

T.C
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakóltesi
Nöroşirurji Anabilim Dalı

**Deneyşel Olarak Ratlarda Oluşturulan
Periferik Sinir Yaralanmalarında Asiatik Asit'in
Rolünün İncelenmesi**

YAKUP ÇAĞLAROĞLU

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. HAKAN HADİ KADIOĞLU
DR.ÖĞRETİM ÜYESİ MEHMET HAKAN ŞAHİN

Bu araştırma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından TTU-2020-8514 kodlu proje olarak
desteklenmiştir.

ERZURUM-2021

TEŞEKKÜR

Anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Hakan Hadi Kadioğlu'na, tüm eğitimim boyunca ve tezimi hazırladığım süre zarfında bana yol gösterdiği ve öncülük ettiği için teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca klinik eğitimime emeklerinden dolayı anabilim dalımızın diğer öğretim üyelerine, özellikle asistanlık sürecimin ilk gününden son gününe kadar her zaman desteğini hissettiğim ve tez çalışması sürecinde yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Hakan Şahin'e, deney sürecinde de kliniğimizde olduğu gibi ekip çalışmasının hazzına vardığım değerli arkadaşlarım Dr. Ufuk Temtek ve Dr. Muhammet Elveren'e, tez çalışmamın başlangıcından bitimine dek her daim yol gösterici olan Tıbbi Farmakoloji ABD Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Zekai Halıcı ve Prof. Dr. Elif Çadircı'ya, deneyin biyokimyasal hazırlıklarında yardımını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya ABD Araştırma Görevlisi Dr. Halil İbrahim Özkan'a, patolojik spesmenlerin incelenmesinde yardımcı ve öğretici olan Tıbbi Patoloji ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sare Şipal'e, Histoloji ve Embriyoloji ABD Öğretim Üyesi Doç. Dr. Osman Nuri Keleş'e ve istatistiksel değerlendirmelerdeki hassasiyeti sayesinde elde ettiğimiz sonuçları ortaya çıkarmada pay sahibi olan İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi'nden Doç. Dr. Dilek Özdemir'e teşekkür ederim.

Tabi ki asistanlığımın her aşamasında gece gündüz bana desteklerini esirgemeyen aileme ve bu zorlu sürecin bana en büyük hediyesi sevgili eşim Dr. Merve Çağlaroğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Yakup Çağlaroğlu

Şubat 2021

ÖZET

Deneyisel Olarak Ratlarda Oluşturulan Periferik Sinir Yaralanmalarında Asiatik Asit'in Rolünün İncelenmesi

YAKUP ÇAĞLAR OĞLU, ERZURUM 2021

Amaç: Deneyisel olarak aksonotmezis ve nörotmezis tipi yaralanma modellerinde Asiatik Asit'in (AA) nöroprotektif ve rejeneratif etkileri histopatolojik, elektrofizyolojik ve klinik olarak incelendi.

Gereç ve Yöntem: 56 adet erkek Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan, yedi alt gruba ayrıldı. Grup1 (kontrol), Grup2A (aksonotmezis sonrası 28 gün oral serum fizyolojik verilen grup), Grup2B (aksonotmezis sonrası 10/mg/kg/gün x 28 gün oral AA tedavisi verilen grup), Grup2C (aksonotmezis sonrası 20/mg/kg/gün x 28 gün oral AA tedavisi verilen grup), Grup3A (nörotmezis sonrası oral serum fizyolojik verilen grup), Grup3B (nörotmezis sonrası 10/mg/kg/gün x 28 gün oral AA tedavisi verilen grup) ve Grup3C (nörotmezis sonrası 20/mg/kg/gün x 28 gün oral AA tedavisi verilen grup) olarak tanzim edildi. Fonksiyonel değerlendirme için yürüme testi, siyatik fonksiyon indeksi, ektansör postural thrust ve gastroknemius kası ağırlık indeksi parametrelerine bakıldı. Elektrofizyolojik değerlendirme için elektromyografi (EMG) yapıldı. Tüm gruplar 28.gün sonunda sakrifiye edildi. Siyatik sinirler ve gastroknemius kasları eksize edildi. Siyatik sinirler hemotoksilen-eozin ve toluidin mavisiyle, gastroknemius kası ise masson trikrom ile histopatolojik olarak boyandı. Siyatik sinirler; anti-TNF-alfa, anti-TGF-beta, anti-NGF ve anti-S100 ile immünohistokimyasal olarak da boyandı. Boyamalar sonrası preparatlar semikantitatif ve stereolojik yöntemlerle incelendi. Sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi.

Bulgular: Aksonotmezis ve nörotmezis yapılan gruplarda klinik, elektrofizyolojik ve histopatolojik olarak güncel literatür ile paralel patolojik bulgular elde edildi. AA verilen tüm grupların, ilaç verilmeyen travma gruplarına göre histopatolojik, klinik ve elektrofizyolojik değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi. Ayrıca tedavi grupları içerisindeki doz farklılıklarının histopatolojik iyileşmede istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü.

Sonuç: Analizler sonucunda oral asiatik asit verilen gruplarda; rejenere akson sayısı, miyelin formasyonu ve denerve kas atrofisinin restorasyonunda pozitif yönde anlamlı görüntüler tespit ve klinik testlerle teyit edildi. Bu nedenle asiatik asitin antiinflamatuvar, antioksidan ve nöroprotektif etkileriyle periferik sinir yaralanmalarının tedavisine katkılar sağlayacağı ve periferik sinir yaralanmalarının tedavisi için yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Asiatik asit, periferik sinir yaralanmaları, travma, sıçan modeli

ABSTRACT

Investigation of the Role of Asiatic Acid in Experimentally Created Peripheral Nerve Injuries in Rats

YAKUP ÇAĞLARÖĞLU, ERZURUM 2021

Objective: The neuroprotective and regenerative effects of Asiatic Acid (AA) were examined histopathologically, electrophysiologically and clinically in axonotmesis and neurotmesis type injury models experimentally.

Material and Method: 56 male Spraque-Dawley male rats were divided into seven subgroups. Group1 (control), Group2A (the group that received oral saline for 28 days after axonotmesis), Group2B (the group that received 10 / mg / kg / day x 28 days of oral AA treatment after axonotmesis), Group2C (the group that received 20 / mg / kg / day x 28 days of oral AA treatment after axonotmesis), Group3A (the group that received oral saline for 28 days after neurotmesis), Group3B (the group that received 10 / mg / kg / day x 28 days of oral AA treatment after neurotmesis) and Group3C (the group that received 20 / mg / kg / day x 28 days of oral AA treatment after neurotmesis). For functional evaluation; walking test, sciatic function index, extensor postural thrust and gastrocnemius muscle weight index parameters were measured. Electromyography (EMG) was performed for electrophysiological evaluation. All groups were sacrificed at the end of the 28th day. Sciatic nerves and gastrocnemius muscles were excised. Sciatic nerves were histopathologically stained with hemotoxylin-eosin and toluidin blue, and gastrocnemius muscle with masson trichrome. Sciatic nerves; It was also stained immunohistochemically with anti-TNF-alpha, anti-TGF-beta, anti-NGF and anti-S100. After staining, the preparations were examined by semi-quantitative and stereological methods. Results were analyzed statistically.

Results: Clinical, electrophysiological and histopathological pathological findings were obtained in parallel with the current literature in the groups that underwent axonotmesis and neurotmesis. It was observed that all groups given AA were statistically significant in histopathological, clinical and electrophysiological evaluation compared to the trauma groups that were not given medication. In addition, it was observed that the dose differences within the treatment groups did not make a statistically significant difference in histopathological improvement.

Conclusion: As a result of the analysis, in groups given oral asiatic acid; Significant positive images in the restoration of regenerated axon count, myelin formation and denervated muscle atrophy were detected and confirmed by clinical tests. Therefore, we believe that asiatic acid will contribute to the treatment of peripheral nerve injuries with its anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective effects and will shed light on other studies for the treatment of peripheral nerve injuries.

Keywords: Asiatic acid, peripheral nerve injuries, trauma, rat model

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
TABLOLAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	XI
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Temel Bilgiler.....	2
2.1.1. Periferik Sinir Sistemi Elemanları.....	2
2.1.1.1.Nöron.....	5
2.1.1.2.Dendrit.....	6
2.1.1.3.Akson.....	7
2.1.1.4.Schwann Hücresi ve Miyelin Kılıf.....	8
2.1.1.5.Periferik Sinir Bağ Dokusu.....	9
2.1.1.6. Vasküler Yapılar.....	10
2.1.2.Periferik Sinir Sistemi Fizyolojisi.....	11
2.2.Periferik Sinir Yaralanmaları.....	12
2.2.1.Periferik Sinir Yaralanmalarının Etyolojisi.....	12
2.2.1.1.İskemi.....	12
2.2.1.2.Travma.....	13
2.2.1.2.1.Kompresyon.....	13
2.2.1.2.2.Ezilme.....	14
2.2.1.2.3.Traksiyon.....	14
2.2.1.3.Kesici Cisimlerle Olan Yaralanmalar.....	15
2.2.1.4.Ateşli Silah Yaralanmaları.....	15
2.2.1.5. Termal Yaralanmalar.....	15
2.2.1.6. Elektrik Şoku.....	15
2.2.1.7. Enjeksiyon Yaralanması.....	16
2.2.1.8. Vibrasyon yaralanması.....	16
2.2.1.9.Radyasyon.....	17
2.2.2.Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması.....	17
2.2.2.1 Seddon Sınıflaması.....	17
2.2.2.1.1 Nöropraksi.....	17
2.2.2.1.2 Aksonotmezis.....	18

2.2.2.1.3 Nörotmezis.....	18
2.2.2.2 Sunderland Sınıflaması.....	18
2.2.3 Sinir Dejenerasyonunun ve Rejenerasyonunun Hücresel Temelleri	21
2.2.4.Sinir Rejenerasyonu Üzerine Etkili Faktörler.....	29
2.2.4.1. Büyüme Faktörleri ve Nerve Growth Factor (NGF).....	29
2.2.4.2. İnflamasyon ve Sitokinler (TNF- α ve TGF- β)	30
2.2.4.2.1 Tumor Necrosis Factor- alfa (TNF- α).....	32
2.2.4.2.2 Transforming Growth Factor-beta (TGF- β).....	34
2.2.4.3 Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler ve S100.....	35
2.3.Periferik Sinir Yaralanmalarında Deneysel Modeller.....	36
2.4. Periferik Sinir Yaralanmalarında Elektrodagnostik.....	38
2.5. Periferik Sinir Yaralanmalarının Tedavisinde Tarihsel Süreç.....	39
2.6.Sinir Rejenerasyonunda Farmakoterapi.....	39
2.7. Asiatik Asit'in Yapısı ve Etkileri.....	40
2.7.1.Centella Asiatica.....	40
2.7.2.Asiatik Asit.....	41
2.7.2.1. Asiatik Asitin Kanserde Kullanımı.....	41
2.7.2.2. Asiatik Asitin Karaciğer Hastalıklarında Kullanımı.....	42
2.7.2.3.Asiatik Asitin Apoptozisde Etkisi.....	42
2.7.2.4.Asiatik Asitin Diyabette Kullanımı	42
2.7.2.5.Asiatik Asitin Antiinflamatuvar Etkisi.....	43
2.7.2.6.Asiatik Asitin Osteoartritte Kullanımı.....	43
2.7.2.7.Asiatik Asitin Antioksidan ve Nöroprotektif Etkisi.....	44
2.7.2.8.Asiatik Asitin Parkinsonda Kullanımı.....	44
2.7.2.9.Asiatik Asitin Antiepileptik Etkisi.....	44
3)GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1.Denekler.....	45
3.2. Uygulama.....	47
3.2.1. Anestezi ve Genel Cerrahi.....	47
3.2.2. Sinir Yaralanması Oluşturma	49
3.2.2.1.Aksonotmezis Oluşturma Modeli: Klempleme Yöntemi.....	49
3.2.2.2. Nörotmezis Oluşturma Modeli ve Uç Uca Anastomoz yöntemi.....	50
3.2.3.Takip.....	51
3.2.4. Sakrifikasyon ve Numune Alma.....	52
3.3. Değerlendirme Yöntemleri.....	53

3.3.1 Fonksiyonel Değerlendirme.....	53
3.3.1.1 Yürüme Testi.....	53
3.3.1.2. Siyatik Fonksiyonel İndeks Hesaplanması.....	54
3.3.1.3 Basma Kuvveti Değerlendirmesi (Extensor Postural Thrust-EPT).....	55
3.3.1.4 Gastroknemius Kas Ağırlık İndeks Hesaplanması.....	56
3.3.2.Elektrofizyolojik Değerlendirme.....	57
3.3.3.Histopatolojik Değerlendirme.....	58
3.3.4.İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	60
3.3.5. İstatistiki Değerlendirme.....	61
4)BULGULAR.....	62
4.1. Genel Değerlendirme Bulguları.....	62
4.2.Fonksiyonel Değerlendirme Bulguları.....	63
4.2.1 Yürüme Testi Bulguları.....	63
4.2.2. Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFİ) Bulguları.....	64
4.2.3.Basma Kuvveti (Extensor Postural Thrust-EPT) Bulguları.....	66
4.2.4.Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi Bulguları.....	69
4.3. Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları.....	70
4.4. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları.....	74
4.4.1. Makroskopik bulgular.....	74
4.4.2. Hematoksilen&Eozin (H&E) Boyama Bulguları.....	74
4.4.3. Toluidin Blue Boyama Bulguları.....	78
4.4.3.1. Miyelinli Akson Yoğunluğu Bulguları.....	79
4.4.3.2. Miyelin Kılıf Kalınlığı Bulguları.....	81
4.4.3.3. Miyelinli Akson Çapı Bulguları.....	83
4.4.4. Masson Trichrome (MTC) Boyama Bulguları.....	84
4.4.4.1. Gastroknemius Kas Lif Çapı Bulguları.....	85
4.4.4.2. Kollajen Lif alan Yüzdesi Bulguları.....	86
4.4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	88
4.4.5.1.NGF İmmunohistokimyasal Bulguları.....	90
4.4.5.2. S100 İmmunohistokimyasal Bulguları.....	92
4.4.5.3.TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları.....	94
4.4.5.4. TGF- β İmmunohistokimyasal Boyama Bulguları.....	96
5)TARTIŞMA	98
6)SONUÇ VE ÖNERİLER.....	109
KAYNAKÇA.....	110

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Sinir Liflerinin İletim Hızı ve Kalınlıklarına Göre Sınıflandırılması.....	8
Tablo 2: Seddon ve Sunderland Sınıflamasının Karşılaştırılması.....	20
Tablo 3: Modifiye Histopatolojik Skolama (MHS) Kriterleri	60
Tablo 4: Düşük Ayak ve Ayak Sürüklenme Testi Verileri	64
Tablo 5: Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ) Verileri.....	65
Tablo 6: Gruplardaki Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ) Ortalama Değerleri	65
Tablo 7: Grup1 EPT (gr) Verileri.....	67
Tablo 8: Grup2 EPT (gr) Verileri.....	67
Tablo 9: Grup3 EPT (gr) Verileri.....	68
Tablo 10: Gruplardaki 28.gün EPT (gr) Ortalama Değerleri	68
Tablo 11: Gruplardaki Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi (%) Verileri.....	69
Tablo 12: Gruplardaki Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi (%) Ortalama Değerleri.....	70
Tablo 13: Grup1 Amplitüd Verileri (µV).....	72
Tablo 14: Grup2 Amplitüd Verileri (µV).....	72
Tablo 15: Grup3 Amplitüd Verileri (µV).....	73
Tablo 16: Grupların 28.gün Amplitüd (µV) Ortalama Değerleri	73
Tablo 17: Grup2 Deneklerin MHS Tablosuna Göre Değerlendirilmesi.....	76
Tablo 18: Grup2 Deneklerin MHS Tablosuna Göre Değerlendirilmesi.....	77
Tablo 19: Grupların Miyelinli Akson Yoğunluğu (n/µm ³) Verileri.....	80
Tablo 20: Grupların Miyelinli Akson Yoğunluğu (n/µm ³) Ortalama Değerleri.....	80
Tablo 21: Grupların Miyelin Kılıf Kalınlığı (µm) Verileri.....	82
Tablo 22: Grupların Miyelin Kılıf Kalınlığının (µm) Ortalama Değerleri.....	82
Tablo 23: Grupların Miyelinli Akson Çapı (µm) Verileri.....	83
Tablo 24: Grupların Miyelinli Akson Çaplarının (µm) Ortalama Değerleri.....	83
Tablo 25: Grupların Gastrokinemius Kas Lif Çapı (µm) Verileri.....	85
Tablo 26: Grupların Gastrokinemius Kas Lif Çaplarının (µm) Ortalama Değerleri.....	86
Tablo 27: Grupların Kollajen Lif alan Yüzdesi Verileri.....	87
Tablo 28: Grupların Kollajen Lif alan Yüzdesi Ortalama Değerleri.....	87
Tablo 29: Grup1 İmmunohistokimyasal Değerlendirme Verileri	89
Tablo 30: Grup2 İmmunohistokimyasal Değerlendirme Verileri	89
Tablo 31: Grup3 İmmunohistokimyasal Değerlendirme Verileri.....	89
Tablo 32: Grupların NGF İmmunreaktif Alan Yüzdesi	90
Tablo 33: Grupların NGF İmmunreaktif Alan Yüzdesinin Ortalama Değerleri.....	90
Tablo 34: Grupların S100 İmmunreaktif Alan Yüzdesi	92

Tablo 35: Grupların S100 İmmunreaktif Alan Yüzdesinin Ortalama Değerleri	92
Tablo 36: Grupların TNF- α İmmunreaktif Alan Yüzdesi	94
Tablo 37: Grupların TNF- α İmmunreaktif Alan Yüzdesinin Ortalama Değerleri.....	94
Tablo 38: Grupların TGF- β İmmunreaktif Alan Yüzdesi.....	96
Tablo 39: Grupların TGF- β İmmunreaktif Alan Yüzdesinin Ortalama Değerleri	96



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1: Periferik sinir anatomisi.....	3
Şekil 2: Periferik sinir oluşumu.....	5
Şekil 3: Motor nöron.....	6
Şekil 4: Periferik sinir hücresi.....	7
Şekil 5: Periferik sinirin vaskülarizasyonu.....	11
Şekil 6: Sunderland Sınıflaması.....	20
Şekil 7: Seddon Sınıflaması.....	21
Şekil 8: Wallerian dejenerasyonu ve akson rejenerasyonunun progresyonu.....	22
Şekil 9: Periferik sinir hasarı ve rejenerasyonu.....	26
Şekil 10: Aksonal yanlış yönlendirme	27
Şekil 11: TNF- α ve reseptörlerinin DRG'de dağılımının şematik sunumu.....	33
Şekil 12: Centella Asiatica bitkisi.....	40
Şekil 13: Deneyler için kullanılan ekipmanlardan bazıları.....	45
Şekil 14: Cerrahi işlem için gluteal ve uyluk lateral kısımları traş edilen denekler.....	47
Şekil 15: Anatomik olarak siyatik sinirin ortaya çıkarılması.....	48
Şekil 16: Bulldog klempe (Dietrich) ile aksonotmezis tipi yaralanma oluşturulması.....	49
Şekil 17: Aksonotmezis tipi yaralanma oluşturulan siyatik sinirin erken dönem görüntüsü.....	50
Şekil 18: Nörotmezis tipi yaralanma oluşturulan siyatik sinir.....	50
Şekil 19: Deneysel travma sonrası EMG kaydı alınması.....	51
Şekil 20: Postop 28.gün reeksplere edilen deneğin nörofizyolojik değerlendirmesi.....	52
Şekil 21: Deneklerin yok edildiği kül fırını.....	52
Şekil 22: SFİ hesaplanması için yürütülen deneklerin ayak izi dökümleri.....	53
Şekil 23: Walking Track analizi yapılan bazı deneklerin yürüme kayıt bantları	54
Şekil 24: Siyatik Fonksiyonel İndeksini hesaplamak için yapılan PL, TS, ITS ölçümleri.....	55
Şekil 25: Extensor Postural Thrust (EPT) ölçümü.....	55
Şekil 26: Gastrokinemius Kas İndeksi ölçümü için eksize edilen kaslar	56
Şekil 27: Grup2A deneklerinin bilateral çıkarılmış gastrokinemius kas örnekleri	56
Şekil 28: Deneylerde kullanılan EMG cihazı.....	57
Şekil 29: Siyatik sinire direkt uyarı verilerek alınan EMG kaydı	57
Şekil 30: Normal rat n.ischiadicus' unun uyarılması ile alınan ileti kaydı.....	58
Şekil 31: Postoperatif 28.gün reeksplere edilen siyatik sinir örneği.....	62
Şekil 32: Grup3A'daki deneğin sağ bacakta oluşan kas atrofisi.....	63
Şekil 33: Gruplara ait siyatik fonksiyon indeksinin (SFİ) karşılaştırmalı grafiği.....	65
Şekil 34: Gruplara ait 28.gün EPT (gr) karşılaştırmalı grafiği.....	68

Şekil 35: Gruplara ait gastrokinemius kas ağırlık indeksi (%) karşılaştırmalı grafiği.....	70
Şekil 36: Gruplara ait 28.gün amplitüdlerinin (μV) karşılaştırmalı grafiği.....	73
Şekil 37: Kontrol grubuna ait sağlam sinir lifleri, H&E, x200.....	74
Şekil 38: Grup2A'ya ait sinir lifleri, H&E	75
Şekil 39: Grup3A'ya ait Sinir dokusunda belirgin inflamasyon ve hasar bulguları, H&E.....	77
Şekil 40: Kontrol grubuna ait siyatik sinir kesiti, toluidin mavisi x200	78
Şekil 41: Grup3A' ya ait hasarlı sinir lifinde belirgin myelin kaybı, toluidin mavisi	79
Şekil 42: Grupların miyelinli akson sayısal yoğunluğunun ($n/\mu m^3$) karşılaştırmalı grafiği.....	81
Şekil 43: Grupların miyelin kılıf kalınlığının (μm) karşılaştırmalı grafiği.....	82
Şekil 44: Grupların miyelinli akson çapının (μm) karşılaştırmalı grafiği.....	84
Şekil 45: Kas gruplarında fibrozis değerlendirmesi MTC boyası x200.....	84
Şekil 46: Grupların gastrokinemius kas lifi çaplarının (μm) karşılaştırmalı grafiği.....	86
Şekil 47: Grupların kollajen lif alan yüzdelерinin karşılaştırmalı grafiği.....	87
Şekil 48: Grupların NGF İmmunreaktif alan yüzdesinin karşılaştırmalı grafiği.....	91
Şekil 49: NGF immünreaktivitesi.....	91
Şekil 50: Grupların S100 İmmunreaktif alan yüzdesinin karşılaştırmalı grafiği.....	93
Şekil 51: S100 immünreaktivitesi.....	93
Şekil 52: Grupların TNF- α İmmunreaktif alan yüzdesinin karşılaştırmalı grafiği.....	95
Şekil 53: TNF- α immünreaktivitesi	95
Şekil 54: Grupların TGF- β İmmunreaktif alan yüzdesinin karşılaştırmalı grafiği.....	97
Şekil 55: TGF- β immünreaktivitesi.....	97

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA: Asiatik Asit

AIF: Apopitoz İndükleyici Faktör

AKT: Protein Kinaz B

ANOVA: analysis of variance

AP-1: Aktivatör Protein-1

BCL-2: B cell CLL/Lenfoma 2

BDNF: Beyin Kaynaklı Büyüme Faktörü

CGRP: Kalsitonin Gen İlişkili Peptit

CNTF: Silyer Büyüme Faktörü

COX2: Siklooksijenaz-2

CREB: cAMP Yanıt Elemanı Bağlama Proteinini

CTGF: Bağ Dokusu Büyüme Faktörü

DRG:Dorsal Kök Ganglionları

EMG:Elektromyografi

EPT: Basma Kuvveti

ERK: Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

GAP-43: Büyüme İle İlişkili Protein-43

Gr: Gram

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

İL-1 β : İnterlökin-1 β

İL-6: İnterlökin-6

İL-8: İnterlökin-8

LOX: Lipoksijenaz

MAG: Myelinle İlişkili Glikoprotein

MAP-2: Mikrotübül İlişkili Protein-2

MAP-3: Mikrotübül İlişkili Protein-3

MAPK: Mitojen Aktive Protein Kinaz

MHS:Modifiye Histopatolojik Skarlama

MMP: Matriks metalloproteinaz

MSS (CNS): Merkezi Sinir Sistemi

NCS: Sinir İleti Çalışmaları

NF- κ B: Nükleer Faktör Kabba B

NGF: Sinir Büyüme Faktörü

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

NRF2: Nuclear Factor-like 2

NRG-1: Neuregülin-1

PGD2: Prostoglandin E2

PGE2: Prostoglandin E2

PI3K : Fosfatidilinositol 3-kinaz

PKC: Protein Kinaz-C

PSS (PNS): Periferik Sinir Sistemi

SC: Schwann Hücresi

SFI: Siyatik Fonksiyon İndeksi

SGC: Satellit Glial Hücresi

STAT3: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TNF- α : Tümör Nekrotizan Faktör- α

WD: Wallerian Dejenerasyon

μ m: Mikrometre

μ m³: Mikrometreküp

μ V: Mikrovolt

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinir sistemi (PSS), merkezi sinir sistemi (MSS) ile nihai organlar arası her türlü duyusal, motor, endokrin iletişimin ve koordinasyonun sağlandığı çok gelişmiş bir ağıdır. Bu sistemde meydana gelebilecek bir hasar canlı organizma için ciddi kayıplara yol açabilir. Periferik sinir yaralanmalarının etyolojisinde; travma, ezilme, bası, laserasyon, gerilme ve kimyasallar gibi bir takım sebepler vardır [1, 2].

Periferik sinir hücresinin; wallerian dejenerasyon, aksonal dejenerasyon ve segmental demiyelinizasyon olmak üzere yaralanma tipleri mevcuttur. Sinir lifi travma sonrası hücreden ayrı kalan kısımda morfolojik, kimyasal ve fonksiyonel olarak gelişen değişikliklerin tümüne sinir dejenerasyonu denir. Sinirde meydana gelen bu değişikliklere wallerian dejenerasyon (WD) adı verilir. WD'ye uğramış bir sinirin iyileşip normal fonksiyonunu kazanmasına rejenerasyon denir [3].

Periferik sinir yaralanmaları Seddon ve Sunderland tarafından, periferik sinirin anatomisi, nöral elementler ve konnektif doku hasarı göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. Seddon 1943 yılında periferik sinir yaralanmalarını, nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak periferik sinir akut veya kronik travmaya uğradığında üç farklı derecedeki lezyona göre sınıflamıştır. Daha sonra 1951 yılında Sunderland, bu sınıflamayı yaralanmanın şiddetine göre beş dereceye ayırmıştır. Sunderland sınıflamasında Seddon sınıflamasından farklı olarak aksonotmezis kendi içinde üç ayrı gruba bölünmüştür. İlkinde akson etkilenmişken, perinöryum ve epinöryum sağlamdır. İkincisinde akson ve endonöral tüp devamlılığı bozulmuştur ama perinöryum ve fasiküller sağlamdır. Üçüncüsünde akson, endonöral tüp, perinöryum, fasikulusların devamlılığı bozulmuş ama epinöryum sağlamdır [4-6].

Wallerian dejenerasyonun da immün süreçte nötrofiller, makrofajlar ve T hücreleri de dahil olmak üzere çok sayıda immün hücrenin, patojenik süreçlere katkıda bulundukları sinir hasarını takiben yaralı bölgelere alındığı bilinmektedir. Periferik sinir yaralanmaları sonrası inflamatuvar sürecin tetiklenmesiyle oksidatif stresin artması ve inflamatuvar mediatörlerin salınımı artmaktadır.

Asiatik asit (AA) doğal bir pentasiklik triterpenoid olup geniş farmakolojik etkileri sayesinde oldukça umut vaat eden bir bileşiktir. Yapılan çalışmalarda AA' nın antioksidan, antienflamatuvar ve analjezik etkileri olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarda AA'nın NOS enziminin aktivitesini etkileyerek antiinflamatuvar ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzim aktivitelerini artırarak da antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür. Yine yapılan çalışmalar da NF-kB'nin 'downregülasyonu' ve MAPK fosforilasyonunun baskılanması ile NOS, COX2, İL-1b, İL-6 ve TNF-a ekspresyonunun inhibisyonu ile AA'nın antiinflamatuvar

etki gösterdiğini rapor edilmiştir [7-10]. Bir çalışmada ise nöroprotektif etkisini, beyinde kan-beyin bariyerini stabilize ederek ve mitokondriyal metabolizmayı düzenleyerek sağladığı gösterilmiştir [11].

Ayrıca spinal kord hasarında ise lipit peroksidasyonu azalttığı ve çeşitli proinflatuar sitokinleri azaltarak motor fonksiyonlarda iyileşme sağlandığı gösterilmiştir [12]. Antiinflatuar, analjezik ve nöroprotektif etkisi olan asiatik asitin ratlarda periferik sinir yaralanması sonrası rolünü inceleyen araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Asiatik asitin periferik sinirde aksonotmezis ve nörotmezis tipi yaralanmalarda sinir rejenerasyonunda rolü ve katkısı ilk kez gösterilecektir. Çalışmamızda asiatik asitin dozlarını daha önceki çalışmalara göre belirledik[12]. Asiatik asit antiinflatuar, antioksidan, nöroprotektif ve analjezik etkilerinden dolayı periferik sinir yararlanmalarında muhtemel yeni katkılar sağlayacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Temel Bilgiler

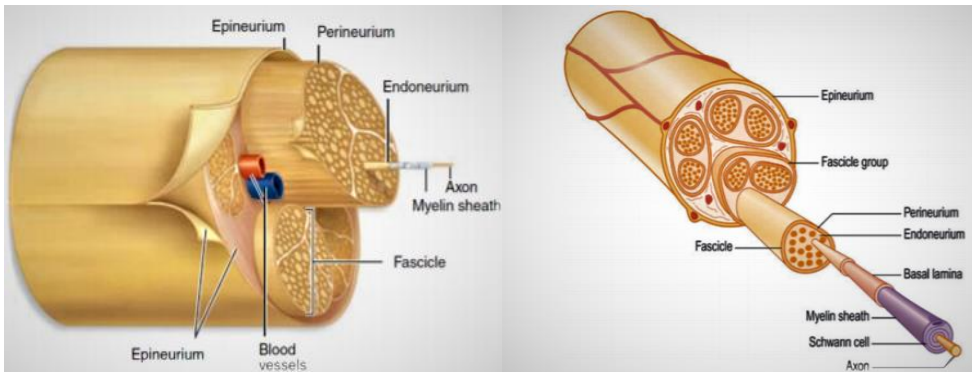
2.1.1. Periferik Sinir Sistemi Elemanları

Periferik sinirler çeşitli efektör organlar veya duysal sonlar ile santral sinir sistemi arasında çift yönlü uyarı iletimini sağlayan farklı nöron türlerinin aksonlarını içeren yapılardır. İskelet kası liflerini innerve eden motor nöronların hücre gövdeleri omuriliğin gri maddesinin ön boynuzlarındadır. Spinal kordun servikal ve lomber segmentlerdeki genişlemeleri üst ve alt uzuvların büyük bölgelerinin uyarılmasını sağlayan noktalar. İlk duyu nöronları, anterior ve posterior köklerin bileşim noktasının hemen proksimalinde ve intervertebral foraminada yerleşen dorsal kök ganglionlarında bulunur. Periferik sinirler motor, duysal ve sempatik sinirden liflerinden oluşur. Bir sinir lifi sinirin merkezi bir çekirdek, akson ve SC'leri içeren iletken birimdir. Bazı sinir lifleri miyelin kılıf ile çevriliyken diğerleri bu miyelin kılıfı içermez [13-16].

Aksonlar mitokondri, nörofilamentler, endoplazmik retikulum, mikrotübüller ve yoğun parçacıkları içerirler. Aksonlar sırasıyla omurilikte yerleşik uygun nöronal hücre gövdelerinden, DRG'den veya otonomik gangliyondan köken alır. SC'ler periferik sinir sisteminin glial hücreleridir ve aksonun uzunluğu boyunca uzanırlar. Sağlıklı periferik sinirlerde, büyük ve küçük farklı çapta sinir lifleri vardır. Sadece büyük lifler segmental lipoprotein ile çevrilidir ya da miyelin ile kaplıdır. Bu durumda, komşu SC'nin membranları bir akson segmenti etrafında eş merkezli olarak sarılır. Komşu SC' ler arasındaki küçük alan "Ranvier düğümü" olarak bilinir.

Ranvier düğümü bir sinir lifinin aksoplazması ile hücreler arası boşluk arasında iyonik değişimlere izin verir ve sinir aksiyon potansiyellerinin saltatuar iletimi sağlar, herhangi bir düğümden diğerine atlar ve hızlı sinyal iletiminin temelini oluşturur. Küçük ve daha az miyelinli lifler genellikle etrafını lipoprotein bir kılıf sarmayan SC'nin zarı tarafından gruplandırılır ve sarılır (Remak demetleri). Bu liflerin saltatuar iletim için yapısal kapasitesi yoktur ve sinir uyarıları akson boyunca yavaşça iletir. SC aksonlara sadece miyelin ve bazal membran sağlamakla kalmaz, komşu aksonun bakımını destekleyen trofik ve büyüme faktörlerinin kaynağı olur.

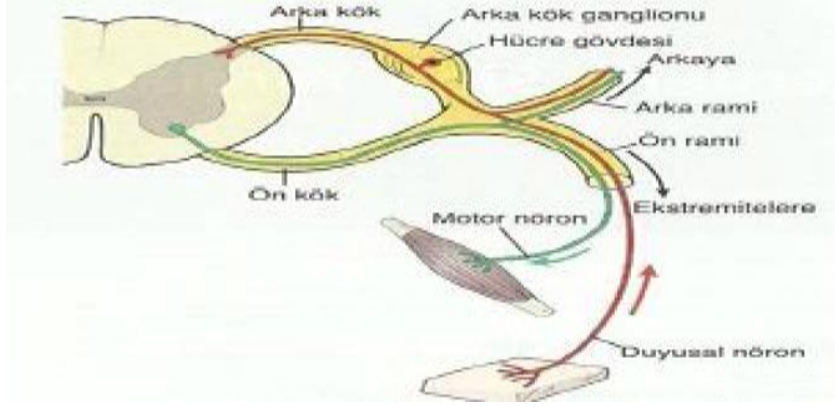
Sinir lifleri için destekleyici çerçeve oluşturan bağ dokusu interfasiküler endonuryumdur. Perinöryal hücrelerden ince bir kılıf özelleşir ve perinöryum adını alır. Perinöryum bir demet sinir lifini sarar ve fasikül yapısını oluşturur. Endonöryum, ağırlıklı olarak longitudinal dizilişli küçük çaplı kolajen fibrillerin bir matriksidir. Sıkı kavşaklara sahip mikro damarlar bu yapıda bulunur ve bu kapillere bitişik doku muhtemelen bir kan siniri bariyeri olarak endonöryal dokunun kendisine hizmet eder [13, 17]. Perinöryum, oblik, sirküler ve longitudinal kollajen fibrillerden oluşur perinöral hücreler arasında dağılır. Perinöryumun dış lamelleri moleküler transportta rol oynayabilecek yüksek bir endositotik vezikül yoğunluğuna sahiptir (ör. Glikoz). İç lameller bitişik perinöral hücreler arasında makromoleküllerin hücreler arası taşınmasını engelleyebilen sıkı bağlantılara sahiptir ve kan-sinir bariyerine çok önemli katkıda bulunur [18]. Perinöryum kesintisi çevrelediği aksonların işlevini etkileyebilir. Perinöryum sinir için ana gerilme mukavemeti kaynağıdır. Epinöryum, tüm siniri gövdesinin kaplayan bağ dokusunu temsil eder. Epinöryum ve çevresindeki doku arasındaki katmana paranöryum denir. Aksoplazma; proteinler, nörofilamentler ve mikrotübüller dahil sitoskeletal elementleri içerir. Aksoplazma, aksonal transport mekanizmaları tarafından sürekli olarak inşa edilir ve sürdürülür [19].



Şekil 1: Periferik sinir anatomisi [20, 21]

Periferik sinirlerin kan ihtiyacını epinöryuma, perinöryuma ve endonöryuma giden küçük damarları karşılar. Normal sinir dokusu ciddi derecede intrinsik kan takviyesine bağımlıdır. İntrinsik damarlar, bileşiklerin difüzyonu ve ekstrüzyonuna yardımcı olmak için sıkı bağlantılar içeren endotelial hücrelere sahip damarlar istisna olmak üzere diğer damarlara benzer. İntrinsik kan ihtiyacı rejenerasyon sırasında çok önemlidir, çünkü kan siniri bariyer yaralanma sırasında birkaç gün içinde sinir boyunca düzgün bir şekilde parçalanır. Büyüme faktörleri ve bağışıklık hücreleri gibi büyük moleküllerin karşıya geçip, endonöral boşluğa girmesine yol açar. Ekstrinsik kan tedarik sistemi segmental olarak düzenlenmiş ve boyut olarak değişen damarlardan oluşur ve genellikle komşu büyük arterlerden ve venlerden kaynaklanır. Bu besleyici damarlar epinöryuma ulaştığında epinöryum içinde dallara ayrılır, inen ve çıkan dallar arasında bulunan intranöral pleksusu besler [19].

PSS, çevre ile MSS arasında bağlantıyı sağlayan sistem görevi görmektedir. PSS çevreden gelen uyarıları MSS' ye, merkezden gelen uyarı ve yanıtları da son organa iletmekle görevlidir. Üç tip periferik sinir vardır. Bunlar; duyu, motor ve otonom olarak ayrılabilir. Medulla spinalisin ön boynuzunda motor sinirlerin hücre gövdeleri bulunmaktadır. DRG'lerde duyu sinirlerinin hücre gövdeleri vardır. Motor iletiler omurilik ön boynuz hücrelerinden periferiye uzanarak iletilirler. Afferent liflerle alınan duyu iletileri DRG'ye oradan da arka boynuza gelerek merkezi sinir sistemine iletilir. Omurilik ön boynuzunda yerleşmiş ikinci motor nöronların aksonları ön kökten omuriliği terk ederler ve periferik motor sinir liflerini oluştururlar. Periferik duysal sinir liflerinin gövdeleri ise omuriliğin dışında, intervertebral foramende yerleşimli DRG içindedir. Bipolar duysal nöronların periferik uzantıları periferik sinir içinde yer alırken, santral uzantıları arka kök yoluyla omuriliğe girerler. Spinal sinirler arka (dorsal rami) ve ön (ventral rami) dallara ayrılırlar. Arka dallar, omurganın üzerindeki cildin duyusunu ve paraspinal kasların innervasyonunu sağlar. Ön dallar ise göğüste interkostal sinirleri oluştururken, boyunda ve ekstremitelerde servikal, brakiyal ve lumbosakral pleksusları oluşturur. Brakiyal pleksusu oluşturan sinir lifleri üst, orta ve alt trunkusları yapar. Bunlar daha sonra anterior ve posterior divizyonlar halinde devam eder ve sonunda lateral, posterior ve medyal kordlar olarak son bulur. Kordlardan üst ekstremitenin periferik sinirleri çıkarlar. Alt ekstremitede ise lomber ve sakral pleksus net bir ayrım göstermediği için lumbosakral pleksus olarak birlikte anılırlar. Lumbosakral pleksus dorsal ve ventral dallara ayrılır. Daha sonra periferik sinirleri oluşturur [4, 22]. Duyu lifleri içeren dorsal spinal köklerin ve motor lifler içeren ventral spinal köklerin birleşmesinden periferik sinirler oluşmaktadır [23].



Şekil 2: Periferik sinir oluşumu [24]

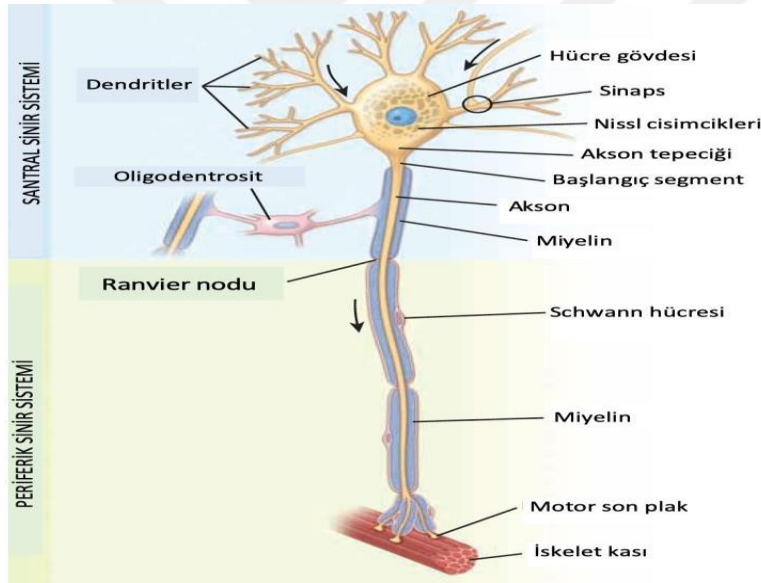
PSS omurilikten aldığı iletileri uygun yerlere iletir ve vücudun belirli bölgelerinden aldığı iletileri spinal korda ulaştırır. MSS’de bulunan 12 çift kranyal sinir ve spinal kort kökenli 31 çift spinal sinir PSS’yi oluşturan yapılardır. Periferik sinir sisteminin iki çeşit motor lif yapısı bulunur. Bunlar, iskelet kaslarında sonlanan somatik motor lifler ile düz kas, kalp kası ve bez yapılarında sonlanan otonomik liflerdir.

Periferik sinir sistemini oluşturan sinir hücresi, perikaryon denilen bir gövde ile akson ve dendrit adı verilen uzantılardan oluşur [4, 25].

2.1.1.1.Nöron

Nöron, soma veya perikaryon olarak bilinen hücre gövdesi; bir veya birden fazla dendritik çıkıntılardan ve bir adet aksonal çıkıntıdan 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 görüntülendiğinde 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 sitoskeletal bileşenleri nörofilament, mikroflament ve nörotübüllerden oluşur. Mikroflamentlerin yapısını, çoğunlukla akson ve dendrit hücre membranlarının plasmalemmadaki hareketinden sorumlu filamentöz aktin oluşturur. Nöroflamentler ise akson ve dendritlerin rejenerasyon ve gelişimini destekler. Stoplazmada ve dendritlerdeki MAP-2 (microtubule associated protein-2), aksondaki MAP-3 (microtubule associated protein-3) gibi mikroflamentler, hücre şeklini korumak için iskelet benzeri yapı sergilerken, somadan gelen materyallerin taşınmasında da yardımcıdır [26]. GAP-43 (growth-associated protein-43), sinir rejenerasyonu esnasında büyüme konisinin yüksek aktivitesiyle eksprese edilen mikrotübüller bir proteindir [27]. Birbirleriyle bağlantılarını dendrit denen sitoplazmik

uzantılar aracılığı ile sağlarlar. Dendritler reseptör görevi görürler. Çevreden gelen uyarıları hücre gövdesine iletirler. Sinir hücrelerinin perifer ile iletişimini sağlayan uzantı ise aksondur. Genellikle her bir sinir hücresinin çok sayıda dendriti olmasına rağmen, tek bir aksonu vardır. Aksonlar, hücre gövde çapının binlerce katı kadar uzunlukta perifere uzanım gösterebilirler. Nöronda metabolik olaylar gövde kısmında gerçekleşir. Gövde, sinir liflerinin beslenmesini, korunmasını ve devamlılığını sağlayan yapıdır. Nükleus, nükleolus ve Nissl cisimciklerini (ribozomlu-granüllü endoplazmik retikulum) içerir. Nissl cisimcikleri protein sentezinden sorumlu olan kısımdır ve sinir rejenerasyonu gibi metabolik aktivitenin arttığı durumlarda artış gösterir [28]. Sitoplazma içerisinde bulunan önemli bir yapı da nörofibrillerdir. Nörofibriller nörotübül ve nörofilamentlerden oluşur. Dendrit ve aksonların sonlarına kadar uzanan bu yapılar metabolitlerin taşınmasında, hücre şeklinin korunması ve desteklenmesinde görev alırlar. Sinirin sağlıklı şekilde çalışması için gövde ile akson bütünlüğü şarttır. Bu bütünlük bozulduğu takdirde aksonda dejenerasyon meydana gelir [28, 29].



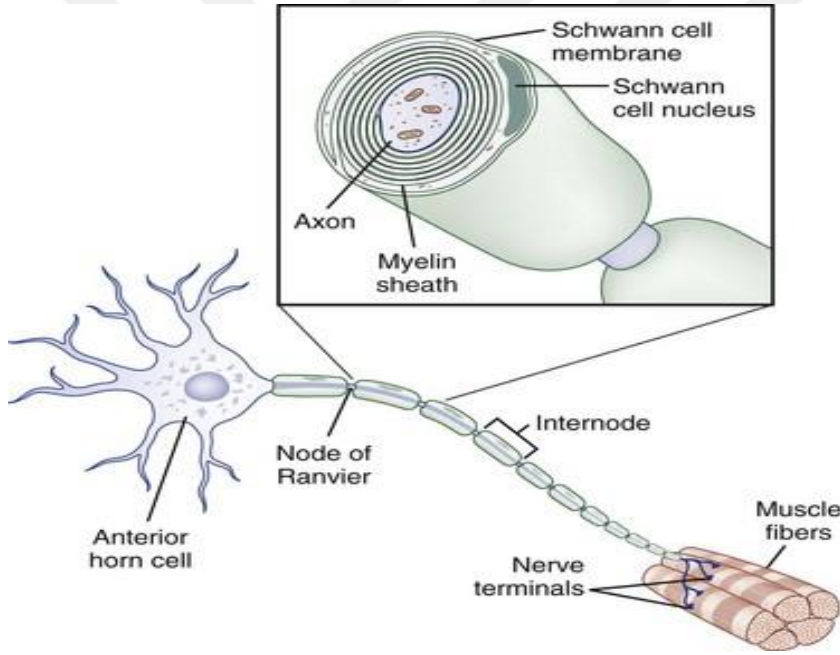
Şekil 3: Motor nöron [30]

2.1.1.2.Dendrit

Dendritler kısa, dallanma gösterebilen, endoplazmik retikulum ve veziküllerin bulunduğu, impulsları özelleşmiş reseptörleriyle alarak hücre gövdesine aktaran yapılardır. Fazla sayıda dallanma gösterebildikleri için bir çok farklı kaynaktan eş zamanlı bilgi transferi yapabilirler [26].

2.1.1.3.Akson

Sinir hücrelerinin gövdelerinden hedef organlara doğru uzatmış oldukları aksoplazmik uzantılar akson adını alırlar. Aksonlar miyelinli veya miyelinsiz olabilirler. Miyelinsiz aksonlar SC membranlarının invajinasyonlarıyla parsiyel olarak sarılmış iken miyelinli aksonlar, spiral şekilde düzenlenmiş SC membranlarının konsantrik şekilde kompakt hal alması ile oluşmaktadır. Miyelin örtüleri arasında bulunan ranvier düğümlerine kadar olan akson kısmında iletim iyon akışı ile sağlanırken; düğümler seviyesinde bu iyon akışı, elektriksel aksiyon potansiyeline dönüşerek ilerler. İletim bu bölgelerde atlayıcı olarak ilerlemektedir. Bu sebeplerle insanlarda miyelinli bir sinir hücresinde ileti hızı, miyelinsiz hücelere kıyasla kat kat daha fazladır. Aksoplazma; hücre iskeleti elemanları, mitokondri, endoplazmik retikulum ve ribozom gibi yapısal fonksiyonlardan sorumlu organelleri içerir [31].



Şekil 4: Periferik sinir hücresi [32]

Aksonlar sinirsel uyarıyı hedef dokuya aksiyon potansiyeli olarak taşır. Akson, nöronun gövdesinden çıkan lifsi uzantı şeklinde olup, yüksek fosfolipid içeriği olan ve istirahat potansiyelinin devamlılığını sağlayabilecek özelliklere sahip üç katlı aksolemma ile çevrilidir [28]. Akson içindeki sitoplazmaya aksoplazma denir. Aksoplazmada yapısal bütünlüğün devamının sağlanmasında ve aksonal iletimde önem olan mikrotübül ve mikroflamanlar bulunur [33].

2.1.1.4.Schwann Hücresi ve Miyelin Kılıf

SC'ler aksonların etrafının ince bir myelin tabakasıyla sarılarak hızlı ve saltatorik aksiyon potansiyellerinin oluşumunu sağlayan PSS'nin glial hücreleridir [34, 35]. SC'ler nöral krestten türetilmiş SC öncülerinden kaynaklanır [36]. SC biyolojisinin neredeyse tüm basamakları ana düzenleyici neuregulin-1 (NRG1) tarafından yönetilir [35, 37]. Prekürsör hücreler bazal laminalı immatür SC'lere dönüşür, bir otokrin hayatta kalma döngüsü edinir ve akson demetlerini çevreler [34, 35].

Akson miyelinizasyonu hızlı saltatorik impuls iletimi elde etmek için zaruridir. Bu olağanüstü çok katmanlı miyelin kılıf yapısı periferik sinir sisteminde SC'ler gibi özelleşmiş glial hücrelerin plazma zarının büyük kalibreli aksonların etrafında sarılmasıyla oluşur. Bu nedenle miyelin kılıfın bozulması yahut malformasyonu skleroz, lökodistrofiler ve periferik nöropati gibi nörolojik hastalıkların ortaya çıkmasına yol açar [35, 38]. Miyelin oluşumu, gelişimi, yaralanmadan sonra miyelin bakımı ve remiyelinizasyon hastalık etiyolojisini anlamak için temel oluşturur. Hastalıklarda miyelin hasarından sonra neredeyse her zaman akson hasarı gözlenir ve bu durum bozulmuş glia-akson sinyalizasyonunu düşündürür [35, 39]. Aksonal sinyaller SC'lerin hayatta kalma , proliferasyon ve migrasyonu için çok kritiktir ve dahası aksonlar miyelinli ve miyelinsiz farklılaşmayı belirlerler [34, 35]. Miyelinli sinirlerde ileti hızı daha yüksektir. [40]. Sinir lifleri ileti hızları ve çaplarına göre ayrımı aşağıda gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1:Sinir Liflerinin İletim Hızı ve Kalınlıklarına Göre Sınıflandırılması [29]

Lif Tipi	İletim Hızı(m/sn)	Lif çapı(μm)	Fonksiyon	Miyelin
A Lifleri				
Alfa	30-120	6-22	Motor	Var
Beta	30-120	6-22	Dokunma, propriyosepsiyon	Var
Gama	15-35	3-8	Kas tonusu	Var
Delta	5-30	1-4	Acı, soğuk, sıcaklık dokunma	Var
B Lifleri	3-15	1-3	Çeşitli otonom fonksiyonlar	Var
C Lifleri	0.1-2	0.3-1.3	Çeşitli otonom fonksiyonlar, acı, sıcak, sıcaklık, dokunma	Yok

2.1.1.5.Periferik Sinir Bağ Dokusu

Periferik sinirler, aksonları çevreleyen endonöryum, fasikülleri çevreleyen perinöryum ve siniri dışardan sınırlayan epinöryum tarafından sarılmıştır.

Epinöryum, uni ve multifasiküler sinirlerin fasiküllerinin perinöryal kılıfını çevreleyen gevşek bağ dokularının yoğunlaşmasıdır. Epinöryum tip 1ve tip 3 kollajen liflerden, elastik liflerden, fibroblastlardan ve değişen oranlarda yağ dokusundan oluşur. 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, epinöral bağ dokusunun daha fazla oranda mevcut olduğu görülür. Kollajen demetleri epinöryum boyunca dağılmıştır. Epinöryum çapları sinire, kişiye, bulunduğu yere göre değişir. Sinir dallara ayrılıp fasikül oluşturarak daha küçük bir hal aldığında, epinöryum da kısa izlenir. Birkaç fasikülden oluşan periferik sinirlerde arter, ven ve lenfatikler epinöryum içinde sinire paralel seyrederek. Bu damarların tıkanması ya da inflamasyonuyla seyreden hastalıklarda sinir hasarının en önemli sebebidir. Vasa nervorum epinöryuma çeşitli seviyelerde girer. Sinire girerken, bu damarlar arteriol ve venüllerle karmaşık bir anastomoz yapar. 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 [41, 42].

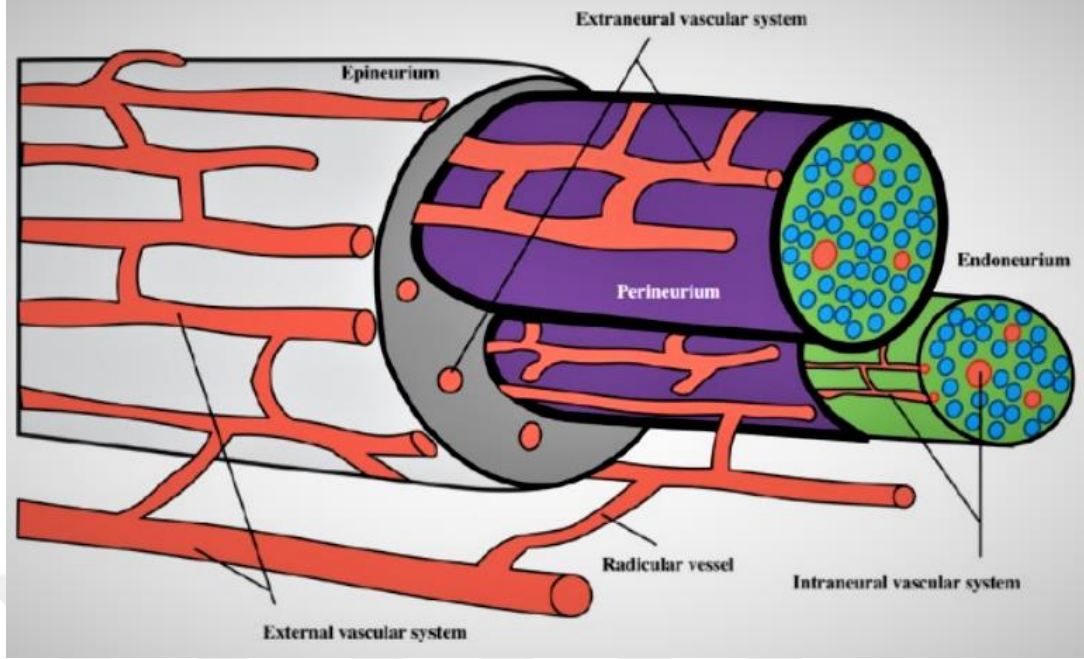
Perinöryum, her bir fasikülü saran sıkı ve kuvvetli bir bağ dokusudur. Kollajen tabakaları tarafından ayrılan düzleşmiş hücrelerin konsantrik dizilimleriyle oluşmuştur [43]. Perinöryum hem somatik hem de periferik otonomik sinirler ve onların gangliyonları için bir örtü oluşturur. Perinöral hücreler bazal laminanın her iki tarafında boşluklu bir yapı oluşturacak şekilde bulunmaktadır. Perinöral hücreler ekstraselüler boşluğun oblitere olduğu alanlarda sıkı bağlantılarla bağlıdır. Arteriol ve venüller arasındaki longitudinal bağlantıları olan kan damarları perinöryuma girer [41]. Periferik sinirlerdeki epinöral kılıf, spinal sinirlerdeki dura mater ile devamlılık göstermektedir. Perinöryum ise pia-araknoid ile devamlılık göstermektedir. Endonöral yapıları koruyan mekanik bir bariyer görevi yapar. Yassı perinöral hücreler tarafından oluşturulmuş çok katlı bir tabakadır ve travmaya karşı asıl koruyucu olan yapıdır. Bunun yanı sıra kan-sinir bariyeri yapar. Bu bariyer esas olarak endonöral ortamın korunması ve regülasyonuna yöneliktir. Perinöryum travma ve iskemiye karşı dayanıklı olmasına karşın, bozulduğunda sinir iletimi doğrudan etkilenir [44]. Kan-sinir bariyeri, aksonlar için ortamın korunması açısından önemlidir. Kan-sinir bariyerinin temelini oluşturan sıkı bağlantılar, seçici geçirgenliği sağlamada iki farklı rol oynayan hücreler arası bağlantılardır. İlki moleküllerin sızmasını önlemek için komşu hücreleri bir tabaka ile

kapatan bir bariyer oluşturmak, diğeri ise plazma membranının apikal ve bazolateral bölgeleri arasında membran proteinlerinin difüzyonunu önlemektir. Crush yaralanmalarda kan-sinir bariyerinin bozulduğu, endonöral ödem geliştiği ve aşamalı olarak yaklaşık yedinci günde düzeldiği görülmüştür [45].

Endonöryum , tek bir aksonu saran dokunun en iç tabakasıdır. Sinir liflerinin gevşek bir bağ dokusu ile çevrili olduğu kattır. Bu tabakada; SC'ler, kollajen lifler, fibroblastlar, kapiller damarlar ve az sayıda mast hücreleri bulunmaktadır. Sinir yaralanması sonucu bariyerin bozulması ve endonöral damarlardaki geçirgenlik artışından mast hücreleri sorumludurlar. Mast hücrelerinden salınan enzimler miyelinitik aktivite sonucu demiyelinizasyona neden olurlar. Endonöryumdaki kollajen lifler, sinir liflerini ve çevresindeki Schwann hücrelerini iki farklı kılıf oluşturacak biçimde sararlar. Endonöral alan sinir fonksiyonu için en ideal ortamı sağlar ve bu yapının bozulduğu durumlarda endonöral içerik dışarı çıkarak sinir fonksiyonu bozulmuş olur [42] .

2.1.1.6. Vasküler Yapılar

Sinir hücrelerinde, normal fonksiyonların devamlılığı için aerobik metabolizmanın korunması ve yeterli oksijen desteğinin sağlanması önemlidir. Periferik sinirlerde uyarı iletimi ve aksonal transport için gerekli olan enerji; epinöryum, perinöryum ve endonöryum tabakalarındaki vasküler ağ sayesinde sağlanır [46]. Periferik sinirlerde ekstresek ve intrinsek olmak üzere, birbiriyle bağlantılı ancak fonksiyonel olarak birbirinden bağımsız iki ayrı vasküler sistem mevcuttur. Ekstresek sistem, sinirin dış yüzeyindeki gevşek bağ doku içerisinde bulunan damarlardan oluşur. Bu bölgeye vaza nervorum denilmektedir ve bu damarlar mezonöryum denen gevşek bağ doku kılıfı içerisinde seyretmektedirler. Vaza nervorumlar sinirlere yandaş seyreden damarlardan gelen besleyici dallardan oluşur. Bunun yanı sıra periosteal damarlar, kaslara giden perforan damarlardan da beslenirler. Mezonöryumdan seyreden damarlar bazı yerlerde mezonöryumu delerek intrinsek sistemle anastomozlar oluşturur. İntrensek sistem, endonöryum, perinöryum ve epinöryumda bulunan vasküler pleksuslardan oluşur [28, 29]. İnternal vasküler sistem, epinöryumdan (ekstranöral vasküler sistem) geçen, perinöryuma ulaşan ve nihayetinde endonöryuma (intranöral vasküler sistem) katılan uzunlamasına yönlendirilmiş perivasiküler damarlardan oluşur. (Şekil 5)



Şekil 5: Periferik sinirin vaskülarizasyonu [47, 48]

Epinöryumun yüzeysel ve derin katları içinde uzanan epinöral damarlar, her fasiküle besleyici dallar gönderir ve değişik seviyelerde perinöral pleksuslarla anastomoz yaparlar. Longitudinal uzanan perinöral damarlar, oblik olarak perinöryumun iç tabakasını delerek endonöral aralığa geçer ve endonöral vasküler pleksusu oluştururlar. Endonöral vasküler pleksus fasikülle boyunca anastomotik ağlar oluşturur. Bu şekilde sabit bir fasiküler kan akımı sağlanmış olur. Endonöral bölgedeki kan akımı perinöryum dış tabakalardaki sempatik innervasyon kontrolünün aksine, lokal perfüzyon basıncı ile dengelenir. Periferik sinirlerdeki vasküler yapılar, sinüzoidal ve kıvrımlıdır. Bu özellikleri sayesinde vasküler sistem gerilme tipi yaralanmalardan korunur [46, 49] .

2.1.2.Periferik Sinir Sistemi 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. Ortograd taşınım aksonun uzunluğu boyunca uzanan mikrotübüllerde gerçekleşir, dinein ve kinezin olmak üzere iki moleküler motora gereksinim gösterir. Ortograd taşınım hücre gövdesinden akson sonlanmalarına doğru hareket eder. Retrograd taşınım mikrotübüller boyunca 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. Sinir hücreleri elektriksel, kimyasal ve mekanik uyarılara yanıt verir. Miyelinli aksonlarda ileti saltatorik ileti şeklindeydir. Miyelinli aksonların, en hızlı miyelinsiz liflerden 50 kat daha hızlı iletim yapmasına imkan veren de bu süreçtir [50].

2.2.Periferik Sinir Yaralanmaları

Multitravma hastalarının yaklaşık olarak %2,8'inde periferik sinir yaralanması meydana gelir [51]. İnsidansı 1:1000 olup ve doku morbiditesiyle ve yaşam kalitesinin düşmesiyle sonuçlanır [52]. Direkt travma, kontüzyon, bası, iskemi, ısı, elektrik ve enjeksiyon uygulamaları gibi nedenler periferik sinir yaralanmalarının etiyolojisinde yer almaktadır [53, 54]. Fiziksel ajanlar nadiren anatomik olarak tek bir bölüme zarar verirler. Örneğin radyasyon sadece nöronu değil, sinirin hem dış hem i  dolaşımını hem de siniri  vreleyen dokuları etkiler. Keza tuzaklanma nöropatisi basit fokal bir kompresyondan çok daha fazlasıdır. Örneğin, dirsekte ulnar sinirin yahut birinci kosta düzeyinde brakial pleksusun alt dallarının traksiyonu sinir üzerinde sıkışmaya ve gerginliğe yol açar. Burada anoksiye yol açan kompresyon ve traksiyondur. Tabi mekanik deformasyon da vardır. Bu faktörler kombine olarak iskemi ve fokal demiyelinizasyon ile iletim bloğuna, daha sonra tedavi edilmeyenlerde dejenerasyon ve düzensiz rejenerasyona yol açar. Büyük eklemlerin artroplastisi sırasında yaygın ve ciddi sinir hasarı ortaya çıkabilir. Komple transeksiyon, konk zyon veya kompresyondan kaynaklanan geçici iletim bloğunu bir kenarıya koyarsak lezyon her zaman karmaşıktır; yani bazı lifler hasarlıyken bazı lifler sağlamdır. İletim bloğu veya uygun dejeneratif lezyon dışındakilerde iyileşme zordur. Bu nedenle nörofizyolojik araştırmalar lezyonun seviyesini ve derecesini belirlemede yardımcı olur ama prognozu güvenilir bir şekilde gösteremez [55].

2.2.1.Periferik Sinir Yaralanmalarının Etiyolojisi

2.2.1.1.İskemi

Akut iskeminin etkilerini diğer fiziksel ajanların etkilerden ayırmak zor olsa da tek başına iskeminin doku üzerine etkilerine örnekler vardır. Örneğin femoral embolektominin başarılı bir şekilde yapıldığı ancak şiddetli ağrıdaki azalmanın yetersiz olduğu bir olguda amputasyondan sonra alt ekstremitede incelenmiştir. Bu çalışmada kas enfarktüsü alanlarının olduğu ancak bunların uylukta sınırlı olduğu diz altındaki kasların renginin normal olduğu gösterilmiştir. Yine bacadaki sinirlerin  l , distalden geçen sinirlerin yumuşak ve gri

görünümde olduğu, alınan histopatolojik kesitlerde miyelin kılıflarının şiştiği ve epinöryumda sadece yetersiz bir hücrel reaksiyona sahip aksonların olduğunu gösterilmiştir [56]. Tamponata bağlı iskemi tipleri de vardır. En dramatik örnekler, spinal kordun infraktüsüdür. İnterskalen bloktan sonra ya da intervertebral foramina içine lokal anestezi ajanların enjeksiyonu sonrası olabilmektedir. Radiküler arterler boyunca akış sonucu, anterior spinal arter tıkanır, omurilik enfarktüsüne gider. Nörovasküler fasyal kompartmanlar içinde de akut kompresyon ve iskemi olabilir. Bu, kanamanın veya sıvının fasyal kompartmana infüzyonundan kaynaklanır. Fasyal kompartman sinir ve aksiyal damarları içerir, ancak kasları kapsamaz. Kasıktaki femoral sinir, önkoldaki ulnar sinir ve kasıkta tibial sinir özellikle risk altındaki sinirlerdir. Medial brakiyal fasyal kompartman sendromu muhtemelen aksiller blok sonrası olan infraklavikular pleksopatilerin ve ayrıca bu bölgedeki kapalı veya penetran travmalarından kaynaklanan nörovasküler yaralanmaların çoğundan sorumludur. Lezyonun ilerlemesi karakteristiktir: neredeyse her zaman ağrı disesteziye eşlik eder; takip eden kısa süre içinde his kaybı gelişir ve ardından 2-3 saat sonra felç ortaya çıkar [56].

Ödemli ve şişmiş kastan da akut kompresyon ile iskemi olabilir. Sinirler üzerindeki etki, nörovasküler kılıf içinde en az kompresyon vakalarında olduğu kadar hızlıdır. Üç saat içinde düzeltmeye verilen yanıt neredeyse her zaman memnuniyet vericidir ve bu düzeltmeden önceki gecikmenin sonuçları özellikle ağırdır. Sinirlerin vasküler düzenlemelerini sağlayan ana arterlerin yaralanmaları gibi durumlarda sinir nekrozundan daha fazla kas enfarktüsü oluşturma olasılığı vardır. 36 saat boyunca ciddi şekilde iskemik olan sinirlerde bile yeterli fonksiyon iyileşmesi görülebilir. Multi organ yetmezliği veya sepsis gelişen hastalarda nöropati gelişebilir. Ödemli ve şişmiş uzuvlar içinde sinir gövdelerinin yoğun bir şekilde sıkışmasının bu bozukluğa katkıda bulunması muhtemeldir [56]. İskemi traksiyondan da kaynaklanabilir. Bir sinir segmentinde %8'lik bir uzama vasküler akışkanlarda bozulmaya neden olabilmekte iken %10-15'lik bir uzama tüm kan akışını durdurabilmektedir. 30 dakika içinde gevşeme, çoğu durumda akış ve iletkenlik restorasyonunu sağlarken, artan hematoma üzerinde gerilen sinirlerde ciddi lezyonlara yol açabilmektedir [56].

2.2.1.2.Travma

2.2.1.2.1.Kompresyon

Bu tip yaralanmalar, sinirde ayrılma ve kopmanın olmadığı yaralanmaları içerir. Kompresyon sonucu kan akımı bozulur, mekanik kompresyon ve iskemiye bağlı hasar oluşur. Uzun ve ciddi bir iskemi yaygın aksonal hasara ve WD'ye neden olabilmektedir. Geri

dönüşümsüz hasar olması için kritik süre sekiz saattir [57]. Sıklıkla brakiyal pleksus, ulnar, siyatik ve peroneal sinirler etkilenir. Radial sinirin humerus tarafından kompresyonu sonucu meydana gelen iskemi cumartesi gecesi paralizisi adı verilen klinik ile sonuçlanabilir. Sıklıkla kendiliğinden geri dönüşümlüdür [5]. Ekstremiteye harici bir kuvvet uygulandığı zaman bilinçli bir hastada genellikle yol açtığı iletim bloğu kapalı kompresyon lezyonudur. Lezyon içerisinde iletim bloğundan çok daha ciddi kompresyon yaralanmaları olabilir. Daha uzun süreli kompresyon daha derin lezyonlara yol açar [56].

2.2.1.2.2.Ezilme

Ezilme yaralanmaları kompresyonun aşırı bir şekli olarak düşünülmesine rağmen klinik kanıtlar bundan çok daha fazlası olduğunu göstermektedir. Altta yatan sebep süratle iyileştirilmedikçe sinir lezyonu hızla nörotomezis olur. Bu durumun en uç örneklerinden biri ortopedik bir cerrahi esnasında sinirin sütürle çevrildiği zamanlardır. Bir siniri çevreleyen sütür bu siniri sadece boğmakla kalmaz aynı zamanda gerer. Bu durumda şiddetli ağrı olağandır ve gerilmiş sinir yoğun ağrıyı provoke eder [56].

2.2.1.2.3.Traksiyon

Periferik sinirlerin kollajen endonöryumları nedeniyle esnek bir yapıları vardır. Gerilme kuvvetinin sinirin esneme kapasitesini aştığı fraktürler veya luksasyonlar sonrası değişik derecelerde hasar meydana gelir. Sinir gerildiğinde ilk önce epinöryum, daha sonra fasiküller ve en son akson gerilir. İlk hasar gören yapı ise aksondur. Aşırı gerilmeler sonucu oluşan periferik sinir hasarlanmaları fibrozis ile iyileşir [5, 25, 58]. Periferik sinirin elastikiyetini aşan seviyelerde çekilme ılımlı nöropraksiden ciddi aksonotmezise kadar hasara neden olabilir. Cerrahi girişim sırasındaki ekartasyona bağlı çekilmeler genellikle iyi prognozlidir. Bu mekanizmadan en çok etkilenen sinirler brakiyal pleksus, radial ve peroneal sinirlerdir [29]. Omurilik kanalı dışındaki periferik sinirler önemli ölçüde gerilme mukavemetine sahiptir, ancak işlevleri %12 veya daha fazla uzama olursa zarar görür, uzama süresine göre hasar kapsamı değişir. Epinöryumun uzamasını fasiküller içinde sinir liflerinin irregüler dizilimi sağlar. Perinöryum rüptüründen önce sinir liflerine verilen hasar, ya nöropraksi ya da aksonotmezisidir. Çünkü endonöryal kılıflar ve Schwann lifleri bozulmadan kalır. Kapalı traksiyon lezyonunda epinöryum rüptürünü görmek yaygındır, ancak içindeki perinöryum gergin de olsa bozulmadan kalır. Bu yaralanmalar genellikle birkaç santimetreyi bulabilen epinöryuma kanama nedeniyle komplikedir. Ekstremitelerde traksiyon yaralanmalarında sinir yırtılır veya kastan avulsiye olur [56].

2.2.1.3. Kesici Cisimlerle Olan Yaralanmalar

Kesici ve delici alet yaralanmalarının bazı serilerde periferik sinir yaralanmaları içinde %30 oranında olduğu bildirilmiştir. Kolay yapılabildiğinden, deneysel yaralanma modeli olarak sık kullanılmaktadır. Tam kesi varsa uç uca onarılmalı, tam kesi olmayan yaralanmalarda en az 4 hafta çevre doku iyileşmesi için beklenmelidir. Eğer ezilme yaralanması ile beraberse nöral hasar fazladır. Bu yaralanmalarda hasta önce medikal tedavi ile izlenmelidir. Eğer 3-4 ay sonra beklenen gelişme olmazsa uygun cerrahi planlanmalıdır [5].

2.2.1.4. Ateşli Silah Yaralanmaları

Ateşli silah yaralanmasında hem merminin kitlesi hem de enerjisi hasara neden olur ve mermi yumuşak dokudan geçerken oluşan kavitasyon etkisiyle sinir hasarına neden olur [59].

2.2.1.5. Termal Yaralanmalar

Isı yaralanmalarına bağlı nöral hasar gelişebilir. Ciddi yanıklarda motor ve duysal kayıp oldukça ağır olabilir. Bu tip yaralanmalarda doku nekrozu ve enfeksiyon ekarte edildiği takdirde cerrahi girişim hemen uygulanmalıdır. Çevresel yanıklı hastalarda geç dönemde oluşan fibrozis, bası etkisi ile nöral hasara neden olabilir. Periferik sinirlerin elektrik hasarına karşı direnci düşüktür. Ciddi elektrik yanıklarında sinir gövdesinde geri dönüşümsüz hasar meydana gelebilmektedir [60, 61].

Soğğun sinirler üzerindeki etkileri de kapsamlı olarak araştırılmıştır. Donma hasarında yaşayan ve ölü doku arasında sıklıkla açık bir sınır hattı olan doku nekrozu vardır. WD bu yaralanmaların erken bir özelliğidir. Uzun süreli olarak soğğa maruz kalındığında iskemi ve reperfüzyon döngüsü içerisinde hem miyelinli hem de miyelsiz sinir liflerinde hasar oluşur [62]. Günümüzde termal yaralanmalara artroplasti sırasında polimere sementin sıcaklığıyla temel sinirlerin zarar görmesi durumu klinik olarak örnek gösterilebilir. Aşırı ısı sırasında diyatermi ile sinirler yok edilebilir. Alev yanıkları, sinirlerin ve bitişik dokuların geniş çapta fibrozuna neden olur. Çevreleyen eskarın acil insizyonu göz önünde bulundurulmalıdır [56].

2.2.1.6. Elektrik Şoku

Ciddi cilt ve derin doku yanıklarına yol açar ve sinirdeki hasarda çok yoğundur. Akım periferik sinirler boyunca santral hücreye gider ve burada hasar oluşturur ki bu da rejenerasyon şansını azaltır [5]. Elektrik yaralanması deriden dokulara geçen elektrik

akımından dolayı olan ark yanığıdır. Elektrik akımı dışarıdan vücuda oradan toprağa geçer. İkincil alev yanığı ise giysilerin tutuşmasıyla olur. Kendiliğinden iyileşme tahrip olmamış komşu dokulardan kan akımıyla meydana gelebilir. Elektrik kontağı kısa olduğunda çok az yanma olabilir, ancak elektrik akımı hücre zarlarının bozulmasına neden olur. Kas ve sinir hücreleri özellikle bu sürece duyarlıdır [56].

2.2.1.7. Enjeksiyon Yaralanması

Gluteal enjeksiyonlara bağlı siyatik sinir lezyonları, sağlık personeli uygun şekilde eğitilmiş olsa bile nadir değildir [63]. Bir iğne ucuyla perinörium lasere olabilir ve bilinci yerinde hastada şiddetli ağrıya yol açabilir. Bu ağrı şikayeti göz ardı edilirse ve orada sinir içine enjeksiyon yapılırsa sonuçları şiddetli olabilir. En sık etkilenen sinirler brakial pleksus, radyal sinir ve siyatik sinirdir. Genellikle, şiddetli lokal ve yayılan ağrının ortaya çıkması, ilacın sinire enjekte edildiğini düşündürür. Gecikmiş başlangıç muhtemelen sinir yakınına yapılmış enjeksiyondan kaynaklanır ve daha sonra difüzyondan dolayı olur. Zararlı enjeksiyonu genellikle epinöral fibrozis ve bazen de yoğun intranöral skar takip eder [56]. Yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki; hasar kimyasal ajanın epinöryuma ve daha ciddi hasarlar için endonörium veya fasikül içine nüfuzunu gerektirir [64]. Enjeksiyon hasarı, enjeksiyon yapılan bölgeye ve enjekte edilen farmakolojik ajanın nörotoksik etkisine bağlıdır. Temel patolojik mekanizma nekrozdur. Periferik sinire yapılacak bir enjeksiyonda akut gelişen ödem, inflamatuvar değişiklikler ve nekroz birlikte ortaya çıkar ve bağ dokusunu, aksonları ve miyelinini etkiler. Bağ dokusunda gelişen inflamatuvar reaksiyonlar fibrozis ve skarlaşma ile neticelenir. Skarın varlığı ise periferik sinirin rejenerasyonuna engel olur [4, 5, 64]. Tedavi amacıyla yapılan enjeksiyonlara bağlı yaralanmalar gelişmekte olan ülkelerde önemli bir yer tutar. Elektromyografi (EMG) çalışması ile cerrahiye karar verilmelidir [4, 25, 58, 65]. Eğitimsiz ve yetersiz kişilerin yaptığı intramusküler enjeksiyonlar insanlarda önemli sakatlanmalara ve hayat kalitesini bozan tablolara yol açabilmektedir [64].

2.2.1.8. Vibrasyon yaralanması

Elde tutulan titreşimli aletlerin düzenli kullanımı, el-kol vibrasyon sendromu diye isimlendirilen semptom kompleksine yol açabilmektedir. Sensorinöral, vazospastik veya her ikisinin kombinasyonu şeklinde semptom verebilir. Soğuk intoleransı sensorinöral semptomları olan hastaların yarısında ciddi bir semptomdur. Vibrasyon yaralanmalarının neticesini araştırmak üzere yapılan dorsal interosseöz sinir biyopsilerinde demiyelinizasyon, endonöral-perinöral fibrozis ve akson kaybı tespit edilmiştir [56].

2.2.1.9.Radyasyon

20 Gy'i aşan radyasyona maruz kalanlarda periferik sinirlerin hasar gördüğü tespit edilmiştir. Daha büyük sinir lifleri daha kötü etkilenirler. İlk değişiklikler akson içinde meydana gelir. Burada mikrotübüllerin ve nörofilamentlerin yoğunluğu artar [56]. Daha sonra akson, SC'ler ve miyelin kılıfı etkilenir. Neticede fibrozise yol açan vaskülit ile ilişkilidir ve etkisi ana damara kadar uzanabilir [62]. Bireysel varyasyonları olmakla beraber nöral doku tarafından tolere edilen radyasyon dozu, genel olarak toplam doza ve verildiği zaman periyoduna bağlıdır [56].

2.2.2.Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması

Periferik sinir yaralanmaları Seddon ve Sunderland tarafından, periferik sinirin anatomisi, nöral elementler ve konnektif doku hasarı göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. 70 yıldan daha uzun bir süre önce sinir lezyonları kompresyon, kontüzyon, laserasyon veya bölünme lezyonları olarak sınıflandırıldı. Seddon 1943'te sinir lifi ve sinir gövdesi patolojisine dayanarak periferik sinir yaralanmalarını üç kategoriye (nöropraksi, aksonotmesis ve nörotmesis) ayırdı. Daha sonra 1951 yılında ise Sunderland, bu sınıflamayı yaralanmanın şiddetine göre beş dereceye ayırmıştır [5, 58].

2.2.2.1 Seddon Sınıflaması

2.2.2.1.1 Nöropraksi

En basit travmayla sinirde anatomik bir bozulma olmadan meydana gelen fizyolojik iletim kaybıdır. Hafif hasar tipidir. Geçici, kısa süreli fonksiyon kaybı ve lokal iletim bloğu görülür. Periferik sinirde meydana gelen lezyon düzeldikten sonra sinirin fonksiyonları tam olarak 6-8 haftada geriye döner. Sıklıkla künt travma, çok uzun olmayan hafif derecede bası, çekilme bu duruma yol açabilir. Segmental demiyelinizasyon EMG ile tespit edilebilir [5, 58].

Brakiyal pleksus, radial, median, ulnar ve peroneal sinirler daha sık etkilenir. Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte birden çok mekanizma etkili olabilir. Geri dönüşlü yerel iletim kaybına iyon bozuklukları eşlik edebilmekle beraber, daha uzun süren fonksiyon kaybına segmental demiyelinizasyon ve diğer perinodal miyelin değişiklikleri neden olabilmektedir. Bu nedenle, 8-12 haftadan uzun süren fonksiyon kayıplarında daha ciddi travma araştırılmalıdır. Tanıda anamnez ve muayene esas olup genellikle cerrahi girişim gerekmez [66].

2.2.2.1.2 Aksonotmezis

Sinir çevresindeki mezenkimal yapılar olan perinöryum ve epinöryum korunarak, sinirin akson ve çevresindeki myelin kılıfta komplet kesilme olduğunda oluşan hasardır. Akson bazal membranı ile birlikte epinöryum, perinöryum ve endonöryum sağlamdır. Distal kısmında WD oluşur ve komplet denervasyona neden olur. Distal sinirde tam bir duyu, motor ve otonomik kayıp mevcuttur. İyileşme yeni miyelin kılıf oluşumu ve aksonal büyüme şeklinde olur [5, 58]. Aksonotmeziste motor, duysal ve otonom fonksiyonlar bozulur. EMG’de 2-3 hafta sonra denervasyon bulguları görünür. Endonöral tüpler sağlam kaldığı için rejenerasyon kendiliğinden başlar. Fonksiyonda geri dönüşüm hastanın yaşına ve yaralanmanın merkezden uzaklığına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Anamnez, fizik muayene ve elektrofizyolojik tetkiklerle tanı koyulur. Bu tip yaralanmalar kırıklarda, orta dereceli çekilme, bası veya enjeksiyon yaralanmasına bağlı olarak da görülebilmektedir [29, 67].

2.2.2.1.3 Nörotmezis

Sinirin nöral ve destek dokusuyla birlikte tam anatomik kesidir. Çok seyrek olarak sinirin devamlılığı olabilir, ancak bu durumlarda da nöral hasar çok fazla olduğundan bunlar da nörotmezis olarak değerlendirilir. Yaralanma sonrası lezyonun distalinde tam duysal, motor ve otonomik kayıp mevcuttur. İyileşme sırasında proksimal uçta nöroma oluşur. Cerrahi müdahale olmaksızın iyileşme söz konusu değildir. Çünkü, aksonların yeniden uzaması için klavuzluk edecek mezenşimal doku kaybı olmuş ve skar dokusu oluşmuştur. Nörotmeziste fonksiyonların düzelmesi; hastanın yaşına, paralizisi süresine, yaralanmanın seviyesine, sinirin tipine ve cerrahi zamanlamaya bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [5, 58] (Şekil 6,7) (Tablo 2).

2.2.2.2 Sunderland Sınıflaması

Seddon sınıflamasından farklı olarak, Sunderland periferik sinir yaralanmalarını beş dereceye ayırmıştır (Şekil 6).

GRADE-1: Bu tip lezyonda yaralanma bölgesinde iletimin kesilmesi söz konusudur. Bu nedenle, bu lezyon derecesi Seddon sınıflandırmasındaki nöropraksiye karşılık gelir. Fokal bir demiyelinizasyon ile karakterizedir fakat WD görülmez. Miyelin kılıfın yeniden düzenlenmesi 3-4 hafta sürer. Bu süreden sonra sinir işlevi normale dönebilir. Kısmi hasarlanmalarda motor fonksiyon daha çok etkilenir. Duysal fonksiyonlarda ise kalın miyelinize sinirler daha çok etkilenir. Elektromyelografide yaralanma bölgesinde iletim bloğu mevcut olup, distal iletim olağandır [5, 18, 68].

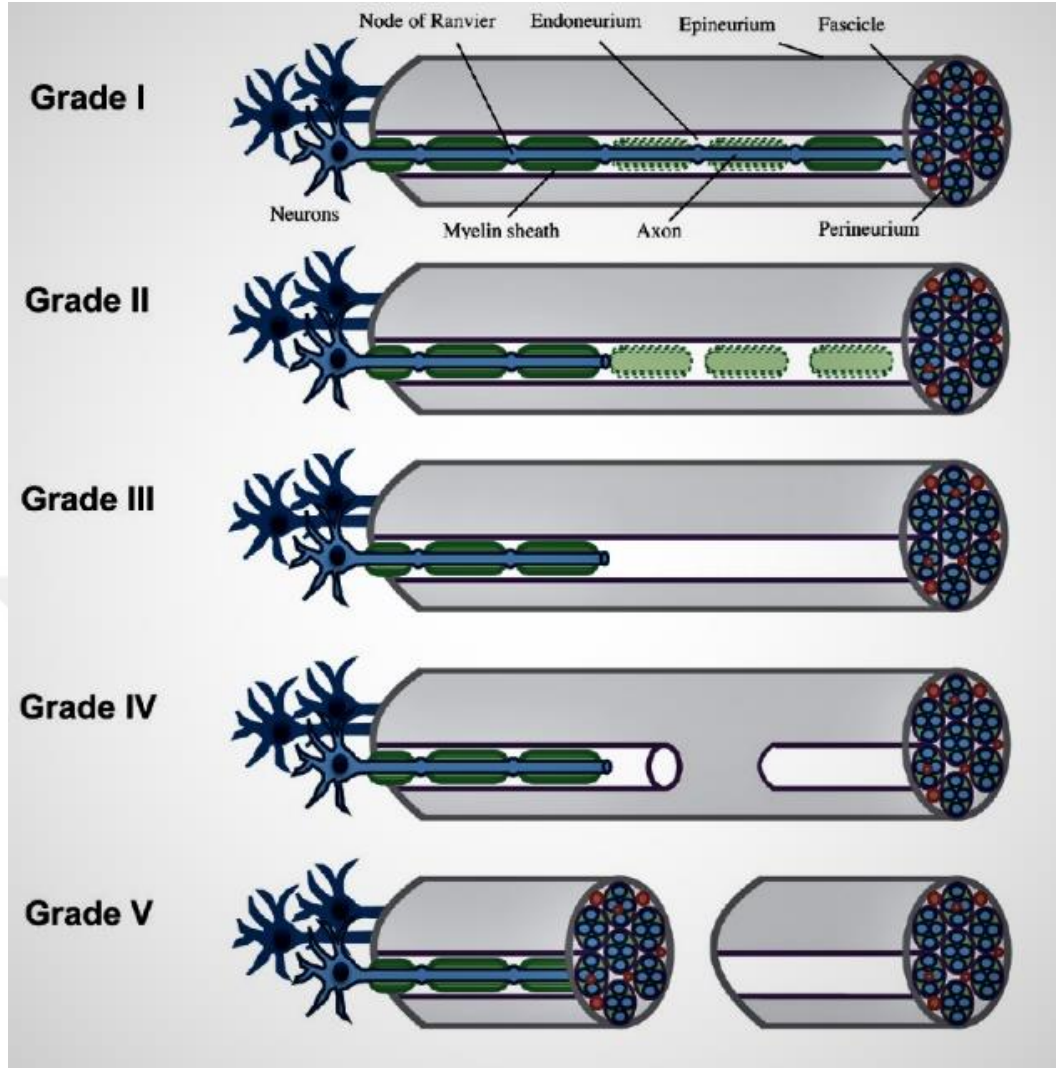
GRADE-2: Bu lezyon Seddon sınıflandırmasındaki aksonotmezise karşılık gelir. Akson kopmuş, ama sinir lifinin endonöral kılıfı ve bazal laminası korunmuştur. Perinöryum

ve epinöryum sağlam, akson hasarlıdır. Aksonlarda WD olur. Endonöryum korunduğunda, yüksek iyileşme potansiyeli vardır. Lezyon ile hedef kas arasındaki mesafeye bağlı olarak yenilenme süreci birkaç ay sürer. Genellikle aylar sonra iyileşme olur [5, 18, 64, 68].

GRADE-3: Bu yaralanmaların temel özellikleri sinir lif yapılarındaki endonöral yıkımlardır. Aksonlar parçalanır, WD olur ve endonöral tüp sürekliliğinde kayıp meydana gelir. Bu yaralanmalarda WD'nin olduğu akson ve miyelin hasarına, endonöral bozulma sonucu meydana gelen fasikül içi hasar da eklenmiştir. Epinöryum, perinöryum ve fasiküler yapı sağlamdır. Parsiyel endonöryum hasarı vardır. Aksonotmezis ve nörotmezis arasında yer alır. Ciddi tuzak nöropatiler, iskemi veya çekilme, bası, kimyasal enjeksiyon sonucu oluşur. Perinöryum ve epinöryum korunduğundan, sinirin anatomik devamlılığı tamdır. Fasikül içi ağır hasar rejenere aksonlarda yaygın fibrozise neden olabileceği için lezyon nörotmezise daha yakındır. Klinikte hasar distalinde tam motor, duysal ve otonom fonksiyonel kayıp vardır. Elektrofizyolojik değerlendirmede tam denervasyon mevcuttur. İyileşme fasiküller arası fibrozise bağlı olup genellikle uzun zaman alır. Çok ciddi yaralanmalarda iyileşme olmayabilir [5, 18, 64, 68].

GRADE-4: Bu yaralanmalarda epinöryum hala korunurken fasiküller ve perinöryum yırtılır. Epinöryum dışındaki tüm destek dokular da nöral yapılarla birlikte hasarlanmıştır. Sinirin tüm fonksiyonları kaybolmuş olup, fasikül yapısı bozulmuştur. Hatta sıkıştırma kuvvetlerinin rejenerasyon akson filizlerinin gelişimini bloke etmesiyle devamında nöroma oluşumuyla sonuçlanır [5, 18].

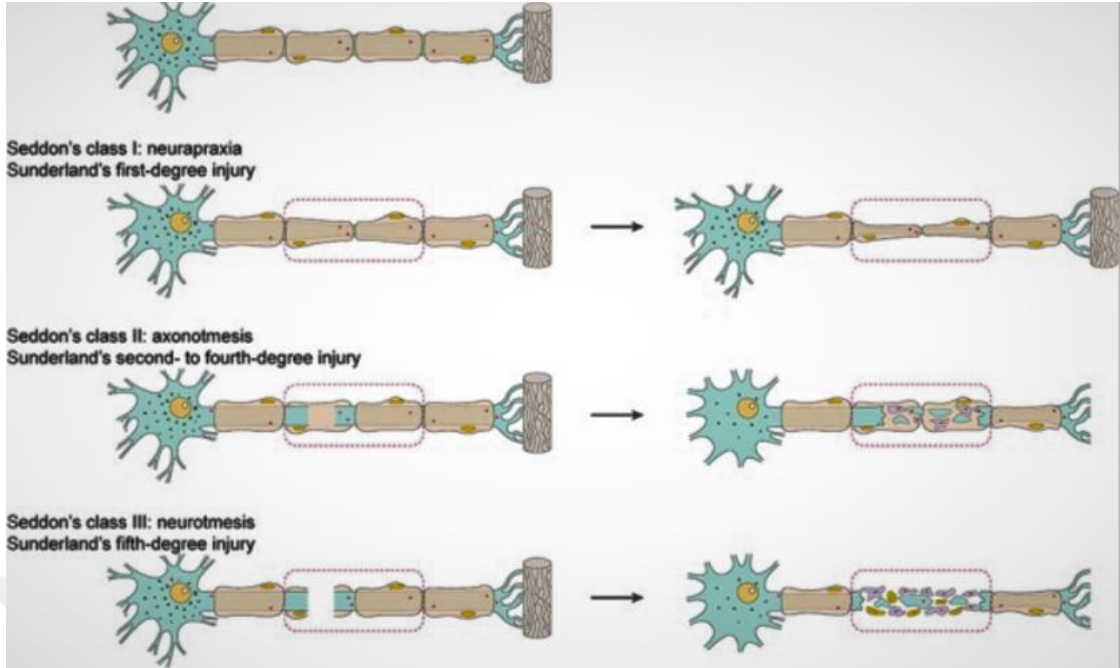
GRADE-5: Bu lezyonda sinir gövdesinde tam bir süreklilik kaybı vardır ve kendiliğinden iyileşme şansı yoktur. Lezyon nörotmezise uyar. Sinir gövdesinin devamlılığı tamamen bozulmuştur. Lezyonun distalinde tam bir duyu, motor ve otonomik fonksiyon kaybı mevcuttur. Rejenerasyon için cerrahi tamir mutlak gereklidir. Rejenerasyon çabaları ayrılmış sinir kökleri üzerinde nöroma formasyonu oluşturur. Bu yaralanmalar genellikle kesi ve ciddi çekilme bası ile oluşur. Rejenerasyon için cerrahi tamir mutlak gereklidir. 4. ve 5. lezyon dereceleri spontan iyileşme ile ilgili çok kötü prognoz gösterir [5, 18] (Şekil 6,7) (Tablo 2).



Şekil 6: Sunderland Sınıflaması

Tablo 2: Seddon ve Sunderland Sınıflamasında Karşılaştırma

SEDDON	HASAR	SUNDERLAND
Nöropraksi	İletim bloğu	Grade-1
Aksonotmezis	Akson etkilenmiş, perinöryum ve epinöryum sağlam	Grade-2
Aksonotmezis	Akson ve endonöral tüp devamlılığı bozulmuş, perinöryum ve fasiküller sağlam	Grade-3
Aksonotmezis	Akson, endonöral tüp, perinöryum, fasikulusların devamlılığı bozulmuş, epinöryum sağlam	Grade-4
Nörotmezis	Tüm sinir turunkusunun devamlılığı bozulmuş	Grade-5



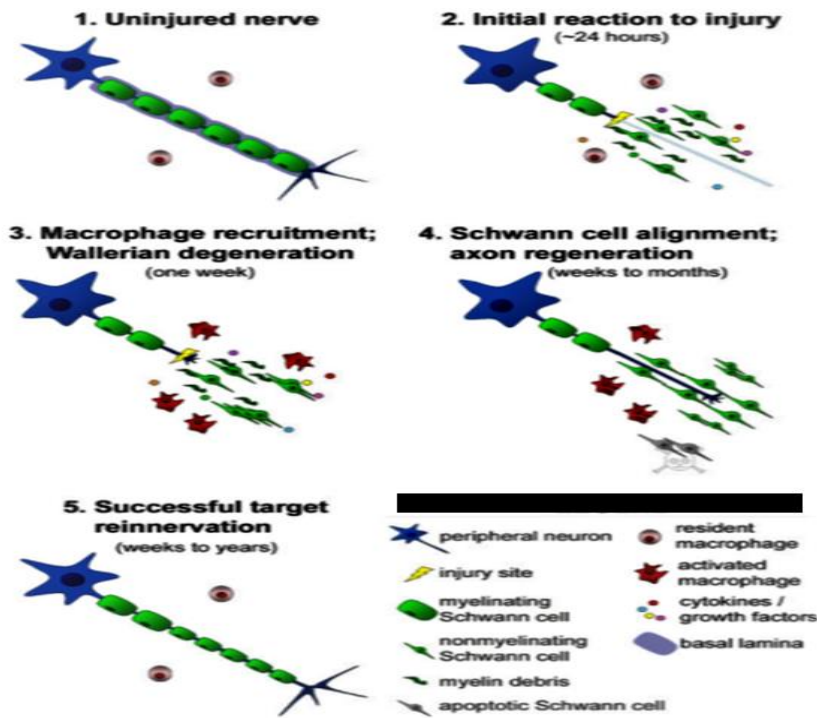
Şekil 7: Seddon Sınıflaması [69]

2.2.3 Sinir Dejenerasyonunun ve Rejenerasyonunun Hücresel Temelleri

Periferik sinir sistemi hasarından sonra sinir rejenerasyonunu desteklemek için karmaşık ve düzenlenmiş hücresel ve moleküler olaylar gerçekleşir. Wallerian dejenerasyon (WD) olarak bilinen bu olaylar ilk kez 1850 yılında August Waller tarafından tanımlanmıştır. Wallerian dejenerasyonda proksimal segmentte elongasyon ve rejenerasyon olabilirken distal segmentte dejenerasyon olur. Bu süreç kalsiyum akışı ile başlar ve sonuç olarak akson hücre iskeletinin parçalanmasını tetikleyen kalpainler gibi proteazların aktivasyonu olur. SC'ler aksonların şarjından ve miyelin enkaz temizliğinden sorumlu aktif hücreler haline gelir. Sinir doku rejenerasyonuna asıl izin veren bu fagositik süreçte önemli rol oynayan makrofajlar yaralanma bölgesine iner. SC'ler farklılaşır, proliferatif progenitör benzeri bir fenotipe dönüşür, bazal lamine tüpleri içinde sıralanır, bunlara Büngner bantları denir ve büyüyen aksonlar için substarata kılavuzluk sağlar. SC'ler aksonlara bağlandıktan sonra, kompakt miyelin kılıflarından remiyelinizasyon süreci meydana gelir. Yaralanma üzerine, büyümeyi teşvik edici ve engelleyici faktörler arasındaki hassas denge, moleküler işaretler ve sinyal yollarını aktivasyonu yenilenme sürecinin kaderinde önemli rol oynar [70, 71].

Periferik sinir sistemine izin verilen büyüme ortamına ve intrinsik büyüme kapasitesine rağmen, sinir cerrahisi rekonstrüksiyonu sonrası fonksiyonel iyileşmesi genellikle yetersizdir. Sinir yaralanmasını takiben, periferik sinir kas ve cildi reinerve etmek için büyüyerek ve/veya kollateral filizler yaparak kendini onarmaya çalışacaktır. Bununla birlikte, fonksiyonel sonuç için sinir büyümesi oranı kritiktir, çünkü rejenerasyon potansiyeli

zaman geçtikçe azalmaya eğilimlidir. Ek olarak, duyuşal ve motor liflerin uyumsuzluğu ve uygunsuz dokular boyunca sinir tuzaklaması potansiyel olarak nöroma gelişimine, hedef organların atrofisine ve böylece tam fonksiyonel iyileşmesinin bozulmasına yol açar. Yaş, etkilenen sinir gövdesi, cerrahi onarım için uygulanan yaklaşım, travma ve sinir onarımı arasındaki aralık, ve hepsinden önemlisi yaralanmanın türü ve kapsamı gibi faktörler sinir rejenerasyonunun başarısını etkileyen diğer faktörlerdir [72]. Sinir lifinin iletken bileşeni olan akson fokal yaralanmaya çeşitli yollarla karşılık verir. İki temel lezyon vardır. İlk olarak, akson sağlam ama lezyon seviyesinde iletim engellenir. Bu iletim bloğudur. Buradaki olay WD değildir; bu non-dejeneratif lezyondur. Yani nedeni ortadan kaldırılırsa iyileşme tamamlanacaktır. İkincisinde, akson kesilir, WD meydana gelir; bu ise dejeneratif lezyondur (Şekil 8). İki tür dejeneratif lezyon vardır. İlkinde, SC kılıfının bazal laminası sağlam ve akson distal SC tüpünde düzenli bir şekilde yenilenebilir. İkinci tipte bazal lamina kesilir ve kendiliğinden rejenerasyon eksik ve düzensiz olacak ve hiç gerçekleşmeyebilecektir. Seddon 1943 yılında iletim bloğu için nöropraksi, bazal lamina intakt olduğundan en olumlu prognoza sahip dejeneratif lezyon olarak aksonotmezis, bazal lamina kesintiye uğradığından en olumsuz prognoza sahip dejeneratif lezyon için nörotmezis tanımlarını kullanmıştır. Klinik pratikte nörotmezis genellikle sadece aksonun ve onun SC kılıfının değil, aynı zamanda perinörium ve epinöriumunda kesilmesi anlamında kullanılır [56].



Şekil 8: Wallerian dejenerasyonu ve akson rejenerasyonunun progresyonu [73]

İletim bloğu nöropraksi olarak da adlandırılır ve birkaç farklı modeli vardır. Anoksi birçok hastada baskın bir faktördür ve diğer nedenlerin hepsinden önemlidir [56]. İskeminin periferik sinirler üzerindeki ilk etkisi, anoksik bloğa bağlı aksoplazmik taşıma sistemlerinin ve iyon kanalının fonksiyonel paralizisine bağlı iletim kaybıdır. İlerleyen iskemide yavaş gelişen anoksik iletim kaybı daha yaygındır. Sinirlerin hematom ile sıkıştırılması karakteristik bir örnek oluşturur [13, 74]. Şiddetli uzun süreli basınç lokal demiyelinizasyona ve daha uzun iletim bloğuna neden olur, haftalar veya aylarca sürebilecek bir iletim bloğu ortaya çıkar [56]. WD sadece aksonu değil aynı zamanda hücre gövdesini de etkiler; sadece nöronu değil aynı zamanda SC ve miyelin kılıfını da etkiler. Değişim endonöral hücrelerde de olur ve daha uzun sürede motor ve duyu son organlarda da görülür. Yaralanma bölgesinin distalinde akson dejenere olur; sitoskeleton ve aksoplazmanın granüler parçalanması vardır, bunlar sonraki günlerde şekilsiz kalıntılara dönüşür. Lezyon, schwann hücre bazal laminalarının proksimalden distale kadar orijinal yollarının sürekliliğini kesintiye uğratabilecek kadar şiddetli olmadığı sürece aksonların yeniden büyümesi devam eder. Bazal laminanın sürekliliğinin korunma ve yıkımı arasındaki fark dejeneratif lezyonların arasındaki farktır. Bunlar kendiliğinden iyileşme potansiyeli olan lezyonlar (aksonotmesis) ve önlem alınmadıkça iyileşmeyecek olanlar (nörotmesis) dir. WD süreçleri her iki lezyon tipinde aynıdır, ancak bazal laminanın sağlam olduğu yerlerde çok daha az şiddetlidir, çünkü akson rejenerasyonu için hızlıca distal SC ile yeniden temas kurabilir, böylece SC'lerden ve hedef dokulardan nörotrofin akışı sağlanır. Her şeyden önce santral hücre ölümü insidansı aksonotmezisde, nörotmezisden daha düşüktür [56]. Aksonal hasar sonrası altı saat içerisinde; sinir hücre gövdesinde hacim artar, hücre çekirdeği periferik göçer, nissl cisimcikleri ve granüllü endoplazmik retikulumlar yıkılır. Sitosolun bu değişikliğine kromatoliz denir. Bu reaktif değişiklik travma sonrası ikinci ve üçüncü haftaları arasında zirveye ulaşır [75]. Kromatoliz derecesi, hasarın şiddeti ve hasarın proksimale yakınlığı ile ilişkilidir. Hücre gövdesine yakın hasarlar hücre için ölümcül olabilir [19, 76]. Nöron ölümü duyu nöronlarında motor nöronlara göre daha fazla meydana gelir [77].

Aksonal hasarın proksimalinde birkaç internodal segment boyunca ilerleyen dejenerasyon görülür. Yaralanma sonrası 24 saatlik latent bir evreden sonra proksimal uçta terminal ve kollateral aksonal tomurcuklanmalar oluşmaya başlar. Kollateral tomurcuklanma proksimaldeki sağlam olan Ranvier düğümlerinden köken alırken, terminal tomurcuklanma aksonun proksimal ucundan köken alır ve anterograd olarak ilerler. Hasarlanmış sinir aksonundan ilk 6 saat içinde tomurcuklanma başlamasına rağmen, bu ilk tomurcuklar rezorbe olurlar. 24 saatlik latent periyot sonrası beliren tomurcuklar internal sitoskeletal yapılara sahip olup kalıcı tomurcuklardır. Kalıcı olarak uzanan her bir tomurcuğa

rejenerasyon ünitesi, uç kısmındaki bölüme de büyüme konisi adı verilir [28, 29, 78]. Büyüme konisi, düz endoplazmik retikulum, mitokondri, lizozom, mikrotübül, mikrofilaman ve diğer veziküler yapılardan zengin bir içeriğe sahiptir. Büyüme konisi içerdiği aktin filamanları ve miyozin sayesinde filapoid çıkıntılar yapar ve hareketli bir yapı özelliği kazanır. Distal segmentteki SC kolonları (Büngner bantları) büyüme konisinin ilerlemesi için uygun ortamı hazırlar. Büyüme konisinin SC bazal laminasındaki fibronektin ve laminine affinitesi vardır. Bu affinite aksonal tomurcukların büyüme yönünü belirlemede rol oynar [28, 49]. Kalıcı tomurcukların distal segment ile bağlanamayanları zamanla regrese olur. Bağlantıyı yapanlar mature olur. Bu düzenlemeyi uç organlardan salgılanan nörotrofik maddeler sağlamaktadır [29]. Hücre gövdesi nörotrofinlerin ihtiyaçlarını karşılamaktan uzaklaşır ve rejenerasyon işlemi bitebilir. Birkaç gün içinde proksimal aksonun kalibresinde bir azalma olur; sinir iletim hızı proksimal segmentte düşer [79].

Proksimal nörotmeziste hücre kaybı daha şiddetlidir ve yenidoğanlarda erişkinlere göre daha hızlı ve çok daha fazla duyuşal ve motor nöron ölüm insidansına sahiptir [56]. İkinci derecede hasar gören aksonun distal segmentinde WD'ye benzer olaylar görülür. Fasikül içi yaralanmanın aksonal rejenerasyonu baskılaması sonucu endonöral tüpler uzun bir süre denerve olarak kalır. Endonöral tüpler denerve haldeyken küçülmeye başlar ve yaralanma sonrası 3-4 ayda en küçük halini alır. Schwann hücresi bazal membran dış yüzeyinde kollajen depolanmasına sekonder endonöral kılıf kalınlaşmaya başlar. Rejenere olan bir akson olmazsa endonöral tüp ilerleyici fibröz doku tarafından oblitere olur [53, 80].

Daha önemli derecedeki yaralanmalarda bozulmuş endonöral tüpler olarak görünen SC kümeleri WD'nin geç dönemlerinde mikroskobik olarak görünür şekle gelir. Bu SC kolonlarına Büngner bantları denir ve reinnervasyon sırasında akson tomurcuklarına kılavuzluk yapmaktadırlar [53, 80]. Üçüncü ve dördüncü derece yaralanmaya lokal cevap şiddetlidir. Epinörium, fasiküller ve endonörium hasarlanmıştır. Epinöral fibroblastlar hasarlanmış uçlarda 24 saat içinde görülmeye başlar. Hücresel proliferasyon birinci hafta zirveye ulaşır ve uzun bir süre devam eder. Kapiller geçirgenlik artmasıyla birlikte ödem ve makrofaj infiltrasyonu gerçekleşir. Cevabın büyüklüğü travmanın sinire ve çevre dokulara verdiği hasarla doğru orantılıdır [53, 81]. Dördüncü ve beşinci derece yaralanmalarda, sinir uçları tamamen ayrılmıştır. Hasar bölgesi; SC, kapillerler, fibroblastlar, makrofajlar ve kollajen fibrillerden oluşan şişkin bir kitle halini almıştır. Rejenere aksonlar proksimal güdüğe ulaşır ama inflamatuvar bariyeri aşp distal segmente geçemezler. Birçok akson skar dokusu içinde helezonik bir yapı oluşturur, bir kısım akson proksimal segment boyunca geri döner ya da çevre dokuya doğru dışarıya uzanırlar. Uzun süre doldurulamayan endonöral tüpler fibröz dokuya tıkanır [53, 81].

WD'nin sınırlı bir süre için de olsa rejenerasyona dirençli aksonlarının, bu rejenerasyona aktif olarak duyarlı olan aksonlara dönüştüğü normal sinirin etrafındaki aktif süreçtir. Erken değişiklikler hücre iskeletini etkiler. Distal sinirlerde SC' ler, miyelinli ve miyelinsiz lifler bir proliferasyon sürecine başlar. Makrofaj sayısı artar. Makrofajlar miyelin ve aksoplazma enkazını temizlerler ve miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG) gibi normalde aksonal büyümeyi inhibe edici proteinleri ortadan kaldırır. Zaman geçtikçe endonöral tüpler küçülür, endonöryumda daha fazla kollajen birikir ve distal segment içinde ilerleyici fibrozis olur. Gecikmeli olarak SC sayısı azalır ve rejenere aksonlara karşı daha az duyarlı hale gelirler. SC ile akson arasındaki sinyalizasyonunda önemli olan reseptörlerin ekspresyonunda azalma olur. Bu etkiler iskemi ve sepsiste daha da kötüleşir. WD perinöryum açıldıktan sonra kaçınılmazdır. Perinöryum yırtıldıktan sonra sinir gövdesinde nöroma gelişebilmektedir [56].

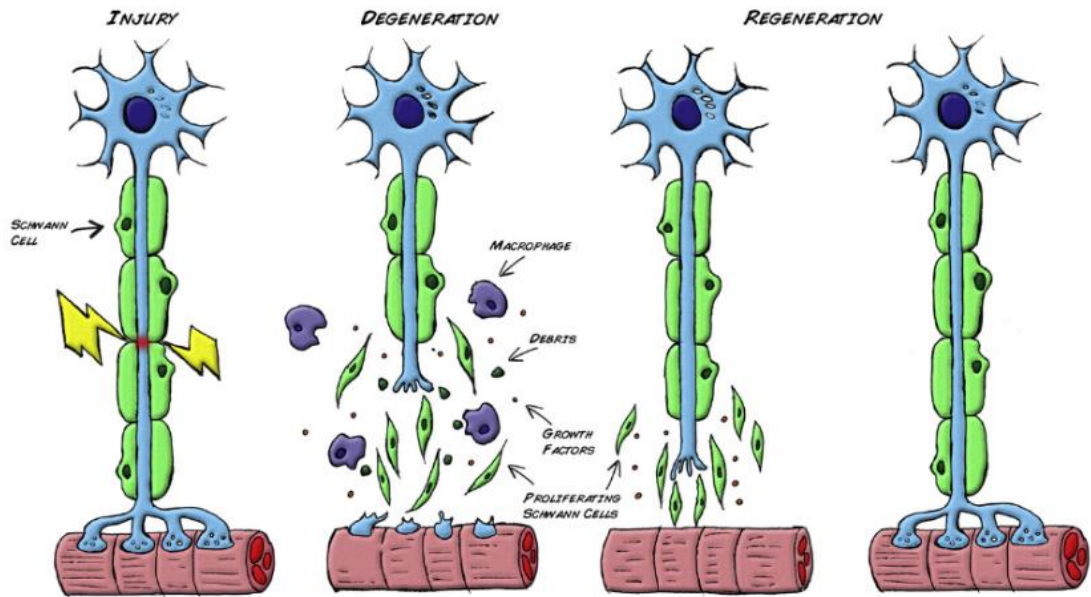
Proksimal lezyonlarda nöronal somanın yaralanması iyileşme potansiyeli olmayan çok şiddetli sinir yaralanmasına yol açar. Sinirde doğrudan nöronal hasar meydana gelir [18]. Periferik aksonal yaralanmalarda nöronal hücre ölümü ve soma kaybıyla sonuçlanan sinir köklerinin avulsiyonunun aksine nöronal hücre ölümü meydana gelmez. Bu nedenle, periferik sinirler yaralanma sonrası rejeneratif bir potansiyele sahiptir. WD'de histolojik değişiklikler saatler içinde başlar. Hasardan 48-72 saat sonra aksonal bütünlük bozulur ve impuls iletimi kaybolur. Miyelin yıkımı ise aksonların yıkımından az bir süre sonrasında başlar ve 36-48 saatte belirgin hale gelir [53, 82]. SC'ler hasar sonrası 24 saat içinde aktifleşir. SC'ler dejenerasyon ve rejenerasyona yardım eden birçok molekülün gen ekspresyonunu düzenler. Dejenere akson ve miyelin artıklarını başlangıçta Schwann hücreleri, sonrasında makrofajlar temizler. 5-8 haftalık süreçte dejeneratif süreç tamamlanmaktadır [82]. Üçüncü dereceli yaralanmalarda travmanın şiddetine bağlı daha güçlü enflamatuvar cevap oluşur, kanama ve ödeme neden olur. Bu bölgede fibroblastlar çoğalır ve fasiküller arası fibrozis gelişmektedir [53].

WD'de aksonal bileşenlerin yapısında hızlı bir şekilde bozulma ortaya çıkar. Rejenerasyon sürecine hayati şekilde katkı yapan non-nöronal hücrelerin aktivasyonu meydana gelir. Bu süreç SC'lerin endonöryum içindeki makrofajların aktivasyonu ve periferdeki destekleyici immün hücrelerin takviyesiyle differensiasyon, proliferasyon ve migrasyonunu olaylarını içerir. Bu hücreler miyelin kalıntılarını ve nöral yara iyilişmesi yanıtındaki akson rejenerasyonunun diğer inhibitörlerinin temizleyerek distal siniri rejenerasyona hazırlar. Schwann hücrelerinin ve makrofajların takviyesi birkaç diğer spesifik proinflamatuvar sitokin salınımına bağlıdır. Bu proinflamatuvar stokinlerin salınımı benzer şekilde makrofajların ve immunkompetan hücrelerin periferden salınımı uyarır [18, 83].

Periferik bir sinire ciddi bir hasarın bir sonucu olarak, distal ve proksimal aksonal dejenerasyon dizisi gerçekleşeceği tahmin edilebilir. Yaralanma her seferinde nöron ölümüne yol açmaz, rejenerasyon ilerler, süreç başarısız sonuçlanabilir ya da efektif fonksiyonel restorasyona neden olabilir (Şekil 9). Günümüz sinir rejenerasyon araştırmalarında, sinir rejenerasyonunun dejenere distal sinirin otorejenerasyonu ile değil proksimal kökten aksonal büyüme ile gerçekleştiği tespit edilmiştir [18]. Periferik sinir hasarından sonra, üç tip intrinsik ve extrinsik süreç nöronu moleküler düzeyde etkiler:

1. Mitojenle aktive edilen protein kinazların (MAPK'lar) retrograd taşınmasından elde edilen pozitif sinyaller yaralanma bölgesinden hücre gövdesine taşınır.
2. Aksonal yaralanma, aksiyon potansiyel iletiminin bozulmasına ve büyük bir kalsiyum akışına ve depolarizasyon dalgasına yol açar. Bu ilk kalsiyum akışı, hücre içinde protein kinaz C (PKC) aktivasyonuna ve rejenerasyonla ilişkili baskılayıcı bir gen salgılanmasına yol açar [18, 84].
3. Büyüme faktörlerin retrograd taşınmasının kesilmesi ve uç organdan aksonal büyümenin negatif düzenleyicileri, rejenerasyonla ilişkili genlerin artışına yol açar [18, 85].

Sinir rejenerasyonunun hızı, sinir yaralanmalarının uzaklığıyla ters orantılıdır. Altta yatan yatak iyi vaskülarize olursa aksonal büyüme daha hızlı olmaktadır. Yaralanma ve tamir arasında geçen zaman miktarı, hastanın yaşı, sinir tipi, sinir hasarı seviyesi, yaralanmanın nedeni fonksiyonel iyileşme prognozu için çok önemlidir [18].

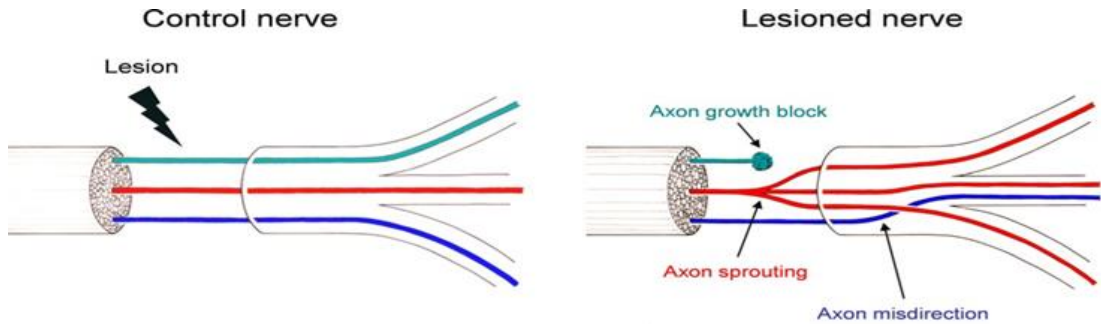


Şekil 9: Periferik sinir hasarı ve rejenerasyonu [86]

Rejenerasyonun altında yatan temel hücresel süreçler farklı yaralanmalarda benzerdir ama yaralanmanın şiddetine, yaralanmanın ilişkili dokular üzerindeki etkilerine, özellikle iskemi ve gecikmiş onarım durumuna göre değişir. Bir sinir lezyonunda laboratuvarda rejenere aksonların gösterilmesi insanda muhakkak fonksiyonun geri kazanılacağı anlamına gelmez [13]. Transeksiyondan sonra aksonların hala sağlam olduğu düzeydeki ranvier nodlarından kollateral filizler ortaya çıkar; hayatta kalan aksonun ucundan terminal filizler oluşur. Akson yanıtını takibe birkaç gün içinde, destekleyici hücre sayısında dramatik artış meydana gelir. Endonoryum içine hematojen makrofajların akın etmesi, SC'ler içinde yoğun mitotik aktiviteye yol açar [87].

Periferik sinir yaralanmalarından sonra hastaların sadece % 60'ında efektif fonksiyonel iyileşme görülür. Bu durumun çeşitli nedenleri vardır. İlki nöroma oluşumuyla sonuçlanan lokal filizlenmedir. İkincisi aksonların birden fazla periferik sinir dalını innerve edecek şekilde uzamasıdır. Üçüncüsü de aksonal yanlış yönlendirilmedir. Motor aksonların duyu aksonları yerine büyümesi aksonal yanlış yönlendirilmeye örnek gösterilebilir (Şekil 10).

Aksonal filizlenme yaralanma sonrası azalan fonksiyonel kapasiteyi artırmak için uyarlanmış bir kompensatuar mekanizma olarak kabul edilmiştir [88]. Yanlış yönlendirilmiş aksonlar ise senkronize fonksiyon üzerinde zararlı etkilere yol açarlar. Bu nedenle postlezyonal aksonal filizlenme kas reinnervasyonunda yetmezlik ile sonuçlanabilmektedir [89].



Şekil 10: Aksonal yanlış yönlendirme

SC' ler rejenere aksonları teşvik eder ve yönlendirir. PNS'de rejenerasyon sadece SC ile akson arasındaki etkileşimle mümkündür. Çoğalan SC'ler aksonların miyelinli/ miyelinsiz ve duyu/motor dönüşümünü belirler [90].

Deneyisel çalışmalar proksimal segmentten büyüyen aksonların; sinir, tendon ve granülasyon dokusu gibi distal hedeflerin arasından sinirin tercih edildiğini göstermiştir. Sinirlerin özellikle sinirlere doğru büyüdüğü, hatta motor aksonlardan motor sonlanmalara ve duysal aksonlardan duysal sonlanmalara yönelim olduğu, daha da ileri derecede

spesifikleşmeye yol açılabildiği, gereksiz akson filizlerinin ise atrofiye gittiği gösterilmiştir [87].

Sinirin işlevsel restorasyonu için en iyi seçenek sepsisin önlenmesi, aksiyal arter yaralanmasında kan akımının sağlanması, dokuların perfüzyonunun restorasyonu, herhangi bir kırığın stabilizasyonu ve tamir yerinin üzerinin derinin tüm tabakaları kaplaması gibi temel prensipler içinde yaranın tedavisidir. Sinirin kendisi mümkün olan en kısa sürede onarılmalıdır [13].

Kutanöz duyu reseptörleri denervasyondan sonra yavaş bir dejeneratif değişikliğe uğrar. Üç yıl sonra ortadan kaybolabilirler. Denervasyon süresi ne kadar uzun olursa rejenerasyon o kadar eksik olacaktır [91].

Spinal köklerin avulsiyon veya rüptürü, dorsal ve ventral hornlar içindeki hücreler üzerinde yıkıcı bir etkiye sahiptir. Çevre nörotrofinlerin ve nöroprotektif ajanların kombinasyonu ile geliştirilen periferik etkiyle motor nöronlar, sisteme tekrar bağlanarak kurtarılabilirler [92]. 24 saat içinde sinirin onarılması ile birlikte nöroprotektif ajanların uygulanmasıyla dorsal boynuz nöronlarının korunduğu gösterilmiştir [93].

Sinir rejenerasyonundan sonra zayıflık, azalmış dayanıklılık, eklemlere etki eden kas kuvvetlerinin dengesizliği ve sinir onarımından sonra koordinasyon bozukluğu olağandır. Kontraksiyon, traksiyon lezyonları boyunca düzensiz rejenerasyonun sık görülen bir komplikasyonudur [87].

Ağrı özellikle sinir hasarının ortak bir özelliğidir, ancak sinir rejenerasyonunun kendisi özellikle yetişkinlerde ağrı ile ilişkili olabilir. Birçok hasta brakial pleksusun veya siyatik sinirin yüksek lezyonlarının onarımından aylar sonra ve kas fonksiyonunun belirgin iyileşmesinden kısa süre önce karıncalanma ve kramp ağrısı yaşar. Bu durum kas aktivitesinin geri dönüşüyle yakın ilişkisi olan derin afferent yolun reintegrasyonunu düşündürür. Büyük bir kutanöz bileşeni olan bir sinirin onarılmasından sonra, genellikle hasta aşırı reaksiyon yaşar. Serin, sıcak veya iğne batırma gibi normal uyaranlar, hoş olmayan soğuk, ateş veya bıçaklanma olarak algılanabilir. Bu aşırı tepki genellikle 2-5 yıllık bir süre içinde düzelir, ancak bu durum devam da edebilir. Soğuk, sağlıklı sinirlerde işlevsel aksonların sayısının ciddi oranda azalmasına yol açar, bu nedenle ciddiye alınmayan soğuk koşullar rejenerasyonu bozup hasar vererek sağlıklı sinirleri kötü etkiler. Hem motor hem de duyu işlevler etkilenir [87].

Sinir onarımından sonra iyileşme prognozu bir dizi faktör tarafından belirlenir. Bunlardan ikisi özellikle önemlidir. Birincisi yaralanmanın şiddeti, ikincisi onarım öncesi gecikmedir. Eğer bir yaranın tedavisinin temel prensiplerinde ihmal varsa fonksiyonda yararlı iyileşme beklenemez. Arterler onarılmalı, dokular perfüze edilmelidir, iskelet

stabilize olmalı ve sinir ve damarları onarmalıdır ve tüm cilt katmanlarıyla kaplanmalıdır [87].

Nöronların ölümden kurtarılması ve akson rejenerasyon programları yaralanmadan sonra başarılı fonksiyonel reinervasyonun önemli önkoşullarıdır. WD sırasındaki moleküler değişiklikler nöronal somada ve çevresindeki glial hücrelerdeki inflamatuvar reaksiyonlar için hem pozitif hem de negatif sinyal moleküllerinin kaynağını oluşturur. Bu retrograd sinyale ile indüklenen inflamasyon nöronların ölümüne ve / veya korunmasına yol açabilmektedir [94].

2.2.4.Sinir Rejenerasyonu Üzerine Etkili Faktörler

2.2.4.1. Büyüme Faktörleri ve Nerve Growth Factor (NGF)

PNS, sinir devamlılığı zarar gördüğü zaman sinirde spontan rejenerasyona izin veren intrinsik bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir [95]. Bununla birlikte, spontan rejenerasyonun fonksiyonel sonucu genellikle tatmin edici değildir ve hastalarda yaşam kalitesini düşüren fiziksel morbiditeye neden olur [96]. Ayrıca, yaralanma ve onarım arasında meydana gelen gecikmeden dolayı perifer ile iletişimi kesilen nöronların hücre ölümüne yol açması innervasyonu eksik kalan dokularda periferik atrofiye neden olur [97, 98]. Bu durum özellikle ağır transeksiyon yaralanmaları için önemlidir. Bu durumda rejenerasyon büyük boşluklar içinde büyümeye ihtiyaç duyarlar [99]. Periferik sinir yaralanmalarının tedavisi için güncel teknikler hasarlı sinirlerin proksimal ve distal segmentlerini bir araya getiren cerrahi girişimleri içeren tekniklerdir [100, 101]. Aksonun proksimal segmentinden sinir liflerinin distal segmente yada hedef son organa ulaşmasıyla aksonal rejenerasyonun oluşmasına nörotropizm denir. SC'ler ve başta NGF gibi nörotropik faktörlerin nörotropizmin sağlanmasında etkisi büyüktür [71, 102]. SC'ler periferik sinir hasarını takiben aksonal rejenerasyon ve matürasyonun sağlanması amacıyla "Nerve Growth Factor" (NGF), "Insulin-like Growth Factor-1" (IGF-1), "Fibroblast Growth Factor" (FGF), "Ciliary Neurotrophic Factor" (CNTF) ve "Brain-derived Neurotrophic Factor" (BDNF) gibi faktörlerin sentez ve salınımında rol alırlar [103]. Günümüzde nörotrofinlerin santral sinir sistemi gelişimini sağladıkları gibi, adult sinir sisteminin yapısal bütünlüğünü idame ettirdikleri düşünülmektedir. NGF sempatik ve sensoriyal nöronların gelişimleri boyunca sağkalım faktörüdür [104]. Sinir rejenerasyonu için umut vaat eden birçok büyüme faktörü arasında NGF en çok çalışılanlardan biridir [105].

Geniş bir polipeptid terapötik ajan grubu olan büyüme faktörlerinin nöral onarım üzerinde sitoprotektif ve onarıcı fonksiyon uyguladığı gösterilmiştir [106, 107]. Nörotrofik faktörlerin belirlenmesi sinir yenilenmesinin moleküler zemininin izahı için önemlidir. Nörotrofik faktörler arasında NGF nin anahtar rolü vardır ve nöroprotektör görevi görür

[108]. 1950'lerde Rita Levi-Montalcini ve Viktor Hamburger tarafından in vitro fare sarkom kültürlerinde tarafından keşfedilen ilk nörotrofin olan sinir büyüme faktörü (NGF) nin sonraki çalışmalarda PNS içinde nöronların hayatta kalması ve olgunlaşmasına aracılık etmede önemli rolü olduğu gösterilmiştir [109]. Aynı zamanda NGF sensorimotor iyileşmeyi ve aksonal rejenerasyonu sağlar [110, 111].

NGF'nin fizyolojisi son derece karmaşıktır ve her ne kadar bu nörotrofin ile ilgili çalışmaların başlangıcı 60 yıldan daha uzun bir süre önce başladıysa da hala tam olarak açıklık getirilememiştir. NGF, öncü molekülü pro-NGF ve kendi farklı reseptör sistemleri hem sinir hem de bağışıklık sistemlerinin gelişim ve yetişkin fizyolojisinde anahtar rollere sahiptir. Son yıllarda, NGF'nin veya reseptörlerinin inhibitörlerinin kullanımı çeşitli nörolojik hastalıklarda ve yaralanmalarda terapötik bir araç olarak düşünülmüştür [112]. Nörotropinler, gelişen sinir sisteminde iletimin kurulmasına yardım eden hedef hücreler tarafından üretilen yapısal ve fonksiyonel olarak benzer olan proteinlerin bir grubudur. Beyinde en yüksek düzeylerde majör kolinerjik yolların bulunduğu hipokampus ve serebral korteks gibi bölgelerde bulunur. NGF sinir hücrelerinde büyüme, farklılaşma, canlılığını sürdürme ve rejenerasyonda önemli bir role sahiptir [113, 114]. Serebral hasar sonrası NGF düzeyinde yükselme, nöronal iyileşme için esastır. Yapılan birçok çalışma ile nörotropik faktörlerin sellüler kalsiyum homeostazisini kontrol ettiğini, serebral kan akımını düzenlediğini ve iskeminin etkilerini iyileştirdiğini, antioksidan enzimleri arttırarak; serbest radikallerin oluşumunun baskıladığı gösterilmiştir [115]. Ayrıca öğrenme başta olmak üzere kognitif fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir [116]. Periferik sinir sisteminde NGF'nin ana rolü hasarlanmış nöronlarda akson jenerasyonunu sağlanmasıyla birlikte P maddesi ve CGRP gibi nöropeptidlerin sentez ve salınımını arttırmaktır. NGF'nin periferik sinir rejenerasyonu üzerindeki yararlı etkilerini inceleyen birçok klinik çalışma olmuştur [117]. PNS içerisinde sempatik ve duyuşal nöronlarının gelişimi, bakımı ve rejenerasyonunda NGF'nin hayati rolünü tartışmış ve göstermiştir [112]. Enflamatuar araçlar ve sitokinler, hücrelerde ve dokularda NGF sentezini büyük ölçüde artırabilirler. Ayrıca NGF konsantrasyonları klinik ağırlık ile koreledir [112]. NGF salınımı nöronal popülasyonu korur [118] ve miyelin onarımını indükler [119, 120]. NGF nin nöroprotektif etkisi spinal kord yaralanması yahut farklı etiyolojilerle karakterize edilen diğer nöropatolojilerde de ortak görünmektedir [106, 121, 122].

2.2.4.2. İnflamasyon ve Sitokinler (TNF- α ve TGF- β)

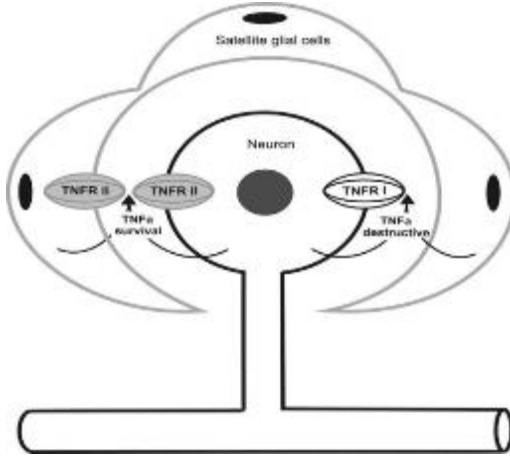
Sinir hasarı distalindeki aksonal dejenerasyon WD olarak bilinir ve yaralanmış sinir liflerinin yanı sıra inflamatuvar olaylar kaskadının tetikleyicisidir. WD'nin erken inflamatuvar

reaksiyonları, kompleman sistemi, araşidonik asit metabolitleri ve miyelin parçalanması ile ilişkili inflamatuvar araçları ve SC aktivasyonunu içerir. Periferik sinir hasarı ve immün sistem arasındaki moleküler etkileşimlerin anlaşılması, fonksiyonel reinervasyonun gelişimi için hedeflenen inflamatuvar mediatörlere yeni olanaklar açar. Periferik sinirin yaralanması, periferik dokularda aksonların fonksiyonel bağlantılarının kaybına neden olur. Yenilenen fonksiyonel bağlantı kopmuş aksonların rejenerasyonu ve bunların hedef dokulara doğru yönlendirilmesiyle sağlanır. Periferik sinir travması genellikle sinir onarımı ve fonksiyonel reinervasyon için gerekli olan inflamatuvar bir yanıtı tetikler. Diğer dokularda olduğu gibi sinir lezyonundan sonra inflamatuvar reaksiyon, çok sayıda inflamatuvar mediatör tarafından kontrol edilen dinamik bir süreçtir. Bu nedenle, travmatik sinir hasarından sonra ve sinir rejenerasyonu sırasında inflamasyon hakkında ayrıntılı bilgi, fonksiyonel iyileşmenin artırılması bakımından önemlidir [123]. WD, yaralanmanın distalindeki sinir liflerinin hücresel ve moleküler basamaklıp kaskadıdır ve bir tür doğuştan gelen immün reaksiyon veya nöroinflamasyon sürecidir [124]. WD sonrası hücresel düzeyde aksonların kopan distal kısımların dejenerasyonu [125], SC'lerin aktivasyonu, kan-sinir bariyerinin bozulması [47], hematojen makrofajlar ve sitokinlerin yoğunlaşması gerçekleşir [126]. Sinir yaralanması distalindeki hem hücresel hem de moleküler olaylar proksimal segmentlerden aksonların yeniden gelişimini indükleyen koşullar yaratır [127, 128]. Yaralı sinirin aksonal parçalanmasıyla başlatılan inflamatuvar yanıt hem humoral (kompleman sistemi, siklooksijenaz-lipoksijenaz yolları, sitokinler/ kemokinler) hem de hücresel (kan-sinir bariyeri permeabilizasyonu, SC aktivasyonu, makrofaj göçü) bileşenleri içerir. Sitokinler klasik olarak immün sistemin aktivasyonu ve inflamatuvar yanıtla ilişkili heterojen bir grup polipeptid mediatör içerir. Son zamanlarda sitokinlerin sinir sistemi hasarı sonrası ekspresyonlarında artış olduğuna dair artan kanıtlar vardır. Sitokin üretimi periferik nöronlar, SC'ler ve immün hücreler tarafından yapılır [129]. Akson rejenerasyonu üzerindeki sitokin etkilerine ilişkin yayınlanmış sonuçlar sıklıkla tartışmalıdır, çünkü sitokinler, inflamasyonun kendisi gibi, sinir rejenerasyonu ile ilgili "iki ucu keskin bıçak" şeklinde etki oluşturur. Bu karşıt etkiler yaralanmış sinirde inflamatuvar reaksiyonların derecesi ve zamanlaması ile ilgilidir [130]. WD'nin erken döneminde SC'ler tarafından aktive edilmiş sitokinler miyelin yıkımına ve hematojen makrofajların takviyesine neden olur [131, 132]. SC'ler, distal sinir yaralanmasında çoğalır ve immatür hale farklılaşır. Büngner bantlarının içinde dizilen immatür SC'ler sitokinlerin [133] nörotrofik faktörlerin [134] ve hücre adezyon moleküllerinin [135, 136] temel kaynağıdır. Sitokinler ve onların sinyal molekülleri aksotomi ile indüklenen olaylara katkıda bulunup, glial hücrelerin çevrenmesini, nöronun hayatta kalmasını ve akson rejenerasyonunu etkileyebilmektedir [129].

2.2.4.2.1 Tumor Necrosis Factor- alfa (TNF- α)

Sinirin iskemiye maruz kalması sinir liflerinde dejenerasyona neden olur. İskemi sonrası reperfüzyon, sinir liflerinde dejenerasyona ilaveten oksitadif stres ve imflamatuar yanıt nedeniyle oluştğı kabul edilen reperfüzyon hasarına yol açar [137]. Proinflatuar sitokinler, özellikle tümör nekrozu faktör-alfa (TNF- α), iskemi-reperfuzyon hasarını takiben oluşan inflammatuar cevabın önemli bir bileşenidir ve mRNA düzeyinden protein düzeyine hızla upregüle edilir [132, 138]. TNF- α , NF- κ B ve kaspaz yolunu aktive ederek inflamasyonu, immün modülasyonu ve apopitozu düzenler [139]. Çalışmalar merkezi sinir sisteminde iskemi-reperfuzyon hasarında TNF- α 'nın kilit rolünü desteklemektedir [140]. Periferik sinir hasarının patogenezinde ise TNF- α 'nın rolü henüz tam anlaşılamamasına rağmen yapılan bir çalışmada TNF- α 'nın periferik sinir iskemisi-reperfüzyon hasarı patogenezinde muhtemelen kısmen NF- κ B'nin aktivasyonu yoluyla önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir [137]. Bazı yayınlarda TNF- α 'nın akson büyümesini teşvik ettiğini gösterilse de [141], diğerlerinde akson büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir [142]. TNF- α 'nın fonksiyonel iyileşme [143, 144] üzerindeki olumsuz etkileri de rapor edilmiştir. Periferik sinirlerde TNF- α enjeksiyonu WD'yi indükler, ayrıca sinir yaralanmasının ardından nöropati gelişimine de katkıda bulunur [145]. Periferik sinir yaralanmasından sonra erken dönemde (saatler içinde) TNF- α ekspresyonu artar [146-148]. TNF- α 'nın WD'nin erken safhasında miyelin parçalanması ve fagositoz, SC aktivasyonu ve makrofaj takviyesi üzerinde faydalı etkileri vardır [149, 150]. Bununla beraber TNF- α 'nın stümüle ettiği fibroblast proliferasyonu ile fonksiyonel sinir rejenerasyonunun bozukluğa neden olan nöroma oluşumunu indüklediği tespit edilmiştir [129]. TNF- α 'nın sinir yenilenmesi üzerinde zararlı etkisinin olduğunu gösteren daha fazla kanıt vardır. TNF- α antagonisti (etanercept) nin sistemik ve lokal uygulaması ile aksonal rejenerasyon hızını yükselttiği tespit edilmiştir [142].

TNF- α 'nın pleiotropik aktivitelerine iki ayrı reseptör alttipi aracılık eder, esas olarak eksprese edilen reseptör-1 (TNF-R1, p55) ve indüklenebilir reseptör-2 (TNF-R2, p75). TNF-R2'nin immün hücre aktivasyonuna katkısı TNF-R1 ile işbirliği içinde çalışmasına bağlıdır (Şekil 11) [151].



Şekil 11: TNF- α ve reseptörlerinin DRG' de dağılımının şematik sunumu

TNFR1 sadece nöronal organlarda upregüle edilirken, TNF- α nöronlarda ve onların satellit glial hücrelerinde upregüle edilir. TNF- α 'nın TNFR1 ile indüklenen destrüktif etkileri üzerinden nöronal cisimler üzerine otokrin ve parakrin faaliyetleri hakkında tahmin yapılabilir. Aksine, TNF- α 'nın TNF-R2 yoluyla otokrin ve parakrin faaliyetleri muhtemelen satellit glial hücreler (SGC) ve DRG nöronlarının bir alt popülasyonu üzerinde koruyucu etkilere sahiptir [151]. TNF-R2(p75NTR), ayrıca nöropatik ağrıya neden olur ve mekanik ve termal hiperaljeziye katkıda bulunur [152].

Sinir lezyon bölgelerinde üretilen TNF- α retrograd olarak DRG nöronları TNF-R1 ve TNF-R2'nin ekspresyonu ile korele spinal kord dorsal kolonlarına taşınır [153]. Retrograd taşınan bu TNF- α siyatik sinir yaralanmasından sonra DRG nöronlarının ve SGC'lerin sentezlediği TNF- α 'dır [154]. TNF- α 'nın nörotoksik etkilerinin TNF-R1 aracılığıyla aracılık edilmektedir [151].

WD süreci lezyon bölgesinde sitokinlerde ve büyüme faktörlerinde bir artışa neden olur ve bu da TNF-R2(p75 NTR) seviyelerini artırır [155]. TNF-R2(p75NTR) sinyal aktivasyonundaki azalmayla, MAPK inhibisyonu ve kaspaz 3 aktivitesinin baskılanması periferik sinir yaralanmasıyla tetiklenen apoptotik süreci hafifletir ve muhtemelen siyatik sinirin duysal ve motor iyileşmesine katkıda bulunur [156]. Nitekim TNF-R2(p75NTR) üzerindeki inhibitör etkinin aksonal rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşmeyi teşvik ettiği gösterilmiştir [157]. Endojen TNF- α , NGF varlığında nörotoksik etkiler göstermez. NGF geri çekildiği zaman endojen TNF- α 'nın TNF-R1 aracılığıyla nöronlar üzerinde nörotoksik etkileri ortaya çıkar. Bu nörotoksik etkilerin aksine, TNF- α 'nın TNF-R2 yoluyla nöron sağkalımını teşvik edebileceği kanıtlar vardır [158].

Bu tartışmalı sonuçlar TNF- α 'nın periferik sinir rejenerasyonu üzerindeki karmaşık etkilerini göstermektedir ve daha fazla deney yapılmasını gerektirmektedir [129].

2.2.4.2.2 Transforming Growth Factor-beta (TGF- β)

TGF- β ; büyüme, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz dahil birçok hücresel işlevi olan [159], reinnervasyonun tüm kilit noktalarında rol alan güçlü, çok işlevli bir sitokindir [160]. Yaralı sinirlere; DRG nöronları, makrofajlar ve SC'ler tarafından sekrete edilen regülatör bir sitokindir. İnaktif bir prekursor olarak üç izoform (TGF- β 1, β 2, β 3) halinde sentezlenir ve 25 kDa ağırlığındadır. Esasen olarak monositlerin / makrofajların ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe eder [161]. Her üç TGF- β , eylemlerini tip 1 (TGF- β RI) ve tip 2 (TGF- β RII) reseptörlerinden oluşan serin/treonin kinaz reseptör kompleksi yoluyla modüle eder [162].

Siyatik sinir yaralanmasından sonra WD sürecinde TGF- β 'nın anahtar role sahip önemli düzenleyicilerden biri olduğu antikor dizisi ve biyoinformatik analizler ile ortaya çıkarılmıştır [163]. Akut yaralanmadan sonra SC'ler tarafından nörotrofinler ve reseptörleri, TGF- β gibi sitokinler [164], adhezyon molekülleri [165] ve rejenerasyonla ilişkili genler eksprese edilir. Bunlar distal sinir segmenti boyunca rejenerasyon ünitelerinin gelişimini destekler ve nöromüsküler bağlantının yeniden kurulmasını sağlar [166-168]. Sinirin normal ortamı içinde SC'lerin yanı sıra aktive makrofajlar ve nöronlar TGF- β sekrete ederler. Rejenere aksonların varlığında TGF- β , SC'ler üzerinde modülatördür [168]. Hücre çoğalması ve farklılaşmasında, çeşitli hücre tiplerinde hastalık regülasyonunda, doku onarımı ve diğer birçok fonksiyonun düzenlenmesinde rol alırlar [169-171]. TGF- β , SC'lerde eksprese edilir. TGF- β 'nın baskılanması, SC proliferasyonunu ve apoptozu inhibe eder. TGF- β 'nın upregülasyonu, hücre proliferasyonunu ve apoptozu indükler [172]. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda TGF- β 'nın bazı sinyal yolları aracılığıyla hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyebilen bir otokrin sinyal molekülü grubu olduğunu göstermektedir [173]. TGF- β 'nın farklı hücre tipleri üzerinde farklı etkileri vardır ve aynı hücre üzerinde farklı zamanlarda farklı etkilere sahip olabilmektedir [171, 174]. Travmatik spinal kord yaralanmasını takiben, TGF- β 1 ve TGF- β 2 farklı ekspresyon patternleri ile upregüle edilir [175]. TGF- β yaralı sinir bölgesine makrofajları çekmek için nörokimyasal bir faktör olarak işlev görebilmektedir. Periferik sinir rejenerasyonu sırasında FGF ekspresyonunu upregüle ederek periferik sinir rejenerasyonunu teşvik etmede önemli roller oynar. TGF- β sadece sinir gelişimini ve rejenerasyonunu etkilemez aynı zamanda yaralanmadan sonra inflamasyonu ve apoptozu da etkiler [176-178]. TGF- β ekspresyonu SC proliferasyonunu ve apoptozu etkiler ve Smad-AKT sinyal yollarını aktive eder. Bu

aktivasyon TGF- β ile düzenlenen sinir dejenerasyonu ve/veya rejenerasyonunun moleküler mekanizmaları için temel oluşturmaktan dolayı çok önemlidir [172].

Hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre dışı matris molekülü (ECM) üretimi ve hücre hayatta kalması gibi geniş bir biyolojik yanıt yelpazesini düzenlerler. Çünkü TGF- β bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynamaktadır [179]. Bu yüzden son yıllarda bir dizi hastalık için yoğun araştırma ve klinik denemelerin hedefi olmuşlardır [180].

2.2.4.3 Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler ve S100

Kalsiyum kas kasılmasından hücre farklılaşması ya da hücre ölümüne kadar değişen bir dizi hücresel süreçte yer alan ikinci bir haberci olarak işlev görebilir [181]. Kalsiyum sinyalizasyonu ve hücre içi kalsiyum seviyeleri birkaç tane kalsiyum taşıyıcısı ve membran kanalları tarafından düzenlenir. Kalsiyum bağlayıcı proteinler hücre içi kalsiyum seviyelerinin ve birçok sinyal yolağının düzenlenebilmesini sağlar [181, 182]. Bu kalsiyum aracılı proteinler spesifik hedef prototeinlerine bağlanarak kalsiyum sinyalleri iletirler.

S100 proteinleri çok sayıda hücre içi ve/veya hücre dışı düzenleyici aktivitede rol oynayan ve kalsiyum ile modüle edilmiş proteinleri içeren en büyük familyadır [181, 183]. S100 proteinleri nöral krestten (SC'ler, melanositler ve glial hücreler) türetilen hücrelerde bulunan spesifik bir proteindir. S100 proteinleri farklı hücre tiplerinde intraselüler veya ekstraselüler fonksiyonların düzenlenmesi, hücre apoptozu, proliferasyon, farklılaşma, göç, enerji metabolizması, Ca²⁺ + homeostazi, protein fosforilasyonu ve inflamasyon dahil geniş bir alanda rol alır [181, 184]. Hücre hasarı / stresinden sonra veya nötrofiller ve makrofajlar dahil olmak üzere bağışıklık hücrelerinin aktivasyonundan sonra çeşitli immün ve inflamatuvar süreçlerde kritik role sahip olan ekstraselüler aralığa S100 proteinleri salınır [181, 185]. Alzheimer [186], Parkinson [187] gibi nörodejeneratif hastalıkların ağırlık derecesiyle serum S100 seviyelerinin yakından ilişkili olduğu da tespit edilmiştir [181].

S100 proteinleri lökosit migrasyonuna katkıda bulunarak NF- κ B yollarının aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokin üretimini tetiklemektedir. Vücut sıvılarında çok sayıda S100 proteini tanımlanabildiğinden, belirli bir hastalığı tespit etmek için biyolojik belirteçler olarak kullanılabilirler, artan ekspresyon seviyeleri patolojik durumların göstergesidir. Bazı S100 proteinlerinin travmatik beyin hasarının yönetimi için bir izleme ve takip aracı olarak kullanılabileceği [181, 188], aşırı ekspresyonunda da Down sendromu [181, 189] gibi bazı genetik bozukluklar ve hatta glial patolojinin bir sonucu olarak duygudurum bozuklukları ile ilişkili olabileceği ortaya çıkarılmıştır [181].

S100 ekspresyon seviyeleri, siyatik sinir rejenerasyon araştırmalarında SC'lerin proliferasyonu için belirteç görevi görür [190-192]. Siyatik siniri etkileyen üçüncü derece

arka pati yanık hasarının derecesini ve süresini göstermek için SC'lerde S100 protein düzeyleri kullanılmıştır [191]. Ginsenosid Re'nin sıçan siyatik sinir rejenerasyonunu teşvik etmek için SC'lerde S100 ekspresyonunu büyük ölçüde arttırdığı bildirilmiştir [190]. Keza siyatik sinir yaralanma deney modelinde sıçanlara Frankincense ekstresi uygulamasından sonra SC'lerde S100 ekspresyonunda artış ve siyatik sinirde rejenerasyon gösterilmiştir [192].

2.3.Periferik Sinir Yaralanmalarında Deneysel Modeller

Hayvan modelleri, periferik sinir hasarı ve rejenerasyon araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır, çünkü periferik sinirlerin anatomisinde ve insanlar ve hayvanlar arasında sinir rejenerasyonunun fizyolojisinde sadece küçük farklılıklar vardır. Hayvan modelleri, özellikle kemirgenler bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvan modelleri sinir cerrahisinde popülerdir çünkü periferik sinirlerin anatomisi ve sinir rejenerasyonunun fizyolojisi hayvanlarda ve insanlarda benzerdir. Bu nedenle, sinir deneyleri bir hayvan modelinde kolayca kopyalanabilir. Uzunluğa bağlı sinir rejenerasyonu ve uç organ reinnervasyonunun insanlara göre daha hızlı olması nedeniyle genellikle daha küçük boyutlu hayvanlar tercih edilir [193].

Sinir cerrahisindeki hayvan modelleri kemirgenler ve kemirgen olmayanlar olarak ikiye ayrılabilir. Kemirgenler, sıçan, fare, kobay, hamster, vb. gibi hayvanları içeren üst ve alt çenede büyüyen kesici dişlerin varlığı ile karakterize edilir. Sinir cerrahisinde kemirgen olmayan modeller tavşan, maymun, at, kedi, köpek, koyunları domuz vb. içerir. Bulunabilirlik kolaylığı, düşük bakım ve bakım maliyeti, toplumsal kabul ve ameliyat sonrası enfeksiyonlara göreceli direnç, sinir cerrahisinde en yaygın kullanılan hayvan modeli olan sıçanı yapmıştır [194, 195].

Maymun, at ve köpek gibi daha büyük hayvanların tedarik edilmesinin zorluğu, taşınma ve bakımının pahalı olması nedeniyle nadiren kullanılır. Yaygın olarak kullanılan sıçan türleri Wistar, Sprague-Dawley, Lewis, vs.'dir. Siyatik sinir, sinir deneyleri yapmak için en yaygın kullanılan sinirdir [194, 196, 197]. Çünkü en büyük sinirdir, bu da kullanım ve onarım daha kolaylığı sağlar [198].

Sıçanda yaygın olarak kullanılan diğer sinirler peroneal, tibial, radyal, median ve ulnar sinirlerdir. Ön ayakların sinirleri, daha küçük boyutlarından dolayı nadiren kullanılır, özellikle de fareler gibi daha küçük hayvanlarda, bu sinirleri idare etmek ve onarmak için gelişmiş mikrocerrahi becerileri gereklidir. Doğru "lezyon" seçimi, çalışma hedeflerine bağlıdır. Genel olarak, "aksonotmezis modeli", sinir rejenerasyonunun biyolojisini incelemek ve özellikle nöropatik ağrıda yeni farmakolojik ve terapötik ajanları test etmek için seçilir.

Çeşitli sonuç değerlendirme parametrelerindeki farklılıklar müdahalenin etkinliğini kanıtlamaya yardımcı olacağından, 'nörotmezis modeli' genellikle terapötik müdahalelerin klinik öncesi çalışmalarında kullanılır. Ön ayak sinirinin arka bacak sinirine üstünlüğü veya tam tersi kesin olarak belirlenmemiştir. Deneylerin çoğu karışık sinirler üzerinde yapılmıştır; ancak klinik hedefe bağlı olarak saf motor, saf duyu veya otonomik sinir de seçilebilir. Otonom sinirler genellikle ürolojik çalışmalar için seçilir [197]. Bir duyu siniri, motor sinire kıyasla daha az etkili sinir yenilenmesine sahiptir [199].

Cerrahi tekniklerin gelişmesine rağmen, onarım sonrası mümkün olan en iyi sonuçlar belli bir seviyede kalmıştır. Bu nedenle, hayvanlardaki sinir çalışmalarının çoğunun amacı, sinir onarımını takiben periferik sinir rejenerasyonunu iyileştirmektir. İnsanlarda ve daha büyük hayvanlarda, özellikle primatlarda sinir rejenerasyonu çalışması, yenilenen sinirin yavaş büyüme hızı ve maliyet ve etik hususlar tarafından gölgelenmiştir. Kemirgen modelleri bu nedenle tercih edilmektedir [200].

Nöropatik ağrı, 'tüm işkencelerin en kötüsü' olarak tanımlanmıştır. İnsanlarda nöropatik ağrının kopyalanması, geri dönüşü olmayan sinir hasarına neden olabilir ve bu nedenle işlem insanlarda yapılmaz. Sıçan, deneylerde en çok kullanılan hayvandır. Nöropatik ağrı çok sayıda nedene bağlı olabilir, bu nedenle hayvanlarda klinik senaryoyu kopyalamak için çok sayıda model tanımlanmıştır. Bunlar arasında tam sinir transeksiyon modeli, sinir etrafındaki bağların kullanıldığı kronik daralma yaralanması modeli, kısmi siyatik sinir ligasyonu modeli, korunmuş sinir yaralanması modeli (tibial, peroneal sinir tamamen kesilirken sural sinir sağlam bırakılır), siyatik sinir kryoöliz (siyatik sinir bir kriyoprob ile -60 ° C'ye dondurulur), siyatik inflamatuvar nörit (nöriti indüklemek için tümör nekroz faktörü- alfa veya zimosan veya deniz yosunu proteini enjeksiyonu), lazerle indüklenen siyatik sinir hasarı, fotokimyasal indüklü sinir hasarı ve çeşitli ilaç kaynaklı nöropati modelleri vardır. Bu modeller, nöropatik ağrıyı tedavi etmek için yeni ilaçların farmakolojik etkinliğini test etmek için çalışılmıştır [201].

Sonuçların değerlendirmesi, deneysel grupları birbirleriyle karşılaştırılabilir hale getiren sinir rejenerasyonunun derecesini doğru bir şekilde belgelemek için önemlidir. Motor fonksiyonel değerlendirme, sonucu değerlendirmek için en yaygın yöntemlerden biridir. Yürüyüş; siyatik fonksiyonel indeks, adım uzunluğu oranı, yürüme yolu analizi, merdiven basamak analizi, Basso-Beattie-Bresnahan skoru ve bilgisayarlı yürüyüş analizi (Cat Walk sistemi) gibi çok sayıda parametre ile analiz edilebilir [202]. Ön ayak motor fonksiyonu; kavrama testi, Irvine-Beatties-Bresnahan (IBB) ön ayak ölçeği ve merdiven testi vb. İle değerlendirilebilir [197, 203, 204]. Duyusal fonksiyon değerlendirmesi termal duyarlılık test ve Von-Frey testi kullanılarak yapılabilir [205, 206]. Elektromiyografi (EMG) ve bileşik

motor aksiyon potansiyeli (CMAP) kullanarak elektrofizyolojik değerlendirme sinir fonksiyonunun değerlendirilmesine yardımcı olur. Sinir hasarı bölgesine proksimal ve distal olarak kaydedilen CMAP'ler, fonksiyonel sinir iyileşmesinin değerlendirilmesine yardımcı olur [205, 207].

Sinir segmentinin histolojik ve histomorfometrik analizi, fonksiyonel ve elektrofizyolojik değerlendirmeyi tamamlar yenilenen aksonların sayısının, miyelin kılıfının varlığının ve kalınlığının, perinöral adezyonların ve fibrozun değerlendirilmesinde son derece faydalıdır [202].

Hayvan deneyleri genellikle klinik senaryo ile uyuşmayan başka hastalıklardan arınmış çok genç hayvanlar üzerinde yapılır. Bu nedenle, bazı araştırmacılar diyabet, enfeksiyon vb. Hastalıkları olan yaşlı hayvanlar ve hayvanlarla deneyler yaptılar [208]. Sinir rejenerasyonundaki hayvan çalışmalarının çoğu, akut bir ortamda 1 cm'den daha az sinir boşluğuna sahip bir sinir transeksiyonu ve koaptasyon modeli kullanır [194]. Hayvanlarda gecikmiş sinir onarım modelleri nadiren tanımlanmıştır [209]. Bununla birlikte, klinik ortamdaki sinir yaralanmalarının çoğu gecikmiş bir prezentasyona, daha uzun sinir boşluklarına sahiptir ve doğada nadiren temiz bir kesilme meydana gelir. Klinik ortamlarda gerilme, yırtık, nöroma oluşumu veya tüm bu yaralanma modlarının bir kombinasyonu görülür; ancak, nadiren hayvan modellerinde tarif edilirler [195, 210]. Bu nedenle, hayvan modellerinde sinir yenilenmesinin dikkat çekici sonuçları bu sınırlamalar akılda tutularak yorumlanmalıdır.

Hayvanların, hayvan türlerinin, sinir yaralanma modellerinin standardizasyonu ve sinir rejenerasyonu ve iyileşmesinin sonuç değerlendirme kriterleri, hayvan deney verilerini birbiriyle karşılaştırılabilir kılmak için kritiktir [193]

2.4. Periferik Sinir Yaralanmalarında Elektrodiagnostik

Elektrodiagnostik, periferik sinir yaralanması sonrası tanısal doğruluğu artırmak için geliştirilmiştir [211]. Klasik olarak elektrodiagnostik tanı yöntemlerinden yaralanma sonrası patolojik bulguların zamanlamasının daha iyi anlaşılması bakımından faydalanılmaktadır [212, 213]. Periferik sinir lezyonlarını değerlendirmek için en uygun elektrodiagnostik yöntemler iğne elektromiyografi (EMG) ve sinir ileti çalışmalarıdır (NCS) [214, 215]. Aksonal hasar innerve edilen motor birimlerinde fonksiyonel ve yapısal değişiklikleri neden olur, sonuç olarak etkilenen motor ünitelerin elektriksel özelliklerinde değişikliklere neden olur. EMG'nin periferik sinir yaralanmalarındaki diagnostik değeri de böyle izah edilmektedir. Yerleşik elektrodiagnostik yöntemlerin önemli bir eksikliği, nörotmezis ve total aksonotmezis arasında önemli bir ayrım yapılmasına yardımcı olmamasıdır. Burada

unutulmaması gereken nokta periferik sinir yaralanmasındaki klinik bulguların, en az laboratuvar, radyolojik ve EMG testleri kadar tanı koydurucu ve değerli olduğudur [216].

2.5. Periferik Sinir Yaralanmalarının Tedavisinde Tarihsel Süreç

Milattan sonra ikinci yüzyılda Galen yaşadığı dönemde dini inanışlar nedeniyle kadavra çalışması yapamamasına rağmen gerçekleştirdiği birçok hayvan deneyi ile periferik sinir anatomisini çalışmış ve sinirlerin kopunca tekrar iyileştirilemeyeceğini belirtmiştir Avrupalılar tarafından Avicenna ismi ile tanınan ve M.S. 980-1037 yıllarında yaşayan İbn-i Sina "Tıp Kanunu" kitabında anatomi ve fizyoloji ile ilgili konulara da yer vermiştir. İbn-i Sina eserlerinde Hippocrates ve Galen' in görüşlerinden de yararlanmıştır [217]. Arap cerrahlar 9. ve 10. yüzyıllarda periferik sinir kesilerinde sutureasyon uygulamıştır [218, 219]. Sinirlerin tübüler yapısı Du Trochet tarafından 1824' de tanımlanmıştır. 1839'da Schwann kendi adıyla anılan sinir kılıfını tanımlamıştır. Waller ise 1850'de aksonal hasarın distalinde dejenerasyon olduğunu ve distal aksonun onarımının fonksiyonu düzelteceğini ileri sürmüştür. Sinir defektlerini sinir greftleri ile onarma fikri ilk kez Philippeaux ve Vulpian tarafından ortaya atılmış, ilk klinik uygulama ise 1878 yılında Albert tarafından yapılmıştır. Bu konuda ilk başarılı sonuç ancak 20. yüzyılın başlarında Mayo Robson tarafından yayınlanmıştır. 1945'te ise Sunderland, sinir onarımlarında mikrocerrahi teknikleri tanımlamıştır. 1963 yılında operasyon mikroskoplarının kullanıma girmesi de sinir cerrahisi açısından önemli bir dönüm noktası olmuştur. Mikrocerrahi tekniklerin gelişmesiyle birlikte sinir cerrahisinde gözlenen önemli ilerlemelerden birisi de 1967 yılında Bora tarafından gerçekleştirilen perinöral onarımın keşfidir. Yirminci yüzyılın başında ise anatomi ve cerrahi açısından bilgiler artmış ve cerrahide gelişmeler olmuştur. Günümüzde periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde mikrocerrahinin yanı sıra sinir rejenerasyonuna yardımcı olmak amacıyla farmakoterapik tedaviler üzerine yoğunlaşmıştır.

2.6.Sinir Rejenerasyonunda Farmakoterapi

Tıp ve cerrahinin diğer birçok sahasında farmakolojinin büyük ilerlemelerine rağmen, travma ve rekonstrüksiyon sonrası sinir rejenerasyonunu özel olarak iyileştirmek için hala yerleşik bir ilaç tedavisi protokolü yoktur. Tabii ki, bu hastalara eşzamanlı oluşan durumlar için tedavi amacıyla çeşitli postoperatif ilaçlar (örneğin, enfeksiyonlar için antibiyotikler) verilebilmektedir. Genellikle sinir cerrahisi sonrası sinir rejenerasyon ve maturasyon derecesini artırmak için özel bir ilaç verilmemektedir. Spesifik sinir rejenerasyonunu teşvik eden hiçbir ilaç hala girmemiş olsa da klinikler, deneysel olarak çeşitli farmakolojik yaklaşımların bu kompleks iyileşme süreci üzerinde olumlu bir etkisi

olabilecek birçok çalışma öne sürmüştür. Görünen o ki sinir rejenasyonunu ve gelişimini teşvik eden ilaçların bulunması için klinik çalışmalarının çok uygun olduğu bir zaman dilimindeyiz [220].

2.7. Asiatik Asit'in Yapısı ve Etkileri

2.7.1. Centella Asiatica

Centella asiatica Asya'da yaygın olarak kullanılan tıbbi bir bitkidir [221, 222]. Özellikle Hindistan, Endonezya, Çin, Malezya gibi Güney Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılan maydanozgiller ailesine ait şifalı bir bitkidir [223]. Nehir kenarlarında ve sulak arazilerde yaygın şekilde bulunur. Çin, Sri Lanka, Malezya ve Nepal'de cilt problemleri ve yara iyileşmesi için kullanılır. Ayrıca Hindistan'da sinir sistemi hastalıklarında kullanıldığından beyin gıdası olarak da isimlendirilmiştir [224]. 19. yüzyılda Amerika'da şifalı bitkilerin tıbbi amaçla kullanılabileceğini düşünen hekimler lepra tedavisi için *Centella asiatica*'nın kullanımının faydalı olduğunu rapor etmişlerdir. 1888 yılında Melbourne Uluslararası Yüzyıl Sergisinde ilaç olarak sergilenmiştir [225]. *Centella asiatica* kökleri tüysüz, çizgili ve yumru şeklinde, kendisi sarmaşık , çiçekleri şemsiye şeklinde, zayıf aromatik, genellikle 15 cm boyuna ulaşan bir bitkidir [226].



Şekil 12: *Centella Asiatica* bitkisi

Centella asiatica demir, kalsiyum, potasyum ve magnezyum gibi minerallerce ve K, C, E ve B gibi vitaminlerince zengindir. Ayrıca beta karoten, lutein, neoksantin, zeoksantin içerir. *Centella asiatica*'nın ana kimyasal bileşikleri triterpenlerdir. Ana bileşenleri asiatik asit, madekasik asit, madekosid, tankunisid, brahmosid ve brahmik asittir [225]. Bu tıbbi bitkinin aktif bileşen içerisinde asıl olanı bir triterpenoid olan asiatik asittir [227]. *Centella*

asiaticadan elde edilen biyoaktif bir bileşik olan Asiatic asitin (AA) antioksidan, antiinflamatuvar ve hepatoprotektif aktiviteler gibi multipl etkileri vardır [228].

2.7.2. Asiatik Asit

Asiatik asit (AA) doğal bir pentasiklik triterpenoid olup birçok yenilebilir bitkisel gıdada doğal olarak bulunur [229]. AA' nın birkaç hastalıkta çok güçlü tedavi edici etkisi olduğunu gösterilmiştir ve geniş farmakolojik etki sahası nedeniyle oldukça umut vaat eden bir bileşiktir [7]. AA'nın farmakolojik etkileri şöyle sıralanabilir.

2.7.2.1. Asiatik Asitin Kanserde Kullanımı

AA gibi triterpenoidler tarafından modüle edilen moleküler hedefler; sitokinler, kemokinler, onkojenler, COX-2, 5-LOX ve MMP'ler gibi inflamatuvar enzimler, anti-apoptotik proteinler, tümör hücresi çoğalmasını, dönüşümünü, hayatta kalmasını, invazyonunu, anjiyogenezini, metastazını, kemorezistansını ve radyorezistansı düzenleyen AP-1, CREB ve NRF2 (nükleer faktör like 2 ile ilişkili faktör), NF-κB, STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerinden oluşur [230].

AA etkinliği farklı tip kanserlerde invitro ve invivo olarak çalışılmıştır. AA'nın enflamasyonu azalttığı, tümör hücresi proliferasyonunu inhibe ettiği ve mitokondriye bağımlı bir yolla apoptozu indüklediği gösterilmiştir [231]. AA'nın moleküler hedefleri olan NRF2 ve NF-κB üzerinden serbest radikallerin temizlenmesi ve hücrel apoptozisi engellenmesi şeklindedir [232]. Bu etkileri sayesinde antikanser, sitoprotektif, kemosenesitizör etkileri oluşturur ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyip apoptozisini indükler. Anti-kanser etkinliği, çeşitli tümör hücrelerinde transkripsiyon faktörü NF-κB, p38 MAP ve ERK kinazlarını inhibe etme kabiliyetine atfedilir [231, 233-235]. Birçok çalışma AA'nın glioblastoma multiforme hücrelerinde kaspazlar gibi proteinlerin ekspresyonunu düzenleyerek apoptotik ölümü indüklediğini göstermektedir [236]. AA'nın glioblastoma multiforme hücrelerinde hücre içi Ca düzeylerini arttırdığı ve tümörde hücrel hasara neden olduğu gösterilmiştir [237]. Aynı şekilde AA' nın hücre içi kalsiyum salınımını artırarak insan hepatoma hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir [237]. AA'nın kolon kanseri hücrelerinde IL-8'i belirgin azalttığı gösterilmiştir [238]. AA'nın topikal uygulamasının NO oluşumunu, iNOS ve COX2 ekspresyonunu inhibe ederek farelerde deri tümörü oluşumunu azalttığı gösterilmiştir [239]. AA'nın p53'den bağımsız olarak da serbest oksijen radikallerinin üretimini artmasına ve kaspaz-3 yolağının aktive olmasını sağlayıp apoptozisi indüklediği gösterilmiştir [235]. Tümöral hücreler mitokondri membranının permeabilitesinin artmasına sebep olarak sitokrom C'nin mitokondri içinden

sitozole salınmasına sebep olup hem kaspaz-3'ün aktifleşmesine hem de kaspaz-9'un aktifleşmesine sebep olarak irreversibl hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir [231].

2.7.2.2. Asiatik Asitin Karaciğer Hastalıklarında Kullanımı

AA'nın hepatositleri hücresel antioksidan sistem mekanizmaları üzerinden hücre hasarından koruduğunu göstermiştir [240]. AA'nın TGF- β 'nin otokrin etkisini bloke ederek keloid fibroblastlardan ve hepatik stellat hücrelerinden kollojen matriks üretilmesini engelleyip, TGF- β /Smad sinyal yolağının indüklediği bu sayede karaciğer fibrozisinin tedavisinde kullanılabileceğini gösterilmiştir [237]. Karaciğer fibrozu, karaciğer yetmezliğinin başlıca nedenidir, ancak etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Ratlarda karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulan karaciğer fibrozunda AA'nın anti-hepatofibrotik ve hepatoprotektif aktiviteleri gösterilmiştir. AA'nın fibrozis üzerindeki hepatoprotektif etkileri hepatik Smad7'nin upregülasyonu ile ilişkilidir. AA, TGF- β sinyalizasyonunun bir inhibitörüdür, böylece TGF- β 1 ve CTGF(connective tissue growth factor) 'nin upregülasyonunu bloke eder [240].

Ayrıca AA'nın intragastrik uygulanması ile oksidatif stresi azaltarak etanole bağlı gelişen karaciğer toksisitesini azalttığı gösterilmiştir [241]. Ratlarda yapılan bir çalışmada üç hafta boyunca günlük 10-20 mg/kg AA alınması ile yüksek karbonhidrat ve yağlı diyetle bağlı gelişen glukoz intoleransını, hipertansiyonu, oksidatif ve inflamatuvar stresi azalttığı gösterilmiştir [242]. Yapılan bu çalışmalar yağlı diyetle bağlı gelişen karaciğer hastalıklarında AA'nın antilipojenik, antioksidatif ve antienflamatuvar etkileri sayesinde tedavide kullanılabileceğini desteklemektedir.

2.7.2.3. Asiatik Asitin Apoptozisde Etkisi

Apoptozis proapoptotik proteinlerin indüklenmesi ve antiapoptotik proteinlerin inhibisyonuyla hücrenin uyarıldığı programlanmış hücre ölümü sürecidir [243]. BCL-2 hücre büyümesinde ve antiapoptotik süreçte ana düzenleyicidir ve apoptozu regüle eder. AA bazı kanser hücrelerinde BCL-2 ve BCL-XL ekspresyonunu etkileyerek apoptoziste rol oynar [241].

2.7.2.4. Asiatik Asitin Diyabette Kullanımı

AA'nın glikasyon son ürünlerinin oluşumunu bloke ederek sağladığı antioksidan etkiyle diyabetik nefropati ve nöropati gelişimini azalttığı gösterilmiştir [244]. Yapılan deneysel bir çalışmada AA'nın tip-1 diyabetik farelerde glukoz seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir [245]. Yapılan bir başka deneysel çalışmada AA'nın kan insülin seviyesini

artırarak glukoz seviyesini düşürdüğü ve glukoz metabolizmasındaki anahtar enzimlerin düzenlenmesini revize ettiği, iskelet kaslarında P13K-Akt sinyal yolağını üzerinden glukoz alımını artırarak antihiperglisemik etkisini geliştirdiği ve lipid peroksidasyonunu engellediği gösterilmiştir [246]. Yine streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda yapılan bir araştırmada AA'nın karbonhidrat metabolizmasının hepatik enzimlerinin aktiviteleri üzerine antihiperglisemik etkisini değerlendirilmiştir. Sonuç olarak AA'nın STZ'ye bağlı diyabetik sıçanlara oral tedavisinin kan glukoz düzeylerini düşürdüğü açıkça gösterilmiştir [247].

2.7.2.5.Asiatik Asitin Antiinflamatuvar Etkisi

AA'nın NOS enzim aktivitesini etkileyerek antiinflamatuvar, süperoksit dizmutaz gibi antioksidan enzim aktivitelerini artırarak da antioksidan etki oluşturduğu gösterilmiştir [9]. AA'nın ayrıca NF- κ B' nin downregülasyonu ve MAPK fosforilasyonunun baskılanması ile NOS, COX2, İL-1b, İL-6 ve TNF-a ekspresyonunun inhibisyonu ile de antiinflamatuvar etki gösterdiğini rapor edilmiştir [10]. MAPK ve NF- κ B sinyal yolağını uyararak oksidatif ve inflamatuvar yolağı başlattığı, serbest oksijen radikallerini ve PGE2 üretimini azalttığı, NADPH, COX2, MAPK ve NF- κ B enzimlerinin aktiviteleri engelleyerek dokuları oksidan ve inflamatuvar etkiden koruduğu gösterilmiştir. AA'nın mitokondriyal membran stabilizasyonunu artırarak NADPH oksidaz, PGED2, p65 ekspresyonunu azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği de görülmüştür [248]. Metabolik sendromlu farelerde AA kullanımının antioksidan etki ile metabolik abnormaliteleri düzelttiği [242], yine lipopolisakkaritlerin indüklediği fulminan karaciğer hasarında AA'nın antioksidan etkisi sayesinde bu hasarı azalttığını gösterilmiştir [228]. AA'nın PA (phthalic anhydride) ile indüklenen alerjik dermatit hayvan modelinde NOS ve COX-2 ekspresyonuna katkıda bulunan NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum AA'nın alerjik dermatit için umut verici bir ajan olabileceğini düşündürmektedir [249].

2.7.2.6.Asiatik Asitin Osteoartritte Kullanımı

Osteoartrit, eklem kıkırdağının ilerleyici dejenerasyonu ile karakterize en yaygın görülen eklem hastalığıdır. Eklem kıkırdağındaki patoloji kondrosit hipertrofisi ve fibrozisdir. AA'nın AMPK / PI3K / AKT sinyal yolunu hedefleyerek eklem kondrositlerinin kondrojenik fenotipini aktive, hipertrofik ve fibrotik fenotipini inhibe ettiği gösterilmiştir [250].

2.7.2.7.Asiatik Asitin Antioksidan ve Nöroprotektif Etkisi

AA'nın oksidatif stresi azaltarak glutamat bağımlı kognitif defisitleri hafifletebildiği tespit edilmiştir [251]. Nöroproteksiyon beyin fonksiyon ve yapılarının muhafaza edilmesi olarak tarif edilmektedir. Nörodejenerasyon beyin fazla miktarda oksidatif strese, inflamasyona, mitokondriyal disfonksiyona, protein defisitlerine veya başka nörotoksik ajanlara maruz kalması sonucu oluşur. AA nöroprotektif etkisini kan beyin bariyerini stabilize ederek ve mitokondriyal metabolizmayı düzenleyerek sağlar [11]. AA, fokal embolik stroke karşı beyin mitokondrilerinden sitokrom c'yi ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını azaltarak nöroprotektif etki sağlamaktadır [252].

Spinal kord travması sonrası verilen AA'nın lipit peroksidasyonu azalttığı ve çeşitli proinflamatuvar sitokinleri azaltarak motor fonksiyonlarda iyileşme sağladığı gösterilmiştir [253]. AA'nın hipokampal nörojenezi artırarak öğrenme ve hafızada artış sağladığı [254], hipokampal nöronlarında dentritik arborizasyon sağladığı ve bu şekilde sinaptik bağlantılarını artırdığı ve de hipokampus subgranüler zonunda nöronal proliferasyonu artırdığı görülmüştür [255]. Bu çalışmalar AA'nın öğrenme ve hafıza kusuru yaşayan hastalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca AA'nın mitokondriyal disfonksiyonu ve metaloproteinaz-9 indüksiyonunu azaltarak serebral enfarktüsde iskemiye bağlı hasarı azalttığı gösterilmiştir [256].

2.7.2.8.Asiatik Asitin Parkinsonda Kullanımı

Parkinson hastalığı (PD), dopaminerjik nöronların kaybıyla ortaya çıkan sonuçta yaşlı popülasyonlarda hareket bozukluğuna yol açan kronik nörodejeneratif bir hastalıktır ve patogenezi; oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz gibi çeşitli faktörlerle ilişkilidir. Asiatik asit (AA) glutamat toksisitesine karşı nöroproteksiyon sağlayan antioksidan ve antiinflamatuvar ajandır. İn vitro PD modelinde rotenon (mitokondriyal kompleks I inhibitörü) ile mitokondriyal disfonksiyon yapılmış ve AA verilmesinden sonra disfonksiyonun tersi yönde işlediği gösterilmiştir [257].

2.7.2.9.Asiatik Asitin Antiepileptik Etkisi

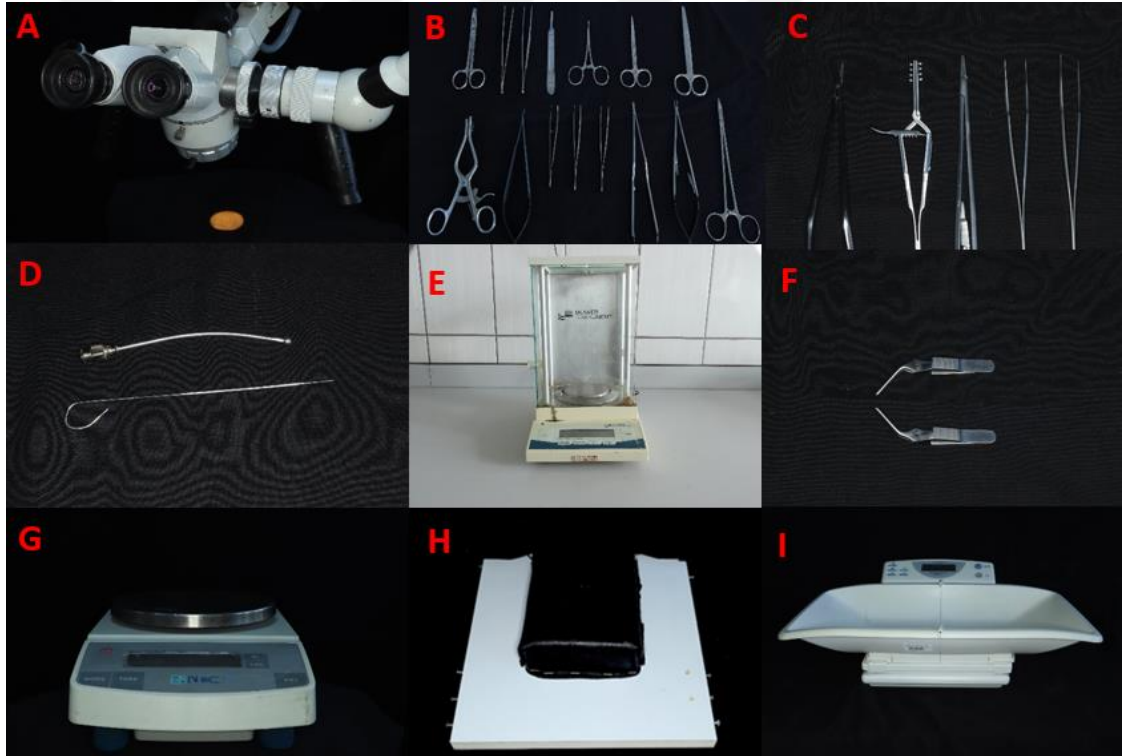
Centella asiatica'nın özellikle tıbbi nitelikleri üzerine yapılan kapsamlı çalışmalarda nöroprotektif etkinliğinin yanısıra antiepileptik aktivitesine de ilgi duyulmuştur [258, 259]. AA'nın kan-beyin bariyerine serbestçe nüfuz ettiği [260], bu şekilde antioksidan, antiinflamatuvar, bilişsel güçlendirici, nöroprotektif ve antiepileptik özelliklere sahip olduğu [261, 262] ve de presinaptik olarak sıçan hipokampusünde glutamat salınımını bastırarak antiepileptik etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir [263].

3)GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Denekler

Erzurum Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 18.02.2020 tarihli ve 42190979-000-E.2000053833 sayılı izni ile yapıldı. Denekler Erzurum Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi. Ağırlıkları 200- 250 gr arasında olan 56 tane erkek Sprague-Dawley rat kullanıldı. Deneklerin sağlıklı, daha önce ilaç verilmemiş ve herhangi bir deneyde kullanılmamış olmalarına dikkat edildi.

Denekler cerrahi işleme başlamadan 12 saat önce aç bırakıldı ve ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Deneklerin 28 günlük deney boyunca ağırlıkları günlük ölçüldü ve ilaç doz ayarlamaları ağırlıklarına uygun olarak hassas terazide yapıldı ve gavajla oral yolla deneklere verildi. Deneyler mikroskop eşliğinde ve mikrocerrahi ekipmanları ile yapıldı (Şekil 13).



Şekil 13: Deneyler için kullanılan ekipmanlardan bazıları

(A: Mikroskop, B: Mikrocerrahi set C: Makrocerrahi set, D: Gavaj, E: İlaç doz ayarı için kullanılan hassas terazi, F: Aksonotmezis tipi sinir yaralanması yapmak için kullanılan Dietrich bulldog klemp, G: EPT testi için kullanılan hassas terazi, H: Deney tahtası, I: Denek ağırlıklarının ölçülmesi için kullanılan hassas terazi)

Deneyler sırasında kullanılan Asiatic Asit ürün bilgileri; Alfa Aesar™ Asiatic acid, %97 500 mg, H60149. ME, Code: NEW, Additional Details: CAS Number: 464-92-6, product of China, ThermoFisher (Kandel) /Germany şeklindedir.

Üretici firma tarafından iyofilize halde -20°C’de soğuk zincirde teslim edilen AA, oda sıcaklığında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı’nda deneklerin ağırlıklarının ölçülmesini takiben günlük doz miktarına uygun olarak dimetil sülfoksit (DMSO) yardımı ile çözüldü. Denekler öncelikle 3 ana gruba ayrıldı. Grup1 (kontrol grubu) :8 rat, Grup2 (aksonotmezis grubu): 24 rat, Grup3 (nörotmezis grubu): 24 rat ile oluşturuldu. Sonrasında Grup2 ve Grup3 kendi içerisinde eşit olarak üç gruba ayrılarak (2A: 8 rat, 2B: 8 rat, 2C:8 rat, 3A:8 rat, 3B:8 rat, 3C:8 rat) toplamda herbiri sekizer denek içeren 7 alt grup oluşturuldu.

1. Kontrol grubu (n:8):

Bu gruptaki ratlarda, cerrahi diseksiyon ile siyatik sinirler ortaya kondu ve siyatik sinire herhangi bir travma uygulanmadı.

2. Aksonotmezis tipi yaralanma kontrol grubu (n:24):

2A. Klempleme yöntemi ile siyatik sinir yaralanması oluşturuldu ve ilaç uygulanmayıp oral serum fizyolojik verildi.

2B. Klempleme yöntemi ile siyatik sinir yaralanması oluşturuldu ve oral 28 gün boyunca günde tek doz 10 mg/kg AA verildi.

2C. Klempleme yöntemi ile siyatik sinir yaralanması oluşturuldu ve oral 28 gün boyunca günde tek doz 20 mg/kg AA verildi.

3. Nörotmezis tipi yaralanma grubu (n:24):

3A. Mikromakas ile cerrahi mikroskop altında tam kesi ile siyatik sinir yaralanması oluşturuldu, sonrasında 10/0 sütür ile cerrahi mikroskop altında uç uca anastomoz yapıldı ve ilaç uygulanmayıp oral serum fizyolojik verildi.

3B. Mikromakas ile cerrahi mikroskop altında tam kesi ile siyatik sinir yaralanması oluşturuldu, sonrasında 10/0 sütür ile cerrahi mikroskop altında uç uca anastomoz yapıldı ve oral 28 gün boyunca günde tek doz 10 mg/kg AA verildi.

3C. Mikromakas ile cerrahi mikroskop altında tam kesi ile siyatik sinir yaralanması oluşturuldu, sonrasında 10/0 sütür ile cerrahi mikroskop altında uç uca anastomoz yapıldı ve oral 28 gün boyunca günde tek doz 20 mg/kg AA verildi.

3.2. Uygulama

3.2.1. Anestezi ve Genel Cerrahi

Denekler cerrahi işlemden 12 saat önce aç bırakıldı. Deneklere Ketamin Hidroklorür (Ketalar® flakon, Parke-Davis lisansı ile Eczacıbaşı İlaç Sanayi İstanbul) 50 mg/kg ve Xylazin (Rhompun® enjektabl flakon, Bayer Türk Kimya Sanayi İstanbul) 10 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanarak genel anestezi sağlandı.

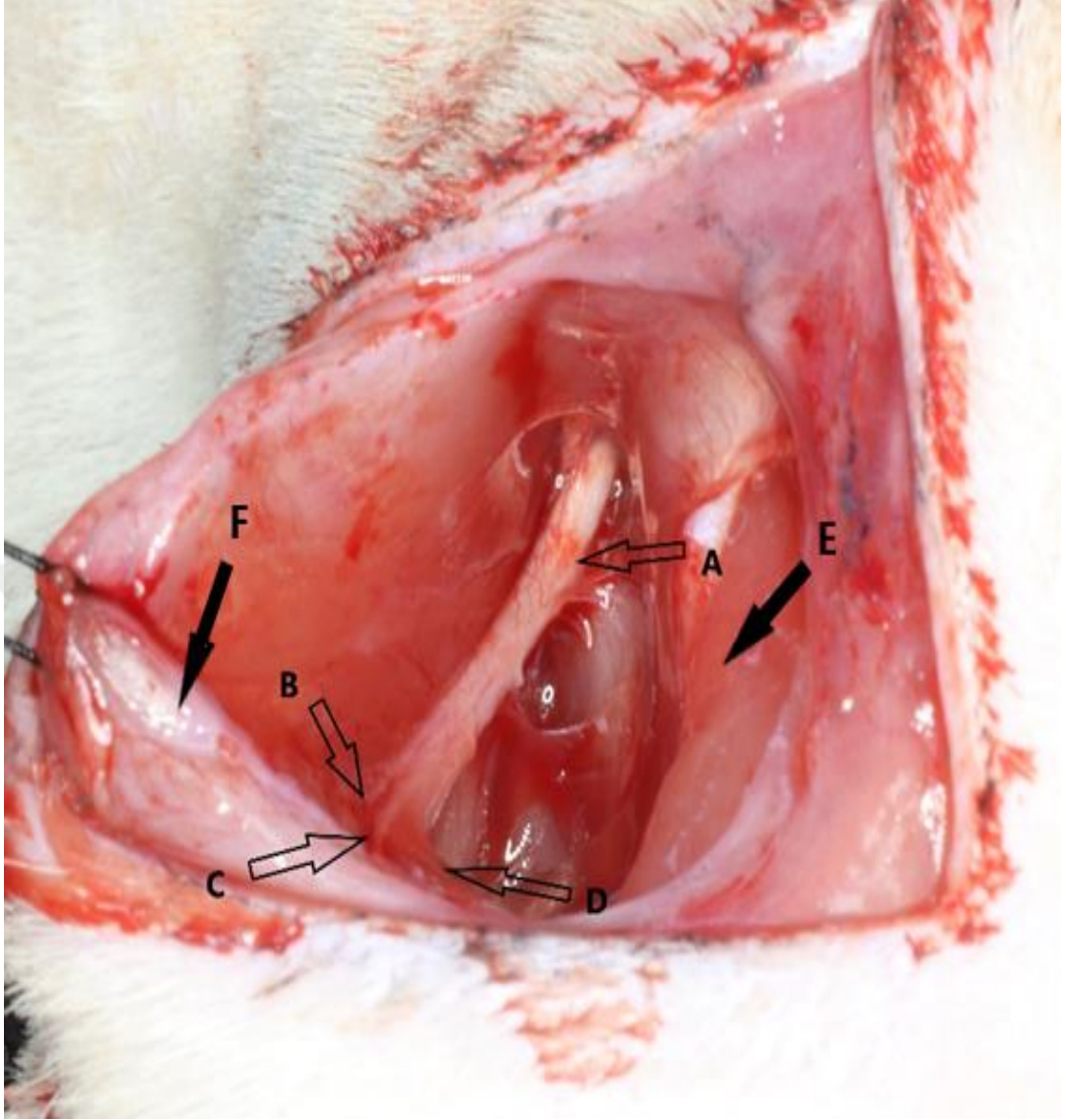
Deneyde tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından standart cerrahi teknikler kullanılarak uygulandı. Cerrahi işlem tatbik edilirken standart pozisyonun temini için denekler deney tahtası üzerinde prone pozisyonunda sabitlendi.

Cerrahi işlemden önce operasyon ve pansuman kolaylığı açısından bilateral gluteal ve uyluk lateral bölgeleri traş edildi ve tüm deneklerde cerrahi işlem sağ siyatik sinir üzerinde gerçekleştirildi (Şekil 14).



Şekil 14: Cerrahi işlem için gluteal ve uyluk lateral kısımları traş edilen denekler

Deneğe operasyon tahtası üstünde prone pozisyon verildi. Denek kan dolaşımını bozmayacak şekilde dört ekstremiteden bağlanarak sabitlendi. Sağ gluteal ve uyluk lateral bölgesi traş edildi. Povidon iodine ile insizyon yeri temizliği yapıldı. Operasyon sahası siyah steril örtü ile örtüldü. Sağ alt ekstremitede kalça eklemi hizasından femoral kemiğe paralel şekilde oblik gluteal 3 cm'lik insizyon yapıldı. Cilt sıyrılarak biceps femoris kasına ulaşıldı. Biceps femoris ve gluteus superficialis komşuluğundan girişim yapıldı. Vastus lateralis görüldü. Biceps femoris posterioara doğru ekarte edildi. Siyatik sinir ortaya çıkarıldı (Şekil 15).



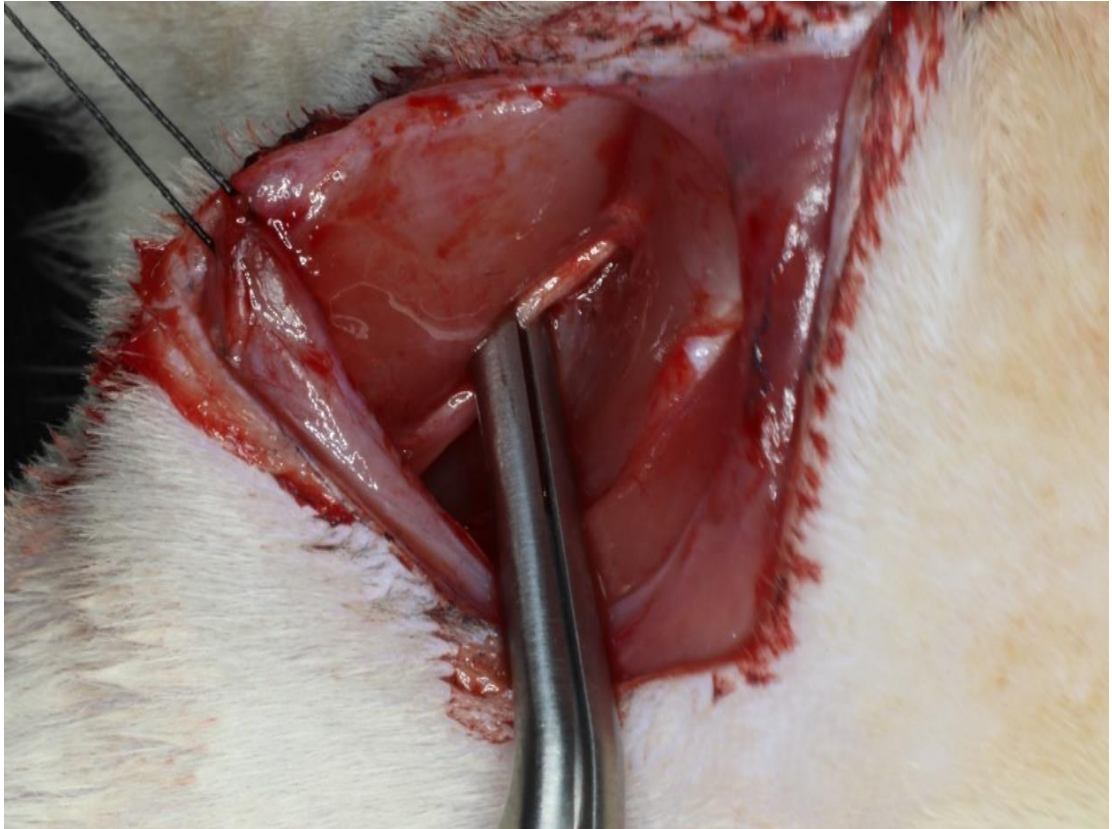
Şekil 15: Anatomik olarak siyatik sinirin ortaya çıkarılması

(**A:** n.ischiadicus, **B:**n.suralis, **C:** n.tibialis, **D:** n.peronealis, **E:** m.gluteus süperficialis, **F:** m.biceps femoris)

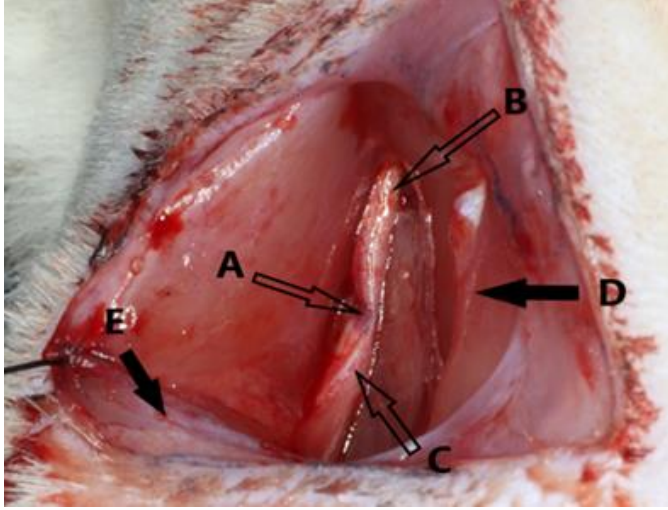
3.2.2. Sinir Yaralanması Oluşturma

3.2.2.1. Aksonotmezis Oluşturma Modeli: Klempleme Yöntemi

Aksonotmezis hasar modeli için, sıçan siyatik sinir ezilme tarzı yaralanma modeli kullanıldı. Bu model, periferik sinir rejenerasyonunun hücresel ve moleküler mekanizmalarını ve rejenerasyon süreci üzerine değişik faktörlerin etkilerini incelemek için oldukça uygun bir modeldir. Bu model üzerinde farklı farmakolojik ajanlarla yapılmış birçok deneysel çalışma mevcuttur. Deneysel olarak periferik sinirlerde ezilme tarzı yaralanma oluşturmak için tanımlanmış fazla sayıda teknik vardır. Bu tip deneysel çalışmalarda temel sorun hasar miktarının standart bir değere oturtulmamış olmasıdır. Bu problemi minimize etmek için, aksonotmezis tipi yaralanma oluşturmak amacıyla; siyatik sinir üzerine 180 gr'lık kuvvet [1,76 Newton (N)] uygulayan 5 cm uzunluğunda 13 mm uç uzunluğuna sahip Dietrich bulldog klem (Tekno-Cer® AC-123-20) 1 dakika süreyle yerleştirilip, lezyon oluşturuldu (Şekil 16), ve klem çıkarıldı (Şekil 17). Kas fasiası 4/0 vicryl suture, cilt ise 4/0 prolene suture ile kapatıldı.



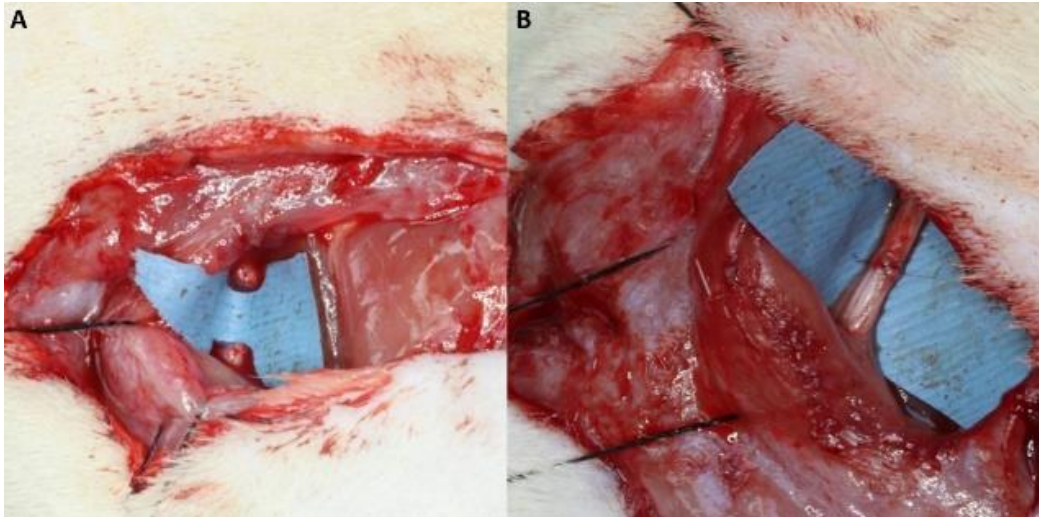
Şekil 16: Bulldog klem (Dietrich) ile aksonotmezis tipi yaralanma oluşturulması



Şekil 17: Aksonotmezis tipi yaralanma oluşturulan siyatik sinirin erken dönem görüntüsü (A: Klemple ezilen siyatik sinir kısmı, B: Siyatik sinir proksimali, C: Siyatik sinir distali, D: m.gluteus superficialis E:m.gastrocnemius)

3.2.2.2. Nörotmezis Oluşturma Modeli ve Uç Uca Anastomoz yöntemi

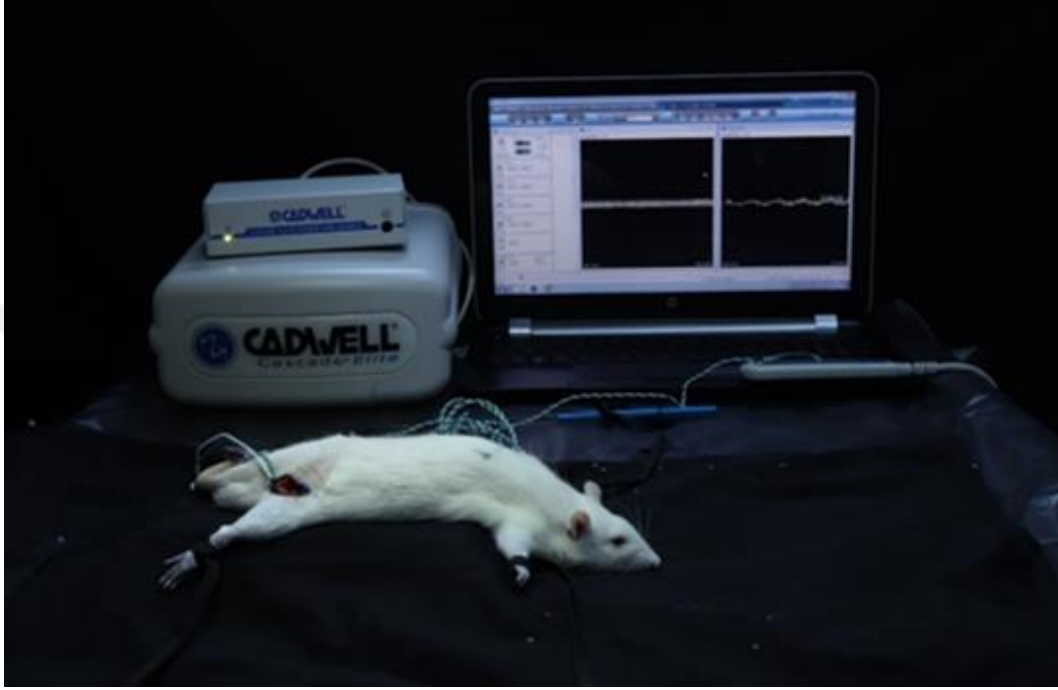
Nörotmezis tipi yaralanma oluşturmak amacıyla, cerrahi olarak eksplere edildi, cerrahi mikroskop kesi alanı üzerine getirilerek, 25'lik büyütme yapılarak mikromakas yardımı ile kesildi. Sonrasında mikrocerrahi teknikle tüm sinirler uç uca aynı cerrah tarafından yapılmak üzere 10/0 naylon suture ile epinöral olarak dikildi (Şekil 18). Kas fasyası ve cilt daha önce tarif edildiği gibi kapatıldı.



Şekil 18: Nörotmezis tipi yaralanma oluşturulan siyatik sinir (A: Mikromakas yardımıyla yapılan nörotmezis tipi yaralanma, B: Nörotmezis yapılan sinirin mikrocerrahiyle uç uca anastomozu)

3.2.3.Takip

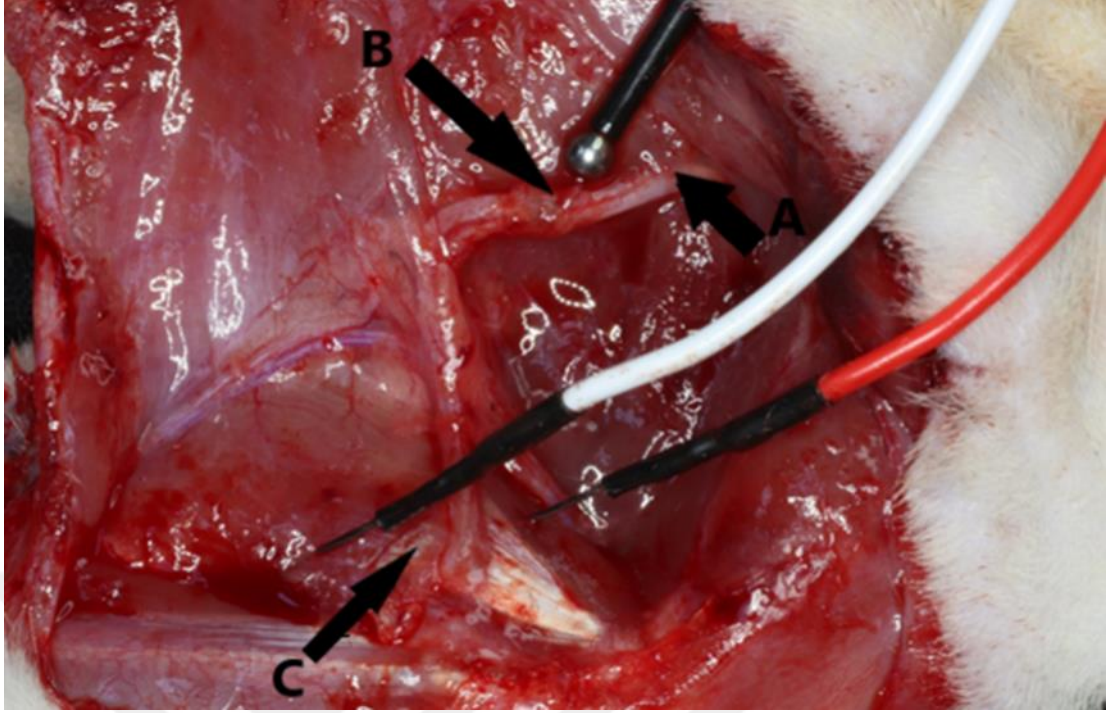
Uygulanacak olan deneysel travma (klempleme ve tam kesi) yapıldıktan sonra bir kez daha EMG kaydı alındı ve ikinci amplitüd değerleri kaydedildi (Şekil 19). Daha sonra tabakalar usulüne uygun olarak kapatıldı. Yara dezenfekte edildi.



Şekil 19: Deneysel travma sonrası EMG kaydı alınması

(Operasyon masasında prone pozisyonunda anestetize edilen deneğin eksplere edilen r.n.ischiadicus motor ileti kaybı alınıyor)

Yaraya 10 gün boyunca pansuman yapıldı. Denekler post-operatif dönemde kafeslerinde, normal oda sıcaklığında, günlük povidon iyot ile pansumanları yapılarak veteriner hekim kontrolünde tutuldular. Proflaktik antibiyotik olarak yeme karıştırılmış vaziyette amoksisilin klavulonik asid verildi. Günlük beslenmeleri ve su ihtiyaçları karşılandı. İlk operasyondan 28 gün sonra denekler reeksplere edildi. Ortaya çıkartılan siyatik sinirde EMG kaydı ile üçüncü amplitüd değerleri alındı. (Şekil 20)



Şekil 20: Postoperatif 28.gün reeksplore edilen Grup3'e (Nörotmezis) ait bir denekte nörofizyolojik değerlendirme (A: n.ischiadicus, B:Kesi yerinde sütür materyalleri C: m.gastrocnemius)

3.2.4. Sakrifikasyon ve Numune Alma

28 günlük deney süresince deney gruplarında toplam 2 rat (ikisi de nörotmezis 3A grubundan olmak üzere kanibalizm sonucu) öldüğünden değerlendirmeye alınmadı. Çalışmaya dahil edilemeyen deneklerin çalışmamızı istatistiki olarak etkilemeyeceği kanısıyla yerlerine yeni denek konulmadı. 28. günün sonunda deneklerin yaralanma oluşturulan sağ siyatik sinirleri hasar bölgesinin proksimal ve distalini de içine alacak şekilde çıkarıldı. Bilateral gastroknemius kasları da eksize edildi. Tüm deney aşamalarından geçen denekler daha sonra karbonmonoksit kutusu kullanılarak uyutuldu. Uyutulan denekler kül fırınına (NÜVE MF 110) konularak deney sonlandırıldı (Şekil 21).



Şekil 21: Deneklerin yok edildiği kül fırını

3.3. Değerlendirme Yöntemleri

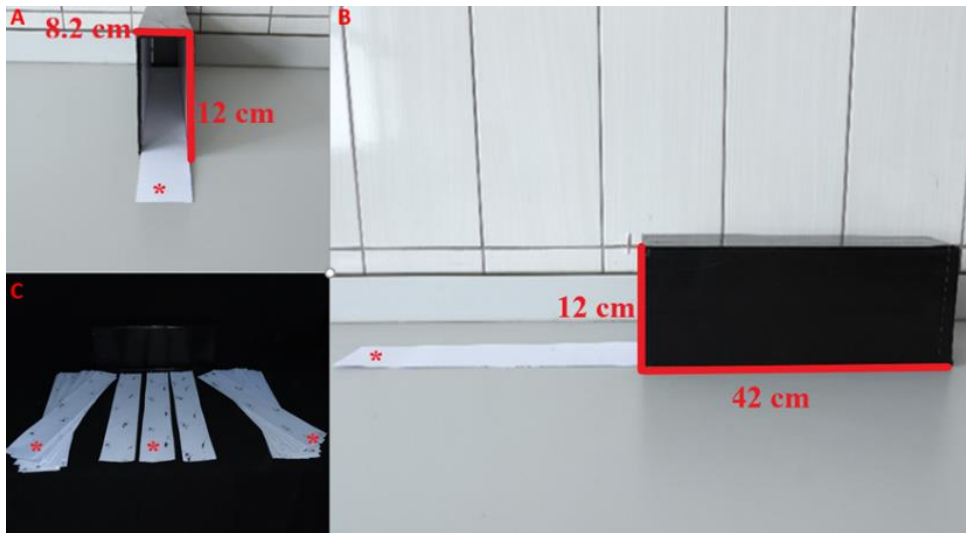
Çalışma yaptığımız denekler; fonksiyonel, elektrofizyolojik, histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme ile değerlendirildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

3.3.1 Fonksiyonel Değerlendirme

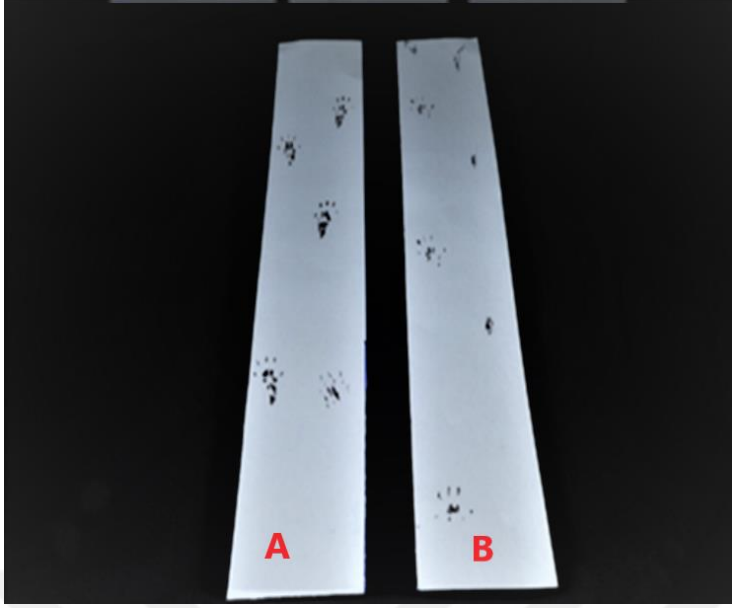
Operasyon öncesi tüm deneklerin nörolojik olarak sağlıklı olduğunun görülmesinde sonra yürüme testi, siyatik fonksiyonel indeks, ekstansör postural thrust (EPT) ve gastrocnemius kas ağırlık ölçümü parametrelerine göre yapıldı.

3.3.1.1 Yürüme Testi

Walking Track analizi, siyatik sinir yaralanmasından sonra fonksiyonel iyileşmeyi ölçmek amacıyla yapıldı [264]. Bu yöntem gereğince ratların yürüme değerlendirmesi için karanlık bir kutu ile son bulan 42 cm boyunda, 8,2 cm eninde, 12 cm yüksekliğinde bir tünel yapıldı. Bu platform içine aynı boyutta kesilerek hazırlanan beyaz dosya kağıtları yerleştirildi. Deneklerin alt ekstremitelerinin plantar yüzeyleri mürekkep ile boyandı ve yürüme testi sonrası tüm deney gruplarının ekstremitelerinin beyaz kağıtlara bıraktığı izler incelendi (Şekil 22). 4 haftalık süre sonunda ikinci siyatik sinir eksplorasyonundan önce deneklerde bacak sürüklemenin ve düşük ayağın varlığı değerlendirildi (Şekil 23). Ölçümlerde elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi.



Şekil 22: Siyatik Fonksiyonel İndeks hesaplanması için yürütülen deneklerin ayak izi dökümleri (A ve B: Deneklerin yürüme testleri için hazırlanan 42 ×12×8,2 cm ebatlı tünel, C: * ile işaretli yürüme kayıt bantları)



Şekil 23: Walking Track analizi yapılan bazı deneklerin yürüme kayıt bantları
(**A:** Grup1'e ait denneğin yürüme bandı, **B:** Grup3A'ya ait denneğin yürüme bandı)

3.3.1.2. Siyatik Fonksiyonel İndeks Hesaplanması

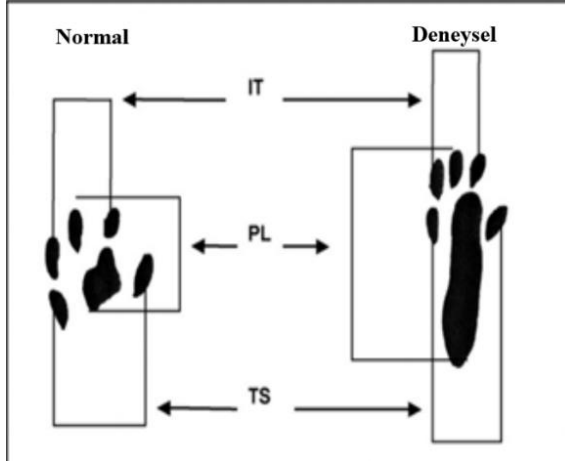
Cerrahi işlem uygulanan 2.ve 3.grup deneklerine cerrahi işlem sonrası 1 ve 28.günlerde tekrardan yürüme testi yapıldı. İdrar ve dışkı bulaşı olmayan sağlıklı izler ölçüldü [265]. Dökümanlardaki uygun ayak izleri kullanılarak, topuk ve parmak ucu arasındaki mesafe-bası uzunluğu (print length (PL)), birinci ile beşinci parmaklar arası mesafe-adım genişliği (toe spread (TS)), ikinci ile dördüncü parmaklar arası mesafe- adım ortası genişlik (intermediate toe spread (IT)) milimetrik cetvel ile ölçüldü (Şekil 24).

Tüm yürüme testlerinde elde edilen dökümanlar Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ) değerlendirmesine tabi tutuldu. Ölçümler, Bain-Maccinon-Hunter Siyatik Fonksiyonel İndeks formülüne yerleştirilerek SFİ hesaplandı [266].

$$SFİ = -38.3 + (EPL - NPL) / NPL + 109.5 (ETS - NTS) / NTS + 13.3 (EIT - NIT) / NIT - 8.8$$

(E: deney yapılan taraf, N: normal taraf)

Ölçümde 0 ile -100 arası elde edilen değerlerde, sıfır normal fonksiyonu gösterirken, -100 tam fonksiyon kaybına işaret etmektedir. Elde edilen SFİ değerlerinde gruplar arası fark olup olmadığı istatistiksel olarak araştırıldı.



IT(intermediate toe spread):ikinci ile dördüncü parmaklar arası mesafe- adım ortası genişlik

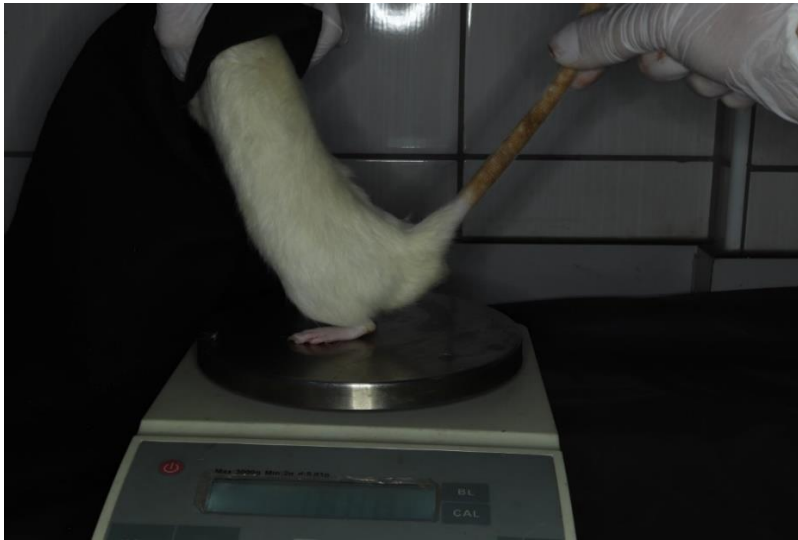
PL(print length):topuk ve parmak ucu arasındaki mesafe-bası uzunluğu

TS(toe spread):birinci ile beşinci parmaklar arası mesafe-adım genişliği

Şekil 24: Siyatik Fonksiyonel İndeksini hesaplamak için yapılan PL, TS, ITS ölçümleri

3.3.1.3 Basma Kuvveti Değerlendirmesi (Extensor Postural Thrust-EPT)

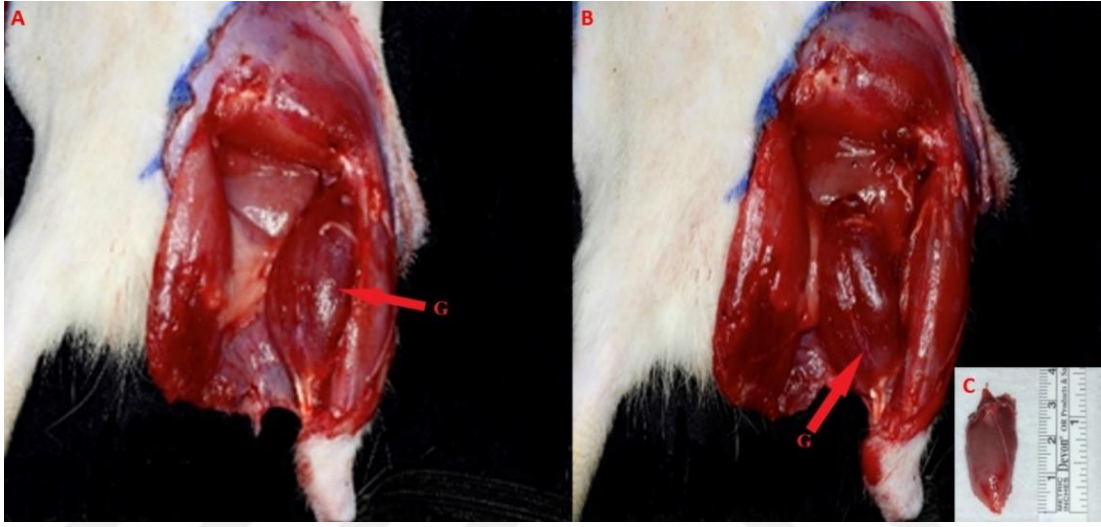
Deneklerin motor performansları 1995 yılında Thalhammer ve ark. tarafından geliştirilen Extensor Postural Thrust (EPT) testi ile değerlendirildi. Bu değerlendirmede deneğin ön ekstremiteleri kumaşla sarılarak etkisiz hale getirildi. Kuyruğu da elle yerden kaldırılarak deneğin destek alma ihtimali ortadan kaldırıldı. Arka uzuvları üzerinde ekstensiyona getirilen deneğin dijital hassas terazinin kafesine basması sağlandı. Terazî ölçümü basma kuvveti olarak kaydedildi. Bu ölçümler preoperatif, postoperatif 1. günde ve postoperatif 28. günde tekrarlandı (Şekil 25). Ölçümlerde elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi.



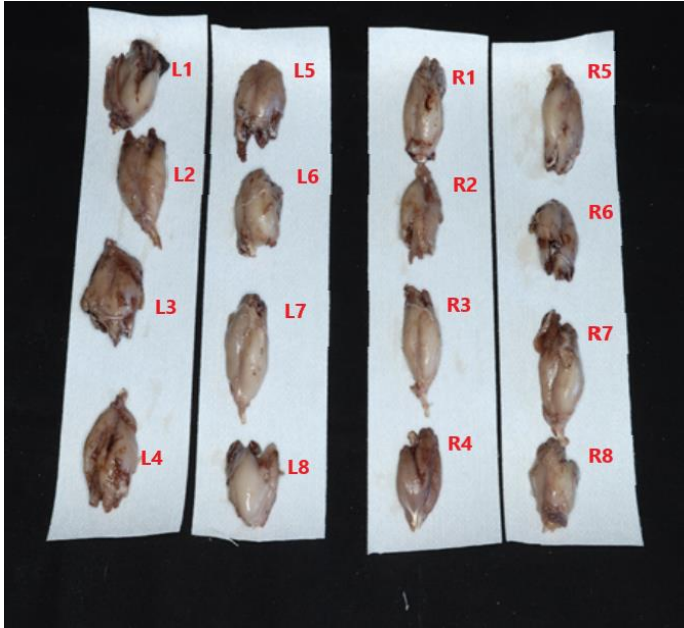
Şekil 25: Extansor Postural Thrust (EPT) ölçümü

3.3.1.4 Gastroknemius Kas Ağırlık İndeks Hesaplanması

Tüm denekler postoperatif 28. gün sonunda anestezi altında prone pozisyonda iken siyatik sinirlerinin çıkarılmasını takiben deney (sağ) tarafı ve kontrol (sol) taraf gastroknemius kasları, medial başı medial epikondilden lateral başı lateral epikondilden ve distali tuber kalkanei' den eksize edildi. Sonra dijital terazi ile tartıldı (Şekil 26). Gastroknemius Kas İndeksi, opere olan tarafın kas ağırlığının kontralateral taraf kas ağırlığına bölünmesiyle hesaplandı (Şekil 27).



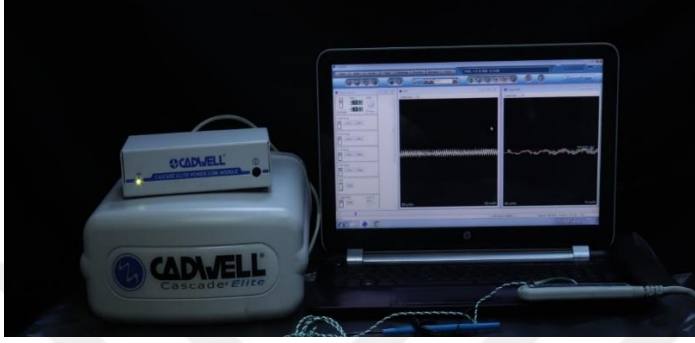
Şekil 26: Gastrokinemius Kas İndeksi ölçümü için eksize edilen kaslar (G: m.gastrocnemius)



Şekil 27: Grup 2A deneklerinin bilateral çıkarılmış gastrokinemius kas örnekleri (L:sol, R: sağ)

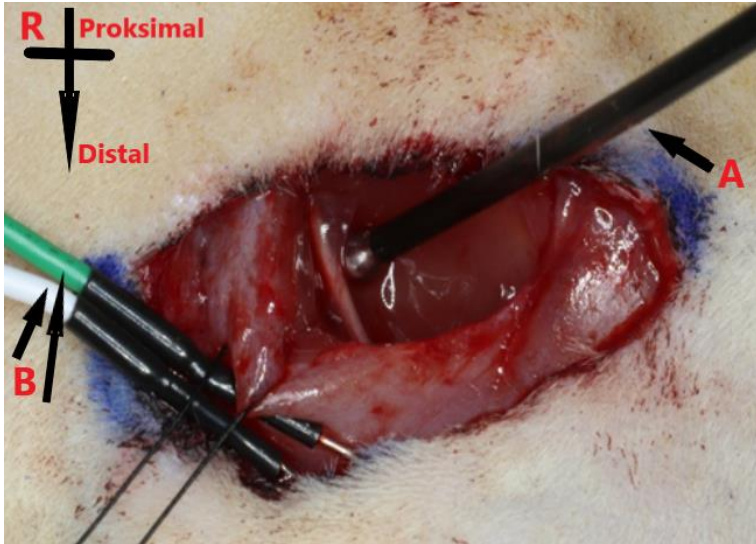
3.3.2. Elektrofizyolojik Değerlendirme

Elektrofizyolojik değerlendirme için Cadwell Cascade Elite marka 32 kanallı elektronöromonitörizasyon cihazı kullanıldı. Preoperatif, postoperatif 1. günde ve postoperatif 28. günde denekler sakrifiye edilmeden önce toplamda üç kez EMG kaydı yapıldı (Şekil 28).



Şekil 28: Deneylerde kullanılan EMG cihazı

EMG kaydının olumsuz etkilenmemesi amacıyla anestezi ajanı intraperitoneal olarak verildi. Gastroknemius kasının üzerine iğne elektrodlar uygun bir şekilde yerleştirildi. Topraklama elektrodu ise priformis kasına yerleştirildi. Elektrodlar bakır kablo ile bağlanan paslanmaz çelikten 13 mm'lik uç özelliğine sahipti. Serbest monopolar elektrot ile siyatik sinire direkt temas edilerek uyarı verildi ve EMG kaydı alındı (Şekil 29).



Şekil 29: Siyatik sinire direkt uyarı verilerek alınan EMG kaydı (A: monopolar sinir stimülatör probu, B: gastroknemius kasına yerleştirilen subdermal twisted iğne elektrotları, R: sağ taraf)

Aktif serbest elektrod ile referans ve topraklama elektrotlarının mesafesi 1cm olarak her denekte sabit tutuldu. EMG cihazının filtre ayarı 20 Hz ile 2000 Hz aralığında tutuldu. Süpürme hızı 10 msn olarak ayarlandı. Uyarı sonrası izoelektrik noktadan ilk sapma başlangıç latensi (ms), aksiyon potansiyelinin maksimum noktası tepe latensi (msn) ve maksimum latensteki tepeler arasındaki fark amplitüd (μV) olarak tespit edildi (Şekil 30).



Şekil 30: Normal rat n.ischiadicus' unun uyarılması ile alınan ileti kaydı

Deneklerin preoperatif, postoperatif 1.gün ve postoperatif 28.gün sonunda ölçülen amplitüdüleri istatistiki olarak değerlendirildi. EMG ölçümünü yapan teknisyene hangi deneğin hangi gruptan olduğunu bilgisi verilmedi.

3.3.3.Histopatolojik Değerlendirme

28. günün sonunda 3.elektrofizyolojik değerlendirme yapıldıktan sonra tüm grupların denekleri 'reeksplere' edildi. Siyatik sinirler aksonotmezis veya nörotmezis yapılan sahaları içine alacak şekilde eksize edildi. Deneklerin bilateral gastroknemius kasları da eksize edildi. Her deneğe ait sinir ve kas dokuları, içinde %10'luk formalin solüsyonu bulunan kaplarına konuldu. Solüsyon içinde bir gün bekletildi. Sinir örneklerinden alınan ardışık transvers kesitler Thermo Fisher Scientific marka, Shandon Excelsior ET model takip cihazında parafinle bloklandı. Her bir hayvana ait parafin bloktan 5 μm kalınlığında kesitler alındı. Denek başına 5 kesit, toplamda 270 kesit alındı. Sinir morfolojisi, inflamasyon, ödem ve konjesyonunu göstermek amacıyla hematoksilin – eozin (H&E) ve WD'yi göstermek için Toloudin Blue ile boyandı. Gastroknemius kası numuneleri ise sinir inervasyonunun bozukluğunu ve atrofiye gittiğini histopatolojik olarak göstermek amacıyla masson trichrome

(MTC) ile boyandı ve fibrozis durumları derecelendirildi. Hematoksilen – eozin (H&E) boyama işlemi şu prosedürler ile yapıldı; rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki longitudinal ve transvers periferik sinir kesitleri, deparafinizasyon işlemi için 37°C’lik etüvde bir gece bırakıldıktan sonra deparafinizasyonun devamında etüv ısısı 57°C’ye çıkarılarak 1 saat bekletildi. Kesitler daha sonra 3 kez 20’şer dakika ksilolde bekletilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Rehidratasyon işlemi için azalan etil alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70 ve %50) 10’ar dakika tutulan kesitler, havada kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, 10 dakika akan musluk suyu ile yıkayıp alkolden uzaklaştırıldı. Yıkama sonrası 10 dakika Hematoksilen boya solüsyonunda tutuldu. Sonrasında akan musluk suyu altında 10 dakika daha yıkandı. Glasiyel asetik asit ile alkol karışımı olan solüsyona 2-3 kez batırılıp çıkarılarak akan musluk suyu altında tekrar 10 dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 10 dakika Eosin boya solüsyonunda bekletilerek, tekrar 10 dakika akan musluk suyu ile yıkamanın ardından dehidratasyon işlemi için sırasıyla %50, %70, %80, %90 ve %100’lük artan etil alkol serilerinden hızlıca geçirildi. 45 dakika ksilolde bekletilip lamalar kapama mediumu ile kapatıldı. Toluidine Blue boyama işlemi şu prosedürle yapıldı; 5 µm kalınlığında kesitler alındı deparafinize edildi. %2’lik toluidin blue çözeltisi damlatıldı, 2-3 dk beklendikten sonra su ile yıkandı. Alkol ve ksilol işlemlerinden sonra lam, lamel ile kapatıldı. MTC boyama işlemi şu prosedürle yapıldı; gastrokinemius kas dokusu bloklarından alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitler 37 °C’lik etüvde bir gece bırakıldı. Deparafiniz edildikten sonra etüv ısısı 57 °C’ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. 2 kez beşer dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sonlandırıldı. Ardından 2 kez üçer dakika %100’ lük etil alkolden geçirildi. Sonra sırasıyla %90, %80, %70 ve %50 azalan etil alkol serilerinden geçirildi. Akan musluk suyunda yıkayarak boyamaya hazır hale getirildi. Kesitlere Masson Trichrome boyama kiti uygulandı. Weigert’in Demirli Hematoksilen solüsyonu ile 20 dakika çekirdek boyaması yapıldı. Suda hızlıca yıkayarak, %1’lik asit alkol solüsyonunda farklılaştırılarak, tekrar yıkamaya alındı. Ponceau Fuchsin solüsyonunun 5 dakika boyama yapıldı ve ardından distile suda ile yıkandı. Fosfotungstik asit solüsyonu ile 15 dakika mordanlaştırılan kesitler ardından %2,5’lik asetik asit - %2’lik metil blue solüsyonu ile 5 dakika boyandı. Suda yıkama işleminin ardından kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilole alındı ve kapama mediumu ile kapatıldı. Hematoksilen–eozin (H&E), Toluidine Blue ve MTC ile boyanıp hazırlanan preparatlar Carl Zeiss marka Axio Scope. A1 model polarize ışık mikroskopunda değerlendirildiler. Stereorolojik analiz için bir yazılım (Stereoinvestigator, Microbrightfield; USA) ve kamera ataçmanı kullanıldı. İlk olarak her bir rat için siyatik sinir örnekleri düşük büyültmede çizildi. İkinci olarak, uygun grid büyüklüğü ve unbiased sayım çerçeve

büyüklüğü belirlendi. Çizili alanlar Fractionator probe aracılığı ile sistematik ve randomize bir şekilde örneklendi ve miyelinli aksonlar yüksek büyültmede sayıldı. Son olarak, ortalama miyelinli akson sayısal yoğunluğu şu formül ile hesaplandı [267].

$$N_v = \Sigma Q / \Sigma S \times A$$

N_v: Sayısal yoğunluk

ΣQ: Sayılan toplam markerlar

ΣS: Örneklenen tarafların sayısı

A: Sayılan çerçeve alanı

Sinir dokusuna ait kesitlerden miyelinli akson yoğunluğu, miyelin kılıf kalınlığı, myelinli akson çapı, gastrokinemius kas dokusuna ait kesitlerden gastroknemius kas lifi çapı ve kollajen lif alan yüzdesi stereolojik olarak hesaplandı. Preparatların histopatolojik değerlendirilmesinde; fibrozis, wallerian dejenerasyon, ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu parametrelerine göre 3 puan üzerinden skorelama yapılan modifiye histopatolojik gradeleme skalası kullanıldı [86, 268, 269] .(Tablo 3).

Tablo 3: Modifiye Histopatolojik Skorelama Kriterleri

Skor	Kriter (Kesit alanda x40 büyütmede)
Fibrozis	
Grade 1	< 150 fibroblast
Grade 2	100 – 150 fibroblast
Grade 3	> 150 fibroblast
Wallerian dejenerasyon	
Grade 1	< %25 dejenerasyon
Grade 2	%25-%75 dejenerasyon
Grade 3	> %75 dejenerasyon
Ödem	
Grade 1	< %25 ödem
Grade 2	%25- %75 ödem
Grade 3	> %75 ödem
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	
Grade 1	0 – 10 nötrofil
Grade 2	10 – 50 nötrofil
Grade 3	> 50 nötrofil

3.3.4.İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal değerlendirme; anti-NGF, anti-S100, anti- TNF-α ve anti-TGF-β boyamalarına göre yapıldı. İnflamasyon derecesini göstermek için anti-TNF-alfa ve

anti-TGF-beta, aksonal rejenerasyonu göstermek içinde anti-NGF ve anti-S100 boyamalar yapıldı. Işık mikroskobunda preparatlar bağımsız 2 patolog tarafından değerlendirildi. Pozitif şarjlı lamlara alınan kesitler; Leica Bond-Max otomatik immünohistokimya cihazına yerleştirilerek, NGF, S100, TGF- β ve TNF- α Bond Polymer Refine Detection Kit® ile boyandı. Leica Bond-Max otomatik immünohistokimya boyama cihazında: 30 dakika, 60 derecede parafininin erimesi sağlandı. 15 dakika ksilol solüsyonunda tutularak deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. 15 dakika %99' luk alkolde tutularak rehidratasyon gerçekleştirildi. Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkandı. Epitop-2 solüsyonunda antijen retrieval işlemi gerçekleştirildi. Wash Buffer solüsyonunda 3 dakika yıkandı. %3 lük hidrojen peroksidade' da 10 dk bekletildi. Tekrardan Wash Buffer (PBS) solüsyonunda 3 dakika yıkandı. Antikor damlatılıp 60 dk beklendi. Tekrardan Wash Buffer (BPS) solüsyonunda 3 dakika yıkandı. Sekonder antibody damlatılarak 15 dk. bekletildi. Tekrardan Wash Buffer (PBS) solüsyonunda 3 dakika yıkandı. Polimer solüsyon damlatılarak 15 dk bekletildi. Tekrardan Wash Buffer (PBS) solüsyonunda 3 dakika yıkandı. Saf suda 3 dakika yıkandı. DAB+Kromojen damlatılıp 5 dk bekletildi. Saf suda 3 dakika yıkandı. Hematoksilende 5 dakika boyandı. Distile su ile 3 dakika yıkandı. Alkolde 2 dakika bekletildi. Ksilolde 2 dakika bekletildi ve entellan ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal analizlerin görüntülenmesi Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda ve Leica LAS V4.9 (Germany) programında gerçekleştirildi. Preperatlar iki şekilde değerlendirildi. İlk olarak deney gruplarına ait periferik sinirlerde NGF(Nerve Growth Faktör), S100, TNF- α ve TGF- β antikorlarına ait immünohistokimyasal analizler ImageJ programı (Java-based software program, National Institutes of Health) ile NGF(Nerve Growth Faktör), S100, TNF- α ve TGF- β pozitif alan yüzdesi ölçülerek değerlendirildi [270]. Daha sonra NGF (Nerve Growth Faktör), S100, TNF- α ve TGF- β ' nın immünohistokimyasal boyanma durumunu belirlemek için dört puanlı bir ölçek (0 = yok, 1 = açık sarı, 2 = açık kahverengi, 3 = koyu kahverengi) kullanılarak birbirinden bağımsız iki patolog tarafından semikantitatif olarak puanlandı [271].

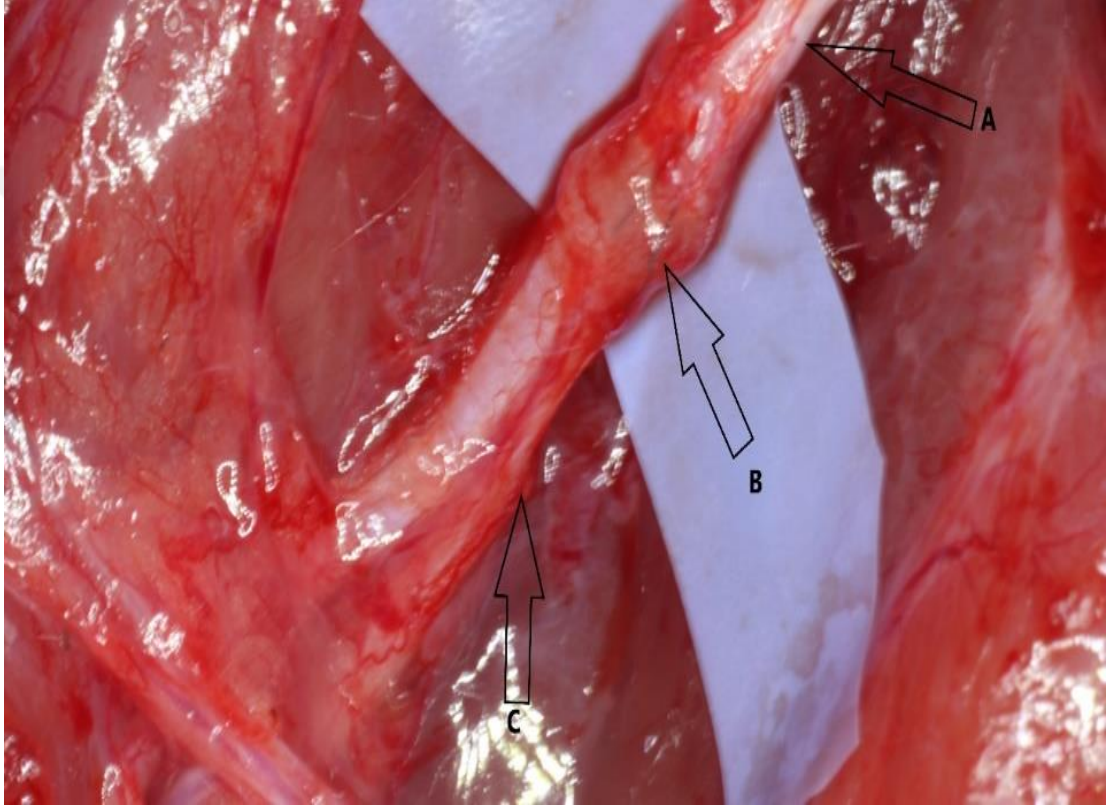
3.3.5. İstatistiki Değerlendirme

İstatistiksel analizler IBM-SPSS Statistics 22 (IBM, USA) programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ değeri anlamlı farklılık olarak kabul edildi. İki'den fazla bağımsız grup için normal dağılım ve varyans homojenliği varsayımları sağlandığında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Tukey HSD uygulandı. Korelasyon incelemelerinde Pearson Ki - kare ve ANOVA testleri kullanıldı.

4)BULGULAR

4.1. Genel Değerlendirme Bulguları

28 günlük deney süresince deney gruplarından toplamda 2 rat (ikisi de nörotmezis IIIa grubundan kanibalizm sonucu) öldüğünden 54 rat değerlendirmeye alındı. Makroskopik olarak bacak postürü, ayak basma özellikleri, bacak fleksör kaslarında atrofi gelişip gelişmediği, bası yaralarının olup olmadığı ve insizyon hattı özelliklerine dikkat edildi. Haricen yara yeri problemi tespit edilmedi. (Şekil 31)



Şekil 31: Postoperatif 28.gün reeksplore edilen siyatik sinir örneği (**A:** siyatik sinir hasar proksimali, **B:** suture hattı, **C:** siyatik sinir hasar distali)

Cerrahi sonrası erken dönem yapılan yürüme değerlendirmesinde Grup-3 (nörotmezis grubu) deneklerin tümünün sağ ayak parmakları üzerine basamadıkları, bunun yerine sağ ayak topukları üzerine basarak yürüdükleri tespit edildi. Bu durum efektif cerrahi yapıldığı yönünde yorumlandı. Özellikle Grup3A' da makroskopik olarak da açıkça gözlenebilen kas atrofisi dikkat çekici idi (Şekil 32).



Şekil 32: Grup-3A'daki deneğin 28 günlük izlem süresi sonunda sağ bacakta oluşan kas atrofisi
(**A:** Doğal kas yapısına sahip sol bacak **B:** Atrofik yapısına sahip sağ bacak **C:** Epitelize olmuş insizyon hattı)

Cerrahi sonrası 28. günün sonunda sıçanlar sakrifiye edildi ve her iki arka uzuv siyatik sinir ve gastroknemius kasları histolojik inceleme için alındı. Ayrıca gastrokinemius kas ağırlık indeksini hesaplamak için çalışma yapılmamış olan sol gastroknemius kasları da eksize edildi. Tüm gruplarda kontrol sol bacak gastroknemius kaslarının makroskopik görünümü normaldi ve gruplar arasında belirgin fark yoktu. Sağ bacak gastroknemius kaslarında ise grup-3 deneklerinin tamamında atrofik görünüm mevcut idi.

4.2.Fonksiyonel Değerlendirme Bulguları

4.2.1 Yürüme Testi Bulguları

Postoperatif 28.gün sonu walking track analizi neticesinde Grup2A'daki deneklerin çoğunluğunda düşük ayak ve ayak sürüklenme testi müspet idi ve istatistiksel olarak da anlamlı idi ($p<0.05$). Grup2B ve Grup2C'deki deneklerin tamamında düşük ayak ve ayak sürüklenme testi negatif idi ve istatistiksel olarak da anlamlı idi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup3A'daki deneklerin tamamında düşük ayak ve ayak sürüklenme testi müspet idi ve istatistiksel olarak da anlamlı idi ($p<0.001$). Grup3B ve Grup3C'deki deneklerin çoğunluğunda düşük ayak ve ayak sürüklenme testi negatif idi ve istatistiksel olarak da anlamlı idi (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$). (Tablo 4)

Tablo 4: Düşük ayak ve ayak sürüklenme testi verileri

Denek	Grup1	Grup2			Grup3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	-	-	-	-	+	-	-
2	-	+	-	-	+	-	-
3	-	+	-	-	+	-	-
4	-	+	-	-	+	-	-
5	-	+	-	-	+	-	-
6	-	+	-	-	+	-	-
7	-	+	-	-	*	+	-
8	-	+	-	-	*	+	+

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

4.2.2. Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFİ) Bulguları

Postoperatif 28.gün sonu Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ) verilerinin istatistiki değerlendirilmesi sonucunda Grup1'deki deneklerde ortalama SFİ değeri % -4.14 ± 2.03 olarak değerlendirildi. En düşük değer % -6.67 , en yüksek değer % -1.23 olarak saptandı. Grup2A'deki deneklerde ortalama SFİ değeri -80.06 ± 6.42 olarak değerlendirildi. En düşük değer % -89.11 , en yüksek değer % -70.89 olarak saptandı. Grup2B'deki deneklerde ortalama SFİ değeri % -58.66 ± 5.13 olarak değerlendirildi. En düşük değer % -64.13 , en yüksek değer % -49.57 olarak saptandı. Grup2C'deki deneklerde ortalama SFİ değeri % -25.82 ± 4.61 olarak değerlendirildi. En düşük değer % -33.87 , en yüksek değer % -19.32 olarak saptandı. Grup3A'deki deneklerde ortalama SFİ değeri % -92.67 ± 3.25 olarak değerlendirildi. En düşük değer % -97.64 , en yüksek değer % -88.33 olarak saptandı. Grup3B'deki deneklerde ortalama SFİ değeri % -70.64 ± 4.31 olarak değerlendirildi. En düşük değer % -77.67 , en yüksek değer % -65.63 olarak saptandı. Grup3C'deki deneklerde ortalama SFİ değeri % -64.91 ± 3.47 olarak değerlendirildi. En düşük değer % -70.11 , en yüksek değer % -60.88 olarak saptandı. İstatistiksel olarak tüm gruplardaki değerler anlamlı idi ($p<0.001$) (Tablo 5, 6)

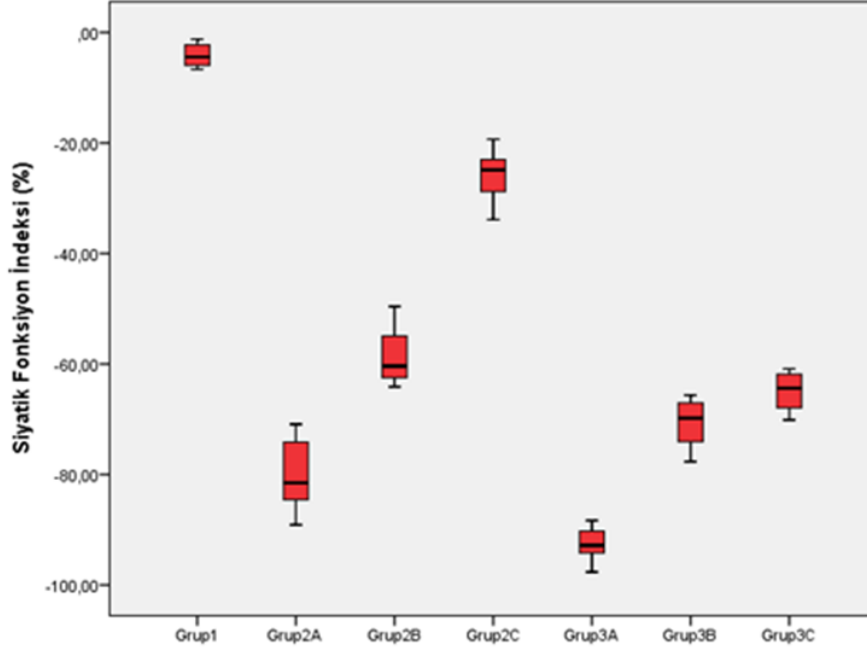
Tablo 5: Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ) Verileri

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	-1.23	-70.89	-49.57	-19.32	-88.33	-65.63	-60.88
2	-1.96	-72.98	-53.32	-22.67	-90.23	-66.87	-61.43
3	-2.56	-75.34	-56.56	-23.33	-92.12	-67.23	-62.28
4	-4.32	-79.88	-59.11	-24.33	-93.55	-69.23	-63.12
5	-4.54	-83.12	-61.64	-25.47	-94.19	-70.37	-65.63
6	-5.88	-84.57	-62.01	-27.11	-97.64	-72.58	-67.75
7	-6.03	-84.59	-62.98	-30.49	*	-75.55	-68.13
8	-6.67	-89.11	-64.13	-33.87	*	-77.67	-70.11
Ort ± SD	-4.14 ±2.03	-80.06 ±6.42	-58.66 ±5.13	-25.82 ±4.61	-92.67 ±3.25	-70.64 ±4.31	-64.91 ±3.47

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 6: Gruplardaki Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ) ortalama değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama ± SD
1	-6.67	-1.23	-4.14 ± 2.03
2A	-89.11	-70.89	-80.06 ± 6.42
2B	-64.13	-49.57	-58.66 ± 5.13
2C	-33.87	-19.32	-25.82 ± 4.61
3A	-97.64	-88.33	-92.67 ± 3.25
3B	-77.67	-65.63	-70.64 ± 4.31
3C	-70.11	-60.88	-64.91 ± 3.47

**Şekil 33: Gruplara ait siyatik fonksiyon indeksinin karşılaştırmalı grafiği**

4.2.3.Basma Kuvveti (Extensor Postural Thrust-EPT) Bulguları

Grup1' deki deneklerin EPT verilerinin istatistiki değerlendirilmesi sonucunda 0.gün EPT ortalaması 32.18 ± 1.30 gr, 1.gün EPT ortalaması 31.81 ± 1.75 gr ve 28.gün EPT ortalaması 33.05 ± 2.65 gr olarak ölçüldü ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 7,10).

Grup2A' daki deneklerin preoperatif ortalama EPT değeri $31.92 \pm 1,70$ gr, en düşük EPT değeri 29.8 gr ve en yüksek EPT değeri 34.3 gr olarak ölçüldü ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup2A' daki deneklerin postoperatif 1.gün ortalama EPT değeri 24.22 ± 1.54 gr, en düşük EPT değeri 22.2 gr ve en yüksek EPT değeri 26.3 gr olarak ölçüldü ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$). Grup2A' daki deneklerin postoperatif 28.gün ortalama EPT değeri 25.03 ± 1.67 gr, en düşük EPT değeri 22.3 gr ve en yüksek EPT değeri 26.9 gr olarak ölçüldü ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$) (Tablo 8, 10).

Grup2B' daki deneklerin preoperatif ortalama EPT değeri 31.93 ± 0.80 gr, en düşük EPT değeri 31.1 gr ve en yüksek EPT değeri 32.9 gr olarak ölçüldü ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup2B' daki deneklerin postoperatif 1.gün ortalama EPT değeri 23.93 ± 1.60 gr, en düşük EPT değeri 21.3 gr ve en yüksek EPT değeri 26.3 gr olarak ölçüldü ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$). Grup2B' daki deneklerin postoperatif 28.gün ortalama EPT değeri 28.07 ± 1.67 gr, en düşük EPT değeri 25.3 gr ve en yüksek EPT değeri 29.9.gr olarak ölçüldü ve anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$) (Tablo 8, 10).

Grup2C' daki deneklerin preoperatif ortalama EPT değeri 32.72 ± 0.65 gr, en düşük EPT değeri 32.1 gr ve en yüksek EPT değeri 33.8 gr olarak ölçüldü ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup2C' daki deneklerin postoperatif 1. gün ortalama EPT değeri 24.33 ± 1.58 gr, en düşük EPT değeri 22.1 gr ve en yüksek EPT değeri 25.9 gr olarak ölçüldü ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$). Grup2C' daki deneklerin postoperatif 28. Gün ortalama EPT değeri 29.11 ± 2.15 gr, en düşük EPT değeri 26.3 ve en yüksek EPT değeri 32.9 gr olarak ölçüldü ve anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$) (Tablo 8, 10).

Grup3A' daki deneklerin preoperatif ortalama EPT değeri 31.65 ± 0.99 gr, en düşük EPT değeri 30.1 gr ve en yüksek EPT değeri 32.8 gr olarak ölçüldü ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3A' daki deneklerin postoperatif 1. gün ortalama EPT değeri 17.18 ± 3.29 gr, en düşük EPT değeri 13.2 gr ve en yüksek EPT değeri 21.5 gr olarak ölçüldü ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$). Grup3A' daki deneklerin postoperatif 28. gün ortalama EPT değeri 16.55 ± 3.43 gr, en düşük EPT değeri 13.1 gr ve en yüksek EPT değeri 20.9 gr olarak ölçüldü ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$) (Tablo 9, 10).

Grup3B' daki deneklerin preoperatif ortalama EPT değeri 32.18 ± 1.30 gr, en düşük EPT değeri 30.1 gr ve en yüksek EPT değeri 33.9. gr olarak ölçüldü ve anlamlı farklılık

saptanmadı ($p>0.05$). Grup3B’ deki deneklerin postoperatif 1. gün ortalama EPT değeri 17.72 ± 2.42 gr, en düşük EPT değeri 13.5 gr ve en yüksek EPT değeri 21.2 gr olarak ölçüldü ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$). Grup3B’ deki deneklerin postoperatif 28. gün ortalama EPT değeri 19.97 ± 2.52 gr, en düşük EPT değeri 16.5 gr ve en yüksek EPT değeri 24.6 gr olarak ölçüldü ve anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$) (Tablo 9, 10).

Grup3C’ deki deneklerin preoperatif ortalama EPT değeri 32.18 ± 1.30 gr, en düşük EPT değeri 30.1 gr ve en yüksek EPT değeri 33.9 gr olarak ölçüldü ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C’ deki deneklerin postoperatif 1. gün ortalama EPT değeri 17.22 ± 2.50 gr, en düşük EPT değeri 14.2 gr ve en yüksek EPT değeri 19.9 gr olarak ölçüldü ve anlamlı düşüklük saptandı ($p>0.05$). Grup3C’ deki deneklerin postoperatif 28. gün ortalama EPT değeri 21.76 ± 2.75 gr, en düşük EPT değeri 17.5 gr ve en yüksek EPT değeri 25.5 gr olarak ölçüldü ve anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$) (Tablo 9, 10).

Tablo 7: Grup1 EPT (gr) Verileri

Denekler	0.gün	1.gün	28.gün
1	30.1	30.2	30.1
2	31.2	30.2	30.5
3	31.2	30.5	30.9
4	32.2	30.6	31.2
5	32.4	31.7	34.4
6	32.8	32.8	34.8
7	33.7	33.9	35.7
8	33.9	34.6	36.8
Ort $\pm$ SD	32.18 $\pm$ 1.30	31.81 $\pm$ 1.75	33.05 $\pm$ 2.65

Tablo 8: Grup2 EPT (gr) Verileri

Denek	2A			2B			2C		
	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün
1	29.8	22.2	22.3	31.1	21.3	25.3	32.1	22.1	26.3
2	30.1	22.4	23.6	31.2	22.4	26.6	32.2	22.4	27.7
3	30.2	23.1	23.6	31.2	23.3	26.6	32.4	23.4	27.8
4	32.3	23.9	25.7	31.3	24.2	28.7	32.5	23.9	28.7
5	32.5	25.1	25.8	32.4	24.2	28.8	32.5	25.6	28.8
6	32.5	25.3	25.6	32.5	24.3	29.1	32.6	25.7	29.1
7	33.7	25.5	26.8	32.9	25.5	29.6	33.7	25.7	31.6
8	34.3	26.3	26.9	32.9	26.3	29.9	33.8	25.9	32.9
Ort $\pm$ SD	31.92 $\pm$ 1.70	24.22 $\pm$ 1.54	25.03 $\pm$ 1.67	31.93 $\pm$ 0.80	23.93 $\pm$ 1.60	28.07 $\pm$ 1.67	32.72 $\pm$ 0.65	24.33 $\pm$ 1.58	29.11 $\pm$ 2.15

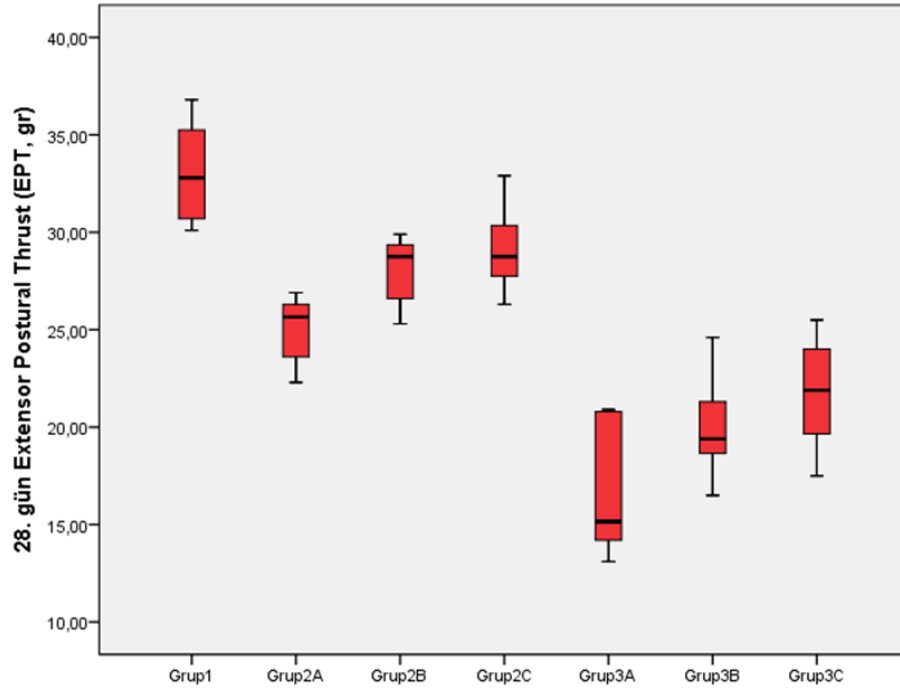
Tablo 9: Grup3 EPT (gr) Verileri

Denek	3A			3B			3C		
	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün
1	30.1	13.2	13.1	30.1	13.5	16.5	30.1	14.2	17.5
2	31.2	14.4	14.2	31.2	16.4	18.6	31.2	14.4	18.8
3	31.2	15.5	14.6	31.2	16.5	18.7	31.2	14.5	20.5
4	32.2	18.7	15.7	32.2	16.7	18.9	32.2	17.7	21.5
5	32.4	19.8	20.8	32.4	18.8	19.9	32.4	17.8	22.3
6	32.8	21.5	20.9	32.8	18.8	20.1	32.8	19.5	23.6
7	*	*	*	33.7	19.9	22.5	33.7	19.8	24.4
8	*	*	*	33.9	21.2	24.6	33.9	19.9	25.5
Ort $\pm$ SD	31.65 $\pm$ 0.99	17.18 $\pm$ 3.29	16.55 $\pm$ 3.43	32.18 $\pm$ 1.30	17.72 $\pm$ 2.42	19.97 $\pm$ 2.52	32.18 $\pm$ 1.30	17.22 $\pm$ 2.50	21.76 $\pm$ 2.75

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 10: Gruplardaki 28.gün EPT (gr) Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama $\pm$ SD
1	30.1	36.8	33.05 $\pm$ 2.65
2A	22.3	26.9	25.03 $\pm$ 1.67
2B	25.3	29.9	28.07 $\pm$ 1.67
2C	26.3	32.9	29.11 $\pm$ 2.15
3A	13.1	20.9	16.55 $\pm$ 3.43
3B	16.5	24.6	19.97 $\pm$ 2.52
3C	17.5	25.5	21.76 $\pm$ 2.75

**Şekil 34: Gruplara ait 28.gün EPT karşılaştırmalı grafiği**

4.2.4. Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi Bulguları

Grup1'deki deneklerin gastroknemius kas ağırlık indeksinin değerlendirilmesi sonucunda ortalama gastroknemius kas ağırlık indeksi 99.93 ± 0.69 , en düşük 98.62 ve en yüksek 101.17 olarak değerlendirildi. Anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup2A' daki deneklerin gastroknemius kas ağırlık indeksinin değerlendirilmesi sonucunda ortalama gastroknemius kas ağırlık indeksi 64.03 ± 4.32 , en düşük 57.16 ve en yüksek 69.59 olarak değerlendirildi. Anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$). Grup2B' deki deneklerin gastroknemius kas ağırlık indeksinin değerlendirilmesi sonucunda ortalama gastroknemius kas ağırlık indeksi 78.07 ± 3.72 , en düşük 70.57 ve en yüksek 81.13 olarak değerlendirildi. Anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$). Grup2C' deki deneklerin gastroknemius kas ağırlık indeksinin değerlendirilmesi sonucunda ortalama gastroknemius kas ağırlık indeksi 84.31 ± 3.92 , en düşük 78.53 ve en yüksek 88.12 olarak değerlendirildi. Anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.001$). Grup3A' daki deneklerin gastroknemius kas ağırlık indeksinin değerlendirilmesi sonucunda ortalama gastroknemius kas ağırlık indeksi 27.52 ± 6.54 , en düşük 19.33 ve en yüksek 37.52 olarak değerlendirildi. Anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.001$). Grup3B' deki deneklerin gastroknemius kas ağırlık indeksinin değerlendirilmesi sonucunda ortalama gastroknemius kas ağırlık indeksi 48.67 ± 4.62 , en düşük 40.63 ve en yüksek 53.38 olarak değerlendirildi. Anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$). Grup3C' deki deneklerin gastroknemius kas ağırlık indeksinin değerlendirilmesi sonucunda ortalama gastroknemius kas ağırlık indeksi 55.58 ± 4.44 , en düşük 48.88 ve en yüksek 61.21 olarak değerlendirildi. Anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$) (Tablo 11, 12)

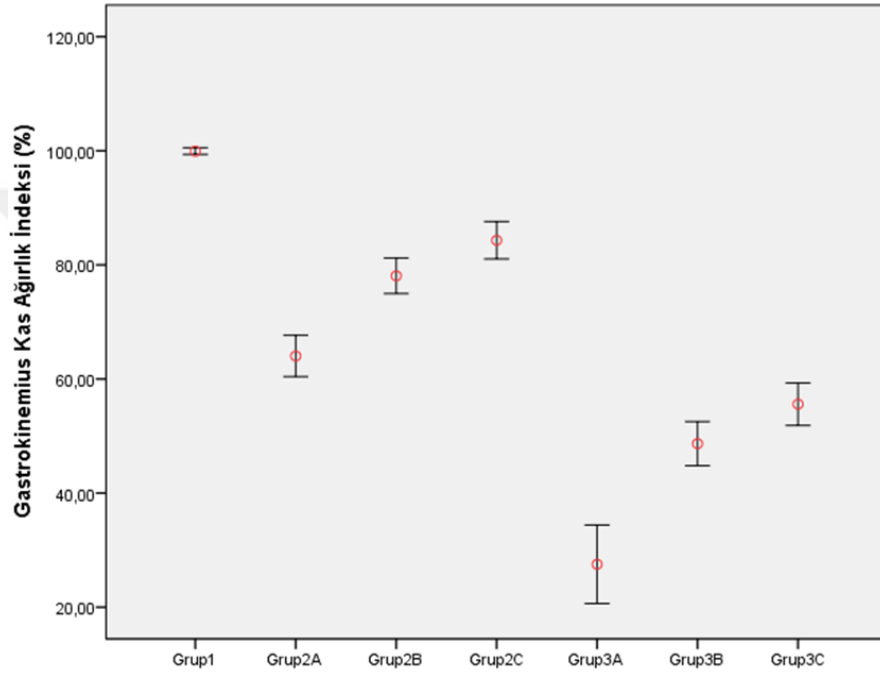
Tablo 11: Gruplardaki Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi (%) Verileri

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	98.62	57.16	70.57	78.53	19.33	40.63	48.88
2	99.65	59.85	74.54	79.25	23.67	42.58	50.12
3	99.89	61.61	77.77	82.25	24.53	48.87	53.34
4	99.95	63.88	79.11	84.33	27.75	49.93	55.63
5	99.99	64.47	80.11	86.15	32.35	50.11	57.57
6	100.01	67.54	80.45	87.85	37.52	51.24	58.84
7	100.21	68.15	80.95	88.05	*	52.63	59.12
8	101.17	69.59	81.13	88.12	*	53.38	61.21
Ort $\pm$ SD	99.93 $\pm$ 0.69	64.03 $\pm$ 4.32	78.07 $\pm$ 3.72	84.31 $\pm$ 3.92	27.52 $\pm$ 6.54	48.67 $\pm$ 4.62	55.58 $\pm$ 4.44

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo12: Gruptaki Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi (%) Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maximum	Ortalama $\pm$ SD
1	98.62	101.17	99.93 $\pm$ 0.69
2A	57.16	69.59	64.03 $\pm$ 4.32
2B	70.57	81.13	78.07 $\pm$ 3.72
2C	78.53	88.12	84.31 $\pm$ 3.92
3A	19.33	37.52	27.52 $\pm$ 6.54
3B	40.63	53.38	48.67 $\pm$ 4.62
3C	48.88	61.21	55.58 $\pm$ 4.44



Şekil 35: Gruplara ait gastroknemius kas ağırlık indeksi karşılaştırmalı grafiği

4.3. Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları

Grup1’ deki deneklerin amplitüdlerinin istatistiki değerlendirilmesi sonucunda 0.gün amplitüd ortalaması $653.75 \pm 37.36 \mu V$, 1.gün amplitüd ortalaması $650.75 \pm 35.42 \mu V$ ve 28.gün amplitüd ortalaması $655.62 \pm 32.76 \mu V$ olarak değerlendirildi ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$). (Tablo 13,16).

Grup2A’ daki deneklerin preoperatif ortalama amplitüdü $668.62 \pm 38.04 \mu V$, en düşük amplitüdü $600 \mu V$ ve en yüksek amplitüdü $704 \mu V$ olarak değerlendirildi ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$). Grup2A’ daki deneklerin postoperatif 1.gün ortalama amplitüdü $268.50 \pm 27.62 \mu V$, en düşük amplitüdü $240 \mu V$ ve en yüksek amplitüdü $315 \mu V$ olarak değerlendirildi ve anlamlı düşüklük saptandı ($p < 0.001$). Grup2A’ daki deneklerin postoperatif 28.gün ortalama amplitüdü $291.25 \pm 27.88 \mu V$, en düşük amplitüdü $255 \mu V$ ve

en yüksek amplitüdü 332 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.001$). (Tablo 14, 16).

Grup2B' daki deneklerin preoperatif ortalama amplitüdü $682,50 \pm 31,42 \mu$ V, en düşük amplitüdü 632 μ V ve en yüksek amplitüdü 711 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup2B' daki deneklerin postoperatif 1.gün ortalama amplitüdü $266,37 \pm 26,50\mu$ V, en düşük amplitüdü 232 μ V ve en yüksek amplitüdü 312 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.001$). Grup2B' daki deneklerin postoperatif 28.gün ortalama amplitüdü $467,75 \pm 15,22 \mu$ V, en düşük amplitüdü 445 μ V ve en yüksek amplitüdü 484 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$). (Tablo 14, 16).

Grup2C' daki deneklerin preoperatif ortalama amplitüdü $671,25 \pm 40,01 \mu$ V, en düşük amplitüdü 605 μ V ve en yüksek amplitüdü 718 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup2C' daki deneklerin postoperatif 1. gün ortalama amplitüdü $267,25 \pm 25,15\mu$ V, en düşük amplitüdü 243 μ V ve en yüksek amplitüdü 309 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$). Grup2C' daki deneklerin postoperatif 28. Gün ortalama amplitüdü $566,75 \pm 52,68 \mu$ V, en düşük amplitüdü 473 μ V ve en yüksek amplitüdü 625 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.001$). (Tablo 14, 16).

Grup3A' daki deneklerin preoperatif ortalama amplitüdü $675,16 \pm 31,12 \mu$ V, en düşük amplitüdü 642 μ V ve en yüksek amplitüdü 712 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3A' daki deneklerin postoperatif 1. gün ortalama amplitüdü $132,83 \pm 13,04 \mu$ V, en düşük amplitüdü 118 μ V ve en yüksek amplitüdü 155 μ V değerlendirildi ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.001$). Grup3A' daki deneklerin postoperatif 28. gün ortalama amplitüdü $139,50 \pm 14,32 \mu$ V, en düşük amplitüdü 122 μ V ve en yüksek amplitüdü 162 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.001$). (Tablo 15, 16).

Grup3B' daki deneklerin preoperatif ortalama amplitüdü $671,87 \pm 31,26 \mu$ V, en düşük amplitüdü 619 μ V ve en yüksek amplitüdü 705 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3B' daki deneklerin postoperatif 1. gün amplitüdü $167,62 \pm 16,23 \mu$ V, en düşük amplitüdü 145 μ V ve en yüksek amplitüdü 195 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.001$). Grup3B' daki deneklerin postoperatif 28. gün amplitüdü $264,12 \pm 19,34 \mu$ V, en düşük amplitüdü 235 μ V ve en yüksek amplitüdü 288 μ V olarak değerlendirildi ve anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$). (Tablo 15, 16).

Grup3C’ deki deneklerin preoperatif ortalama amplitüdü $677.50 \pm 35.63 \mu V$, en düşük amplitüdü $630 \mu V$ ve en yüksek amplitüdü $725 \mu V$ olarak değerlendirildi ve anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C’ deki deneklerin postoperatif 1. gün ortalama amplitüdü $162.25 \pm 20.06 \mu V$, en düşük amplitüdü $139 \mu V$ ve en yüksek amplitüdü $199 \mu V$ olarak değerlendirildi ve anlamlı düşüklük saptandı ($p>0.001$). Grup3C’ deki deneklerin postoperatif 28. gün ortalama amplitüdü $355.25 \pm 36,31 \mu V$, en düşük amplitüdü $305 \mu V$ ve en yüksek amplitüdü $399 \mu V$ olarak değerlendirildi ve anlamlı yükseklik saptandı ($p<0.05$). (Tablo 15, 16)

Tablo 13: Grup1 Amplitüd Verileri(μV)

Denekler	0.gün	1.gün	28.gün
1	615	617	611
2	618	619	619
3	620	625	642
4	635	625	648
5	654	648	653
6	688	676	678
7	695	688	695
8	705	708	699
Ort $\pm$ SD	653.75 $\pm$ 37.36	650.75 $\pm$ 35.42	655.62 $\pm$ 32.76

Tablo-14: Grup2 Amplitüd Verileri(μV)

Denek	2A			2B			2C		
	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün
1	600	240	255	632	232	445	605	243	473
2	625	245	266	635	242	452	623	245	515
3	655	248	271	686	245	457	655	247	545
4	688	251	282	690	261	464	678	251	578
5	689	266	294	695	276	477	695	266	582
6	693	288	305	703	278	481	697	285	595
7	695	295	325	708	285	482	699	292	621
8	704	315	332	711	312	484	718	309	625
Ort $\pm$ SD	668.62 $\pm$ 38.04	268.50 $\pm$ 27.62	291.25 $\pm$ 27.88	682,50 $\pm$ 31.42	266.37 $\pm$ 26.50	467.75 $\pm$ 15,22	671.25 $\pm$ 40.01	267.25 $\pm$ 25,15	566.75 $\pm$ 52.68

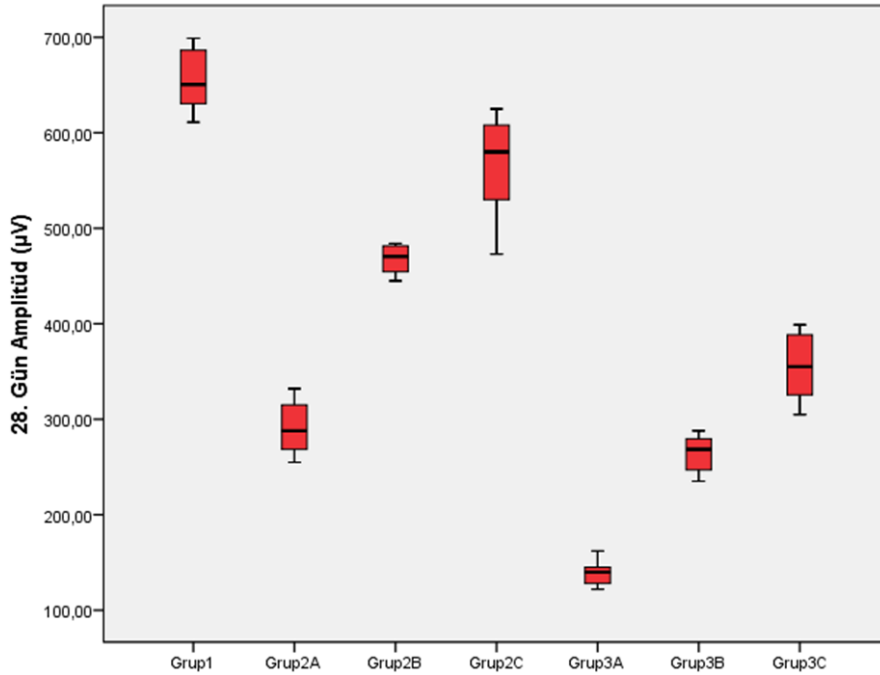
Tablo 15: Grup3 Amplitüd Verileri (µV)

Denek	3A			3B			3C		
	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün	Preop	Postop 1.gün	Postop 28.gün
1	642	118	122	619	145	235	630	139	305
2	648	125	128	644	154	242	634	148	309
3	655	128	135	655	156	252	652	150	342
4	685	131	145	666	166	266	681	150	344
5	709	140	145	684	168	271	685	162	366
6	712	155	162	699	175	275	700	168	385
7	*	*	*	703	182	284	713	182	392
8	*	*	*	705	195	288	725	199	399
Ort ± SD	675.16 ±31.12	132.83 ±13.04	139.50 ±14.32	671.87 ±31.26	167.62 ±16.23	264.12 ±19.34	677.50 ±35.63	162.25 ±20.06	355.25 ±36.31

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo16: Gruplardaki 28.gün Amplitüd (µV) Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama ± SD
1	611	699	655.62 ± 32.76
2A	255	332	291.25 ± 27.88
2B	445	484	467.75 ± 15.22
2C	473	625	566.75 ± 52.68
3A	122	162	139.50 ± 14.32
3B	235	288	264.12 ± 19.34
3C	305	399	355.25 ± 36.31

**Şekil 36: Gruplara ait 28.gün amplitüdlerinin karşılaştırmalı grafiği**

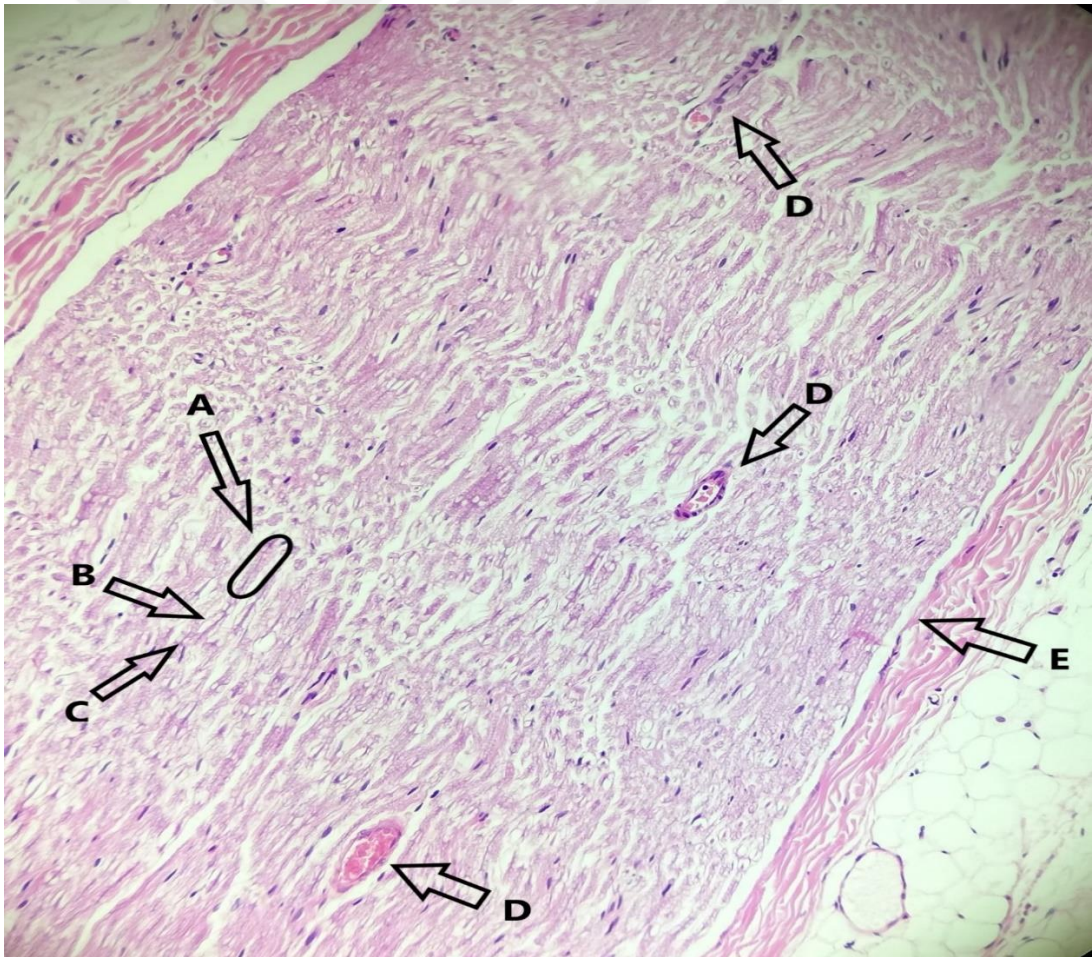
4.4. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

4.4.1. Makroskopik bulgular

Çalışmaya dahil edilen 54 deneğe ait siyatik sinir dokularının cerrahi eksplorasyon sonrası yapılan makroskopik değerlendirmesinde; kontrol grubunda yer alan deneklerde çevre dokuya yapışıklık ve nöroma izlenmezken, çalışma gruplarına ait sinirlerde sütür hattına uyan bölgelerde çevre dokuya yapışıklık görüldü. Nöroma oluşumu saptanmadı

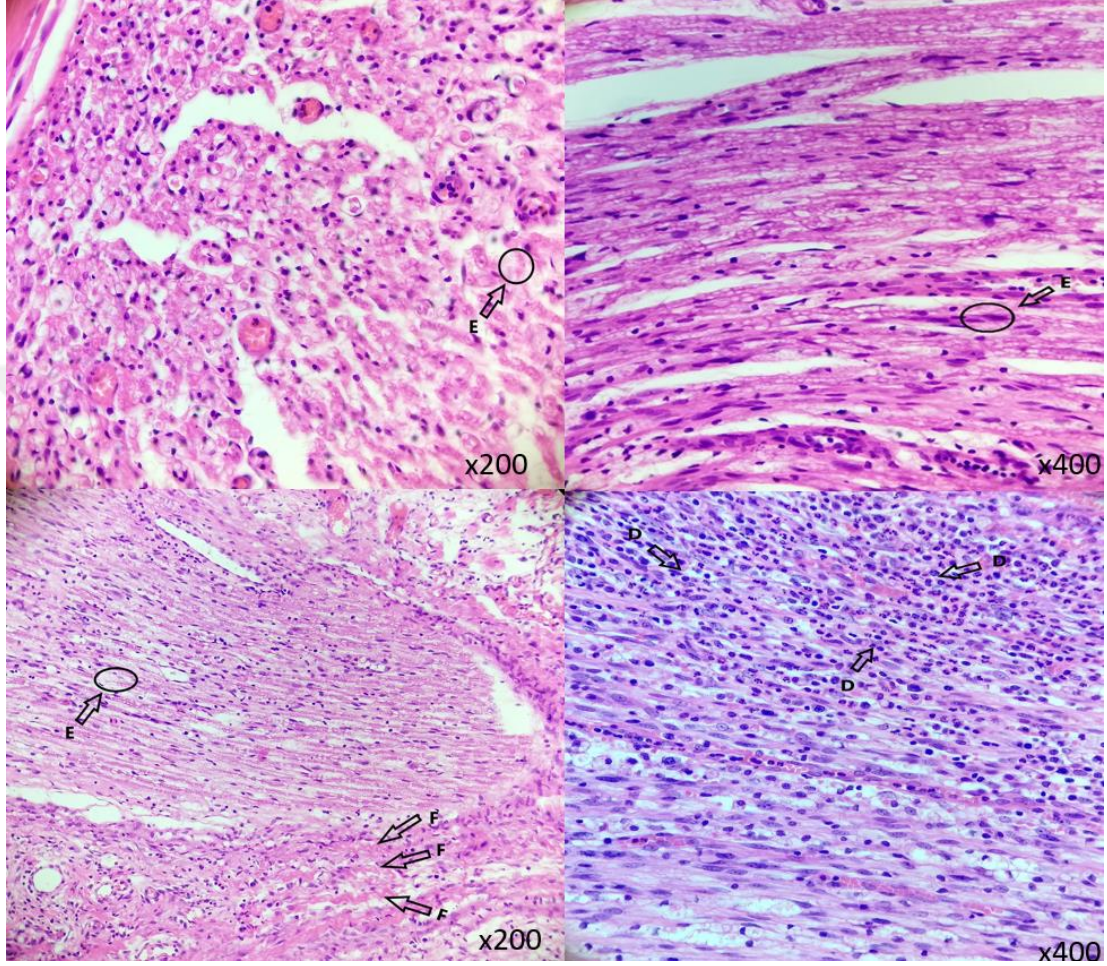
4.4.2. Hematoksilen&Eozin (H&E) Boyama Bulguları

Deney gruplarına ait periferik sinir dokuları H&E boyama sonrasında değerlendirildi. Grup1’de sinir liflerin düzenli olduğu, SC’ ye ait nukleuslar ve düzenli akson yapıları ile tüm bölümlerde normal histolojik yapıda olduğu izlendi. Fibrozis, WD, ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu tespit edilmedi (Şekil 37).



Şekil 37: Kontrol grubuna ait sağlam sinir lifleri, H&E, x200 (A: Sinir Lifi, B: Miyelin
C: Schwan hücresi, D: Vasküler yapı, E: Perinöryum)

Grup2A'daki deneklerde periferik sinir doku bütünlüğünün kaybolduğu görüldü. Dejeneratif zeminde akson yoğunluğunun azaldığı, myelin kaybı olduğu ve sinir liflerinin irregüler dağıldığı tespit edildi (Şekil 38) .



Şekil 38: Grup2A'ya ait sinir lifleri, H&E (E: Miyelin kaybı, F: Kollajen lifler D: İnflamatuar hücreler)

Grup2A'daki Denekler Modifiye Histopatolojik Skorlama Tablosuna göre fibrozis bakımından Grade 1 - 2 - 3, WD bakımından Grade 2 - 3, ödem bakımından Grade 1 - 2 - 3, inflammatuar hücre infiltrasyonu bakımından Grade 2 - 3 düzeyinde tespit edildi (Tablo 17). Değerler istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$).

Grup2B'deki deneklerde akson ve miyelin yapısının düzenlenmeye başladığı, fibrotik alanların ve konjesyonun azaldığı gözlemlendi. Grup2B' deki denekler Modifiye Histopatolojik Skorlama Tablosuna göre fibrozis bakımından Grade 1 - 2, WD bakımından Grade 1 - 2, ödem bakımından Grade 1 - 2, inflammatuar hücre infiltrasyonu bakımından

Grade 0 - 1 - 2 düzeyinde tespit edildi (Tablo 17). Değerler istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$).

Grup2C'deki deneklerde dejeneratif değişikliklerde ve konjesyonda azalma, akson ve miyelin organizasyonunda iyileşme tespit gözlendi. Grup2C' deki denekler Modifiye Histopatolojik Skorlama Tablosuna göre fibrozis bakımından Grade 1 - 2, WD bakımından Grade 0 - 1 - 2, ödem bakımından Grade 0 - 1 - 2, inflammatuar hücre infiltrasyonu bakımından Grade 0 - 1 düzeyinde tespit edildi (Tablo 17). Değerler istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$).

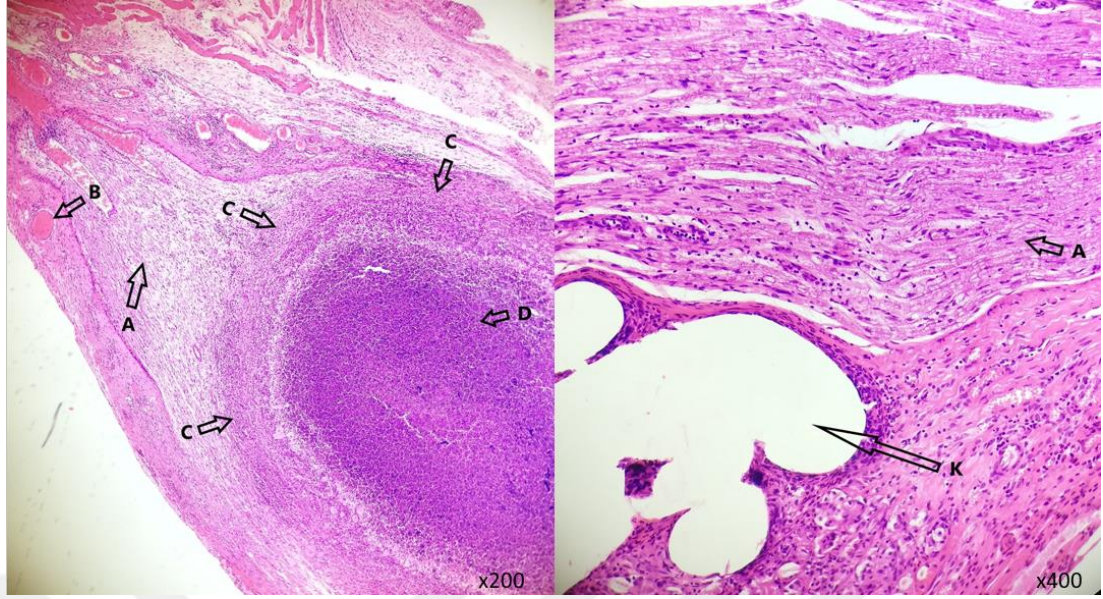
Tablo 17: Grup2 Deneklerin Siyatik Sinir Hasarının Modifiye Histopatolojik Skorlama Tablosuna Göre Değerlendirilmesi

Denekler	Fibrozis			WD			Ödem			İnflammatuar hücre infiltrasyonu		
	(1-2-3)			(1-2-3)			(1-2-3)			(1-2-3)		
	2A	2B	2C	2A	2B	2C	2A	2B	2C	2A	2B	2C
1	1	1	1	2	1	0	1	1	0	2	0	0
2	3	1	1	3	1	1	3	1	0	2	1	0
3	2	1	1	3	1	1	3	1	1	2	1	0
4	3	1	1	2	1	1	3	1	1	2	1	0
5	2	1	1	3	1	1	3	1	1	3	1	1
6	1	1	1	3	2	1	3	2	1	3	1	1
7	3	2	1	3	2	2	2	2	1	3	1	1
8	3	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2	1

Grup3A'daki deneklerde çok yoğun inflammatuar hücre infiltrasyonu, belirgin konjesyon sahaları, yoğun kollajen lifler, aksonal bütünlükte bozulma miyelin kaybı ve yabancı cisim reaksiyonu gözlendi (Şekil 39).

Grup3A' daki denekler Modifiye Histopatolojik Skorlama Tablosuna göre fibrozis bakımından Grade 2 - 3, WD bakımından Grade 2 - 3, ödem bakımından Grade 2 - 3, inflammatuar hücre infiltrasyonu bakımından Grade 2 - 3 düzeyinde tespit edildi (Tablo 18). Değerler istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$).

Grup3B' deki deneklerde akson yapısının ve miyelin organizasyonunun kısmen düzenlendiği, fibrotik alanların, inflammatuar hücre infiltrasyonunun ve konjesyonun azaldığı gözlendi. Grup3B' deki denekler Modifiye Histopatolojik Skorlama Tablosuna göre fibrozis bakımından Grade 1 - 2 - 3, WD bakımından Grade 1 - 2, ödem bakımından Grade 1 - 2, inflammatuar hücre infiltrasyonu bakımından Grade 1 düzeyinde tespit edildi (Tablo 18). Değerler istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$).



Şekil 39: Grup3A'ya ait Sinir dokusunda belirgin inflamasyon ve hasar bulguları, H&E

(A: Sinir lifleri, B: Vasküler yapı, C: Fibrozis, D: İnflamatuar hücreler, K: Yabancı cisim reaksiyonu)

Grup3C' deki deneklerde akson yapısının ve miyelin organizasyonunun kısmen düzenlendiği, fibrotik alanların, inflammatuar hücre infiltrasyonunun ve konjesyonun azaldığı gözlemlendi. Grup3C' deki denekler Modifiye Histopatolojik Skorlama Tablosuna göre fibrozis bakımından Grade 1 - 2 , WD bakımından Grade 1 - 2, ödem bakımından Grade 1 - 2, inflammatuar hücre infiltrasyonu bakımından Grade 0 - 1 düzeyinde tespit edildi (Tablo 18). Değerler istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$).

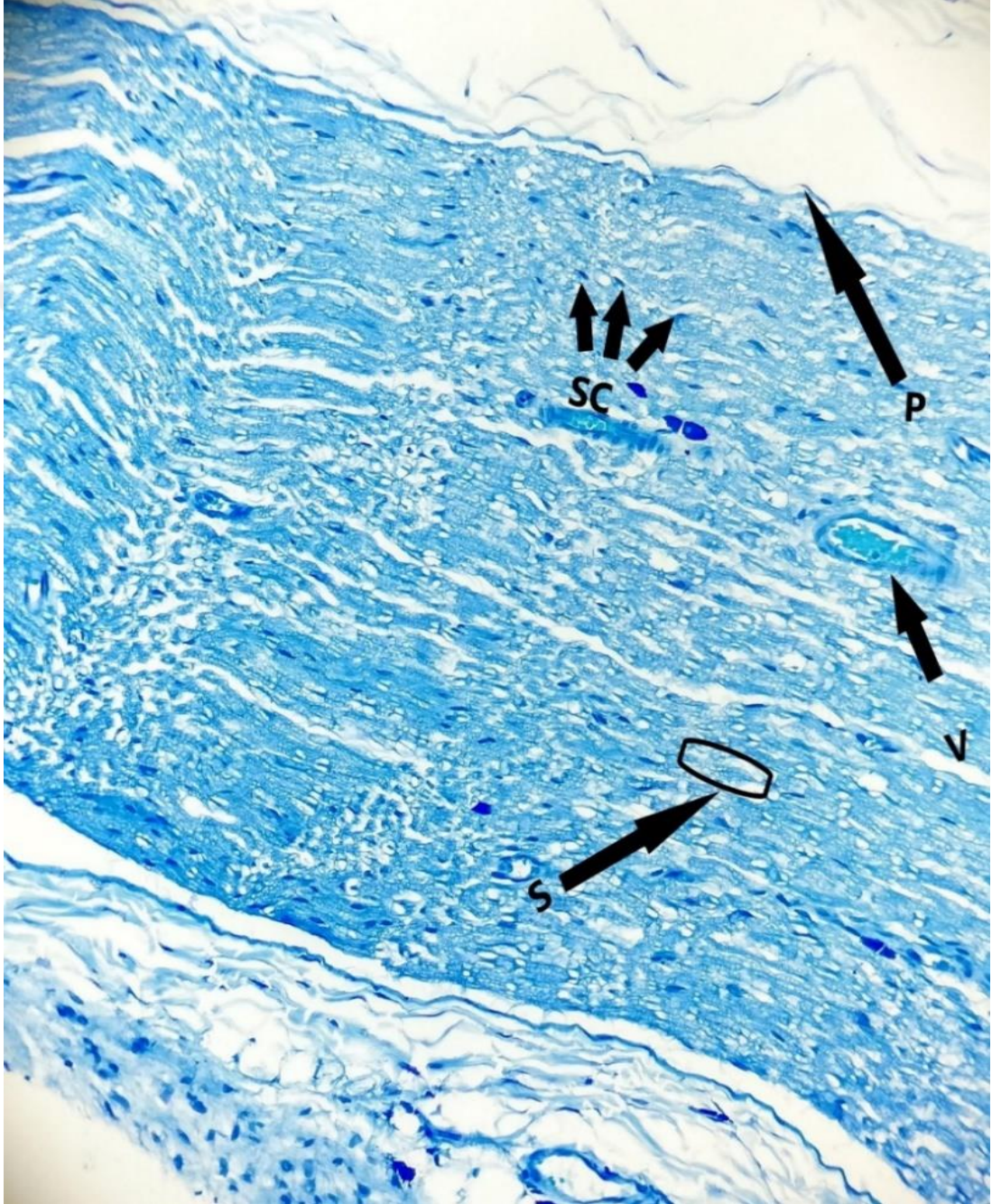
Tablo 18: Grup3 Deneklerin Siyatik Sinir Hasarının Modifiye Histopatolojik Skorlama Tablosuna Göre Değerlendirilmesi

Denekler	Fibrozis			WD			Ödem			İnflamatuar hücre infiltrasyonu		
	(1-2-3)			(1-2-3)			(1-2-3)			(1-2-3)		
	3A	3B	3C	3A	3B	3C	3A	3B	3C	3A	3B	3C
1	3	1	1	2	1	1	2	1	1	3	1	0
2	2	1	1	3	2	1	3	1	1	2	1	0
3	2	2	1	3	2	2	3	1	1	2	1	1
4	3	2	1	2	2	2	3	2	2	3	1	1
5	3	2	2	3	2	2	3	2	2	3	1	1
6	3	2	2	3	2	2	3	2	2	3	1	1
7	*	2	2	*	2	2	*	2	2	*	1	1
8	*	3	2	*	2	2	*	2	2	*	1	1

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

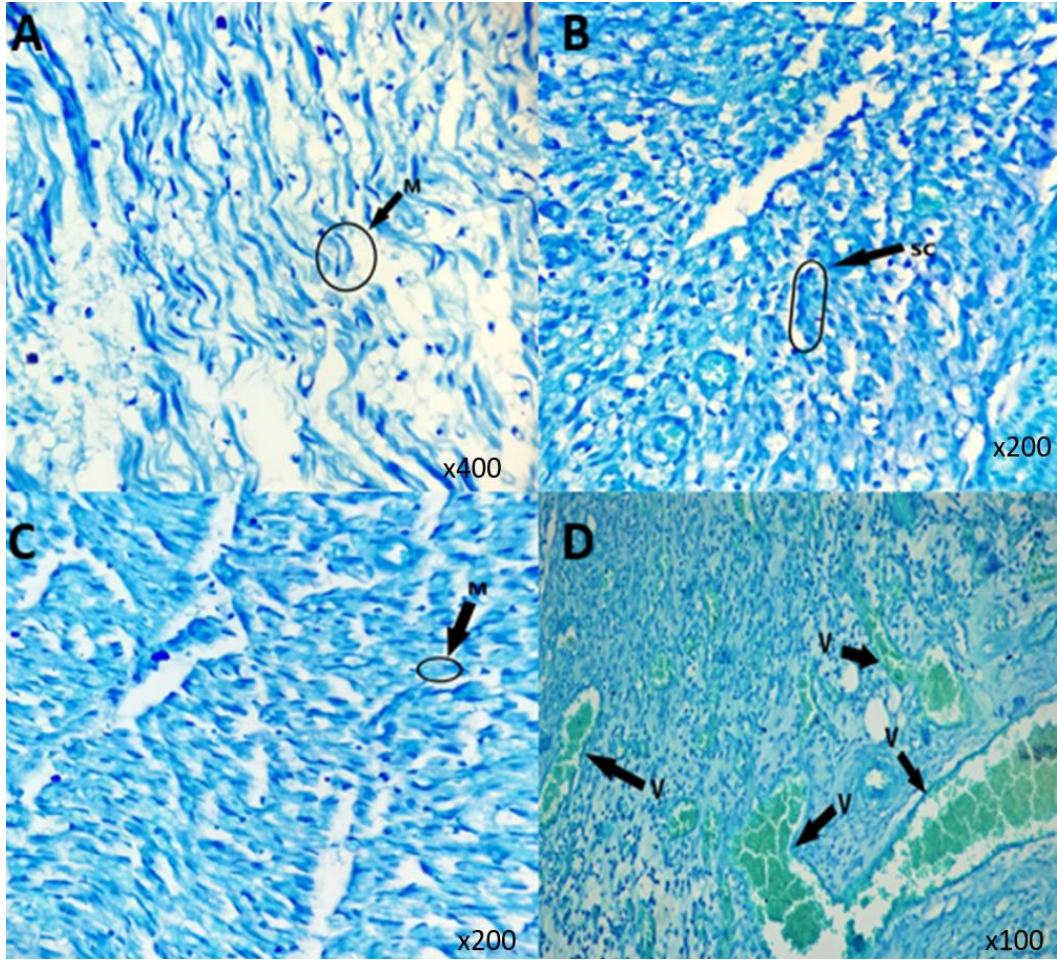
4.4.3. Toluidin Blue Boyama Bulguları

Grup1’de sinir liflerin düzenli olduğu, SC’ ye ait nukleuslar ve düzenli akson yapıları ile tüm bölümlerde normal histolojik yapıda olduğu izlendi. Aksonal organizasyon düzenliydi ve WD gözlenmedi (Şekil 40).



Şekil 40: Kontrol grubuna ait siyatik sinir kesiti, toluidin mavisi x200 (P: Perinöryum, V: vasküler yapı, S: sinir lifi, SC: Schwann hücresi)

Yaralanma yapılan kontrol gruplarında (Grup2A ve Grup3A) wallerian dejenerasyon, miyelin kaybı, konjesyon, kollajen lif ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu belirlendi, kısmen Schwann hücre hiperplazisi gözlemlendi. Grup2B, Grup2C, Grup3B ve Grup3C’ de rejenere aksonlar ve Schwann hücre artışı ön plandaydı.(Şekil 41)



Şekil 41: Grup3A’ ya ait hasarlı sinir lifinde belirgin miyelin kaybı, toluidin mavisi (M:Myelin Kaybı, SC: Schwann hücre artışı, V:Vasküler yapı)

4.4.3.1. Miyelinli Akson Yoğunluğu Bulguları

Grup1’ deki deneklerin miyelinli akson yoğunluğu ortalama 0.00426 ± 0.00106 $n/\mu m^3$, en düşük 0.00332 $n/\mu m^3$, en yüksek 0.00667 $n/\mu m^3$ olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup2A’ daki deneklerin miyelinli akson yoğunluğu ortalama 0.00103 ± 0.00025 $n/\mu m^3$, en düşük 0.00076 $n/\mu m^3$, en yüksek 0.00139 $n/\mu m^3$ olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.001$). Grup2B’ deki deneklerin miyelinli akson yoğunluğu ortalama 0.00239 ± 0.00100 $n/\mu m^3$, en düşük

0.00136 n/μm³, en yüksek 0.00433 n/μm³ olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik saptandı (p<0.05). Grup2C’ deki deneklerin miyelinli akson yoğunluğu ortalama 0.00322 ± 0.00149 n/μm³, en düşük 0.00186 n/μm³, en yüksek 0.00646 n/μm³ olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik saptandı (p<0.001). Grup3A’ daki deneklerin miyelinli akson yoğunluğu ortalama 0.00050 ± 0.00015 n/μm³, en düşük 0.00025 n/μm³, en yüksek 0.00065 n/μm³ olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük saptandı (p<0.001). Grup3B’ deki deneklerin miyelinli akson yoğunluğu ortalama 0.00088 ± 0.00045 n/μm³, en düşük 0.00046 n/μm³, en yüksek 0.00167 n/μm³ olarak saptandı. Miyelinli akson yoğunluğundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Grup3C’ deki deneklerin miyelinli akson yoğunluğu ortalama 0.00122 ± 0.00102 n/μm³, en düşük 0.00042 n/μm³, en yüksek 0.00330 n/μm³ olarak saptandı. Miyelinli akson yoğunluğundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05) (Tablo 19, 20).

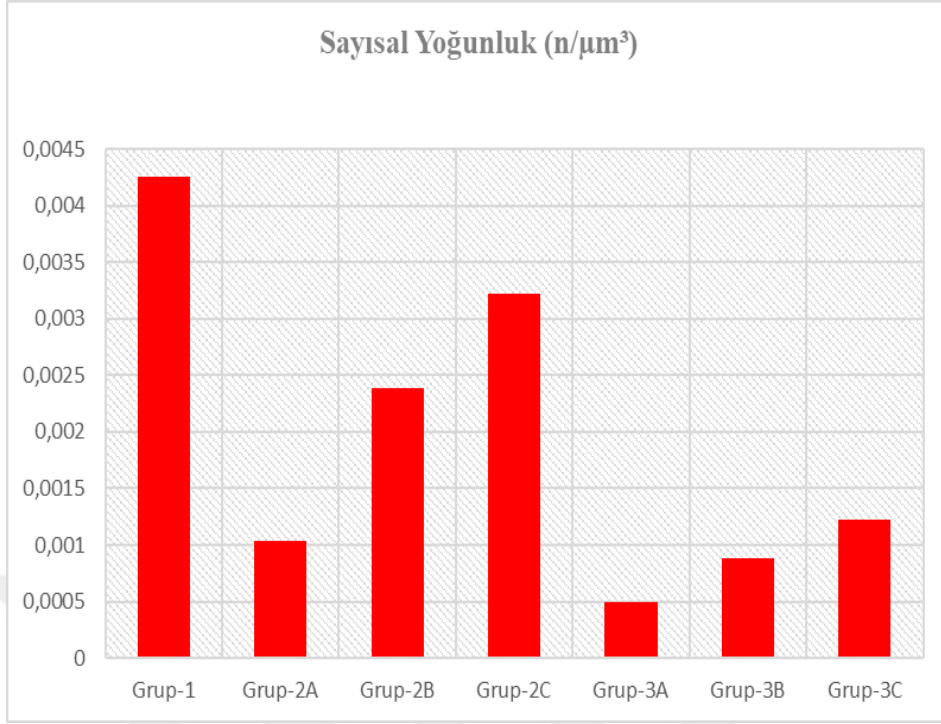
Tablo 19: Grupların Miyelinli Akson Yoğunluğu (n/μm³) Verileri

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	0.00332	0.00076	0.00136	0.00186	0.00025	0.00046	0.00042
2	0.00344	0.00084	0.00146	0.00222	0.00040	0.00050	0.00047
3	0.00374	0.00087	0.00189	0.00240	0.00049	0.00051	0.00050
4	0.00379	0.00088	0.00208	0.00243	0.00059	0.00074	0.00075
5	0.00423	0.00095	0.00228	0.00294	0.00060	0.00083	0.00075
6	0.00444	0.00119	0.00238	0.00334	0.00065	0.00089	0.00154
7	0.00444	0.00138	0.00333	0.00412	*	0.00142	0.00203
8	0.00667	0.00139	0.00433	0.00646	*	0.00167	0.00330
Ort	0.00426	0.00103	0.00239	0.00322	0.00050	0.00088	0.00122
±SD	±0.00106	±0.00025	±0.00100	±0.00149	±0.00015	±0.00045	±0.00102

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 20: Grupların Ait Miyelinli Akson Yoğunluğu (n/μm³) Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama ± SD
1	0.00332	0.00667	0.00426 ± 0.00106
2A	0.00076	0.00139	0.00103 ± 0.00025
2B	0.00136	0.00433	0.00239 ± 0.00100
2C	0.00186	0.00646	0.00322 ± 0.00149
3A	0.00025	0.00065	0.00050 ± 0.00015
3B	0.00046	0.00167	0.00088 ± 0.00045
3C	0.00042	0.00330	0.00122 ± 0.00102



Şekil 42: Grupların miyelinli aksonların sayısal yoğunluğunun karşılaştırmalı grafiği

4.4.3.2. Miyelin Kılıf Kalınlığı Bulguları

Grup1’ deki deneklerin miyelin kılıf kalınlığı ortalama $1.27 \pm 0.09 \mu\text{m}$, en düşük $1.15 \mu\text{m}$, en yüksek $1.43 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup2A’ daki deneklerin miyelin kılıf kalınlığı ortalama $0.98 \pm 0.17 \mu\text{m}$, en düşük $0.71 \mu\text{m}$, en yüksek $1.18 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Miyelin kılıf kalınlığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2B’ deki deneklerin miyelin kılıf kalınlığı ortalama $1.06 \pm 0.15 \mu\text{m}$, en düşük $0.85 \mu\text{m}$, en yüksek $1.22 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Miyelin kılıf kalınlığındaki artma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2C’ deki deneklerin miyelin kılıf kalınlığı ortalama $1.16 \pm 0.15 \mu\text{m}$, en düşük $0.95 \mu\text{m}$, en yüksek $1.41 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Miyelin kılıf kalınlığındaki artma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup3A’ daki deneklerin miyelin kılıf kalınlığı ortalama $0.78 \pm 0.14 \mu\text{m}$, en düşük $0.62 \mu\text{m}$, en yüksek $0.99 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Miyelin kılıf kalınlığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). Grup3B’ deki deneklerin miyelin kılıf kalınlığı ortalama $1.07 \pm 0.16 \mu\text{m}$, en düşük $0.84 \mu\text{m}$, en yüksek $1.26 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Miyelin kılıf kalınlığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). Grup3C’ deki deneklerin miyelin kılıf kalınlığı ortalama $1.10 \pm 0.18 \mu\text{m}$, en düşük $0.81 \mu\text{m}$, en yüksek $1.28 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Miyelin kılıf kalınlığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$) (Tablo 21, 22).

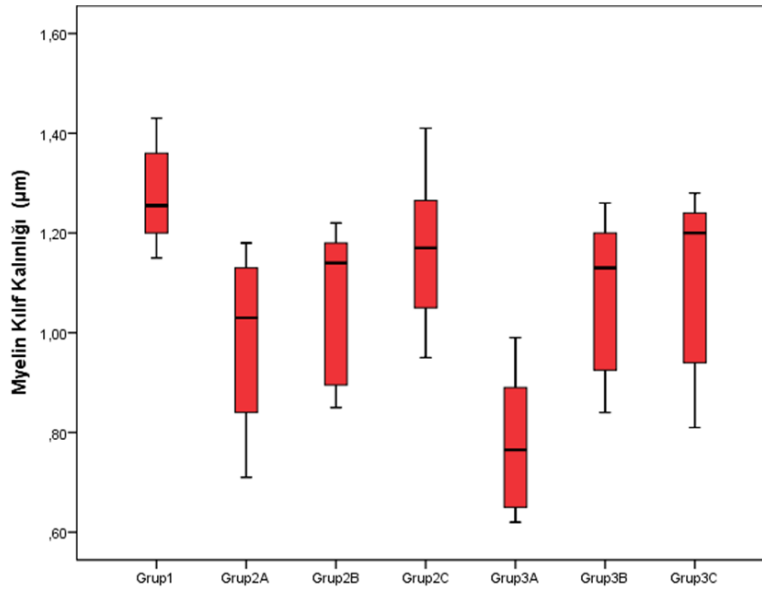
Tablo 21: Grupların Miyelin Kılıf Kalınlığı (µm) Verileri

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	1.15	0.71	0.85	0.95	0.62	0.84	0.81
2	1.19	0.77	0.88	0.99	0.65	0.86	0.89
3	1.21	0.91	0.91	1.11	0.74	0.99	0.99
4	1.23	0.99	1.13	1.12	0.79	1.11	1.19
5	1.28	1.07	1.15	1.22	0.89	1.15	1.21
6	1.34	1.11	1.15	1.24	0.99	1.19	1.23
7	1.38	1.15	1.21	1.29	*	1.21	1.25
8	1.43	1.18	1.22	1.41	*	1.26	1.28
Ort ± SD	1.27 ± 0.09	0.98 ± 0.17	1.06 ± 0.15	1.16 ± 0.15	0.78 ± 0.14	1.07 ± 0.16	1.10 ± 0.18

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 22: Grupların Miyelin Kılıf Kalınlığının Ortalama Değerleri (µm)

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama ± SD
1	1.15	1.43	1.27 ± 0.09
2A	0.71	1.18	0.98 ± 0.17
2B	0.85	1.22	1.06 ± 0.15
2C	0.95	1.41	1.16 ± 0.15
3A	0.62	0.99	0.78 ± 0.14
3B	0.84	1.26	1.07 ± 0.16
3C	0.81	1.28	1.10 ± 0.18

**Şekil 43: Grupların miyelin kılıf kalınlığının karşılaştırmalı grafiği**

4.4.3.3. Miyelinli Akson Çapı Bulguları

Grup1’ deki deneklerin miyelinli akson çapı ortalaması $5.41 \pm 0.55 \mu\text{m}$, en düşük $4.81 \mu\text{m}$, en yüksek $6.31 \mu\text{m}$ idi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup2A’ daki deneklerin miyelinli akson çapı ortalama $3.87 \pm 0.47 \mu\text{m}$, en düşük $3.23 \mu\text{m}$, en yüksek $4.54 \mu\text{m}$ idi. Miyelinli akson çapındaki azalma anlamlıydı ($p<0.05$). Grup2B’ deki deneklerin miyelinli akson çapı ortalama $4.30 \pm 0.48 \mu\text{m}$, en düşük $3.66 \mu\text{m}$, en yüksek $4.89 \mu\text{m}$ idi. Miyelinli akson çapındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Grup2C’ deki deneklerin miyelinli akson çapı ortalama $4.61 \pm 0.50 \mu\text{m}$, en düşük $3.93 \mu\text{m}$, en yüksek $5.29 \mu\text{m}$ idi. Miyelinli akson çapındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$). Grup3A’ daki deneklerin miyelinli akson çapı, ortalama $3.29 \pm 0.23 \mu\text{m}$, en düşük $3.03 \mu\text{m}$, en yüksek $3.66 \mu\text{m}$ idi. Miyelinli akson çapındaki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Grup3B’ deki deneklerin miyelinli akson çapı ortalama $3.72 \pm 0.28 \mu\text{m}$, en düşük $3.28 \mu\text{m}$, en yüksek $4.05 \mu\text{m}$ idi. Miyelinli akson çapındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Grup3C’ deki deneklerin miyelinli akson çapı ortalama $3.88 \pm 0.22 \mu\text{m}$, en düşük $3.58 \mu\text{m}$, en yüksek $4.17 \mu\text{m}$ idi. Miyelinli akson çapındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo 23, 24).

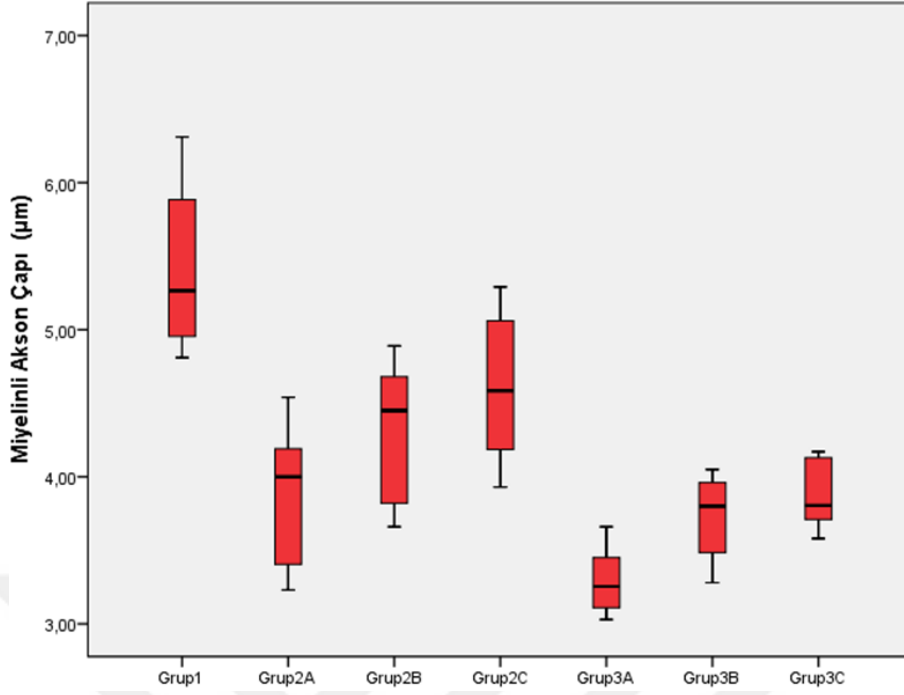
Tablo 23: Grupların Miyelinli Akson Çapı (μm) Verileri

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	4.81	3.23	3.66	3.93	3.03	3.28	3.58
2	4.92	3.25	3.69	4.12	3.11	3.39	3.71
3	4.99	3.56	3.95	4.25	3.19	3.58	3.71
4	5.21	3.89	4.35	4.48	3.32	3.79	3.78
5	5.32	4.11	4.55	4.69	3.45	3.81	3.83
6	5.74	4.15	4.58	4.87	3.66	3.89	4.11
7	6.03	4.23	4.78	5.25	*	4.03	4.15
8	6.31	4.54	4.89	5.29	*	4.05	4.17
Ort $\pm$ SD	5.41 ± 0.55	3.87 ± 0.47	4.30 ± 0.48	4.61 ± 0.50	3.29 ± 0.23	3.72 ± 0.28	3.88 ± 0.22

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 24: Grupların Miyelinli Akson Çaplarının Ortalama Değerleri (μm)

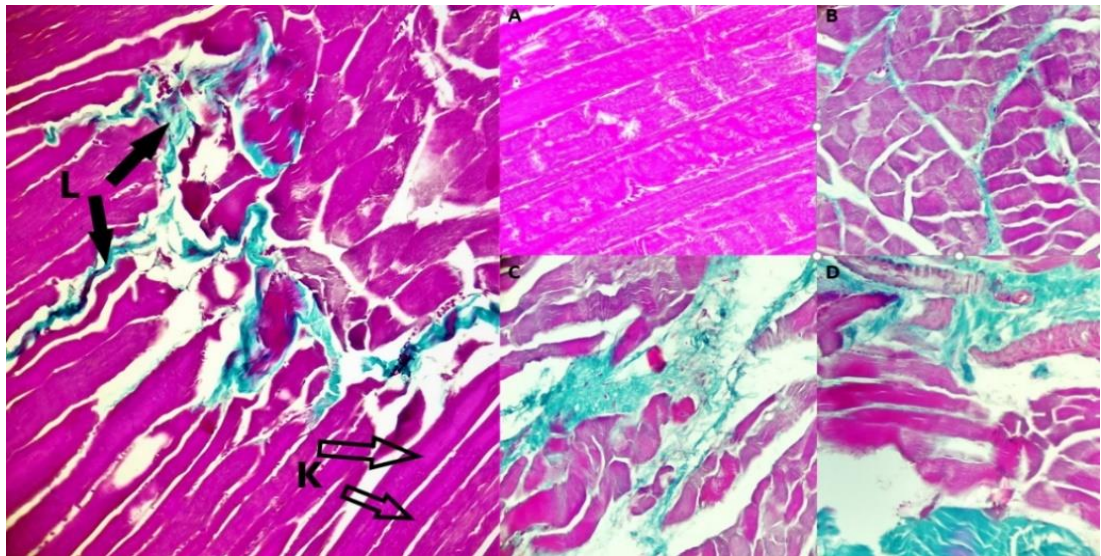
Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama $\pm$ SD
1	4.81	6.31	5.41 ± 0.55
2A	3.23	4.54	3.87 ± 0.47
2B	3.66	4.89	4.30 ± 0.48
2C	3.93	5.29	4.61 ± 0.50
3A	3.03	3.66	3.29 ± 0.23
3B	3.28	4.05	3.72 ± 0.28
3C	3.58	4.17	3.88 ± 0.22



Şekil 44: Grupların miyelinli akson çapının karşılaştırmalı grafiği

4.4.4. Masson Trichrome (MTC) Boyama Bulguları

Grup1'e ait deneklerin gastrokinemius kas örneklerinde çizgili kas demetleri nizami idi ve kollajen lif saptanmadı. Grup2A ve Grup 3A'ya ait deneklerin kas demetlerinde atrofi ve fibrozis ve kollajen lif oranında artış saptandı. Grup2B, Grup2C, Grup3B ve Grup3C'ye ait deneklerde fibrozis ve kollajen lif oranında azalma saptandı. (Şekil 45)



Şekil 45: Kas gruplarında fibrozis değerlendirmesi MTC boyası x200 (L: Kollajen lif, K: Çizgili kas, A: Normal kas, B: Hafif fibrozis, C: Orta derecede fibrozis, D: İleri derecede fibrozis)

4.4.4.1. Gastroknemius Kas Lifi apı Bulguları

Grup1' e ait deneklerin gastrokinemius kas lifi apları değerlendirildiğinde ortalama $46.78 \pm 4.61 \mu\text{m}$, en düşük $40.19 \mu\text{m}$, en yüksek $53.39 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2A' ya ait deneklerin gastroknemius kas lifi apları değerlendirildiğinde ortalama $26.16 \pm 2.35 \mu\text{m}$, en düşük $23.23 \mu\text{m}$, en yüksek $29.98 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup2B' ye ait deneklerin gastroknemius kas lifi apları değerlendirildiğinde ortalama $31.13 \pm 2.06 \mu\text{m}$, en düşük $28.21 \mu\text{m}$, en yüksek $34.52 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.05$). Grup2C' ye ait deneklerin gastroknemius kas lifi apları değerlendirildiğinde ortalama $39.23 \pm 5.81 \mu\text{m}$, en düşük $29.98 \mu\text{m}$, en yüksek $45.96 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$). Grup3A' ya ait deneklerin gastroknemius kas lifi apları değerlendirildiğinde ortalama $17.85 \pm 1,23 \mu\text{m}$, en düşük $16.76 \mu\text{m}$, en yüksek $19.99 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup3B' ye ait deneklerin gastroknemius kas lifi apları değerlendirildiğinde ortalama $27.36 \pm 1.44 \mu\text{m}$, en düşük $25.43 \mu\text{m}$, en yüksek $29.99 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$). Grup3C' ye ait deneklerin gastroknemius kas lifi apları değerlendirildiğinde ortalama $32.15 \pm 2.60 \mu\text{m}$, en düşük $28.32 \mu\text{m}$, en yüksek $36.16 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$) (Tablo 25, 26).

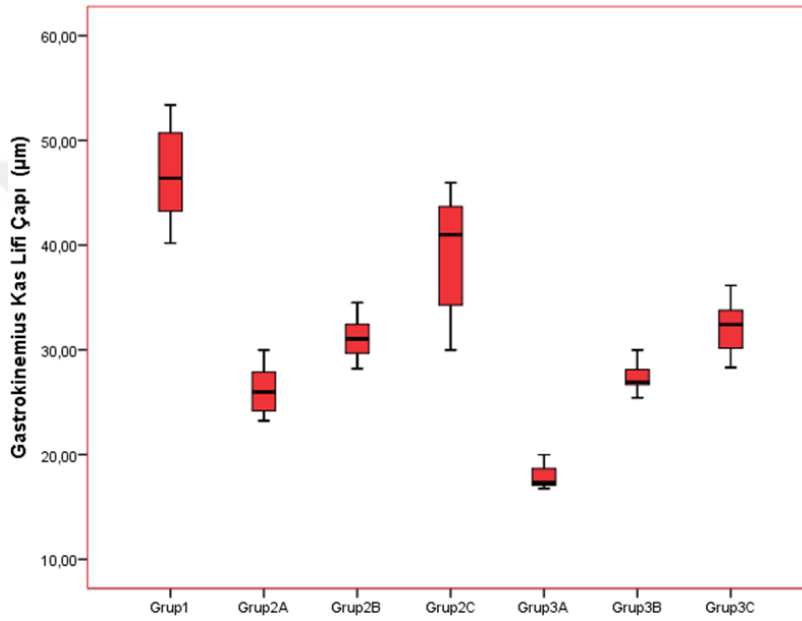
Tablo 25: Grupların Gastrokinemius Kas Lifi apı (μm) Verileri

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	40.19	23.23	28.21	29.98	16.76	25.43	28.32
2	42.14	23.26	29.32	32.21	17.08	26.67	29.11
3	44.33	25.11	30.05	36.35	17.31	26.69	31.22
4	46.16	25.98	30.98	40.13	17.33	26.89	32.32
5	46.61	25.99	31.11	41.87	18.66	26.99	32.52
6	49.45	27.65	31.45	43.15	19.99	27.25	33.11
7	51.98	28.13	33.43	44.22	*	28.99	34.47
8	53.39	29.98	34.52	45.96	*	29.99	36.16
Ort $\pm$ SD	46.78 ± 4.61	26.16 ± 2.35	31.13 ± 2.06	39.23 ± 5.81	17.85 $\pm 1,23$	27.36 ± 1.44	32.15 ± 2.60

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 26: Grupların Gastroknemius Kas Lif Çaplarının (µm) Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama ± SD
1	40.19	53.39	46.78 ± 4.61
2A	23.23	29.98	26.16 ± 2.35
2B	28.21	34.52	31.13 ± 2.06
2C	29.98	45.96	39.23 ± 5.81
3A	16.76	19.99	17.85 ± 1,23
3B	25.43	29.99	27.36 ± 1.44
3C	28.32	36.16	32.15 ± 2.60



Şekil 46: Grupların gastroknemius kas lifi çaplarının karşılaştırmalı grafiği

4.4.4.2. Kollajen Lif alan Yüzdesi Bulguları

Grup1'e ait deneklerin kollajen lif alan yüzdesi ortalama 1.50 ± 1.23 , en düşük 0.26, en yüksek 4.21 idi. İstatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2A'ya ait deneklerin kollajen lif alan yüzdesi ortalama 4.60 ± 1.67 , en düşük 1.12, en yüksek 6.14 idi. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.05$). Grup2B'ye ait deneklerin kollajen lif alan yüzdesi ortalama 3.44 ± 1.50 , en düşük 1.09, en yüksek 6.23 idi. Kollajen lif alan yüzdesindeki azalma anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2C'ye ait deneklerin kollajen lif alan yüzdesi ortalama 1.84 ± 1.30 , en düşük 0.96, en yüksek 4.84 idi. Kollajen lif alan yüzdesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Grup3A'ya ait deneklerin kollajen lif alan yüzdesi ortalama 6.61 ± 3.18 , en düşük 2.26, en yüksek 11.62 idi. Kollajen lif alan yüzdesindeki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Grup3B'ye ait deneklerin kollajen lif alan yüzdesi ortalama 4.72 ± 1.86 , en düşük 1.96, en yüksek 7.76 idi. Kollajen lif

alan yüzdesindeki azalma anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup3C'ye ait deneklerin kollajen lif alan yüzdesi ortalama 4.49 ± 1.82 , en düşük 2.12, en yüksek 8.01 idi. Kollajen lif alan yüzdesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Tablo 27, 28).

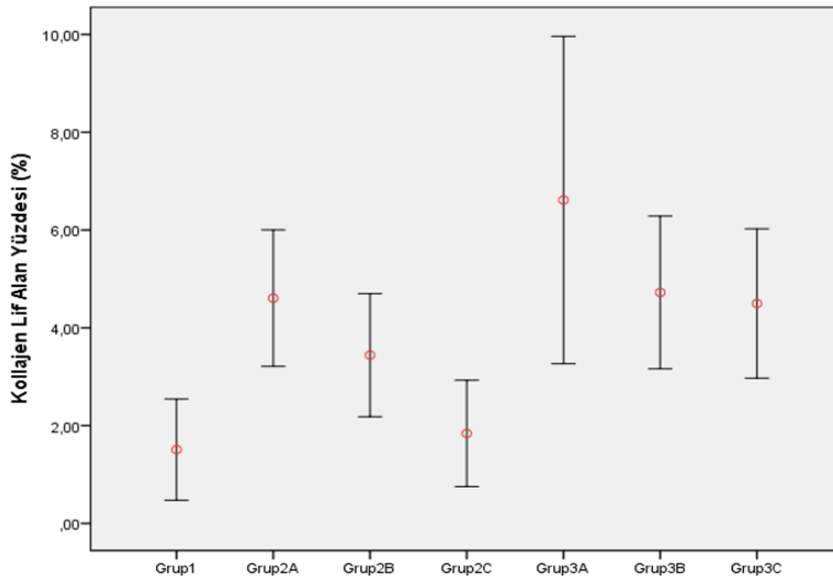
Tablo 27: Grupların Kollajen Lif alan Yüzde Verileri

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	0.26	1.12	1.09	0.96	2.26	1.96	2.12
2	0.56	3.25	2.41	0.99	4.87	2.43	2.96
3	0.99	4.48	2.87	1.12	5.56	4.51	3.56
4	1.23	5.23	2.96	1.25	7.23	4.86	4.02
5	1.24	5.25	3.84	1.32	8.14	4.99	4.44
6	1.36	5.62	3.96	1.96	11.62	5.12	5.13
7	2.22	5.77	4.17	2.28	*	6.15	5.74
8	4.21	6.14	6.23	4.84	*	7.76	8.01
Ort $\pm$ SD	1.50 $\pm$ 1.23	4.60 $\pm$ 1.67	3.44 $\pm$ 1.50	1.84 $\pm$ 1.30	6.61 $\pm$ 3.18	4.72 $\pm$ 1.86	4.49 $\pm$ 1.82

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 28: Grupların Kollajen Lif alan Yüzdeilerinin Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama $\pm$ SD
1	0.26	4.21	1.50 $\pm$ 1.23
2A	1.12	6.14	4.60 $\pm$ 1.67
2B	1.09	6.23	3.44 $\pm$ 1.50
2C	0.96	4.84	1.84 $\pm$ 1.30
3A	2.26	11.62	6.61 $\pm$ 3.18
3B	1.96	7.76	4.72 $\pm$ 1.86
3C	2.12	8.01	4.49 $\pm$ 1.82



Şekil 47: Grupların kollajen lif alan yüzdeilerinin karşılaştırmalı grafiği

4.4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

Grupların NGF (Nerve Growth Faktör), S100, TNF- α ve TGF- β ile immünohistokimyasal boyanma dercesine göre semikantitatif, boyanma alan yüzdesine göre de stereolojik olarak değerlendirildi.

Grupların NGF immünreaktivite dereceleri dört puanlı immünohistokimyasal ölçeğe göre Grup1'deki deneklerde 0 ve 1 puan olarak, Grup2A'daki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup2B'deki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup2C'deki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup3A'daki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup3B'deki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup3C'deki deneklerde 1 ve 2 puan ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak sonuçlar anlamlı değildi ($p>0.05$) (Tablo 29, 30, 31)

Grupların S100 immünreaktivite dereceleri dört puanlı immünohistokimyasal ölçeğe göre; Grup1'deki deneklerde 2 ve 3 puan olarak, Grup2A'daki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup2B'deki deneklerde 2 ve 3 puan, Grup2C'deki deneklerde 2 ve 3 puan, Grup3A'daki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup3B'deki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup3C'deki deneklerde 1 ve 2 puan ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak Grup1'deki sonuçlar anlamlı değilken ($p>0.05$), Grup2A' da anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.05$). Grup2B ve Grup 2C' de anlamlı yükseklik tespit edildi (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$). Grup3A, Grup3B ve Grup3C' deki sonuçlar anlamlı değildi (sırasıyla $p>0.05$, $p>0.05$). (Tablo 29, 30, 31)

Grupların TNF- α immünreaktivite dereceleri dört puanlı immünohistokimyasal ölçeğe göre; Grup1'deki deneklerde 0 puan olarak, Grup2A'daki deneklerde 2 ve 3 puan, Grup2B'deki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup2C'deki deneklerde 0 ve 1 puan, Grup3A'daki deneklerde 2 ve 3 puan, Grup3B'deki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup3C'deki deneklerde 1 ve 2 puan ile değerlendirildi. Grup1' deki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2A'da anlamlı yükseklik tespit edilirken ($p<0.001$), Grup2B'da ve 2C'de anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$). Grup3A'da anlamlı yükseklik tespit edilirken ($p<0.001$), Grup3B'da ve 3C'de anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). (Tablo 29, 30, 31)

Grupların TGF- β immünreaktivite dereceleri dört puanlı immünohistokimyasal ölçeğe göre; Grup1'deki deneklerde 0 puan olarak, Grup2A'daki deneklerde 2 ve 3 puan, Grup2B'deki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup2C'deki deneklerde 0 ve 1 puan, Grup3A'daki deneklerde 2 ve 3 puan, Grup3B'deki deneklerde 1 ve 2 puan, Grup3C'deki deneklerde 1 ve 2 puan ile değerlendirildi. Grup1' deki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2A'da anlamlı yükseklik tespit edilirken ($p<0.001$), Grup2B'da ve 2C'de anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$). Grup3A'da anlamlı yükseklik tespit

edilirken ($p<0.001$), Grup3B’da ve 3C’de anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.001$). (Tablo 29, 30, 31)

Tablo 29: Grup1 İmmünohistokimyasal Değerlendirme Verileri

Denekler	NGF	S100	TNF- α	TGF- β
1	0	3	0	0
2	0	3	0	0
3	0	2	0	0
4	1	3	0	0
5	0	3	0	0
6	0	2	0	0
7	0	3	0	0
8	0	3	0	0

Tablo 30: Grup2 İmmünohistokimyasal Değerlendirme Verileri

Denekler	NGF			S100			TNF- α			TGF- β		
	2A	2B	2C	2A	2B	2C	2A	2B	2C	2A	2B	2C
1	1	1	2	2	3	3	2	1	1	2	1	1
2	1	2	1	1	2	3	2	1	1	2	2	1
3	1	1	2	2	3	3	3	1	0	2	1	1
4	2	2	1	1	2	2	2	2	1	3	2	1
5	1	1	2	2	3	3	2	1	1	2	1	1
6	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1
7	1	1	2	2	3	3	2	1	0	2	1	0
8	1	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	0

Tablo 31: Grup3 İmmünohistokimyasal Değerlendirme Verileri

Denekler	NGF			S100			TNF- α			TGF- β		
	3A	3B	3C	3A	3B	3C	3A	3B	3C	3A	3B	3C
1	1	1	2	1	1	2	3	2	1	3	2	1
2	1	1	1	1	1	1	3	2	1	3	1	1
3	1	2	2	1	2	1	2	1	1	3	2	1
4	1	1	1	1	2	1	3	2	1	2	2	1
5	1	1	2	2	1	1	3	2	1	3	2	1
6	1	2	1	1	2	1	3	2	1	3	2	1
7	*	1	1	*	2	2	*	2	1	*	2	2
8	*	1	1	*	1	2	*	2	2	*	2	2

(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

4.4.5.1. NGF İmmunohistokimyasal Bulguları

Grup1’ deki deneklerin NGF immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 1.83 ± 0.57 , en düşük 1.15, en yüksek 2.57 idi. İstatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2A’ daki deneklerin NGF immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 3.40 ± 1.00 , en düşük 1.98, en yüksek 4.98 idi. Yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) Grup2B’ deki deneklerin NGF immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 5.72 ± 1.56 , en düşük 2.46, en yüksek 7.78 idi. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.05$). Grup2C’ deki deneklerin NGF immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 5.69 ± 1.69 , en düşük 2.98, en yüksek 7.28 olarak idi. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.05$). Grup3A’ daki deneklerin NGF immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 3.03 ± 0.86 , en düşük 1.79, en yüksek 4.11 idi. Yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) Grup3B’ deki deneklerin NGF immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 5.47 ± 1.27 , en düşük 3.19, en yüksek 6.99 idi. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.05$). Grup3C’ deki deneklerin NGF immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 5.86 ± 1.47 , en düşük 2.87, en yüksek 7.33 idi. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 32, 33).

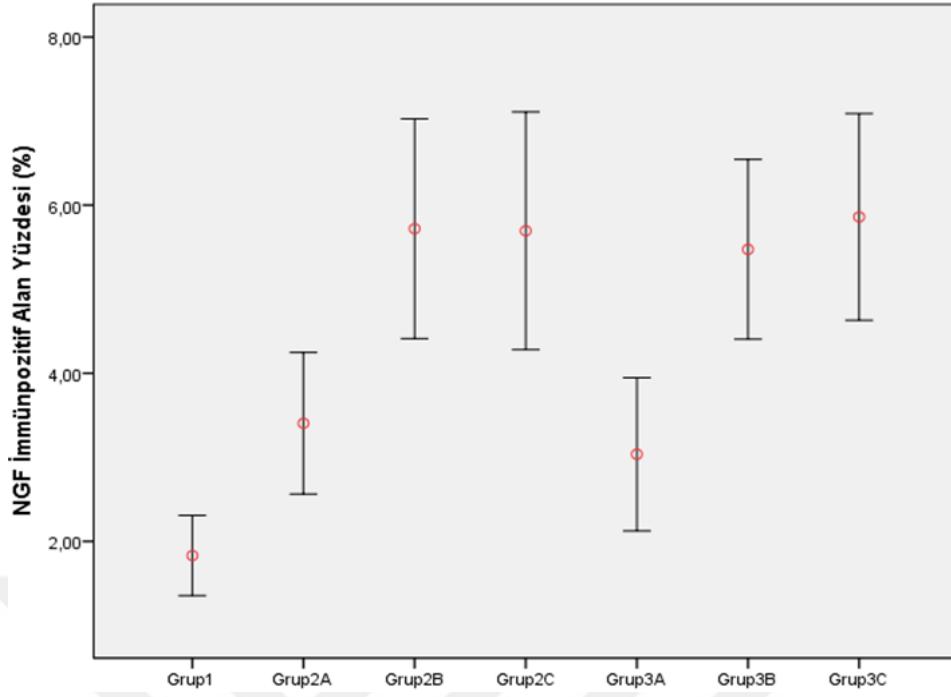
Tablo 32: Grupların NGF İmmunreaktif Alan Yüzdesi

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	1.15	1.98	2.46	2.98	1.79	3.19	2.87
2	1.26	2.12	4.87	3.87	2.22	4.87	4.87
3	1.36	3.25	5.44	4.44	3.15	4.89	5.44
4	1.48	3.36	6.06	5.98	3.47	4.98	5.98
5	2.21	3.38	6.31	6.92	3.48	5.48	6.58
6	2.29	4.02	6.32	6.98	4.11	6.63	6.62
7	2.33	4.15	6.52	7.11	*	6.76	7.19
8	2.57	4.98	7.78	7.28	*	6.99	7.33
Ort $\pm$ SD	1.83 ± 0.57	3.40 ± 1.00	5.72 ± 1.56	5.69 ± 1.69	3.03 ± 0.86	5.47 ± 1.27	5.86 ± 1.47

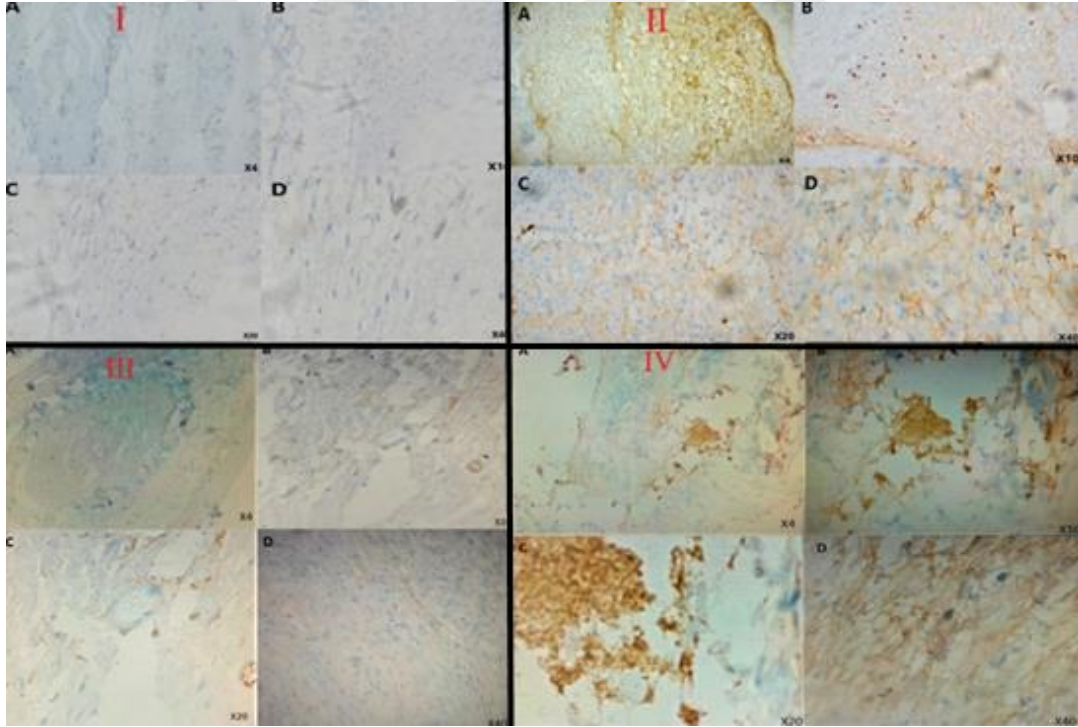
(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 33: Grupların NGF İmmunreaktif Alan Yüzdesinin Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama $\pm$ SD
1	1.15	2.57	1.83 ± 0.57
2A	1.98	4.98	3.40 ± 1.00
2B	2.46	7.78	5.72 ± 1.56
2C	2.98	7.28	5.69 ± 1.69
3A	1.79	4.11	3.03 ± 0.86
3B	3.19	6.99	5.47 ± 1.27
3C	2.87	7.33	5.86 ± 1.47



Şekil 48: Grupların NGF İmmünreaktif alan yüzdesinin karşılaştırmalı grafiği



Şekil 49: NGF immünreaktivitesi (I: Grup1, II: Grup2A, III: Grup3A, IV: Grup2C, Aynı preparatların Ax40, Bx100, Cx100, Dx400 büyütmede görüntüleri görülmektedir. Grup 1-Kontrol grubunda immünreaktivite izlenmezken, Grup2A-Aksonotmezis kontrol ve Grup-3A-Nörotmezis kontrol gruplarında immünreaktivitede hafif artış izlenmektedir. Grup 2C-Aksonotmezis+20 mg/kg AA uygulanan grupta NGF immünreaktivitesinde belirgin artış dikkat çekmektedir.)

4.4.5.2. S100 İmmunohistokimyasal Bulguları

Grup1’ deki deneklerin S100 immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 6.38 ± 1.86 , en düşük 3.33, en yüksek 8.83 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) Grup2A’ daki deneklerin S100 immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 2.65 ± 0.36 , en düşük 2.12, en yüksek 3.15 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup2B’ deki deneklerin S100 immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 4.61 ± 0.86 , en düşük 3.34, en yüksek 5.89 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.05$) Grup2C’ deki deneklerin S100 immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 5.51 ± 1.53 , en düşük 3.34, en yüksek 7.29 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$). Grup3A’ daki deneklerin S100 immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 2.09 ± 0.28 , en düşük 1.56, en yüksek 2.35 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup3B’ deki deneklerin S100 immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 3.72 ± 0.81 , en düşük 2.56, en yüksek 4.88 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.05$). Grup3C’ deki deneklerin S100 immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 4.44 ± 1.05 , en düşük 2.14, en yüksek 5.98 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$) (Tablo 34, Tablo 35).

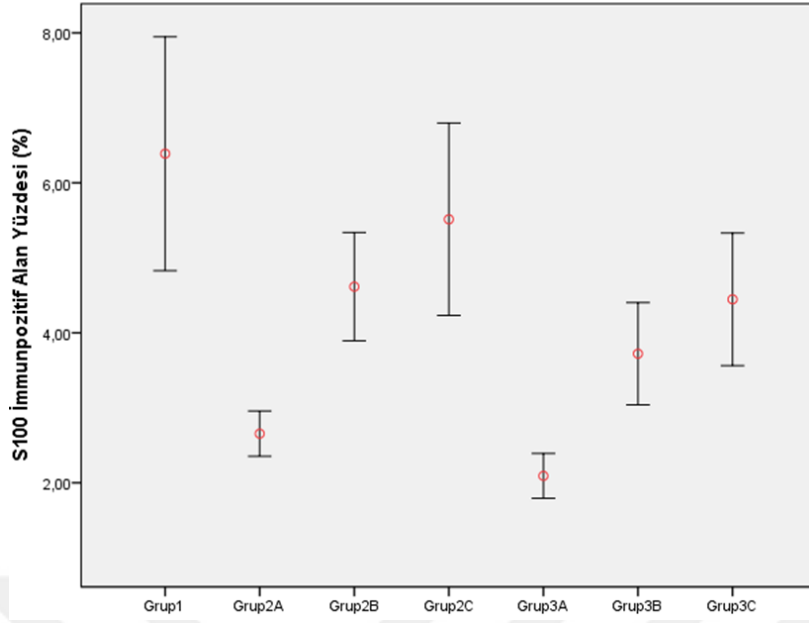
Tablo 34: Grupların S100 İmmunreaktif Alan Yüzdesi

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	3.33	2.12	3.34	3.34	1.56	2.56	2.14
2	4.89	2.21	3.43	3.98	2.03	3.03	4.43
3	5.96	2.54	4.67	4.19	2.11	3.11	4.47
4	5.42	2.61	4.71	5.22	2.22	3.38	4.57
5	6.77	2.77	4.71	6.32	2.28	4.02	4.61
6	7.39	2.85	4.85	6.85	2.35	4.32	4.65
7	8.52	2.99	5.32	6.92	*	4.47	4.72
8	8.83	3.15	5.89	7.29	*	4.88	5.98
Ort $\pm$ SD	6.38 ± 1.86	2.65 ± 0.36	4.61 ± 0.86	5.51 ± 1.53	2.09 ± 0.28	3.72 ± 0.81	4.44 ± 1.05

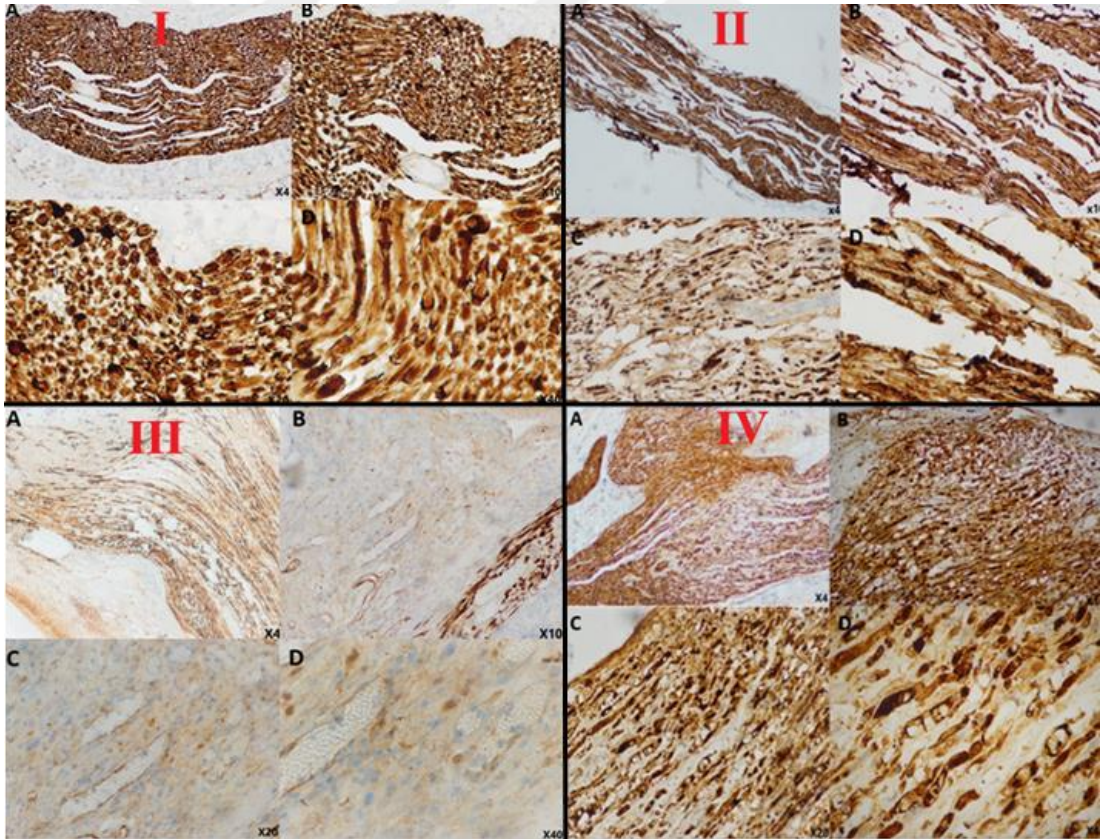
(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 35: Grupların S100 İmmunreaktif Alan Yüzdesinin Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama $\pm$ SD
1	3.33	8.83	6.38 ± 1.86
2A	2.12	3.15	2.65 ± 0.36
2B	3.34	5.89	4.61 ± 0.86
2C	3.34	7.29	5.51 ± 1.53
3A	1.56	2.35	2.09 ± 0.28
3B	2.56	4.88	3.72 ± 0.81
3C	2.14	5.98	4.44 ± 1.05



Şekil 50: Grupların S100 İmmünreaktif alan yüzdesinin karşılaştırmalı grafiği



Şekil 51: S100 immünreaktivitesi (I: Grup1 II: Grup2A III: Grup3A, IV: Grup2C Aynı preparatların Ax40, Bx100, Cx100, Dx400 büyütmede görüntüleri görülmektedir. Grup 1-Kontrol grubunda belirgin immünreaktivite izlenirken, Grup2A-Aksonotmezis kontrol ve Grup-3A-Nörotmezis kontrol gruplarında immünreaktivitenin azaldığı görülmektedir. Grup 2C-Aksonotmezis+20 mg/kg AA uygulanan grupta S100 immünreaktivitesinde yeniden artış olması dikkat çekmektedir.)

4.4.5.3. TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları

Grup1’ deki deneklerin TNF- α immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 0.49 ± 0.32 , en düşük 0.13, en yüksek 0.99 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2A’ daki deneklerin TNF- α immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 10.28 ± 3.48 , en düşük 4.79, en yüksek 14.41 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$). Grup2B’ deki deneklerin TNF- α immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 3.37 ± 1.10 , en düşük 1.89, en yüksek 4.48 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup2C’ deki deneklerin TNF- α immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 2.42 ± 0.95 , en düşük 1.15, en yüksek 3.98 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup3A’ daki deneklerin TNF- α immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 12.31 ± 1.61 , en düşük 10.17, en yüksek 14.51 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$). Grup3B’ deki deneklerin TNF- α immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 6.57 ± 1.29 , en düşük 4.07, en yüksek 8.13 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup3C’ deki deneklerin TNF- α immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 5.92 ± 1.43 , en düşük 4.15, en yüksek 7.98 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$) (Tablo 36, 37).

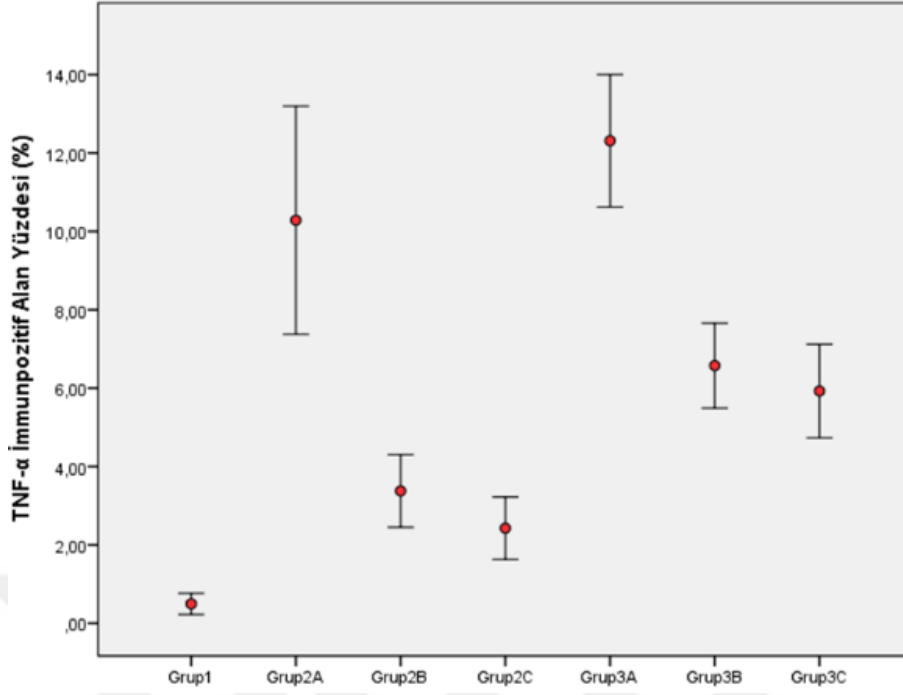
Tablo 36: Grupların TNF- α İmmunreaktif Alan Yüzdesi

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	0.13	4.79	1.89	1.15	10.17	4.07	4.15
2	0.16	6.72	1.99	1.52	11.11	5.57	4.52
3	0.23	8.71	2.57	1.68	11.85	5.96	4.68
4	0.37	8.98	3.21	2.36	12.58	6.98	5.36
5	0.54	12.66	4.07	2.55	13.66	7.23	6.55
6	0.72	12.66	4.32	2.98	14.51	7.33	6.98
7	0.82	13.36	4.48	3.19	*	7.33	7.19
8	0.99	14.41	4.48	3.98	*	8.13	7.98
Ort $\pm$ SD	0.49 ± 0.32	10.28 ± 3.48	3.37 ± 1.10	2.42 ± 0.95	12.31 ± 1.61	6.57 ± 1.29	5.92 ± 1.43

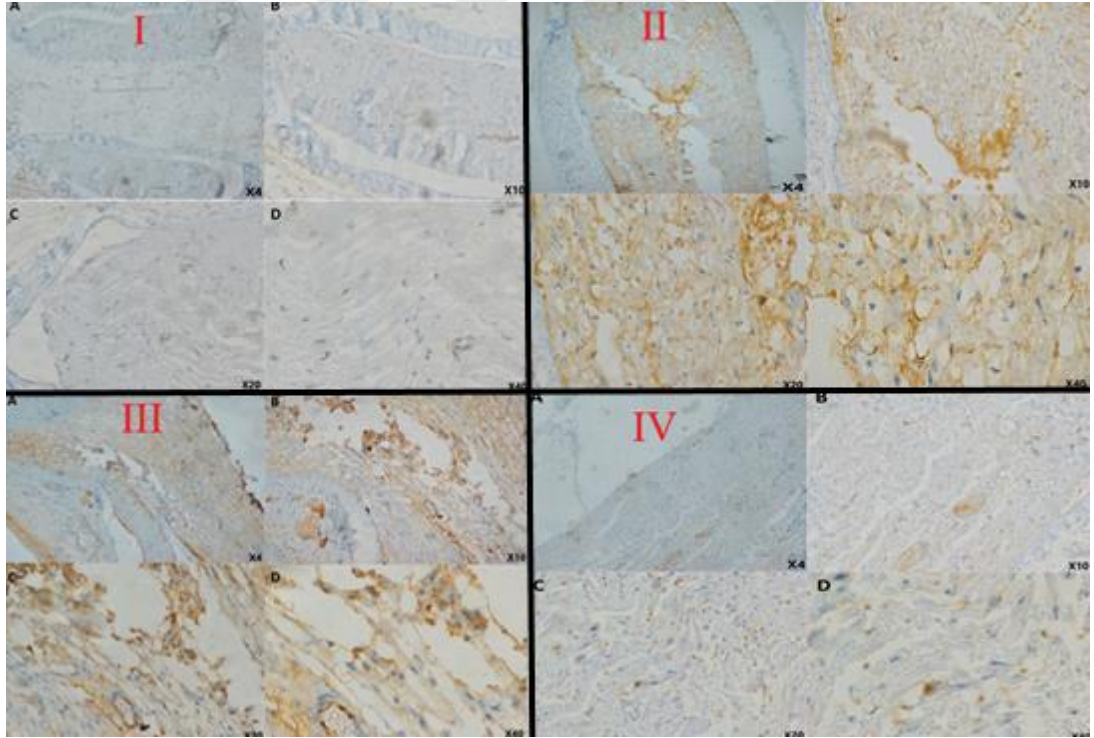
(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 37: Grupların TNF- α İmmunreaktif Alan Yüzdesinin Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama $\pm$ SD
1	0.13	0.99	0.49 $\pm$ 0.32
2A	4.79	14.41	10.28 $\pm$ 3.48
2B	1.89	4.48	3.37 $\pm$ 1.10
2C	1.15	3.98	2.42 $\pm$ 0.95
3A	10.17	14.51	12.31 $\pm$ 1.61
3B	4.07	8.13	6.57 $\pm$ 1.29
3C	4.15	7.98	5.92 $\pm$ 1.43



Şekil 52: Grupların TNF- α İmmünreaktif alan yüzdesinin karşılaştırmalı grafiği



Şekil 53: TNF- α immünreaktivitesi (I: Grup1 II: Grup2A III: Grup3A, IV: Grup2C Aynı preparatların Ax40, Bx100, Cx100, Dx400 büyütmede görüntüleri görülmektedir. Grup 1-Kontrol grubunda immünreaktivite izlenmezken, Grup2A-Aksonotmezis kontrol ve Grup-3A-Nörotmezis kontrol gruplarında belirgin immünreaktivite izlenmektedir. Grup 2C-Aksonotmezis+20 mg/kg AA uygulanan grupta TNF- α immünreaktivitesinde baskılanma dikkat çekmektedir.)

4.4.5.4. TGF-β İmmunohistokimyasal Boyama Bulguları

Grup1’ deki deneklerin TGF-β immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 0.35 ± 0.23 , en düşük 0.11, en yüksek 0.79 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup2A’ daki deneklerin TGF-β immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 9.75 ± 2.42 , en düşük 5.57, en yüksek 12.98 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$). Grup2B’ deki deneklerin TGF-β immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 4.74 ± 1.12 , en düşük 2.57, en yüksek 5.88 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup2C’ deki deneklerin TGF-β immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 4.03 ± 1.42 , en düşük 1.98, en yüksek 5.96 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup3A’ daki deneklerin TGF-β immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 12.80 ± 2.36 , en düşük 8.76, en yüksek 14.98 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$). Grup3B’ deki deneklerin TGF-β immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 6.38 ± 1.11 , en düşük 4.12, en yüksek 7.88 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup3C’ deki deneklerin TGF-β immünreaktif alan yüzdeleri ortalama 5.40 ± 1.46 , en düşük 3.87, en yüksek 7.91 olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$) (Tablo 38, 39).

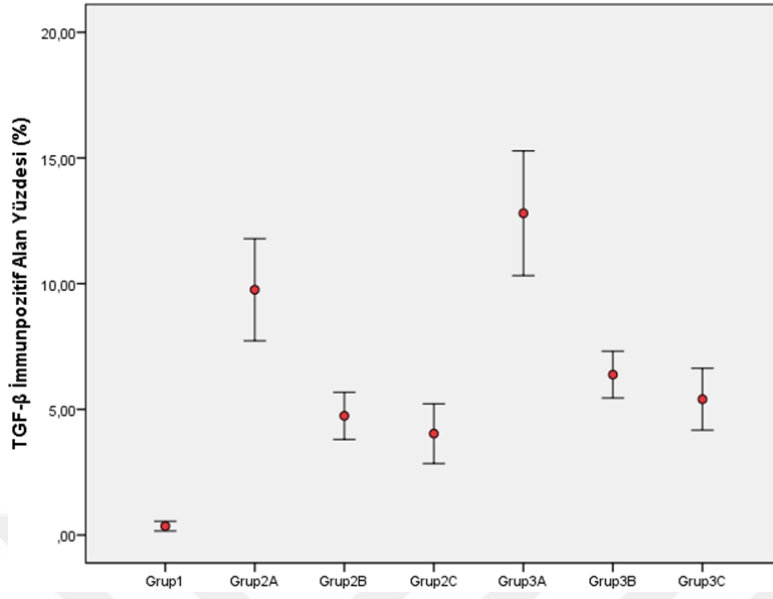
Tablo 38: Grupların TGF-β İmmunreaktif Alan Yüzdesi

Denek	Grup-1	Grup-2			Grup-3		
		2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	0.11	5.57	2.57	1.98	8.76	4.12	3.87
2	0.12	7.27	3.47	2.22	11.57	5.98	4.16
3	0.21	8.74	4.89	3.19	12.66	6.09	4.25
4	0.31	9.98	5.19	4.42	14.21	6.15	4.69
5	0.31	10.96	5.22	4.52	14.63	6.73	5.17
6	0.44	11.21	5.36	4.87	14.98	6.98	6.24
7	0.56	11.36	5.36	5.11	*	7.11	6.93
8	0.79	12.98	5.88	5.96	*	7.88	7.91
Ort ± SD	0.35 ± 0.23	9.75 ± 2.42	4.74 ± 1.12	4.03 ± 1.42	12.80 ± 2.36	6.38 ± 1.11	5.40 ± 1.46

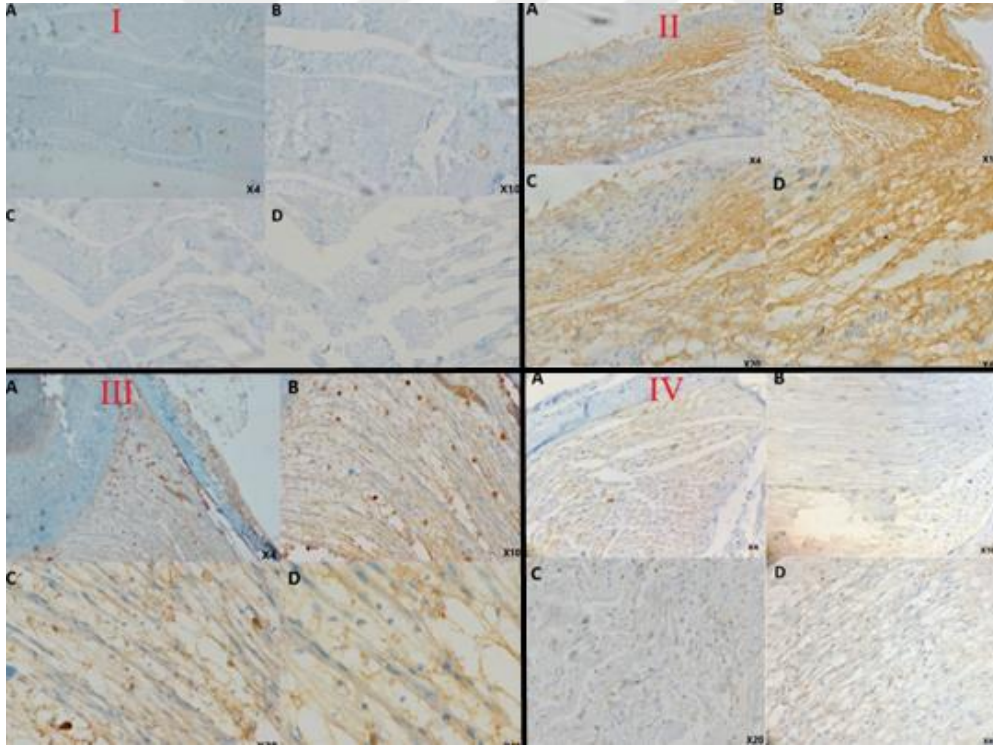
(* işaretli ratlar öldüğünden değerlendirmeye alınamamıştır)

Tablo 39: Grupların TGF-β İmmunreaktif Alan Yüzdesinin Ortalama Değerleri

Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama ± SD
1	0.11	0.79	0.35 ± 0.23
2A	5.57	12.98	9.75 ± 2.42
2B	2.57	5.88	4.74 ± 1.12
2C	1.98	5.96	4.03 ± 1.42
3A	8.76	14.98	12.80 ± 2.36
3B	4.12	7.88	6.38 ± 1.11
3C	3.87	7.91	5.40 ± 1.46



Şekil 54: Grupların TGF-β İmmünreaktif alan yüzdesinin karşılaştırmalı grafiği



Şekil 55: TGF-β immünreaktivitesi (I: Grup1 II: Grup2A III: Grup3A, IV: Grup2C, Aynı preparatların Ax40, Bx100, Cx100, Dx400 büyütmede görüntüleri görülmektedir. Grup 1-Kontrol grubunda immünreaktivite izlenmezken, Grup2A-Aksonotmezis kontrol ve Grup-3A-Nörotmezis kontrol gruplarında belirgin immünreaktivite izlenmektedir. Grup 2C-Aksonotmezis+20 mg/kg AA uygulanan grupta TGF-β immünreaktivitesinde baskılanma dikkat çekmektedir.)

5)TARTIŞMA

Günümüzde trafik ve iş kazalarının artması, sporun hayatımızda daha fazla yer almaya başlaması, toplumsal şiddet olaylarının artması sonucu ateşli silah ve kesici-delici aletle oluşan yaralanmalara bağlı olarak periferik sinir yaralanmaları daha sık gözükmemektedir. Avrupada periferik sinir yaralanmasının insidansının yılda yaklaşık 300.000 vaka olduğu tahmin edilmektedir [272]. Multitravma hastalarının yaklaşık % 2,8' inde meydana gelen periferik sinir hasarları; motor, duyuşal ve otonom işlevlerinin kısmi veya tam kaybına yol açmaktadır. Bu durum önemli ölçüde iş ve güç kaybına neden olmaktadır [4, 22, 25, 218]. Direkt travma, kontüzyon, bası, iskemi, ısı, elektrik ve enjeksiyon uygulamaları gibi nedenler periferik sinir yaralanmalarının etiyolojisinde yer almaktadır [53, 54]. Sinir kesilerinin olduğu yaralanmalar, yarattıkları morbidite sebebiyle aşılımaya çalışılan önemli bir sağlık sorunudur. Periferik sinir yaralanmalarının tedavisi; yaralanmanın şekli, lezyonun yeri, çevre dokuların durumu ve eşlik eden yaralanmalara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Proksimal seviyedeki yaralanmalarda dorsal kök ganglionlarında ve ön boynuzda çok sayıda hücre ölümü de fonksiyonel iyileşmenin kısıtlayıcı etkenlerindendir [273].

Proksimal yaralanma sonrası iyileşmenin uzun sürmesi hedef organda disfonksiyonlara sebep olabilmektedir. Bundan dolayı bilim insanları daha iyi sinir iyileşmesini sağlayabilmek için yeni metodlar araştırmışlardır. Periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde cerrahi tedavi ve medikal tedaviler uygulanmaktadır.

Literatür incelendiğinde deneysel rat modelinde sinir yaralanması yapıp, kullanılan maddelerin sinir iyileşmesi üzerine etkinliğinin araştırıldığı birçok çalışma vardır [274]. Çalışmamızda; insana en yakın deneysel model olması, uygulamada ve teknikte kolaylık sağlaması nedeniyle deney modeli olarak rat modeli seçilmiştir. Özellikle rat siyatik siniri, uzun seyri, orta uyluk bölgesinde kolay diseksiyona izin vermesi ve manipölasyon için uygun bir alana sahip olması, bu siniri sinir çalışmalarında vazgeçilmez kılmaktadır. İnsanlarda siyatik sinir yaralanmaları nadir olmasına karşın, deneysel modellerde bu sinirin tercih edilmesindeki bir diğer neden de polifasiküler miks tip bir sinir olması ve farklı boyut ve tiplerde aksonları içermesi nedeniyle kapsamlı bir araştırma olanağı sağlamasıdır. Aksonotmezis tipi yaralanma oluşturmak için sıklıkla klempleme yöntemi kullanılır. Klemp kompresyonu mekanik yaralanma yanında iskemiye de yol açar. Bu şekilde, hem duyu hem de motor fonksiyonları aynı anda değerlendirmeye olanak tanır [275]. Siyatik sinir ortaya konduktan sonra klempleme ile yapılan kompresyon; önceden belirlenmiş şiddette yaralanma yapabilir. Luis ve arkadaşlarının [276] deneysel modellerinde tanımladıkları 54 newtonluk basınç uygulayan özel klempin bir benzerini, Varejeo ve arkadaşları [277] da kullanarak, bu

basınç altında yapılan ezilme hasarı ile komplet fonksiyonel defisitinin oluştuğunu ve normal değerlerin en erken 7. haftada geri döndüğünü çalışmalarında göstermişlerdir. Çeşitli çalışmalarda saptanan farklı fonksiyonel rejenerasyon zamanları, muhtemelen farklı basınçların sinir üzerinde oluşturdukları farklı ezilme hasarı derecelerine bağlıdır [278-280]. Klemp kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek farklı şiddetlerde yaralanma oluşturulabilir. Bu tip deneysel çalışmalardaki temel sorun hasar miktarının standart bir değere oturtulmamış olmasıdır. Bu problemi minimize etmek için çalışmamızda, siyatik sinir üzerine 180 gr'lık kuvvet [1,76 Newton (N)] uygulayan 5 cm uzunluğunda 13 mm uç uzunluğuna sahip Dietrich bulldog klemp 1 dakika süreyle yerleştirilip aksonotmezis tipi yaralanma oluşturuldu. Nörotmezis tipi yaralanma için ise mikromakas ile tam kat kesi oluşturuldu. Sütürasyonu için ise en sık kullanılan üç mikrosütürasyon tekniğinden (epinöral, fasiküler ve epi-perinöral sütürasyon) epinöral sütürasyon tercih edildi. Epinöral sütürasyon periferik sinirlerin uç uca dikilmesidir. Epinöral kan damarları fasiküler hizalama için kılavuz olarak kullanılır. Her iki uçta da sütürler epinöryumdan geçer. Bu tekniğin avantajları sinirin fasikülleri boyunca minimal cerrahi müdahale olmasıdır. Bu teknik fasiküler sinir onarımından daha kolaydır ve daha az sütüre ihtiyaç duyar, dezavantajı bu teknikte rejenere sinir liflerinin yanlış yöneliminin görülebilmesidir. Fasiküler sütürasyon epinöral sütürasyon ile karşılaştırıldığında daha zorlu bir tekniktir, daha uzun operasyon süresine ihtiyaç duyar ve daha fazla doku reaksiyonuna sebep olur. Avantajları sinir liflerinin yanlış yönelimi en aza indirmesi ve çok fasiküllü sinirlerde onarımı kolaylaştırıp fibrozis derecesini minimize etmesidir. Epi-perinöral sütürasyon ise nadir durumlarda kullanılabilen bir tekniktir. İğne ile hem epinöryumdan hem de yakındaki fasikülden aynı anda geçmesiyle sinirin daha iyi birleşmesine izin verebilmektedir. Üç sütürasyon tekniği incelendiğinde klinik pratiğimizde, periferik bir sinir yaralanmasından sonraki ilk tercihimiz sinirin gerginlik olmadan uç-uca epinöral dikilmesiyle birincil rekonstrüksiyondur. Epinöral sütürasyon minimum çalışma süresi ile en iyi sonuçları sağlar ve ayrıca daha az girişimsel bir yöntemdir [281]. Çalışmamızda, rat siyatik siniri mikromakas ile tam kat kesildikten sonra 10/0 naylon sütür kullanarak mikrocerrahi teknik ile uç-uca epinöral anastomoz yapıldı

Periferik sinir cerrahisinin zamanlaması ile alakalı olarak ise genel kanı şu yöndedir. Kesilen bir sinir ; yaralanmadan sonra fibrozu azaltmak, retraksiyona bağlı gerilmeyi minimize ve biyolojik yeniden büyümeyi maksimize etmek için iki ila üç gün içinde onarılmalıdır [282]. Erken onarım postoperatif sinir hücresi ölümünü önemli ölçüde azaltır ve epinöral kan damarları gibi nirengi noktaları hala doğru sinir uçlarını eşleştirmek için kullanılabilir. Preoperatif gecikmenin artması; nöronların progresif kaybının, Schwann hücrelerinin atrofisinin ve distal sinir segmentinin fibrozisinin bir sonucu olarak sonuçları giderek daha da kötüleştirir

[283]. Periferik sinir yaralanması kontamine ise, çevre dokular tahrip olmuşsa, sinir uçlarında ödem, hematoma, ezilme varsa, lezyonun uzunluğu tahmin edilemeyeceğinden demarkasyon hattının geliştiği ve sinirin metabolik aktivitesinin en üst düzeye ulaştığı 3. haftaya kadar cerrahi geciktirilebilir. Ancak bıçak ve cam gibi kesici aletlerle oluşan yaralanmalarda, olumsuz şartlar bulunmadığından, hemen cerrahi olarak uç-uca anastomoz yapılması olumlu sonuçlar vermiştir [58]. Çalışmamızda, bistüri ile yaralanma oluşturduğumuz deneklerde skar dokusu oluşmadığından, siyatik sinir kesisinden hemen sonra uç-uca epinöral anastomozu gerçekleştirildi. Tüm ratlarda siyatik sinir kesisini tam uyuluk ortasından yaparak nöron perikaryonuna aynı uzaklıkta olmasına dikkat edildi.

Asiatik asit (AA) doğal bir pentasiklik triterpenoid olup geniş farmakolojik etkileri sayesinde oldukça umut vaat eden bir bileşiktir. Yapılan çalışmalarda AA'nın antioksidan, antienflamatuar ve analjezik etkileri olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarda AA'nın NOS enziminin aktivitesini etkileyerek antiinflamatuar ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzim aktivitelerini artırarak da antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür. Yine yapılan çalışmalar da NF-kB'nin 'downregülasyonu' ve MAPK fosforilasyonunun baskılanması ile NOS, COX2, İL-1b, İL-6 ve TNF-a ekspresyonunun inhibisyonu ile AA'nın antiinflamatuar etki gösterdiğini rapor edilmiştir [7, 9, 10, 240]. Ayrıca spinal kord hasarında ise lipid peroksidasyonu azalttığı ve çeşitli proinflamatuar sitokinleri azaltarak motor fonksiyonlarda iyileşme sağlandığı gösterilmiştir [12]. Literatürde B vitamini kompleksinin proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonu azaltıp ve antiinflamatuar sitokinlerin ekspresyonunun artırarak nöroinflamasyonu çözüp nörorejeneratif etkinlik sağladığı gösterilmiştir [272]. Temel bir soya izoflavonu olan Genistein'in de antiinflamatuar etkisiyle sinir iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir[284]. Nitrik oksit sentaz (iNOS) inhibitörü ve N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) antagonisti olan Agmatin'in antioksidan etkisiyle travmatik sinirin distal kısmındaki doku hasarını azaltıp sinir iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir[285].

Periferik sinir yaralanmasında hasar patogenezinde oksidatif stres ve inflamasyon önemli bir rol oynar [286-288]. Oksidatif stres yaralanma sonrası nöral hasarın ana nedenlerinden biridir ve periferik sinir yaralanması sonrası fonksiyonel iyileşmede olumsuz rol oynar [289, 290]. Periferik sinir yaralanmalarının farklı türleri farklı derecelerde oksidatif strese yol açabilir [291]. Son araştırmalar, periferik sinir yaralanmasından sonra oksidatif stresin inhibisyonunun, fonksiyonel işlevin artmasına ve onarım sürecinde hızlanmaya neden olabileceğini göstermiştir [292, 293]. Periferik sinir yaralanmasını takiben gelişen hızlı proinflamatuar yanıt, doku artıklarının ortadan kaldırılması ve etkin bir sinir rejenerasyonu için gereklidir [294]. Ancak inflamasyon devam ederse ve zamanında etkili bir şekilde baskılanmazsa fonksiyonel iyileşme etkilenir. Periferik sinir hasarından sonra

inflatuar yanıtın baskılanması iyileşmeye katkıda bulunur [295]. Sonuç olarak, oksidatif stresin ve inflamasyonun baskılanması oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtla sekonder oluşan nöral hasarın önlenmesini sağlayarak sinir rejenerasyonuna ve fonksiyonel rekonstrüksiyona katkıda bulunabilir [123]. Yaralı sinirin aksonal parçalanmasıyla başlatılan inflamatuvar yanıt hem humoral (kompleman sistemi, siklooksijenaz-lipoksijenaz yolları, sitokinler/ kemokinler) hem de hücrel (kan-sinir bariyeri permeabilizasyonu, SC aktivasyonu, makrofaj göçü) komponentler içerir. Sitokinler klasik olarak immün sistemin aktivasyonu ve inflamatuvar yanıtla ilişkili heterojen bir grup polipeptid mediatör içerir. Son zamanlarda sitokinlerin sinir sistemi hasarı sonrası ekspresyonlarında artış olduğuna dair artan kanıtlar vardır [123]. İskemi sonrası reperfüzyon, sinir liflerinde dejenerasyona ilaveten oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt nedeniyle oluştuğu kabul edilen reperfüzyon hasarına yol açar [137]. Proinflamatuvar sitokinler, özellikle tümör nekrozu faktör-alfa (TNF- α), iskemi-reperfüzyon hasarını takiben oluşan inflamatuvar cevabın önemli bir bileşenidir [132]. TNF- α 'nın sinir yenilenmesi üzerinde zararlı etkisinin olduğunu gösteren daha fazla kanıt vardır. TNF- α antagonisti (etanercept) nin sistemik ve lokal uygulaması ile aksonal rejenerasyon hızını yükselttiği tespit edilmiştir [142]. TGF- β ; büyüme, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz dahil birçok hücrel işlevi olan ve reinnervasyonun tüm kilit noktalarında rol alan güçlü, çok işlevli bir sitokindir [159, 160]. TGF- β ekspresyonu SC proliferasyonunu ve apoptozu etkiler ve Smad-AKT sinyal yollarını aktive eder. Bu aktivasyon TGF- β ile düzenlenen sinir dejenerasyonu ve/veya rejenerasyonunun moleküler mekanizmaları için temel oluşturmasından dolayı çok önemlidir [172]. AA'nın NOS enzim aktivitesini etkileyerek antiinflamatuvar, süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzim aktivitelerini artırarak da antioksidan etki oluşturduğu gösterilmiştir [9]. AA'nın ayrıca NF- κ B' nin downregülasyonu ve MAPK fosforilasyonunun baskılanması ile NOS, COX2, İL-1b, İL-6 ve TNF- α ekspresyonu azaltıp antiinflamatuvar etki gösterdiği rapor edilmiştir [10].

Periferik sinir sistemi, sinir devamlılığı zarar gördüğü zaman sinirde spontan rejenerasyona izin veren intrinsik bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir [101]. SC' ler periferik sinir hasarını takiben aksonal rejenerasyon ve matürasyonun sağlanması amacıyla "Nerve Growth Factor" (NGF) sentez ve salınımında rol alır [109]. NGF sensorimotor iyileşmeyi ve aksonal rejenerasyonu sağlar [116, 117]. Doğal bir alkaloid olan Vinorin, NGF düzeylerinin upregülasyonu ile nöron rejenerasyonunu hızlandırır [293].

S100 proteinleri ise nöral krestten (SC'ler, melanositler ve glial hücreler) türetilen hücrelerde bulunan spesifik proteinlerdir [193] ve çok sayıda hücre içi ve/veya hücre dışı düzenleyici aktivitede rol oynarlar [190]. S100 ekspresyon seviyeleri, siyatik sinir rejenerasyon araştırmalarında SC'lerin proliferasyonu için belirteç görevi görür [202-204].

Ginsenosid Re'nin sıçan siyatik sinir rejenerasyonunu teşvik etmek için SC' lerde S100 ekspresyonunu büyük ölçüde arttırdığı bildirilmiştir [202]. Siyatik siniri etkileyen üçüncü derece arka pati yanık hasarının derecesini ve süresini göstermek için SC' lerde S100 protein düzeyleri kullanılmıştır [203]. Keza siyatik sinir yaralanma deney modelinde sıçanlara Frankincense ekstresi uygulamasından sonra SC' lerde S100 ekspresyonunda artış ve siyatik sinirde rejenerasyon gösterilmiştir [204].

Antiinflamatuvar, antioksidan ve nöroprotektif etkisi olan AA' nın ratlarda periferik sinir yaralanması sonrası rolünü inceleyen araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. AA'nın periferik sinirde aksonotmezis ve nörotomezis tipi yaralanmalarda sinir rejenerasyonunda rolü ve katkısı ilk kez gösterilmiştir. Çalışmamızda periferik sinir yaralanması sonucu TNF- α , TGF- β , NGF, S100 düzeyleri ve AA'nın TNF- α , TGF- β , NGF, S100 düzeyleri üzerindeki etkileri incelendi.

Grupların TNF- α immünreaktif alan yüzdeleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B' de Grup2A' ya kıyasla anlamlı azalma tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup2C ve Grup2B arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C ve Grup3B' de Grup3A' ya kıyasla TNF- α immünreaktif alan yüzdeleri bakımından anlamlı azalma tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup3C ve Grup3B arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grupların semikantitatif TNF- α immünreaktivite dereceleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B' de Grup2A' ya kıyasla anlamlı azalma tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.012$). Grup2C' de ise Grup2B' ye kıyasla anlamlı azalma saptandı ($p=0.012$). Grup3C ve Grup3B' de Grup3A' ya kıyasla TNF- α immünreaktivitesi bakımından anlamlı azalma tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup3C' de ise Grup3B' ye kıyasla anlamlı azalma saptandı ($p=0.02$). Bu durum TNF- α 'nın sadece yaralanma yapıp AA verilmeyen gruplarda ciddi oranda arttığını, yaralanma sonrası AA verilen gruplarda TNF- α düzeylerinin belirgin olarak azaldığını gösterdi. Semikantitatif değerlendirmede 20 mg/kg AA kullanımının TNF- α düzeylerini daha çok baskıladığı görüldü.

Grupların TGF- β immünreaktif alan yüzdeleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B' de Grup2A' ya kıyasla anlamlı azalma tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup2C ve Grup2B arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C ve Grup3B' de Grup3A' ya kıyasla TGF- β immünreaktif alan yüzdeleri bakımından anlamlı azalma tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup3C ve Grup3B arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grupların semikantitatif TGF- β immünreaktivite dereceleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B' de Grup2A' ya kıyasla anlamlı azalma tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.032$). Grup2C' de

ise Grup2B' ye kıyasla anlamlı azalma saptandı ($p=0.009$). Grup3C ve Grup3B' de Grup3A' ya kıyasla TGF- β immünreaktivitesi bakımından anlamlı azalma tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.01$). Grup3C' de ise Grup3B' ye kıyasla anlamlı azalma saptandı ($p=0.018$). Bu durum TGF- β 'nın sadece yaralanma yapıp AA verilmeyen gruplarda ciddi oranda arttığını, yaralanma sonrası AA verilen gruplarda TGF- β düzeylerinin belirgin olarak azaldığını gösterdi. Semikantitatif değerlendirmede 20 mg/kg AA kullanımının TGF- β düzeylerini daha çok baskıladığı görüldü.

Grupların NGF immünreaktif alan yüzdeleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B' de Grup2A' ya kıyasla anlamlı yükselme tespit edildi (sırasıyla $p=0.013$, $p=0.0012$). Grup2C ve Grup2B arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C ve Grup3B' de Grup3A' ya kıyasla NGF immünreaktif alan yüzdeleri bakımından anlamlı yükselme tespit edildi (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.006$). Grup3C ve Grup3B arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grupların semikantitatif NGF immünreaktivite dereceleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2A, Grup2B ve Grup2C arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3A, Grup3B ve Grup3C arasında NGF immünreaktivite dereceleri bakımından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu durum NGF'nin sadece yaralanma yapıp AA verilmeyen gruplarda arttığını, fakat yaralanma sonrası AA verilen gruplarda NGF düzeylerindeki artışın daha yüksek olduğunu gösterdi. AA sonrası NGF artışının ilaç doz artışı ile korele olmadığı görüldü.

Grupların S100 immünreaktif alan yüzdeleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B' de Grup2A' ya kıyasla anlamlı yükselme tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.003$). Grup2C ve Grup2B arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C ve Grup3B' de Grup3A' ya kıyasla S100 immünreaktif alan yüzdeleri bakımından anlamlı yükselme tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.005$). Grup3C ve Grup3B arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grupların semikantitatif S100 immünreaktivite dereceleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup 2C ve Grup2B' de Grup2A' ya kıyasla anlamlı yükseklik tespit edildi (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.008$). Grup2C ve Grup2B arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3A, Grup3B ve Grup3C arasında S100 immünreaktivite dereceleri bakımından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu durum S100'ün sadece yaralanma yapıp AA verilmeyen gruplarda ciddi oranda azaldığını gösterdi. Yaralanma sonrası azalan S100 düzeylerinin AA verilen gruplarda belirgin olarak arttığı ama S100 artışının ilaç doz artışı ile korele olmadığı görüldü.

Aksonal hasar innerve edilen motor birimlerinde fonksiyonel ve yapısal değişikliklere yol açıp, sonuç olarak etkilenen motor ünitelerin elektriksel özelliklerinde değişikliklere neden olmaktadır. Periferik sinir lezyonlarını değerlendirmek için en uygun

elektrodiagnostik yöntemler iğne elektromiyografi (EMG) ve sinir ileti çalışmalarıdır [211]. Periferik sinir yaralanmalarında sinir iletiminin bozulması yahut sonrasındaki iyileşme süreci sonrası sinir iletimin düzelmesi elektrofizyolojik olarak gösterilebilir. Çalışmamızda, AA'nın nöroprotektif etkisinin ispatı için periferik sinir yaralanmaları sonrasında aksonların yenilenmesinin sağlanması, kesintiye uğrayan biyoelektriksel iletimin tekrar başlatılması ve sonuçta periferik sinirin fonksiyonlarının yeniden kazanılması sürecinin elektrofizyolojik olarak gösterilmesi için sinir ileti çalışmaları yapıldı. Amplitüdlere ölçüldü. Grupların ortalama amplitüdlere istatistiksel olarak değerlendirildiğinde preoperatif verilerine göre gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Postoperatif 1.gün verilerine göre Grup2A, 2B ve 2C'de anlamlı düşüklük ($p<0.001$) saptandı. Postoperatif 28.gün verilerine göre Grup2C ve Grup2B' de Grup2A'ya kıyasla anlamlı yükseklik tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup2C' de Grup2B' ye kıyasla ise anlamlı yükseklik tespit edildi. Postoperatif 1.gün verilerine göre Grup3A, Grup3B ve Grup3C' de anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.001$). Grup3C ve Grup3A arasında anlamlı farklılık saptanırken Grup3C ile 3B arasında anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla $p=0.013$, $p>0.05$). Grup3B ve Grup3A arasında da anlamlı farklılık saptandı ($p=0.003$). Postop 28.gün verilerine göre Grup3C ile Grup3B' de Grup3A' ya göre anlamlı yükseklik tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup3C' de Grup3B' ye göre anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$). Bu değerler hasar oluşturulan tüm gruplarda postoperatif 1.gün ciddi amplitüd düşüklüğü olduğunu, AA verilen gruplarda postoperatif 28.gündeki amplitüdlere belirgin artış olduğunu gösterdi. 20mg/kg AA verilen grupların, 10 mg/kg AA verilen gruplara göre amplitüdlere daha yüksek olduğu görüldü.

Siyatik sinir yaralanmasından sonra fonksiyonel iyileşmeyi göstermek amacıyla genellikle Walking Track analizi ve siyatik fonksiyonel indeks hesaplaması yapılmaktadır [264]. Deneklerin yürüme parkurunda kâğıt şeritler üzerine bıraktığı ayak izine göre ayak sürüklemeye testi ve SFİ değerleri motor fonksiyon değerlendirmesi için çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamız da AA tedavisinin fonksiyonel iyileşme üzerindeki etkilerini göstermek için düşük ayak ve bacak sürüklemeye testi yapıp siyatik fonksiyon indeksleri hesaplandı. Postoperatif 28.gün sonu walking track analizi neticesinde Grup3A'daki deneklerin tamamında ve Grup2A'daki deneklerin çoğunluğunda düşük ayak ve ayak sürüklemeye testi müspet idi ve istatistiksel olarak da anlamlı idi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.05$). Grup2B ve Grup2C'deki deneklerin tamamında düşük ayak ve ayak sürüklemeye testi negatif idi ve istatistiksel olarak da anlamlı idi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup2B ve Grup2C arasında anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$). Grup3B ve Grup3C'deki deneklerin çoğunluğunda düşük ayak ve ayak sürüklemeye testi negatif idi ve istatistiksel olarak da

anlamalı idi (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$). Grup3B ve Grup3C arasında anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$). AA verilen gruplarda ilaç doz artışından bağımsız olarak düşük ayak gelişiminin belirgin olarak azaldığı görüldü. Postoperatif 28.gün sonu Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ) verilerinin istatistiki değerlendirilmesi sonucunda Grup2C; Grup2B ve Grup2A' ya göre anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla $p <0.001$, $p <0.001$). Grup2B ise Grup2A'dan anlamlı derecede yüksekti ($p <0.001$). Grup3B ve Grup3C, Grup3A' ya göre anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla $p<0.001$, $p <0.001$). Grup3C ise 3B' ye göre anlamlı derecede yüksekti ($p=0.017$). Bu durum yaralanma oluşturulan gruplarda SFİ değerlerinin belirgin olarak düştüğünü, AA verilen gruplarda SFİ değerlerinin ciddi oranda yükseldiğini ve 20 mg/kg AA verilenlerin 10 mg/kg AA verilenlere göre daha yüksek SFİ değerlerine ulaştığı görüldü.

Periferik sinir yaralanması, ekstremitte kas/kemik atrofisine neden olur [296]. Bugüne kadar, sinir yaralanmasından sonra kas/kemik atrofisinin ağrı davranışları ve immobilizasyon ile ilişkili olduğu düşünülmekteydi [297]. Bu görüşün aksine kas/kemik atrofisini tek başına ağrı ve immobilizasyon ile açıklamanın zor olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur [298]. Periferik sinir hasarıyla oluşan lokal inflamasyon (nörojenik inflamasyon) ağrıyı şiddetlendirir ve kronik ağrıya neden olur [130, 299, 300]. Nörojenik enflamasyonda, sinir yaralanmasından sonra, makrofaj, nötrofil ve periferik sinir sistemindeki lenfosit birikimi, TNF- α gibi çeşitli sitokinlerin aracılığıyla periferik duyarlılaşmaya katkıda bulunur [301]. Çalışmamızda deneklerin basma kuvveti (extensor postural thrust-EPT) ve gastroknemius kas ağırlık indekslerine bakarak AA' nın antiinflamatuvar ve nöroprotektif özelliklerinin bu parametreler üzerine etkisi incelendi.

EPT verilerinin istatistiki değerlendirilmesi sonucunda preoperatif değerler açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.005$). Postoperatif 1.gün değerleri yaralanma yapılan tüm gruplarda düşük olup aralarında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.005$). Postoperatif 28.gün değerleri açısından Grup2C ve Grup2B' de Grup 2A'ya göre anlamlı yükseklik tespit edildi (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.009$). Grup2C ve Grup2B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Postoperatif 28.gün değerleri açısından Grup3C' nin Grup3A' ya göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi ($p=0.009$) fakat Grup3C ile Grup3B arasında ve Grup3B ile Grup3A arasında anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla $p>0.05$, $p>0.05$). Yaralanma oluşturulan gruplarda EPT değerlerinin düştüğü, AA verilen gruplarda postoperatif 28.gün ilaç doz artışından bağımsız olarak EPT değerlerinde artış olduğu saptandı.

Gastroknemius kas ağırlık indeksinin istatistiki değerlendirilmesi sonucunda Grup2C ve Grup2B'nin Grup2A'ya göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup2C'nin de Grup 2B'ye göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü

($p=0.014$). Grup3C ve Grup3B'nin Grup3A'ya göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup3C'nin de Grup 3B'ye göre anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ($p=0.037$). Bu duruma göre sinir yaralanması yapılan gruplarda gastroknemius kas ağırlık indeksinin belirgin olarak düştüğü, AA verilen gruplarda ciddi oranda yükseldiği görüldü. 20 mg/kg AA verilen gruplarda, 10 mg/kg AA verilen gruplara göre bu yüksekliğin daha fazla olduğu gözlemlendi.

Histopatolojik olarak bir periferik sinir lifinde merkezi bir çekirdek, akson ve SC'leri bulunur. Bazı sinir lifleri miyelin kılıf ile çevriliyken diğerleri bu miyelin kılıfı içermez [13-16]. Sinirde travma sonrası gelişen morfolojik, kimyasal ve fonksiyonel değişikliklerin tümüne wallerian dejenerasyon (WD) adı verilir. WD'ye uğramış bir sinirin iyileşip normal fonksiyonunu kazanmasına rejenerasyon denir [3]. WD'de histolojik değişiklikler saatler içinde başlar. Hasardan 48-72 saat sonra aksonal bütünlük bozulur ve impuls iletimi kaybolur. Miyelin yıkımı ise aksonların yıkımından az bir süre sonrasında başlar ve 36-48 saatte belirgin hale gelir [53, 82]. SC'ler hasar sonrası 24 saat içinde aktifleşir. SC'ler dejenerasyon ve rejenerasyona yardım eden birçok molekülün gen ekspresyonunu düzenler. Dejenere akson ve miyelin artıklarını başlangıçta Schwann hücreleri, sonrasında makrofajlar temizler. 5-8 haftalık süreçte dejeneratif süreç tamamlanır [82]. Travmanın şiddetine bağlı daha güçlü enflamatuvar cevap oluşabilir; buna bağlı konjesyon, ödem ve fibrozis gelişmektedir [53]. Çalışmamızda ilk kez deneysel olarak ratlarda oluşturulan siyatik hasar modelinde AA'nın yaralanmış sinir üzerine antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkilerinin gösterilmesi için histopatolojik incelemeler yapıldı. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, wallerian dejenerasyon ve fibrozis semikantitatif yöntemlerle, miyelinli akson yoğunluğu, miyelin kılıf kalınlığı, miyelinli akson çapı, gastroknemius kas lifi çapı ve gastroknemius kası kollajen lif alan yüzdesi stereolojik olarak değerlendirildi.

Grupların fibrozis dereceleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B'de Grup 2A'ya kıyasla anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p=0.004$, $p=0.01$). Grup2C ve Grup2B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C ve Grup3B'de fibrozis açısından Grup3A'ya kıyasla anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p=0.03$, $p=0.048$). Grup3C ve Grup3B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu duruma göre sinir yaralanması olan gruplarda fibrozisin ciddi olarak arttığı, AA verilen gruplarda ilaç doz artışından bağımsız olarak fibrozis derecelerinde belirgin azalma olduğu gözlemlendi.

Grupların WD dereceleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B'de Grup2A'ya kıyasla anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup2C ve Grup2B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C ve

Grup3B’de WD açısından Grup3A’ya kıyasla anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p=0.03$, $p=0.01$). Grup3C ve Grup3B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu duruma göre sinir yaralanması olan gruplarda WD’ nin ciddi olarak arttığı, AA verilen gruplarda ilaç doz artışından bağımsız olarak WD derecelerinde belirgin azalma olduğu gözlemlendi.

Grupların ödem dereceleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B’de Grup2A’ya kıyasla anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.02$). Grup2C ve Grup2B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C ve Grup3B’de ödem açısından Grup3A’ya kıyasla anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p=0.01$, $p=0.01$). Grup3C ve Grup3B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu duruma göre sinir yaralanması olan gruplarda ödemin arttığı, AA verilen gruplarda ilaç doz artışından bağımsız olarak ödem derecelerinde azalma olduğu gözlemlendi.

Grupların inflamatuvar hücre infiltrasyon dereceleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B’de Grup2A’ya kıyasla anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup2C ve Grup2B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C ve Grup3B’de inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından Grup3A’ya kıyasla anlamlı düşüklük tespit edildi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup3C ve Grup3B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu duruma göre sinir yaralanması olan gruplarda inflamatuvar hücre infiltrasyonunun ciddi olarak arttığı, AA verilen gruplarda ilaç doz artışından bağımsız olarak inflamatuvar hücre infiltrasyonunda belirgin azalma olduğu gözlemlendi.

Grupların miyelinli akson yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B’de Grup2A’ya kıyasla anlamlı yükseklik tespit edildi (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.043$). Grup2C ve Grup2B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup 3A, Grup 3B ve Grup3C arasında ise miyelinli akson yoğunluğu bakımından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.005$). Bu duruma göre sinir yaralanması olan gruplarda miyelinli akson yoğunluğunun azaldığı, AA verilen gruplarda özellikle aksonotmezis gruplarında ilaç doz artışından bağımsız olarak miyelinli akson yoğunluğunda belirgin artış olduğu gözlemlendi.

Grupların miyelin kılıf kalınlığı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2A, Grup2B ve Grup2C arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3C ve Grup3B’de miyelin kılıf kalınlığı bakımından Grup3A’ya kıyasla anlamlı yükseklik tespit edildi (sırasıyla $p=0.004$, $p=0.009$). Grup3C ile Grup3B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu duruma göre sinir yaralanması olan gruplarda miyelin kılıf kalınlığının azaldığı, AA verilen gruplarda özellikle nörotmezis gruplarında ilaç doz artışından bağımsız olarak miyelin kılıf kalınlığında artış olduğu gözlemlendi.

Grupların miyelinli akson çapı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C' nin Grup2A'ya kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi (sırasıyla $p=0.017$). Grup2C ile Grup2B arasında ve Grup2B ile Grup2A arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla $p>0.05$, $p>0.05$). Grup3C ve Grup3B'de miyelinli akson çapı bakımından Grup3A'ya kıyasla anlamlı yükseklik tespit edildi (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.013$). Grup3C ile Grup3B arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu duruma göre sinir yaralanması olan gruplarda miyelinli akson çapının azaldığı, AA verilen gruplarda ilaç doz artışından bağımsız olarak miyelinli akson çapında artış olduğu gözlemlendi.

Grupların gastroknemius kas lifi çapları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C ve Grup2B' de Grup2A'ya kıyasla anlamlı yükseklik saptandı (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.042$). Grup2C' de Grup2B'ye kıyasla anlamlı yükseklik tespit edildi ($p=0.01$). Grup3C ve Grup3B' de Grup3A'ya kıyasla gastroknemius kas lifi çapı bakımından anlamlı yükseklik saptandı (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Grup3C'de Grup3B'ye kıyasla anlamlı yükseklik tespit edildi ($p<0.001$). Bu duruma göre sinir yaralanması olan gruplarda gastroknemius kas lifi çaplarının azaldığı, AA verilen gruplarda gastroknemius kas lifi çaplarında belirgin artış saptandı. 20 mg/kg AA verilen gruplarda 10 mg/kg AA verilen kıyasla bu artışın daha fazla olduğu gözlemlendi.

Grupların kollajen lif alan yüzdesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Grup2C' de Grup2A'ya kıyasla anlamlı düşüklük saptandı (sırasıyla $p=0.004$). Grup2C ile Grup2B arasında ve Grup2B ile Grup2A arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Grup3A, Grup3B ve Grup3C arasında kollajen lif alan yüzdesi bakımından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu duruma göre sinir yaralanması olan gruplarda kollajen lif alan yüzdesinde artış olduğu, aksonotmezis yapıp 20/mg kg AA verilen grupta kollajen lif yüzdesinde düşüş olduğu saptandı.

Bu analizler doğrultusunda AA' nın, periferik sinir yaralanmasında NGF ve S100 düzeylerini artırıp, TNF- α ve TGF- β düzeylerini azaltarak; nöroprotektif, antiinflamatuvar ve antioksidan etki gösterdiği ilk kez gösterildi. AA' nın bu mekanizmalarla fonksiyonel olarak, düşük ayak gelişimini azalttığı, siyatik fonksiyon indeksini (SFI), basma kuvveti (EPT) ve gastroknemius kas ağırlık indeksini artırdığı tespit edildi. Elektrofizyolojik olarak amplitüd ölçümlerini artırdığı gösterildi. Histopatolojik olarak ise fibrozis, wallerian dejenerasyon (WD), ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kollajen lif yoğunluğunu azalttığı; miyelinli akson yoğunluğunu, miyelin kılıf kalınlığını, miyelinli akson çapını ve gastrokinemius kas lifi çapını artırdığı gösterildi.

6)SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; periferik sinir yaralanmalarından sonra uygulanan uygun dozda asiatic asitin periferik sinir rejenerasyonunda olumlu etkileri gözlenmiştir. Analizler sonucunda oral asiatic asit verilen gruplarda; rejenere akson sayısı, miyelin formasyonu ve denerve kas atrofisinin restorasyonunda pozitif yönde anlamlı görüntüler tespit ve klinik testlerle teyit edildiğinden dolayı, asiatic asitin antiinflamatuvar, antioksidan ve nöroprotektif etkileriyle periferik sinir yaralanmalarının tedavisine katkılar sağlayacağı ve periferik sinir yaralanmalarının tedavisi için yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.



KAYNAKÇA

1. Daneyemez M, Solmaz I, Izci Y. Prognostic factors for the surgical management of peripheral nerve lesions. *Tohoku J Exp Med*. 2005. 205(3): p. 269-275.
2. Seçer Hİ, Daneyemez MK. Periferik sinir yaralanmaları ve cerrahisi. İçinde: Temel Nöroşirürji. Ankara: Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları; 2010. p. 1763- 1764.
3. Zhang P, Xue F, Zhao F, Lu Hu, et al. The immunohistological observation of proliferation rule of Schwann cell after sciatic nerve injury in rats *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2008. 36(2): p. 150-155.
4. Ertaş M. Periferik sinirlerin anatomi, fizyoloji ve patolojik süreçleri. İçinde: İstanbul Tıp Nöroloji Kitabı. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2004. p. 555-562.
5. Daneyemez MK, Seçer Hİ. Periferik sinir yaralanmaları ve fizyopatolojisi. İçinde: Periferik Sinir Cerrahisi. Ankara: Buluş Tasarım ve Matbaacılık; 2008. p. 99-108.
6. Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol*. 2015. 130(5): p. 605-618.
7. Gonçalves BMF, Salvador JAR, Marín S, Cascante M. Synthesis and biological evaluation of novel asiatic acid derivatives with anticancer activity. *Eur J Med Chem*. 2016. 6(5): p. 3967-3985.
8. Tang L, He R, Yang G, et al. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling in vivo and in vitro. *PLoS One*, 2012. 7(2).
9. Huang SS, Chiu CS, Chen HJ, et al. Antinociceptive activities and the mechanisms of anti-inflammation of asiatic acid in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011.
10. Yun KJ, Kim JY, Kim JB, et al. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-κB inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int Immunopharmacol*. 2008. 8(3): p. 431-441.
11. Zhang X, Wu J, Dou Y, et al. Asiatic acid protects primary neurons against C2-ceramide-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 2012. 679(1-3): p. 51-59.
12. Meng Z, Li H, Si C, et al. Asiatic acid inhibits cardiac fibrosis through Nrf2/HO-1 and TGF-β1/Smads signaling pathways in spontaneous hypertension rats. *Int Immunopharmacol*. 2019. 74: p. 105712.
13. Birch, R. Surgical disorders of the peripheral nerves. Springer Science & Business Media; 2011
14. Kretschmer T, Antoniadis G, Assmus H. In Nerven Chirurgie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014
15. Penkert G, Fansa H. Peripheral Nerve Lesions. Springer; 2004.

16. Rea, P. Essential clinically applied anatomy of the peripheral nervous system in the limbs. Academic Press; 2015.
17. Prabhakar A, Mancuso K, Lissauer J. Peripheral Nerve Monitoring 17. Principles of Neurophysiological Assessment, Mapping, and Monitoring, 2013: p. 215.
18. Antoniadis G, The Peripheral Nerve: Neuroanatomical Principles Before and After Injury in Modern Concepts of Peripheral Nerve Repair. Springer; 2017. p. 1-11.
19. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. J Hand Surg Br, 2000. 25(3): p. 391-414.
20. Petcu EB, Midha R, McColl E, et al. 3D printing strategies for peripheral nerve regeneration. Biofabrication, 2018. 10(3): p. 032001.
21. Bota O, Fodor L. The influence of drugs on peripheral nerve regeneration. Drug Metab Rev. 2019. 51(3): p. 266-292.
22. Okutan Ö. Periferik Sinir Sisteminin Anatomisi, içinde Periferik Sinir Cerrahisi. Tasarım ve Matbaacılık; 2008. p. 7-26.
23. Catala M, Kubis N, Gross anatomy and development of the peripheral nervous system, in Handbook of Clinical Neurology. Elsevier; 2013. p. 29-41.
24. Ertaş M. Periferik sinir anatomi ve fizyolojisi, zararlanmaları, içinde İstanbul Tıp Nöroloji Kitabı. Nobel Matbaacılık; 200 p. 176-185.
25. Benli K. Periferik sinir cerrahisinin önemi, içinde Türk Nöroşirurji Dergisi 2005. p. 15:196-197.
26. Patestas MA, Gartner LP. A Textbook of Neuroanatomy. John Wiley & Sons; 2016.
27. Bouquet C, Nothias F. Molecular mechanisms of axonal growth. Adv Exp Med Biol, 2007. 621: p. 1-16.
28. Gummy LF, Tan CL, Fawcett JW. The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. Exp Neurol. 2010. 223(1): p. 28-37.
29. Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Peripheral nerve trauma: mechanisms of injury and recovery. Hand Clinics, 2013. 29(3): p. 317.
30. Pawlina W, Ross MH. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
31. Kimura J. Nerve conduction and needle electromyography, in Peripheral Neuropathy. Elsevier; 2005. p. 899-969.
32. Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J, Mazziotta JC. trauma of the nervous system, in Neurology in Clinical Practice, Elsevier; 2012.

33. O’Rahilly R, Müller F. The development of the neural crest in the human. *Journal of anatomy*, 2007. 211(3): p. 335-351.
34. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*. 2005. 6(9): p. 671-682.
35. Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci*. 2012. 35(2): p. 123-134.
36. Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, et al. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell*, 2009. 139(2): p. 366-379.
37. Birchmeier C, Nave KA. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia*, 2008. 56(14): p. 1491-1497.
38. Zalc B, Goujet D, Colman D. The origin of the myelination program in vertebrates. *Curr Biol*. 2008. 18(12): p. R511-R512.
39. Nave KA, Trapp BD. Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci*. 2008. 31: p. 535-561.
40. Ikeda M, Oka Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav*. 2012. 2(4): p. 382-390.
41. Smith BE. Anatomy and histology of peripheral nerve, in *Handbook of Clinical Neurophysiology*. Elsevier; 2006. p. 3-22.
42. Vargas ME, Watanabe J, SinghVargas SJ, et al. Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proc Natl Acad Sci*, 2010. 107(26): p. 11993-11998.
43. Peltonen S, Alanne M, Peltonen J. Barriers of the peripheral nerve. *Tissue Barriers*, 2013. 1(3): p. e24956.
44. Reina MA, López A, Villanueva MC, et al. The blood-nerve barrier in peripheral nerves. *Rev Esp Anesthesiol Reanim*. 2003. 50(2): p. 80-86.
45. Hirakawa H, Okajima S, Nagaoka T, et al. Loss and recovery of the blood–nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins. *Exp Cell Res*. 2003. 284(2): p. 194-208.
46. Hollenbeck PJ, Saxton WM. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci*. 2005. 118(23): p. 5411-5419.
47. Mizisin AP, Weerasuriya A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol*. 2011. 121(3): p. 291-312.

48. Caillaud M, Richard L, Vallat JM, et al. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. *Neural Regen Res*. 2019. 14(1): p. 24.
49. Priestley JV. Promoting anatomical plasticity and recovery of function after traumatic injury to the central or peripheral nervous system. *Brain*, 2007. 130(4): p. 895-897.
50. McGurk S. Ganong's Review of Medical Physiology. 2010. 24(20): p. 30-31.
51. Zochodne DW. The challenges and beauty of peripheral nerve regrowth. *J Peripher Nerv Syst*. 2012. 17(1): p. 1-18.
52. Adams AM, Arruda EM, Larkin LM. Use of adipose-derived stem cells to fabricate scaffoldless tissue-engineered neural conduits in vitro. *Neuroscience*, 2012. 201: p. 349-356.
53. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004. 16(5): p. 1-7.
54. Mishra P, Stringer M. Sciatic nerve injury from intramuscular injection: a persistent and global problem. *Int J Clin Pract Suppl*. 2010. 64(11): p. 1573-1579.
55. Montgomery A, Birch R, Malone A. Sciatic neurostenalgia: caused by total hip arthroplasty, cured by late neurolysis. *J Bone Joint Surg Br*. 2005. 87(3): p. 410-411.
56. Birch R. Reactions to Injury, in *Peripheral Nerve Injuries: A Clinical Guide*. London. Springer; 2013. p. 69-109.
57. Ide M, Ide J, YamagaIde M, et al. Symptoms and signs of irritation of the brachial plexus in whiplash injuries. *J Bone Joint Surg Br*. 2001. 83(2): p. 226-229.
58. Ertekin C. Santral ve Periferik EMG kitabı. İzmir; Meta Basım; 2006
59. Secer HI, Solmaz I, Anik I, et al. Surgical outcomes of the brachial plexus lesions caused by gunshot wounds in adults. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2009. 4(01): p. e66-e75.
60. Kasahara T, Toyokura M, Furuno K, et al. Bilateral brachial plexus palsies due to malpositioning after burn injury. *Tokai J Exp Clin Med*. 2007. 32(1): p. 1-5.
61. Chan Q, Ng K, Vandervord J. Critical illness polyneuropathy in patients with major burn injuries. *Eplasty*. 2010.
62. Donaghy M. Toxic and environmental disorders, in Donaghy M. *Brain's diseases of the Nervous System*. Oxford University Press; 2009. p. 141–64.
63. Kadioglu HH, Sciatic nerve injuries from gluteal intramuscular injection according to records of the High Health Council. *Turk Neurosurg*, 2018. 28(3): p. 474-478.
64. Kim HJ, Park SH. Sciatic nerve injection injury. *J Int Med Res*. 2014. 42(4): p. 887-897.
65. Kadioğlu HH. Injection induced sciatic nerve injury: is it a complication? *Atatürk University Journal of Medicine* 2004; 36: 65-70.

66. Maroon JC, El-Kadi H, Abila AA, et al. Cervical neurapraxia in elite athletes: evaluation and surgical treatment: Report of five cases. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 2007. 6(4): p. 356-363.
67. Evans G.R. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec*. 2001. 263(4): p. 396-404.
68. Chhabra A, Ahlawat S, Belzberg A, et al. Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: as referenced to Seddon and Sunderland classifications. *Indian J Radiol Imaging*. 2014. 24(3): p. 217.
69. Yi S, Zhang Y, Gu X, et al. Application of stem cells in peripheral nerve regeneration. *Burns Trauma*. 2020.
70. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, et al. Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2009. 87: p. 27-46.
71. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst*. 2002. 7(1): p. 13-27.
72. Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. 2007. 82(4): p. 163-201.
73. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*. 2011. 8(1): p. 1-13.
74. Birch R, Eardley W, Ramasamy A. War nerve injuries part 1–epidemiology: part II–outcomes. *J Bone Joint Surg Br. B*, 2012. 94: p. 523-35.
75. Moon LDF. Chromatolysis: Do injured axons regenerate poorly when ribonucleases attack rough endoplasmic reticulum, ribosomes and RNA? *Dev Neurobiol*. 2018. 78(10): p. 1011-1024.
76. Maggi SP, Lowe JB, and Mackinnon SE, Pathophysiology of nerve injury. *Clinics in plastic surgery*, 2003. 30(2): p. 109-126.
77. Webster KA, Graham RM, Thompson JW, et al. Redox stress and the contributions of BH3-only proteins to infarction. *Antioxid Redox Signal*. 2006. 8(9-10): p. 1667-1676.
78. Huebner EA, Strittmatter SM. Axon regeneration In the Peripheral and Central Nervous Systems, in *Cell Biology of the Axon*. Springer; 2009. p. 305-360.
79. Groves MJ, Scaravilli F. Pathology of peripheral neuron cell bodies, in *Peripheral Neuropathy*. Elsevier; 2005. p. 683-732.
80. Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle & Nerve*, 2000. 23(S9): p. S33-S38.

81. Liu Q, Wang X, Yi S. Pathophysiological changes of physical barriers of peripheral nerves after injury. *Front Neurosci*. 2018. 12: p. 597.
82. Pagnotta, A., et al., Neurotrophins and their receptors in early axonal regeneration along muscle-vein-combined grafts. *Microsurgery*. 2002. 22(7): p. 300-303.
83. Perrin FE, Lacroix S, Avilés-Trigueros M, et al. Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1 α and interleukin-1 β in Wallerian degeneration. *Brain*. 2005. 128(4): p. 854-866.
84. Cho Y, Sloutsky R, Naegle KM, et al. Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration. *Cell*. 2013. 155(4): p. 894-908.
85. Abe N, Cavalli V. Nerve injury signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 2008. 18(3): p. 276-283.
86. Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, et al. Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015. 82: p. 160-167.
87. Birch R. Regeneration and Recovery of Function, in *Peripheral Nerve Injuries: A Clinical Guide*. London. Springer; 2013. p. 113-140.
88. Gordon T, Hegedus J, Tam SL. Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease. *Neurol Res*. 2004. 26(2): p. 174-185.
89. Klimaschewski L, Hausott B, Angelov DN. The pros and cons of growth factors and cytokines in peripheral axon regeneration, *Int Rev Neurobiol*. Elsevier; 2013. p. 137-171.
90. Hall S. Mechanisms of repair after traumatic injury, in *Peripheral Neuropathy*. Elsevier; 2005. p. 1403-1433.
91. Anand P, Birch R. Restoration of sensory function and lack of long-term chronic pain syndromes after brachial plexus injury in human neonates. *Brain*. 2002. 125(1): p. 113-122.
92. Bergerot A, Shortland PJ, Anan P, et al. Co-treatment with riluzole and GDNF is necessary for functional recovery after ventral root avulsion injury. *Exp Neurol*. 2004. 187(2): p. 359-366.
93. Hart AM, Terenghi G, Kellerth JO, et al. Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. *Neuroscience*, 2004. 125(1): p. 91-101.
94. Dubový P, Jančálek R, Kubek T. Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration, *Int Rev Neurobiol*. Elsevier; 2013. p. 173-206.
95. Höke A, Ho T, Crawford TO, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J Neurosci*. 2003. 23(2): p. 561-567.

96. Faroni A, Terenghi G, Reid AJ. Adipose-Derived Stem Cells and Nerve Regeneration: Promises and Pitfalls, *Tissue Engineering of the Peripheral Nerve*, Volume 108, *Int Rev Neurobiol*. Academic Press; 2013. p. 121-136.
97. Reid AJ, Sun M, Wiberg M, et al. Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis. *Neuroscience*, 2011. 199: p. 515-522.
98. Terenghi G, Hart A, Wiberg M. The nerve injury and the dying neurons: diagnosis and prevention. *J Hand Surg Eur Vol*. 2011. 36(9): p. 730-734.
99. Sulaiman OAR, Gordon T. Role of chronic Schwann cell denervation in poor functional recovery after nerve injuries and experimental strategies to combat it. *Neurosurgery*, 2009. p. A105-14.
100. Bell J.H, Haycock JW. Next generation nerve guides: materials, fabrication, growth factors, and cell delivery. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012. 18(2): p. 116-128
101. Keilhoff G, Fansa H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration—a real hope or just an empty promise? *Exp Neurol*. 2011. 2(232): p. 110-113.
102. Karanth S, Yang G, Yeh J, et al. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Exp Neurol*. 2006. 202(1): p. 161-166.
103. McCallister WV, Tang P, Smith J, et al. Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in an end-to-side model. *J Hand Surg Br*. 2001. 26(3): p. 478-488.
104. Huang, EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001. 24(1): p. 677-736.
105. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview, in *Neurotrophic factors*. Methods Mol Biol. Springer; 2012. p. 1-12.
106. Schulte-Herbruggen O, Braun A, Rochlitz S, et al. Neurotrophic factors-a tool for therapeutic strategies in neurological, neuropsychiatric and neuroimmunological diseases? *Curr Med Chem*. 2007. 14(22): p. 2318-2329.
107. Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*. 2012. 98(1): p. 16-37.
108. Moattari M, Kouchesfehni HM, Kaka G, et al. Evaluation of nerve growth factor (NGF) treated mesenchymal stem cells for recovery in neurotmesis model of peripheral nerve injury. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018. 46(6): p. 898-904.
109. Keefe K.M, Sheikh I.S, Smith G.M. Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury. *Int J Mol Sci*. 2017. 18(3): p. 548.

110. Kemp SWP, Webb AA, Dhaliwal S, et al. Dose and duration of nerve growth factor (NGF) administration determine the extent of behavioral recovery following peripheral nerve injury in the rat. *Exp Neurol*. 2011. 229(2): p. 460-470.
111. Li R, Li Y, Wu Y, et al. Heparin-poloxamer thermosensitive hydrogel loaded with bFGF and NGF enhances peripheral nerve regeneration in diabetic rats. *Biomaterials*, 2018. 168: p. 24-37.
112. Bracci-Laudiero L, De Stefano ME. NGF in early embryogenesis, differentiation, and pathology in the nervous and immune systems, in *Neurotoxin Modeling of Brain Disorders Life-long Outcomes in Behavioral Teratology*. Curr Top Behav Neurosci. Springer; 2015. p. 125-152.
113. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*. 2001. 24(1): p. 1217-1281.
114. Castellanos MR, Aguiar J, Fernández CI, et al. Evaluation of the neurorestorative effects of the murine β -nerve growth factor infusions in old rat with cognitive deficit. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 312(4): p. 867-872.
115. Salehi A, Delcroix JD, Swaab DF. Alzheimer's disease and NGF signaling. *J Neural Transm*. 2004. 111(3): p. 323-345.
116. Jakubowska-Doğru E, Gümüşbaş U. chronic intracerebroventricular NGF administration improves working memory in young adult memory deficient rats. *Neurosci Lett*. 2005. 382(1-2): p. 45-50.
117. Manni L, Rocco ML, Bianchi P, et al. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. *Growth Factors*, 2013. 31(4): p. 115-122.
118. Linker R, Gold R, Luhder F. Function of neurotrophic factors beyond the nervous system: inflammation and autoimmune demyelination. *Crit Rev Immunol*. 2009. 29(1).
119. Acosta CMR, Cortes C, MacPhee H, et al. Exploring the role of nerve growth factor in multiple sclerosis: implications in myelin repair. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013. 12(8): p. 1242-1256.
120. Øren A, Falk K, Röttschke O, et al. Production of neuroprotective NGF in astrocyte-T helper cell cocultures is upregulated following antigen recognition. *J Neuroimmunol*. 2004. 149(1-2): p. 59-65.
121. Saab CY, Shamaa F, El Sabban ME, et al. Transient increase in cytokines and nerve growth factor in the rat dorsal root ganglia after nerve lesion and peripheral inflammation. *J Neuroimmunol*. 2009. 208(1-2): p. 94-103.

122. Colafrancesco V, Villoslada P. Targeting NGF-pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases. *Arch Ital Biol.* 2011. 149(2): p. 183-192.
123. Dubový P, Jančálek R, Kubek T. Role of Inflammation and Cytokines in Peripheral Nerve Regeneration, *Tissue Engineering of the Peripheral Nerve, Volume 108, Int Rev Neurobiol. Academic Press;*2013. p. 173-206.
124. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 2011. 8(1): p. 110.
125. Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci.* 2005. 6(11): p. 889-898.
126. Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation.* 2011. 8(1): p. 109.
127. Raivich G, Makwana M. The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways. *Brain Res Rev.*2007. 53(2): p. 287-311.
128. Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp Neurol.* 2010. 223(1): p. 51-59.
129. Dubový P, Tomas Kubek RJ, Role of Inflammation and Cytokines in Peripheral Nerve Regeneration, *Tissue Engineering of the Peripheral Nerve, Volume 108. Int Rev Neurobiol. Academic Press;*2013. p. 173-206.
130. Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol.* 2010. 229(1-2): p. 26-50.
131. Taskinen HS, Røyttä M. Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1 α , RANTES) after peripheral nerve transection. *J Peripher Nerv Syst.* 5(2): p. 75-81.
132. Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *J Neurosci.* 2002. 22(8): p. 3052-3060.
133. Dubový P, Raška O, Klusáková I, et al. Ciliary neurotrophic factor promotes motor reinnervation of the musculocutaneous nerve in an experimental model of end-to-side neurorrhaphy. *BMC Neurosci.* 2011. 12(1): p. 58.
134. Gordon T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. *J Commun Disord.* 2010. 43(4): p. 265-273.
135. Gardiner NJ. Integrins and the extracellular matrix: key mediators of development and regeneration of the sensory nervous system. *Dev Neurobiol.* 2011. 71(11): p. 1054-1072.

136. Kirsch M, Friz MC, Vougioukas VI, et al. Wallerian degeneration and axonal regeneration after sciatic nerve crush are altered in ICAM-1-deficient mice. *Cell Tissue Res.* 2009. 338(1): p. 19-28.
137. Wang Y, Kawamura N, Schmelzer, et al. Decreased peripheral nerve damage after ischemia–reperfusion injury in mice lacking TNF- α . *J Neurol Sci.* 2008. 267(1-2): p. 107-111.
138. Ohtaki H, Yin L, Nakamachi T, et al. Expression of tumor necrosis factor α in nerve fibers and oligodendrocytes after transient focal ischemia in mice. *Neurosci Lett.* 2004. 368(2): p. 162-166.
139. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2003. 66(8): p. 1403-1408.
140. Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med.* 2002. 8(12): p. 1363-1368.
141. Saleh A, Smith DR, Balakrishnan S, et al. Tumor necrosis factor- α elevates neurite outgrowth through an NF- κ B-dependent pathway in cultured adult sensory neurons: diminished expression in diabetes may contribute to sensory neuropathy. *Brain Res.* 2011. 1423: p. 87-95.
142. Kato K, Liu H, Kikuchi S, et al. Immediate anti-tumor necrosis factor- α (etanercept) therapy enhances axonal regeneration after sciatic nerve crush. *J Neurosci Res.* 2010. 88(2): p. 360-368.
143. Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, et al. TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron.* 2014. 83(5): p. 1098-1116.
144. Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, et al. TNF- α blockage in a mouse model of SCI: evidence for improved outcome. *Shock.* 2008. 29(1): p. 32-41.
145. Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Fernández-Garza NE, Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. *Neuroimmunomodulation.* 2010. 17(5): p. 314-324.
146. Temporin K, Tanaka H, Kuroda Y, et al. IL-1 β promotes neurite outgrowth by deactivating RhoA via p38 MAPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008. 365(2): p. 375-380.
147. Temporin K, Tanaka H, Kuroda Y, et al. Interleukin-1 beta promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury. *Neurosci Lett.* 2008. 440(2): p. 130-133.

148. George A, Buehl A, Sommer C. Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo-and epineurial tumor necrosis factor- α protein. *Neurosci Lett*. 372(3): p. 215-219.
149. Schäfers M, Schmidt C, Vogel C, et al. Tumor necrosis factor- α (TNF) regulates the expression of ICAM-1 predominantly through TNF receptor 1 after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve. *Acta Neuropathol*. 2002. 104(2): p. 197-205.
150. Shubayev VI, Angert M, Dolkas J, et al. TNF α -induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci*. 2006. 31(3): p. 407-415.
151. Chadwick W, Magnus T, Martin B, et al. Targeting TNF- α receptors for neurotherapeutics. *Trends Neurosci*. 2008. 31(10): p. 504-511.
152. Kobayashi T, Yamauchi K, Matsuura Y, et al. The Effects of Generally Administered Anti-Nerve Growth Factor Receptor (p75NTR) Antibody on Pain-Related Behavior, Dorsal Root Ganglia, and Spinal Glia Activation in a Rat Model of Brachial Plexus Avulsion. *J Hand Surg Br*. 2015. 40(10): p. 2017-2025.
153. Shubayev VI, Myers RR. Axonal transport of TNF- α in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors. *J Neuroimmunol*. 2001. 114(1-2): p. 48-56.
154. Dubový P, Jančálek R, Klusáková I, et al. Intra-and extraneuronal changes of immunofluorescence staining for TNF-and TNFR1 in the dorsal root ganglia of rat peripheral neuropathic pain models. *Cell Mol Neurobiol*. 2006. 26(7-8): p. 1203-1215.
155. Obata K, Katsura, Sakurai J, et al. Suppression of the p75 neurotrophin receptor in uninjured sensory neurons reduces neuropathic pain after nerve injury. *J Neurosci*. 2006. 26(46): p. 11974-11986.
156. Oliveira MA, Heimfarth L, Passos FRS, et al. Naringenin complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin improves the sciatic nerve regeneration through inhibition of p75NTR and JNK pathway. *Life Sci*. 2020. 241: p. 117102.
157. Wang YT, Lu XM, Zhu F, et al. Ameliorative effects of p75NTR-ED-Fc on axonal regeneration and functional recovery in spinal cord-injured rats. *Mol Neurobiol*. 2015. 52(3): p. 1821-1834.
158. Barker V, Middleton G, Davey F, et al. TNF α contributes to the death of NGF-dependent neurons during development. *Nat Neurosci*. 2001. 4(12): p. 1194-1198.
159. Huh Y, Ji RR, Chen G. Neuroinflammation, bone marrow stem cells, and chronic pain. *Front Immunol*. 2017. 8: p. 1014.
160. Taskinen HS, Ruohonen S, Jagodic M, et al. Distinct Expression of TGF- β 1 mRNA in the Endo-and Epineurium after Nerve Injury. *J Neurotrauma*. 2004. 21(7): p. 969-975.

161. Vidal PM, Lemmens E, Dooley D, et al. The role of “anti-inflammatory” cytokines in axon regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013. 24(1): p. 1-12.
162. Bastien D, Lacroix S. Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. *Exp Neurol.* 2014. 258: p. 62-77.
163. Li M, Zhang P, Guo W, et al. Protein Expression Profiling During Wallerian Degeneration After Rat Sciatic Nerve Injury. *Muscle & Nerve*, 2014. 50(1): p. 73-78.
164. Feng Z, CP Ko, Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor- β 1. *J Neurosci.* 2008. 28(39): p. 9599-9609.
165. Avari P, Huang W, Averill S, et al. The spatiotemporal localization of JAM-C following sciatic nerve crush in adult rats. *Brain Behav.* 2012. 2(4): p. 402-414.
166. Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus.* 2009. 26(2): p. E3.
167. Kingham PJ, Mantovani C, Terenghi G. Stem cell and neuron co-cultures for the study of nerve regeneration, *Methods Mol Biol.* Springer; 2011. p.115-127.
168. Sulaiman W, Dreesen T, Nguyen D. Single local application of TGF- β promotes a proregenerative state throughout a chronically injured nerve. *Neurosurgery*, 2018. 82(6): p. 894-902.
169. Gomes FCA, de Oliveira Sousa V, Romão L. Emerging roles for TGF- β 1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci.* 2005. 23(5): p. 413-424.
170. Kelly RJ, Morris JC. Transforming growth factor-beta: a target for cancer therapy. *J Immunotoxicol.* 2010. 7(1): p. 15-26.
171. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012. 13(10): p. 616-630.
172. Li M, Zhang P, Li H, et al. TGF- β 1 is critical for Wallerian degeneration after rat sciatic nerve injury. *Neuroscience*, 2015. 284: p. 759-767.
173. Kojima Y, Acar A, Eaton EN, et al. Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci.* 2010. 107(46): p. 20009-20014.
174. Song L, Gu Y, Jie J, et al. Dab2 attenuates brain injury in APP/PS1 mice via targeting transforming growth factor-beta/SMAD signaling. *Neural Regen Res.* 2014. 9(1): p. 41.
175. Buss A, Pech K, Kakulas BA, et al. TGF- β 1 and TGF- β 2 expression after traumatic human spinal cord injury. *Spinal cord*, 2008. 46(5): p. 364-371.

176. Echeverry S, Wu Y, Zhang J. Selectively reducing cytokine/chemokine expressing macrophages in injured nerves impairs the development of neuropathic pain. *Exp Neurol*. 2013. 240: p. 205-218.
177. Lantero A, Tramullas M, Pilar-CuellarLantero F, et al. TGF- β and opioid receptor signaling crosstalk results in improvement of endogenous and exogenous opioid analgesia under pathological pain conditions. *J Neurosci*. 2014. 34(15): p. 5385-5395.
178. Nie X, Deng M, Yang M, et al. Axonal regeneration and remyelination evaluation of chitosan/gelatin-based nerve guide combined with transforming growth factor- β 1 and Schwann cells. *Cell Biochem Biophys*. 2014. 68(1): p. 163-172.
179. Li MO, Flavell RA. TGF- β : a master of all T cell trades. *Cell*, 2008. 134(3): p. 392-404.
180. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2012. 11(10): p. 790-811.
181. Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020. 1867(6): p. 118677.
182. Permyakov EA, Kretsinger RH. Cell signaling, beyond cytosolic calcium in eukaryotes. *J Inorg Biochem*. 2009. 103(1): p. 77-86.
183. Zimmer DB, Eubanks JO, Ramakrishnan D, et al. Evolution of the S100 family of calcium sensor proteins. *Cell Calcium*, 2013. 53(3): p. 170-179.
184. Donato R. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*, 2013. 13(1): p. 24-57.
185. Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, et al. S100 proteins as an important regulator of macrophage inflammation. *Front Immunol*. 2018. 8: p. 1908.
186. Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED. et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflammation*. 2010. 7(1): p. 6.
187. Schaf DV, Tort ABL, Fricke D, et al. S100B and NSE serum levels in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2005. 11(1): p. 39-43.
188. Thelin EP, Nelson DW, Bellander BM. A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 2017. 159(2): p. 209-225.
189. Lu J, Esposito G, Scuderi C, et al. S100B and APP promote a gliocentric shift and impaired neurogenesis in Down syndrome neural progenitors. *PLoS One*. 2011. 6(7): p. e22126.

190. Wang L, Yuan D, Zhang D, et al. Ginsenoside Re promotes nerve regeneration by facilitating the proliferation, differentiation and migration of Schwann cells via the ERK-and JNK-dependent pathway in rat model of sciatic nerve crush injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2015. 35(6): p. 827-840.
191. Wu SH, Huang SH, Cheng KI, et al. Third-degree hindpaw burn injury induced apoptosis of lumbar spinal cord ventral horn motor neurons and sciatic nerve and muscle atrophy in rats. *Biomed Res Int*. 2015.
192. Jiang X, Ma J, Wei Q, et al. Effect of frankincense extract on nerve recovery in the rat sciatic nerve damage model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016.
193. Mohanty CB, Bhat DI, Devi BI. Use of animal models in peripheral nerve surgery and research. *Neurol India*. 2019. 67(7): p. 100.
194. Angius D, Wang H, Spinne RJ, et al. A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials*, 2012. 33(32): p. 8034-8039.
195. Toia F, Giesen T, Giovanoli P, et al. A systematic review of animal models for experimental neuroma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015. 68(10): p. 1447-1463.
196. Griffin JW, Pan BH, Polley MA, et al. Measuring nerve regeneration in the mouse. *Exp Neurol*. 2010. 223(1): p. 60-71.
197. Tos P, Ronchi G, Papalia I, et al. Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: Part-I Experimental models. *Int Rev Neurobiol*. 2009. 87: p. 47-79.
198. Varejão ASP, Melo-Pinto P, Meek MF, et al. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res*. 2004. 26(2): p. 186-194.
199. Moradzadeh A, Borschel GH, Luciano JP, et al. The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2008. 212(2): p. 370-376.
200. Hoyng SA, de Winter F, Tannemaat MR, et al. Gene therapy and peripheral nerve repair: a perspective *Front Mol Neurosci*. 2015. 8: p. 32.
201. Shurey S, Akelina Y, Legagneux J, et al. The rat model in microsurgery education: classical exercises and new horizons. *Arch Plast Surg*. 2014. 41(3): p. 201.
202. Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods*. 2015. 243: p. 39-46.
203. Speck AE, Ilha J, do Espírito Santo CC, et al. The IBB forelimb scale as a tool to assess functional recovery after peripheral nerve injury in mice. *J Neurosci Methods*. 2014. 226: p. 66-72.

204. Stößel M, Rehra L, Haastert-Talini K. Reflex-based grasping, skilled forelimb reaching, and electrodiagnostic evaluation for comprehensive analysis of functional recovery-The 7-mm rat median nerve gap repair model revisited. *Brain Behav.* 2017. 7(10): p. e00813.
205. Shakhbazau A, Mohanty C, Kumar R, et al. Sensory recovery after cell therapy in peripheral nerve repair: effects of naive and skin precursor-derived Schwann cells. *J Neurosurg.* 2014. 121(2): p. 423-431.
206. Cobianchi S, de Cruz J, Navarro X. Assessment of sensory thresholds and nociceptive fiber growth after sciatic nerve injury reveals the differential contribution of collateral reinnervation and nerve regeneration to neuropathic pain. *Exp Neurol.* 2014. 255: p. 1-11.
207. Navarro X, Udina E. Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: Part III-Electrophysiological evaluation. *Int Rev Neurobiol.* 2009. 87: p. 105-126.
208. Jolivald CG, Vu Y, Mizisin LM, et al. Impaired prosaposin secretion during nerve regeneration in diabetic rats and protection of nerve regeneration by a prosaposin-derived peptide. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008. 67(7): p. 702-710.
209. Khuong HT, Kumar R, Senjaya F, et al. Skin derived precursor Schwann cells improve behavioral recovery for acute and delayed nerve repair. *Exp Neurol.* 2014. 254: p. 168-179.
210. Alant JDV, Kemp SWP, Khu KJOL, et al. Traumatic neuroma in continuity injury model in rodents. *J Neurotrauma.* 2012. 29(8): p. 1691-1703.
211. Kimura J. *Electrodiagnosis in Diseases of Nerve and Muscle: Principles and Practice.* Oxford University Press; 2013.
212. Eder M, Schulte-Mattler W, Pöschl P. Neurographic course Of Wallerian degeneration after human peripheral nerve injury. *Muscle & Nerve.* 2017. 56(2): p. 247-252.
213. Jürgens TP, Puchner C, Schulte-Mattler WJ. Discharge rates in electromyography distinguish early between peripheral and central paresis. *Muscle & Nerve.* 2012. 46(4): p. 591-593.
214. Schulte-Mattler W. Diagnostische Bedeutung von Entladungsraten motorischer Einheiten. *Klinische Neurophysiologie.* 2005. 36(03): p. 110-115.
215. Campbell, W.W., Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology.* 2008. 119(9): p. 1951-1965.
216. Bischoff C, Kollmer J, Schulte-Mattler W. Christian Bischoff. State of the Art Diagnosis of Peripheral Nerve Trauma: Clinical Examination, Electrodiagnostic, and Imaging .in *Modern Concepts of Peripheral Nerve Repair*, Springer; 2017. p. 11-27.

217. Cankur NŞ. Anatomiye giriş ve temel kavramlar. Bursa. Uludağ Üniversitesi Basımevi; 2002.
218. Akbay A. Periferik sinirin mikroanatomi ve sinir kesilerinde uygulanan cerrahi teknikler. *Turk Norosirurji Dergisi*, 2005. 15(3): p. 198-201.
219. Naderi S, Güçlü B. Periferik sinir cerrahisinin tarihçesi, içinde *Periferik Sinir Cerrahisi, Buluş Tasarım ve Matbaacılık*; 2008. p. 1-6.
220. Geuna S, Perroteau I, Tos P, Battiston B. Tissue Engineering of the Peripheral Nerve: Stem Cells and Regeneration Promoting Factors Volume 108. in *International Review of Neurobiology*. Academic Press;2013
221. Gohil KJ, Patel JA, Gajjar AK. Pharmacological review on *Centella asiatica*: a potential herbal cure-all *Indian J Pharm Sci*. 2010. 72(5): p. 546.
222. Orhan IE. *Centella asiatica* (L.) Urban: from traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012.
223. Jamil SS, Nizami Q, Salam M. *Centella asiatica* (Linn.) Urban a review. 2007.
224. Somboonwong J, Kankaisre M. Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. *BMC Complement Altern Med*. 2012. 12(1): p. 1-7.
225. Chandrika UG, Kumara PAP. *Centella asiatica*: nutritional properties and plausible health benefits, *Adv Food Nutr Res*. Elsevier; 2015. p. 125-157.
226. Seevaratnam V, Banumathi P, Premalatha MR, et al. Functional properties of *Centella asiatica* (L.): a review. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2012. 4(5): p. 8-14.
227. Nasir MN, Habsah M, Zamzuri I, et al. Effects of asiatic acid on passive and active avoidance task in male Sprague–Dawley rats. *J Ethnopharmacol*. 2011. 134(2): p. 203-209.
228. Lv H, Qi Z, Wang S, et al. Asiatic acid exhibits anti-inflammatory and antioxidant activities against lipopolysaccharide and d-galactosamine-induced fulminant hepatic failure. *Front Immunol*. 2017. 8: p. 785.
229. Yin MC, Lin MC, Mong MC, et al. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. *J Agric Food Chem*. 2012. 60(31): p. 7697-7701.
230. Shanmugam MK, Nguyen AH, Kumar AP, et al. Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Lett*. 2012. 320(2): p. 158-170.
231. Tang XL, Yang XY, Jung HJ, et al. Asiatic acid induces colon cancer cell growth inhibition and apoptosis through mitochondrial death cascade. *Biol Pharm Bull*. 2009. 32(8): p. 1399-1405.

232. Kavitha CV, Jain AK, Agarwal C, et al. Asiatic acid induces endoplasmic reticulum stress and apoptotic death in glioblastoma multiforme cells both in vitro and in vivo. *Mol Carcinog*. 2015. 54(11): p. 1417-1429.
233. Hsu YL, Kuo PL, Lin LT, et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis and cell cycle arrest through activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in human breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005. 313(1): p. 333-344.
234. Gurfinkel DM, Chow S, Hurren R, et al. Disruption of the endoplasmic reticulum and increases in cytoplasmic calcium are early events in cell death induced by the natural triterpenoid Asiatic acid. *Apoptosis*. 2006. 11(9): p. 1463-1471.
235. Park BC, Bosire KO, Lee ES, et al. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Cancer Lett*. 2005. 218(1): p. 81-90.
236. Cho CW, Choi DS, Cardone MH, et al. Glioblastoma cell death induced by asiatic acid. *Cell Biol Toxicol*. 2006. 22(6): p. 393-408.
237. Lee YS, Jin DQ, Kwon EJ, et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca^{2+} release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. *Cancer Lett*. 2002. 186(1): p. 83-91.
238. Yang GX, Zhang RZ, Lou B, et al. Chemical constituents from *Melastoma dodecandrum* and their inhibitory activity on interleukin-8 production in HT-29 cells. *Nat Prod Res*. 2014. 28(17): p. 1383-1387.
239. Park BC, Paek SH, Lee YS, et al. Inhibitory effects of asiatic acid on 7, 12-dimethylbenz anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion in mice. *Biol Pharm Bull*. 2007. 30(1): p. 176-179.
240. Tang L, He R, Yang G, et al. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling in vivo and in vitro. *PloS One*. 2012. 7(2): p. e31350.
241. Wei J, Huang Q, Huang R, et al. Asiatic acid from *Potentilla chinensis* attenuate ethanol-induced hepatic injury via suppression of oxidative stress and Kupffer cell activation. *Biol Pharm Bull*. 2013: p. b13-00634.
242. Pakdeechote P, Bunbupha S, Kukongviriyapan U, et al. Asiatic acid alleviates hemodynamic and metabolic alterations via restoring eNOS/iNOS expression, oxidative stress, and inflammation in diet-induced metabolic syndrome rats. *Nutrients*. 2014. 6(1): p. 355-370.
243. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. 2009. 9(7): p. 501-507.

244. Zhang L, Chen J, Gong Y, et al. Synthesis and biological evaluation of asiatic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases. *Chem Biodivers*. 2009. 6(6): p. 864-874.
245. Sun Z. Quality assessment and improvement in diabetes care an issue now and for the future. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010. 26(6): p. 446-447.
246. Ramachandran V, Saravanan R. Glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/Akt signaling pathway by asiatic acid in diabetic rats. *Hum Exp Toxicol*. 2015. 34(9): p. 884-893.
247. Ramachandran, V, R. Saravanan. Efficacy of asiatic acid, a pentacyclic triterpene on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 2013. 20(3-4): p. 230-236.
248. Tsao S, Yin M. Antioxidative and antiinflammatory activities of asiatic acid, glycyrrhizic acid, and oleanolic acid in human bronchial epithelial cells. *J Agric Food Chem*. 2015. 63(12): p. 3196-3204.
249. Park JH, Choi JY, Son DJ, et al. Anti-inflammatory effect of titrated extract of *Centella asiatica* in phthalic anhydride-induced allergic dermatitis animal model. *Int J Mol Sci*. 2017. 18(4): p. 738.
250. Liu N, Fu D, Yang J, et al. Asiatic acid attenuates hypertrophic and fibrotic differentiation of articular chondrocytes via AMPK/PI3K/AKT signaling pathway. *Arthritis Res Ther*. 2020. 22: p. 1-14.
251. Xu M, Xiong Y, Liu J, et al. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene in *Centella asiatica*, attenuates glutamate-induced cognitive deficits in mice and apoptosis in SH-SY5Y cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2012. 33(5): p. 578-587.
252. Lee KY, Bae ON, Weinstock S, et al. Neuroprotective effect of asiatic acid in rat model of focal embolic stroke. *Biol Pharm Bull*. 2014. 37(8): p. 1397-1401.
253. Gurcan O, Gurcat AG, Kazanci A et al. Effect of asiatic acid on the treatment of spinal cord injury: An Experimental study in rats. *Turk Neurosurg*. 2017.
254. Sirichoat A, Chaijaroonkhanarak W, Prachaney P, et al. Effects of asiatic acid on spatial working memory and cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Nutrients*, 2015. 7(10): p. 8413-8423.
255. Gadahad MRK, Rao M, Rao G. Enhancement of hippocampal CA3 neuronal dendritic arborization by *Centella asiatica* (Linn) fresh leaf extract treatment in adult rats. *J Chin Med Assoc*. 2008. 71(1): p. 6-13.

256. Lee KY, Bae ON, Serfozo K, et al. Asiatic acid attenuates infarct volume, mitochondrial dysfunction, and matrix metalloproteinase-9 induction after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2012. 43(6): p. 1632-1638.
257. Nataraj J, Manivasagam T. Neuroprotective effect of asiatic acid on rotenone-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress-mediated apoptosis in differentiated SH-SY5Y cells. *Nutr Neurosci*. 2017. 20(6): p. 351-359.
258. Visweswari G, Prasad KS, Chetan PS, et al. Evaluation of the anticonvulsant effect of *Centella asiatica* in pentylenetetrazol-induced seizures with respect to cholinergic neurotransmission. *Epilepsy Behav*. 2010. 17(3): p. 332-335.
259. Lokanathan Y, Omar N, Puzi NNA, et al. Recent updates in neuroprotective and neuroregenerative potential of *Centella asiatica*. *Malays J Med Sci*. 2016. 23(1): p. 4.
260. Raval N, Mistry T, Acharya N. et al. Development of glutathione-conjugated asiatic acid-loaded bovine serum albumin nanoparticles for brain-targeted drug delivery. *J Pharm Pharmacol*. 2015. 67(11): p. 1503-1511.
261. Loganathan C, Thayumanavan P. Asiatic acid prevents the quinolinic acid-induced oxidative stress and cognitive impairment. *Metab Brain Dis*. 2018. 33(1): p. 151-159.
262. Wang Z, Mong M, Yang Y, et al. Asiatic acid and maslinic acid attenuated kainic acid-induced seizure through decreasing hippocampal inflammatory and oxidative stress. *Epilepsy Res*. 2018. 139: p. 28-34.
263. Lu CW, Lin TY, Wang SJ, et al. Asiatic acid, an active substance of *Centella asiatica*, presynaptically depresses glutamate release in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 2019. 865: p. 172781.
264. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982. 77(3): p. 634-643.
265. Deumens R, Jaken RJP, Marcus MAE, et al. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods*. 2007. 164(1): p. 120-130.
266. Bain J, Mackinnon S, Hunter D. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989. 83(1): p. 129-138.
267. Çakır M, Zengin S, Çalikoğlu Ç, et al. Protective Role of Interferon-B in experimentally induced peripheral nerve injury in rats. *Acta Medica Mediterranea*. 2015. p.973-979

268. Yarar E, Kuruoglu E, Kocabıcak E, et al. Electrophysiological and histopathological effects of mesenchymal stem cells in treatment of experimental rat model of sciatic nerve injury. *Int J Clin Exp Med*. 2015. 8(6): p. 8776.
269. Zeynal M. Ratlarda Periferik Sinir Enjeksiyon Hasarı Modelinde Siyatik Sinirin Değerlendirilmesi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2017, Erzurum (Danışman: Prof. Dr. H. Hadi Kadioğlu)
270. Tawab SA, Omar SMM, Zeid AAA, et al. Role of Adipose Tissue-Derived Stem Cells versus Differentiated Schwann-like cells Transplantation on the Regeneration of Crushed Sciatic Nerve in Rats. A Histological Study. *International Journal of Stem Cell Research & Therapeutics*, 2018. 1: p. 1-10.
271. Zhang H, Wu J, Shen FF, et al. Activated Schwann cells and increased inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α in patients' sural nerve are lack of tight relationship with specific sensory disturbances in Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther*. 2020. 26(5): p. 518-526.
272. Ehmedah A, Nedeljkovic P, Dacic S, et al. Vitamin B complex treatment attenuates local inflammation after peripheral nerve injury. *Molecules*, 2019. 24(24): p. 4615.
273. Scheib J, Höke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol*. 2013. 9(12): p. 668-676.
274. Kurtoglu Z, Ozturk AH, Bagdatoglu C, et al. Effects of trapidil after crush injury in peripheral nerve. *Acta Med Okayama*. 2005. 59(2): p. 37-44.
275. Tetik C, Erol B, Cabukoglu C, et al. Comparison of the functional evaluation methods in rat sciatic nerve model by a new system. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2000. 34: p. 523-527.
276. Luís AL, Amado S, Geuna S, et al. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurosci Methods*. 2007. 163(1): p. 92-104.
277. Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, et al. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*. 2004. 21(11): p. 1652-1670.
278. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, et al. Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*, 2005. 25(6): p. 508-519.

279. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, et al. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*. 2000. 96(2): p. 89-96.
280. Hadlock TA, Heaton J, Cheney M, et al. Functional recovery after facial and sciatic nerve crush injury in the rat. *Arch Facial Plast Surg*. 2005. 7(1): p. 17-20.
281. Beris A, Gkias I, Gelalis I, et al. Current concepts in peripheral nerve surgery. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2019. 29(2): p. 263-269.
282. Griffin JW, Hogan MCV, Chhabra AB, et al., Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am*. 2013. 95(23): p. 2144-2151.
283. Lundborg G, Rosén B. Hand function after nerve repair. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007. 189(2): p. 207-217.
284. Ozbek Z, Aydin HE, Kocman AE, et al. Neuroprotective effect of genistein in peripheral nerve injury. *Turk Neurosurg*. 2017. 27(5): p. 816-822.
285. Sezer A, Guçlu B, Kazancı B, et al. Neuroprotective effects of agmatine in experimental peripheral nerve injury in rats: a prospective randomized and placebo-controlled trial. *Turk Neurosurg*. 2014. p. 196-201
286. McLachlan EM, Hu P. Inflammation in dorsal root ganglia after peripheral nerve injury: effects of the sympathetic innervation. *Auton Neurosci*. 2014. 182: p. 108-117.
287. Komirishetty P, Areti A, Yerra VG, et al. PARP inhibition attenuates neuroinflammation and oxidative stress in chronic constriction injury induced peripheral neuropathy. *Life Sci*. 2016. 150: p. 50-60.
288. Xiang Q, Yu C, Zhu YF, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 antibody attenuates thermal hyperalgesia in the dorsal root ganglion: Neurochemical changes and behavioral studies after sciatic nerve-pinch injury. *Injury*. 2016. 47(8): p. 1647-1654.
289. Zhang L, Johnson D, Johnson JA. Deletion of Nrf2 impairs functional recovery, reduces clearance of myelin debris and decreases axonal remyelination after peripheral nerve injury. *Neurobiol Dis*. 2013. 54: p. 329-338.
290. Lanza C, Raimondo S, Vergani L, et al. Expression of antioxidant molecules after peripheral nerve injury and regeneration. *J Neurosci Res*. 2012. 90(4): p. 842-848.
291. Wang H, Ding XG, Li SW, et al. Role of oxidative stress in surgical cavernous nerve injury in a rat model. *J Neurosci Res*. 2015. 93(6): p. 922-929.
292. Qian Y, Han Q, Zhao X, et al. 3D melatonin nerve scaffold reduces oxidative stress and inflammation and increases autophagy in peripheral nerve regeneration. *J Pineal Res*. 2018. 65(4): p. e12516.

293. Renno WM, Benov L, Khan KM. Possible role of antioxidative capacity of epigallocatechin-3-gallate treatment in morphological and neurobehavioral recovery after sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg Spine*. 2017. 27(5): p. 593-613.
294. Mietto BS, Kroner A, Girolami EI, et al. Role of IL-10 in resolution of inflammation and functional recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2015. 35(50): p. 16431-16442.
295. Ydens E, Demon D, Lornet G, et al. Nlrp6 promotes recovery after peripheral nerve injury independently of inflammasomes. *Journal of neuroinflammation*, 2015. 12(1): p. 1-14.
296. Said G. Examination and clinical care of the patient with neuropathy. *Handbook of Clinical Neurology*, 2013. 115: p. 235-244.
297. van Wilgen CP, Dijkstra PU. Chronic pain and severe disuse syndrome: long-term outcome of an inpatient multidisciplinary cognitive behavioural programme. *J Rehabil Med*. 2009. 41(3): p. 122-128.
298. Hulsman NM, Geertzen JHB, Dijkstra PU, et al. Myopathy in CRPS-I: disuse or neurogenic? *Eur J Pain*. 2009. 13(7): p. 731-736.
299. Calvo M, Dawes JM, Bennett DL. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol*. 2012. 11(7): p. 629-642.
300. Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol*. 2012. 12(1): p. 55-61.
301. Shimada N, Sakata A, Igarashi T, et al. M1 macrophage infiltration exacerbate muscle/bone atrophy after peripheral nerve injury. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020. 21(1): p. 1-10.