğu tahmin edilmektedir. HA nanofibröz iskelesi doğal ekstreseüler matriksin yapısını

tahtit edebilecek şekilde de uygulanmaktadır. Mükemmel bir su bağlama kapasitesi olan HA, sinovial sıvı, göz içi vitröz sıvı, derinin dermis tabakası gibi dokularda nemin sürekliliğini sağlar. HA solüsyonları, eşsiz viskoelastik özellikleri ile ortopedik uygulamalara izin verecek şekilde yüksek bir viskozite gösterir. Dizdeki osteoartrit tedavisinde HA'nın enjektebl formunun kullanıldığı birçok çalışma vardır. HA göz solüsyonu olarak da kullanılabilir. Oral uygulaması ise ayrıntılı çalışmalar gerektirmektedir.

HAnın sinir iyileşmesindeki rolü üzerine pek çok çalışma bulunmaktadır. Çünkü HA lenfosit göçü, proliferasyon ve kemotaksi, granülosit fagositozu ve ayrıca makrofaj hareketliliğini inhibe etmek suretiyle skar oluşumunu yavaşlatır. Ayrıca HAnın topikal uygulamalarının sinir rejenerasyonunu kolaylaştırabildiğine dair çalışmalarda mevcuttur (Özgenel 2003).

Ekstrasellüler matriksin önemli bir bileşeni olan HA; ekstrasellüler matriks sentezi ve yeniden şekillendirilmesinde ve çoğalıp göç eden hücreler için, hücre - matriks etkileşimlerinde görev alır. Bu durum özellikle yara iyileşmesi için önemlidir. Yaralanma sonrası inflamasyon döneminde hyaluronik asid sentezinde artış gözlenir ve bunun sonucunda proinflatuar sitokin sentezinde artış ve inflamatuar hücrelerin yaralanma alanına göçü gerçekleşir.

Yara iyileşmesinin erken dönemlerinde proinflatuar fonksiyon gören HA, geç dönemde inflamasyonun regülasyonu ve iyileşme sürecinin diğer fazlara devamında görev alır. Erişkin hayatta yara iyileşmesi skar dokusu oluşumu ile karakterizedir. HA günümüzde oftalmolojide, osteoarthritis tedavisinde, cilt bakımında ve estetik girişimlerde dolgu materyali olarak da kullanılmaktadır.

Özgenel (2003), 48 adet sıçan üzerinde hyaluronik asidin topikal uygulamasının etkilerini araştırdığı çalışmada dört ve on iki haftalık HA uygulamasının skar dokusu oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Deney sonuçları histolojik, elektrofizyolojik, gastroknemius kas ağırlığı ve siyatik fonksiyon indeksi kriterleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Histolojik kesitlerde akson sayısının HA uygulaması ile değişim

göstermediği, ancak akson ve fiber çaplarında artış olduğu tespit edilmiştir (Özgenel 2003).

Hüseyinoğlu vd.(2012)'nin yaptığı çalışmada siyatik sinir kesisi onarımında silikon tüp içerisine HA uygulamasının sinir rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar elektrofizyolojik olarak da değerlendirilmiştir. Otuzuncu ve altmışıncı günde alınan ölçümler sonucu HA ile doldurulmuş silikon tüp uygulamasının, uygulama yapılmamış gruba göre daha etkili bir aksonal rejenerasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Hüseyinoğlu vd., 2012).

Özaydın vd.(2014)'nin yaptığı çalışmada ise nörorafi uygulamasının ardından silikon tüp veya silikon tüp+HA uygulamasının etkileri histolojik ve stereolojik yöntemler ile araştırılmıştır. Otuzuncu ve altmışıncı günlerde yapılan diseksiyon sonucunda kontrol grubunda 30. ve 60. günlerde düzensiz morfoloji ve çevreye yapışıklık gözlenmiştir. Silikon tüp kullanılan gruplarda 60. günde belirgin skar dokusu ile karşılaşılırken, silikon tüp+HA uygulanan grupta ise 30. ve 60. günlerde skar oluşmadığı gösterilmiştir. Ayrıca silikon tüp+HA uygulaması altmış günlük gruplarda aksonların myelin kalınlığında ve akson alanlarında artışa, myelin dejenerasyonunda ise azalışa yol açmıştır (Özaydın vd., 2014).

2.5.4. Lityum ve sinir iyileşmesindeki rolü

Sinir rejenerasyonunda etkili bir tedavi ancak yeniden oluşan sinirin vücutta doğal olarak bulunan yapısına en yakın haline ulaşması ile olur. PS hasarı sonrasında SHlerinin yaralanması ve aksonal dejenerasyon sonucu demiyelinizasyon oluşur. Etkin sinir rejenerasyonunun önemli bir basamağı aksonal uyarıların hızlı iletimidir ki, rejenerasyon süreci içerisinde bu aşama miyelinizasyondur (Makoukji vd., 2012). Son yıllarda yapılan in vitro, in vivo ve klinik çalışmalarla lityumun sinir korunmasında ve remiyelinizasyonuna olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.

Lityumun nörokoruyucu etkileri in vitro olarak serebellar granül hücreleri, serebral kortikal hücreler ve hipokampal nöronlarda; PC12 hücrelerinde ve nöroblastoma hücrelerinde gösterilmiştir. Yapılan in vivo çalışmalarda ise fokal serebral iskemi, geçici

iskemi ve kinolinik asit infüzyon çalışmalarında nörokoruyucu etkileri desteklenmiştir (Rowe ve Chuang, 2004).

Lityum bu kullanımının yanı sıra bipolar kişilik bozukluklarında, felç gibi travmatik yaraları takiben beyin hasarının önlenmesinde ya da Huntington ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılır (Croce vd., 2014; Fu vd., 2014; Makoukji vd., 2012; Quiroz vd.,2010; Rowe ve Chuang, 2004).

Lityum apoptoz bağımlı hücrel ölümün önlenmesinde etkili bir nörokoruyucu bir ajandır. Lityumun nörokoruyuculuğu, çoklu ve birbiriyle kesişen mekanizmalarla sağlanır ve etkisini özellikle de apoptotik yolak üzerine gösterir. Bu etkiler sağ kalım sinyal yolağının lityum ile indüklenmesi ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör ilişkili kalsiyum içe akımının lityum ile inhibe olması yönündedir. Yapılan çalışmalar lityumun nöronal plastisite ile ilgili çeşitli molekülleri de upregule ettiğini göstermektedir (Shim vd., 2013). Lityumun ayrıca siklik adenozin monofosfat (cAMP) cevap elementi bağlayıcı protein (CREB) aktivasyonunu artırdığını da tespit edilmiştir (Einat vd., 2003; Hammonds ve Shim, 2009; Heinrich vd., 2009; Omata vd., 2008).

Lityumun hücredeki hayatiyet yada apoptotik süreç üzerine etkileri üç ana başlıkta toplanabilir:

1. Lityum, Beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF)ü indükleyerek sırasıyla tropomiyozin reseptör kinaz B (TrkB) ve devamında fosfoinositit 3-Kinaz/ Protein Kinaz B (PI3K/Akt) ve mitojen aktivasyonlu protein/ hücreler arası sinyal düzenleyici kinaz kinaz / Hücreler arası düzenleyici kinaz (MEK/ERK) yolaklarını aktive eder. Her iki yolak da nörokoruyucu etkilerle direk ilişkilidir. PI3K/Akt yolağı glikojen sentez kinaz 3B (GSK-3B), tümör protein 53 (p53) ve kaspaz 9 aktivitelerini inhibe eder. MEK/ERK yolağı da ribozomal S6 kinaz (RSK) aracılığı ile CREB'i uyarır ve GSK-3B'yi inhibe eder.

2. Lityumun bir etkisi de GSK-3B 'yi direk inhibe etmesidir. GSK-3B temelde CREB, ısı şok transkripsiyon faktörü-1 (HSF-1), aktive olan B hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir güçlendiricisi (NFκB) ve β-katenin gibi birçok antiapoptotik faktörü inhibe etmektedir. Ancak lityum yoluyla GSK-3B aktivitesi durdurulduğunda tüm bu faktörler serbest hale geçerler.

3. Lityum NMDA aracılı kalsiyum içe akışını inhibe eder. Kalsiyum içe akışı hücreleri baskılar. Bu etki p38 ve JNK proapoptotik faktörlerini kapsayan mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağını aktive eder. Lityum, kalsiyum içe akışını inhibe etmek suretiyle bu aktivasyonu baskılar. Bu sayede apoptotik etkilerin baskılanmasıyla hücre sel sağkalım sağlanmış olur. Lityum farklı noktalarda pek çok yolak ve efektör üzerinden hücre canlılığını etkileyebilir. Bununla beraber bu değişimler B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi üyeleri oranlarını antiapoptotik üyelere kaydırır. Bu da sitokrom c salınımı önler ve kaspaz aktivasyonunu inhibe eder (Rowe ve Chuang, 2004).

Schuettauf vd. (2006)'nın lityum ve sitikolinin optik sinir hasarı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, ajanların hem tek başlarına hem de kombine uygulamaları sonucu Bcl-2 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Farklı sürelerle yapılan uygulamalar sonucunda sitikolinin, lityumun ve kombine uygulamalarının retinal gangliyon hücrelerinde üç, yedi ve yirmi birinci günlerde belirgin bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ajanların üç, yedi ve yirmibirinci günlerde gösterdiği nörokoruyucu etkiler immünohistokimyasal verilerle de desteklenmiştir (Schuettauf vd. 2006).

Wu vd. (2008) etkili bir antiepileptik ilaç olarak da bilinen valproik asidin(VPA) periferik sinir rejenerasyonu ve motor fonksiyonların iyileşmesi üzerine yaptıkları çalışmada VPA, silikon tüp içerisine enjekte edilerek uygulanmıştır. Kontrol grubu ise VPA yerine Serum içeren bir silikon tüp olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu amaçla 30 adet Spraque-Dawley cinsi rat kullanılmış, her iki gruba da 1 cm'lik sinir kesisi oluşturulmuş ve ardından kesi, silikon tüp ile birleştirilmiştir. Sonuçlar siyatik fonksiyon indeksi, elektrofizyolojik çalışma, histolojik ve morfometrik analizler ile değerlendirilmiştir. Elektrofizyolojik deneyler sonucu ilk 4 haftada her iki grupta da ciddi fonksiyonel hasarı gösteren düşük değerler elde edilmiştir. 8. ve 12. haftalarda ise VPA uygulanan grupta daha anlamlı fonksiyonel iyileşme olduğu tespit edilmiştir (Wu vd. 2008).

Huang vd. (2003)'nın yaptıkları çalışmada retinal gangliyon ve beyin -retinal hücre kültürlerinde lityum uygulamasının Bcl-2 genine bağlı etkinliği araştırılmıştır. Lityumun retinal gangliyon hücrelerinin sağ kalımında doza bağımlı olmayan etkinliği olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde lityum uygulamasının doza bağımlı olmayarak Bcl-2 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Huang vd., 2003)

Sonuç olarak hem HA hem de lityum, hasarlı sinir rejenerasyonunda olumlu sonuçlar veren temel terapötik ajanlardır. Bu ajanların kombine kullanımları, tek başına kullanımlarına göre daha etkili sonuçlar verebilir. Ayrıca her iki ajanın klinik etkinliklerinin altında yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılması gerekmektedir. Çalışmamıza sinir hasarının etkin tedavisinde kullanılmak amacıyla bir hücrel matris elemanı olan HA ve rejenerasyonu tetiklemek amacıyla lityum kullanılmıştır. HA, sinir dokusunda etkin tedavinin sağlanması ve oluşacak hücrelere bir büyüme faktörü etkisi yaratmak amacıyla; lityum ise sinir rejenerasyonunu hücrel yollarla tetiklemek amacıyla kullanılmıştır. HA sinir hücrelerinde yoğun olarak bulunan bir bileşen olup sinir hasarı tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda genel amaç, iyileşme sürecine ket vuran skar oluşumunu engellemektir. HA yüksek çözünürlüğe sahip ve oldukça kolay yıkılabilen bir materyaldir.

Çalışmamızda HA'nın mikrojel olarak vücutta daha stabil kalması etkinliğini daha uzun süre koruyabilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu hidrojellere lityum yüklenmesinin sinir hücrelerini apoptozdan koruması ve miyelin kılıf üretimini indükleyerek aktif iletim sağlayan sinir demeti oluşumuna katkı sağlayabilirliği incelenmiştir. Çalışmamızda kullanılan bu yeni materyal ile, doğal rejenerasyon etkisine benzer bir iyileşme sağlanabilmesi, otograft uygulamasında sıkça karşılaşılan kısıtlamaların önüne geçilmesi, skar oluşumunun engellenmesi ve etkili bir fonksiyonel iyileşmenin elde edilmesi hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

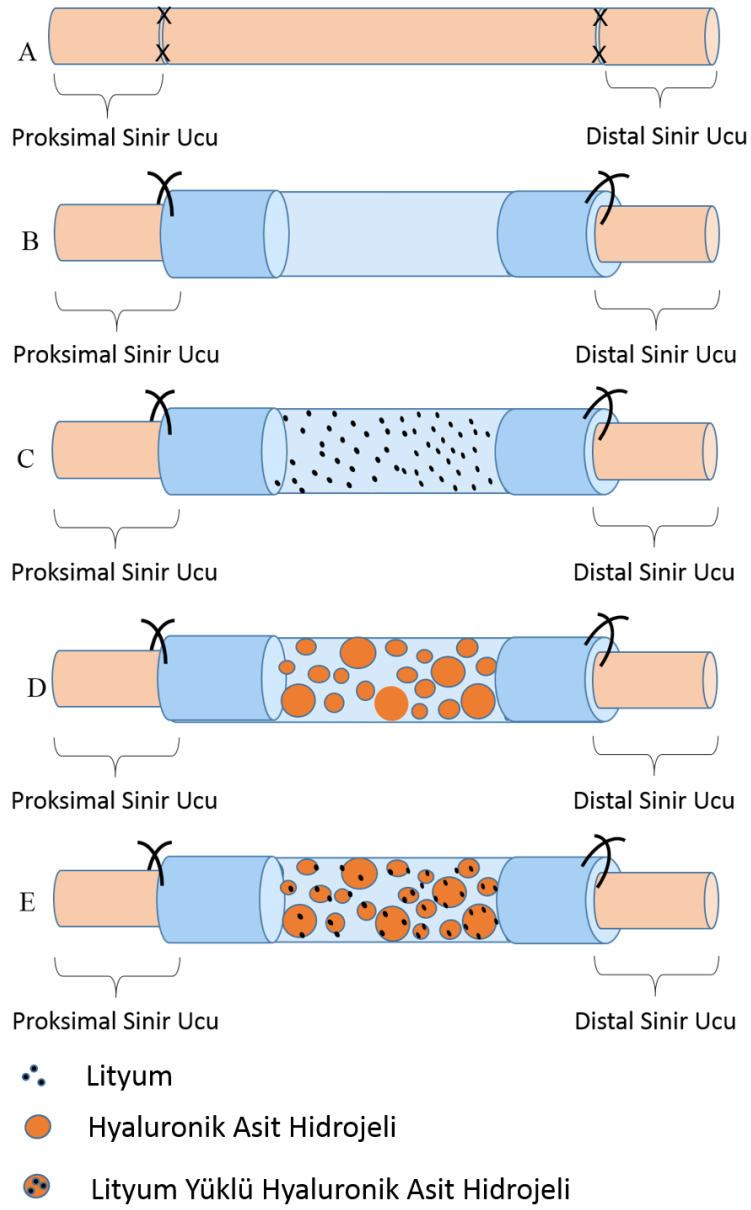
Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM) tarafından, Tıp Fakültesi Anatomi ve Plastik Cerrahi Anabilim Dalının da katkılarıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 483/2015 sayılı izni alınmış, "Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi" ve "Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi"nde yer alan tüm şartlara uyulmuştur. Cerrahi işlemler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde (TICAM) gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 250 – 300 gr arasında değişen ağırlıklarda, üç veya dört aylık Sprague-Dawley cinsi 30 adet sıçan kullanılmıştır. Hayvanların üretimi, deneyler öncesi ve sonrası bakımları da Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde (TICAM)da yapılmıştır.

Deney hayvanları 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsünün sağlandığı, $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, $\%50\pm 5$ nem oranında ve düzenli havalandırmanın sağlandığı odalarda barındırılmıştır. Çalışma boyunca beslenmeleri için standart ticari sıçan yemi ve içme suyu olarak da çeşme suyu verilmiştir. Hayvanlarda beslenme ve su tüketimlerinde bir sınırlandırma yapılmamıştır. Her gruptaki denekler uygulama sonrasında üç ay boyunca ayrı kafeslerde barındırılmıştır.

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Otuz adet sıçan eşit sayıda olmak şartıyla rastgele altı gruba ($n=5$) ayrılmıştır. Denek gruplar sırasıyla kullanılan yapı ve etken maddeye göre aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur (Şekil 3.1.):

- I. Grup: SHAM
- II. Grup: Otolog sinir grefti (OSG)
- III. Grup: Silikon tüp (ST)
- IV. Grup: Silikon tüp +LiCl (SL)
- V. Grup: Silikon tüp+ Hyaluronik asit (SH)
- VI. Grup: Silikon tüp+ Hyaluronik asit+LiCl₂ (SHL)



Şekil 3.1. Deney gruplarının şematik gösterimi A) Sinir otografı B) Boş silikon tüp C) Boş silikon tüp içine lityum klorür uygulaması D) Boş silikon tüp içine hyaluronik asit hidrojel uygulaması, E) Boş silikon tüp içine lityum yüklü hyaluronik asit hidrojel uygulaması

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Etil alkol (Sigma, Aldrich-ABD), Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck- Almanya),; Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck-ABD); Monopotasyum fosfat (KH_2PO_4)(Merck – A.B.D.); Glutaraldehit (EMS,ABD); Osmiyum Tetraoksit (EMS,ABD); Uranil asetat (EMS,ABD); Propilen oksit (Merck-A.B.D.); Araldit CY212

(Agar Scientific,İngiltere); Sodyum sitrat (Merck-ABD); Kurşun nitrat (Merck-ABD), Toluidin mavisi (Sigma Aldrich, A.B.D.); Susuz Boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) (Sigma Aldrich, A.B.D.); Lityum klorür (LiCl_2) (Sigma Aldrich, A.B.D.); Hyaluronik Asit (Sigma Aldrich, A.B.D.); Dioktil sodium süksinat (Sigma Aldrich, A.B.D.); İzooktan (Sigma Aldrich, A.B.D.); Trimetilolpropan triglisidil eter (Sigma Aldrich, A.B.D.); Thiopental sodyum (İ. Ulugay - Türkiye)

3.3. Kullanılan Cihazlar

Işık mikroskop (Olympus-Almanya); Rotator (TedPella, ABD); Ultramikrotom (Leica-Almanya); Trim cihazı (Leica-Almanya); Knifemaker (Leica-Almanya); Manyetik karıştırıcı (Schott, A.B.D.);Buzdolabı (Arçelik- Türkiye); Distile su cihazı (Elga-Almanya); Etüv (Binder, Almanya); Hassas terazi (Ohaus-İsviçre)

3.4. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

3.4.1. Lityum klorür çözeltisi hazırlanması

Lityum klorür (LiCl) çözeltisi 1,5 miliekivalan (mEq) olacak şekilde PBS solüsyonu içerisinde hazırlandı. Ekivalan tanım olarak molekül ağırlığının valans değerine oranıdır. Yani

$$E = m / v \text{ dır.}$$

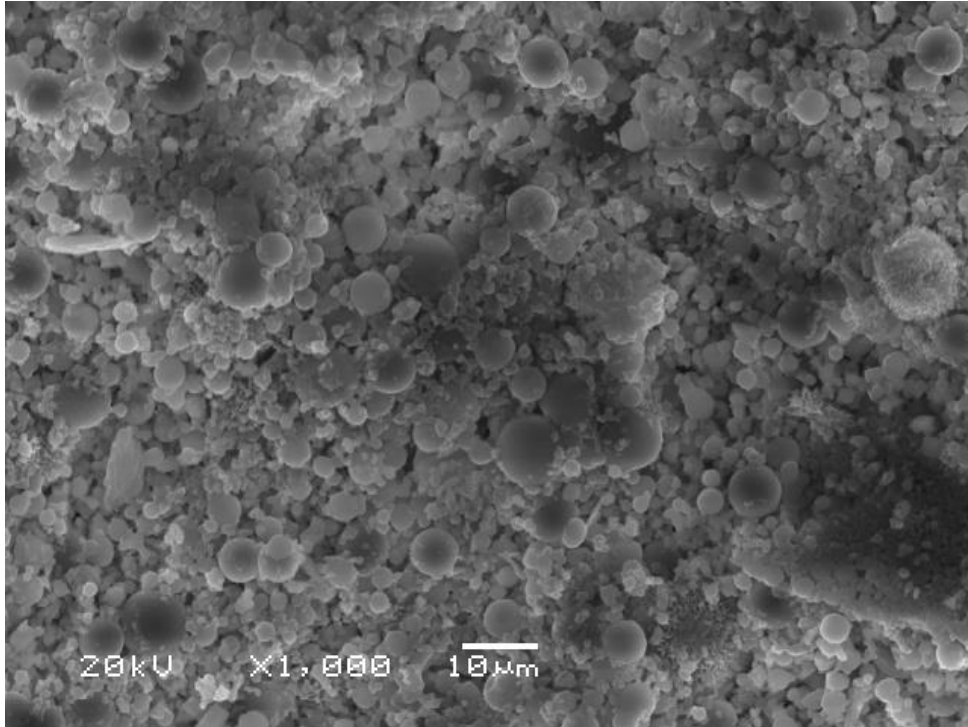
Bir molekülün valans değeri o molekülün çözücü ortamına verdiği pozitif ya da negatif iyon sayısı ile belirlenir. Lityumun valans değeri birdir. Bu durumda 0,0636 gr LiCl tuzu tartılarak 1000 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisinde çözünmesi sağlanmış, 1,5 mEq LiCl çözeltisi elde edilmiştir. Uygulama öncesi elde edilen çözelti 0,22 mikrometre gözenekli filtreden geçirilmiştir. Uygulama sırasında bu çözeltiden insülin iğnesi yardımıyla 0.2 ml kullanılmıştır.

3.4.2. Hyaluronik asit hidrojelinin hazırlanması

Lineer yapıdaki hyaluronik asit (HA) 50 mg/L konsantrasyonunda 0.2 M sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde çözeltisi hazırlanarak, 400 rpm'de yaklaşık 1 saat karıştırma

ile lineer HA'in çözünmesi sağlanmıştır. 40 ml'lik viallerde 10 adet 30'ar ml 0.2 M dioktil sodyum sulfosuksinat çözeltisi izooktan içerisinde hazırlanmış ve çoklu karıştırıcı kullanılarak her bir vialde daha önceden hazırlanmış olan HA çözeltisinden 1.0 ml ilave edilip vortekslelendikten sonra 1200 rpm'de 1 saat karışması sağlanmıştır. Bu süre sonunda ortama çapraz bağlayıcı olarak trimetilolpropan triglisidil eter, HA'in tekrarlayan birimleri baz alınarak hesaplanan miktarda ilave edilmiştir. Çapraz bağlayıcı ilavesinden hemen sonra karışım vortekslenmiş ve 1200 rpm de 1 saat daha partikül oluşumu için karışıma bırakılmıştır. Çapraz bağlanma sonrası aseton kullanılarak HA partiküllerinin çökmesi için bir gece beklenmiş, Çöken HA hidrojel partikülleri 10000 rpm 10 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası dekantasyon ile supernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3 defa yapılarak, elde edilen HA hidrojel partikülleri freezdryer'da 24 saat kurumaya bırakılmıştır.(Şekil3.2)

Uygulama sırasında 10 mg kuru hidrojel 1 ml distile su içerisinde alınmış, 750 rpm hızda bir saat karıştırılarak homojenizasyon sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyon insülin iğnesi yardımıyla 0.2 ml olarak uygulanmıştır.



Şekil 3.2. Hyaluronik asit hidrojelinin taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmesi (Bar: 10 µm)

3.4.3. Lityum yüklü hyaluronik asit hidrojel hazırlanışı

Hazırlanan HA hidrojel partikülleri (300 mg) 0.1 M 40 ml lityum klorür sulu çözeltisine eklenerek iki saat absorpsiyon sağlanmıştır. Lityum yüklü HA partikülleri asetonda çöktürülerek santrifüjlenmiş ve freezdryer'da kurutulmuştur. Absorplanan lityum miktarının belirlenmesi için 5 M HCl çözeltisi ile desorpsiyon sağlanmış ve çözelti ICP/OES cihazında analiz edilmiştir. Yaptığımız çalışma sonucunda TMP çapraz bağlayıcısı ile bağlanmış HA hidrojellerine yüklenen lityum miktarı 12 mg Li/gr hidrojel olarak belirlenmiştir.

Uygulama sırasında 10 mg kuru hidrojel 1 ml distile su içerisinde alınmış, 750 rpm hızda bir saat karıştırılarak homojenizasyon sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyon insülin iğnesi yardımıyla 0.2 ml olarak uygulanmıştır.

3.4.4. Uranil asetat boyasının hazırlanışı

Uranil asetat boyası hazırlanırken 1 gr uranil asetat'ın 20 ml metanol içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Boya +4°C'de, koyu renkli şişelerde ve karanlıkta saklanmıştır. Kullanmadan önce oda sıcaklığına ulaşmasında dikkat edilmiş, her bir örnek 20 dakika filtrelenmiş uranil asetat ile boyanmış sonrasında ultra saf su ile yıkanmıştır.

3.4.5. Reynold's kurşun boyasının hazırlanışı

Reynold's kurşun boyası hazırlanırken 1,73 gr sodyum sitrat ve 1,33 gr kurşun nitrat tartılmıştır. Her iki kimyasalın 30 ml su içerisinde çözünmesi sağlanmış, 1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 12'ye ayarlanmıştır. Bu aşamadan sonra çözelti 50 ml'ye distile su ile tamamlanmış ve tekrar pH 12 olması sağlanmıştır. Boya +4°C'de, koyu renkli şişelerde ve karanlıkta saklanmıştır. Kullanmadan önce oda sıcaklığına ulaşmasına dikkat edilmiş, her bir örnek 4 dakika filtrelenmiş uranil asetat ile boyanmış sonrasında ultra saf su ile yıkanmıştır.

3.4.6. Fosfat tamponunun hazırlanışı

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) hazırlanışında öncelikle sodyum ve potasyum tamponları hazırlanır. Sodyum tamponu için sodyum hidrojen fosfat'dan (Na_2HPO_4) 7,42 gr tartılarak saf su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Potasyum tamponu için monopotasyum fosfat'dan (KH_2PO_4) 5,675 gr tartılarak 412,5 ml içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan bu tamponlardan 360 ml sodyum tamponundan ve 55 ml potasyum tamponundan alınarak karıştırılmıştır. Karışımın pH değeri 7.4 olmalıdır. pH değerinin ayarlanması gerekirse düşük pH için sodyum tamponu, yüksek pH için ise potasyum tamponu kullanılarak ayarlama yapılmıştır.

3.4.7. Toluidin mavisi boyasının hazırlanışı

Toluidin mavisi boyası hazırlanırken 1 gr toluidin mavisi ile 1 gr susuz boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) tartılmıştır. Her iki kimyasal 100 ml ultra saf su içerisine eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan kimyasal örnek boyaması için önce filtrelenmiş daha sonra da sıcaklığı 50 derece olacak şekilde ısıtılmıştır. Alınan yarı ince kesitler 5 dakika boya içerisinde bekletilmiş sonrasında ise 3 kez 30 saniye ultra saf su ile yıkanmıştır.

3.5. Hayvanlara Uygulanan Cerrahi İşlemler

Hayvanlara uygulanan tüm cerrahi işlemler genel anestezi altında yapılmıştır. Anestezik madde olarak intraperitoneal (i.p) Thiopental sodyum (50mg /kg, İ. Ulugay, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Gerekli hallerde anestezi ek ilaç dozlarıyla idame ettirilmiştir. Sıçanların sağ uylukları tüyler makasla kısaltıldıktan sonra tüy dökücü kremlerle temizlenmiştir. Hayvanlar cerrahi masasına tespit edildikten sonra, cerrahi saha Povidon iyodin solüsyonu ile temizlenmiştir. Tüm cerrahi işlemlerde sterilizasyon kurallarına uyulmuştur. Sağ uyluğa cilt kesisini takiben gluteus maximus kası ikiye ayrılarak siyatik sinir ortaya konmuştur. Cerrahi işlemler bu aşamadan sonra gruplara göre farklılık göstermektedir. SHAM grubunda siyatik sinir etraf dokulardan serbestleştirildikten sonra ek işlem yapılmamıştır. OSG'de siyatik sinir trifukasyonun 2mm üzerinden 10 mm'lik sinir parçası çıkarıldıktan sonra ortotopik olarak greft şeklinde tekrar yerine konmuş; proksimal ve distalinden 4'er adet dikişle 8/0 prolenle (Ethicon, İngiltere) tespit

edilmiştir. ST grubunda ise sinirin kesilme sonrası geri çekilmesi de gözönüne alınarak 10 mm'lik sinir parçası çıkarılmış; 14 mm uzunluğundaki silikon tüp içine kesilen sinirin proksimal ve distal güdüğü her biri 2 mm olacak şekilde sokulmuş ve iki güdük arasında nihai olarak 10 mm aralık kalacak şekilde 4 adet 8/0 prolenle tespit edilmiştir (Şekil3.3). Bu aşamadan sonra otolog sinir grefti ve SHAM grubu dışındaki bütün gruplara cerrahi işlem ardından distal bölgeden insülin enjektörü ile 0,2 ml uygulama yapılmıştır. Uygulama sonrasında sinirin distal ve proksimal kısımları steril vazelin kullanılarak kapatılmıştır.



Şekil 3.3. Siyatik sinirin proksimal ve distal uçlarının silikon tüp içine yerleştirilmesi. SL, SH ve SHL gruplarında benzer uygulama yapıldıktan sonra proksimalden enjektör yardımıyla silikon tüp içerisine enjeksiyon saplanmıştır.

3.6. Hayvanların Öldürülmesi ve Biyopsilerin Alınması

Üç aylık bekleme süresini takiben sıçanlar yüksek doz tiyopental sodyum (100mg/kg i.p) anestezisi altında kalpten kanın boşaltılması yoluyla öldürülmüştür. Batınları açılarak aort içine 21 gauge damar tüpü yerleştirilerek önce PBS ile sonra 20 ml %3 gluteraldehit tespit solüsyonu ile yıkanmıştır. Tespit solüsyonunun dokulara iyice yerleşmesi için 10 dakika beklendikten sonra eski sağ uyluk kesisi tekrar açılarak, deney grupları uzunluğu boyunca siyatik sinir, otolog sinir grefti ve ya siyatik sinir-silikon tüp yapılarının proksimal ve distal uçları 5/0 ipek dikişle işaretlenerek blok halinde

çıkarılmıştır. Alınan doku örnekleri %3 gluteraldehit solüsyonuna konularak ışık ve elektron mikroskopik inceleme için ilgili laboratuvara gönderilmiştir.

3.7. Biyopsilerden Işık ve Elektron Mikroskopi Takibi ve İncelemesi

Elektron mikroskobik değerlendirme için alınan doku parçaları bir mm³'lük parçalara ayrılarak %3'lük gluteraldehitli PBS solüsyonuna alındı ve bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün 3 kez 15 dakika PBS solüsyonu ile yıkanan dokular PBS ile hazırlanmış %1'lik osmiyum tetraoksit solüsyonunda iki saat oda ısısında rotatorda karıştırılarak tespit edilmiştir. Daha sonra tekrar 3 kez 15 dakika PBS solüsyonu ile yıkandı. Sonraki aşamalarda aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

- %30'luk alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %50'lik alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %70'lik alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %90'lık alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %95'lik alkolde +4°C'de 15 dakika 2 defa
- %100'lük alkolde +4°C'de 30 dakika 1 defa
- %100'lük alkolde oda ısısında 30 dakika 1 defa

Bu basamaklar ile dehidrasyon aşaması tamamlanmıştır. Bu aşamadan sonra yapılacak işlemler oda ısısında gerçekleştirilmiştir. Dehidrasyon sonrasında şeffaflaştırma işlemi için 2 defa propilen oksitte 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra eş miktarda karıştırılmış propilen oksit ve resin CY212 solüsyonunda 2 saat rotatorda karıştırılmış, bu aşama sonrasında saf resin CY212 içerisine alınarak bir gece rotatorda karıştırılmaya bırakılmıştır. Ertesi gün gömme materyali bulunan kuyucuklara gömme işlemi yapılmış ve 60°C'de 48 saat polimerizasyon işlemine bırakılmıştır.

Ultramikrotom (Leica UltraCutR) kullanılarak histolojik inceleme için 700 nm kalınlığında kesitler ve elektron mikroskobik inceleme için 60 nm kalınlığında kesitler alınmıştır. Histolojik kesitler %1'lik toluidin mavisi ile, elektron mikroskobik kesitler ise metanol içerisinde hazırlanmış %5'lik uranil asetat boyası ve Reynold kurşun boyası ile boyanarak incelenmiştir.

3.8. Histomorfolojik Değerlendirme

Siyatik sınırlardan elde edilen kesitlerin analizi dijital kamera ve tablo kontrol ünitesi içeren bir bilgisayar ile bir araştırma mikroskobundan (Leica DM3000) oluşan stereolojik görüntü analiz birimini (StereoInvestigator) aracılığı ile yapılmıştır. İlk olarak her bir rat için siyatik sinir örneklerinin sınırları küçük büyütmede (10x) belirlenmiştir. İkinci olarak, 20µm x 20µm boyutlarında tarafsız sayım çerçevesi büyüklüğü belirlenmiş, bilgisayar programı tarafından sistematik rastgele bir şekilde örnekleme yapılmış ve yüksek büyütmede (100x) gözlenen aksonlar sayılmıştır.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verileri değerlendirmek için SPSS®(Statistical Package for Social Sciences, IBM Statistic, 22. sürüm) paket programı kullanılmıştır. Değerlerin dağılımları Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Grup içi dağılımlar normal olmadığı için Kruskal-Wallis testi ve Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

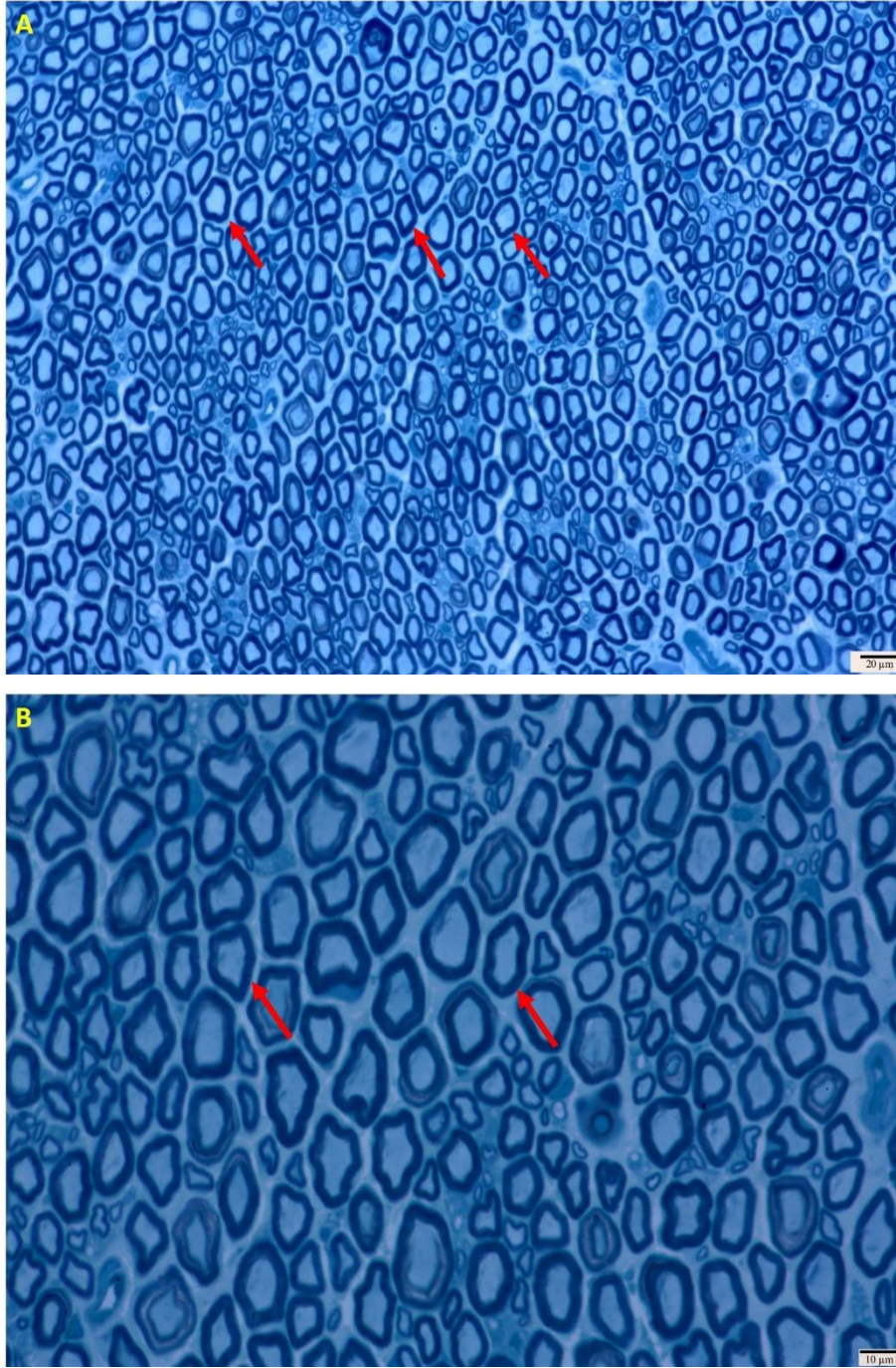
4.BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızın ilk aşamalarında silikon konduitin uygun iç çapının belirlenmesi için 1.0mm, 1.5mm ve 2.0 mm çap ölçüsüne sahip konduitler kullanılmış ve üç ay bekleme süresi sonunda sakrifiye edilen hayvanlarda rejenerasyon bakımından 1.0 mm iç çaplı konduit kullanımının daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Diğer aşama da ise hidrojel konduit içerisine hangi yolla uygulanacağını belirlemek üzere iki farklı deneme yapılmıştır: Birinci gruptaki hayvanlarda, bir ucu sinire eklenmiş konduit içerisine önce hidrojel uygulanmış, ardından konduitin diğer ucu sinire suture edilmiştir. İkinci gruptaki hayvanlarda ise önce konduitin her iki ucu sinire eklenmiş ve daha sonrasında hidrojel, bir iğne (21 gauge) yardımıyla konduit içerisine uygulanmıştır. Üç aylık bekleme periyodu sonrası birinci grupta çalışılan hayvanlarda hem yapı olarak daha ince hem de daha yüzeysel bir rejenerasyon gözlenmiş; ikinci gruptaki hayvanlarda ise daha kalın bir rejenerasyon gövdesi elde edilmiştir ve bu gruptaki hayvanların uygulama yapılan ayaklarını daha iyi kullandıkları gözlenmiştir ve çalışmanın devamında bu veriler göz önüne alınarak uygulamalara devam edilmiştir. Bu doğrultuda hayvanlardan alınan siyatik sinir örneklerinin elektron mikroskopik takipleri gerçekleştirilmiş, hazırlanan bloklardan öncelikle ultramikrotom (Leica Ultracut) yardımıyla 700 nm'lik yarı ince kesitler; daha sonra da 60 nm'lik tam ince kesitler alınmış ve verilerimiz elde edilmiştir.

4.1. Deney Gruplarının Işık Mikroskopik Verileri

Çalışma gerçekleştirilken silikon tüpün yerleşimine göre her gruptan üçer örnek alınmıştır. Silikon tüpün ayağa yakın olan tarafı distal, omuriliğe yakın olan tarafı proksimal, silikon tüp içerisinde kalan bölgesi ise rejenere olarak isimlendirilmiştir. Çalışmamızda rejenere ve distal kısımların ışık mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Aşağıda her örnek için önce rejenere ardından da distal grupların resimleri sunulmuştur.

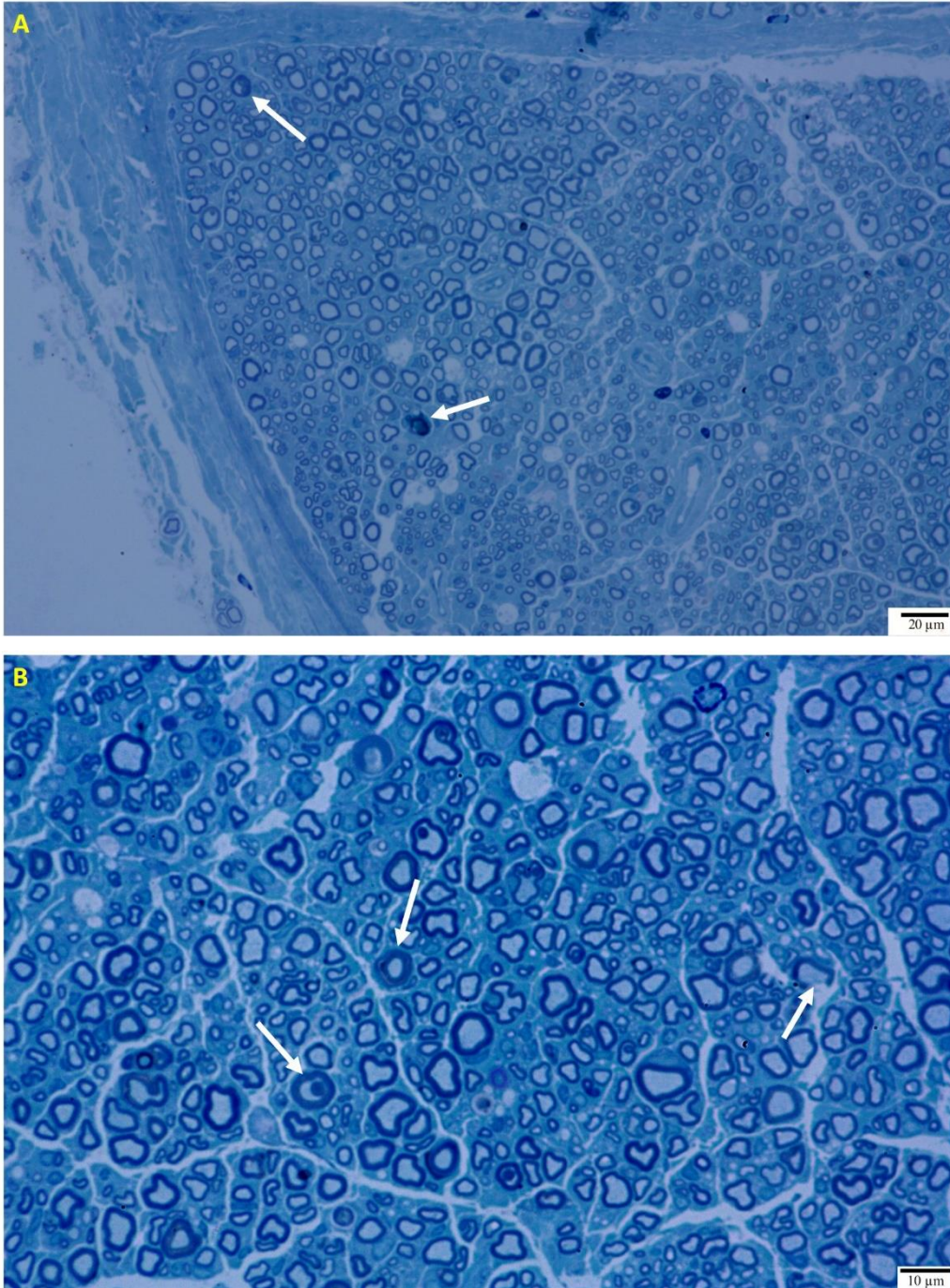
SHAM grubuna ait kesitlerde normal nöral morfoloji (kırmızı ok) izlenmiştir. Siyatik sinirin myelinli aksonları normal görünümde olup çok az myelinsiz akson belirlemiştir (Şekil 4.1).



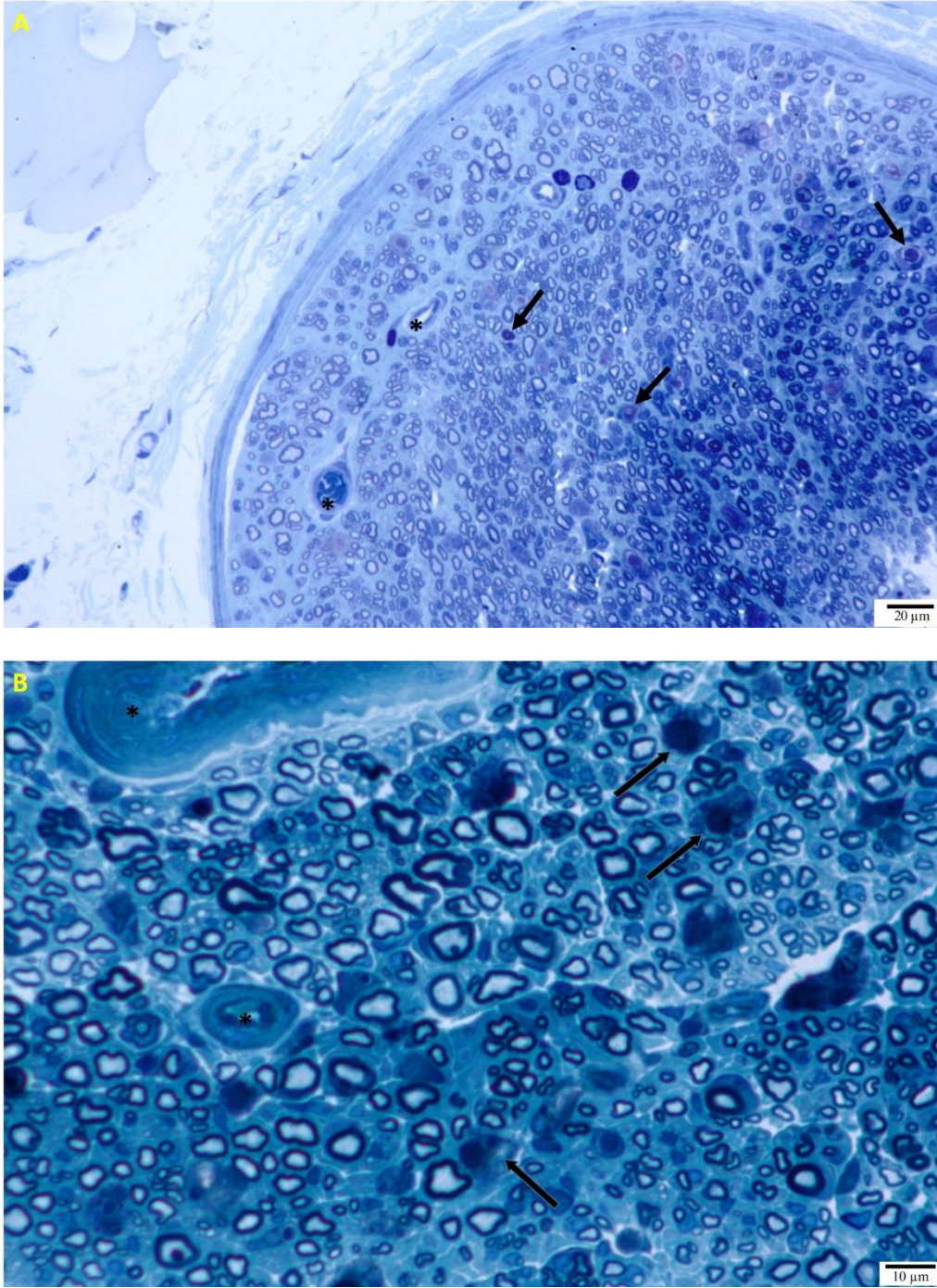
Şekil.4.1. SHAM grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, Normal nöral morfoloji gösteren aksonlar (ok ile gösterilmiştir), skala bar:10µm b) 40x büyütme, Normal nöral morfoloji gösteren aksonlar (ok ile gösterilmiştir), skala bar:10µm

Otograft kullanımı sonrası gözlenen morfolojik bulgular Şekil 4.2’de verilmiştir. Rejenere bölgenin kesitlerinde ise normal miyelinli ve miyelinsiz sinir lifi yapıları gözlenirken, çok az dejenere aksone (beyaz ok) rastlanmıştır. Distal bölgede ise akson

sayıları çok olmakla birlikte birkaç kalın miyelinli aksonda dejenerasyonlar (siyah ok) tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



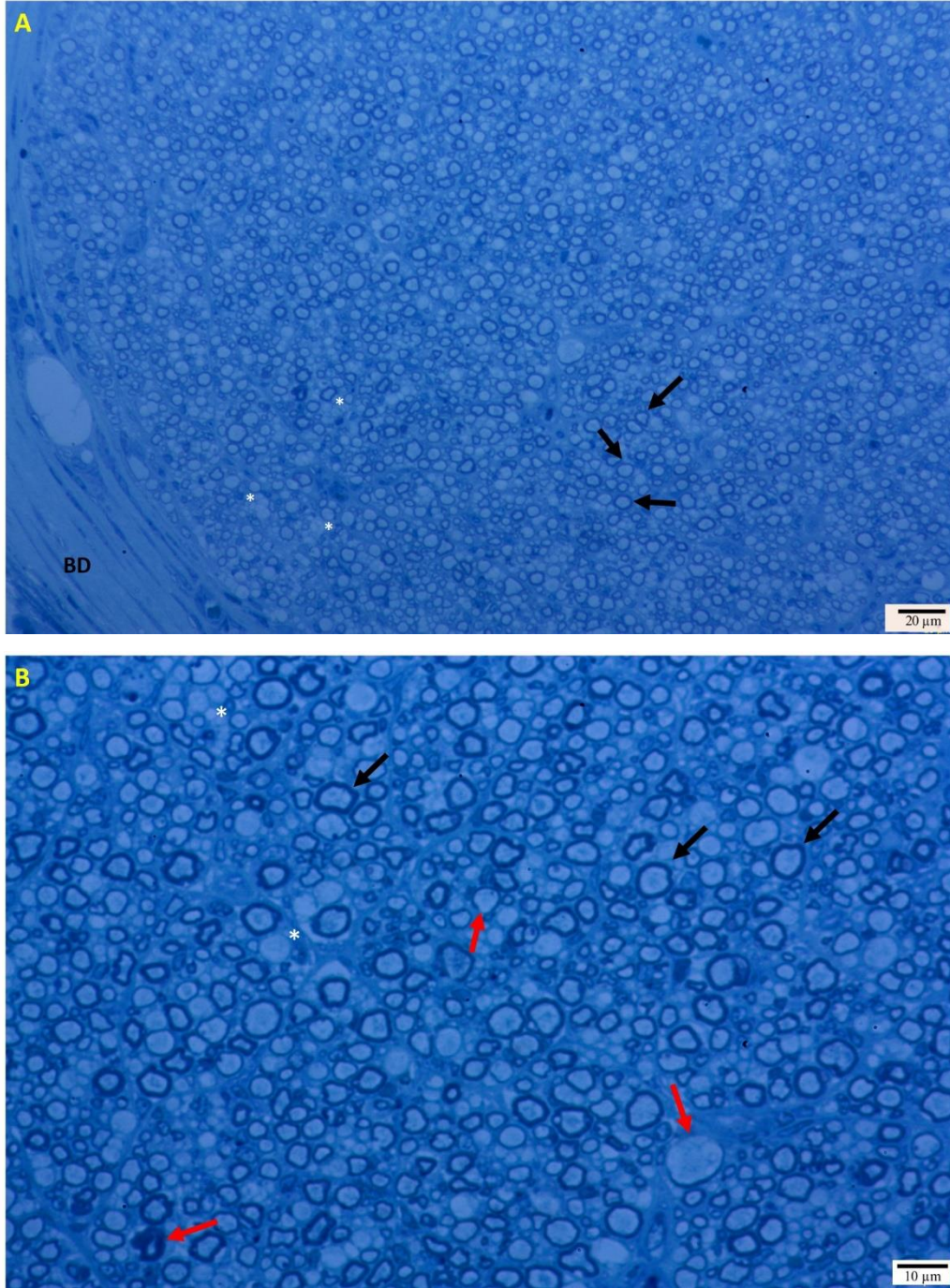
Şekil 4.2. OSG - rejenere grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm b) 40x büyütme, skala bar:10µm



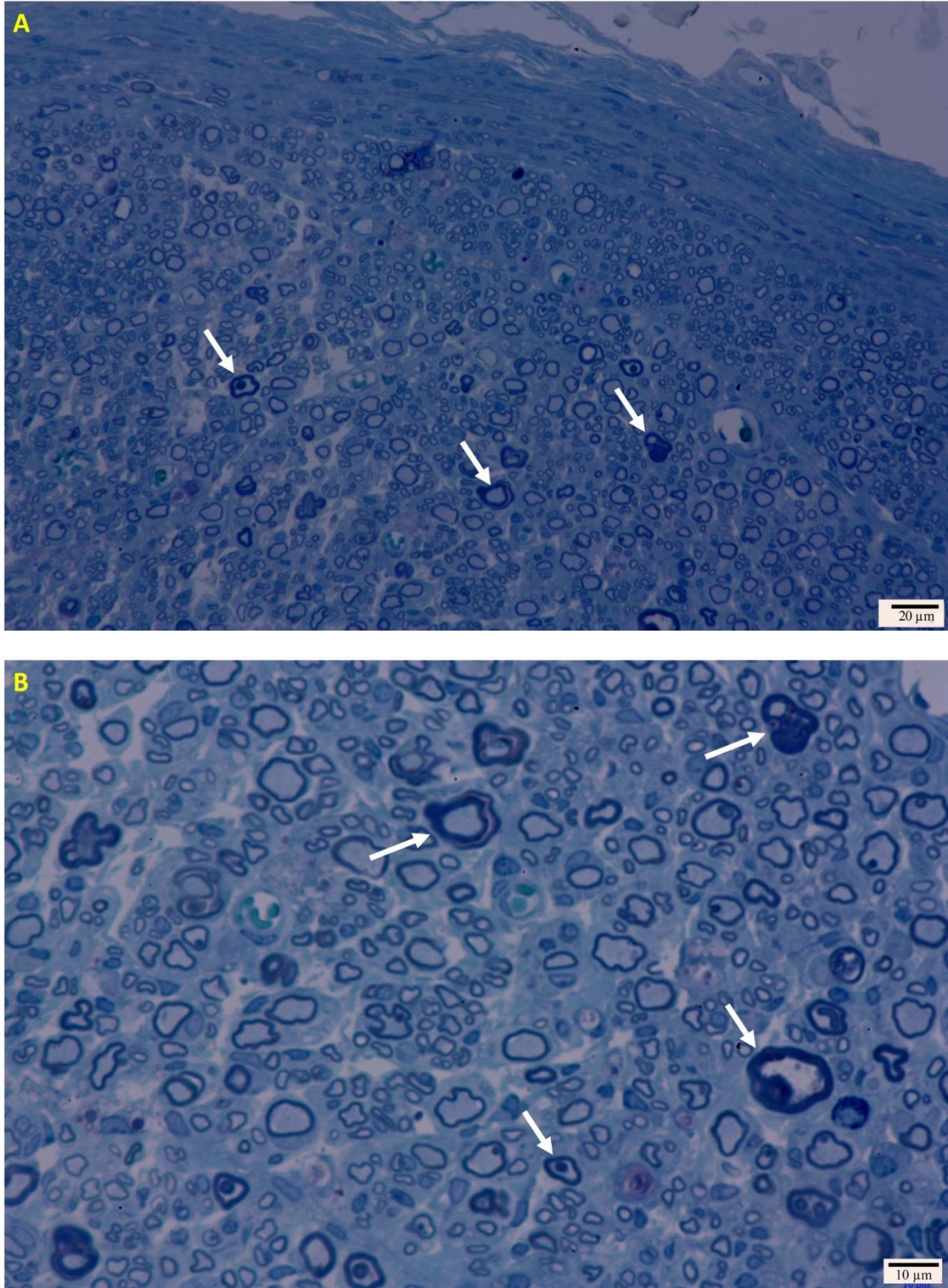
Şekil 4.3. OSG - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) Aksonal dejenerasyon (siyah oklar) ve kan damarları (siyah yıldız) gösterilmektedir, 20x büyütme, skala bar:10µm b) Aksonal dejenerasyon (siyah oklar) ve kan damarları (siyah yıldız) gösterilmektedir,40x büyütme, skala bar:10µm

Sadece silikon konduit uygulanan grupta rejenere alanın periferik kısmında düzgün dağılım gösteren bağ doku yapısı (BD) ve merkeze doğru gidildikçe artan sayıda remyelinize aksonlar dikkat çekmektedir. Akson boyutlarının oldukça küçük ve kalın

myelinli akson sayılarının az olması dikkat çekici bir bulgu olarak belirlemiştir (Şekil 4.4). Aynı örneğin distal bölgesinde ise az sayıdaki büyük miyelinli aksonlarda hasar, akson sayılarında azalma ve yer yer dejenerasyonlar (beyaz ok) tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

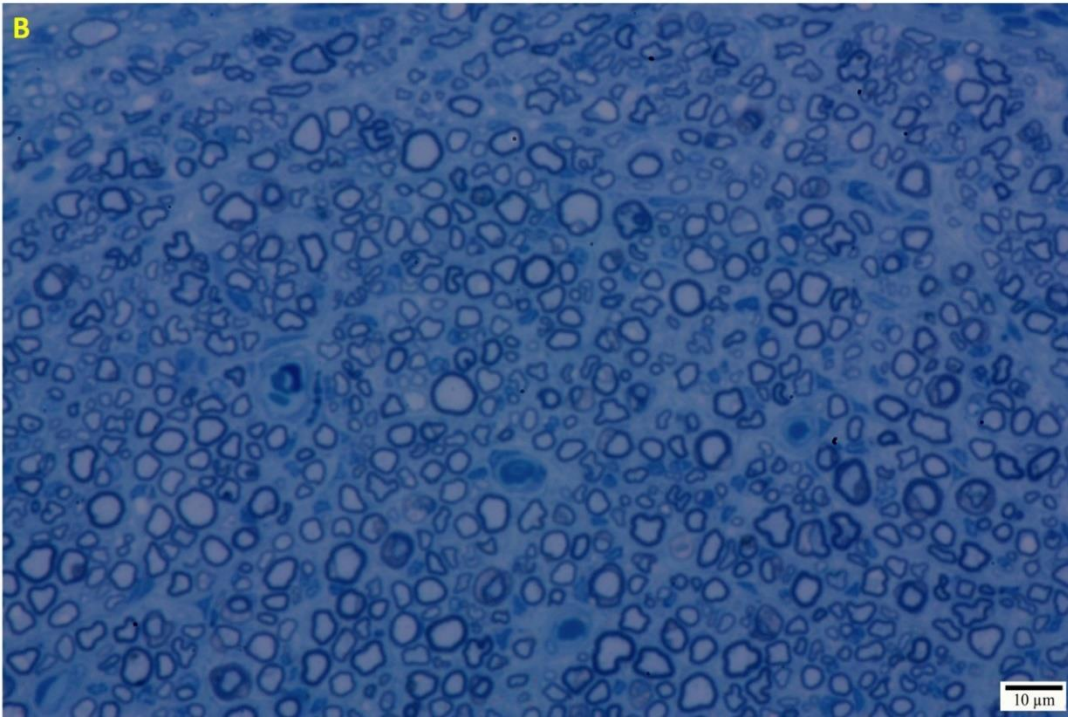
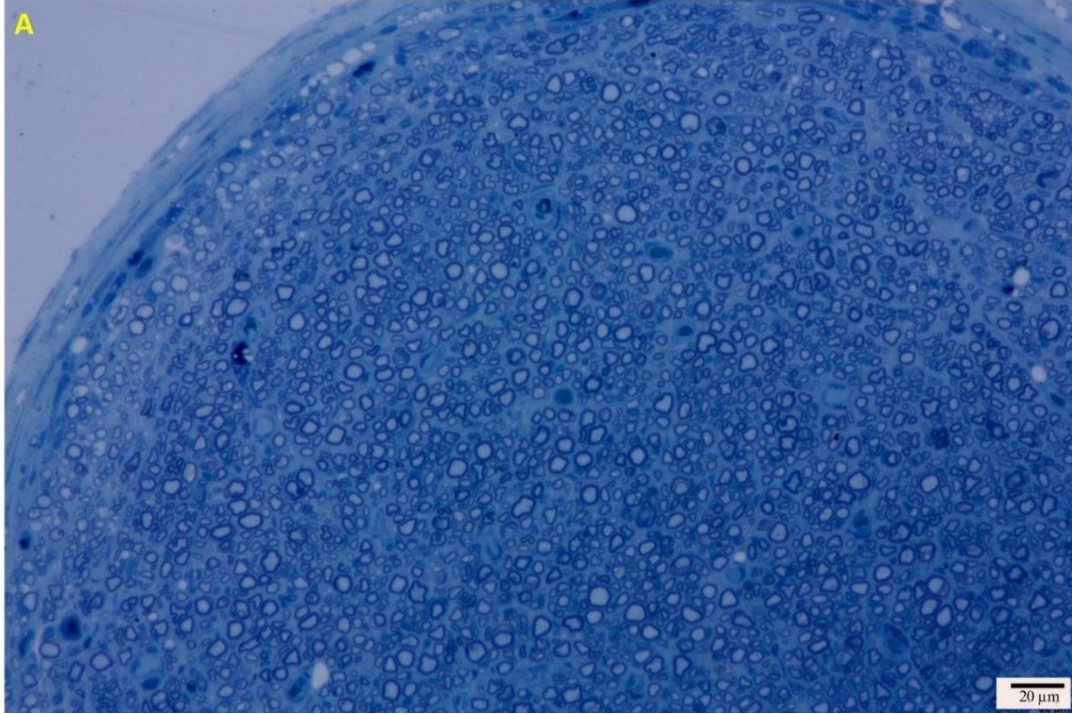


Şekil 4.4. ST - rejenera grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) Bağ dokusu (BD), miyelinli aksonlar (siyah oklar) ve miyelinsiz aksonlar (beyaz yıldız) gösterilmektedir. 20x büyütme, skala bar: 20µm b) Miyelinli aksonlar (siyah oklar), miyelinsiz aksonlar (beyaz yıldız) ve bazı dejenerasyon bulguları (kırmızı oklar) gösterilmektedir. (40x büyütme, skala bar:10µm)



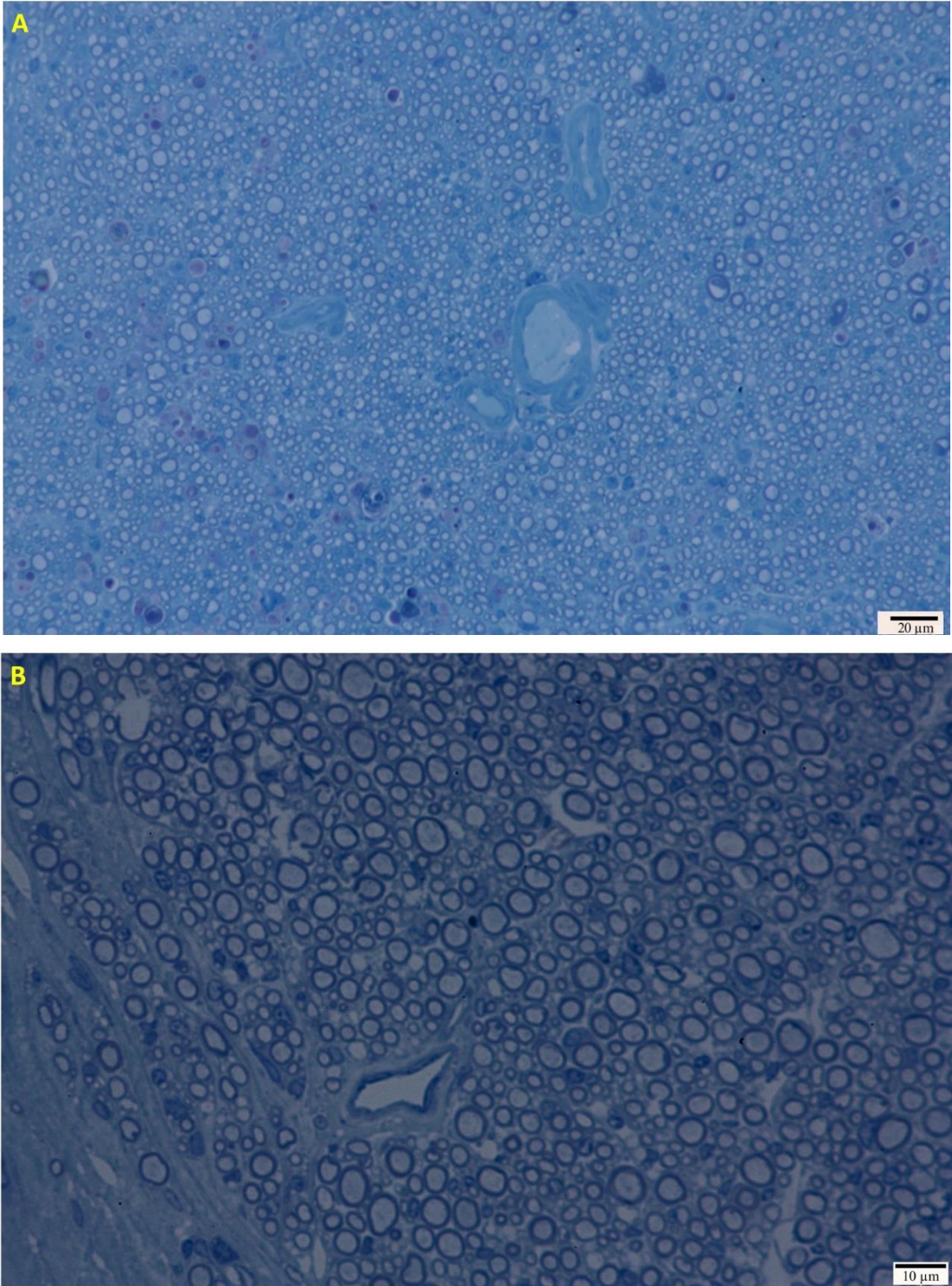
Şekil 4.5. ST - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:20µm b) 40x büyütme, skala bar:10µm

Lityumun direk silikon tüp içerisine uygulaması sonucu elde edilen ışık mikroskopik verilerde rejenere alanda kompakt ve düzenli akson yapıları gözlenmiş ve remyelinize alanlar oldukça fazla belirmiştir (Şekil 4.6). Distal bölgede ise akson yapılarının oldukça düzenli ve kompakt olduğu görülmüştür (Şekil 4.7)



5

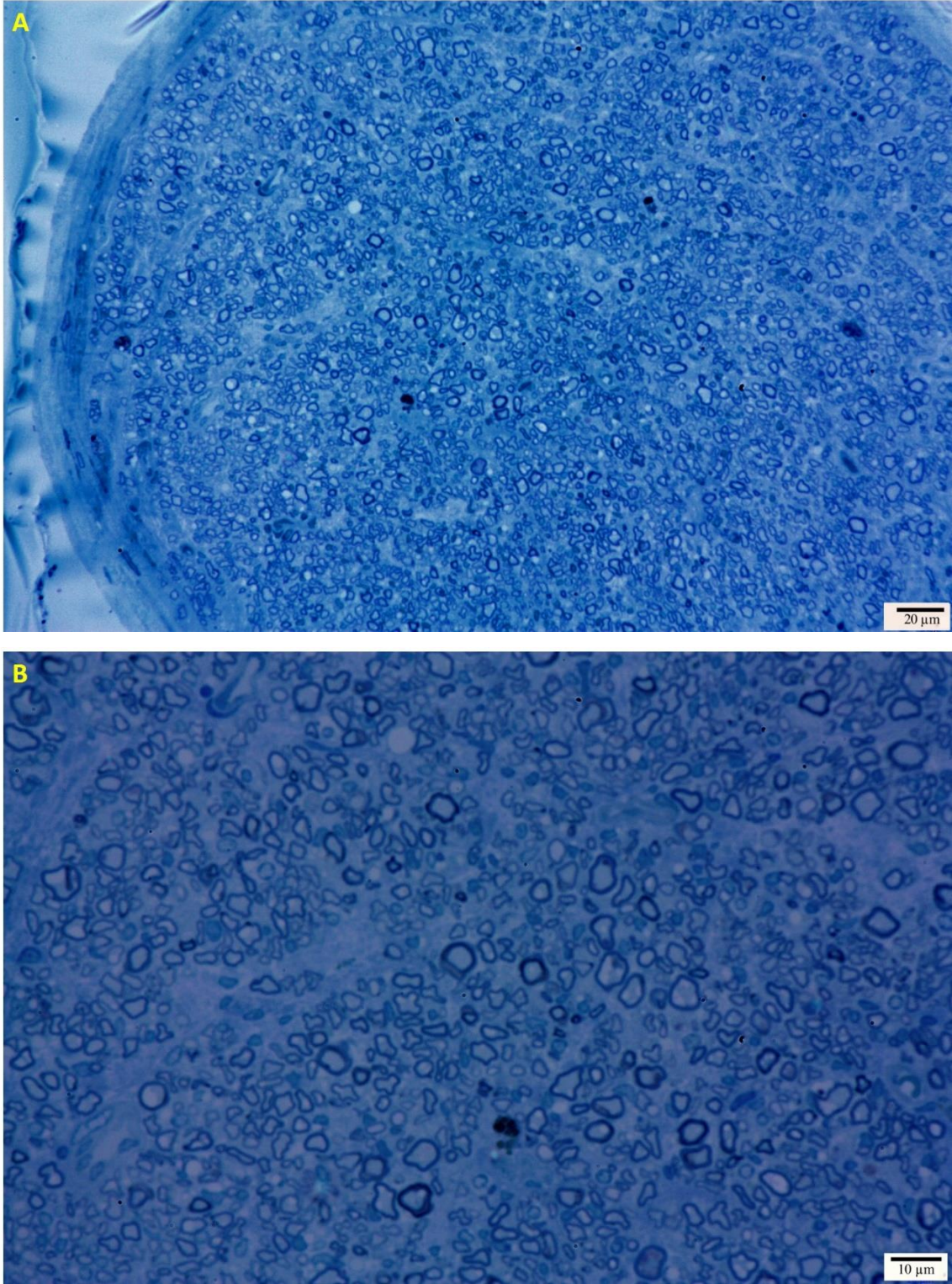
Şekil 4.6. SL – rejenere grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm
b) 40x büyütme, skala bar:10µm



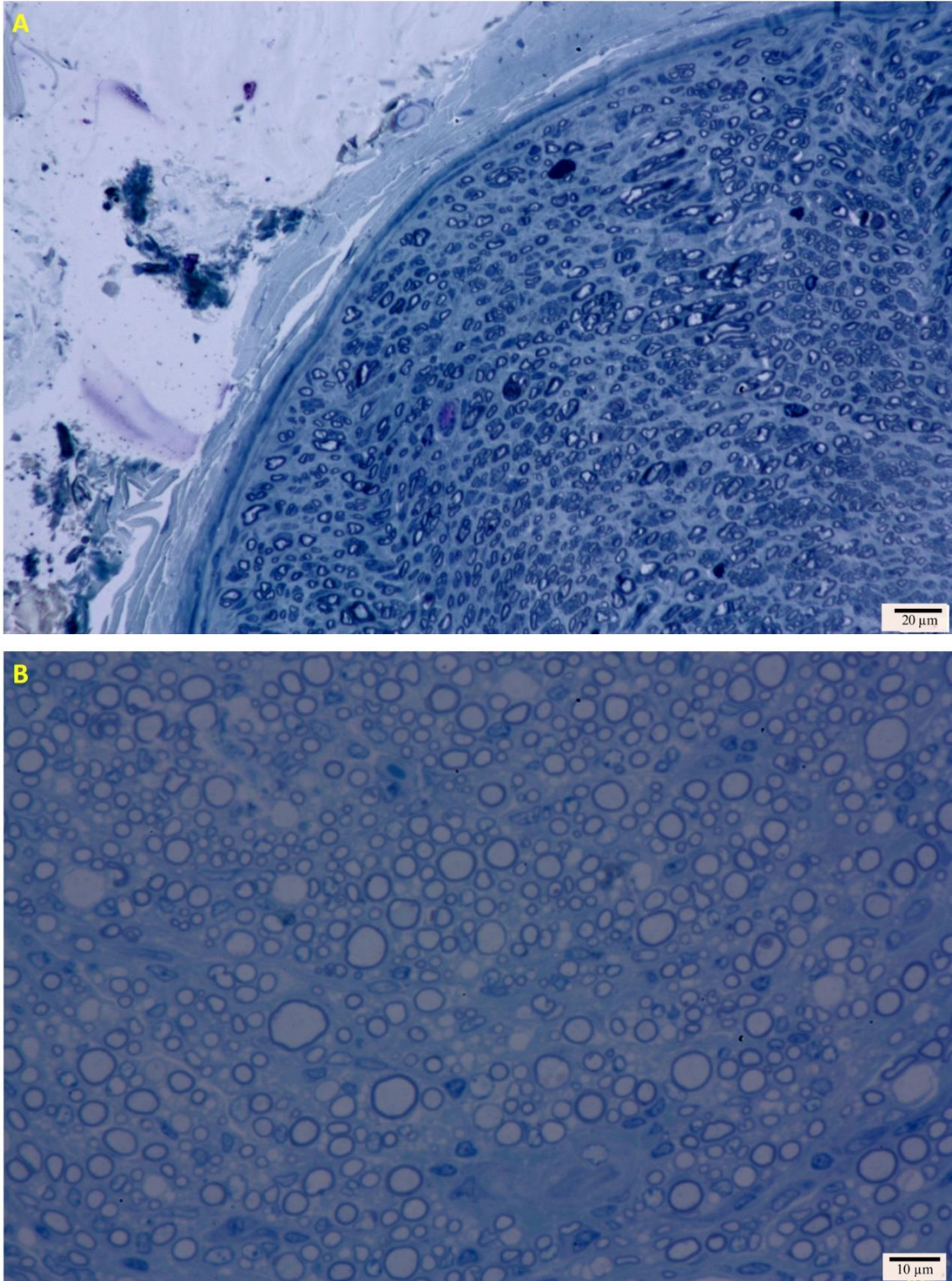
Şekil 4.7. SL - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm b) 40x büyütme, skala bar:10µm

HA hidrojeli kullanılan grupta rejenere bölgede tipik akson ve miyelin yapıları gözlenmekle birlikte yer yer akson sayılarında azalma görülmektedir. Remiyelinizasyon

fazladır. Kalın myelinli akson sayısı ise çok azdır (Şekil 4.8). Distal bölgede ise bazı alanlarda myelinli liflerde kopma ve dejenerasyonlar tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



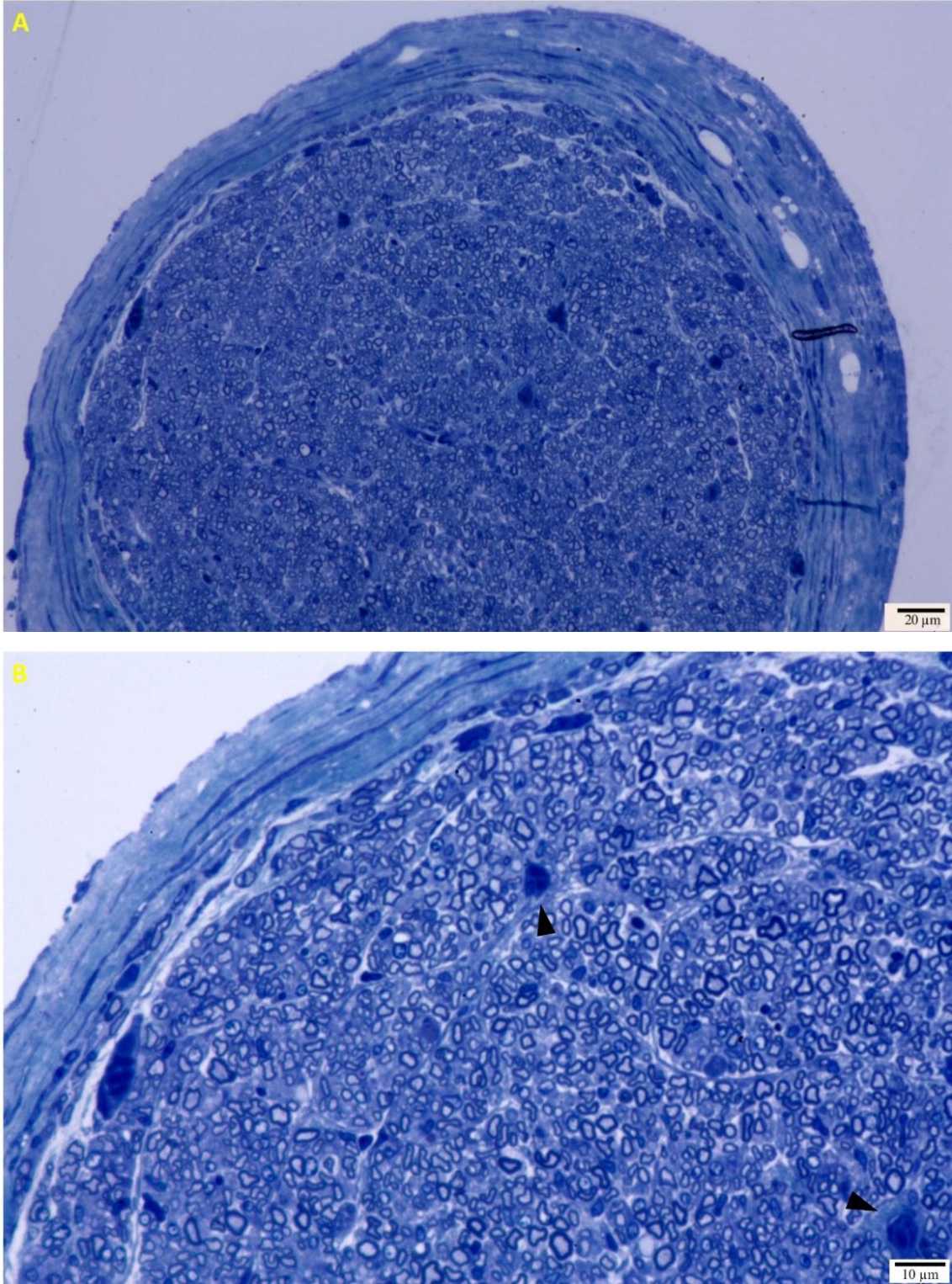
Şekil 4.8. SH - rejenere grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm
b) 40x büyütme, skala bar:10µm



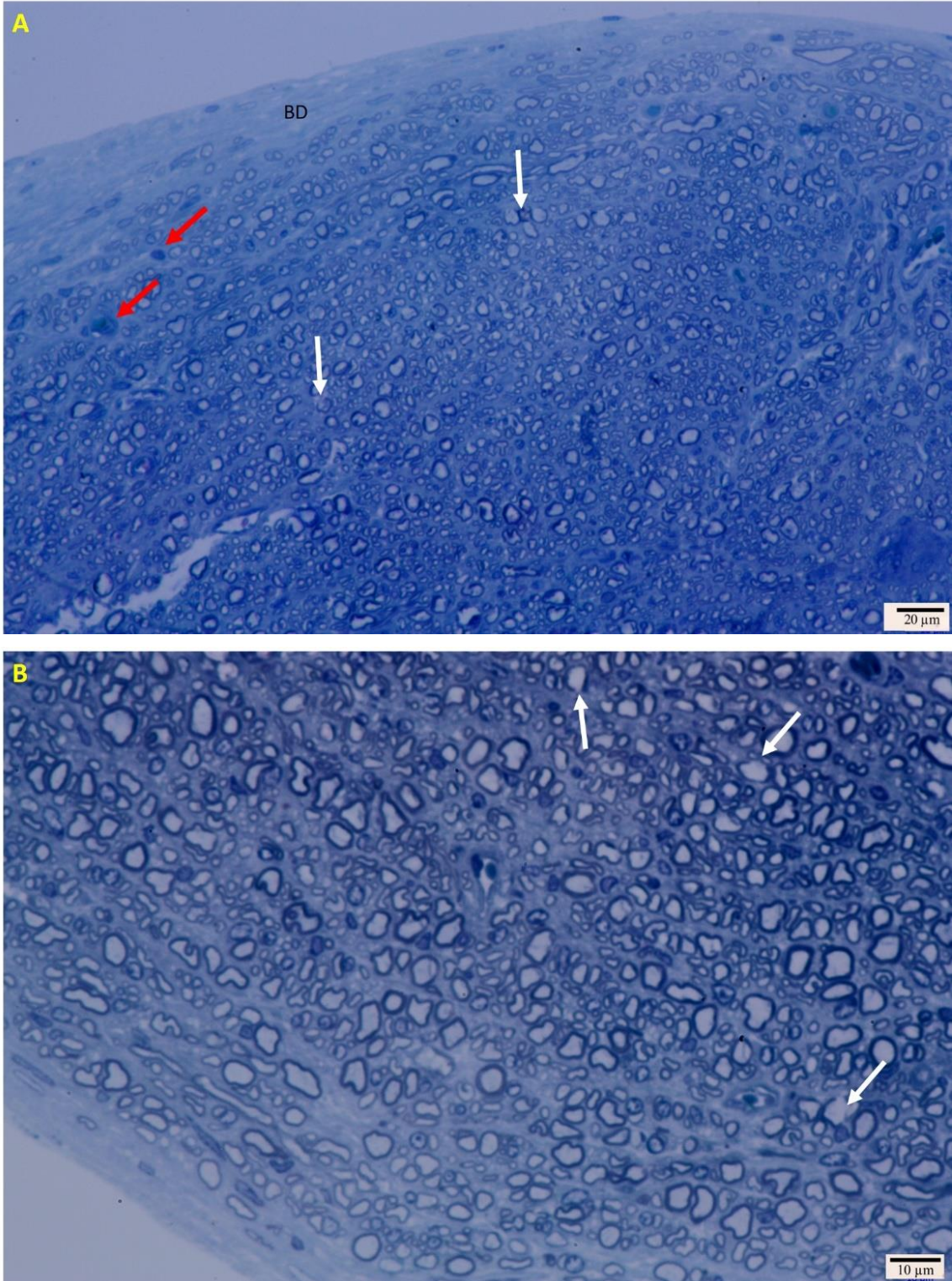
Şekil 4.9. SH - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10μm b) 40x büyütme, skala bar:10μm

Lityum taşıyan hyaluronik asit hidrojel uygulamasında, rejenere bölgede normal morfolojik bulgular tespit edilmiş olup, akson boyutlarının oldukça küçük ve düzenli

olmadığı göze çarpmaktadır (Şekil 4.10). Distal alanda ise düzensiz akson dağılımı yanında yer yer aksonal kopma ve hasarlar (beyaz ok) tespit edilmiştir (Şekil 4.11)



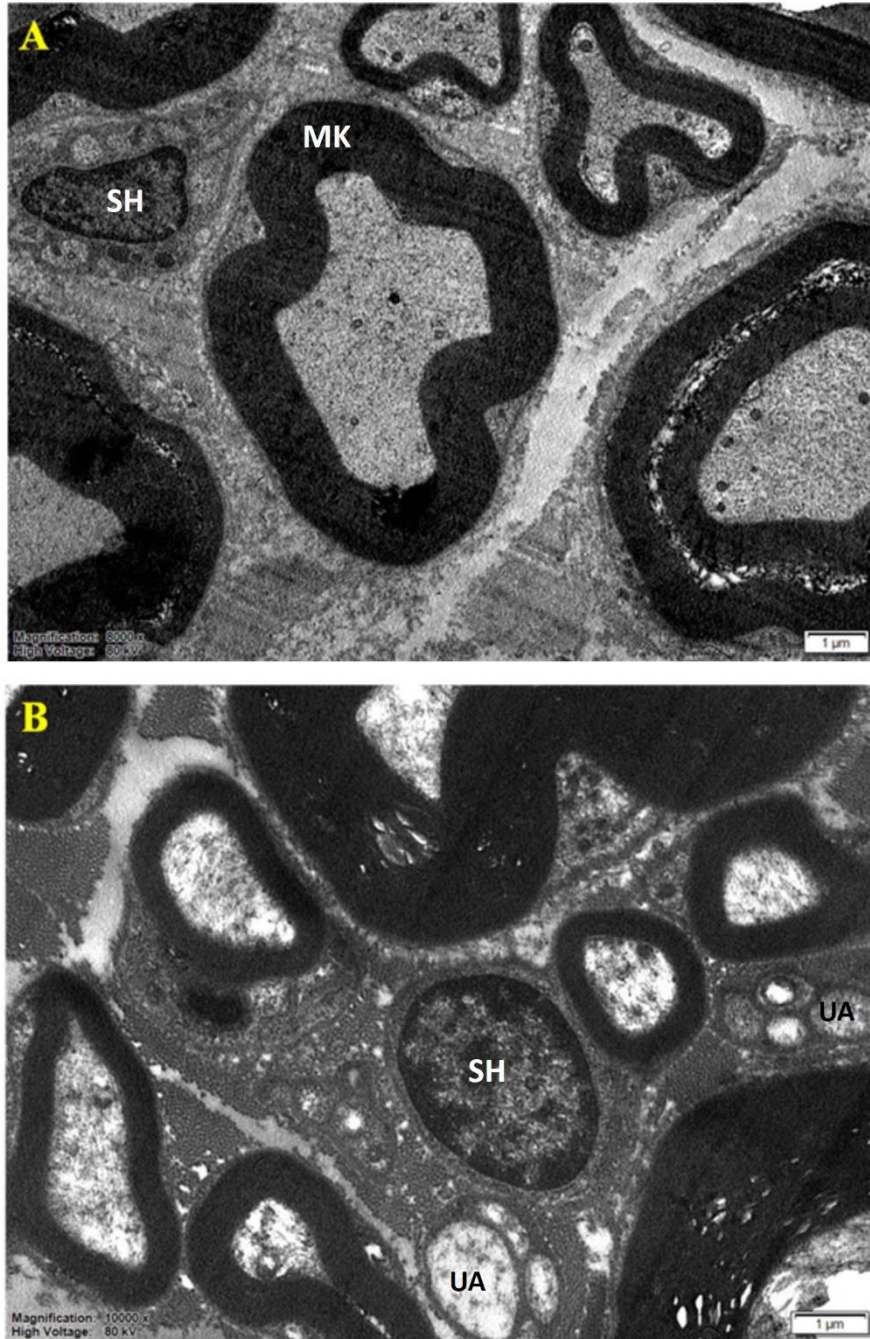
Şekil 4.10. SHL - rejenerere grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) 20x büyütme, skala bar:10µm b) Aksonal dejenerasyon bulgusu (siyah ok başı) gösterilmiştir. 40x büyütme, skala bar:10µm



Şekil 4.11. SHL - distal grubu ışık mikroskopik görüntüsü a) Bağ doku (BD), aksonal dejenerasyon (kırmızı ok) ve aksonal kopmalar (beyaz ok) gösterilmiştir. 20x büyütme, skala bar:10µm b) Aksonal kopmalar (beyaz ok) gösterilmiştir 40x büyütme, skala bar:10µm

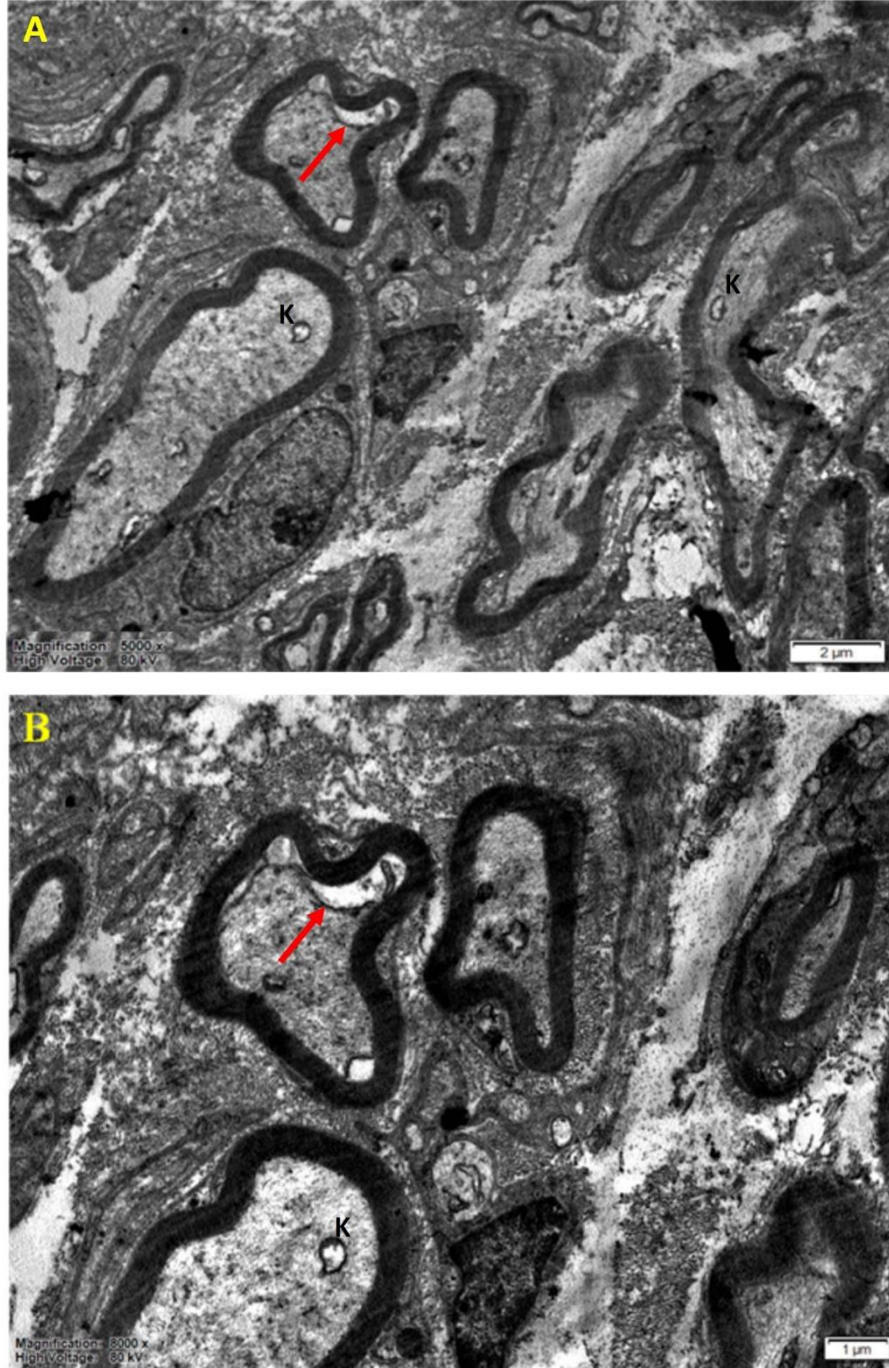
4.2. Deney Gruplarının Elektron Mikroskopik İncelenmesi

TEM ile elde edilen görüntülerde SHAM grubuna ait aksonlar organize ve koyu boyanmış bir filament ağıyla karakterize olarak belirmiştir. Akson stoplazması normal ultrayapısal morfolojiler göstermektedir (Şekil 4.12).



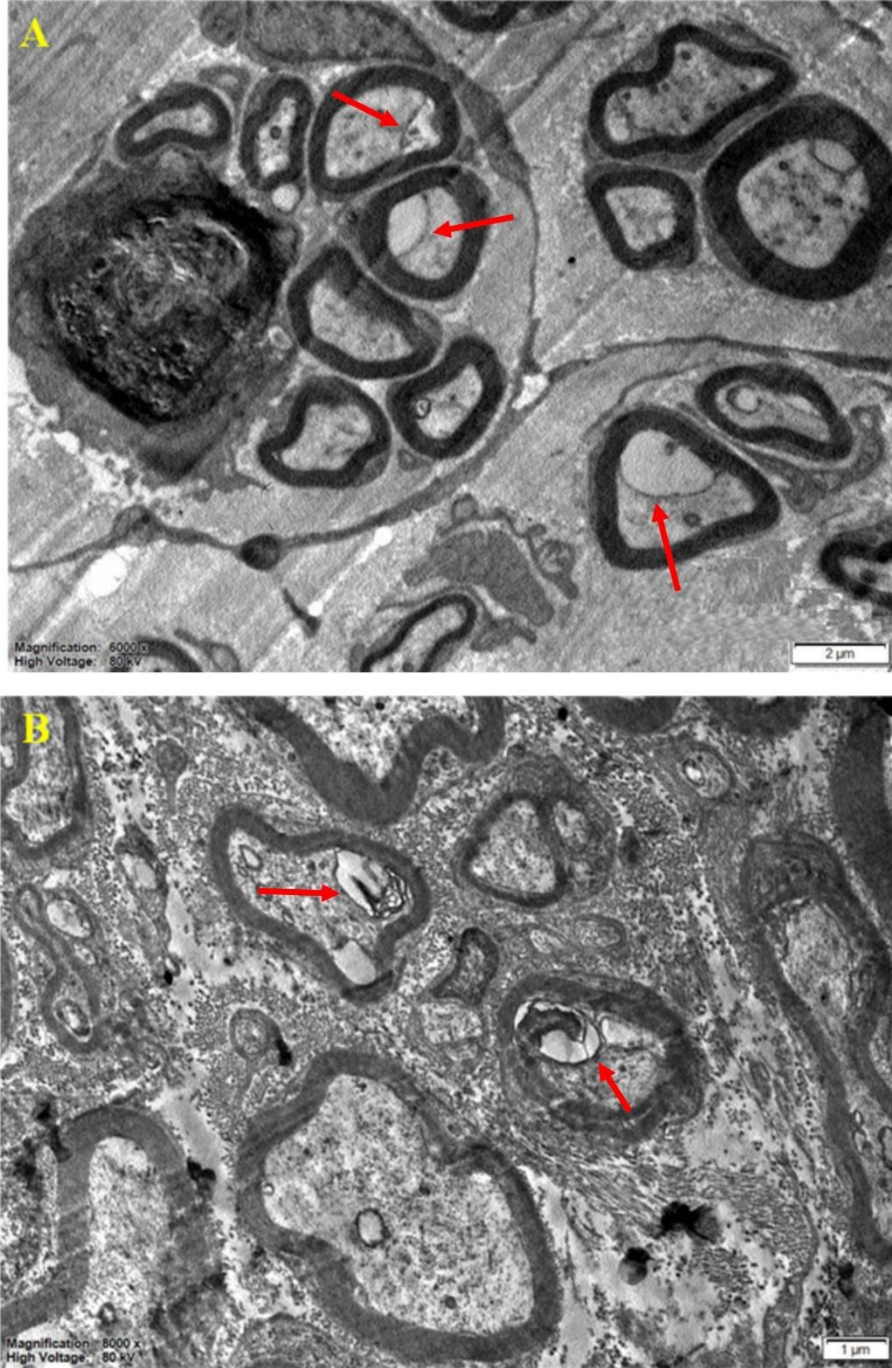
Şekil 4.12. SHAM grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Schwann hücreleri (SH) ve miyelin kılıf (MK) gösterilmiştir. Bar: 1 µm, B) Schwann hücreleri (SH) ve miyelinsiz aksonlar (UA) gösterilmiştir Bar: 1 µm

Otograft kullanımı sonrası rejenerasyon alanlarında gözlenen morfolojik bulgular Şekil 4.14’de verilmiştir. Kesitlerde aksonal büzüşme ve kofullaşma (K) gözlenirken, yer yer akson miyelin ayrılmaları (kırmızı ok) dikkat çekmiştir (Şekil 4.13).



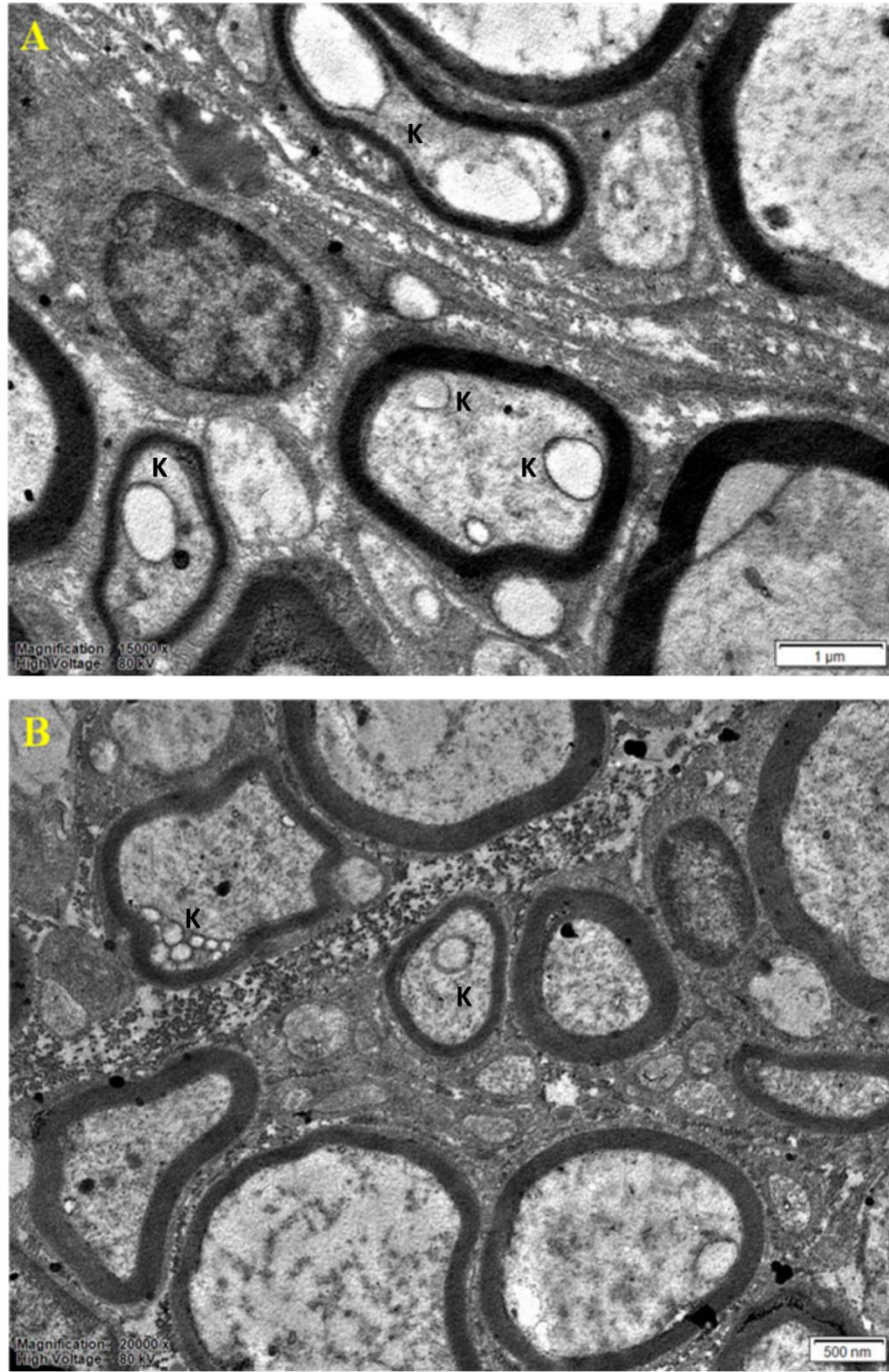
Şekil 4.13. OSG - rejenerasyon grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 2 µm B) Bar: 1 µm

Distal bölgede ise akson miyelin ayrılmalarında (kırmızı ok) belirgin artış tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



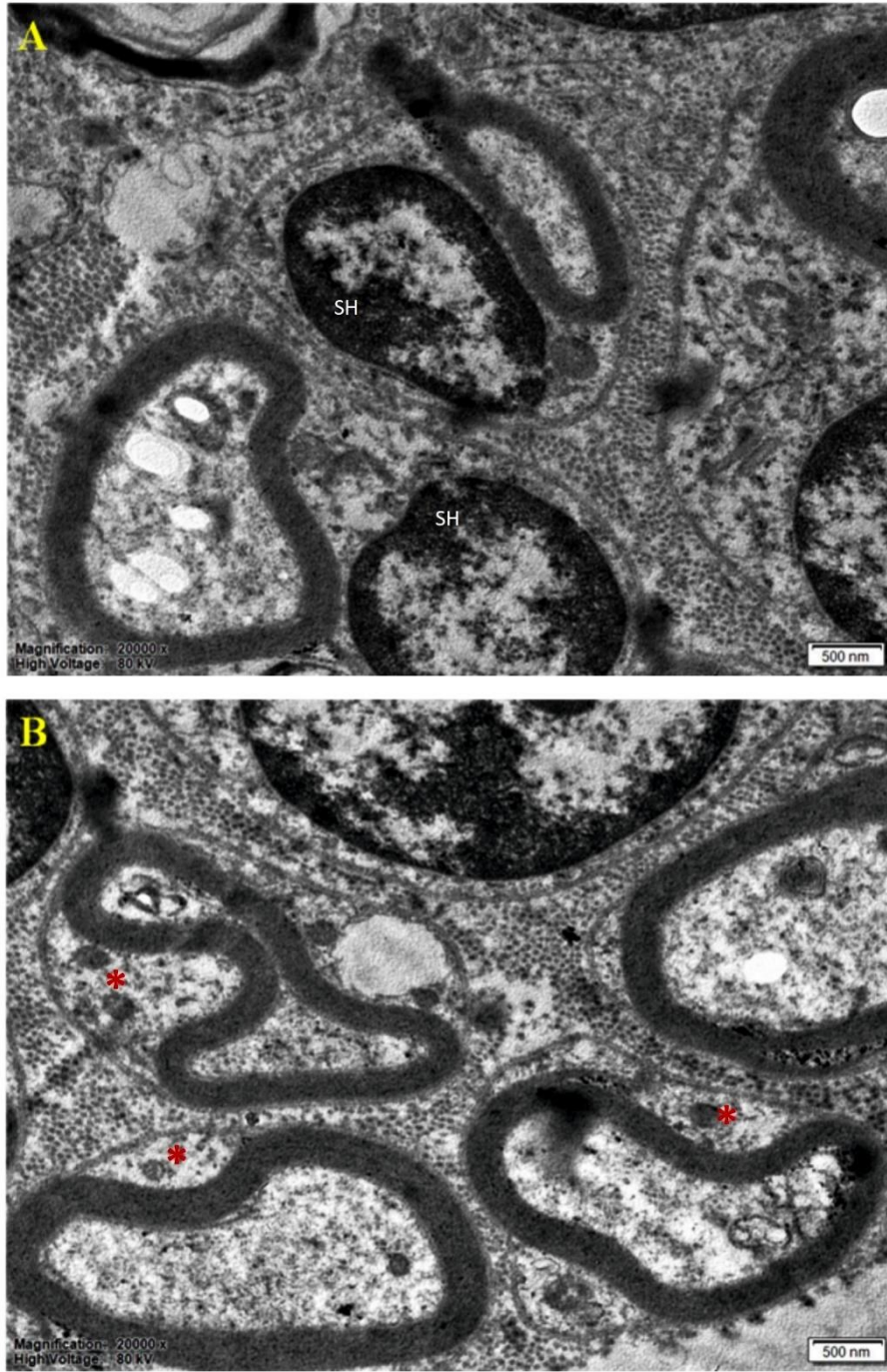
Şekil 4.14. OSG - distal grubu elektron mikroskobik görüntüsü A) Bar: 2 μm B) Bar: 1 μm

Sadece silikon konduit uygulanan grupta rejenerasyon alanında akson ve miyelin yapılarının düzenli olduğu gözlenmiştir. Az sayıda rejenerasyon bölgeleri ve aksoplazmada kofullaşma (K) belirgin olarak gözlenmektedir. Miyelinsiz aksonlar ise düzenli olarak belirmiştir (Şekil 4.15).



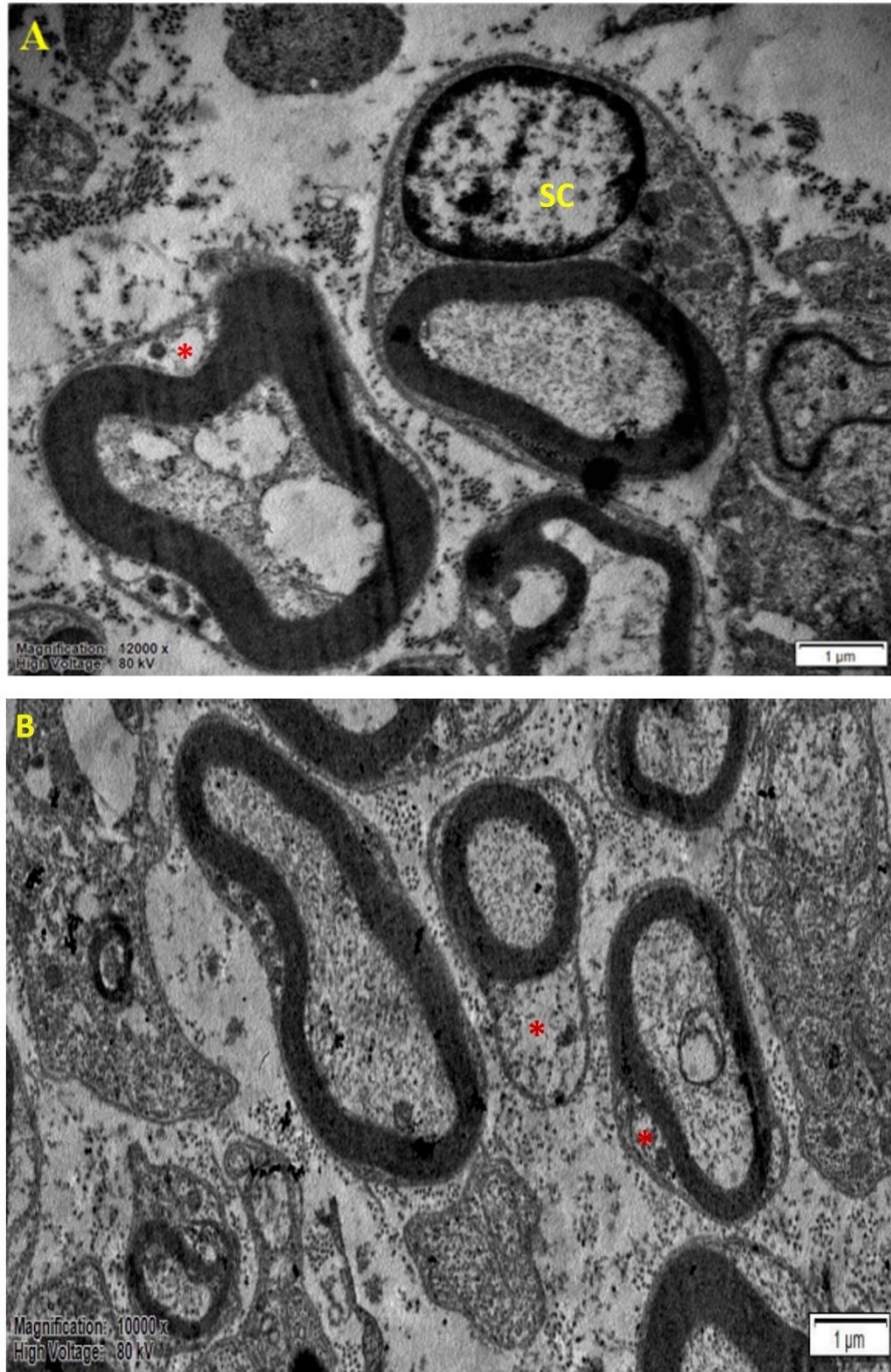
Şekil 4.15. ST - rejenere grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 1 µm B) Bar: 500 nm

Aynı örneğin distal bölgesinde ise aksonal büzüşmeler başlamış olup Schwann hücreleri (SH) normal görünümündedir (Şekil 4.16).



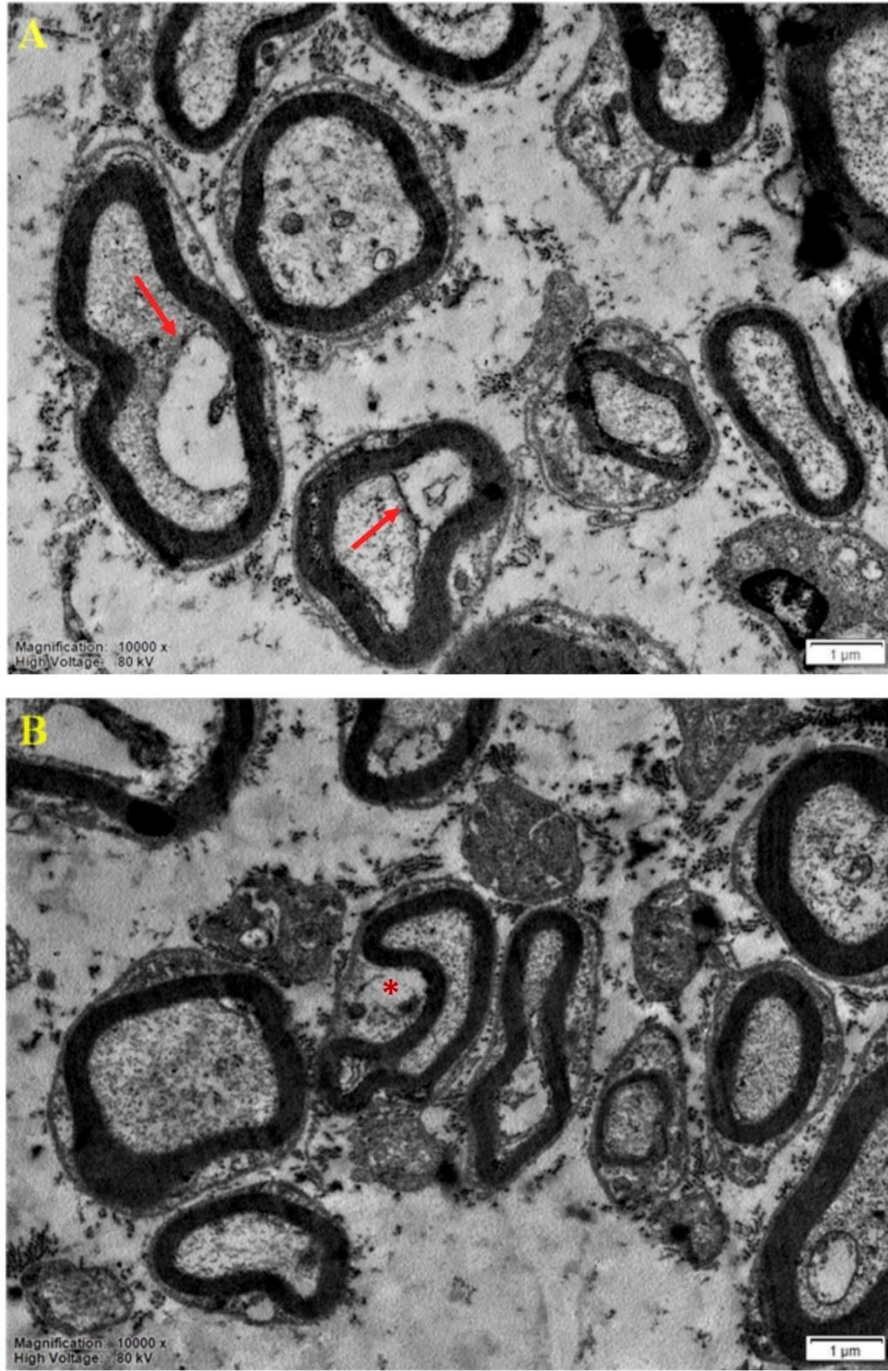
Şekil 4.16. ST - distal grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 500 nm B) Aksonal çökmeler yıldız ile gösterilmiştir. Bar: 500 nm

Lityumun direk uygulaması sonucu elde edilen verilerde rejenere alanda Schwann hücreleri normal görümlü iken en dikkat çekici bulgu kalın miyelinli aksonlarda akson miyelin ayrılmalarının gözlenmesidir. Miyelinsiz aksonlar normaldir. Miyelin fiberler normal görünümündedir (Şekil 4.17).



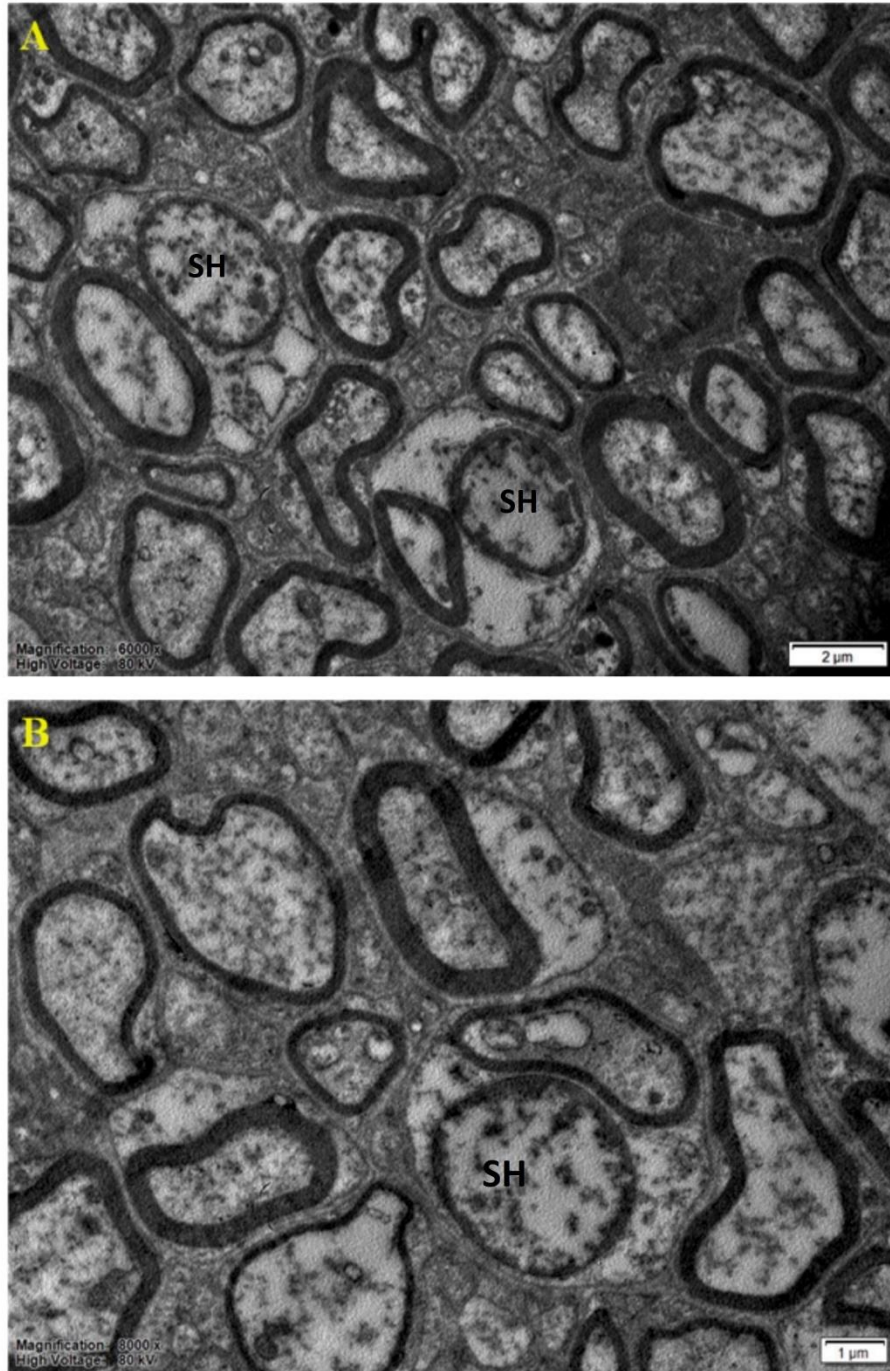
Şekil 4.17. SL - rejenerasyon grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 1 µm B) Aksonal çökmeleri yıldız ile gösterilmiştir. Bar: 1 µm

Distal bölgede ise akson miyelin ayrılmaları (ok yine bazı alanlarda gözlenmiş ve miyelinli liflerin en dış kısımlarında lamellar ayrılmalar gözlenmiştir (Şekil 4.18).



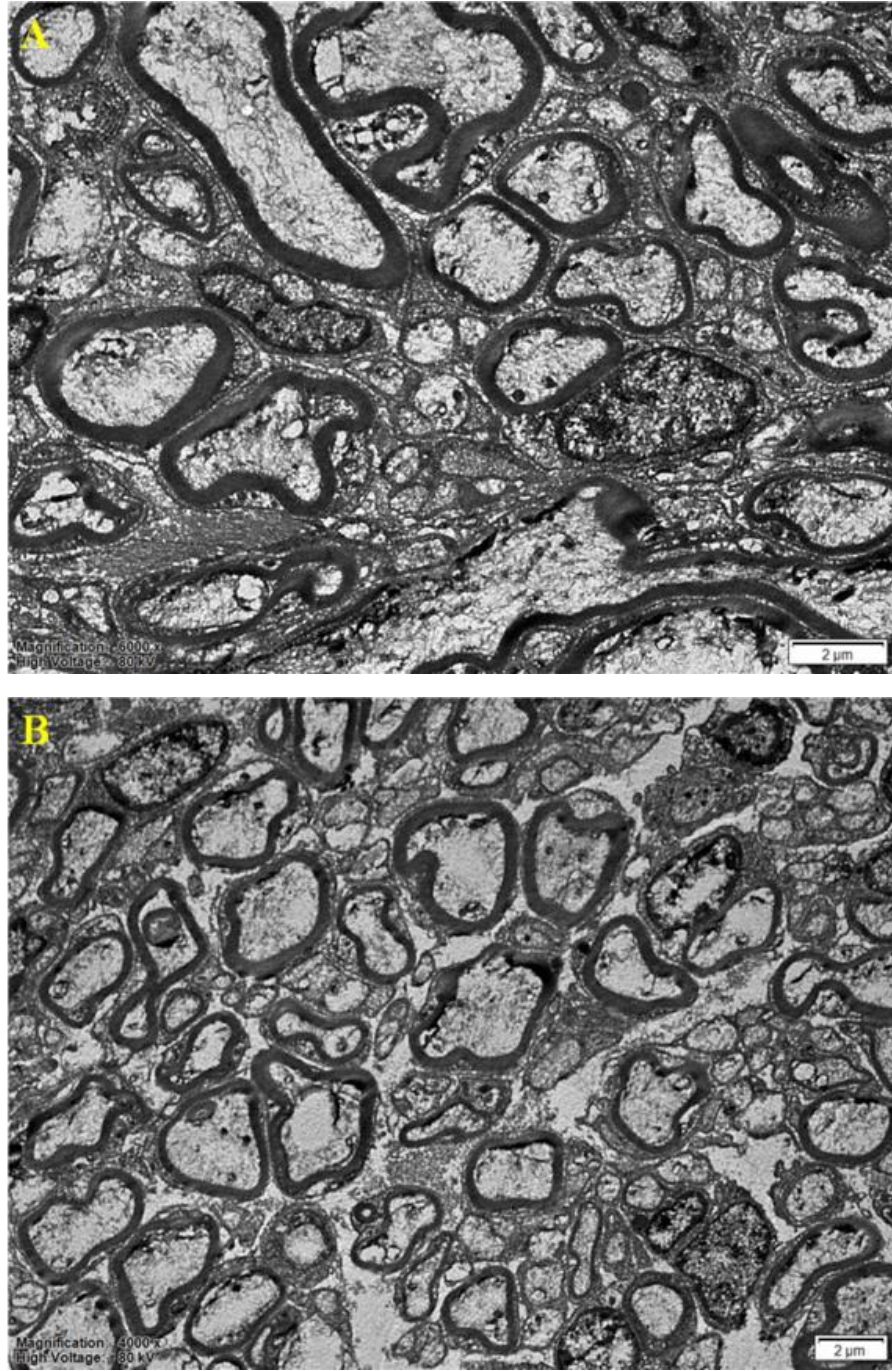
Şekil 4.18. SL - distal grubu elektron mikroskobik görüntüsü A) Bar: 1 µm B) Aksonal çökmeler yıldız ile gösterilmiştir. Bar: 1 µm

Hyaluronik asit hidrojel kullanılarak yapılan grupta rejenerasyon bölgesinde kalın myelinli akson sayısı az olup Schwann hücrelerinde (SH) belirgin şişmeler izlenmiştir. Akson yapıları ise genel olarak düzgündür (Şekil 4.19).



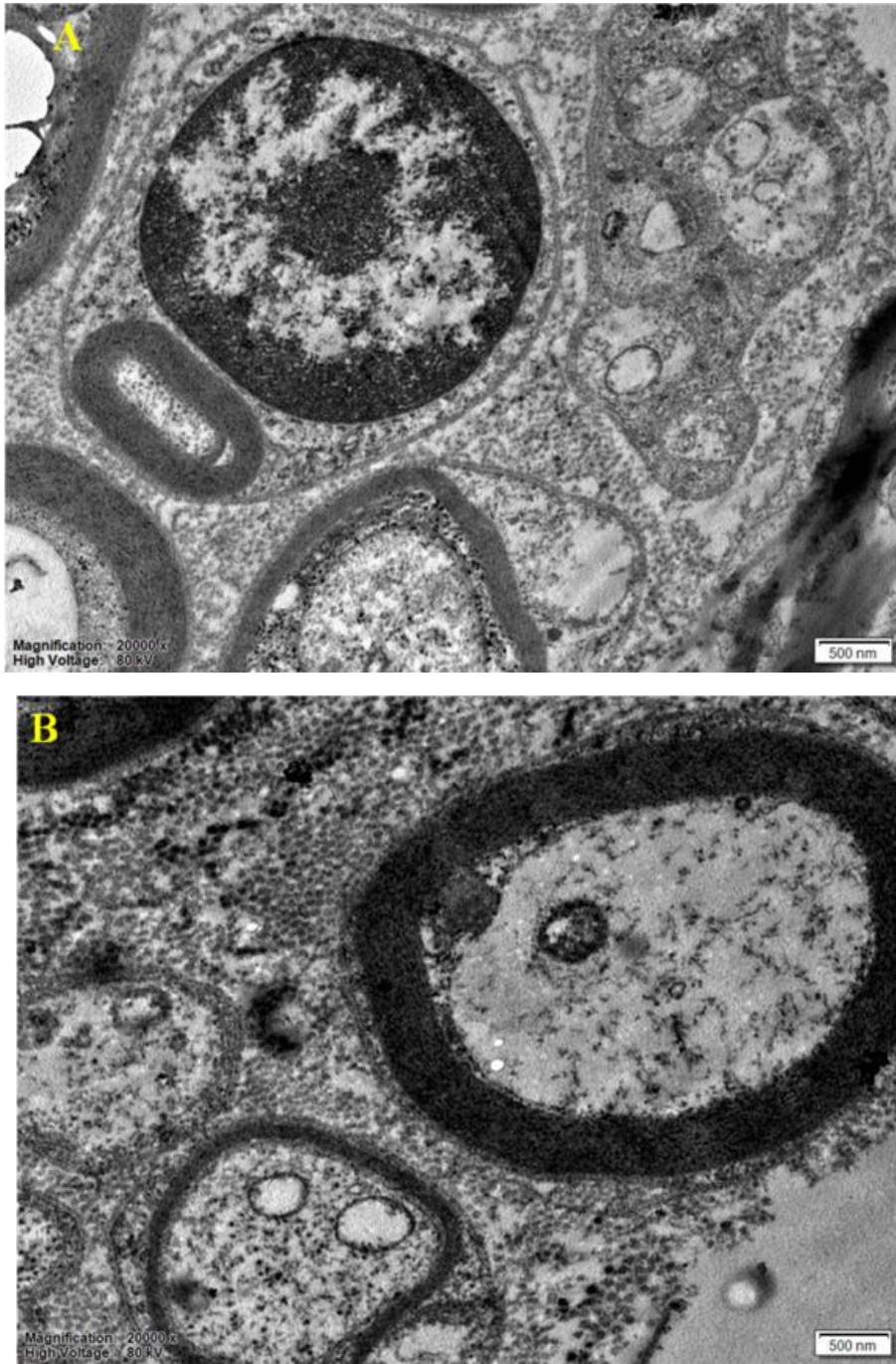
Şekil 4.19. SH - rejenerere grubu elektron mikroskobik görüntüsü A) Bar: 2 µm B) Bar: 1 µm

Distal bölgede ise akson yapıları rejenerere bölgeye göre anlamlı derecede dejeneratif ve büzüşmüş biçimde gözlenmiştir. Akson miyelin ayrılmaları ve atipik Schwann hücre görünümleri dikkat çekmektedir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. SH - distal grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 2 μ m B) Bar: 2 μ m

Lityum taşıyan hyaluronik asit hidrojel uygulamasında, rejenere bölgede normal morfolojik bulgular tespit edilmiş olup, Schwann hücreleri ve myelinsiz kılıflar oldukça sağlam görünümündedir. Bazı alanlarda tamamlanmamış remiyelinizasyon bölgeleri tespit edilmiştir. Kalın miyelinli aksonlarda önemli bir hasar gözlenmemiş, az sayıda miyelinli aksonda da kofullar izlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. SHL - rejenerere grubu elektron mikroskobik görüntüsü A) Bar: 500 nm B) Bar: 500 nm

Distal alanda ise Schwann hücreleri sağlıklı görünümünü korumakta olup miyelin kılıflarda çok ciddi bir hasara rastlanmamıştır (Şekil 4.22).

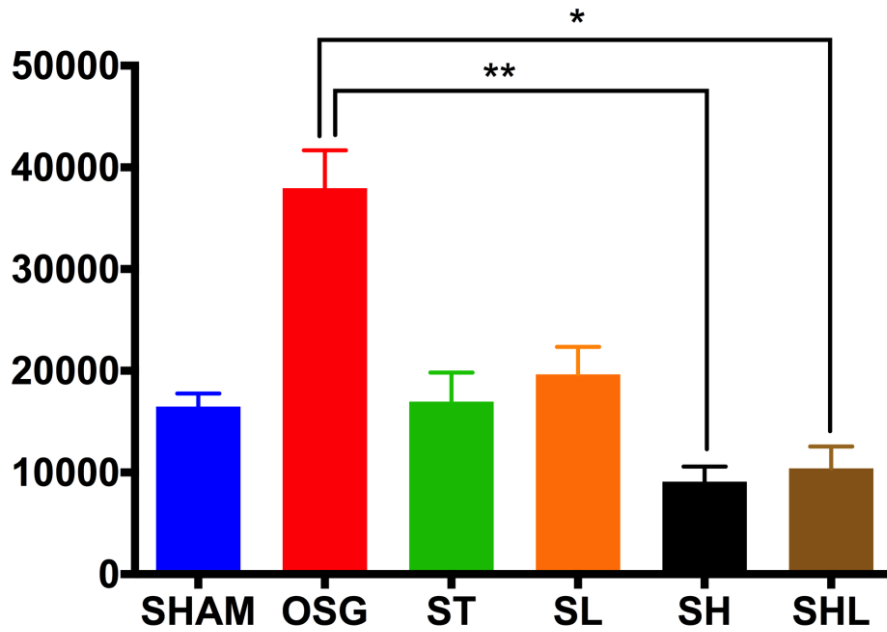


Şekil 4.22. SHL - distal grubu elektron mikroskopik görüntüsü A) Bar: 500nm B) Bar: 1 µm

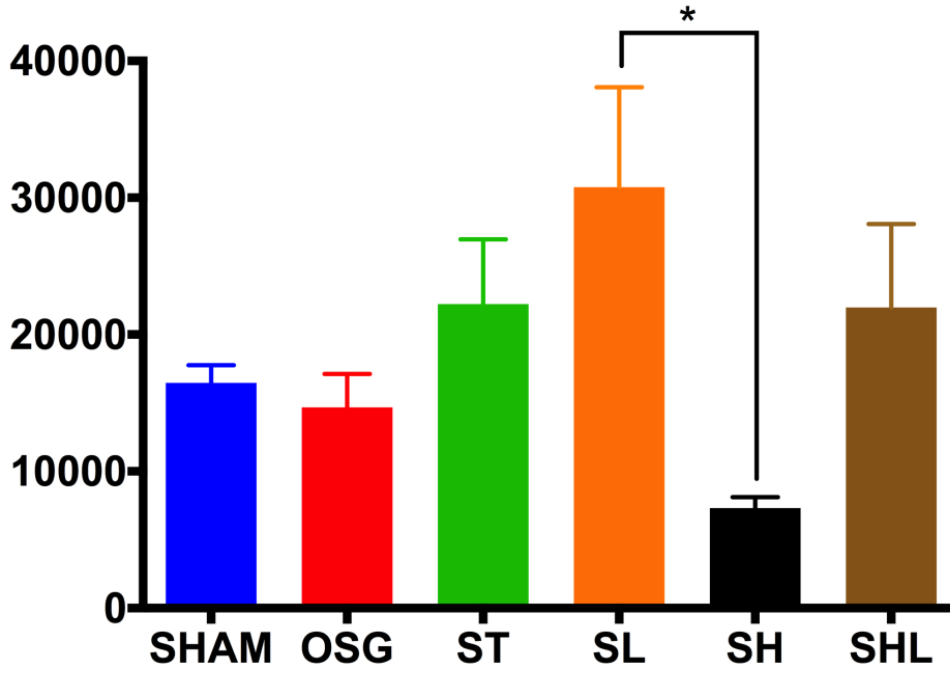
4.3. Deney Gruplarının Histometrik İncelenmesi

Rejenere alanlarda toplam akson sayıları karşılaştırıldığında OSG grubunun diğer gruplara oranla daha fazla sayıda akson içerdikleri gözlenmektedir. Ancak bu farklılık

sadece SH ($p<0,01$), SHL grupları ($p<0,05$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (Şekil 4.23). Distal bölgeler incelendiğinde ise SHAM, OSG ve ST grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Hyaluronik asit hidrojel uygulanan grupta distal alanlardaki toplam akson sayısında çarpıcı bir azalma tespit edilmiştir. Lityum grubunun, SH ve SHL gruplarına oranla belirgin olarak daha fazla akson içerdiği gözlenmiştir ($p<0,05$). SHL grubunda SH grubundan daha fazla SL grubundan daha az akson sayılmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.23. Rejenere alanların toplam akson sayısı bakımından karşılaştırılması. OSG’de, SH ve SHL’ye oranla rejenere alanda daha fazla akson gözlenmiştir. Grafikte verilen değerler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmektedir. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Kruskal-Wallis ve Dunn’s çoklu karşılaştırma testi.



Şekil 4.24. Distal alanların toplam akson sayısı bakımından karşılaştırılması. SL grubunda, SH grubuna oranla distal alanda daha fazla akson gözlenmiştir. Grafikte verilen değerler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmektedir. * $p < 0,05$. Kruskal-Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma testi.

4.4. Literatür Işığında Bulguların Tartışılması

PS yaralanmaları oldukça sık görülen ve fonksiyonel sonuçları genellikle çok iyi olmayan yaralanmalardır. Nöron ve SH yaralanması sonucu ortaya çıkan demiyelinizasyonu aksonal dejenerasyon takip eder. Günümüze kadar pek çok antiinflamatuvar veya rejeneratif ajan tedavi amacıyla uygulanmasına rağmen henüz sinir iyileşmesinde en iyi sonuçlara ulaşılamamıştır.

Uç uca sinir onarımının mümkün olmadığı durumlarda ise defektif sinir onarımında altın standart kabul edilen otolog sinir greftleri kullanılmaktadır. Ancak insanda ve diğer canlılarda otolog sinir grefti alıcı alanları sınırlı sayıda olduğu için, araştırmalar doğal sinir dokusuna alternatif yöntemlere (biyolojik ve sentetik konduitler, hücre tedavileri, dolgu maddeleri, büyüme faktörleri vb.) yönlendirilmiştir. Bunlardan literatür araştırması bölümünde ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

Sentetik sinir konduitleri, PS cerrahisinde uç uca onarımın direk mümkün olamadığı durumlarda sinir boşlukları arasında bir köprü görevi görecektir şekilde kullanılmaktadır. Burada kullanılan biyomateryallerle rejenere olan aksonlar için ortam oluşturulması amaçlanmaktadır. Bu biyomateryaller aksonun çevresini saran miyelini üreten SHlerini desteklemelidir. Böylece periferik sinir rejenerasyonu için uygun mikroçevre oluşturulabilir. Konduit yanında mikroçevreyi oluşturan bir diğer faktör de ekstrasellüler matrikstir. HA, ekstrasellular matriksi oluşturan önemli bir yapı olup, periferik sinir dokusu dahil olmak üzere vücudun tüm dokularında dokuyu destekleyici özellikleri iyi bilinmektedir. HANın hücre gelişimi, farklılaşması ve hücre membran yüzeyleri üzerindeki adezyon moleküllü reseptörleriyle hücre göçünde de destekleyici özellikleri rapor edilmektedir (Hu vd., 2000). Ancak vücut ısısında sudaki aşırı çözünürlüğü sebebiyle kısa ömürlüdür ve hızla parçalanarak ortamdan temizlenir. HAIN doku mühendisliği ile üretilen yapay organ ve dokularda yapı taşı olarak kullanımı ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Mohammadi ve arkadaşları insan amniyotik membranından elde edilen biyobozunur bir sinir konduiti içine HA ve sinir büyüme faktörü kullanarak aksonal rejenerasyonda artış olduğunu rapor etmişlerdir (Mohammad vd., 2000). Zhang ve arkadaşları tavşanda defektif yüz sinir yaralanmalarında tedavisi için, HA-kollajen konduitler içine nöral stem hücreleri gömülmüş nörotrofin-3 kombinasyonunun etkilerini araştırmışlardır. Fasiküller ve sinir fiberlerinin gelişiminde doku rejenerasyonu tespit edilmiş; dejenerasyonunda da azalma gözlenmiştir (Zhang vd., 2008). Benzer şekilde Özgenel ve arkadaşları, erişkin bir rat modelinde tek doz hyaluronik asidin topikal uygulanmasının periferik sinir rejenerasyonu artışı ve sinir dokusunda skar oluşumu azalması üzerine olumlu etkileri olduğunu rapor etmişlerdir (Özgenel et al., 2003). Hüseyinoğlu ve ark. yaptığı çalışmada rat siyatik sinir nörorafisinde silikon tüp ve HA uygulamasının sinir rejenerasyonu üzerine etkilerini elektrofizyolojik olarak araştırmışlardır. Sonuçlar, sinir onarımı sırasında silikon tüp ve HA kullanımının sinir rejenerasyonu açısından iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir (Hüseyinoğlu vd., 2012). Ancak HA'nın sinir rejenerasyonuna etkisinin sınırlı olduğuna dair de çalışmalar mevcuttur. Mekaj ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada sinir onarım bölgesine topikal olarak serum fizyolojik, HA ve takrolimus uygulanmış ve siyatik sinirin biyomekanik özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca bu tavşanlarda sinir rejenerasyonunun fonksiyonel ve morfolojik

karakteristikleri de karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar ne HA ne de takrolimus kullanımının sinir onarımı sonrası 12 haftada biyomekanik özellikleri değiştirmedığını rapor etmişlerdir (Mekaj vd., 2015).

Miyelin, aksonal impulsların hızlı iletiminde temel bir rol oynamaktadır. Miyelinizasyon periferik sinirlerde SHleri tarafından sağlanan kompleks ve iyi düzenlenmiş bir prostestir (Susuki vd., 2011; Woodhoo ve Sommer, 2008). Miyelin gen ekspresyonu, kemiricilerde doğum sonrası 1-21. günlerde oluşan miyelinizasyon prosesi süresince uyarılmaktadır. Sonrasında ise bu genlerin düşük dozlarda ekspresyonu bile miyelinleşme sürecini devam ettirmek için yeterlidir. Bu genler sinir yaralanması sonrası remiyelinizasyonu başlatmak için uyarılmaktadır (Madduri ve Gardner, 2010)

Miyelin gen ekspresyonunu doğrudan düzenleyen çok az hücresel sinyal bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda Wingless-ilişkili bağlantı bölgesi (WNT) / β -catenin sinyal yolağının miyelin gen ekspresyonunda temel bir rol oynadığı gösterilmiştir. Wnt aktivasyonu, glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3 β) enzimini inhibe eder ve β -catenin degradasyonunu önler. Stabilize β -catenin çekirdek içine doğru yer değiştirir ve çekirdek, gen transkripsiyonun düzenlendiği yerdir (Rowe ve Chuang, 2004; Quiroz vd., 2004)

Lityum, GSK3 β 'nin enzimatik bir inhibitörüdür ve WNT/ β -catenin sinyal yolağını taklit etmektedir. Duygudurum ve kişilik bozukluklarının tedavisinde de sıkça kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarla sinir koruyucu ve antiapoptotik özelliklere sahip olduğu ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceği rapor edilmiştir (Forlenza vd., 2014; Diniz vd., 2013; Camins vd., 2010). Ancak Lityumun periferik sinir hasarındaki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça azdır. Periferik sinir hasarında lityumun rolünü inceleyen ilk çalışma 2008 yılında yayınlanan bir ön inceleme niteliğindedir (Nouri vd., 2009). Sistemik uygulanan Lityumun sıçanlarda sinir ezilme hasarı sonrasında nörolojik fonksiyonu anlamlı düzeyde düzeltmese de, histolojik olarak sinir rejenerasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Makoukji vd. (2012) ise sistemik verilen lityumun yüz ve siatik sinirin ezilme yaralanmalarında SHlerindeki preiferik myelin genleri aktivitesini arttırarak remyelizasyonu sağladığını bildirmişlerdir (Makoukji vd., 2012). Yazarlara göre lityum bu etkisini hücre çekirdeğinin içindeki β -catenin miktarını arttırarak göstermektedir. Lityumun SHleri üzerindeki etkisi yanında doğrudan akson rejenerasyonu üzerine de etkisi olabilir. Su vd. (2014) sıçanlarda omuriliği ventral kök

avülzyon yaralanması oluşturulan sıçanlarda GSK-3 β aktivitesinin tetiklendiğini ve sistemik Lityum uygulamasının bu aktiviteyi baskıladığını bildirmişlerdir (Su vd., 2014). Aynı çalışmanın ikinci kısmında ise avülziye olan ventral kök replante edildikten sonra Lityum verilmesi halinde aksonal rejenerasyonun belirgin bir şekilde arttığı nöron işaretleme çalışmaları ile gösterilmiştir. Ancak sistemik Lityum uygulaması ajanın güvenlik sınırı geniş olmasına rağmen istenmeyen etkilere neden olabilir. Başlıca duygu-durum bozuklukları tedavisinde kullanılan Lityumun sistemik olarak verilmesi merkezi sinir sistemi belirtilerine yol açabilir. Periferik sinir yaralanması gibi bölgesel ve tek uzvu içeren yaralanmalarda lokal kullanılması daha uygundur. Lin ve ark. sıçanlarda defektif siyatik sinir yaralanması modelinde lokal olarak çevre kas dokulara verilen lityumun uygun konduit ve mikroçevre koşullarında sinerjistik etki ile SHsi ve akson fiber dansitesini arttırdığını göstermişlerdir (Lin vd., 2013). Bu çalışmada Lityum klorid solusyonu 1,5 ve 2,5 mEq/kg dozunda ve 14 gün boyunca uygulanmıştır. Çalışmaya yüksek dozunun daha etkin olduğu bildirilmektedir. Ancak bu çalışmaya bazı eleştiriler getirilebilir. Birincisi çalışmaya sinir rejenerasyonunu olumlu etkileyen pek çok değişken dahil edilmiştir. Bu durum lityumun uygulamasının doğrudan etkinliğini gösteren kanıtları gizlemektedir. İkincisi çevre dokuya yapılan topikal uygulama lityumun hedef dokuda daha etkinliğine ulaşmadan çevre dokularca emilmesi ile sonuçlanabilir. Ayrıca bir ajanın topikal etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda etken madde konduit içinde verilmektedir (Azizi vd., 2012; Mohammadi vd., 2013a; Mohammadi vd., 2013b; Park vd., 2011; Mekaj vd., 2014)

Çalışmamızda ise lityumun etkinliği, sinir rejenerasyonunu doğrudan etkilemeyen ve çevre dokudan sinir dokusunun daha iyi izole olduğu silikon tüp içinde incelenmiştir. Bu lityumun sinir rejenerasyonuna etkisini doğrudan gösterme açısından önemlidir. Bu şekilde 1,5 mEq derişimdeki Lityum clorid çözeltilisinin de sinir regenerasyonuna olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir.

Çalışmanın hipotezi kurulurken lityum kloridin suda çözünen formunun uzun süre ortamda kalamayacağı düşünüldüğü için Li molekülleri HA içerikli jel formunda bir taşıyıcıya yüklenmiştir. Ayrıca bu jel yapısının ekstrasellüler matriks özelliğinden de faydalanabileceği düşünülmüştür. HA'nın diğer çalışmalara benzer olarak sinir rejeneasyonuna olumlu etkisi olduğu, yeni oluşan sinir dokusundaki fibrozisi azalttığı

gösterilmesine rağmen, konduit içinde oluşan sinir dokusu çapı; boş silikon ve Lityum yüklü silikon konduitlerin içinde oluşan sinir dokusuna göre daha ince olduğu görülmüştür. Bunun sebebi çalışma için hazırlanan HA moleküllerinin kimya laboatuvarında özel bir işlemle çapraz bağ sayısının arttırılması olabilir. HA'nın yıkım süresinin uzatılması amaçlanmıştır ancak oluşturulan HA molekülü sinirin ilerlemesini kısmen de olsa engellemiş olabilir. Ancak bu ayrı araştırma konusudur.

Bu çalışma kapalı bir ortamda lityumun defektif periferik sinir yaralanmalarında tek başına ve HA moleküllerine yüklenmiş şekilde uygulandığında rejenerasyonu arttırıcı özelliğini göstermesi açısından ilk olma özelliğine sahiptir. İleriki çalışmalarda lityumun sinir kaynaklı büyüme faktörleri salınımına etkisi yanında SHleri ve aksonal rejenerasyon üzerindeki etkileri de araştırılacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Lityum duygu- durum bozuklukları tedavisinde sık kullanılması yanında son yıllarda diğer nörodejeneratif sinir sistemi hastalıklarda etkisi ispatlanmıştır. Bu çalışmada genelde sistemik yolla uygulanan lityumun periferik sinir yaralanmalarında topikal uygulamasının etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda lityumun sinir rejenerasyonuna olumlu etkisi olduğu tespit edilse de çalışmanın moleküler, mekanik ve ileri morfolojik incelemelerle ortaya çıkacak yeni kanıtlarla desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abreu, L. B., 1997, Upper extremity nerve lesions(diagnosis, indications,surgical techniques), San Paulo Medical Journal, 115, 4, 1495-1507.
- Akbay, A., 2005, Periferik sinir mikroanatomisi ve sinir kesilerinde uygulanan cerrahi teknikler, Türk Nöroşirurji Dergisi, 15,3, s. 198-201.
- Aksoy, K., 2005, Temel Nörosirurji, Türk Nörosirurji Derneği Yayınları, s.1262-1271.
- Anselin, A., Fink, T., Davey, D., 1998, An alternative to nerve grafts in peripheral nerve repair: Nerve guides seeded with adult schwann cells, Acta Churgica Austriaca, 147, 19-24.
- Archibald, S. J., J. Shefner, C. Krarup and R. D. Madison, 1995, "Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube.", The Journal of Neuroscience, 15, 4109-4123.
- Aston, S.J., Beasley, R.W., Thorne, C.H.M., 1997, Grabb and Smith's Plastic Surgery, Lippincott-Raven, p. 80.
- Augustin, J.G., Purves, D., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A.S., vd., 2004, Neuroscience 3rd edition. Sinauer Associates Inc., p.31- 198.
- Azizi, S., Mohammadi, R., Amini, K., Fallah, R., 2012, Effects of topically administered FK506 on sciatic nerve regeneration and reinnervation after vein graft repair of short nerve gaps, Journal of Neurosurgery, 32, 5, E5
- Bain, J.R., Mackinon, S.E., Hunter, D.A., 1989, Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat, Plastic and Reconstructive Surgery, 83, 129- 36.
- Barcelos, A. S.,Rodrigues, A. C., Silva, M. D., Padovani, C. R., 2003, Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair, Microsurgery, 23, 66-71.
- Barreiros, V. C. P., Dias, F. J., Iyomasa, M. M., Coutinho-Netto, J., de Sousa, L. G.vd., 2014, Morphological and morphometric analyses of crushed sciatic nerves after application of a purified protein from natural latex and hyaluronic acid hydrogel, Growth Factors, 32, 5, 164-170.
- Barton, M. J., Morley, J. W., Stoodley, M. A., Lauto, A., Mahns, D. A., 2014, Nerve repair: toward a sutureless approach, Neurosurgical Review, 37, 4, 585-595.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Battiston, B., Tos, P., Geuna, S., 2007, Alternative techniques for peripheral nerve repair: conduits and end-to-side neurorrhaphy, *Acta Neurochirurgica Supplement*, 100, 43-50.
- Belkas, J., Midha, R., Shoichet, M., 2005, Peripheral nerve regeneration through a synthetic hydrogel nerve tube, *Restorative Neurology and Neuroscience*, 23, 19-29.
- Berg, D.K., 1984, New neuronal growth factors, *Annual Review of Neuroscience*, 7, 149-70.
- Biazar, E., Khorasani, M. T., Montazeri, N., Pourshamsian, K., Daliri, M., vd., 2010, Types of neural guides and using nanotechnology for peripheral nerve reconstruction, *International Journal of Nanomedicine*, 5, 839-852.
- Bora, F.W., 1967, Peripheral nerve repair in cats. The fascicular stitch, *The Journal of Bone & Joint Surgery American Volume*, 49, 4, 659-666.
- Bowden, R.E.M, Gutmann ,E., 1944, Denervation and re-innervation of human voluntary muscle, *Brain*, 273–313.
- Burnett, M., Zager, E., 2004, Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review, *Neurosurgical Focus*, 16, 1-7.
- Camins, A., Sureda, F. X., Junyent, F., Verdager, S., Folch, J. vd., 2010, An overview of investigational antiapoptotic drugs with potential application for the treatment of neurodegenerative disorders, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19, 5, 587-604
- Campbell, W.W., 2008, Evaluation and management of peripheral nerve injury, *Clinical Neurophysiology*, 119, 1951–1965.
- Carriel, V., Alaminos, M., Garzon, I., Campos, A., Cornelissen, M., 2014, Tissue engineering of the peripheral nervous system, *Expert Review of Neurotherapeutics*, 14, 3, 301-318.
- Chen, M. B., Zhang, F., Lineaweaver, W. C., 2006, Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair, *Annals of Plastic Surgery*, 57, 462-471.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Croce, N., Mathe, A. A., Gelfo, F., Caltagirone, C., Bernardini, S., vd., 2014, Effects of lithium and valproic acid on BDNF protein and gene expression in an in vitro human neuron-like model of degeneration, *Journal of Psychopharmacology*, 28, 10, 964-972.
- Dahlin, L. B., 2004, The biology of nerve injury and repair, *Journal of American Society for Surgery of the Hand.*, 4, 3, 143-155.
- Dahlin, L. B., 2008, Techniques of peripheral nerve repair, *Scandinavian Journal of Surgery*, 97, 4, 310-316.
- Daly, W., Yao, L., Zeugolis, D., Windebank, A., Pandit, A., 2012, A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery, *Journal of the Royal Society Interface*, 9, 202-221
- Danyemez, M. D., Seçer, H. İ., 2010, Periferik sinir yaralanmaları ve cerrahisi. Temel nöroşirurji, *Türk Nöroşirurji Derneği Yayınları*, s.1763-1787.
- Demircan, N., Zileli, M., 2008, *Periferik Sinir Cerrahisi*, s.105.-107.
- Deumens, R., Koopmans, G. C., Joosten, E. A., 2010a, Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury, *Progress in Neurobiology*, 77, 57-89.
- Deumens, R., Bozkurt, A., Meek, M. F., Marcus, M. A. E., Joosten, E. A. J. vd., 2010b, Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap, *Progress in Neurobiology*, 92, 3, 245 – 276
- Diniz, B. S., Machado-Vieira, R., Forlenza, O. V., 2013, Lithium and neuroprotection: translational evidence and implications for the treatment of neuropsychiatric disorders, *Neuropsychiatric disease and treatment*, 9, 493-500
- Ducic, I., Fu, R., Iorio, M. L., 2012, Innovative treatment of peripheral nerve injuries: combined reconstructive concepts, *Annals of Plastic Surgery*, 68, 180-187.
- Ducker, T. B., Kempe L.G., Hayes, G. J., 1969, The metabolic background for peripheral nerve surgery. *Journal of Neurosurgery* 30, 270-80.
- Einat, H., Yuan, P., Gould, T.D., Li, J., Du, J., vd., 2003, The role of the extracellular signaling pathway in mood modulation, *The Journal of Neuroscience*, 23, 7311-7316.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eppley, B. L., Woodell, J. E., Higgins, J., 2004, Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 114, 6, 1502-1508.
- Evans, G. R. D., 2000, Challenges to nerve regeneration, *Seminars in surgical oncology*, 19, 3, 312-318.
- Forlenza, O. V., De Paulo, V. J. R., Diniz, B. S., 2014, Neuroprotective effects of lithium: implications for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders, *American Chemical Society Chemical Neuroscience*, 5, 6, 443-450
- Frostick, S., Yin, Q., Kemp, G., 1998, Schwann cells, neurotrophic factors and peripheral nerve regeneration, *Microsurgery*, 18, 397-405.
- Fu, R., Tang, Y., Ling, Z. M., Li, Y.Q., Cheng, X., vd., 2014, Lithium enhances survival and regrowth of spinal motoneurons after ventral root avulsion, *BioMed Central Neuroscience*, 15, 84, 1-14.
- Geuna, S., Raimondo, S., Ronchi, G., Di Scipio, F., Tos, P. vd., 2009, Chapter 3: Histology of the Peripheral Nerve and Changes Occurring During Nerve Regeneration, *International Review of Neurobiology*, 87, 27-46.
- Hall S., 1997, Axonal regeneration through acellular muscle grafts, , 190, 57-71.
- Hall, S. M., 1989, Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 15, 6, 513-29.
- Hammonds, M. D., Shim, S. S., 2009, Effects of 4 weeks lithium and olanzapine treatment on levels of BDNF, bcl-2 and phosphorylated CREB in the hippocampus, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105, 113-119.
- Heinrich, A., Boer, U., Tzvetkov, M., Oetjen, E., Knepel, W., 2009, Stimulation by lithium of the interaction between the transcription factor CREB and its co-activator TORC, *Bioscience Reports*, 29, 77-87.
- Hu, M., Sabelman, E. E., Tsai, C., Tan, J., Hentz, V. R., 2000, Improvement of Schwann cell attachment and proliferation on modified hyaluronic acid strands by polylysine, *Tissue Engineering*, 6, 6, 585-593

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, X., Wu, D. Y., Chen, G., Manji, H., Chen, D. F., 2003, Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 1, 347-354.
- Hudson, T. W., Evans, G. R. D., Schmidt, C. E., 2000, Engineering strategies for peripheral nerve repair, *Orthopedic Clinics of North America*, 31, 3, 485-497.
- Hung, H. A., Sun, G., Keles, S., Svaren, J., 2015, Dynamic regulation of schwann cell enhances after peripheral nerve injury, *Journal of Biological Chemistry*, 290, 11, 6937-6950.
- Huseyinoglu, H., Yıldırım, C.H., Sengoz, A., Ozaydin, I., Aksoy, O., vd., 2012, Electrophysiological Assessment of the Effects of Silicone Tubes and Hyaluronic Acid on Nerve Regeneration in Rats with Sciatic Neurorrhaphy, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 18, 6, 917-922.
- Jahn, O., Tenzer, S., Werner, H. B., 2009, Myelin proteomics: Molecular anatomy of an insulating sheath, *Molecular Neurobiology*, 40, 1, 55-72
- Jessen, K. R., Mirsky, R., 2005, The origin and development of glial cells in peripheral nerves, *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 9, 671-682
- Jessen, K. R., Mirsky, R., 2016, The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves, *The Journal of Physiology*, doi: 10.1113/JP270874.
- Jubran, M., Widenfalk, J., 2003, Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors, *Experimental Neurology*, 181, 2, 204-12.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., Hudspeth, A. J., 2013, *Principles of neural sciences*, McGraw Hill Book, p. 21-38
- Karanth, S., Yang, G., Yeh, J., Richardson, P. M., 2006, Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves, *Experimental Neurology*, 202, 161-166.
- Kazuho, H., Masaru, K., 2002, Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during wallerian degeneration, *Microscopy Research and Technique*, 57, 541-547.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kehoe, S., Zhang, X. F., Boyd, D., 2012, FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of material of efficiency, *Injury*, 43, 553-572.
- Kim, Y., Haftel, V. K., Kumar, S., Bellamkonda, R. V., 2008, The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging long peripheral nerve gaps, *Biomaterials*, 29, 21, 3117–3127.
- Lee, A. C., Yu, V. M., Lowe, J. B., Brenner, M. J., Hunter, D. A., vd., 2003, Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration, *Experimental Neurology*, 184, 1, 295-303.
- Leskovar, A., Moriarty, L. J., Turek, J. J., Schoenlein, I. A., Borgens, R. B., 2000, The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems, *Journal of Experimental Biology*, 203, 1783-1795.
- Lewis, T., Pickering, G. W., Rothschild, P., 1931, Centripetal paralysis arising out of arrested bloodflow to the limb, *Heart*, 16, 1–32.
- Li, Y., Rodrigues, J., Tomas, H., 2012, Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 41, 2193-2221.
- Lieberman, A. R., 1971, The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury, *International Review of Neurobiology*, 14, 49-124.
- Lin, Y. C., Marra, K. G., 2012, Injectable systems and implantable conduits for peripheral nerve repair, *Biomedical Materials*, 7, 024102, 1-9.
- Lin, Y. C., Oh, S. J., Marra, K. G., 2013, Synergistic lithium chloride and glial cell line-derived neurotrophic factor delivery for peripheral nerve repair in a rodent sciatic nerve injury model, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132, 2, 251e-62e.
- London, C. A., Abbas, A. K., Kelso, A., 1998, Helper T cell subsets: Heterogeneity, functions and development, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 63, 37–44.
- Lundborg, G., 1987, Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 58, 2, 145-69.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lundborg, G., Dahlin, L., Dohi, D., Kanje, M. and Terada, N., 1997, A new type of "bioartificial" nerve graft for bridging extended defects in nerves, *The Journal of Hand Surgery British & European Volume*, 22, 3, 299-303.
- Madduri, S. ve Gander, B., 2010, Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration, *Journal of the Peripheral Nervous System*, 15, 2, 93-103.
- Maggi, S. P., Lowe, J. B., Mackinnon, S. E., 2003, Pathophysiology of nerve injury, *Clinics in Plastic Surgery*, 30, 2, 109–26.
- Makoukji, J., Belle, M., Meffre, D., Stassart, R., Grenier, J., vd., 2012, Lithium enhances remyelination of peripheral nerves, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 10, 3973-8.
- Makwana, M., Raivich, G., 2005, Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration, *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 272, 2628-2638.
- Mathes, S. J., 2006, *Plastic surgery*, Philadelphia: Saunders Elsevier, p: 719-43.
- Matsuyama, T., Mackay, M., Midha, R., 2000, Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review, *Neurologia Medico Chirurgica*, 40, 4, 187-99.
- McCarthy, J. G., May, J. W., Litter, W. J. , 1990, *Plastic surgery*. Philadelphia: WB Saunders, 630-97.
- Mekaj, A. Y., Morina, A. A., Bytyqi C. I., Mekaj, Y. H., Duci, S. B., 2014, Application of topical pharmacological agents at the site of peripheral nerve injury and methods used for evaluating the success of the regenerative process, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 9, 94
- Mekaj, A. Y., Morina, A. A., Lajqi S., Manxhuka-Kerliu, S., Kelmendi, F. M. vd., 2015, Biomechanical properties of the sciatic nerve following repair: effects of topical application of hyaluronic acid or tacrolimus, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8, 11, 20218-20226
- Meshner, A. L., 2013. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas* (13. Baskı). Çin: The McGraw-Hill Companies

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Milessi, H., 2000, Techniques for nerve grafting, *Hand Clinics*, 16, 73-91.
- Mirajullah, M., Xinya, S., 2002, Schwann cells: Leader of nervenkitt, *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 14, 30-33.
- Mohammad, J. A., Warnke, P. H., Pan, Y. C., Shenaq, S., 2000, Increased axonal regeneration through a biodegradable amnionic tube nerve conduit: Effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor/ hyaluronic acid media, *Annals of Plastic Surgery*, 44, 1, 59-64
- Mohammadi, R., Azad-Tirgan, M., Amini K., 2013a, Dexamethasone topically accelerates peripheral nerve repair and target organ reinnervation: A transected sciatic nerve model in rat, *Injury*, 44, 4, 565-569
- Mohammadi, R., Esmail-Sani, Z., Amini K., 2013b, Effect of local administration of insulin-like growth factor I combined with inside-out artery graft on peripheral nerve regeneration, *Injury*, 44, 10, 1295-1301
- Napoli, I., Noon, L. A., Ribeiro, S., 2012, A central role for the erk-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo, *Neuron*, 73, 729-42.
- Nie, X., Deng, M., Yang, M., Liu, L., Zhang, Y., Wen, X., 2014, Axonal regeneration and remyelination evaluation of chitosan/gelatin-based nerve guide combined with transforming growth factor-beta1 and Schwann cells, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68, 1, 163-172.
- Niu, Y., Chen, K. C., He, T., Yu, W., Huang, S. vd., 2014, Scaffolds from block polyurethanes based on poly(epsilon-caprolactone) (PCL) and poly(ethylene glycol) (PEG) for peripheral nerve regeneration, *Biomaterials*, 35, 14, 4266-4277
- Nouri, M., Rasouli, M. R., Rahimian, R., Asadi-Amoli, F., Dehpour, A. R., 2009, Lithium improves regeneration after sciatic nerve traumatic injury in rat, *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 25, 2, 151.
- Okutan, Ö., Solaroğlu, İ., 2010, TND Temel nöroşirürji kitabı, s.91-93.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ozgenel, G.Y., 2003, Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats, *Microsurgery*, 23, 6, 575-581.
- Özaydın, İ., Ünsaldı, E., Aksoy, Ö., Yayla, S., Kaya, M. vd., 2014, The Effect of Silicone Tube and Silicone Tube+ Hyaluronic Acid Application on Adhesion Formation in Experimental Peri-and Epi-neurorrhaphy in A Rat Model, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 20, 591-597.
- Park, J. S., Lee, H. J., Han, C. S., Chung, D. W., Kim, G. Y., 2011, Effect of Hyaluronic Acid-Carboxymethylcellulose Solution on Perineural Scar Formation after Sciatic Nerve Repair in Rats, *Clinics in Orthopedic Surgery*, 3, 4, 315-324
- Pineau, I., Lacroix, S., 2007, Proinflammatory cytokine synthesis in the injured Mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved, *Journal of Comparative Neurology*, 500, 267-285.
- Quiroz, J. A., Machado-Vieira, R., Zarate, C. A., Manji, H. K., 2010, Novel insights into lithium's mechanism of action: neurotrophic and neuroprotective effects, *Neuropsychobiology*, 62, 50-60.
- Raimondo, S., Fornaro, M., Tos, P., Battiston, B., Giacobini-Robecchi, M. G. vd., 2011, Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves, *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 193, 4, 334-340
- Rhoades, R. A., Bell, D. R., 2009, *Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine*, Lippincott Williams and Wilkins, p.108-118.
- Richardson, P. M., McGuinness, U. M., Aguayo, A. J., 1980, Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts, *Nature*, 284, 264-265.
- Richardson, W. D., Jessen, K. R., 2001, *Glial cell development*, Oxford University Press, 299–330.
- Robinson, L. R., 2000, Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*, 23, 863- 73.
- Ross, M., Pawlina, W., 2006, *Histology:A text and atlas*, Lippincott Williams & Wilkins,
- Rowe, M. K., Chuang, D. M. 2004. “Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications”, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 6, 1-18.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schmidt, C. E., Leach, J. B. 2003. "Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration" Annual Review of Biomedical Engineering, 5, 293-347.
- Schuettauf, F., Rejdak, R., Thaler, S., Bolz, S., Lehaci, C. vd., 2006, Citicoline and lithium rescue retinal ganglion cells following partial optic nerve crush in the rat, Experimental Eye Research, 83, 5, 1128-1134.
- Sedaghati, T., Jell, G., Seifalian, A. M., 2014, Nerve regeneration and bioengineering, Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation, 799-810.
- Shim, S. S., Hammonds, M. D, Mervis, R. F. 2013. "Four weeks lithium treatment alters neuronal dendrites in the rat hippocampus", International Journal of Neuropsychopharmacology, 16(6), 1373-1382.
- Siebert, H., Bruck, W., 2003, The role of cytokines and adhesion molecules in axon degeneration after peripheral nerve axotomy: a study in different knockout mice, Brain Res, 960, 152-156.
- So, K. F., Xu, X. M., 2015, Neural Regeneration, Science Press Beijing, s. 82.
- Stoll, G., Jander, S., Myers, R. R., 2002, Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation, Journal of Peripheral Nervous System, 7, 13-27.
- Strauch, B., Ferder. M., Lovelle-Allen, S., Moore, K., Kim, D. J., vd., 1996, Determining the maximal length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration, Journal of Reconstructive Microsurgery, 12, 521-527.
- Stubgen, J. P., 2008, Tumor necrosis factor-alpha antagonists and neuropathy, Muscle Nerve 37, 281-292.
- Su, H., Yuan, Q., Qin, D., Yang, X., Wong, W. M. vd., 2014, Lithium enhances axonal regeneration in peripheral nerve by inhibiting glycogen synthase kinase 3beta activation. BioMed Research International, 658753.
- Sufan, W., Suzuki, Y., Tanihara, M., Ohniski, K., Endo, K. vd., 2001, Sciatic nerve regeneration through alginate with tubulation or nontubulation repair in cat, Journal of Neurotrauma, 18, 3, 329-338.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Susuki, K., Raphael, A. R., Ogawa, Y., Stankewich, M. C., Peles, E. vd., 2011, Schwann cell spectrins modulate peripheral nerve myelination, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 19, 8009 - 8014.
- Sunderland, S., 1991, *Nerve injuries and their repair: A critical appraisal*, Melbourne. Churchill Livingstone,
- Takemura, Y., Imai, S., Kojima, H., Katagi, M., Yamakawa, I. vd., 2012, Brain-derived neurotrophic factor from bone marrow-derived cells promotes post-injury repair of peripheral nerve, *Plos-One*, 7, 9, e44592
- Terenghi, G., 1999, Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *Journal of Anatomy*, 194(Pt 1), 1-14.
- Quiroz, J. A., Gould, T. D., Manji, H. K., 2004, Molecular effect of lithium, *Molecular Interventions*, 4, 5, 259-272
- Vajero, A., Meek, M. .F., Ferreira, A. .J., 2001, Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis, *Journal of Neuroscience Methods*, 108, 1-9.
- Vekris, M., Soucacos, P., 2006, Update on peripheral nerve microsurgery, *Microsurgery*, 26, 216-217.
- Wakatsuki, S., Araki, T., Sehara-Fujisawa, A., 2014, Neurogilin-1/glial growth factor stimulates Schwann cell migration bu inducing $\alpha 5 \beta 1$ integrin-ErbB2- focal adhesion kinase complx formation, *Genes Cells*, 19, 1, 66-77.
- Wang, S., Cai, L. 2010. "Polymers for Fabricating Nerve Conduits", *International Journal of Polymer Science*, 2010, 1-20.
- Weber, A., Breidenback, W. C., Brown, R. E., Jabaley, M. E., Mass, D. P., 2000, A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 106, 1036-1045.
- Whitworth, I. H., Brown, R. A., Dore, C. J. , Anand, P., Green, C. J. vd., 1996, Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts, *The Journal of Hand Surgery: British &European Volume*, 21, 4, 514-22.
- Wilgis, E. F. S., 1982, *Nerve repair and grafting*, Churchill Livingstone, s. 915-38.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Winograd, J. M., Mackinnon, S. E., 2006, Peripheral nerve injuries: Repair and reconstruction, Philadelphia: Saunders Elsevier, p.47-514.
- Woodhoo, A. ve Sommer L., 2008, Development of the Schwann cell lineage: From the neural crest to the myelinated nerve, *Glia*, 56, 14, 1481-1490.
- Wu, F., Xing, D., Peng, Z., Rao, T., 2008, Enhanced rat sciatic nerve regeneration through silicon tubes implanted with valproic acid, *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 24, 267-276.
- Yang, Y., Chen, X., Ding, F., Zhang, P., Liu, J., vd., 2007, Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro, *Biomaterials*, 28, 9, 1643-1652.
- Yin, Q., Kemp, G. J., Frostick, S. P., 1998, Neurotrophins, neurons and peripheral nerve regeneration, *The Journal of Hand Surgery: British&European Volume*, 23, 4, 433-7.
- Zhang, H., Wei, Y. T., Tsang, K. S., Sun, C. R., Li, J. vd., 2008, Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model, *Journal of translational medicine*, 6, 67
- Zor, F., Deveci, M., Kilic, A., Ozdag, M. F., Kurt, B. vd., 2014. "Effect of VEGF gene therapy and hyaluronic acid film sheath on peripheral nerve regeneration", *Microsurgery*, 34, 209-216.