

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ**  
**ANABİLİM DALI**

**PERİFERİK SİNİR YARALANMALARINDA BOMBESİNİN**  
**NÖROTROFİK ETKİSİNİN ELEKTROFİZYOLOJİK VE**  
**HİSTOPATOLOJİK İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. ALİ ŞİMŞEK**

**DANIŞMAN**

**DR. ÖĞRETİM ÜYESİ RAMAZAN HAKAN ÖZCAN**

**DENİZLİ – 2019**

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ**  
**ANABİLİM DALI**

**PERİFERİK SİNİR YARALANMALARINDA BOMBESİNİN**  
**NÖROTROFİK ETKİSİNİN ELEKTROFİZYOLOJİK VE**  
**HİSTOPATOLOJİK İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. ALİ ŞİMŞEK**

**DANIŞMAN**

**DR. ÖĞRETİM ÜYESİ RAMAZAN HAKAN ÖZCAN**

Bu proje T.C. Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Koordinatörlüğü tarafından

**2018TIPF024** nolu proje olarak desteklenmiştir.

**DENİZLİ – 2019**

EK-3

R.Hakan Özcan danışmanlığında Dr. Ali Simssek tarafından yapılan "Periferik Sinerjilerde Kararlılıkların da Bunuza İlgili Nörotrafik Etkisi nin Elektrofizyolojik ve Histopatolojik İncelenmesi" başlıklı tez çalışması gün.../ay.../yıl... tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Plastik Robotik ve Tıp Fakültesi Anabilim/Bilim Dalı'nda TIPTA /YANDAL UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Prof. Dr. İnci Gülalın Kara

ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi

Ramazan Hakan Özcan

ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi

Selma Halkı Altunbaş

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. gün.../ay.../yıl.

Prof. Dr. Derman ÇİLEKÇİ  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Hakkını ödeyemeyeceğim, tez danışmanım, Sayın hocam Dr. Ramazan Hakan ÖZCAN'a

Anabilimdalı başkanımız, bilgi birikimi ve tecrübeleri eşsiz Sayın hocam Dr. Bahriye İnci GÖKALAN KARA'ya

Uzmanlık eğitimimin son dönemlerinde tanıştığım, yardımlarını ve bilgi paylaşımını esirgemeyen sempatik hocamız Sayın Dr. Özgen KIVANÇ'a

Projemin oluşturulmasında emeği geçen nöroloji anabilimdalı üyesi Dr. Çağdaş ERDOĞAN'a, histoloji anabilimdalı üyesi Dr. Gülçin ABBAN METE'ye , anatomi anabilimdalı üyesi Dr. Mehmet Bülent ÖZDEMİR'E, biyoistatistik anabilimdalı üyesi Dr. Hande ŞENOL'a, hayvan deneyleri araştırma biriminden Vt. Dr. Barbaros ŞAHİN'e

Çalışmamda yardımlarını ve enerjilerini esirgemeyen asistan arkadaşlarım Dr. Erkan KURAL, Dr. Süleyman ALİYAZICIOĞLU ve Arş. Gör. Gül NEŞET'e

Bütün hırçınlıklarına katlanıp yanımda olan benden asla vazgeçmeyen biricik tatlı eşim Dr. Duygu ÇAL ŞİMŞEK'e, biricik güzel annem Belkiye ŞİMŞEK'e, biricik aslan babam Celal ŞİMŞEK'e

Ve uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım, hemşire, tekniker ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	IV
KISALTMALAR DİZİNİ .....	VI
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÖZET .....	XI
ABSTRACT .....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Periferik Sinir Histoanatomisi, Morfolojisi ve Fizyolojisi.....	2
2.1.1. Periferik Sinir Histoanatomisi.....	2
2.1.2. Periferik Sinir Morfolojisi.....	5
2.1.3. Periferik Sinir Fizyolojisi.....	10
2.2. Periferik Sinir Hasarları.....	12
2.3.Sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu .....	14
2.4.Periferik Sinir Onarımı .....	19
2.5.Aksonal büyümeyi etkileyen faktörler.....	21
2.6.Bombesin.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	31
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA .....	58
6. SONUÇ .....	68
7. KAYNAKLAR.....	69

## **KISALTMALAR**

Akt: Protein kinaz B

Amp: Amplitud

ATP: Adenozil tri fosfat

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

CNTF: Cilier Neurotrophic Factor

COX-2: Siklooksijenaz-2

CREB: cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein

EMA: Endonöral mesafede artışı

EMG: Elektromiyografi

GAB-1: GRB2-associated-binding protein-1

GAP-43: Growth-associated protein-43

Grb2: Growth factor receptor-bound protein-2

GRP: Gastrin releasing peptid

IHC: İmmünohistokimya

IGF: İnsulin benzeri büyüme faktörü

IL-1: İnterlökin-1

IL-6: İnterlökin-6

JNK: Jun amino-terminal kinaz

kDa: Kilo Dalton

Lat: Latans

LIF: Lösemi inhibe edici faktör

MAP: Microtubule associated protein

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MEK : MAPK kinase

N-CAM: Neural cell adhesion molecule (nral hücre adezyon molekülü)

NF-κB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NGF: Nerve Growth Factor

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentetaz

NRIF : Neurotrophin receptor interacting factor

NRP-1: Nrofilin-1

NT: Nörotrofin

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PSS: Periferik Sinir Sistemi

p75NTR: p75 Nörotrofin reseptörü

RalGDS: Rasrelated guanine nkleotit disosiasyon stimlatr

SEM: Scanning Elektron Mikroskopisi

SFI: Siyatik fonksiyonel indeks

SOD: Superoksit dismutaz

SSS: Santral Sinir Sistemi

TGF: Transforming büyüme faktörü

Trk: Tirozin Kinaz

TLR: Tool-like reseptör

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGFR: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü

μg: Mikrogram

μm: Mikrometre

ZO-1: Zonula occludens-1

## **TABLolar**

Tablo 1 : Peterson skollama sistemi.....	43
Tablo 2: Denek grupları ve SFI haftalık analiz ortalama ve standart sapmaları....	47
Tablo 3: Gastrocnemius kas deneysel ve kontrol taraf oranları.....	48
Tablo 4: Denek grupları ve EMG sonuçları (AMPLİTÜD).....	49
Tablo 5: Denek grupları ve EMG sonuçları (LATANS).....	50
Tablo 6: Histopatolojik skollama.....	57

## **GRAFİKLER**

Grafik 1: SFİ sonuçları.....	47
Grafik 2: Gastrocnemius kas ağırlıkları.....	48
Grafik 3: EMG amplitüd sonuçları .....	49
Grafik 4: EMG latans sonuçları.....	50
Grafik 5: Histopatolojik skorlar.....	57

## **ŞEKİLLER**

Şekil 1:Periferik Sinir Hücresi.....	3
Şekil 2:Periferik Sinir Morfolojisi.....	6
Şekil 3:Periferik Sinir Mikrovasküler Anatomisi.....	8
Şekil 4:Periferik Sinir Yaralanma Tipleri.....	13
Şekil 5:Akson kesisi sonrası meydana gelen değişiklikler.....	16
Şekil 6:Aksonal rejenerasyon.....	18
Şekil 7:Fasiküler herniasyon ve trimleme.....	19
Şekil 8 :a)Sinirde tam kesi b)Epinöral onarım c)Perinöral onarım.....	21



Şekil 9: Trk sinyal yolları, nörotrofin transfosforilasyonu, sinyal proteinlerinin bağlanması.....	22
Şekil 10 : NGF'nin çekilmesiyle aktiflenen hücre ölüm yolları.....	26
Şekil 11: p75NTR sinyal yolağı.....	27
Şekil 12: Bombesin benzeri peptidler MA: molekül ağırlığı D: Dalton.....	28
Şekil 13: Ratın operasyona hazırlanması.....	32
Şekil 14: Diseksiyon ve eksplorasyon.....	33
Şekil 15: Trifikasyondan 1 cm ölçüm ve tam kat kesi.....	33
Şekil 16: Mikrocerrahi sinir onarımı.....	34
Şekil 17: Kas ve cilt sütürasyonu.....	34
Şekil 18: %8 hidrolize jelatin ve enjektabl bombesin alikvatları.....	35
Şekil 19: Subkutan enjeksiyon.....	36
Şekil 20: Gastrocinemius kas örnekleri.....	37
Şekil 21: SFI ölçüm ve analiz için hazırlanmış yürüme düzeneğı.....	38
Şekil 22: SFI formülündeki değerlerin tespitinin şematize edilmesi.....	39
Şekil 23: Sağlam(sol) ve kesi yapılan taraf(sağ) ayak izleri.....	39
Şekil 24: Anestezi altında dermal elektrotlar kullanılarak yapılan EMG ve aksiyon potansiyeli parametreleri. ....	40
Şekil 25: Elektrofizyolojik değerlendirme .....	41
Şekil 26: Sakrifikasyon sonrası onarım hattı ortada olacak şekilde 1 cm sinir örneğı alınması .....	42
Şekil 27: 12. hafta invertte duruş ve dirsek teması .....	46
Şekil 28: Grup 1 (sham) cerrahi stres grubu 2000 büyütmede SEM görüntüsü...51	
Şekil 29: Grup 2 (kontrol) 1000 ve 2000 büyütmede SEM görüntüsü.....51	
Şekil 30: Grup 3 BBS 10 µg/kg ; grupta bağ dokusu liflerinde kopukluklar ve sinir liflerinde dejenerasyon .....	52
Şekil 31: Grup 4 BBS 100 µg/kg ; a) kesi distali b) longitudinal kesi.....52	

Şekil 32: NGF ekspresyonun yerleşimi ve ekspresyonu. ....	53
Şekil 33: VEGFekspresyonun yerleşimi ve ekspresyonu .....	54
Şekil 34: MAP ekspresyonun yerleşimi ve ekspresyonu .....	55
Şekil 35: GAP-43 ekspresyonun yerleşimi ve ekspresyon.....	55
Şekil 36: H+E BOYANMA.....	56

## ÖZET

### Periferik sinir yaralanmalarında bombesinin nörotrofik etkisinin elektrofizyolojik ve histopatolojik incelenmesi

**Amaç:** Bombesin mukoza hücreleri üzerinde trofik, immünolojik, mitojenik; sinir sistemi üzerinde biyolojik ve immün etkilere sahip bir peptitdir. Periferik sinir tam kat kesisi sonrası oluşan fizyopatolojik süreçte bombesin isimli nöropeptidin farklı dozlarda, kesi distalinde oluşan akson rejenerasyonuna ve fonksiyonel iyileşmeye etkisini eletrofizyolojik ve histopatolojik olarak incelemek amaçlanmıştır.

**Materyal ve metod:** Çalışmada 40 adet 200-250 gr ağırlığında Wistar cinsi erkek rat kullanıldı. Rastgele 10 'arlı sham (cerrahi stres,kesi yapılmayan), kontrol, düşük doz bombesin grubu(10 µg/kg), yüksek doz bombesin grubu (100 µg/kg) şeklinde 4 grup oluşturuldu. Ketaminle anestezi altındaki ratlar uygun diseksiyon, tam kat kesi ve mikrocerrahi onarım sonrası kafeslere alındı. Bombesin gruplarına hazırlanmış süspansiyonlar insülin enjektörleriyle günde 3 defa 8 saatde 1, 7 gün boyunca aynı saatlerde (08.00, 16.00, 00.00) ense derisinden subkutan enjeksiyon yapıldı. 12 haftalık takip sonrası SFİ, EMG, SEM, IHC, gastrocnemius ağırlık ölçümü ve histopatolojik analizler karşılaştırıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

**Bulgular :** EMG ve gastrocnemius ağırlık ölçümü sonuçlarında kontrol grubuna kıyasla yüksek doz bombesin yapılan grup (100 µg/kg )'ta farklılık görülsede istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ( $p>0.05$ ). SFİ, SEM, IHC ve diğer histopatolojik parametrelerde, yüksek doz bombesin yapılan grupta iyileşme yönünde, istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** Periferik sinir tam kat kesilerinde, subkutan uygulanan 100 µg/kg bombesin morfolojik ve fonksiyonel iyileşmeyi pozitif yönde desteklemiştir.

**Anahtar kelimeler:** Periferik sinir yaralanmaları, bombesin, nörotrofik faktörler, periferik sinir rejenerasyonu

## ABSTRACT

### **Electrophysiological and histopathological examination of neurotrophic effect of bombesin in peripheral nerve injuries**

**Aim:** Bombesin is a peptide trophic, immunological and mitogenic agent on mucosal cells; with biological and immune effects on the nervous system. The aim of this study was to investigate the effect of bombesin neuropeptide on axonal regeneration and functional recovery in different doses in the physiopathological process after peripheral nerve transection.

**Material and Method:** 40 male Wistar rats weighing 200-250 g were used in the study. Four groups were randomly assigned as 10-sham (surgical stress, dissection, but no incision), 10-control, 10-low dose bombesin group (10 µg / kg), 10-high dose bombesin group (100 µg / kg). Rats anesthetized with ketamine were placed in cages after appropriate dissection, transection and microsurgical repair. Suspensions prepared for bombesin groups were injected with insulin injectors 3 times a day for 8 hours 1, 7 days at the same time (08.00, 16.00, 00.00) subcutaneous injection from the nape skin. After 12 weeks of follow-up, SFI, EMG, SEM, IHC, gastrocnemius weight measurement and histopathological analysis were compared. Results were evaluated statistically.

**Results:** Although there was a significant difference in EMG and gastrocnemius weight measurement results compared to the control group (100 µg / kg), no statistically significant difference was observed ( $p > 0.05$ ). There was a statistically significant difference in SFI, SEM, IHC and other histopathological parameters in terms of improvement in high dose bombesin group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Subcutaneously applied 100 µg / kg bombesin promoted morphological and functional recovery positively in peripheral nerve transection.

**Keywords:** Peripheral nerve injuries, bombesin, neurotrophic factors, peripheral nerve regeneration

## GİRİŞ

Periferik sinir sisteminde travma sonrası iyileşmenin sınırlı olması, yaralanmanın nedeninden bağımsız olarak sinir dokusunda iyileşmenin tam olmaması veya sinirin anormal rejenerasyonu, sıklıkla fonksiyonel kayıp ve kronik ağrı ile sonuçlanmaktadır [1]. Bu nedenle periferik sinir yaralanmaları sonrasında tedavideki amaç, sinir bütünlüğünü tekrar sağlayarak iletimin, kaybolan motor ve duyu fonksiyonlarının en üst seviyede geri dönüşünü sağlamaktır [2, 3]. Yaralanma sonrası sinirin proksimal ve distal uçlarında önemli histopatolojik değişiklikler ortaya çıkar [4, 5]. Aksonal hasarı takiben, schwann hücrelerinde ve inflamatuvar hücrelerin sayısında oluşan değişiklikler nörotrofik ve nörotropik mediatörler aracılığı ile oluşur[6].

Bombesin(BBS) 1970 de bombina bombina ve bombina varigeta adlı amfibianların derilerinden Erspamer, Colluguen ve 1971 de Anastasi ve arkadaşları tarafından izole edilmiş 14 aminoasitlik küçük bir tetradekapeptiddir [7]. Bu aileye ait olan amfibi peptitler şu anda üç alt aileye ayrılmaktadır; bombesin ve alitesin içeren bombesin grubu; ranatensin, litorin ve rohdei litorini içeren ranatensin grubu; ve Leu (8) - ve Phe (8) -fillolitorinleri içeren phyllolitorin grubudur [8, 9]. Memelilerde ki bombesin homologu gastrin salgılayan peptid(GRP), ilk olarak domuz mide dokusundan izole edilmiştir. Hipertansif eylem, kolon, uterus ve ileum üzerinde kontraksiyon etkisi, gastrik ve insulin sekresyonunu artırıcı etkileri farklı sistemler üzerinde farmakolojik etkileri bilinmektedir [10].

Bombesin ve bombesin benzeri peptidlerin, memeli dokuları üzerinde özellikle gastrointestinal sistem (GIS) 'de trofik, immunolojik ve mitojenik; santral sinir sistemi (SSS) üzerinde biyolojik ve immun reaktivitede bulunduğu saptanmıştır [11, 12]. İn vitro yapılan yara iyileşmesi çalışmalarında bombesinin IL-1, IL-8, TGF-b gibi sitokinleri ; COX-2, VEGF ve TLRs gibi proangiogenik parametreleri artırdığı görülmüştür [13].

Yapılan çalışmalardan yola çıkarak , bombesinin sinir iyileşmesine olan etkilerinin histopatolojik ve elektrofizyolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Periferik Sinir Histoanatomi, Morfolojisi, Fizyolojisi**

#### **2.1.1. Periferik Sinir Histoanatomi**

##### **Nöron**

Nöron, soma veya perikaryon olarak bilinen hücre gövdesi; bir veya birden fazla dendritik çıkıntılardan ve bir adet aksonal çıkıntından oluşur. Soma çekirdek ve organelleri barındırır. Boyut ve morfolojisi sinir sistemindeki işlevine göre değişebilmektedir. Perikaryon stoplazması serbest ribozom ve kaba endoplazmik retikulumdan zengindir. Işık mikroskobu ile görüntülediğinde koyu mavi boyanan sık dizilmiş asidofilik lekeler; Nissl cisimcikleri görülebilmektedir. Hücre gövdesi, melanin ve lipofuscin pigmentleri ve yağ damlacıkları gibi sayısız inklüzyon cisimciği ihtiva etmektedir.

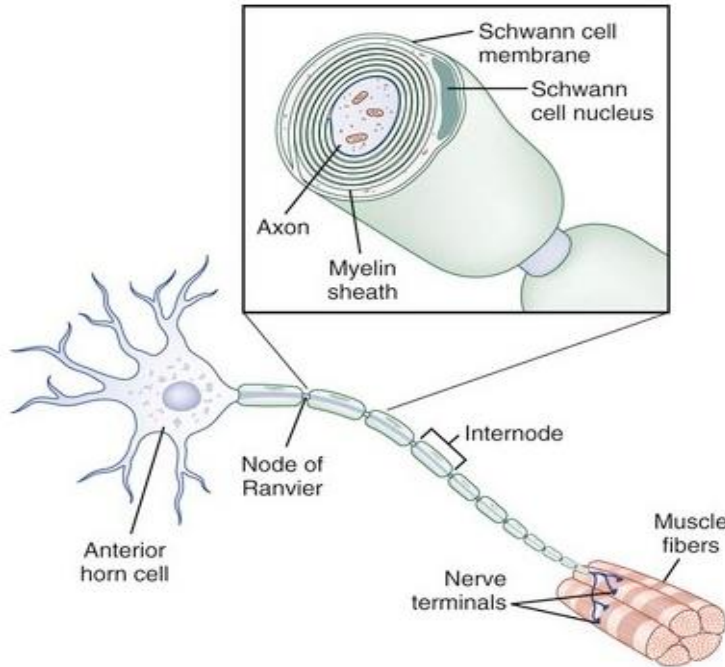
Nöronların sitoiskeletal bileşenleri nörofilament, mikrofilament ve nörotübüllerden oluşur. Mikrofilamentlerin yapısını, çoğunlukla akson ve dendrit hücre membranlarının plasmalemmada ki hareketinden sorumlu filamentöz aktin oluşturur. Nörofilamentlerin yapısını, çapı 2 mikrondan az nörofibriller ara filamentler oluşturur. Nörofilamentler akson ve dendritlerin rejenerasyon ve gelişimini destekler. Stoplazmada ve dendritlerdeki MAP-2 (microtubule associated protein-2), aksondaki MAP-3 (microtubule associated protein-3) gibi mikrofilamentler, hücre şeklini korumak için iskelet benzeri yapı sergilerken, somadan gelen materyallerin taşınmasında da yardımcıdır [14]. GAP-43 (growth-associated protein-43), sinir rejenerasyonu esnasında büyüme konisinin yüksek aktivitesiyle eksprese edilen mikrotübüller bir proteindir [15].

## Dendrit

Dendritler kısa, dallanma gösterebilen, endoplazmik retikulum ve vesiküllerin bulunduğu, impulsları özelleşmiş reseptörleriyle alarak hücre gövdesine aktaran yapılardır. Fazla sayıda dallanma gösterebildikleri için bir çok farklı kaynaktan eş zamanlı bilgi transferi yapabilirler [14].

## Akson

Memeli aksonları aksolemma denilen yaklaşık 7-9 nm kalınlıktaki trilaminer plazma membranıyla kaplıdır. İç tabaka daha yoğun olmak üzere iç ve dış tabakalar osmofiliktir. Aksolemma iç yüzeyinde ve ranvier nodları etrafında belirgin 7-12 nm lik parçacıkların iyon kanalı benzeri transmembran proteinleri olduğu kabul edilmektedir (Şekil 1). Aksoplazma hücre iskeleti elemanları, dense granülleri, mitokondri, endoplazmik retikulum, ribozom vs ultrayapısal fonksiyonlardan sorumlu organelleri ihtiva eder.



**Şekil 1: Periferik Sinir Hücresi [16]**

Aksonun kesit alanı sınıflandırıldığı ve tanımlandığı temel özelliği gösterir. Periferik sinir sistemindeki aksonların kalibresi belirli modelleri takip eder ve

aksonların fonksiyonel sınıflandırılmasına izin verir. Aksonun kalibresi gelişen sinirde myelin kalınlığını ve belki de myelogenezi etkiler. Akson çapı ve ve sinir iletimi arasındaki bağlantı saniyede metre cinsinden  $\mu\text{m}$  çapının 6 katına eşittir ( $\dot{I}H=6\dot{C}$ ). Daha küçük myelinli sinir lifleri için faktör daha düşüktür ( $\dot{I}H=1.7\dot{C}$ ). İleti hızının çapa bağlı değişimi, akson kalibresinin düşmesiyle artan monosinaptik ark gecikmesidir. Akson-kesitsel alandaki değişiklikler, sekonder demyelinizasyonun eşlik ettiği periferik sinir hastalıklarında da görülür.

### **Schwann hücresi**

Schwann hücresinin dış tarafından içeriye doğru ilerlerken, karşılaşılan ilk yapı bazal laminadır. Schwann hücresinin tamamı, ranvier düğümü boyunca sürekli olan ve uzun bir tüp oluşturarak sinir lifinin uzunluğunu oluşturan ve akson hasarı sonrası yenilenen sinir liflerinin yönlendirilmesinde önemli olduğu düşünülen bir bazal membran ile çevrilidir. Aksolemma gibi, schwann hücresinin plazma membranı trilaminardır, ancak aksonu sınırlayan membranın aksine, iç ve dış tabakaları benzer elektron yoğunluğuna sahiptir. Myelinli sinir liflerini aksonu kavrayarak destekler. Bu konfigürasyonda 3 farklı zon oluşur. En içteki veya en küçük boyut miyelin dönüşü ve aksolemma arasında adaksonal sitoplazmik bölgedir. En büyük, biraz daha geniş segment, kompakt miyelin kılıfını destekleyen ve proksimal kenarlarından uzanan nodal mikrovilliyeye uzak abaxonal sitoplazmadır. Ara kısım, paranod civarında bulunan aksolemmaya helikal olarak bağlı bir sitoplazma kenarına sahip kompakt miyelin içeren yapıdır.



## **Myelin kılıf**

Miyelinli sinir liflerinin karakteristik ultrastrüktürel özelliği; enine kesit incelemelerde açık lamelli düzenli kompakt spiral yapısıdır. Aldehitle fikse preparasyonları daha yakından incelendiğinde, 12 ila 17 nm arasında radyal periyodik bir yapı gösterir. PSS'deki miyelinli aksonlar, omurilikteki ve beyin sapındaki motor nöronlar veya periferik duyu ve otonomik gangliyonlarda olduğu gibi, merkezi sinir sisteminde bulunan ana sinir hücresi gövdelerinden uzayan uzun ince sitoplazmik çıkıntılardır. Bu hücrelerin birçoğu, SSS'den çevreye uzanır, ya da dorsal kök gangliyon hücresi gibi, uzun aksonları hem merkezi olarak (dorsal kolon duyu aksonları) hem de periferik olarak (primer duyu aferent sinir lifleri) ileti gönderir.

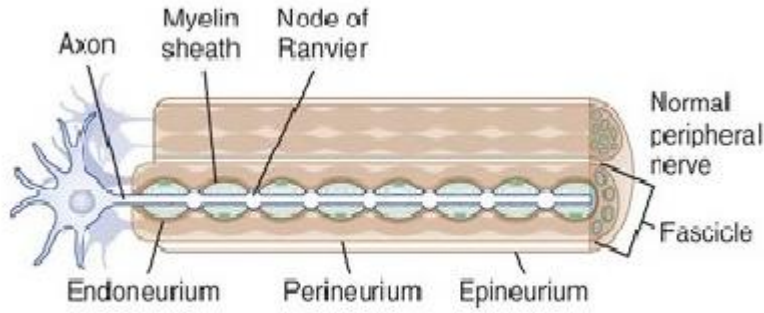
Tamamen SSS dışında kaldığı söylenebilen tek periferik sinir hücreleri, postganglionik otonomik nöronlardır. Miyelinli periferik sinir lifi, akson ve çok sayıda schwann hücresinden oluşur; bir dizi uzayan boncuklar gibi akson boyunca iç düğüm oluşturur ve boncuklar arasındaki dar boşluklar, ranvier düğümleri ile kesilir. Bu silindirik miyelin kılıfı, tipik olarak aksonu, sinir terminallerinin birkaç mikron periferine uzanan, hücre gövdesine yakın bir noktadan ayırır.

## **2.1.2. Periferik Sinir Morfolojisi**

### **2.1.2.1.Epinöryum**

Epinöryum, uni ve multifasiküler sinirlerin fasiküllerinin perinöryal kılıfını çevreleyen gevşek bağ dokularının yoğunlaşmasıdır. Çevreleyen bağ dokuları ile sürekli olmasına rağmen, fiziksel bağlanma oldukça gevşektir, böylece sinir gövdeleri büyük kan damarları ile bağlandığı durumlar dışında hareketliliği korurlar. Sinirlerin kesiştiği yerlerde, epinöryal bağ dokusunun daha fazla oranda mevcut olduğu görülür. Kollajen demetleri epinöryum boyunca dağılmıştır. Bu

lifler esas olarak sinir gövdesinin ekseni boyunca yönlendirilir (Şekil 2). Epinöryum yapıları oluşturan ana hücreleri dışında fibroblastlar, epinöryum mast hücreleri ve lenfosit veya makrofaj gibi tek tük bağışıklık sistemi hücreleri içerebilir. Özellikle daha büyük proksimal sinir gövdelerinde değişken miktarlarda epinöral yağ mevcut olabilir.



**Şekil 2: Periferik Sinir Morfolojisi[16]**

Vasa nervorum epinöryum'a çeşitli seviyelerde girer. Sinire girerken, bu damarlar arteriol ve venüllerle karmaşık, uzunlamasına bir anastomoz ağı oluşturur. Sunderland sinirlerin lenf drenajı ile bir epinöral lenfatik kapiller ağı, sinir kanalının arterlerine eşlik eden, daha büyük kanallar oluşturmak için birleştiği ve en sonunda bölgesel lenf düğümlerine akan lenfatik kanallar tarafından boşaltıldığı sonucuna varmıştır.

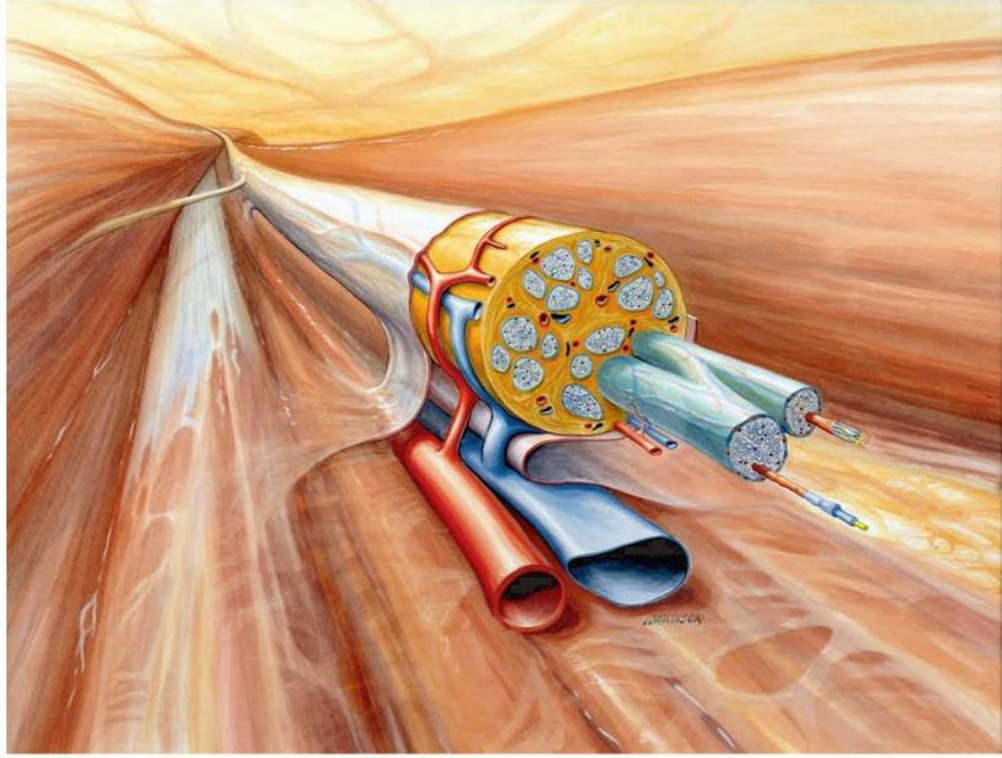
#### **2.1.2.2. Perinöryum**

Perinöryum hem somatik hem de periferik otonomik sinirler ve onların gangliyonları için bir örtü oluşturur. Perinöral lameller, düzleşmiş poligonal hücrelerin eşmerkezli katmanlarından oluşur. Lamel sayısı genellikle fasikülün

çapıyla orantılı iken, büyük memeli sinir gövdelerinin fasiküllerinin etrafında 15 tabakaya kadar olabilir.

Perinöral hücreler basal laminanın her iki tarafında boşluklu bir yapı oluşturacak şekilde bulunmaktadır. Bazal lamina bazen oldukça kalın, bazen memeli sinirlerinde 0.5 mikron kadardır. Sitoplazma, perinükleer bölgede hariç, yetersizdir. Endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organellerin ağırlıklı olarak çekirdeğin yakınında toplanmış ve glikojen partikülleri sıklıkla bol miktarda bulunur. Perinöral hücreler ekstraselüler boşluğun oblitere olduğu alanlarda sıkı bağlantılarla bağlıdırlar. ZO-1 ve occludin ile etkileşime giren claudin-1 sıkı bağlantıların önemli yapı taşıdır ve perinöral hücreler tarafından bolca sentezlenir. Perinöral hücreler tarafından eksprese edilen diğer belirteçler arasında epitelyal membran antijeni ve glikoz taşıyıcı-1 bulunmaktadır.

Endositotik vesiküllerin, özellikle de dış tabakada bulunması, perinöral hücreler boyunca bir taşıma sistemi olduğunu göstermiştir. Histokimyasal analizler, perinöral hücrelerin geniş bir yelpazede fosforlama enzimleri, ATPaz hem de kreatin fosfataz aktivitesinin yüksek titrelerini içermektedir. Bu tür hücre ilişkilerinin varlığı, perinöryum difüzyon bariyeri özelliği ile ilişkili olabilir.



**Şekil 3: Periferik Sinir Mikrovasküler Anatomisi[17]**

Perinöral hücreler arasındaki etkileşim donma-kırılma metodolojisi ile açıklanmıştır ve temas noktalarında geniş zonula okludensler ile doğrulanır. Arteriol ve venüller arasındaki longitudinal bağlantıları olan kan damarları perinöryuma girer. Bu vasküler yapılar aynı zamanda epinöryumdaki interfasiküler kapiller ağla bağlantılıdır (Şekil 3). Perinöral ünite, çıkmakta olan terminal sinir dallarını çevreye doğru takip eder. Burada, en küçük sinir dalları, tek bir perinöral hücre tabakası tarafından kaplanabilir. Bu tabaka, daha sonra kas iğlerinin kapsülleri ve kapsüllenmiş uç organlarla birleşir. Kapsüllenmemiş uçlarda ve nöromüsküler kavşaklarda, perinöryal kovan açık bir uç ile sonlanır. Perinöral kılıfın ve kas lifini kaplayan bazal laminanın sonlandırılması arasında 1 ila 1.5 um açık bir boşluk vardır. Bu endonöral aralık ve dış tabaka arasında bağlantı oluşturur.

### 2.1.2.3.Endonöryum

Endonöryum, seyrek olarak bağ dokular, sinir lifleri, mikrodamarlar ve nadiren tek hücreler tarafından kaplanan, periferik sinirlerin her bir fasikülü içindeki kolektif bölmedir. Endonöryumdaki kollajen fibrilleri, perinöryumun görünümüne ve boyutuna benzerdir, uzunlamasına yönlendirilir ve sinir lifleri endonöral mikrodamarların yakınında kondansasyonlar gösterir. Sinir fasikülleri içinde, ultrastrüktürel çalışmalar, elektron mikroskobu ile bile, belirli bir tanımlanabilir profile sahip olmayan, ince taneli heterojen bir materyalden ibaret olduğunu gösterir. Bununla birlikte perinöryuma hemen bitişik, birkaç morfolojik desen, değişken kalınlık alanı da dahil olmak üzere ayırt edilebilir. Sinir lifleri küçük gevşek demetler halinde gruplanma eğilimindedir. Perinöryum ile sınırlanan kesit alanı, enine endonöral alan olarak adlandırılır. Bunun distal insan sural sinirinde 0,6 ila 1,2 mm<sup>2</sup> arasında değiştiği tahmin edilmektedir. Toplamın yoğun kollajen fibrilleri tarafından alınan alan 0.3 mm<sup>2</sup> 'dir. Miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri tarafından doldurulan kalan endonöryum, 0.2 ila 0.4 mm<sup>2</sup> 'dir.

Her sinir fibrili, ranvier düğümlerinin dış hattını izleyen ve her ikisi de schwann hücre nodunu, paranodal aparatı ve aynı zamanda araya giren hücre dışı alanı kaplayan sürekli bir bazal lamina ile kaplıdır. Bunun biraz dışında, daha büyük miyelinli sinir liflerini çevreleyen, tipik olarak dairesel ve eğik bir yönelimi gösteren, ince bir kollajen fibril bandı bulunur. İç ve dış endonöral kılıflar arasında, kollajen fibrillerinin sinir lif eksenine paralel, daha az yoğun olarak paketlenmiş ve yönlendirildiği küçük miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri arasında belirgin bir ayrım yoktur. Endonöryumda; fibroblastlar, schwann hücreleri, makrofajların ve lenfositlerin sitolojik ve histokimyasal özelliklerine sahip bazı

hücreler, normal memeli sinirlerinde sıklıkla perivasküler veya subperinöryal dağılımda görülür [18].

### 2.1.3.Periferik Sinir Fizyolojisi

Nöronlar salgı yapan hücrelerdir; diğer salgı yapan hücrelerden farklı olarak salgı yapan kısım hücre gövdesinden uzakta aksonun sonundadır. Protein sentezi için gerekli organel genellikle hücre gövdesindedir. Proteinler ve polipeptidler aksonal sonlanmaya aksoplazik akımla taşınır. Böylece hücre gövdesi, aksonun işlevsel bütünlüğünü sağlar. Akson kesilirse distalde dejenerasyon oluşur.

Orto grad taşınım aksonun uzunluğu boyunca uzanan mikrotübüllerde gerçekleşir, dinein ve kinezin olmak üzere iki moleküler motora gereksinim gösterir. Orto grad taşınım hücre gövdesinden akson sonlanmalarına doğru hareket eder. Bu taşınımın hızlı ve yavaş bileşenleri vardır; hızlı akson taşınımı, 400 mm/gün hızında ve yavaş akson taşınımı 0,5-10 mm/gün hızında gerçekleşir. Retro grad taşınım mikrotübüller boyunca 200 mm/gün hızında, sinir sonlanmasından hücre gövdesine doğru ters yönde oluşur. Sinaptik veziküller hücre zarında tekrar tekrar kullanılır; fakat bazı kullanılmış veziküller hücre gövdesine geri taşınır ve lizozomlara girer. Aralarında sinir büyüme faktörü (NGF) ve çeşitli virüslerin de bulunduğu bazı maddeler sonlanma bölgesinden endositozla alınarak hücre gövdesine geri taşınır. Bazı dendritlerde bu kuralların önemli istisnaları bulunmaktadır. Bu dendritlerde hücre gövdesinden taşınan tek sarmallı mRNA'lar uygun ribozomlarla temas kurar ve böylece ortaya çıkan protein sentezi lokal protein alanları meydana getirir.

Sinir hücreleri elektriksel, kimyasal ve mekanik uyarılara yanıt verir. Nöronlarda istirahat zar potansiyeli - 70 mV'dur ve bu değer K<sup>+</sup> için denge potansiyeline yakındır. İstirahat sırasında Na<sup>+</sup> kanalına göre çok fazla sayıda K<sup>+</sup> kanalı bulunduğu için zarın K<sup>+</sup> 'a geçirgenliği daha fazladır. Aksiyon potansiyeli

sırasında Na<sup>+</sup> sinir hücresine girer ve K<sup>+</sup> hücreyi terk eder. Ancak bu harekette yer alan iyonların sayısı toplam sayı ile karşılaştırıldığında çok azdır. Zar potansiyelini + 30 mV'tan (aksiyon potansiyelinin zirvesi) -70 mV' a getirmek için K<sup>+</sup> iyonlarının yalnızca 100.000' de birinin zarı geçtiği hesaplanmıştır. İyon konsantrasyonlarındaki belirgin değişiklikler ancak uzun süreli, yineleyen uyarılardan sonra ölçülebilmektedir.

İstirahat sırasında sinir hücresi zarı pozitif yükler zarın dış kısmı ve negatif yükler iç kısmı boyunca sıralanmış şekilde kutuplanmıştır. Aksiyon potansiyeli sırasında bu kutuplanma ortadan kalkar ve kısa bir süre için tam tersine döner. Aksiyon potansiyelinin önünde ve arkasında yer alan zar alanlarındaki pozitif yükler, aksiyon potansiyeli tarafından oluşturulan negatif yük bölgesine doğru akar. Bu akım, pozitif yükleri uzaklaştırarak aksiyon potansiyelinin önündeki zarın kutuplanmasını azaltır. Bu tür elektrotonik depolarizasyonlar lokal bir yanıt başlatır ve ateşleme düzeyine erişildiğinde ilerleyen bir yanıt oluşturarak önündeki zarı daha sonra elektrotonik olarak depolarize eder.

Voltaj-kapılı Na<sup>+</sup> kanalları, miyelinli nöronların başlangıç bölümünde ve ranvier boğumlarında çok yoğundur. Miyelinli memeli nöronlarında zarın mikrometre karesinde bulunan Na<sup>+</sup> kanallarının sayısı hücre gövdesinde 50-75, başlangıç bölümünde 350-500, miyelinin yüzeyinde 25'den az, ranvier boğumlarında 2000-12000 ve akson sonlanmalarında 20-75'dir. Miyelinsiz nöronlarda aksonlar boyunca bu sayı yaklaşık 110' dur. Birçok miyelinli nöronda Na<sup>+</sup> kanallarının hemen yakınında repolarizasyonda görev alan K<sup>+</sup> kanalları bulunur. Miyelinli aksonlarda ileti, yukarıda tarif edildiği üzere döngüsel akıma benzer bir paterne dayanır. Bununla birlikte miyelin etkin bir yalıtıcıdır ve buradan geçen akım ihmal edilebilir oranda azdır. Bunun yerine miyelinli aksonlarda depolarizasyon, aksiyon potansiyelinin önündeki boğumu ateşleme seviyesine ulaşmaya kadar elektrotonik olarak depolarize eden (aktif boğumdaki)

akım çukuru tarafından bir ranvier boğumundan diğerine taşınır. Depolarizasyonun boğumdan boğuma bu sıçramasına sıçrayıcı (saltatorik) ileti denir. Miyelinli aksonların, en hızlı miyelinsiz liflerden 50 kat daha hızlı iletim yapmasına imkan veren hızlı bir süreçtir [19] .

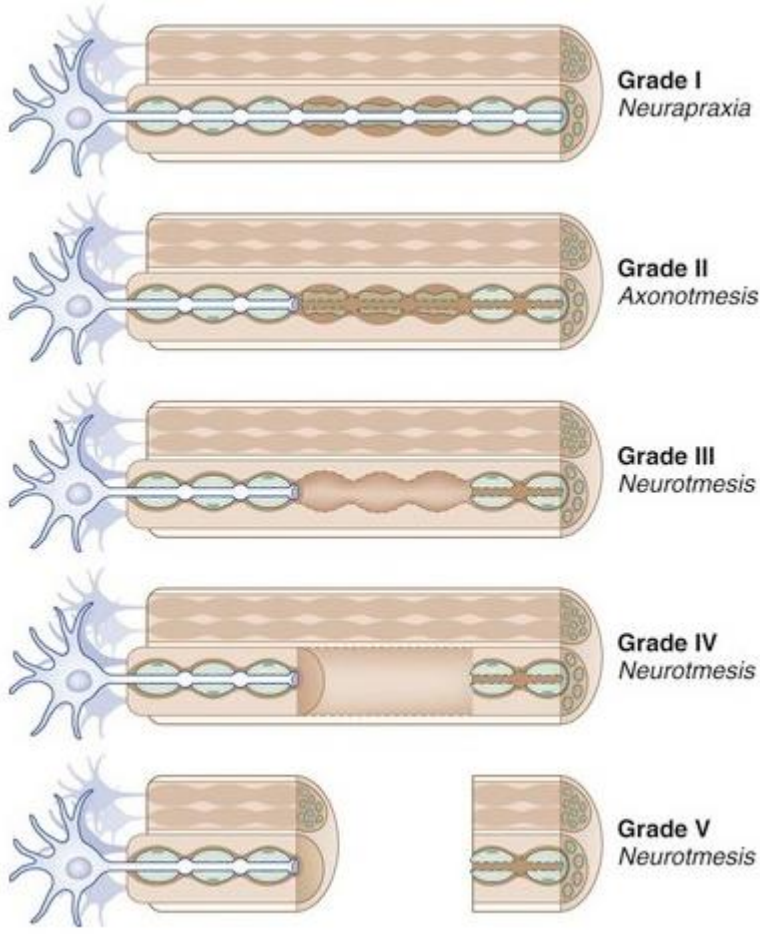
## 2.2.Periferik Sinir Hasarları

Seddon'un ve Sunderland'in 1947'de ve 1951'de tanımladıkları sınıflandırma sistemleri, sinir hasarı yönetimine rehberlik etmeye ve rekonstrüktif stratejiler için cerrahları yönlendirmeye devam ediyor. Seddon orijinal sınıflandırmasında, (nöropraksi,aksonotmezis,nörotmezis) aksonotmezisi tam (Sunderland II) veya eksik iyileşme (Sunderland III) olarak tanımladı. Ayrıca Seddon, nörotmetik bir hasarın süreklilik içinde olabileceğini (Sunderland IV) veya tam bir geçiş olabileceğini (Sunderland V) de belirtmiştir.

Nöropraksi (birinci derece) yaralanması, segmental demiyelinizasyona sahip olan, ancak aksonal veya bağ dokuda kesintiye neden olmayan iskemik bir hasarı temsil eder. Lokalize bir iletim bloğu görülür, ancak aksonlar yaralanmadığı için rejenerasyon gerekli değildir ve 12 haftaya kadar remiyelinizasyon ve iyileşme beklenir. Turnike palsiler tipik olarak akut iletim bloklarıdır ve 12 hafta içinde iyileşir.

Bir aksonotmetik (ikinci derece) yaralanma, sağlam bağ doku kılıfları ile karakterize aksonal bozulmadır. Distaldeki akson segmenti wallerian dejenerasyona uğrarken, proksimaldeki sinir lifleri ayda ~ 1 inç (2.5 cm) oranında yenilenir. Tanım olarak, bağ dokusu tabakaları zarar görmez. Rejenerasyonun ilerleyişi tinel testi ile takip edebilir.





**Şekil 4: Periferik Sinir Yaralanma Tipleri [16]**

Üçüncü derece yaralanmalar endonöryumdaki bazı yaralı aksonların rejenerasyonunu önleyen fibrozisle karakterizedir (Şekil 4). Bu, eksik veya eşleşmeyen uç organ innervasyonuna yol açar ve yaralanma, bir sıkışma alanına lokalize olursa cerrahi dekompresyon ihtiyacı olur. Hasar derecesi greftle onarım yapılmış sinirden daha iyi olmakla beraber ağrı ve nedenselliği kontrol etmek için dördüncü derece hasar gibi yaklaşılabilir. Distal kasları koruma adına end to side süpersaj sinir transferi yapılabilir.

Dördüncü derece yaralanmalar spontan iyileşme potansiyeli olmayan sürekli bir nöroma potansiyeline sahiptir, çünkü rejeneratif aksonların tüm popülasyonu skar ile bloke edilir. Sinir grefti onarımı ile nöroma eksizyonu endikedir.

Nörotmezis (beşinci derece) yaralanmalar sinir lifi , hem aksonları hem de tüm bağ dokusu elementlerinin bölünmüş olduğu durumdur. Cerrahi endikedir.

Mackinnon, normal fasiküllerin karışık görüntüsünü, aynı seviyede bozulma, iki veya daha fazla hasar paternini gösteren sinir yaralanmalarını tanımlamak için, altıncı derece hasarını tanımlamıştır. İç topografinin, ana bileşenlerin ayrı fasiküller halinde ayrıldığı durumlarda, ayrıntılı bir klinik muayene, tek bir sinirin ayrı bölümlerinin işlevini ortaya koyabilir. Çeşitli sinir fasiküllerini yaralanma derecelerine göre farklı şekilde tedavi etmeyi gerektirir. Bu karmaşık rekonstrüktif yaklaşım, normal olan veya iyileşme potansiyeline sahip fasikülleri korumak ve kaybetmemek için en yüksek yargılama ve teknik beceri düzeyini gerektirir [20].

### **2.3.Sinir Dejenerasyonu ve rejenerasyonu**

Büyük miyelinli periferik aksonlar yaralanma veya hastalığa üç şekilde yanıt verebilir; segmental demiyelinizasyon, wallerian dejenerasyon ve aksonal dejenerasyon. Segmental demiyelinizasyon ve wallerian dejenerasyon, travmatik sinir hasarı ile ilgilidir. Aksonal dejenerasyon ise daha karakteristik olarak diabetes mellitus ve böbrek yetmezliği gibi metabolik ve toksik sinir bozukluklarında görülür.

#### **Segmental demiyelinizasyon**

Segmental demiyelinizasyon, fokal bir sinir segmentinde nispeten hafif bir bası veya çekiş kuvvetine maruz kaldığında ortaya çıkar. Yaralanma yerinin distali ve proksimale uzanan sinir segmentleri normaldir. Bununla birlikte, yaralı

bölüm boyunca iletim bozulur, ancak miyelin kılıfının distorsiyonu, bir veya birkaç internodun dejenerasyonuna neden olur. Böylece kılıfın bir elektrik izolatörü olarak hareket etme kabiliyeti azalır. Myelin kılıf hafif hasar görürse, lokal sonuç; sinir segmenti boyunca iletim hızının yavaşlamasıdır. Bir sinir fasikülü içindeki aksonların fokal demiyelinizasyonu, bazı lifleri etkileyebilir ve etkilenen sinir segmenti boyunca asenkronize iletim ile sonuçlanır. Bu durumda, impulslar, milisaniye cinsinden bir gecikmeden sonra hedeflerine ulaşır, ancak yavaşlama, parestezi ile sonuçlanan, yüksek senkronize; derin tendon refleksleri, titreşim hissi gibi sinir fonksiyonlarını etkileyebilir.

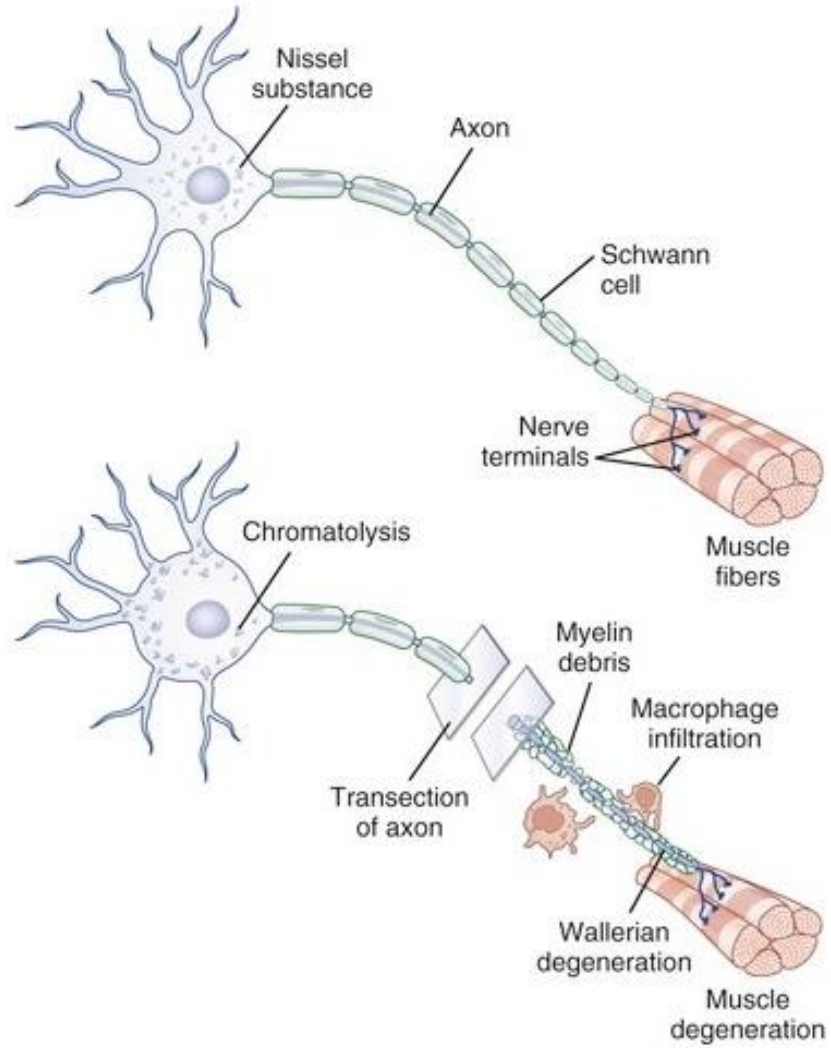
### **Wallerian dejenerasyon**

Periferik sinir hasarında, akson, hücre gövdesi, hücresel bağlantılar ve çevresindeki bağ dokuları içeren karmaşık bir süreç başlar. Wallerian dejenerasyonu; grade II den grade V e kadar olan yaralanmalarda, distal sinir segmentlerini ve yaralanma zonu proksimalini kapsar .

### **Distal segment**

Sinir yaralanmasından sonra, en erken değişiklikler zon distalinde kalan akson bölgesinde meydana gelir, retrograd ve anterograd sinyal akışı kesintiye uğrar [21]. Aksonal plazma zarındaki bozulma ile kalsiyum ve sodyum gibi ekstraselüler iyonların hızlı akışı olur, bu da programlanmış hücre ölümü (apoptoz) zincirini aktive eder. Aksonal yaralanma aynı zamanda sitokin aracılı sinyal kaskadını başlatır ve komşu olmayan hücrelerde değişiklik yapar ki; bu da lökositlerin kemotaksisini, nörotrofinlerin, kemokinlerin, hücre dışı matris moleküllerinin, proteolitik enzimlerin ve interlökinlerin sentezini tetikler [22].

Tüm aksonal wallerian dejenerasyon süreci yaklaşık 1 hafta sürmektedir. 3. günde Schwann hücreleri, ranvier düğümünlerine yönelir ve aktive makrofajlar miyelini sindirmeye başlar. Nöronal dejenerasyon süreci, proksimal güdükte, nöronal rejenerasyona geçene kadar hızla devam eder (Şekil 5).



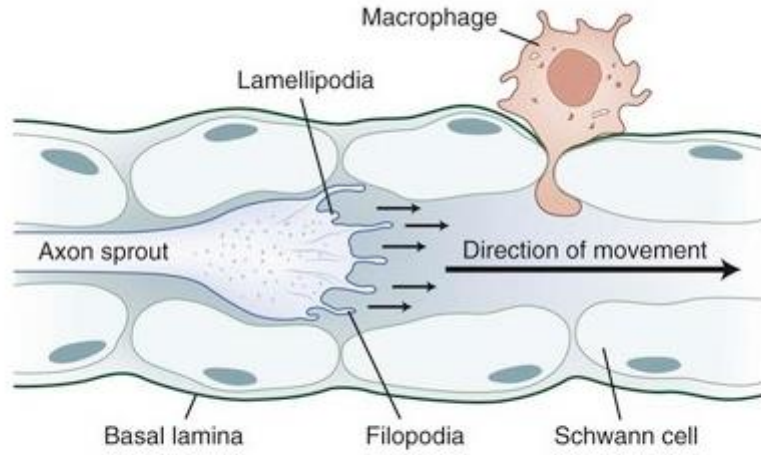
Şekil 5: Akson kesisi sonrası meydana gelen değişiklikler [16]

### **Proksimal segment**

Yaralanmanın ciddiyetine bağlı olarak, yaralanma bölgesinden ilk ranvier nodunun proksimaline kadar sınırlı bir akson bozulması olur. Proksimal yaralanmaların çoğu, hücre gövdesinin kendisinde apoptosise yol açabilse de, aksonal hasarın daha yaygın bir sonucu, hücre gövdesinin kromatolizise uğramasıdır. Bu da kaba endoplazmik retikulumun parçalanması ve dispersiyonunu, hücre çekirdeğinin eksantrik yer değiştirmesini ve akson bakımından protein sentezi için gerekli gen ekspresyon modelini değiştiren transkripsiyon faktörlerinin nükleer ekspresyonunun artışı demektir [23].

### **Sinir rejenerasyonu**

Fokal demiyelinizasyon sonrası schwan hücrelerinin üretmiş olduğu myelin yapı daha incedir. Bir kası inerve eden aksonların sadece bir kısmı hasar gördüğünde, bozulmamış motor aksonlar, denerve kas lifini yeniden inerve edecek kollateraller üretir. Kollateral dallar yaralanma sonrası 4. gün ranvier düğümlerinden başlar. Kollateral filizlenme nedeniyle klinik iyileşme, yaralanma sonrası 3 ila 6 ay kadar sürer. Hayatta kalan motor aksonun hemen filizlenme sürecine başladığı kısmi veya hafif sinir yaralanmasının aksine, şiddetli veya tam hasarda nöronal rejenerasyon, sadece wallerian dejenerasyonu tamamlandıktan sonra proksimal güdükten başlar. Bu filizler daha sonra, yeni aksonların büyümesi için bir yol sağlayan miyelinli aksonların ( büngner bantları) bazal lamina tüplerinin etrafına hizalı kordlar oluşturur [4].



**Şekil 6: Aksonal rejenerasyon [16]**

Büyüme konisi adı verilen akson filizinin ucu, filopodia ve lamellipodia denilen, nörotrofik reseptörlerce zengin çıkıntılar yoluyla hareket eder (Şekil 6). Proksimal lezyonlarda, büyüme 2 ila 3 mm/gün kadar hızlı olabilirken, distal lezyonlarda ise 1 mm/gün kadardır [24].

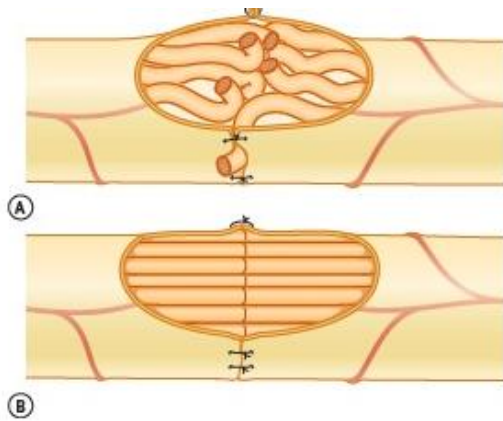
Schwann hücrelerinin proliferasyonu, sinir büyüme faktörü (NGF) [25] ve fibroblast büyüme faktörü [26], beyin derive nörotrofik faktör (BDNF), glial hücre derive nörotrofik faktör (GDNF), insulin-benzeri büyüme faktörleri-1/2 [IGF1, IGF2], transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), fibroblast büyüme faktörü (FGF), leukaemia inhibitor faktör (LIF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi ve sonic hedgehog/shh, interleukin-1 [IL-1], IL-6, pleiotrophin, glial büyüme faktörü-nöregrelin gibi nörotrofinlerin sentezlenmesine neden olur [27-29]. N-CAM, miyelin ilişkili glikoprotein ve tümörle ilişkili glikoprotein (TAG)-1 gibi bir dizi hücre adezyon molekülü [30], laminin ve fibronektin gibi nörit büyümesini teşvik edici faktörler distal sinir segmentindeki rejeneratif aksonların gelişmesinde önemli rol oynamaktadırlar [31].

## 2.4.Periferik Sinir Onarımı

Sinir transeksiyonu şüphesi var ise hastanın durumunun stabil olması dışında eksplorasyon ve onarım açısından beklemeye gerek yoktur. İlk iki gün içerisinde yapılan eksplorasyon ve onarım primer, iki ile yedi gün arasında gecikmiş primer onarımdır. Bir hafta sonrası onarım, sekonder onarım olarak kabul edilir. Gene de yaralanmadan 2-3 hafta sonra bile sinir, greft gerekmeden koaptlanabilir. Bununla birlikte yaralanma sonrası süre ne kadar uzarsa primer nörorafi imkanı o kadar azalmaktadır [32].

### Gerilim ve sinir onarımı

Sinir onarımında aşırı gerilimin, koaptasyon bölgesindeki skarlaşmayı arttırdığı ve rejenerasyonu bozduğu bilinmektedir. Zedelenmemiş bir sinirde mikrovasküler akımın % 15 azalması relaksasyondan bir saat sonrasında bile ileti hızında % 34 azalmaya sebep olur [33]. Diğer taraftan hafif gerginliğin, nörotropik büyüme faktörlerini uyararak onarım için yararlı olduğuna inanılmaktadır. Sinirin iki ucu makul bir şekilde yaklaştırılır gerekirse trimlenir (Şekil 7).



Şekil 7:Fasiküler herniasyon ve trimleme [34]

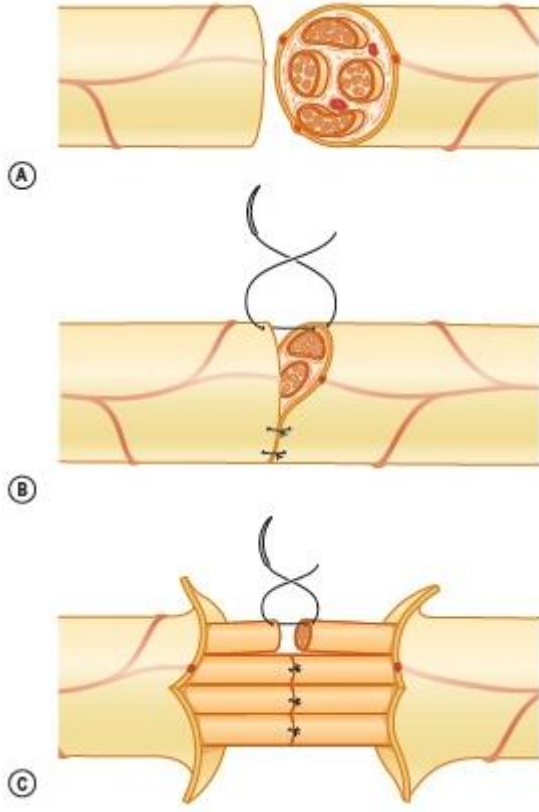
Sinirin gerilmesi mikro dolaşımı azaltır ve aşırı gerginlik onarımın bozulmasına neden olur. Ek olarak, kolun adduksiyonda konumlandırılması veya el bileği ve parmakların fleksiyona getirilmesi gibi püf noktalar, hasarın konumuna bağlı olarak onarımdaki gerilimi önemli ölçüde azaltacaktır ve mevcut sinirin toplam uzunluğunu artıracaktır. Ancak, primer onarımı zorlamamak için postüral manipülasyondan kaçınmak gerekir. Onarımın yakınındaki eklem çok erken hareket ettiğinde dehisans meydana gelebilir fakat uzun süreli hareketsiz kalmadan dolayı da önemli bir kontraktür oluşabilir [35].

### **Epinöral ve fasiküler onarım**

Giddins, 9-0 naylonun en büyük distraktif kuvvetlere dayanmasını , sütürün akut onarımının kuvvetini, medyan sinirin kuvvetiyle karşılaştıran bir kadavra çalışması yapmıştır. Daha düşük bir gerilimde 10-0 kopmuş ve 8-0 dikişler sinir dokusundan çekilmiştir [36].

Sinir ve epinöryum kalınlığına bağlı olarak sütür tercihi değişmektedir. Sinir kesilerinin primer onarımında epinöral ve fasiküler onarımlar tercih edilmektedir. Bu aşamada vasa nervorumlar kılavuz olarak kullanılabilir. Büyük periferik sinirler için fasiküler onarım sinir uçlarının hizalanmasını artırmak amaçlı tercih edilebilir, ancak fasiküller örtüşmediği sürece iki teknik arasında sinir iyileşmesi açısından anlamlı bir fark yoktur [37].





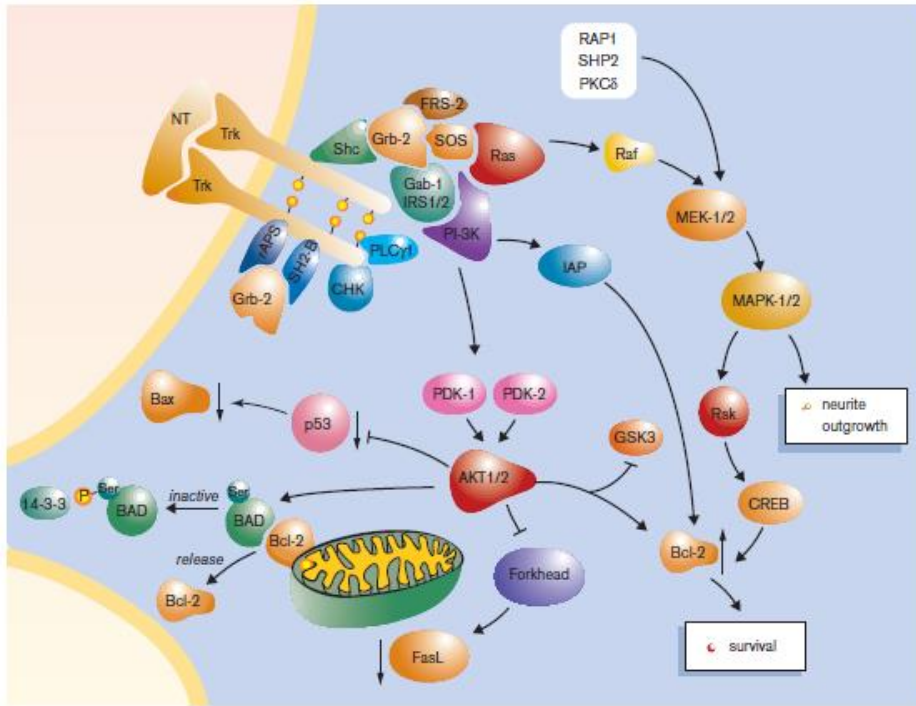
**Şekil 8 :a)Sinirde tam kesi b)Epinöral onarım c)Perinöral onarım [34]**

Perinöral onarımın dezavantajı, geniş diseksiyon ve kalıcı intranöral dikişlerin fibrozis artışına yol açabilmesidir [38]. Travma, ödem ve skarlaşma topografik anatomiye bozacağından lifleri hizalamak genellikle zordur, bu sebepten epinöral onarım çoğu kez tercih edilmektedir (Şekil 8).

### **Aksonal büyümeyle etkileyen faktörler**

Nörotrofinler, iki tip hücre yüzeyi reseptörüne, Trk tirozin kinazlarına ve p75 nörotropin reseptörüne (p75NTR) bağlanarak nöronların hayatta kalmasını, farklılaşmasını, büyümesini ve apoptozunu düzenler. Nörotrofin reseptörlerinin fonksiyonları, gelişmekte olan sinir sisteminin şekillendirilmesinden hasarlanmış nöronların hayatta kalmasına ve rejenerasyonuna kadar belirgin bir şekilde

değişmektedir. Trk reseptörleri, gelişmiş sağkalım ve büyüme gibi pozitif sinyalleri, p75NTR ise hem pozitif hem negatif sinyalleri iletir. İki nörotrofin reseptörü tarafından üretilen sinyaller, ya birbirini güçlendirir ya da zayıflatır. Trk ve p75NTR, her biri diğerinin eylemlerini bastırmak ya da geliştirmek için hareket eden paradoksal bir ilişki içindedir.



**Şekil 9 :Trk sinyal yolları,nörotrofin transfosforilasyonu,sinyal proteinlerinin bağlanması[39]**

Trk aracılı sağkalım sıklıkla, nöronların hayatta kalmasına aracılık ettiği gösterilen ilk nörotrofin ile aktive edilmiş sinyalleme proteini, küçük GTP bağlayıcı protein Ras üzerinden sağlanır [40]. Nörotrofin bağımlı sağkalımın %40-60'ından sorumlu olan Ras, doğrudan hareket etmez. Daha ziyade, nörotrofin ile başlatılan sinyalleri çoklu sinyalleme yollarına çevirerek veya yönlendirerek çalışır (Şekil 9 ). Bu sinyal yollarından ikisi, PI-3K / Akt ve MEK / MAPK , nörotrofin ve Ras ile aktive edilmiş sağkalmanın başlıca etkileycileridir.

## PI-3K/AKT

PI-3K, ilk olarak, sinir büyüme faktörü (NGF) bağımlı PC12 hücrelerinde Cooper ve arkadaşlarının nörotrofin aracılı sağkalım cevaplarının bir regülatörü olarak tanımlanmıştır [41]. Daha sonra serebellar, sempatik, duyuşal, kortikal ve motor nöronlarda PI-3 kinaz aktivitesinin nörotrofin regüle hücre sağkalımının %80'inden sorumlu, nöronlar için başlıca hayatta kalmayı destekleyen protein olduğu gösterilmiştir. Ras'ın doğrudan PI-3K ile etkileştiği ve Ras'in baskılanmış NGF aracılı PI-3K aktivitesinin inhibisyonu bilinmektedir. PI-3K'yi aktive etmek için seçici olan fakat MEK / MAPK veya RalGDS (Rasrelated guanine nükleotit disosiasyon stimülatörü)'yi aktive etmek için seçici olmayan Ras efektör mutantları, sağ kalımı indüklerken, Ras-aracılı sağ kalım PI-3K inhibitörü LY294002 tarafından bloke edilmiştir [42, 43] . Ras, Trk'ın PI-3K'yi aktive etmesinin tek yolu değildir. Trk sisteminde PI-3K aktivasyonu muhtemelen, PI-3K'yi bağlayan ve uyaran ve aşırı eksprese edildiğinde NGF'den bağımsız sağkalımı güçlü bir şekilde uyarılmış olan bir adaptör protein olan Ras ve Gab-1'in kombine hareketlerinden kaynaklanır [44, 45] . Ras gibi PI-3K, birçok sinyalleme proteininin aktivitesini uyarır. Bunlar arasında NGF ile indüklenen PI-3K aktivitesinin bir hedefi olan serin / treonin kinaz Akt (veya protein kinaz B) yer alır [46, 47] . Akt sadece büyüme faktörü ile düzenlenmiş hücre sağkalımına aracılık etmekle kalmaz, aynı zamanda depolarizasyon ile teşvik edilen nöronal sağkalımı da etkiler. Serebellar nöronlarda Akt, L-tipi kalsiyum kanalları aracılığıyla Ca<sup>2+</sup> girişini uyararak sureti ile hayatta kalmayı sağlamış, sempatik nöronlarda ise L-tipi kanalların ve Ras / PI-3K'nin akış yönünde hareketini desteklemiştir [48, 49] .

## MEK/MAPK

Ras-MEK/MAPK yolu, sinaptik plastisite, uzun süreli potansiyelizasyon ve hayatta kalma da dahil olmak üzere nöronlarda birçok role sahiptir. Bununla birlikte, bu yolun nöronal sağkalım için katkısının kanıtı, çelişkilidir. NGF sempatik nöronlarda ve PC12 hücrelerinde güçlü ve sürekli bir MAPK aktivasyonu indüklerken, çoğu çalışma MEK inhibisyonunun NGF'ye bağlı nöronal sağkalım üzerinde minimal etkilere sahip olduğunu bildirmiştir [43, 50, 51]. Bu nedenle, MEK / MAPK'ın selektif aktivasyonu nöronal sağkalımı destekleyebilmesine rağmen, MEK inhibitörlerinin (hayatta kalan hücre sayısında < % 20 azalma) dramatik etkilerinin olmaması aynı hücre tiplerinde MEK aktivitesinin yeterli olduğunu, ancak çoğu zaman nörotrofin aracılı sağkalımda gerekli olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte BDNF aracılı sağkalımda, MEK inhibe edildiğinde, MEK-MAPK'nin nörotrofin aracılı serebellar nöron sağkalımında sadece % 20-30 oranında azalma olmuştur. MEK aktivitesinin bu faktörler tarafından desteklenerek hayatta kalma için gerekli olduğunu göstermektedir [52]. MEK'in sağkalım yollarındaki ana rolü, nöronları, trofik faktörlerin geri çekilmesinden ziyade, yaralanma veya toksisiteden korumak olabilir. Kortikal nöronlar, yapısal olarak aktif MEK ile korunurken, MEK inhibisyonu BDNF'yi engellenmiş, camptotecin aracılı apoptozdan kaynaklanan nöroproteksiyon azalmıştır [53].

Akt, apoptotik proteinlerin aktivitesini inhibe ederek nöronal yaşayabilirliği artırır. Farklı şekilde, MEK / MAPK, Bcl-2 ve transkripsiyon faktörü CREB (cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein) de dahil olmak üzere anti-apoptotik proteinlerin aktivitesini veya ekspresyonunu uyararak etki eder. NGF'nin, sempatik nöronlarda Bcl-2 seviyelerini güçlü bir şekilde arttırdığı, diğer nöronları da apoptotik hücre ölümlerinden koruduğu rapor edilmiştir [54, 55].

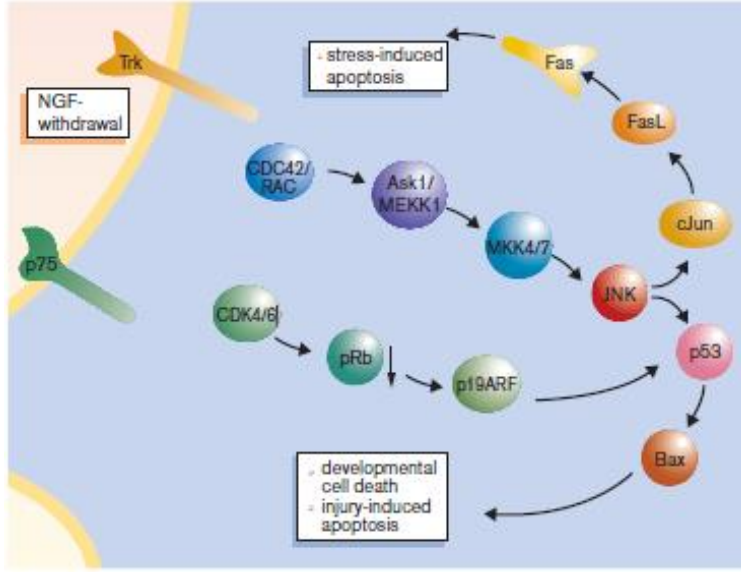
PC12 hücrelerinde MEK / MAPK aktivitesinin inhibisyonu, NGF'nin Bcl-2 seviyelerini artırma yeteneğini tamamen bloke etmiştir, bu da Bcl-2'nin MEK / MAPK yolunun transkripsiyonel hedefi olduğunu düşündürmektedir [56] .

### **p75NTR**

P75NTR ilk izole edilmiş nörotrofin reseptörü ve p75NTR / Fas / TNFR1 (tümör nekroz faktörü reseptörü 1) ailesinin ilk bildirilen üyesidir. Trk ile doğrudan etkileşim kurabilmesi ve bunun sinyal kapasitesinin Trk reseptörlerinin aktivasyonu ile modifiye edilmesi karmaşık bir ilişki oluşturmaktadır [57] .

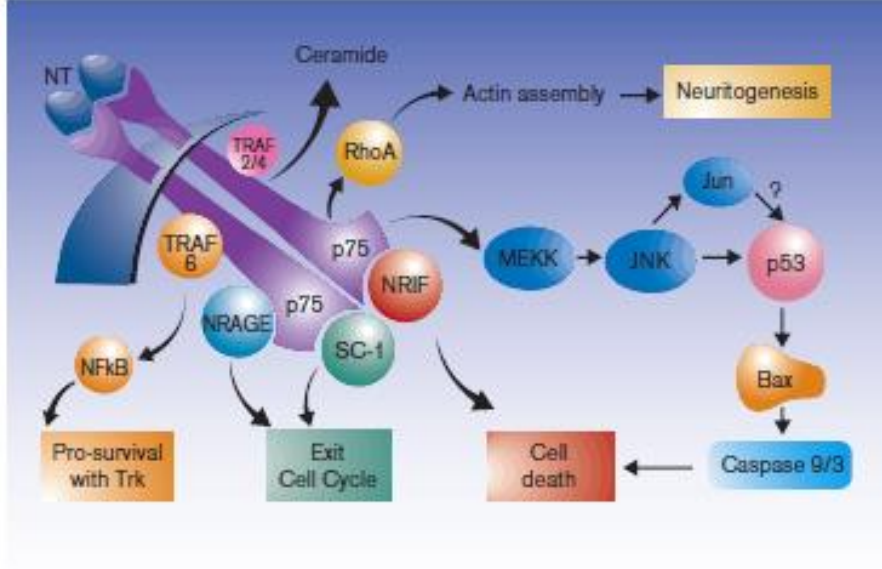
Yaralanma sonrası intraselüler p75NTR domain ekspresyonuna bağlı transgenik farelerde fasyal motor nöron ölümüne neden olması p75NTR'nin apoptoza neden olabileceğini düşündürmüştür [58] . Endojen p75NTR'nin, yaralanmış yenidoğan yüz motor nöronlarının ölümünde rol oynadığı ve yetişkin hayvanlarda nöbet geçirdikten sonra, ölen nöronlarda, nöronal apoptoza p75NTR'nin indüklenmesi eşlik etmiştir [59, 60] .

Ekzojen BDNF, kainik asit tedavisini takiben CA3 piramidal nöronlarının ölümünü şiddetlendirmiştir [61] . Bu bağlamda hem endojen hem de ekzojen nörotrofinlerin, hasarlı sinir sisteminde apoptoza neden olmak için p75NTR yoluyla hareket edebileceği düşünülebilir. Ayrıca p75NTR'nin gelişimsel hücre ölümü sırasında hızlı ve uygun apoptoz için gerekli olduğunu gösterilmiştir [62].



**Şekil 10 :NGF'nin çekilmesiyle aktiflenen hücre ölüm yolları[39]**

p75NTR aktivasyonu ile aktive olan ve NGF'nin geri çekilmesini takiben JNK (Jun amino-terminal kinaz) -p53-Bax'ı içeren yolakta, p53 bir anahtar ölüm sensörü gibi görünmektedir, bu proteinin seviyeleri nöronların in vivo ve kültürde apoptoz seviyesini belirlemektedir (Şekil 10) [54]. p75NTR aracılı apoptozu inhibe eden sempatik nöronlardaki TrkA aktivasyonu, Ras ve belki de PI-3K / Akt yoluyla bu JNK-p53 ölüm yolunu, oligodendrositlerde ise TrkA aktivasyonu, p75NTR aracılığındaki apoptozun baskılanmasıyla eş zamanlı JNK aktivasyonunu, seçici olarak susturur. p75NTR, aynı zamanda büyüme düzenleyici protein Rho'nun tarif edilen bir modülasyonu yoluyla aksonal büyüme de düzenler. Yamashita ve diğ. [63] 293 hücrede, p75NTR'nin transfeksiyonunun, Rho'nun güçlü bir aktivasyonuna yol açtığını ve p75NTR'ye bağlanan nörotrofin'in, bu p75NTR'ye bağlı Rho aktivasyonunu büyük ölçüde baskıladığını göstermiştir.



Şekil 11: p75NTR sinyal yolağı[39]

Rho aktivasyonunun nöronal büyümeyi inhibe ettiği gösterildiğinden [64], p75NTR; yerel mikroçevrede bulunan liganda bağlı ve bağlı olmayan oranlarıyla alakalı olarak, aksonal büyümeyi pozitif veya negatif olarak düzenleyebilmektedir (Şekil 11).

## 2.5.Bombesin

Bombesin, Avrupa kurbağaları *Bombina bombina* ve *Bombina variegata*'nın derilerinden üretilen metanolik ekstraktlarda bulunan 14 amino asitli bir tetradekapeptiddir [7]. Bu aileye ait olan amfibi peptitler şu anda üç alt aileye ayrılmaktadır; bombesin ve alitesin içeren bombesin grubu; ranatensin, litorin ve rohdei litorini içeren ranatensin grubu; ve Leu (8) - ve Phe (8) -fillolitorinleri içeren phyllolitorin grubudur [8]. Sonraki çalışmalar, memelilerin ve kuşların, amfibi cilt bombesinlerine çok benzeyen peptitlere sahip olduğunu ortaya

çıkarmıştır. Bu moleküllere, 'gastrin-releasing peptid' GRP adı verilmiştir [65]. Bu moleküller, 10 adet karboksil terminalinden, tek bir pozisyonda (20) kaydedilen farklılık dışında bombesin ile özdeş olduğu 27 amino asit kalıntısı içerir. Terminolojide karışıklık olmaması için C-terminal amino asit dizisi benzerliklerine sahip olan tüm peptitler için 'bombesin benzeri peptidler ' terimi kullanılmaktadır (Şekil 12).

<i>İsim</i>	<i>Amino asit Dizilimi</i>	<i>MA(D)</i>
<b>Bombesinler</b>		
Bombesin	pEQRLGNQWAVGHLM-NH <sub>2</sub>	1618
[pGlu1] bombesin (6-14)	pEQWAVGHLM-NH <sub>2</sub>	1053
[Phe13] bombesin	pEQRLGNQWAVGHFM-NH <sub>2</sub>	1621
Alytesin	pEGRLGTQWAVGHLM-NH <sub>2</sub>	1536
<b>Ranatensinler</b>		
Litorin	pEQWAVGHFM-NH <sub>2</sub>	1084
[Glu(OMe) <sub>2</sub> ] litorin	pEE(OMe)WAVGHFM-NH <sub>2</sub>	1098
PG litorin	pEGGGPGinWAVGHFM-NH <sub>2</sub>	1352
Rohdei litorin	pELWATGHFM-NH <sub>2</sub>	1034
Ranatensin	pEVPQWAVGHFM-NH <sub>2</sub>	1280
<b>Phyllolitorinler</b>		
Phyllolitorin	pELWAVGSFM-NH <sub>2</sub>	1019
[Leu8] phyllolitorin	pELWAVGSLM-NH <sub>2</sub>	985
[Thr5, Leu8] phyllolitorin	pELWATGSLM-NH <sub>2</sub>	987

### Şekil 12: Bombesin benzeri peptidler MA: molekül ağırlığı D: Dalton

Köpek GRP-27 si domuz GRP-27 sinden 4 aa farklılık göstermektedir. Daha önceleri neuromedin C adı verilen peptidin aslında domuz spinal kordundan izole edilen GRP-10 olduğu ; Ranatensin ve Neuromedin B nin de yapısal olarak bombesinle ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Ranatensin 11 aa içeren bir peptiddir. 7 karboksil terminali bombesinle aynıdır. Sondan bir önceki aa bombesinde ve GRP 'de lösün iken ranatensinde fenilalanindir. Ranatensinin memelilerdeki muadili olan 32 aa içeren neuromedin B'nin, 5. aa hariç yedi karboksil terminali



aynıdır. 5. aa ranatensinde valin, neuromedin B' de treonindir. Neuromedin B GRP-10 dan 3 aa farklılık göstermektedir [66] .

GRP ve bombesin benzeri peptidler memeli beyinde ve omurilikte, gastrointestinal sistemde tanımlanmıştır. İmmünohistokimyasal lokalizasyon çalışmaları, bu peptitlerin merkezi ve periferik sinir sistemlerde nöronlarla sınırlı olduğunu göstermiştir. Tek memeli istisnası, bronş epitelinde bombesin içeren endokrin benzeri hücrelerin görüldüğü fetal akciğerdir [67].

Sıçanlarda vücut sıcaklığının düşürülmesi sonrası, beyin içine yapılan bombesinin, endojen bir beyin GRP'sinin artışına yol açtığı görülmüş, GRP 'nin memeli termoregülasyonunda rol oynadığı düşünülmüştür. Hiperglisemi, steriotipik hareketler ve kaşıma gibi davranışsal etkilere, hipotalamik ve hipofiz hormonu salgılanmasına, tokluk indüksiyonuna gibi merkezi; gastrin salgılanmasının uyarılması ve gastrik asit sekresyonunun inhibisyonu gibi periferik etkilere neden olmuştur. Bu aktivite, insülin, glukagon, pankreatik polipeptid, somatostatin ve muhtemelen kolesistokinin dahil olmak üzere birçok başka gastrointestinal hormonun salındığı gösterildiğinden, bombesin için genel bir özelliği temsil edebilir [68]. Bombesin ayrıca memelilerde ekzokrin pankreastan sindirim enzimlerinin salgılanmasını doğrudan uyarır. Bombesin tedavisinden sonra mide-bağırsak hareketliliği üzerine çeşitli etkiler bildirilmiştir.

Bombesin diğer etkilerinden biri, hücre ve doku büyümesini uyarmasıdır. Bombesin-benzeri peptitlerin, bronşiyal epitelyal hücrelerin, insan küçük hücreli akciğer karsinom hücrelerinin klonal büyümesini uyardığı gösterilmiştir [69]. Ayrıca, bombesine karşı yönlendirilen bir monoklonal antikorun, SCLC'nin klonal büyümesini inhibe ettiği ve çıplak farelerde tümör regresyonuna neden olduğu da gösterilmiştir [70]. Ayrıca gastrointestinal kanalın ve ekzokrin pankreasın belirli segmentlerinde ve dokularında trofik etkileri bulunmaktadır [71-73] .

Ratlarda spinal duyu ganglionların yaklaşık % 5'i bombesin-like immün reaktivite göstermektedir. Spinal kordda, variköz liflerde, lissauer traktında,

posterior boynuz tüm seviyelerinde, anterior boynuzun motor nöronları ve perisantral liflerinde bombesin-like immün reaktivite görülmüştür.

Swiss 3t3 fibroblast hücre kültürüne eklenen bombesinin spesifik GRP reseptörleriyle etkileşime girerek DNA sentezini ve hücre bölünmesini artırdığı ; bu proliferatif cevapta, protein kinaz C, hücre içi kalsiyum ve guanin nükleotidlerinin rol oynadığı saptanmıştır [66].

Güllüoğlu ve arkadaşları, trinitrobenzene sülfonik asit (TNBS) ile oluşturdukları deneysel kolit modelinde kolonik hasarda bombesin etkisini incelemişler; hasarın zayıfladığını ve bombesinin histopatolojik olarak mukozal proliferasyonu belirgin derecede stimüle ettiği vurgulamışlardır. Bu trofik etki mekanizmasının PGE-2 analoglarının ve araşidonik asit metabolitlerinin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bombesin etkisiyle barsak lenfoid dokusunda T hücre proliferasyonu, intestinal sekresyonlarda Ig A ve NK hücre aktivitesi artmaktadır. Dolaylı olarak bombesin, bakteriyel invazyonu önlemekte ve enfeksiyona karşı defans oluşturmaktadır [11, 74, 75].

Bombesin reseptörleri, bazı memeli hücresi ve membran preparatlarında gösterilmiştir. Radyoaktif işaretli bombesin veya GRP'nin yüksek afiniteli spesifik bağlanması, sıçan beyin zarlarında [76], gine domuzlarında pankreatik asiner hücrelerinde [77], ratlarda hipofiz hücre hattında [78], hamsterlarda pankreatik adacık hücre dizilerinde [79], insan küçük hücreli akciğer karsinom hücre çizgilerinde [80], fare embriyo fibroblastlarından elde edilen Swiss 3T3 hücre çizgilerinde [81] ve köpek mide gastrin hücrelerinde gösterilmiştir .

Çeşitli preparatlarda bağlanma afinitesi ve spesifitesinde bazı farklılıklar kaydedilmiş olsada, yukarıdaki varsayımsal bombesin reseptörlerinin tümü, memelilerde önemli biyolojik etkilere aracılık eden özgün reseptörler rolüyle tutarlı özellikler sergiler. Memeli beynindeki [82] ve bağırsaklarındaki [83] ,bu reseptör bağlanma bölgelerinin anatomik dağılımı, memelilerde endojen olarak salgılanan GRP'nin fizyolojik etkilerine aracılık eden rolleriyle de tutarlıdır.

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

Çalışmada 40 adet 200-250 gr ağırlığında Wistar cinsi erkek rat kullanılmıştır.

Bu proje Pamukkale Üniversitesi hayvan deneyleri etik kurulunun 17.01.2018 tarih ve PAUHDEK-2018/01 sayılı toplantısında kabul edilmiştir.

Bütün sıçanlar deney süresince, PAÜTF Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında standart laboratuvar yemi ve damıtık su ile beslendi. Deney süresince metabolik kafeslerde standart laboratuvar koşullarında (gece/gündüz= 12/12 saat, sıcaklık 21±2 °C, nem oranı %50) yaşatıldı. Sinir koaptasyonu için SEILER marka 107 series model mikroskop, 9/0 NYLON suture (*coviden, Norderstedt, Germany*) ve aynı mikrocerrahi aletler kullanıldı.

## **ÇALIŞMA GRUPLARI**

Grup 1 (N=10) Cerrahi stres amaçlı cilt insizyonu sonrası yumuşak doku diseksiyonu, siyatik sinir görüldükten sonra cerrahi sahanın primer kapatıldığı, sinir kesisi yapılmayan grup (SHAM).

Grup 2 (N=10) (kontrol grubu) Cilt insizyonu, yumuşak doku diseksiyonu, siyatik sinirin mikromakasla tam kat kesi sonrası primer onarılan grup. (epinöral suture, primer nörorafi). Cilt altı ve cilt suture sonrası iyileşmeye bırakılan grup.

Grup 3 (N=10) Cilt insizyonu, yumuşak doku diseksiyonu, siyatik sinirin mikromakasla tam kat kesi sonrası epinöral onarım sonrası SC 10µg/kg 8 saatte bir 7 gün boyunca enjeksiyon yapılan grup.

Grup 4 (N=10) Cilt insizyonu, yumuşak doku diseksiyonu, siyatik sinirin mikromakasla tam kat kesi sonrası epinöral onarılan SC 100 µg/kg 8 saatde bir 7 gün boyunca enjeksiyon yapılan grup.

### **CERRAHİ TEKNİK**

Operasyon PAÜTF Deneş Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

Ratların anestezisinde intraperitoneal 90mg/kg Ketamin HCl (*Ketalar*) ve 10 mg/kg Ksilazin HCl (*Alfazyne %2*) kullanıldı. Operasyon alanı traş edildi ve povidon iodine ile dezenfekte edildi. Ratlar prone pozisyonunda sabitlendi. Dört ekstremitesi flasterle tespit edildi (Şekil 13).



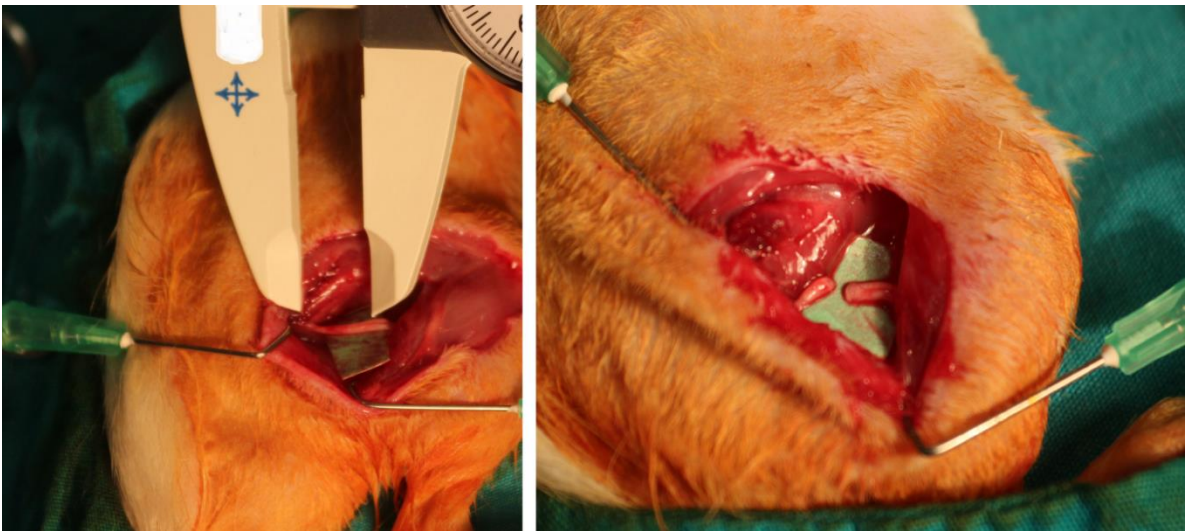
**Şekil 13:Ratın operasyona hazırlanması**

İnsizyon sağ alt ekstremitede kalça eklemi katlantısının 2-3 mm distalinden oblik olarak yapıldı. Cilt altı ve biceps femoris kası, femur posterior sınırı boyunca küt diseksiyonla açıldı ve siyatik sinire ulaşıldı (Şekil 14).



**Şekil 14: Diseksiyon ve eksplorasyon**

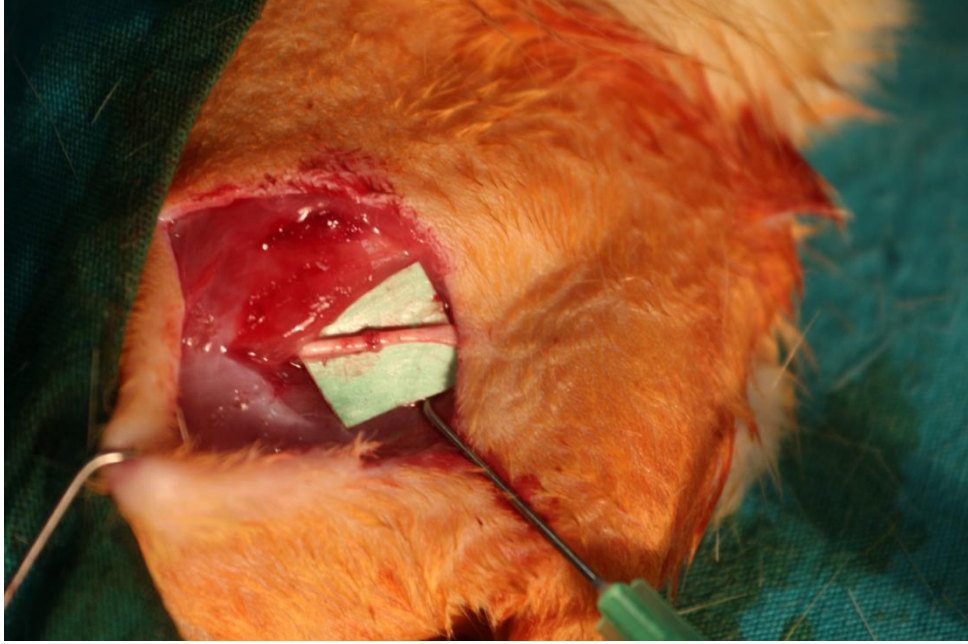
Siyatik sinir ince uçlu diseksiyon makası ile yaklaşık 2 cm çevre dokulardan diseksiyon edildi. Sham grubu hariç diğer gruplar için ince uçlu mikromakas yardımıyla sinir orta noktasından tam kat kesildi (Şekil 15).



**Şekil 15: Trifikasyondan 1 cm ölçüm ve tam kat kesi**



Sinir onarımları *SEILER* marka 107 series model mikroskop altında 9/0 *NYLON* suture (*coviden, Norderstedt, Germany*) kullanılarak geçilen dört adet epinöral dikiş ile yapıldı (Şekil 16). Biceps kası 5/0 yuvarlak vikril, cilt 4/0 keskin prolen suture ile primer onarıldı.. Povidon iodine ile pansuman sonrası operasyon sonlandırıldı (Şekil 17).



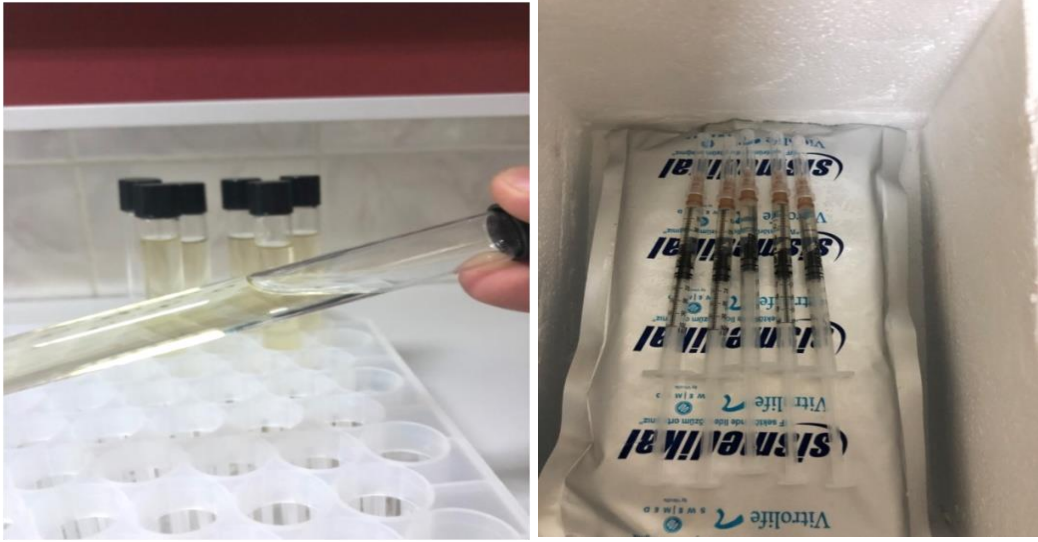
**Şekil 16: Mikrocerrahi sinir onarımı**



**Şekil 17: Kas ve cilt sutureasyonu**

### **Bombesin preparasyonu ve uygulama**

Toz flakon şeklinde olan peptid %0.1 bovin serum albumin içeren steril su ile 1ml süspansiyon oluşturulup, %1'lik bovin serum albümini içeren salinle dilüe edilerek hazırlanan 0.1 ml çözelti; total volüm her enjeksiyon başına 10 µg/kg ve 100 µg/kg bombesin içeren çözeltiler hazırlanıp, aliquatlanarak -20 C de muhafaza edildi. 0.4 ml % 8 lik hidrolize jelatin eklenerek (emilim süresini uzatmak amaçlı) 0.5 ml çözeltiler hazırlandı (Şekil 18).



**Şekil 18: %8 hidrolize jelatin ve enjektabl bombesin aliquatları**



**Şekil 19:Subkutan enjeksiyon (günde 3 defa,7 gün)**

İnsülin enjektörleriyle günde 3 defa 8 saatde 1, 7 gün boyunca aynı saatlerde (08.00, 16.00, 00.00) ense derisinden subkutan enjeksiyon yapıldı (Şekil 19).

**Postoperatif dönem:**

Deneklerin anesteziden uyanmaları beklendi. Postoperatif dönemde 1. gruptan ve 4.gruptan 1'er adet toplamda 2 adet rat uyanmadı, exitus kabul edilerek çalışma dışı bırakıldı. Hayvanlar postoperatif dönemde standart laboratuvar şartlarında, uzman veteriner kontrolünde, 5 şerli kafeslere yerleştirilerek vücut sıcaklıkları uygun ekipmanlarla korunarak izlendi, pelet yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak karşılandı. Ameliyat sonrası dönemde günlük takiplerde insizyon alanlarına epitelizasyon tamamlanana kadar povidon iyodin ile pansuman yapıldı.



## DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

### Makroskobik Değerlendirme

3 ayın sonuna kadar sakrifiye edilmemiş olan tüm gruplardaki sıçanların makroskobik incelenmesinde, normal bacak postürü, yere ayak yada topuk basma özellikleri, bacak fleksör kaslarında atrofi gelişip gelişmediği, bası yaralarının olup olmadığına bakıldı, ayrıca insizyon hattı özelliklerine (enfeksiyon, kronik yara vb.) dikkat edildi.



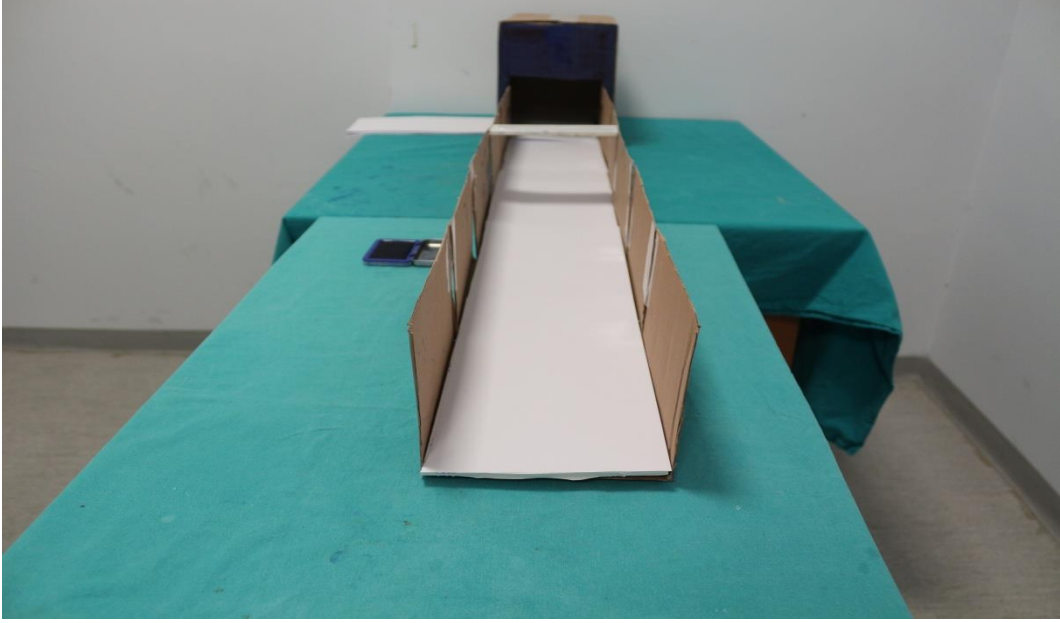
**Şekil 20:Gastrocnemius kas örnekleri**

Tüm denekler anestezi altında prone pozisyonda iken siyatik sinir ekstirpasyonlarını takiben deney (sağ) tarafı ve kontrol (sol) taraf gastrocnemius kasları, medial başı medial epikondilden lateral başı lateral epikondilden ve distali tuber kalkanei den ayrılarak total olarak bisturi ile kesilerek eksize edildi, hassas terazi ile tartıldı (Şekil 20). Gastrocnemius kası deneysel/ kontrol bacak kas ağırlık oranları kıyaslandı .

## Yürüme analizleri

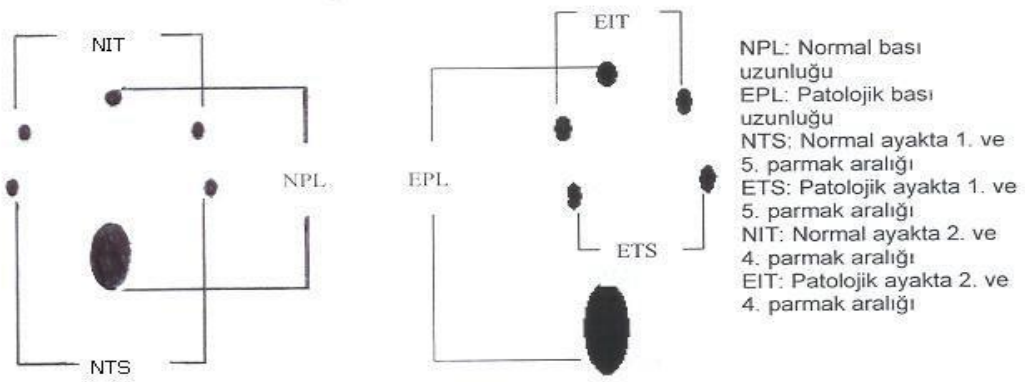
Walking Track analizi, siyatik sinir yaralanmasından sonra fonksiyonel iyileşmeyi ölçmek amacıyla kullanılan bir metoddur. Medicaneli ve arkadaşları 1982 de ilk bu metodu tanımlamışlardır [84].

Çalışmada sıçanların aynı doğrultuda yürümeleri için 10 cm eninde 100 cm uzunlukta kenarları 13 cm yükseklikte karanlık alanla sonlanan yürüme düzeneği hazırlandı. Ayak izleri alınmadan önce her hayvan birkaç kez düzenekte yürütüldü ( Şekil 21) . Alıştırma sonrası A4 kagıtların serili olduğu düzenekte hayvanlar her iki arka ayakları mürekkebe batırılarak yürütüldü. İdrar ve dışkı muamelesi ihtimali olmayan sağlıklı izler ölçüldü [85, 86] .



**Şekil 21:SFI ölçüm ve analiz için hazırlanmış yürüme düzeneği**

Klasik Siyatik Fonksiyonel indeks hesabı sağlam ve işlem yapılmış taraflar arasında yapıldı. Yürüme analizi, iyileşme seviyesinin sağlıklı değerlendirilmesi açısından 2. 4. 6. 8. 10. ve 12. haftalarda düzenli olarak yapılmıştır. .



**Şekil 22:SFI formülündeki değerlerin tespitinin şematize edilmesi.**

Elde edilen veriler, Bain-Maccinon-Hunter Siyatik Fonksiyonel İndeks formülüne yerleştirildi.

$$SFI = - 38.3 \times PLF + 109.5 \times TSF + 13.3 \times ITF - 8.8$$

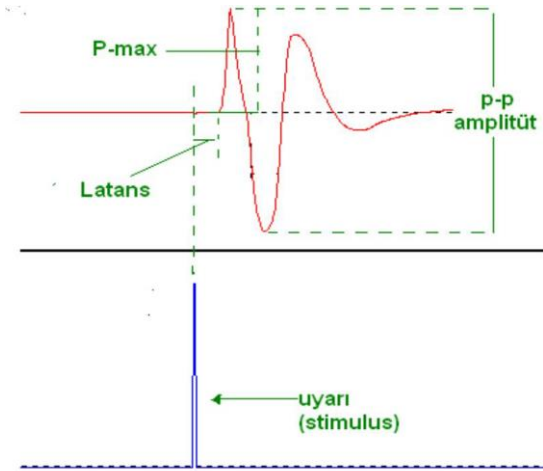
Kağıt şeritteki en belirgin ve uygun ayak izleri kullanılarak ayak izlerinde, topuk ile parmak ucu arasındaki mesafe [print length (PL)], birinci ve beşinci parmaklar arasındaki mesafe [toe spread (TS)], ikinci ve dördüncü parmaklar arasındaki mesafe [intermediate toe spread (IT)] milimetrik cetvel aracılığıyla ölçüldü ve deneysel taraf (E), kontrol taraf (N) ile belirtildi [85-90] . SFI; 0 değerinde normal kabul edilirken, - 100 e yaklaştıkça siyatik sinir fonksiyonunda totale yakın kayıp olarak değerlendirildi, sonuçlar istatistiki olarak değerlendirildi (Şekil 22,23) .



**Şekil 23:Sağlam(sol) ve kesi yapılan taraf(sağ) ayak izleri**

## Elektrofizyolojik değerlendirme

Elektrofizyolojik incelemeler sinir yaralanmalarında, spesifik olarak iğne şeklindeki elektrotun çevresindeki kas fibrillerinde depolarizasyon ve repolarizasyon sonucu oluşan aksiyon potansiyelini ölçmek için kullanılan yöntemlerdir [91, 92]. Birleşik kas aksiyon potansiyeli parametrelerinden distal latans hızı yani aksiyon potansiyeli gelişinceye kadar geçen süre, sinir myelin kılıfının devamlılığı, amplitüd ise sinir lifindeki aksonların sayısı ve bütünlüğü hakkında fikir vermektedir (Şekil 24). [93-95]. Sinir liflerinin kalın ve myelinli olması ve aksonlar tarafından hızlı iletilmesi amplitüd ve ileti hızı üzerine o kadar etkilidir ki bu iki parametre sinirin toplam işlevi yerine, en hızlı ve en fazla myelin içeren sinir liflerinin işlevini gösterir.



**Şekil 24: Anestezi altında dermal elektrotlar kullanılarak yapılan EMG ve aksiyon potansiyeli parametreleri**

Spontan EMG amplitüdünde siyatik sinir kesisi sonrası her 3 kasteda (gastrocnemius, soleus, tibialis anterior) hızlıca düştüğü izlenir. Akson ve myelin kılıf kaybı ve distalde Wallerian dejenerasyonla ilerleyen ağır periferik sinir hasarında, kesi distalinde yapılan uyarımda sinir aksiyon potansiyeli özellikle akut dönemde elde edilmesine rağmen, kesi proksimalinden yapılan uyarımda aksiyon

potansiyeli elde edilemez. Proje dahilinde tüm ratlara 4, 8, ve 12 . h ölçümleri tekrarlanarak istatistiki inceleme için distal latans ve amplitüd değerleri kayda alındı. Sinir ileti çalışmaları, daha önce bildirilmiş protokollar çerçevesinde, sıçanların hangi gruba ait oldukları tarafından bilinmeden aynı nörolog tarafından ve aynı cihaz ile yapıldı .

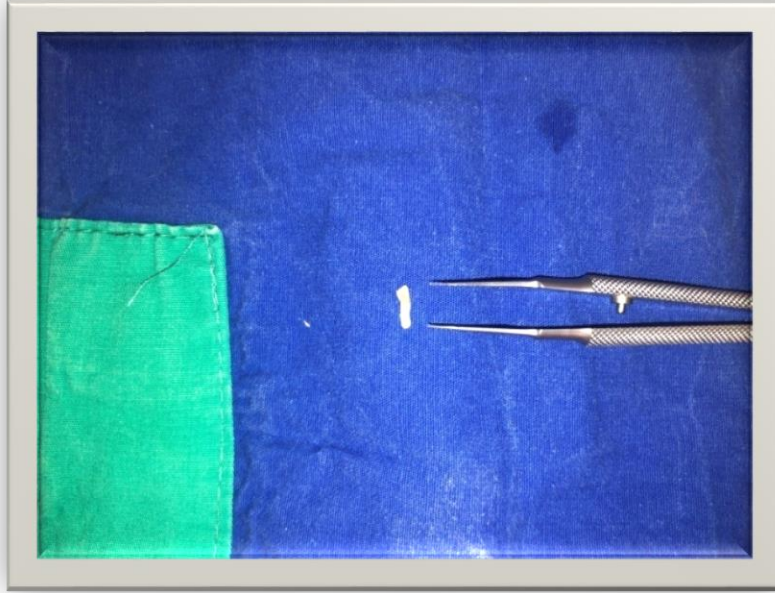


Şekil 25:Elektrofizyolojik değerlendirme

Ratların vücut sıcaklığı 37 derecede muhafaza edilerek ketamin ve ksilazinin anestezisi altında ölçüme gidildi, kas gevşetici yapılmadı. EMG için paslanmaz çelik subdermal iğne elektrotlar ve MEDELEC Premiere plus cihaz kullanıldı (Şekil 25) . Distalde ayak bileğinin hemen üzerinde ve siyatik yarıktaki üzere iki noktada elektriksel uyarı verildi. Distal latans süresinde uzama ve amplitüdde düşme, aksonal dejenerasyon ve demyelinizasyon lehine yorumlandı.

## Sakrifikasyon,doku takibi

12. hafta intraperitoneal ketamin anestezisi altında emg sonrası, bölge temizliği ve cerrahi hazırlıkları takiben eski insizyon sahasından girilerek sinir onarım bölgesine ulaşıldı. Deneklerin onarım hattının 1 cm proksimal ve distalini de içerecek şekilde normal sinir segmentlerine ulaşılarak sinir örnekleri alındı [96] .



**Şekil 26:Sakrifikasyon sonrası onarım hattı ortada olacak şekilde 1 cm sinir örneği alınması**

Ardından proksimal femura yapışma yerinden aşile dek uzanan tüm gastrocnemius kasları da çıkarılarak kuru ağırlıkları tartıldı aynı işlem diğer bacağa da uygulandı. İmmunhistokimyasal incelemeler için sinir örnekleri tamponlanmış %10'luk nötral formaldehit içine alındı (Şekil 26). Tüm sıçanlar işlem sonrası servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.



### **Doku takibinde kullanılan kimyasallar ve süreleri:**

Elde edilen parafin bloklardan Leica marka kızaklı mikrotomda 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler rutin histolojik incelemeler için normal lamlara, immünohistokimyasal incelemeler için Poly-L-lysine kaplı lamlara (Thermo Scientific) alındı. Her bir bloktan Hematoksilen-Eozin boyamaları için 2 şer adet preparat hazırlandı. Boyanan sinir kesitleri, kameralı binoküler mikroskop aracılığıyla fotoğraflandı.

12. hafta sakrifikasyon sonrası alınan sinir örnekleri H+E boyama sonrası histopatolojik olarak rejenerasyon derecesi 5 üzerinden, inflamasyon ve fibrozis varlığı 3 üzerinden değerlendirildi ve skorlama yapıldı [97].

**Tablo 1 : Peterson skorlama sistemi**

<b>Doku</b>	<b>Evre</b>
<b>Rejenerasyon</b>	1 sinir rejenerasyonu yok.
	2 kötü organize sinir iyileşimi
	3 orta derecede sinir iyileşimi
	4 iyi organize sinir iyileşimi
	5 mükemmel organize sinir iyileşimi
<b>İnflamasyon</b>	1 hafif
	2 orta
	3 yoğun
<b>Fibrozis</b>	1 hafif
	2 orta
	3 yoğun

### **Elektron mikroskopik takip ve görüntüleme**

Deney çalışma gruplarından elde edilen siyatik sinirden alınmış dokular, elektron mikroskopik inceleme için 1X1mm<sup>3</sup> ebatında alındı ve % 4'lük tamponlanmış

gluteraldehitli fiksatif içerisinde 48 saat +4 °C de tespit edildi. Fiksatif içinden çıkarılan doku örnekleri 0,1M Sorenson fosfat tamponunda yıkandı. Daha sonra 1 saat boyunca karanlık oda sıcaklığında osmiyum tetroksit içinde bekletildi. Osmiyum tetroksitten çıkarılan doku örnekleri 0,1 M Sorenson fosfat tamponunda tekrar yıkandı. Daha sonra dokular sırasıyla % 30'luk, % 50'lik %70'lik %80'lik %90'lik %100'lük alkol serilerinden 15 'er dakika geçirildi. Leica EM CPD 300 marka cihazda kritik kurutma işlemi yapıldı. Kurutulan örnekler Au/Pd kaplama cihazında (QuOrum Q150R ES) kaplanarak iletken hale getirildi. Onarım hattı, longitudinal kesit ve onarım hattı distali olmak üzere sinir örneklerine 3 kesitte, ayrı kesi işlemleri yapılarak ayrı kaplama işlemleri yapıldı. Çekimlerde Carl Zeiss Suora 40 VP elektron mikroskobu kullanıldı.

### **İmmunhistokimyasal boyama ve değerlendirme**

Deneyin sonunda, uygulama yapılan sağ siyatik sinirden sütur hattını içeren 1cm'lik örnekler, nötral tamponlanmış formalin (%10, Merck) solüsyonu içine alınarak fiksasyon işlemi sağlandı. Fiksasyon işlemi sonrası akar su altında yaklaşık olarak 12 saat boyunca, dokuların yıkanması beklendi. Ardından sırasıyla, %30, %50, %70, %80, %90 ve %96'lık alkollerde 8 saat bekletilen dokular absolut alkol içerisinde 2X30 dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Saydamlaştırma ve alkolü dokudan uzaklaştırmak için 3X10 dakika ksilol kullanıldı. İnfiltrasyon için bekletilen dokular daha sonra parafine gömülüp, bloklandı . Her bir parafin bloktan, tam otomatik, rotary mikrotom(Leica RM 2265, Germany) yardımıyla 4-6µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler alındıktan sonra, bir gece 37°C etüvde bekletilen dokular, 58 °C'ye ayarlanmış etüve alınıp bir saat kadar bekletildi. Ardından 3X10 dakika ksilolden geçirildi ve kurutmaya bırakıldı. 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve %80'lik alkol serilerinden geçirildi. 2X5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, antijen retrieval işlemi için



önerilen Sitrat Buffer solüsyonuna(Thermo Scientific) alınıp, mikrodalgada 20 dakika bekletildi. Mikrodalgadan çıkarılan kesitler, doğrudan oda sıcaklığında soğumaları için 20 dakika kadar bekletildi. 2X5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, kurulanıp, dokunun olduğu yer silikon kalem vasıtasıyla çevrenip, sınırlandı. İmmunohistokimya barına dizilen, kesitlerin üzerine 3X 5 dakika Fosfat Tamponlu Salin (Sigma) damlatıldı. Bu sırada immunohistokimya barına nemliliği sağlamak için daha önceden hazırlanan sıcak su konuldu. Kesitlerin üzerindeki PBS alınıp üzerine Hidrojen peroksit blokaj solüsyonu(200cc distile suya 25 cc h<sub>2</sub>o<sub>2</sub>) damlatılıp 10 dakika inkübe edildi.Ardından UV blok damlatılıp 8 dakika bekletildi. Primer antikorlarla (\*VEGF Biont Lot:20181128702, \*MAP2/MAP-2a.b.c Biont Lot:20181128703, \*GAP43 Biont Lot:20181128704 , \*NGFbeta Bioss Lot:AG10271065) işlem sonrası örnekler +4 °C'de 1 gece bekletildi. İmmunohistokimya barına dizilen, kesitlerin üzerine 3X 5 dakika Fosfat Tamponlu Salin (Sigma) damlatıldı. Sekonder antikorlarla (Large Volume Anti-Polyvalent, HRP,TermoScientific Lot:PHL170627 USA) 10 dakika muamele sonrası 3X 5 dakika Fosfat Tamponlu Salin (Sigma) damlatıldı. Streptavidinperoksidazla 10dk muamele sonrası 3X 5 dakika Fosfat Tamponlu Salin (Sigma) damlatıldı.

Örnekler renk alıncaya kadar DAB (Mouse kit with DAB Brown BIOTnABiotech Lot:0480HC3081 Kit contents; HydrogenPeroxideBlock, Immunoblock Mouse Labeling DabChromogen DabBuffer) damlatıldı. Distile su ile 3x5 dakika yıkanan kesitler %80, % 90, % 96 alkolde dehidre edildikten sonra kurutmaya bırakıldı. Ksilol ile 3 dakika muamele sonrası kapatılan kesitler değerlendirilip, mikrografları alındı.

## İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizlerde SPSS 21 programı kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Çoklu grupların karşılaştırılmasında nonparametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile kullanıldı. Test sonucunun anlamlı çıktığı durumunda grupların ikili olarak karşılaştırılmasında bağımsız değişkenler için çift yönlü nonparametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi  $p \leq 0.05$  olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışma aynı çevresel ortamda takip edilen 40 adet ağırlıkları 240-260 gr arası değişen wistar albino erkek ratlarla başlandı. 1. ve 4. gruptan birer adet rat sinir koaptasyonu sonrası anesteziden uyanmadı. Çalışma 38 adet ratla tamamlandı. İlk hafta yapılan yürüme analizinde 2. 3. ve 4. grup ratların sağ ayak üzerine basmadıkları veya dirsek teması gerçekleştirdikleri görüldü; tam kat kesi prosedürüne uygun şeklinde yorumlandı. Yara iyileşmeleri sorunsuzdu. Ödem, kızarıklık, ısı artışı gibi inflamasyon belirtileri yoktu. 8.haftadan sonra yapılan yürüme analizlerinde 2. grupta daha çok dikkat çeken inversiyon ve kapalı duruş postürü belirgindi (Şekil 27) .



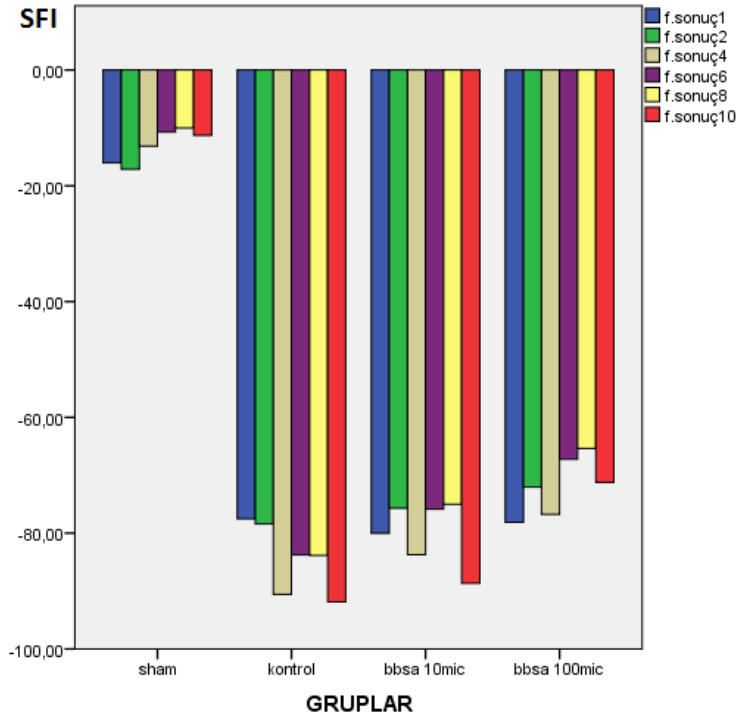
Şekil 27: 12. hafta invertede duruş ve dirsek teması

## Siyatik sinir fonksiyonel indeks bulguları

1. ve 2. hafta yapılan yürüme analizi sonrası yapılan karşılaştırmada sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmadı. 4. hafta ve 6.hafta gruplar arası analizde 4.grup ve 2.grup arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılık bulundu( $p<0,05$ ). 8.hafta ve 10.hafta analizde 4.grup, 3.grup ve 2. grup arasında anlamlı fark saptandı ( $p<0,05$ ). 12.hafta yapılan analizde kontrol grubunda daha belirgin ve sayıca fazla olan invertte ve kapalı postür nedeniyle ayak izleri bazı deneklerde net olarak alınamadı. 12. hafta SFI sonuçları bundan dolayı karşılaştırılmadı.

**Tablo 2:Denek grupları ve SFI haftalık analiz ortalama ve standart sapmaları**

GRUPLAR	SFI 1	SFI 2	SFI 4	SFI 6	SFI 8	SFI 10
	A.O $\pm$ S.S	A.O $\pm$ S.S	A.O $\pm$ S.S	A.O $\pm$ S.S	A.O $\pm$ S.S	A.O $\pm$ S.S
<b>GRUP1</b>	-16,03 $\pm$ 6,36	-17,16 $\pm$ 5,49	-13,14 $\pm$ 4,82	-10,71 $\pm$ 6,81	-10,03 $\pm$ 5,08	-11,3 $\pm$ 4,01
<b>GRUP2</b>	-77,53 $\pm$ 5,17	-78,42 $\pm$ 2,6	-90,58 $\pm$ 6,03	-83,75 $\pm$ 10,32	-83,85 $\pm$ 7,74	-91,87 $\pm$ 3,11
<b>GRUP3</b>	-80,03 $\pm$ 3,98	-75,69 $\pm$ 9,96	-83,73 $\pm$ 7,68	-75,85 $\pm$ 8,13	-75,01 $\pm$ 9,21	-88,66 $\pm$ 9,85
<b>GRUP4</b>	-78,12 $\pm$ 5,83	-72,05 $\pm$ 6,73	-76,75 $\pm$ 5,93	-67,23 $\pm$ 14,15	-65,35 $\pm$ 6,25	-71,21 $\pm$ 20,45

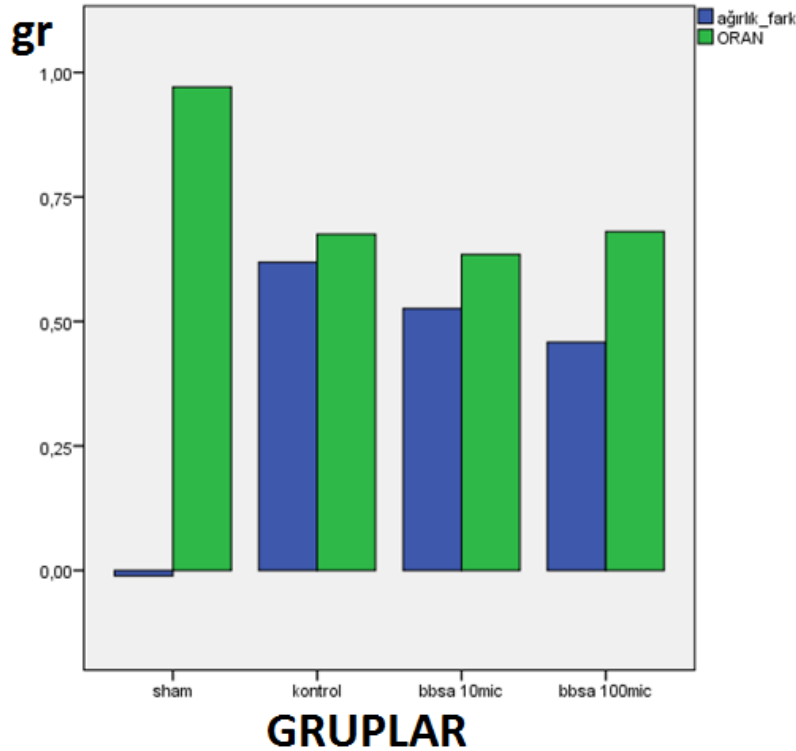


**Grafik 1: SFI sonuçları**

12. hafta siyatik sinire işlem yapılmış sağ taraf ve işlem yapılmamış kontrol sol taraf kas ağırlık farkları karşılaştırıldı. Deney gruplarıyla kontrol grubu kas oranları arasında fark olsada istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p < 0,05$ ).

**Tablo 3: Gastrocnemius kas deneysel ve kontrol taraf oranları**

DENEK	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GRUP1	1,032419	1,132924		0,835399	0,94995	0,957824	1,081635	0,888135	0,886091	1,151151
GRUP2	0,612738	0,731212	0,683887	0,629616	0,66746	0,549694	0,624464	0,568613	0,531871	0,523469
GRUP3	0,755671	0,549348	0,523142	0,702772	0,655558	0,563505	0,549314	0,833061	0,689903	0,683849
GRUP4	0,721768	0,89338	0,626883	0,503229		0,751609	0,652248	0,609058	0,780678	0,840439



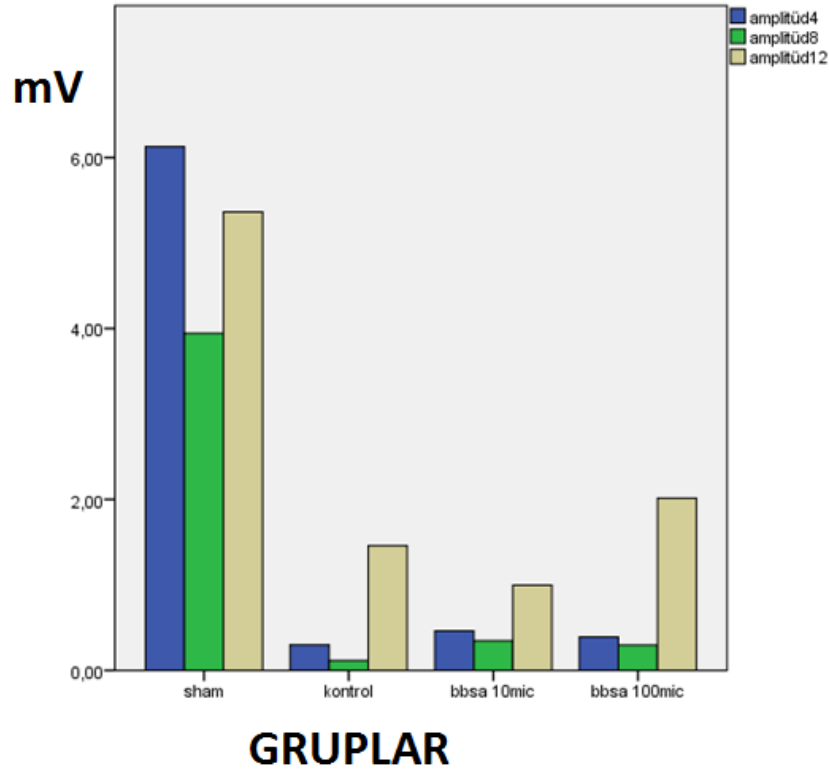
**Grafik 2: Gastrocnemius kas ağırlık oranları**

## Elektrofizyolojik bulgular

4.hafta, 8.hafta ve 12 hafta yapılan EMG de distal latans ve amplitüd değerlerine bakıldı. Yapılan analizler sonrası grup 2, 3 ve 4 arasında en yüksek amplitüd değerleri grup 4 de alınmıştır. Ortalama yönünden incelendiğinde 4. ve 8. hafta analizlerinde grup 3 ve grup 4'te pozitif farklılık görülmüştür. 12. hafta yapılan EMG de ortalama ve en yüksek değerler grup 4 te saptandı. İyileşme yönünde pozitif değerlendirilse de istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı ( $p < 0,05$ ).

**Tablo 4:Denek grupları ve EMG sonuçları (AMPLİTÜD)**

GRUPLAR	EMG 4	EMG 8	EMG 12
	A.O $\pm$ S.S	A.O $\pm$ S.S	A.O $\pm$ S.S
GRUP1	6,13 $\pm$ 2,99	3,94 $\pm$ 2,04	5,36 $\pm$ 2,42
GRUP2	0,3 $\pm$ 0,2	0,11 $\pm$ 0,13	1,46 $\pm$ 0,96
GRUP3	0,46 $\pm$ 0,42	0,35 $\pm$ 0,34	1 $\pm$ 0,7
GRUP4	0,39 $\pm$ 0,24	0,29 $\pm$ 0,21	2,01 $\pm$ 1,38

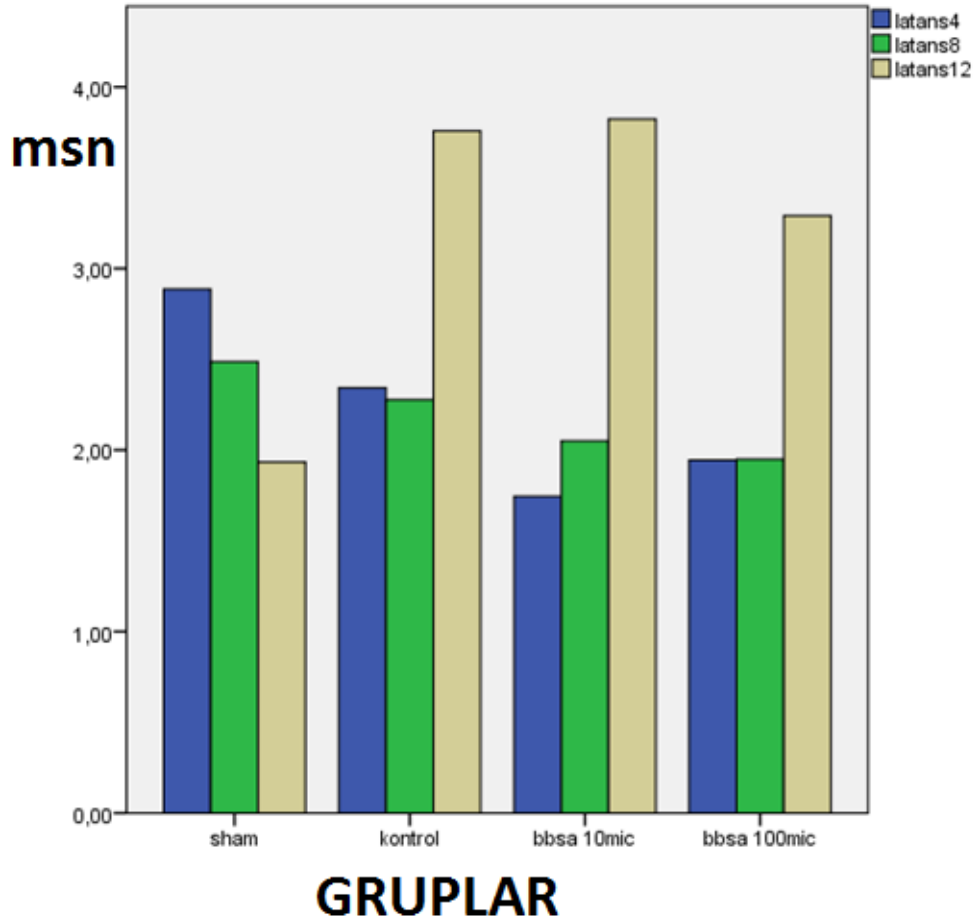


**Grafik 3: EMG amplitüd sonuçları**

Kasılma latans değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ( $p < 0,05$ ).

**Tablo 5:Denek grupları ve EMG sonuçları (LATANS)**

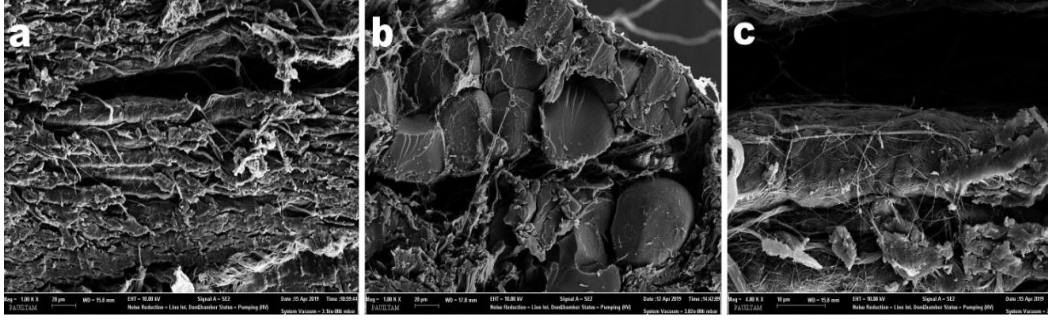
GRUPLAR	EMG 4	EMG 8	EMG 12
	A.O $\pm$ S.S	A.O $\pm$ S.S	A.O $\pm$ S.S
GRUP1	2,89 $\pm$ 0,33	2,49 $\pm$ 0,16	1,93 $\pm$ 0,18
GRUP2	2,34 $\pm$ 0,6	2,28 $\pm$ 0,82	3,76 $\pm$ 0,71
GRUP3	1,74 $\pm$ 0,15	2,05 $\pm$ 0,72	3,82 $\pm$ 0,6
GRUP4	1,94 $\pm$ 0,14	1,95 $\pm$ 0,53	3,29 $\pm$ 0,52



**Grafik 4: EMG latans sonuçları**

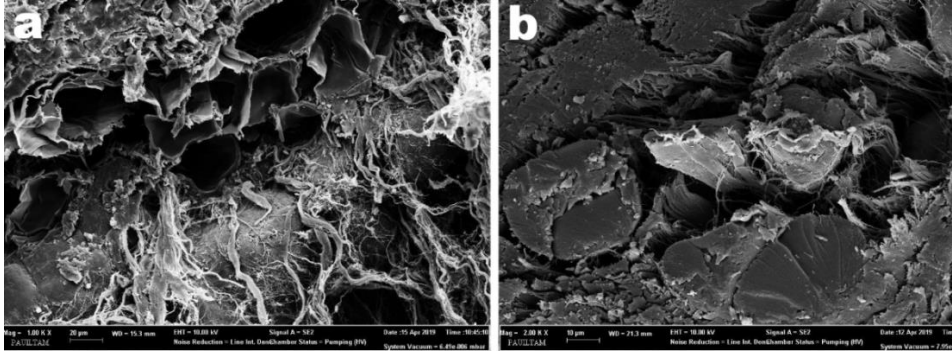
## Histopatolojik bulgular

Grup 1 de perinöryumun hemen altında enine ve boyuna kesitlerde normal görümlü sinir lifleri izlenmekteydi. Endonöryumla çevrili sinir liflerinde ortada yerleşmiş aksonlar belirgindi. Bağ dokusu liflerin birbirleriyle olan bağlantıları devam etmekteydi (Şekil 28).



**Şekil 28:Grup 1 (sham) cerrahi stres grubu 2000 büyütmede SEM görüntüsü a)onarım hattı b)kesi distali c) longitudinal kesit**

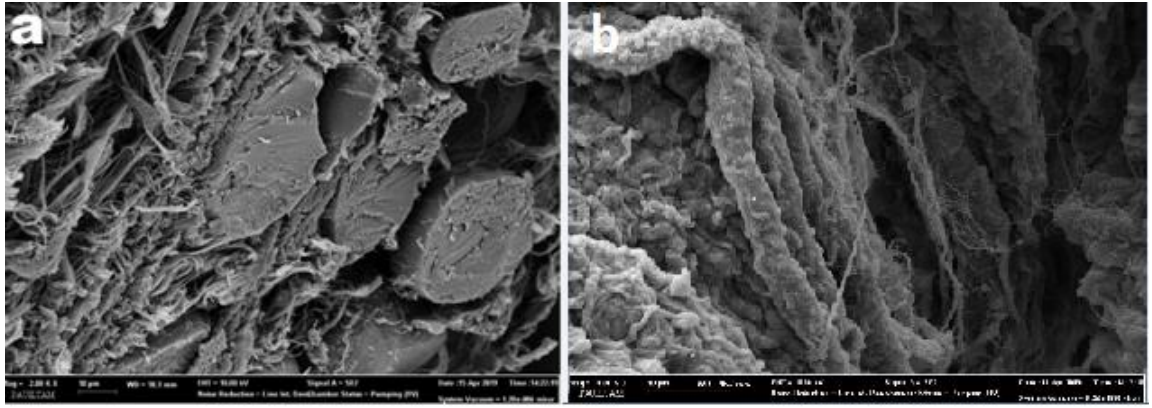
Grup 2 den alınan kesitlerde sinir liflerinde dejenerasyon belirgindi. Doku bütünlüğün kaybolduğu ve açılmaların meydana geldiği izlendi. Perinöryum ve endonöryum yapıları izlenmedi. Sinir liflerini saran bağ dokusunda liflerin düzensizleştiği bağlantıların azalarak gevşediği kopuklukların olduğu izlendi. Sinir hücrelerinde bütünlük kaybolmuştu. Sınırlarında ve yüzeyinde düzensizlik izlendi. Bağ dokusu kılıflarında incelmeye ve dejenerasyon belirgindi (Şekil 29) .



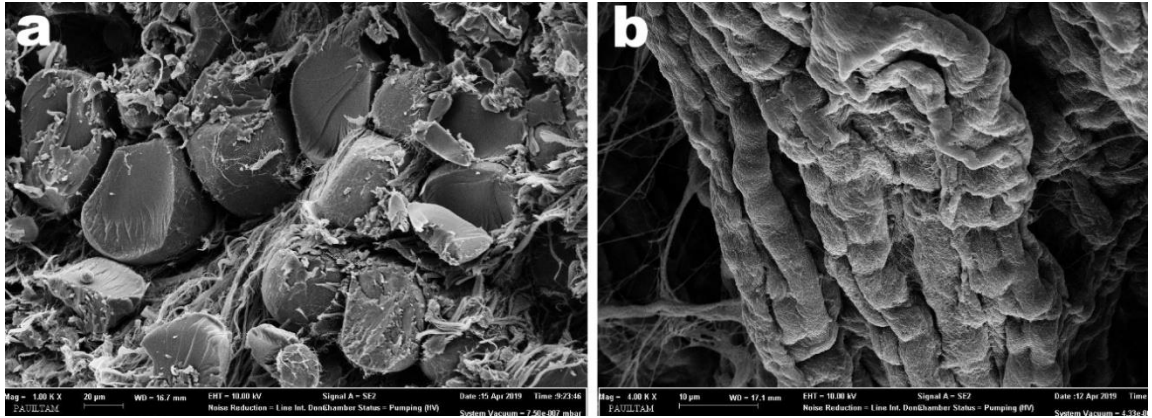
**Şekil 29:Grup 2 (kontrol) 1000 ve 2000 büyütmede SEM görüntüsü a) Vakualizasyonlar B) kesi distali**



Bombesin uygulanan gruplarda dejenerasyon izlenmesine karşın özellikle grup 4'te normal görünümlü sinir liflerinin varlığı dikkat çekti. Her iki deney grubunda da dokuda açılmaları olmakla birlikte dejenerasyonun kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Bununla birlikte irili ufaklı vakuoller her iki grupta da izlendi (Şekil 30, 31) .



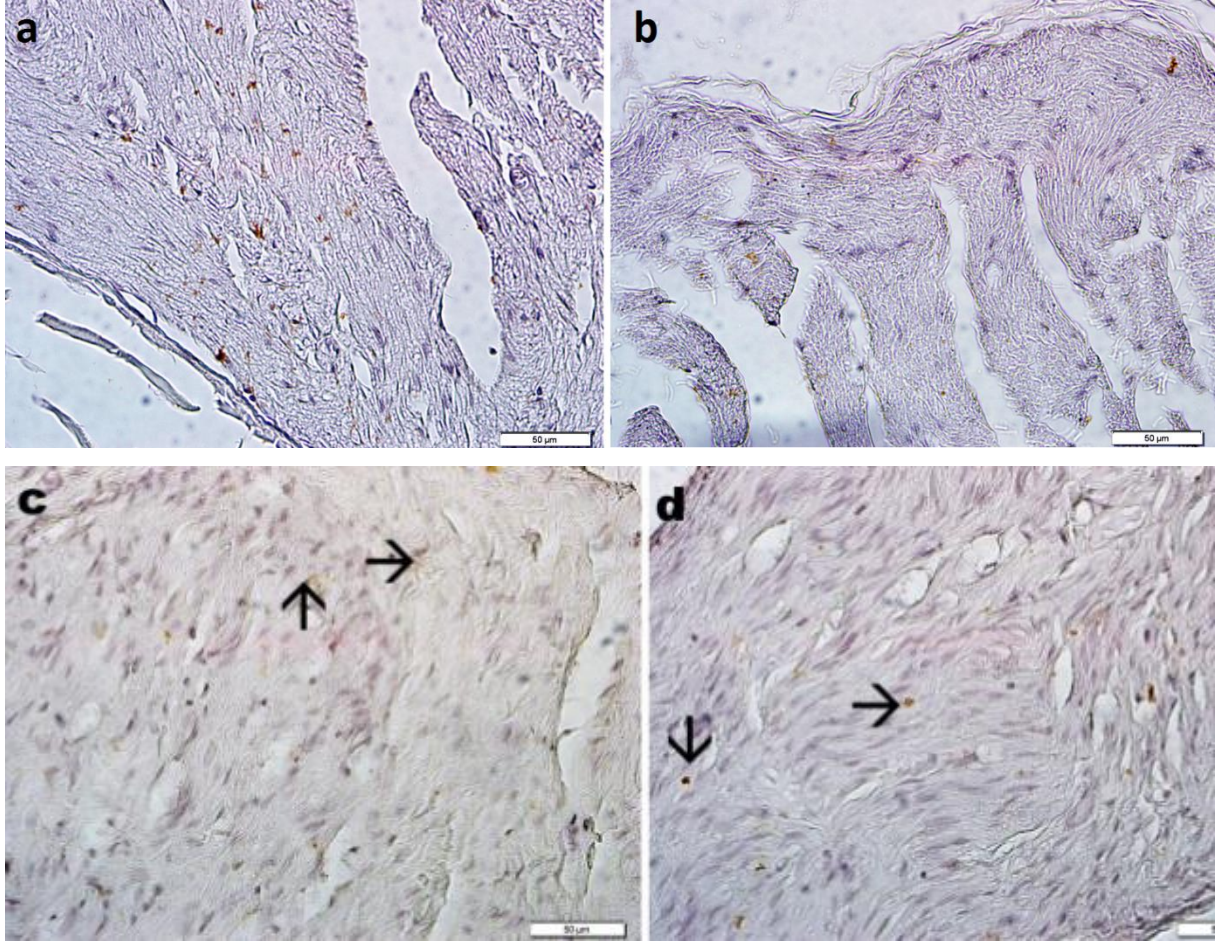
**Şekil 30:Grup 3 bbs10 µg/kg ; bağ dokusu liflerinde kopukluklar ve sinir liflerinde dejenerasyon devam etmekteydi.**



**Şekil 31:Grup 4 BBS 100 µg/kg ; grupta çoğunlukla liflerde düzelme izlenmekteydi. Kontrol grubunda izlenen pürüzlü yüzey ve dalgalı kenarlar çoğunlukla görülmedi . Dejenerasyon kontrol grubuna oranla daha azdı. a) kesi distali b) longitudinal kesi**

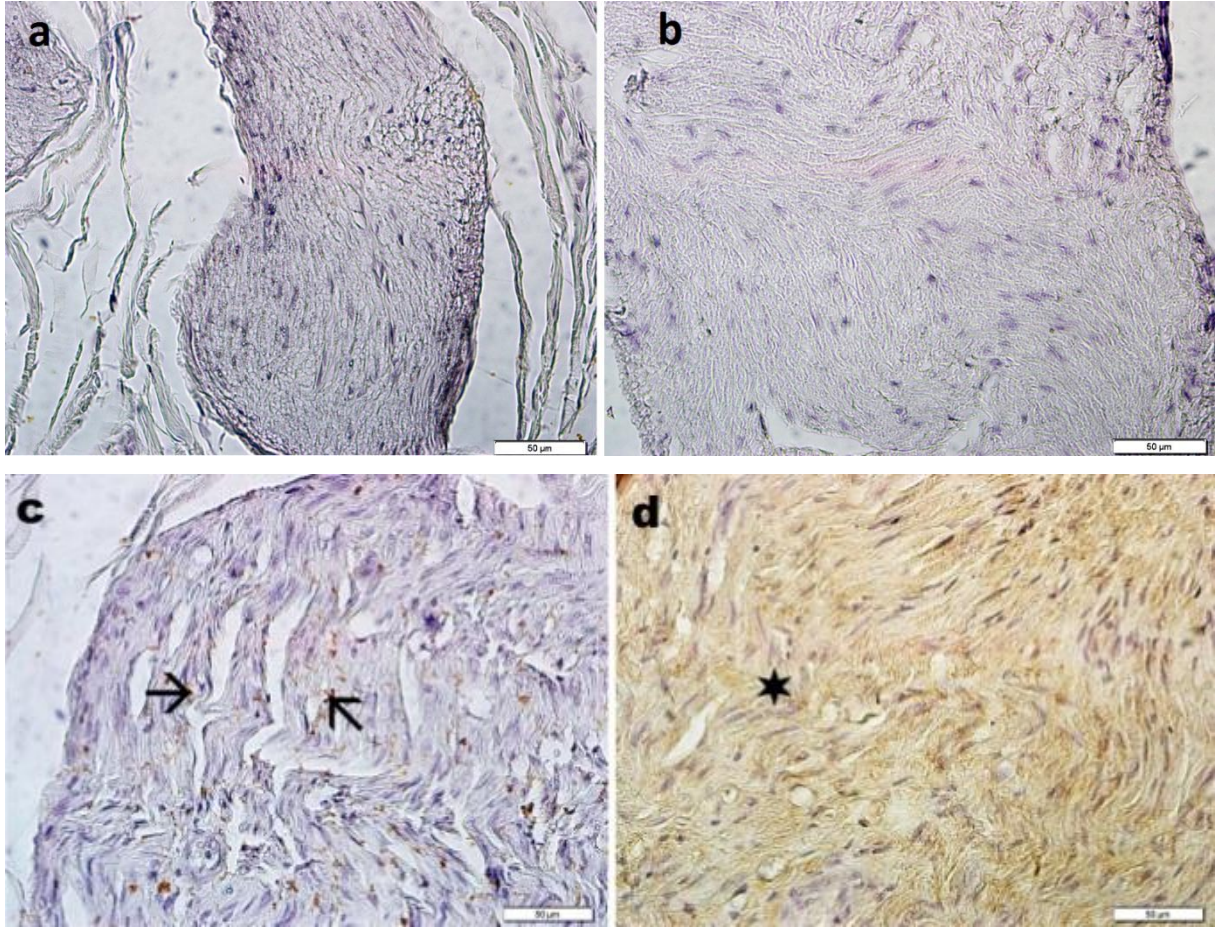


NGF ekspresyonu kontrol grubunda negatifti. Sham grubunda kuvvetli NGF eksprese eden hücelere rastlandı. Bombesin uygulanan gruplarda NGF pozitif hücrelerin varlığı belirlendi. Ancak 10µg uygulanan grupta ekspresyon orta dereceli iken 100µg uygulanan 4. Grupta ekspresyon daha kuvvetliydi (Şekil 32) .



**Şekil 32: NGF ekspresyonun yerleşimi ve ekspresyonu. A: SHAM grubu grup 1, b; kontrol grubu grup2, c; 10µg bombesin uygulanan grup 3 ,d;100µg bombesin uygulanan grup 4 . Ok ekspresyon gösteren hücreler. İmmunperoksidaz X400.**

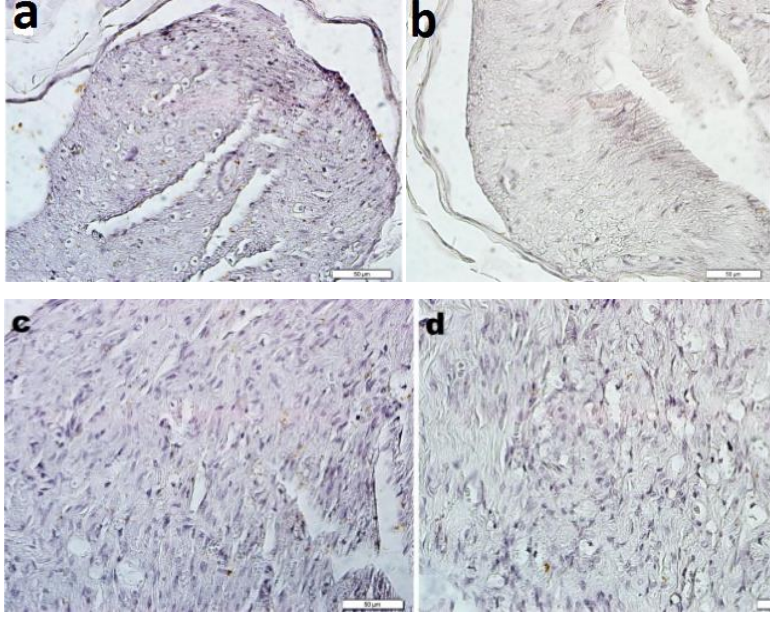
VEGF hem kontrol hem de sham grubunda negatif ekspresyona sahipken bombesin uygulanan gruplarda pozitif. 3. Grupta VEGF pozitif hücelere rastlanırken grup4'te sinir liflerinde yaygın boyanma dikkati çekti (Şekil 33).



**Şekil 33: VEGF ekspresyonunun yerleşimi ve ekspresyonu. A: SHAM grubu grup 1, b; kontrol grubu grup2, c; 10µg bombesin uygulanan grup3 ,d;100µg bombesin uygulanan grup4 . Ok ekspresyon gösteren hüceler. İmmunperoksidaz X400.**

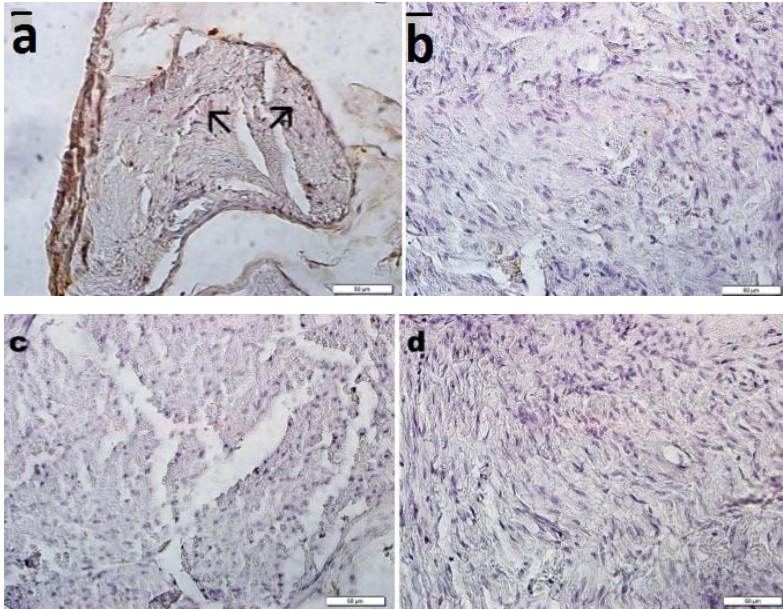


MAP-2 tüm gruplarda negatif ekspresyon gösterdi (Şekil 34).



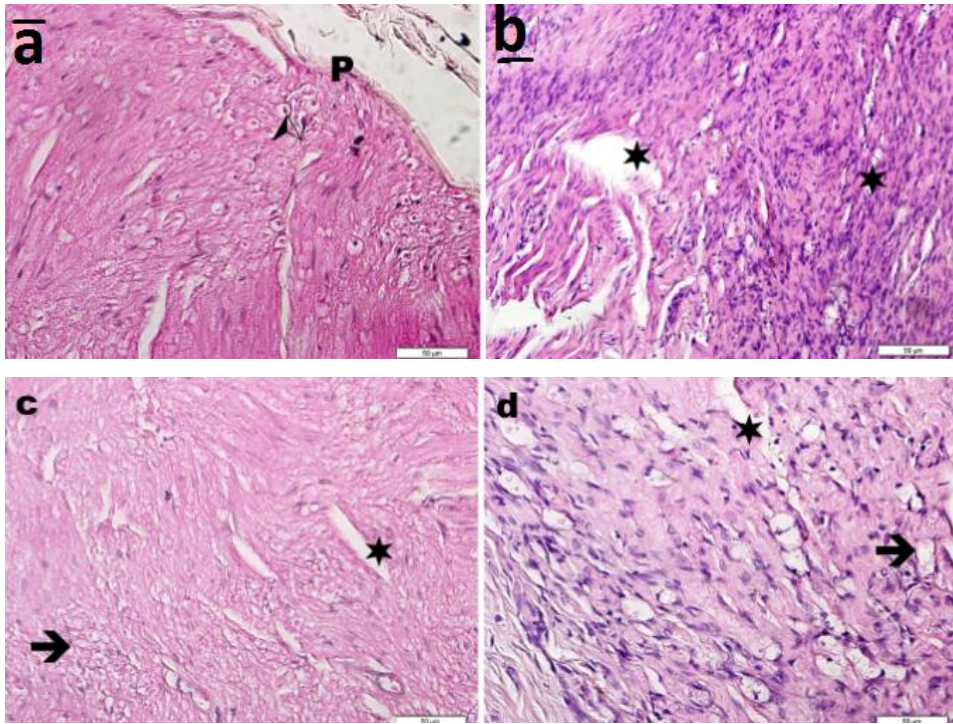
**Şekil 34: MAP ekspresyonunun yerleşimi ve ekspresyonu A: SHAM grubu grup 1, b; kontrol grubu grup2, c; 10µg bombesin uygulanan grup3 ,d;100µg bombesin uygulanan grup4 . Ok ekspresyon gösteren hücreler. İmmunperoksidaz X400**

GAP-43 ekspresyonu sadece sham grubunda zayıf pozitif izlenirken diğer gruplarda ekspresyon negatifti (Şekil 35).



**Şekil 35: GAP ekspresyonunun yerleşimi ve ekspresyonu. A: SHAM grubu grup 1, b; kontrol grubu grup2, c; 10µg bombesin uygulanan grup3 ,d;100µg bombesin uygulanan grup4 . Ok ekspresyon gösteren hücreler. İmmunperoksidaz X400**

Kontrol grubundan alınan kesitlerde sinir liflerinde dejenerasyon belirgindi. Doku bütünlüğün kaybolduğu ve açılmaların meydana geldiği görüldü. Hücre proliferasyonu azalmıştı ve büyük ölçüde bağ dokusu invazyonu izlendi. Perinöryum ve endonöryum yapıları izlenmedi. Sham grubunda perinöryumun hemen altında enine ve boyuna kesitlerde normal görünümlü sinir lifleri izlenmekteydi. Endonöryumla çevrili sinir liflerinde ortada yerleşmiş aksonlar belirgindi. Bombesin uygulanan gruplarda dejenerasyon izlenmesine karşın özellikle 4. grupta normal görünümlü sinir liflerinin varlığı dikkati çekti. Her iki deney grubunda da dokuda açılmaları olmakla birlikte hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre daha fazlaydı. Bununla birlikte irili ufaklı vakuoller her iki grupta da izlendi (Şekil 36).



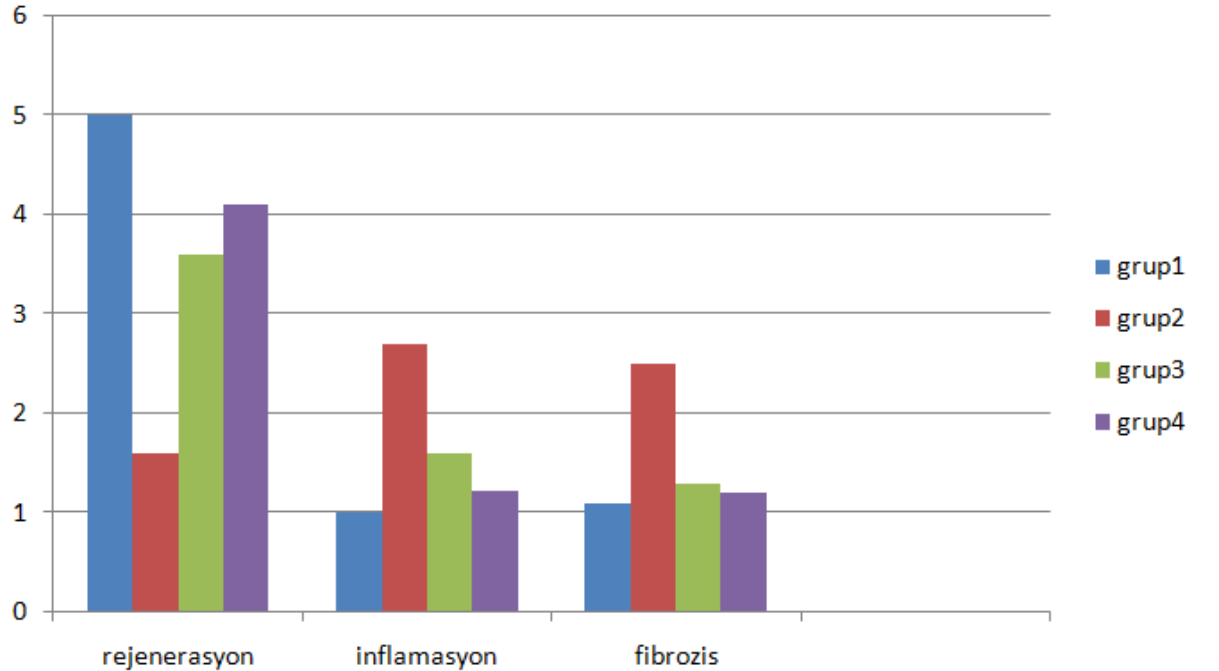
**Şekil 36:H+E BOYANMA** Hematoksilen ile boyanan periferik kesitlerden görüntüler. a) Ortada yerleşmiş aksonları ile birlikte sinir lifi. b ) Asteriks; doku bütünlüğünün kaybolduğu açılmalar, ok; Vakuoller. Hematoksilen&eosin. X400.

12.hafta sinir kesitleri H+E boyama 400 büyütmede yapılan analiz sonrası Peterson skorumaya sistemine göre rejenerasyona 1-5 arası, inflamasyon ve fibrozise 1-3 arası iyileşme oranına göre skor verildi.

**Tablo 6: Histopatolojik skorumaya**

Denek	Rejenerasyon	İnflamasyon	Fibrozis
	A.O ± S.S	A.O ± S.S	A.O ± S.S
Grup1	5±0	1±0	1,1±0,33
Grup2	1,6±0,51	2,7±0,48	2,5±0,52
Grup3	3,6±0,68	1,6±0,51	1,3±0,48
Grup4	4,1±0,33	1,2±0,48	1,2±0,44

Histopatolojik skorumaya sonrası yapılan analizlerde rejenerasyon açısından grup2 ile grup 4 arasında daha belirgin, inflamasyon ve fibrozis açısından bakıldığında grup 2, grup 3 ve grup 4 arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu( $p<0,05$ ).



**Grafik 5: Histopatolojik skorlar**

## TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları, distal sinir güdüğünün dejenerasyonuna yol açar; motor, duysal ve otonomik fonksiyonların kaybına neden olur [98]. Aksonlar Wallerian dejenerasyonu olarak bilinen işlemde parçalanır, proksimal güdük boyunca schwann hücreleri, artıkları gidermek ve aksonların yeniden büyümesine yardımcı olmak için makrofajlarla farklılaşmaya başlar[99]. Aksotomlu nöronlar hayatta kalabilir ve tekrar büyüyebilirse, hedef organlarıyla uygun şekilde yeniden bağlantı oluşturur ve fonksiyonlar iyileşir [100].

Dejenere olmuş sinirin iki tarafı inflamatuvar hücreler, matriks ve perinöral hücreler tarafından sarılarak köprü oluşturulur. Makrofaj integrasyonu sonrası; aynı zamanda schwan hücre migrasyonu içinde gerekli olan, üretilen VEGF sayesinde köprü vaskularize hale gelir [101, 102]. Schwann hücresinin proliferasyonu, sinir büyüme faktörü(NGF) [25] ve fibroblast büyüme faktörü [26], beyin derive nörotrofik faktör (BDNF), glial hücre derive nörotrofik faktör (GDNF), insulin-benzeri büyüme faktörleri-1/2 [IGF1, IGF2], transforming growth factor-beta 1 (TGF-b1), fibroblast büyüme faktörü (FGF), leukaemia inhibitor faktör (LIF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi ve sonic hedgehog/shh, interleukin-1 [IL-1], IL-6, pleiotrophin, glial büyüme faktörü-nöroreglin gibi nörotrofinlerin sentezlenmesine neden olur [27-29]. N-CAM, miyelin ilişkili glikoprotein ve tümörle ilişkili glikoprotein (TAG) -1 gibi bir dizi hücre adezyon molekülü [30], laminin ve fibronektin gibi nörit büyümesi teşvik edici faktörler distal sinir segmentindeki rejeneratif aksonların gelişmesinde önemli rol oynamaktadırlar [31].

Periferik sinir rejenerasyonunda, nöronal iyileşmeden sorumlu farklı yollar tanımlanmıştır. PI3K / Akt ve Ras / ERK sinyalleşme kaskadları, nöronal sağkalımda kilit rol oynar. Eritropoietin, takrolimus, asetil-l-karnitin, n-asetilsistein ve geldanamisinin dahil olmak üzere bu yolları hedef alan bir çok



ajanın etkili olduğu gösterilmiştir. cAMP'yi yukarı doğru düzenleyen Trk reseptörü sinyal olayları, aksonal büyüme oranının artırılmasında önemli bir rol oynar. Rolipram, testosteron, fasudil, ibuprofen ve kondroitinaz ABC dahil olmak üzere bu yolu hedefleyen ajanlar, insan uygulamaları için umut vadetmektedir [39, 103, 104]. Trk aracılı sağkalım sıklıkla, nöronların hayatta kalmasına aracılık ettiği gösterilen ilk nörotrofin ile aktive edilmiş sinyalleme proteini, küçük GTP bağlayıcı protein Ras üzerinden sağlanır [40]. Nörotrofin bağımlı sağ kalımın % 40-60'ından sorumlu olan Ras, doğrudan hareket etmez. Daha ziyade, nörotrofin ile başlatılan sinyalleri çoklu sinyalleme yollarına çevirerek veya yönlendirerek çalışır. Bu sinyal yollarından ikisi, PI-3K / Akt ve MEK / MAPK, nörotrofin ve Ras ile aktive edilmiş sağkalımın başlıca etkileyicileridir. Ras-MEK/MAPK yolu, sinaptik plastisite, uzun süreli potansiyelizasyon ve hayatta kalma da dahil olmak üzere nöronlarda birçok role sahiptir. BDNF aracılı sağkalımda, MEK inhibe edildiğinde, MEK-MAPK'nin nörotrofin aracılı serebellar nöron sağkalımında sadece % 20-30 oranında azalma olmuştur. Buna rağmen MEK aktivitesinin bu faktörler tarafından desteklenerek hayatta kalma için gerekli olduğunu görülmektedir [52].

Literatürde periferik sinir rejenerasyonuna etkisi araştırılan başlıca ajanlar ; hyalüronik asit [105], insülin-benzeri büyüme faktörü [106], prosaposin [107], silier nörotrofik faktör [108], asidik fibroblast faktör [109], gangliozid GM1 [110], lepeptin [111], kreatin mono-hidrat [112], eritropoetin [113] , melatonin [114], takrolimus [115], asetil-L-karnitin [116], rolipram [117], kültüre edilmiş schwan hücresi [118] , asetil salisilik asit [119] , testosteron [120] , geldanamisin [121], fasudil [122], kondroitinaz ABC [123], ibuprofen [124], transtretin [125] 'dir. Çalışmalar genel olarak travmaya bağlı değişen mikroçevreyi iyileştirme amacıyla olup rutin kullanımda olmasalarda farklı çalışmalarda farklı düzeylerde pozitif sonuçlar alınmıştır.

Çalışmamızda bombesinin; periferik sinir tam kat kesisinde, aynı günlerde ve aynı saatlerde ense derisinden subkutan yapılan farklı doz enjeksiyonlarının

periferik sinir iyileşmesine olan etkileri histopatolojik ve elektrofizyolojik olarak incelemek amaçlanmıştır.

A.Baroni ve arkadaşları yaptıkları kültür çalışmalarında bombesinin yara iyileşmesinde epitelizasyon ve keratinosit proliferasyonunu VEGF, IL-8 ve COX-2 gibi anjiyojenik faktörlerin uyarması sebebiyle artırdığını vurgulamışlardır [126].

Güllüoğlu ve arkadaşları, trinitrobenzene sülfonik asit (TNBS) ile oluşturdukları deneysel kolit modelinde kolonik hasarda bombesin etkisini incelemiş ; mukozal hasarı azalttığı ve bombesinin histopatolojik olarak mukozal proliferasyonu belirgin derecede stimüle ettiğini vurgulamışlardır. Bu trofik etki mekanizmasının PGE-2 analoglarının ve araşidonik asit metabolitlerinin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bombesin etkisiyle barsak lenfoid dokusunda T hücre proliferasyonu ,intestinal sekresyonlarda Ig A ve NK hücre aktivitesi artmaktadır. Dolaylı olarak bombesin, bakteriyal invazyonu önlemekte ve enfeksiyona karşı da defans oluşturmaktadır [11, 74, 75].

Çalışma imkanlarının kolay olması ve insan anatomisiyle benzerliğinden dolayı çalışmamızda wistar cinsi erkek rat kullanılmış, özellikle crush yaralanma çalışmalarında meydana gelebilecek hasarlanma derecesi farklılığını ortadan kaldırmak amacıyla transeksiyon yapılmıştır.

Bombesin-benzeri peptitlerin, bronşiyal epitelyal hücrelerin insan küçük hücreli akciğer karsinom hücrelerinin klonal büyümesini uyardığı göstergelerini içermektedir [69]. Ayrıca, bombesine karşı yönlendirilen bir monoklonal antikorun, SCLC'nin klonal büyümesini inhibe ettiği ve çıplak farelerde tümör regresyonuna neden olduğu da gösterilmiştir [70]. Ayrıca gastrointestinal kanalın ve ekzokrin pankreasın belirli segmentlerinde ve dokularında trofik etkileri bulunmaktadır [71-73] .



Literatürde bombesinin hücre kültür çalışmaları, yara iyileşmesi çalışmaları, mukozal ülserler ve gastrointesinal sistem üzerinde etkileri incelenmiş olup; ortak doku rejenerasyon fazları ve yolakları bulunan sinir rejenerasyonuna etkileri literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda sinir transeksiyonu ve 9/0 mikrocerrahi koaptasyon sonrası, grup3'e 10 µg/kg dozunda, grup4'e 100 µg/kg dozunda 08.00, 16.00, 00.00 saatlerinde günde 3 kez ense derisinden subkutan 7 gün boyunca enjeksiyon yapıldı. Toksik olabileceği düşünülerek 1000 µg/kg dozu özellikle yapılmadı.

Sinir iyileşmesi değerlendirmesinde, seçilmesi gereken ölçüm metodu istenen parametreye göre istenen sonuçları verebilmesi açısından önemlidir. Elektrofizyolojik veya histopatolojik ölçümler sonucunda alınan veriler, motor veya duyuşsal iyileşme ile örtüşmeyebilir. Akson sayılarının ve myelinizasyonun değerlendirildiği diğer ölçüm yöntemleri ile nöronal iyileşmenin hedef organa ulaşp ulaşmadığını bilmek mümkün olmayabilir. Bu durumda genellikle sinir koaptasyonu etrafındaki sinir dokusu histopatolojik anlamda incelemeye alınmaktadır. Fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için siyatik sinir yaralanma modellerinde, “siyatik fonksiyon indeksi” literatürde yoğun olarak kullanılmış bir ölçüm yöntemidir. Yürüme analizleri ile maksimum kas kuvveti ölçen yöntemler arasında korelasyon olmaması; yürümenin maksimum efor gerektiren bir aktivite olmaması sebebiyle olağan karşılanabilir [127]. Ekstremitelerde distalde ototomiler, kontraktür formasyonları gibi sorunlar, yürüme analizinin değerlendirme yöntemi olarak kullanıldığı çalışmalarda karşımıza çıkabilmektedir. Böyle durumlarda yürüme analizleri her zaman doğru sonuçlar vermeyebilir [128]. Bu nedenle çalışmamızda yürüme analizi değerlendirmelerinde kontraktür olan deneklerde yürüme analizleri patoloji geliştiği özellikle 10. hafta dan sonra değerlendirmeye alınmadı.

Çalışma sonucunda gruplarda 1.ve 2. hafta yapılan SFI sonuçlarında ortalama değerlerde ve istatistiksel sonuçlarda farklılık görülmedi. 4. hafta yapılan SFI sonuçlarında 2.grup ve 4. grup arasında, 6.hafta yapılan SFI sonuçlarında 2.grup ve 4. grup arasında, 8. hafta yapılan SFI sonuçlarında 100 µg/kg bombesin yapılan

grup 4 lehine 3. grup ve 2. grup arasında, 10.hafta yapılan SFI analizinde 100 µg/kg bombesin yapılan 4. grup, 3. grup ve 2. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ). 12.hafta, özellikle kontrol grubunda dikkat çeken, inverte ve kapalı duruş postürü nedeniyle grup 2 daha çok sayıda grup 3 ve grup 4 te ki bazı deneklerden ayak izi alınmadığı için 12. hafta SFI analiz ve karşılaştırma yapılmadı. Genel olarak SFI analiz sonuçları değerlendirildiğinde özellikle 100 µg/kg bombesin yapılan deney grubu sonuçları kontrol grubuna göre iyileşme ve pozitif yönde etki olarak yorumlanmıştır.

Çalışmamızda 4, 8 ve 12. hafta yapılan EMG uygulamaları sonuçlarına bakıldığında grup 2, grup 3 ve grup 4 amplitüd ve latans ölçümlerinde ortalama ve standart sapma sonuçlarında pozitif farklılıklar grup4 lehine amplitüd artışı ve latansda kısalma yönünde olsa da, istatistiki olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ). 12. hafta yapılan gastrocnemius kas ağırlık farkı/sağlam taraf oranlarında grup 4 lehine iyileşme bulguları ve daha az atrofi görülse de; istatistiki anlamlı fark görülmedi ( $p>0,05$ ).

Hücre artışı, ekstrasellüler matriks sentezi, trofik faktörlerin üretimi, mikroçevre stabilizasyonu, remyelinizasyon ve immünmodulasyon gibi muhtemel rejenerasyon mekanizmalarından hangisi olursa olsun sinir rejenerasyonu; aynı sinir hücreleri tarafından innerve edilen hedef hücrelerin trofik etkisine bağlıdır [129, 130]. Sinir hücrelerinin temel aktivite ve yaşamını sürdürmesinde etkili olan trofik faktörler, retrograd aksonal transport yoluyla taşınır.

Dorsal kök gangliolarında ve rat periferik sinir transeksiyonları sonra in vitro uygulana NGF 'nin sinir rejenerasyonunda schwann hücresi uyarımı ve sinir myelinizasyonu artırdığı , denerve kas üzerinde myoprotektif etki ettiği öne sürülmüştür [131, 132].

NGF , nörotrofin ailesinin prototipik üyesidir. Sempatik ganglionlardan dramatik büyümeyi teşvik etme kabiliyeti temelinde keşfedilmiştir. Gelişim

sırasında sempatik nöronların ve bir dizi duyuşal nöronun hayatta kalması için kesinlikle gereklidir. NGF, bu nöronlar tarafından innervasyon alan dokularda sentezlenir ve programlanmış hücre ölümü meydana geldiğinde gelişim döneminde bu dokulara rejenerasyon sürecini uzatan nöronların bir kısmını tutar. Hedef organların trofik destek sağlama yetenekleri, nörotrofik hipotezin temelini oluşturmaktadır ve diğer nörotrofinlerin etkisinin çoğu bu temelde açıklanabilir. NGF'nin, nöronal öncül popülasyonun proliferasyonunu destekleyerek değil, programlanmış hücre ölümünden korunan nöronların seçici olarak hayatta kalmasına izin vererek hücre sayısını düzenlediği belirtilmelidir. NGF, diğer klasik büyüme faktörleri gibi, çok çeşitli biyosentetik işlem dizisini pozitif olarak düzenleyerek hücreşel metabolizmayı uyarır. Aksonal ve dendritik işlemlerin geniş yayılımını teşvik ederek hedef hücrelerinin morfolojik farklılaşmasını sağlar. [133].

Hipoksik koşullarda VEGF ekspresyonu, spesifik hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörlerinin, HIF-1 ve HIF-2 aktivasyonu ile aracılık eder. HIF-1 aktivasyonunun bir sonucu olarak, VEGF transkripsiyonu hipoksi sırasında artar [134, 135].

Glutamata maruz kalmadan önce VEGF ile yapılan altı saatlik ön muamele, artmış hücre sağkalımı ile sonuçlanmış, kaspaz-3 benzeri aktivitenin düzenlenmesi ve ayrıca zayıflatılmış DNA merdivenlemesi ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar VEGF'nin belirli hücre soylarında nöronal apoptozu bloke edebildiği anlamına gelir. Bu hipotezi destekleyen diğer kanıtlar, VEGF'nin iskemik bir beynin yüzeyine topikal olarak uygulanmasının, deneysel olarak indüklenen inmenin başlamasından 24 saat sonra, enfarktüs hacminde ve nöronal hasarı engellediği gösterilmiştir [136].

Daha önceki çalışmalarda sarılık ve kolit modeli oluşturulan ratlara uygulanan bombesinin bağırsak lipid peroksidasyonunun azalttığı, antioksidan GSH'yı

artırdığı ve ayrıca ilave protein oksidasyonunun azalttığı gösterildiği gibi, oksidatif strese karşı koruduğu bildirilmiştir [137, 138].

Zor ve arkadaşları transekte edilmiş rat siyatik sinir modelinde in vitro uyguladıkları VEGF' in nörotrofik aktiviteye sahip olduğunu ve periferik sinir sisteminde aksonal büyümeyi uyardığını, hücre sağkalımını ve schwann hücre proliferasyonunu arttırdığını göstermişlerdir [139].

Mohammadi ve arkadaşlarının yapmış olduğu diğer çalışma, oksijenizasyonun bozulduğu sinir kesisi sahasında, nöroproteksiyona vasküler yapıların VEGF sayesinde desteklenerek regenerasyona pozitif etki ettiği yönündedir [140].

Nöronal sitoskeleton'u kontrol eden ana mekanizmalardan biri, sitoskeletal proteinlerin fosforilasyon durumunun, nöronlar içindeki protein kinazların ve fosfatazların nispi aktivitelerindeki değişikliklerle değiştirilmesidir. Özellikle, mikrotubule bağlı protein-2 (MAP-2) protein ailesi, ağırlıklı olarak nöronlarda eksprese edilen ve nöronlarda bulunan protein kinazlarının ve fosfatazların çoğu için substrat olarak görev yapan bol miktarda bir hücre iskeleti bileşeni grubudur. MAP-2 fosforilasyonunun hücre iskeleti ile olan ilişkisini kontrol ettiği görülmektedir ve gelişimsel olarak düzenlenmiştir.

Isıya dayanıklı MAP-2'nin bu varsayılan işlevlerinin ayrıca, nöronal işlemlerin, sinaptik plastisitenin ve nöronal hücre ölümünün büyümesinde önemli roller oynadığı öne sürülmüştür. Nörit büyümesinde MAP-2 fosforilasyonu ;büyüme konileri ve filopodia, nöronlar arasında doğru sinaptik temasların kurulması için dendritlerin ve aksonların uzamasını ve olgunlaşmasını yönlendirir. Bu yapıların distal bölgeleri, fosfatazlardan daha yüksek kinaz aktivitesi tarafından üretilen yüksek fosforlu MAP-2 varlığı ile karakterize edilir. Yüksek oranda fosforile edilmiş MAP-2, mikrotübüller için daha düşük bir afiniteye sahip olduğundan, mikrofilamentlerle birleşerek hızlı bir aksonal ve dendritik büyümeye izin verecek oldukça dinamik bir sito-iskelete yol açabilir [141-145].

Büyüme ile ilişkili protein (GAP-43) genel olarak presinaptik nöronal büyüme ve nöronal plastisite ile ilişkilidir [146]. GAP-43 geni üç ekzon içerir. İlk ekzon membran hedefleme alanını kodlar, ikinci ekzon bir kalmodulin bağlanma alanını ve bir protein kinaz C (PKC) fosforilasyon alanını kodlarken, 5' yan dizisi birkaç bölgeden RNA transkripsiyonunun başlatılmasını yönlendirir [147].

Siyatik sinirin in vivo olarak yetişkin sıçanlarda kesilmesinden veya ezilmesinden sonra, GAP-43 immünoaktivitesinin aksotomize edilmiş dorsal kök ganglion hücrelerinde görünmesi ve ardından yeni oluşan filizlere taşınması 3 gün sürer. Lekelenmenin yoğunluğu 21 günde zirve yapar ve ezilme yaralanmasından 9 hafta sonra ve siyatik sinirin kesilmesinden 36 hafta sonra tespit edilemez hale gelir [148, 149].

GAP-43'ün down regülasyonunun, aksotomi sonrası tırmanma liflerinde yeni oluşturulan dallarda önemli bir azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir. GAP-43 mRNA down regülasyonu, aktive edilmiş akut filizlerin oluşumunu da engellemiş, bu da GAP-43'ün aksotomi sonrası aksonal yeniden büyümenin başlamasının teşvik edilmesinde bir zorunluluk olduğunu göstermiştir [150].

Sakrifikasyon sonrası sinir örneklerine NGF, VEGF, MAP-2 ve GAP-43 hazır antikorlar kullanılarak immunohistokimyasal boyama yapıldı. İnceleme sonrası grup 3 te daha az, grup 4 de belirgin, grup 2 ye göre anlamlı derece NGF pozitif hücreye rastlandı. VEGF panelinde grup 2 de boyanma görülmezken, grup3 ve grup 4 de boyanma dikkati çekmiştir. GAP-43 ve MAP-2 tubüler protein antikorları panellerinde deney gruplarında anlamlı boyanma gözlenmedi. Diğer çalışmalarda göz önünde bulundurulduğunda, uygulanan bombesinin NGF ve VEGF üzerinde pozitif aktivatör etki ettiği, transekte edilmiş sinir örneklerinde dolaylı yönden etkileri rejenerasyonda kanıtlanmış nörofik faktörleri artırarak, sinir rejenerasyonuna olumlu etki ettiği söylenebilir. MAP-2 ve GAP-43 panellerinde istenilen seviyede boyanma olmaması, tubüler proteinlerin sinir rejenerasyonunun erken dönemlerinde saptanabilmesiyle ilişkilendirildi.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) 'nun avantajları, geniş kapsamlı uygulama yelpazesini, detaylı üç boyutlu topografik görüntüleme ve farklı detektörlerden toplanan çok yönlü bilgileri içerir. SEM'lerin bilgisayar teknolojisindeki uygun eğitim ve gelişmeler ile kullanımı kolaydır ve ilgili yazılım kullanımı kolaylaştırır. Cihaz hızlı çalışır ve analizlerini beş dakikadan kısa sürede tamamlar. Hemen hemen her türlü numune, iletken ve iletken olmayan (leke kaplaması gerekli); Yüzey etkileşimi esasına dayanarak elektron transparan numune gerektirmez. Numunenin x-y-z (3D) döndürmesi ile her yöne görüntüleme imkanı verir.SEM doğrudan iletken olmayan numunelerde çalışır[151].

Yüksek çözünürlük, 0,2 nm kadar küçük görüntüleme ve numunenin içindeki kusurları temizleme imkanı, faz tanımlama, yapı-simetri tayini ve parametre ölçümü açısından faydalı olsa da transmisyon elektron mikroskobisi (TEM) yaparken; elektron saydam bir numune hazırlamak zordur (iletkenlik veya elektron yoğunluğu ve numune kalınlığı nedeniyle). TEM, özel operasyon ve analiz eğitimi gerektirir.

Numuneler elektron saydam olan, vakum odasını tolere edebilen ve odaya sığacak kadar küçük olanlarla sınırlıdır. Elektron mikroskopları titreşime ve elektromanyetik alanlara duyarlıdır ve onları olası maruz kalmalardan izole eden bir alana yerleştirilmelidir[152]. Diğer açıdan değerlendirildiğinde aynı organik örnekte TEM çalışılması SEM görüntülemesine oranla 1.5 kat daha pahalıdır.

3 boyutlu elektron mikroskobisi sonuçlarına dayanılarak 3 farklı pozisyon kesi işlemi uygulanan sinir örnekleri onarım hattı fibrozis miktarı, akson distali horizontal ve longitudinal şekilde kesilerek, ayrı ayrı kaplama yapıldıktan sonra, incelenmiş olup; grup 2 de düzensiz yapılanma, fibrozis artışı ve vakuolizasyon ve endonöral gap yapıları dikkat çekmiştir. Buna karşın grup 4 'de grup 2 de görülmeyen perinöral yapılar görülmekte ve kesitler incelendiğinde grup 4'teki lif kalınlıklarının grup2 ye oranla daha büyük ve düzgün olduğu görülmüştür. Bu bağlamda yapılan distale ilerleyen kesi ve 3 boyutlu elektron mikroskobisi

görüntüleri, 3d ve autocad programında piksel oranlarına dayanılarak karşılaştırıldı. Aynı seviyedeki en büyük distal sinir lifi çapının, total sinir alanına oranlarının matematiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ( $p<0,05$ ).

SEM çalışmalarında genel olarak analiz sonuçları kalitatif görünse de; farklı alan görüntüleme ve 3d analiz imkanlarının geliştirilmesi ve bunların ortak kullanımıyla sonuçlar daha kantitatif yorumlanabilmektedir.

## SONUÇ

Çalışmamızda subkutan yapılan farklı dozlarda bombesin enjeksiyonunun periferik sinir tam kat kesi modelinde sinir iyileşmesine olan etkileri araştırılmak istendi. Yara iyileşmesi, mukozal hasarlanma ve merkezi sinir sistemi travmaları sonrası oluşan hipoksi ve buna bağlı artan metabolit sorunlarının oluşturduğu istenmeyen etkilerin ilgili çalışmalarda bombesin etkisinde giderildiği veya kontrol gruplarına oranla azaldığı farkedilmiştir.

Kontrol grubuna oranla düşük doz bombesin yapılan grupta sinir iyileşmesinde göze çarpan bir amplitüde artma ve latans seviyelerinde azalma farkedilmezken, yüksek doz bombesin yapılan grupta amplitüde artma ve latans seviyelerinde azalma görüldü. Siyatik fonksiyonel analiz ve gastrocnemius kas ağırlık ölçümü sonuçları da benzerdi.

Histopatoloji ve elektron mikroskopisi sonuçları değerlendirildiğinde; deney gruplarında kontrol grubuna oranla vakuolizasyonun, inflamasyon ve fibrozisin azaldığını, rejenerasyonun arttığını destekler nitelikte sonuçlar bulundu. İmmüno histokimyasal parametrelerde özellikle yüksek doz bombesin yapılan grupta; NGF ve VEGF panellerinde ki boyanma diğer yara çalışmalarında olduğu gibi bombesinin sinir iyileşmesinde de pozitif trofik etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Periferik sinir iyileşmesinde bombesinin etkilerinin; ayrıntılı şekilde elde edilebilecek verileri , mekanizmaları ortaya koyacak ileri doku mühendisliği ve sinir rejenerasyonun da gelişmiş modellerle karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyacı vardır.



## KAYNAKLAR

1. Mackinnon, S.E., et al., *A study of neurotrophism in a primate model*. J Hand Surg Am, 1986. **11**(6): p. 888-894.
2. Brushart, T.M., et al., *Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation*. J Neurosci, 1998. **18**(21): p. 8674-81.
3. Li, S.T., et al., *Peripheral nerve repair with collagen conduits*. Clin Mater, 1992. **9**(3-4): p. 195-200.
4. Burnett, M.G. and E.L. Zager, *Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review*. Neurosurg Focus, 2004. **16**(5): p. E1.
5. Robinson, L.R., *Traumatic injury to peripheral nerves*. Muscle Nerve, 2000. **23**(6): p. 863-73.
6. Liuzzi, F.J. and B. Tedeschi, *Peripheral nerve regeneration*. Neurosurg Clin N Am, 1991. **2**(1): p. 31-42.
7. Anastasi, A., V. Erspamer, and M. Bucci, *Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes*. Experientia, 1971. **27**(2): p. 166-7.
8. Erspamer, V., et al., *Active peptides in the skins of one hundred amphibian species from Australia and Papua New Guinea*. Comp Biochem Physiol C, 1984. **77**(1): p. 99-108.
9. Erspamer, V., et al., *Phyllomedusa skin: a huge factory and store-house of a variety of active peptides*. Peptides, 1985. **6 Suppl 3**: p. 7-12.
10. West, S.D. and D.W. Mercer, *Bombesin-induced gastroprotection*. Ann Surg, 2005. **241**(2): p. 227-31.
11. Gulluoglu, B.M., et al., *Bombesin ameliorates colonic damage in experimental colitis*. Dig Dis Sci, 1999. **44**(8): p. 1531-8.
12. N, B., *Gastrin-releasing peptide*, in *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*, W.J.D. GJ, Editor. 1994. p. 423-445.
13. Baroni, A., et al., *Bombesin: a possible role in wound repair*. Peptides, 2008. **29**(7): p. 1157-66.
14. Maria A. Patestas, L.P.G., *Neuroanatomy, A textbook of neuroanatomy*. 1. ed. 2006: Blackwell; 1 edition 29-35.
15. Bouquet, C. and F. Nothias, *Molecular mechanisms of axonal growth*. Adv Exp Med Biol, 2007. **621**: p. 1-16.
16. <https://clinicalgate.com/trauma-of-the-nervous-system-peripheral-nerve-trauma/#bib9002>, *Trauma of the Nervous System*. 2006(Peripheral Nerve Trauma).
17. Mackinnon, S.E., *Nerve Surgery*, in *Nerve Surgery*, S.E. Mackinnon and A. Yee, Editors. 2015, Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
18. Smith, B.E., *Chapter 1 Anatomy and histology of peripheral nerve*, in *Handbook of Clinical Neurophysiology*, J. Kimura, Editor. 2006, Elsevier. p. 3-22.
19. Kim E. Barret , S.M.B., *Ganong's Review of Medical Physiology*. 23. ed. 2010. 79-92.

20. Mackinnon, S.E., *New directions in peripheral nerve surgery*. Ann Plast Surg, 1989. **22**(3): p. 257-73.
21. Makwana, M. and G. Raivich, *Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration*. Febs j, 2005. **272**(11): p. 2628-38.
22. Hall, S.M., *Mechanisms of repair after traumatic injury*. In *Peripheral Neuropathy*, in *Peripheral Neuropathy*. 2005, Unknown Publisher. p. 1403-1434.
23. Dieu, T., B.R. Johnstone, and D.F. Newgreen, *Genes and nerves*. J Reconstr Microsurg, 2005. **21**(3): p. 179-86.
24. Marx, J., *Helping neurons find their way*. Science, 1995. **268**(5213): p. 971-3.
25. Heumann, R., *Regulation of the synthesis of nerve growth factor*. J Exp Biol, 1987. **132**: p. 133-50.
26. Funakoshi, H., et al., *Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve*. J Cell Biol, 1993. **123**(2): p. 455-65.
27. Allodi, I., E. Udina, and X. Navarro, *Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level*. Prog Neurobiol, 2012. **98**(1): p. 16-37.
28. Geuna, S., et al., *Nerve regeneration along bioengineered scaffolds*. Microsurgery, 2007. **27**(5): p. 429-38.
29. Raivich, G. and M. Makwana, *The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways*. Brain Res Rev, 2007. **53**(2): p. 287-311.
30. Daniloff, J.K., et al., *Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair*. J Cell Biol, 1986. **103**(3): p. 929-45.
31. Baron-Van Evercooren, A., et al., *Nerve growth factor, laminin, and fibronectin promote neurite growth in human fetal sensory ganglia cultures*. J Neurosci Res, 1982. **8**(2-3): p. 179-93.
32. Warren, R.J. and P.C. Neligan, *Plastic Surgery: Volume 2: Aesthetic Surgery (Expert Consult - Online and Print)*. 2012: Elsevier Health Sciences.
33. Driscoll, P.J., M.A. Glasby, and G.M. Lawson, *An in vivo study of peripheral nerves in continuity: biomechanical and physiological responses to elongation*. J Orthop Res, 2002. **20**(2): p. 370-5.
34. Neligan, P.C., *Repair and grafting of peripheral nerve*. Elsevier, 2013. **one**(nerve repair): p. 466-478.
35. Millesi, H., *Microsurgery of peripheral nerves*. Hand, 1973. **5**(2): p. 157-60.
36. Giddins, G.E., P.J. Wade, and A.A. Amis, *Primary nerve repair: strength of repair with different gauges of nylon suture material*. J Hand Surg Br, 1989. **14**(3): p. 301-2.
37. Cabaud, H.E., et al., *Epineurial and perineurial fascicular nerve repairs: a critical comparison*. J Hand Surg Am, 1976. **1**(2): p. 131-7.
38. Zhao, Q., et al., *Specificity of muscle reinnervation following repair of the transected sciatic nerve. A comparative study of different repair techniques in the rat*. J Hand Surg Br, 1992. **17**(3): p. 257-61.

39. Kaplan, D.R. and F.D. Miller, *Neurotrophin signal transduction in the nervous system*. Current opinion in neurobiology, 2000. **10**(3): p. 381-391.
40. Vogel, K.S., et al., *Loss of neurofibromin results in neurotrophin-independent survival of embryonic sensory and sympathetic neurons*. Cell, 1995. **82**(5): p. 733-742.
41. Yao, R. and G.M. Cooper, *Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor*. Science, 1995. **267**(5206): p. 2003-2006.
42. Klesse, L.J. and L.F. Parada, *p21 ras and phosphatidylinositol-3 kinase are required for survival of wild-type and NF1 mutant sensory neurons*. Journal of Neuroscience, 1998. **18**(24): p. 10420-10428.
43. Mazzoni, I.E., et al., *Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway*. Journal of Neuroscience, 1999. **19**(22): p. 9716-9727.
44. Holgado-Madruga, M., et al., *Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(23): p. 12419-12424.
45. Korhonen, J.M., et al., *Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(52): p. 37307-37314.
46. Andjelković, M., et al., *Nerve growth factor promotes activation of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  isoforms of protein kinase B in PC12 pheochromocytoma cells*. European journal of biochemistry, 1998. **251**(1-2): p. 195-200.
47. Ashcroft, M., et al., *The selective and inducible activation of endogenous PI 3-kinase in PC12 cells results in efficient NGF-mediated survival but defective neurite outgrowth*. Oncogene, 1999. **18**(32): p. 4586.
48. Blair, L.A., et al., *Akt-dependent potentiation of L channels by insulin-like growth factor-1 is required for neuronal survival*. Journal of Neuroscience, 1999. **19**(6): p. 1940-1951.
49. Vaillant, A., et al., *Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival*. The Journal of cell biology, 1999. **146**(5): p. 955-966.
50. Creedon, D.J., E.M. Johnson, and J.C. Lawrence, *Mitogen-activated protein kinase-independent pathways mediate the effects of nerve growth factor and cAMP on neuronal survival*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(34): p. 20713-20718.
51. Klesse, L., et al., *Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells*. Oncogene, 1999. **18**(12): p. 2055.
52. Bonni, A., et al., *Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1358-1362.
53. Hetman, M., et al., *Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(32): p. 22569-22580.

54. Aloyz, R.S., et al., *p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors*. The Journal of cell biology, 1998. **143**(6): p. 1691-1703.
55. Michaelidis, T., et al., *Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development*. Neuron, 1996. **17**(1): p. 75-89.
56. Liu, Y.-Z., L.M. Boxer, and D.S. Latchman, *Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade*. Nucleic acids research, 1999. **27**(10): p. 2086-2090.
57. Bibel, M., E. Hoppe, and Y.A. Barde, *Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR*. The EMBO journal, 1999. **18**(3): p. 616-622.
58. Majdan, M., et al., *Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis*. Journal of Neuroscience, 1997. **17**(18): p. 6988-6998.
59. Ferri, C.C., F.A. Moore, and M.A. Bisby, *Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor*. Journal of neurobiology, 1998. **34**(1): p. 1-9.
60. Wiese, S., et al., *The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons*. European Journal of Neuroscience, 1999. **11**(5): p. 1668-1676.
61. Rudge, J.S., et al., *Endogenous BDNF protein is increased in adult rat hippocampus after a kainic acid induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective*. Experimental neurology, 1998. **149**(2): p. 398-410.
62. Majdan, M. and F.D. Miller, *Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors*. International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 1999. **17**(3): p. 153-161.
63. Yamashita, T., K.L. Tucker, and Y.-A. Barde, *Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 585-593.
64. Lehmann, M., et al., *Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration*. Journal of Neuroscience, 1999. **19**(17): p. 7537-7547.
65. McDonald, T.J., et al., *Characterization of an avian gastric (proventricular) peptide having sequence homology with the porcine gastrin-releasing peptide and the amphibian peptides bombesin and alytesin*. FEBS Letters, 1980. **122**(1): p. 45-48.
66. Bunnett, N., *Gastrin releasing peptide*. Gut peptides : biochemistry and physiology, 1994.
67. Wharton, J., et al., *Bombesin-like immunoreactivity in the lung*. Nature, 1978. **273**(5665): p. 769-70.
68. Walsh, J.H.J.W.S., *Bombesin-like Peptides*, In *Brain Peptides* M.B.a.J.M. D. Krieger, Editor. 1983: New York. p. 941-60.
69. Willey, J.C., J.F. Lechner, and C.C. Harris, *Bombesin and the C-terminal tetradecapeptide of gastrin-releasing peptide are growth factors for*

- normal human bronchial epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 1984. **153**(1): p. 245-248.
70. Cuttitta, F., et al., *Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer*. *Nature*, 1985. **316**: p. 823.
  71. Lehy, T., et al., *Chronic administration of bombesin stimulates antral gastrin cell proliferation in the rat*. *Gastroenterology*, 1983. **84**(5): p. 914-919.
  72. Lehy, T., et al., *Stimulating effect of bombesin on the growth of gastrointestinal tract and pancreas in suckling rats*. *Gastroenterology*, 1986. **90**(6): p. 1942-1949.
  73. Lhoste, E., et al., *Trophic effect of bombesin on the rat pancreas: Is it mediated by the release of gastrin or cholecystokinin?* *Peptides*, 1985. **6**: p. 89-97.
  74. Chu, K.U., et al., *Role of bombesin on gut mucosal growth*. *Ann Surg*, 1995. **222**(1): p. 94-100.
  75. Li, J., et al., *Bombesin affects mucosal immunity and gut-associated lymphoid tissue in intravenously fed mice*. *Arch Surg*, 1995. **130**(11): p. 1164-9; discussion 1169-70.
  76. Moody, T.W., et al., *Bombesin: specific binding to rat brain membranes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. **75**(11): p. 5372-6.
  77. Jensen, R.T., et al., *Interaction of bombesin and litorin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1978. **75**(12): p. 6139-6143.
  78. Westendorf, J.M. and A. Schonbrunn, *Characterization of bombesin receptors in a rat pituitary cell line*. *Journal of Biological Chemistry*, 1983. **258**(12): p. 7527-7535.
  79. Swope, S.L. and A. Schonbrunn, *Characterization of ligand binding and processing by bombesin receptors in an insulin-secreting cell line*. *Biochem J*, 1987. **247**(3): p. 731-8.
  80. Moody, T.W., et al., *I. High affinity receptors for bombesin/GRP-like peptides on human small cell lung cancer*. *Life Sciences*, 1985. **37**(2): p. 105-113.
  81. Zachary, I. and E. Rozengurt, *High-affinity receptors for peptides of the bombesin family in Swiss 3T3 cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(22): p. 7616-20.
  82. Zarbin, M., et al., *Autoradiographic localization of (125I-Tyr4)bombesin-binding sites in rat brain*. *The Journal of Neuroscience*, 1985. **5**(2): p. 429-437.
  83. Vigna, S.R., et al., *Localization of specific binding sites for bombesin in the canine gastrointestinal tract*. *Gastroenterology*, 1987. **93**(6): p. 1287-1295.
  84. de Medinaceli, L., W.J. Freed, and R.J. Wyatt, *An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks*. *Experimental neurology*, 1982. **77**(3): p. 634-643.
  85. Deumens, R., et al., *The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection*. *Journal of neuroscience methods*, 2007. **164**(1): p. 120-130.

86. Hare, G., et al., *Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery*. *Plastic and reconstructive surgery*, 1992. **89**(2): p. 251-258.
87. Bervar, M., *Video analysis of standing—an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve*. *Journal of neuroscience methods*, 2000. **102**(2): p. 109-116.
88. Bozkurt, A., et al., *CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury*. *Journal of neuroscience methods*, 2008. **173**(1): p. 91-98.
89. Dijkstra, J.R., et al., *Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex*. *Journal of neuroscience methods*, 2000. **96**(2): p. 89-96.
90. Varejão, A.S., et al., *Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis*. *Journal of neuroscience methods*, 2001. **108**(1): p. 1-9.
91. Bain, J., S. Mackinnon, and D. Hunter, *Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat*. *Plastic and reconstructive surgery*, 1989. **83**(1): p. 129-138.
92. Quan, D. and S.J. Bird, *Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nerve injuries*. *Univ Pa Orthop J*, 1999. **12**: p. 45-51.
93. Friedman, W.A., *The electrophysiology of peripheral nerve injuries*. *Neurosurg Clin N Am*, 1991. **2**(1): p. 43-56.
94. Gordon, T., O. Sulaiman, and J.G. Boyd, *Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries*. *Journal of the peripheral nervous system*, 2003. **8**(4): p. 236-250.
95. Taniuchi, M., et al., *Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties*. *Journal of Neuroscience*, 1988. **8**(2): p. 664-681.
96. Mackinnon, S.E., A.R. Hudson, and D.A. Hunter, *Histologic assessment of nerve regeneration in the rat*. *Plast Reconstr Surg*, 1985. **75**(3): p. 384-8.
97. Petersen, J., et al., *Reduction of extraneural scarring by ADCON-T/N after surgical intervention*. *Neurosurgery*, 1996. **38**(5): p. 976-984.
98. Madison, R.D., S.J. Archibald, and T.M. Brushart, *Reinnervation accuracy of the rat femoral nerve by motor and sensory neurons*. *Journal of Neuroscience*, 1996. **16**(18): p. 5698-5703.
99. Conforti, L., J. Gilley, and M.P. Coleman, *Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2014. **15**(6): p. 394.
100. Valero-Cabré, A. and X. Navarro, *Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair*. *Journal of neurotrauma*, 2002. **19**(11): p. 1475-1485.
101. Cattin, A.-L., et al., *Macrophage-induced blood vessels guide Schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves*. *Cell*, 2015. **162**(5): p. 1127-1139.

102. Lewis, G.M. and S. Kucenas, *Perineurial glia are essential for motor axon regrowth following nerve injury*. Journal of Neuroscience, 2014. **34**(38): p. 12762-12777.
103. Chan, K.M., et al., *Improving peripheral nerve regeneration: from molecular mechanisms to potential therapeutic targets*. Experimental neurology, 2014. **261**: p. 826-835.
104. Fujioka, T., A. Fujioka, and R.S. Duman, *Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus*. Journal of Neuroscience, 2004. **24**(2): p. 319-328.
105. Seckel, B.R., et al., *Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat*. Journal of neuroscience research, 1995. **40**(3): p. 318-324.
106. Kanje, M., A. Skottner, and J. Sjo, *Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve*. Brain research, 1989. **486**(2): p. 396-398.
107. O'Brien, J.S., et al., *Identification of prosaposin as a neurotrophic factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(20): p. 9593-9596.
108. Yao, M., et al., *Peripheral nerve regeneration in CNTF knockout mice*. The Laryngoscope, 1999. **109**(8): p. 1263-1268.
109. Laird, J., et al., *Acidic fibroblast growth factor stimulates motor and sensory axon regeneration after sciatic nerve crush in the rat*. Neuroscience, 1995. **65**(1): p. 209-216.
110. Wang, M.S., et al., *Topical GM1 ganglioside to promote crushed rat sciatic nerve regeneration*. Microsurgery, 1995. **16**(8): p. 542-546.
111. Badalamente, M.A., L.C. Hurst, and A. Stracher, *Neuromuscular recovery after peripheral nerve repair: effects of an orally-administered peptide in a primate model*. Journal of reconstructive microsurgery, 1995. **11**(06): p. 429-437.
112. Özkan, Ö., et al., *Effect of systemic creatine monohydrate supplementation on denervated muscle during reinnervation: experimental study in the rat*. Journal of reconstructive microsurgery, 2005. **21**(08): p. 573-580.
113. Elfar, J.C., et al., *Erythropoietin accelerates functional recovery after peripheral nerve injury*. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2008. **90**(8): p. 1644.
114. Odaci, E. and S. Kaplas, *Melatonin and nerve regeneration*. Chapter 16. Int Rev Neurobiol, 2009. **87**: p. 317-335.
115. Yan, Y., et al., *Efficacy of short-term FK506 administration on accelerating nerve regeneration*. Neurorehabilitation and neural repair, 2012. **26**(6): p. 570-580.
116. Kostopoulos, V.K., C.L. Davis, and J.K. Terzis, *Effects of acetylo-L-carnitine in end-to-side neurorrhaphy: A pilot study*. Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery, 2009. **29**(6): p. 456-463.
117. Udina, E., et al., *Rolipram-induced elevation of cAMP or chondroitinase ABC breakdown of inhibitory proteoglycans in the extracellular matrix*

- promotes peripheral nerve regeneration. Experimental neurology*, 2010. **223**(1): p. 143-152.
118. Rodrigues, M.C.O., et al., *Peripheral nerve repair with cultured schwann cells: getting closer to the clinics*. The Scientific World Journal, 2012. **2012**.
  119. Subbanna, P.K.T., et al., *Acetyl salicylic acid augments functional recovery following sciatic nerve crush in mice*. Journal of brachial plexus and peripheral nerve injury, 2007. **2**(1): p. 3.
  120. Sharma, N., et al., *Effects of electrical stimulation and gonadal steroids on rat facial nerve regenerative properties*. Restorative neurology and neuroscience, 2009. **27**(6): p. 635-646.
  121. Sun, H., et al., *Geldanamycin accelerated peripheral nerve regeneration in comparison to FK-506 in vivo*. Neuroscience, 2012. **223**: p. 114-123.
  122. Madura, T., et al., *The Rho-associated kinase inhibitor fasudil hydrochloride enhances neural regeneration after axotomy in the peripheral nervous system*. Plastic and reconstructive surgery, 2007. **119**(2): p. 526-535.
  123. Zuo, J., et al., *Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan*. Experimental neurology, 2002. **176**(1): p. 221-228.
  124. Mohammadi, R., M.-A. Hirsaeae, and K. Amini, *Improvement of functional recovery of transected peripheral nerve by means of artery grafts filled with diclofenac*. International Journal of Surgery, 2013. **11**(3): p. 259-264.
  125. Fleming, C.E., M.J. Saraiva, and M.M. Sousa, *Transthyretin enhances nerve regeneration*. Journal of neurochemistry, 2007. **103**(2): p. 831-839.
  126. Baroni, A., et al., *Bombesin: a possible role in wound repair*. Peptides, 2008. **29**(7): p. 1157-1166.
  127. Urbanek, M.S., et al., *Rat walking tracks do not reflect maximal muscle force capacity*. Journal of reconstructive microsurgery, 1999. **15**(02): p. 143-149.
  128. Sarikcioglu, L., B. Demirel, and A. Utuk, *Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat*. Folia morphologica, 2009. **68**(1): p. 1-7.
  129. Erb, D.E., R.J. Mora, and R.P. Bunge, *Reinnervation of adult rat gastrocnemius muscle by embryonic motoneurons transplanted into the axotomized tibial nerve*. Experimental neurology, 1993. **124**(2): p. 372-376.
  130. Janecka, I.P., *Peripheral nerve regeneration: an experimental study*. The Laryngoscope, 1987. **97**(8): p. 942-950.
  131. Shakhbazau, A., et al., *Early regenerative effects of NGF-transduced Schwann cells in peripheral nerve repair*. Mol Cell Neurosci, 2012. **50**(1): p. 103-12.
  132. Tannemaat, M.R., et al., *Differential effects of lentiviral vector-mediated overexpression of nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor on regenerating sensory and motor axons in the transected peripheral nerve*. Eur J Neurosci, 2008. **28**(8): p. 1467-79.



133. Lewin, G.R., *Neurotrophins and the specification of neuronal phenotype*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 1996. **351**(1338): p. 405-411.
134. Ema, M., et al., *A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(9): p. 4273-4278.
135. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Molecular and cellular biology, 1996. **16**(9): p. 4604-4613.
136. Hayashi, T., K. Abe, and Y. Itoyama, *Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1998. **18**(8): p. 887-895.
137. Akcan, A., et al., *Ameliorative effects of bombesin and neurotensin on trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis, oxidative damage and apoptosis in rats*. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2008. **14**(8): p. 1222.
138. Assimakopoulos, S.F., et al., *Bombesin and neurotensin reduce endotoxemia, intestinal oxidative stress, and apoptosis in experimental obstructive jaundice*. Annals of surgery, 2005. **241**(1): p. 159.
139. Zor, F., et al., *Effect of VEGF gene therapy and hyaluronic acid film sheath on peripheral nerve regeneration*. Microsurgery, 2014. **34**(3): p. 209-16.
140. Mohammadi, R., et al., *Vascular endothelial growth factor promotes peripheral nerve regeneration after sciatic nerve transection in rat*. Chin J Traumatol, 2013. **16**(6): p. 323-9.
141. Dayhoff, J., et al., *Cytoskeletal involvement in neuronal learning: A review*. European biophysics journal, 1994. **23**(2): p. 79-93.
142. Díaz-Nido, J., M.A. Hernández, and J. Avila, *Microtubule proteins in neuronal cells*, in *Microtubule Proteins*. 2018, CRC Press. p. 193-257.
143. Johnson, G. and R.S. Jope, *The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration*. Journal of neuroscience research, 1992. **33**(4): p. 505-512.
144. Sanchez, C., J. Diaz-Nido, and J. Avila, *Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function*. Progress in neurobiology, 2000. **61**(2): p. 133-168.
145. Sheetz, M.P., et al., *Mechanisms of trafficking in axons and dendrites: implications for development and neurodegeneration*. Progress in neurobiology, 1998. **55**(6): p. 577-594.
146. Snipes, G., et al., *Evidence for the coidentification of GAP-43, a growth-associated protein, and F1, a plasticity-associated protein*. Journal of Neuroscience, 1987. **7**(12): p. 4066-4075.
147. Grabczyk, E., et al., *Cloning and characterization of the rat gene encoding GAP-43*. European Journal of Neuroscience, 1990. **2**(10): p. 822-827.
148. Gispen, W., et al., *B-50/GAP-43 in neuronal development and repair*. Restorative neurology and neuroscience, 1990. **1**(3, 4): p. 237-244.

149. Woolf, C., et al., *The growth-associated protein GAP-43 appears in dorsal root ganglion cells and in the dorsal horn of the rat spinal cord following peripheral nerve injury*. Neuroscience, 1990. **34**(2): p. 465-478.
150. Mascaro, A.L.A., et al., *In vivo single branch axotomy induces GAP-43–dependent sprouting and synaptic remodeling in cerebellar cortex*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(26): p. 10824-10829.
151. Priyanka, C.a., *SEM Advantages and Disadvantages in Imaging Components*. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 6(5), 2017: p. 1877-1882. .
152. Choudhary, P.a.O.P., *Uses of TEM in Microscopy and its Advantages and Disadvantages*. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 7(05), 2018: p. 743-747.