

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**SIÇAN SİYATİK SİNİR REJENERASYONUNA PULSLU
MANYETİK ALANIN MAKROFAJ ARACILI ETKİSİNİN
LOKAL CLODRANATE UYGULAMASIYLA
ARAŞTIRILMASI**

İbrahim KAHRAMAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. İsmail GÜNAY

ADANA - 2010

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**SIÇAN SİYATİK SİNİR REJENERASYONUNA PULSLU MANYETİK
ALANIN MAKROFAJ ARACILI ETKİSİNİN LOKAL CLODRANATE
UYGULAMASIYLA ARAŞTIRILMASI**

İbrahim KAHRAMAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. İsmail GÜNAY

**Bu Tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TF2008D2 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

Tez No:.....

ADANA - 2010

KABUL VE ONAY

Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan
“Sıçan Siyatik Sinir Rejenerasyonuna Pulslu Manyetik Alanın Makrofaj Aracılı Etkisinin Lokal
Clodranate Uygulamasıyla Araştırılması”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 14/06/2010

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof Dr. İsmail GÜNAY
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Ferit PEHLİVAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Cemil GÖÇMEN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Mustafa EMRE
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Mustafa GÜVEN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil Kasap
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında yapılan bu çalışmanın farklı aşamaları; Histoloji–Embriyoloji ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dallarında tamamlandı.

Doktora çalışmalarım sırasında büyük emeği geçen, beni her konuda destekleyen, tez çalışmasının projelendirilmesinde, deneysel çalışmaların yürütülmesi ve tamamlanmasında, elde edilen bulguların analiz ve değerlendirilmesinde, teze son şeklinin verilmesinde yardımlarını esirgemeyen, danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsmail GÜNAY’a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tezimi yapabilecek yöntemin bir kısmını bana sabırla öğreten ve her zaman bilgilerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Mustafa Güven’e teşekkür ederim.

Histolojik çalışmaların yapılmasında ve değerlendirilmesinde büyük emeği geçen sayın Prof. Dr. Sait POLAT’a ve değerli asistanı Leman SENCAR’a ve tüm Histoloji-Embriyoloji çalışanlarına teşekkür ederim. Çalışmalarımda kullandığım ajanın hazırlanmasında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Ali İrfan Güzel’e ve Tıbbi Biyoloji Bölüm Başkanı ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Halil KASAP’a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Eğitimim sırasında, bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımızda görevli Doç. Dr. Mustafa EMRE hocama ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Hiçbir zaman yardım isteğimi geri çevirmeyen bölüm sekreterimiz Sn. Perihan YEŞİL’e çok teşekkürler ederim.

Yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, beni yüreklendiren, her koşulda destekleyen anneme ve babama, tüm doktora çalışmalarım sırasında kendilerini ihmal etmek durumunda kaldığım zamanlarda anlayışını esirgemeyen sevgili eşim Özlem’e ve varlığıyla bizi neşelendiren kızım Zeynep’e teşekkür ederim.

Huzur içinde yat sevgili ağabeyciğim Rıdvan KAHRAMAN... Mekânın Cennet Olsun...

Arş. Gör. İbrahim KAHRAMAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Periferik Sinirlerin Anatomi ve Histolojisi	4
2.1.1 Tipik Bir Nöronun Yapısı	5
2.1.2 Aksonal Transport	7
2.1.3 Myelinli Lifler	8
2.1.4 Miyelinsiz Lifler	9
2.1.5 Periferik Sinirlerin Sınıflandırılması	9
2.2 Periferik Sinir Yaralanmaları ve Sınıflandırılması	10
2.2.1 Wallerian Dejenerasyon	11
2.2.2 Hasarın Distalinde Meydana Gelen Dejenerasyon	12
2.2.3 Proksimalde ve Somada Meydana Gelen Dejenerasyon	12
2.2.4 Makrofaj ve Diğer Fagositik Hücrelerin Rolü	13
2.2.5 Nörotropik Faktörlerin Roller	14
2.2.6 Periferik Sinirlerde Rejenerasyon	15
2.2.7 Travmatik Nöropati ve Ağrı	16
2.3 Periferik Sinirlerin Elektriksel Özellikleri	18
2.3.1 Uyarılabilirlik ve Aksiyon Potansiyeli	18
2.3.2 İyon Kanalları	19
2.3.2.1 Voltaj-kapılı Na ⁺ Kanalları	20
2.3.2.2 Yavaş Na ⁺ Akımları ve Gecikmiş Depolarizasyon	21
2.3.2.3 Voltaj-kapılı K ⁺ Kanalları	21
2.4 Manyetik Alan	23

2.4.1 Genel Bilgi	23
2.4.2 PEMA'nın Sinir Rejenerasyonuna Olası Etkileri	23
2.5 Clodronate ve Spesifik Makrofaj Baskılanması	24
2.5.1 Clodronate'in Lipozomla Kaplanması (LEC)	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1 Deney Hayvanları ve Deney Grupları	26
3.2 Cerrahi Yöntemler	27
3.2.1 Travmatik Nöropati oluşturma yöntemi (Ezilme-Crush)	27
3.2.2 Lokal Clodronate (LEC) Uygulaması İçin Cerrahi Girişim	28
3.3 Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması	28
3.3.1 Sukroz-gap Yöntemi ile BAP kayıtlarının Alınması	28
3.3.1.1 Tonik Ölçüm ve Değerlendirilen Parametreler	30
3.3.1.2 Fazik Ölçüm ve Değerlendirilen Parametreler	30
3.3.1.3 İlaçlar ve Çözeltiler	31
3.4 Manyetik Alan Uygulama Sistemi	32
3.4.1 Manyetik Alan Uygulama Protokolü	33
3.5 Termal Plantar Testi	34
3.6 Clodronate'nin Lipozomla Kaplanması (LEC Hazırlanması)	34
3.6.1 LEC Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	35
3.6.2 LEC Hazırlama Yöntemi	35
3.6.3 LEC'in Lokal olarak uygulanması	36
3.7 Histolojik İşlemler	37
3.7.1 Elektron Mikroskopisi Yöntemi	37
3.7.2 Histomorfometrik Yöntemler	38
3.7.3 Makrofaj Sayımı için İmmünohistokimyasal İşlemler	39
3.8 İstatistiksel Değerlendirme	39
4. BULGULAR	40
4.1 Sukroz-gap Bulguları	40
4.1.1 Ezilme gruplarına ait Tibial ve Sural sinir BAP bulguları	40
4.1.2 Ezilme+PMA gruplarına ait Tibial ve Sural sinir BAP bulguları	42
4.1.3 Ezilme+LEC gruplarına ait Tibial ve Sural sinir BAP bulguları	43
4.1.4 Ezilme+Kombine gruplarına ait Tibial ve Sural sinir BAP bulguları	44
4.1.5 Tibial sinir demetinin tüm ezilme gruplarında karşılaştırılması	46
4.1.6 Sural sinir demetinin tüm ezilme gruplarında karşılaştırılması	47

4.1.7 Tibial ve Sural sinir demetinde BAP Genlik-Frekans ilişkisi	48
4.1.8 Tibial ve Sural sinirde Hiperpolarize Edici Ard Potansiyeller	50
4.1.9 Dejenerasyon-Rejenerasyon sürecinde 4-AP'nin	
BAP'lar üzerine etkisi	54
4.1.9.1 Ezilme gruplarında 4-AP'nin BAP bulguları	54
4.1.9.2 Ezilme+PMA gruplarında 4-AP'nin BAP bulguları	56
4.1.9.3 Ezilme+LEC gruplarında 4-AP'nin BAP bulguları	58
4.1.9.4 Ezilme+Kombine gruplarında 4-AP'nin BAP bulguları	59
4.1.9.5 Tibial ve Sural sinir demetinde 4-AP sonrası	
BAP Genlik-Frekans ilişkisi	60
4.1.9.6 Tibial ve Sural sinirde 4-AP'nin HAP'lar üzerine etkisi	62
4.1.10 Dejenerasyon-Rejenerasyon sürecinde	
TEA'nın BAP'lar üzerine etkisi	66
4.1.10.1 Ezilme gruplarında TEA'nın BAP bulguları	66
4.1.10.2 Ezilme+PMA gruplarında TEA'nın BAP bulguları	68
4.1.10.3 Ezilme+LEC gruplarında TEA'nın BAP bulguları	70
4.1.10.4 Ezilme+Kombine gruplarında TEA'nın BAP bulguları	72
4.1.10.5 Tibial ve Sural sinir demetinde TEA sonrası	
BAP Genlik-Frekans ilişkisi	73
4.1.10.6 Tibial ve Sural sinirde TEA'nın HAP'lar üzerine etkisi	75
4.2 Termal Plantar Test Bulguları	78
4.3 Histoloji Bulguları	80
4.3.1 Elektron Mikroskopik Bulguları	80
4.3.1.1 Kontrol Grubu	80
4.3.1.2 Ezilme grubu	81
4.3.1.3 Ezilme+PMA grubu	84
4.3.1.4 Ezilme+LEC grubu	88
4.3.1.5 Ezilme+Kombine grubu	90
4.3.2 Histomorfometrik Bulgular	92
4.3.3 İmmuno-histokimya Bulguları	94
5. TARTIŞMA	96
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	109
7.KAYNAKLAR	111
ÖZGEÇMİŞ	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 2.1.** Tipik bir periferik sinir demeti görülmektedir. Periferik bir sinir lifinin histolojik enine kesiti **Ep**; Epinöryum, **Pe**; Perinöryum ve **En**; Endonöryum. 4
- Şekil 2.2.** Şematik bir nöron hücresi gövdesi. Soma çok gelişmiş bir biyosentez aygıtı gibi iş görür. 5
- Şekil 2.3.** Bir periferik sinir (sinir demeti) merkezden çevreye ve çevreden merkez bilgi taşıyan çok sayıda motor ve duysal sinir lifini (aksonu) içermektedir. 6
- Şekil 2.4.** Soma da sentezlenen materyal hücre iskelet elamanları olan mikrotübüler ray sistemi ile terminale taşınmak zorundadır. Anterograd taşınımın hızlı bileşeni 100-400 mm/gün iken, retrograd taşınım hızı 100-200 mm/gün'dür. Retrograd transport bozulursa sinir hücresine periferden gelen bilgi akışı bozulabileceği için hücre bilgisiz kalıp metabolize edilebilecek impulsları üretemez. Bu bilgi akışı çok önemlidir, eğer bir aksonal travma mevcutsa sinir gövdesi oradan gelecek olan bu impulslara göre rejenerasyonu düzenleyecek olan metabolizmayı ayarlar ²⁰. 7
- Şekil 2.5.** Miyelinli sinirlerde bir Schwann hücresi tek bir aksona adanmıştır ve onu defalarca sararak kompakt miyelin yapıyı oluşturur. Miyelinsiz lifler sadece schwann hücresi tarafından sarılmıştır. 8
- Şekil 2.6.** Sinir hücresi tipleri. Unipolar nöronlar genelde periferik sinir sisteminde duysal sinirler olarak iş görmesine karşın multipolar nöronlar motor yanıtları taşıyan uzun sinirlerdir. 10
- Şekil 2.7.** Sunderland ve Seddon adlı araştırmacıların yapmış olduğu periferik sinir hasarlarının isimlendirilmesi ve derecelendirilmeleri. Ezilme (Crush) tipi yaralanmalar Aksonotmesis tipidir. 11
- Şekil 2.8.** Periferik sinirde wallerian dejenerasyon ve rejenerasyon süreçleri gösterilmektedir. 13
- Şekil 2.9.** Hasarlanmış bir sinirde makrofaj, schwann ve diğer fagositik hücrelerin fonksiyonları şematize edilmiştir. Makrofaj ve diğer hücrelerden büyümeyi teşvik edici moleküller salınmaktadır. 14
- Şekil 2.10.** Periferik sinir yaralanmasından sonra gelişen süreçler. **(a)** Endonöral kılıf sağlam. Miyelin parçalanmış. **(b)** Makrofajlar miyelin artıklarını sindirirlerken Schwann hücreleri yeni hücreleri yapar ve bunlar sıralanarak Büngner bandını oluşturmaya başlarlar. **(c)** Yeni akson dalcıkları uzayıp Schwann hücreleri tarafından oluşturulan rejenerasyon tübünde ilerlerler. **(d)** Uzayan ve kalınlaşan akson dalcığı etrafında miyelin kılıfı oluşmaya başlar. 15
- Şekil 2.11.** Ağrı algılanmasında rol alan duysal lifler. 17
- Şekil 2.12.** Periferik bir sinirden kayıtlanan Aksiyon Potansiyeli ve evreleri gösterilmiştir. 18
- Şekil 2.13.** Sağlam sinirlerden kayıtlanan aksiyon potansiyelleri ve gecikmiş depolarizasyonlar. **A)** 4-Ap sonrası Sural sinirden, **B)** Tibial sinirden kaydedilmiştir (çift yönlü ok). 21
- Şekil 2.14.** Miyelinli bir aksonda Na⁺ ve K⁺ kanallarının lokalizasyonu şematize edilmiştir. RD: Ranvier Düğümü, PN: Paranod, JPN: Jukstraparanod. 22

Şekil 2.15. A) Fosfolipidlerden Lipozomun oluşumu. B) Clodronate'in lipozom kapsüle hapsedilmesi ve makrofaj tarafından fagosite edilmesi sonucu hücre apoptozisi. Çizimler http://www.clodronateliposomes.org/ adresinden alıntıdır.	24
Şekil 3.1. Travmatik deneysel nöropati oluşturma yöntemi. Yaklaşık 1 cm'lik cerrahi inzisyon ile ortaya çıkarılan siyatik sinir, standart bir fine forseps kullanılarak 30 saniye süre ile ezilmektedir. Operasyon sonrası Post-operasyon odasına alınan hayvanlar deney günlerine kadar klimatize edilmiş uygun yaşam ortamında bırakıldı.	27
Şekil 3.2. Lokal lipozom kaplı clodronate (LEC) uygulaması için cerrahi girişim yöntemi. Rezervuar künt diseksiyonla subkutan olarak yerleştirilmektedir.	28
Şekil 3.3. Sukroz-gap kayıt sistemi: Sukroz-gap kutusu, programlayıcı-stimülatör-stimulus yalıtma birimi, uyarıcı ve kayıtlayıcı elektrotlar ile veri toplama sistemi ve bilgisayardan oluşmaktadır. Sukroz-gap kutusundaki dört havuzcuk birbirinden yalıtılmıştır ve KCl, Sukroz ve Test çözeltilerinin bulunduğu havuzcuklar perfüze edilmektedir.	29
Şekil 3.4. Tonik ve Fazik uyarı protokolü.	29
Şekil 3.5. BAP genlik, Yükselme süresi, ½ Yarı-süre, ½ Y-Gen ve gecikmiş depolarizasyonların genliği ölçüldü.	30
Şekil 3.6. Özellikle yüksek uyarı frekanslarında (40 ve 100 Hz'lerde) ortaya çıkan HAP aktivitesi ve ölçülen parametreleri.	30
Şekil 3.7. Tonik ve fazik uyarım frekanslarının BAP genliği üzerine etkisini tanımlamak amacıyla kullanılan örnek kayıtlar. 4-Ap ve TEA öncesi kayıtlanan tonik ve fazik BAP'lar kontrol olarak kabul edildi. İlaç uygulamasından sonra kayıtlanan BAP'lar ile karşılaştırılarak BAP genliklerinde kontrollere göre % düşme tonik blok (üst resimdeki oklar), fazik uyarmalar sırasında BAP genliklerindeki düşme ise fazik blok olarak tanımlandı (alt resimdeki oklar).	31
Şekil 3.8. Pulslu manyetik alan uygulama kabini ve sistemi.	32
Şekil 3.9. Pulslu manyetik alan uygulama protokolü. PMA güç kaynağından dikdörtgen şeklinde akım pulsları çıkmaktadır.	33
Şekil 3.10. PMA uygulama sistemi şematize olarak gösterilmektedir. PMA faraday kafesi içerisinde bulunan (60 cm çap, 100 sarım, 18 gauge bakır tel) bir çift helmholtz bobininden elde edildi. 4 adet sıçan helmholtz halkalarının orta yerine konularak deney sürecinde PMA uygulaması yapıldı.	33
Şekil 3.11. Termal plantar test sistemi. Gövde, sıçanların konduğu cam tabaka ve bunun altında bir kolla istenen konuma hareket ettirilebilen termal radyan kaynağından oluşur. Zaman ölçme sistemi radyant enerjinin uygulanmaya başlaması ve sıçanın pençesini çekmesi arasındaki süreyi ölçer. Isıtıcı sıçanların bulunduğu cam plakanın ayarlanan sıcaklıkta kalmasını sağlar.	34
Şekil 4.1. Kontrol grubu, 2 ve 4 hf ezilme gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip bileşik aksiyon potansiyeli (BAP) kayıtları görülmektedir. A) Tibial sinirden kayıtlanan, B) Sural sinirden kayıtlanan BAP kayıtlarıdır. Tibial sinir %49 oranında motor sinir lifleri, sural sinir ise %97 oranında duysal sinir lifleri içermektedir.	41
Şekil 4.2. Kontrol grubu, 2 ve 4 hafta (hf) Ezilme+PMA gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. A) Tibial sinirden kayıtlanan, B) Sural sinirden kayıtlanan BAP kayıtlarıdır.	43

Şekil 4.3. Kontrol grubu, 2 ve 4 hafta (hf) Ezilme+LEC gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. A) Tibial sinirden kayıtlanan, B) Sural sinirden kayıtlanan BAP kayıtlarıdır. 2. ve 4. haftaya ait BAP'ların diğer gruplara göre repolarizasyon fazının belirgin uzadığı görülmektedir.	44
Şekil 4.4. Kontrol grubu, 2 ve 4 hafta (hf) Ezilme+Kombine gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. A) Tibial sinirden kayıtlanan, B) Sural sinirden kayıtlanan BAP kayıtlarıdır.	45
Şekil.4.5. Tibial sinire ait Kontrol grubu ve 4 haftalık tüm ezilme gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları birlikte görülmektedir.	46
Şekil 4.6. Sural sinire ait Kontrol grubu ve 4 haftalık tüm ezilme gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları birlikte görülmektedir.	47
Şekil 4.7. Tibial sinir demetinde kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri.	48
Şekil 4.8. Sural sinir demetinde kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri.	49
Şekil 4.9. Tibial sinir demetinde kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	50
Şekil 4.10. Tibial sinir demetinde kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir. Uyarı frekansının artmasıyla HAP genliği artmakta, süresi ise kısalmaktadır.	51
Şekil 4.11. Sural sinir demetinde kontrol, 2. ve 4. haftalara ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	53
Şekil 4.12. Sural sinir demetinde kontrol, 2. ve 4. haftalara ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir. Uyarı frekansının artmasıyla HAP genliği artmakta, süresi ise kısalmaktadır.	53
Şekil 4.13. Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık Ezilme gruplarına ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.	55
Şekil 4. 14. Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık Ezilme gruplarına ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.	55
Şekil 4.15. Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+PMA grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği diğer grupların aksine PMA etkisi ile BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.	56
Şekil 4.16. Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık Ezilme+PMA grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği belirgin ve BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.	57

Şekil 4.17. Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+LEC grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.	58
Şekil 4.18. Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+LEC grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.	58
Şekil 4.19. Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+KOM grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.	60
Şekil 4.20. Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+KOM grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.	60
Şekil 4.21. Tibial sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri.	61
Şekil 4.22. Sural sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri.	62
Şekil 4.23. Tibial sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2 ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	63
Şekil 4.24. Tibial sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2 ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	63
Şekil 4.25. Sural sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	64
Şekil 4.26. Sural sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	65
Şekil 4.27. Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almakta, ½DS ve ½GS süresi çok uzamaktadır.	67
Şekil 4.28. Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almakta, ½DS ve ½GS süresi çok uzamaktadır.	68
Şekil 4.29. Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+PMA grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin altında bir değer almaktadır.	69
Şekil 4.30. Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+PMA grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almakta, ½DS ve ½GS süresi çok uzamaktadır.	70

Şekil 4.31. Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+LEC grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir.	71
Şekil 4.32. Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+LEC grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almakta, ½DS ve ½GS süresi çok uzamaktadır.	71
Şekil 4.33. Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+Kombine grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir.	72
Şekil 4.34. Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+Kombine grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir.	73
Şekil 4.35. Tibial sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri.	73
Şekil 4.36. Sural sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri.	74
Şekil 4.37. Tibial sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	76
Şekil 4.38. Sural sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	76
Şekil 4.39. Tibial sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2 ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	77
Şekil 4.40. Sural sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2 ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.	77
Şekil 4.41. Ayak plantar yüzünü inerve eden sinirler görülmektedir.	78
Şekil 4.42. Sinir ezilmesinden 2 hafta sonra Ezilme gruplarında; PMA, LEC ve Kombine uygulamanın termal latans süreleri üzerine etkileri verilmektedir. Ölçüm noktaları ortalama $\pm$ SEM'i temsil etmektedir.	79
Şekil 4.43. Kontrol (sağlam) gruba ait tibial sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (a) ve miyelinsiz sinir lifleri (ma) izlenmektedir. Schwann hücrelerinin (Sh) sinir liflerini sarmış olduğu görülmektedir. Akson sitoplâzmalarında mitokondriyonlar (m) ve nörofilamanlar (n) ayırt edilmektedir. Miyelinli (a) ve miyelinsiz liflerin (ma) aralarında interstisyumda bulunan kollajen lifler (K) görülmektedir. Miyelin kılıfı (mk)	80
Şekil 4.44. 2 haftalık ezilme grubu tibial sinir demetinden elde edilen elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (a) miyelin kılıfı (mk) ve akson harabiyetleri izlenmektedir. Schwann hücrelerinde (Sh) çekirdekte (ç) kromatin kümeleşmesi, sitoplâzma vakuolizasyon gözlenmektedir.	81

- Şekil 4.45.** 2 haftalık ezilme grubu sural sinir demetinden elde edilen elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (**a**) miyelin kılıfın ileri derecede dejeneratif değişiklikler sergilediği görülmektedir. 82
- Şekil 4.46.** 4 haftalık ezilme gruplarından alınan tibial sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Schwann hücrelerinin (**Sh**) miyelinli sinir lifini (**a**) sardığı görülmektedir. Bazı miyelinli sinir liflerinde evaginasyonlar izlenmektedir (*). Sitoplazmasında yağ damlacıkları (**L**) olan bir makrofaj (**M**) dikkati çekmektedir. 83
- Şekil 4.47.** 4 haftalık ezilme gruplarından alınan sural sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (**a**) miyelin kılıf evaginasyonları (*) gibi fokal dejeneratif değişiklikler izlenmektedir. Sitoplazmasında yağ damlacıkları (**L**) içeren makrofajlar (**M**) dikkati çekmektedir. Sinir liflerinin aralarında kollajen liflerin (**K**) varlığı görülmektedir. 84
- Şekil 4.48.** Sinir ezilmesi sonrası 2 hafta PMA uygulamasına maruz bırakılan grubun tibial sinir dokularının elektron mikroskopik görünümü. Sinir lifleri Schwann hücreleri (**Sh**) tarafından sarılmıştır. Miyelinli sinir liflerinde (**a**) miyelin kılıfın (**mk**) lamellar yapısı tamamen bozulmuştur. Schwann hücre (**Sh**) çekirdeğinde (**ç**) heterokromatin artışı vardır. Sitoplazmasında lipid damlacıkları (**L**) bulunan makrofaj da (**M**) ayırt edilmektedir. 85
- Şekil 4.49.** 2 haftalık Ezilme+PMA grubundan alınan sural sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (**a**) ve miyelinsiz sinir liflerinin (**ma**) ileri derecede dejenerasyona uğradığı görülmektedir. Miyelin kılıfın (**mk**) lamellar yapısı bozulmuştur. Schwann hücre (**Sh**) sitoplazmalarında yağ damlacıklarının (**L**) varlığı izlenmektedir. 86
- Şekil 4.50.** 4 haftalık Ezilme+PMA grubundan alınan tibial sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (**a**) ve miyelinsiz (**ma**) sinir lifleri Schwann hücreleri (**Sh**) tarafından sarılmıştır. Akson sitoplazmalarında mitokondriyon (**m**) ve nörofilamanlar (**n**) izlenmektedir. Schwann hücre çekirdeklerinde (**Ç**) heterokromatin artışı belirgindir. Sitoplazmalarında lipid damlacıkları (**L**) içeren makrofaj (**M**) görülmektedir. Sinir liflerinin aralarında kollajen liflerin (**K**) varlığı izlenmektedir. 87
- Şekil 4.51.** 4 haftalık Ezilme+PMA grubundan elde edilen sural sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinin (**a**) sitoplazmalarında büzüşmeler (**b**) izlenmektedir. Schwann hücreleri (**Sh**) sinir liflerini sarmaktadır. Schwann hücre çekirdeklerinde (**Ç**) heterokromatin artışı belirgindir. Bazı alanlarda makrofajların (**M**) sitoplazmalarında lipid damlacıkları (**L**) görülmektedir. 87
- Şekil 4.52.** 2 haftalık Ezilme+LEC uygulaması yapılan grupta tibial sinirde miyelinli sinir liflerinin (**a**) tamamen dejeneratif değişiklikler gösterdiği ve miyelin kılıf (**mk**) lamellar yapısının bozulmuş olduğu izlenmektedir. 88
- Şekil 4.53.** 4 haftalık Ezilme+LEC uygulamasına maruz bırakılan tibial sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (**a**) fokal miyelin kılıf değişiklikleri izlenmektedir. Miyelinsiz sinir lifleri (**ma**) normal histolojik yapılarını korumaktadır. 89
- Şekil 4.54.** 4 haftalık Ezilme+LEC uygulamasına maruz bırakılan sural sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (**a**) ve miyelinsiz (**ma**) sinir lifleri izlenmektedir. Schwann hücrelerinin (**Sh**) tek bir miyelinli sinir lifini (**a**) sarmış olduğu izlenmektedir. Sinir liflerinin aralarında interstisyumda bulunan kollajen lifler (**K**) ayırt edilmektedir. 90
- Şekil 4.55.** 2 haftalık Ezilme+Kombine grubu tibial sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinin (**a**) dejenerasyona uğradıkları ve miyelin kılıf (**mk**) lamellar

yapısının bütünlüğünün bozulduğu izlenmektedir. Sinir liflerinin aralarında kollajen lifler (K) görülmektedir.	90
Şekil 4.56. 4 haftalık Ezilme+Kombine grubu tibial sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Schwann hücresinin (Sh) tek bir miyelinli sinir lifini (a) sararken, birden fazla miyelinsiz sinir lifini (ma) sarmış olduğu izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinin (a) bazılarında miyelin kılıf (mk) evaginasyonları görülmektedir (*)	91
Şekil 4.57. Kontrol, 2 hafta ve 4 hafta gruplarda histo-morfometrik yöntemlerle değerlendirilen ortalama miyelinli lif sayıları verilmektedir. 4. haftada PMA grubu LEC grubuna göre anlamlı olarak daha fazla miyelinli lif içermekteydi (*) ($p<0,05$)	93
Şekil 4.58. Kontrol, 2 hafta ve 4 hafta gruplarda histo-morfometrik yöntemlerle değerlendirilen ortalama miyelinli lif çapları verilmektedir.	93
Şekil 4.59. Makrofajlara özgü CD68 işaretlemesi yapılması için Pozitif ve Negatif kontrol olarak sıçan dalak dokusu kullanıldı. A) Pozitif kontrol; sarı ok başları ile gösterilen kırmızıya boyanmış makrofajlardır. B) Negatif kontrol olduğundan CD68 immünreaksiyon gözlenmedi.	94
Şekil 4.60. Tibial sinirde kontrol ve ezilme gruplarına ait makrofajlara özgü CD68 işaretlemesi yapıldıktan sonra çekilen mikrograflar görülmektedir. A ve B ; Kontrol grubu tibial ve sural sinire ait sarı ok başları ile gösterilen kırmızıya boyanmış makrofajlardır. C ; 2 hafta Ezilme+PMA grubu; artmış CD68 immünreaksiyon dikkati çekmektedir. D ; 2 hafta Ezilme+LEC grubu, E ; 4 hafta Ezilme+PMA grubunda daha az sayıda makrofaj yani daha az pozitif immünreaktivite görülmektedir. F ; 4 hafta Ezilme+LEC grubuna ait gecikmiş immünreaksiyona ait makrofajlar sıklıkla görülmektedir.	95
Şekil 5.1. Sağlam ve hasarlı sinirde miyelin kılıf ve hızlı kinetik gösteren K^+ kanallarının muhtemel lokalizasyonu ve hasarlanmaya karşı verdiği yanıt şematize edilmiştir.	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

- Çizelge 3.1.** Deney grupları. Elektrofizyolojik deneylerde 66 adet sıçan kullanıldı. Histolojik çalışmalarda ise 45 adet sıçan kullanıldı. Fonksiyon testleri (FT), elektrofizyoloji ve histoloji deneylerinde kullanılan hayvanlarda yapıldığı için ek hayvan kullanılmadı. Tüm deneylerde toplam 111 adet sıçan kullanıldı. 26
- Çizelge 4.1.** Tibial ve sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. hafta (2hf) ve 4. hafta (4hf) ya ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. 41
- Çizelge 4.2.** Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. hafta (hf) Ezilme+PMA grubuna ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. 42
- Çizelge 4.3.** Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalarda (hf) Ezilme+LEC gruplarına ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. hf değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. 43
- Çizelge 4.4.** Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2 ve 4 hafta (hf) Ezilme+Kombine grubuna ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. 45
- Çizelge 4.5.** Tibial sinir demetinde ezilme sonrası 4 hafta boyunca PMA uygulamasına maruz bırakılan sıçanların diğer gruplarla istatistiksel açıdan karşılaştırılması verilmektedir. Aşağıda verilen BAP parametrelerindeki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. Diğer BAP parametreleri açısından diğer gruplarla Ezilme+PMA grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). 46
- Çizelge 4.6.** Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme (E) sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait HAP 40 ve 100 Hz değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. 52
- Çizelge 4.7.** 2mM 4-Ap sonrası tibial ve sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. 54
- Çizelge 4.8.** 2mM 4-Ap sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. 56
- Çizelge 4.9.** Tibial sinir demetinde ezilme sonrası 4 hafta boyunca PMA uygulamasına maruz bırakılan sıçanların 2mM 4-Ap uygulaması sonrası diğer gruplarla istatistiksel açıdan

karşılaştırılması verilmektedir. Aşağıda verilen BAP parametrelerindeki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. Diğer BAP parametreleri açısından diğer gruplarla Ezilme+PMA grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). V-dd/BAP oranı PMA etkisiyle anlamlı düzeyde düşük bulundu.

57

Çizelge 4.10. 2mM 4-Ap sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

59

Çizelge 4.11. 2mM 4-Ap sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

59

Çizelge 4.12. Tibial ve Sural sinirde 2mM 4-Ap sonrası; kontrol, ezilme (E) sonrası 2 ve 4. haftalara (hf) ait HAP 40 ve 100 Hz değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

65

Çizelge 4.13. 10 mM TEA sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası Ezilme grubunda 2 ve 4. haftalara (hf) ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

67

Çizelge 4.14. 10 mM TEA sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası Ezilme+PMA grubunda 2 ve 4. haftalara (hf) ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

69

Çizelge 4.15. 10 mM TEA sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası Ezilme+LEC grubunda 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

70

Çizelge 4.16. 10 mM TEA sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası Ezilme+Kombine grubunda 2 ve 4. haftalara (hf) ait BAP değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

72

Çizelge 4.17. Tibial ve Sural sinirde 10 mM TEA sonrası; kontrol, ezilme (E) sonrası 2 ve 4. haftalara (hf) ait HAP 40 ve 100 Hz değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AC	Alternatif Akım
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş-klorür
AP	Aksiyon Potansiyeli
4-Ap	4-Aminopridin
BAP	Bileşik Aksiyon Potansiyeli
BDNF	Beyin kökenli sinir büyüme faktörü
CD68	Makrofajlara özgü progenitor kök hücre antijeni
Cl₂MBP	Cholodranate/chlodronik asit
CNTF	Silyar kökenli sinir büyüme faktörü
½ DS	Yarı Düşme süresi
Del-dep	Deleyad depolarisation/Gecikmiş depolarizasyon
drC	dorsal root C lifleri
DRG	Dorsal Root Ganglion/Arka Kök Ganglion
DZP	Dinlenim Zar Potansiyeli
E	Ezilme
ELF	Extremely Low Frequencies/Çok Düşük Frekanslı
EMA	Elektromanyetik Alan
GNDF	Glia kökenli sinir büyüme faktörü
½ GS	Yarı Genişlik Süresi
HAP	Hiperpolarize edici Ard Potansiyel
Hz	Hertz (sn ⁻¹)
IASP	Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği
IL-1,6	İnterleukin-1,6
KOM	Kombine grup
LEC	Lipozom Enkapsule Clodranate
mm	milimetre
ms	milisaniye
µs	mikrosaniye
µl	mikrolitre
µm	mikrometre
mM	miliMolar
m/s	metre/saniye

MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mT	miliTesla
μT	mikroTesla
mV	miliVolt
NGF	Sinir büyüme faktörü
NT-3,4,5	Nörotropin-3,4,5
PBS	Phosphate Buffer Solution
pH	power of Hydrogen
PMA	Pulsu Elektromanyetik Alan
PSS	Periferik Sinir Sistemi
PWL	Paw Withdrawal Latency/Pençeyi Geri Çekme süresi
sC	sempatik C lifleri
TEA	Tetraetilamonyum
TGF-Beta	Transforming Growth Factor-Beta
T_{HAP}	HAP süresi
TTX	Tetradoksin
STX	Saksitosin
V_{HAP}	HAP genliği
V-dd	Gecikmiş depolarizasyon genliği
YS	Yükselme Süresi
WD	Wallerian Dejenerasyon

ÖZET

“Sıçan Siyatik Sinir Rejenerasyonuna Pulsu Manyetik Alanın Makrofaj Aracılı Etkisinin Lokal Clodronate Uygulamasıyla Araştırılması”

Periferik sinir yaralanmaları, mekanik travma, termal, kimyasal, doğuşsal veya patolojik etiyolojilerden kaynaklanabilir. Hasar görmüş sinirlerin restorasyonu sağlanmazsa, kas fonksiyonlarının kaybına, duysal bozukluklara ve ağırlı nöropatilere neden olabilir. Periferik Sinir Sisteminde (PNS) yaralanma sonrasında, yerleşik ve sistemik dolaşımdaki monositler hızlı bir şekilde yaralanma bölgesine infiltre olurlar, bir süre sonra, yaralanmanın distalinde kalan hasarlı kısım Wallerian Dejenerasyona (WD) uğrar. WD sırasında makrofajların rolü birçok deneysel çalışmaya konu olmuştur. Aksonal rejenerasyon sırasında, makrofajların sitokinler, büyüme faktörleri ve proteolitik enzimler gibi 100 den fazla faktörü sekrete ettiğı bilinmektedir. Bu faktörlerin dokuların büyümesini, yara iyileşmesini ve fagositozu modüle edebileceğı ileri sürülmektedir.

Çalışmamızda, wistar türü sıçanların sağ siyatik sinirleri ezilerek travmatik mononöropati modeli oluşturuldu ve Pulsu Manyetik Alanın (PMA) sinir iyileşmesine etkileri incelendi. Ayrıca, bu çalışmada PMA uygulamasının makrofaj aracılı etkileri belirlendi ve diğer gruplarla karşılaştırıldı.

Deneylerden elde edilen veriler siyatik sinirin distal dalları olan tibial (yüksek oranda motor) ve sural (duysal) sinirlerden elde edildi. Yerleşik ve sistemik makrofajları baskılamak için lipozomla kaplanmış clodronate (LEC) kullanıldı. Travmatik mononöropati deneylerinde Ezilme, PMA, LEC ve Kombine gruplara ait veri elde etmek için, in vitro elektrofizyolojik yöntem (sukroz-gap), fonksiyon test, elektron ve ışık mikroskopik, histomorfometrik incelemeler yapıldı. Yaralanma sonrası yeniden miyelin oluşmasında hızlı ve yavaş K⁺ kanal gelişimini ve lokalizasyonunu belirlemek için 4-Aminopiridin (4-Ap) ve Tetraetilamonyum (TEA) kullanıldı. Siyatik sinir hasarı sonrası sıçanlar 5 farklı gruba ayrılarak PMA'ya maruz bırakıldılar (1 saat/gün, şiddeti; 1,5 mT, puls frekansı; 1-10-20-40 Hz).

Bulgularımız, PMA'nın periferik sinir hasarı sonrası yeniden miyelin oluşması sürecinde fonksiyonel iyileştirici etkisi olabileceğini göstermektedir. Makrofajlar wallerian dejenerasyon sürecinin en önemli elemanlarından biridir. Makrofajların önemli iki temel fonksiyonu vardır: dejenerasyona uğramış myelin yapıyı fagosite etmek, nörotropik faktörleri ve sitokinleri üretmektir. PMA makrofajları stimüle ederek miyelin yapımını ve aksonal büyümeyi destekleyen bir faktör salgılanmasını sağlayabilir. Bu bilinmeyen faktörde, sinir iyileşmesini hızlandırıp rejenerasyon sürecini hızlandırabilir. Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgulara göre PMA periferik sinir hasarı sonrası fonksiyonel iyileşme için potansiyel tedavi edici etkisi olabilir.

Anahtar Sözcükler: Pulsu Elektromanyetik Alan, Periferik sinir hasarı ve rejenerasyonu, Makrofajlar, Lipozomla kaplanmış clodronate, K⁺ kanalları.

ABSTRACT

The Investigation Of Macrophage-Mediated Effect Of Pulsed Magnetic Field On Rat Sciatic Nerve Regeneration By Local Clodronate Administration.

Peripheral nerve injuries can result from mechanical trauma, thermal, chemical, congenital, or pathological etiologies. Failure to restore these damaged nerves can lead to the loss of muscle function, impaired sensation, and painful neuropathies. Following nerve injury in the Peripheral Nervous System (PNS), resident and systemic monocytes rapidly invade the site of injury and, after a delay, the distal portion of injured nerve undergoing Wallerian Degeneration (WD). The role of macrophages during WD has been studied using different experimental approaches. During the axonal regenerating macrophages are known to produce and secrete over 100 different factors which include cytokines, growth factors, and proteolytic enzymes. These factors may act in manner to modulate tissue growth, wound repair, and phagocytosis.

In our study, to create traumatic mononeuropathy model, right sciatic nerve of the wistar rats were crushed and the effects of Pulsed Magnetic Field (PMF) were determined on nerve recovery. Moreover, the aim of this study was to identify macrophage-mediated effects of PMF treatment on the mechanism underlying traumatic mononeuropathy model in rats and compared with experimental other groups.

In our experiments all data were obtained in both the tibial (largely motor) and sural (sensor) distal sciatic branches of rats. In this study we used liposome encapsulated clodronate (LEC) to selectively deplete or reduce resident and systemic macrophages population during the degeneration-regeneration cycle. In traumatic mononeuropathy experiments, to obtain data about the effects of PMF, Crush, LEC and the combination of PMF and LEC groups in vitro electrophysiological methods (sucrose-gap), functional test, electron and light microscobic histomorphometric experiment were carried out. 4-Aminophyridine (4-Ap) and Tetraethylammonium (TEA) were used to determine fast and slow K^+ channel development and localization after remyelination. After crush injury of the sciatic nerves, rats divided into five groups and exposed to PMF (1 h/day, intensity; 1,5 mT, consecutive frequency; 1-10-20-40 Hz).

Our data show that the PMF may be a critical functional recovery effect on remyelination after peripheral nerve injury. Macrophages have been proven to be important effector cells during WD. They provide at least two basic functions: phagocytosis of degenerating myelin and production of cytokines and neurotrophic factors. PMF may stimulate macrophages to secrete a factor that promotes axonal growth and myelin restoration. A unknown factor that initiates the regenerating processes a candidate for enhancing nerve recovery, and PMF seems to be one of the triggers of nerve regeneration. In addition, our results indicate that PMF application may be an effective therapeutic treatment of peripheral nerve injuries.

Key words: Pulsed Electromagnetic Field, Peripheral nerve injury and regeneration, Macrophages, Liposome encapsulated clodronate, K^+ channels.

1- GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmaları kompleks bir süreç olup sadece periferik düzeyde lokal olarak gerçekleşen bir olgu olmayıp aynı zamanda hastanın tutma-kavrama-basma gibi bir çok manipulatif fonksiyonunu ve kişisel günlük yaşamını olumsuz etkileyebilen genel bir süreçtir. Bu yüzden periferik sinir hasarının daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenebilmesi için birçok araştırmaya konu olmaya artarak devam etmektedir.

Periferik sinirlerin mekanik etkilere karşı belirgin bir direnci vardır. Bu özellik, farklı dokulardan oluşan dış kılıfın düzgün ve hassas bir şekilde kendisini çevrelemesinden ve sinir liflerinin bu dokular içine gömülmesinden dolayıdır. Mekanik direnç olmasaydı, eklemler ve vücut yüzeyi ile topografik ilişkisi olan sinirlerin günlük yüklenmelerde fonksiyonlarını zarar görmeden yapabilmeleri mümkün olmazdı. Periferik sinirler günlük yaşam içerisinde ekstremiteelerin hareketleri sonucu oluşan pozisyon değişikliklerine sinir yatağı içerisinde kayma hareketi yaparak uyarlar. Fakat çok şiddetli bir mekanik etki siniri çevreleyen dokunun direncini geçerse öncelikle çevreleyen dokuda ve sonra da sinir liflerinde hasar oluşması sonucu fonksiyon bozukluklarını ya da nöropati denen olguları ortaya çıkarır.

Travma periferik sinirleri veya köklerini doğrudan veya dolaylı etkileyebilir. Önemli olan bu travmatik etkinin çeşidi, süresi ve şiddetidir. Akson devamlılığının kesintiye uğradığı noktadan itibaren, sinir liflerinin bu hasarlanmalara vereceği yanıt göreceli olarak tek tiptir, lezyonun distalinde wallerian dejenerasyon denen bir olgu ortaya çıkar. Akson distalinde kalan parça ve onu saran miyelin yapı proelitik enzim aktivitesi ile parçalara ayrılıp makrofajlar ve diğer fagositik hücreler tarafından 2-3 hafta içinde fagosit edilir. Dejenerasyonun geç dönemlerinde, Schwann hücreleri büyüyen akson filizlerine rehberlik eden Büngner bandlarını oluşturur. Rejenerasyon; aksonun sağlam kalan proksimal ucundan akson filizlerinin uzaması ve bunların büngner bantları içinde günde ortalama 1-5 mm ilerleyerek distal hedef organlarına ulaşması ile amacına ulaşmış olur. Morfolojik ve fonksiyonel olarak rejenerasyonun başarısı rejenere olan aksonun sayısı, çapı ve myelinizasyonun derecesine bağlıdır. Her ne kadar başarılı bir dejenerasyon-rejenerasyon sürecinden sonra distal hedef organla tekrar bağlantı sağlanabilmiş olsa da rejenere olmuş myelinli sinirler uzun süre anormal özelliklerini devam ettirirler. Başarılı bir reinnervasyondan sonra akson tekrar normal kalınlığına yaklaşır; fakat büyük sinir liflerindeki

myelin kılıfları akson çaplarına göre rölatif olarak ince kalır ve yeni oluşan internodal aralıklar kısadır.

Günümüzde mikrocerrahi tekniklerinin gelişmesi ve yaygın olarak kullanılmaya başlaması, biyokimyasal, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerin gelişmesi gibi etmenlerle periferik sinir yaralanmalarında, sinir onarımının başarısı büyük oranda artmıştır. Periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde bugüne kadar; çeşitli sütur teknikleri, anastomozlar, sinir greftleri, non-nöronal doku greftleri, kombine greftler, sinir konduitleri ve silikon-sentetik tüpler gibi pek çok yöntem uygulanmış ve bunların sinir iyileşmesine olan muhtemel etkileri geniş olarak literatürde yerini almıştır. Sinir rejenerasyonunun arttırılmasında eksojen olarak uygulanan başlıca nörotropik faktörler ise (NGF, TGF-beta gibi), steroidler, hormonlar, çeşitli kimyasal maddelerin de etkinliği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu yöntemlerin hepsi invazif cerrahi gerektiren tekniklerdir.

Rejenerasyon sürecini hızlandırmak için uygulanan non-invasif bir alternatif tedavi tekniği de puls şeklinde, çok düşük frekanslı, pulslu manyetik alan (PMA) uygulamalarıdır. Pozitif etkinliği literatürde birçok çalışmada rapor edilmiştir. PMA'nın, canlı metabolizmasında kan akışını arttırarak gerek oksijen, gerekse iyon alışverişini kolaylaştırıp hücre homeostazisini düzenleyebileceği ileri sürülmektedir. PMA uygulaması ile yapılan çalışmalarda bu uygulamanın, vücuttaki yapısal harabiyeti durdurabileceği, rejenerasyon sürecini başlatabileceği ya da hızlandırabileceği gösterilmiştir. Ancak PMA'nın etki mekanizması açık olmamakla birlikte makrofaj aracılı etki gösterebileceği, makrofaj aktivasyonunun artmasının da rejenerasyonda rol alan bazı nörotrofik faktörleri aktive ettiği  ne s r lm ştir.

Sistemik olarak uygulanan PMA'nın etki mekanizmasını açıklamak için yapılan yorumlarda; PMA'nın tiroid ve böbreküstü bezini etkileyerek, immun sistemi modüle ederek anti-inflamatuar aktivite etkisine sahip olabileceği ve PMA'nın analjezi ve anti- demos aktivite etkilerinin ortaya çıkmasına neden olarak iyileşmenin hızlanmasına katkıda bulunabileceği ifade edilmektedir.

Canlı organizmalarda meydana gelebilecek yerel hasar (bir sinir ezilmesi) durumunda hasar görmüş doku ile yerleşik makrofajlar ve kan yoluyla gelen makrofajlar arasında aktif iletişim için inflamatuvar reaksiyon gerekli olan önemli bir parçadır. İlk uyarılan bağışıklık sistemi h creti, makrofajdır. Makrofajlar, periferik sinir sisteminde aksonal iyileşme için anahtar rol oynar. Sinirlerde yerleşik makrofaj popülasyonu çok azdır (sıçan sıyatik sinirlerinde, tüm hücre popülasyonunun yaklaşık %2-9). Bu makrofaj miktarı yaralanma sonrası miyelin kılıfın temizlenmesi için yeterli olmadığı için, periferik sinir hasarlarında,

dolaşım sistemiyle bölgeye gelen makrofajlar, miyelin kılıf ve dejenere olmuş akson artıklarını ortadan kaldırmakla iyileşme sürecine önemli katkıda bulunur. Makrofajlar artıkları temizlemenin dışında, rejenerasyonun hızını arttıran faktörlerin sekresyonunu da hızlandırır.

Canlı organizma patolojik sonuçlar doğurabilecek bir etkiye maruz kaldığında, patolojik bozukluğun başlangıç ve gelişiminin tetiklenmesinde ilk basamak olarak immün sistemin yer aldığı net olarak ortaya konmuştur. Özelikle immün yanıtın en önemli yapı taşlarından makrofajların rolü öne çıkmaktadır. Periferel makrofajların (kan monositleri, karaciğer ve dalak kaynaklı makrofajlar) yoğunluğunu azaltmak için etkinliği literatürde çok açık olarak gösterilmiş bifosfonat türevi olan lipozom ile kaplanmış clodronate (Liposom encapsulated clodronate (clodronik asit); LEC) kullanılmaktadır. Makrofajlara zgl bir ajan olan LEC periferel makrofajların sayısını azaltırken diğer hücreleri etkilememektedir.

Bu projedeki amacımız sıçan siyatik sinirinde ezilme ile oluşturulan yaralanma sonrasında ve rejenerasyon sürecinde, LEC aracılığı ile lokal olarak gerçekleştirilecek makrofaj baskılaması sonrasında PMA'nın makrofaj aracılı etkisinin olup olmadığını siyatik sinirin distal dalları olan sural ve tibial sinirlerde araştırmak, oluşan elektrofizyolojik ve morfolojik değişikliklerini göstermek ve voltaj kapılı iyon kanallarının işlevsel özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri spesifik kanal blokörleri (4-AP, TEA) kullanarak belirlemektir. Nöropatide tedavi edici etkinliklerinden faydalanmayı planladığımız PMA ve makrofaj baskılanması ayrı ayrı ve kombine etkilerini göstermek ve etki mekanizmalarını açıklamaya yönelik yeni verilerin elde edilmesi bu alanlarda yapılan veya yapılması düşünülen çalışmalara yenilikler ve farklı yaklaşımlar kazandırabilecektir.

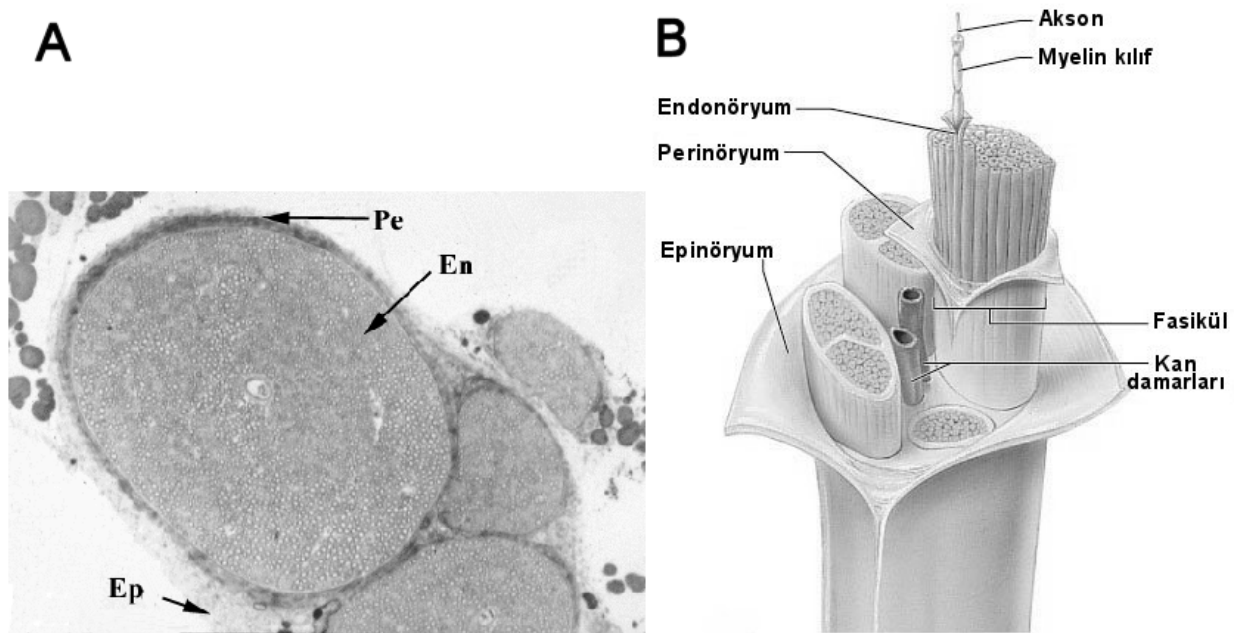
Bu araştırmada ayrıca duyuusal ve motor sinir rejenerasyonlarının ayrı ayrı araştırılması da amaçlanmıştır. Bilindiği gibi sural sinir duyuusal bir sinir olup %97'i duyuusal (sensor) liflerden, buna karşın tibial sinir %49 motor liflerden oluşmaktadır. Rejenerasyon sırasında motor ve duyuusal sinir rejenerasyon hızları elektrofizyolojik yöntem yanında fonksiyon testi ile de takip edildi ve korelasyon arandı. Ayrıca rejenerasyonun gelişimi elektrofizyolojik yöntemin yanı sıra, histolojik, immunohistokimyasal testler kullanarak ta incelendi.

2. GENEL BİLGİ

İnsan vücudun da 100 trilyona (10^{14}) yakın çok çeşitli türde hücre bulunur. Sinir Sistemi (SS)'nde yaklaşık 1 trilyon (10^{12}), Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nde ise 100 milyar dolayında nöron ve bu sayının 10-50 katı kadar nöro-glial destek hücreleri bulunmaktadır. Sinir sistemi, beyin ve omuriliği içeren MSS ve bunların gangliyonlarını içeren Periferik Sinir Sistemi (PSS) şeklinde, 2 ana bölümden oluşur. PSS gelişimi sonrasında somatik ve otonom bölümlere ayrılır. Somatik bölüm duysal-motordur, bilinçli duysal uyarımları beyne iletirken, motor uyarımları da çizgili kaslara taşır¹⁻⁸.

2.1 Periferik Sinirlerin Anatomi ve Histolojisi

Periferik sinir sistemi gelişimi sonrasında somatik ve otonom bölümlere ayrılır. Somatik bölüm duysal-motordur, bilinçli duysal uyarımları beyne iletirken, motor uyarımları da çizgili kaslara taşır. Otonom Sinir Sisteminin tamamına yakını motordur. Uyarımları MSS'den kalp ve ter bezleri gibi istemsiz etkinlik gösteren organlara taşır^{1-5,6}. Periferik sinirler farklı büyüklükteki fasiküllerin bir araya gelerek oluşturduğu kablo şeklinde bir yapı gösterirler. Bunlar plexus şeklindeki uzun seyirlerinde birbirine bağlı olarak bulunurlar ve her birinin etrafı en dışta epinöryum adı verilen bir bağ dokusu zarı ile çevrelenmiştir (Şekil 2.1). Örneğin, bilimsel araştırmalarda model olarak sıklıkla kullanılan

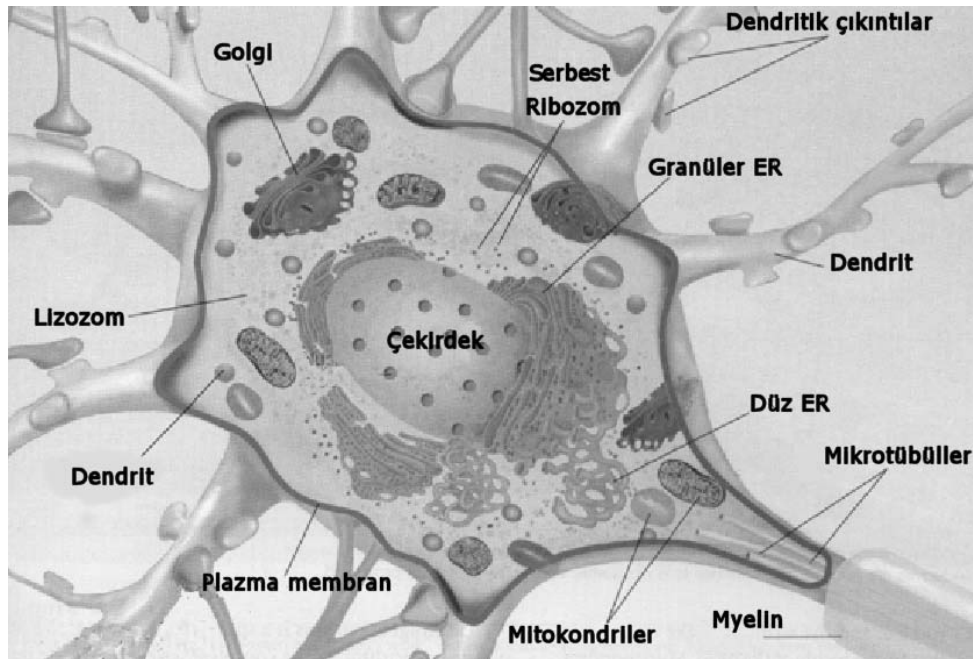


Şekil 2.1 (A) Ep; Epinöryum, Pe; Perinöryum ve En; Endonöryum. Periferik bir sinir lifinin histolojik enine kesiti, (B) Tipik bir periferik sinir demeti görülmektedir.

siyatik sinir gibi tipik, karmaşık bir periferik sinirde yaklaşık 27 bin akson bulunur ve bunlar 80 kadar fasikül şeklinde distale ilerler^{4,9}. Siyatik sinir hem afferent (duyusal) hem de efferent (motor) lifler içerir; ayak ve bacakların duyu ve hareket sinirlerinin bir araya gelmesi ile oluşan, vücuttaki en kalın sinirdir^{6,10,11}. Epinöryum kapalı bir zar sistemi değildir; gevşek, lipid içeriği yüksek, kollejen liflerle kuvvetlendirilmiş bir bağ dokusudur. Siyatik sinirin kalça eklemi düzeyinde transvers bir kesiti alındığında, %85'ini epinöryumun, kalanını da sinir iletim elamanları olan fasiküllerin oluşturduğu söylenebilir^{3,4,6,7,12}.

Her bir sinir fasikülü perinöryum denen çok tabakalı gevşek bağ dokusu tarafından çevrelenmiştir. Perinöryum elastik lifler ve tabakaları arasında sirküler veya uzun olarak yerleşen kollajen liflerle güçlendirilmiştir. Bu yapının perinöryum açısından özel bir anlamı vardır. Bu yapı mekanik olarak gerçek bir sinir kılıfı vazifesi görür⁴.

Endonöryum miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri, fibroblastlar ve nadir olarak mast hücreleri bulundurur. Her fasikül kesitinde 2-6 kapiller bu fasiküle paralel seyrederek. Kollajen fibriller sinir lifleri çevresinde daha yoğun olarak toplanırlar. Önceden bu fibrillerin fonksiyonel sinir kılıfı olduğu düşünüldüyse de günümüzde schwann hücresi ve bazal laminası ile aynı anlama gelen nörolemma (endonöral tüb) adı verilmiştir^{4,7,14}.



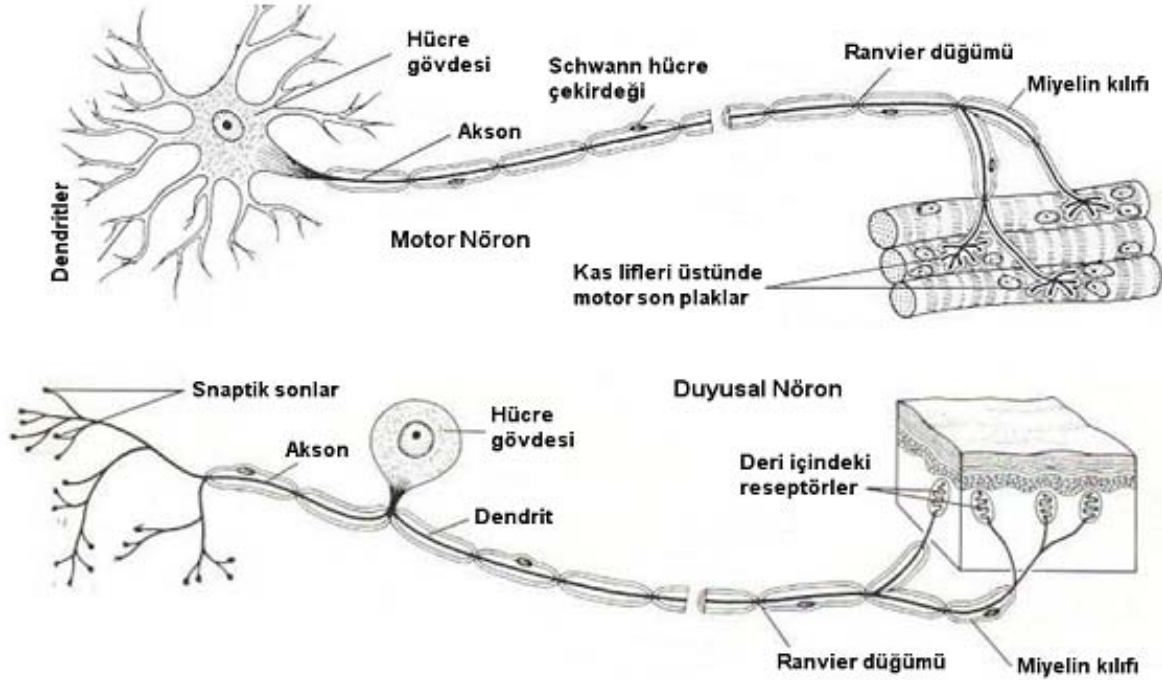
Şekil 2.2 Şematik bir nöron hücresi gövdesi. Soma çok gelişmiş bir biyosentez aygıtı gibi iş görür.

2.1.1 Tipik Bir Nöronun Yapısı

Nöronlar sinir dokusunun yapısal ve işlevsel hücreleridir. Hem MSS hem de PSS de iletişim etkinliği yönünden işlevsel birim nöron'dur. Başka bir deyişle sinir sistemi, Aksiyon

Potansiyeli (AP) oluşturma ve iletme yeteneği olan nöronlardan oluşmuştur. Nöronlar farklı biçim ve yapıda olmalarına rağmen genel bir yapıda tarif edilirler. Her nöron bir hücre gövdesi (soma-perikaryon), çok sayıda dendrit ve tek bir akson içerir. Soma, sitoplazmanın içerdiği çok sayıda organel, bir çekirdek ve bir çekirdekçikten oluşur. İyi gelişmiş biyosentetik ayağına sahiptir (Şekil 2.2). Bu ayağı granüllü endoplazmik retikulumun (gER), yaprakları olan nissl cisimcikleri ve golgi aygıtından oluşur. Çok sayıda mitokondri, nörofilaman ve mikrotübüler iskelet bulunur^{1-4,7,8}.

Somadan dendrit olarak adlandırılan çok sayıda sitoplazmik uzantılar çıkar, proksimal dendritler nissl ve golgi içermesine rağmen temel stoplazmik bileşenleri mikrotübüller ve mikroflamanlardır. Bu uzantılar diğer dendritler, aksonlar ve nöronlardan bilgi almak üzere özelleşmiştir (Şekil 2.3)¹⁻⁶.



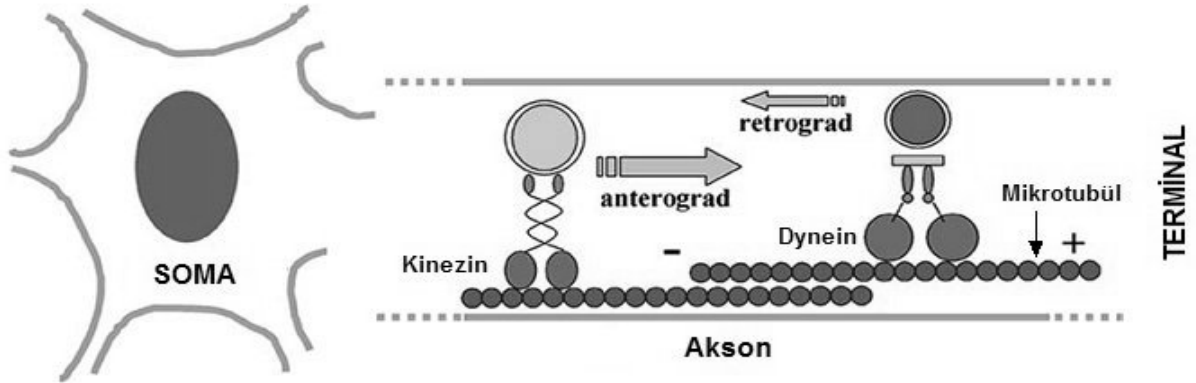
Şekil 2.3 Bir periferik sinir (sinir demeti) merkezden çevreye ve çevreden merkez bilgi taşıyan çok sayıda motor ve duysal sinir lifini (aksonu) içermektedir.

Somadan koni şeklinde çıkan, herhangi bir kesintiye uğramadan hedef organa kadar giden ve diğer hücrelere sinir impulsu iletimini (Aksiyon Potansiyeli-AP) sağlayan ana uzantı aksondur. Uzunluğu ve çapı nöron tipine göre değişir, bazı aksonlar dendritten bile küçükken (1-2 mm), bazıları 1 metreyi geçebilir, çapları ise 50 nm ile 20 µm arasında değişir. Aksonlar düz-granüllü ER, serbest ribozom, golgi aygıtı taşımazlar, bu yönleri ile soma ve proksimal

dendritlerden farklıdır. Bu nedenle aksonlar somadan ayrıldıklarında dejenerasyona uğrarlar, çünkü metabolik gereksinimleri açısından somaya muhtaçtır^{1,4,13}.

2.1.2 Aksonal Transport

Somada sentezlenen ürünlerin akson devamlılığı için taşınması gereklidir. Bu nedenle soma aksonun fonksiyonel ve anatomik entegrasyonunu sağlar, eğer akson kesilir veya hasarlanırsa, distal akson parçası dejenere olur^{6,10,13,16}. 1851 yılında August Waller bazı sinir lif ve köklerini kesip sonuçta periferde hangi sinirlerin dejenere olduğunu incelemiştir. Dejenerasyonun şeklinden Dorsal Root Ganglion'larında bulunan (DRG) somalarının aksonlar için hayati olduğu sonucuna varmıştır. Aksonal taşınımında asıl mekanizmayı açıklayan araştırmacılar Ramon Cajal (1906) ve Paul Weiss (1948), siyatik siniri bağlamış ve aksoplazmanın bağlanan yerin proksimalinde toplandığını görmüştür. Aksoplazmanın yavaşça hücre gövdesinden terminale doğru hareket ettiği sonucuna varılmış ve bu sürece de **aksoplazmik akım** adını vermişlerdir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Soma da sentezlenen materyal hücre iskelet elamanları olan mikrotübüler ray sistemi ile terminale taşınmak zorundadır. Anterograd taşınımın hızlı bileşeni 100-400 mm/gün iken, retrograd taşınım hızı 100-200 mm/gün'dür. Retrograd transport bozulursa sinir hücrelerine periferden gelen bilgi akışı bozulabileceği için hücre bilgisiz kalıp metabolize edilebilecek impulsları üretemez. Bu bilgi akışı çok önemlidir, eğer bir aksonal travma mevcutsa sinir gövdesi oradan gelecek olan bu impulslara göre rejenerasyonu düzenleyecek olan metabolizmayı ayarlar²⁰.

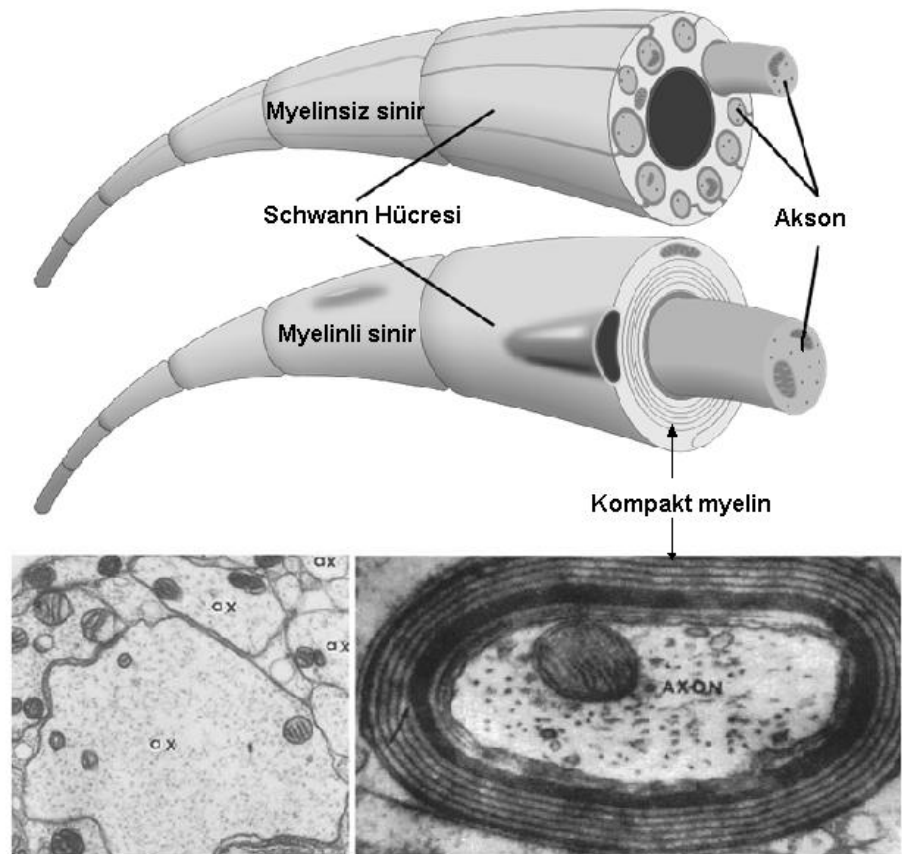
Aksonların çoğu, sentezlenen materyalin diffüzyonla somadan terminale hızlı bir şekilde taşınmasına izin vermeyecek kadar uzundur. Aksonal taşıma için **Kinezin** ve **Dinein** gibi motor proteinler gereklidir. **Kinezin** anterograd (Somadan distale doğru) taşımadan sorumlu iken, **Dinein** retrograd (Distalden somaya doğru) taşımadan sorumludur^{17,18,19}.

2.1.3 Miyelinli Lifler

Schwann hücreleri periferik sinir sisteminin destekleyici hücreleri olup morfolojik açıdan aksonları veya sinir liflerini miyelin varlığına veya yokluğuna göre miyelinli ve miyelinsiz olarak ikiye ayırır^{4,6,7}. PSS’de miyelin kılıfı schwann hücrelerinin bir ürünü olmasına karşın MSS’de oligodentrositlerce yapılır. Schwann hücrelerinin sitoplazmalarının aksonu spiral şekilde tamamen sarması ile iç ve dış mezakson oluşur ve birbiri üzerine 10-120 kez sarılarak sıkışır ve tipik kompakt-konsantrik yapılı miyelin ortaya çıkar (Şekil 2.5). Bu kompakt yapılı miyelin lamelleri arasında kalan plazma adacıklarına “Schmidt-Lanterman” yarıkları denir. Bu yapıların aksonun beslenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Boyuna kesitle bakıldığında zaman miyelin kılıfın süreklilik gösteren bir yapı olmadığı, 0,25-1,5 mm uzunluğunda parçalara bölündüğü gözlenmiştir. Her bir miyelin segmenti bir schwann hücresi tarafından oluşturulmuştur. İki segmentin bağlandığı yerde “Ranvier Düğümleri” (RD) denen 1,0-4,2 μm genişliğinde özel bir yapı bulunur. Bir aksonun çapı ile miyelinizasyonun derecesi ve internodal aksonun uzunluğu arasında pozitif bir ilişkinin olduğu bilinmektedir. Yani küçük çaplı

aksonların miyelinleri ince, büyük çaplı olan aksonları ise kalındır⁴.

Miyelin katmanları aksonun elektriksel direncini yükseltirken Schwann hücreleri arasında kalan boşluklar olan RD’ler ise yoğun iyon değişimine açıktır. Bu nedenlerle miyelinli sinirlerde, 'saltatorik' iletim adı



Şekil 2.5 Miyelinli sinirlerde bir Schwann hücresi tek bir aksona adanmıştır ve onu defalarca sararak kompakt miyelin yapıyı oluşturur. Miyelinsiz lifler sadece schwann hücresi tarafından sarılmıştır.

verilen sıçramalı hızlı aksiyon potansiyeli iletim özelliği vardır. Saltatorik iletim, iletim hızını aynı çaplı miyelinsiz sinirlere göre yaklaşık 10-50 kat artırmaktadır^{1-8,15,16}

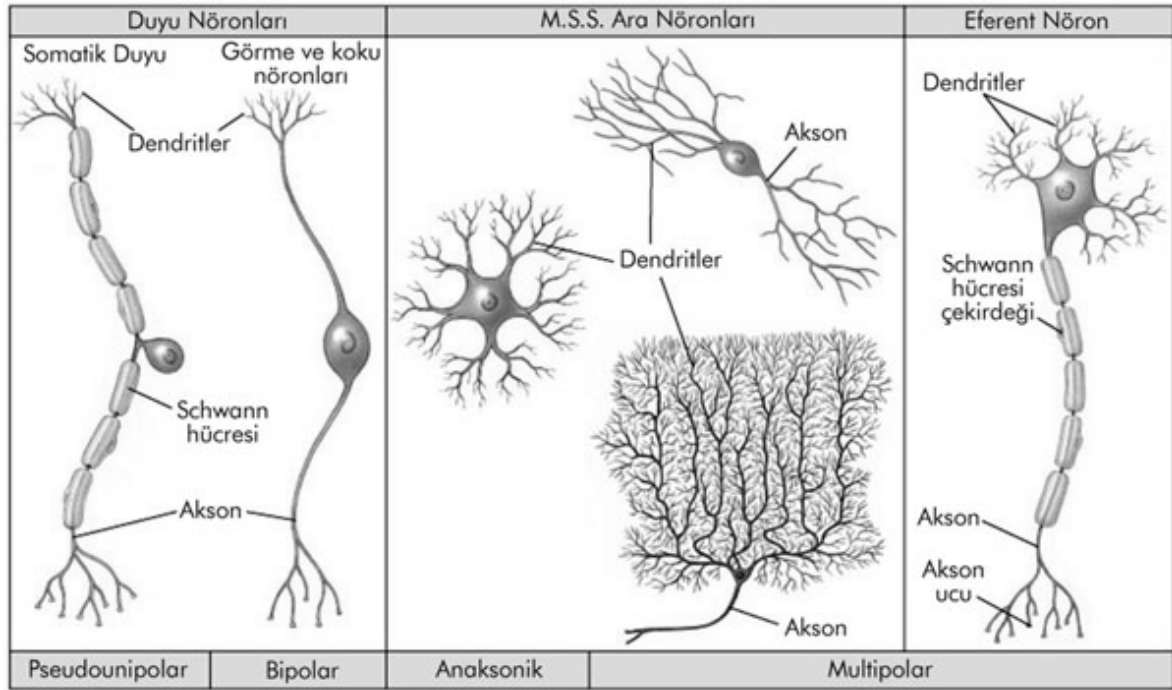
2.1.4 Miyelinsiz Lifler

Miyelinizasyonda, miyelin kılıfın kalınlığı Schwann hücreleri tarafından değil, akson çapı tarafından belirlenir⁷. Tek bir Schwann hücresi, eğer aksonun çapı 1 µm den küçükse birden fazla aksonu sararak miyelinsiz lifleri yaparlar. Ancak aksonun çapı 1-2 µm den büyükse bir tek aksonu defalarca sararak miyelinli lifleri yaparlar. Memelilerin sinir demetlerindeki miyelinsiz sinir lifleri, ince ve çapları 0,1-1,3 µm arasındadır. Miyelinli sinir lifleri ise daha kalındır ve çapları 1-20 µm arasında değişmektedir. Schwann hücre stoplazması miyelinli liflerde aksonu 1:1 oranında sararken bu oran miyelinsiz liflerde 1:1-1:18 olup çok miktarda aksonu sarar (Şekil 2.5). Miyelinli ve miyelinsiz akson aksoplazmalarının yapısal özellikleri birbirinden çok farklı değildir. Miyelinsiz aksonlar miyelinlilere göre daha fazla mikrotübül ihtiva eder^{4,7}. Miyelinsiz lifler karışık, otonomik ve duyu şeklinde olabilir, duyu sinirlerinin %75'ini ve motor sinirlerin de %50'sini oluştururlar¹⁵.

2.1.5 Periferik Sinirlerin Sınıflandırılması

Nöronlar morfolojik yapılarına göre unipolar-pseudounipolar, bipolar ya da multipolar olarak sınıflandırılmışlardır. PSS' de bulunan nöronlar ise afferent (duyusal), internöron (ara nöron ve efferent (motor) olarak ayrılırlar. Bu iki sınıflandırmanın yanı sıra işlev, çap, hız ve miyelinizasyon durumuna göre yapılmış değişik sınıflandırmalar vardır (Şekil 2.6)^{1-3,7,15}.

Erlanger ve Gasser adlı araştırmacılar sinir liflerini A, B, C gruplarına, A grubunu α , β , γ ve δ alt gruplarına, C grubunu da arka kök (drC) ve sempatik (sC) olarak ikiye ayırmıştır. Yapılan ileri araştırmalar harflerle tanımlanan lif unsurlarının homojen olmadığını göstermiş ve sayısal bir sistem de (Ia, Ib, II, III, IV) duyusal sinirleri tanımlamak için kullanılmıştır^{2,13}. A lifleri 2,5-22 µm çapları arasında, B lifleri ise ortalama 3 µm çapındadır. C lifleri ise 0,2-1,6 µm arasında çapa sahip olup miyelinli değildir. A liflerinde iletim en hızlı olup 100 m/s'lere ulaşabilmektedir. B lifleri miyelinli olmasına rağmen iletim hızı A liflerine göre çok daha yavaş olup genelde 3-5 m/s aralığındadır. A liflerine genelde somatik afferent ve efferent yollarda rastlanırken, B liflerine preganglionik otonomik yollarda rastlanır. C liflerinde ise ileti en yavaş olup bu tip liflere somatik afferent ve otonomik postganglionik efferent yollarda rastlanır^{13,21}.



Şekil 2.6 Sinir hücresi tipleri. Unipolar nöronlar genelde periferik sinir sisteminde duyu sinirleri olarak iş görmesine karşın multipolar nöronlar motor yanıtları taşıyan uzun sinirlerdir.

2.2 Periferik Sinir Yaralanmaları ve Sınıflandırılması

Periferik sinirler mekanik bir travmadan (bası, gerim, şiddet) etkilenebilecekleri gibi termal, iskemik ve kimyasal etkenler gibi çok farklı nedenler ile hasarlanırlar. Bu tip yaralanmalarda hayati tehlike pek olmasa da sonuçta kişinin fonksiyonlarını ileri derecede kısıtlayabilmesi, sosyoekonomik ve psikolojik durumunu etkileyebilmesi açısından birçok araştırmaya konu olmaktadır. Periferik sinir hasarı sonrası beklenen, iyileşmenin (fonksiyonel geri dönüş) en kısa sürede sağlanması ve iyileşme dönemi süresinin kısaltılmasıdır^{4,22,23}. Periferik sinirler, kendilerini saran bağ dokularından dolayı elastiktir ayrıca her bir lif önemli gerilme direnci olan uzunlamasına yerleşmiş kollajen fibrillerle çevrelenmiştir. Sinire uygulanan çekme veya bası gerilme direncinin üzerine çıkarsa yaralanma meydana gelir ve devamlılık ortadan kalkabilir ama lifin devamlılığı çoğu zaman korunur. Yaygın olarak görülen yaralanma türü, gerilme ve ezilme (crush) tipi yaralanmalardır. Sonucunda travmatik mononöropati gelişir^{24,25,26}.

Hücresinin iyileşmesi veya ortadan kaldırılması etkenin şiddet ve süresine bağlıdır. Kısa ve odaklı olarak uygulanan bir miktar basınç aksoplazmanın hücre elemanlarını sıkıştırır ve akson çapını azaltır. Bu hemen geri dönüşümlü değişikliktir distal akson dejenerasyonu ile ilgili değildir. Wallerian dejenerasyon olmaksızın iletim bloğu olan

bu tip sinir yaralanması **neurapraxia** olarak adlandırılır. Daha fazla basınçla akson ve miyelin kılıfın kesilerek lezyon bölgesinden ayrılmasına rağmen, siniri çevreleyen bazal lamina ve kollajenin devamlılığı sürebilir. Bu tip yaralanmalara **axonotmesis** denir, lezyon distalinde wallerian dejenerasyon gelişir. **Neurotmesis** tipi yaralanma ise sinirin bağlantılarının kesildiği ve tam bir fonksiyonel kaybın olduğu yaralanma tipidir. Bu tip yaralanmalarda aksonda büyümeyi yönlendirecek yapılar kaybolur ve skar dokusu gelişir. Cerrahi girişim yapılmadan genelde iyileşme meydana gelmez (Şekil 2.7)^{12,13,16,27}.

2.2.1 Wallerian Dejenerasyon

Sinir lifinin hasarlanmasından sonra (II-III-IV. derece yaralanma) aksonun distal kısmında düzenli bir anterograd dejenerasyon oluşmaya başlar. Bu ilkeler 1850 yılında fizyolog Agust Waller tarafından, kedinin fasial sinirini kestikten sonra ortaya konmuş ve ona izafeten “Wallerian Dejenerasyon” (WD) olarak ifade edilmektedir. Nöron ve liflerin organizasyonunda yeni ufuklar açan Waller’in gözlemlerinden somanın aksone “trofik” ya da besleyici destek sağladığı görüşü çıkmıştır. Dejenerasyonun seyri liflerin tipine, cinsine, yaşa ve lezyonun somaya uzaklığına göre değişir. WD’nin başlama süresi liflerin tipine göre farklılık gösterir. Akson çapı büyük ve kalın miyelinli liflerde 24 saat içinde başlar ve distale ilerleme hızı 250 mm/gün, ince miyelinli liflerde 45 saat sonra 46 mm/gün hızı ile başlar,

Sunderland	Seddon	Tanımlama	İyileşme	İyileşme Hızı	Cerrahi
I	Neurapraksi	Wallerian dejenerasyon olmaksızın geçici iletim bloğu	TAM	Hızlı	YOK
II	Aksonotmesis	Akson devamlılığı yok. Wallerian dejenerasyon var. Endonöryum sağlam	TAM	Yavaş 3 cm/ay 1-2 mm/gün	YOK
III		Wallerian dejenerasyon var. Akson ve endonöryum kesik fakat perinöryum sağlam	Değişken	Yavaş 3 cm/ay 1-2 mm/gün	Değişken
IV		Wallerian dejenerasyon var. Akson, endonöryum ve perinöryum kesik. Epinöryum sağlam.	YOK	YOK	VAR
V	Neurotmesis	Tam sinir kesisi. Tüm bağ doku elemanlarının devamlılığı ortadan kalkar	YOK	YOK	VAR

Şekil 2.7 Sunderland ve Seddon adlı araştırmacıların yapmış olduğu periferik sinir hasarlarının isimlendirilmesi ve derecelendirilmeleri. Ezilme (Crush) tipi yaralanmalar Aksonotmesis tipidir.

başka bir deyişle yavaş aksonal taşıma hızı ile uyumludur^{4,12}. Bütün bunlar motor sinirlerin dejenerasyon-rejenerasyon sürecinin, duysal sinirlere göre daha hızlı olduğunu düşündürmektedir. (Erken WD = Hızlı rejenerasyon)

WD birçok sinir yaralanması ve hastalığında sinir lifi yıkımı ve kaybının son ortak yoludur. WD periferik sinir sisteminde sonraki rejenerasyon dönemini hazırlaması açısından önemlidir¹².

2.2.2 Hasarın Distalinde Meydana Gelen Dejenerasyon

Hasarı takiben distal akson parçasında hücre iskeletinin granüler parçalanması ilk yapısal değişikliklerden biridir. Hücre aksoplazmasını oluşturan nörofilamentler ve mikrotübüller 24 saat içinde granüler ve amorf yıkıntılara dönüşür. Bunun sebebi aksonun trofik ya da besleyici kaynağı olan somadan ayrılmasıdır. Soma nöronunda protein sentezinin tek kaynağıdır ve akson, kendisine aksonal taşınım sistemleri ile iletilen materyallerle yaşatılır. Aksonun hızlı bozunması aynı zamanda bunun aktif bir olay olduğunu gösterir. Granüler parçalanma, aksonun kendi içinde endojen nötral proteazların Ca^{+2} konsantrasyonunun artmasıyla aktive olması sonucu tetiklenir. Ca^{+2} daki bu artış ekstrasellüler kaynaklı ya da akson içinde tutulan kalsiyum salınımından kaynaklanabilir.

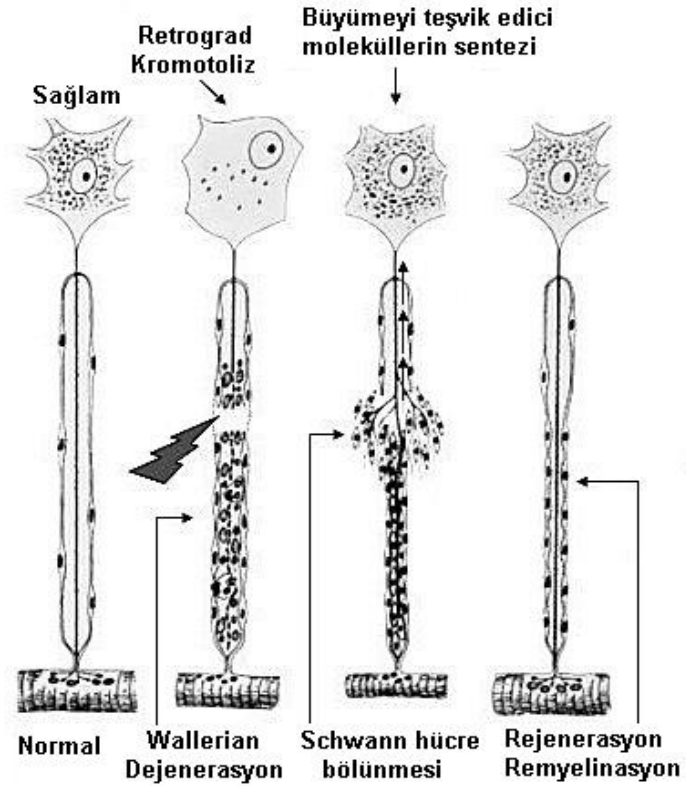
Hasardan ilk 12 saat sonra distal akson boyunca uzanan schwann hücrelerinin miyelin sentezinde belirgin bir azalma ve iki gün içerisinde ana miyelin proteinlerine ait mRNA içeriğinde belirgin bir düşüş görülür. Aksonda yıkımın başlamasıyla birlikte miyelin kılıfında da bir parçalanma ve dağılma ortaya çıkar. Miyelin kılıf internodal bölgeden başlamak üzere 6 ile 10 kısa segmente ayrılır ve yaklaşık 2-3 hafta içerisinde tamamen temizlenir. Schwann hücreleri mitoz ile bölünerek proliferasyona uğrar. Prolifere schwann hücreleri, parçalanmış sinir liflerinin nörolemması içinde kalır bu da aksonal rejenerasyon ve büyüme için uygun bir yer olan uzun schwann hücre bandı (Hanken-Büngner bandı) ile sonuçlanır. Aynı zamanda band içerisindeki yeni schwann hücreleri nöronal bir trofik etken olan NGF salmaya başlarlar (Şekil 2.8)^{4,12,28,29}.

2.2.3 Proksimalde ve Somada Meydana Gelen Dejenerasyon

Hasarlanmaya bağlı olarak, somada ve lezyonun proksimalinde meydana gelen değişiklikler, yaralanmanın şiddeti ve yaralı bölgenin somaya yakın veya uzak olması ile ilişkilidir. Distal uçtan anterograd olarak ilerleyen WD ile aynı zamanda, aksonun proksimal kısmında da retrograd dejenerasyon denen ve az bir segmentle (1. ranvier boğumuna kadar)

sınırlı olan değişimler gözlenir (Şekil 2.8). Proksimal kısımdaki akson çapında ve miyelin kalınlığında bir azalma, schwann hücrelerinde ise yapısal değişiklikler görülür^{4, 24-27,30}.

Hasarlanmayla beraber nöron soması ve çekirdek şişer yuvarlaklaşır, çekirdek 6 saat içinde merkezi konumunu kaybederek periferiye göç eder. Nissl cisimciklerinin bazofilik boyalarla boyanma özelliği ortadan kalkar, rengi açılır ve nöroplazmaya dağılır. Meydana gelen bu reaktif değişim olayına “retrograd chromatolysis” denir (Şekil 2.8). Somanın şişerek belirginleşmesi nöronal metabolizmada artmış sentez hızının bir göstergesidir. Bunun dışında, nöronun sinaptik bağlantıları da genellikle bozulur^{2,4,6,7,12,16,26,31,32}.



Şekil 2.8 Periferik sinirde wallerian dejenerasyon ve rejenerasyon süreçleri gösterilmektedir.

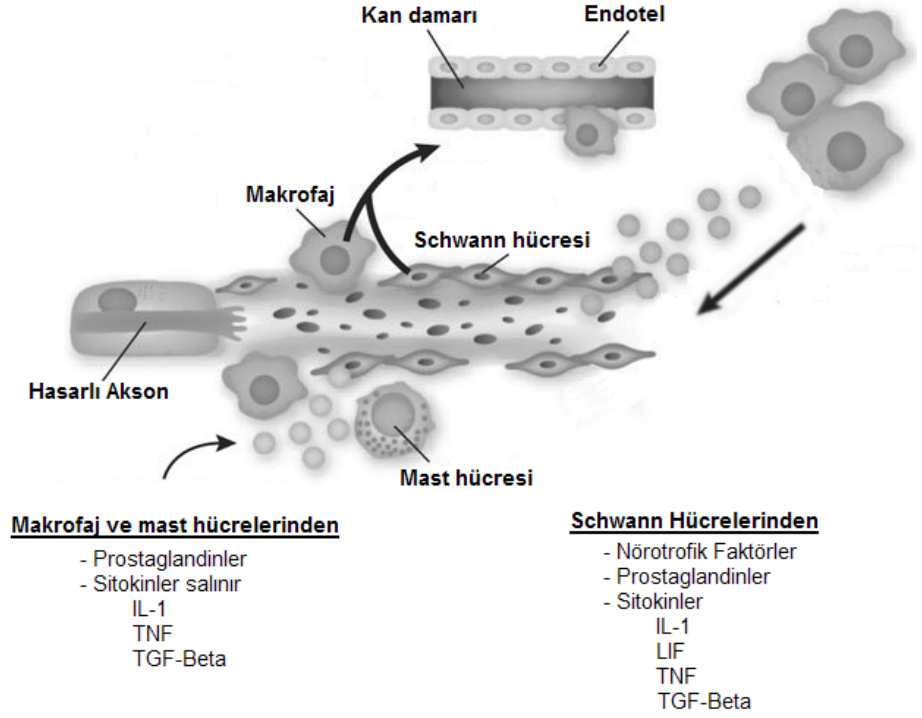
2.2.4 Makrofaj ve Diğer Fagositik Hücrelerin Rolü

Makrofajlar, WD ve aksonal rejenerasyonun birçok safhasında olayın yakın bir şekilde içindedir. Beuche ve Friede⁷⁸ adlı araştırmacıların yapmış olduğu önemli deneyde, sinir segmentleri, büyüklükleri makrofaj geçişine izin vermeyecek kadar küçük milipor bölmeler içine dejenere olmaya bırakıldığında, miyelin kalıntılarının haftalarca kaldığını gösterdiler. Makrofaj geçişine izin veren büyüklükte milipor bölmeler kullandıklarında ise ani miyelin temizlenmesi ile sonuçlandı^{77,78}.

Periferik sinirlerin çoğu endonöryum tabakasında bulunan damarların bazal laminası içinde ya da hemen dışında uzanan yerleşik bir makrofaj grubu içerir (tüm hücre popülasyonunun %2-9'u kadar). Yerleşik makrofajlar, schwann hücreleri ve diğer fagositik hücreler (Monosit ve Mast hücreleri gibi) hasarlanma sonrası miyelin kılıfın kaldırılmasına ne miktarları ne de fagositik özellikleri yeter. Hasarlanma sonrası ilk 2 gün içerisinde, kan dolaşımı yolu ile dalak ve karaciğer kaynaklı makrofajlar spesifik olarak dejenere olan liflere

infiltrate olurlar (Şekil 2.9). Asıl miyelin yıkımından sorumlu makrofaj popülasyonu dolaşım yolu ile lezyon bölgesine göç eden sistemik makrofajlardır^{12,29}.

İnfiltrate olan makrofajların fonksiyonu sadece miyelin kalıntıları fagosite etmek değildir, aynı zamanda nörotrofik önem taşıyan birçok sitokin ve diğer maddeleri de üretirler (Şekil 2.9). Örneğin, WD'deki makrofajlar bir sitokin olan interleukin-1 (IL-1) sentezlerler, IL-1'inde schwann



Şekil 2.9 Hasarlanmış bir sinirde makrofaj, schwann ve diğer fagositik hücrelerin fonksiyonları şematize edilmiştir. Makrofaj ve diğer hücrelerden büyüme teşvik edici moleküller salgılanmaktadır.

hücrelerinde NGF üretimini uyardığı gösterilmiştir³³. NGF, ilk ve en iyi tanımlanan sinir kökenli büyüme faktörüdür. NGF üretildiğinde, spesifik reseptörlerine bağlanarak sinir terminalleri tarafından alınır ve sinir hücre gövdesine retrograd aksonal transport yoluyla iletilir. NGF'nin embriyonik dorsal gangliyon nöronlarının, sempatik ve duyu nöronlarının gelişim ve yaşamını desteklediği rapor edilmiştir³⁴⁻³⁷.

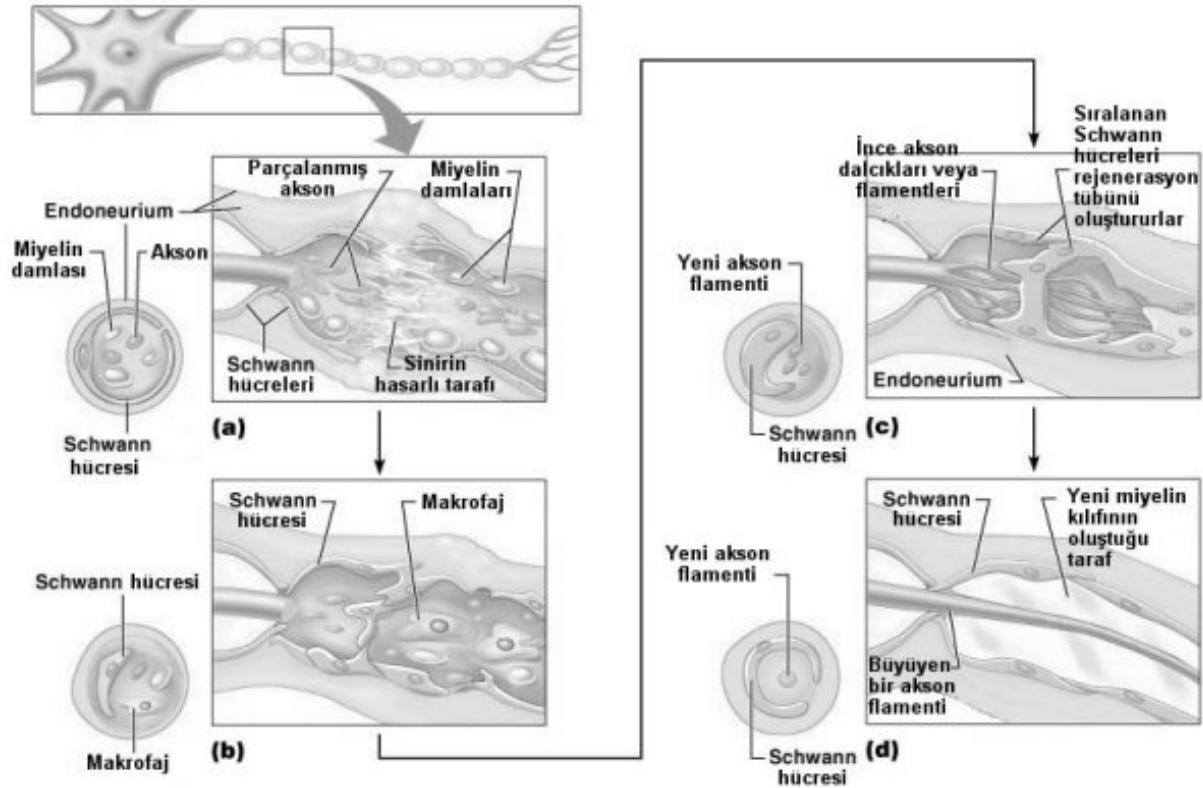
2.2.5 Nörotropik Faktörlerin Roller

Nörotropik faktörler, nöron ve aksonların yaşamını devam ettirmesi için ihtiyaç duyduğu bir polipeptid ailesidir. Embriyonik yaşam boyunca nöronların gelişim ve olgunlaşmalarına katkıda bulundukları ve sinir yaralanmalarından sonra da rejenerasyonu hızlandırdıkları bildirilmiştir. Nörotropik faktörler 3 ana gruba ayrılır. Birinci grup, NGF, BDNF, NT-3 ve NT-4/5'i içeren nörotropinlerdir. Bunlar trk ailesinin (trk A,B,C) tirozin kinaz reseptörlerine etki eden küçük temel polipeptidlerdir. İkinci grup, CNTF ve LIF'i içeren nörokinlerdir. Üçüncü grup ise, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 ve GDNF'yi de içeren TGF-β süper ailesidir³⁵. Örneğin reinnervasyonun erken döneminde, 14 günden sonra TGF-β süper

ailesinin etkisi gösterilmiş, fakat bu etki 6 haftadan sonra görülmemektedir. Bilinen yararlı etkileri ile birlikte, bugüne kadar yapılan çalışmalarda NGF ve diğer nörotropik maddelerin periferik sinir rejenerasyonundaki etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır^{35,38,39}.

2.2.6 Periferik Sinirlerde Rejenerasyon

Rejenerasyon süreci aksonun proksimaldeki sağlam kalan kısmından başlar, proksimal akson ucu hasarlanmadan birkaç gün içinde kalınlaşmaya başlar, bunlar akson tomurcukları olarak isimlendirilir. Bu tomurcuklardan daha sonra akson kolleteral filizcikleri gelişir. Akson uçları distale ulaştıklarında büngner bandlarının içine girerler. Bu band yolağı filizlenen aksonlara rejenerasyonda yol gösterici olarak hizmet eder. Akson filizleri bu yolaklar içinde periferik doğru ilerleyerek distal hedef organlarına ulaşırlar (Şekil 2.10c). Elbette ki bu olay her zaman böyle başarılı bir şekilde sonuçlanamayabilir. Yanlış yolağa girip, bandların dışına çıkan aksonlar dejenerasyona uğrar yerlerini fibröz bir doku alır. Aksonlar distal hedeflerine vardıklarında ise remiyelinizasyon süreci, schwann hücreleri tarafından lezyon bölgesinden başlamak üzere hedef organa doğru tamamlanır (Şekil 2.10d)^{4,12,16,31,40,41,42}.



Şekil 2.10 Periferik sinir yaralanmasından sonra gelişen süreçler. (a) Endonöral kılıf sağlam. Miyelin parçalanmış. (b) Makrofajlar miyelin artıklarını sindirirlerken Schwann hücreleri yeni hücreleri yapar ve bunlar sıralanarak Büngner bandını oluşturmaya başlarlar. (c) Yeni akson dalcıkları uzayıp Schwann hücreleri tarafından oluşturulan rejenerasyon tübünde ilerlerler. (d) Uzayan ve kalınlaşan akson dalcığı etrafında miyelin kılıfı oluşmaya başlar.

Değişik araştırmalara göre aksonal rejenerasyonun hızı farklı sinirlerde 1-5 mm/gün aralığında bildirilmektedir. Sinirlerin proksimal ucunda rejenerasyonun hızı distale göre daha hızlıdır çünkü lezyon bölgesi somaya ne kadar uzak mesafede ise, rejenerasyon hızı da o kadar düşük olmaktadır. Rejenerasyon hızını sinir liflerinin tipi, büyüklüğü, sinir kökleri ve yaş gibi başka nedenlerde etkilemektedir.

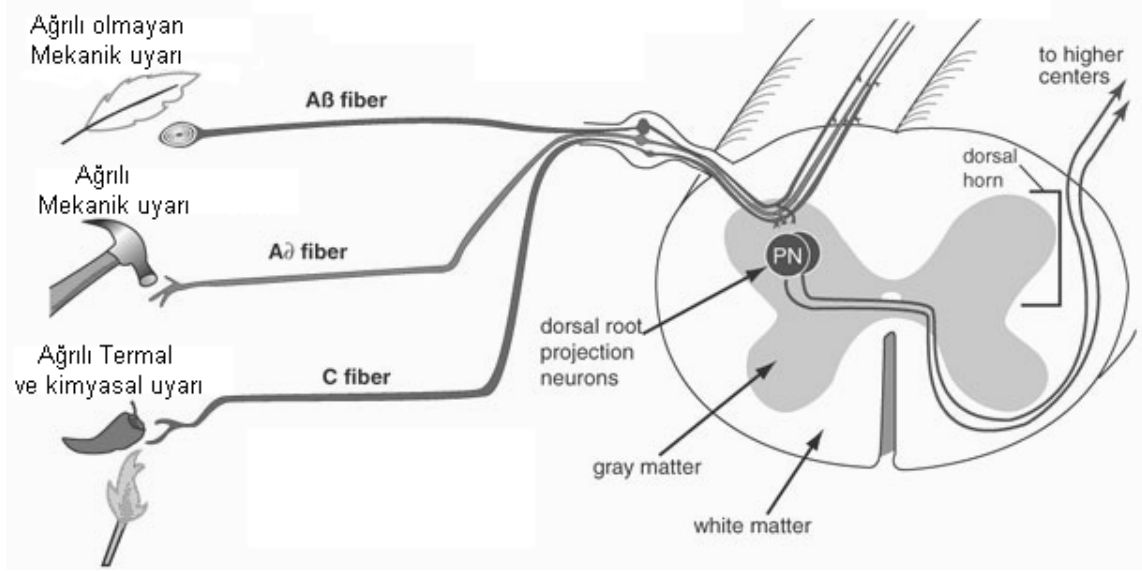
Günümüz imkânları ile rejenerasyonun başarısının değerlendirilmesinde, reinervasyonun ölçülmesi ve fonksiyonların geriye dönmesine göre karar verilir. Morfolojik ve fonksiyonel olarak rejenerasyonun başarısı rejenere-reinnerve olan aksonun sayısı, çapı ve miyelinizasyonun derecesine bağlıdır. Her ne kadar başarılı bir dejenerasyon-rejenerasyon sürecinden sonra distal hedef organla tekrar bağlantı sağlanabilmiş olsa da rejenere olmuş miyelinli sinirler uzun süre anormal özelliklerini devam ettirirler. Başarılı bir reinnervasyondan sonra akson tekrar normal kalınlığına yaklaşır; fakat büyük sinir liflerindeki miyelin kılıfları akson çaplarına göre rölatif olarak ince kalır ve yeni oluşan internodal aralıklar kısadır^{4,12,43-45}.

2.2.7 Travmatik Nöropati ve Ağrı

Deneyisel olarak oluşturulan travmatik sinir hasarı sonrasındaki dejenerasyon-rejenerasyon sürecinde motor ve duysal (miyelinli, miyelinsiz) sinirlerin gelişiminin değerlendirilmesi amacıyla çeşitli testler kullanılmaktadır. Miyelinsiz duysal sinirlerdeki (C lifleri) işlev değişiklikleri termal plantar test ile değerlendirilebilmektedir. Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (IASP) Taksonomi Komitesi tarafından yapılan tanımlamaya göre ağrı; “Vücudun belli bir bölgesinden kaynaklanan, doku harabiyetine bağlı olan veya olmayan, kişinin geçmişteki deneyimleriyle de ilgili, hoş olmayan emosyonel bir durumdur, davranış şeklidir”. Nosisepsiyon ise; doku hasarı oluşturabilen stimülüsler ile özellikle ağrılı uyaranlara karşı duyarlı, sinir sisteminde nosiseptör denilen reseptörlerde oluşturulan bir aktivitedir. Ağrı, nosisepsiyonun algılanmasıdır

Nosiseptörlerin çoğu ısı, mekanik ve kimyasal doku hasarını algılayan serbest sinir uçlarıdır. Sinir uçları miyelinsiz C lifleri ile miyelinli A-delta liflerinin son uçlarından oluşur. Miyelinli A-delta lifleri hızlı ileten liflerdir (20 m/s). İnce uçlu forseps ve iğne gibi alet uyarılarına hassastırlar, mekanik uyarının yanı sıra az da olsa termal uyaranlara da yanıt verir (Şekil 2.11). C liflerinin iletim hızı ise yaklaşık 2 m/s' dir. C lifleri polimodal özellik gösterirler, yani sadece aşırı sıcak ve soğuk uyaranlara değil, kimyasal uyaranlara da

duyarlıdırlar. Bu yavaş iletimli lifler künt, yaygın bir ağrı ve hiperestezi (duysal liflerin ağrılı uyarana karşı aşırı duyarlılığı) oluştururlar.



Şekil 2.11 Ağrı algılanmasında rol alan duysal lifler.

Ağrı ve reseptör ilişkisi yalnızca uyarı ve algılama düzeyinde kalmamakta, birçok çevresel etken işin içine girmektedir. İnflamatuar sürecin bir parçası olarak, tahrip olan bölgelerde makrofaj, lenfosit ve mast hücrelerinden çeşitli intrasellüler maddeler salgılanır. Nosiseptif uyarının kendisi de nörojenik bir inflamasyon cevabı oluşturarak sinir uçlarından P maddesi, nörokinin A salgılanmasına yol açar. Bu peptidlerin salgılanması duysal ve sempatik sinir liflerinde uyarılmada değişiklik, vazodilatasyon, plazma proteinlerinin ekstrasvasyonu ve inflammatuar hücrelerin çeşitli kimyasal mediatörler salgılamasına yol açar. Bu şekilde potasyum, serotonin, nitrik oksit, siklooksijenaz ve lipoksijenaz yollarındaki inflammatuar mediatörlerin salgılanması yüksek eşik değerdeki nosiseptörleri uyarak periferik sensitizasyon denen olayı meydana getirirler. Sensitizasyondan sonra düşük şiddetteki mekanik uyarılar normalde ağrıya yol açmazken, ağrılı olarak algılanmaya başlarlar (Mekanik allodini). Aynı biçimde hasar bölgesinde termal uyarılara karşı yanıtta da artış meydana gelir (Primer Hiperaleji).

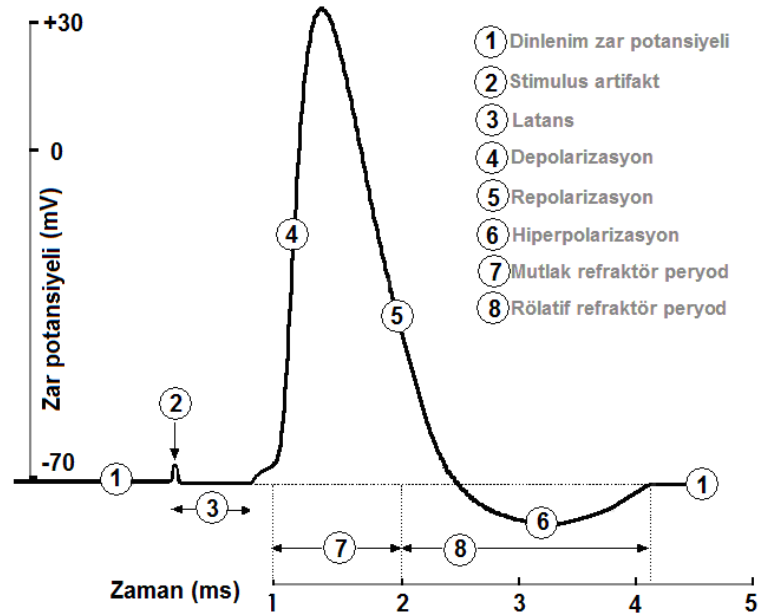
2.3 Periferik Sinirlerin Elektriksel Özellikleri

2.3.1 Uyarılabilirlik ve Aksiyon Potansiyeli

Her hücre için dinlenim zar potansiyelinin (DZP) kritik bir değeri vardır. Sinir hücreleri çevresel değişikliklere, hücre zarlarının iç ve dış yüzeyleri arasında mevcut olan elektriksel potansiyel farklarını değiştirerek yanıt verirler. Bu özelliğe sahip olan hücreler (nöronlar, kas hücreleri ve bazı bez hücreleri gibi) uyarılabilir olarak adlandırılırlar. Sinir ve kas hücreleri uygun bir uyarı ile uyarıldıklarında DZP de geçici ani bir değişiklik olur. Bu değişim belirli bir eşik değeri aşarsa, zar boyunca yayılabilen bu potansiyel değişikliği ile organlar arasında hızlı bir enformasyon iletimi sağlanır. Sinir lifi boyunca iletilen enformasyonun temel lisansı olan ve tek bir aksonda kayıtlanan bu potansiyel değişikliğine Aksiyon Potansiyeli (AP) adı verilir. Farklı uyarılabilir hücrelerde, DZP -60 ile -90 mV arasında, AP tepe değeri de +20 ile +50 mV arasında, AP süresi ise 0,5 ms ile 500 ms arasında değişir. Tipik bir periferik sinir aksonunda DZP -70 mV ve AP tepe değeri +30 mV düzeyindedir^{1-5,7,8,13}.

Akson zarı üzerinde bulunan Na^+/K^+ ATPaz pompası ile pasif (sızıntı) kanalları DZP'ni -70 mV düzeyinde tutarlar. Başka bir deyişle hücre içi dışına göre negatiftir, yani polarize durumdadır. Negatif dinlenim potansiyelinin; pozitif tepe değerine doğru artmasına **de-polarizasyon**, tepe değerinden yeniden negatif potansiyele dönmesine **re-polarizasyon** denir. **Hiperpolarizasyon** ise zar potansiyelinin DZP'den daha da negatif değere düşmesidir.

Soma ve dendritlerde oluşan postsinaptik potansiyellerin toplamı; voltaj bağımlı Na^+ kanallarının yoğun olduğu akson tetikleme (trigger zone) bölgesinde, AP'nin depolarizasyon fazını başlatacak kadar büyük ise, Na^+ kanalları hızlı bir şekilde açılır ve hücre zarında Na^+



Şekil 2.12 Periferik bir sinirden kayıtlanan Aksiyon Potansiyeli ve evreleri gösterilmiştir.

geçirgenliği artar. Na^+ elektrokimyasal gradiyentinden dolayı hücre içine girer. Bu süreç kendi kendini besleyen rejeneratif bir süreçtir (pozitif geribesleme: açılan Na^+ kanallarından daha fazla Na^+ hücre içine girer, zar daha fazla depolarize olur ve bunun sonucunda daha fazla Na^+ kanalının açılır). Bu olay bütün Na^+ kanalları açılincaya kadar devam eder. Depolarizasyon fazında gelişen bu pozitif geri-beslemeli süreç; Na^+ kanallarının inaktivasyon kapılarının kapanması ve voltaj bağımlı K^+ kanallarının açılması ile engellenir. Na^+ kanallarının inaktive olması hücre içine Na^+ girişini durdururken, K^+ kanalları da K^+ iyonlarını hücre dışına atarak hücre içi potansiyeli dinlenim seviyesine doğru çeker. Bu evreye repolarizasyon evresi denir. İnaktive olan Na^+ kanalları, dinlenim potansiyeline yakın bir değere kadar, yeniden açılacak kapalı pozisyonlarına gelemmezler. K^+ kanallarının geç kapanması veya K^+ çıkışının Na^+ girişine göre daha uzun sürmesi nedeni ile zar potansiyeli dinlenim değerinin de altına düşer. Hiperpolarizasyon olarak adlandırılan bu durum Na^+/K^+ ATPaz pompası tarafından yavaş bir şekilde tekrar düzeltilir (Şekil 2.12).

İlk AP'nin oluşmasından sonra ikinci bir AP'nin en kuvvetli bir uyararla bile oluşturulmadığı, evreye *mutlak refraktör dönem* denir. Uygulanan voltaj ne olursa olsun halen birçok Na^+ kanalı inaktif durumda olduğundan açılmazlar ve AP oluşmaz. Bu dönemden hemen sonra ancak ilk uyarandan daha şiddetli ikinci bir uyararla AP oluşabilir. Bu evreye de *rölatif refraktör dönem* denir (Şekil 2.12)^{1-5,13,46,47}.

Bir siniri oluşturan lifler, gerek çap gerek miyelin kalınlığı açısından büyük ölçüde farklılık gösterirler. Tüm liflerde iletim mekanizmaları birbirine benzese de, yapısal farklılıkları nedeni ile iletim hızı, eşik potansiyel gibi iletimle ilgili işlevsel parametreler açısından birbirinden farklıdır. Bir sinir demetinde binlerce miyelinli ve miyelinsiz akson bulunmaktadır. Sinir demetini oluşturan her bir aksonun bireysel AP'nin katkıları ile ortaya çıkan elektriksel aktiviteye “Bileşik Aksiyon Potansiyeli” denir (BAP)¹³.

2.3.2 İyon Kanalları

Sinir hücresi, hücre için yapısal bütünlük sağlayan ve hücre-içi ve hücre-dışı iyonik ortamı düzenleyen hücre zarı ile sınırlanmıştır. İyon kanallarının hepsi zarı her iki yönde aşan içsel (integral) proteinlerdir. Sinir hücre zarları, diğer hücrelerde olduğu gibi çok sayıda birbirinden farklı iyon kanalı tipi içerir. Bunlardan bazıları pasiftir, yani hep açık olan sızıntı kanallarıdır buna karşın diğerleri aktif kanallar olup voltaj-kapılı ve ligand-kapılıdır. Bu kanalların, ve özellikle voltaj-kapılı Na^+ ve K^+ kanallarının davranışı sinirlerdeki elektriksel olayları açıklar^{1,2,5,13}. Periferik sinir sisteminde AP lerin iletilmesinde miyelin yapı oldukça

önemlidir ve bugüne kadar uygun işaretleyicilerle yapılan çalışmalarda AP oluşumuna katılan çok çeşitli tipte ve farklı bölgelerde lokalize iyon kanalları ortaya çıkarılmıştır.

2.3.2.1 Voltaj-kapılı Na⁺ Kanalları

Voltaj-kapılı Na⁺ kanalları birçok uyarılabilir hücrede AP' nin başlatılmasından ve yayılmasından sorumludur. Bu kanallar paralitik ve öldürücü etkileri olan tetrodoksine (TTX) ve saksitoksine (STX) ile spesifik olarak bloklanabilmekte ve bu iki toksik maddenin molekülleri radyoaktif izotoplarla işaretlenerek birim alandaki Na⁺ kanalları sayılabilmektedir. STX bağlama yöntemi ile daha önce yapılan çalışmalarda ranvier düğümlerinde ki Na⁺ kanal yoğunluğu 12000 / μm^2 , internodal bölgede ise <25 / μm^2 olarak belirtilmiş olsa da daha sonra yapılan patch-clamp, voltaj-klamp ve immunohistolojik çalışmalarda voltaj-kapılı Na⁺ kanalları ranvier düğümlerinde yüksek yoğunlukta 1300 / μm^2 , miyelin kılıf altındaki internodal bölgede çok düşük yoğunlukta bulunduğu gözlenmiştir (75-150 / μm^2). Miyelinsiz liflerde ise akson zarında Na⁺ kanalları az sayıda ve homojen dağılmıştır (110/ μm^2)^{2,10,13,47-50}.

Moleküler ve genetik araştırmalarda memelilerde en az 10 farklı gen tarafından kodlanan voltaj-kapılı Na⁺ kanalı olduğu bildirilmektedir. Bu kanalların hepsinde bir alfa ünitesi (4 ayrı polipeptid zinciri ve her zincirde 6 transmembran protein bulunur) ve 2 beta ünitesinden oluşmuştur. Alfa ünitesini oluşturan aminoasit dizilimi farklılık gösterdiğinden Na⁺ kanalları da farklılık göstermektedir. Günümüzde Na⁺ kanalları “Na_vx” formatı temel alınarak isimlendirilirler ve şimdiye kadar 17 izoformu belirlenmiş bu kanallar Na_v1 ile Na_v9 arasında adlandırılmıştır^{51,52}.

Voltaj-kapılı Na⁺ kanal alt tipleri dokularda homojen dağılmamıştır. Bazı dokularda alt tiplerden bazıları baskın olarak bulunurken bazı alt tipleri o dokuda hiç bulunmamaktadır. Bu dağılım dokunun elektrofizyolojik özelliklerini değiştirerek dokular, hatta aynı hücrenin bölgeleri arasında farklılıklara yol açmaktadır. Na_v1.1, 1.2, 1.3, 1.6 baskın olarak MSS'de bulunmasına karşın, Na_v1.4, 1.5 kalp ve iskelet kasları dışında bulunmamaktadır⁵¹. Gelişimin erken evrelerinde ve sinir rejenerasyonu sırasında normal zamanda baskın olarak bulunan kanal tiplerinin yanında başka tip kanallarda ortaya çıkmaktadır. Örneğin Na_v1.6 hem PSS hem de MSS'de ranvier düğümlerinde baskın bulunan kanallardır. Gelişimin erken dönemlerinde ranvier düğümlerinde baskın bulunan kanal tipi Na_v1.2 olup maturasyonla yerini Na_v1.6 ya bırakır, aynı şekilde miyelin hasarı sonrasında Na_v1.2 tipi baskın hale geçer ve rejenerasyonun ilerlemesi ile Na_v1.6 tekrar baskın hale geçmeye başlar. Ayrıca dejenerasyon-rejenerasyon sürecinde ranvier düğümlerindeki Na⁺ kanal yoğunluğu azalarak

(25 / μm^2) akson boyunca dağılmaktadır. Miyelin kılıfın tam olarak tekrar oluşması ile tekrar düğümlerdeki yerini almaktadırlar⁵².

2.3.2.2 Yavaş Na^+ Akımları ve Gecikmiş Depolarizasyon

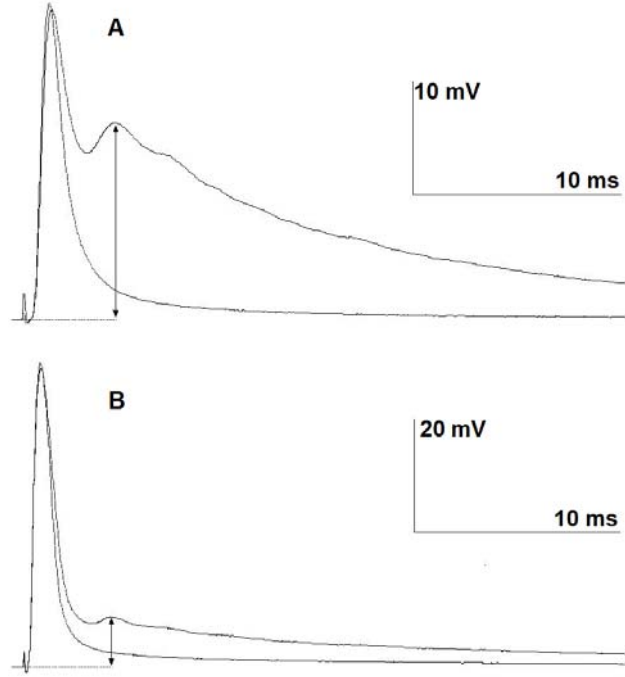
DRG ve kutanöz duyuşal sinir liflerinde (sural sinir) yapılan çalışmalarda farmakolojik ve kinetik olarak birbirinden farklı olan en az 3 tip Na^+ kanal akımları (hızlı ve yavaş) gösterilmiştir. 4-Ap hızlı kinetikli

voltaj-kapılı K^+ kanallarını bloklamak için kullanılmaktadır ve 4-Ap etkisinde bırakılan bazı sinirlerde aksiyon potansiyelini takiben bazı depolarizasyonlar ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.13). Buna gecikmiş

depolarizasyon adı verilmiştir. Bu durum ilk defa sural sinirde miyelinli kutanöz afferent nöronların gövde ve aksonlarında belirlenmiştir, ancak ventral rotlarda, motor aksonlarda ve kas afferent liflerde gecikmiş depolarizasyonlar görülmemektedir.

Daha sonraki çalışmalarda gecikmiş depolarizasyonların nedeninin yavaş kinetikli Na^+ kanallarından

kaynaklandığı anlaşılmıştır⁵³⁻⁶⁰. Yavaş kinetikli Na^+ kanal akımlarından kaynaklanan gecikmiş depolarizasyon (delayed depolarization: del-dep), sinir rejenerasyonunun ilerlemesi ile genliğinde bir düşme gözlenir. Del-dep genliğinin BAP genliğine oranı (Del-dep/BAP) miyelinizasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir.

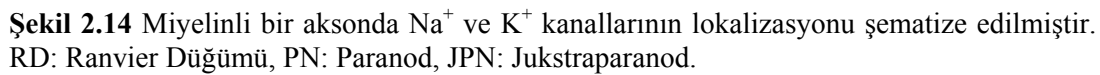


Şekil 2.13 Sağlam sinirlerden kayıtlanan aksiyon potansiyelleri ve gecikmiş depolarizasyonlar. **A)** 4-Ap sonrası Sural sinirden, **B)** Tibial sinirden kaydedilmiştir (çift yönlü ok).

2.3.2.3 Voltaj-kapılı K^+ Kanalları

Memeli miyelinli aksonların K^+ kanal organizasyonunu belirlemek için ligand ve morfolojik işaretleyicilerle yapılan bir dizi elektrofizyolojik çalışmalar ile çeşitli tipte K^+ kanalının varlığı gösterilmiştir. Hızlı aktive olan K^+ kanallarını bloklayan 4-Ap ve yavaş kinetikli K^+ kanallarını bloklayan TEA adlı farmakolojik ajanlar bu çalışmalarda oldukça

Kinetik olarak hızlı olan 4-Ap duyarlı K^+ kanalları internodal (juxtraparanodal) dağılım gösterirler. Deneysel olarak demiyelinize veya rejenerasyonunu tam olarak henüz tamamlamamış aksonlar üzerine 4-Ap ile yapılan deneyler; 4-Ap'nin AP'nin süresi üzerine etkisinin miyelin tabakanın tekrar oluşmasından sonraki etkisinden çok daha büyük olduğunu göstermiştir⁵⁰. Bu bulgu 4-Ap duyarlı ve hızlı kinetik gösteren K^+ kanallarının internodal lokalizasyon gösterdiği veya miyelin kılıf tarafından örtüldüğünün önemli bir kanıtı sayılmıştır (Şekil 2.13). Özetle söylemek gerekirse, miyelin tabaka oluştukça 4-Ap' ye olan duyarlılık azalmaktadır bu da miyelinizasyonun geliştiğinin bir göstergesidir.



Sinir demetlerinin yüksek uyarım frekansları ile uyarılmasının (100 Hz gibi) HAP'ların ortaya çıkmasına neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. HAP'ın yüksek frekanslı uyarımlara karşı sinirin kendisini koruma veya uyum için geliştirdiği bir oluşum olduğu düşünülmekte, fakat altında yatan mekanizma için farklı görüşler ortaya

sürülmektedir. HAP oluşumuna Na^+/K^+ ATPaz pompasının katkısı göz ardı edilmezken, yavaş K^+ kanallarının, Na^+ -bağımlı K^+ iletiminin ve Ca^{+2} aktive olan K^+ kanallarının da bu oluşuma katkı sağlayabileceği ileri sürülmektedir^{43,44,83-86}.

2.4 Manyetik Alan

2.4.1 Genel Bilgi

İçerisinden elektrik akımı geçen bir iletkenin etrafında elektromanyetik alan (EMA) meydana gelir. Günümüzde EMA oluşturan kaynaklar arasında radarlar, mobil telefonlar, radyo ve televizyon vericileri, tıbbi ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan çeşitli aletler, yüksek gerilim hatları, mikrodalga fırınlar, elektrikli ev aletleri bulunmaktadır. EMA'lar madde içine nüfuz edip cismi oluşturan atom ya da moleküllerden elektron koparabilme yeteneklerine göre iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan veya şiddeti zamanla değişmiyorsa DC manyetik alan, değişiyorsa AC manyetik alan olarak tanımlanabilir. EMA'nın birimi gauss (G) veya tesla'dır (T). EMA'lar 0 Hz ile 10^{22} Hz arasında çok geniş bir frekans aralığına sahiptir. Bu geniş spektrum aralığındaki EMA'nın sadece 0 ile 300 Hz arasındaki çok düşük şiddetteki (ELF: Extremely Low Frequencies) EMA'lar tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Bu tür çalışmalarda genellikle puls trenleri şeklinde (akımın şiddeti ve süresi ayarlanmak suretiyle) EMA uygulanmaktadır (t-PEMA). Bu özelliklere sahip PEMA'lar içinde demir çekirdek olan bobinler, selonoidler veya bir çift Helmholtz halkasından AC akım geçirilerek deneysel olarak meydana getirilir.

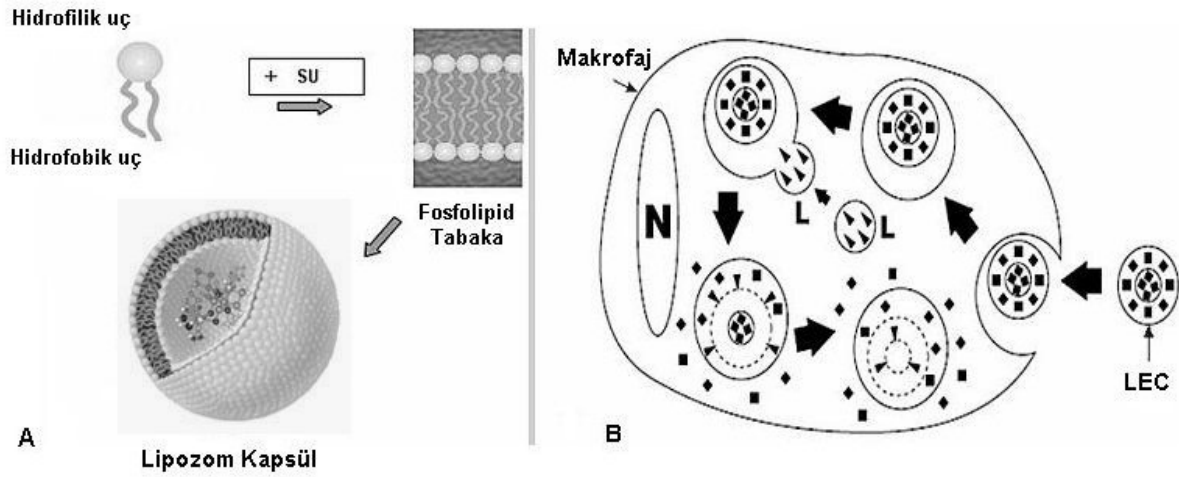
2.4.2 PEMA'nın Sinir Rejenerasyonuna Olası Etkileri

Çok düşük frekanslı elektromanyetik alanların biyolojik sistemler üzerindeki etkileri son yıllarda üzerinde oldukça durulan bir konu olmuştur. Buna rağmen tartışmaların devam etmesinin en önemli nedeni bu alanların canlı organizmalarla olan etkileşiminin hücre ve doku düzeyindeki mekanizmasının henüz tam belirlenememiş olmasıdır^{61,62}. Birçok temel çalışmada PEMA'nın; endokrin ve immün sistemi etkileyerek sinir rejenerasyonunu arttırabileceği görüşü ileri sürülmüştür. PEMA'nın bu tedavi edici etkisinin altında yatan mekanizmayı da şu şekilde açıklamaya çalışmışlardır: PEMA uygulaması; lökosit, sitokin, büyüme faktörleri, osteoblastlar gibi hücre ve moleküllerin performansını etkileyerek yaptığını, diğer bir görüşe göre de PEMA'nın hücre endotel duvarında vazokonstriksiyon/vazodilatasyon yaparak, fagositik aktiviteyi, hücre proliferasyonunu ve hücresel iletişimi etkileyerek iyileşmeyi hızlandırdığını ileri sürmüşlerdir⁶²⁻⁶⁴.

Literatürde sıçanlarda yapılan ezilme tipi yaralanma sonrasında PEMA uygulamasının siyatik sinir rejenerasyonunu ve fonksiyonel geri dönüşü %22 oranında hızlandırdığı gösteren çalışmalar vardır^{65,66,68}. Bir diğer çalışmada ise siyatik sinir kesisi yapılan sıçanlara, PEMA uygulaması sonucu ilk 6-72 saat içinde NGF ve benzeri tropik faktörlerin seviyesinin arttığı böylelikle rejenerasyonu hızlandırabileceği ileri sürülmüştür⁶⁷.

2.5 Clodronate ve Spesifik Makrofaj Baskılanması

Yaralanma sonrası (sinir ezilmesi-crush, diyabet, bası-travma vb) hasar görmüş sinir demeti ile yerleşik makrofajlar ve kan yoluyla gelen sistemik makrofajlar arasında aktif iletişim meydana gelir. Makrofajlar ve schwann hücreleri dejenere olan aksonları ve miyelin tabakasını 1-2 hafta içerisinde fagosit ederek ortadan kaldırırlar. Daha önce yapılan birçok çalışmada PEMA'nın rejenerasyonu hızlandırmasının altında yatan olası sebebin immün sistemi aktive ederek makrofaj aktivitesini arttırması olduğu görüşü ileri sürülmüştür. Bu hipotezi test edebilmek için çalışmamızda makrofajlara özgü baskılayıcı bir ajan olan lipozom ile kaplanmış Clodronate'in (LEC: Liposome Encapsulated Clodronate) periferik sinir hasarı sonrası rejenerasyon sürecine etkisinin araştırılması amaçlandı. LEC periferik makrofajların sayısını azaltırken diğer hücreleri etkilememektedir (Şekil 2.15)⁶⁹.



2.5.1 Clodronate'in Lipozomla Kaplanması (LEC)

Lipozomlar, iki sıralı (bilayer) fosfolipit (ör. Phosphatidylcholine) moleküllerinden yapay olarak oluşturulan tek veya çok katmanlı, çapları 1-10 µm arasında değişen

küreciklerdir. Lipozom küreciklerinin iç ve dış ortamları su molekülleri tarafından sarılı durumdadır (Şekil 2.15). Hidrofilik moleküllerin (ör Clodranate gibi) sulu çözeltileri ve fosfolipit molekülleri aynı ortamda bulunduğunda oluşan lipozom kesecikleri içinde ilgili molekül de hapsolür (enkapsulasyon). Lipozom kesecikleri hücre içine endositoz yolu ile alınır ve lizozomal fosfolipazlar tarafından parçalanır. Bu sırada lipozom kesecikleri içindeki moleküller de hücre içine salınır. Bu şekilde, hücre zarından geçemeyen veya hücreler tarafından alınmayan moleküller lipozomlar aracılığı ile hücre içine taşınmış olur (Şekil 2.15)⁶⁹⁻⁷¹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışmalarımızda, Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından (TIBDAM) üretilen ve 8 haftalıktan büyük, ağırlıkları 220-260 gram arasında olan 111 adet Wistar türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar standart kafeslerde serbestçe beslendi, gece-gündüz ritmi, ortam 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılarak sağlandı ve ortam sıcaklığı 22-25 °C, rölatif nemi % 40-60 olacak şekilde tutuldu.

Çizelge 3.1 Deney grupları. Elektrofizyolojik deneylerde 66 adet sıçan kullanıldı. Histolojik çalışmalarda ise 45 adet sıçan kullanıldı. Fonksiyon testleri (FT), elektrofizyoloji ve histoloji deneylerinde kullanılan hayvanlarda yapıldığı için ek hayvan kullanılmadı. Tüm deneylerde toplam 111 adet sıçan kullanıldı.

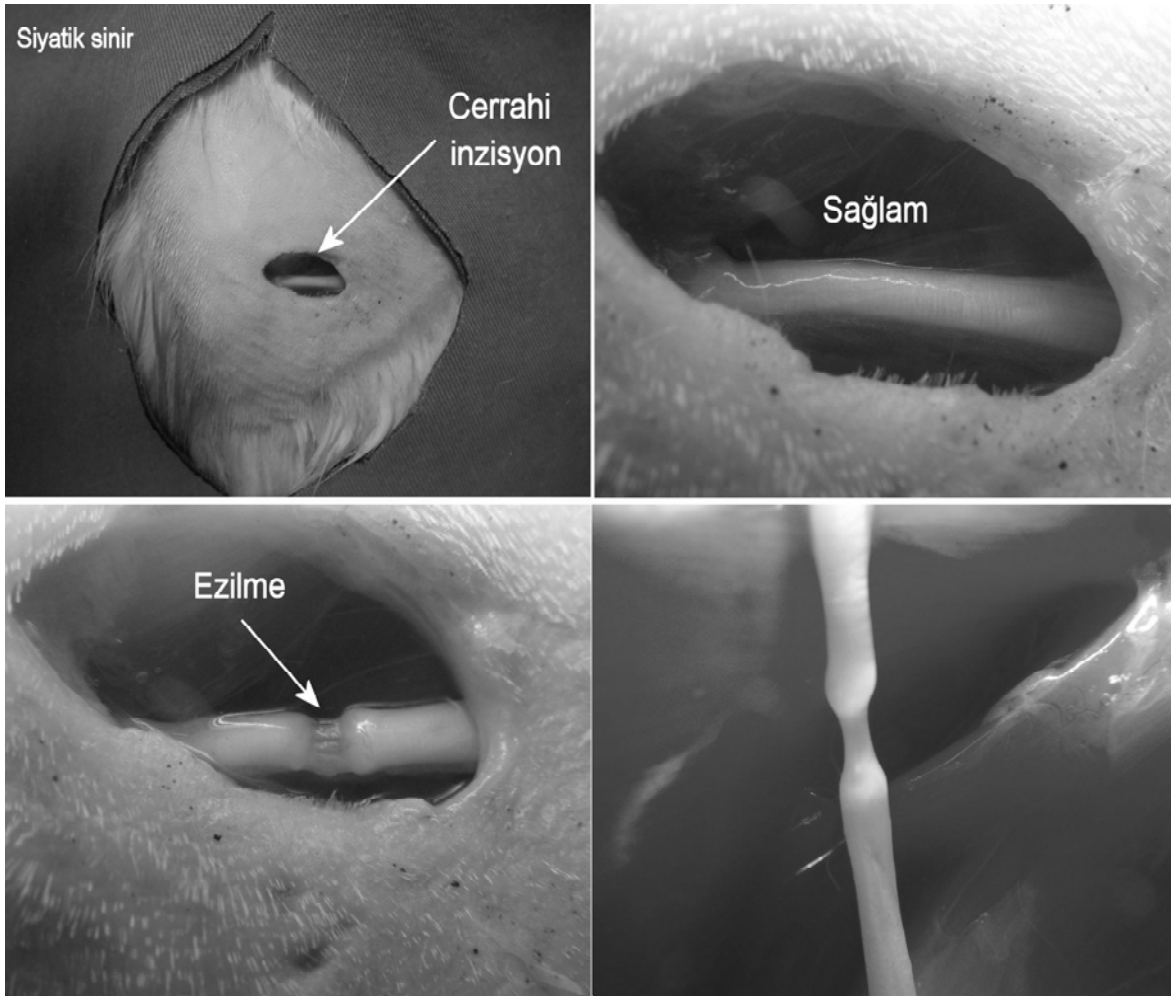
		Elektrofizyoloji				FT	Histoloji					
		Tibial		Sural			Tibial		Sural		Siyatik	
		Sağlam	Ezilme	Sağlam	Ezilme		Sağlam	Ezilme	Sağlam	Ezilme	Sağlam	Ezilme
Kontrol		10	-	10*	-	-	4	-	4*	-	2	-
2 hafta	Ezilme	7*	7	7*	7	-	4*	4	4*	4	-	2
	PMA	7*	7	7*	7	-	4*	4	4*	4	-	2
	LEC	7*	7	7*	7	-	4*	4	4*	4	-	2
	KOM	7*	7	7*	7	-	4*	4	4*	4	-	2
4 hafta	Ezilme	7*	7	7*	7	-	4*	4	4*	4	-	2
	PMA	7*	7	7*	7	-	4*	4	4*	4	-	2
	LEC	7*	7	7*	7	-	4*	4	4*	4	-	2
	KOM	7*	7	7*	7	-	4*	4	4*	4	-	2

Deney hayvanları öncelikle kontrol, 2. ve 4. hafta grubu olmak üzere 3 ana gruba ayrıldı. Kontrol grubu hayvanlarına hiçbir uygulama yapılmadı. 2. ve 4. hafta grubu olan sıçanlar kendi içinde 4 farklı gruba (Ezilme, PMA, LEC ve Kombine grup) ayrılarak sağ siyatik sinirleri standart bir fine forceps yardımıyla ezilerek ezilme tipi (crush) travmatik mononöropati modeli oluşturuldu (Çizelge 3.1). Sol bacak siyatik sinirlerinde hiçbir cerrahi girişim yapılmadan kontrol amaçlı bırakıldı. Tüm gruplardaki sıçanlar üzerinde belirlenen deney günlerinde elektrofizyolojik, fonksiyon, ve histolojik testler yapıldı. Sukroz-gap yöntemi ile sağ siyatik sinirleri ezilmiş sıçanların tibial ve sural sinirlerinde tonik ve fazik BAP kayıtları alındıktan sonra, önce 4-Ap (2 mM) sonra TEA (10 mM) uygulaması yapıp BAP kayıtları tekrar aynı protokolle alındı.

3.2 Cerrahi Yöntemler

3.2.1 Travmatik Nöropati oluşturma yöntemi (Ezilme-Crush)

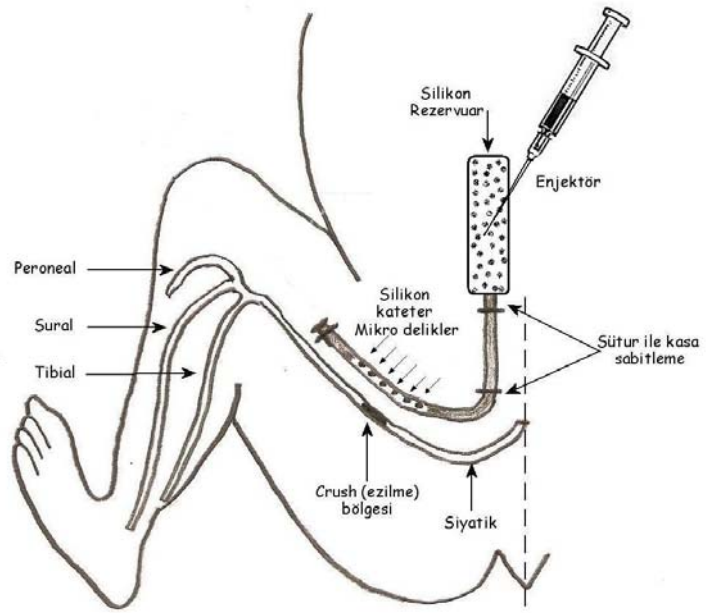
Deney hayvanlarının sağ bacak siyatik sinirlerinde cerrahi işlemler aseptik şartlarda gerçekleştirildi. Sıçanlar, intraperitoneal olarak Ketamin (60 mg/kg), Xylazine (7,5 mg/kg) verilerek anestezi edildikten sonra, siyatik sinir orta uyluk düzeyinde (popliteal fossa) yaklaşık 1 cm lik bir kesi ile ortaya çıkarıldı ve siyatik sinir, standart bir fine forseps kullanılarak 30 saniye süre ile ezildi (Şekil 3.1). Daha sonra, kesi 4,0 propilen sütür kullanılarak kapatıldı. Cerrahi operasyon sonrası deney grupları 2-4 hafta süre için iyileşmeye bırakıldı.



Şekil 3.1 Travmatik deneysel nöropati oluşturma yöntemi. Yaklaşık 1 cm’lik cerrahi inzisyon ile ortaya çıkarılan siyatik sinir, standart bir fine forseps kullanılarak 30 saniye süre ile ezilmektedir. Operasyon sonrası Post-operasyon odasına alınan hayvanlar deney günlerine kadar klimatize edilmiş uygun yaşam ortamında bırakıldı.

3.2.2 Lokal Clodronate (LEC) Uygulaması İçin Cerrahi Girişim

Ezilme sonrası yara bölgesi kapatılmadan künt diseksiyonla deri altına (subkutan) hacmi 150 µl olan silikon rezervuar yerleştirildi ve medikal tip (Medical Adhesive Type A) silikon yapıştırıcı kullanılarak kateter monte edildi. Rezervuara monte edilmiş bu kateter, tam olarak ezilme bölgesi üzerine, absorbe edilen cerrahi ipliklerle (10,0 veya 9,0) sabitlendi. En sonunda yara bölgesi 4.0 propilen cerrahi iplikle kapatıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Lokal lipozom kaplı clodranate (LEC) uygulaması için cerrahi girişim yöntemi. Rezervuar künt diseksiyonla subkutan olarak yerleştirilmektedir

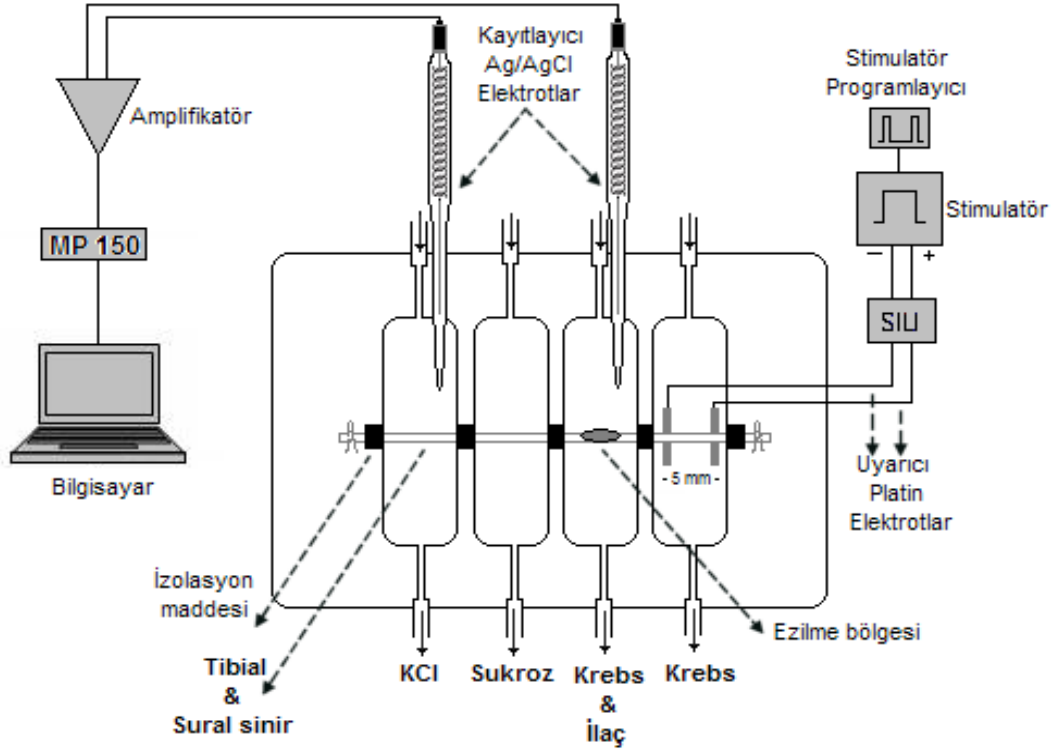
3.3 Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması

3.3.1 Sukroz-gap Yöntemi ile BAP kayıtlarının Alınması

Deneylerde, bileşik sinir aksiyon potansiyellerinin (BAP) ölçümünde bir in-vitro elektrofizyolojik teknik olan sukroz-gap tekniği ve sistemi kullanıldı. Bu sistem preperatın konulduğu sukroz-gap kutusu, perfüzyon sistemi, agar köprülü Ag/AgCl elektrotlar, yüksek giriş empedanslı amplifikatör, stimülatör, stimulus izolasyon ünitesi (SIU), stimülatör programmer, osiloskoptan oluşturulmuştur (Şekil 3.4). Sukroz-gap kutusunda, perfüzyon yapılabilen dört havuzcuk bulunmaktadır. Uyarı havuzcuğunda normal Krebs içinde bir çift platin uyarı elektrodu, test havuzcuğunda Krebs veya test çözeltisi, sukroz havuzcuğunda izotonik sukroz ve KCl havuzcuğunda ise izotonik KCl bulunmaktadır. Çözeltiler dakikada 1-2 mL hızla perfüze edildiler. Sıçan siyatik siniri, sukroz-gap aparatının tüm havuzcuklarından geçecek ve sinirin ezilmiş kısmı test havuzcuğuna gelecek şekilde yerleştirildikten sonra havuzcuklar vazelin-silikon karışımı ile birbirinden izole edildiler. Test ve KCl havuzcukları arasındaki potansiyel farkı bu havuzcuklara daldırılmış agar-jel köprülü Ag/AgCl elektrotlarla ölçüldü (Şekil 3.3).

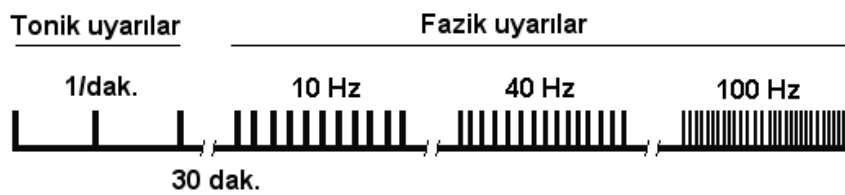
Çalışmalarda ağırlıkları 220-260 gram arasında olan Wistar türü erkek sıçanlardan çıkarılan siyatik sinir demetlerinin distal dalları olan Sural ve Tibial sinirler kullanıldı.

Sinirlerin dış kılıfları (epineurium) %95 O₂ + %5 CO₂ gaz karışımı ile gazlandırılan krebs içinde desheat edildi ve Krebs'ın içerisinde 30 dak bekletildi ve daha sonra sukroz-gap kutusuna yerleştirilerek, 30 dak süresince sinirlerin dengeye gelmesi beklendi. İlaç uygulaması ve kayıtların alınması sinirlerin dengeye gelmesinden sonra yapıldı.



Şekil 3.3 Sukroz-gap kayıt sistemi: Sukroz-gap kutusu, programlayıcı-stimülör-stimulus yalıtma birimi, uyarıcı ve kayıtlayıcı elektrotlar ile veri toplama sistemi ve bilgisayardan oluşmaktadır. Sukroz-gap kutusundaki dört havuzcuk birbirinden yalıtılmıştır ve KCl, Sukroz ve Test çözeltilerinin bulunduğu havuzcuklar perfüze edilmektedir.

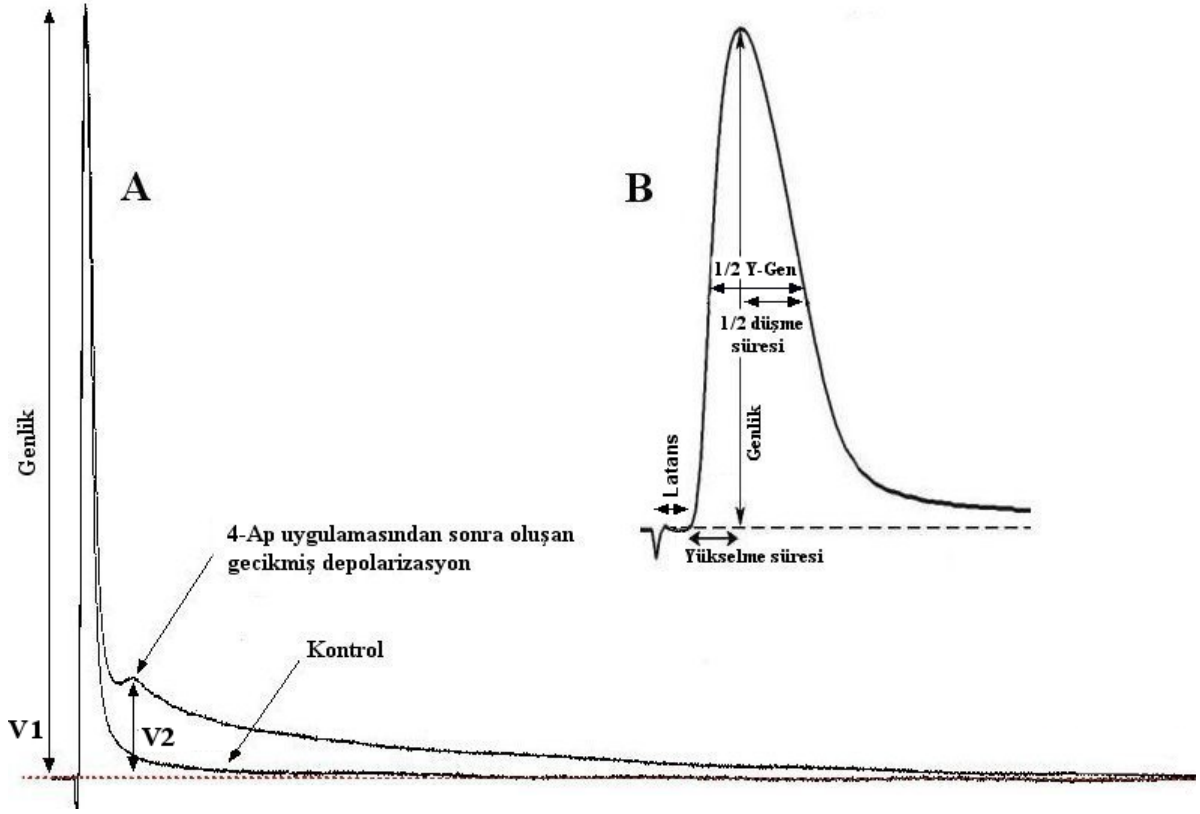
Sinirler, 0,05 ms süreli supramaksimal elektriksel pulslar ile uyarılarak bileşik sinir aksiyon potansiyelleri (BAP) kayıtları. Tonik uyarılar dakikada 1 uyarı (1 uyarı/dak.) ve fazik uyarılar (10, 40 ve 100 Hz frekanslı, 20 pulstan oluşan puls trenleri) ile yapıldı. BAP ların bilgisayara aktarılmasında Biopac MP150 data acquisition sistemi, kayıtların ölçülmesinde ise AcqKnowledge 3.8.2 yazılımı kullanıldı (Şekil 3.4 ve 5).



Şekil 3.4 Tonik ve Fazik uyarı protokolü.

3.3.1.1 Tonik Ölçüm ve Değerlendirilen Parametreler

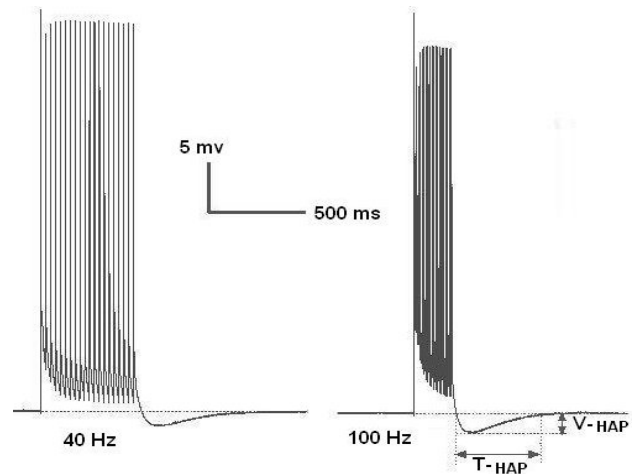
Tonik ölçümlerde BAP genliği (mV), Latans (ms), YS; Yükselme Süresi (ms), $\frac{1}{2}$ DS; Yarı-Düşme Süresi (ms) ve 4-Ap uygulaması sonrası ortaya çıkan gecikmiş depolarizasyon genliği V-dd (mV) ölçülen parametrelerdir (Şekil 3.5).



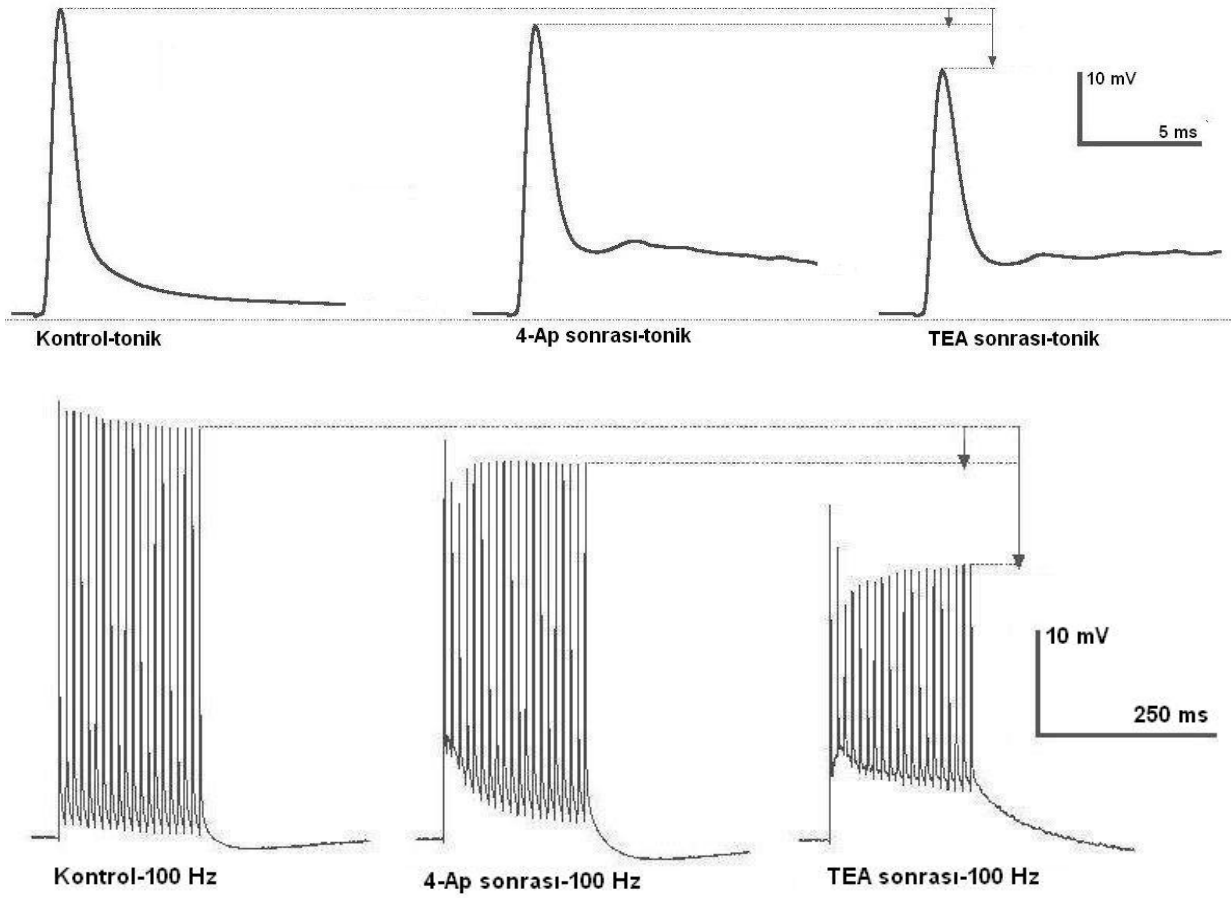
Şekil 3.5 BAP genlik, Yükselme süresi, $\frac{1}{2}$ Yarı-süre ve gecikmiş depolarizasyonların genliği ölçüldü.

3.3.1.2 Fazik Ölçüm ve Değerlendirilen Parametreler

4-Ap ve TEA uygulaması öncesinde alınan tonik ve fazik BAP kayıtları kontrol olarak kabul edildi. İlaç uygulaması sonrasında aynı protokolle kayıtlanan BAP'lar, ilaç öncesinde kayıtlanan kontrol kayıtlarına göre değerlendirildi. Genellikle yüksek uyarım frekanslarında (özellikle 40 ve 100 Hz) görülen Hiperpolarize edici Ard Potansiyellerin (HAP) genlik (V_{HAP}) ve süreleri (T_{HAP}) değerlendirildi (Şekil 3.5, 6).



Şekil 3.6 Özellikle yüksek uyarı frekanslarında (40 ve 100 Hz'lerde) ortaya çıkan HAP aktivitesi ve ölçülen parametreleri.



Şekil 3.7 Tonik ve fazik uyarım frekanslarının BAP genliği üzerine etkisini tanımlamak amacıyla kullanılan örnek kayıtlar. 4-Ap ve TEA öncesi kayıtlanan tonik ve fazik BAP'lar kontrol olarak kabul edildi. İlaç uygulamasından sonra kayıtlanan BAP'lar ile karşılaştırılarak BAP genliklerinde kontrollere göre % düşme tonik blok (üst resimdeki oklar), fazik uyarımlar sırasında BAP genliklerindeki düşme ise fazik blok olarak tanımlandı (alt resimdeki oklar).

3.3.1.3 İlaçlar ve Çözeltiler

Deneylerde kullanılan çözeltiler (mM olarak): Krebs; 124,0 NaCl, 3,0 KCl, 1,3 NaH₂PO₄, 2,0 MgCl₂, 2,0 CaCl₂, 26,0 NaHCO₃ ve 10,0 dekstroz. KCl çözeltisi; 120,0 KCl, 7,0 NaCl, 1,3 NaH₂PO₄, 2,0 MgCl₂, 26,0 NaHCO₃ ve 10,0 dekstroz. İzotonik sukroz; 320 mM sukroz. Çözeltilerin hazırlanmasında deiyonize-bidistile su kullanıldı ve gerektiğinde çözeltiler pH 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Ayrıca, hızlı kinetik gösteren K⁺ kanallarının bloklanması amacıyla 2mM 4-Aminopyridine (4-Ap) ile yavaş kinetik gösteren kanallar için 10 mM TEA (2 mM 4-Ap ile beraber kümülatif uygulandı) kullanıldı. Çözeltiler %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırıldı ve 1-2 ml/dak hızla sukroz-gap kutusunda perfüze edildi. Deneyler 22-25 °C sıcaklıkta yürütüldü.

3.4 Manyetik Alan Uygulama Sistemi

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında bulunan “Pulslu Manyetik Alan (PMA) Uygulama Sistemi”nin fotoğrafı Şekil 3.8’de görülmektedir. Manyetik alan sistemi “ILFA elektronik Sanayi ve Ticaret Ltd Şti-Adana/Türkiye” tarafından özel olarak tasarımılandı ve imal edildi. Sistem, sinyal jeneratörü, puls programmer ve Helmholtz halkalarından oluşmaktadır. Sinyal jeneratörü, genişliği ve yüksekliği ayarlanabilen, yüksek şiddette dikdörtgen şeklinde, tek yönlü-pozitif voltaj pulsarı verebilmektedir. Puls jeneratörü, “puls programmer” ile kontrol edilmekte ve puls jeneratöründen belirlenen sürelerde ve frekanslarda puls trenleri elde edilebilmektedir. Helmholtz halkalarından geçen akımın şiddeti, puls jeneratörünün çıkışına seri bağlanmış $R=0,1$ ohm büyüklüğünde bir direnç üzerinde düşen voltajdan hesaplanmaktadır. Akımın şekli ve süresi osiloskop ile bu dirençten gözlenebilmekte ve ölçülebilmektedir.



Şekil 3.8 Pulslu manyetik alan uygulama kabini ve sistemi

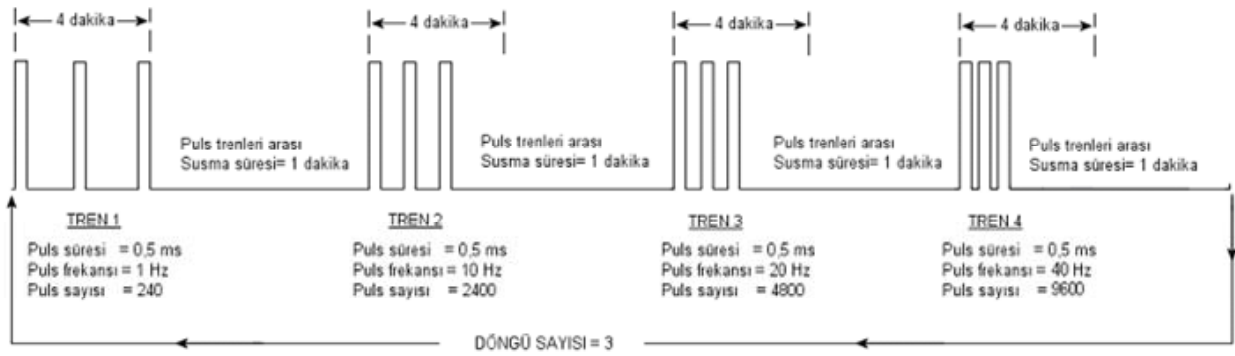
Helmholtz halkaları, kalınlığı $d=1,3$ mm (18 gauge) olan bakır telden yapıldı. Her bir halkanın çapı $2r = 60$ cm ve sarım sayısı $N=100$ dür; halkalar, merkezler aynı çizgi üzerinde olacak şekilde bir birinden yarıçap ($r = 30$ cm) kadar uzağa yerleştirildi. Helmholtz halkaları içindeki manyetik alanın yönü dikey-yukarı olacak şekilde devreden akım geçirildi ve topraklanmış bir Faraday kafesi içine yerleştirildi.

Hall effect problu (Sypris-F.W.Bell Model 6010 Hall Effect Gauss/Tesla Meter) Gaussmetre ve search coil ile Helmholtz halkaları arasındaki manyetik alanın, iki halka arasındaki orta noktadan itibaren $\pm r/4 = \pm 15$ cm uzaklığındaki bir bölgede uzaysal olarak %95 oranında sabit olduğu belirlendi. Bu bölgeye boyutları $W:30 \times D:30 \times H:20$ cm olan sıçan kabı (rat restrainer) yerleştirildi. Bu nedenle sıçanlar yukarı-dikey yönlü düzgün bir manyetik alan etkisinde bırakıldılar.

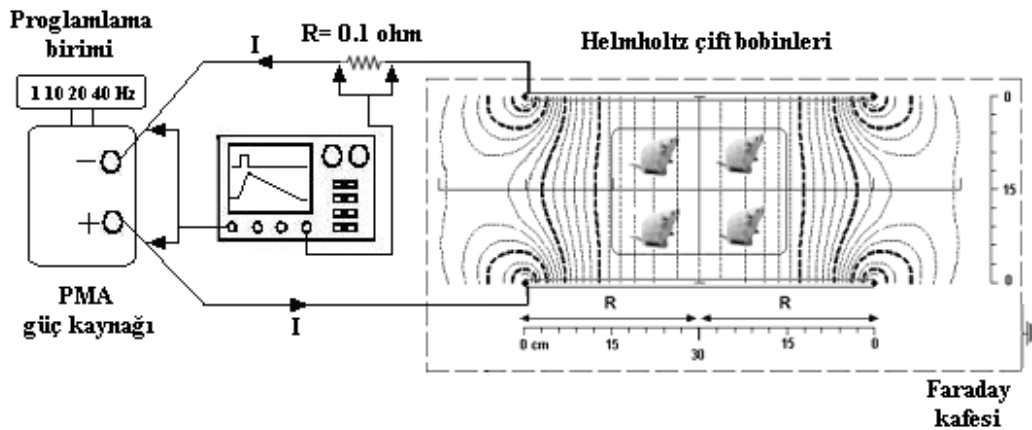
3.4.1 Manyetik Alan Uygulama Protokolü

Deney hayvanları uygulama süresince, düzenli olarak her gün, aynı saatte, aynı kişi tarafından aynı koşullarda 60 dakika süresince genişliği 0,5 ms ve şiddeti 1,5 mT olan puls trenleri şeklindeki manyetik alan (trenlenmiş-pulsu elektromanyetik alan, t-PEMA) etkisinde bırakıldılar. Uygulama her biri 12 dakika süren puls tren setinin ardışık 3 kez tekrarlanması şeklinde yapıldı. Her puls treni setinde ardışık 4 adet farklı frekanslı alt puls treni (1 Hz, 10 Hz, 20 Hz ve 40 Hz) bulunmaktadır, her bir alt puls treninin süresi 4 dakikadır ve alt puls trenleri arasında 1 dakikalık susma süresi bulunmaktadır.

Sıçanlar deney süresince her gün aynı saatlerde pleksiglas bir kutu içerisine, en fazla 4 adet olacak şekilde, Helmholtz halkalarının orta yerine konularak PEMA uygulaması yapıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.9 Pulsu manyetik alan uygulama protokolü. PMA güç kaynağından dikdörtgen şeklinde voltaj pulsuları çıkmaktadır.



Şekil 3.10 PMA uygulama sistemi şematize olarak gösterilmektedir. PMA faraday kafesi içerisinde bulunan (60 cm çap, 100 sarım, 18 gauge bakır tel) bir çift helmholtz bobininden elde edildi. 4 adet sıçan helmholtz halkalarının orta yerine konularak deney sürecinde PMA uygulaması yapıldı.

3.5 Termal Plantar Testi

Bu yöntem ile herhangi bir kısıtlama olmadan serbestçe hareket edebilen sıçanların arka pençelerine, deride herhangi bir hasar oluşturmada n ağı rı hissi oluşturan termal bir uyarı verildi. Verilen (uygulanan) termal bir uyarı sonrasında hayvanın (refleks yanıt), pençesini uyarandan geri çekme süresi ölçüldü (PWL: Paw Withdrawal Latency). Cerrahi operasyon öncesi deney hayvanları 2 hafta önceden post operasyon odasına alışmaları için alındı. Ayrıca deneylere başlamadan önce ortama uyum sağlamaları için sıçanlar yaklaşık 15 dakika, sıcaklığı 30°C’de sabitlenmiş cam tabanlı plastik odacıklarda bekletildi (Şekil 3.11).

Sıçanlar, “Ugo Basile Thermal Plantar™ Analgesia Instrument” firmasına ait sistem ile, arka pençelerinin tabanından termal olarak (bir kızılötesi ışık kaynağı ile) uyarıldı. Cam tabakanın altında bulunan hareketli tutucudaki radyan ısı kaynağı (8 V- 50 W halojen ampul), hayvanın arka pençesinin plantar bölgesinin orta kısmına termal uyarıyı vermek üzere yerleştirildi (Şekil 3.11). Sıçan ağrıyı hissedip ayağını çektiğinde, bir fotosel yansıyan ışık demetindeki kesintiyi dedekte ederek I.R. jeneratörün otomatik olarak kapanmasını ve zaman sayacını durdurarak gecikme zamanının (latans) belirlenmesini sağlar. Bu yöntemde, gecikme zamanı 0,1 s kesinlikte ölçülebilmektedir. Maksimum uyarım süresi (cut off time) hayvanın ayak tabanında bir hasara yol açmaması için 25 s olarak tutulmaktadır. Ardışık uyarılar arası en az 3 dakika beklendi.



Şekil 3.11 Termal plantar test sistemi. Gövde, sıçanların konduğu cam tabaka ve bunun altında bir kolla istenen konuma hareket ettirilebilen termal radyan kaynağından oluşur. Zaman ölçme sistemi radyant enerjinin uygulanmaya başlaması ve sıçanın pençesini çekmesi arasındaki süreyi ölçer. Isıtıcı sıçanların bulunduğu cam plakanın ayarlanan sıcaklıkta kalmasını sağlar.

3.6 Clodronate’nin Lipozomla Kaplanması (LEC Hazırlanması)

Makrofajları spesifik olarak baskılamak amacıyla kullanılan mannozlu (p-amino-phenyl- α -mannopyranoside) lipozom ve lipozom kesecikleri içine enkapsüle edilen

dichloromethylene-bisphosphanate (Cl₂MBP veya diğer adıyla chlodronate/chlodronic acid) hazırlanması, Van Roojen ve Sanders (1994) ve Umezawa (1988) tarafından geliştirilmiş olan protokollere göre yapıldı. LEC, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarında hazırlandı. Her iki araştırmacının yöntemleri esas alınarak lipozom enkapsüle chlodronate (LEC) hazırlanmasında kullanılan kimyasallar, stok solüsyonlar, sarf malzemeleri ve izlenen yöntem aşağıda verildi (laboratuar koşullarına göre gerektiği yerlerde uygulamalar kısmen değiştirildi):

3.6.1 LEC Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Phosphatidylcholine (egg lecitin) (Sigma), kloroform içinde 100 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve -20° C’de saklandı.

Cholesterol (Sigma), kloroform içinde 0,5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve -20° C’de saklandı.

Chlodronate (Cl₂MBP) (Sigma), bidistile su içinde 0,3 gr/ml olacak şekilde hazırlandı ve -20° C’de saklandı.

Mannopyranoside (Sigma), methanol içinde 2 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve -20° C’de saklandı.

Chloroform (Merck)

Methanol (Merck)

PBS (Phosphate Buffer Solution) pH 7,4 (Sigma)

Yuvarlak tabanlı 500 ml’lik flasklar

Pastör pipeti (pamuk tıkaçlı ve fırınlanmış)

50 ml’lik steril tüpler

15 ml’lik steril tüpler

Enjektörler (2, 5 ve 10 ml’lik)

Steril Filtre, Sıvı azot

3.6.2 LEC Hazırlama Yöntemi

1. Yuvarlak tabanlı 500 ml’lik bir flask içine, stok solüsyonundan; 10 ml phosphatidylcholine, 1 ml cholesterol ve 38 ml mannopyranoside ilave edilerek oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika karıştırıldı.

2. Boş lipozom olarak (kontrol) kullanılacak miktar başka bir flaska ayrıldı (bu çalışmada solüsyonun 10 ml’si boş lipozom, 39 ml’si ise chlodronate enkapsülasyonu için ayrıldı).

3. Her iki flaskda rotary evaporatöre takılarak kloroform fazı uçuruldu (oda sıcaklığında, 150 rpm’de). İşlem sonunda flaskların yüzeyinde süt beyazı renginde fosfolipit tabakası oluştuğu gözlemlendi.

4. Kontrol olarak kullanılacak olan flasktaki Fosfolipit tabakası üzerine 10 ml PBS, diğerine ise 10 ml chlodronate solüsyonu ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika süreyle yavaş bir şekilde döndürülerek çözünmesi sağlandı.

5. Solüsyonlar steril pastör pipeti kullanılarak flasklardan alındı, 50 ml’lik tüplerde toplandı ve azot gazı ortamında 1,5 saat bekletildi (lipit tabakası ilave edilen sıvılar içinde süspansiyon oluşturduğu için bekleme sürelerinde solüsyonda sıvı ve lipit fazların ayrıldığı gözlenir).

6. Tüplerdeki süspansiyon dikkatli bir şekilde homojenize edildikten sonra buzlu su içeren bir kap içine alınarak 50 Hz’de 3 dakika süreyle sonikasyona tabi tutuldu.

7. Tüplerin kapakları azot gazı ortamında kapatılarak lipozomların şişmesi için 4° C’de bir gece bekletildi. (bekleme sonunda boş lipozomun dibeye çöktüğü ve chlodronate’li lipozomun yüzeyde kaldığı gözlenir).

8. Süspansiyonlar dikkatli bir şekilde homojenize edilerek pastör pipeti yardımıyla 15 ml’lik steril tüplere paylaştırılır ve 5000 rpm, 4°C’de 30 dakika santrifüjlendi.

9. Tüplerdeki sıvı fazlar uzaklaştırıldı (chlodronate’in tamamı lipozom kesecikleri içinde enkapsüle olmadığı için ilk santrifüjde chlodronate içeren sıvı fazlar temiz tüplerde toplandığında ve filtre edilerek tekrar kullanılabilir).

10. Pelletler üzerine 5 katı kadar steril PBS solüsyonu ilave edilerek pastör pipeti yardımıyla homojenize edildi ve tekrar santrifüjlenerek sıvı faz atıldı. Bu işlem 3 defa tekrar edildi.

11. Pelletler üzerine 5 ml PBS ilave edilerek pastör pipeti yardımıyla dikkatli bir şekilde iyice homojenize edildi ve 50 ml’lik tüplerde toplandı. PBS ilavesiyle, boş lipozom solüsyonu 22 ml’ye chlodronate’li lipozom ise 85 ml’ye tamamlandı.

12. Günlük kullanım kolaylığı ve sterilite için 50 ml’lik tüplerdeki solüsyonlar homojenize edilerek 15 ml’lik tüplere (her bir tüpe 13 ml) paylaştırıldı ve azot gazı ortamında 10 dakika tutulduktan sonra kapakları kapatıldı.

3.6.3 LEC’in Lokal olarak uygulanması

Bu çalışmada immün sisteminin en önemli parçalarından olan makrofajlara spesifik olarak bağlanarak baskılayan bir ajan olan LEC Şekil 3.3’te gösterildiği gibi, bir rezervuar ve ona monte edilmiş silikon kateter (Portex^R Fine Bore Polythene Tubing, id:0,58 mm, od:0,95

mm) yardımıyla lokal olarak uygulandı (X.Santos et al. 1998). Lokal olarak uygulanmasının nedeni; hazırlanan LEC'in homojenize olmaması, sistemik verildiğinde dezavantajlarının tam olarak bilinmemesi, günlük ve taze homojenize ilaç uygulanabilmesi, sistemik olarak verilen dozun azaltılması ve literatürde böyle bir LEC uygulamasının bulunmamasıdır.

Hacmi 150 µL olan silikon rezervuar subkutan olarak deney hayvanının sırtına yerleştirildi, silikon kateter ise ezilen siyatik sinir üzerine 9-10.0 suturela sabitlendi. Rezervuardaki ölü boşluk ilaçla doldurulduktan sonra her gün günlük doz olan 150 mikrolitre LEC ilk 15 gün boyunca rezervuar aracılığı ile sinirin ezilmiş bölgesine uygulandı.

3.7 Histolojik İşlemler

3.7.1 Elektron Mikroskopisi Yöntemi

Elektron mikroskopik incelemeler için kontrol ve deney gruplarından elde edilen siyatik, sural ve tibial sinir doku parçaları hemen Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 5'lik glutaraldehit solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra üzerinde birkaç damla %5'lik glutaraldehit bulunan, dişçi mumu ile kaplanmış petri kutularına alındı ve jilet yardımıyla yaklaşık 1 mm³ büyüklüğünde parçalara ayrıldı. Doku parçaları tekrar %5'lik glutaraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat kadar daha tespit edildi. Böylece dokular bu solüsyonda toplam 4 saat tespit edilmiş oldu. Tespit işleminden sonra, dokular Millonig fosfat tampon solüsyonunda 10 dakika süreyle çalkalandı. Dokular ikinci kez Millonig fosfat tamponuna alındıktan sonra aynı tampon içerisinde bir gece bekletildi. Ertesi gün dokular Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik osmium tetraoksit solüsyonuna alınarak 2 saat süreyle ikinci kez tesbit edildi ve ardından Millonig fosfat tampon solüsyonu ile iki kez 10'ar dakika yıkandı. Dokular daha sonra derecesi aşağıdaki sıraya göre artan alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildi:

- % 50 Etil alkolde +4° C'de 15 dakika
- % 70 Etil alkolde +4° C'de 15 dakika
- % 86 Etil alkolde +4° C'de 15 dakika
- % 96 Etil alkolde +4° C'de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde +4° C'de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde +4° C'de 15 dakika

Buraya kadar olan işlemler buzdolabında +4° C’de gerçekleştirildi. Daha sonra aşağıdaki işlemler oda ısısında gerçekleştirildi

- % 100 Etil alkolde 15 dakika
- Propilen oksitte 15 dakika
- Propilen oksitte 15 dakika

Dehidrate edilen doku parçaları daha sonra aşağıdaki solüsyonlar içerisinde immerse edildi :

- Propilen oksit + gömme materyali 30 dakika
- Propilen oksit + gömme materyali 30 dakika

Bu işlemten sonra doku parçaları içerisinde yeni hazırlanmış gömme materyali (rezin) bulunan tüplere alındı ve bir gece süreyle rotatorda karıştırıldı.

Gömme materyali :

- Araldit CY 212 20 ml
- Sertleştirici HY 964 20 ml
- Hızlandırıcı DY 064 0.6 ml
- Plastikleştirici – Dibütil Fitalat 1 ml

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak 00 polietilen kapsüllere gömüldü ve 60° C’de etüvde 48 saat süreyle polimerize edildi. Daha sonra elde edilen bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile 500 A° kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere toplandı ve % 70’lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds’un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler Jeol JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japon) ile incelendi ve mikrograflar elde edildi.

3.7.2 Histomorfometrik Yöntemler

Sıçan tibial, sural ve siyatik sinir doku bloklarından, elektron mikroskopik inceleme öncesinde, 1µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Kesitler toluidin mavisi ile boyandı ve Olympus BX50 (Tokyo-Japonya) ışık mikroskobunda incelendi. Mikroskoba bağlı Bioquant Omega II software analiz programı kullanılarak, ortalama miyelinli sinir liflerinin sayıları ve miyelinli sinirlerin çapları ölçüldü.

3.7.3 Makrofaj Sayımı için İmmünohistokimyasal İşlemler

- 1) Dokular kasetlendikten sonra %10'luk formaldehitte bekletilir. Aynı gün akşam ototeknikon cihazında fiksasyon işlemi tamamlanır. Ertesi gün sabah parafin blok yapılır.
- 2) Parafin bloktan 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler hazırlanır.
- 3) Oda sıcaklığında alkol ve ksilol serisinden geçirilerek deparafinizasyon işlemi yapılır.
- 4) %0,3 w/v H₂O₂ indistile suda 5-7 dakika bekletilir.
- 5) Saf sudan geçirilir
- 6) 20 dakika mikrodalga fırında antigen retrieval işlemi uygulanır (Citrat buffer pH 6)'nın yaklaşık 45 dakika oda sıcaklığına gelmesi beklenir. Saf su ve PBS (föfat tamponlu çözelti)den geçirilir.
- 7) Normal blocking serum damlatılır, 8-10 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sonunda doku üzerindeki solüsyon dökülür. Dokunun etrafı kurulanır. Tekrar yıkama yapılmadan.
- 8) 1/250 CD68 damlatılır (DAKO M0876 Denmark) Oda sıcaklığında nemli ortamda 2 saat inkübe edilir.
- 9) 3-5 dakika PBS'de yıkanır.
- 10) Biotin damlatılır. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir. (DAKO K0690)
- 11) 3-5 dakika PBS'de yıkanır.
- 12) Strept avidin damlatılır. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir (DAKO K0690)
- 13) 3-5 dakika PBS'de yıkanır.
- 14) AEC chromogen damlatılır, 15-20 dakika inkübasyona bırakılır. Bu zaman aralığında mikroskop altında kontrol edilerek AEC'den çıkarılır.
- 15) Çeşme suyunda yıkanır, saf sudan geçirilir.
- 16) Mayer Hematoxyline 5-7 dakika bekletilerek zıt boyama yapılır. Çeşme suyuna alınarak mavileştirilir.
- 17) Dokunun etrafı kurulanıp su bazlı sıvı kaplama maddesi ile kapatılır.

3.8 İstatistiksel Değerlendirme

Bütün veriler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak ifade edildi. Tek ve çok değişkene göre çoklu karşılaştırmalar One Way ANOVA, Two Way ANOVA veya repeated measure of ANOVA ile yapıldı. Her gruptaki veri sayısı 8-10 arasında değiştiğinden, her gruptaki verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Ayrıca çoklu karşılaştırmaları yapmadan önce grupların homojenliklerine bakıldı (Dawson, 2001).

4. BULGULAR

Bu çalışmada sıçan siyatik sinirinde hemostatik forseps ile sıkarak oluşturulan ezilme sonrasında ve rejenerasyon sürecinde, LEC aracılığı ile lokal olarak gerçekleştirilen makrofaj baskılaması sonrasında PMA'nın makrofaj aracılı etkisinin olup olmadığı siyatik sinirin distal dalları olan sural ve tibial sinirlerde araştırıldı, oluşan elektrofizyolojik ve morfolojik değişiklikler ve voltaj kapılı iyon kanallarının işlevsel özelliklerinde meydana gelen değişiklikler spesifik kanal blokörleri (4-Ap, TEA) kullanılarak belirlendi.

Bu araştırmada ayrıca duysal ve motor sinir rejenerasyonları ayrı ayrı araştırıldı. Bilindiği gibi sural sinir duysal bir sinir olup %97 duysal liflerden, buna karşın tibial sinir %49 motor liflerden oluşmaktadır. Rejenerasyon sırasında motor ve duysal sinir rejenerasyon hızları elektrofizyoloji yanında fonksiyon testleri ile de takip edildi ve korelasyon arandı. Elde edilen bulgular elektrofizyoloji, fonksiyon testleri ve histoloji sırası ile verildi.

Akson zarında iyon kanalı düzeyindeki değişimler aksiyon potansiyeline (AP), dolayısıyla Birleşik Aksiyon Potansiyeline (BAP) etki etmekte, miyelin kılıftaki değişimler de miyelinli aksonun AP'yi iletme hızına yansımaktadır. Bu nedenle travmatik nöropati oluşturulan sıçan siyatik sinirlerinde BAP parametrelerini ve iletim hızındaki değişimleri belirlemede sukroz-gap yöntemi kullanıldı.

4.1 Sukroz-gap Bulguları

4.1.1 Ezilme gruplarına ait Tibial ve Sural sinir BAP bulguları

Çalışmalarda ağırlıkları 220-260 gram arasında olan Wistar türü erkek sıçanlardan çıkarılan siyatik sinir demetlerinin distal dalları olan sural ve tibial sinirler kullanıldı. Kontrol grubu sıçanlar, üzerinde hiçbir cerrahi uygulama yapılmayan sağlam sıçanlardan oluşturuldu. Deneylerde, bileşik sinir aksiyon potansiyellerinin (BAP) ölçümünde bir in-vitro elektrofizyolojik teknik olan sukroz-gap tekniği ve sistemi kullanıldı.

Tonik uyarılarda kontrol grubuna ait ortalama BAP genliği tibial sinirde $68,5 \pm 1,2$ mV, BAP yükselme süresi (YS) $0,50 \pm 0,02$ ms ve yarı-düşme süresi ($\frac{1}{2}DS$) $0,54 \pm 0,02$ ms olarak ölçüldü. Sural sinirde ise ortalama BAP genliği $35,3 \pm 3,1$ mV, BAP YS, $0,80 \pm 0,03$ ms ve $\frac{1}{2}DS$, $0,76 \pm 0,02$ ms ölçüldü.

Çizelge 4.1. Tibial ve sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. hafta (2hf) ve 4. hafta (4hf) ya ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

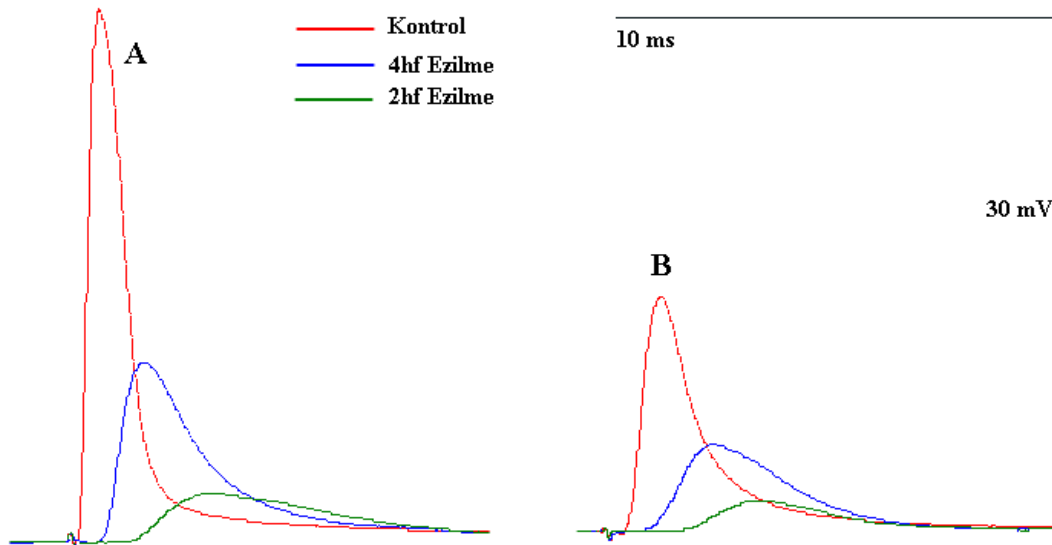
A Ezilme grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri

Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	½DS (ms)	Latans (ms)
Kontrol	68,5 $\pm$ 1,2	0,50 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,07
2hf+Ezilme	6,2 $\pm$ 1,1	2,28 $\pm$ 0,30	4,11 $\pm$ 0,50	1,95 $\pm$ 0,10
4hf+Ezilme	23,8 $\pm$ 2,1	1,17 $\pm$ 0,10	12,7 $\pm$ 0,30	0,76 $\pm$ 0,03

B Ezilme grubu Sural sinire ait BAP parametreleri

Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	½DS (ms)	Latans (ms)
Kontrol	35,3 $\pm$ 3,1	0,80 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,02
2hf+Ezilme	3,9 $\pm$ 0,5	2,65 $\pm$ 0,20	1,89 $\pm$ 0,20	2,24 $\pm$ 0,10
4hf+Ezilme	9,7 $\pm$ 0,7	1,54 $\pm$ 0,40	1,64 $\pm$ 0,40	1,10 $\pm$ 0,10

Travmatik mononöropatinin oluşturulmasından itibaren 2 ve 4 haftalık iyileşme sürecini post-operasyon odasında geçiren deney hayvanlarının, tibial ve sural sinirlerinden ölçülen BAP parametrelerinin, kontrol değerlerine göre her iki sinirde de anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). Deney gruplarında latans değerleri de kontrollere göre oldukça düşük bulundu ($p<0,05$).



Şekil 4.1 Kontrol grubu, 2 ve 4 hf ezilme gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip bileşik aksiyon potansiyeli (BAP) kayıtları görülmektedir. **A)** Tibial sinirden kayıtlanan, **B)** Sural sinirden kayıtlanan BAP kayıtlarıdır

4.1.2 Ezilme+PMA gruplarına ait Tibial ve Sural sinir BAP bulguları

Ezilme+PMA grubunda bulunan deney hayvanları cerrahi operasyon sonrası 2-4 hafta süresince, düzenli olarak her gün, aynı saatte, aynı kişi tarafından aynı koşullarda 60 dakika süresince genişliği 0,5 ms ve şiddeti 1,5 mT olan puls trenleri şeklindeki manyetik alana maruz bırakıldılar, daha sonra bu deneklerin 2. ve 4. haftalarda ezilmiş sinirleri çıkarılarak sukroz-gap yöntemi ile BAP kayıtları alındı.

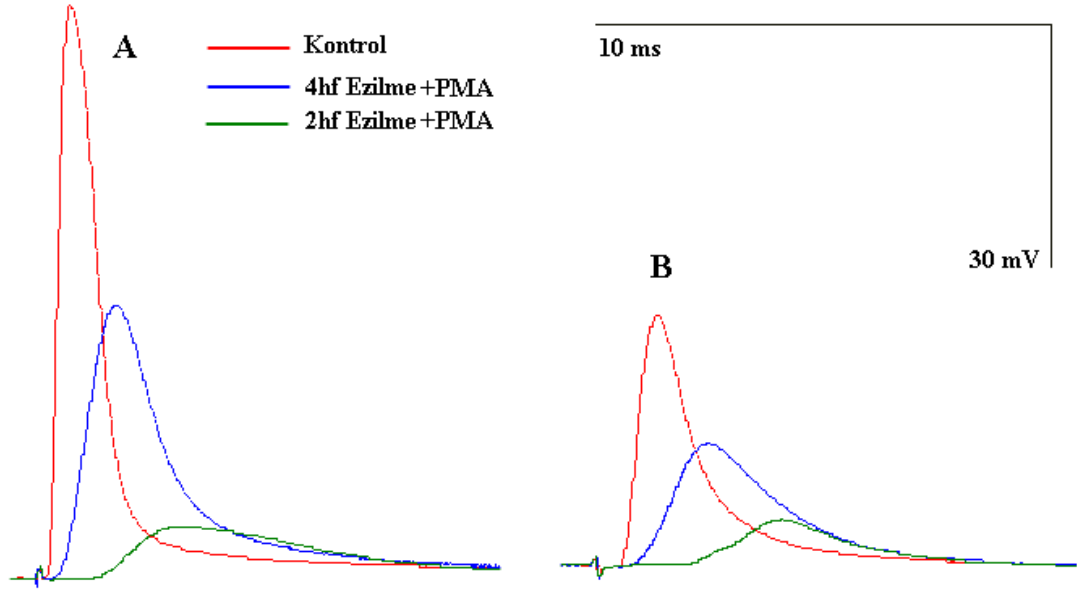
Çizelge 4.2. Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. hafta (hf) Ezilme+PMA grubuna ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A Ezilme+PMA grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri				
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	½DS (ms)	Latans (ms)
Kontrol	65,9 $\pm$ 1,7	0,48 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,06
2hf+E+PMA	6,4 $\pm$ 1,1	2,28 $\pm$ 0,30	3,99 $\pm$ 0,40	1,92 $\pm$ 0,09
4hf+E+PMA	32,8 $\pm$ 2,2	1,01 $\pm$ 0,05	1,18 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,03

B Ezilme+PMA grubu Sural sinire ait BAP parametreleri				
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	½DS (ms)	Latans (ms)
Kontrol	34,2 $\pm$ 3,1	0,80 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,02
2hf+E+PMA	4,0 $\pm$ 0,5	2,63 $\pm$ 0,20	1,86 $\pm$ 0,20	2,22 $\pm$ 0,09
4hf+E+PMA	13,4 $\pm$ 1,2	1,57 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,04

4. haftada tonik uyarılarda Ezilme+PMA grubuna ait ortalama BAP genliği tibial sinirde 32,8 $\pm$ 2,2 mV, BAP YS 1,01 $\pm$ 0,05 ms ve ½DS 1,18 $\pm$ 0,04 ms olarak ölçüldü. Sural sinirde ise ortalama BAP genliği 13,4 $\pm$ 1,2 mV, BAP YS 1,57 $\pm$ 0,05 ms ve ½DS 1,56 $\pm$ 0,05 ms ölçüldü.

Travmatik nöropati sonrası uygun ortamda 2 ve 4 haftalık iyileşme dönemine ek olarak PMA'ya maruz bırakılan deney hayvanlarından, tibial ve sural sinirden ölçülen BAP parametrelerinin kontrol değerlerine göre her iki sinirde de anlamlı bir şekilde düştüğü görüldü ($p<0,05$) (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). Latans değerleride kontrol değerlerine göre oldukça düştü. Sırasıyla latans tibial sinirde 0,51 $\pm$ 0,03 ms iken sural sinirde 1,06 $\pm$ 0,04 ms olarak ölçüldü. Ayrıntılı istatistiksel analizler Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Kontrol grubu, 2 ve 4 hafta (hf) Ezilme+PMA gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. **A)** Tibial sinirden kayıtlanan, **B)** Sural sinirden kayıtlanan BAP kayıtlarıdır.

4.1.3 Ezilme+LEC gruplarına ait Tibial ve Sural sinir BAP bulguları

Ezilme+LEC grubunda bulunan deney hayvanlarının cerrahi operasyonla önce sağ siyatik sinirleri ezildi ve subkutan olarak rezervuar yerleştirildi.

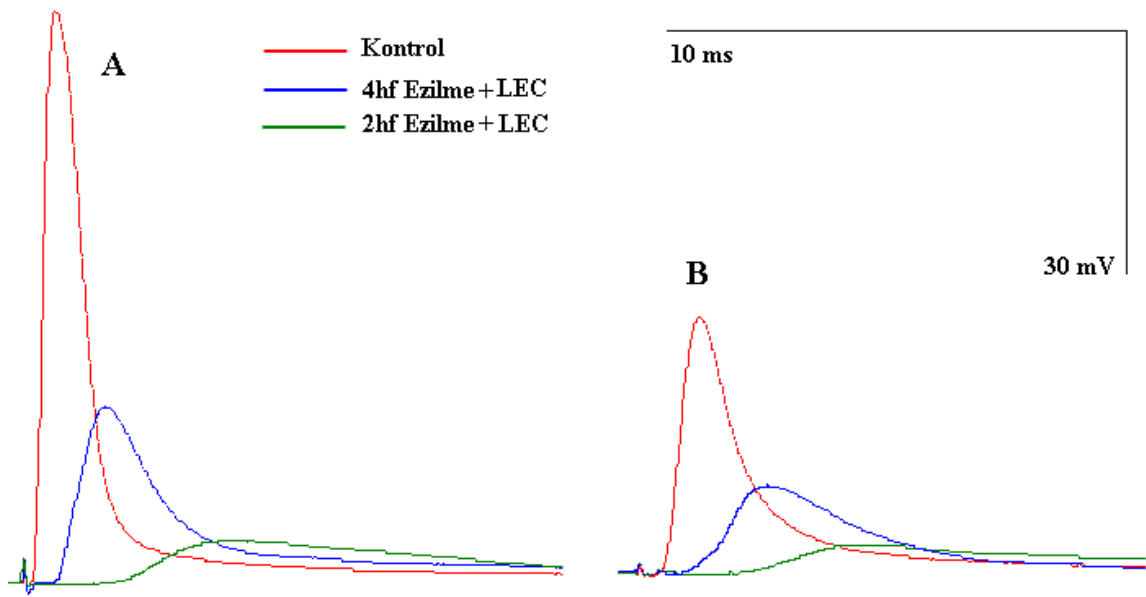
Çizelge 4.3. Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalarda (hf) Ezilme+LEC gruplarına ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. hf değişimlerin tümü $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A Ezilme+LEC grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri				
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	Latans (ms)
Kontrol	67,4 $\pm$ 1,7	0,49 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,01
2hf+E+LEC	6,2 $\pm$ 1,1	2,31 $\pm$ 0,30	4,11 $\pm$ 0,50	1,97 $\pm$ 0,10
4hf+E+LEC	21,6 $\pm$ 1,4	1,20 $\pm$ 0,05	1,24 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,03

B Ezilme+LEC grubu Sural sinire ait BAP parametreleri				
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	Latans (ms)
Kontrol	33,8 $\pm$ 3,1	0,81 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,02
2hf+E+LEC	3,9 $\pm$ 0,5	2,70 $\pm$ 0,20	1,89 $\pm$ 0,20	2,26 $\pm$ 0,10
4hf+E+LEC	9,5 $\pm$ 1,4	1,64 $\pm$ 0,06	1,67 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,03

İlk 2 hafta düzenli olarak her gün, aynı saatte, aynı kişi tarafından 150 µl LEC enjekte edildikten sonra 2. ve 4. haftalarda tibial ve sural sinirleri çıkarılarak BAP kayıtları alındı.

4. haftada tonik uyarılarda Ezilme+LEC grubuna ait ortalama BAP genliği tibial sinirde $21,6 \pm 2,4$ mV, BAP YS $1,20 \pm 0,05$ ms ve $\frac{1}{2}$ DS $1,24 \pm 0,06$ ms olarak ölçüldü. Sural sinirde ise ortalama BAP genliği $9,5 \pm 1,4$ mV, BAP YS $1,64 \pm 0,06$ ms ve $\frac{1}{2}$ DS $1,67 \pm 0,07$ ms ölçüldü (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3). Latans, kontrol değerlerine göre oldukça düşüktü. Sırasıyla latans tibial sinirde $0,73 \pm 0,03$ ms iken sural sinirde $1,15 \pm 0,03$ ms olarak ölçüldü.



Şekil 4.3. Kontrol grubu, 2 ve 4 hafta (hf) Ezilme+LEC gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. **A)** Tibial sinirden kayıtlanan, **B)** Sural sinirden kayıtlanan BAP kayıtlarıdır. 2. ve 4. haftaya ait BAP'ların diğer gruplara göre repolarizasyon fazının belirgin uzadığı görülmektedir.

4.1.4 Ezilme+Kombine gruplarına ait Tibial ve Sural sinir BAP bulguları

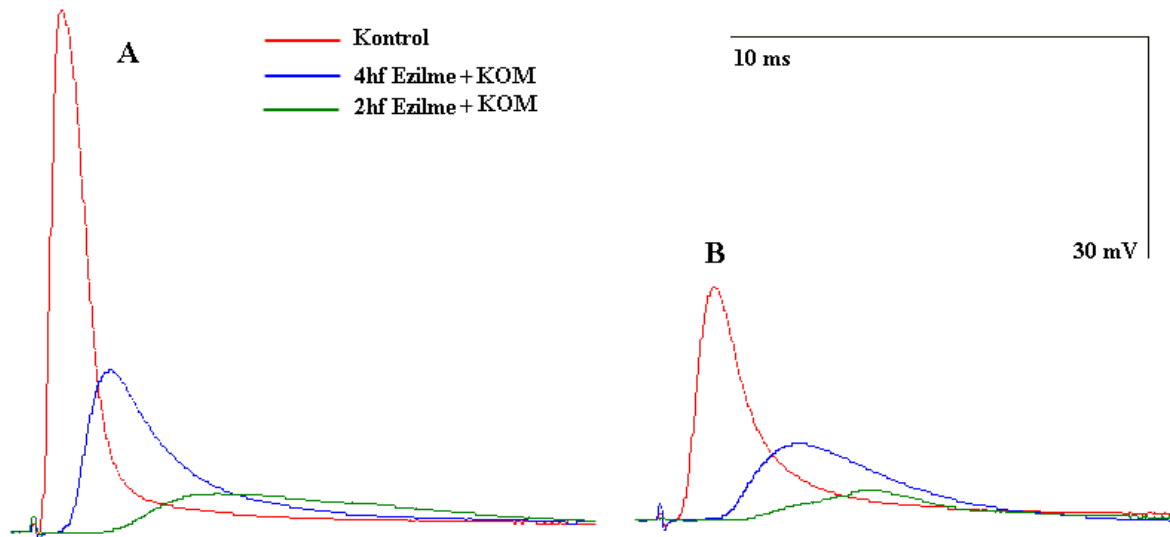
Ezilme+Kombine grubunda bulunan deney hayvanlarının cerrahi operasyonla önce sağ siyatik sinirleri ezildi ve subkutan olarak rezervuar yerleştirildi. İlk 2 hafta düzenli olarak her gün, aynı saatte, aynı kişi tarafından 150 µl LEC enjekte edildikten sonra, günde 1 saat PMA'ya maruz bırakıldılar.

Çizelge 4.4. Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2 ve 4 hafta (hf) Ezilme+Kombine grubuna ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A Ezilme+Kombine grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri				
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	Latans (ms)
Kontrol	$67,4 \pm 1,7$	$0,49 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,01$
2hf+E+KOM	$6,1 \pm 1,3$	$2,41 \pm 0,30$	$4,24 \pm 0,40$	$1,98 \pm 0,10$
4hf+E+KOM	$20,4 \pm 1,3$	$1,21 \pm 0,04$	$1,31 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,02$

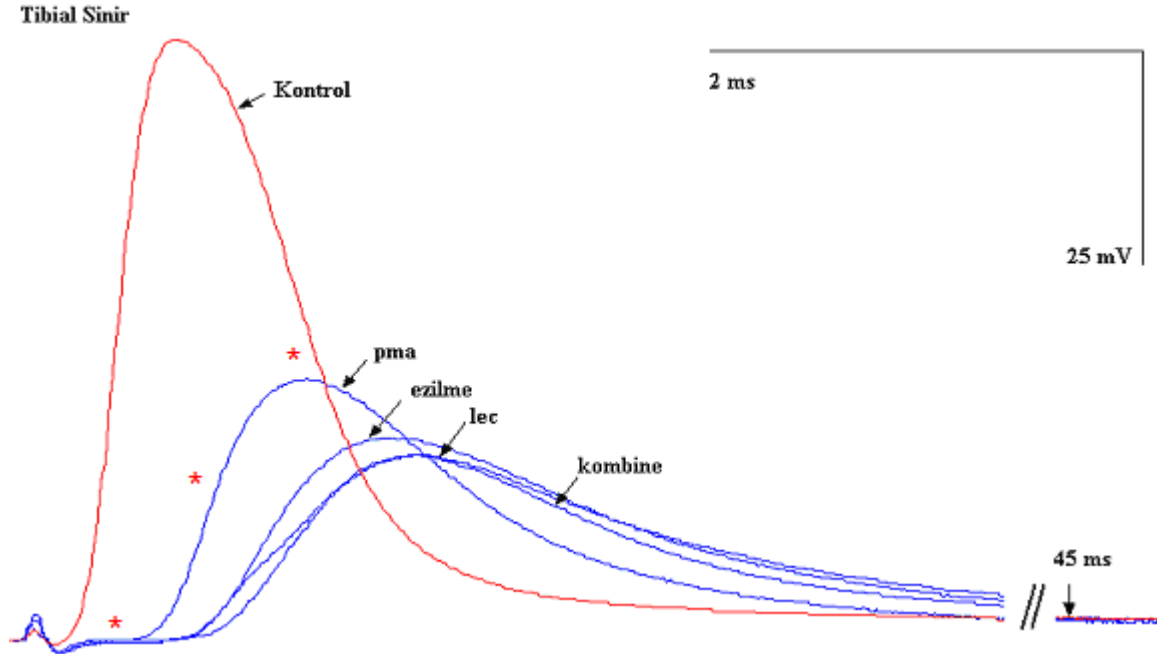
B Ezilme+Kombine grubu Sural sinire ait BAP parametreleri				
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	Latans (ms)
Kontrol	$33,8 \pm 3,1$	$0,81 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,02$
2hf+E+KOM	$3,8 \pm 0,5$	$2,74 \pm 0,20$	$2,02 \pm 0,20$	$2,30 \pm 0,10$
4hf+E+KOM	$9,1 \pm 0,7$	$1,72 \pm 0,05$	$1,66 \pm 0,09$	$1,19 \pm 0,04$

Bu deneklerin 2. ve 4. haftalarda tibial ve sural sinirleri çıkarılarak BAP kayıtları alındı. 4. haftada tonik uyarılarda Ezilme+Kombine grubuna ait ortalama BAP genliği tibial sinirde $20,4 \pm 1,3$ mV, BAP YS $1,21 \pm 0,04$ ms ve $\frac{1}{2}$ DS $1,31 \pm 0,04$ ms ölçüldü. Sural sinirde ise ortalama BAP genliği $9,1 \pm 0,7$ mV, BAP YS $1,72 \pm 0,05$ ms ve $\frac{1}{2}$ DS $1,66 \pm 0,09$ ms ölçüldü (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4). Ayrıntılı istatistiksel analizler Çizelge 4.5’te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kontrol grubu, 2 ve 4 hafta (hf) Ezilme+Kombine gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. **A)** Tibial sinirden kayıtlanan, **B)** Sural sinirden kayıtlanan BAP kayıtlarıdır.

4.1.5 Tibial sinir demetinin tüm ezilme gruplarında karşılaştırılması



Şekil.4.5 Tibial sinire ait Kontrol grubu ve 4 haftalık tüm ezilme gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları birlikte görülmektedir. (* PMA grubunun diğer gruplara göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu BAP parametreleridir.)

Çizelge 4.5 Tibial sinir demetinde ezilme sonrası 4 hafta boyunca PMA uygulamasına maruz bırakılan sıçanların diğer gruplarla istatistiksel açıdan karşılaştırılması verilmektedir. Aşağıda verilen BAP parametrelerindeki değişimlerin tümü $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır. Diğer BAP parametreleri açısından diğer gruplarla Ezilme+PMA grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p > 0,05$).

- 1 Ezilme grubu
- 2 Ezilme+PMA grubu
- 3 Ezilme+LEC grubu
- 4 Ezilme+Kombine grubu temsil etmektedir.

BAP (mV)		F	Sig.
Anova		7,747	0,001
Post-Hoc	1	2	0,024
	2	3	0,004
		4	0,001

Latans (ms)		F	Sig.
Anova		19,177	0,000
Post-Hoc	1	2	0,000
	2	3	0,000
		4	0,000

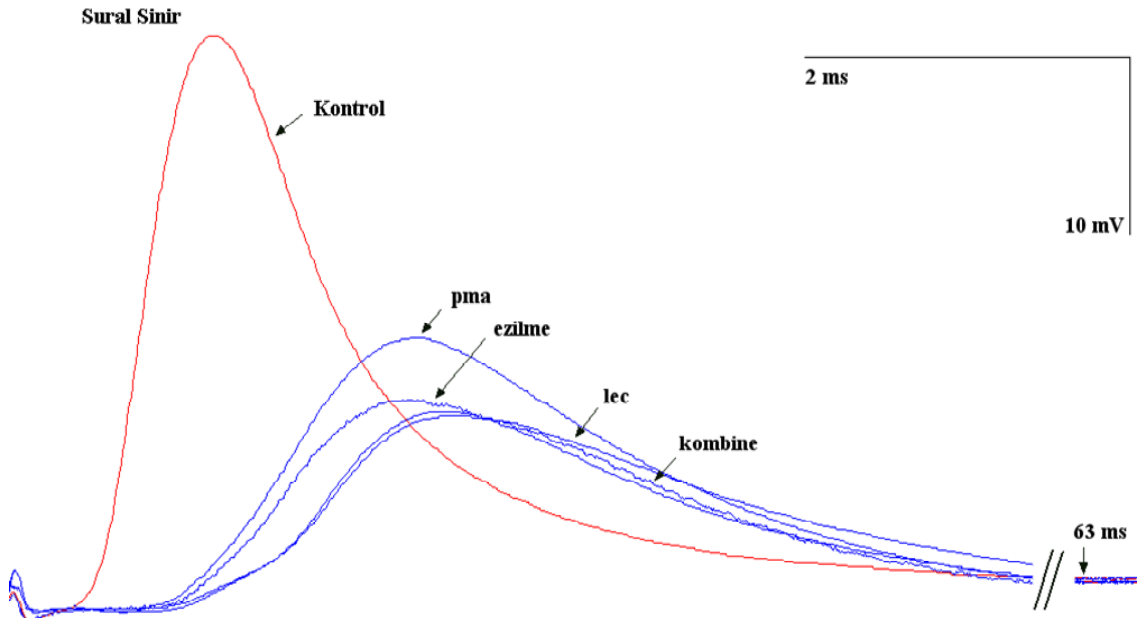
YS (ms)		F	Sig.
Anova		5,590	0,005
Post-Hoc	1	2	0,040
	2	3	0,010
		4	0,009

Ezilme sonrası post-operasyon odasına alınan, normal iyileşme sürecine bırakılan ve bu süreçte periyodik olarak PMA uygulamasına maruz bırakılan sıçanların tibial sinirleri 2. ve 4. haftalarda çıkarılarak BAP kayıtları alındı. 2 haftalık tüm gruplarda istatistiksel olarak fark olmadığından şekil olarak verilmedi. 2 haftalık BAP değerleri Çizelge 4.1-4'te rakamsal olarak $\pm$ SEM ifade edildi.

Tibial sinir demeti 4. hafta Ezilme+PMA grubunda diğer üç gruba göre BAP genliği anlamlı olarak ($p<0,05$) artarak $32,8\pm2,2$ mV seviyesine geldi. Diğer ezilme gruplarında ise sırasıyla $23,8\pm2,1$, $21,6\pm1,4$ ve $20,4\pm1,3$ olarak bulundu. PMA grubunda BAP genliği dışında YS, latans ve hız parametrelerinde de anlamlı farklar bulundu (Çizelge 4.5). Bu gruptan elde edilen ve anlamlı olan BAP değerleri diğer gruplara göre tamamen intak olan gruplardan elde edilen değerlere daha yakındı.

4.1.6 Sural sinir demetinin tüm ezilme gruplarında karşılaştırılması

4. hafta Ezilme+PMA grubunda sural sinir demetinden kayıtlanan BAP parametreleri diğer üç gruba göre daha iyi durumda olmasına rağmen fark anlamsızdı ($p>0,05$). PMA grubunda BAP genliği $13,4\pm1,2$ mV olarak bulundu bu değer diğer gruplara göre kontrol değerlerine daha yakındı. Ezilme grubunda BAP genliği $9,7\pm0,7$ mV, LEC grubunda $9,5\pm1,4$ mV ve Kombine grupta $9,1\pm0,7$ mV olarak bulundu (Şekil4.6).

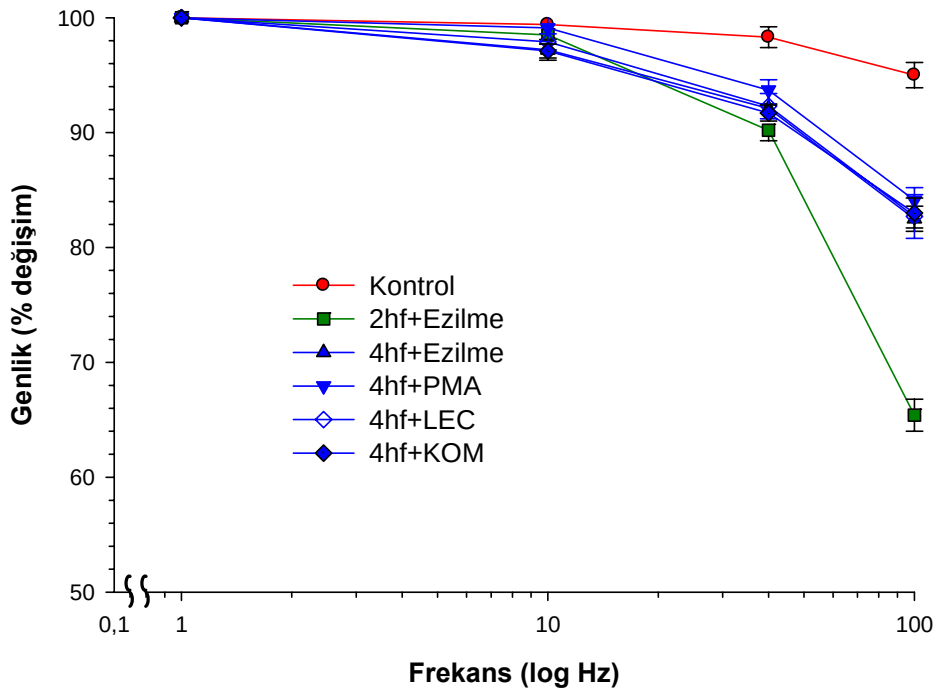


Şekil 4.6 Sural sinire ait Kontrol grubu ve 4 haftalık tüm ezilme gruplarına ait tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları birlikte görülmektedir.

4.1.7 Tibial ve Sural sinir demetinde BAP Genlik-Frekans ilişkisi

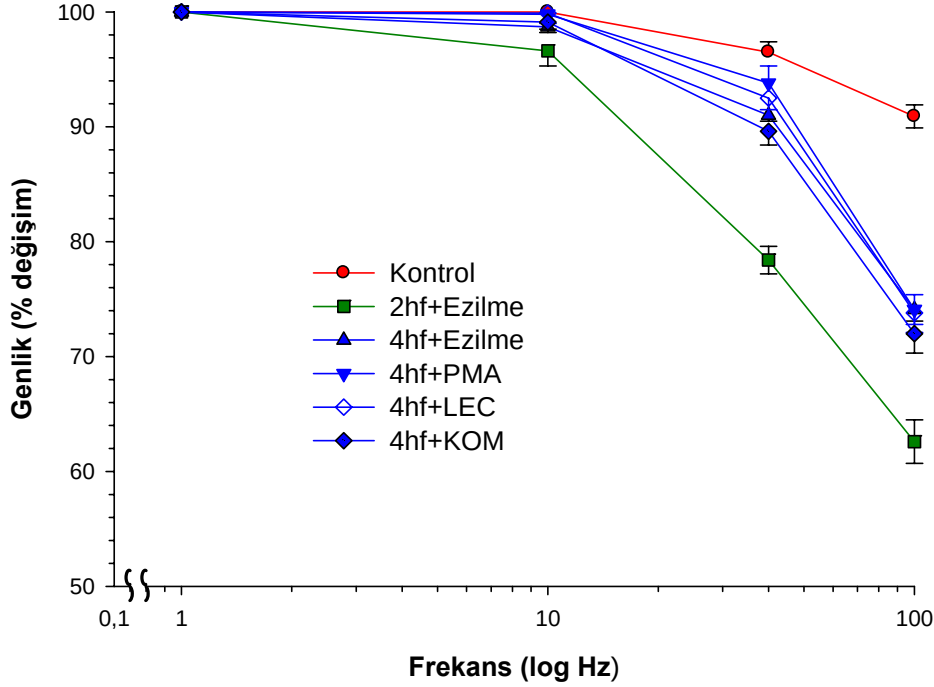
Tonik uyarılarda dakikada bir uyarı, fazik uyarımlar da ise 10, 40 ve 100 Hz frekanslı, 20 pulstan oluşan uyarı puls trenleri uygulandı. Tibial sinirde genlik-frekans ilişkisi özellikle 40 ve 100 Hz'lik uyarımlardan kaydedilen en son BAP'ların arasındaki değişimlerden elde edildi. Fazik uyarımlar sırasında BAP genliklerindeki düşmeler fazik blok olarak tanımlandı.

Uyarım frekansının artırılması ile (özellikle 40-100 Hz) dejenerasyon-rejenerasyon sürecinin ilk 2 haftasında tibial sinir demetinde çok yüksek fazik inhibisyon meydana geldiği Şekil 4.7'de açıkça görülmektedir. 2. haftada 40 ve 100 Hz uyarım frekansı sırasıyla genliği ortalama $90,2 \pm 0,9$ ve $65,4 \pm 1,4$ değerine kadar inhibe ederken, bu durum kontrol grubunda ortalama $98,3 \pm 0,9$ ve $95,0 \pm 1,1$ iken 4hf+Ezilme+PMA grubunda $93,7 \pm 0,9$ ve $84,1 \pm 1,1$ olarak bulundu. PMA, LEC ve diğer ezilme grupları arasındaki frekansa bağlı fazik genlik inhibisyon değerleri, aynı haftalara ve uyarı frekansına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü ($p > 0,05$).



Şekil 4.7 Tibial sinir demetinde kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri.

Sural sinirde ise, özellikle 40-100 Hz uyarı frekanslarında, 2. haftada tibial sinirden daha fazla fazık inhibisyon meydana geldiği Şekil 4.8’de açıkça görülmektedir.



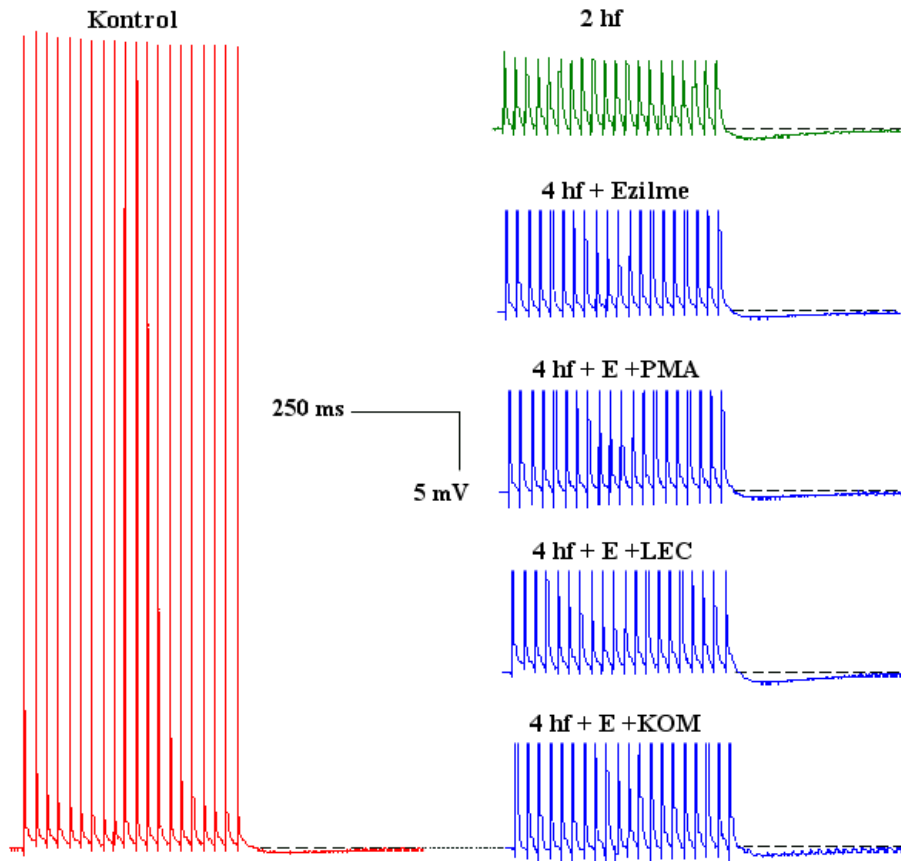
Şekil 4.8 Sural sinir demetinde kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri.

İkinci haftada 40 ve 100 Hz uyarım frekansı sırasıyla genliği ortalama $78,4 \pm 1,2$ ve $62,6 \pm 1,9$ değerine kadar inhibe ederken, bu durum kontrol grubunda ortalama $96,5 \pm 0,9$ ve $90,9 \pm 1,0$, 4hf+Ezilme+PMA grubunda $93,8 \pm 1,2$ ve $74,1 \pm 1,9$ olarak bulundu. PMA, LEC ve diğer ezilme grupları arasındaki frekansa bağlı fazık genlik inhibisyon değerleri, aynı haftalara ve uyarı frekansına göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü ($p > 0,05$).

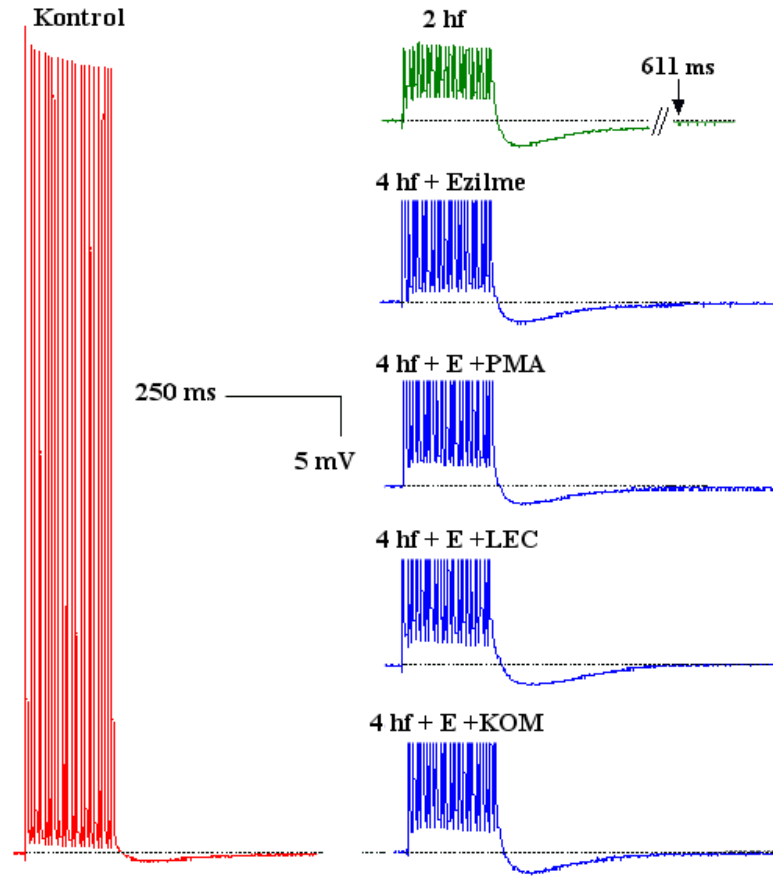
Fakat tibial sinir demetinde de kontrole göre 2-4 hafta arasında yapılan iki yönlü varyans analizlerinde 100 Hz deki tüm değişimler ve sural sinirde ise 40-100 Hz değişimler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

4.1.8 Tibial ve Sural sinirde Hiperpolarize Edici Ard Potansiyeller

Kontrol ve Ezilme gruplarında tonik ve 10 Hz gibi düşük fazik uyarımlarda pek görülmeyen HAP'lar özellikle 40 ve 100 Hz uyarım frekansında çok daha belirgin halde ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.9-10). Tibial sinirde 40 ve 100 Hz uyarım frekansında HAP genliği kontrol grubunda sırasıyla $0,27 \pm 0,08$ ve $0,62 \pm 0,08$ mV, 2 hafta grubunda $1,00 \pm 0,05$ ve $1,55 \pm 0,18$ mV, 4 hafta Ezilme+PMA grubunda ise $0,76 \pm 0,12$ ve $1,46 \pm 0,13$ mV olarak bulundu. 2 ve 4 haftalık deney gruplarında V_{HAP} genliğinin kontrole göre daha yüksek bir değer almaktadır ve uyarı frekansının artmasıyla (40→100 Hz) bu farkın daha da arttığı görüldü (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Tibial sinir demetinde kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.



Şekil 4.10 Tibial sinir demetinde kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir. Uyarı frekansının artmasıyla HAP genliği artmakta, süresi ise kısalmaktadır.

Tibial sinirde 40 ve 100 Hz uyarım frekansında HAP'ın süresi T_{HAP} kontrol grubunda sırasıyla 345 ± 23 ms ve 275 ± 21 ms, 4 hafta PMA grubunda 360 ± 27 ms ve 317 ± 22 ms, 4 hafta Ezilme+LEC grubunda ise 419 ± 44 ms ve 324 ± 28 ms olarak bulundu. 40 ve 100 Hz uyarım frekansında 2 haftalık deney gruplarında T_{HAP} kontrole göre yaklaşık iki kat uzarken, 40 Hz'de 4 haftalık Ezilme ve PMA gruplarında fazla değişmedi fakat 40 Hz' de LEC ve Kombi gruplarında T_{HAP} 'ın bir miktar uzadığı ve bu uzamanın 100 Hz'de ortadan kalktığı görüldü (Çizelge 4.6). Tibial sinirde 40 ve 100 Hz uyarım frekansında 2 ve 4 haftalık gruplarda V_{HAP} genlik değerinin kontrole göre anlamlı düzeyde yükseldiği görülürken, bu fark 2. ve 4. hafta grupları arasında anlamsızdı ($p > 0,05$). 40 ve 100 Hz'te 2. haftada görülen T_{HAP} süresinin yaklaşık iki kat uzaması kontrol ve 4 haftalık deney gruplarına göre anlamlı bulunurken, 4 haftalık gruplardaki değişimler ise birbirlerine ve kontrole göre anlamsız bulundu ($p > 0,05$) (Şekil 4.9 , Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme (E) sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait HAP 40 ve 100 Hz değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

Tibial Sinir

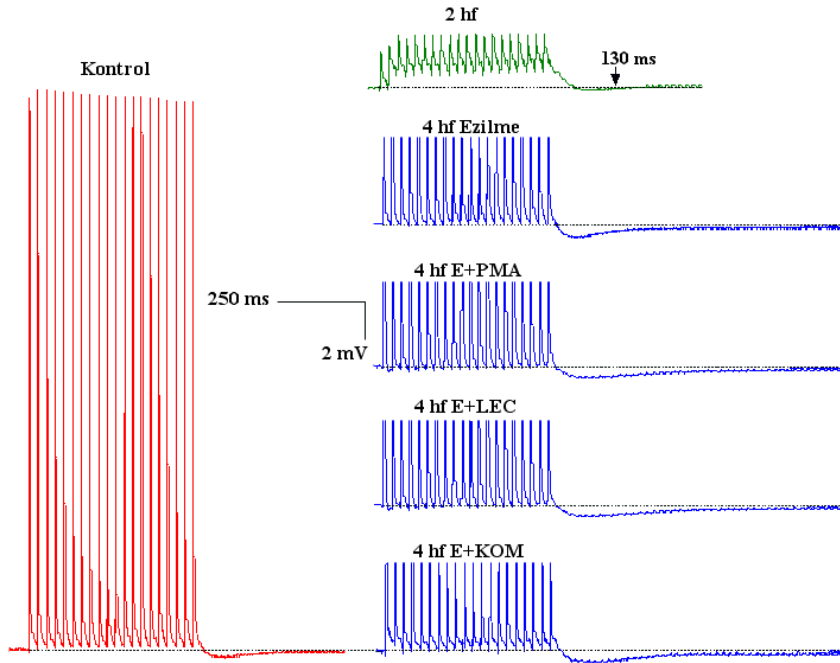
Gruplar	40 Hz		100 Hz	
	V_{HAP} (mV)	T_{HAP} (ms)	V_{HAP} (mV)	T_{HAP} (ms)
Kontrol	$0,27 \pm 0,08$	345 ± 23	$0,62 \pm 0,08$	275 ± 21
2hf+Ezilme	$1,00 \pm 0,05$	611 ± 40	$1,55 \pm 0,18$	653 ± 44
4hf+Ezilme	$0,80 \pm 0,10$	334 ± 27	$1,51 \pm 0,13$	317 ± 22
4hf+E+PMA	$0,76 \pm 0,12$	360 ± 27	$1,46 \pm 0,13$	320 ± 20
4hf+E+LEC	$0,96 \pm 0,14$	419 ± 44	$1,53 \pm 0,16$	324 ± 28
4hf+E+KOM	$0,88 \pm 0,10$	443 ± 23	$1,56 \pm 0,19$	330 ± 21

Sural Sinir

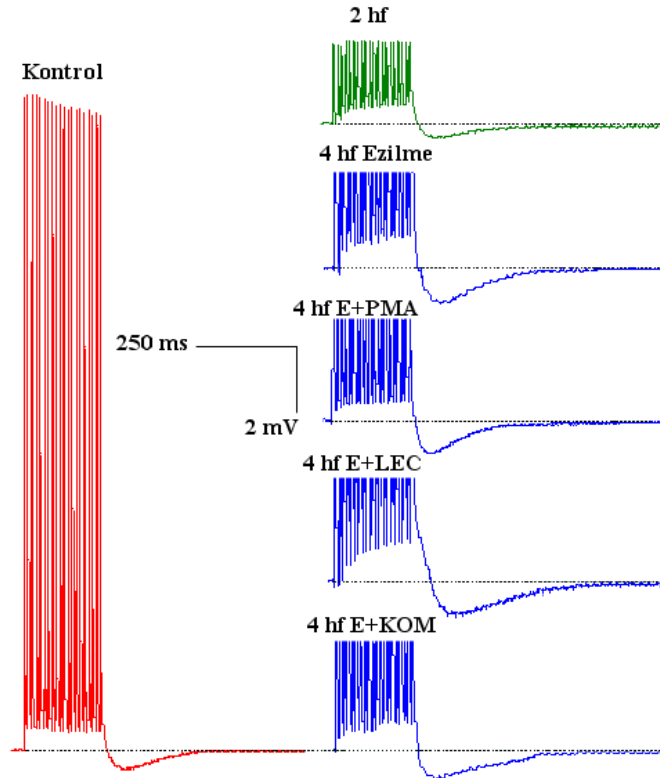
Kontrol	$0,49 \pm 0,04$	246 ± 20	$0,94 \pm 0,17$	235 ± 16
2hf+Ezilme	$0,27 \pm 0,05$	130 ± 11	$0,76 \pm 0,09$	324 ± 25
4hf+Ezilme	$0,75 \pm 0,11$	639 ± 43	$1,60 \pm 0,19$	391 ± 52
4hf+E+PMA	$0,72 \pm 0,12$	581 ± 47	$1,36 \pm 0,11$	339 ± 41
4hf+E+LEC	$0,79 \pm 0,09$	621 ± 46	$1,58 \pm 0,18$	376 ± 62
4hf+E+KOM	$0,84 \pm 0,09$	645 ± 54	$1,41 \pm 0,15$	415 ± 30

Sural sinirde ise 40 Hz ve 100 Hz uyarım frekansında HAP genliği V_{HAP} , kontrol grubunda sırasıyla $0,49 \pm 0,04$ mV ve $0,94 \pm 0,17$ mV iken, 2 hafta grubunda tibial sinirden farklı olarak uyarı frekansının artmasıyla V_{HAP} $0,27 \pm 0,05$ mV ve $0,76 \pm 0,09$ mV olarak daha düşük ölçüldü (Şekil 4.10). 4 hafta Ezilme+PMA grubunda ise $0,72 \pm 0,12$ mV ve $1,36 \pm 0,11$ mV olarak bulundu. 4 haftalık deney gruplarında V_{HAP} genliği kontrole göre daha yüksek bir değer almaktadır ve uyarı frekansının artmasıyla (40→100 Hz) bu farkın daha da büyüdüğü görülmektedir. Sural sinirde HAP'ın süresi (T_{HAP}) tibial sinirden farklı olarak kontrol değerlerine göre özellikle 40 Hz'te daha da artmaktadır (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.10).

Sural sinirde ise 40 Hz'te kontrol grubu ile deney grupları arasında V_{HAP} genlik değeri açısından fark anlamsız iken 2. haftaya ait V_{HAP} değeri 4 haftalık gruplara göre anlamlı düzeyde düşük bulundu. 4 hafta grupları arasında ise fark olmadığı görüldü. 100 Hz'te ise 4 hafta Ezilme ve LEC grubu HAP genliği; kontrol ve 2 haftaya göre anlamlı olarak daha yüksek iken bu değer PMA grubunda kontrol değerine yakın olduğundan istatistiksel olarak anlamsızdı. 40 Hz'de 4 haftalık deney gruplarından elde edilen T_{HAP} süresi kontrole göre anlamlı düzeyde uzarken, bu durum 2 hafta grubunda tibial sinirden farklı olarak daha düşük bulundu. 100 Hz uyarım frekansında sadece 4 hafta+Kombine gruptaki T_{HAP} süresinin uzaması kontrole göre anlamlı iken, diğer 4 haftalık gruplarda bu fark anlamsızdı ($p > 0,05$).



Şekil 4.11 Sural sinir demetinde kontrol, 2. ve 4. haftalara ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.



Şekil 4.12 Sural sinir demetinde kontrol, 2. ve 4. haftalara ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.

Uyarı frekansının artmasıyla HAP genliği artmakta, süresi ise kısalmaktadır.

4.1.9 Dejenerasyon-Rejenerasyon sürecinde 4-AP'nin BAP'lar üzerine etkisi

4.1.9.1 Ezilme gruplarında 4-AP'nin BAP bulguları

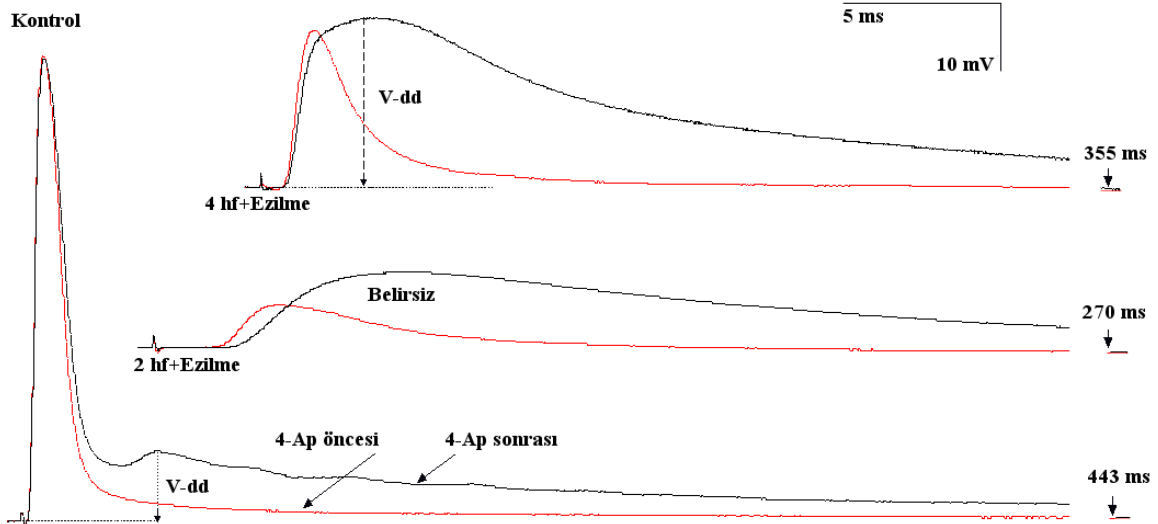
Ezilme sonrası tibial ve sural sinire sukroz-gap yöntemi ile in-vitro koşullarda 2 mM 4-AP uygulanması 2. ve 4. haftalarda genliği ilaç öncesine göre artırırken, kontrol grubunda aksine bir düşüş meydana getirdi. Deney gruplarında BAP genliğindeki bu artış 2 haftalık gruplarda daha fazla olurken, 4 haftalık gruplarda daha az bir artış olduğu görüldü. Tüm gruplarda 4-AP etkisi ile BAP'lara ait süre parametreleri uzadı.

4-AP hızlı kinetikli voltaj-kapılı K^+ kanallarını blokladığından her iki sinirde de farklı oranlarda yavaş Na^+ akımlarından kaynaklanan gecikmiş depolarizasyonlar (V-dd) meydana geldi. Kontrol grubuna ait tibial sinirde; V-dd genliği ve bunun BAP'a oranı sırasıyla $9,1 \pm 0,8$ mV ve $\%13,8 \pm 1,3$ iken, sural sinirde $13,9 \pm 1,4$ mV ve $\%41,2 \pm 3,7$ olarak bulundu. 2 haftalık ezilme gruplarında her iki sinirde de gecikmiş depolarizasyon genliği ile normal BAP genliği birbirinden ayırlamadığı için sağlıklı ölçüm yapılamadı bu Çizelge 4.7'de belirsiz olarak yazıldı. 4 hf+Ezilme grubunda tibial sinir de V-dd $25,7 \pm 1,4$ mV ve $\%100 \pm 2$ iken sural sinirde $12,2 \pm 1,0$ mV ve $\%112 \pm 2$ olarak bulundu.

Çizelge 4.7. 2mM 4-AP sonrası tibial ve sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

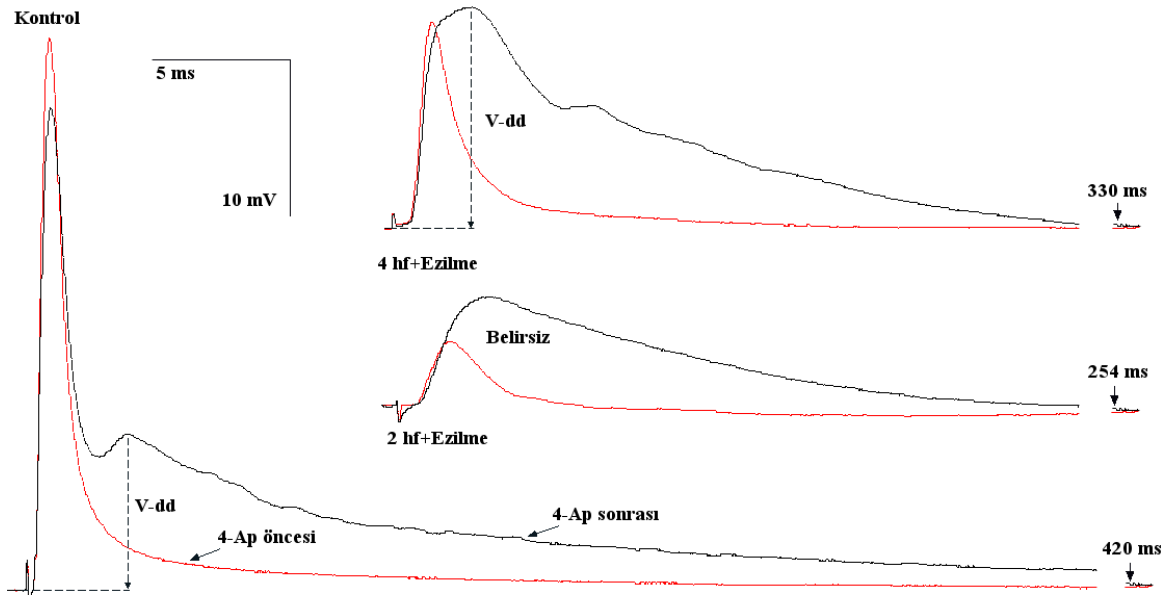
A 4-AP sonrası Ezilme grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	$66,2 \pm 1,2$	$0,52 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,02$	$9,1 \pm 0,8$	$13,8 \pm 1,3$
2hf+Ezilme	$10,7 \pm 1,7$	$5,12 \pm 0,50$	$8,90 \pm 1,00$	belirsiz	belirsiz
4hf+Ezilme	$25,6 \pm 1,6$	$1,46 \pm 0,06$	$6,62 \pm 0,80$	$25,7 \pm 1,4$	100 ± 2

B 4-AP sonrası Ezilme grubu Sural sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	$33,2 \pm 3,6$	$0,87 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,02$	$13,9 \pm 1,4$	$41,2 \pm 3,4$
2hf+Ezilme	$6,5 \pm 0,5$	$3,99 \pm 0,40$	$6,32 \pm 0,90$	belirsiz	belirsiz
4hf+Ezilme	$10,9 \pm 1,0$	$1,95 \pm 0,10$	$5,69 \pm 0,40$	$12,2 \pm 1,0$	112 ± 2



Şekil 4.13 Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık Ezilme gruplarına ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.

4-Ap uygulamasıyla her iki sinir demetinde de hızlı K^+ kanallarının bloklanması ile yavaş Na^+ akımlarından kaynaklanan gecikmiş depolarizasyonlar (V-dd) asıl BAP genliğinin de üzerinde bir değerde olduğu Şekil 4.13-14'de açıkça görülmektedir. Bu sebepten dolayı V-dd/BAP oranı doğal olarak %100'ün üzerine çıkmaktadır.



Şekil 4. 14 Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık Ezilme gruplarına ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.

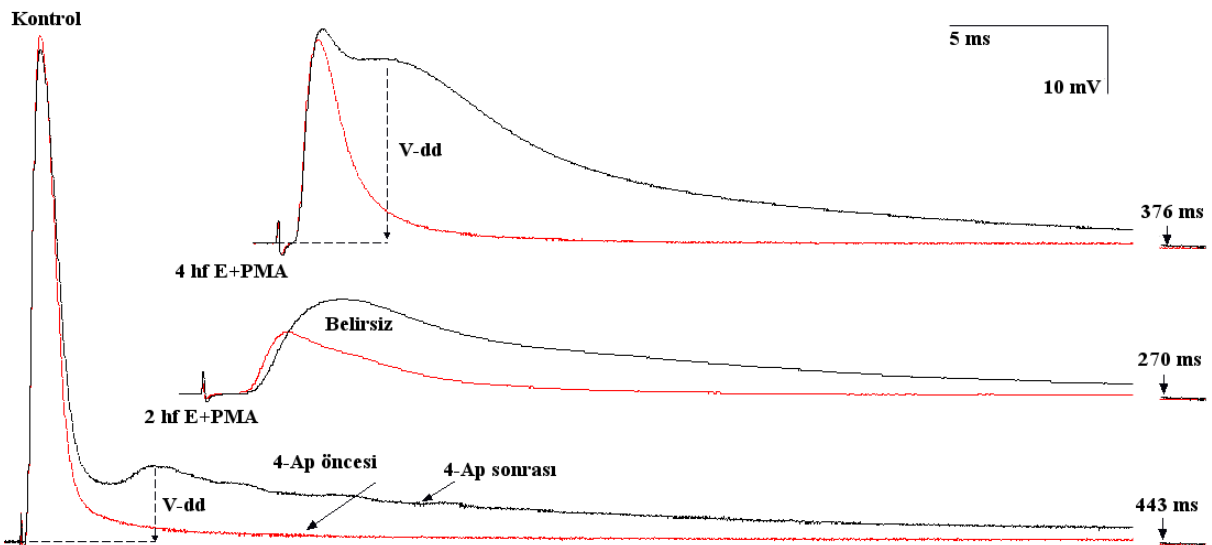
4.1.9.2 Ezilme+PMA gruplarında 4-Ap'nin BAP bulguları

4-Ap sonrası PMA grubunda her iki sinirde de BAP parametreleri diğer gruplara göre daha az uzadı. Tibial sinirde PMA etkisiyle 4-Ap sonrası genlik LEC ve Kombine gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,05$), Ezilme grubuna göre anlamsızdı ($p>0,05$). 4-Ap sonrası BAP'ın Yükselme ve Yarı-düşme süreleri PMA grubunda sadece Kombine grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8. 2mM 4-Ap sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A 4-Ap sonrası Ezilme+PMA grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	65,1 $\pm$ 1,2	0,52 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	9,3 $\pm$ 0,8	14,3 $\pm$ 1,3
2hf+E+PMA	10,5 $\pm$ 1,7	5,02 $\pm$ 0,40	8,84 $\pm$ 1,00	belirsiz	belirsiz
4hf+E+PMA	31,9 $\pm$ 2,1	1,21 $\pm$ 0,07	5,08 $\pm$ 0,40	25,2 $\pm$ 2,3	78,9 $\pm$ 4,7

B 4-Ap sonrası Ezilme+PMA grubu Sural sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	35,4 $\pm$ 3,6	0,87 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,02	13,9 $\pm$ 1,4	39,3 $\pm$ 3,4
2hf+E+PMA	6,6 $\pm$ 0,5	3,93 $\pm$ 0,40	6,31 $\pm$ 0,90	belirsiz	belirsiz
4hf+E+PMA	13,2 $\pm$ 1,3	1,91 $\pm$ 0,10	4,41 $\pm$ 0,30	13,4 $\pm$ 1,3	102 $\pm$ 1



Şekil 4.15 Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+PMA grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği diğer grupların aksine PMA etkisi ile BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.

Çizelge 4.9 Tibial sinir demetinde ezilme sonrası 4 hafta boyunca PMA uygulamasına maruz bırakılan sıçanların 2mM 4-Ap uygulaması sonrası diğer gruplarla istatistiksel açıdan karşılaştırılması verilmektedir. Aşağıda verilen BAP parametrelerindeki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. Diğer BAP parametreleri açısından diğer gruplarla Ezilme+PMA grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). V-dd/BAP oranı PMA etkisiyle anlamlı düzeyde düşük bulundu.

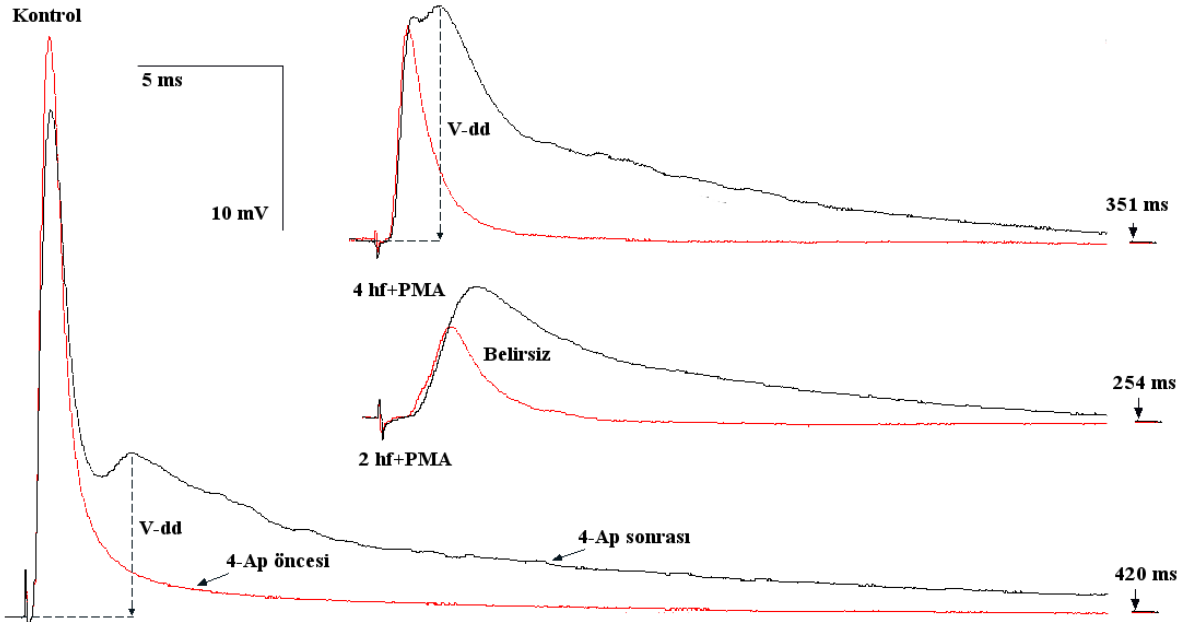
- 1 Ezilme grubu
- 2 Ezilme+PMA grubu
- 3 Ezilme+LEC grubu
- 4 Ezilme+Kombine grubu temsil etmektedir.

BAP (mV)		F	Sig.
Anova		6,636	0,002
Post-Hoc	2	3	0,005
		4	0,003

YS (ms)		F	Sig.
Anova		5,382	0,006
Post-Hoc	2	4	0,009

$\frac{1}{2}$ DS (ms)		F	Sig.
Anova		7,986	0,000
Post-Hoc	2	4	0,001

% V-dd/BAP		F	Sig.
Anova		15,366	0,000
Post-Hoc	2	1	0,023
		3	0,011
		4	0,011

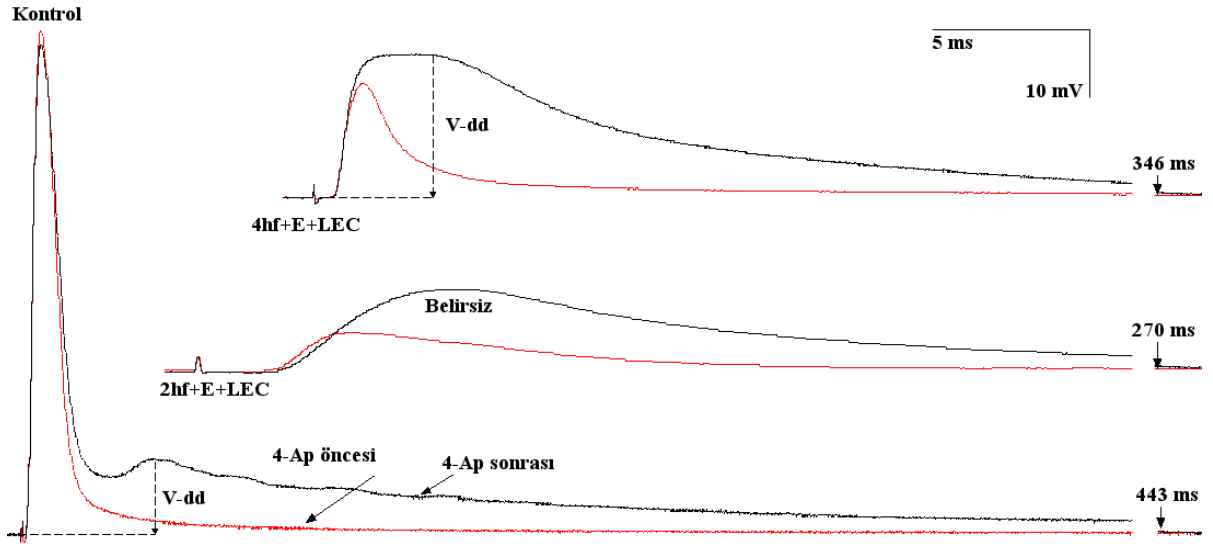


Şekil 4.16 Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık Ezilme+PMA grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği belirgin ve BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.

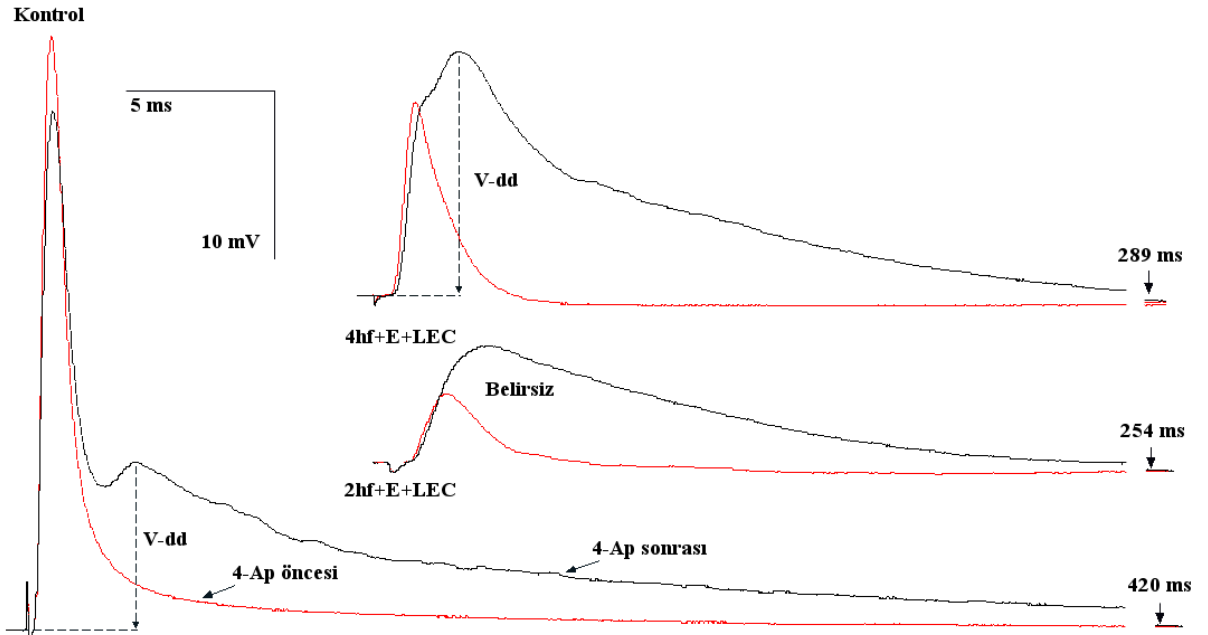
Tibial sinirde PMA uygulaması ile genlikte azda olsa bir artış görülse de diğer gruplara göre çok daha belirgin bir gecikmiş depolarizasyon ortaya çıktı (Şekil 4.15). PMA etkisi ile V-

dd' nin BAP'a oranı da diğer gruplara göre çok daha düşüktü ve bu sağlam kontrol değerlerine daha yakındı ($p<0,05$). Diğer BAP parametreleri açısından anlamlı fark bulunmadı. Sural sinirde ise PMA grubunda 4-Ap sonrası genlik bir miktar düşük bulundu. Tüm BAP parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

4.1.9.3 Ezilme+LEC gruplarında 4-Ap'nin BAP bulguları



Şekil 4.17 Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+LEC grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.



Şekil 4.18 Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+LEC grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.

Çizelge 4.10. 2mM 4-Ap sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A 4-Ap sonrası Ezilme+LEC grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	65,1 $\pm$ 1,2	0,52 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	9,3 $\pm$ 0,8	14,2 $\pm$ 1,3
2hf+E+LEC	10,8 $\pm$ 1,7	5,09 $\pm$ 0,50	8,90 $\pm$ 1,00	belirsiz	belirsiz
4hf+E+LEC	21,9 $\pm$ 3,0	1,38 $\pm$ 0,09	5,17 $\pm$ 0,70	22,8 $\pm$ 2,5	104 $\pm$ 2

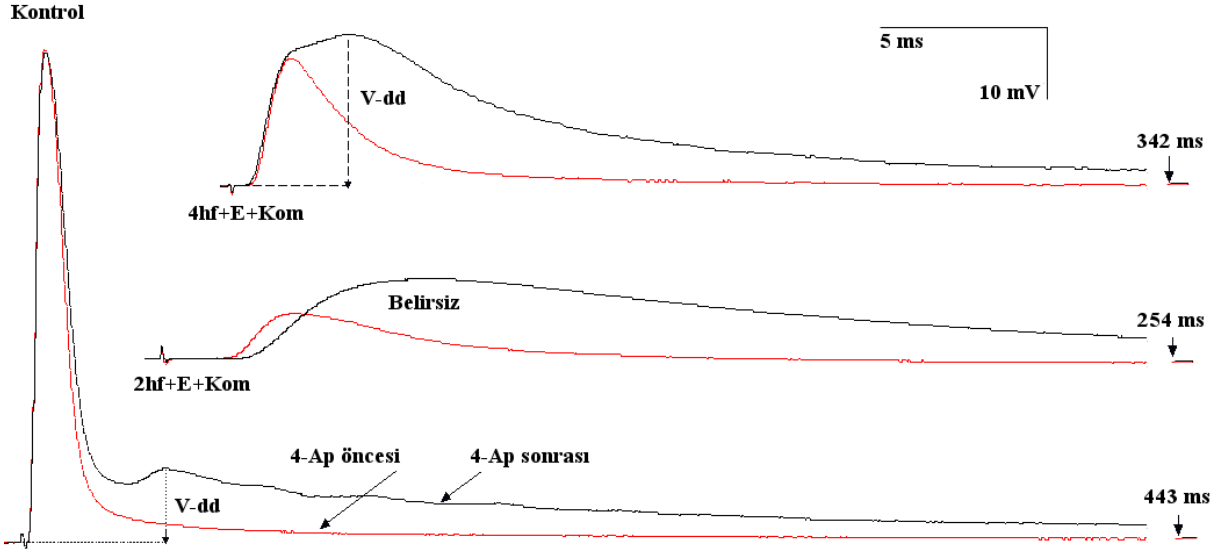
B 4-Ap sonrası Ezilme+LEC grubu Sural sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	35,4 $\pm$ 3,6	0,87 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,02	13,9 $\pm$ 1,4	39,3 $\pm$ 3,3
2hf+E+LEC	6,6 $\pm$ 0,5	4,00 $\pm$ 0,40	6,40 $\pm$ 0,90	belirsiz	belirsiz
4hf+E+LEC	10,3 $\pm$ 1,0	1,97 $\pm$ 0,10	5,91 $\pm$ 0,80	11,3 $\pm$ 1,2	111 $\pm$ 5

4.1.9.4 Ezilme+Kombine gruplarında 4-Ap'nin BAP bulguları

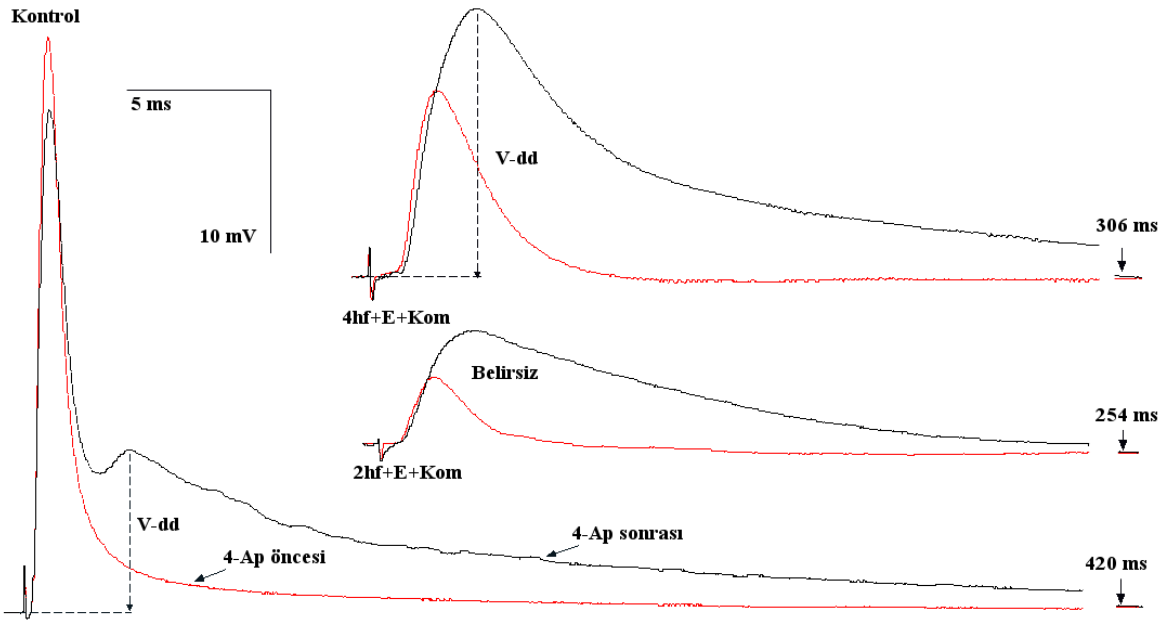
Çizelge 4.11. 2mM 4-Ap sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A 4-Ap sonrası Ezilme+Kombine grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	65,1 $\pm$ 1,2	0,52 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	9,3 $\pm$ 0,8	14,2 $\pm$ 1,3
2hf+E+KOM	11,2 $\pm$ 1,9	5,13 $\pm$ 0,50	9,00 $\pm$ 1,20	belirsiz	belirsiz
4hf+E+KOM	20,9 $\pm$ 1,3	1,72 $\pm$ 0,09	6,67 $\pm$ 2,60	21,9 $\pm$ 0,7	105 $\pm$ 1

B 4-Ap sonrası Ezilme+Kombine grubu Sural sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	35,4 $\pm$ 3,6	0,87 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,02	13,9 $\pm$ 1,4	39,3 $\pm$ 3,4
2hf+E+KOM	6,6 $\pm$ 0,5	4,15 $\pm$ 0,40	6,50 $\pm$ 0,90	belirsiz	belirsiz
4hf+E+KOM	11,3 $\pm$ 1,1	2,07 $\pm$ 0,04	6,04 $\pm$ 0,80	13,8 $\pm$ 1,1	111 $\pm$ 3



Şekil 4.19 Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+KOM grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.



Şekil 4.20 Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+KOM grubuna ait 4-Ap uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğine sahip BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almaktadır.

4.1.9.5 Tibial ve Sural sinir demetinde 4-Ap sonrası BAP Genlik-Frekans ilişkisi

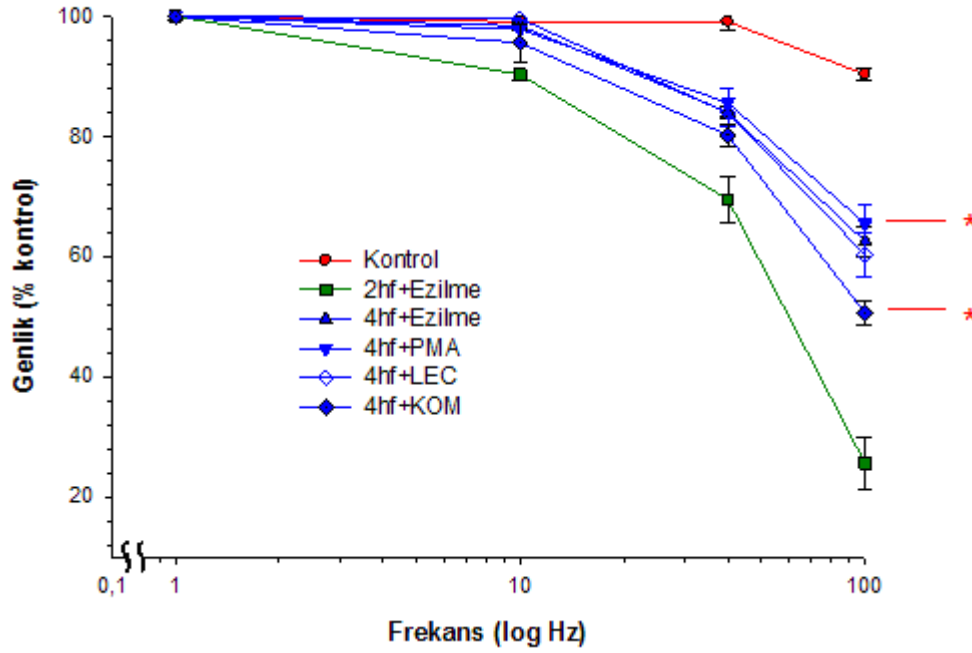
Uyarım frekansının artmasıyla tüm gruplarda meydana gelen fazik bloğun daha da arttığı daha önce Şekil 4.7 ve 8' gösterilmişti. Hızlı K^+ kanal blokörü olan 4-Ap'nin 30 dk boyunca uygulanması, zaten var olan inhibisyonları daha da artırdı.

Tibial sinirde 10 Hz uyarım frekansında anlamlı hiçbir fark bulunmadı fakat sural sinirde, 4-Ap'nin ezilmiş sinirlerde BAP genliğini ilaç öncesine göre arttırması nedeni ile

meydana gelen fazık inhibisyonlar, kontrol değerlerinin de üzerinde bulundu. Bu artış 2 hafta grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,05$) diğer gruplarla anlamlı değildi ($p>0,05$).

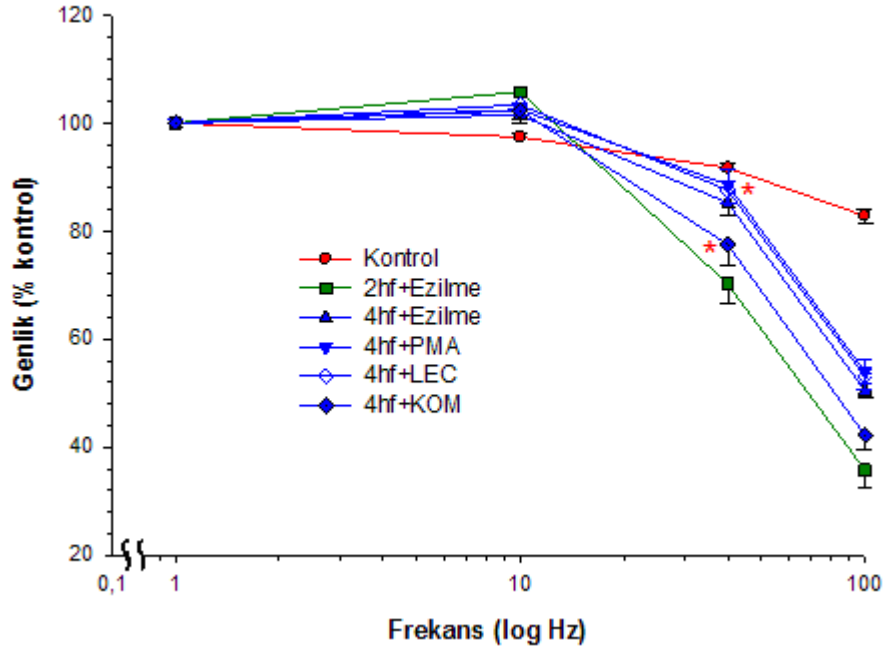
Tibial sinir demetinde 4-Ap etkisiyle; 40 Hz uyarım frekansında 4 hafta PMA grubu hariç, tüm deney gruplarında kontrole göre anlamlı derecede daha fazla blok meydana geldi. 2 ve 4 hafta arasında ise gruplar arası fark anlamsızdı.

Sural sinirde ise 40 Hz’te, 2 hafta ve 4 hafta ezilme+Kombine grupta fazık blok anlamlı düzeyde yüksek bulundu. 2.haftadaki fazık blok 4 hafta kombine grubu hariç diğer 4 haftalık gruplara göre de anlamlı inhibisyon gösterdi ($p<0,05$). Ayrıca 40 Hz uyarım frekansında 4 hafta PMA grubu ile Kombine grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$) (Şekil 4.21 ve 22).



Şekil 4.21 Tibial sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri. * PMA ile Kombine grup arasında $p<0,05$ düzeyinde anlamlılık vardır.

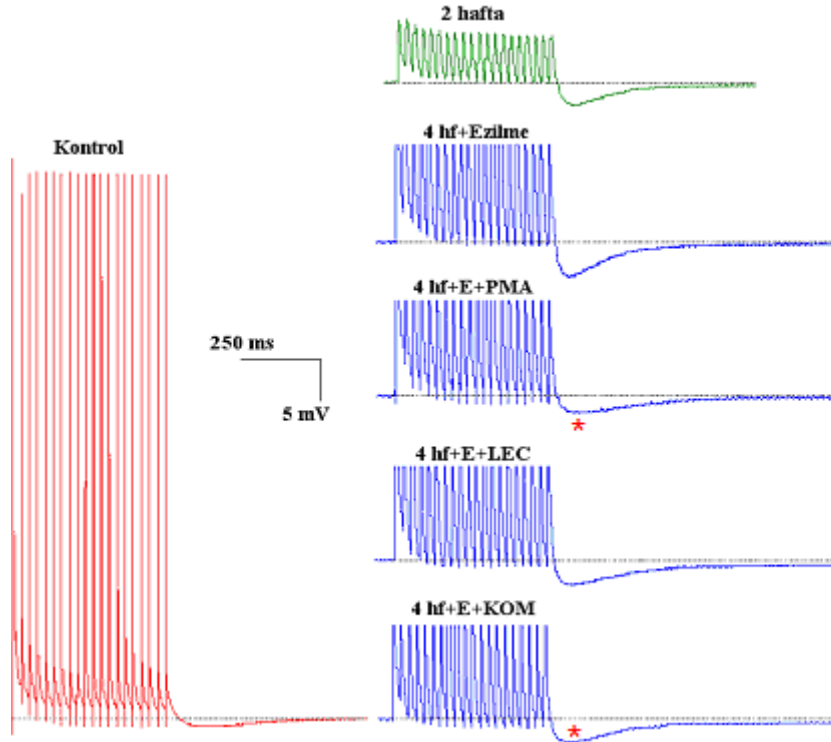
100 Hz uyarım frekansında tibial sinirde, tüm gruplarda kontrollere göre daha fazla blok meydana geldi. 2. haftada 4 haftalık gruplara göre anlamlı düzeyde fazık blok meydana gelirken bu fark 4 haftalık gruplar arasında anlamlı değildi. 100 Hz Sural sinir demetinde ise 2 ve 4. haftada meydana gelen fazık bloklar, kontroller göre anlamlı düzeyde yüksek gerçekleşti. 4 hafta Kombine grupta meydana gelen fazık blok 2. haftadaki blok değerine yakın olmasına rağmen anlamsız bulundu. Ayrıca Kombine grupta PMA ve LEC grubuna göre anlamlı düzeyde daha fazla inhibisyon meydana geldi ($p<0,05$).



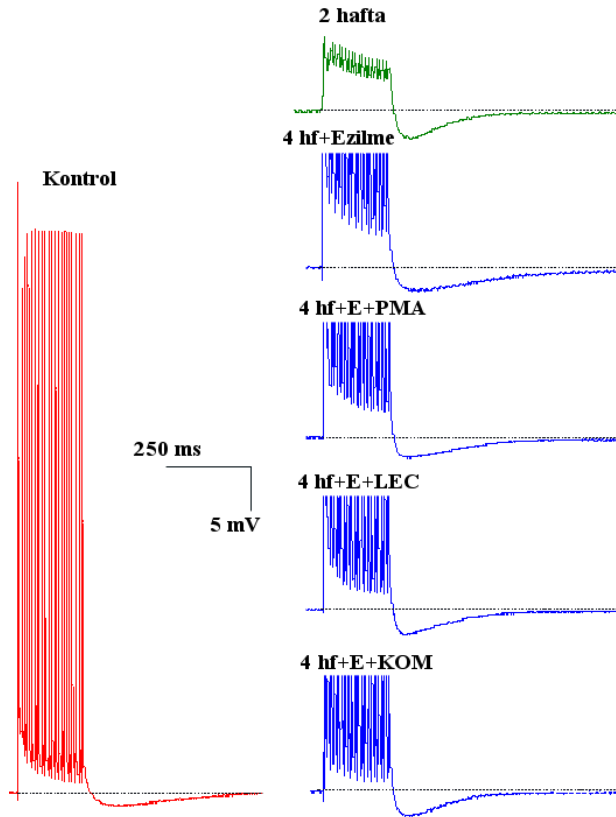
Şekil 4.22 Sural sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri. * PMA ile Kombine grup arasında $p<0,05$ düzeyinde anlamlılık vardır.

4.9.1.6 Tibial ve Sural sinirde 4-Ap'nin HAP'lar üzerine etkisi

40 Hz uyarım frekansı tibial sinir demetinde; V_{HAP} genliği kontrole göre tüm gruplarda anlamlı düzeyde daha yüksek, 2 haftaya göre ise 4 hafta Kombine grubu hariç tüm deney gruplarında daha düşük bulundu. 4 haftalık gruplar arasında sadece PMA grubunda manyetik alan etkisi ile düşük genlikte HAP meydana geldi. Bu fark diğer 4 haftalık gruplarla anlamsız iken Kombine grupla anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.23 ve 24).



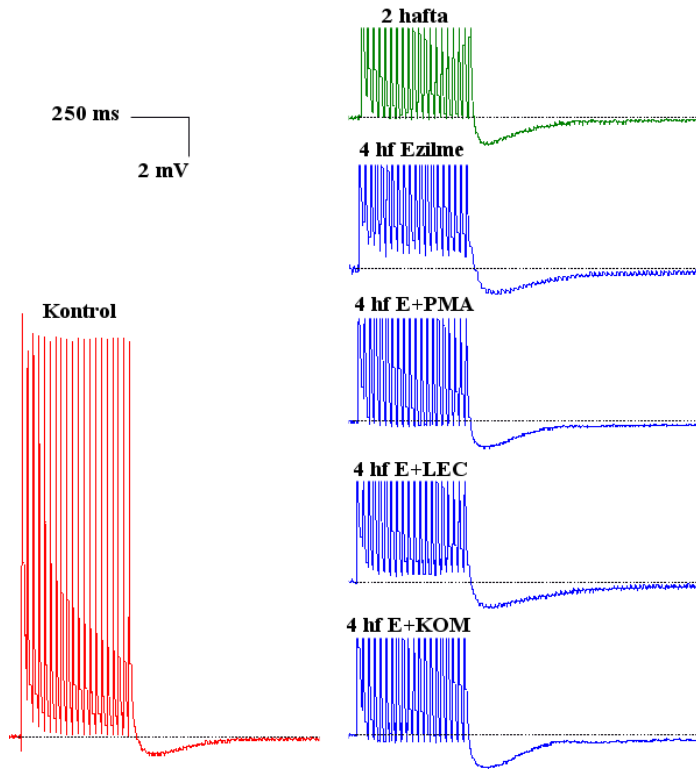
Şekil 4.23 Tibial sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2 ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir. * PMA ile Kombine grup arasında HAP genliği açısından $p<0,05$ düzeyinde anlamlılık vardır.



Şekil 4.24 Tibial sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2 ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.

Uyarım frekansının artmasıyla 100 Hz'te kontrole göre tüm deney grupları anlamlı bulunurken, 2-4 hafta arasında ve 4 haftanın kendi alt gruplarında farklar anlamsızdı.

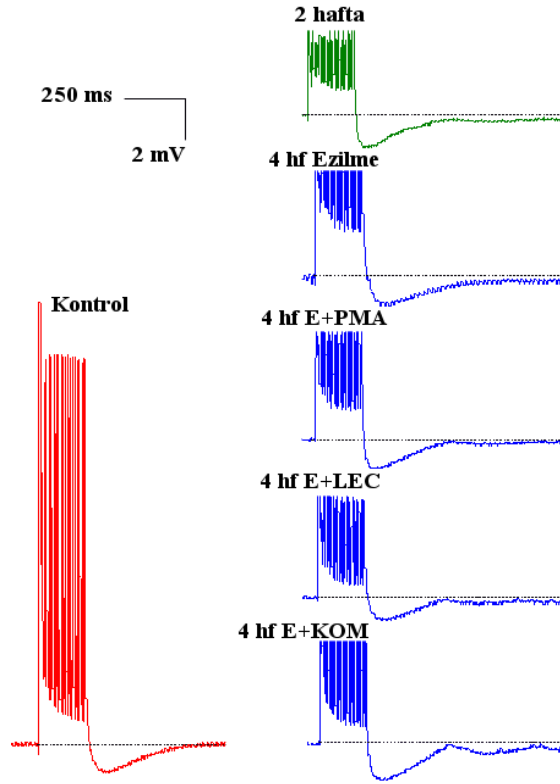
40 ve 100 Hz uyarım frekansında T_{HAP} süresi kontrole göre sadece 2 hafta grubunda anlamlı düzeyde daha uzundu. 2 hafta grubu ile 4 hafta arasında sadece Ezilme ve PMA grubu arasındaki farklar anlamlı bulunurken, diğerleri anlamsız bulundu. HAP süresi bakımından PMA ve Ezilme grubu kontrollere daha yakın değerler aldığı görüldü.



Şekil 4.25 Sural sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.

Sural sinirde ise 40 Hz uyarım frekansında V_{HAP} genliği; kontrollere göre Kombine grubu hariç diğer deney grupları anlamsız bulundu. Kombine grupta V_{HAP} diğer gruplara göre daha yüksekti. Her iki sinir demetinde de PMA grubunda genlik kontrollere yakındı. 2-4 hafta ve 4 haftanın alt grupları arasında anlamlılık yoktu.

40 Hz uyarım frekansında T_{HAP} süresi kontrollere göre; PMA grubunda uzamasına rağmen bu fark anlamsız fakat diğer 4 haftalık gruplardaki süre uzaması anlamlı bulundu. 100 Hz te V_{HAP} genlikleri arasında anlamlılık bulunmazken T_{HAP} süreleri kontrollere göre LEC ve Kombine gruplarda anlamlı düzeyde uzadı. PMA ve Ezilme grubu kontrollere daha yakındı.



Şekil 4.26 Sural sinir demetinde 4-Ap sonrası kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.

Çizelge 4.12. Tibial ve Sural sinirde 2mM 4-Ap sonrası; kontrol, ezilme (E) sonrası 2 ve 4. haftalara (hf) ait HAP 40 ve 100 Hz değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

Tibial Sinir

Gruplar	40 Hz		100 Hz	
	V _{HAP} (mV)	T _{HAP} (ms)	V _{HAP} (mV)	T _{HAP} (ms)
Kontrol	1,05 $\pm$ 0,03	556 $\pm$ 18	1,55 $\pm$ 0,06	486 $\pm$ 19
2hf+Ezilme	2,67 $\pm$ 0,06	889 $\pm$ 32	3,20 $\pm$ 0,24	792 $\pm$ 29
4hf+Ezilme	2,28 $\pm$ 0,08	635 $\pm$ 50	2,66 $\pm$ 0,18	570 $\pm$ 26
4hf+E+PMA	2,04 $\pm$ 0,09	626 $\pm$ 46	2,60 $\pm$ 0,10	510 $\pm$ 49
4hf+E+LEC	2,27 $\pm$ 0,10	742 $\pm$ 72	2,94 $\pm$ 0,16	680 $\pm$ 49
4hf+E+KOM	2,50 $\pm$ 0,11	742 $\pm$ 63	2,90 $\pm$ 0,24	685 $\pm$ 66

Sural Sinir

Kontrol	1,23 $\pm$ 0,08	572 $\pm$ 50	1,61 $\pm$ 0,11	448 $\pm$ 26
2hf+Ezilme	1,68 $\pm$ 0,14	670 $\pm$ 36	1,86 $\pm$ 0,15	615 $\pm$ 43
4hf+Ezilme	1,52 $\pm$ 0,11	897 $\pm$ 41	1,89 $\pm$ 0,11	601 $\pm$ 49
4hf+E+PMA	1,53 $\pm$ 0,14	732 $\pm$ 26	1,72 $\pm$ 0,13	574 $\pm$ 45
4hf+E+LEC	1,55 $\pm$ 0,13	891 $\pm$ 45	1,86 $\pm$ 0,16	671 $\pm$ 41
4hf+E+KOM	1,92 $\pm$ 0,12	970 $\pm$ 32	2,02 $\pm$ 0,27	686 $\pm$ 31

4.1.10 Dejenerasyon-Rejenerasyon sürecinde TEA'nın BAP'lar üzerine etkisi

Ezilme sonrası tibial ve sural sinire sukroz gap yöntemi ile in-vitro koşullarda yavaş kinetikli K^+ kanallarını bloklayan 10 mM TEA uygulanması 2. ve 4. haftalarda genliği ilaç öncesine ve 4-Ap'ye göre düşürdü. Tüm gruplarda TEA etkisi ile BAP'lara ait süre parametreleri uzadı. Tamamen intak kontrol grubu sinirlerde BAP parametrelerindeki süre uzamaları çok az iken deney gruplarında özellikle $\frac{1}{2}DS$ 'de oldukça dramatik uzamalar meydana geldi (Çizelge 4.12). Kontrol gruplarında 4-Ap sonrası ortaya çıkan gecikmiş depolarizasyon genliği V-dd ve bunun BAP genliğine oranı, TEA uygulaması ile bir miktar düştü.

4.1.10.1 Ezilme gruplarında TEA'nın BAP bulguları

10 mM TEA uygulaması ile Ezilme gruplarında BAP genliği kontrollere göre düşük bulundu. Kontrol grubu BAP genliği herhangi bir ilaç uygulama öncesi $68,5 \pm 1,2$ mV iken, 4-Ap uygulaması ile $66,2 \pm 1,2$ mV'a düşerek kontrol değerinin %96,6'sına denk gelmekte, TEA etkisiyle ise $52,9 \pm 1,3$ mV olmakta bu da %77,2' sine denk gelmektedir (Çizelge 4.1, 4.7 ve 4.13).

4 haftalık Ezilme grubu tibial sinirde TEA etkisiyle BAP genliği $21,1 \pm 1,7$ mV'a düşerek kontrol değerinin %89 una, sural sinirde ise TEA sonrası BAP genliği $8,3 \pm 0,6$ mV olarak, ilaç öncesi değerine göre %86 sına denk gelmektedir.

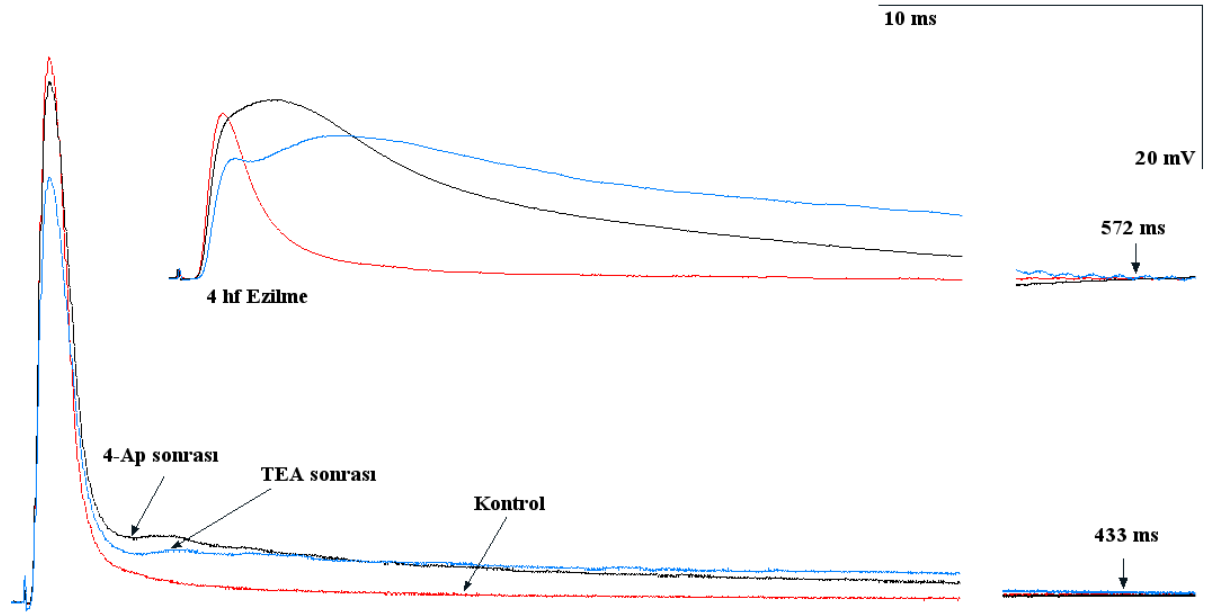
Kontrol grubu tibial sinir demetinde $\frac{1}{2}DS$ süresi 4-Ap etkisiyle ilaç öncesine göre %121 oranında artarken, TEA etkisi ile de çok az artarak %124 olarak bulundu. 4 hafta Ezilme grubunda 4-Ap etkisi ile bu oran %521 değerine yükselirken, TEA etkisiyle dramatik bir şekilde artarak hiçbir ilaç uygulamadan bulunan değerinin yaklaşık 20 katına çıktı.

Sural sinirde ise $\frac{1}{2}DS$ süresi 4-Ap etkisiyle ilaç öncesine göre kontrol grubunda %119 oranında artarken, TEA etkisiyle çok az artarak %123 olarak bulundu. 4 hafta Ezilme grubunda ise bu oran sırasıyla %347 değerine kadar yükselirken, TEA etkisiyle yaklaşık ilaç öncesi değerinin 20 katına kadar yükseldi. Her iki sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır (Çizelge 4.1, 4.7 ve 4.13) (Şekil 4.27 ve 28).

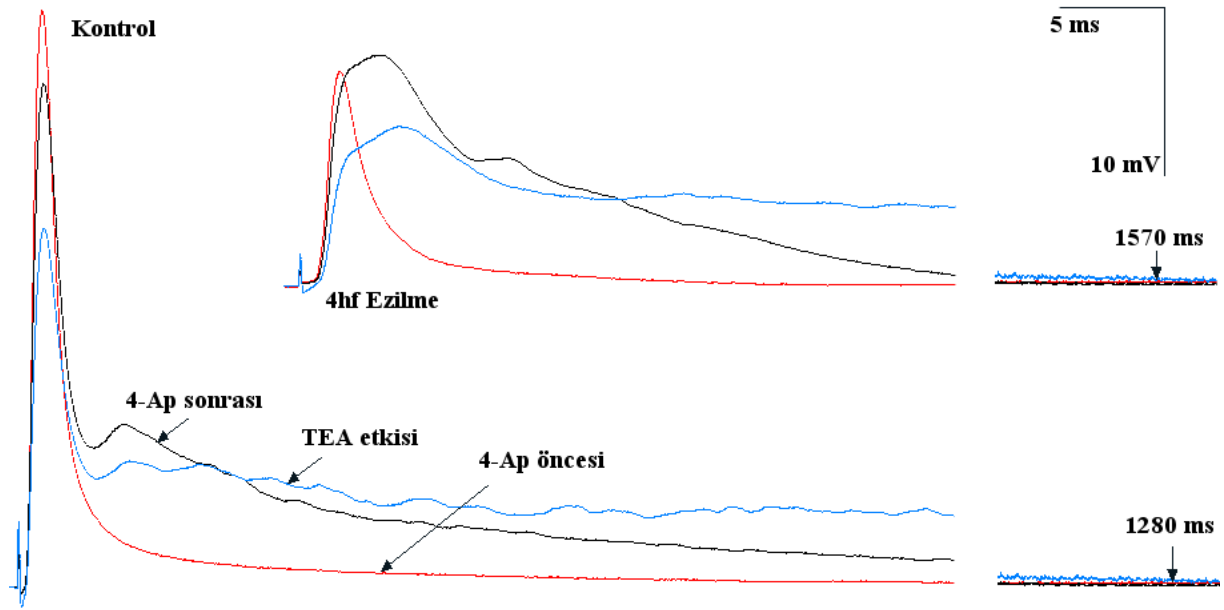
Çizelge 4.13. 10 mM TEA sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası Ezilme grubunda 2 ve 4. haftalara (hf) ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A TEA sonrası Ezilme grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	$52,9 \pm 1,3$	$0,54 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,02$	$6,6 \pm 0,4$	$12,5 \pm 0,7$
2hf+Ezilme	$8,4 \pm 0,8$	$8,54 \pm 1,10$	$24,1 \pm 2,3$	belirsiz	belirsiz
4hf+Ezilme	$21,1 \pm 1,7$	$1,71 \pm 0,10$	$26,3 \pm 2,1$	$22,8 \pm 2,3$	108 ± 4

B TEA sonrası Ezilme grubu Sural sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	$29,0 \pm 3,4$	$0,88 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,03$	$10,2 \pm 0,6$	$35,2 \pm 4,3$
2hf+Ezilme	$6,1 \pm 0,3$	$6,94 \pm 0,50$	$24,1 \pm 2,4$	belirsiz	belirsiz
4hf+Ezilme	$9,1 \pm 0,6$	$2,69 \pm 0,20$	$32,5 \pm 2,2$	$10,6 \pm 0,7$	116 ± 3



Şekil 4.27 Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almakta, $\frac{1}{2}$ DS süresi çok uzamaktadır.



Şekil 4.28 Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almakta, 1/2DS süresi çok uzamaktadır.

4.1.10.2 Ezilme+PMA gruplarında TEA'nın BAP bulguları

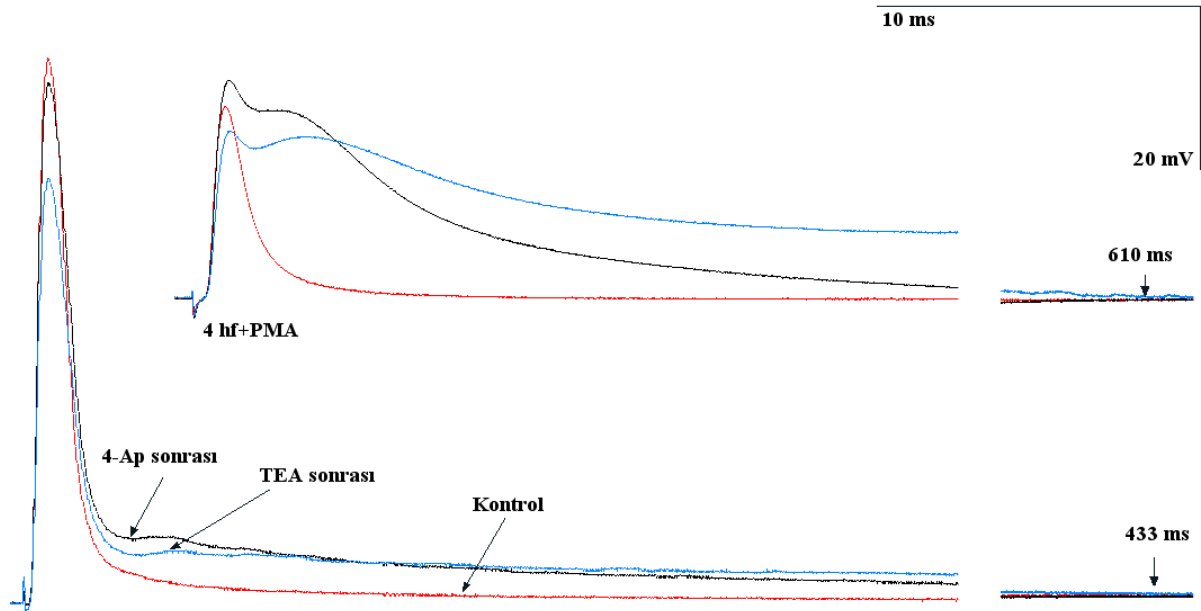
Tibial sinirde 10 mM TEA uygulaması ile Ezilme+PMA grubunda BAP genliği PMA etkisiyle $23,6 \pm 2,3$ mV olarak bulundu bu değer Ezilme grubu hariç diğer 4 haftalık gruplar olan LEC ve Kombine genlik değerlerine göre istatistiksel olarak daha yüksekti ($p < 0,05$). Ezilme+PMA grubundan elde edilen YS (yükselme süresi) ve 1/2DS (yarı-düşme süresi) değerleri diğer 4 haftalık gruplardan anlamlı düzeyde daha kısa bulundu ($p < 0,05$). PMA grubu ile diğer gruplar arasında diğer BAP parametreleri açısından anlamlı farklar bulunmadı.

Sural sinir demetinde 30 dk boyunca 10 mM TEA uygulaması 4 hafta Ezilme+PMA grubunda; 1/2DS (yarı-düşme) süresini sadece Ezilme+Kombine grubuna göre anlamlı düzeyde kısalttı ($p < 0,05$). %V-dd/BAP oranı her iki sinirde de PMA grubu, Ezilme ve Ezilme+LEC gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu görüldü ($p < 0,05$). PMA grubu ile diğer gruplar arasında diğer BAP parametreleri açısından anlamlı farklar bulunmadı.

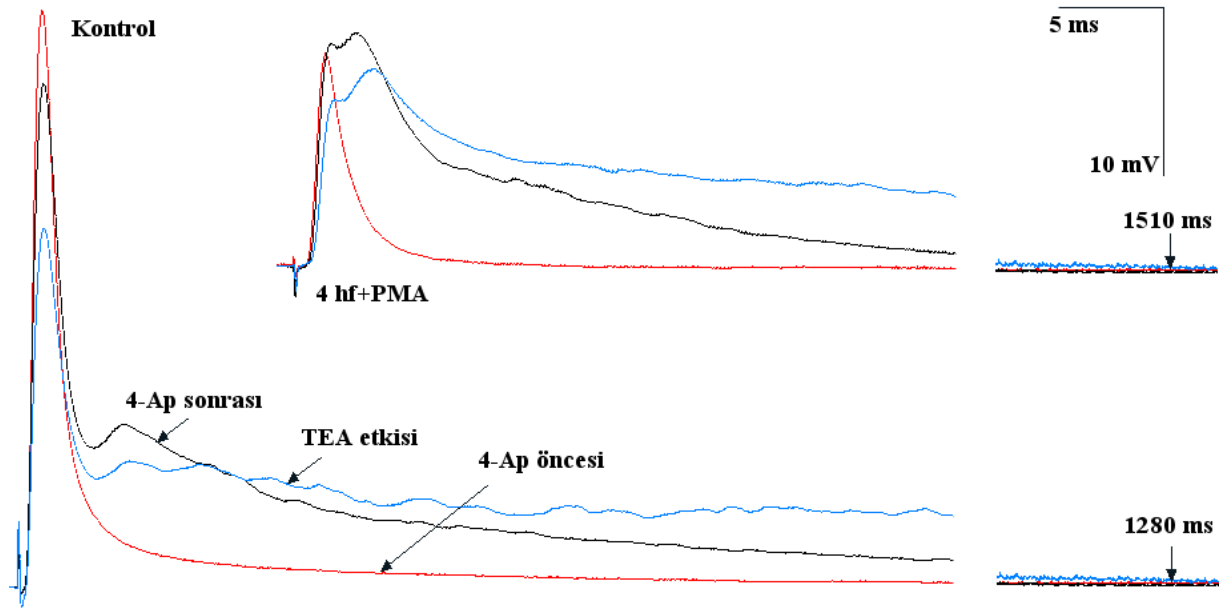
Çizelge 4.14. 10 mM TEA sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası Ezilme+PMA grubunda 2 ve 4. haftalara (hf) ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2. ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2. ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A TEA sonrası Ezilme+PMA grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	52,9 $\pm$ 1,3	0,54 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	6,6 $\pm$ 0,4	12,5 $\pm$ 0,7
2hf+E+PMA	8,7 $\pm$ 0,8	8,38 $\pm$ 1,10	23,9 $\pm$ 2,2	belirsiz	belirsiz
4hf+E+PMA	23,6 $\pm$ 2,3	1,20 $\pm$ 0,06	10,9 $\pm$ 2,2	21,2 $\pm$ 2,9	90 $\pm$ 8

B TEA sonrası Ezilme+PMA grubu Sural sinire ait BAP parametreleri					
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	29,0 $\pm$ 3,4	0,88 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,03	10,2 $\pm$ 0,6	39,0 $\pm$ 4,3
2hf+E+PMA	6,2 $\pm$ 0,3	6,89 $\pm$ 0,50	24,0 $\pm$ 2,4	belirsiz	belirsiz
4hf+E+PMA	10,8 $\pm$ 1,1	2,69 $\pm$ 0,10	23,9 $\pm$ 2,5	11,4 $\pm$ 0,8	105 $\pm$ 2



Şekil 4.29 Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+PMA grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin altında bir değer almaktadır.



Şekil 4.30 Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+PMA grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almakta, $\frac{1}{2}$ DS süresi çok uzamaktadır.

4.1.10.3 Ezilme+LEC gruplarında TEA'nın BAP bulguları

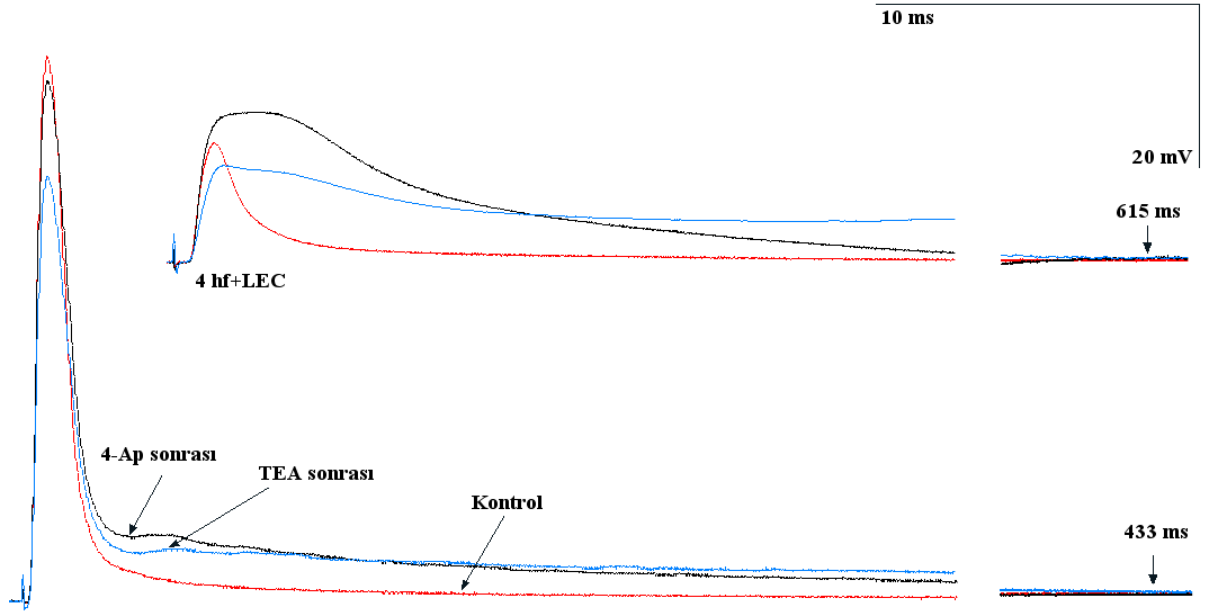
Çizelge 4.15. 10 mM TEA sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası Ezilme+LEC grubunda 2. ve 4. haftalara (hf) ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A TEA sonrası Ezilme+LEC grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri

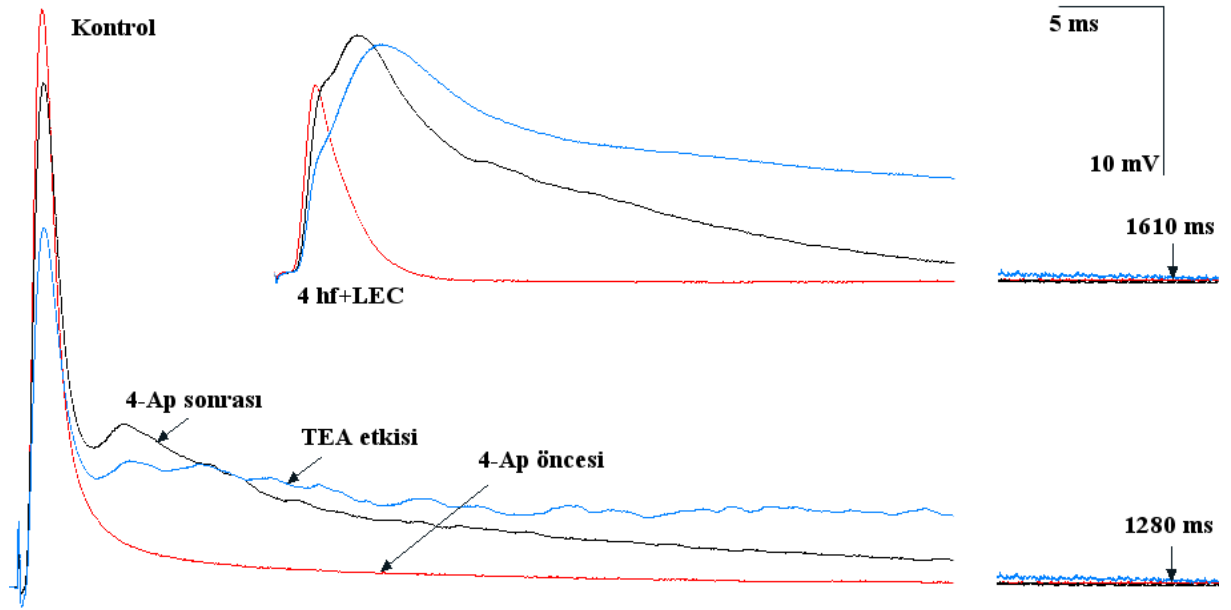
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	52,9 $\pm$ 1,3	0,54 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	6,6 $\pm$ 0,4	12,5 $\pm$ 0,7
2hf+E+LEC	8,4 $\pm$ 0,8	8,58 $\pm$ 1,10	24,2 $\pm$ 2,2	belirsiz	belirsiz
4hf+E+LEC	14,2 $\pm$ 1,7	1,64 $\pm$ 0,10	19,7 $\pm$ 2,3	14,3 $\pm$ 1,2	101 $\pm$ 4

B TEA sonrası Ezilme+LEC grubu Sural sinire ait BAP parametreleri

Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	29,0 $\pm$ 3,4	0,88 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,03	10,2 $\pm$ 0,6	39,0 $\pm$ 4,3
2hf+E+LEC	6,1 $\pm$ 0,3	6,96 $\pm$ 0,50	24,3 $\pm$ 2,4	belirsiz	belirsiz
4hf+E+LEC	8,0 $\pm$ 0,5	2,72 $\pm$ 0,10	31,4 $\pm$ 3,2	9,3 $\pm$ 0,8	116 $\pm$ 4



Şekil 4.31 Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+LEC grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir.



Şekil 4.32 Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+LEC grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir. V-dd genliği BAP genliğinin üzerinde bir değer almakta, $\frac{1}{2}$ DS süresi çok uzamaktadır.

4.1.10.4 Ezilme+Kombine gruplarında TEA'nın BAP bulguları

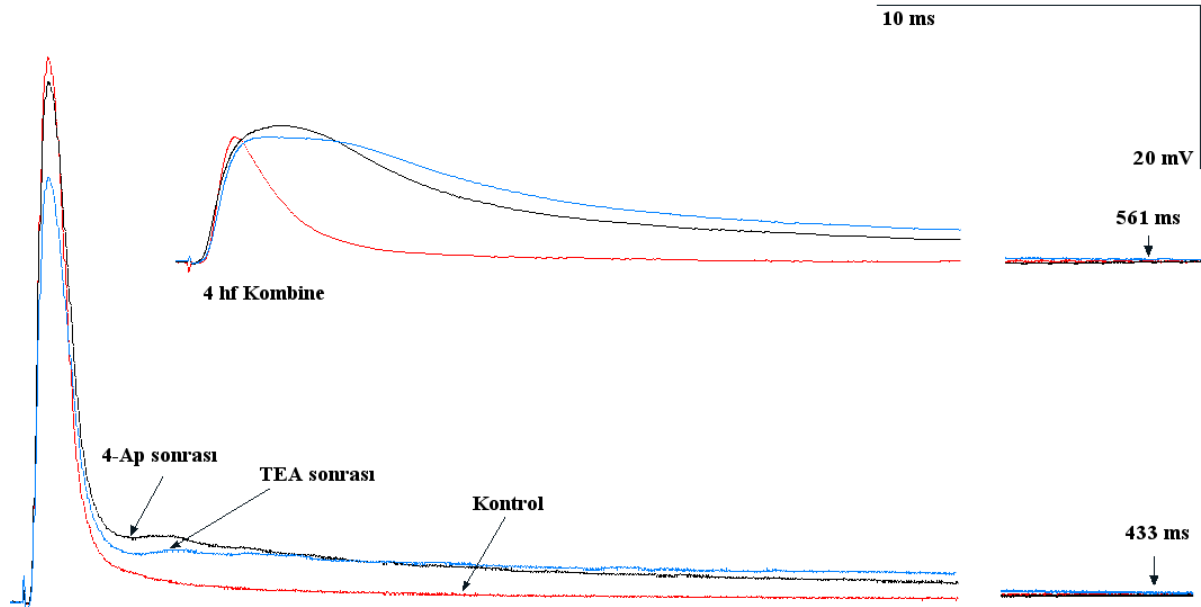
Çizelge 4.16. 10 mM TEA sonrası Tibial ve Sural sinirde; kontrol, ezilme sonrası Ezilme+Kombine grubunda 2 ve 4. haftalara (hf) ait BAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi. **A)** Tibial sinirde kontrollere göre 2 ve 4. haftalardaki değişimlerin tümü $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. **B)** Sural sinirde de 2 ve 4. haftalardaki tüm BAP parametrelerindeki değişimler kontrollere göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

A TEA sonrası Ezilme+Kombine grubu Tibial sinire ait BAP parametreleri

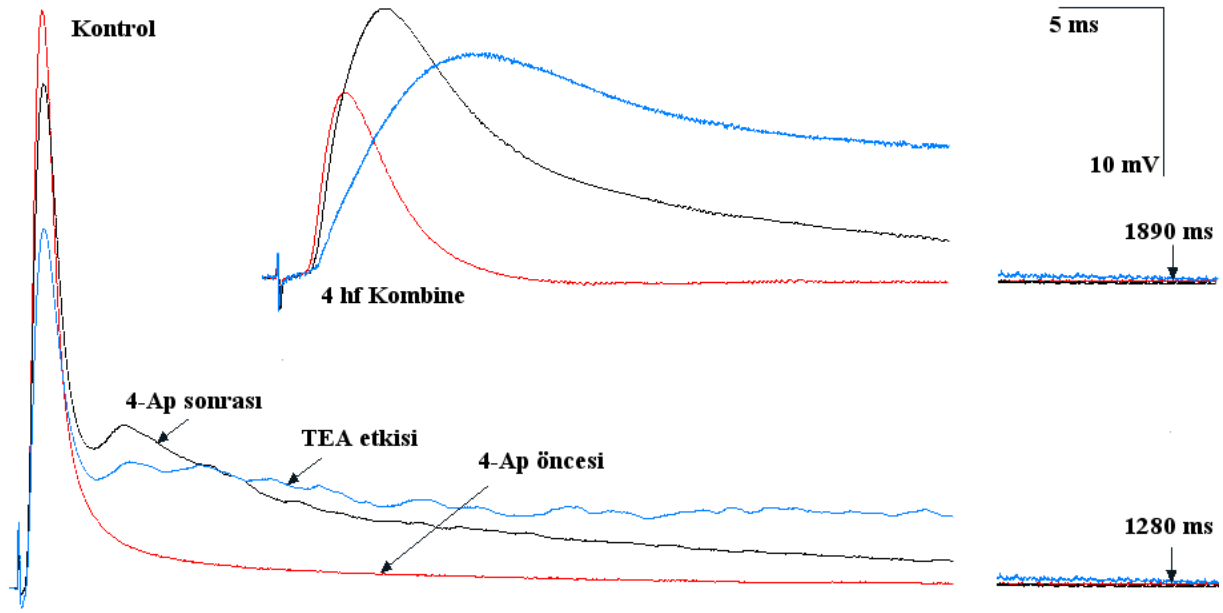
Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	52,9 $\pm$ 1,3	0,54 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	6,6 $\pm$ 0,4	12,5 $\pm$ 0,7
2hf+E+KOM	8,3 $\pm$ 0,8	8,63 $\pm$ 1,26	24,1 $\pm$ 2,2	belirsiz	belirsiz
4hf+E+KOM	16,2 $\pm$ 0,7	1,86 $\pm$ 0,10	16,1 $\pm$ 1,2	17,1 $\pm$ 0,5	105 $\pm$ 1

B TEA sonrası Ezilme+Kombine grubu Sural sinire ait BAP parametreleri

Gruplar n=7	BAP (mV)	YS (ms)	$\frac{1}{2}$ DS (ms)	v-dd (mV)	% v-dd/BAP
Kontrol	29,0 $\pm$ 3,4	0,88 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,03	10,2 $\pm$ 0,6	39,0 $\pm$ 4,3
2hf+E+KOM	5,9 $\pm$ 0,3	7,03 $\pm$ 0,50	25,7 $\pm$ 2,4	belirsiz	belirsiz
4hf+E+KOM	9,5 $\pm$ 1,2	3,19 $\pm$ 0,30	35,1 $\pm$ 1,4	11,0 $\pm$ 1,2	117 $\pm$ 2

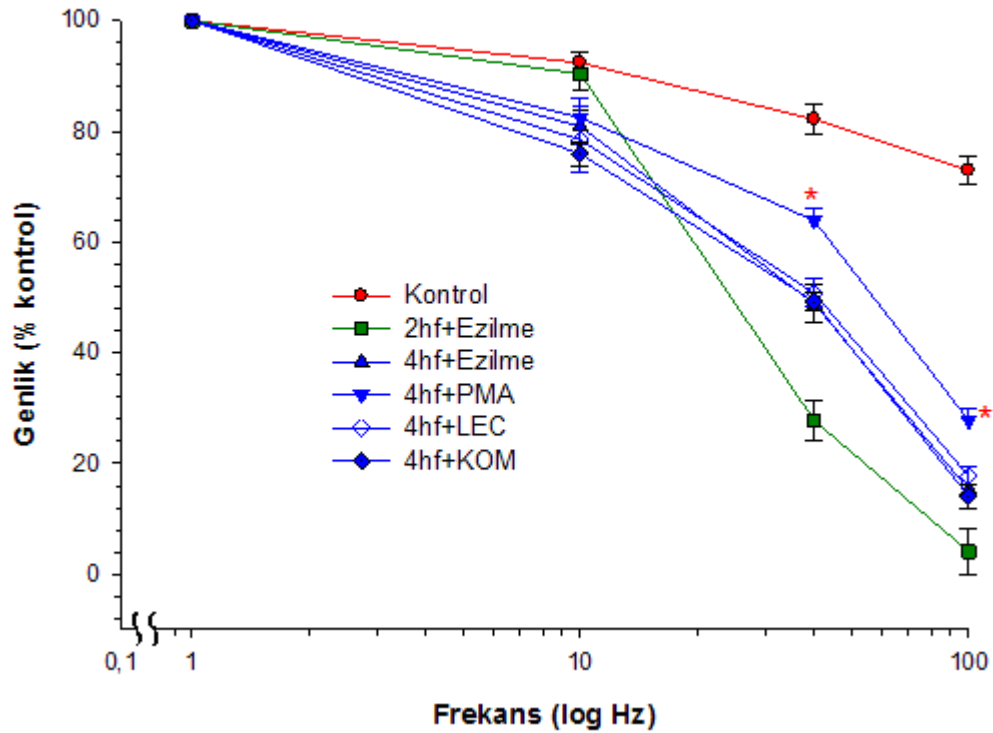


Şekil 4.33 Tibial sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+Kombine grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir.



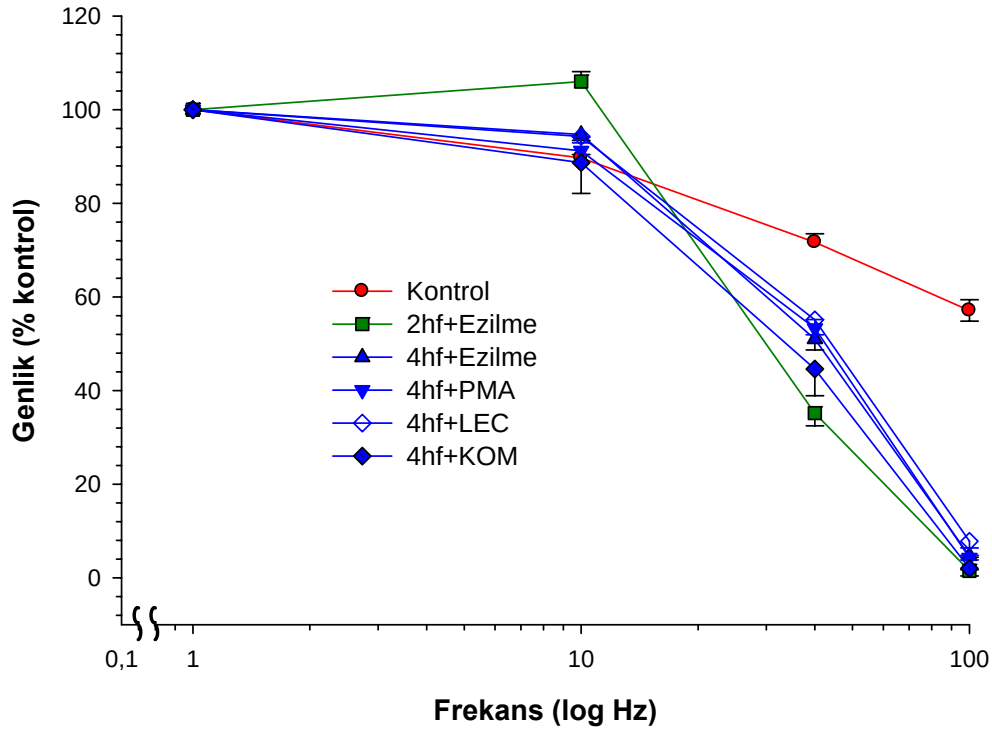
Şekil 4.34 Sural sinirde kontrol grubu, 2 ve 4 haftalık (hf) Ezilme+Kombine grubuna ait TEA uygulaması sonrası tek puls ile tonik olarak uyarılan ve aynı zaman ve genlik ölçeğinde olan BAP kayıtları görülmektedir.

4.1.10.5 Tibial ve Sural sinir demetinde TEA sonrası BAP Genlik-Frekans ilişkisi



Şekil 4.35 Tibial sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri. * 40 ve 100 Hz uyarı frekansında, PMA ile diğer 4 haftalık gruplar arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlılık vardır.

Daha önce Şekil 4.9 ve 10'da hiçbir ilaç uygulamaksızın sadece uyarım frekansının artmasına bağlı olarak meydana gelen % genlik inhibisyonları verilmişti. Şekil 4.21 ve 22'de ise 4-Ap uygulaması sonrası oluşan ilave inhibisyonlar gösterilmişti. Şekil 4.35 ve 36'de ise TEA uygulaması ile meydana gelen yüksek genlik inhibisyonlarının kontrollere göre % genlik değişimi verilmektedir.



Şekil 4.36 Sural sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2 hafta (hf) grubu ve 4 haftalık Ezilme, Ezilme+PMA, Ezilme+LEC ve Ezilme+Kombine gruplarına ait uyarı frekansına bağlı % genlik değişimleri.

Tibial sinirde hiçbir ilaç uygulamadan kontrol grubu sinir demetlerinde meydana gelen 100 Hz'lik % genlik değişimi; $95,0 \pm 0,5$ iken sural sinirde $90,1 \pm 0,6$ olarak bulunmuştu. 4-Ap uygulaması ile sırasıyla bu değerler $90,3 \pm 0,9$ ve $82,8 \pm 1,2$ iken, TEA uygulaması ile değişim daha da artarak $72,9 \pm 2,5$ ve $57,1 \pm 2,3$ değerine düşerek daha yüksek genlik inhibisyonu oluşturdu. Tibial sinirde hiçbir ilaç uygulamadan 2 haftalık Ezilme grubu sinir demetlerinde meydana gelen 100 Hz'lik % genlik değişimi; $65,4 \pm 3,9$ iken sural sinirde $62,6 \pm 1,9$ olarak bulunmuştu. 4-Ap uygulaması ile sırasıyla bu değerler $25,6 \pm 4,31$ ve $35,7 \pm 3,1$ iken, TEA uygulaması ile değişim daha da artarak $4,1 \pm 0,8$ ve $2,1 \pm 0,3$ değerine düşerek neredeyse tam genlik bloğuna yakın inhibisyon meydana getirdi. Tibial sinirde hiçbir ilaç uygulamadan 4 haftalık Ezilme+PMA grubu sinir demetlerinde meydana

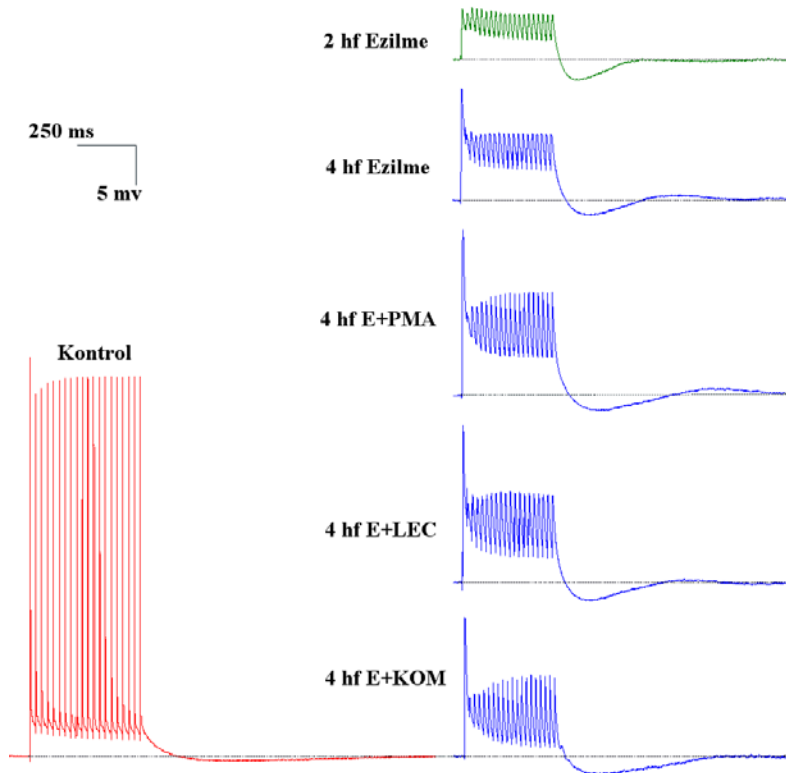
gelen 100 Hz'lik % genlik değişimi; $84,1 \pm 1,1$ iken sural sinirde $74,1 \pm 1,3$ olarak bulunmuştu. 4-Ap uygulaması ile sırasıyla bu değerler $65,6 \pm 2,8$ ve $53,2 \pm 2,4$ iken, TEA uygulaması ile değişim daha da artarak $27,8 \pm 7,8$ ve $4,3 \pm 0,5$ değerine düştü (Şekil 4.35 ve 36).

10 Hz uyarım frekansı tibial sinir 4 hafta E+Kombine grubunda meydana gelen fazik inhibisyon diğer 4 haftalık gruplara göre anlamsız bulunurken 2 hf ve kontrole göre anlamlı düzeyde daha fazla blok görüldü. Sural sinirde ise 2 hafta grubunda, kontrol ve 4 hafta gruplarına göre ilginç bir şekilde daha az fazik inhibisyon olduğu görüldü. Bu ilginç fark kontrollere ve 4 haftalık gruplara (4 hf+Kombine grup hariç) göre anlamlı bulundu. 4 hafta grup içi farklar anlamsızdı.

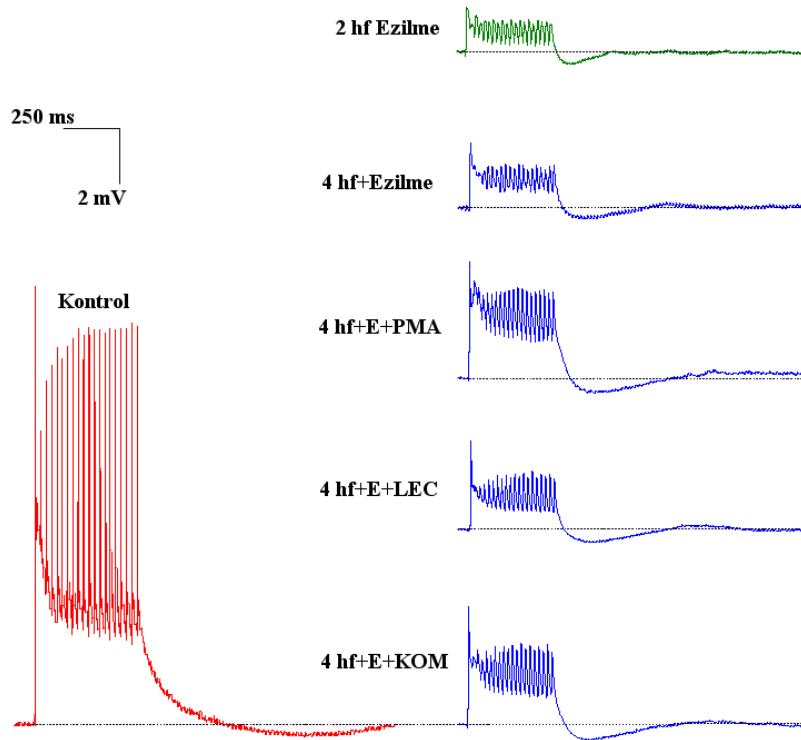
Tibial sinir demetinde 4 hafta+E+PMA grubunda 40 Hz uyarım frekansında meydana gelen fazik inhibisyon kontrol değerine yakın olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, diğer 2 ve 4 haftalık deney grupları kontrollere göre anlamlı düzeyde daha yüksek genlik bloğu oluşturdu. Sural sinirde ise 40 Hz'te kontrollere göre tüm deney grupları anlamlı düzeyde daha fazla genlik bloğu meydana getirdi. 2 ve 4 hafta deney grupları arasındaki farklar, 4 hf+Kombine grup hariç, anlamlı bulundu. Tibial sinirde 4 hafta grup içi karşılaştırmada, PMA grubunun 40 ve 100 Hz de diğer gruplara göre daha az inhibisyona uğradığı açıktır ($p<0,05$) (Şekil 4.35). Tibial sinirde 100 Hz'te meydana gelen fazik blok kontrole göre tüm deney gruplarında anlamlı yüksekti.

4.1.10.6 Tibial ve Sural sinirde TEA'nın HAP'lar üzerine etkisi

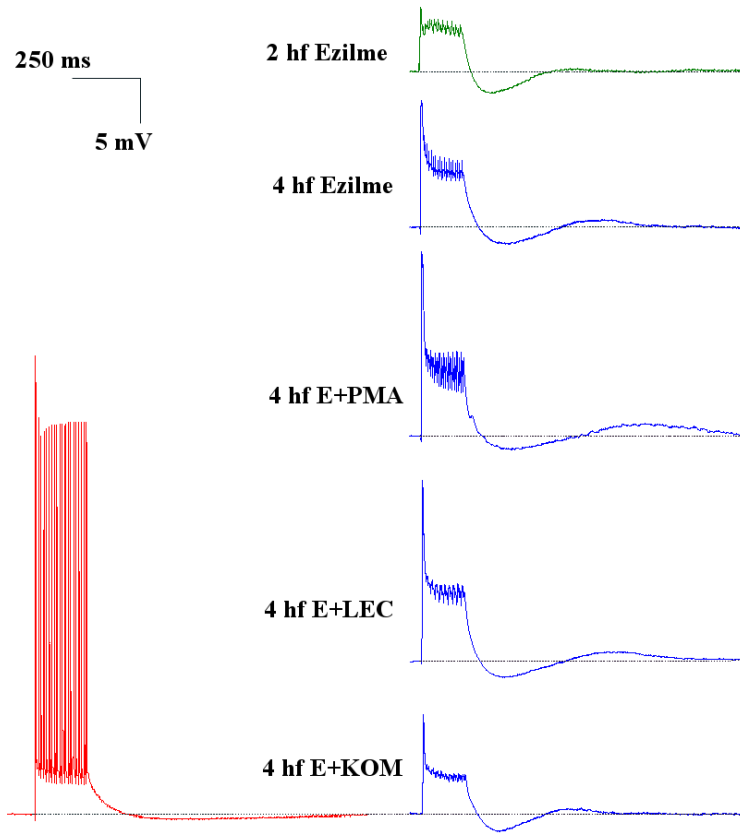
10 mM TEA uygulaması ile tibial ve sural sinir demetinde 40 ve 100 Hz uyarım frekansında oluşan HAP genlikleri, kontrollere göre tüm deney gruplarında anlamlı düzeyde yüksek iken, HAP sürelerinin ise daha kısa olduğu görüldü ($p<0,05$). 40 Hz uyarım frekansında tüm 4 haftalık gruplar, 2 haftalık gruplara göre daha düşük genlikte HAP meydana getirirken bu fark sadece PMA ve Ezilme grubuna göre istatistiksel anlam taşımaktaydı. 100 Hz'te ise 2. ve 4. hafta arasındaki farklar tüm 4 haftalık gruplarda anlamlı bulundu. 4 hafta grup içi genlik ve süreler açısından her iki sinir demetinde de farklar anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).



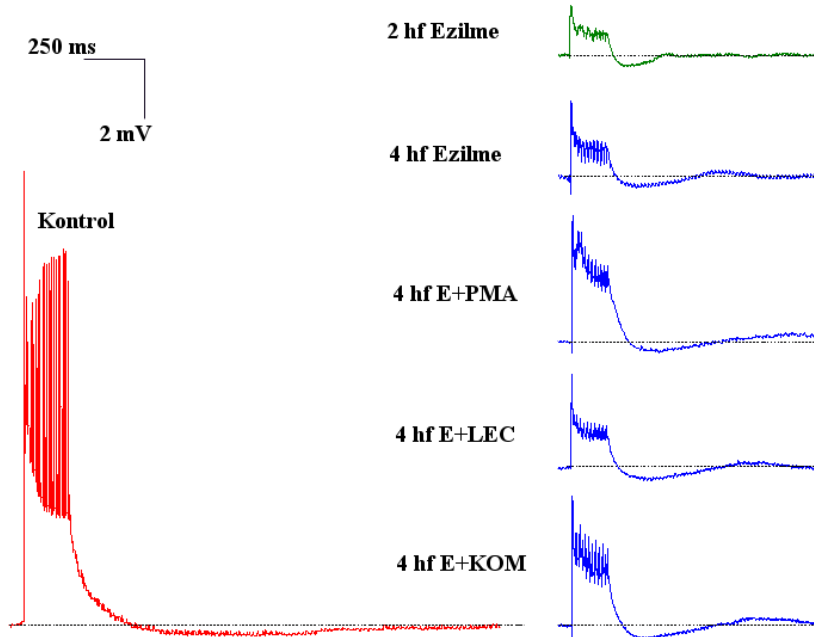
Şekil 4.37 Tibial sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.



Şekil 4.38 Sural sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2. ve 4. haftalara (hf) ait 40 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.



Şekil 4.39 Tibial sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2 ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.



Şekil 4.40 Sural sinir demetinde TEA sonrası kontrol, 2 ve 4. haftalara (hf) ait 100 Hz'lik uyarım frekansında ortaya çıkan HAP'lar gösterilmektedir.

Çizelge 4.17. Tibial ve Sural sinirde 10 mM TEA sonrası; kontrol, ezilme (E) sonrası 2 ve 4. haftalara (hf) ait HAP 40 ve 100 Hz değerleri verilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

Tibial Sinir

Gruplar	40 Hz		100 Hz	
	V _{HAP} (mV)	T _{HAP} (ms)	V _{HAP} (mV)	T _{HAP} (ms)
Kontrol	0,60 $\pm$ 0,04	991 $\pm$ 25	0,55 $\pm$ 0,05	708 $\pm$ 23
2hf+Ezilme	3,17 $\pm$ 0,12	381 $\pm$ 12	3,04 $\pm$ 0,15	292 $\pm$ 18
4hf+Ezilme	2,36 $\pm$ 0,11	367 $\pm$ 31	2,35 $\pm$ 0,16	329 $\pm$ 26
4hf+E+PMA	2,05 $\pm$ 0,13	474 $\pm$ 27	1,80 $\pm$ 0,15	370 $\pm$ 20
4hf+E+LEC	2,67 $\pm$ 0,28	445 $\pm$ 30	2,10 $\pm$ 0,16	320 $\pm$ 14
4hf+E+KOM	2,64 $\pm$ 0,15	610 $\pm$ 26	1,91 $\pm$ 0,11	285 $\pm$ 15

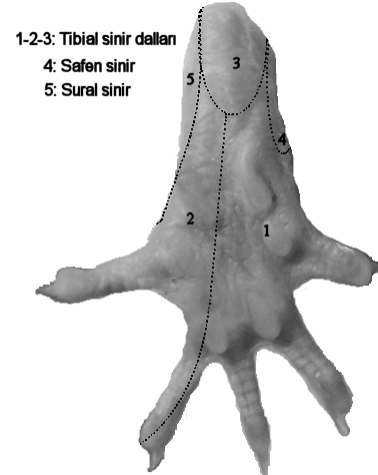
Sural Sinir

Kontrol	0,86 $\pm$ 0,11	679 $\pm$ 39	0,74 $\pm$ 0,01	992 $\pm$ 33
2hf+Ezilme	1,44 $\pm$ 0,12	262 $\pm$ 26	1,19 $\pm$ 0,03	240 $\pm$ 23
4hf+Ezilme	1,57 $\pm$ 0,16	403 $\pm$ 29	1,47 $\pm$ 0,14	354 $\pm$ 18
4hf+E+PMA	1,44 $\pm$ 0,12	482 $\pm$ 46	1,53 $\pm$ 0,15	426 $\pm$ 31
4hf+E+LEC	1,52 $\pm$ 0,18	507 $\pm$ 45	1,33 $\pm$ 0,11	441 $\pm$ 39
4hf+E+KOM	1,63 $\pm$ 0,12	466 $\pm$ 35	1,34 $\pm$ 0,06	430 $\pm$ 29

4.2 Termal Plantar Test Bulguları

Fonksiyon test veya duysal (sensör) test olarak ifade edilebilen termal plantar testlerden elde edilen veriler, sağ siyatik siniri ezilerek travmatik mononöropati modeli (aksonometis tipi ezilme) oluşturulan deney gruplarında özellikle duysal sinirlerde ortaya çıkan yapısal ve işlevsel anormallikleri yansıtmaktadır.

Bu testler dejenerasyon-rejenerasyon sürecinde myelinli veya myelinsiz duysal sinirlerin gelişiminin izlenmesini sağlamaktadır. Testlerde ölçülen primer hiperaljezi deney hayvanının ayak tabanının plantar

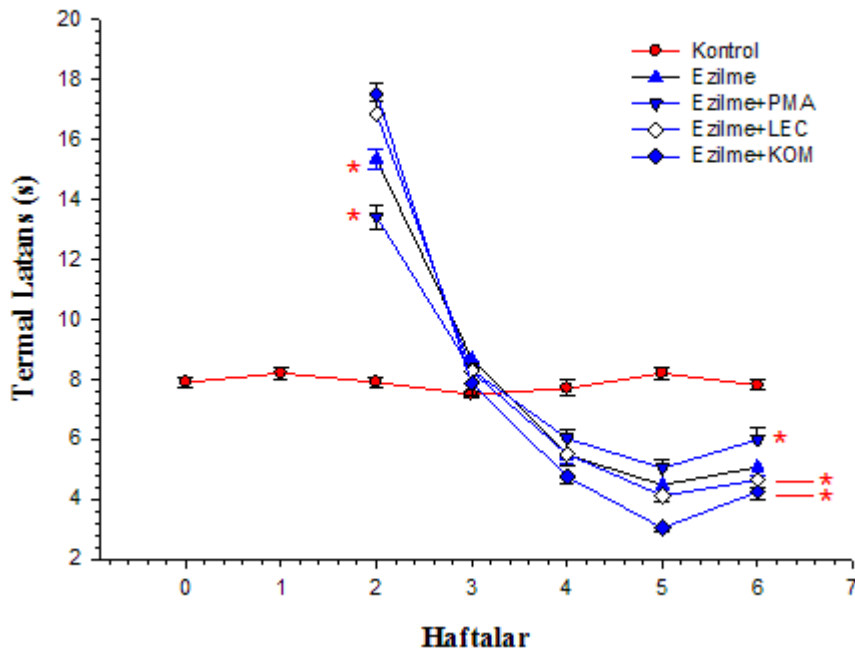


Şekil 4.41 Ayak plantar yüzünü inerve eden sinirler görülmektedir.

yüzeylerinin orta kısımlarına uygulandığından; bu testler daha çok tibial sinir demeti içerisinde bulunan duysal myelinli veya myelinsiz liflerin karakteristiğini yansıtmaktadır. Çünkü ayağın plantar yüzü büyük oranda tibial sinirden çıkan 3 dal ile inerve edilmektedir (Şekil 4.41).

Deneyisel olarak sinirde meydana getirilen ezilme tipi ezilme sonrası ilk haftada, yoğun dejeneratif süreçten dolayı termal testlerde, maksimum uyarım süresi (cut off time) hayvanın ayak tabanında bir hasara yol açmaması için sırası ile 25 s olarak ayarlanmıştı. İlk haftada cut-off değerinin aşılması çok sık gözlemlendiğinden ve bölümümüzde daha önce yapılan çalışmalarda da tecrübe edildiğinden ölçüm yapılmaması tercih edildi.

Başka bir deyişle amaç; deney hayvanının kendi ayağını yemesi olarak adlandırılan otofajinin (ototomi) engellenmesidir. Dejenerasyon sürecini takiben meydana gelen rejenerasyon sürecini, termal test bulguları net bir şekilde ortaya koymaktadır (Şekil 4.42).



Şekil 4.42 Sinir ezilmesinden 2 hafta sonra Ezilme gruplarında; PMA, LEC ve Kombine uygulamanın termal latans süreleri üzerine etkileri verilmektedir. Ölçüm noktaları ortalama $\pm$ SEM'i temsil etmektedir. * 4 hafta PMA ve Ezilme grubu diğer gruplara göre, termal latansı istatistiksel olarak daha düşüktü. Aynı şekilde PMA grubu nun 6 hafta sonraki termal latans değeri LEC ve Kombine grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,05$).

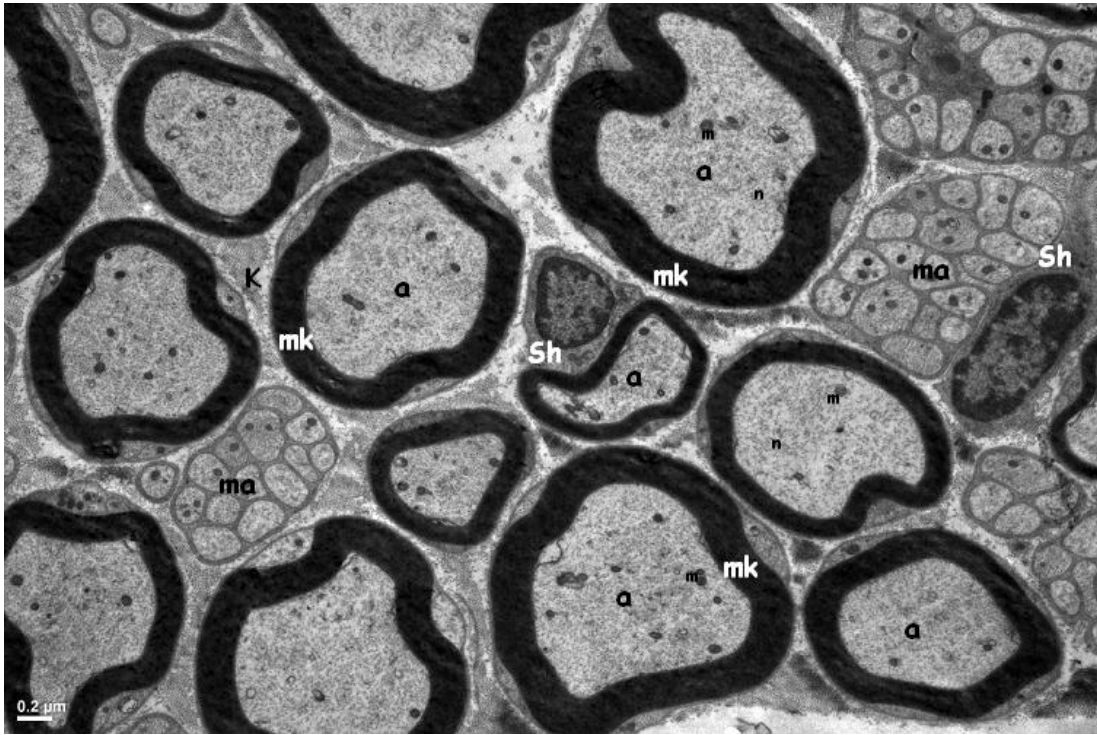
Ezilme ve Ezilme+PMA grubunda 2. haftada ölçülen termal latans süresi, Kombine ve LEC grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu görüldü. Ayrıca PMA grubu tüm ezilme gruplarına göre 2. haftada daha düşük latansa sahipti ($p<0,05$). 3. haftadan itibaren gruplar arasındaki bu fark ortadan kalkarak tüm ezilme gruplarında kontrollere göre anlamlı düzeyde primer hiperaljezi gelişerek 6. haftaya kadar devam etti. PMA grubunda termal latans süresi 5 ve 6. haftalarda LEC ve Kombine gruba göre anlamlı düzeyde daha uzun olup kontrol değerlerine en yakın olandı ($p<0,05$).

4.3 Histoloji Bulguları

4.3.1 Elektron Mikroskopik Bulguları

4.3.1.1 Kontrol Grubu

Kontrol grubuna ait siyatik, sural ve tibial sinir demetlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde, sinir fasiküllerinin miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinden oluştuğu dikkati çekti. Sinir liflerinin schwann hücreleri tarafından sarılı oldukları izlendi. Schwann hücrelerinin, heterokromatinden zengin oval ya da yuvarlak bir çekirdeğe sahip oldukları, heterokromatinin genellikle nüklear kılıf yakınında bulunduğu gözlemlendi. Schwann hücreleri dıştan bir bazal lamina ile sarılı idi, bazal laminanın altında hücrenin plazmalemması yer almaktaydı. Schwann hücrelerinin sitoplazmasında endoplazmik retikülüm sisternaları, golgi kompleksi, mitokondriyonlar, lizozomlar ve ribozomlar yer almaktaydı. Miyelinli sinir liflerinde, Schwann hücrelerinin aksonu sararak, akson etrafında konsantrik lamellar tarzda miyelin kılıfı oluşturdıkları gözlemlendi.

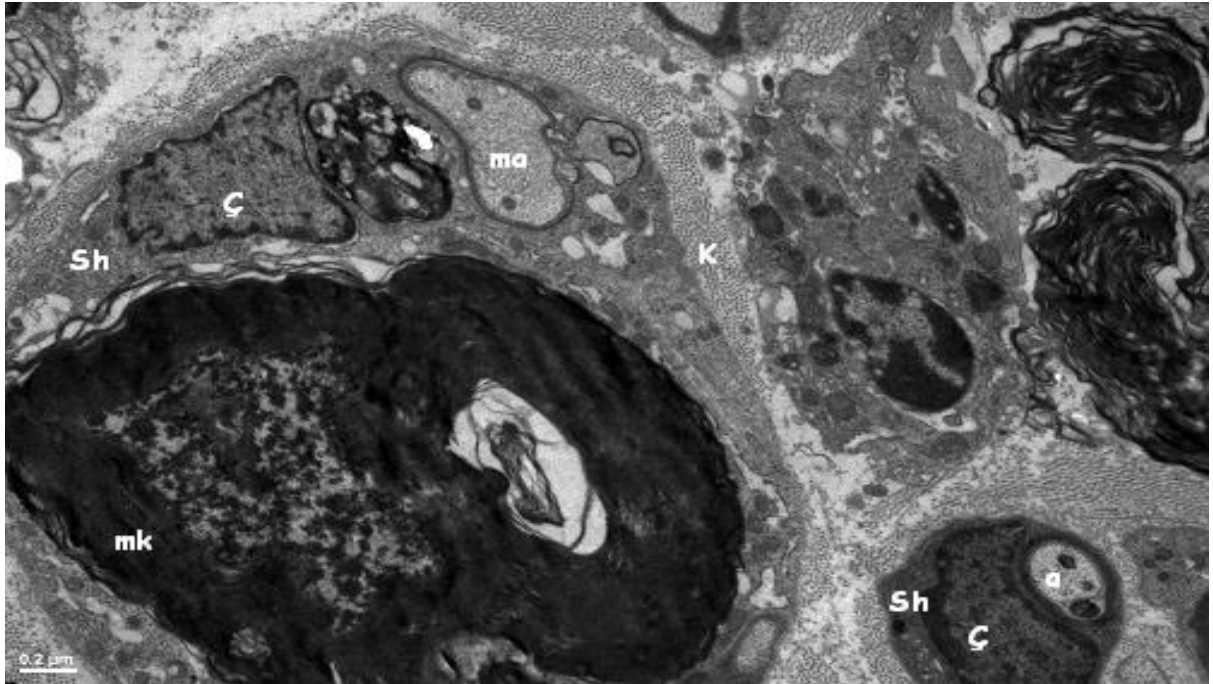


Şekil 4.43 Kontrol (sağlam) gruba ait tibial sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (a) ve miyelinsiz sinir lifleri (ma) izlenmektedir. Schwann hücrelerinin (Sh) sinir liflerini sarmış olduğu görülmektedir. Akson sitoplazmalarında mitokondriyonlar (m) ve nörofilamanlar (n) ayırt edilmektedir. Miyelinli (a) ve miyelinsiz liflerin (ma) aralarında interstisyumda bulunan kollajen lifler (K) görülmektedir. Miyelin kılıfı (mk)

Miyelinli sinir liflerinde, schwann hücrelerinin tek bir aksonu sardığı ve aksolemma ile hücre zarı arasında periaksonal boşluğun bulunduğu görüldü. Akson içerisinde mitokondriyonlar, agranüler endoplazmik retikülüm sisternaları, çok miktarda nörotübül ve nörofilamanların varlığı izlendi. Miyelinsiz sinir liflerinde, bir schwann hücrelerinin, genellikle birden fazla aksonu aynı anda sardığı dikkati çekti. Miyelin kılıfa sahip olmayan aksonlar, schwann hücresi sitoplazması içerisine gömülü olarak izlendi. Sinir lifleri, schwann kılıfının üzerinde fibröz bağ dokudan oluşan ve endonörium adı verilen bağ dokusu kılıfı ile sarılıydı. Sinir liflerinin aralarında, ince uzun sitoplazmik uzantıları ve heterokromatik çekirdekleriyle karakterize edilen fibroblastların varlığı izlendi. Ayrıca, az sayıda mast hücresi, makrofaj, kapiller damarlar ve başlıca kollajen liflerden oluşan fibröz bağ dokusu da yer almaktaydı (Şekil 4.43).

4.3.1.2 Ezilme grubu

Sinir ezilmesinden 2 hafta sonra alınan sinir demetlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde, schwann hücreleri, miyelinli sinir lifleri ve aksonlarda dejeneratif değişiklikler izlendi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfın yapısal bütünlüğünün bozulduğu, miyelin lamellerinin birbirlerinden ayrıldığı, aksonun büzüşmesine bağlı olarak

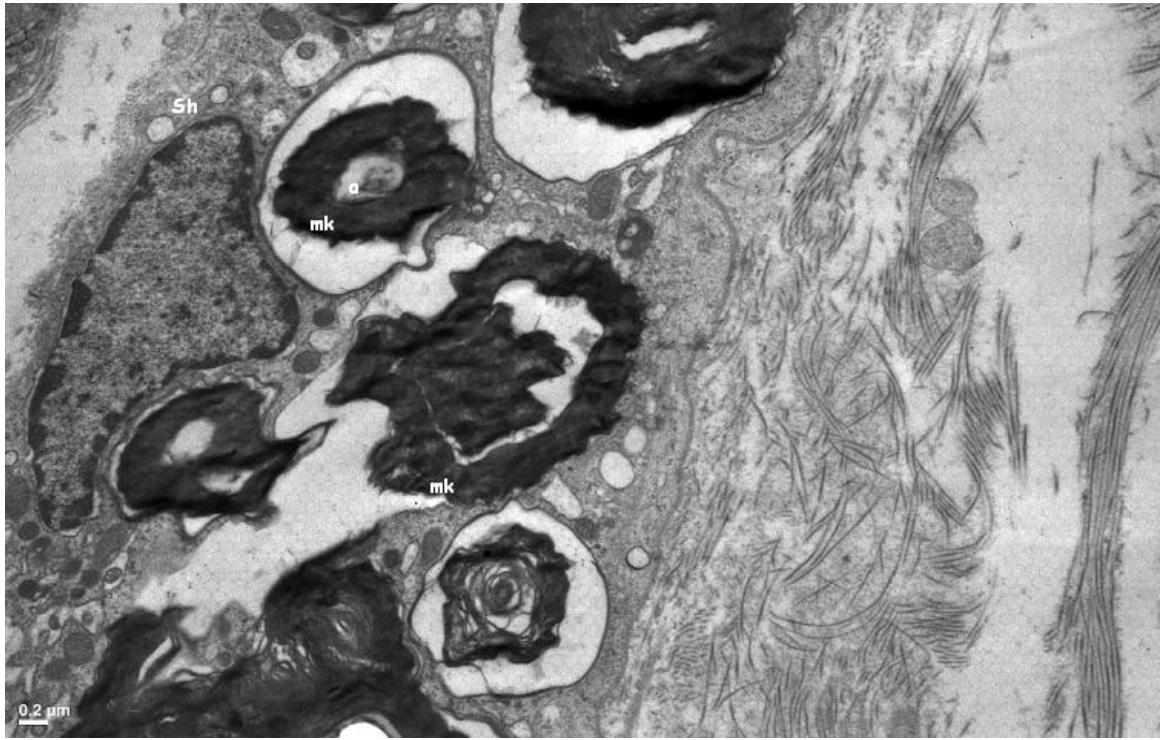


Şekil 4.44 2 haftalık ezilme grubu tibial sinir demetinden elde edilen elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (a) miyelin kılıf (mk) ve akson harabiyetleri izlenmektedir. Schwann hücrelerinde (Sh) çekirdekte (ç) kromatin kümeleşmesi, sitoplazmada vakuolizasyon gözlenmektedir.

akson ve miyelin kılıf arasında geniş boşlukların olduğu gözlemlendi. Dejenerasyonun belirgin olduğu sinir liflerinde, akson içerisinde özellikle mitokondriyonlar da belirgin olmak üzere organel harabiyetinin varlığı dikkati çekti. Sinir liflerini saran ve onların etrafında miyelin kılıf oluşturan schwann hücrelerinde çekirdekte kromatin kümeleşmesi, sitoplazmada fagosite edilmiş miyelin artıkları ve çok sayıda içleri boş, farklı büyüklüklerde vakuollere rastlandı.

Bunların yanı sıra, ortamda makrofaj varlığı da izlendi. Makrofaj sitoplazmasında fagosite edilmiş miyelin kılıf lamelleri ve çeşitli büyüklüklerde lipid damlacıklarına sıklıkla rastlandı (Şekil 4.44). Miyelinsiz sinir liflerinde, aksoplazmada organel harabiyeti ile çeşitli büyüklükte vakuoller kaydedildi.

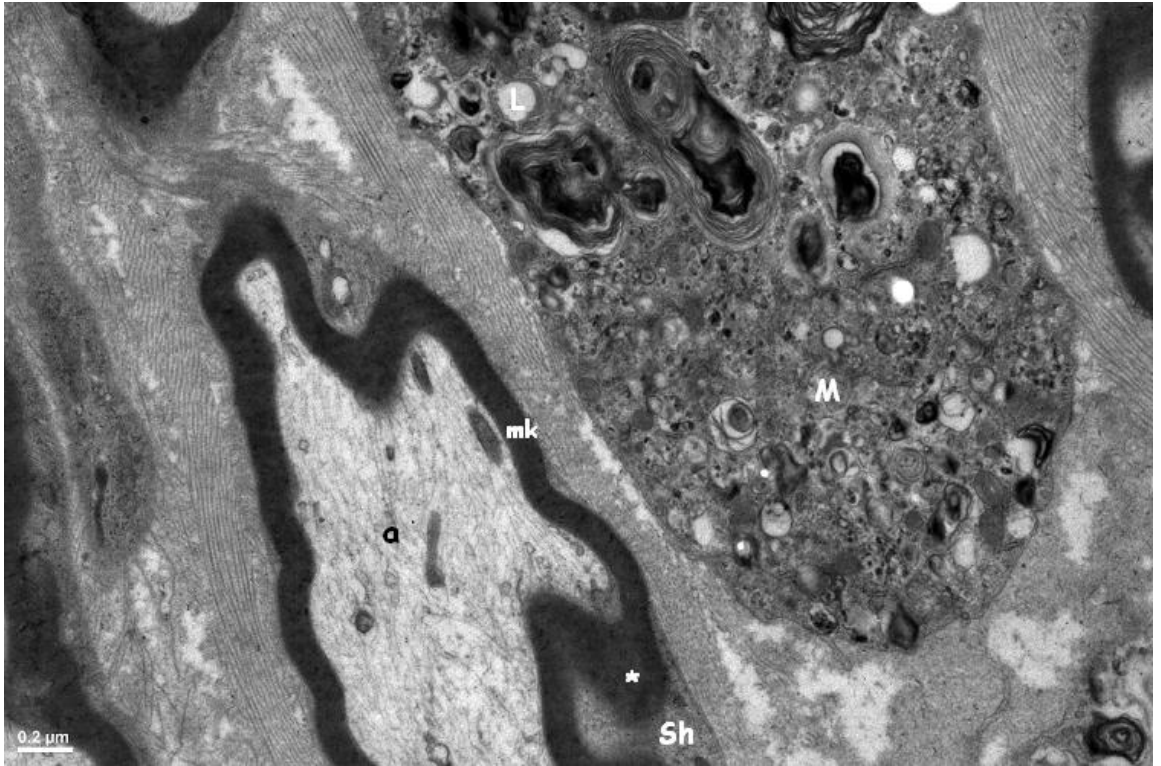
Aynı gruba ait sural ve tibial sinirlerin elektron mikroskopik incelenmesinde siyatik sinirde gözlenen yapısal değişikliklere benzer bulgular kaydedildi (Şekil 4.45). Ancak, miyelin kılıf harabiyeti, aksonal değişiklikler ve schwann hücrelerinde meydana gelen yapısal bozukluklar sural ve tibial sinirlerde daha da belirgindi.



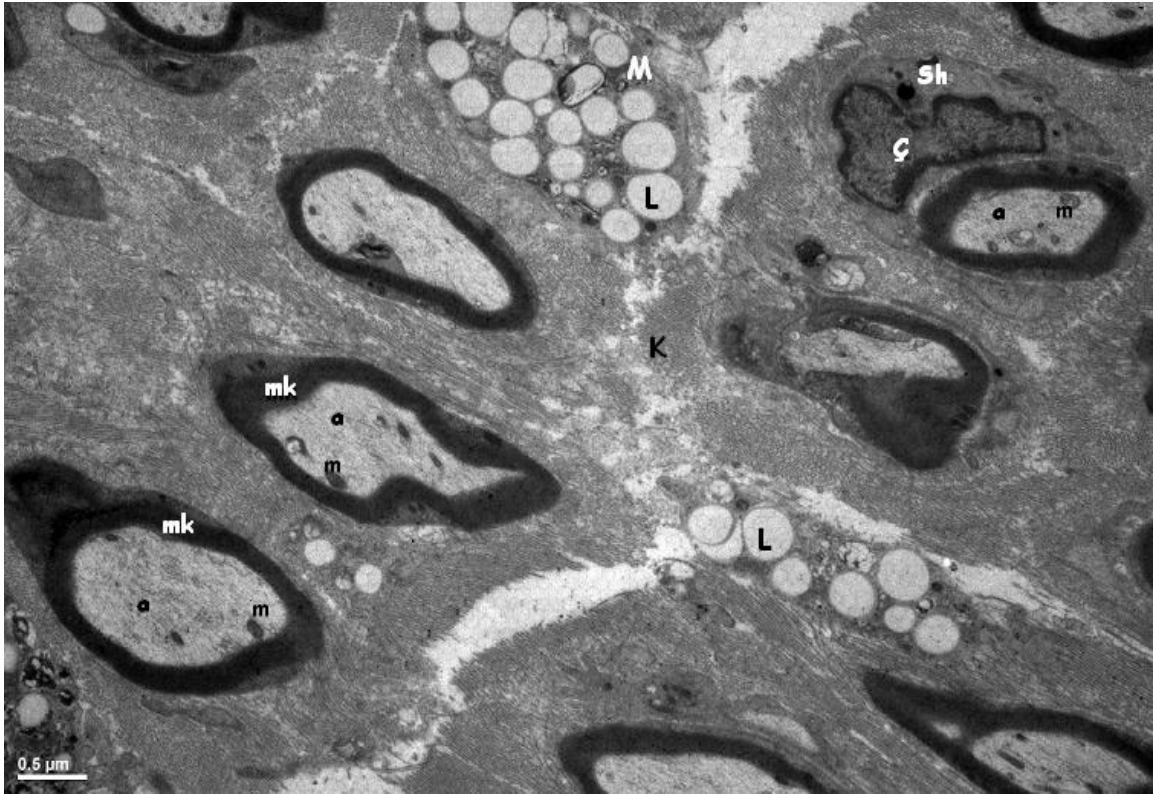
Şekil 4.45 2 haftalık ezilme grubu sural sinir demetinden elde edilen elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (a) miyelin kılıfın ileri derecede dejeneratif değişiklikler sergilediği görülmektedir.

Sinir ezilmesini takiben 4 hafta sonra incelenen tibial sinir demetlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde sinir lifleri ve schwann hücre yapısının, 2 haftalık ezilme gruplarına göre, daha iyi durumda olduğu belirlendi. Bununla birlikte, miyelinli sinir

liflerinde, miyelin kılıfın lameller yapısında ayrılmalar, fokal miyelin kılıf bozuklukları, aksonal büzüşme, aksoplazmada mitokondriyon harabiyeti sonucu oluşan vakuolizasyon, akson ile miyelin kılıf arasında meydana gelen geniş boşluklar bu grupta da görüldü. Miyelinsiz sinir liflerinde, yapısal bütünlük nisbeten korunmuştu. Buna rağmen bazı miyelinsiz sinir liflerinde organel harabiyeti ve vakuolleri içeren hafif yapısal değişiklikler de gözlemlendi. Schwann hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmik yapı nisbeten normale yakındı. Buna karşın bazı hücrelerde sitoplazmada miyelin kılıf artıklarını içeren fagozomlara da rastlandı. Bunların dışında, sinir liflerinin aralarında sitoplazmasında lipid damlacıkları ve fagozomların yer aldığı çok sayıda makrofaja da rastlandı. Sinir liflerinin etrafında fibroblast ve kollajen lifleri içeren fibröz bağ dokusu yer almaktaydı (Şekil 4.46). Fibroblastların oldukça aktif oldukları ve sitoplazmik uzantıları ile sinir liflerini sardıkları belirlendi. Kollajen liflerin yapı ve organizasyonları normal olarak değerlendirildi. Ortamda çok sayıda kapiller damarın varlığı da görüldü.



Şekil 4.46 4 haftalık ezilme gruplarından alınan tibial sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Schwann hücresinin (Sh) miyelinli sinir lifini (a) sardığı görülmektedir. Bazı miyelinli sinir liflerinde evaginasyonlar izlenmektedir (*). Sitoplazmasında yağ damlacıkları (L) olan bir makrofaj (M) dikkati çekmektedir.



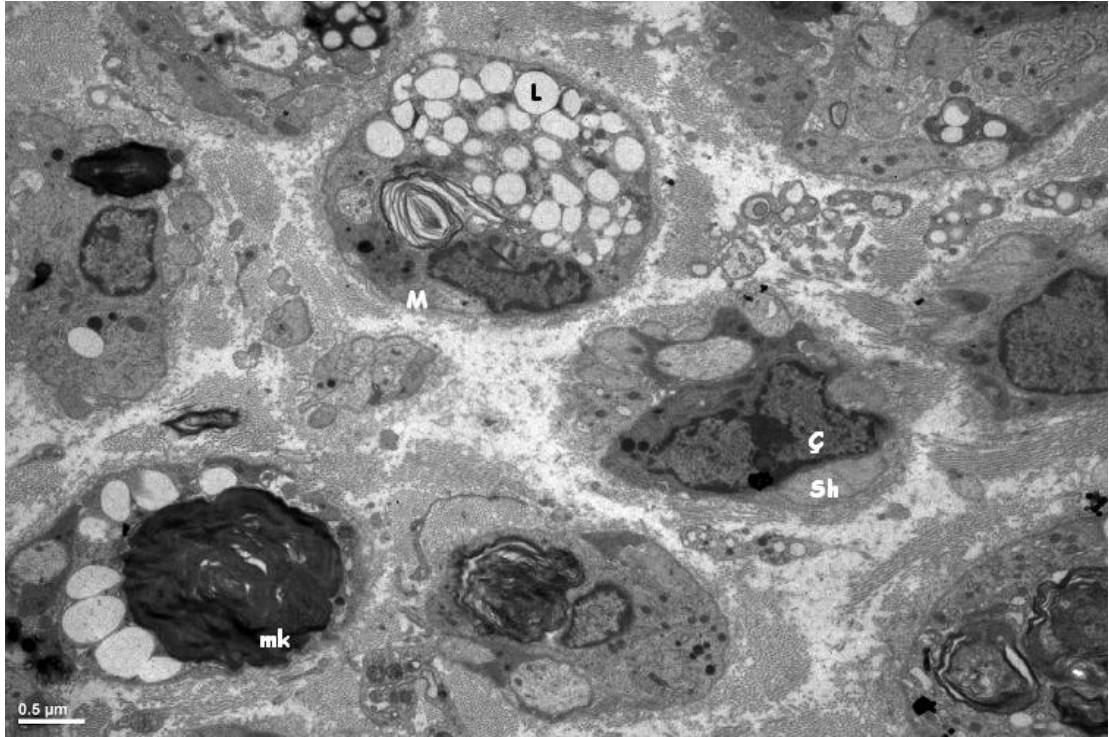
Şekil 4.47 4 haftalık ezilme gruplarından alınan sural sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (a) miyelin kılıf evaginasyonları (*) gibi fokal dejeneratif değişiklikler izlenmektedir. Sitoplazmasında yağ damlacıkları (L) içeren makrofajlar (M) dikkati çekmektedir. Sinir liflerinin aralarında kollajen liflerin (K) varlığı görülmektedir.

Bu grupta yer alan sural ve tibial sinir dokularının incelenmesinde miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri ile schwann hücrelerinin yapılarının birbirlerine benzedikleri ve özellikle miyelinli sinir liflerinde yapısal değişikliklerin 2 haftalık ezilme gruplarına göre daha iyi olmakla birlikte, fokal miyelin kılıf bozuklukları, lamellerde ayrışma ve aksonal büzüşmenin varlığının bu grupta da devam ettiği belirlendi. Schwann hücrelerinde normal yapısal bütünlük ve proliferasyon dikkat çekiciydi. Miyelinsiz sinir liflerinin normal yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 4.47). Sinir liflerini dıştan destekleyen fibröz bağ dokusunda fibroblastlarda sayıca artış ve kollajen liflerde düzenli organizasyon olduğu görüldü.

4.3.1.3 Ezilme+PMA grubu

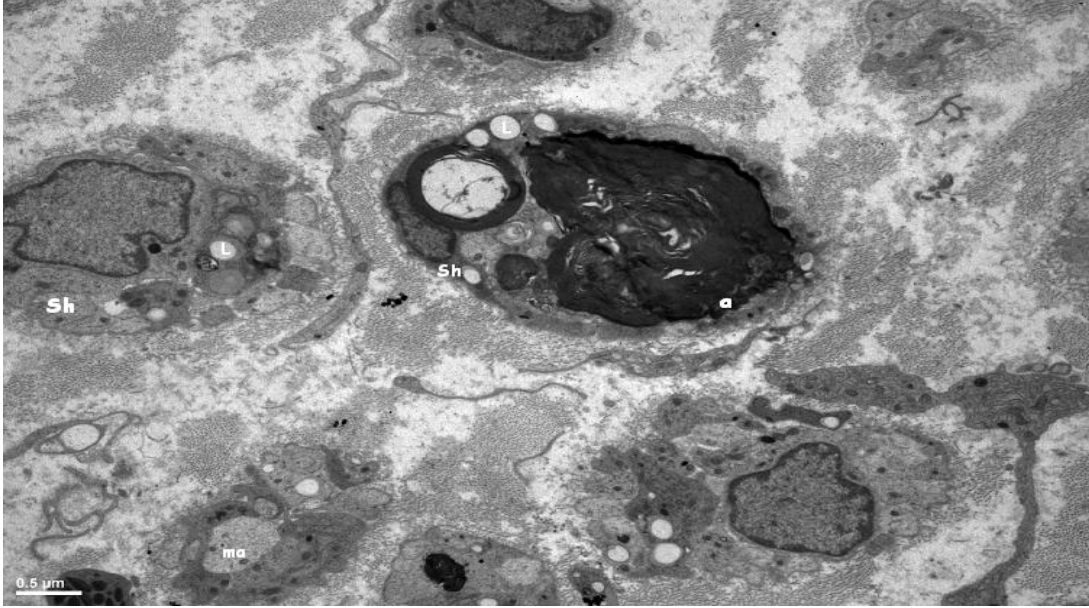
Sinir ezilmesinden sonra 2 hafta boyunca manyetik alan uygulamasına maruz bırakılan sinir demetlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde schwann hücreleri, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinde ileri derecede yapısal değişikliklerin meydana geldiği belirlendi. Schwann hücrelerinin sitoplazmasında dejeneratif veya yapısal bozukluğa uğramış pek çok miyelin kılıf artıklarının varlığı dikkati çekti. Hücrelerde çekirdekte kromatin kümeleşmesi ve

sitoplazmada lipid damlacıkları ve sekonder lizozom yapılarına da sıklıkla rastlandı. Schwann hücreleri dışında ortamda çok sayıda reaktif makrofajların da yer aldığı gözlemlendi. Makrofajlar yuvarlak bir çekirdek ve sitoplazmik uzantıları ile ayırt edilmekteydiler. Makrofaj sitoplazmalarında çok sayıda fagozom, lizozom ve lipid damlacıklarının varlığı kaydedildi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf ve aksonda belirgin olan ileri derecede dejeneratif değişikliklerin varlığı dikkati çekti. Miyelin kılıf lamellerinin çoğunlukla konsentrik düzenlenmelerini kaybettikleri ve aksonal zona doğru invagine oldukları izlendi. Akson içerisinde mitokondriyonlarda belirgin olan organel harabiyetleri görüldü. Miyelinsiz sinir liflerinde organel harabiyeti ve vakuol oluşumu gözlemlendi.



Şekil 4.48 Sinir ezilmesi sonrası 2 hafta PMA uygulamasına maruz bırakılan grubun tibial sinir dokularının elektron mikroskopik görünümü. Sinir lifleri Schwann hücreleri (Sh) tarafından sarılmıştır. Miyelinli sinir liflerinde (a) miyelin kılıfın (mk) lamellar yapısı tamamen bozulmuştur. Schwann hücre (Sh) çekirdeğinde (ç) heterokromatin artışı vardır. Sitoplazmasında lipid damlacıkları (L) bulunan makrofaj da (M) ayırt edilmektedir.

Sinir liflerinin aralarında geniş boşluklar şeklinde ödem alanlarının varlığı belirlendi. Ayrıca kollajen liflerin organizasyonlarında düzensizliklerin olduğu da dikkati çekti (Şekil 4.48). Miyelinli sinirlerde orta dereceden şiddetliye kadar değişen yapısal bozukluklar kaydedildi. Ayrıca ortamda çok sayıda makrofajın bulunduğu, hücrelerin sitoplazmasında miyelin artıklarını içeren fagozomlar ve lipid damlacıkları izlendi. Schwann hücrelerinde de siyatik sinir benzeri yapısal bozukluklar belirlendi (Şekil 4.49).

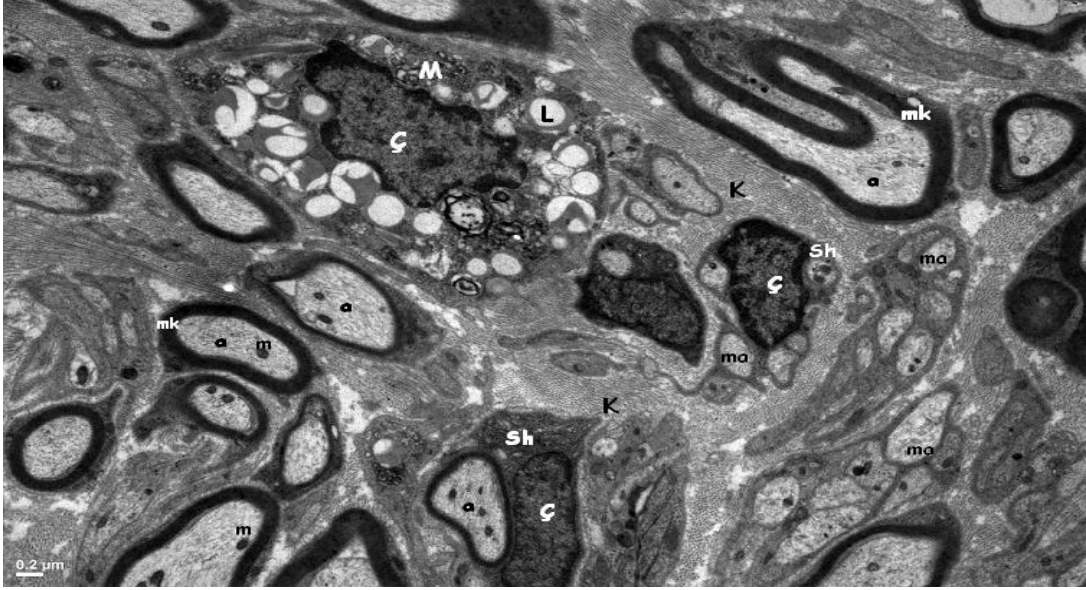


Şekil 4.49 2 haftalık Ezilme+PMA grubundan alınan sural sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (**a**) ve miyelinsiz sinir liflerinin (**ma**) ileri derecede dejenerasyona uğradığı görülmektedir. Miyelin kılıfın (**mk**) lamellar yapısı bozulmuştur. Schwann hücre (**Sh**) sitoplazmalarında yağ damlacıklarının (**L**) varlığı izlenmektedir.

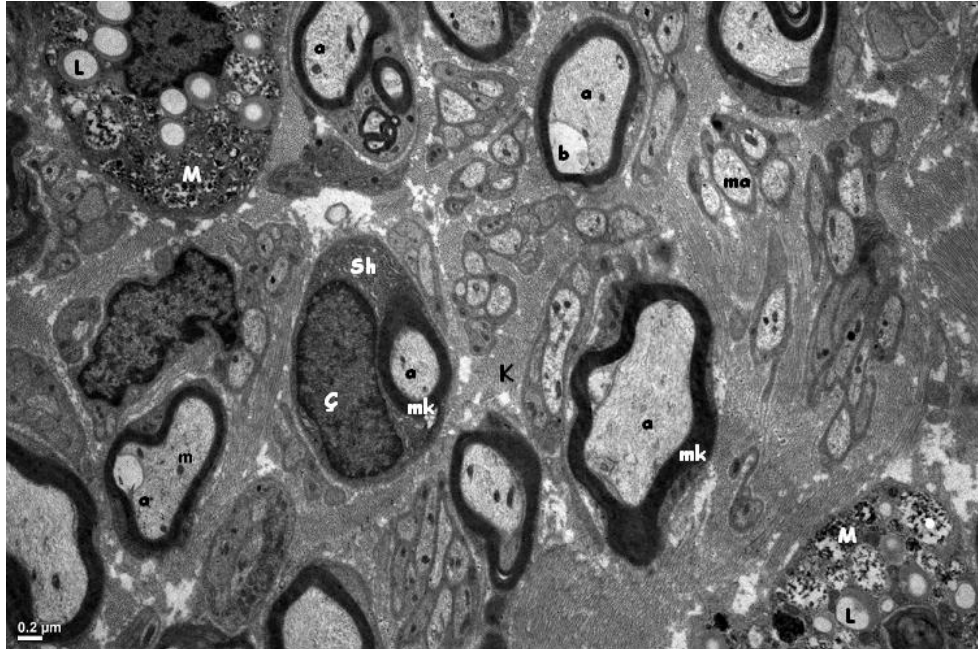
Sinir ezilmesini takiben 4 hafta boyunca manyetik alan uygulamasına maruz bırakılan siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik incelenmesinde miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin birçok alanda normal yapılarını korumuş oldukları dikkati çekti. Sinir liflerinde miyelin kılıf ve akson yapısı normal kontrol grubuna benzemektedir. Bununla birlikte, bazı alanlarda miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfta fokal dejeneratif değişikliklere de rastlandı. Sinir liflerinin bazılarında aksonlarda hafif büzüşme, akson ile miyelin kılıf arasında boşluklar izlendi. Schwann hücreleri miyelinli ve miyelinsiz lifleri sarmaktaydı. Bazı alanlarda bu hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıkları izlenmekle birlikte yapısal bütünlüğün genellikle korunduğu gözlemlendi. Sinir liflerinin aralarında sitoplazmasında fagozomlar, sekonder lizozomlar ve çok sayıda lipid damlacıklarına sahip makrofajlara da rastlandı. Sinir liflerinin aralarında yer alan fibroblast ve kollajen liflerin normal yapıda oldukları ve dıştan sinir liflerini destekledikleri gözlemlendi (Şekil 4.50).

4 hafta boyunca manyetik alana maruz bırakılan sural ve tibial sinir demetlerinde benzer olarak miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin bütünlüklerini korudukları görüldü. Sinir liflerinin önemli bir bölümünde miyelin kılıf ve akson yapısının normal kontrol grubuna benzemesi ilgi çekici bulundu. Miyelin kılıfta bazı alanlarda aksonal zona doğru invaginasyonlar görülmekle birlikte miyelin kılıfın genel olarak normal yapıda olduğu gözlemlendi. Miyelinsiz sinir lifleri normal yapıda izlendi. Schwann hücreleri, makrofajlar,

fibroblastlar ve kollajen liflerin yapı ve dağılımları da normal olarak değerlendirildi (Şekil 4.51).



Şekil 4.50 4 haftalık Ezilme+PMA grubundan alınan tibial sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (a) ve miyelinsiz (ma) sinir lifleri Schwann hücreleri (Sh) tarafından sarılmıştır. Akson sitoplazmalarında mitokondriyon (m) ve nörofilamanlar (n) izlenmektedir. Schwann hücre çekirdeklerinde (Ç) heterokromatin artışı belirgindir. Sitoplazmalarında lipid damlacıkları (L) içeren makrofaj (M) görülmektedir. Sinir liflerinin aralarında kollajen liflerin (K) varlığı izlenmektedir.

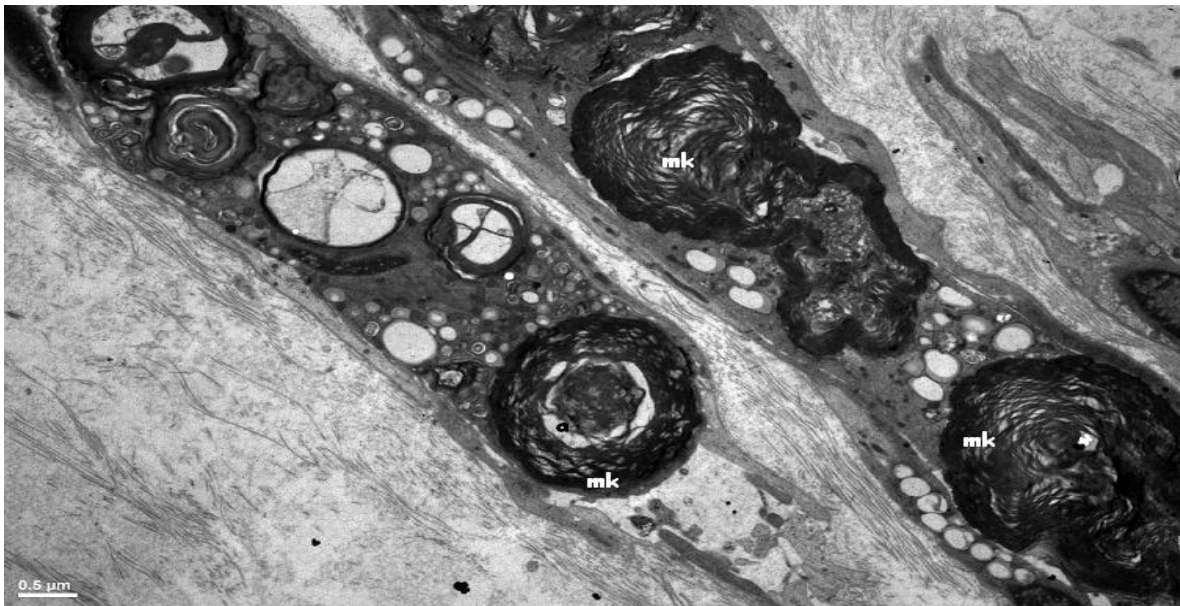


Şekil 4.51 4 haftalık Ezilme+PMA grubundan elde edilen sural sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinin (a) sitoplazmalarında büzüşmeler (b) izlenmektedir. Schwann hücreleri (Sh) sinir liflerini sarmaktadır. Schwann hücre çekirdeklerinde (Ç) heterokromatin artışı belirgindir. Bazı alanlarda makrofajların (M) sitoplazmalarında lipid damlacıkları (L) görülmektedir.

4.3.1.4 Ezilme+LEC grubu

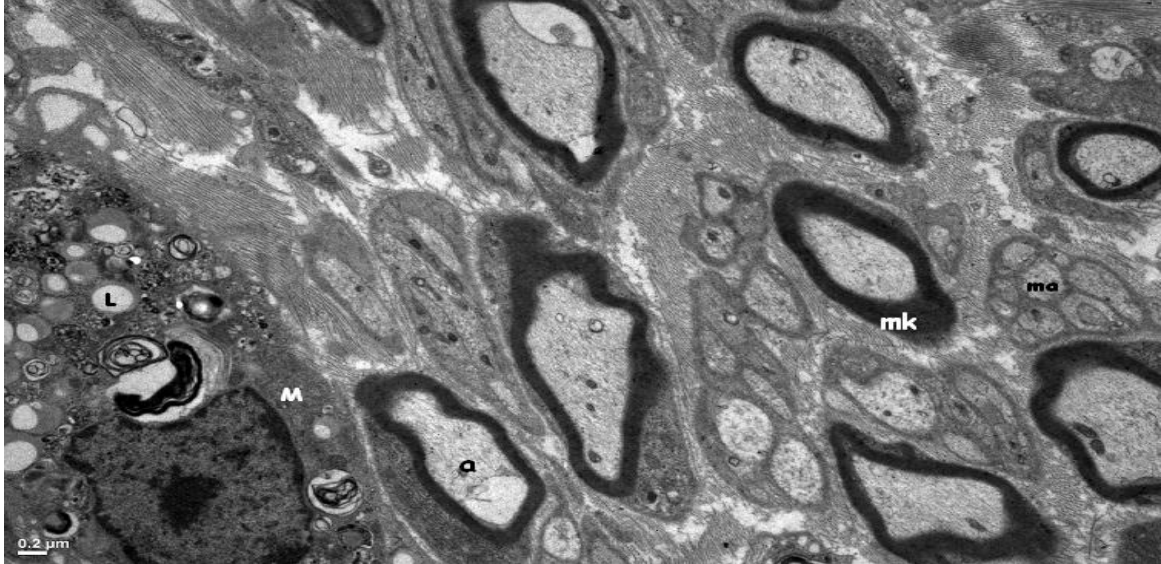
Sinir ezilmesi sonrasında LEC uygulanmış siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik değerlendirmesinde miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri, Schwann hücreleri ve makrofajlarda yapı ve dağılım 2 haftalık ezilme gruplarına benzemektedir. Sinir liflerinin sayılarının son derece azaldığı dikkati çekmekteydi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf ve akson yapısının bozulduğu, miyelin kılıf lamellerinin birbirinden ayrıştığı, miyelin lamellerinin aksonal zona doğru invagine oldukları, aksonlarda organellerin dejenere oldukları, aksonlarda aşırı büzüşmeye bağlı olarak akson ile miyelin kılıf arasında geniş boşlukların oluştuğu dikkati çekti. Ortamda bozulmuş ve dejenere olmuş miyelin kılıf artıklarını fagosite etmiş makrofajlara rastlandı. Makrofaj sitoplazmalarında ayrıca çok sayıda lipid damlacıkları ve sekonder lizozomlara da rastlandı. Schwann hücrelerinde çekirdekte heterokromatin artışı, sitoplazmada bozulmuş miyelin kılıf lamelleri ve vakuollerin varlığı gözlemlendi (Şekil 4.52). Sinir liflerinin aralarında yer alan fibroblast ve kollajen liflerin zayıf olarak temsil edildiği gözlemlendi.

Sinir ezilmesini takiben LEC uygulaması yapılan sural ve tibial sinir dokularının ultrastrüktürü siyatik sinirde olduğu gibi yapısal değişikliklere uğramıştı. Sinir lifleri etrafında yer alan miyelin kılıf lamellerinde ayrışma, bozulma ve dejenerasyonlar belirlendi. Miyelinsiz aksonlarda organellerde bozulma ve vakuolizasyon izlendi. Schwann hücreleri ve makrofajlarda sitoplazmanın fagozomlar ile dolu olduğu dikkati çekti.



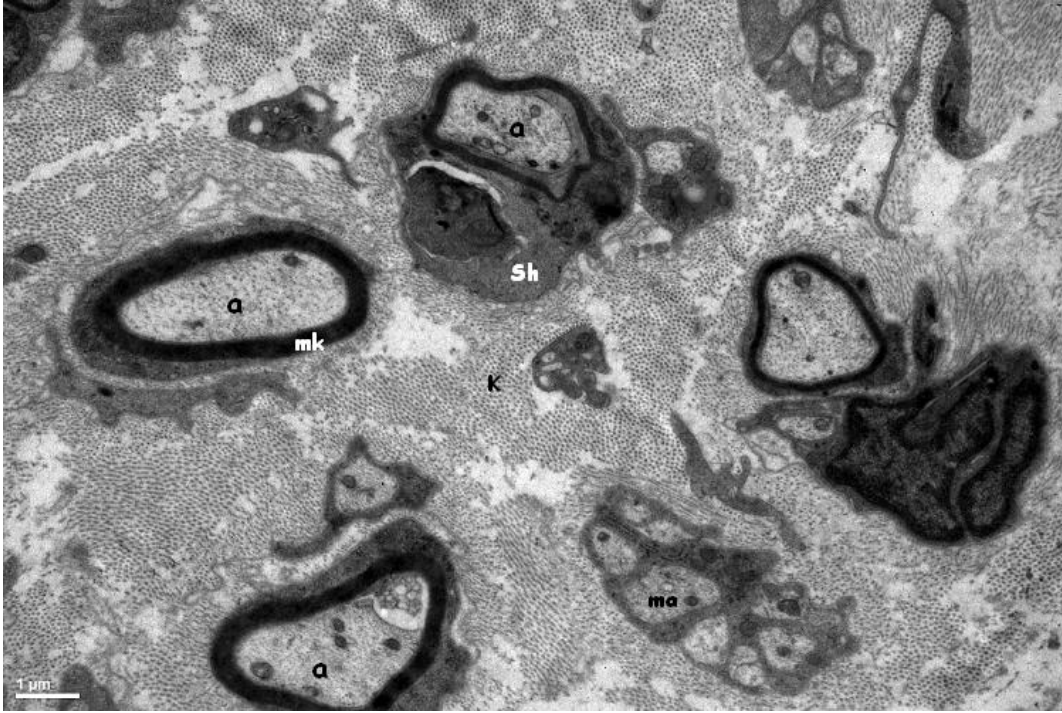
Şekil 4.52 2 haftalık Ezilme+LEC uygulaması yapılan grupta tibial sinirde miyelinli sinir liflerinin (a) tamamen dejeneratif değişiklikler gösterdiği ve miyelin kılıf (mk) lamellar yapısının bozulmuş olduğu izlenmektedir.

Sinir ezilmesini takiben 4 hafta boyunca LEC uygulanan siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik incelenmesinde yapının 2 haftalık gruba göre daha iyi durumda olduğu, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin çoğu alanlarda normale yakın oldukları gözlemlendi. Sinir liflerinde miyelin kılıf ve akson yapısı hafif miyelin kılıf bozuklukları dışında genellikle, normal yapısını korumuştur. Bununla birlikte, sinir liflerinin sayılarında belirgin azalma ve bazı alanlarda miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfta fokal dejeneratif değişikliklere bu grupta da rastlandı. Sinir liflerinin bazılarında aksonlarda hafif büzüşme, akson ile miyelin kılıf arasında boşluklar izlendi. Miyelinli ve miyelinsiz lifleri saran Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıkları izlenmekle birlikte yapısal bütünlüğün genellikle korunduğu gözlemlendi. Sinir liflerinin aralarında sitoplazmasında fagozomlar, sekonder lizozomlar ve çok sayıda lipid damlacıklarına sahip makrofajlara da rastlandı (Şekil 4.53).



Şekil 4.53 4 haftalık Ezilme+LEC uygulamasına maruz bırakılan tibial sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (a) fokal miyelin kılıf değişiklikleri izlenmektedir. Miyelinsiz sinir lifleri (ma) normal histolojik yapılarını korumaktadır.

Ezilmeyi takiben 4 hafta boyunca LEC uygulanan sural ve tibial sinir dokularında da birbirine benzer olarak miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin genellikle normal yapılarını korudukları görüldü. Miyelin kılıfta bazı alanlarda fokal miyelin kılıf bozuklukları ile aksonal zona doğru invaginasyonlar görülmekle birlikte miyelin kılıfın genel olarak normal yapıda olduğu gözlemlendi. Miyelinsiz sinir liflerinde de organellerde genişleme ve vakuolizasyon izlendi. Schwann hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve kollajen liflerin yapı ve dağılımları nisbeten normal olarak değerlendirildi (Şekil 4.54)



Şekil 4.54 4 haftalık Ezilme+LEC uygulamasına maruz bırakılan sural sinir demetinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (**a**) ve miyelinsiz (**ma**) sinir lifleri izlenmektedir. Schwann hücresinin (**Sh**) tek bir miyelinli sinir lifini (**a**) sarmış olduğu izlenmektedir. Sinir liflerinin aralarında interstisyumda bulunan kollajen lifler (**K**) ayırt edilmektedir

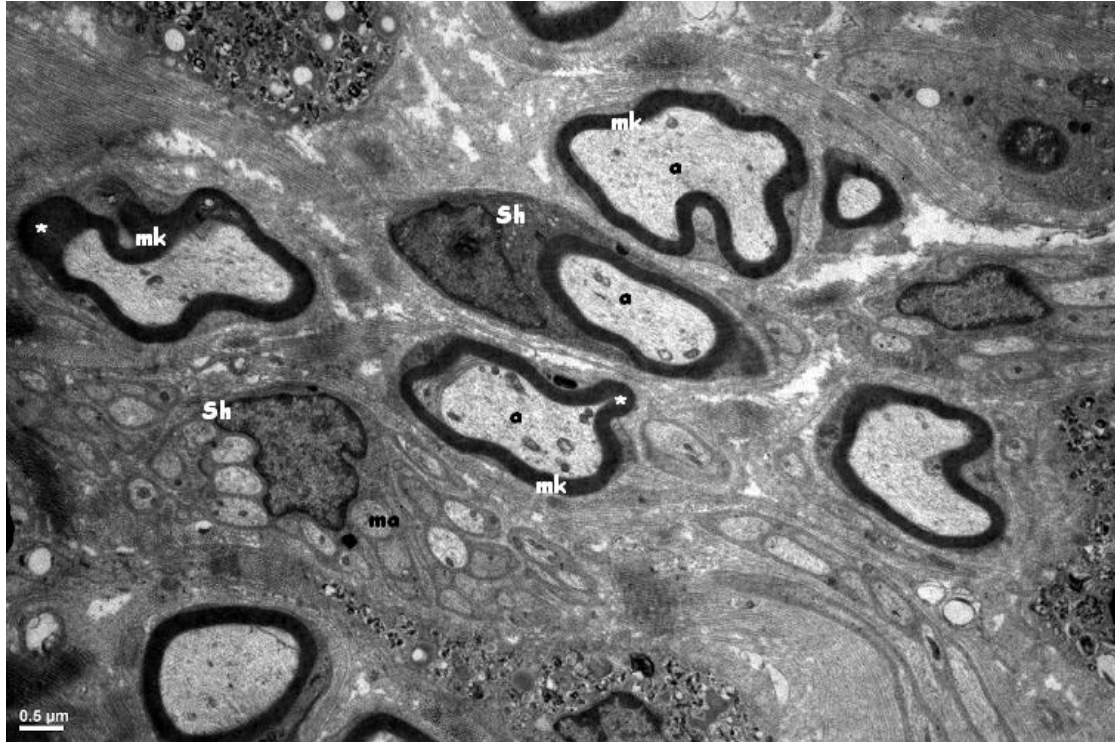
4.3.1.5 Ezilme+Kombine grubu



Şekil 4.55 2 haftalık Ezilme+Kombine grubu tibial sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinin (**a**) dejenerasyona uğradıkları ve miyelin kılıf (**mk**) lamellar yapısının bütünlüğünün bozulduğu izlenmektedir. Sinir liflerinin aralarında kollajen lifler (**K**) görülmektedir.

Sinir ezilmesini takiben manyetik alanla birlikte ilk 2 hafta LEC uygulanan siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik incelemesinde miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinde özellikle miyelin kılıf ve akson yapısında dejeneratif bozukluklar belirlendi. Miyelinli sinir liflerinde, miyelin kılıfın lameller yapısının tamamen bozulmuş olduğu ve miyelin lamellerinin birbirlerinden ayrılmış oldukları dikkati çekti.

Ayrıca aksonlarda büzüşme ve organel harabiyeti, akson ile miyelin kılıf arasında geniş boşlukların oluşumu da kaydedildi. Aksoplazmada nörotübül ve nörofilamanlarında yapısal düzenlenmeleri bozulmuştu. Bunun dışında, miyelinsiz sinir liflerinde organel harabiyeti ve vakuolizasyon gözlemlendi. Sinir lifleri etrafında yer alan schwann hücrelerinin çekirdeğinde kromatin artışı ve sitoplazmalarında fagozomlar izlendi. Makrofaj sitoplazmalarında fagosite edilmiş miyelin artıkları ile lipid damlacıkları ve lizozomlara da sıklıkla rastlandı. Sinir liflerinin aralarında yer alan fibroblast ve kollajen liflerin gelişimi zayıf olarak temsil edilmekteydi (Şekil 4.56). Sinir liflerindeki dejenerasyon her iki sinirde de oldukça belirgin olup, miyelin kılıf değişiklikleri, aksonal harabiyet ve schwann hücrelerinde kaydedilen yapısal bozukluklar gözlenen ortak bulguları.



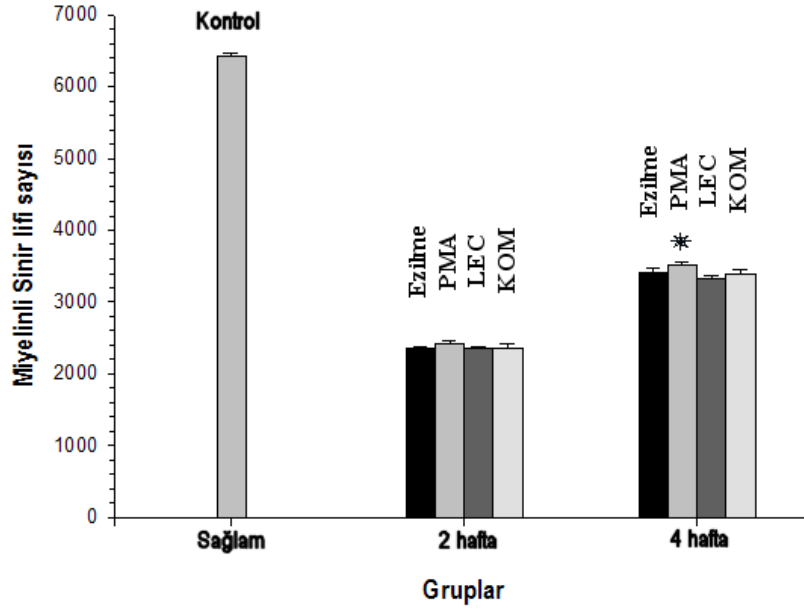
Şekil 4.56 4 haftalık Ezilme+Kombine grubu tibial sinir demetlerinin elektron mikroskopik görünümü. Schwann hücresinin (Sh) tek bir miyelinli sinir lifini (a) sararken, birden fazla miyelinsiz sinir lifini (ma) sarmış olduğu izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinin (a) bazılarında miyelin kılıf (mk) evaginasyonları görülmektedir (*)

Sinir ezilmesinden sonra 4 hafta süreyle manyetik alan ve ilk 2 hafta LEC'in birlikte uygulandığı bu gruba ait sinir dokularının elektron mikroskopik incelenmelerinde, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin azda olsa bazı alanlarda normal yapılarını korumuş oldukları, miyelin kılıf yapısının genellikle normal yakın olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, bazı alanlarda miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfta fokal dejeneratif değişikliklere rastlandı. Sinir liflerinin bazılarında aksonlarda hafif büzüşme, akson ile miyelin kılıf arasında boşluklara izlendi. Schwann hücreleri miyelinli ve miyelinsiz lifleri sarmaktaydı. Bazı alanlarda bu hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıkları izlenmekle birlikte yapısal bütünlüğün genellikle korunduğu gözlemlendi. Sinir liflerinin aralarında sitoplazmasında fagozomlar, sekonder lizozomlar ve çok sayıda lipid damlacıklarına sahip makrofajlara da rastlandı. Sinir liflerinin aralarında yer alan fibroblast ve kollajen liflerin normal oldukları gözlemlendi (Şekil 4.56).

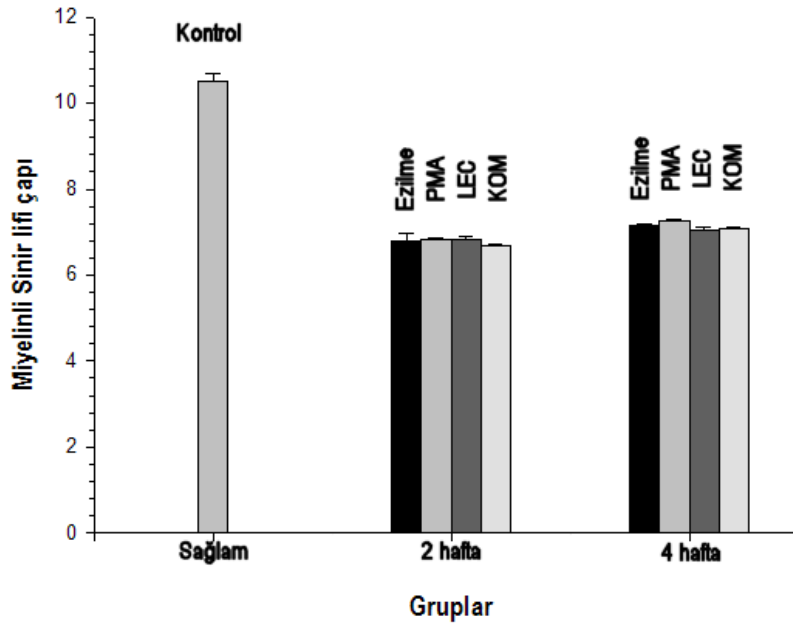
4.3.2 Histomorfometrik Bulgular

Bütün gruplarda siyatik sinirde, ortalama miyelinli sinir liflerinin sayıları ve miyelinli sinir liflerinin çapları değerlendirildi. Ortalama miyelinli sinir lifi sayıları dikkate alındığında; sağlam grupta ortalama miyelinli sinir lifi sayısı: 6432 ± 34 ; 2 haftalık Ezilme grubunda 2354 ± 33 ; 2 haftalık Ezilme+PMA grubunda 2419 ± 44 ; 2 haftalık Ezilme+LEC grubunda 2363 ± 25 ; 2 haftalık Ezilme+Kombine grubunda 2366 ± 49 olarak hesaplandı. 4 haftalık Ezilme grubunda ise 3419 ± 56 ; 4 haftalık Ezilme+PMA grubunda 3512 ± 49 ; 4 haftalık Ezilme+LEC grubunda 3325 ± 39 ; 4 haftalık Ezilme+Kombine grubunda 3398 ± 54 olarak sayıldı.

Miyelinli sinirlerde ortalama sinir lifi çapları dikkate alındığında; normal siyatik sinirde $10,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$; 2 haftalık Ezilme grubunda $6,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$; 2 haftalık Ezilme+PMA grubunda $6,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$; 2 haftalık Ezilme+LEC grubunda $6,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$; 2 haftalık Ezilme+Kombine grubunda $6,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ olarak hesaplandı. 4 haftalık Ezilme grubunda ise $7,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$; 4 haftalık Ezilme+PMA grubunda $7,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$; 4 haftalık Ezilme+LEC grubunda $7,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$; 4 haftalık Ezilme+Kombine grubunda $7,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$ olarak sayıldı.



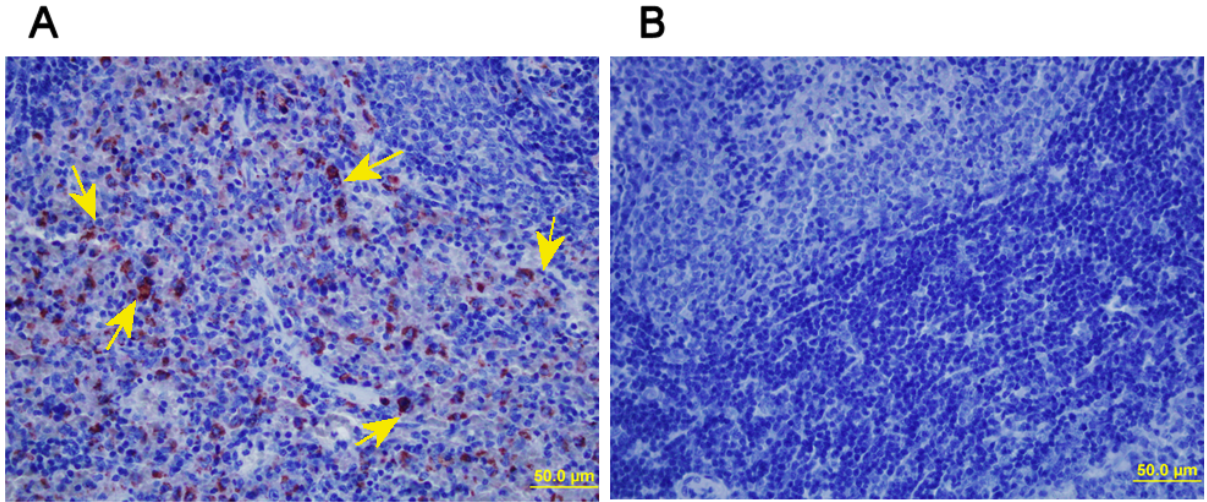
Şekil 4.57. Kontrol, 2 hafta ve 4 hafta gruplarda histo-morfometrik yöntemlerle değerlendirilen ortalama miyelinli lif sayıları verilmektedir. 4. haftada PMA grubu LEC grubuna göre anlamlı olarak daha fazla miyelinli lif içermekteydi (*) ($p<0,05$)



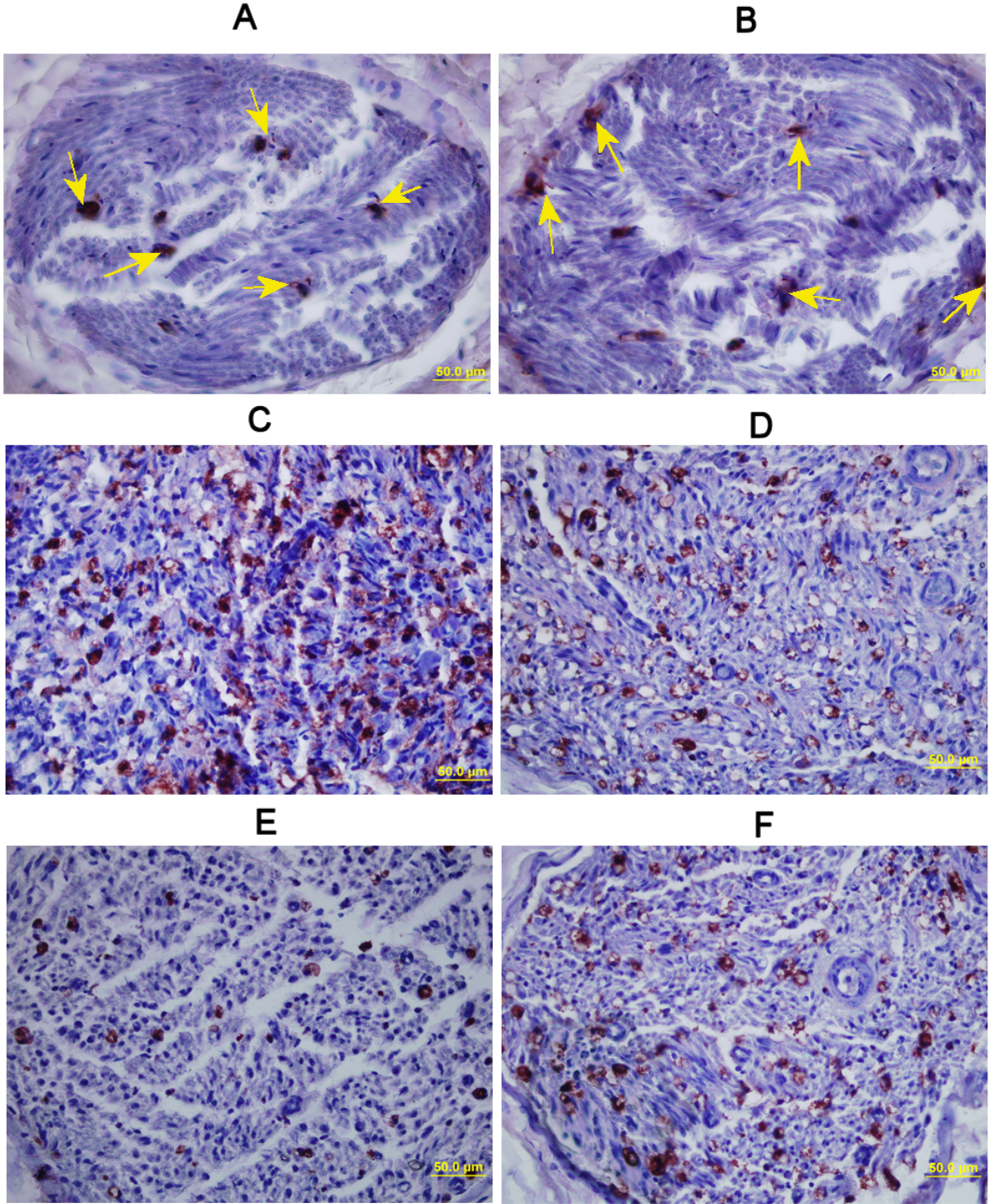
Şekil 4.58. Kontrol, 2 hafta ve 4 hafta gruplarda histo-morfometrik yöntemlerle değerlendirilen ortalama miyelinli lif çapları verilmektedir.

4.3.3 İmmuno-histokimya Bulguları

Siyatik, sural ve tibial sinirlerde kontrol ve deney gruplarında makrofaj aktivitesinin immünohistokimyasal olarak belirlenmesi amacıyla, makrofajlara özgü CD68 işaretlemesi yapıldı. Pozitif kontrol olarak sıçan dalak dokusu kullanıldı, bu grupta, beyaz pulpada folliküllerde ve kırmızı pulpa içerisindeki hücre sütunlarında bulunan makrofajlarda belirgin CD68 immünreaktivitesi gözlemlendi. Anti-CD68 primer antikörünün kullanılmadığı negatif kontrol dalak kesitlerinde CD68 immünreaktivitesi belirlenmedi (Şekil 4.59 A ve B). Tamamen normal kontrol sinirlerde, az sayıda makrofajın varlığı, epinöryumda, sinir fasiküllerinin aralarında ve sinir lifleri ile kapiller damarlar çevresinde kaydedildi. 2 haftalık ezilme gruplarında CD68 immünreaktivitesi belirgin olarak, özellikle dejenerasyonun belirgin olduğu alanlarda, sinir liflerinin aralarında ve perinöral bağ dokusu içerisinde gözlemlendi. 2 haftalık ezilmeyi takiben PMA uygulanan gruplarda makrofaj immünreaktivitesi ezilme gruplarına benzemekle beraber reaktif makrofaj miktarı artmıştı. 4 haftalık ezilme gruplarında, makrofaj immünreaktivitesi, 2 haftalık ezilme gruplarına göre nispeten azalmakla birlikte, bu gruplarda da belirgindi. Bununla birlikte, 4 haftalık ezilmeyi takiben PMA uygulanan gruplarda immünreaktivitedeki azalma dikkati çekti. Bu azalma özellikle PMA uygulamasında çok daha belirgindi (Şekil 4.60).



Şekil 4.59 Makrofajlara özgü CD68 işaretlemesi yapılması için Pozitif ve Negatif kontrol olarak sıçan dalak dokusu kullanıldı. A) Pozitif kontrol; sarı ok başları ile gösterilen kırmızıya boyanmış makrofajlardır. B) Negatif kontrol olduğundan CD68 immünreaksiyon gözlenmedi



Şekil 4.60 Tibial sinirde kontrol ve ezilme gruplarına ait makrofajlara özgü CD68 işaretlemesi yapıldıktan sonra çekilen mikrograflar görülmektedir. **A ve B**; Kontrol grubu tibial ve sural sinire ait sarı ok başları ile gösterilen kırmızıya boyanmış makrofajlardır. **C**; 2 hafta Ezilme+PMA grubu; artmış CD68 immünreaksiyon dikkati çekmektedir. **D**; 2 hafta Ezilme+LEC grubu, **E**; 4 hafta Ezilme+PMA grubunda daha az sayıda makrofaj yani daha az pozitif immünreaktivite görülmektedir. **F**; 4 hafta Ezilme+LEC grubuna ait gecikmiş immünreaksiyona ait makrofajlar daha sıklıkla görülmektedir.

5. TARTIŞMA

5.1 Periferik Sinirlerde Nöropati ve Rejenerasyon

Periferik sinirler mekanik bir travmadan (bası, gerim, şiddet) başka termal, iskemik ve kimyasal etkenler gibi çok farklı etkenlerle de hasarlanabilmektedirler. Bu tip yaralanmalarda hayati tehlike pek olmasa da sonuçta kişinin fonksiyonlarını ileri derecede kısıtlayabilmesi, sosyoekonomik ve psikolojik durumunu etkileyebilmesi açısından önemlidir. Periferik sinir hasarının daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenebilmesi için periferik sinir hasarı birçok araştırmaya konu olmaya artarak devam etmektedir. Periferik sinir hasarı sonrası beklenen; iyileşmenin (fonksiyonel geri dönüş) en kısa sürede sağlanması ve iyileşme döneminin kısaltılmasıdır. Sinir rejenerasyonunun nihai başarısı kompleks bir sürecin tamamlanmasına bağlıdır. Bu süreç: Aksonal filizlenme, büyüme, uygun duysal/motor hedeflere reinervasyon ve rejenere liflerin merkezi sinir sistemi ile yeniden entegrasyonunu içermektedir^{4,22,23}. Periferik sinirler, kendilerini saran bağ dokularından dolayı elastiktir ayrıca her bir lif önemli gerilme direnci olan uzunlamasına yerleşmiş kollajen fibrillerle çevrelenmiştir. Sinire uygulanan çekme veya bası, gerilme direncinin üzerine çıkarsa yaralanma meydana gelir ve devamlılık ortadan kalkabilir ama lifin devamlılığı çoğu zaman korunur. Yaygın olarak görülen yaralanma türü, gerilme ve ezilme (crush) tipi yaralanmalardır. Sonucunda travmatik mononöropati gelişir^{24,25,26}.

Birçok sinir araştırmacısının deneysel model tercihi sıçanlar (rat) olmuştur. Sıçan periferik sinirinin histolojik değerlendirilmesi insan sinir dokusundan pek de farklı değildir. Bu çalışmanın amacı sıçanlarda siyatik sinirin mekanik ezilmesi ile meydana getirilen mononöropatinin gelişim ve iyileşme sürecini araştırmak ve tedaviye yönelik yaklaşımlar getirebilmektir. Sıçanlarda deneysel olarak meydana getirilen travmatik mononöropati modeli ezilme sonrası dejenerasyon ve rejenerasyon sürecinin değerlendirilmesine imkan tanıyan bir model olarak sıklıkla kullanılır. Sinir ezilmesinde farklı tekniklerin kullanılması ve değerlendirme yöntemlerinin farklılık göstermesi, karşılaştırmalarda bazı güçlükleri ortaya çıkarabilmektedir^{36,37,70}. Ezilme tipi nöropati oluşturmak için genellikle ince uçlu forseps kullanılmaktadır. Çalışmamızda ince uçlu non-serrated (dişsiz), hemostatik standart bir forseps ile siyatik sinir 30 s boyunca 2 diş sıklıkta ezildi. Meydana getirdiğimiz travmatik mononöropati modeli elektrofizyolojik ve histolojik bulgular açısından literatür ile uyumludur^{14,43,55,73}.

Periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde bugüne kadar; çeşitli sütur teknikleri, anastomozlar, sinir greftleri, non-nöronal doku greftleri, kombine greftler, sinir konduitleri ve silikon-sentetik tüpler gibi pek çok yöntem uygulanmış ve bunların sinir iyileşmesine olan

muhtemel etkileri geniş olarak literatürde yerini almıştır. Sinir rejenerasyonunun arttırılmasında eksojen olarak uygulanan başlıca nörotropik faktörler ise (NGF, TGF-beta gibi), steroidler, hormonlar, çeşitli kimyasal maddelerin de etkinliği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu yöntemlerin hepsi invazif cerrahi gerektiren tekniklerdir.

5.2 Manyetik Alan Etkisi ve Uygulama Protokolü

Literatürde sinir rejenerasyonu üzerine PMA etkisini inceleyen araştırmalarda çoğunlukla μT ve mT şiddetindeki alanlar kullanılmaktadır. Uygulamalarda çoğunlukla puls sıklığı 0-100 (s^{-1}) Hz arasında, puls trenleri şeklinde ve günlük uygulama süreleri de genellikle birkaç saat/gün olarak uygulanmaktadır⁶³. Bu çalışmada uyguladığımız PMA'nın şiddeti, süresi ve frekansı literatüre uygun olarak seçildi. PMA'nın rejenerasyon ve iyileşme üzerindeki etkilerini araştırarak yazılar literatürde geniş yer tutmaktadır. Bu alanlar başlıca kemik kırıkları, sinir yaralanmaları, deri ve yumuşak doku hasarlarıdır. Kemik kırıkları, kültür ortamında kırıldak doku üretimi ve deri yaralanmalarında iyileşmeyi hızlandırdığı yönünde birçok makaleye konu edilmektedir. Sıçanlarda siyatik sinir yaralanmalarında ise fonksiyonel iyileşmeyi %20-22 oranında hızlandırdığı ileri sürülmüştür⁶¹⁻⁶⁸. Sinir hücre kültürlerinde yapılan diğer bazı araştırmalarda sinir hücrelerinde nörit uzama hızının PMA etkisi ile arttığı ve bunun PMA'nın intrasellüler Ca^{+2} salınımını tetiklemesi yoluyla gerçekleştirdiği bildirilmektedir⁷⁹.

Rejenerasyon sürecini hızlandırmak için uygulanan non-invasif bir alternatif tedavi tekniği de puls şeklinde, çok düşük frekanslı, pulslu manyetik alan (PMA) uygulamalarıdır. Pozitif etkinliği literatürde birçok çalışmada rapor edilen PMA'nın yapısal harabiyeti durdurabileceği, rejenerasyon sürecini hızlandırabileceği ifade edilmektedir. Ancak PMA'nın etki mekanizması açık olmamakla birlikte; makrofaj aracılı etki gösterebileceği, makrofaj aktivasyonunun artmasının da rejenerasyonda rol alan bazı nörotrofik faktörleri aktive ettiği öne sürülmüştür^{62,64}.

Makrofajlar, Wallerian Dejenerasyon (WD) ve aksonal rejenerasyonun birçok safhasında olayın yakın bir şekilde içindedir. Beuche ve Friede⁷⁸ adlı araştırmacıların yapmış olduğu önemli deneyde, sinir segmentleri, büyüklükleri makrofaj geçişine izin vermeyecek kadar küçük milipor bölmeler içine dejenere olmaya bırakıldığında, miyelin kalıntılarının haftalarca kaldığını gösterdiler. Makrofaj geçişine izin veren büyüklükte milipor bölmeler kullandıklarında ise ani miyelin temizlenmesi ile sonuçlandı^{77,78}. Başka bir deyişle makrofaj; WD için olmazsa olmaz fagositik hücredir, başka bir deyişle erken WD, erken rejenerasyondur^{26,29,77,78,93}.

Periferik sinirlerin çoğu endonöryum tabakasında bulunan damarların bazal laminası içinde ya da hemen dışında uzanan yerleşik bir makrofaj grubu içerir (tüm hücre popülasyonunun %2-9'u kadar). Yerleşik makrofajlar, schwann hücreleri ve diğer fagositik hücrelerin (Monosit ve Mast hücreleri gibi), hasarlanma sonrası miyelin kılıfın kaldırılmasına ne miktarları ne de fagositik özellikleri yeter. Hasarlanma sonrası ilk 2 gün içerisinde, kan dolaşımı yolu ile dalak ve karaciğer kaynaklı makrofajlar spesifik olarak dejenere olan liflere infiltre olurlar. Asıl miyelin yıkımından sorumlu makrofaj popülasyonu dolaşım yolu ile lezyon bölgesine göç eden sistemik makrofajlardır^{12,29}. İnfiltre olan makrofajların fonksiyonu sadece miyelin kalıntıları fagosite etmek değildir, aynı zamanda nörotrofik önem taşıyan birçok sitokin ve diğer maddeleri de üretirler. Örneğin, WD'deki makrofajlar prostaglandinler ve sitokin ailesinin üyeleri olan TNF, TGF- β süper ailesi ve interleukin-1 ve 6 (IL-1 ve 6) sentezlerler, IL-1'in de schwann hücrelerinde NGF üretimini uyardığı gösterilmiştir³³. Bir diğer çalışmada ise siyatik sinir kesisi yapılan sıçanlara, PEMA uygulaması sonucu ilk 6-72 saat içinde NGF ve benzeri tropik faktörlerin seviyesinin arttığı böylelikle rejenerasyonu hızlandırabileceği ileri sürülmüştür⁶⁷. NGF, ilk ve en iyi tanımlanan sinir kökenli büyüme faktörüdür. Nörotropik faktörler, nöron ve aksonların yaşamını devam ettirmesi için ihtiyaç duyduğu bir polipeptid ailesidir. Embryonik yaşam boyunca nöronların gelişim ve olgunlaşmalarına katkıda bulundukları ve sinir yaralanmalarından sonra da rejenerasyonu hızlandırdıkları bildirilmiştir^{35,38,39}.

Periferik makrofajların (kan monositleri, karaciğer ve dalak kaynaklı makrofajlar) yoğunluğunu azaltmak için etkinliği literatürde çok açık olarak gösterilmiş bifosfonat türevi olan lipozom ile kaplanmış clodronate (Liposom encapsulated clodronate (clodronik asit); LEC) kullanılmaktadır. Makrofajlara özgül bir ajan olan LEC periferik makrofajların sayısını azaltırken diğer hücreleri etkilememektedir^{69,70}.

5.3 Dejenerasyon-Rejenerasyon Sürecinin Değerlendirilmesi

LEC aracılığı ile lokal olarak gerçekleştirilecek makrofaj baskılaması sonrasında 1,5 mT düşük şiddetteki PMA'nın makrofaj aracılı etkisinin olup olmadığını siyatik sinirin distal dalları olan sural ve tibial sinirlerde sukroz-gap yöntemi ile araştırıldı. Sukroz-gap yöntemi bileşik aksiyon potansiyellerinin hücre dışından ölçülmesi için kullanılan bir yöntem olup potansiyeller gerçek değerine en yakın şekilde ölçülebilmektedir^{74,75}. Bu tekniğin kolay uygulanabilir olması, tek bir lif yerine lif demetinin kullanılabilir olması ve düzeneğin basit, maliyetinde düşük olması gibi avantajları vardır. Bu yöntemi kullanarak sağlam ya da rejene olan sinir demetlerinde ölçtüğümüz potansiyeller, literatürde aynı yöntem kullanılarak ölçülen

değerlerle uyumludur^{43,46,48,50,53-55,74,76}. Ezilme tipi nöropatilerde myelinli ve myelinsiz tüm sinirlerin yapısı, akson zarı ve iyon kanalları tümüyle bozulmaktadır^{1,6,12,16}. Sinir ezildikten sonra hasarlı bölgede yaklaşık ilk hafta BAP oluşmaz. Sukroz gap yöntemi ile elde edilen sonuçlar sinir lifinin ortalama 2 mm'lik ezilmiş kısmının ve rejenere olan bölümünün elektrofizyolojik aktivitesinin sonucudur.

Periferik sinir rejenerasyonu, sinir demetinde bulunan tüm bileşenlerin katıldığı kompleks bir süreçtir. Bu süreçte ezilen bölgenin ve distalin fagositik aktivite ile temizlenmesi, rejenerasyon yollarının hazırlanması, aksonun bu yollardan uzayarak schwann hücrelerinin etraflarında yeniden myelin yapı geliştirmeleri sırasında normal süreçten farklı fizyolojik reaksiyonlar oluşmaktadır. Sukroz-gap yöntemi ile ölçülen tüm elektrofizyolojik yanıtlar tüm bu sürecin elektriksel aktivitesinin bir yansımasıdır.

Meydana gelen elektrofizyolojik ve morfolojik değişiklikler ve voltaj kapılı iyon kanallarının işlevsel özelliklerinde meydana gelen değişiklikler spesifik K⁺ kanal blokörleri (4-AP, TEA) kullanarak belirlendi. Ayrıca elektron-mikroskopik, immuno-histokimyasal, morfometrik ve davranış testi ile rejenerasyonun diğer boyutları da incelendi.

5.4 Siyatik Sinirin Distal Dalları: Tibial ve Sural Sinir

Çalışmamızda kullandığımız sural ve tibial sinir demetleri siyatik sinirin distal dalları olup aralarında önemli yapısal ve işlevsel farklar bulunmaktadır. Literatüre göre sural sinirin yaklaşık %97'si duysal ve %3 kadarı ise motor aksonlardan oluşmaktadır. Tibial sinirde ise %49 oranında motor akson bulunmaktadır^{9,11}.

Bu nedenle sural sinirden kaydedilen BAP yüksek oranda kutanöz duysal sinirlerin (miyelinli veya miyelinsiz) özelliklerini yansıtmaktadır. Sağlam sural ve tibial sinir demetlerinden ölçtüğümüz BAP parametreleri, önceki yıllarda aynı yöntem ile yapılmış çalışmalardaki ölçümler ile uyumlu olduğu görülmektedir^{50,53-60,76,84,90,91}.

Ölçümlerimizde intak sural sinirden ölçülen BAP sürelerinin, tibial sinire göre daha uzun olduğu, genliklerinin ise düşük olduğu görülmektedir. Bu durum sural sinirin içeriğindeki aksonların, tibial sinirdeki aksonlara göre daha yavaş iletim hızına sahip olmalarından kaynaklandığı akla getirmektedir. Bilindiği üzere sinirlerdeki iletim hızı, aksonun miyelinizasyonu, aksonun çapı ve akson zarındaki Na⁺ kanal yoğunluğu ile yakından ilişkilidir^{13,55}.

5.5 Kontrol Grubu ve BAP Parametreleri

Tonik uyarılarda kontrol grubuna ait ortalama BAP genliği tibial sinirde $68,5 \pm 1,2$ mV, BAP yükselme süresi (YS) $0,50 \pm 0,02$ ms ve latans $0,22 \pm 0,07$ ms olarak ölçüldü. Sural sinirde ise ortalama BAP genliği $35,3 \pm 3,1$ mV, YS, $0,80 \pm 0,03$ ms ve latans $0,41 \pm 0,02$ ms olarak ölçüldü. Fazik uyarılarda ise (10-40-100 Hz) anlamlı olmayan çok küçük fazik inhibisyon değışimleri gözlemlendi. Sukroz-gap yöntemi ile ölçülen sağlam gruba ait tonik ve fazik BAP değeri literatür bilgileri ile uyumlu değışim göstermektedir^{47,53,55-57,76,90}.

Ezilme sonrası tibial ve sural sinire 2 mM 4-Ap uygulanması, 2. ve 4. haftalarda genliği ilaç öncesine göre artırırken, sağlam sinirlerde istatistiksel olarak anlamlı değışiklikler meydana getirmemektedir. Bilindiği gibi voltaj kapılı Na^+ kanalları, aksiyon potansiyelinin başlamasından, yayılmasından ve depolarizasyon fazının oluşmasından sorumludur⁴⁶⁻⁴⁸. Açılan Na^+ kanallarından Na^+ girişı zarın daha fazla depolarizasyonuna, bu durum ise daha fazla Na^+ kanalının açılmasına ve zarın Na^+ 'a geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Böylece zar potansiyelini Na^+ denge potansiyeline (yaklaşık +50 mV) yaklaştırır. Aksiyon potansiyeli tepe noktasına ulaşınca (yaklaşık +30 mV) Na^+ kanalları inaktive olur ve K^+ kanalları açılmaya başlar¹³. Bu nedenle sağlam sinirlerde, hızlı K^+ kanallarını spesifik olarak bloklayan 4-Ap. nin, voltaj kapılı Na^+ kanallarının sorumlu olduğu BAP genliğinde anlamlı bir değışiklik meydana getirmesi beklenmemelidir.

Fakat hasarlı sinirlere 4-Ap uygulandığında BAP genliği anlamlı düzeyde artmaktadır. Hızlı K^+ kanallarının paranodal veya juxtaparanodal yerleşim gösterdikleri ve myelin kılıf tarafından üstünün kapatıldığı yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir^{43,44}. Sinir hasarının erken dönemlerinde myelin kılıf oluşmadığı için, hızlı K^+ kanalları açıktadır ve hasarlanmadan dolayı lokalizasyonu da değışmiştir. Böyle hasarlı bir sinire in-vitro olarak 4-Ap uygulanması, çok sayıda hızlı K^+ kanalını spesifik olarak bloklayacağından, dışarı doğru olan K^+ çıkışı engellenir. Böylece depolarizasyon sonrasında zar potansiyelini yeniden dinlenim değeriine döndüren hızlı repolarizasyon evresi sekteye uğrar. Sonuç olarak, hasarlı sinirlerde 4-Ap uygulaması ilaç öncesine göre daha yüksek BAP genliklerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Kontrol grubuna ait tibial sinirde; gecikmiş depolarizasyonun genliği (V-dd) ve bunun BAP'a oranı sırasıyla $9,1 \pm 0,8$ mV ve $\%13,8 \pm 1,3$ iken, sural sinirde $13,9 \pm 1,4$ mV ve $\%41,2 \pm 3,7$ olarak bulunması da sural ve tibial sinir demetleri arasında önemli yapısal ve işlevsel farkların olduğunu desteklemektedir. Arka Kök Ganglionlarında (DRG) ve kutanöz duysal sinir liflerinde (sural sinir) yapılan çalışmalarda farmakolojik ve kinetik olarak birbirinden farklı olan en az 3 tip Na^+ kanal akımı (hızlı ve yavaş inaktivasyona sahip)

gösterilmiştir⁹². 4-Ap hızlı kinetik gösteren K^+ kanallarını spesifik olarak bloklamaktadır. Yapılan çalışmalarda 4-Ap'in kutanöz lif içeren sinir demetlerinde ve bunların dorsal kök aksonlarında aksiyon potansiyeli sonrası hump (hörgüç) denen bir gecikmiş depolarizasyona neden olduğu gösterilmiştir. Gecikmiş depolarizasyonlar, hızlı K^+ kanallarının 4-Ap ile bloklanması sonrasında yavaş kinetik gösteren Na^+ kanallarının üzerindeki maskenin kalkması ile ortaya çıkmaktadır^{53-56,58-60,76,90}. Bu durum ilk defa sural sinirde miyelinli kutanöz duysal nöronların gövde ve aksonlarında belirlenmiştir, ancak ön kök ganglionlarında (VRG), motor aksonlarda ve kaslara ait tamamen duysal liflerde gecikmiş depolarizasyonlar görülmemektedir. Çalışmamızda sural sinire ait gecikmiş depolarizasyon genliğinin ve bunun BAP'a oranının (Del-dep/BAP) tibial sinire göre daha yüksek çıkmasının altında yatan neden; sural sinirin daha fazla oranda kutanöz duysal lif içermesidir. Başka bir deyişle sural sinir demetinde bulunan kutanöz duysal liflere ait akson zarında daha fazla yavaş kinetik gösteren Na^+ kanalının olmasıdır. Tibial sinir demetine 4-Ap uygulandığında sural sinire göre daha düşük genlikte gecikmiş depolarizasyonlar ortaya çıkmaktadır. Bu bulgu bize tibial sinirde de kutanöz duysal liflerin varlığını göstermektedir, ancak her iki sinir demetinin de içerdiği toplam lif sayısı göz önüne alındığında, tibial sinirin surale göre yüksek oranda motor akson ve kalın miyelinli lif içerdiği açıktır.

Ezilme sonrası tibial ve sural sinirlere yavaş kinetikli K^+ kanallarını bloklayan 10 mM TEA uygulanması ile tüm gruplarda BAP'lara ait süre parametrelerinin uzadığı belirlendi. Tam (intak) kontrol grubu sinirlerde BAP parametrelerindeki süre uzamaları çok az iken deney gruplarında özellikle $\frac{1}{2}DS$ 'de oldukça dramatik uzamalar meydana geldi.

Kontrol gruplarında 4-Ap sonrası ortaya çıkan gecikmiş depolarizasyon genliği V-dd ve bunun BAP genliğine oranı, TEA uygulaması ile bir miktar düşmektedir^{47,53-57,76,90}.

5.6 Ezilme grubu ve Ezilmenin BAP parametrelerine etkisi

Ezilme sonrası ilk haftada, her iki sinir demetinin hasarlanmış bölgelerinden, elektron mikroskopik incelemelerde açıkça görülen WD nedeniyle BAP kayıtlanmamıştır. İkinci haftadan itibaren tibial ve sural sinir demetlerinde rejenerasyon belirginleşmesiyle düşük genlikli BAP kayıtları alınmaya başlanmıştır. Ezilmeden 2 hafta sonra elde edilen BAP genliği ve diğer parametreleri, sağlam sinir liflerinden elde edilen değerlere göre oldukça düşüktür. 4 hafta sonra elde edilen değerler ise 2 hafta grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen kontrol değerlerine göre daha düşük bulunmaktadır. 2 haftalık gruplarda çok uzun BAP süre parametreleri ölçülürken, bu değerler rejenerasyonun ilerlemesi ile 4. haftada kısalarak kontrol değerlerine yaklaşmaktadır.

Fazik inhibisyon oranları da ezilmiş sinirlerde ilk 2 haftada dramatik bir şekilde çok yüksek ölçülürken 4. haftada iyileşmeye paralel olarak normal değerlere doğru değişmektedir. Bilindiği gibi fazik uyarılarda inaktif duruma geçen Na^+ kanal sayısının giderek artması fazik inhibisyonun başlıca nedenidir^{13,47,76,80,90}.

Ayrıca miyelinsiz ve ince sinir liflerinde iletim hızı düşüktür^{1,13,81,82}. Demyelinize sinirlerde iletim hızı normale göre yaklaşık 5 kat düşmekte ve refraktör peryot 2 ile 5 kat uzamaktadır^{81,82}. Rejenere olan aksonda Na^+ kanallarının yetersiz yoğunlukta olması ve myelinizasyonun yeterince gelişmemesi nedeniyle, BAP genliğinin azaldığı, fazik inhibisyon oranının arttığı ve BAP süre parametrelerinin de bu nedenle uzadığı düşünülmektedir.

Ayrıca yüksek fazik uyarımlarda, kontrol ve ezilme gruplarında tonik ve 10 Hz gibi düşük fazik uyarımlarda pek görülmeyen hiperpolarize edici ard potansiyeller (HAP) özellikle 40 ve 100 Hz uyarım frekansında çok daha belirgin halde ortaya çıkmaktadır. Başka bir deyişle hem sağlam hem de ezilmiş sinirlerde yüksek fazik uyarımlar; HAP oluşmasına neden olmaktadır. 2. haftada kontrol değerlerine göre yüksek genlikte meydana gelen HAP'lar, 4. haftada giderek düşmektedir.

2 mM 4-Ap uygulaması rejenerasyon sürecindeki tibial sinir demetinde yüksek uyarım frekanslarında, HAP'ın genliğinin ve süresinin artmasına neden oldu. Sural sinirde 40 Hz uyarım frekansında tibial sinire benzer şekilde HAP meydana gelirken, 100 Hz uyarım frekansında tüm sural sinirlerde (2 ve 4 hafta) genlik artarken süre uzamasının olmaması dikkat çekiciydi. Genel olarak HAP'lar, K^+ 'un elektrokimyasal gradienti altında, dışarı doğru yönelmiş K^+ iletimi nedeniyle oluşmaktadır. Bu K^+ iletiminin kaynağının farklı iyon kanalları ya da pompaların olabileceği yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. HAP oluşumuna katılan kaynaklar; Na^+/K^+ ATPaz elektrojenik pompası, TEA duyarlı yavaş kinetik gösteren K^+ kanalı, Ca^{2+} ile aktive olan K^+ akımı, Na^+ ile aktive olan K^+ akımları olarak sayılabilir^{10,47,83-86}.

Aynı şekilde sinir ezilmesinden 2 hafta sonra alınan sinir demetlerinin elektron mikroskopik ve immuno-histokimyasal incelenmesinde, schwann hücreleri, miyelinli sinir lifleri ve aksonlarda ileri derecede dejeneratif değişiklikler izlendi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfın yapısal bütünlüğünün bozulmuş olduğu ve ortamda çok sayıda makrofajın varlığı da belirlendi. Sinir ezilmesini takiben 4 hafta sonra incelenen tibial ve sural sinir demetlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde sinir lifleri ve schwann hücre yapısının, 2 haftalık ezilme gruplarına göre, daha iyi durumda olduğu belirlendi.

5.7 Ezilme+PMA grubu ve PMA'nın BAP parametrelerine etkisi

Çok düşük frekanslı elektromanyetik alanların biyolojik sistemler üzerindeki etkileri son yıllarda üzerinde oldukça durulan bir konu olmuştur. Buna rağmen tartışmaların devam etmesinin en önemli nedeni bu alanların canlı organizmalarla olan etkileşiminin hücre ve doku düzeyindeki mekanizmasının henüz tam belirlenememiş olmasıdır^{61,62}. Birçok temel çalışmada PMA'nın; endokrin ve immün sistemi etkileyerek sinir rejenerasyonunu arttırabileceği görüşü ileri sürülmüştür. PMA'nın bu tedavi edici etkisinin altında yatan mekanizmayı da şu şekilde açıklamaya çalışmışlardır: PMA, 1-hücre membranında iyon bağlanması ve göçünün etkileyerek, 2-fibrinojen, lökosit, sitokin, büyüme faktörleri, kollajen, osteoblastlar, serbest radikaller gibi hücre ve moleküllerin performansını etkileyerek, 3-hücre endotel duvarında vazokonstriksiyon/vazodilatasyon yaparak, 4-fagositik aktiviteyi, immün hücre proliferasyonunu, hücresel iletişimi, epitelizasyonu ve skar doku oluşumunu etkileyerek iyileşmeyi hızlandırmaktadır^{62-64,79}.

Literatürde sıçanlarda yapılan ezilme tipi yaralanma sonrasında PMA uygulamasının periferik sinir rejenerasyonunu ve fonksiyonel geri dönüşü %22 oranında hızlandırdığını gösteren davranış çalışmaları vardır^{65,66,68}. Bir diğer çalışmada ise siyatik sinir kesisi yapılan sıçanlara, PMA uygulaması sonucu ilk 6-72 saat içinde NGF ve benzeri tropik faktörlerin seviyesinin arttığı böylelikle rejenerasyonu hızlandırabileceği ileri sürülmüştür⁶⁷. Diğer bir çalışmada ise 4 hafta boyunca 1,8 mT şiddetinde PMA maruz bırakılan ve siyatik sinir kesisi sonrası anastomoz yapılan sıçanlarda; sinir lifi sayısının anlamlı düzeyde arttığı ve motor son plak enzimlerinin de yükseldiği görülmüştür. PMA'nın rejenerasyona etki mekanizmasını tek bir yolla değil tüm fizyolojik sistemleri kompleks bir yolla etkileyerek yaptığını söylemek daha doğru olur^{62-64,87}.

Bu çalışmada, deney gruplarının maruz bırakıldığı PMA protokolünün tibial ve sural sinir demetlerinde meydana getirdiği etkiler, elektrofizyolojik ve morfolojik değişiklikler ve voltaj kapılı iyon kanallarının işlevsel özelliklerinde meydana gelen değişiklikler spesifik K⁺ kanal blokörleri (4-AP, TEA) kullanarak belirlendi. Ayrıca elektron-mikroskopik, immuno-histokimyasal, morfometrik ve davranış testi ile rejenerasyonun diğer boyutları da araştırıldı.

Ezilme+PMA grubuna ait tibial sinir demetlerinde, 4 haftalık deney sürecinde diğer deney gruplarına göre (Ezilme, Ezilme+LEC ve Kombine gruplar) BAP'ın bazı parametreleri açısından daha iyi durumda idi. BAP parametreleri açısından bu farklar; BAP genlik, YS, latans ve sukroz-gap kutusundan ölçülen hızda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diğer parametreler açısından fark anlamsızdı. Diğer deney gruplarına göre, PMA grubundan elde edilen ve istatistiksel olarak anlamlı olan BAP değerleri tam (intak) olan gruplardan elde

edilen değerlere daha yakındı. PMA grubu sural sinir demetine ait BAP parametreleri diğer deney gruplarına göre daha iyi durumda olmasına rağmen, farklar istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Bütün bunlar motor ağırlıklı sinirlerin dejenerasyon-rejenerasyon sürecinin, duysal sinirlere göre daha hızlı olduğunu düşündürmektedir, başka bir deyişle erken WD, erken rejenerasyondur. Literatüre göre tibial sinirin %49 motor aksonlardan oluşurken, en iyi ihtimal ile sural sinirin ancak %3'ü motor, %97'si duysal aksondur. Bununla birlikte literatürde, sural siniri tamamen %100 duysal (sensor) kabul eden makalelerde mevcuttur^{9,11,88,89}.

Periferik sinir sisteminde aksiyon potansiyellerinin (AP) iletilmesinde miyelin yapı oldukça önemlidir ve bugüne kadar uygun işaretleyicilerle yapılan çalışmalarda AP oluşumuna katılan çok çeşitli tipte ve farklı bölgelerde lokalize iyon kanalları ortaya çıkarılmıştır. 4-Ap etkisinde bırakılan bazı sinirlerde aksiyon potansiyelini takiben bazı depolarizasyonlar ortaya çıktığı ve bu gecikmiş depolarizasyonların nedeninin yavaş kinetikli Na^+ kanallarından kaynaklandığı belirtilmişti^{50,53-60}. Yavaş kinetikli Na^+ kanal akımlarından kaynaklanan gecikmiş depolarizasyon (delayed depolarization: del-dep), sinir rejenerasyonunun ilerlemesi ile genliğinde bir düşme gözlenir. Del-dep genliğinin BAP genliğine oranı (V-dd/BAP) miyelinizasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir^{56,57}.

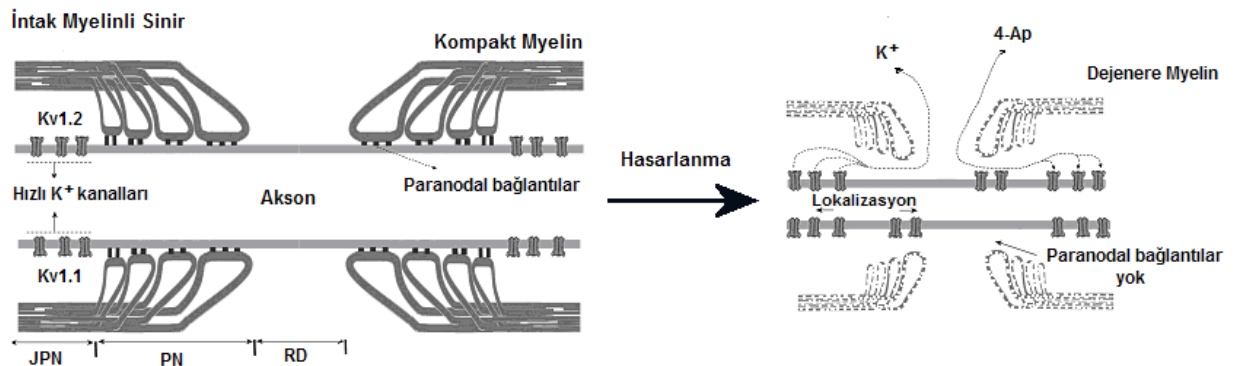
Yavaş kinetik gösteren TEA duyarlı K^+ kanalları ranvier düğümlerinde (RD) yoğun olarak bulunurken, kinetik olarak hızlı olan 4-Ap duyarlı K^+ kanalları ise internodal (juxtraparanodal: JPN) dağılım gösterirler. Deneysel olarak demiyelinize veya rejenerasyonunu tam olarak henüz tamamlamamış aksonlar üzerine 4-Ap ile yapılan deneylerde; miyelin tabakanın tekrar oluşmasından sonraki etkisinden çok daha büyük olduğunu göstermiştir^{50,53-60}. Bu bulgu 4-Ap duyarlı ve hızlı kinetik gösteren K^+ kanallarının internodal lokalizasyon gösterdiği veya miyelin kılıf tarafından örtüldüğünün önemli bir kanıtı sayılmıştır (Şekil 5.1). Özetle söylemek gerekirse, miyelin tabaka oluştuğu 4-Ap' ye olan duyarlılık azalmakta bu da miyelinizasyonun geliştiğini göstermektedir.

Tibial sinirde PMA etkisiyle 4-Ap sonrası genlikteki yükselme; LEC ve Kombine gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, Ezilme grubuna göre anlamsızdı. 4-Ap sonrası BAP'ın YS ve $\frac{1}{2}$ DS (Yükselme ve Yarı-düşme süreleri) PMA grubunda sadece Kombine grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu. Myelin yapı hakkında elektrofizyolojik olarak değerlendirme yapmamıza olanak sağlayan 4-Ap uygulaması sonrasında, PMA'nın 4 haftalık deney süresince diğer deney gruplarına göre daha etkili olduğu bulgular bölümünde ortaya konmuştur. 4-Ap sonrası PMA grubunda her iki sinirde de BAP'a ait süre parametreleri diğer gruplara göre daha az uzadı. Tibial sinirde PMA uygulaması ile

genlikte azda olsa bir artış görülse de, diğer gruplara göre çok daha belirgin BAP'tan kolayca ayırt edilebilen bir gecikmiş depolarizasyon ortaya çıktı. PMA etkisi ile V-dd' nin BAP'a oranı da diğer gruplara göre çok daha düşük, sağlam kontrol değerlerine daha yakın ve istatistiksel olarak anlamlı bir bulgudur. Sural sinirde ise PMA grubunda 4-Ap sonrası genlik bir miktar düşük bulundu. Sural sinir tüm BAP parametreleri açısından daha iyi durumda olmasına karşın, gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

PMA+LEC'in birlikte uygulandığı kombine grubunda ve LEC'in tek başına uygulandığı gruplarda, rejenerasyon süreci, diğer gruplara göre daha geri kalmış görünmektedir. Kombine grupta, uygulanan LEC'in sistemik ve yerleşik makrofaj popülasyonunu spesifik olarak baskılaması veya azaltması nedeniyle, PMA'nın olumlu bir etkisi görülmedi. Başka bir deyişle, çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular ışığında, PMA iyileşmeyi hızlandırıcı etkisini immün sistem üzerinden yapmaktadır hipotezini daha güçlü bir hale getirmektedir.

Özellikle tibial sinirde, 4-Ap uygulaması ile ortaya çıkan gecikmiş depolarizasyonun genliğinin ve bu değerın BAP genliğine oranının PMA grubunda diğer gruplara göre daha düşük çıkması; PMA uygulamasının myelin yapının oluşumunu hızlandırdığını gösterebilir. Başka bir deyişle; 4-Ap spesifik olarak blokladığı hızlı kinetik gösteren K^+ kanalları (Kv1.1, Kv1.2) myelin tabakası tarafından örtülü durumdadır. Myelin yapıda wallerian dejenerasyona bağlı meydana gelebilecek herhangi bir hasarlanma veya bozukluk 4-Ap'nin etkisini doğal olarak arttıracaktır (Şekil 5.1). Bu durumda çok daha fazla hızlı K^+ kanalı 4-Ap tarafından blokaja uğrayacak ve yavaş Na^+ akımlarına bağlı gecikmiş depolarizasyon daha belirgin ve yüksek genlikte karşımıza çıkacaktır. Ancak PMA'ya maruz bırakılan grupta tam aksi bir durum görülmektedir.



Şekil 5.1 Sağlam ve hasarlı sinirde myelin kılıf ve hızlı kinetik gösteren K^+ kanallarının muhtemel lokalizasyonu ve hasarlanmaya karşı verdiği yanıt şematize edilmiştir. RD: Ranvier Dügümü, PN: Paranod, JPN: Jukstraparanod.

PMA'nın bu iyileştirici etkisini bir başka şekilde ifade etmek gerekirse; PMA myelin yapının restorasyonunu hızlandırarak 4-Ap tarafından bloklanan hızlı K^+ iletiminin azalmasına, dolayısıyla bu kanalların bloklanmasıyla ortaya çıkan yavaş Na^+ akımlarının azalmasına neden olur. Elde edilen tüm bulgular göz önüne alındığında, PMA myelin tabakanın kalınlaşmasını sağlayarak, bu tabakanın altında kalacak olan dışarıya doğru hızlı K^+ iletimini azaltabilir (Şekil 5.1).

Tibial sinirde PMA uygulaması ile genlikte azda olsa bir artış görülse de diğer gruplara göre çok daha belirgin bir gecikmiş depolarizasyon ortaya çıktı. PMA etkisi ile V-dd' nin BAP'a oranı da 79 ± 5 değerinde olup diğer gruplara göre çok daha düşüktü ve bu sağlam kontrol değerlerine daha yakındı. Ezilme grubunda bu oran 100 ± 2 iken, LEC grubunda 104 ± 2 , kombine grupta ise 105 ± 1 olarak gerçekleşti. Bu çalışmadan elde edilen rakamsal veriler ışığında, PMA etkisi ile sinir rejenerasyonunun $20-25$ oranında hızlandığı düşünülmektedir. Ayrıca bu değerlendirme literatür ile de uyum göstermektedir⁶³⁻⁶⁷.

Myelinizasyon hakkında bilgi sağlayacak bir diğer elektrofizyolojik veride latans parametresidir. Miyelinli sinirlerde, 'saltatorik' iletim adı verilen sıçramalı hızlı aksiyon potansiyeli iletim özelliği vardır. Saltatorik iletim, iletim hızını aynı çaplı miyelinsiz sinirlere göre yaklaşık 10-50 kat artırmaktadır^{1-8,13,15,16}. Myelin kılıf aksonu defalarca sararak kompakt myelin tabakayı yapar, bu tabaka ranvier nodlarında kesintiye uğrayarak internodal aralıklar meydana getirilir. Bunun sonucunda da sinyaller sadece nodlar üzerinden sıçramalı bir şekilde gerçekleşir. Myelin kılıf hasarlandığında internodal izolasyon bozulacağından iletim hızı da azalacak ve latans uzayacaktır. PMA'ya maruz bırakılmış her iki sinir demetinde de (özellikle tibial sinirde) latans değeri diğer gruplara göre daha kısa değer alması da ilginç bir bulgu olabilir. Dejenerasyonun seyri liflerin tipine, cinsine, yaşa ve lezyonun somaya uzaklığına göre değişir. WD'nin başlama süresi liflerin tipine göre farklılık gösterir. Akson çapı büyük ve kalın miyelinli liflerde 24 saat içinde başlar ve distale ilerleme hızı 250 mm/gün, ince miyelinli liflerde 45 saat sonra 46 mm/gün hızı ile başlar, başka bir deyişle yavaş aksonal taşıma hızı ile uyumludur^{4,12}. Ayrıca motor sinirlerin dejenerasyon-rejenerasyon süreci, duyu sinirlere göre daha hızlıdır. Buna ilaveten tibial ve sural sinir demetleri arasında lif içeriği açısından önemli yapısal ve işlevsel farkların olduğunu da desteklemektedir.

Ayrıca, yüksek frekanslı uyarımlar sonrasında meydana gelen HAP aktivitesinin PMA tarafından azaltılması da önemlidir. HAP sinirde membran potansiyel etkinliğini de yansıtabilen bir oluşumdur⁸³. Yüksek HAP aktivitesi uyarılabilirliği ve dolayısıyla da sinir iletimini olumsuz yönde etkileyen bir durumdur. Düşük frekanslı PMA'nın HAP aktivitesini

azaltıcı etkisi, yine PMA'nın yaralanma sonrası iyileşme sürecindeki sinirlerde tedavi edici bir non-invasif bir alternatif teknik olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Tibial sinir demetinde 4-Ap etkisiyle; 40 Hz uyarım frekansında, 4 hafta PMA grubu hariç, tüm deney gruplarında kontrollere göre anlamlı derecede daha fazla fazık blok ve daha yüksek genlikte HAP aktivitesi meydana geldi.

Ayrıca tibial sinirde 10 mM TEA+2 mM 4-Ap uygulaması ile Ezilme+PMA grubunda BAP genliği PMA etkisiyle $23,6 \pm 2,3$ mV olarak bulundu bu değer (ezilme grubu hariç) diğer 4 haftalık gruplar olan LEC ve Kombine genlik değerlerine göre istatistiksel olarak daha yüksekti. Ezilme+PMA grubundan elde edilen YS (yükselme süresi) ve $\frac{1}{2}$ DS (yarı-düşme süresi) değerleri diğer 4 haftalık gruplardan anlamlı düzeyde daha kısa bulundu. BAP süre parametrelerinin diğer gruplara göre daha da kısa olması PMA'nın sinir rejenerasyonunu hızlandırdığının bir göstergesi olabilir.

Walerian Dejenerasyonu sürecinin bir parçası olarak, hasarlı olan bölgelere makrofaj, lenfosit ve mast hücrelerinden çeşitli intrasellüler maddeler salgılanır. Nositseptif uyarının kendisi de nörojenik bir inflamasyon cevabı oluşturarak sinir uçlarından P maddesi, nörokinin A salgılanmasına yol açar. Bu şekilde potasyum, serotonin, nitrik oksit, siklooksijenaz ve lipoksijenaz yollarındaki inflamatuvar mediatörlerin salgılanması yüksek eşik değerdeki nosiseptörleri uyarak periferik sensitizasyon denen olayı meydana getirirler. Sensitizasyondan sonra düşük şiddetteki termal uyarılara karşı yanıtta da artış meydana gelir (Primer Hiperaljezi). Dejenerasyon sürecini takiben meydana gelen rejenerasyon sürecini, termal test bulguları net bir şekilde ortaya koymaktadır (Şekil 4.42). PMA uygulanan grupta ilk haftalarda, termal latans değeri diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük olması artmış immün bir reaksiyonun göstergesi olabilir. Aynı şekilde 5. ve 6. haftalarda da termal latans değerinin diğer gruplara göre daha uzun olması, başka bir deyişle kontrol değerlerine yakın olması azalmış makrofaj aktivitesinin göstergesi olabilir. Ayrıca termal plantar testinden elde edilen bulguların, elektrofizyolojik ve histolojik deneylerden elde edilen verilerle örtüşmesi "PMA, immün sistemi aktive ederek rejenerasyonu hızlandırır" hipotezini güçlendirmektedir.

Tüm elektrofizyolojik bulgulara ek olarak ezilme sonrası 2 ve 4 haftalık süreçte, tüm deney gruplarında yapılan, elektron-mikroskopik, immuno-histokimyasal ve morfometrik incelemelerde de gruplar arasında kayda değer farkların bulunması ilginçtir. Sinir ezilmesinden 2 hafta sonra alınan sinir demetlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde, schwann hücreleri, miyelinli sinir lifleri ve aksonlarda ileri derecede dejeneratif değişiklikler izlendi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfın yapısal bütünlüğünün bozulduğu, miyelin lamellerinin birbirlerinden ayrıldığı, aksonun büzüşmesine bağlı olarak akson ve miyelin kılıf

arasında geniş boşlukların olduğu gözlemlendi. Bunların yanı sıra, ortamda çok sayıda makrofajın varlığı da izlendi. Makrofaj stoplazmasında fagosite edilmiş miyelin kılıf lamelleri ve çeşitli büyüklüklerde lipid damlacıklarına sıklıkla rastlandı. Sinir ezilmesini takiben 4 hafta sonra incelenen sinir demetlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde sinir lifleri ve schwann hücre yapısının, 2 haftalık ezilme gruplarına göre, daha iyi durumda olduğu belirlendi.

Bununla birlikte, miyelinli sinir liflerinde, miyelin kılıfın lameller yapısında ayrılmalar, fokal miyelin kılıf değişiklikleri, aksonal büzüşme, aksoplazmada mitokondriyon harabiyeti sonucu oluşan vakuolizasyon, akson ile miyelin kılıf arasında meydana gelen geniş boşluklar bu grupta da görüldü. Sinir ezilmesinden sonra 2 hafta boyunca PMA'ya maruz bırakılan sinir demetlerinin elektron mikroskopik incelenmesinde schwann hücreleri, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinde diğer gruplara göre ileri derecede yapısal değişikliklerin meydana gelmesi ilginç bulundu. PMA grubunda Schwann hücreleri dışında ortamda çok sayıda reaktif makrofajların da yer aldığı gözlemlendi. Makrofaj stoplazmasında çok sayıda fagozom, lizozom ve lipid damlacıklarının varlığı kaydedildi

Sinir ezilmesini takiben 4 hafta boyunca PMA'ya maruz bırakılan sinir dokularının elektron mikroskopik incelenmesinde, diğer ezilme gruplarına göre miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin birçok alanda normal yapılarını korumuş oldukları dikkati çekti. Sinir liflerinde miyelin kılıf ve akson yapısı normal kontrol grubuna benzemekteydi. Bununla birlikte, bazı alanlarda miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfta fokal dejeneratif değişikliklere de rastlandı. Schwann hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve kollajen liflerin yapı ve dağılımları da normal olarak değerlendirildi.

PMA uygulanan grupta ilk 2 haftada çok yoğun olarak reaktif makrofaj varlığının görülmesi ve 4.haftada da fagositik aktivitenin diğer gruplara göre daha az olması oldukça ilgi çekici bir bulgudur. Bu çalışmada: “PMA'nın etki mekanizması açık olmamakla birlikte makrofaj aracılı etki gösterebilir, makrofaj aktivasyonunun artması da rejenerasyonda rol alan bazı nörotrofik faktörleri aktive edebilir” hipotezi test edilmek istendi. Elde edilen tüm elektrofizyolojik ve histolojik bulgular PMA'nın immün sistemi aktive ederek dejenerasyon ve rejenerasyon sürecini hızlandırdığı yönündeki hipotezimizi destekler görünmektedir, başka bir deyişle erken WD, erken rejenerasyondur^{26,29,77,78,93}. Yine bu hipotezimizi test etmek için kullandığımız ajan olan LEC, makrofajları spesifik olarak baskılamaktadır. Bununla birlikte LEC grubunda 4.haftada bile makrofaj varlığının PMA grubuna göre fazla olması, uygulanan LEC'in geç kalmış bir immün reaksiyona neden olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada sıçan siyatik sinirinde forsepsle oluşturulan ezilme sonrasında ve rejenerasyon sürecinde, LEC aracılığı ile lokal olarak gerçekleştirilen makrofaj baskılaması sonrasında PMA'nın makrofaj aracılı etkisinin olup olmadığı siyatik sinirin distal dalları olan sural ve tibial sinirlerde araştırıldı, oluşan elektrofizyolojik ve morfolojik değişiklikler ve voltaj kapılı iyon kanallarının işlevsel özelliklerinde meydana gelen değişiklikler spesifik kanal blokörleri (4-Ap, TEA) kullanılarak belirlendi.

Bu araştırmada ayrıca duyuusal ve motor sinir rejenerasyonları ayrı ayrı araştırıldı. Bilindiği gibi sural sinir duyuusal bir sinir olup %97 duyuusal liflerden, buna karşın tibial sinir %49 motor liflerden oluşmaktadır. Rejenerasyon sırasında motor ve duyuusal sinir rejenerasyon hızları elektrofizyoloji yanında elektron-mikroskopik, immuno-histokimyasal, morfometrik ve davranış testleri ile rejenerasyonun diğer boyutları da incelendi. Bu çalışma sonucunda;

1. Sinir ezilmesini sonrası, sinir demetlerinin elektrofizyolojik ve elektron mikroskopik incelenmesinde, ileri derecede walerian dejenerasyona bağlı önemli yapısal ve işlevsel değişikliklerin olduğu gözlemlendi.
2. Periferik sinir hasarını takiben makrofajlara özgü baskılayıcı bir ajan olan LEC'in dejenerasyon sürecini uzattığı dolayısıyla rejenerasyon sürecini de olumsuz etkilediği sonucuna varıldı.
3. 1,5 mT şiddetinde Pulsu Manyetik Alanın, immün sistemi aktive ederek makrofaj aktivitesini arttırabilir ve bu durumda dejeneratif süreci kısaltarak rejenerasyonu öne çekebilir.
4. PMA uygulaması; yaralanmış miyelinli sinirlerde, makrofajları ve diğer fagositik hücreleri modüle ederek hasarlı miyelin kalıntılarının fagositesini hızlandırabilir. Böylelikle remiyelizasyona yardımcı olarak miyelin sentezini ve kalınlığını pozitif yönde etkileyebilir.
5. PMA ve LEC'in kombine uygulandığı gruplarda rejenerasyon süreci diğer gruplara göre daha geri kaldı. Bu grupta uygulanan LEC'in makrofaj popülasyonunu spesifik olarak baskılaması veya azaltması nedeniyle PMA'nın olumlu bir etkisi görülmedi. Bu durum, PMA; iyileşmeyi hızlandırıcı etkisini immün sistem üzerinden yapmaktadır hipotezimizi güçlendirmektedir.

Eldeki tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, sistemik olarak uygulanan PMA'nın rejenerasyonu hızlandırabileceği düşünülmektedir. Ancak PMA'nın hangi fizyolojik sistemleri harekete geçirdiği, bu çalışmadan elde edilen bulgularla tam olarak açıklanamamaktadır. Literatürde PMA'nın frekans, süre şiddet, dalga şekli olarak çok farklı uygulama alanı ve kombinasyonları bulunmaktadır. Bu kombinasyonların, lokal veya sistemik uygulama yöntemi ile birlikte uygulama süresinin de değiştirilmesinin farklı sonuçlara yol açabileceği göz önünde tutulmalıdır.

Bu çalışma, periferik sinir hasarından sonra yapılan PMA uygulamasının, etkin mekanizması ne olursa olsun, miyelin ve aksonal hasarlanmalardan doğan patolojiler üzerine etki ederek iyileşmeyi hızlandırdığını gösteren çalışmalardan biri olabilir. Ancak klinik kullanımda uygulanabilmesi için etkili protokolün seçimi, uygulama yöntemi ve yan etkileri konusunda ek çalışmaların yapılması gerekmektedir. Klinikte non-invasif alternatif bir teknik olarak PMA kullanılması, önemli bir sorun olan periferik sinir hasarının düzeltilebilmesi sorununa yardımcı olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Guyton and Hall.** Medical Physiology, 9. ed. **1996:** 57-72, 565-580.
2. **William F. Ganong.** Tıbbi Fizyoloji, 17.baskı, I.cilt: 61-75
3. **Junquiera LC, Carneiro J.** Basic Histology: Text and atlas. 10. ed, New York, Lange Mc Graw Hill, **2003**.
4. **Marco Mumenthaler, Manfred Stöhr, Hermann Müller-Vahl.** Nobel Tıp Yayınları, Çeviri. Periferik Sinir Lezyonları ve Radiküler Sendromlar. **2005:** 1-95.
5. **Ben Greenstein, Adam Greenstein.** Nobel Tıp Yayınları, Çeviri. Nörobilim Renkli Atlası, Nöroanatomi, Nörofizyoloji. **2004:** sf 56
6. **Dere F.** Nöroanatomi ve Fonksiyonel Nöroloji, **1996:** 18-27.
7. **Ross MH, Pawlina W.** Histology: A text and atlas. Baltimore, Philadelphia, 5. ed, Lipincott Williams&Wilkins, **2006**.
8. **Eric R. Kandell, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell.** Principles of Neuronal Science, 4.ed. **2000:** 1073
9. **H. Schmalbruch.** Fiber Composition of the Rat Sciatic Nerve. The Anatomical Record **1986:** 215, 71-81
10. **Waxmann SG and Ritchie JM.** Molecular dissection of the myelinated axon. Ann. Neurol, **1993;** 33, 121-136.
11. **Swett JE, Wikholm RP, Blanks RHI, Swett AL and Conley LC.** Motoneurons of Rat Sciatic Nerve. Experimental Neurology. **1986:** 93, 227-252.
12. **Bilimsel ve Teknik Yayınları Vakfı.** Periferik Nöropati. **1995:** 17-36.
13. **Pehlivan F.** Biyofizik. 2. baskı, A.Ü. Tıp Fakültesi, **1997**
14. **Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Cabrita AM.** Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. J Neuroscience Methods, **2001;** 108: 1-9.
15. **Steven S. Scherer.** Myelination: some receptors required. The Journal of Cell Biology, Volume 156, Number 1, January 7, **2002** 13–15
16. **Chizuka I.** Peripheral Nerve Regeneration. Neuroscience Research, **1996;** 25: 101-121.
17. **Emin Öztaş.** Neuronal tracing. Neuroanatomy, **2003:** Volume 2, Pages 2-5.
18. **Scott T. Brady.** Neurofilaments run sprints not marathons. Nature Cell Biology. **2000:** Volume 2, 43-45.
19. **Subhojit Roy, Bin Zhang, Virginia M, Y. Lee, John Q. Trojanowski.** Acta Neuropathol (**2005**) 109: 5–13
20. **McPhail LT, Fernandes KJ, Chan CC, Vanderluit JL, Tetzlaff W (2004)** Axonal reinjury reveals the survival and re-expression of regeneration-associated genes in chronically axotomized adult mouse motoneurons. Exp Neurol; 188 (2): 331-340

21. **Terzis JK, Smith KL (1990)** Repair and grafting of the peripheral nerve. In: Mc Carthy, JG 2nd Ed, Plastic Surgery, WB Saunders Co; 1: 630-697
22. **Lundborg G, Dahlin LB (1996)** Anatomy, function, and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression. *Hand Clin* 12(2): 185-193
23. **Lars B. Dahlin, Jerker Brandt.** Basic Science of Peripheral Nerve Repair: Wallerian Degeneration/Growth Cones. *Oper Tech Orthop* 14: 138-145 © **2004**
24. **Robinson LR.** Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle&Nerve*, **2000**; 23: 863-873.
25. **Burnett MG, Zager EL.** Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*, **2004**; 16(5): 1-7.
26. **Zochodne DW.** The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Supplement*, **2000**; 9: 33-38.
27. **Fernandez E, Pallini R, Lauretti L, Scogna A.** Neurosurgery of the peripheral nervous system. *Surg Neurol*, **1997**; 48: 446-447.
28. **FV White, AD Toews, JF Goodrum, DL Novicki, TW Bouldin, P Morell.** Lipid Metabolism During Early Stages of Wallerian Degeneration in the Rat Sciatic Nerve. *Journal of Neurochemistry*, **1989**; 52: 1085-1092.
29. **Bruck W.** The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Path.* **1997**: 741-752,
30. **Frostick SP, Yin Q and Kemp GJ.** Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*, **1998**; 18: 397-405.
31. **Stoll G, Muller HW.** Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: Basic insights. *BrainPathology*, 9: 313-325, **1999**.
32. **Stoll G, Jander S and Myers RR.** Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripheral Nervous System*, **2002**; 7: 13-27.
33. **Lindholm D, Heumano R, Meyer M, Thoeneo H.** Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* **1987**: 330;658-659
34. **Pagnotta A, Tos P, Fornaro M, Gigante A, Geuna S, Battiston B.** Neurotrophins and their receptors in early axonal regeneration along muscle-vein-combined grafts. *Microsurgery*, **2002**; 22: 300-303.
35. **Terenghi G.** Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*, **1999**; 194: 1-14.
36. **Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B and Bilboa G.** Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system. *J Neuroscience Methods*, **1998**; 85 (1): 119-127.
37. **Lee AC, Yu VM, Lowe YB, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, Elbert-Sakiyama SE.** Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Experimental Neurology*, **2003**; 184 (1): 295-303.

- 38. Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Ionomou TG, Panayotou PN, and Ioannovich JD.** Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery*, **2004**; 24: 408-415.
- 39. Makwana M, Raivich G.** Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS Journal*, **2005**; 272: 2628-2638
- 40. Garbaya B, Heapec A.M, Sargueila F, Cassagnea C.** Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61: 267-304, **2000**.
- 41. Gold R, Archelos JJ and Hartung HP.** Mechanism of Immune Regulation in the Peripheral Nervous System. *Brain Pathology* **1999**; 9: 343-360.
- 42. Liua T, Rooijenb NV and Traceya DJ.** Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. *Pain* **2000**; 86: 25-32.
- 43. Gordon TR, Kocsis JD and Waxman SG.** TEA-sensitive Potassium channels and inward rectification in regenerated rat sciatic nerve. *Muscle and nerve*, **1991**; 14: 640-646.
- 44. Eng DL, Gordon TR, Kocsis JD and Waxman SG.** Current clamp analysis of time-dependent rectification in rat optic nerve. *J. Physiol*, **1990**; 421: 185-202
- 45. J. P. Ballantyne and M. J. Campbell.** Electrophysiological study after surgical repair of sectioned human peripheral nerves. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **1973**, 36, 797-805
- 46. Catterall WA.** Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **1988**; 242: 50-61.
- 47. Hille, B.** *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd ed. Sinauer associates, Inc, Sunderland, Massachusetts **1992**: 59-83.
- 48. Catterall, W.A., 2000.** From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13 - 25.
- 49. William A. Catterall, Alan L. Goldin, And Stephen G. Waxman.** International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol Rev* 57:397–409, **2005**
- 50. Black, J.A., Kocsis, J.D., Waxman, S.G., 1990.** Ion channel organization of the myelinated fiber. *Trends Neurosci.* 133, 48 – 54.
- 51. Goldin AL. 2002.** Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol.* 2001;63: 871-94.
- 52. Waxman SG.** Ion Channels and Neuronal Dysfunction in Multiple Sclerosis. *Arch. Neurol.* **2002** Sep;59(9):1377-80
- 53. Honmou, O., Utzschneider, D.A., Rizzo, M.A., Bowe, C.M., Waxman, S.G., Kocsis, J.D., 1994.** Delayed depolarization and slow sodium currents in cutaneous afferents. *J. Neurophysiol.* 71, 1627 – 1637.
- 54. Nonaka T, Honmou O, Sakai J, Hashi K, Kocsis JD.** Excitability changes of dorsal root axons following nerve injury: implications for injury-induced changes in axonal Na⁺ channels. **2000**. *Brain Research* 859; 280-285.

- 55. Sakai J, Honmou O, Kocsis JD, Hashi K.** The delayed depolarization in rat cutaneous afferent axons is reduced following nerve transection and ligation, but not crush: implications for injury-induced axonal Na⁺ channel reorganization. **1998.** Muscle and Nerve Aug; 21(8): 1040-7
- 56. Hildebrand C, Kocsis JD, Berglund S, Waxman SG.** Myelin sheath remodelling in regenerated rat sciatic nerve. **1985** Brain Research 358; 163-170.
- 57. Hildebrand C, Bowe CM, Remahl IN.** Myelination and myelin sheath remodelling in normal and pathological PNS nerve fibers. **1994** Progress in Neurobiology Vol. 43, pp. 85 to 141
- 58. Kocsis JD and Waxman SG.** Ionic channel organization of normal and regenerating mammalian axons. **1987.** Progress in Brain Research, Vol.71
- 59. Kocsis JD and Waxman SG.** Membrane Organization and Myelin Remodelling in regenerating Axons. **1988.** Advances in Neurology, Vol 47: Functional Recovery in Neurological Disease.
- 60. Fehlings MG, Nashmi R.** Changes in pharmacological sensitivity of the spinal cord to potassium channel blockers following acute spinal cord injury. **1996.** Brain Research 736;135-145
- 61. Adey W.R.** Tissue interactions with non-ionizing electromagnetic fields. Physiol. Rev **1981**; 61: 435-514.
- 62. Markov S. Marko .(2007)**'Magnetic Field Therapy: A Review',Electromagnetic Biology and Medicine,26:1,1 — 23
- 63. Shupak, NM. (2003).** Therapeutic uses of pulsed magnetic-field exposure: a review. Radio Sci.Bull. 307:9–32
- 64. Markov, M. S., Nindl, G., Hazlewood, C., Cuppen, J. (2006).** Interactions between electromagnetic fields and immune system: possible mechanisms for pain control. In: Ayrapetyan, S., Markov, M. S., eds. Bioelectromagnetics: Current Concepts. Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 213–226.
- 65. Kanje M, Rusovan A, Siskin B, and Lundborg G.** Pretreatment of Rats With Pulsed Electromagnetic Fields Enhances Regeneration of the Sciatic Nerve. **1993.** Bioelectromagnetics 14: 353-359.
- 66. Walker JL, Kryscio, Smith J, Pilla A, and Siskin BF.** Electromagnetic Field Treatment of Nerve Crush Injury in a Rat Model: Effect of Signal Configuration on Functional Recovery. Bioelectromagnetics 28: 256-263 (**2007**)
- 67. F.M. Longo, T. Yang, S. Hamilton, J.F. Hyde, J.Walker, L. Jennes, R. Stach and B.F. Siskin.** Electromagnetic Fields Influence NGF Activity and Levels Following Sciatic Nerve Transection. Journal of Neuroscience Research 55: 230–237 (**1999**)
- 68. Walker J., Evans JM., Resig P., Guarnieri S., Meade P., Siskin BF.,** Enhancement of functional recovery following crush lesion to the rat sciatic nerve by exposure to pulsed electromagnetic fields, Exper. Neurol, 125, 302-305, (**1994a**).
- 69. Van Rooijen N., Sanders A.,** Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications, J. Immunol. Methods, 174, 83-93, (**1994**).
- 70. Van Rooijen N., Sanders A., van den Berg TK.,** Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine, J. Immunol.

Methods, 193, 93-99, (1996).

71. Gregory Gregoriadis, Liposome Technology, Volume I, Third Edition by Informa Healthcare Inc., USA, (2007).

72. Varejao AS, Cabrito AM, Meek MF, Blulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini- Roberchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*, **2004**; 21: 1652-1670.

73. De Koning P, Brakkee JH, Gispen WH. Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and precise testing of return of sensory function: Beneficial effects of melanocortins. *J Neurological Sciences*, **1986**; 74: 237-246.

74. Stampfli R. A new method for measuring potentials with external electrodes. *Experientia*, **1954**; 10: 508-509.

75. Sherman-Gold Rivka. The axon guide for electrophysiology and biophysics laboratory techniques. In: Bioelectricity, Foster city: Axon instruments, Inc. **1993**:8-9.

76. Guven M, Bozdemir H, Gunay I, Sarica Y, Kahraman I, Koc F. The actions of lamotrigine and levetiracetam on the conduction properties of isolated rat sciatic nerve. *European Journal of Pharmacology* 553(2006) 129–134

77. Beuche W, Fried RL. Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration of peripheral nerves depends on silica-sensitive, bg/bg-negative and Fc-positive monocytes. *Brain Research* **1986** Jul 16; 378(1): 97-106.

78. Beuche W, Fried RL. Millipore diffusion chambers allow dissociation of myelin phagocytosis by non-resident cells and of allogenic nerve graft rejection. *J Neurol Sci.* **1985** Jul; 69(3): 231-46.

79. Bassett C.A.L. Low energy pulsing electromagnetic fields modify biomedical processes. *BioEssays* Vol. **1989**: 6, No:1.

80. Hille, B. Local anesthetics: Hydrophilic and Hydrophobic Pathways for the Drug-Receptor reaction. *J. Gen physiol*, **1977**; 69: 497.

81. Utzschneider, D.A, Thio C, Sontheimer H, Ritchie JM, Waxman SG, Kocsis JD. Action potential conduction and sodium channel content in the rat optic nerve of the myelin deficient rat. *Proc R Soc Lond B*, **1993**; 254: 245-250.

82. Felts PA, Baker TA, Smith KJ. Conduction in segmentally demyelinated mammalian central axons. *J Neurosci.* **1997**; 1; 17(19): 7267-77.

83. McIntyre C. C, Richardson A. G, Grill W. M. Modelling the excitability of mammalian nerve fibres: Influence of afterpotentials on the recovery cycle. *J Neurophysiol* **2002**; 87: 995-1006.

84. Mert T, Güneş Y, Güven M, Gunay I and Göçmen C. Differential effects of lidocaine and tramadol on modified nerve impulse by 4-aminopyridine in rat. *Pharmacology*, **2003**; 69(2): 68-73.

85. Jirounek P, Chardonnes E and Brunet PC. After potential in non-myelinated nerve fibers. *J. Neurophysiol.* **1991**; 65(4), 860-873.

86. Robert A and Jirounek P. Axonal and glial currents activated during the post-tetanic hyperpolarization in non-myelinated nerve. *Plüfers Arch-Eur J Physiol*, **1998**; 436: 529-537.

- 87. J.A.De Pedro, A.J.Perez-Caballer, J.Dominguez, F.Colla, J.Blanco and M.Salvado.** Pulsed Electromagnetic Fields Induce Peripheral Nerve Regeneration and Endplate Enzymatic Changes. *Bioelectromagnetics* 26: 20-27 (2005).
- 88. DA Chad, U DeGirolami and J. Zivin.** Motor fibers in the sural nerve. *Acta Neuropathol (Berl)* (1986) 71: 338-340. Short original communications.
- 89. Dyck JP, Karnes J, Lais A, Lofgren EP, Stevens JC (1984).** Pathological alterations of the peripheral nervous system of humans. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R (eds) *Peripheral neuropathy* vol 1, 2nd edn. Saunders, Philadelphia.
- 90. Guven M, Kahraman I, Koc F, Bozdemir H, Sarica Y, Gunay I.** The conduction block produced by oxcarbazepine in the isolated rat sciatic nerve: a comparison with lamotrigine. *Neurological Research.* (2010) In press. DOI: 10.1179/016164110X12714125204191.
- 91. Tokuno HA, Bradberry CW, Everill B, Agulian SK, Wilkes S, Baldwin RM, Tamagnan GD, Kocsis JD.** Local anesthetic effects of cocaethylene and isopropylcocaine on rat peripheral nerves. *Brain Res.* 2004 Jan 23;996(2):159-67.
- 92. Caffrey JM, Eng DL, Black JA, Waxman SG, Kocsis JD.** Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 1992 Oct 2;592(1-2):283-97.
- 93. Tanaka K, Zhang QL, Webster HD.** Myelinated fiber regeneration after sciatic nerve crush: morphometric observations in young adult and aging mice and the effects of macrophage suppression and conditioning lesions. *Exp Neurol.* 1992 Oct;118(1):53-61.

ÖZGEÇMİŞ

25.09.1974 yılı Antakya – HATAY’da doğdu. İlkokulu Vali Teoman İlkokulunda, orta ve lise eğitimimi Antakya Merkez Lisesinde tamamladı. 1992 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümünde lisans eğitimine başladı. 1996 Güz döneminde lisans eğitimini bitirdi. 1998 yılında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Dalında Yüksek Lisansa başladı (Tezli). 1998 – 2001 yılları arası Celal Bayar Üniversitesi Araştırma Hastanesinde Araştırma Görevlisi olarak; Rutin Biyokimya, Elektroforez, Hormon, İdrar ve Hematoloji Laboratuvarlarında çalıştı. 2001 yılında lisansüstü eğitimini tamamlayarak Biyokimya Bilim Uzmanı oldu. 2004 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim dalında Araştırma Görevlisi oldu. Doktorasını yapmak üzere Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalına YÖK’ün 2547 sayılı “35/b” maddesi gereğince geldi. Evli ve bir çocuk babası olan Arş.Gör İbrahim KAHRAMAN halen aynı Anabilim Dalında çalışmaktadır.