

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

DEKORİN PROTEİN UYGULAMASININ SIÇAN SİYATİK
SİNİR İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ALPER GEYİK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HALUK VAYVADA

İZMİR-2020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

DEKORİN PROTEİN UYGULAMASININ SIÇAN SİYATİK
SİNİR İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR.ALPER GEYİK

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR.HALUK VAYVADA

Bu tez DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Proje No:
2019.KB.SAG.058, Talep No:201933 ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
RESİM LİSTESİ	V
GRAFİK LİSTESİ	VI
KISALTMALAR VE SİMGELER	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ÖZET.....	1
İNGİLİZCE ÖZET	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1. TARİHÇE	9
3. PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ.....	11
4. PERİFERİK SİNİR TOPOGRAFİK ANATOMİSİ İLE HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİSİ	13
5.PERİFERİK SİNİR FİZYOLOJİSİ.....	17
5.1 DİNLENİM ZAR POTANSİYELİ	17
5.2 LATENT DÖNEM.....	17
5.3 AKSİYON POTANSİYELİ.....	17
5.4 “HEP YA DA HİÇ” YASASI.....	18
5.5 ELEKTRONİK POTANSİYELLER SİRASINDA UYARILABİLİRLİKTE DEĞİŞİKLİKLER VE AKSİYON POTANSİYELLERİ.....	19
5.6 AKSİYON POTANSİYELİN ELEKTRİKSEL GELİŞİMİ.....	19
5.7 SIÇRAYICI (SALTATUVAR) İLETİM	19
5.8 UYARILMANIN İYONLARA İLİŞKİN TEMELİ VE İLETİM	20
5.9 DİNLENİM ZAR POTANSİYELİNİN İYON TEMELİ	20
5.10 AKSİYON POTANSİYEL SİRASINDA İYON AKIMLARI.....	21
5.11 MİYELİNLİ NÖRONLARDA İYON KANALLARININ DAĞILIMI	21
5.12 ENERJİ KAYNAKLARI, BESLENMESİ VE METABOLİZMASI.....	22
6.PERİFERİK SİNİR YARALANMASI	23
6.1. SİNİR REJENERASYONU.....	25
7. PERİFERİK SİNİR ONARIMLARI	27
8. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	30
8.1.CERRAHİ HAZIRLIK	32
8.1.1. ANESTEZİ.....	32

8.1.2. DEKORİN PROTEİN	33
8.1.3. SIÇAN SİYATİK SİNİR ANATOMİSİ	35
8.2. CERRAHİ ÖNCESİ MOTOR VE DUYU FONKSİYONLARININDEĞERLENDİRİLMESİ.....	36
8.3. CERRAHİ TEKNİK VE DENEY GRUPLARI	38
8.4. SİNİR İYİLEŞMESİ TAKİBİ VE DEĞERLENDİRME	40
8.4.1. FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME	41
8.4.1.1. SİYATİK FONKSİYONEL İNDEKS (SFI) DEĞERLENDİRME	41
8.5. ELEKTROFİZYOLOJİK İNCELEME	42
8.6. HİSTOMORFOLOJİK İNCELEME	45
8.6.1. LABORATUVAR İNCELEMELERİ SIRASINDA KULLANILAN MATERYALLER.....	45
8.6.1.1 CİHAZLAR	45
8.6.1.2 KİMYASALLAR	45
8.6.2. IŞIK MİKROSKOBİK DOKU TAKİP PROTOKOLÜ MASSON-TRİKROM BOYAMASI	46
8.6.3. HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ PERİFERİK SİNİR DOKUSUNUN HİSTOMORFOLOJİKDEĞERLENDİRMESİ.....	46
8.6.4. MASSON TRİKROM BOYAMA PROTOKOLÜ	47
8.6.5.İNDİREKT İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM	48
8.6.6. HİSTOLOJİK HASAR SKORLAMASI.....	49
8.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	50
9.BULGULAR	51
10. TARTIŞMA	77
11. SONUÇ	92
12. KAYNAKÇA	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Periferik sinir yaralanması sınıflandırması

Tablo 2. Küçük lösinden zengin proteoglikanlar

Tablo 3. SFI skor değerlendirmesi

Tablo 4. Işık mikroskopik doku takip metodu

Tablo 5. Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

Tablo 6. Masson Trikrom boyama protokolü

Tablo 7. SFI ölçüm sonuçları

Tablo 8. Puanlama sonrası sonuç tablosu



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Motor ve duyu nöronlarının şematik çizimi

Şekil 2. Sinir hasarı sınıflandırması

Şekil 3. Sinir hasarlanması sonrası ortaya çıkan dejenerasyon ve rejenerasyon

Şekil 4. Uzantılarına göre nöronların sınıflandırması

Şekil 5. Dorsal ve ventral köklerden periferik sinirlerin ayrılması

Şekil 6. Schwann hücresi ve miyelin kılıf oluşumu

Şekil 7. Sinir lifi tipleri ve fonksiyonları

Şekil 8. Sinir kılıf tabakaları

Şekil 9. Bir periferik sinirde kaydedilmiş aksiyon potansiyeli

Şekil 10. Epinöral onarım

Şekil 11. Fasiküler onarım

Şekil 12. Grup fasiküler onarım

Şekil 13. Dekorin-Kollajen ilişkisi

Şekil 14. Siyatik sinir seyri ve dallanma noktaları

Şekil 15. SFI için kullanılan değerlerin ölçümü

Şekil 16. Örnek EMG

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Sıçanların barınma kafesi

Resim 2. Cerrahi Set

Resim 3. Kullanılan sütur materyalleri ve rat prone pozisyonda, traş sonrasında steril örtüler örtülmeden önceki hali

Resim 4. Open field testinin yapıldığı platform

Resim 5. Rotarod aparatı ve deneklerin alıştırılma aşaması

Resim 6. Operasyon sonrası yapılan rotarod testi görüntüsü

Resim 7. Hot plate testi için kullanılan alet

Resim 8. SFI değerlendirilmesi ve kurutma kâğıdı üzerindeki görüntüsü

Resim 9. EMG uygulanan sistem ve uygulama sırasında görüntüsü

Resim 10. EMG uygulanan sistem ve uygulama sırasında görüntüsü

Resim 11. Sham grubunda distal EMG ölçüm görüntüsü

Resim 12. Dekorin infüzyon proksimal EMG ölçüm görüntüsü

Resim 13. Gastroknemius çıkarılması sonrası ağırlık ölçümü

Resim 14. Operasyon sonrası birinci haftada yara yeri görünümü

Resim 15. Kontrol grubu ve dekorin bolus grubunda bulunan self mutilasyon sonrası görüntü

Resim 16. Post operatif birinci haftada opere edilen sol ayak topuk bölgesinde ödem

Resim 17. Post operatif birinci haftada opere edilen sol ayak topuk bölgesinde ödem

Resim 18. Disseksiyon ve onarım sonrasında siyatik sinir görünümü

Resim 19. Osmotik pompa yerleştirilmesi sırasında görünüm

Resim 20. Dekorin uygulaması sonrasında sinir üzerinde meydana gelen kistik oluşumlar

Resim 21. Çıkarılan gastroknemius kaslarının ağırlık ölçümü öncesi görünümü

Resim 22. Sham grubu EMG ölçüm grafiği

Resim 23. Pbs bolus grubu EMG ölçüm grafiği

Resim 24. Dekorin bolus grubu EMG ölçüm grafiği

Resim 25. Dekorin infüzyon grubu EMG ölçüm grafiği

Resim 26. Gruplara ait H&E boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü

Resim 27. Gruplara ait Masson Trikrom boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü

Resim 28. Gruplara ait Kollagen 1 immunohistokimyasal boyaması

Resim 29. Gruplara ait Laminin immunohistokimyasal boyaması

Resim 30. Gruplara ait Fibronektin immunohistokimyasal boyaması

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Gruplar arası günlük ağırlık değişimi

Grafik 2. Rotarod aparatında kaydedilen ortalama hızlar operasyon öncesi ve sonrası

Grafik 3. Operasyon öncesi ve sonrasında ağrı duyusu ölçümü

Grafik 4. Gastroknemius kas ağırlık değişimi

Grafik 5. Open field testi sonrasında katedilen mesafe analiz sonuçları

Grafik 6. SFI istatistiksel analiz sonuçları

Grafik 7. EMG travma proksimali 5 mv analiz sonuçları

Grafik 8. EMG travma distali 5 mv analiz sonuçları

Grafik 9. EMG travma proksimali 10 mv analiz sonuçları

Grafik 10. EMG travma distali 10 mv analiz sonuçları

Grafik 11. EMG travma proksimali 10 mv latans analiz sonuçları

KISALTMALAR VE SİMGELER

Arkadaşları -- **ark**

Dakika -- **dk**

Diaminobenzidin -- **DAB**

Doku metalloproteinaz inhibitörü -- **TIMP**

Ekstrasellüler matriks -- **ECM**

Elektromiyografi -- **EMG**

Epidermal büyüme faktörü -- **EGF**

Epidermal büyüme faktörü reseptörü -- **EGFR**

Fosfat ile tamponlanmış salin -- **PBS**

Glikozaminoglikan -- **GAG**

Gram -- **gr**

Heat shock protein -- **HSP**

İnsülin benzeri büyüme faktörü -- **IGF**

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri -- **NSCLC**

Küçük lösenden zengin proteoglikan -- **SLRP**

Malign periferik sinir kılıfı tümörü -- **MPNST**

Malonyl-dialdehid -- **MDA**

Matriks metalloproteinaz -- **MMP**

Metre/saniye -- **m/s**

Milattan önce -- **MÖ**

Milattan sonra -- **MS**

Miliamper -- **ma**

Miligram/mililitre -- **mg/ml**

Milimetre -- **mm**

Milisaniye -- **ms**

Mikrogram/mililitre -- **mg/ml**

Miyelin ilişkili glikoprotein -- **MAG**

Oligodendrosit kökenli glikoprotein -- **OMgp**

Open-field maze -- **OPM**

Periferik Sinir Sistemi -- **PSS**

Platelet kökenli büyüme faktörü -- **PDGF**

Potasyum -- **K**

Pozitif ve negatif pikler arası mesafe -- **P-P (peak to peak)**

Proteaz aktive edici reseptör -- **PAR**

Reaktif oksijen radikalleri -- **ROR**

Round per minute -- **rpm**

Titanyum -- **Ti**

Saniye -- **s**

Santimetre -- **cm**

Santral Sinir Sistem -- **SSS**

Siyatik fonksiyonel indeks -- **SFI**

Sodyum -- **Na**

Süperoksid dismutaz -- **SOD**

Transforme edici büyüme faktörü -- **TGF**

Vasküler endotelyal büyüme faktörü -- **VEGF**

Volt -- **V**

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca birikimlerini ve deneyimlerini esirgemeyen tez danışmanım Prof.Dr. Haluk VAYVADA ile yetişmemde büyük katkıları olan güzide kliniğimizin fedakâr hocaları başta anabilim dalı başkanımız Prof.Dr. Can KARACA olmak üzere, Prof.Dr. Ali BARUTÇU, Prof.Dr. Mustafa YILMAZ, Prof.Dr. Adnan MENDERES ve Prof. Dr. Cenk DEMİRDÖVER’e saygılarımı sunarım.

Asistanlık dönemim boyunca benden bir an olsun desteklerini esirgemeyen, hem teorik hem pratik anlamda deneyimlerini paylaşan tüm asistan arkadaşlarıma, servis ve ameliyat hemşirelerimize, personellerimize yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin elektrofizyolojik kayıtlarının alınmasında ve motor ve duyu testlerinin değerlendirilmesinde yardımcı olan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Müge KIRAY ve Fizyoloji asistanı Dr. Talha Başar KOÇ’a, histolojik incelemelerin yapılması ve değerlendirilmesi aşamasında yardımcı olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Serap Çılaker MICİLİ’ya teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak benden hem maddi, hem manevi desteklerini hiç eksik etmeyen, her türlü sorunumu çözen ve her daim karşılık beklemeden yardımına koşan annem Nuray GEYİK, babam Yasin GEYİK ve sevgili kardeşim Emre GEYİK’e sevgilerimle..

DR.ALPER GEYİK

DEKORİN PROTEİN UYGULAMASININ PERİFERİK SINİR İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Periferik sinirler, temelde üç alt tipe ayrılmaktadır; bunlar motor nöronlar, duyu nöronları ve otonomik (sempatik-parasempatik) nöronlardır. Bu nöronlarda ortaya çıkan uyarılar ki bunlar ışık, sıcaklık, basınç gibi birbirlerinden farklı olabilmektedir, hücre membranında bulunan sodyum-potasyum ATPaz olarak adlandırılan pompayı aktive ederler. Aktive olan bu pompa, sitoplazmada (hücre içinde) ve ekstrasellüler matrikste (hücre dışında) dengede bulunan elektrolitlerin yer değiştirmesine sebep olur. Bu uyarılar belirli bir eşik değeri geçtikten sonra ortaya impuls olarak adlandırılan bir iletim işlemi ortaya çıkar.

Vücut bütünlüğü korunduğu müddetçe, bu fizyolojik süreç her an devam etmektedir. Ancak periferik sinirlerde meydana gelen travmalar bu süreci geriye dönüşsüz şekilde sekteye uğratabilmektedir. Yapılan çalışmalarda ortaya konduğu üzere periferik sinirleri ilgilendiren yaralanmalar travma hastalarının %5'ini oluşturmaktadır ve ülke çapında değerlendirildiğinde bu oran oldukça fazla insanı ilgilendirmektedir. Operatif tekniklerde gelişmeler olmasına karşın ameliyat sonrası ortaya çıkan skar fonksiyonel iyileşmeyi engellemekte ve epinöral skarlaşma sütur hattından aksonal uzamaya mekanik bariyer oluşturmaktadır. İyileşme sırasında oluşan yapışıklıklarda sinir mobilitesini kısıtlayarak hasarı arttırmaktadır.

Bu çalışmada, periferik sinir yaralanması sonrası ortaya çıkan skar dokusunu engellemek için dekorin denilen bir molekül kullanılacaktır. Dekorin, total olarak 100 kDa ağırlığında, SLRP olarak adlandırılan lösinden zengin bir protein ailesinin parçasıdır. Bu protein temel olarak fibroblast, kondrosit, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde üretilmektedir. Ayrıca bu molekül, hücre dışında bulunan büyüme faktörleri ve onların reseptörleri ve diğer proteinlerle etkileşebilmektedir. Hücre çoğalması, göç etmesi, farklılaşmasının regülasyonu yanında yaralanma sonrası ortaya çıkan inflamasyon sürecinin regülasyonunda da rol almaktadır.

Literatürde dekorin molekülünün iyileşme sürecinde ortaya çıkan fibrozisi ortadan kaldırdığı organ bazında gösterilmiştir. Glomeruloskleroz, bleomisin kullanımı sonrası akciğer hasarı ve santral sinir sisteminde fibrozis ile ilerleyen hastalıklarda etkin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır; ancak periferik sinir iyileşmesinde skar oluşumu sonucunda fonksiyon kaybının önlenmesini araştıran benzer bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı anti fibrotik etkinlik gösterdiği kanıtlanan dekorin molekülünün periferik sinir iyileşmesinde sorun oluşturan skar dokusunu azaltıp azaltamayacağını göstermektir.

Yaptığımız çalışmada oluşturulan hayvan modelinde, siyatik sinir hasarı oluşturulmuştur. Lasere sinir dokusu mikrocerrahi yöntem ile epinöral olarak suture edilmiş, ardından bolus ve osmotik pompa ile infüzyon şeklinde dekorin protein uygulaması yapılmıştır. Deneklere operasyon öncesi ve sonrasında motor ile duyu testleri yapılmıştır. Motor değerlendirme open-field, rotarod ve EMG ile yapılmıştır. Duyu, hot-plate testi ile değerlendirilmiştir.

Dekorin protein uygulaması, onarım sonrasında sinir iyileşmesi üzerine hem fonksiyonel hem de histolojik olarak faydalı sonuçlar vermiştir. Gruplar değerlendirildiğinde bolus uygulama istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya çıkarmıştır. Halen dekorinin uygulama zamanlaması, dozu, belirlenen dozun ne kadar aralıklarla verileceği ve veriliş yolu belirsizliğini korumaktadır. Bunun yanında pahalı olması, ilaca erişimin zor olması, üretimin uzun ve belirli laboratuvarlarda gerçekleşmesi klinik uygulamasını kısıtlamaktadır.

Sinir iyileşmesi oldukça kompleks ve karmaşık yollar içeren bir süreçtir. Bu yüzden tek bir ilaç veya teknik kullanarak tam iyileşmeyi sağlamak için daha moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır; ancak bolus dekorin protein uygulaması sinir iyileşmesine önemli katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler; Sinir yaralanması, fibrozis, dekorin protein

SUMMARY

Project Title

EFFECT OF DECORIN PROTEIN APPLICATION ON RAT SCIATIC NERVE HEALING

Project Summary

Peripheral nerves are basically divided into three subtypes, which are motor neurons, sensory neurons, and autonomic(sympathetic-parasympathetic) neurons. These are the signals that occur in neurons, which can be different from each other, such as light, temperature, pressure, and activate the pump called sodium-potassium ATPase, which is located in the cell membrane. This pump is activated, causing the electrolytes in the cytoplasm (inside the cell) and in the extracellular matrix (outside the cell) to shift in balance. A transmission process called impulse occurs when these warnings occur after passing a certain threshold value.

As long as body integrity is maintained, this physiological process continues at any time. However, the traumas that occur in the peripheral nerves can disrupt this process in an irreversible way. As revealed in the studies, injuries related to peripheral nerves account for 5% of trauma patients, and when evaluated nationwide, this ratio concerns quite a lot of people. Although there are improvements in operative techniques, scarring after surgery (scar tissue) prevents functional recovery and epineural scarring (outer layer of nerve) creates a mechanical barrier from suture line to axonal elongation. It increases damage by restricting nerve mobility in adhesions formed during recovery.

In this study, a molecule called decorin will be used to block scar tissue that occurs after peripheral nerve injury. Decorin is part of a protein family rich in leucine(an aminoacid) called SLRP, which weighs 100 kDa in total. This protein is mainly produced in fibroblast (connective tissue cell), chondrocyte (cartilage cell), smooth muscle cells, and endothelial (cells lining the inside of veins) cells. In addition, this molecule is able to interact with growth factors and their receptors and other proteins located outside the cell. Besides the regulation of cell proliferation, migration, differentiation, it is also involved in the regulation of the inflammation process that occurs after injury.

In the literature, it is shown on the basis of the organ that the decorin molecule eliminated the fibrosis (bad healing tissue) that occurs during the healing process. There are studies showing that glomerulosclerosis (kidney damage), lung damage after the use of bleomycin (chemotherapy drug), and fibrosis in the central nervous system are effective in progressive diseases; however, no previous study model on the peripheral nerve has been found in the literature. The study aims to show the decorin molecule, which has been proven to have anti fibrotic efficacy given the above, can reduce scar tissue to resolve problems in peripheral nerve healing.

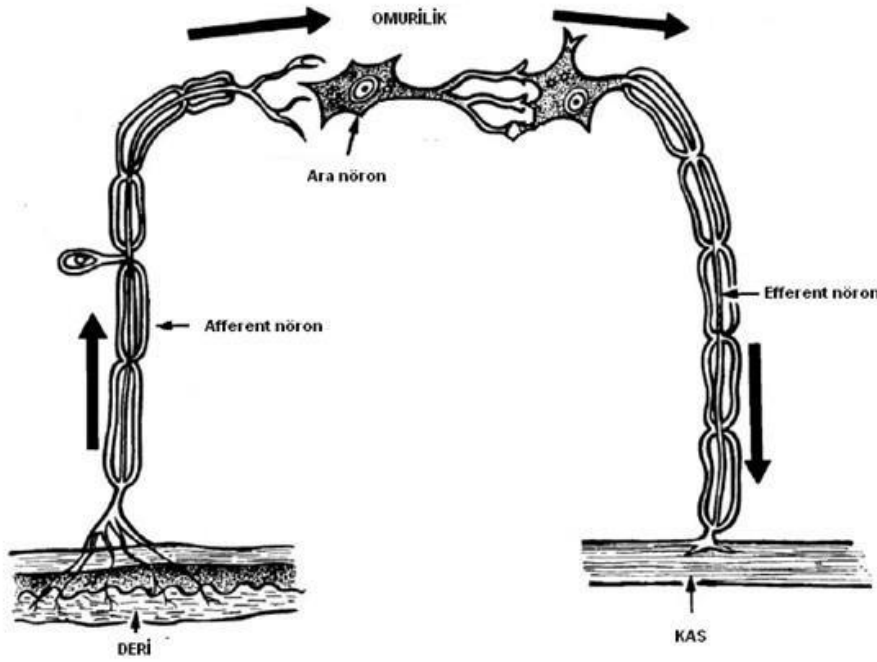
Although application of the decorin did not provide superiority when it was compared to the neuropraxia group in the evaluation of motor and sensory tests, it gave better results compared to the group that applied Pbs both functionally and histologically. Although bolus application reveals a statistically significant difference, the timing of the decorin, the dose, the intervals to be given, and the route of administration remain uncertain. In addition, it is expensive, difficult to access and production is long. These restrict clinical practice.

Nerve healing is a very complex and complicated process. Therefore, more molecular studies are needed to achieve full recovery using a single drug or technique; however, application of the decorin contributes significantly to nerve healing.

Key Words: Nerve injury, fibrosis, decorin protein

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinir sistemi temel olarak üç tip hücre grubundan meydana gelmektedir. Bu hücreler nöronlar, nöronlara destek görevi gören glial hücreler ve bağ dokusunu oluşturan stromal hücrelerdir. Periferik sinirler bilindiği üzere, vücut ile beyin arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır. Efferent nöronlar (motor ve otonomik), santral sinir sisteminden aldığı impulsları asetilkolin nörotransmitterini kullanarak perifere iletirler. Afferent nöronlar (duyu), özelleşmiş hücre yapıları aracılığıyla periferden aldığı sıcaklık, basınç, vibrasyon, dokunma gibi hisleri santral sinir sistemine aktarırlar.¹ (Şekil 1)

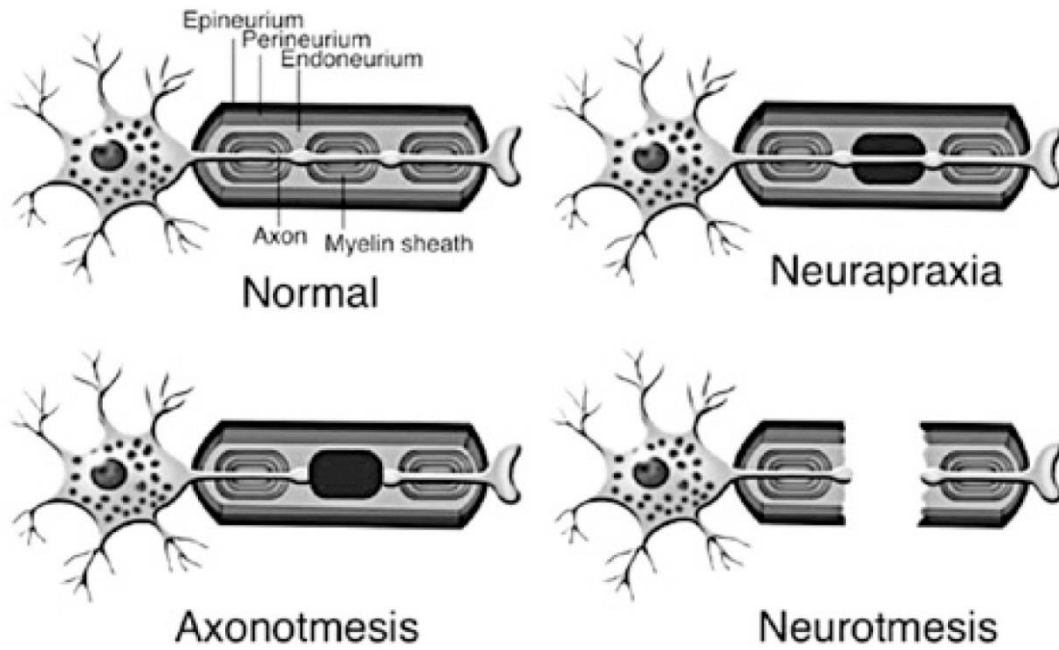


Şekil 1. Motor ve duyu nöronlarının şematik çizimi

Periferik sinirler ayrıca miyelinli ve miyelin kılıfı olmayanlar olarak sınıflandırılabilir. Miyelin kılıflarını schwann hücreleri denilen sinir hücrelerine destek olan ve NGF gibi büyüme faktörü sentezleyen hücreler oluşturur. Aksonları miyelin kılıf, sinir liflerini endonöryum, sinir lifi gruplarını (fasikül) perinöryum, bütün fasikülleri ise en dışta epinöryum çevrelemektedir. Bu yapılarda meydana gelen yaralanmalar sonrası ortaya çıkan anatomik ve histolojik değişikliklere göre Seddon ve sonrasında Sunderland tarafından sınıflandırma geliştirilmiştir.^{2,3} (Tablo 1, Şekil 2)

Tablo 1. Periferik sinir yaralanması sınıflandırması

Seddon	Sunderland
1. Nöropraksi	1-Nöropraksi
2. Aksonotmesis	2-Aksonal rüptür bazal lamina sağlam
3. Nörotmesis	3-Aksonal rüptür
	4-Total skar bloğu
	5-Total ayrılma

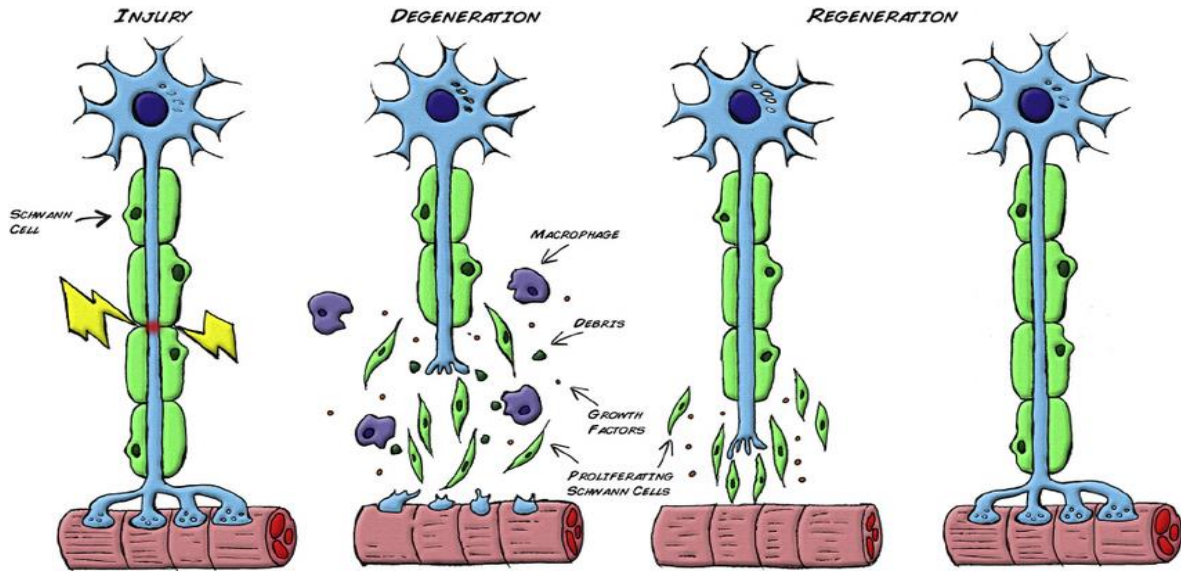


Şekil 2. Sinir hasarı sınıflandırması

Periferik sinir hasarlanması etiyolojisinde gerilme ve avülzyon, kompresyon, ezilme, penetran yaralanmalar görülmektedir. Penetran yaralanmalarda kendi içerisinde keskin, künt, patlayıcı ve elektrik nedenli olarak dörde ayrılabilir. Bu etiyolojik nedenlerden herhangi biri nedeniyle meydana gelen yaralanma sonrasında sinir hücre gövdesi ile akson arasında antegrad ve retrograd aksoplazmik transport, nörotransmitter akışı sekteye uğrar. Bu yaralanma hızlı bir şekilde iyileştirilebilecek düzeyde ise durum eski haline döner; ancak geri dönüşü olmayan şekilde bir yaralanma ile sinirin hasarlı kısmının proksimalinde ve distalinde programlı hücre ölümü meydana gelir.⁴ Bu programlı hücre ölümü, yaralanmanın proksimalinde kromatoliz olarak adlandırılır.

Yaralanmanın distalinde ise 24-48 saat içerisinde wallerian dejenerasyon olarak adlandırılan aksonun ve miyelin kılıfın parçalanması gözlenir.⁵ Schwann hücreleri ve makrofajlar ortamda bulunan parçalanmış hücre artıklarını temizleyerek büyüme faktörleri salgılar.

Oluşturulan ortam sayesinde, aksonlar rejenere olarak kılıf içerisinde ilerler ve uyarması gereken reseptöre ulaşır. (Şekil 3) Eğer oluşan skar nedeniyle optimal iyileşme koşulları sağlanamazsa aksonal rejenerasyon daha az olur.⁶ Bu da kalıcı hasara yol açar.



Şekil 3. Sinir hasarlanması sonrası ortaya çıkan dejenerasyon ve rejenerasyon⁶

Sinir onarımları onarım zamanına göre üçe ayrılmaktadır. Primer onarım, yaralanmadan sonra ilk iki günü kapsamaktadır. Bu dönemde yapılan onarımların sonuçları diğerlerine nazaran daha iyidir.⁷ Gecikmiş primer onarım 2 ile 7 gün arasını kapsamaktadır. Yedinci günden sonra yapılan onarımlar ise sekonder onarım olarak adlandırılır. Sinir defekti olan yaralanmalarda otolog sinir dokusu veya doğal- sentetik konduit ile onarım yapılabilir.

Onarım teknikleri temel olarak ikiye ayrılmaktadır. Sinirin yalnızca dış kılıfı olan epinöryum onarımı ile sinirin onarılması ve fasikül denilen sinir lifleri gruplarının ayrı ayrı onarılmasıdır.

Her iki onarım tekniğinin de avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır; ancak sonuçta iyileşme sonuçları açısından anlamlı fark genellikle bulunmamıştır. Hatta disseksiyonun fazla olması sonucu skar dokusunun oluşmasını arttırması nedeniyle epinöral onarımın üstün olduğu söylenmektedir.⁸

Yaralanma sonrasında ortaya çıkan skar dokusunu azaltmak, reseptöre ulaşamayan aksonların kontrolsüz rejenere olması nedeniyle oluşan nöroma formasyonunu azaltmak, sinir defektlerini onarmak için uygun sentetik veya doğal materyaller kullanmak geçmişten günümüze kadar devam eden çalışma başlıklarını oluşturmaktadır. Her bir başlık altında yapılan araştırmalar sonucunda belirgin ilerleme kaydedilmesine karşın hala yeterli sonuç elde edilememiştir.

Özellikle dışarıdan müdahale edilmediği takdirde, kendiliğinden iyileşme olmayan Sunderland evre 4 ve 5 periferik sinir yaralanmalarında onarım sonrası ortaya çıkan fibrozis, skar dokusu, adezyonlar (yapışıklar) aksonal iletimi engellemektedir. Retrograd veya anterograd yönde iletimi gerçekleştiremeyen sinirler hayat boyu non-fonksiyonel halde kalmaktadır. Hem sinir iyileşmesinin basamaklarının öğrenilmesi açısından hem de sayılan istenmeyen durumların azaltılması açısından literatürde oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır.⁹⁻¹²

Bu çalışmada oluşturulacak olan hayvan modelinde, siyatik sinir hasarı sonrası onarım yapılan sıçanlarda fibrozisi azalttığı kanıtlanmış olan dekorin molekülünün onarım hattına uygulanarak fibrozis ve skar dokusu azaltıp azaltmayacağı değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Santral sinir sistemi ve ona bağlı bulunan periferik sinir sisteminin günümüze ulaşan yazılı tarihi Edmund Smith papirüsleri olarak adlandırılan ve M.Ö. 2000 yıllarına dayanan belgeler ile başlamaktadır. O dönemlerde kalp vücudun merkezi olarak kabul edildiğinden sinir sisteminin yaşamsal önemi ve işlevi tam olarak anlaşılamamış idi. Yine de, bu yazılı belgelerde boyun yaralanması olan bir kişinin alt ve üst ekstremitelerinde duyunun kaybolduğu ve bunları hareket ettiremediği tespit edildiğinde omurga kırığı olduğu ve omuriliğinin hasar görmüş olabileceği belirtilmiştir.¹³

Yazılı kaynakların az olması ve tıbbi gelişmelerin aktarımındaki sorundan kaynaklı olacak ki M.Ö 4. yüzyılda Yunan filozofu Aristoteles (MÖ 384-322) sinirlerin kalp tarafından kontrol edildiğini ve ondan kaynaklandığını söylemiştir. Ayrıca sinirlerin diğer tübüler yapılar ile ayrımını yapamamıştır. Bu ayrımın yapılabilmesi ancak İbn-i Sina (MS 980-1037) döneminde mümkün olmuştur.

Aristoteles döneminden 600 yıl sonra yaşamış olan Galen (MS 130-200) medulla spinalisin beynin devamı olduğu, beyinden çıkan bu sinirlerin motor ve duyu fonksiyonları olduğunu ortaya koymuştur. Sinir dokusunun ayrı bir yapılanma olduğunun ortaya konmasından sonra bu dokunun onarımına ilk değinenlerden biri Paulus Aeginatus'tur (MS 626-696). İleriki yıllarda İbn-i Sina (MS 980-1037) teknik detay vermemesine karşın, uç uca epinöral onarımı tanımlamıştır.¹⁴ Dört yüz yıl önce Gabriele Ferrara (1543-1627) tarafından İtalya'da tanımlanan ve modern tekniklerin komponentleri olan güdük uçlarının çevre dokudan serbestlenmesi, onarım şekli ve kullanılacak aletler günümüzde geçerliliğini korumaktadır.¹⁵

On sekizinci yüzyılın başlarında Bell, Magendie, Remark ve Von Purkinje gibi çeşitli araştırmacılar tarafından sinir hücrelerinin anatomik organizasyonları daha detaylı şekilde tanımlanmıştır. Sir Charles Bell (1774-1842) motor sinirlerin ventral köklerdeki anatomik organizasyonunu, François Magendie (1783-1854) dorsal köklerin yapısını ortaya koymuştur. 1847 yılında Paget, median sinir kesisi olan hastanın sinirini primer onarmış ve fonksiyonel geri dönüş konusunda deneyimlerini paylaşmıştır.¹⁶

1850 yılında August Waller kurbağaların 10. ve 12. kafa çiftlerinde yaptığı deneylerde yaralanmadan sonra sinir distalinde ortaya çıkan değişiklikleri, günümüzde bunları “Wallerian dejenerasyon” olarak isimlendirmektediriz, tanımlamıştır.¹⁷

Golgi ve Cajal, 1906 yılında sinir sisteminin yapısını ve sinirlerin fonksiyonel bağlantılarını keşfederek Nobel Tıp Ödülü’nü kazanmışlardır. Sherrington, önceki çalışmalardan faydalanarak sinaps adı verilen sinirlerin fonksiyonel bağlantı noktalarını tanımlamıştır. Sunderland, Milesi ve Terzis’in sinir hücreleri, Schwann hücrelerinin rolü, sinir yaralanmaları, aksona ait transport ve aksonal filizlenmeler konusundaki çalışmaları periferik sinir cerrahisinde önemli gelişmelere örnek oluşturmuştur.^{16,18}

Sunderland ve Seddon sinir hasar mekanizmalarını detaylandırmışlar, kendi adlarıyla anılan bir sınıflandırma oluşturmuşlar. Bunun yanında periferik sinirlerin topografik anatomileri üzerine çalışmalar yapmışlardır.^{19,20}

3. PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ

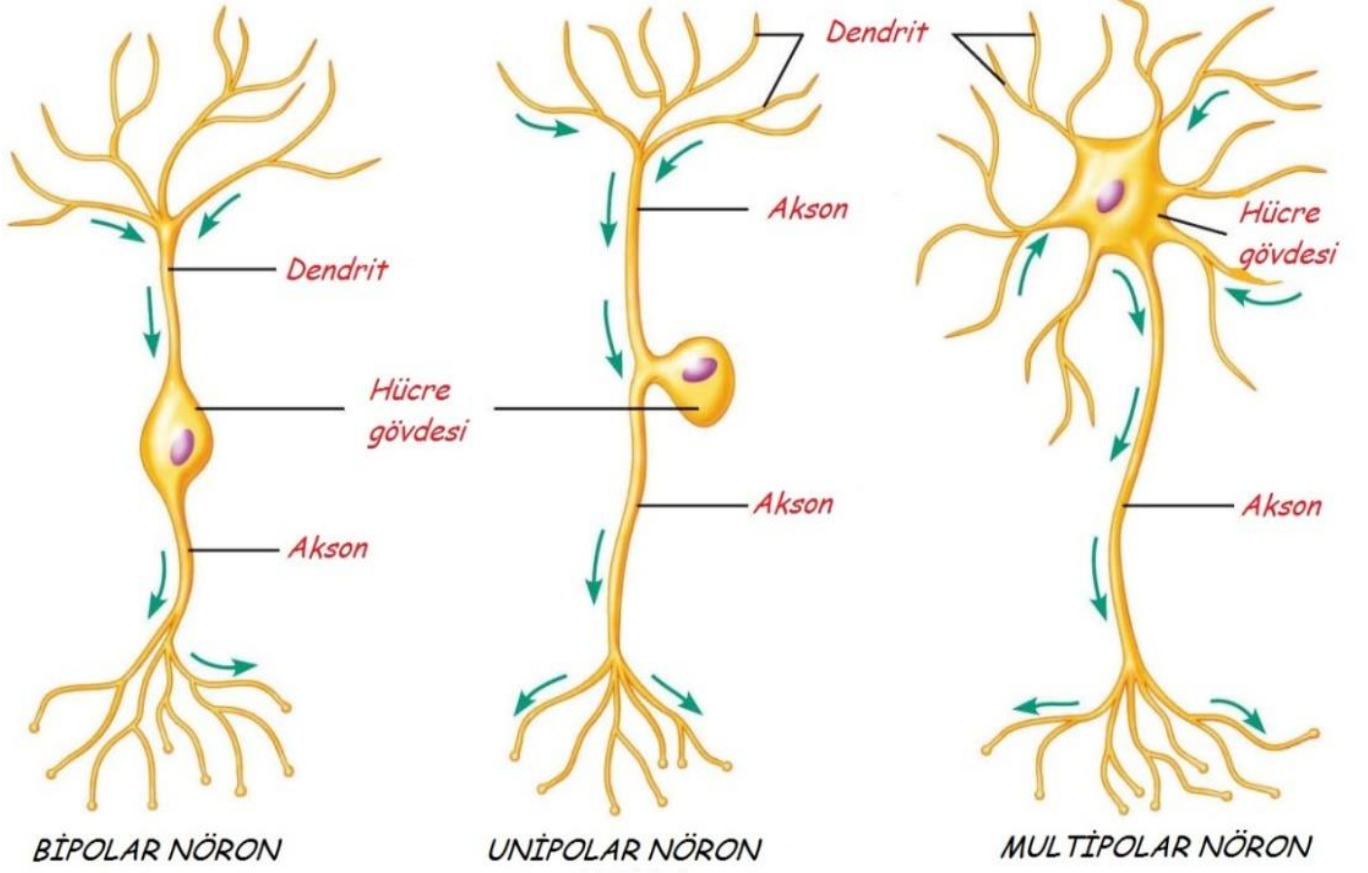
Sinir uyarıları periferden merkezi sinir sistemine, veya merkezi sinir sisteminden perifere, periferik sinirler aracılığıyla taşınır. Periferik sinirler sinir lifleri, ganglionlar ve sensitif veya motor son-uç plaklarından oluşur. Afferent lifler, periferden reseptör tarafından alınan duyuları merkezi sinir sistemine (beyin ve medulla spinalis) iletirler. Efferent lifler, merkezi sinir sisteminden çıkarak kaslara (somatomotor) veya organlara (visseromotor) giderler. Afferent ve efferent liflerin somatik olanları, kemik, iskelet kasları ve deri ile ilgili olup, genel vücut duyusu (genel somatik afferent) olarak bilinir. Visseral olanları ise iç organlar, damarlar ve müköz zarlarla ilgilidir.

Periferik sinir sistemi, kranial sinirler, spinal sinirler ve otonom sinir sistemi olarak üç ana bölüme ayrılır. Bu üç bölüm, afferent ve efferent lifleri ile innerve edilen yapıları ortak olarak kontrol ederler. Organların çalışmasını sağlayan efferent impulslar, kısmen sempatik sisteme, kısmen de parasempatik sisteme ait sinirler ile birlikte ilgili organlara götürülür. Periferik sinirler, miyelinli ve miyelinsiz olmak üzere iki çeşittir. Çoğunluğu oluşturan miyelinli lifler spinal sinirler ve dalları ile bazı kranial sinirlerde görülürler.

Periferik sinir sonlanmaları; sinir lifleri periferde basit çıplak lifler veya sıklıkla uç organlar ile sonlanır. Sinir liflerinde bulunan bu sonlanmalar, reseptör ve efektör sonlanma şeklinde ifade edilir. Genel reseptörler, sıcak, soğuk, ağrı, temas ile proprioseptif duyu denilen kas ve eklemlerden gelen duyuları alır. Özel reseptörler ise görme, işitme, denge, tat ve koku duyularını alır.

Motor sinirler, hem çizgili hem de çizgisiz kasları innerve eder. Çizgisiz veya isteğimiz dışında çalışan kaslar, otonom sistemden gelen ve genellikle miyelinsiz liflerden innerve olurlar. Çizgili kaslara giden somatomotor lifler kranial ve spinal sinirler aracılığıyla gelirler ventral kökten çıkan bu sinirler multipolar nöronlardır ve başlıca miyelinli liflerden oluşurlar. (Şekil 4)

Bu lifler de kas kılıfına girecek daha ince dallarına ayrılır. Bu dallanma her bir kas lifine bir dal düşecek şekilde olur. Terminal liflerin uçları genişleyerek motor son plaklarını oluşturur.²¹

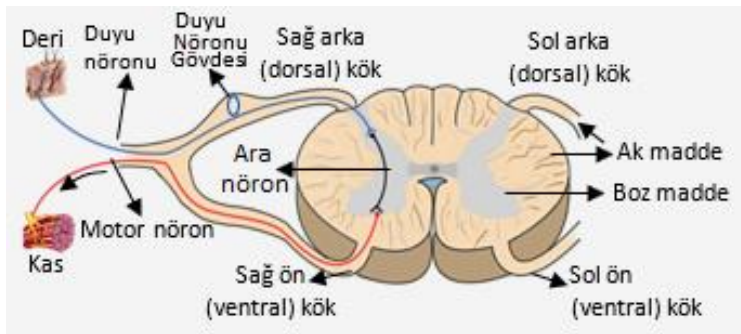


Şekil 4. Uzantılarına göre nöronların sınıflandırması²¹

4. PERİFERİK SINIR TOPOGRAFİK ANATOMİSİ İLE HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİSİ

Periferik sinir sisteminin gelişimi santral sinir sistemi gelişiminin devamında gerçekleşir. Embriyonik dönemde, üçüncü haftanın başlarında primitif düğümün önünde orta-dorsal bölgede yerleşmiş terlik biçimli kalınlaşmış bir ektodermal plak, nöral plak halinde belirir. Nöral plağın lateral kenarları, kısa bir süre sonra nöral katlantıları meydana getirmek üzere yukarı doğru kıvrılır. Nöral katlantıların dış kenarları biraz daha yükselerek orta hatta birbirine yaklaşır ve en sonunda birbirine yapışarak nöral tüpü oluşturur. Kapanan nöral tüpün duvarı nöroepitelyal hücrelerden meydana gelir. Bu hücreler, duvarın tüm kalınlığı boyunca ilerleyerek, kalın bir yalancı çok katlı epitelyum oluştururlar. Ayrıca, nöral tüpün kapanmasından hemen sonra bu hücreler hızla çoğalmaya devam ederek nöroepitelyal tabakayı oluştururlar. Bu tabakada gelişen nöroblastlar spinal kordun gri cevherini, bu tabakadan çıkan sinir lifleri de miyelinizasyon sonrasında beyaz cevheri oluşturur. Nöroblastların gelişim ve farklılaşma safhalarında öncelikle apolar hale gelen primitif sinir hücreleri, unipolar, bipolar ve multipolar nöronları oluşturur.

Spinal sinirlerin uzantıları olan periferik sinirler, ventral ve dorsal köklerden çıkarlar. Dorsal primer ramuslar dorsal aksiyel kasları, vertebral eklemleri ve sırtın derisini innerve ederler. Ventral primer ramuslar ise, ekstremiteleri ve vücut ön duvarını innerve eder ve majör sinir pleksuslarını (kranial, brakial ve lumbosakral) oluştururlar. (Şekil 5)

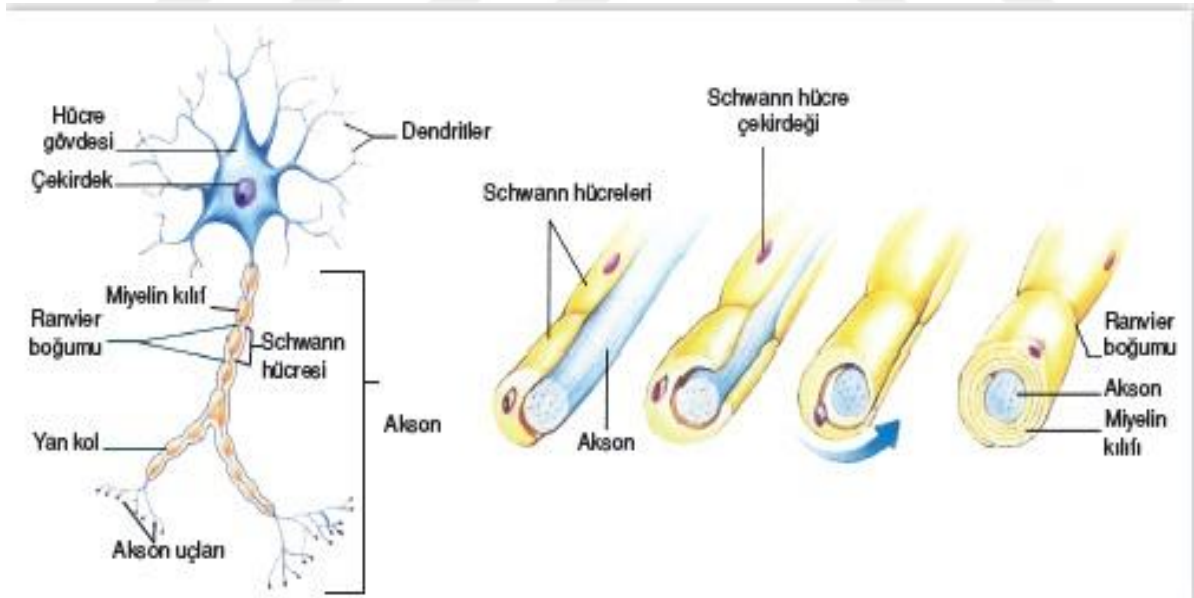


Şekil 5. Dorsal ve ventral köklerden periferik sinirlerin ayrılması

Periferik sinirlerin miyelinizasyonu Schwann hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Nöral krestten kaynaklanan bu hücreler, perifere doğru göç ederek aksonların çevresini sararlar ve böylece nörolemma olarak adlandırılan kılıfı oluştururlar.

Fetal yaşamın dördüncü ayının başında sinir liflerinin birçoğu, üzerlerinde Schwann hücresi membranının akson üzerinde birçok kez kıvrılması sonucu oluşan miyelinin birikmesiyle, beyazımsı bir görünüm alırlar.²² Bunun yanında Schwann hücrelerinin salgıladıkları ekstrasellüler matriks proteinleri ile oluşturdukları bazal lamina çevre düzenini sağlamaktan sorumludur. Schwann hücrelerinin ve bazal laminanın oluşturduğu Büngner bantları aksonlar için nörotropik destek sağlayarak iyileşmeye yardımcı olur. Schwann hücreleri bazal laminada bulunan ve bir glikoprotein olan laminin, fibronektin, heparan sülfat, entaktin ve Tip 4 kollajen sentezinde de rol almaktadır.

Miyelin yapı olarak %75 lipid, %25 proteinden meydana gelir. Miyelinli aksonlarında Ranvier boğumu denilen miyelinsiz alanlar mevcuttur. Akson tepeciği ve boğumlar iletimin sıçrayarak (saltatuar) hızlı şekilde ilerlemesini sağlar.²³ Ranvier boğumları arasında kalan bölgeye internod denilir. Genelde 1 μm 'den büyük sinirler miyelinli olma olasılığı yüksektir. Daha küçük sinirler miyelinsizdir. Miyelin bulunmayan bir motor veya duyu siniri 0,2-1,5 μm çapında, ileti hızı 0,4-2,0 m/s iken, 12-20 μm çapına ulaşan sinirlerin ileti hızları 72-120 m/s hıza çıkabilmektedir. (Şekil 6 ve Şekil 7)

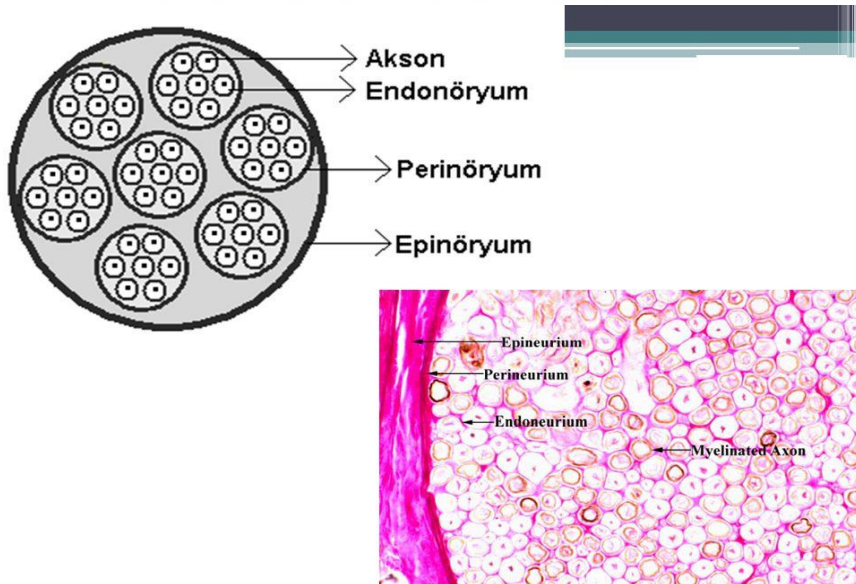


Şekil 6. Schwann hücresi ve miyelin kılıf oluşumu

LİF TİPİ	İŞLEVİ	LİF ÇAPI(μm)	İLETİ HIZI(m/s)	AP SÜRESİ (ms)
A				
α	Propriyoseptif, somatik motor	12-20	70-120	
β	Dokunma, basınç	5-12	30-70	
χ	Kas içciklerine motor	3-6	15-30	0,4-0,5
σ	Ağrı,soğuk, dokunma	2-5	12-30	
B	Otonom pregangliyonik	<3	3-15	1,2
C				
Dorsal kök	Ağrı,sıcaklık, mekanoreseptörler	0,4-1,2	0,5-2,3	2
Sempatik	Otonom postgangliyonik	0,3-1,3	0,7-2,3	2

Şekil 7. Sinir lifi tipleri ve fonksiyonları

Sinirin üzerini saran kılıf üç ana tabakadan meydana gelmektedir. En dıştaki kısım epinörיום, ortada perinörיום, en içte ise endonörיוםdur. (şekil 8)



Şekil 8. Sinir kılıf tabakaları

Epinörיום, sinirleri dıştan saran ve sinir demetlerinin arasını dolduran fibröz bir bağ dokusudur. Fasiküler gövdeyi travmalardan korumakla görevli kılıf elastik liflerden, fibroblastlardan, tip 1 ve 3 kollajenden ve yağ dokusundan oluşmaktadır.

Epinörium fonksiyon itibariyle iki kısımdan oluşur. Dış kısım dış epinörium yani epifasiküler epinörium olarak bilinir ve kolayca ayrılabilen asıl dayanıklı kısımdır. İç epinörium, interfasiküler epinörium olarak bilinir ve fasikülleri sıkıca sararak gevşekçe bir arada tutar. Toplam sinir kesit alanının %30-70'ini epinörium oluşturur ve distale gittikçe kalınlığı azalır.²⁴

Perinörium, fasikülleri sıkıca saran ve kenarlarında bitişik hale gelerek kan sinir bariyerini oluşturan miyelin kılıfıdır. Mekanik görevi dışında, iyon dengesini sağlayan bir bariyerdir. Mekanik koruyuculuğunu yassı perinöral hücreler sayesinde sağlar. Distalde incelerek tek katlı bir yapı olan ve henle kılıfı olarak adlandırılan bir hale gelir. Endonörium ve perinörium arasında plexus yapan vasküler yapılarca delinir.²⁵

Endonörium, ekstrasellüler matrikse gömülmüş ince kollajen fibrilleri ve jel benzeri yapı içeren akson ve Schwann hücreleri içermektedir. Aksonlar, miyelin ve miyelin kılıfını oluşturan Schwann hücreleri tarafından kaplanmıştır. Miyelinizasyon yapan Schwann hücre zarları aksonun etrafına sarılır ve çok katmanlı membran yapılarına neden olur. Miyelin kılıfı, kompakt ve kompakt olmayan miyelin bölmelerine ayrılmıştır. Kompakt olmayan miyelin üç konumda bulunur; elektriksel impulsun hızlı bir şekilde iletilmesini sağlayan Ranvier (paranodal bölgesi) düğümlerinin hemen yanında, kompakt miyelin kılıfının içinde bulunan Schmidt-Lanterman kesimlerinde ve Schwann hücre sitoplazmasının hacminin sıkıştırılmış miyelin alanlarına kıyasla arttığı iç ve dış aksonlardadır.²⁶

5. PERİFERİK SİNİR FİZYOLOJİSİ

Sinir hücreleri uyarılma için düşük bir eşiğe sahiptir. Uyaran elektriksel, kimyasal veya mekanik olabilir. İki tip fizikokimyasal değişiklik meydana gelir: yerel, ilerlemeyen potansiyellerle bulunduğu yere göre sinaptik veya jeneratör potansiyeller ve ilerleyen potansiyeller; yani aksiyon potansiyelleri veya sinir impulsları adı verilir. Bu impulslar iyon kanallarındaki değişimler sonucu gelişen, iyonların hücre zarı boyunca iletimindeki değişikliklere bağlıdır.²⁷

Nöronlardaki elektriksel olaylar hızlıdır. Milisaniye (ms)'ler şeklinde ölçülür ve potansiyel farklar küçük olup milivolt (mV) ile ifade edilir. 1µm'den daha az uç çapı olan mikroelettrotların geliştirilmesine ek olarak, sinirlerde etkinliğin ayrıntılı çalışılmasını olası kılan temel ilerlemeler elektronik büyüteçler ve katod ışını osiloskopların(KIO) gelişmesi olmuştur. Çağdaş büyüteçler potansiyel değişiklikleri 1000 kez ya da daha fazla büyütür ve KIO elektriksel olayları kaydetmede hemen hemen eylemsiz ve derhal yanıt veren bir kaldıraç görevi yapar.²⁷

5.1. DİNLENİM ZAR POTANSİYELİ

Uygun bir büyüteç aracılığıyla 2 elektrod KIO'ya bağlandığında ve tek bir aksonun yüzeyine yerleştirildiğinde hiçbir potansiyel fark gözlenmez. Öte yandan elektrodun biri hücrenin içine sokulursa dinlenimde içerisi dışarıya göre eksi olacak şekilde sabit bir potansiyel fark gözlenir. Bu dinlenim zar potansiyeli hemen tüm hücrelerde bulunur. Nöronlarda bu değer genellikle -70 mV'dur.²⁷

5.2. LATENT DÖNEM

Eğer akson uyarılırsa ve iletilen bir uyarı oluşursa, uyarı dıştaki elektrodu aşarken aksiyon potansiyel adı verilen karakteristik bir seri potansiyel farkı gözlenir.

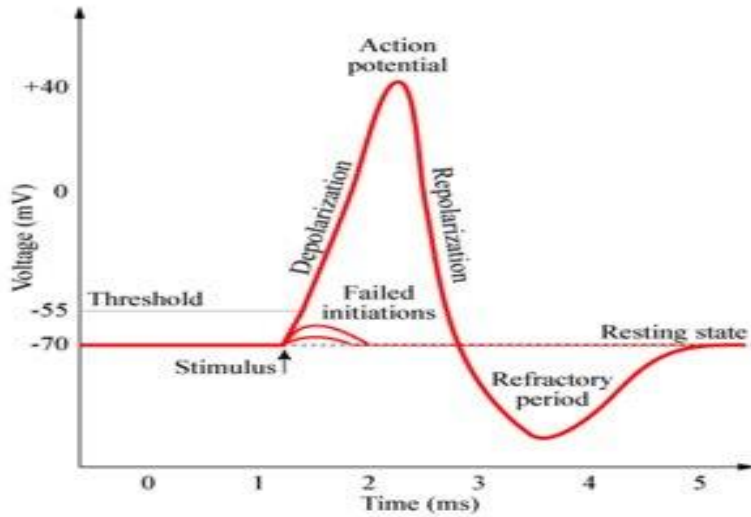
Uyarı uygulandığında, bazal çizginin ani düzensiz bir sapması olan, uyarı artefaktı olur. Bu artefakt uyarıcı elektrotlardan kaydedici elektrotlara doğru olan akım kaçığına bağlıdır. Bu kaçık yalıtıma rağmen meydana gelir ve katod ışını perdesinde uyarının uygulandığı noktayı işaret etmesi açısından değerlidir.

Uyarı artefaktını, bir izopotansiyel ara (latent) dönem takip eder ve aksiyon potansiyelinin başlangıcı ile sonlanır. Bu dönem impulsun uyarı noktasından kaydedici elektrotlara kadar ilerlemesi için geçen süreye karşılıktır.

Süresi uyaran ve kaydeden elektrotlar arasındaki uzaklıkla doğru, aksonun iletim hızıyla ters orantılıdır. Eğer latent dönemin süresi ve elektrotlar arası uzaklık biliniyorsa aksondaki iletim hızı hesaplanabilir.²⁷

5.3. AKSİYON POTANSİYELİ

Yaklaşan aksiyon potansiyelin ilk belirtisi zarın bir başlangıç depolarizasyonudur. 15 mV'luk bir başlangıç depolarizasyonundan sonra depolarizasyon hızı artar. Hızdaki bu değişikliğin görüldüğü noktaya eşik değer denir. Bundan sonra osiloskoptaki çizim hızla izopotansiyel çizgiye ulaşır ve yaklaşık +35 mV'a kadar ulaşan aşırı fırlama yapar. (Şekil 9) Daha sonra tersine döner ve hızla dinlenim düzeyine düşer. Repolarizasyon büyük oranda tamamlandığında hızı azalır ve dinlenim düzeyine daha yavaş yaklaşır. Önceki dinlenim düzeyine ulaştıktan sonra çizim hiperpolarizasyon yönünde hafifçe fırlayarak küçük fakat uzun süreli hiperpolarizasyon sonrası dönemi oluşturur.²⁷



Şekil 9: Bir periferik sinirde kaydedilmiş aksiyon potansiyeli

5.4. “HEP YA DA HİÇ” YASASI

Bir uyaran belirli bir süre uygulanırsa yalnızca bir aksiyon potansiyeli oluşturacak en düşük uyaran şiddetini (eşik şiddeti) belirlemek olasıdır. Eşik şiddet süre ile değişir; zayıf uyaranlarla uzun, kuvvetli uyaranlarla ise kısa sürer. Bir eşik uyarının süresi ile şiddeti arasındaki ilişkiye şiddet-süre eğrisi denir. Yavaşça yükselen akımlar siniri ateşleyemez, sinir uygulanan uyarana uyum sağlar, bu sürece uyum (akomodasyon) denir.

Eşik uyaran şiddetine ulaşıldığında, tam bir aksiyon potansiyeli oluşur. Diğer deneysel koşullar sabit kaldığı müddetçe uyarının şiddetindeki ek artışlar aksiyon potansiyelde herhangi bir artışa yol açmaz.

Uyaranın büyüklüğü eşik altı değerde ise aksiyon potansiyeli oluşmaz., uyaran ancak eşik şiddetin üzerine çıktığı takdirde aksiyon potansiyeli oluşur. Bu duruma hep ya da hiç yasası denir.²⁷

5.5. ELEKTRONİK POTANSİYELLER

SIRASINDA UYARILABİLİRLİKTE DEĞİŞİKLİKLER VE AKSİYON POTANSİYELLERİ

Aksiyon potansiyel sırasında olduğu gibi katelektrotonik ve anelektrotonik potansiyeller ve lokal yanıt sırasında da nöronun eşğinde değişiklikler olur. Hiperpolarize edici anelektrotonik yanıtlar eşği yükseltir ve katelektrotonik potansiyeller zar potansiyelini ateşleme düzeyine yaklaştırdıkça eşği düşürür.

Yanıt sırasında eşik düşer fakat dikensi potansiyelin yükselme fazı ve düşme fazında nöron uyarıya duyarsızdır (refrakter periyod). Bu dönem absolü ve rölatif refrakter dönem olarak ikiye ayrılır. Absolü duyarsız dönemde, ne kadar güçlü olursa olsun hiçbir uyaran siniri uyaramaz; ancak rölatif dönemde normalden daha kuvvetli uyaranlar uyarılmaya neden olabilir.²⁷

5.6. AKSİYON POTANSİYELİNİN ELEKTRİKSEL GELİŞİMİ

Sinir hücresi zarı dinlenimde artı yükler zarın dışı boyunca ve eksi yükler içi boyunca sıralanmış bir şekilde kutuplanmıştır. Aksiyon potansiyeli sırasında bu kutuplanma ortadan kalkar ve kısa bir süre için tersine döner. Aksiyon potansiyel akışının önünde ve gerisinde zardan artı yükler aksiyon potansiyeli ile temsil edilen eksi alana doğru akar. Bu tür elektrotonik bir depolarizasyon lokal yanıtı başlatır ve ateşleme düzeyine erişildiğinde ilerleyen bir yanıt oluşarak hücre zarını depolarize eder. Bu olay dizisi miyelinsiz akson boyunca sonuna kadar ilerler.²⁷

5.7. SIÇRAYICI (SALTATUVAR) İLETİM

Miyelin etkin bir yalıtkandır ve bundan geçen akım ihmal edilebilir düzeyde azdır. Bunun yerine miyelinli aksonlarda depolarizasyon bir Ranvier boğumundan diğerine sıçrarken etkin boğumdaki aksonal bölge aksiyon potansiyelinin ilerisindeki boğumu ateşleme düzeyine elektrotonik olarak depolarize etmeye hizmet eder. Depolarizasyonun boğumdan boğuma sıçramasına saltatuvar ileti denir. Hızlı bir süreçtir ve miyelinli aksonlar en hızlı miyelinsiz liflerden 50 kez daha hızlı iletilir.²⁷

5.8. UYARILMANIN İYONLARA İLİŞKİN TEMELİ VE İLETİM

Sinirlerin hücre zarları, diğer hücrelerde olduğu gibi çok sayıda, birbirinden farklı iyon kanalı tipi içerir. Bunlardan bazıları edilgen, yani hep açıkken, diğerleri voltaj kapılı ve ligand kapılıdır. Bu kanalların ve özellikle Na ve K kanallarının davranışı sinirlerdeki elektriksel olayları açıklar.²⁷

5.9. DİNLENİM ZAR POTANSİYELİNİN İYON TEMELİ

Na nöronlar ve diğer hücrelerde etkin olarak hücre dışına taşınırken K etkin olarak hücre içine taşınır. K hücre dışına sızarken Na hücre içine sızar, fakat K kanalları nedeniyle K'a olan geçirgenlik Na'ya oranla çok daha fazladır. Zar, hücre içindeki anyonların çoğuna geçirimsiz olduğundan K'nın dışa akımı eşit oranda anyon akımı ile birlikte olmaz ve zar dışı arısı içeriye göre artı olacak şekilde kutuplanmış (polarize) bir durumda kalır.²⁷

5.10. AKSİYON POTANSİYEL SIRASINDA İYON AKIMLARI

Bir iyonun iletkenliği onun elektriksel direncinin tersiyle orantılıdır ve zarın bu iyona geçirgenliğinin bir ölçütüdür. Dinlenim zar potansiyelinde hafif bir düşüş artmış K dışa akımına ve Cl içe akımına neden olarak dinlenim potansiyelini yeniden oluşturur. Ancak depolarizasyon 7 mV'u aşınca, voltaj bağımlı Na kanalları artan bir hızla açılmaya başlar ve ateşleme düzeyine ulaşıldığında, içeriye doğru yönlenmiş derişim ve elektriksel gradientler boyunca Na'nın içeri akımı o kadar fazla olur ki repolarize edici güçleri geçici olarak yok eder.²⁷

Memeli nöronlarında Na için Nernst denklemi ile hesaplanan dengeleme potansiyeli yaklaşık +60 mV'dur. Aksiyon potansiyeli sırasında zar potansiyeli bu değere doğru yaklaşır fakat ulaşamaz, çünkü temel olarak Na geçirgenliğindeki artış kısa sürelidir. Na kanalları hızla etkin olmayan durum denen kapalı bir duruma girer ve dinlenim durumuna dönmeden önce bu halde birkaç milisaniye kalır. Ayrıca, fırlama fazında Na'nın elektriksel gradientinin yönü değişir çünkü zar potansiyeli tersine dönmüştür ve bu Na'nın hücre içine akışını kısıtlar. Repolarizasyonu sağlayan üçüncü bir faktör voltaj kapılı K kanallarının açılmasıdır.²⁷

Bu açılış Na kanallarının açılışına göre daha yavaş ve daha uzun sürelidir ve sonuçta K geçirgenliğindeki artışın çoğu Na geçirgenliğindeki artıştan sonra gelir.

Bu sırada K'nın dışa akımına bağlı artı yüklerin hücre dışına ait hareketi repolarizasyon sürecinin tamamlanmasına yardımcı olur. K kanallarının kapalı duruma yavaş dönüşleri hiperpolarizasyon sonrası dönemi de açıklamaktadır.

Na'nın hücre dışındaki derişimini azaltmak aksiyon potansiyelinin boyutunu azaltır, fakat azalan Na derişiminin dinlenim zar potansiyeline etkisi çok az olur. Dinlenim zar potansiyeline pek etkisinin olmaması Goldman denklemi ile açıklanabilir. Aksine hücre dışı K derişimini arttırmak dinlenim zar potansiyelini azaltır.²⁷

Aksiyon potansiyeli sırasında Na'nın hücre içine girmesine ve K'nın hücreyi terk etmesine rağmen bu harekette yer alan iyonların sayısı toplam mevcut sayı ile karşılaştırıldığında çok azdır. Etkinleşme sırasında hücrenin Na kazanıp, K kaybettiği olgusu deneysel olarak gösterilmiştir, fakat iyon derişimlerinde anlamlı değişiklikler ancak uzamış, yineleyen uyarılardan sonra ölçülebilmektedir.

Voltaj kapılı K kanallarının yavaş açılışı ve gecikmiş kapanışı uyumu da açıklamaktadır. Eğer depolarizasyon hızlı gerçekleşirse, Na kanallarının açılışı repolarize edici güçleri yener, fakat başlatılan depolarizasyon yavaş gerçekleşirse, K kanallarının açılışı ve Na kanallarının basamaklı açılışını dengeler ve bir aksiyon potansiyeli gerçekleşmez.

Hücre dışı kalsiyumdaki azalma sinir ve kas hücrelerinin uyarılabilirliğini artırır; bunu aksiyon potansiyeli oluşturacak Na ve K geçirgenliğindeki değişiklikleri başlatmaya yetecek depolarizasyon miktarını azaltmak suretiyle gerçekleştirir. Aksine, hücre dışı kalsiyumdaki bir artış uyarılabilirliği azaltır.²⁷

5.11. MİYELİNLİ NÖRONLARDA İYON KANALLARININ DAĞILIMI

Na kanalları miyelinli nöronlarda Ranvier düğümleri başlangıç bölümünde çok yoğundur. Başlangıç bölümü ve duysal nöronlardaki ilk Ranvier düğümü uyarıların ilk oluşturulduğu yerlerdir. Miyelinli memeli nöronlarında zarın mikrometre karesinde bulunan Na kanallarını sayısı hücre gövdesinde 50-75, başlangıç bölümünde 300-500, miyelinin yüzeyinde 25'den az, Ranvier düğümlerinde 2000-12000 ve akson uçlarında 20-75 arasındadır. Miyelinsiz nöronlarda bu sayı ortalama 110'dur.²⁷

5.12. ENERJİ KAYNAKLARI, BESLENMESİ VE SİNİR METABOLİZMASI

Sinir hücresinin enerji gereksiniminin büyük kısmı (yaklaşık %70'i), Na-K ATPaz pompasının çalışması ile zar polarizasyonunda kullanılır. Azami etkinlik sırasında sinirin metabolik etkinliği iki katına çıkar; karşılaştırılacak olursa iskelet kasının metabolik hızı 100 kat kadar artar.²⁷

Periferik sinirler aksonal transport ve uyarıların iletiminin sağlanması için gerekli enerjiyi miyelin kılıfının her üç tabakasında bulunan vasküler pleksusun yaptığı anastomozlardan sağlamaktadır. Periferik sinir dolaşımı ekstrensek (segmental) ve intrinsek (longitudinal) olmak üzere ikiye ayrılır.

Diğer bir şekilde dominant pedikül olmadan segmental kanlanma, sinirle birlikte seyreden longitudinal tek bir dominant pedikül, sinir boyunca uzanan multipl dominant pediküller olarak sınıflandırılabilir.²⁷

Sinirin dış yüzeyindeki gevşek bağ dokusunda bulunan ekstrensek sisteme vaso nervorum denilir ve bu damarlar mezonöryum içerisinde uzanırlar. Vaso nervorum sistemine muskuler perforanlar ve periosteal damarlarda destek vermektedir. Sempatik sinir sistemi ve lokal faktörler buradaki kan akımını etkileyebilir.

İntrinsek sistem aksine lokal faktörlerden ve otonom sinir sisteminden etkilenmez. Epinöral damarlar her fasiküle besleyici damar göndermesi yanında yer yer perinöral pleksus ile de anastomozlar yaparlar. Perinöral pleksus dalları, iç tabakayı perfore ederek endonöral vasküler pleksusu meydana getirir. Endonöral dolaşım lokal perfüzyon basıncı ile stabil tutulmaktadır.^{28,29,30} Periferik sinir vasküler yapıları sinüzoidal ve kıvrımlı olduğundan vasküler sistem traksiyon tarzında travmalarda hasarlanmayabilir^{29,30}. Periferik sinirlerde lenfatik sistem benzeri sistem bulunmamasına rağmen endonöral bölgede lenfatik kanallara benzer yapılar görülmektedir. Travma sonucu oluşan ödem hızlı uzaklaştırılamadığından sinirde fibrozis ve skara neden olup iletimi bozabilmektedir.³¹⁻³²

6. PERİFERİK SİNİR YARALANMASI

Periferik sinir hasarlanması, acil servis başvurularında ve periferik sinir cerrahisi ile ilgilenen branşların pratiğinde sık karşılaşılan bir durumdur. Periferik sinir hasarlanmasına yol açan temel nedenler; penetran travmalar, ezilme (crush), traksiyon, iskemiye sekonder gelişenler, daha az oranda ise termal yaralanmalar, radyasyon ve elektrik akımına maruziyettir.³³ Bütün sinirler etkilenebilmekle birlikte yapılan bir çalışmada yaralanmaların çoğunluğunun üst ekstremitede olduğu ve etkilenen sinirlerin çoğunlukla ulnar ve median sinirler olduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada sinir yaralanmalarına neden olan birincil sebep ise araç içi veya dışı trafik kazaları olarak saptanmıştır.³⁴ Travmatik periferik sinir yaralanmalarına yaklaşım, ilişkili anatomi, altta yatan patoloji ve patofizyoloji, tanı ve cerrahi tedavi yöntemlerinin tamamına hâkim olmayı gerektirmektedir.

Periferik sinir anatomik olarak temelde üç adet kılıf içermektedir. Bunlar içten dışa doğru endonöryum, perinöryum ve epinöryum olarak adlandırılmaktadır. Endonöryum miyelinli veya miyelinsiz aksonları saran kılıftır. Aksonlar bir araya gelerek fasikülleri oluşturmaktadır. Perinöryum ise bu fasikülleri bir arada tutan kılıftır. Epinöryum ise hem fasiküllerin arasında epifasiküler olarak, hem de sinir gövdesinin tamamını saran dış epinöral tabaka olarak ikiye ayrılmaktadır.³⁴ Endonöryum longitudinal yerleşimli iken, perinöryum ve epinöryum bulunduğu yapının çevresini sarmaktadır.³⁵ Arteryal pleksuslar longitudinal bir şekilde epinöryumda ilerleyerek perinöryuma transvers dallar göndererek endonöryuma kadar uzanan vasküler bir ağ oluşturmaktadır. Sinir travmaya maruz kaldığında epinöral vasküler ağ ilk olarak etkilenmekte, devam eden basınç, kompresyon gibi etkenler endonöral beslenmeyi de bozarak intrafasiküler ödem ve sekonder sinir hasarına sebep olmaktadır.³⁶

Sinir hasarlanmasıyla aksoplazmik boşalma ve membran geçirgenliğinde artış olmaktadır. İnterlökin, TGF- β gibi sitokinlerin salınımı sonucu lökosit migrasyonu gerçekleşmektedir. Travma sonrası oksijenizasyon ve arteryal beslenme bozulduğundan schwann hücrelerinin içine kalsiyum akışı başlar. Kalsiyum erken dönemde schwann hücre proliferasyonunu artırır.³⁷

Distalde wallerian dejenerasyon meydana gelmektedir. Akson dejenere olmakta ve fragmanlara ayrılmaktadır. Miyelin tabakası ise yağ artıklarına dönüşmektedir. Bu hasarlanmış yapılar ve artıklar “digestion chambers” olarak adlandırılan oval şekilli bir forma geçerek aşamalı olarak fagosite edilirler.³⁸ Proksimalde aksonal büyüme faktörlerinin etkisi ile birlikte rejenerasyon süreci başlar. Anterograd aksonal transport nedeniyle hücre organellerinde şişme meydana gelir. Bununla birlikte kalsiyum deşarjına bağlı salınan vazoaktif aminler, mast hücrelerinin salgıları ve anjiogenez sinir ucunda hiperemiye neden olur. Meydana gelen aksonal dejenerasyon lokal olarak artan kalsiyum seviyesinin tetiklediği fosfolipaz ve kalpain gibi kalsiyum bağımlı proteolitik enzimlerin aktivitesine bağlıdır. Bu aktiviteye bağlı olarak hücre iskeleti ortadan kalkmaktadır.³⁹ Distal uçta akson ortadan kalkmasına karşın bağ dokusu bazal tabakası intakt kalarak endonöral tüpleri oluşturmaya başlar. Bu tüpleri Schwann hücreleri oluşturur ve Büngner bantları olarak isimlendirilir. Bu tüpler aksonal rejenerasyon için yol gösterici özellik taşımaktadır. Schwann hücrelerinin oluşturduğu bu yapılar kalıcı olmayıp eğer aksonal rejenerasyon süreci başlamazsa involüsyone uğrayıp ortadan kalkmaktadır.⁴⁰ Ana sinir gövdesinin de hasarlandığı yaralanmalarda rejenerasyon daha sınırlı olmaktadır. Sinir fonksiyonlarında geri dönüş ağrı, hafif dokunma ve sıcaklık sırasıyla olmaktadır.

Periferik sinir yaralanması için kullanılan iki tip sınıflandırma bulunmaktadır. Bunlar Seddon ve Sunderland sınıflandırmalarıdır. (Tablo 1) Günümüzde Sunderland sınıflaması daha kompleks ve kullanışlı olması sebebiyle daha fazla kabul görmektedir. Ancak her iki sınıflamada cerrahi literatürde kullanıldığından her ikisini de bilmek önem arz etmektedir. Seddon sınıflamasını üçe ayırmaktadır.¹⁹ Bunlar nörapaksi, aksonotmezis ve nörotmezistir. İlk aşama olan nörapakside, sinir sağlam olmakla birlikte impuls iletimi olmamaktadır. Aksonotmezis aşamasında akson hasarlanması veya yapının tamamen ortadan kalkması ile birlikte çevre dokular sağlamlığını korumaktadır. Nörotmeziste ise sinir gövdesi tamamen parçalanmış ve anatomik bütünlük ortadan kalkmıştır.

Seddon sınıflamasında tanımlanan nörapakside segmental demiyelinizasyon bulunmaktadır ve Sunderland sınıflamasında 1.derece yaralanmaya karşılık gelmektedir.²⁰ En hafif düzeyde olan bu hasarlanma içerisinde aksonlar intakt olmakla birlikte fonksiyon gösterememektedirler. Motor kayıp, duyu kaybına oranla daha fazladır. Bu aşamada çoğunlukla klinik olarak kas atrofi gözlenmez.

Elektrofizyolojik değerlendirmelerde distale sinir iletimi olağan saptanırken, lezyon geçişinde azalmış aktivite bulguları demiyelinizasyondan ileri gelmektedir. Yaklaşık üç ay içerisinde remiyelinizasyonu takiben fonksiyon kaybı olmadan iyileşme beklenir.⁴¹

Aksonotmezis aşamasında akson bütünlüğü bozulur ve Wallerian dejenerasyon gözlenir. Akson hasarlanması çoğunlukla ezilme ve çekilme yaralanmalarında oluşur. Reinnervasyon hasar miktarına ve yaralanmanın kasa olan uzaklığına bağlı olarak değişir. Nörotmeziste ise nöron spontan olarak rejenere olamayacak kadar hasarlanmış ve bütünlüğü bozulmuştur. Keskin bir cisimle yaralanma, masif travma veya sinir rüptürüne sebep olan traksiyon yaralanmalarında gözlenir ki bu durum Sunderland sınıflandırmasına göre üçüncü dereceden sonraya karşılık gelmektedir, cerrahi girişim olmadan iyileşme olmaz.³³

6.1. SİNİR REJENERASYONU

Sinir rejenerasyonu ve iyileşmesi yaralanma sonrasında sinir hücresinin gövdesinde, nöron ile yaralanma alanı arasındaki segmentte, yaralanma alanında, yaralanma alanı ile distalde motor son plak arasındaki segment ve son olarak motor son plakta çoklu seviyelerde başlamaktadır.⁴²

Sinir iyileşmesi santral sinir sisteminde (SSS) plastisite, yani sağlam alanların hasarlı alanları doldurması ile gerçekleşmektedir. SSS kendi kendini iyileştirme kapasitesine sahip değildir. Periferik sinir sistemi (PSS) ile karşılaştırıldığında temel fark, periferik sinirlerin iyileşme özelliğinin bulunmasıdır.⁴² İyileşme üç mekanizma ile meydana gelmektedir. Bunlar; remiyelinizasyon, hasarlanmayan aksonlardan distale doğru kollateral dallanma ve travma alanından direk rejenerasyondur.⁴² Tüm aksonların %20-30'unu oluşturan yaralanmalarda iyileşme temel olarak kollateral dallanma ile olur. Bu süreç çoğunlukla 2-6 ay kadar sürmektedir.

Aksonların %90'ından fazlası hasarlandığında bu sefer iyileşme rejenerasyon üzerinden yürümektedir. Rejenerasyonun başarısı yaralanma şekli ve proksimal ve distal arasındaki mesafe ile ilişkilidir.

Travma sonrasında yaralanma sahasında kaskad şeklinde hücre sinyal molekülleri ve nörotrofik faktörler ortaya çıkar.⁴³

Schwann hücreleri rejenerasyonda hücre yüzey moleküllerini, laminin ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezini arttırarak çok önemli rol oynar.⁴⁴ İyileşme süreci yaralanmadan sonra yarım saat içerisinde intrasellüler olarak başlamaktadır.⁴⁵

Schwann hücrelerinin artan aktivitesi, PMP22, P₀, connexin-32 gibi artan proteinleri ve sinir büyüme faktörleri aksonal temas sağlamazsa giderek azalmaktadır.

Artan sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri ile birlikte bunların bağlanacağı reseptörlerin de sayılarında artış olmaktadır. Makrofajlar IL-1, IL-6 sentezini arttırarak, Schwann hücrelerinin sayılarını arttırmasının yanında, NGF'nin transkripsiyonunu ve reseptör yoğunluğunu arttırmaktadır.⁴⁶ Ayrıca aksonal iyileşme aşamasında bulunan nöronlar iletim yerine iyileşme moduna geçerek büyüme ile ilişkili GAP-43 gibi proteinler, tübülün ve aktin gibi nöropeptit ve sitokinler sentezlerler. Bununla birlikte, sinir koruyucu özelliği olan ısı-şok proteini 27 (HSP 27) sentezi artarak hasarlanmış nöronların hayatta kalmasını kolaylaştırmakta ve aksonal iyileşme için gerekli hücre iskeleti değişikliklerine öncülük etmektedir.⁴⁷

Rejenerasyon aşamasında iyileşmeyi etkileyen en önemli faktörlerden biri, proksimal ve distal yaralanma alanı arasında bulunan mesafedir. Aksonlar distale ulaşamadıklarında parçalanmakta veya çevre dokuya doğru büyüme göstererek işlevini yitirmektedir. Oluşan skar dokusu da akson ilerleyişini sekteye uğratmasının yanında iyileşme rotasını bozarak aksonların fonksiyonel olarak alakasız endonöral tüplere doğru büyümesine sebep olmaktadır. Büyüme konilerinde aksonların yönlenmesini sağlayan ana yol gösterici molekül aktindir.

İntrasellüler iyileşme yanında elektrik stimülasyon tedavisi gibi dışarıdan yapılan tedavilerinde rejenerasyon ilişkili genlerin sentezini ve etkilerini arttırdığı ortaya çıkmıştır.⁴⁸ Bunun dışında farklı tedavi yöntemleri olarak ilaçlar, hiperbarik oksijen, çeşitli hormonlar, egzersiz, ultrason ve düşük düzeyde laser tedavisi araştırılmıştır.

Rejenerasyon özellikle proksimal yerleşimli yaralanmalar ve gençlerde daha iyi olmaktadır. Ancak; akson doğru endonöral tüpe girerek iyileşmeye devam etse bile, fonksiyonel iyileşme matürasyon ve yeniden şekillenme aşamalarına, remiyelinizasyon ve motor son plağın durumuna göre değişmektedir.

7. PERİFERİK SİNİR ONARIMLARI

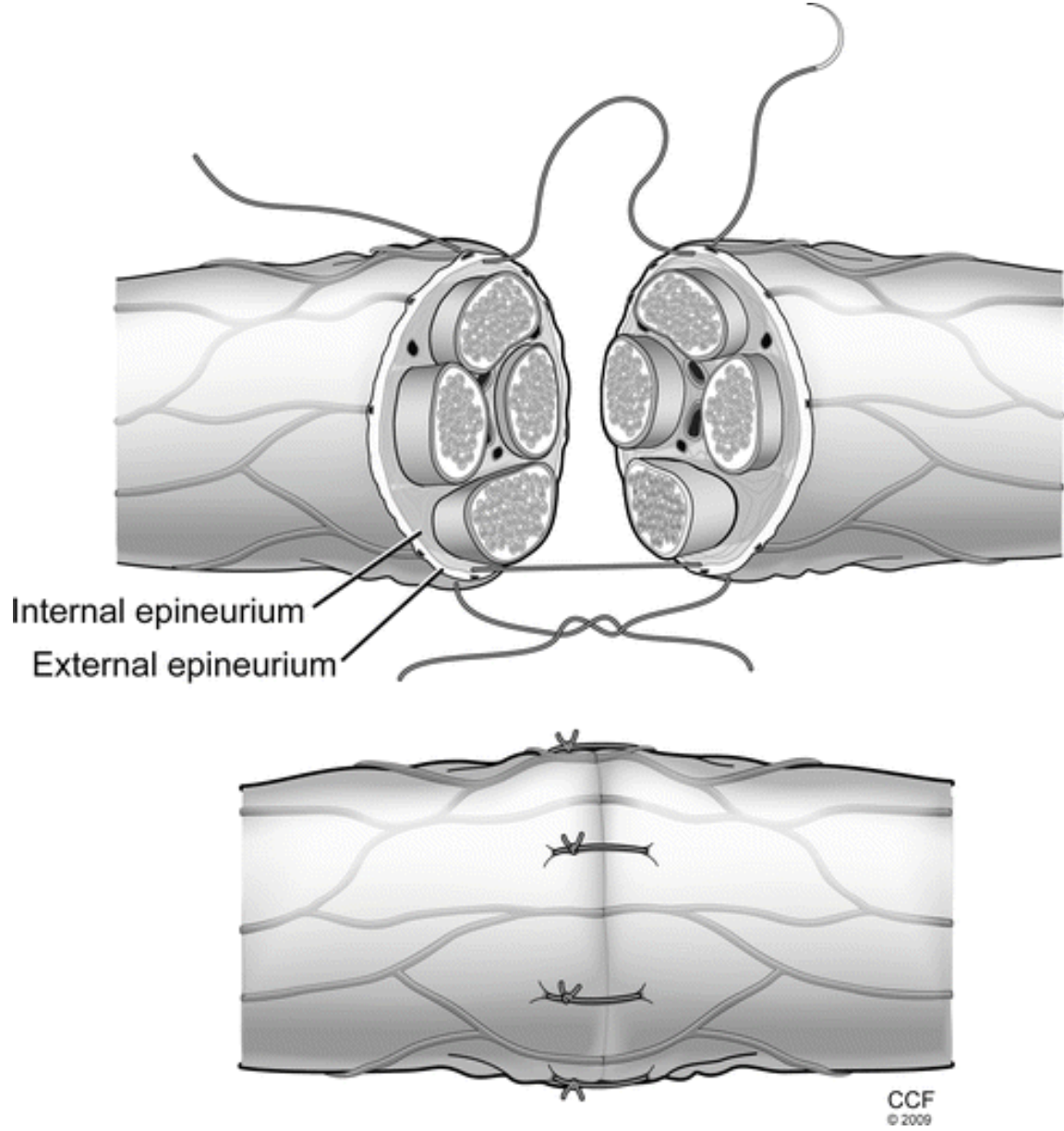
Sinir yaralanmaları künt bir şekilde veya keskin bir cisimle laserasyona bağlı oluşabilir. İlk 72 saat içerisinde hemen onarılan laserasyona bağlı oluşan travmalarda en iyi yöntem uç uca nörorafidir. Sinir onarımı geciktikçe proksimal ve distal uçlar arasındaki mesafe artmakta ve aradaki defekti kapatmak için sinir greftine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum cerrahi başarı şansını düşürmektedir. Uygun şartlar altında proksimalden aksonal büyüme 1 mm/gün şeklindedir. Geri dönüşümsüz kas atrofisi ile operasyona rağmen kalıcı fonksiyonel kayıp için süre 12-18 aydır.

Cerrahi onarım teknikleri nöroliz, uç uca onarım, sinir grefti ve sinir transferidir.⁴¹ Kompresyona bağlı parsiyel yaralanmalarda kullanılan temel teknik nörolizdir. Komplet yaralanmalarda tercih edilen ve en iyi prognoza sahip yöntem uç uca onarımdır.⁴⁹ Cerrahinin temel amacı sağlıklı sinir fasiküllerini bir araya getirmektir. Gerilim olmadan sinir fasikülleri bir araya getirilemiyorsa sinir grefti veya sinir transferi kullanılır. Onarım hattındaki gerilim iyileşme sırasında skar dokusunun oluşmasına ve rejenere olan sinir liflerinde blokaja neden olmaktadır. Sinir grefti olarak sentetik conduitler veya non-nöral dokularda kullanılabilir.

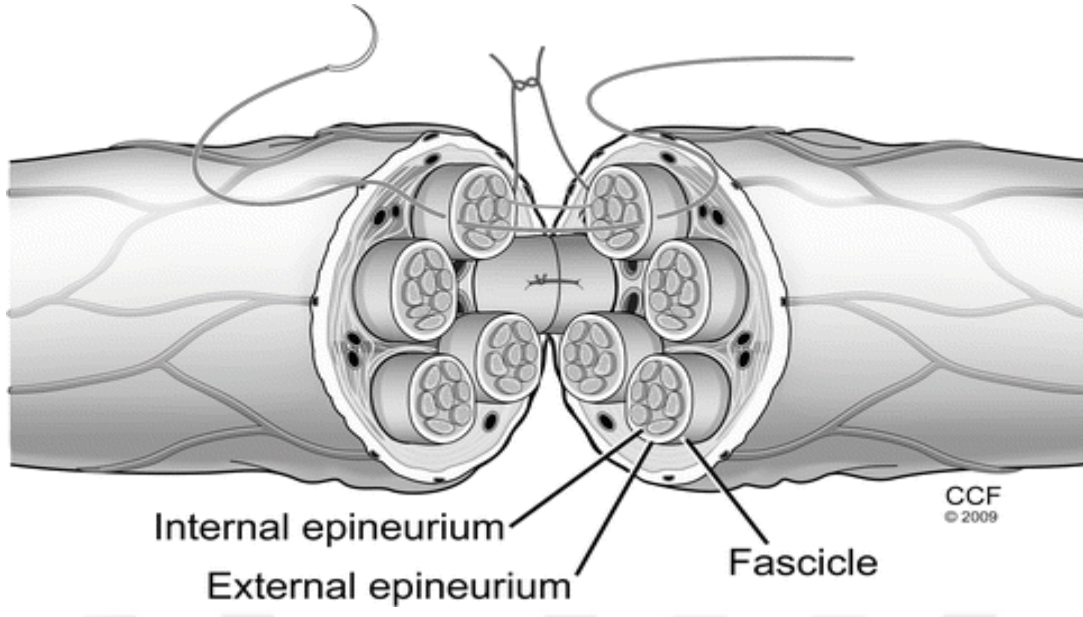
Günümüzde sinir grefti olarak kullanılan yapı sural sinirdir. Bunun yanında vaskülarize sinir grefti, ven grefti de kullanılabilir. Sinir transferi ise minör fonksiyona sahip intakt motor sinirlerin alınarak diğer kasların reinnervasyonunda kullanılmasına olanak veren bir yöntemdir. Uç yan onarım ise nispeten daha yeni bir teknik olup yaralanma distalinde bulunan alanda, distal güdüğün sağlıklı sinir dokusuna suture edilerek onarılmasına verilen isimdir.⁵⁰

Sinirlerin primer onarımı, epinöral veya fasiküler (tek ya da grup) olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Epinöral onarım uygun fasiküller karşılıklı getirildikten sonra 180 derece süturlar yerleştirilip torsiyon engellendikten sonra mikro süturlar kullanılarak uygulanan uç-uca onarım tekniğidir. (Şekil 10) Fasiküler onarım tekniğinde ise, fasiküler yapılan disseksiyon ortaya konarak epinöryum kendi üzerine katlanır. Karşılıklı süturlar yerleştirilmesi yeterlidir. (Şekil 11) Grup fasiküler yöntemde ise aynı grup duyu ve motor fasikül grupları belirlenerek eşleştirilerek suture edilir. Bu onarım tekniği çoğunlukla el bileği seviyesinin proksimalinde kullanılmaktadır. (Şekil 12)

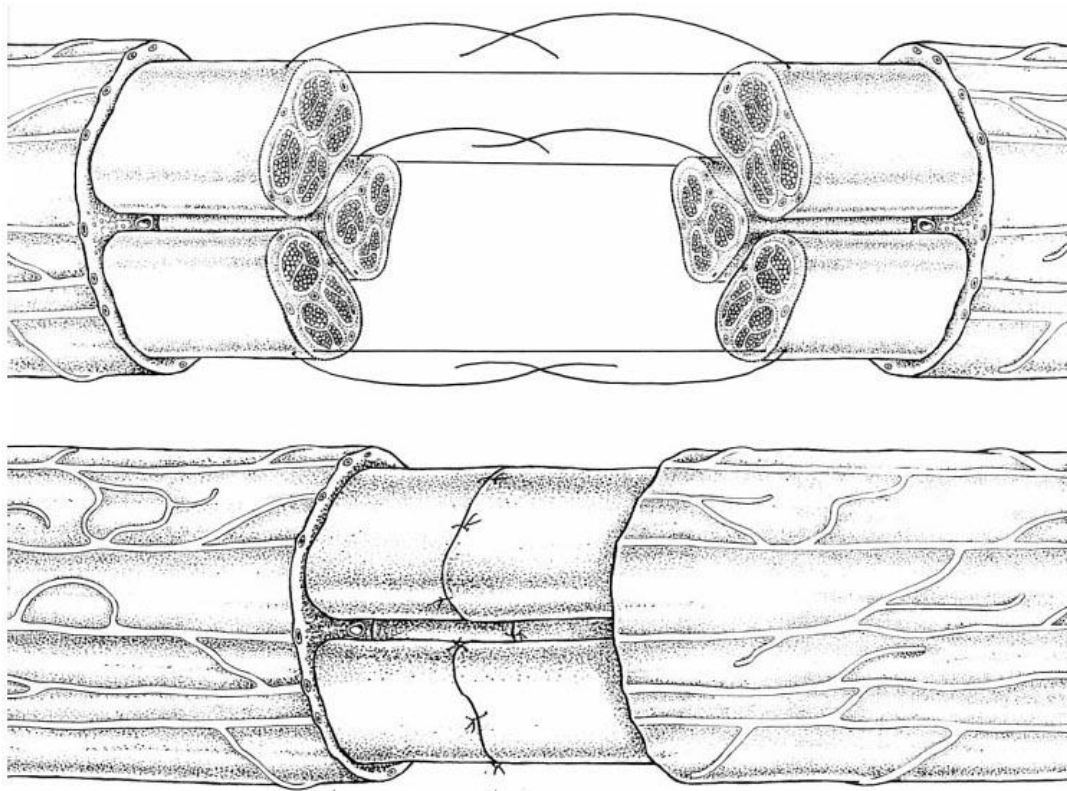
Fasiküler onarım yapılırken duysal ve motor demetlerin uygun adaptasyonu önemlidir. Bunun için histokimyasal yöntemler ve yapılan sinir uyarı çalışmaları ile duyu veya motor fasikül ayrımı yapılabilir. Örneğin; asetilkolinesteraz miyelinli motor liflerde bulunurken, karbonik anhidraz enzimi miyelinli duysal liflerde gözlenmektedir.⁵¹



Şekil 10. Epinöral onarım



Şekil 11. Fasiküler onarım



Şekil 12. Grup fasiküler onarım

8. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızın Etik Kurulu onayı Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı. Çalışmamızın; cerrahi bölümü, sıçanların barındırılması ve kurbanıye edilmesi işlemi Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nın belirli olan usül ve işleyiş esasları doğrultusunda Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, EMG kayıtlarının alınması Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Elektrofizyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmamızın histomorfolojik değeriendirilmesi, örneklerin ışık mikroskopları altında incelenmesi ve uygun histolojik yöntemlerle immunohistokimyasal incelemesi Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Proliferasyon safhası içerisinde yer alan fibrozis oluşumu insan yara iyileşmesinde, inflamasyon sonrasında 4-5. günlerde başlayarak 21. güne kadar devam etmektedir. Ratlarda ise bu süre daha kısa olup 7-10 gündür. Çalışmanın süresi fibrozisin maksimuma ulaştığı 1 haftalık periyodu da içine alacak şekilde 4 hafta olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarından sağlanacak olan 24 adet 4,5-5 aylık, 400-450 gr ağırlığında, erkek Sprague-Dawley rat kullanıldı. Deney hayvanları internasyonel hayvan deney bakım ve deney klavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık $23\pm2^{\circ}\text{C}$, nem %45-65, 12 saat gündüz/gece siklusu) açık kafeslere (Resim 1) alındı. Deney Hayvanları, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarı'nda standart koşullarda beslenerek takip edildi. Çalışmamızda dört grup ve her bir grupta altı hayvan olacak şekilde hayvan modeli oluşturuldu. Deney hayvanlarının arka bacaklarının her ikisinin de fonksiyon kaybına uğraması hayvanların hareketlerini kısıtlayacağından ve depresyona sokabileceğinden her grupta yalnızca sol siyatik siniri kullanıldı. Herhangi bir işlem yapılmayan sağ taraftan ise işlem yapılan taraf ile karşılaştırma ve histolojik değeriendirme için sakrifikasyon sonrası örnek alındı.

Birinci grup sham grubu (cilt ve kas insizyonları sonrasında siyatik sinir disseke edilip intakt bırakılan grup) olarak belirlendi. İkinci gruba sinir laserasyonu sonrasında Pbs uygulandı. Üçüncü gruba epinöral onarım sonrasında bolus olarak 0,1 ml 25 µg dekorin protein uygulandı.

Dördüncü gruba ise laserasyon sonrasında onarım ardından osmotik pompa yerleştirilerek bir hafta süre zarfında toplamda 25 µg dekorin protein yavaş salımlı olarak uygulandı.

Sinirde, uygun şekilde EMG yapılabilmesi adına dallanma noktasına ve lumbosakral pleksustan çıktığı alan ve distalde kaslara dal verdiği alandan sırasıyla 1,5 cm proksimalde ve distalde olacak şekilde mikromakas ile total lasere edildi. Uygun naylon süturlarla mikrocerrahi olarak suture edilmesi ardından suture hattına ilaçlar 0,3mm x 13 mm'lik sarı iğne uçlu ppd enjektörü aracılığıyla verildi. Uygulama suture hattı üzerine yapıldı. İkinci grupta laserasyon sonrası onarımın ardından 0,1 ml Pbs uygulandı. Üçüncü gruba bolus olarak önceki grup ile aynı olacak şekilde 0,1 ml 25 µg dekorin protein uygulaması yapıldı. Dördüncü grupta fibrozisin en yoğun olduğu birinci haftaya dek toplamda 25 µg dekorin protein uygulaması cilt altına yerleştirilen osmotik pompa (ALZET 1004) aracılığıyla kontrollü salınım şeklinde yapıldı. Kas altına ve sinir üzerine yerleştirilen osmotik pomda 1,5 cm uzunluğunda ve 0,6 cm genişliğinde idi.



Resim 1. Sıçanların barınma kafesi

8.1. CERRAHİ HAZIRLIK

Uygun cerrahi aletler hazırlandı. Cerrahi alet olarak hidrojen peroksit ile steril edilmiş portegü, penset, Mayo makası, klemp kullanıldı. Mikrocerrahi işlemler için mikropenset, mikroportegü ve mikromakas kullanıldı. (Resim 2)



Resim 2. Cerrahi Set

8.1.1. ANESTEZİ

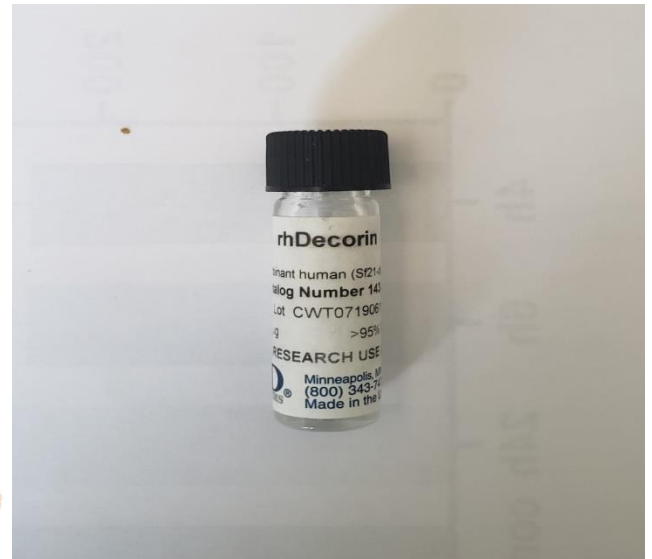
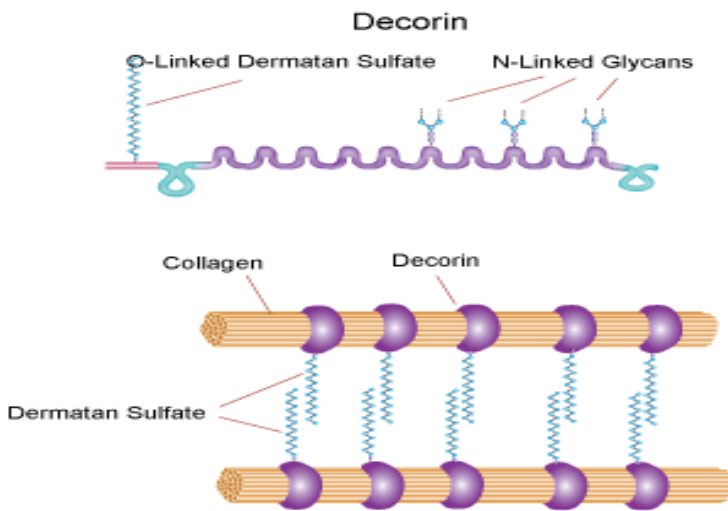
Bu çalışmada kullanılacak olan deneklerin anestezisi, 60 mg/kg ketamin (KETALAR®, PFIZER) ve 6 mg/kg ksilazin klorür (BASİLAZİN %2, baVET) intraperitoneal olarak uygulandı. Intramuskuler yol siyatik sinire veya çevresine ek travma yaratabileceğinden tercih edilmedi. Anestezi sonrasında denekler spontan solunuma bırakıldı. Denekler prone pozisyonunda tespit edildi. Sağ gluteal ve femoral bölgeler traş edildi. (Resim 3) Cerrahi saha lokal antiseptik ile yıkanması ardından steril örtüler örtüldü. Cerrahide mikrocerrahi için loupe, uygun set ve süturlar kullanıldı.



Resim 3. Kullanılan suture materyalleri ve rat prone pozisyonda, traş sonrasında steril örtüler örtülmeden önceki hali

8.1.2. DEKORİN PROTEİN

Dekörin küçük löşinden zengin proteoglikan (SLRP) ailesinden bir ekstrasellüler matriks proteinidir. SLRP nin 17 üyesi bulunmaktadır. (Tablo 2) Bu beş farklı grup, korudukları protein yapıları, zengin löşin tekrarları, sisteinden zengin N-terminal kısımları ve kromozomal organizasyon baz alınarak oluşturulmuştur.^{52,53} Dekörin proteini, bağ dokusunun tamamında bulunan kollajen lifleri ile ilişkilidir. Bir adet kondroitin/dermatan sülfat içeren glikozaminoglikan zinciri ve 40 kDa büyüklüğünde kor proteini içeren ve ağırlığı yaklaşık olarak 100 kDa olan bir moleküldür.



Şekil 13. Dekörin-Kollajen ilişkisi ve rhDekörin

Biglikan ve fibromodülin gibi diğer proteoglikanlar gibi lösinden zengin tekrarlar içerir. Yay şeklinde olan esas protein yapısı ki dekoron olarak adlandırılır, ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri, büyüme faktörleri ve onların reseptörleri ile etkileşebilir. Fibroblast, kondrosit, düz kas hücreleri, endotel hücrelerinde üretilir.

Tablo 2. Küçük Lösinden Zengin Proteoglikanlar

Küçük Lösinden Zengin Proteoglikanlar	
I.Grup	Dekörin Biglikan Asporin Ekstrasellüler matriks protein 2
II.Grup	Fibromodülin Lumikan Prolin ve arjininden zengin sonlu lösün tekrarları içeren protein Keratokan Osteomodülin
III.Grup	Epifikan Optisin Osteoglisin
IV.Grup	Kondroadherin Niktalopin Tsukushi
V.Grup	Podokan Podokan benzeri protein

ECM yapısal komponenti olması dışında proliferasyon, migrasyon, differansiyasyon ve inflamatuvar sürecin regülasyonunda rol almaktadır.^{54,55} Bunun yanında myogenez⁵⁶, fetal membranların oluşumu⁵⁶ ve yara iyileşmesinde⁵⁷ de etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

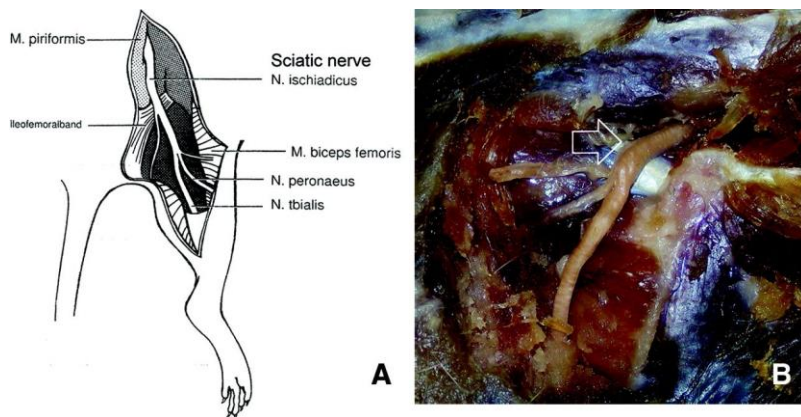
Dekörin antifibrotik etkisini TGF- β inaktivasyonu yaparak gösterir. Kollajen yapısını kompakt hale getirerek yapısını korur (Şekil 13). Daha önceki çalışmalarda glomeruloskleroz⁵⁹, kemoterapötik ajan olan bleomisine sekonder gelişen akciğer fibrozisi⁶⁰, santral sinir sisteminde meydana gelen fibrozis⁶¹ ve kas yaralanmasına sekonder gelişen fibrozise⁶² karşı etkin olduğu gösterilen dekörin molekülünün periferik sinir üzerine etkisi araştırıldı. Mikrocerrahi yöntemle epinöral olarak onarılan sıçan siyatik sinirine bolus şeklinde ve osmotik pompa aracılığıyla düzenli salınım sağlanarak süregelen uygulama yapıldı.

8.1.3. SIÇAN SİYATİK SİNİR ANATOMİSİ

Lumbosakral trunkustan çıkan ve periferik sinirlerin en kalını siyatik sinirdir; ayağın tümü ile bacak derisinin büyük kısmına sensitif dallar, uyluğun arka tarafındaki kaslar ile bacak ve ayağın tüm kaslarına somatomotor lifler gönderir.⁶³ Siyatik sinir pelvisde L1-L4 ve S1-S3 spinal sinir köklerinin ventral dallarından şekillenir ve m. piriformis'in altından foramen ischiadicum majustan geçerek; alt ekstremiteye geçer. Siyatik sinir trochanter major ve tuber ischiadicumun arasından fossa popliteaya doğru ilerler.⁶⁴

Siyatik sinirin n. tibialis ve n. fibularis communis dalları tek bir epinöral kılıf ile çevrilmiştir ve siyatik sinirin bu terminal dallarına ayrılması fossa poplitea üzerinde veya fossa poplitea içinde farklı seviyelerde gerçekleşebilir.⁶⁵ Fossa poplitea; yukarı iç tarafta m. semimembranosus ve semitendinosus; yukarı dış tarafta m. biceps femoris; aşağı iç tarafta m. gastrocnemiusun caput medialesi ve aşağı dış tarafta m. gastrocnemiusun caput lateralesi ve m. plantaris tarafından sınırlandırılan alandır. İçinden; a.v. poplitea, n. tibialis, n. fibularis communis, n. suralisı oluşturan n. cutaneus surae medialis ve lateralis, v. saphena parva, popliteal lenf düğümleri ve n. cutaneus femoris posterior geçer.⁶⁶ (Şekil 14) Siyatik sinirin n. tibialis dalı n. fibularis communise göre daha kalındır ve orta hatta paralel ve az oranda lateralde olarak ilerler.

Aşağıda m. gastrocnemiusun başları arasından geçer. N. fibularis communis m. biceps femorisin medial kenarını takip eder ve laterale doğru fibula başına gelir. Fibula boynunu dolanarak bacağın ön dış kısmında m. peroneus longusa girerek burada n. fibularis superficialis ve n. fibularis profundus dallarına ayrılır. N. tibialis ve n. fibularis communis; n. saphenus tarafından innerve edilen bacak ve ayağın anteromedialı hariç dizin aşağısındaki tüm bacak ve ayağın innervasyonu sağlanır.⁶⁷



Şekil 14. Siyatik sinir seyri ve dallanma noktaları

8.2. CERRAHİ ÖNCESİ MOTOR VE DUYU FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bütün denek gruplarına operasyon öncesinde tartıldıktan sonra total lokomotor fonksiyonlarının değerlendirilmesinde ve ansiyete ilişkili duygu durum değerlendirilmesinde kullanılan open field maze (OFM) testi yapıldı.^{68,69}

Literatürde tanımlanan protokole benzer şekilde test, tek platformdan oluşan 85x85x40 cm büyüklüğünde suntadan oluşturulmuş alan içerisinde (Resim 4) gerçekleştirildi. Platform yüzeyi pürüzsüz ve içerisi tamamiyle boş idi.



Resim 4. Open field testinin yapıldığı platform

Her değerlendirme sonrasında, önceki deneğin kokusu kalmaması için yüzeyler %70 etil alkol içeren dezenfektan ile silindi. Oda içerisine yerleştirilen deneğin hareketleri platform üzerinde tavanda asılı şekilde bulunan kamera tarafından kaydedilerek, bilgisayara aktarıldı. Her hayvan bulunduğu kafesten alınarak platformun ortasına yerleştirildi. Toplam alınan mesafe, ortalama hız, dış ve iç kısımda geçirilen süre, tigmotaksis (duvarlara yakın durma) gibi parametreler sayısal veri şeklinde değerlendirmeye alındı. Open field testi sonrasında her bir denek grubuna rotarod testi⁷⁰ uygulandı. Denekler rotarod aparatına (Resim 5) alıştırdıktan sonra 4 rpm hız ile başlanarak 40 rpm'e kadar arttırıldı. Deneğin 10 sn ve üzerinde durması ardından manuel olarak platform hızlandırıldı. Operasyon öncesi ve sonrasında işlem tekrarlandı. (Resim 6)

Deneklerin 5 sn içerisinde düşmesi yerleştirme yetersizliği olarak değerlendirildi. 5-10 sn arasında sabit süratte üç defa düşmesi o denek için maksimum hız olarak kaydedildi.



Resim 5. Rotarod aparatı ve deneklerin alıştırılma aşaması



Resim 6. Operasyon sonrası yapılan rotarod testi görüntüsü

Duyu aktivitesinin değerlendirilmesi için nosiseptif duyunun değerlendirilmesinde kullanılan hot plate testi uygulandı.⁷¹ Cerrahi öncesi ve sonrasında 52.5°C de ağrı duyusu değerlendirilmesi yapıldı.



Resim 7. Hot plate testi için kullanılan alet

Denekler hot plate üzerine yerleştirildikten sonra arka ayaklarını yalama ve yüzey kadrantları üzerinde dans etme hareketi yapana kadar kronometre ile zaman tutuldu ve kayıt altına alındı. (Resim 7)

8.3. CERRAHİ TEKNİK VE DENEY GRUPLARI

Cerrahi işlemlerin tamamı aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi. Tüm sıçanların sol siyatik siniri deney için kullanılırken, sağ siyatik siniri hareketin kolaylaşması açısından sağlam bırakıldı. Cerrahi öncesinde bütün denekler tartıldı. Sol gluteal tıraşlanıp prone pozisyonunda ayaklar tespit edildi. Povidon iodinle cerrahi alan temizliği yapıldı. Sol kalça eklemi katlantısından oblik gluteal insizyon yapıldı. Biseps femoris kası disseke edilerek siyatik sinire ulaşıldı. Sinir koaptasyonları steril ortamda cerrahi loupe altında 9/0 poliamid suture ile yapıldı. Her bir sinire altı suture atıldı. Kas 4.0 yuvarlak poliglaktin 910 ile ve cilt insizyonları 3.0 naylon ile primer suture edildi. Çalışmanın birinci haftasında SFI (siyatik fonksiyonel indeksi) yapıldı. Böylece her bir grup arasında iyileşme açısından farklar ortaya kondu. EMG ve sinir iletim çalışması yapılarak, histomorfolojik örnekler alındı. Sonrasında sıçanlar CO₂ kabineye yerleştirilerek sakrifiye edildi.

Sonuç olarak çalışmada fonksiyonel değerlendirme open field test, rotarod aparat, hot plate test ve SFI ile, elektrofizyolojik değerlendirme EMG ve sinir iletim çalışması ile, histomorfolojik değerlendirme de ışık mikroskobu ile yapıldı.

Siyatik sinir disseke edilip ortaya konduktan sonra, dallanma noktasının 1-1,5 cm proksimalinde ve lumbosakral pleksustan çıktığı yerin 1-1,5 cm distalinde olacak şekilde tam kat laserasyon oluşturuldu. Böylece EMG ölçümünde elektrotların yerleştirilmesi kolaylaştırıldı ve hem yaralanma distalinden hem de proksimalinden okuma alındı. Oluşturulan laserasyon naylon iğne ile iğnelendi. Birinci gruba disseksiyon sonrası herhangi bir uygulama yapılmadı. İkinci gruba onarım sonrası 0,1 ml Pbs bolus uygulandı. Diğer gruplar için kullanılmak üzere içerisinde 100 µg dekorin protein bulunan tüpler alındı ve 0,4 ml Pbs ile sulandırıldı. Solüsyon içerisinde eşit çözünmeyi sağlamak için her tüp üç saniye süre ile vortekse tutuldu. Sonrasında üçüncü gruba iğne hattı üzerine bolus olarak 0,4 ml Pbs ile sulandırılan karışımdan 0,1 ml olacak şekilde 25 µg dekorin proteini enjekte edildi. Tam olarak iğne hattı üzerine uygulama için mikroiğne uzun bırakıldı, kas üzeri örtüldükten sonra mesafe branül ile ölçüldü. Böylece uygulama işaretli alan ve uygun mesafe ölçümü ile iğne hattı üzerine yapıldı.

Dördüncü gruba 100 µl (0,1 ml) hacme sahip ALZET® Model 1004 (Durect Corporation, Cupertino, CA) osmotik pompa içerisine yerleştirilmiş 0,1 ml ile sulandırılmış toplamda 25 µg dekorin proteini bir hafta boyunca düzenli salınım olacak şekilde uygulandı.

Bolus uygulamalar sırasında kas üzeri örtüldükten sonra poş içerisine ilaç uygulandı, eşit doz için dışarı taşırılmamaya azami dikkat gösterildi. Literatürde siyatik sinir üzerine yapılan çalışmalarda rutin antibiyoterapi protokolü olmaması nedeni, yalnızca ağrı kesici olması açısından 10 mg/kg/gün subkutan uygulama dozundan, operasyon sonrasında 72 saat süresince dekstketoprofen uygulandı.

8.4. SİNİR İYİLEŞMESİ TAKİBİ VE DEĞERLENDİRME

8.4.1. FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME

8.4.1.1. SİYATİK FONKSİYONEL İNDEKS (SFI)

DEĞERLENDİRME

Siyatik fonksiyonel indeks, çalışmanın birinci haftasında fonksiyonel değerlendirme için kullanıldı. 100 cm uzunluğunda ve 10 cm genişliğinde (Resim 8) oluşturulan koridorda beyaz kağıt üzerine mürekkeple boyanmış ayaklarının bırakacakları izin takibi için yürümleri sağlandı.⁷² Denekler, arka ayakları mürekkebe bulanmış stampaya batırıldıktan sonra koridorda yürütüldü. Mürekkebin dağılması, deneklerin yürüme sırasındaki ürünasyonu sonucu izlerin ıslanması veya deneğin kuyruk hareketiyle izlerin dağılması durumunda, düzgün ayak izi alınana kadar yürütme işlemi tekrarlandı. Ölçümler için düzgün, net olan ayak izleri seçildi. 1989 yılında Bain ve ark. tarafından ortaya konulan formül ile SFI hesaplandı.⁷³

Bu formüle göre;

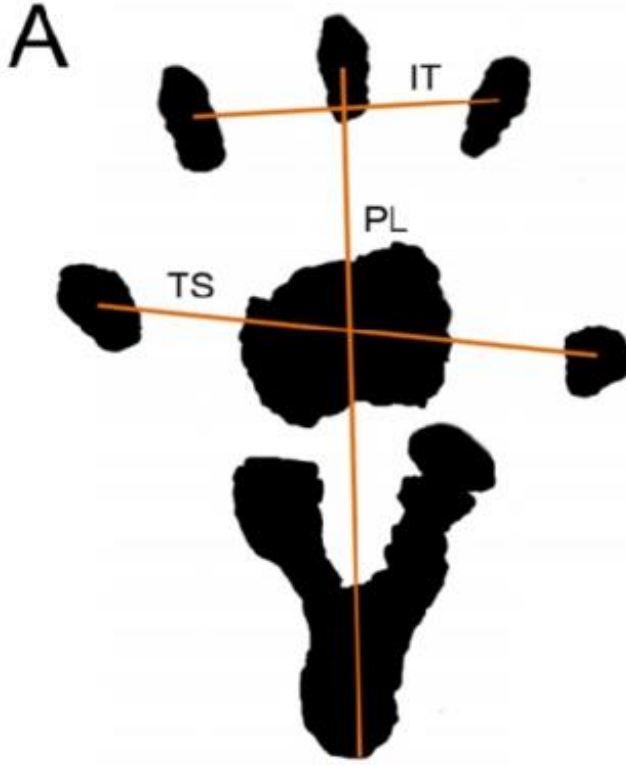
$$SFI = -38,3 \times PLF + 109,5 \times TSF + 13,3 \times ITF - 8,8 \text{ (Şekil 15)}$$

$$PLF \text{ (print lenght factor)} = \frac{\text{Deneysel PL} - \text{Normal PL}}{\text{Normal PL}}$$

$$TSF \text{ (toe spread factor)} = \frac{\text{Deneysel TS} - \text{Normal TS}}{\text{Normal TS}}$$

$$ITF \text{ (intermediary toe spread factor)} = \frac{\text{Deneysel IT} - \text{Normal IT}}{\text{Normal IT}}$$

- PL; (Print length, topuktan parmak ucuna kadar olan mesafe)
- TS; (Toe spread, 1. ve 5. parmaklar arasındaki mesafe)
- IT ; (Intermediary toe spread, 2. ve 4. parmaklar arasındaki mesafe)

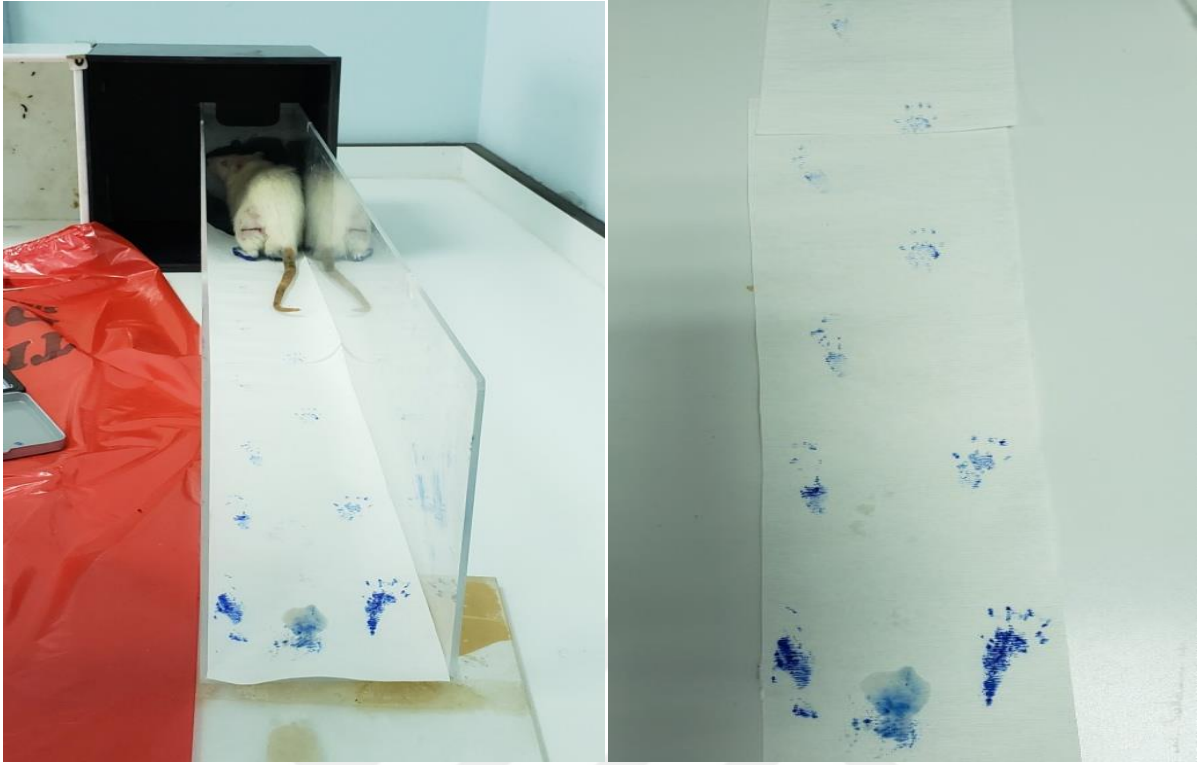


Şekil 15. SFI için kullanılan değerlerin ölçümü

Ölçümler hem normal, hem de deneysel taraf için yapıldı. Her iki yöntemle elde edilen veriler Bain ve ark.'nın modifiye ettiği formüle yerleştirildi.⁷³ Literatürde SFI için oluşturulan skorlama sistemi⁷⁴ ile sonuçlar değerlendirilerek gruplar analiz edildi.

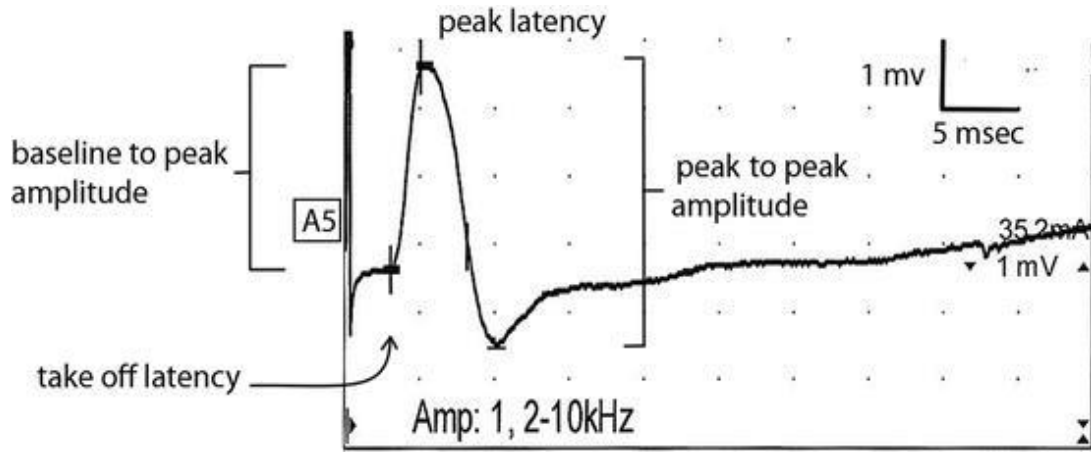
Tablo 3. SFI skor değerlendirmesi⁷⁴

SFI Skor Değerlendirmesi	
SFI Değer Aralığı	Fonksiyonel Değerlendirme
12 ile -12	Mükemmel
-13 ile -37	İyi
-38 ile -62	Orta
-63 ile -87	Kötü
-88 ile -112	Total defisit
-113 ile -137	Total defisitten daha kötü



Resim 8. SFI değeri değerlendirilmesi ve kurutma kâğıdı üzerindeki görüntüsü

8.5. ELEKTROFİZYOLOJİK İNCELEME

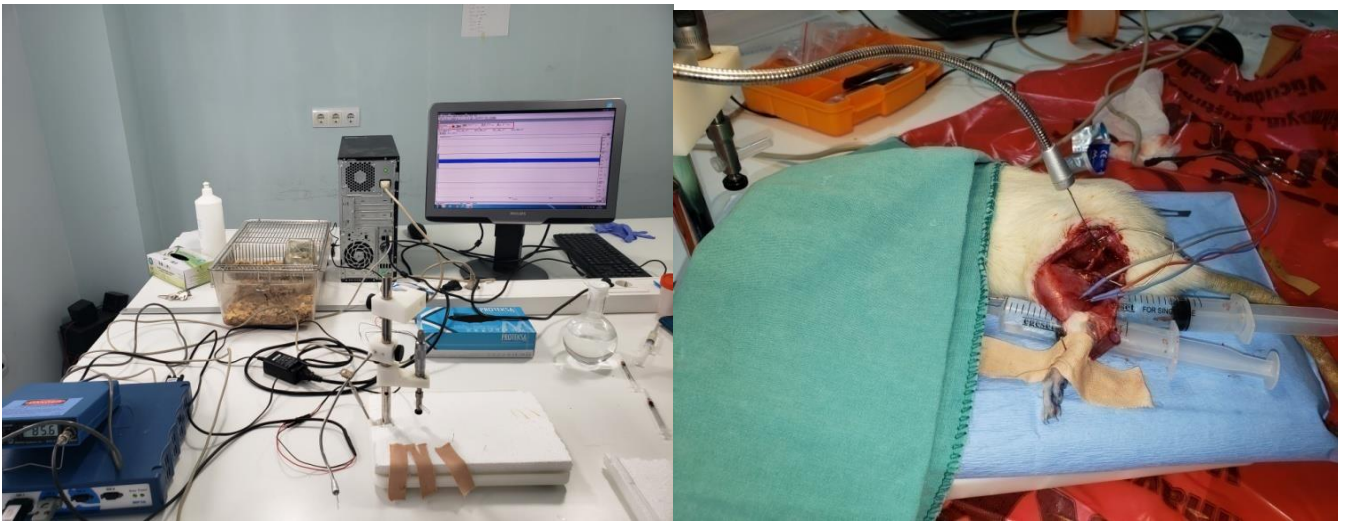


Şekil 16. Örnek EMG

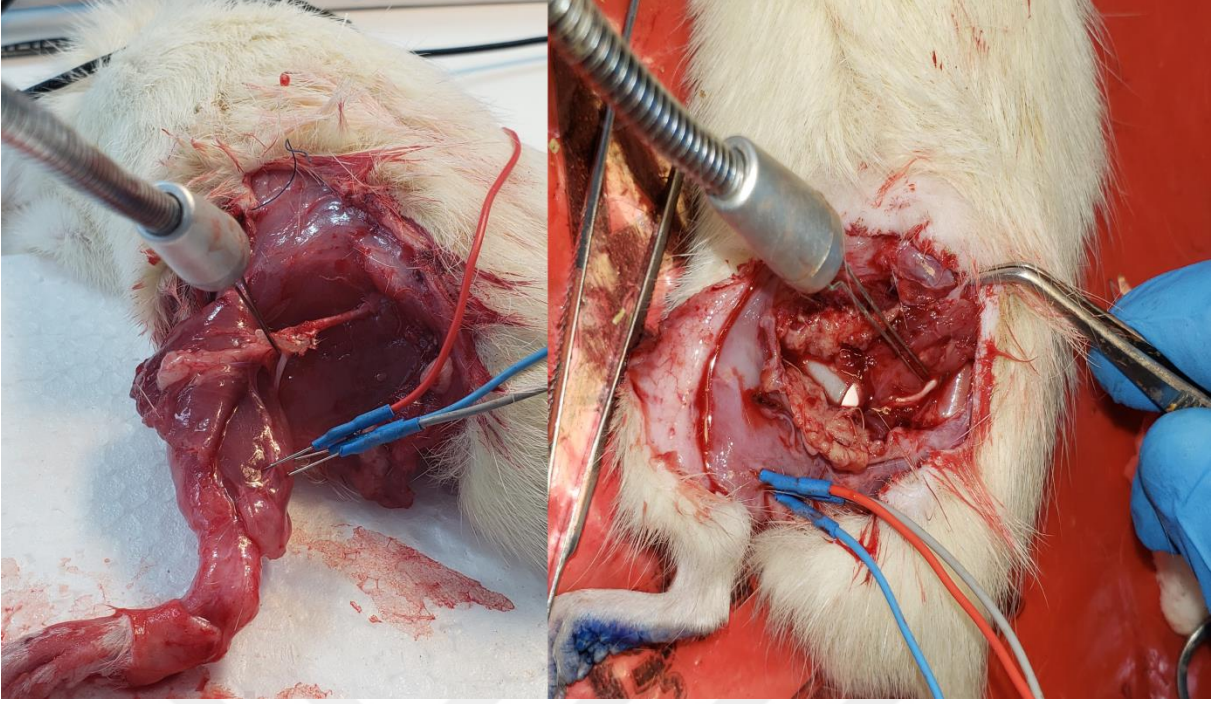
Uyarı sonrası yanıtı kadar geçen süreye latans denir. Peak to peak (tepe – tepe potansiyeli) yanıt sonrası pozitif ve negatif yöndeki en yüksek notalar arasındaki potansiyel farkı göstermektedir.

Latans ne kadar kısa olursa, uyarı iletimi o derece hızlıdır. İki tepe noktası arasındaki farkın fazla olması sinir iyileşmesinin iyi olduğunun kanıtıdır. Gastrocnemius kasında yapılan EMG sonrası görüntü şekilde gösterildi. (Şekil 16)

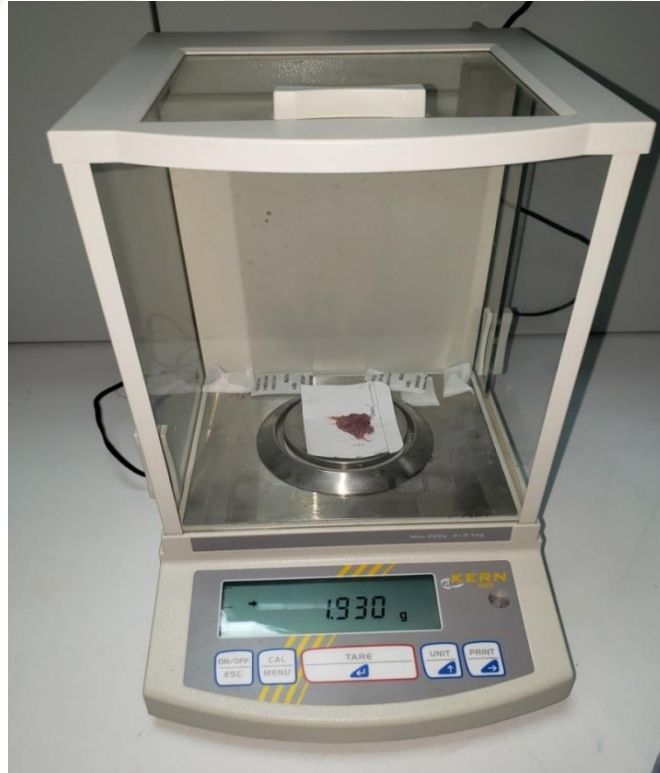
Çalışmamızda birinci hafta sonunda dört grupta yer alan altı tane denek için Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında EMG ve sinir iletim çalışması işlemi yapıldı (Resim 9 ve 10). Deneklere 60 mg/kg ketamin hidroklorid (Parke-Davis, İstanbul, Türkiye) ve 6 mg/kg ksilazin (Bayer, İstanbul, Türkiye) ile anestezi işlemi gerçekleştirildi. Paslanmaz çelik iğne elektrotlar ile değerler ölçüldü. Elektrotlar aynı tarafta gastrocnemius ve soleus kasları ile diğer sağlam bacakta gastrocnemius kaslarına yerleştirildi. Deneklerin bilateral gluteal bölgelerinden yapılan insizyon ile kaslar disseke edilerek siyatik sinirlerin bifurkasyonuna kadar ortaya kondu. Uyarı elektrodu sinir koaptasyonunun bir cm proksimaline ve distaline yerleştirildi. (Resim 11 ve 12) 0,5 ms uyarı süresiyle minimum uyarıyla maksimum yanıtın alınacağı uyarı miktarına kadar uyarı amplitüdü artırılarak en uygun uyarı şiddeti belirlendi (5-10 mA). Her deneğin siniri için üç kayıt alındı. Alınan kayıtlar sonrasında denekler anestezi altında iken karbondioksit gazı ile sakrifiye edildi, sonrasında dekapitasyon yapılması ardından gastrocnemius kasları anatomik uzanımına uygun şekilde eksize edildi ve atrofi değerlendirilmesi için ağırlık ölçümü yapıldı. (Resim 13)



Resim 9 ve Resim 10. EMG uygulanan sistem ve uygulama sırasında görüntüsü



Resim 11 ve Resim 12. Sham ve dekorin infüzyon grubunda distal ve proksimal ölçüm görüntüsü



Resim 13. Gastrocnemius çıkarılması sonrası ağırlık ölçümü

8.6. HİSTOMORFOLOJİK İNCELEME

Dokuların histolojik incelenmesi ve ölçümler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

8.6.1 LABORATUVAR İNCELEMELERİ SIRASINDA KULLANILAN MATERYALLER

8.6.1.1 CİHAZLAR

Işık mikroskop (Olympus DP70), Mikrotom (RM 2255, Leica), Digital kamera (Olympus DP71) , Santrifüj (Sigma1-14), Hassas Terazî (Sartorius, GC803S-0CE), Otomatik Pipet (Eperndorf), Mikrodalga fırın (Galanx), Etüv (Dedeoğlu), Vorteks (VelpScientifica), Bilgisayarlı analiz sistemi (Image J)

8.6.1.2 KİMYASALLAR

Hematoksilen (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire), Eozin (Surgipath, 01602, Canada), Entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya), Masson Trikrom boyama seti (Facepath, 86811065)

Fibronektin primer antikor (bs-0666R, 1/200 dilusyon), Collagen 1 primer antikor, (bs-10423R, 1/200 dilusyon) ED1 primer antikor (bs-1149R, 1/200 dilusyon), Laminin primer antikor (bs-0821R, 1/200 dilusyon), Tripsin (Kat No:00-3008 Digest All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA), Sekonder Kit (İnvitrogen, Histostain- Plus BroadSpectrum Cat No:85-9043), Diaminobenzidin (DAB) (Katologno: 1718096, Roche), Dakopen (Dako, Glostrup, Denmark)

8.6.2. IŞIK MİKROSKOPİK DOKU TAKİP PROTOKOLÜ

%10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla bir gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika dört değişim aseton solusyonlarından geçirildikten sonra iki değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde iki değişim parafin uygulanıp birer saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5 µm'lik kesitler alındı. (Tablo 4)

Tablo 3. Işık mikroskopik doku takip metodu

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 70, 80,90 etil alkol	20'şer dk
	Aseton (4 değişim)	20 dk
Şeffaflaştırma		30x2 dk
Emdirme %60 C etüv	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

8.6.3. HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ

Mikrotom aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. 10 dakika hematoksislen ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, iki dakika eozin boyası ile boyandı.

Ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı. (Tablo 4)

Tablo 4. Hematoksislen-Eozin boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	(3 değişim)	20 dk
Rehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	(3 değişim)	20 dk
Kapama	Entellan	

8.6.4. MASSON TRİKROM BOYAMA PROTOKOLÜ

Bir gece 60°C'lik etüvde deparafinize edilen dokular, 20'şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından %95'den %70'e azalan alkol (C₂H₅OH) serilerinden geçirilerek boyanmaya hazır hale getirildi. Lamlara Reagent A'dan altı damla ve Reagent B'den altı damla damlatıldı 10 dakika bekletildi. Preparatlar yıkanmadan Reagent C'den 10 damla damlatıldı beş dakika boyunca bekletildi ve distile sudan geçirildi. Lamlara Reagent D'den 10 damla damlatıldı ve preparatlar distile sudan yıkandı. Lamlara Reagent E'den 10 damla damlatıldı ve 10 dakika beklendikten sonra distile suda yıkandı. Bir sonraki aşamada ise lamlara Reagent F'den 10 damla damlatılarak 10 dakika bekletildi. Ardından lamlar distile suda yıkandı ve hızlıca artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon işlemi için hazır hale getirildi. Daha sonra son işlem için hazır olan preparatlar ksilen ile muamele edildi ve entellan ile lamlar kapatıldı.

Boyama sonucunda sitoplazma eritrositler ve kas doku kırmızı, kollagen mavi, çekirdekler koyu kahverengi olarak gözlendi. (Tablo 5)

Tablo 5. MassonTrikromboyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C'lik Etüv	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol I (Deparafinizasyon I, etüvde)	20 dk
	Ksilol II (Deparafinizasyon II)	20 dk
	Ksilol III (Deparafinizasyon III)	20 dk
Rehidrasyon	%96 Alkol	Yıkama
	%80 Alkol	Yıkama
	%70 Alkol	Yıkama
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Reagent A ve Reagent B solüsyonları, 6'şar damla	10 dk
	Reagent C, 10 damla	5 dk
	Distile su	Yıkama
	Reagent D, 10 damla	15 dk
	Distile su	Yıkama
	Reagent E, 10 damla	10 dk
	Distile su	Yıkama
	Reagent F, 10 damla	10 dk
Yıkama	Distile su	Yıkama
Dehidrasyon	%70 Alkol	Yıkama
	%80 Alkol	Yıkama
	%96 Alkol	Yıkama
	%96 Alkol	Yıkama
Şeffaflaştırma	Ksilol I (Clearing I)	15 dk
	Ksilol II (Clearing II)	15 dk
	Ksilol III (Clearing III)	15 dk
Kapama	Entellan	

8.6.5. İNDİREKT İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

İmmunohistokimyasal inceleme için 60°C'lik etüvde bir gece ve ksilolde üç değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen ile çevreleri sınırlandı. Tripsin solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojenperoksidazınıinhibe etmek amacıyla beş dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulandı.

Fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler oda ısısında bloklama ile inkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan Collagen 1, Fibronektin, Laminin ve ED1 primer antikorları ile bir gece +4°C’de inkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dk inkübe edildi. Pbs solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (Streptavidin 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer’s hematoksilin ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

8.6.6. HİSTOLOJİK HASAR SKORLAMASI

H&E ile boyanmış kesitlerde hasar iyileşmesi skoru yapıldı. Skora göre; normal doku(Skor 0), hasar bölgesinde iyi derecede organizasyon ve iyileşme (Skor 1), hasar bölgesinde orta derecede organizasyon ve iyileşme (Skor 2), hasar bölgesinde yetersiz organizasyon ve iyileşme (Skor 3), hasar bölgesinde düzensizlik ve başarısız iyileşme (Skor 4) olarak değerlendirildi ve istatistiksel analiz yapıldı.⁷⁵

Massontrikrom ile boyanmış kesitlerde fibrozis skoru yapıldı. Skora göre; normal doku (Skor 0), minimal hasar (Skor 1), orta derecede (Skor 2), gelişmiş (Skor 3), oldukça artmış fibrozis (Skor 4) olarak değerlendirildi.⁷⁶

Ayrıca her grupta Image J programında birim alan başına düşen akson sayısı, hasar bölgesindeki perinöral tabaka kalınlığı ve ölçüldü ve istatistiksel olarak analiz edildi.⁷⁷

İmmunohistokimyasal Skorlama (H-skoru), video kamera (Olympos DP91, Tokyo, Japan) ile görüntülenip, bilgisayar programı (Image J) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı. İmmunohistokimyasal boyama yoğunluğu H skoru ile değerlendirildi. İmmun boyama yoğunluğu, 0: Boyama yok, 1 (zayıf boyanma), 2 (orta yoğunlukta boyanma) ve 3 (şiddeti boyanma) şeklinde değerlendirildi. H-skoru= $\sum P_i (i + 1)$ formülü ile hesaplandı. P_i : %0 dan %100 e kadarki her boyama yoğunluğunun yüzdesi, i: 0, 1, 2,3 şeklindeki boyama yoğunluğu olarak tanımlandı. Her preparat için beş farklı alan mikroskopik olarak değerlendirildi ve ortalamaları alındı.⁷⁸

Elde edilen histolojik verilerin değerlendirilmesinde SPSS 22.0 paket programı kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ Standart hata şeklinde verildi. Tüm gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal Wallis non-parametrik testi, ikili gruplar arasındaki fark ise Mann-whitney U testi ile değerlendirildi.

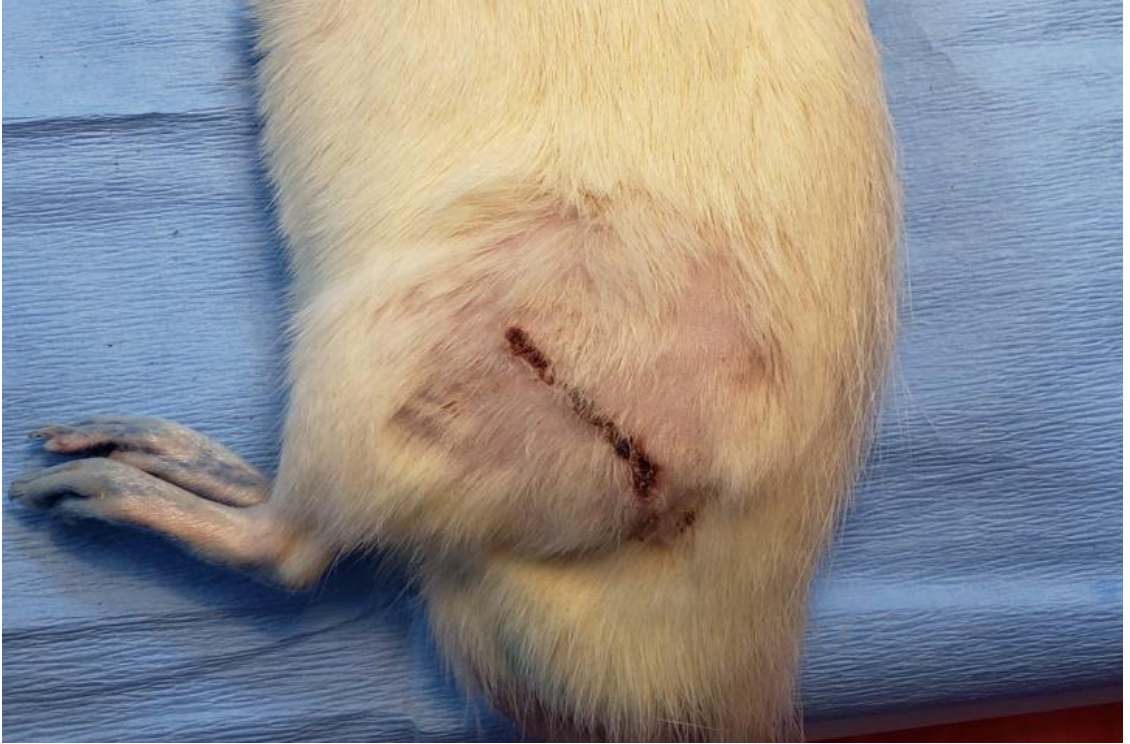
3.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Parametrik veriler ortalama standart sapma ve non-parametrik veriler median (min, max) olarak değerlendirildi. Değerlerin lmnde çoklu karşılaştırma için ANOVA ve non parametrik test olan Kruskal Wallis testi ile analiz edildi.

Gruplar arasında olabilecek farklılıkların hangi gruptan kaynaklandığına non parametrik test olan Mann Whitney U testi ile bakıldı. Tüm analizlerde GraphPad Prism version 8.00 Windows, (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) ve SPSS 22.0 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.) ile değerlendirildi. Farkın $p<0.05$ 'ten küçük olması istatistiksel anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmamız süresince dört hafta zaman aralığı içerisinde rutin beslenme ve barınma yöntemleri ile bakım yapılırken günlük insizyon hattı takibi ve batikon ile açık pansumanı yapıldı. Bu süre zarfında hayvan kaybı olmadı. Yara yeri enfeksiyonuna ve kötü iyileşmeye rastlanmadı. (Resim 14) Bir adet kontrol grubunda ve bir adet dekorin bolus grubunda olmak üzere iki denekte self mutilasyon gözlemlendi. (Resim 15) Yalnızca bir denekte insizyon hattı ile ilişkisiz bölgede karın cildinde yara ortaya çıktı. Hayvanların yürüme paternlerine bakıldığında sinir hasarı oluşturulan tarafta plantar ve dorsal fleksiyon hareketi ortadan kalktığından düşük ayak ile hareket ettikleri ve ayak parmakları arasında abdüksiyon hareketinin azaldığı gözlemlendi. Deneklerin opere edilen taraftaki ayaklarında sinir hasarına sekonder basma paternlerinde değişikliğe bağlı topuk bölgesinde ödem ve ayak kemerinde düzleşme meydana geldi.(Resim 16 ve 17)



Resim 14. Operasyon sonrası birinci haftada yara yeri görünümü



Resim 15. Kontrol grubu ve dekorin bolus grubunda bulunan self mutilasyon sonrası görüntü

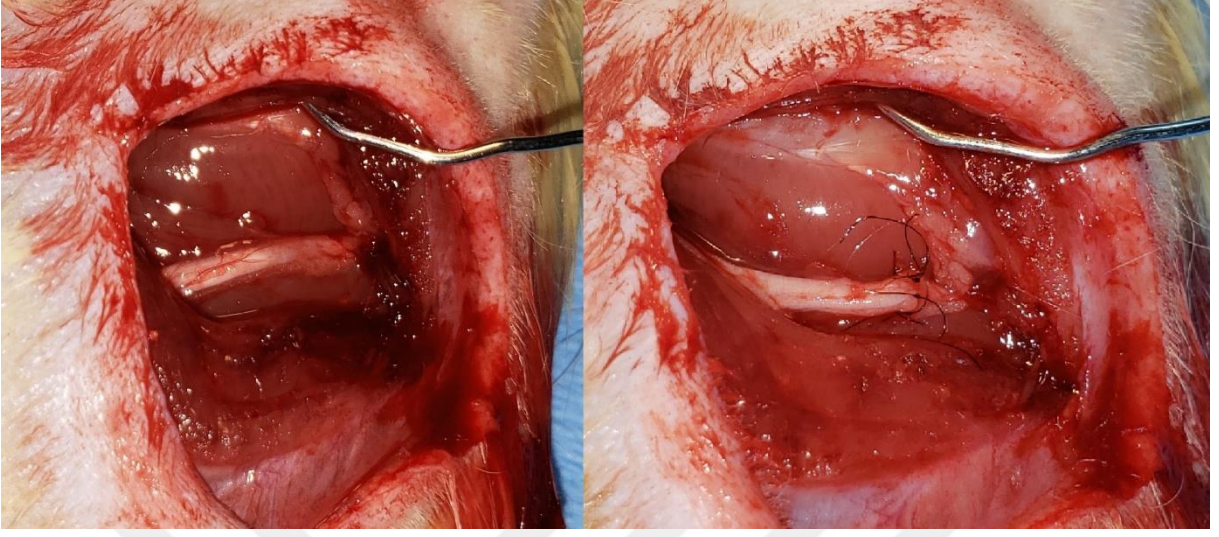


Resim 16. Post operatif birinci haftada opere edilen sol ayak topuk bölgesinde ödem

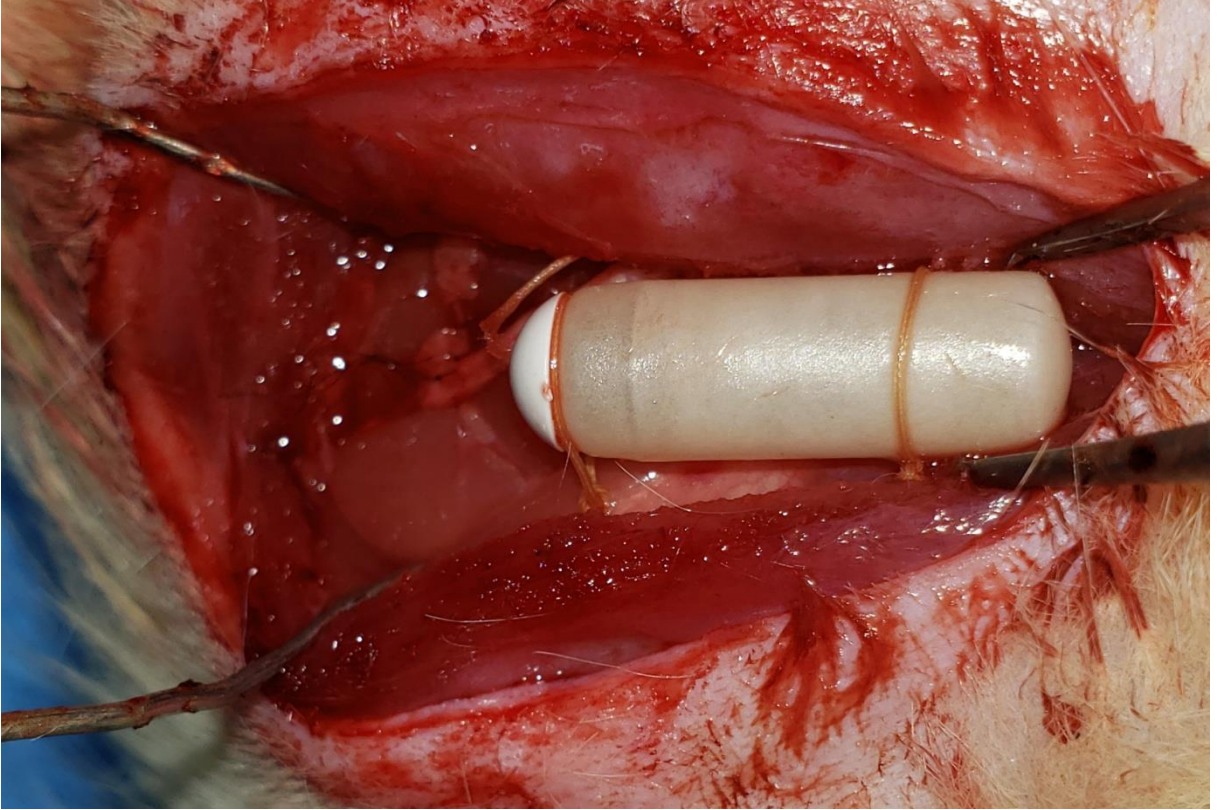


Resim 17. Post operatif birinci haftada opere edilen sol ayak topuk bölgesinde ödem

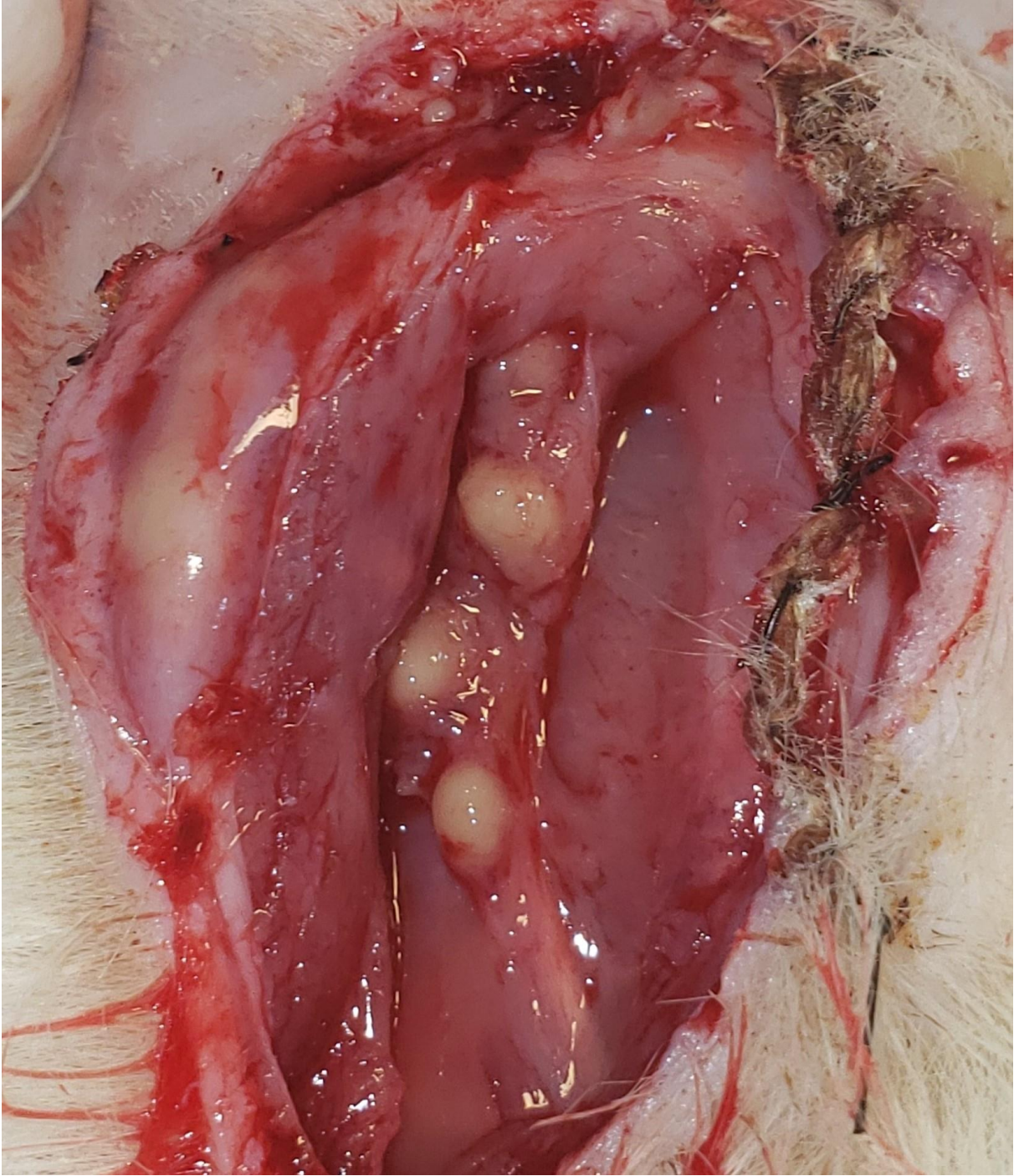
İntraperitoneal ketamin-ksilazin anestezisi uygulandıktan sonra deneklere uygun pozisyon verildi, batikonlu temizlik ve steril örtüler örtülmesi ardından, posterolateral insizyonla sol bacakta gluteal kaslar aralanarak siyatik sinire ulaşıldı ve mikrocerrahi teknikle sinir diseke edildi. Her bir sinire 9.0 naylon ile altı adet primer sütur atıldı. Kas ve cilt usulüne uygun şekilde sütüre edildi. (Resim 18) Sonrasında deneğe dahil olduğu gruba uygun şekilde Pbs, bolus dekorin protein uygulaması veya osmotik pompa ile infüzyon şeklinde tedavi verildi. (Resim 19) Birinci hafta sonunda disseksiyon sırasında yapılan makroskopik incelemede bazı deneklerin sinir ve kas çevrelerinde iyi sınırlı, kapsüllü kistik kitlelerin ortaya çıktığı gözlemlendi. (Resim 20)



Resim 18. Disseksiyon ve onarım sonrasında siyatik sinir görünümü



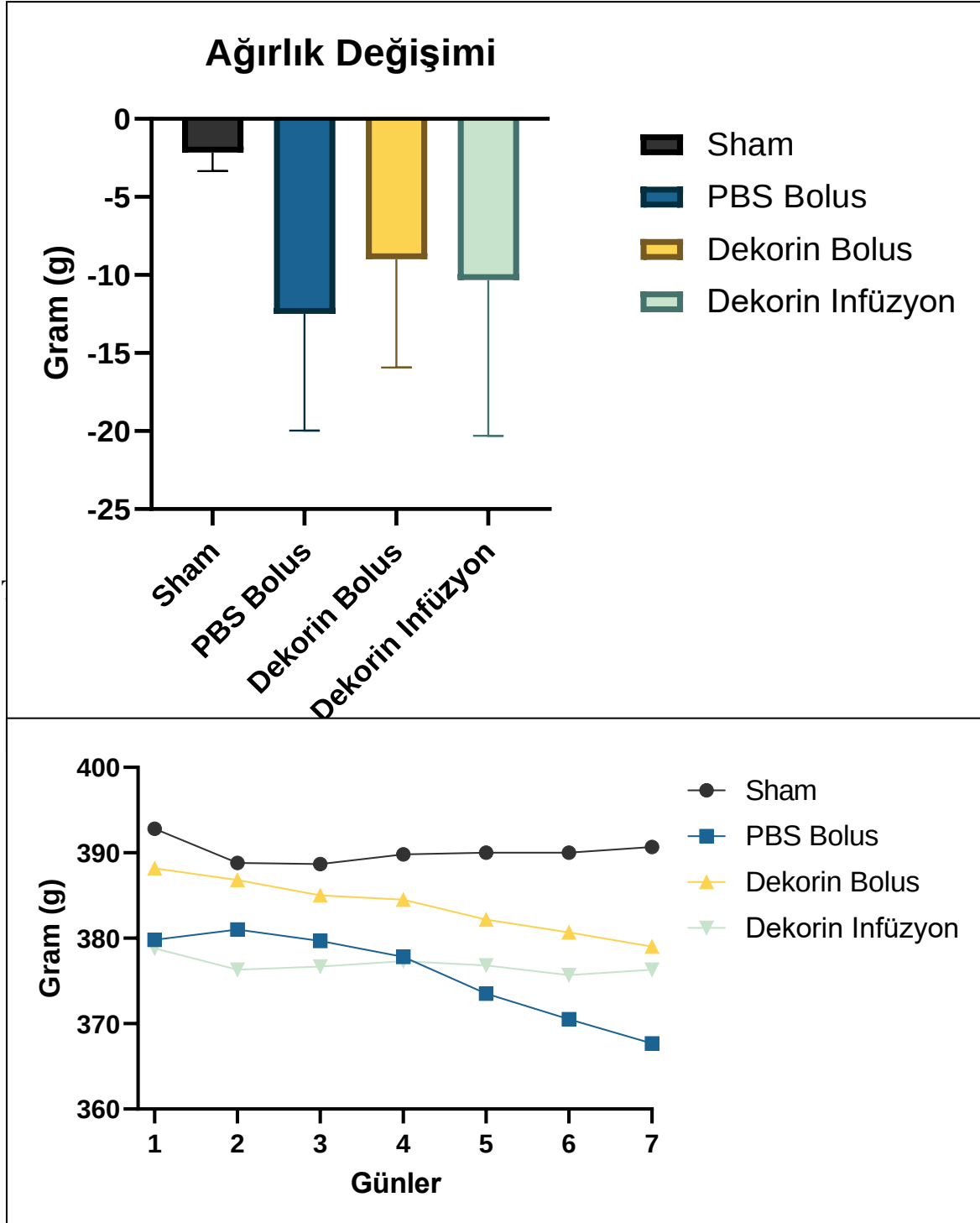
Resim 19. Osmotik pompa yerleştirilmesi sırasında görünüm



Resim 20. Dekorin uygulaması sonrasında sinir üzerinde meydana gelen kistik oluşumlar

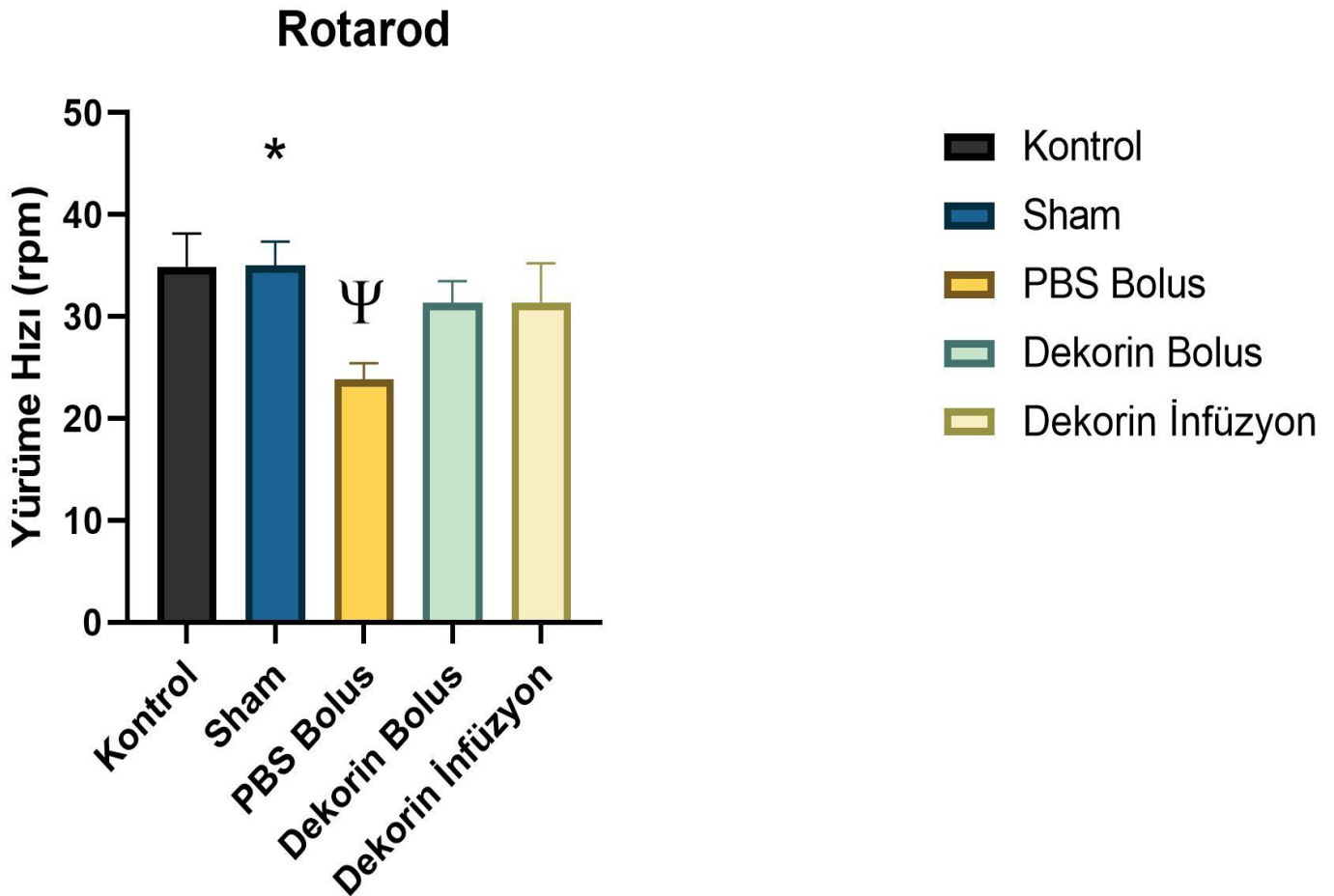
Her denek operasyon öncesinde ve operasyon sonrasında her gün olacak şekilde tartıldı. Günlük ağırlık değişimleri kayıt altına alındı. Ağırlık miktarında azalma hiçbir denekte %10'un üzerine çıkmadı, ağırlık kaybı nedeniyle deney dışı bırakılan olmadı.

Kaydedilen ağırlık verileri grafik şeklinde sunuldu. (Grafik 1) Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p= 0,1$, $p>0,05$) Anlamlı fark saptanmamasına karşın ortalama ağırlıklar göz önüne alındığında sham grubu ile Pbs bolus arasında 10,33 gr, sham ve dekorin bolus grubu arasında ise 8,16 gr sham grubu lehine fark saptandı. Pbs bolus grubu diğer gruplara kıyasla daha fazla ağırlık kaybetti.



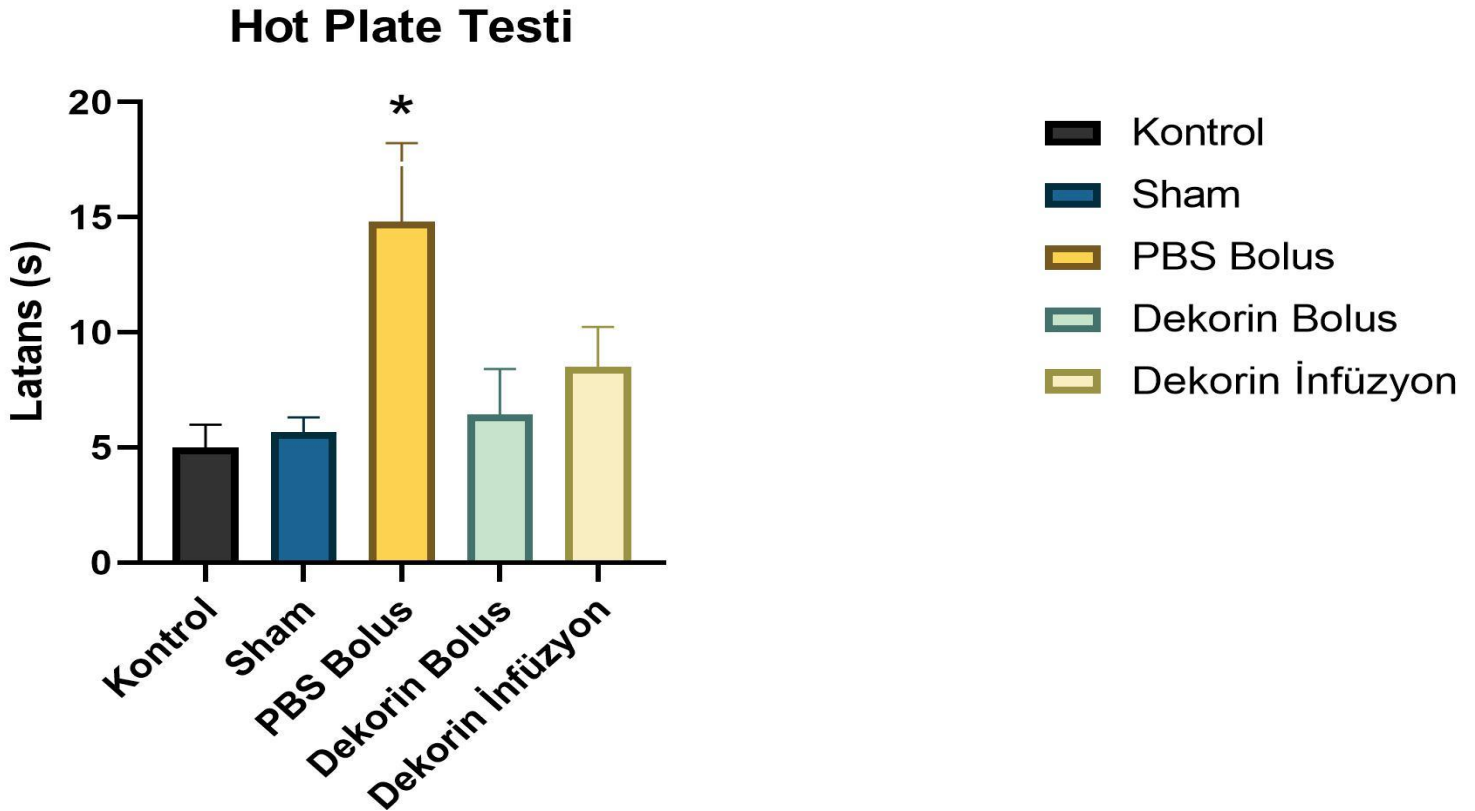
Grafik 1. Gruplar arası günlük ağırlık değişimi

Her denek grubuna operasyon öncesi ve operasyondan bir hafta sonrasında yapılan rotarod testinde hız ortalamaları alındıktan sonra istatistiksel analiz yapıldı. (Grafik 2) Buna göre dekorin bolus ve dekorin infüzyon grubunda operasyon öncesinde alınan değerler ile karşılaştırıldığında anlamlı değişim gözlenmezken, bu gruplarda ortalama hızlarda düşüş saptandı. Dekorin bolus ile Pbs ($p<0,0001$, $p<0,05$) ve Dekorin infüzyon ile Pbs ($p=0,0027$, $p<0,05$) grupları arasında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı fark saptandı. Dekorin bolus ve dekorin infüzyon grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p=0,22$, $p>0,05$) Kontrol grubu ile Pbs bolus ve sham grubu ($p<0,0001$, $p<0,05$) arasında da anlamlı fark saptandı.



Grafik 2. Rotarod aparatında kaydedilen ortalama hızlar operasyon öncesi ve sonrası

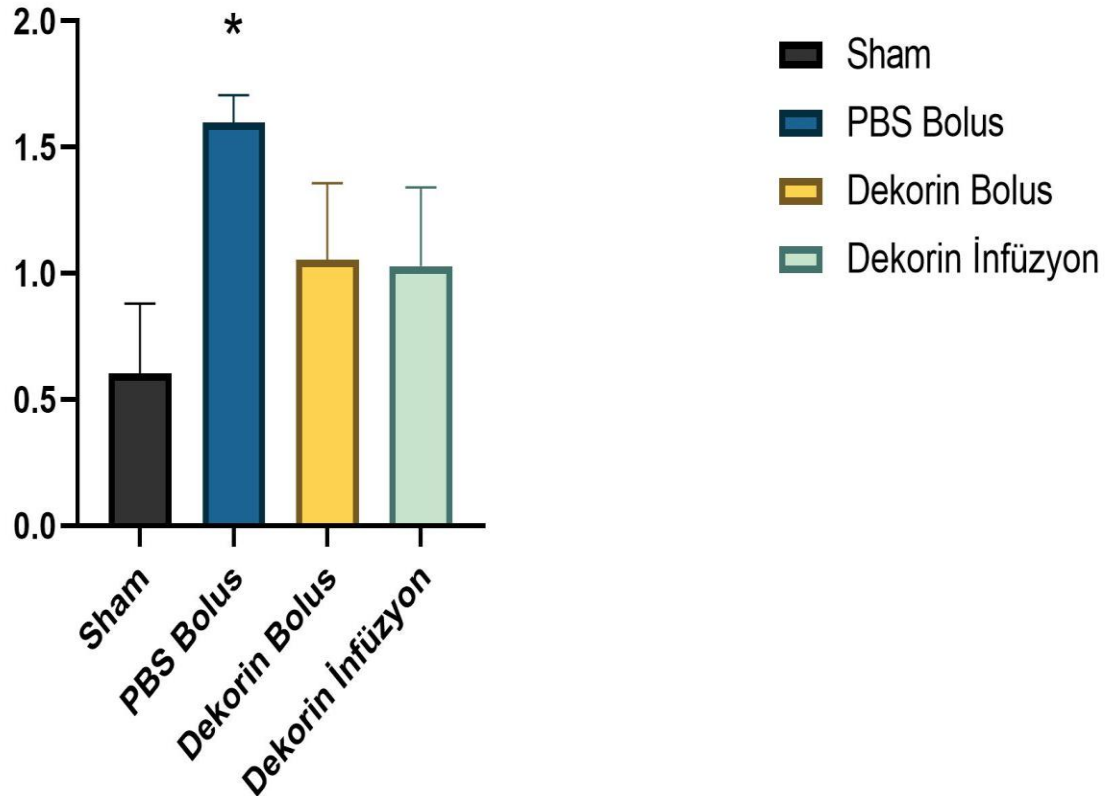
Her denek grubuna operasyon öncesi ve operasyondan bir hafta sonrasında hot plate testi gerçekleştirildi. Elde edilen veriler ile gruplar arasında ağrı duyusunda istatistiksel açıdan anlamlı fark olup olmadığına bakıldı. (Grafik 3) Sonuç olarak duyu açısından bütün gruplarda latansın arttığı gözlemlendi. Dekorin bolus ve infüzyon grubundaki latans artışları Pbs bolus verilen gruba göre anlamlı şekilde daha az olarak saptandı. ($p<0,001$) Dekorin bolus ile kontrol ($p=0,3$), dekorin bolus ile sham ($p=0,92$) ve dekorin bolus ve infüzyon grupları ($p=0,17$) arasında latans artışları açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Hot plate testinde arka ayağın yalanması veya kaldırması hareketi ölçüm için yeterli olurken, post operatif gruplar içerisinde bulunan sham grubu hariç hiçbir denek saptanan zaman aralığında opere edilen sol ayağını kaldırmadı, aksine sol ayağını destek olarak kullanarak sağ ayağını kaldırdı.



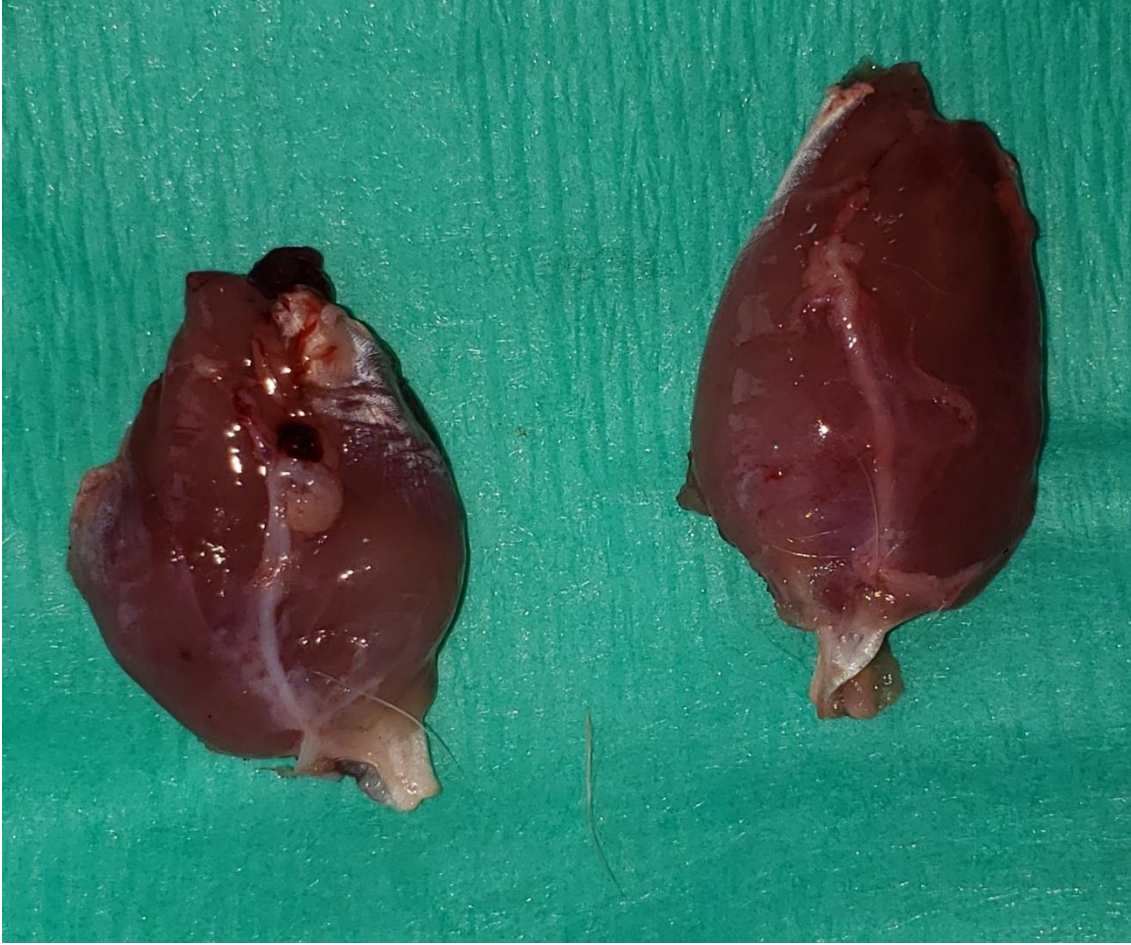
Grafik 3. Operasyon öncesi ve sonrasında ağrı duyusu ölçümü

Her deneğin birinci hafta sonunda dekapitasyon ile sakrifikasyonu gerçekleştirilmesi ardından gastrocnemius kasları origo ve insersiyo kısımlarından eksize edildi. (Resim 21) Opere edilmeyen sağlam sağ bacadan alınan gastrocnemius ile karşılaştırılarak aradaki fark hesaplandı. Sonrasında denek ağırlığına bölünerek gram başına yüzde kas ağırlık değişimi hesaplandı. Her deneğin ağırlığı farklı olduğundan ötürü, her iki gastrocnemius arasındaki ağırlık farkı deneğin ağırlığına bölünerek elde edilen değerler ile istatistiksel analiz yapıldı. (Grafik 4) Opere edilen taraflarda gastrocnemiuslar karşı sağlam bacağa göre atrofik olarak saptandı ancak; dekorin bolus ve infüzyon gruplarındaki atrofi Pbs bolus grubuna göre daha az saptandı. ($p=0,006$, $p<0,05$) En az ağırlık değişimi beklenildiği üzere Sham grubunda olurken, dekorin bolus ve dekorin infüzyon grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p=0,99$, $p>0,05$).

Gram Başına Yüzde Gastrocnemius Ağırlık Değişimi

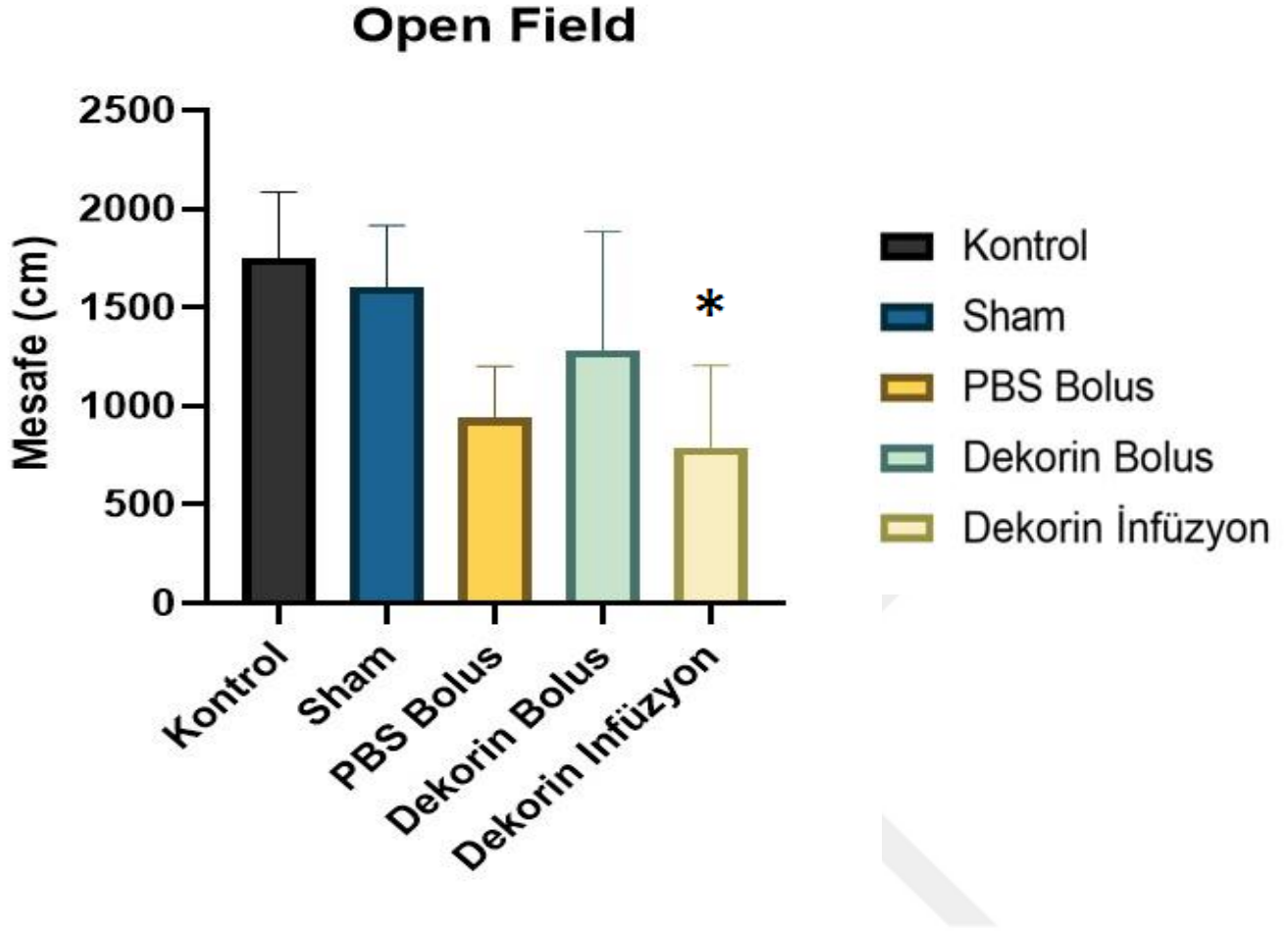


Grafik 4. Gastrocnemius kas ağırlık değişimi



Resim 21. Çıkarılan gastroknemius kaslarının ağırlık ölçümü öncesi görünümü

Ethovision XT video sistemi ile kaydedilen open field maze (OFM) testi verileri bütün gruplar için operasyon öncesinde ve sonrasında kaydedildi. Katedilen toplam mesafe (cm), ortalama hız, iç alanda ve dış alanda geçirilen süre değerlendirmeye alındı. (Grafik 5) Verilerden ortalama hız ve geçirilen zaman değerlerinin çarpımı mesafeyi verdiği için istatistiksel analiz yalnızca mesafe parametresi üzerinden yapıldı. Dekorin infüzyon grubu diğer gruplara oranla anlamlı şekilde daha az mesafe katettiği görüldü. ($p=0,02$, $p<0,05$) Dekorin bolus grubu Pbs bolus ve dekorin infüzyon grubuna oranla daha fazla mesafe katetmesine karşın yalnızca dekorin infüzyon grubu ile anlamlı fark mevcut idi.



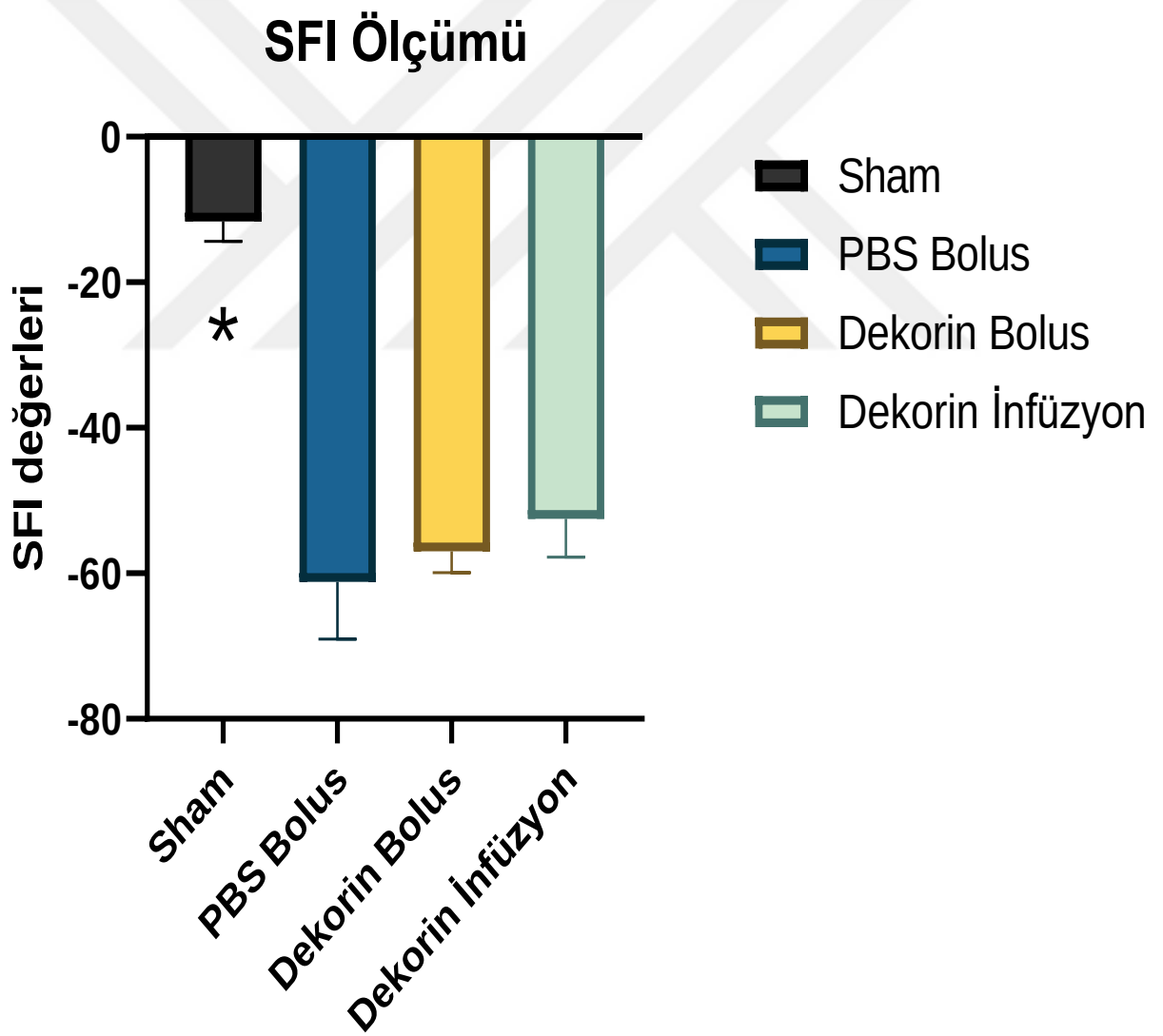
Grafik 5. Open field testi sonrasında katedilen mesafe analiz sonuçları

SİYATİK FONKSİYONEL İNDEKS (SFI) DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

Çalışmada deneklerin tamamına SFI değerlendirmesi yapıldı. Elde edilen veriler yüzde olarak hesaplandı. Sıfıra yakın değerler iyileşmenin iyi olduğunu gösterirken yüze yakın değerler kötü iyileşmeyi göstermektedir. Bütün deneklerin değerleri ölçüldükten sonra ortalaması alınarak iyileşme açısından karşılaştırıldı. (Tablo 6) Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı fark saptanmazken, dekorin infüzyon grubunda diğer gruplara göre daha iyi sonuçlar elde edildi. (Grafik 6) Ortalamalar arasındaki farklara bakıldığında Pbs grubuna göre 8,6, dekorin bolus grubuna göre 4,4 birim iyileşmenin daha iyi olduğu saptandı.

Tablo 6. SFI ölçüm sonuçları

Pbs Bolus	Sham	Dekorin Bolus	Dekorin İnfüzyon
-75,04	-14,66	-35,68	-45,89
-61,53	-10,56	-58,24	-59,05
-73	-7,77	-61,44	-52,4
-54,69	-11,67	-55,67	-46,92
-53,4	-13,56	-53,86	-56,71
-63,36	-8,77	-55,49	-54,05



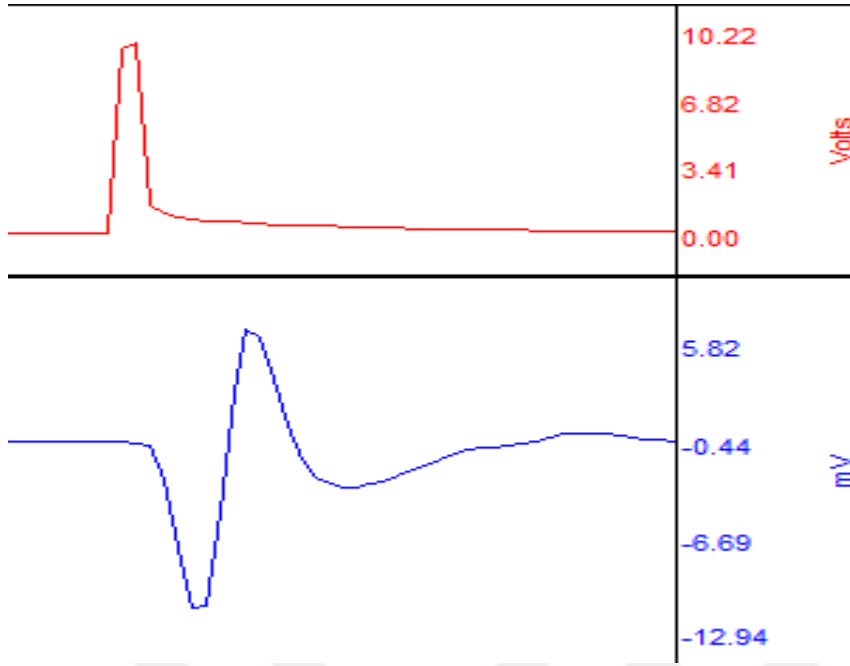
Grafik 6. SFI istatistiksel analiz sonuçları

ELEKTROFİZYOLOJİK İNCELEMELER

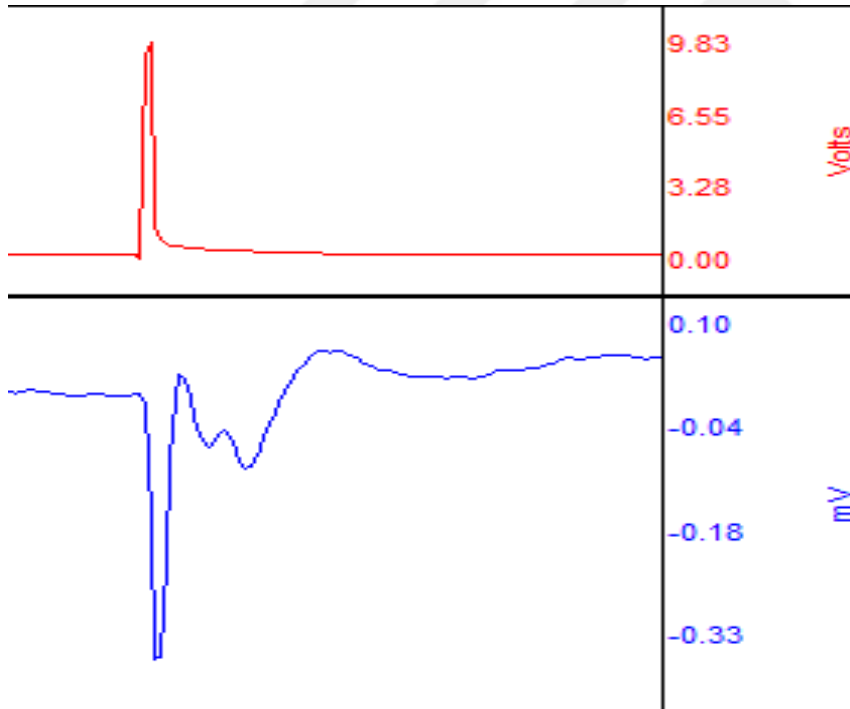
Çalışmamızda, yapılan bilateral gluteal insizyonlar ile sağlam ve onarılmış siyatik sinirler ortaya konduktan sonra gastroknemius ve soleus kaslarına elektrotlar yerleştirildi. Her bir deneğe ölçümler travma distalinde ve proksimalinde üçer kez yapıldı. Verilen uyarılar 5 mv ve 10 mv olacak şekilde ayrı ayrı değerlendirildi. (Resim 21,22,23,24) Ölçülen latans değerler karşılaştırıldı. Sağlam taraf (sağ) ile ölçülen değerler karşılaştırılarak sinir iletimi, dejenerasyon-rejenerasyon ve anti fibrotik etkinlik değerlendirildi. Gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığı kıyaslandı. Yapılan ölçümlerde $p>0.05$ üzerinde olması anlamlı kabul edildi.

Onarımın 1 cm proksimali ve distalinde alınan ölçümler istatistiksel olarak ayrı ayrı değerlendirildi. Travma proksimalinde 5 mV ile yapılan ölçümde, dekorin bolus grubunun sham grubu ile arasında anlamlı fark saptanmadı. Dekorinin bolus uygulanması infüzyona göre üstün olduğu görüldü. (Grafik 7) Pbs uygulanan grubun uyarıya cevabı bütün gruplara göre anlamlı şekilde düşmüştüğü gözlemlendi. ($p<0.0001$) Opere edilen tarafta Pbs ve dekorin infüzyonu uygulanan gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p>0.05$, $p=0.995$)

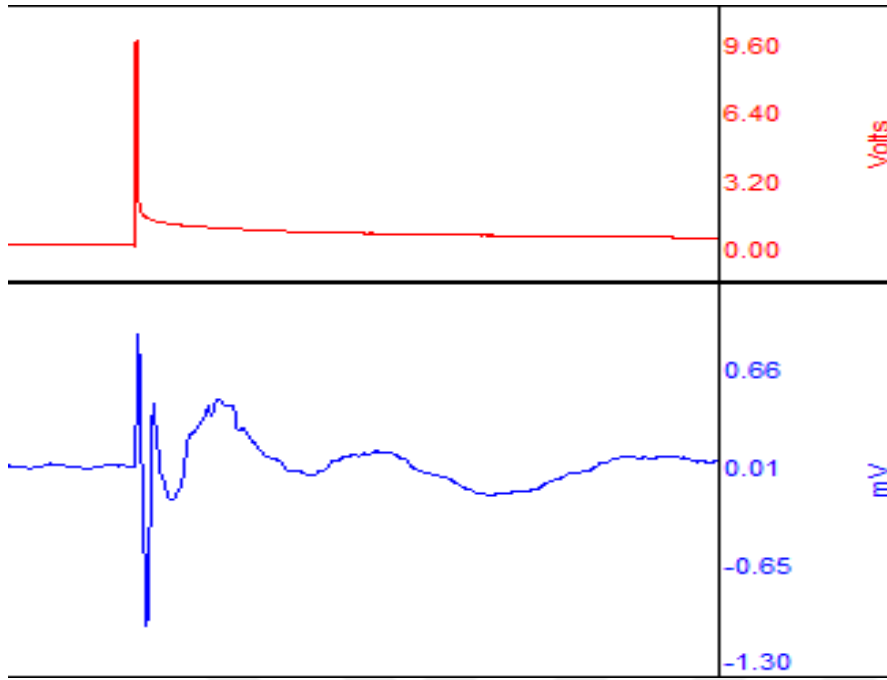
Onarımın distalinde alınan ölçümlerde wallerian dejenerasyon ile uyumlu olarak bütün değerlerin düştüğü görüldü. Travma distalinde 5 mV ile yapılan ölçümlerde dekorin bolus ve infüzyon grubunun, Pbs grubu ile arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p>0.999$) Dekorin bolus ile infüzyon grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p>0.05$, $p=0.9038$) Dekorin bolus ile sham grubu arasında anlamlı fark gözlenmiştir. ($p<0.0002$) Ortaya çıkan bu fark distalde dekorin bolus uygulamasının etkinliğinin proksimal ile farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. (Grafik 8)



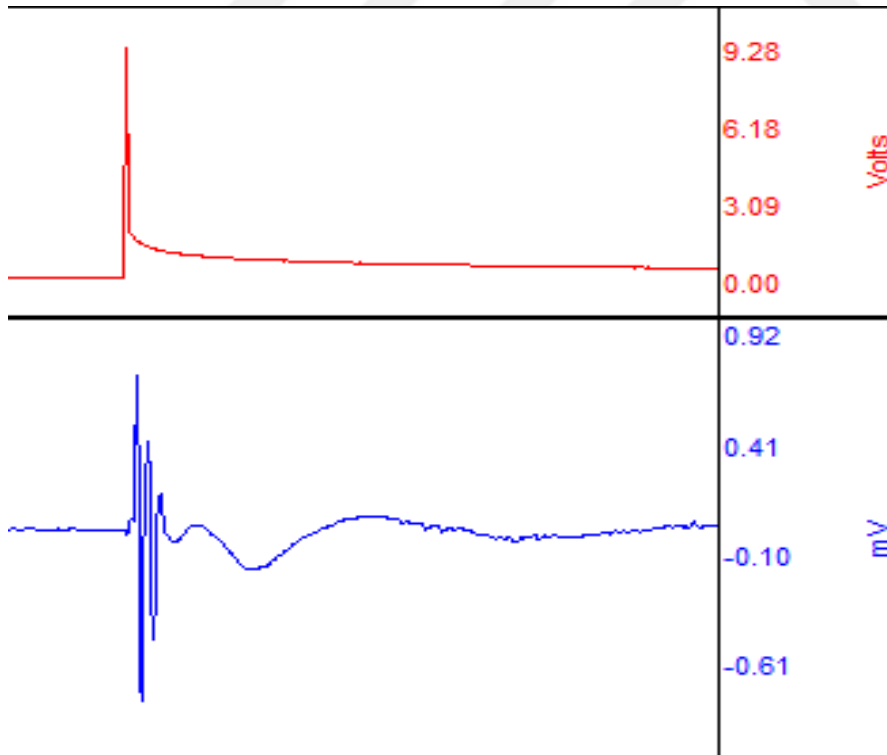
Resim 22. Sham grubu EMG ölçüm grafiği



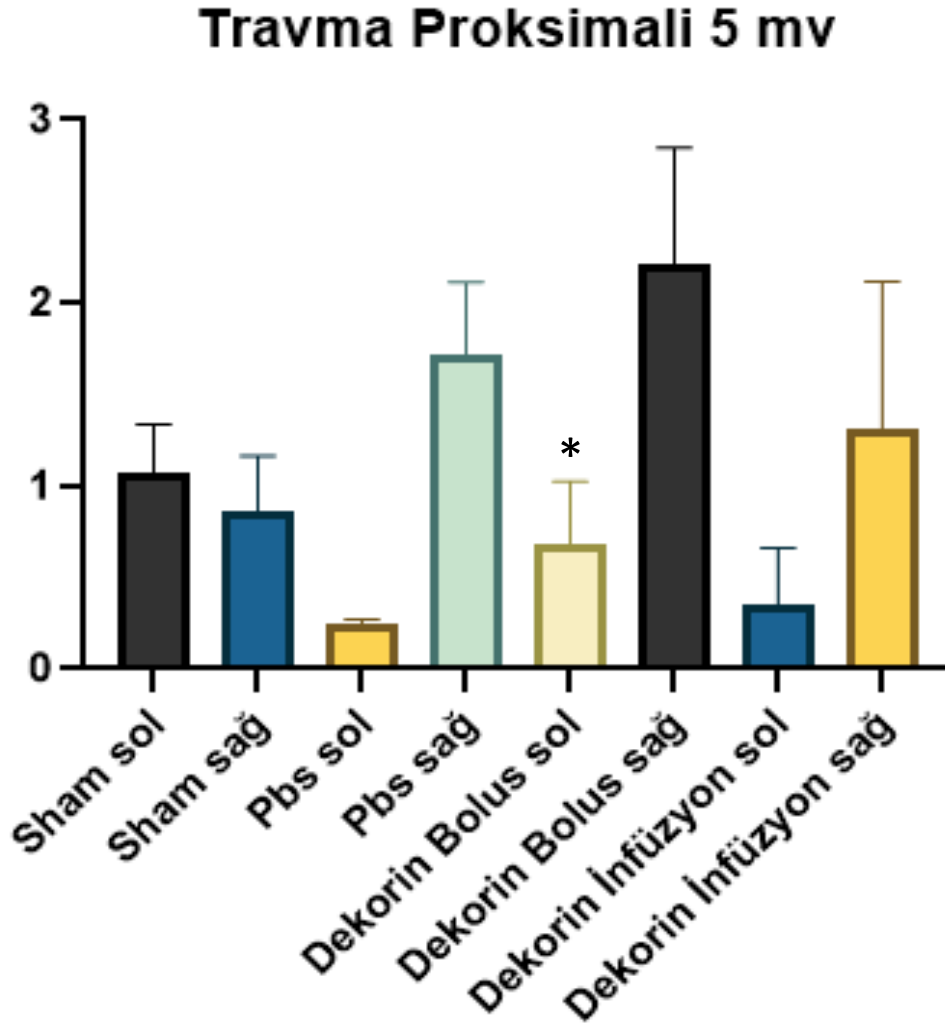
Resim 23. Pbs bolus grubu EMG ölçüm grafiği



Resim 24. Dekorin bolus grubu EMG ölçüm grafiği

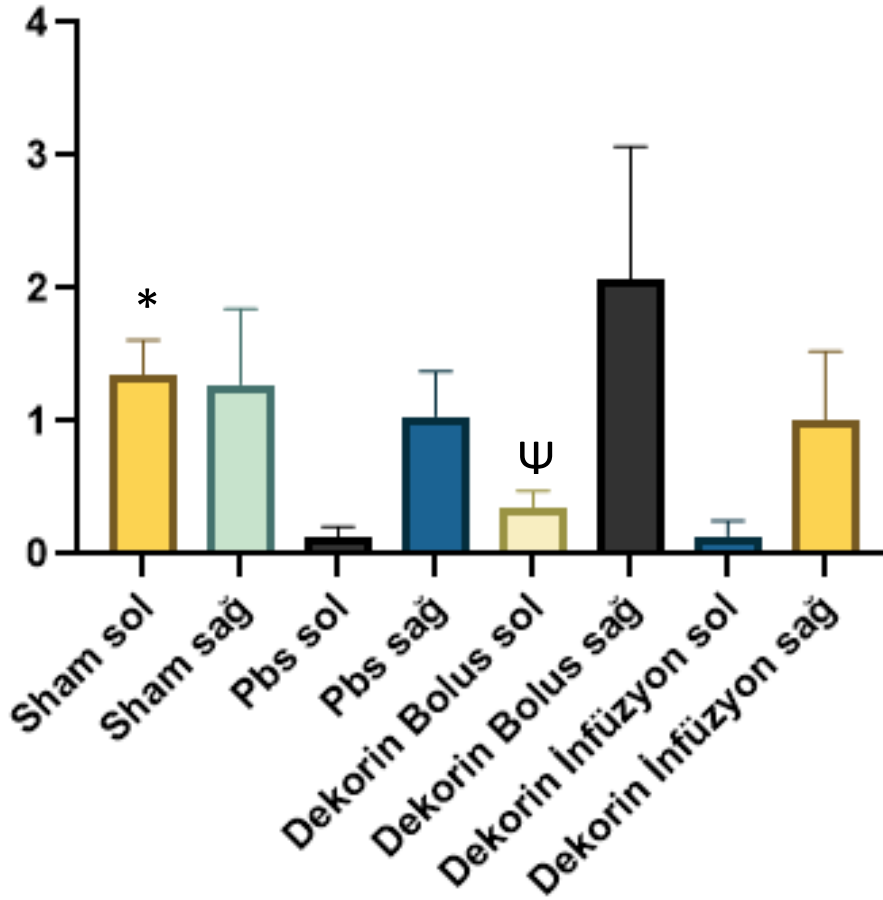


Resim 25. Dekorin infüzyon grubu EMG ölçüm grafiği



Grafik 7. EMG travma proksimali 5 mv analiz sonuçları

Travma Distali 5 mv

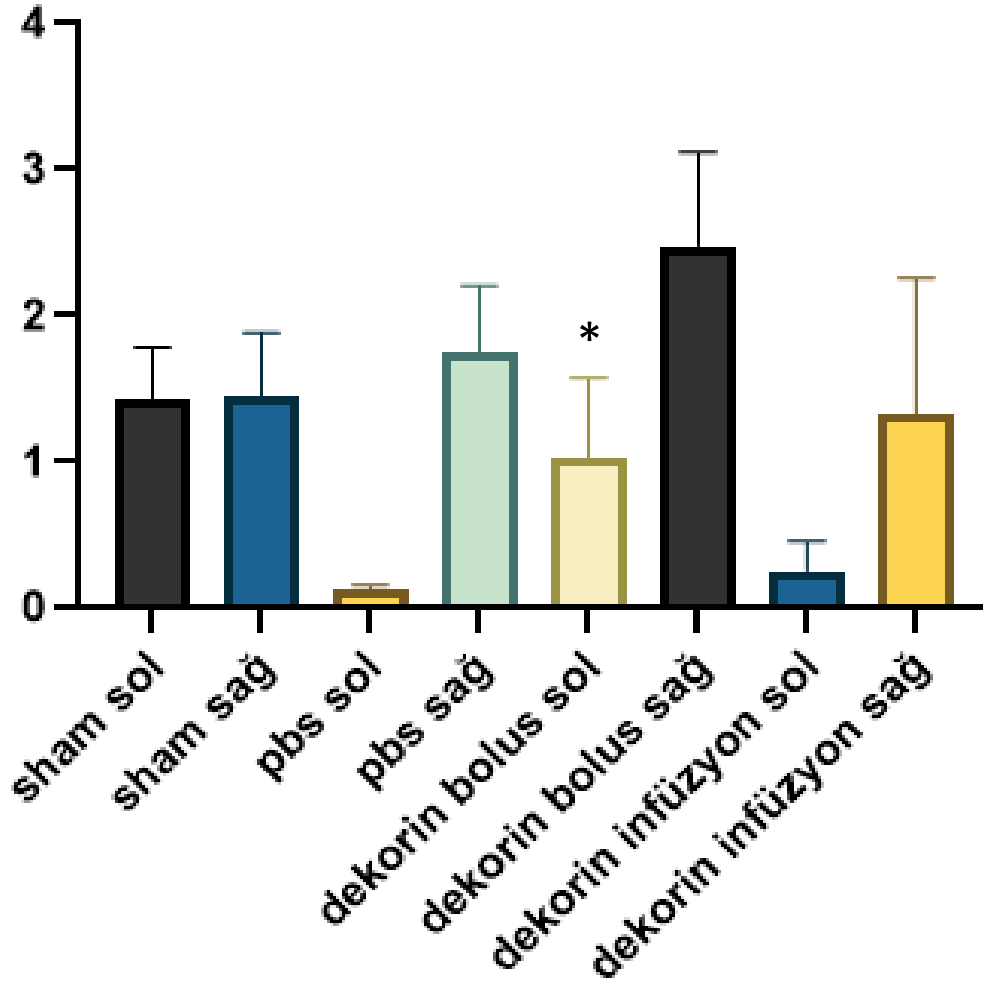


Grafik 8. EMG travmadistali 5 mv analiz sonuçları

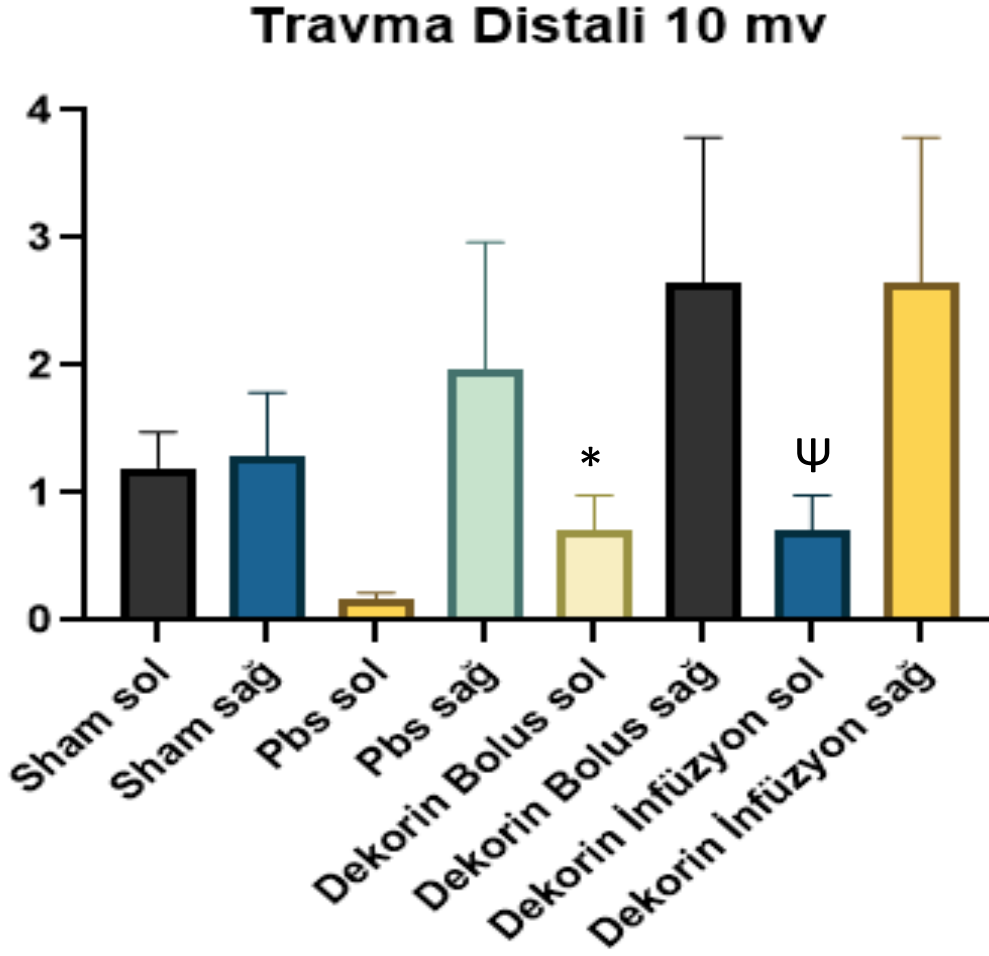
Verilen uyarı miktarı 10 mV yapıldığında proksimalde dekorin bolus ve sham grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p>0.05$, $p=0,6623$) Ancak dekorin infüzyon ile arasında ileri derecede anlamlı fark bulunmaktadır. ($p<0.0001$) Pbs grubunda düşüş benzer şekilde diğer gruplara oranla anlamlı şekilde fazladır. ($P<0,001$) Hiç opere edilmeyen sağ bacakların uyarıya yanıtı beklenildiği üzere yüksektir. (Grafik 9)

Distalde uyarı miktarı 10 mV yapıldığında ise, 5 mV ile alınan ölçümlere benzer şekilde dekorin bolus ile Pbs grubu arasında fark saptanmadı. ($p=0,6291$) Dekorin bolus ile infüzyon grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p>0,999$) Sham gruplarının sağ ve sol bacağına fark saptanmaması sinir dokusu çevresi hasarlanıp yalnızca nöropraksi oluşturulduğundan olağan olarak değerlendirildi. Sağlam olan sağ bacaklarda aksiyon potansiyeli değerleri her zaman yüksek çıktı. (Grafik 10)

Travma Proksimali 10 mv



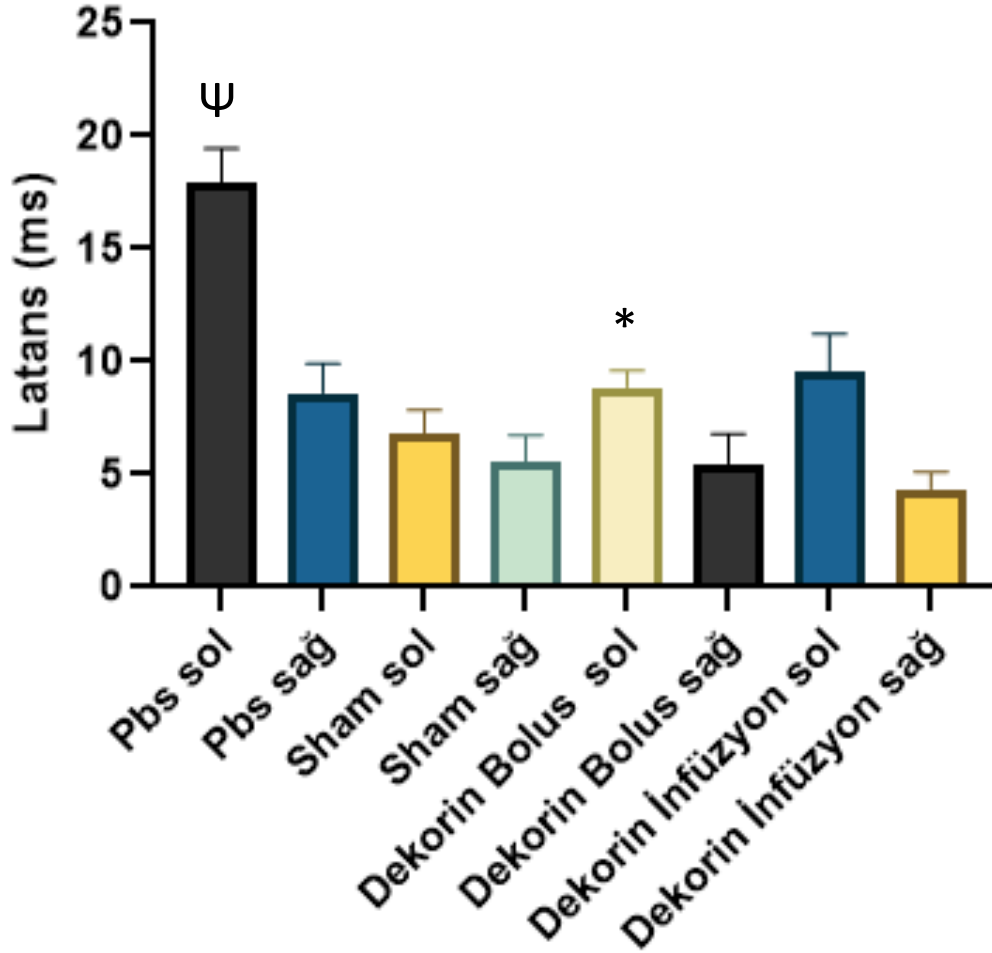
Grafik 9. EMG travma proksimali 10 mv analiz sonuçları



Grafik 10. EMG travma distali 10 mv analiz sonuçları

Yapılan analizlerde 5 mv uyarı ile her zaman aksiyon potansiyeli dalgası elde edilemediğinden ötürü latans ölçümünde 10 mv ve yaralanma proksimali ele alınmıştır. Dekorin bolus ve infüzyon grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. ($p=0,6214$) Dekorin bolus ve sham grubu ile dekorin infüzyon ve sham grubu arasında ileri derecede anlamlı fark saptandı. ($p<0,0001$) Latans değerleri en yüksek Pbs grubunda saptandı. Yani iletim hızı en kötü etkilenen grubun Pbs grubu olduğu görüldü. Sham grubu ise sinire yalnızca nöropraksi yapıldığından normale en yakın grup olarak saptandı. Sonuç olarak, iletim hızı açısından her iki grupta Sham grubunu yakalayamadı. (Grafik 11)

Travma Proksimali 10 mv Latans



Grafik 11. EMG travma proksimali 10 mv latans analiz sonuçları

HİSTOMORFOMETRİK İNCELEME BULGULARI

İŞIK MİKROSKOP BULGULARI

Sham grubunun siyatik sinir kesitlerinin HE boyaması ile ışık mikroskopik incelemesinde, düzenli miyelinli aksonlar gözlemlendi. Miyelinli akson fibrilleri sıkı bir şekilde ince bir bağ doku kılıfı olan endonöryum ile sarılmıştı. Endonöryumun altında Schwann hücrelerinden oluşan nörolemma kılıfının varlığı izlendi. Aksonları oval ya da yuvarlak çekirdekli Schwann hücreleri desteklemekteydi.

Aksonlar, Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülmüş halde, soluk renkli olarak gözlemlendi. Miyelinli sinir liflerinde, Schwann hücreleri tarafından yapılan ve aksonun etrafında yerleşmiş olan bir miyelin kılıfının varlığı görüldü. Sinir fibrillerinden oluşan fasiküller perinörium denen bağ doku kılıfı ile çevrelenmişti.

Perinöriumda kan damarları görüldü. Sinirin dıştan kalın fibröz bir bağ dokudan oluşan epinörium ile çevrili olduğu izlendi. Epinöriumda fibröz bağ dokusu dışında, kan damarlarının varlığı da gözlemlendi. (Şekil 26) Pbs bolus grubunda bazı sinir kesitlerinin epinörium ile çevrili olduğu izlenmekle birlikte, örneklerin çoğunluğunda miyelin kılıfı bütünlüğünün kaybolduğu gözlemlendi. Dokunun çoğunluğunda aksonlarda ve miyelin kılıflarda belirgin dejenerasyonla birlikte, miyelin kılıf lamellerinin düzensizleştikleri ve birbirlerinden ayrıldıkları gözlemlendi.(Şekil 26) Dekorin bolus grubunda periferik sinir histolojisi sham grubuna yakın özellikteyken (Şekil 26), dekorin infüzyon grubunda ise dekorin bolus grubuna göre biraz daha az doku iyileşmesi gözlemlendi.

Gruplara ait kesitlerin Masson trikrom bağ doku boyamasının ışık mikroskopik incelenmesinde, Sham grubunda bağ doku artışı gözlenmezken, Pbs bolus grubunda sinir fibrilleri arasında bağ doku artışının yüksek oranda olduğu, perinöriumda bağ doku artışı nedeniyle kalınlaşma olduğu gözlemlendi. Dekorin bolus grubunda bağ doku artışı oldukça az iken, dekorin infüzyon grubunda biraz daha yoğun olduğu gözlemlendi. (şekil 27)

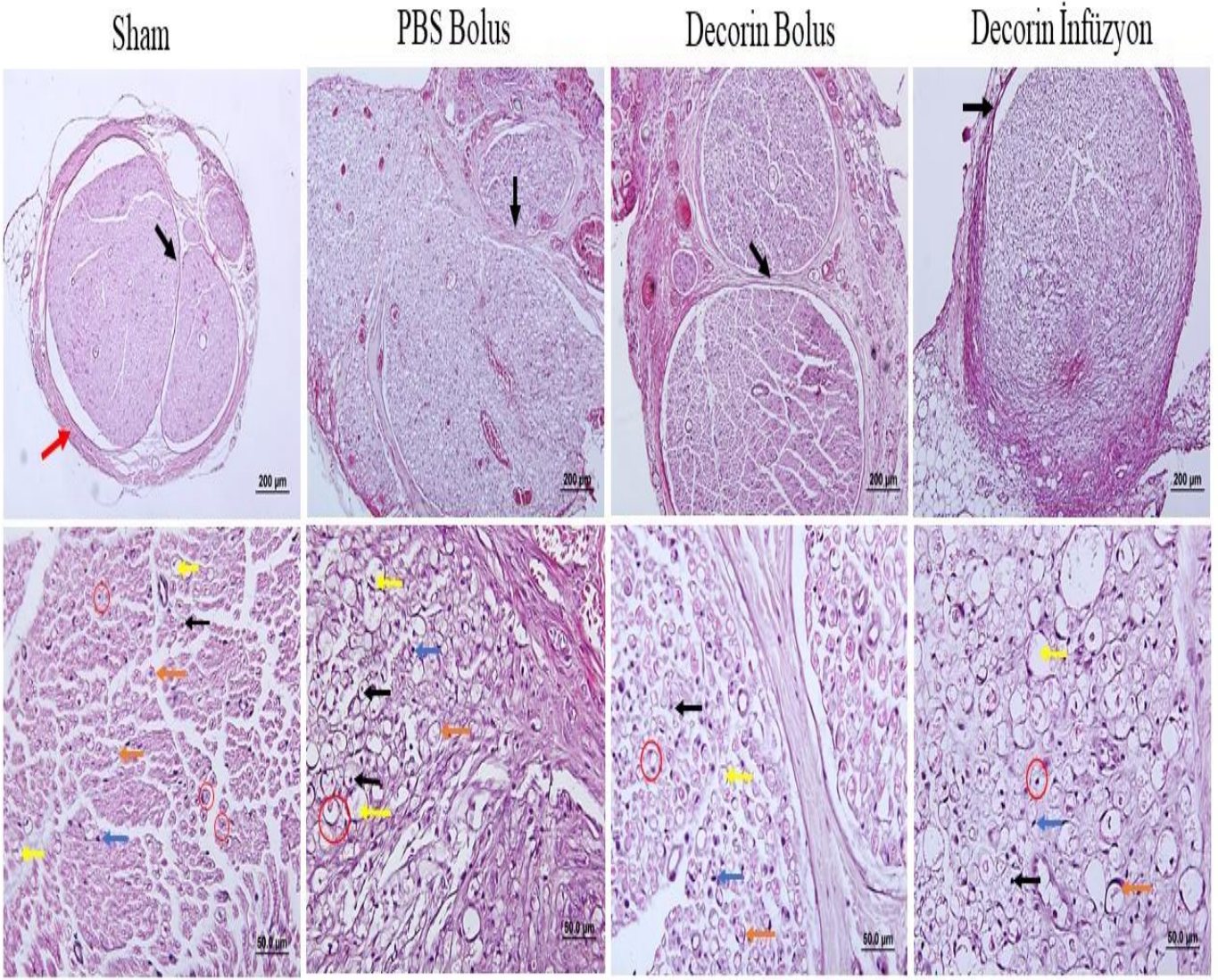
Bütün gruplar kendi içerisinde yara iyileşmesi, fibrozis, akson sayısı, perinörium kalınlığı, immunhistokimyasal boyama için kullanılan kollajen 1, fibronektin, laminin ve ED-1 açısından değerlendirildi. Yapılan puanlama sonrası sonuçlar ve standart sapma bir arada verildi. (Tablo 6) Elde edilen veriler istatistiksel analiz edildi.

Tablo 8. Puanlama sonrası sonuç tablosu

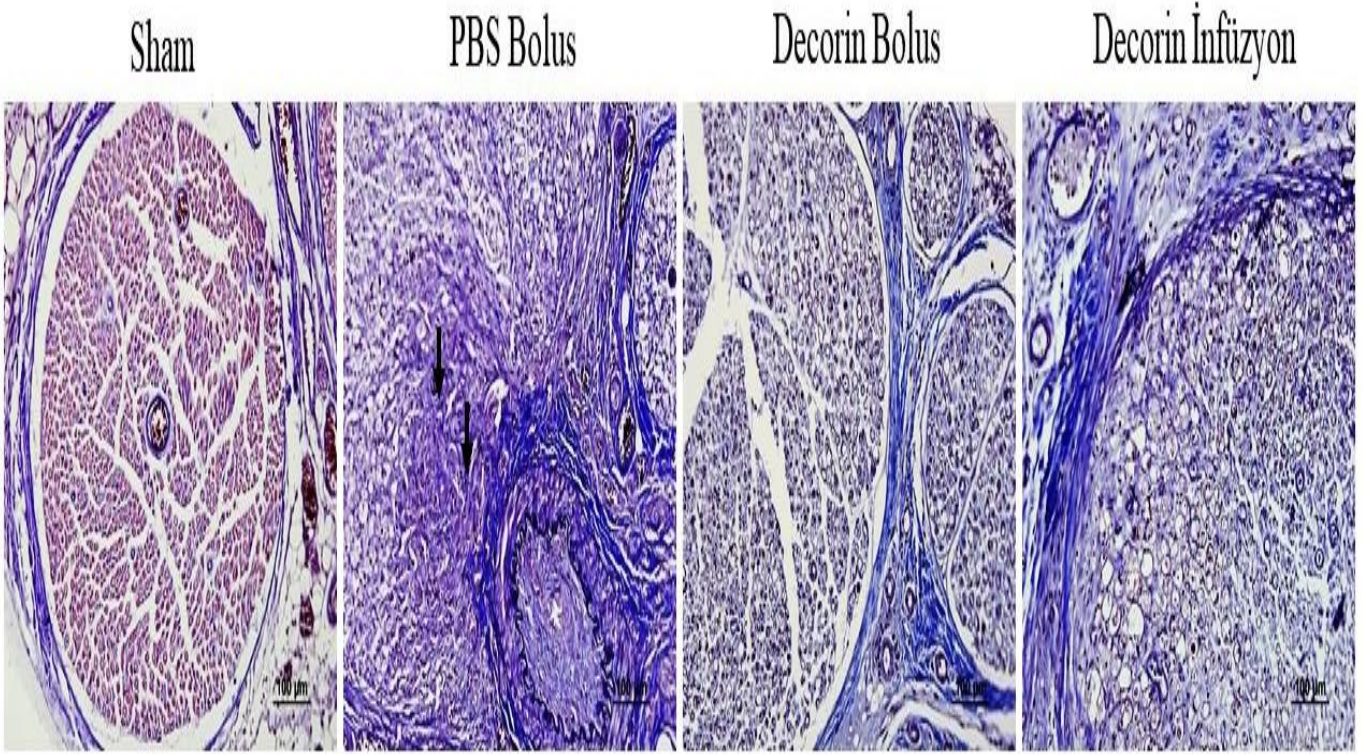
Gruplar Değerler	Sham	Pbs Bolus	Dekorin Bolus	Dekorin İnfüzyon
Yara iyileşmesi	0	3,83±0,4	1,66±0,51	2,5±0,54
Fibrozis	0	3,16±0,4	1,33±0,51	2,16±0,40
Akson sayısı	31,66±1,63	15,5±1,64	24±1,78	21,3±1,50
Perinöryum kalınlığı	6,16±1,16	17,16±1,72	8±0,89	11,66±1,63
Kollajen 1	114±1,67	350,5±1,87	250,5±1,87	265,5±1,04
Fibronektin	111±1,47	357,6±6,05	248,3±4,36	265±1,89
Laminin	131±4,16	347,5±3,39	243,1±4,62	249±3,63
ED-1	100±1,21	333,6±3,07	224,3±3,72	242±5,31

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

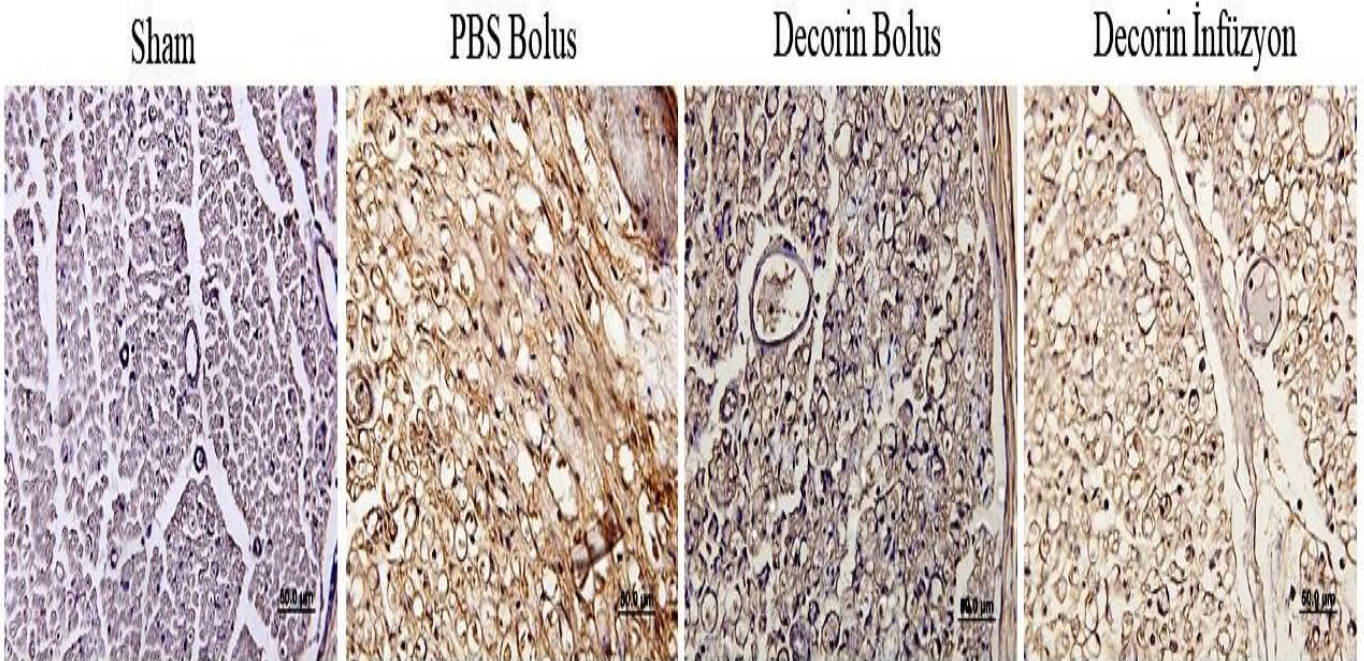
Kollajen-1 ile yapılan işlemde Sham grubunda boyanma değeri 114, Pbs bolus grubunda 350,5, Dekorin bolus grubunda 250,5, Dekorin infüzyon grubunda ise 265,5 olarak ölçüldü. (Resim 28) Fibronektin için Sham grubunda boyanma değeri 111, Pbs bolus grubunda 357,6, Dekorin bolus grubunda 248,3, Dekorin infüzyon grubunda ise 265 olarak ölçüldü. (Resim 29) Laminin için Sham grubunda boyanma değeri 131, Pbs bolus grubunda 347,5, Dekorin bolus grubunda 243,1, Dekorin infüzyon grubunda ise 249 olarak ölçüldü. (Resim 30) ED-1 için Sham grubunda boyanma değeri 100, Pbs bolus grubunda 333,6, Dekorin bolus grubunda 224,3, Dekorin infüzyon grubunda ise 242 olarak ölçüldü. (Resim 31). Sham grubuna en yakın değerler Dekorin bolus grubunda saptandı. Dekorin bolus ve infüzyon grubu histolojik olarakta Pbs bolus grubuna göre daha iyi sonuçlar verdi. (Tablo 8)



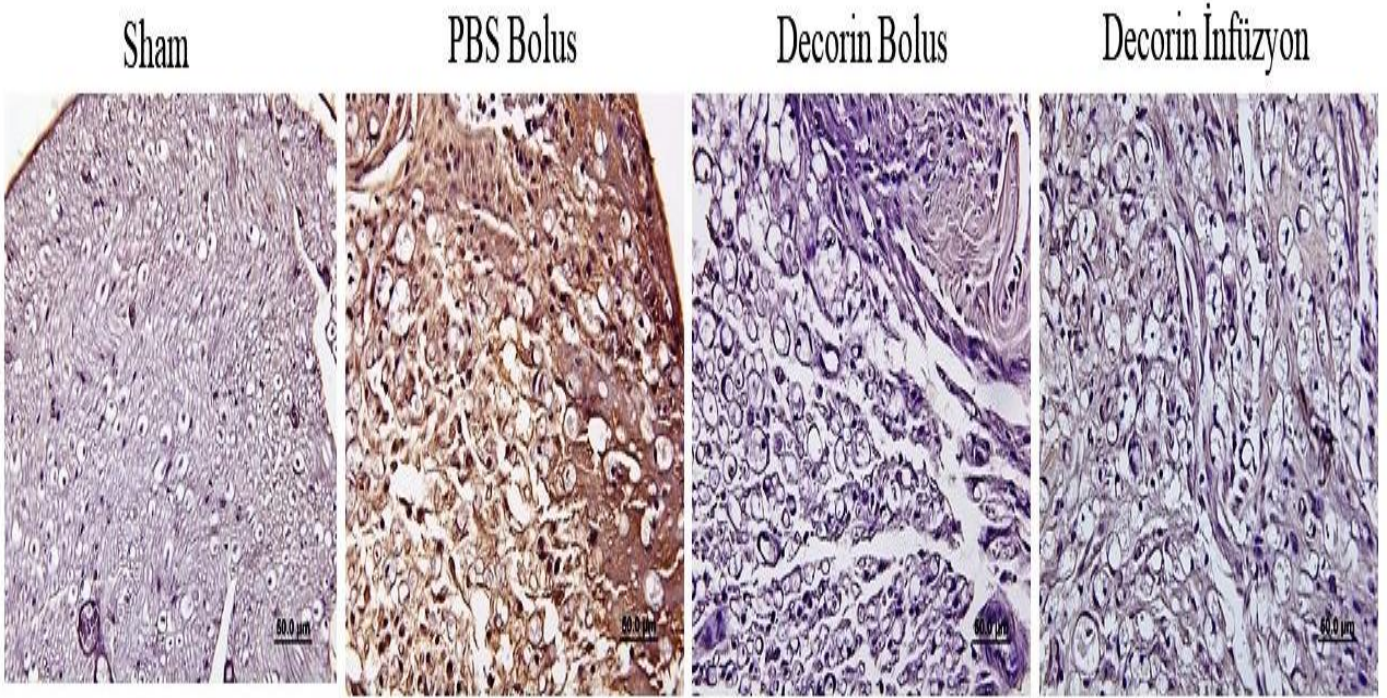
Resim 26. Gruplara ait H&E boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. Kırmızı kalın ok: Epinöryum, Siyah kalın ok: Perinöryum, Kırmızı Daire: Sinir fibrili, Siyah ince ok: Akson, Sarı ok: Miyelin kılıf, Turuncu ok: Endonöryum, Mavi ok: Schwann hücresi



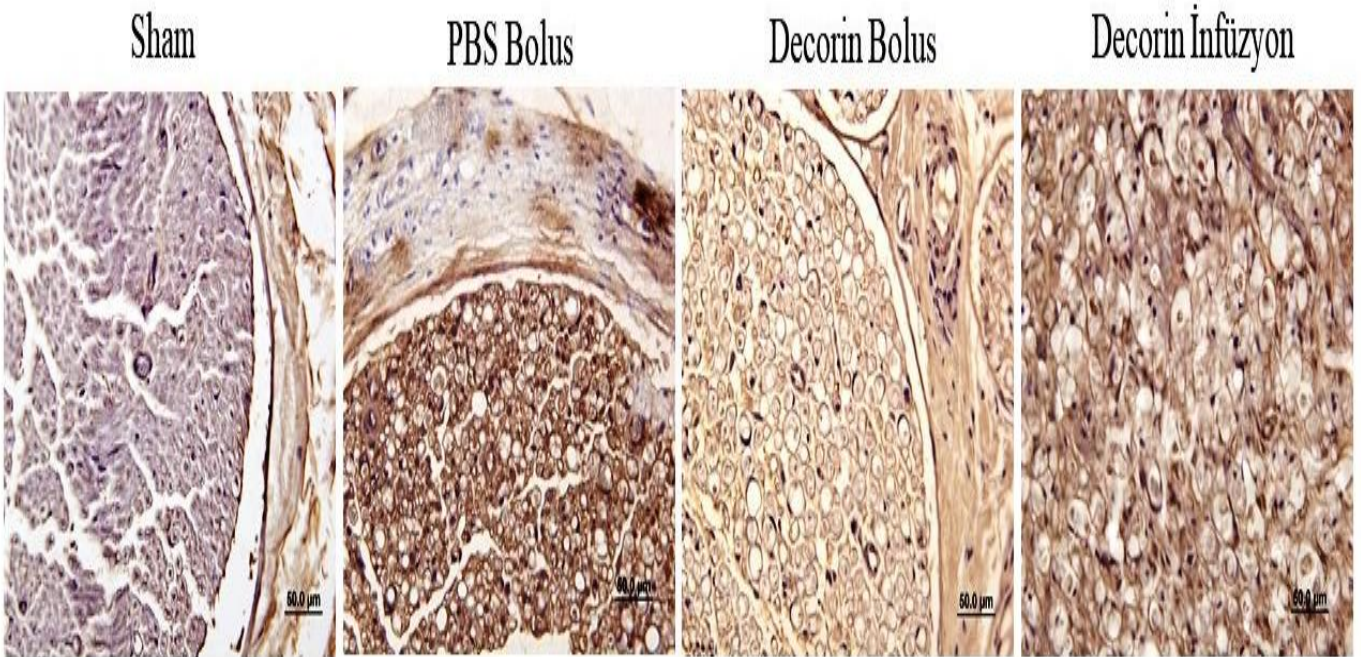
Resim 27. Gruplara ait Masson Trikrom boyanmasının ışık mikroskopik görüntüsü. Oklar: Artmış fibrozisi göstermekte.



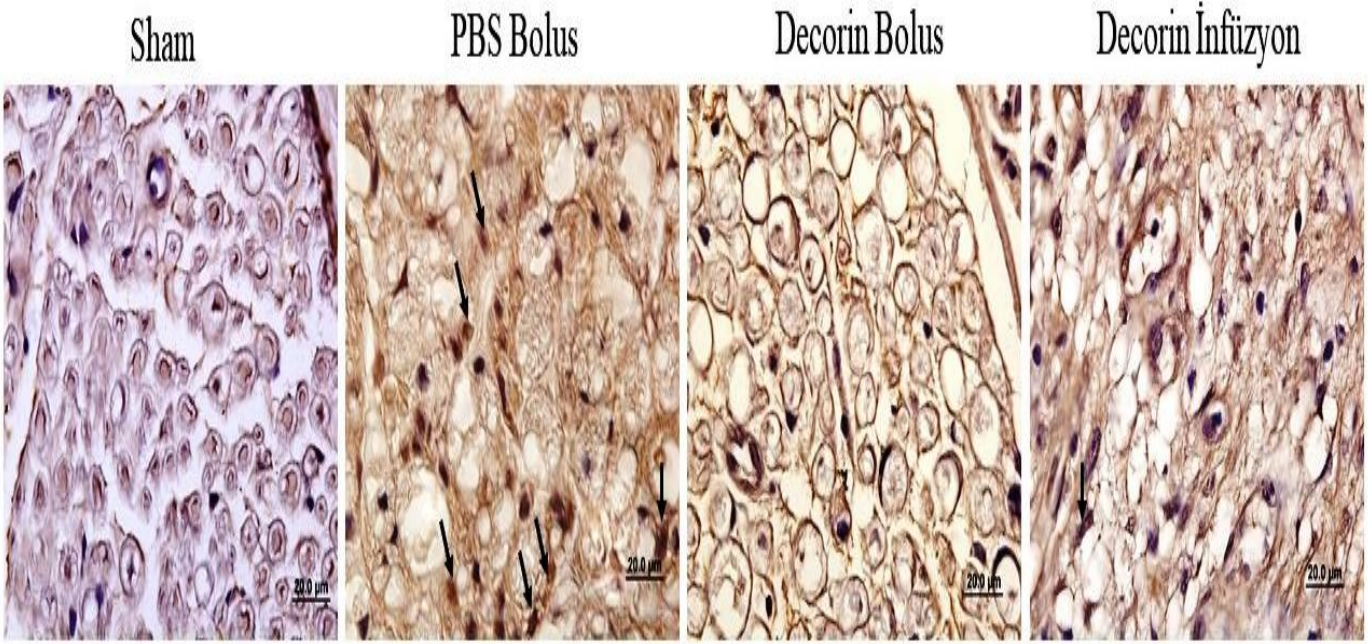
Resim 28. Gruplara ait Kollagen 1 immunohistokimyasal boyaması.



Resim 29. Gruplara ait Laminin immunohistokimyasal boyaması.



Resim 30. Gruplara ait Fibronektin immunohistokimyasal boyaması.



Resim 31. Gruplara ait ED1 immunohistokimyasal boyaması. Oklar immunpozitif makrofajları göstermekte.

Sham grubu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında bütün değerlerde istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı. ($p < 0,05$) Dekorin bolus ve infüzyon grubu Pbs bolus grubu ile karşılaştırıldığında bütün değerler istatistiksel olarak iyileşme ve fibrozisi azaltma açısından anlamlı idi. ($p < 0.05$) Dekorin bolus ve infüzyon karşılaştırmasında sırasıyla değişkenler değerlendirilecek olursa yara iyileşmesi ($p=0,03$), fibrozis ($p=0,018$), akson sayısı ($p=0,029$), perinöryum kalınlığı ($p=0,006$), kollajen 1, fibronektin, ED-1 ($p=0,004$), laminin ($p=0,023$) olarak saptandı. Bütün parametrelerde bolus uygulama infüzyona üstün geldi.

5. TARTIŞMA

Periferik sinir hasarına sebep olan travmalar her yıl Avrupa'da 300,000 kişiyi etkilemektedir.⁷⁹ Tüm üst ve alt ekstremitte yaralanmalarında %2-2,8 oranında sinir yaralanması saptanmaktadır.⁸⁰ Travmaların meydana geldiği yaş aralığı çoğunlukla aktif çalışan 18-45 yaşında genç erişkinlerdir. Bu da toplumda iş gücü kaybı, şahıs için ekonomik kayıp oluşturmaktadır.⁸¹ Gelişmelere karşın periferik sinir onarımı sonrasında duysal ve motor fonksiyon geri dönüşümü hala yeterli değildir. Öyle ki yapılan çalışmalarda izole üst ve alt ekstremitte sinir yaralanması olan ve fonksiyonel olarak kendilerini iyi veya mükemmel olarak değerlendirenler üst ekstremitte için %75, alt ekstremitte için %67 dolaylarındadır.⁸²

Periferik sinir hasarlanması etiyolojisinde gerilme ve avülziyon, kompresyon, ezilme, penetran yaralanmalar görülebildiği gibi iskemi, enfeksiyon, iyonizan radyasyon, yanık gibi sebeplerle de yaralanabilir. Penetran yaralanmalarda kendi içerisinde keskin, künt, patlayıcı ve elektrik nedenli olarak dörde ayrılır. Bu etiyolojik nedenlerden herhangi biri nedeniyle meydana gelen yaralanma sonrasında sinir hücre gövdesi ile akson arasında antegrad ve retrograd aksoplazmik transport, nörotransmitter akışı sekteye uğrar. Bu yaralanma hızlı bir şekilde iyileştirilebilecek düzeyde ise durum eski haline döner; ancak geri dönüşü olmayan şekilde bir yaralanma ise sinirin hasarlı alanın proksimalinde ve distalinde programlı hücre ölümü meydana gelir.⁴

Özellikle dışarıdan müdahale edilmediği takdirde, kendiliğinden iyileşme olmayan Sunderland evre 4 ve 5 periferik sinir yaralanmalarında onarım sonrası ortaya çıkan fibrozis, skar dokusu, adezyonlar aksonal iletimi engellemektedir. Retrograd veya anterograd yönde iletimi gerçekleştiremeyen sinirler hayat boyu non-fonksiyonel halde kalmaktadır. Hem sinir iyileşmesinin basamaklarının öğrenilmesi açısından hem de sayılan istenmeyen durumların azaltılması açısından literatürde oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır.⁹⁻¹²

Periferik sinir yaralanmaları sonrası meydana gelen iyileşme yaralanma ile hastaya bağlı faktörler tarafından etkilenmektedir. Yaralanmanın tipine, seviyesine, yapılan onarım şekli, zamanlaması, onarımda kullanılan materyal, sinirde defekt olup olmaması, sinir grefti veya konduit kullanılması, hastanın yaşı, cinsiyeti, ek hastalıkları, kullandığı ilaçlar ve sigara gibi multifaktöryel sebeplerle değişim göstermektedir.⁸³

Yapılan bir meta-analizde ulnar ve median sinir yaralanmaları sonrası onarım yapılan makaleler çalışmaya dahil edilmiş. Motor ve duyu fonksiyonlarında iyileşme oranı skalalara göre değerlendirilmiş. Motor iyileşmeyi etkileyen faktörler yaş, onarıma kadar geçen süre, hangi sinirin hasar gördüğü ve yaralanmanın seviyesi iken, duyu iyileşmesini etkileyen faktörler yaş ve onarıma kadar geçen süre olarak saptanmıştır.⁸⁴

Periferik sinir cerrahisi için oluşturulan hayvan modelleri kemirgenler ve kemirgen olmayanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Deneylerde kemirgenlerden fare, rat, hamster ve kobay kullanılırken, kemirgen olmayanlar sınıfında tavşan, maymun, kedi, köpek, domuz, koyun ve at kullanılmaktadır.⁸⁵

Kolay bulunabilir olması, bakımının sorunsuz ve ucuz olması, kafeslerde toplu olarak yaşatılabilmesi, cerrahi sonrası enfeksiyonlara dayanıklı olması nedeniyle sinir cerrahisinde en çok ratlar kullanılmaktadır.^{85,86}

Hayvan modellerinde sinir olarak en çok siyatik sinir tercih edilmektedir.⁸⁵ Kemirgenlerde en büyük sinir olması, mikrocerrahi olarak tutuş ve onarımını kolaylaştırmaktadır.⁸⁶ Peroneal, tibial, radial, median ve ulnar sinirlerde deneylerde kullanılabilir. Özellikle ön bacağın küçük olması, ileri mikrocerrahi alet ve deneyim gerektirmesi nedeniyle siyatik sinir dışındaki sinirler nadiren tercih edilmektedir.⁸⁷

Oluşturulacak hasar modeli çalışmanın amacına göre dizayn edilmektedir. Aksonotmezis modeli, sinir rejenerasyonu basamaklarını araştırmak ve nöropatik ağrıda geliştirilen yeni farmakolojik ajanların denenmesi için seçilebilirken, nörotmezis modeli ise tedavi amaçlı yapılan girişimlerin ve uygulamaların pre-klinik değerlendirmesi amacıyla tercih edilmektedir.⁸⁸ Hayvanların tür, cinsiyet, yaş, ortalama ağırlık ile yaralanma şeklinin ve seviyesinin standardize edilmesi deneysel çalışma verilerinin karşılaştırılması açısından önemlidir.

Bizim çalışmamızda standardizasyon için aynı yaş, cinsiyet ve ağırlıkta Sprague-Dawley rat kullanılmıştır. Penetran bir travma olan tam kat laserasyon ile nörotmezis modeli oluşturulmuştur. Bütün deneklerde siyatik sinir, proksimalde m.piriformis kası altından ve foramen ischiadicum majustan geçtikten 1-1,5 cm sonra distalde ise dallanma noktasından 1-1,5 cm önce kesilmiştir.

Sinir yaralanmalarının sınıflandırmasında dünya genelinde Seddon ve Sunderland sınıflandırmaları kullanılmaktadır.^{19,20} Bu sınıflandırmalara göre özellikle Seddon tip 3 ve Sunderland tip 4-5 yaralanmalar nöropraksinin ötesinde tam kat sinir yaralanmalarını içermektedir. Bu düzeyde bulunan yaralanmalar vücudun kendi iyileşme kapasitesinin üzerindedir. Bu yüzden; yaralanan sinir uçları uç-uca veya çok tercih edilmemekle birlikte uç yan olacak şekilde sütüre edilerek, proksimal ve distal uçlar arasında bütünlük sağlanmalıdır. Bu bütünlük sayesinde aksonlara uzaması için yol gösterilebilir.

Çalışmamızda, yaralanma sonrası en çok tercih edilen mikrocerrahi yöntem olan uç uca koaptasyon yapılmıştır.⁸³ Onarım zamanlaması ise ilk 24 saat içerisinde olduğundan erken primer onarıma örnek oluşturmaktadır.

Periferik sinir hasarlanması sonrasında Schwann hücreleri ve epinöryum-endonöryumda bulunan fibroblastik hücreler harekete geçer. İlk 24-96 saat içerisinde hem çevredeki hem de kan dolaşımında bulunan makrofajları yaralanma sahasına çekerler. Bu hücreler miyelin yıkılımı ve fibrozis sırasında meydana gelen kollajen depolanmasından sorumludurlar.⁸⁹

Sonuç olarak oluşan adezyonlar epinöryum ve çevresinde ise ekstrasöral fibrozis, endonöryumda ise intranöral fibrozis olarak adlandırılır.⁹⁰ Adezyon sonucunda gerilen kollajen lifleri ekstremitte hareketi sırasında eş zamanlı sinir hareketini engeller.

Ortaya çıkan traksiyon ve bası sinirde iskemi ve fonksiyon kaybına sebep olur; ancak onarıma rağmen hayvanlarda yapılan çalışmalarda periferik sinir yaralanmasına bağlı olarak duyu ve motor nöronların spinal ganglionlarında dejenerasyon ortaya çıktığı bununda fonksiyon kaybını arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur.^{91,92}

Adezyonları azaltmak ve sinir fonksiyonlarını arttırmak amacıyla çeşitli cerrahi teknikler⁹³ ve ajanlar⁹⁴ denenmiştir. Yapılan bir çalışmada siyatik sinire fırça ile abrazyon hasarı oluşturulmuş, sonrasında mitomisin C ve daunorubisin topikal olarak uygulanmış. Uygulama epinöral skara etkili saptanmış ve ilaçlara bağlı yan etki belirtilmemiştir.⁹⁴ Diğer bir çalışmada, eksternal nöroliz, abrazyon ve koaptasyon işlemleri yapılan siyatik sinirlerin çevresine aprotinin emdirilmiş kollajen iskele yerleştirilmiş ve epinöral skara etkili olduğu saptanmıştır.⁹⁵ Benzer şekilde periferik sinir travma modelinde karbonhidrat polimer jelin (Adcon-T/N) oluşan ekstrasöral skarı azalttığı gösterilmiştir.⁹⁶

Ayrıca, literatürde insan amniotik sıvısı içerdiği büyüme faktörleri nedeniyle siyatik sinir hasarı sonrasında tedavi amacıyla kullanılmış. Amniotik sıvı amniosentez materyalinden elde edilmiş. Absorbe olan jelatin sünger içine 0,3 ml amniotik sıvı emdirilerek uygulama yapılmış. Amniotik sıvının, ekstraselüler fibrozisi azaltmasının yanında, hem fonksiyonel hem de histolojik olarak rejenerasyonu arttırdığı ortaya konmuştur⁹⁷; ancak klinik uygulama için humoral cevabın detaylı bir şekilde araştırılması gerektiği vurgulanmıştır. Görüldüğü kadarıyla, yapılan çalışmaların bir kısmı kompresyon, abrazyon modeli oluşturmuş, bir kısmı da ekstraselüler fibrozisi azaltmaya yönelik tedaviler uygulamıştır.

Özellikle oluşturulan deney modellerinde adiposit kaynaklı kök hücrelerin fibrozisi azaltmada schwann hücresi benzeri hücrelere dönüşerek etkin rol oynadığı gösterilmiştir.⁹⁸ Yapılan çalışmalar sonucu, ekstrasellüler matrikste cilt, iskelet kası ve periferik sinirlerde tip 6 kollajenin yapısal bütünlük ve etkin işlev için olmazsa olmaz yapıtaşlarından biri olduğu saptanmıştır; ancak yaralanma sonrasında periferik sinirlerde hasarlanma alanında makrofajlar birikerek tip 4 kollajen miktarını arttırmakta ve oluşan fibrotik skar aksonal rejenerasyona engel oluşturmaktadır. Bu yüzden sistemik veya lokal olarak uygulanan ilaçlarla hasarlanan sinirlerde bir şekilde bu kollajen depozisyonunun önlenmesi gerekmektedir.

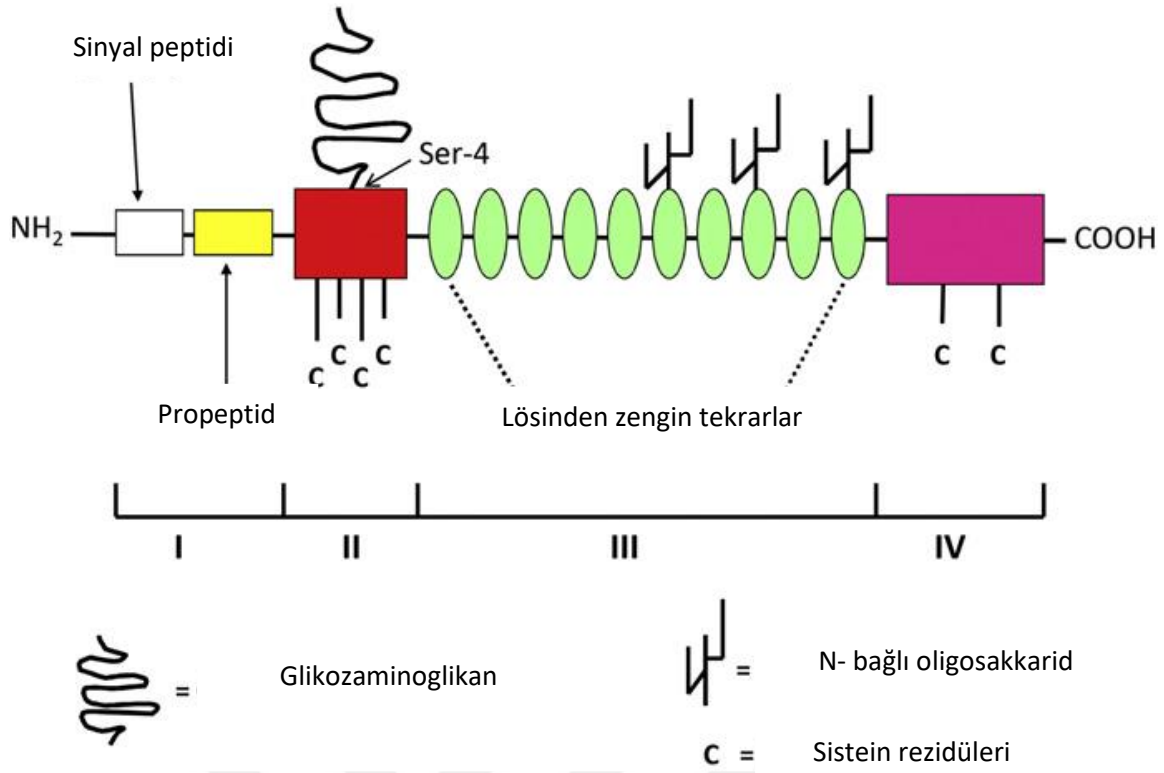
Başka bir çalışmada makrofajların aktive ettiği fibroblastların başlattığı kontrolsüz kollajen tip 1 oluşumu skar oluşumuna neden olduğu; bunun çözümü için fibroblast aktivitesini baskılayan lokal siklosporin uygulaması denenmiştir.⁹⁹ Bu kalsinörin inhibitörü olan ajanın kullanımı, bir başka immünsüpresan molekül olan takrolimusun fibrozisi engellemede etkin olmasının gösterilmesi üzerine gerçekleştirilmiştir.¹⁰⁰ Bu ajanlar T hücre aktivasyonunu engellemektedir. Böylece bu hücrelerden salgılanan pro inflamatuvar IL-2, IL-3, IL-4 salgılanamamaktadır. IL-4 ekstrasellüler matriks proteinlerinden kollajen 1, 4 ve fibronektini oluşmasını aktive eden oldukça potent fibrotik bir ajandır. Yan etkilerini azaltmak adına lokal siklosporin ile yapılan bu çalışmada fibrozis azaldığı gösterilmiştir.¹⁰¹ Görüldüğü üzere skar oluşumunda çoklu basamaklar, çok çeşitli pro-inflamatuvar ajanlar, yapısal ECM proteinleri önemli yer tutmaktadır.

Kollajen, fibroblastlar tarafından üretimi düzenlenen skarın ana komponentlerinden biridir. Skar oluşumunun patogeneğinde yatan temel mekanizma kollajenin sentezi ve degradasyonu arasındaki dengedir.¹⁰² Kollajen üç polipeptid zincirinden oluşan bir moleküldür. Kollajen molekülleri arasında bulunan çapraz bağlar ECM'nin stabilitesini ve gücünü sağlar.¹⁰³

Skar dokusu tip 1 ve tip 3 kollajenin fibroblastlar tarafından aşırı sentezlenmesi ve depozisyonu ile karakterizedir.¹⁰⁴ TGF- β 'nın memelilerde üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlar TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 tür. TGF- β 1 ve β 2 memeli dokularında doku fibrozisinden temel sorumlu olan sitokinlerdir.^{105,106} TGF- β 3 ise anti-fibrotik etkinlik göstererek skar dokusunu azaltmaktadır.¹⁰⁷ TGF- β sinyali sonrası etkinlik membran reseptörü tip 2 (T β RII) ile bağlanmasıyla başlar. Sonrasında T β RII, serin/treonin kinaz kompleksi oluşturur. Bu da Smad kaskadını başlatır. Smad2 ve Smad3 fosforilasyonu sonrasında Smad4 ile kompleks oluşturur. Bu kompleks çekirdek içerisine geçecek olan transkripsiyon faktörünün translokasyonuna neden olarak kollajen tip 1,2 ve 7 sentezini arttıracak olan genlerin okunmasını sağlar. Tüm bunlar anormal skar formasyonu ve patolojik kollajen liflerinin oluşumuna neden olur.^{108,109}

Proteoglikanların alt grubu olan küçük lösinden zengin proteoglikanlar (SLRP) matriks organizasyonunda ve hücre büyümesinin regülasyonu ve sinyalizasyonunda önemli rol oynarlar. Dekorin, dermatan sülfat yan zincir içeren bir proteoglikandır.^{110,111} (Şekil 32,33) SLRP'ler içerisinde en fazla anti-fibrotik etkinliği bulunan molekül dekorindir. Literatürde, periferik sinir hasarlanması sonrasında ortaya çıkan ektranöral ve intranöral fibrozisi ortadan kaldırmaya yönelik dekorin kullanımına rastlanmamıştır. Bu yüzden çalışmamızda dekorin molekülü tercih edilmiştir.

Dekorin kor proteini içerisinde dört adet ayrı domain bulunmaktadır. İlk domain 14 aminoasitlik sinyal peptidi ve 16 aminoasitlik pro-peptid yapısından oluşur, dekorin salınmadan önce bu kısımlar kesilir. İkinci domain sisteinden zengin glikozaminoglikan (GAG) yan zincir taşıyan kısım. Üçüncü domain lösinden zengin parça 24 aminoasitten oluşan (çoğunluğu lösin) 10-12 tekrar içeren bölgedir ki bu kısım dekorine üç boyutlu yay şeklinde bir yapı kazandırmaktadır.¹¹²⁻¹¹⁵ Dördüncü domain kor proteini olup iki sistein rezidüsü ve disülfid sarmal içeren karboksi terminal parçadır.



Şekil 32. Dekorin molekülünün şematik hali¹¹⁵



Şekil 33. Dekorin molekülü üç boyutlu yapısı¹¹⁵

Hem kor proteini hem de GAG zinciri dekorinin ayrı etkilerini ortaya çıkarmaktadır. Kor proteini ErbB reseptör tirozin kinaz ailesinin aktivitesini inhibe ederek tümör gelişimini inhibe eder. GAG yan zincir ise intrasellüler asidifikasyon ile düz kas hücreleri ve melanoma hücrelerinin migrasyonunu engeller.^{116,117}

Dekorin molekülünde bulunan bir tek GAG zinciri memeli hücrelerinde büyüklük ve içerik açısından heterojeniteye neden olmaktadır.⁵⁵ Aslında molekülün etkinliğinin büyük kısmı GAG parçası olmadan gerçekleşmektedir. Büyüme faktörleri ve reseptörler ile etkileşimler kor proteini ile olmaktadır. GAG bağlanması için önem arz eden serin rezidülerini rekombinant sentez sırasında mutasyona uğratarak dekorin sentezlenebilir.¹¹⁸ ve bu durum klinik kullanımının önünü açabilir. Bu hedefe ulaşabilmek adına GAG içermeyen dekorin kor proteinleri üretilmiştir.^{119,120} Bu geliştirilmiş protein küçük bir peptid ile kombine edilerek sistemik uygulanan dekorinin taşınmasını ve hedef alanda etki göstermesini sağlamaktadır. Bu peptid “CAR” olarak isimlendirilmekte ve tümör dokusunun damarları ile rejenere olan dokularda bulunmaktadır. CAR peptidi ile birleşen dekorin TGF- β salınımını daha güçlü bloke etmektedir. Bunun sebebi, peptidin hücrede bulunan ve TGF- β ’nın biyolojik aktivitesini arttıran heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanmasıdır.¹²¹ Bu sayede akciğerler, infarktüs sonrası myokard dokusunda bulunan mezenkimal kök hücreler gibi farklı dokular hedef alınarak başarılı tedavi modelleri oluşturulmuştur.¹²²⁻¹²⁴ Bu yüzden ileride yapılan çalışmaların doz-zamanlama ile anti-fibrotik, anti-kanser, anti-anjiogenik etkinlik arasında bulunan bağlantıya odaklanması gerekmektedir.

Literatüre bakıldığında CAR peptidi ile benzer şekilde bir aracı ile birlikte dekorin uygulamasının etkinliği arttırdığına yönelik veriler mevcuttur. Örneğin korneaya uygulanan amniotik membrana (AM) alternatif oluşturabilmek adına hücre kültürü çalışmasında korneal fibroblastlara yedi gün boyunca TGF β -1 eklenerek myofibroblast haline gelmeleri sağlanmış. Sphingomonas elodea bakterisi tarafından üretilen sulandırılmış jel (Gellan sakızı) içerisinde dekorin eklenerek ve eklenmeden karşılaştırılmış. Dekorinin topikal kullanımını kolaylaştırmak adına suda çözünen anyonik polisakkarid içerisinde kontrollü salınımı sağlanmış.¹²⁵ Sonuç olarak, skar azalması anlamlı şekilde artmış olarak saptanmış.

Dekorinin anti veya pro-anjiogenik olması dokunun fizyolojik ve patolojik durumuna bağılı olarak değişmektedir.¹²⁶ Dekorin kollajen lif formunu düzenlemektedir. Tip 1 kollajen lifleri endotelin apikal kısmı ile temas ederek vasküler tüp formunun oluşması için temel görevi görmektedir. Böylece anjiogeneze yol gösterici ve başlatıcı rol üstlenmektedir. Kollajen lifleri ile sarılan dekorin proteolitik ataklara karşı da direnç kazanmaktadır böylece daha stabil bir kollajen ağı sistemi oluşmaktadır. Dekorin kor proteini MMP-1 aktivitesi anjiogeneze yüksek oranda aktif olan kollajenaz aktivitesi gösterebilir.^{127,128} Bu proteaz VEGFR2 ekspresyonunu protez aktive edici reseptör-1 (PAR-1) ve nükleer faktör- κ B(NF- κ B) stimüle ederek artırır.¹²⁸ Ayrıca MMP-2 yi de aktive ederek bazal membran oluşumunda temel olan tip 4 kollajen yıkımına sebep olur. MMP-1 ve 2 vasküler proliferasyonu arttırmaktadır. Bunun yanında dekorin TIMP-2 ve TIMP-3 aktivitesini arttırarak angiogenezi azaltabilir

Dekorin anti-fibrotik etkisi ile yanık sonrası oluşan hipertrofik skarlarda yararlı etki oluşturmuştur.¹²⁹

Literatürde yapılan diğer bir çalışmada oluşturulan femur fraktürü sonrası osteomyelit modelinde dekorin molekülü operasyon sonrası 0, 1 ve 2. günlerde fraktür çevresinde bulunan kas dokusuna intramuskuler olarak 50 μ g dozunda uygulanmıştır.

Operasyon sonrasında 14. ve 28. günlerde alınan kas örneklerinde dekorin verilen grupta TGF β 1, pSmad2, pSmad3 ve tip 1 kollajen sentezinde anlamlı azalma saptanmış böylece osteomyelitte meydana gelen kas hasarlanmasının dekorin tarafından azaltıldığı ifade edilmiştir.¹³⁰ Buna ek olarak çalışmada dekorin etkinliğinin denekler arasında değişiklikler gösterebileceği söylenmiş, anti-fibrotik etkinin doz ve zaman bağımlılığı olduğu sonucuna varılmıştır.

Bizim çalışmamıza da temel oluşturan bir hayvan modeli çalışmasında yaralanma sonrası 10. ve 15. günlerde intramuskuler olarak 5,25 ve 50 μ g dekorin enjeksiyonu yapılmış. Uygulama sonrası analizlerde 25 ve 50 μ g arasında anti-fibrotik etkinlik açısından anlamlı fark saptanmamış.¹³¹ Bizde dekorin molekülünü etkinlik gösterdiği minimum doz olarak belirtilen 25 μ g dozunda lokal olarak kullandık. İlaç uygulamasını bolus ve osmotik pompa ile uzun salınımlı olacak şekilde gerçekleştirdik.

Bir diğerk hücre kültürü çalışmasında dekorin ile kaplanmış titanyum (Ti) polidopamin yüzeyin osteosarkom hücre proliferasyonunu, invazyonu ve migrasyonu inhibe ettiğı bunun yanında pre-osteoblastları inhibe etmediğini ortaya koymuştur.¹³² Serbest verilen dekorin yerine Ti-DOPA yüzey üzerinde immobilize edilmiş dekorinin uygulanması etkinliğini arttırmış.

Bu durum literatürde serbest enzim ile bağı enzim etkinliğinin karşılaştırılması ve bağı enzim aktivitesinin serbest olana göre daha uzun zamana yayıldığı ile açıklanabilmiştir.¹³³ Bağı dekorinin yarı ömrü, serbest dekorine daha uzun olabileceğı üzerinde durulmuştur.

Çalışmamızda dekorin uzun salınımlı etkisini taklit etmek adına osmotik pompa ile sinirde suture hattı üzerine lokal uygulama gerçekleştirildi. Dekorin infüzyon grubu rotarod testinde iyi performans göstermesi ve gastrocnemius ağırlık kaybı (atrofi) açısından faydalı gözükmeyle birlikte özellikle open-field testinde alınan mesafe açısından en kötü grup olmuştur. Bunun sebebi konulan osmotik pompanın mekanik etkisi ile yürümenin ağrıyı tetiklemesi olabilir. Sonuç olarak bütün veriler ışığında infüzyon grubunun bolus olarak serbest dekorin uygulamaya bir üstünlüğü gösterilememiştir.

Malign periferik sinir kılıfı tümöründe (MPNST) ise dekorin ekspresyonu pozitif olanlarda 5 yıllık sağkalım %78,5 iken dekorin negatif olanlarda sağkalım %18,75 olarak verilmiş, bu yüzden güvenilir prognostik biomarker benign-malign ayrımında kullanılabileceğı öne sürülmüştür.¹³⁴ Literatür ışığında bakacak olursak tüm bu anti tümöral etkinliğe karşın çalışmamızda dekorin bolus grubunda bir denekte daha fazla olmakla birlikte tüm deney grubunda yumuşak doku, kas ve sinir çevresinde nodüler kitle oluşumları dikkat çekicidir; ancak histolojik incelemede bu oluşumlarda tümör hücresine rastlanmamış olup yabancı cisim reaksiyonuna benzer non-spesifik granümatöz reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. (Şekil 31)

Dekorin molekülünün nöral doku üzerinde yapılan çalışmalarının büyük kısmı beyin ve spinal kord üzerinde yapılmıştır. Temel olarak hayvan modellerinde, beyinde kafa travması sonrası gelişen travmatik beyin hasarının azaltılması, post-hemorajik ventriküler dilatasyonun nörolojik defisitlerinin önlenmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Spinal kord da laminektomi sonrası gelişen fibrozis önlenmesinde kullanılmıştır.

Santral sinir sisteminde travma sonrası mikroçevre birtakım akson büyümesinin inhibitörleri olan nörokan, fosfokan, brevikan, NG2¹³⁵, kondrotin sülfat proteoglikanları, semaforin 3A ve efrin B3¹³⁶, astrositlerleri, oligodendrosit progenitör hücreleri (synantosit), fibroblastı ve lökositleri içermektedir.¹³⁷

Miyelin kökenli nogo faktör, miyelin ilişkili glikoprotein (MAG), oligodendrosit kökenli glikoprotein (OMgp) yaralanma çevresinden miyelin yıkımı sırasında salınmaktadır.^{138,139} Bu ligandların bağlandığı reseptörler ile Rho/ROCK sinyal yolağı aktive olmaktadır. Akson büyüme plağında aktin polimerizasyonu bu faktörler nedeniyle sekteye uğrar, aktive olan sinyal yolakları nedeniyle SSS’de akson büyümesi durur.¹³⁹

Yapılan bir çalışmada, oluşturulan travmatik beyin hasarı modelinde 0,01 mg/kg intraperitoneal olarak dekorin uygulanan grupta lipid peroksidasyon göstergesi olan malonyl-dialdehid (MDA) metaboliti, peroksinitrit (NOO-) oluşumunda rol oynayan nitrik oksit (NO), kaspaz-3 aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış saptanmış, bunun yanında antioksidan olan glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz aktivitesinde artış saptanmıştır. Dekorin böylece beyni oksidatif stresten koruma fonksiyonu göstermiştir.¹⁴⁰

Mekanizma olarak travma sonrası salınan TGF- β 1, reaktif oksijen radikalleri (ROR) oluşturan enzimler ve NADPH oksidazın etkisini arttırarak proteinleri ve bağların parçalanmasını arttırdığı, indirekt olarak artan MMP’ler kaspaz-1/3 ve IL-1 β salınımını arttırarak apopitoz ve nöroinflamasyona sebep olduğu ifade edilmiştir. Ek olarak, TGF- β 1 tarafından aktive edilen smad yolağı, mitojen aktive protein kinaz yolağı, Rho-GTPaz yolağı ROR sentezini arttırmış. ROR’da TGF- β 1 salınımını arttırarak içinden çıkılamayan kısır bir döngü oluşturduğu üzerinde durulmuştur.¹⁴⁰

TGF- β 1 ve TNF- α , süperoksid dismutaz (SOD), katalaz, glutaredoksin ve glutamat-sistein ligaz aktivitesini azaltarak glutatyon konsantrasyonunda azalma antioksidan enzimleri azaltarak nöron ölümüne sebep olur.¹⁴¹⁻¹⁴³ Dekorin TGF- β 1 ve TNF- α bağlayarak inaktif hale getirir.¹⁴⁴ Ek olarak T β R-I/II reseptörlerini bloke eder, TGF- β nin aktive ettiği Smad 2/3 kompleksini etkisini oluşmadan ortadan kaldırır. Böylece inflamasyon, oksidatif stres ve apopitozu durdurur.¹⁴⁵

Rekombinant dekorinin kan beyin bariyerini ne ölçüde geçtiği tam olarak bilinmemekle birlikte laserasyon sonrası santral sinir sisteminde skar oluşumunu azalttığı gösterilmiştir.¹⁴⁶

Oluşturulan bir başka deney modelinde yenidoğan ratlarda kanama sonrası ventriküler dilatasyon modeli oluşturulmuş kolşisin farklı gruplara 20 ve 50 µg/kg/gün ve dekorin intraventriküler 4 mg/kg olarak uygulanmış. Yenidoğanlarda nöromotor test negatif geotaksis testi kullanılarak değerlendirilmiş. Dekorin verilen grupta nöromotor gerilikte düzelme saptanmamış.

Bunun sebebi olarak anti-fibrotik etkinliğe karşılık nöral rejenerasyonu sağlayamadığı bu yüzden NGF gibi sinir büyüme faktörlerinin kombine kullanılması ile etkinliğin arttırılabileceği ifade edilmiş. Tekrarlayan intraventriküler enjeksiyon fibrozisi uyardığından ötürü dekorin TGF-β konsantrasyonlarını yeterli miktarda düşürememiştir. Bunun nedeni olarak kanama sonrası ortamda çok fazla platelet olması ve bunlardan salgılanan TGF-β'nin yeterli miktarda dekorin tarafından antagonize edilemediği belirtilmiştir.¹⁴⁷ Enjeksiyonun sinir dokusunda ek olarak fibrozisi uyarabileceği düşüncesinden yola çıkarak çalışmamızda kolay uygulama açısından sinir dokusu üzerine lokal uygulama yapılmıştır.

Laminektomi sonrası skar dokusunu azaltarak fonksiyonel geri dönüşü arttırmak adına dizayn edilen bir çalışmada, bir gruba yalnızca laminektomi yapılmış, diğer gruba laminektomi sonrasında 100 µg/kg dekorin spongostana emdirilerek dura mater üzerine uygulanmış. Son gruba ise spongostana serum fizyolojik emdirilerek yerleştirilmiş. Epidural fibrozis dekorin uygulanan grupta daha az olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁸

Yaptığımız deneysel işlemler, literatürde yer alan bir çalışma temel alınarak dizayn edilmiştir.¹¹⁵ Yukarıda daha önceden belirtildiği üzere çok fazla sayıda çalışma dekorinin farklı dozlarda etkinlik oluşturduğunu göstermiştir. Uygulama yolu açısından bolus tarzda lokal uygulama ve osmotik pompa ile kontrollü salınım karşılaştırılmıştır.

Literatürde, intraperitoneal plazmid ile gen aktarımı¹⁴⁹, intraventriküler¹⁴⁷, intramuskuler¹²³, lokal uygulama¹⁴⁸ gibi çok çeşitli uygulama yolları mevcuttur; ancak bunlardan hangisinin üstün olduğuna dair karşılaştırmalı çalışmalar ile literatür taramasında karşılaşılmamıştır. Bu yüzden en yüksek etkinlik görülebileceği yer olan sinir üzerine lokal uygulama çalışmada kullanılmıştır. Uygulama tek doz olarak yapılmasına karşın literatürde tekrarlayan uygulamalar da mevcuttur.^{123,124}

Bu çalışmaların her birinin takip süreleri de birbirinden farklıdır. Ratların iyileşme periyodu insanlardan farklı olduğundan biz çalışmamızda literatürde ratlarda yara iyileşmesinin proliferasyon evresinin maksimum seviyeye çıktığı bir haftalık^{150,151} periyodu aldık. Bu insanlarda proliferasyon evresinin en üst düzeye eriştiği üç haftalık sinir iyileşmesi periyoduna denk düşmektedir. Fibrozisin artış gösterdiği bu zaman diliminde fibrotik etkinliği ortadan kaldırmayı amaçladık. Bununla birlikte testlerde ortaya çıkan yetersiz iyileşme ve fonksiyon kayıpları çalışmanın kısa takip sürecinde sinir iyileşme basamaklarının devam etmesinden kaynaklı olabilir.

Çalışmamızda sinir iyileşmesini değerlendirmek adına motor fonksiyon değerlendirilmesinde open field testinde katedilen mesafe⁶⁸ ve rotarod test⁷⁰ kullanılmıştır. Sinir-kas kavşağı son-plak iletimi indirekt olarak gastroknemius kas ağırlık değişimi ile ölçülmüştür. Duyu testi için hot plate⁷¹ testi tercih edilmiştir.

Deneklerin ağırlık değişimleri incelendiğinde dekorin uygulandığı gruplarda Pbs bolus grubuna göre anlamlı fark yaratmamıştır. Ağırlıklarda azalma sham grupları ile karşılaştırıldığında fazla olarak gözlenmiştir. Kilo kaybı, sinir hasarı sonrası iyileşme sırasında alt ekstremita hareketlerinin kısıtlanması ve ağrı nedeniyle olabilir. Ağırlık değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmaması sinir iyileşmesini etkileyebilecek beslenme yetersizliğinin olmadığını göstermektedir.

Rotarod testinde, dekorin bolus ve infüzyon grubu Pbs bolus grubuna kıyasla daha iyi performans göstermiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında motor fonksiyonlarda azalma olmakla birlikte dekorin fonksiyonel iyileşmeye katkı sağlamış gibi gözükmektedir.

Hot plate testinde dekorin bolus ve infüzyon grubu Pbs bolus uygulanan gruba göre ağrı duyusunu daha kısa sürede algılamıştır; ancak sham grubu dışında kalan gruplarda denekler sol ayaklarından destek alıp sağlam olan sağ ayaklarını kaldırarak ağrıdan kaçınmışlardır. Deney süresi göz önüne alındığında duyuusal iyileşmenin tamamlanması beklenmemektedir. Yine de, dekorin bolus ve infüzyon grubunda literatürde tanımlanan periferik sinir yaralanmasına bağlı olarak duyu ve motor nöronların spinal ganglionlarında ortaya çıkan dejenerasyona^{91,92} ve kalıcı hasara rastlanmamıştır.

Kas atrofisi açısından dekorin bolus ile sham grubu arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır, Pbs bolus grubunda ise atrofi anlamlı şekilde artmıştır. Dekorin hangi yol ile verilirse verilsin kas atrofisini ve fonksiyon kaybını azaltmıştır. Open field testinde, dekorin infüzyon grubunda belirgin düşük gözlenmesi konulan osmotik pompanın mekanik etkisinden kaynaklanmış olabilir; yine de bu veriler rotarod testi ile uyumlu gözükmemektedir.

Open field testinde dekorin bolus ile operasyon öncesi (kontrol) ve sham grupları arasında katedilen mesafe değerlendirildiğinde anlamlı fark saptanmamıştır. Dekorin bolus grubu, Pbs bolus ve infüzyon grubuna göre daha fazla mesafe katetmiştir. Konulan osmotik pompanın mekanik etkisi ile dekorin infüzyon grubu daha az hareket etmiş olabilir. Bu testte, anksiyete de bir faktördür. Gruplarda toplam alınan mesafede azalma deneklerin korkusundan ötürü olabilir.

SFI değerlerinde sham grubu dışında fonksiyonel indekste belirgin bozulma meydana geldi. Literatürde SFI için oluşturulan skorum sistemi⁷⁴ değerleri (Tablo 3) ile grup ortalamalarını karşılaştırıldı. Dekorin bolus ve infüzyon grubu ise sırasıyla -52,503 ve -53,396 olarak fonksiyonel açıdan orta grubunda yer almaktadır. Pbs grubu -63,503 ile kötü kısımda yer almaktadır. Sham grubu -11,165 ortalama ile mükemmel kısımda yer almaktadır. Dekorin çalışmamızda hasarı azaltmasına karşın iyileşmeyi yeterli düzeyde destekleyememiştir. Bu durum ileriki çalışmalarda sinir büyüme faktörü (NGF) gibi sinir dokusunu stimüle edici ajanlarla kombine kullanılarak aşılabılır.

Sinir iletim testi özellikle motor ve duyu sinirlerinde iletimi göstermek için kullanılmaktadır. İğne EMG ile birlikte ekstremitelerde ağrı, kompresyon nöropatisi veya sinir hasarı tanısında yararlıdır. Bizde çalışmamızda EMG ile birlikte yaralanma proksimali ve distalinde farklı şiddette stimulus vererek sinir iletim testi ve latans ölçümü gerçekleştirdik.

Dekorin bolus ve infüzyon grubunda özellikle distalde alınan ölçümlerde Pbs grubu da dahil olmak üzere anlamlı fark gözlenmemesi wallerian dejenerasyonun devam ettiğini düşündürmüştür. Verilen 5 mv'luk stimulus çoğunlukla aksiyon potansiyeli oluşturamayacak yetersiz elektriksel aktiviteye neden olmuştur.

Pbs bolus uygulaması yapılan grupta beklenildiği üzere elde edilen amplitüdler düşük ve latanslar uzun olmuştur. Sham grubu ise hiçbir işlem yapılmayan sağ bacak ile hemen hemen eşdeğer bulgular vermiştir.

Proksimalden alınan 10 mV'luk ölçümlerde sinir iletiminin koaptasyon hattından distale doğru gerçekleştiği gözlenmiştir; ancak distalde wallerian dejenerasyon nedenli oluşan aksiyon potansiyel amplitüdlere oldukça düşmüştür. Proksimalde dekorin bolus grubunun istatistiksel açıdan sham grubunu yakalaması dikkat çekicidir. Bu durum anti-fibrotik etkinliği kanıtlamaktadır. Deneysel çalışma süresi inflamasyon ve proliferasyonun maksimuma ulaştığı bir haftalık takibi içermektedir. Bu süre sinir iyileşme çalışmalarına göre kısadır. Amacın fibrozisi azaltmak olması nedenli sinir iyileşmesi düzeyi ortaya konmakta güçlük çekilsede sinir rejenerasyonunu stimüle edici bir ajan ile birlikte kullanımı ileride yapılacak çalışmalar için umut vaat etmektedir.

İnfüzyon grubu, hem operasyon sonrası gerçekleştirilen motor fonksiyon test performansı hem de EMG verileri ele alındığında bolus gruba göre her zaman geride kalmıştır. Literatürde bir taşıyıcı ile verilmesinin dekorinin yarı ömrünü uzattığı gösterilse de en azından osmotik pompa kullanılarak kontrollü salınım tekniği ile etkinliğin yeterli düzeyde artmadığını düşünmekteyiz. Ayrıca, bolus grubunda latans değerlerinde belirgin azalma dekorinin anti-fibrotik etkinliğini kanıtlar niteliktedir.

Dekorinin henüz yapılan çalışmalarda veriliş yolu, dozu ve yaralanma sonrası hangi günlerde kullanılacağı ile ilgili bir fikir birliğine varılamamıştır. Literatürde daha çok akciğer (bronşlar), beyin (ventrikül), böbrek (glomerül) gibi potansiyel boşluk nedenli uygulama kolaylığı olan yerlerde kullanılmakla birlikte periferik sinirler üzerine ilk kez kullanılan dekorinin en azından bolus uygulamasının sonuçları kayda değerdir.

Histolojik veriler değerlendirildiğinde dekorin bolus grubunda H&E boyaması ile wallerian dejenerasyonun daha az olması ve sinir dokusunun yapısal formasyonun diğer sinir laserasyonu oluşturulan gruplara oranla daha az bozulmuş olması dikkat çekicidir. (Resim 23) Bu dekorinin inflamasyonu regüle edici etkisini kanıtlar niteliktedir. Bununla birlikte Masson- trikrom boyamasında fibrozis ve perinöryum kalınlık artışı dekorin bolus grubunda daha azdır. Dekorin infüzyon grubunun da Pbs bolus uygulanan gruptan daha iyi sonuçlar vermesi anti-fibrotik etkinlik açısından önemli bir veridir. (Resim 24) Sham grubu bütün boyamalarda ve istatistiksel analizlerde üstün gözükmemektedir. Yalnızca nöropraksi oluşturulması ve sinire hasar verilmemesi nedenli sonuç beklendiği gibidir. Diğer grupların iyileşme açısından Sham grubunu yakalaması mevcut durumda mümkün değildir.

Fibrozisi gösteren immunhistokimyasal boyalar olan kollajen-1, fibronektin ve laminin de dekorin ile tatbik edilen gruplarda daha az boyanma paterni göstermiştir. (Resim 25,26,27) Yaralanma sahasında makrofaj aktivitesini gösteren ED-1 boyası da dekorin sayesinde daha az boyanmıştır. (Resim 28)

Makrofaj aktivitesinin sınırlandırılması, inflamasyonun kontrol altında tutulması sinir hasarını olasılıkla azaltmıştır. Süreç içerisinde dekorin bolus grubunda akson sayılarının fazla olması bu proteinin anti-fibrotik etkinlik yanı sıra sinir iyileşmesi açısından da birtakım etkileri olduğunu göstermektedir; fakat bu etkiler wallerian dejenerasyonu önlemeye yeterli değildir.

Literatürde dekorinin anti-fibrotik ve anti-kanser etkinliğine yönelik çok fazla sayıda çalışmalar vardır. Bunlar hayvan deneyleri, toksisite çalışmaları ve preklinik denemeleri içermesine karşın bu molekül ilaç olarak kullanıma girememiştir. Bunun sebepleri arasında kan dolaşımında bulunma süresinin kısa olması, yüksek dozlarda uygulama ihtiyacı, seri üretim sürecinin zor olması verilebilir.¹⁵²

Uygulanış yolu, dozu ve zamanlaması belirlendikten sonra dekorinin ilaç haline getirilmesi mümkün olduğu takdirde özellikle üst ve alt ekstremitelerde kesici delici alet yaralanmaları, trafik kazaları, ateşli silah yaralanmaları gibi sebeplerle meydana gelen sinir yaralanmalarında onarım sonrası kullanılmasının fayda sağlayacağını düşünmekteyiz.

Bu çalışma, çok sık görülen periferik sinir yaralanmalarında optimal bir mikrocerrahi onarım sonrasında fonksiyonel kaybı en aza indirebilmek adına dekorinin yardımcı olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, çalışmamız yapılacak sonraki deneysel modellere temel oluşturabilir. Ancak, bütün bu bilinmeyenler giderilse bile seri üretimin zor olması ve ücretinin pahalı olması rutin kullanımda hız kısıtlayıcı basamaklar olarak kalmaya devam edecektir.

6. SONUÇ

Daha önceden protein yapısı, etkisi ve kullanımını oldukça fazla sayıda makale ile ortaya konmuş olan dekorin molekülünü anti-fibrotik etkinliği baz alınarak periferik sinirlerde ilk defa kullandık.

Yapılan motor testlerde, sinir iletim çalışmasında ve histolojik değerlendirmede dekorinin 25µg dozunda, bolus şekilde, tek seferde lokal uygulanması skar gelişiminin önlenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya çıkarmıştır. Bu durum klinik pratikte uygulama açısından kolaylık oluşturmaktadır.

Bu çalışma anti-fibrotik etkinliği gösterebilmek amacıyla inflamasyon ve proliferasyon fazı ile sınırlı tutulmuştur. Bu yüzden daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, dekorinin uygulama zamanlaması, dozu, belirlenen dozun ne kadar aralıklarla verileceği, veriliş yolu ve doz bağımlı etkisi farklı çalışmalarla ortaya konması gerekmektedir.

Dekorinin üretiminin belirli laboratuvarlarda yapılabilmesi, seri üretim sürecinin zor olması, yarılanma süresinin kısa olması, yüksek dozlarda uygulama ihtiyacı, pahalı olması, soğuk zincirde saklanması, sulandırma sonrasında kullanım süresinin kısa olması klinik uygulamada dezavantaj oluşturmaktadır. Bu dezavantajlar ortadan kaldırıldığı takdirde klinik olarak kullanılabilir.

Her halükârda sinir iyileşmesi oldukça kompleks ve karmaşık yolları içeren, bir süreçtir. Bu yüzden tek bir ilaç veya teknik kullanarak tam iyileşmeyi sağlamak için daha moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır. Yakın gelecekte bizim çalışmamızda verileri kullanılarak sinir rejenerasyonunu sağlayan ve fonksiyonları tamamen geri döndüren tedavi protokolleri oluşturulabilir.

7. KAYNAKLAR

- 1- Menorca RMG, Fussell TS, Elfar JC, *Nerve physiology. Mechanisms of injury and recovery*, Hand Clinics, 2013; 29 (3): 317-30
- 2-Seddon HJ, The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves, Br. J. Surg, 1947; 35 (138): 151-67
- 3-Sunderland S, *Nerve Injuries and Their Repair: A Critical Appraisal*, Churchill Livingstone, New York, NY, USA, 1991, pp. 151–67
- 4-Bittner GD, Schallert T, Peduzzi JD, “*Degeneration, trophic interactions, and repair of severed axons: a reconsideration of some common assumptions*,” Neuroscientist, 2000; 6 (2): 88-109
- 5-Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN, “*Peripheral nerve repair and reconstruction*,” Journal of Bone and Joint Surgery A, 2013; 95 (23): 2144-51
- 6-Pan YA, Misgeld T, Lichtman JW, Sanes JR, “*Effects of neurotoxic and neuroprotective agents on peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo*,” Journal of Neuroscience, 2003; 23 (36): 11479-88
- 7-Mackinnon SE, “*New directions in peripheral nerve surgery*,” Annals of Plastic Surgery, 1989; 22 (3): 257-73
- 8-Lundborg G, *A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance*, Journal of Hand Surgery, 2000; 25 (3): 391-414
- 9-Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. *Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast Reconstr Surg* 1989; 83:129–38.
- 10-Ngeow WC, *Scar less: a review of methods of scar reduction at sites of peripheral nerve repair*. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2010; 109:357–366.
- 11-Atkins S, Smith KG, Loescher AR, Boissonade FM, O’Kane S, Ferguson MW, Robinson PP. *Scarring impedes regeneration at sites of peripheral nerve repair*. Neuroreport. 2006;17(12):1245-9.
- 12-Dam-Hieu P, Lacroix C, Said G, Devanz P, Liu S, Tadie M. *Reduction of postoperative perineural adhesions by Hyaloglide gel: an experimental study in the rat sciatic nerve*. Neurosurgery 2005;56:425-33.

- 13-"Edwin Smith Surgical Papyrus", Case 31. Thebes, c. 1550 BC. Breasted, J. H. (ed.) The Edwin Smith Surgical Papyrus. The University of Chicago Press, 1930
- 14- Ibn Sînâ. *Kânûn der Tıbb (The canon of medicine)*, vol 4. Tehran: Shoroush Press; 1997. p. 501-12 (Translated by Sharafkandi, A. in Persian)
- 15-Artico M, Cervoni L, Nucci F, Giuffré R. *Birthday of peripheral nervous system surgery: the contribution of Gabriele Ferrara (1543-1627)*. Neurosurgery 1996;39:380-3.
- 16-Terzis JK, Smith KL, *Repair and grafting of the peripheral nerve*. In: J.G. McCarthy, May JW, Litter WJ, Editor. Plastic Surgery.1: Philedelphia: WB Saunders; 1990. p. 630-697
- 17-Brunelli GA, Battiston B, Vigasio A, Brunelli G, Marocolo D. *Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits*. Microsurgery 1993; 14: 247–51.
- 18-Donaghy R. *History of microsurgery*. In: Wilkins RH, Rengechary SS (eds) Neurosurgery. New York: McGraw-Hill Book Co; 1985. p. 20-26
- 19-Seddon HJ, *A classification of nerve injuries*. Br Med J 1942; 2(4260):237–239
- 20-Sunderland S, *A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function*. Brain 1951; 74(4):491–516
- 21-Arıncı K, Elhan A. *Periferik Sinir Sistemi*. İçinde: Anatomi. 2. Cilt. 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2001: p. 129-130
- 22- Sadler TW, *Santral sinir sistemi İçinde: Langman Medikal Embriyoloji* 11. Baskı Ankara: Palme Kitabevi, 2011: p. 293-300
- 23- Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. *Historical and basic science review: Past, present, and future of nerve repair*. J Reconstr Microsurg 1997; 13: 215–225
- 24-Thomas PK, Berthold CH, Ochoa J: *Microscopic anatomy of the peripheral nervous system: Peripheral Neuropathy*. 3rd edition. Dyck P (Ed) WB Saunders Philedelphia 1993.
- 25-Maggi SP, Lowe III JB, Mackinnon SE. *Pathophysiology of nerve injury*. Clin Plast Surg 2003;30:109–26.
- 26-Mizisin AP, Weerasuriya A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. Acta Neuropathol. 2011;121:291–312.
- 27-Ganong W.F. *Ganong Tıbbi Fizyoloji*, Appleton ve Lange Yayınevi, San Francisco; 2000 syf 54-66

- 28-Lundborg G, *Nerve regeneration and repair. A review.* Acta Orthop Scand, 1987; 58(2): 145-69
- 29-Maggi SP, Lowe JB, Mackinnon SE, *Pathophysiology of nerve injury.* Clin Plast Surg, 2003; 30(2): 109-126
- 30-Winograd JM, Mackinnon SE, *Peripheral nerve injuries: Repair and Reconstruction.* In: S.J. Mathes, Editor. Plastic Surgery 7: Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006
- 31-Lundborg G, *Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation and nerve function.* J Bone Joint Surg. AM, 1975; 57(7): 938-48
- 32-Rempel D, Dahlin L, Lundborg G. *Pathophysiology of nerve compression syndromes: response of peripheral nerves to loading.* Journal of Bone and Joint Surgery [Am] 1999; 81(11): 1600-10.
- 33-Campbell WW. *Evaluation and management of peripheral nerve injury.* Clin Neurophysiol. 2008; 119: 1951-1965.
- 34-Kouyoumdjian JA. *Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases.* Muscle Nerve 2006; 34: 785-8
- 35-Sunderland S. *The anatomy and physiology of nerve injury.* Muscle Nerve 1990; 13: 771-84
- 36-Rydevik B, Lundborg G. *Permeability of intraneural microvessels and perineurium following acute, graded experimental nerve compression.* Scand J Plast Reconstr Surg 1977; 11: 179-87
- 37-Svenningsen, A.F., Kanje, M., *Regulation of Schwann cell proliferation in cultured segments of the adult rat sciatic nerve.* Journal of Neuroscience Research 1998; 52 (5): 530-537.
- 38-Chaudhry V, Glass JD, Griffin JW. *Wallerian degeneration in peripheral nerve disease.* Neurol Clin 1992; 10: 613-27.
- 39-Hall S. *Mechanisms of repair after traumatic injury.* In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. Peripheral neuropathy. Philadelphia: Elsevier, Saunders; 2005. p. 1403-33.
- 40-Hall SM. *The biology of chronically denervated Schwann cells.* Ann. N.Y. Acad. Sci 1999; 883: 215-33
- 41-Dumitru D, Zwarts MJ, Amato AA. *Peripheral nervous system's reaction to injury.* In: Dumitru D, Amato AA, Zwarts M, editors. Electrodiagnostic medicine. 2nd ed. Philadelphia: Hanley and Belfus; 2001. p. 115-56

- 42-Burnett MG, Zager EL. *Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review*. Neurosurg Focus 2004;16:1–7
- 43-Zochodne DW, Levy D. *Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system*. Cell Mol. Biol, 2005;51:255–67.
- 44-Fu SY, Gordon T. *The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration*. Mol Neurobiol 1997;14:67–116
- 45-Dahlin LB. *Nerve injury and repair: from molecule to man*. In: Slutsky DJ, Hentz VR, editors. Peripheral nerve surgery: practical applications in the upper extremity. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier; 2006. p. 1–22.
- 46-Davis JB, Stroobant P. *Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells*. J Cell Biol 1990;110:1353–60.
- 47-Lewis SE, Mannion RJ, White FA, Coggeshall RE, Beggs S, Costigan M, et al. *A role for HSP27 in sensory neuron survival*. J Neurosci 1999;19:8945–53.
- 48-Ahlborn P, Schachner M, Irintchev A. *One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair*. Exp Neurol 2007;208:137–44
- 49-Spinner RJ, Kline DG. *Surgery for peripheral nerve and brachial plexus injuries or other nerve lesions*. Muscle Nerve 2000;23:680–95
- 50-Diao E, Vannuyen T. *Techniques for primary nerve repair*. Hand Clin 2000;16:53–66
- 51-Matsuyama T, Mackay M, Midha R. *Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review*. Neurol Med Chir (Tokyo) 2000;40:187–99
- 52-Nikitovic D, Aggelidakis J, Young MF, et al. *The biology of small leucine-rich proteoglycans in bone pathophysiology*, J. Biol. Chem. 2012; 287: 33926–33933.
- 53-Adany R, Heimer R, Caterson B, Sorrell JM, Iozzo RV. *Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels*. J Biol Chem 1990;265:11389–96.
- 54-Ruoslahti E, Yamaguchi Y, *Proteoglycans as modulators of growth factor activities*, Cell, 1991; 5 (64): 867-69
- 55-Yamaguchi Y, DM Mann, Ruoslahti E, *Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin*, Nature, 1990; 346 (6281): 281-284
- 56-Brandan E, Gutierrez J. *Role of skeletal muscle proteoglycans during myogenesis*. Matrix Biol. 2013; 32:289–97.

- 57-Wu Z, Horgan CE, Carr O, Owens RT, Iozzo RV, Lechner BE. *Biglycan and decorin differentially regulate signaling in the fetal membranes*. Matrix Biol. 2014; 35:266–75.
- 58-Dunkman AA, Buckley MR, Mienaltowski MJ, et al. *The injury response of aged tendons in the absence of biglycan and decorin*. Matrix Biol. 2014; 35:232–8.
- 59-Huijun, W., Long, C., Zhigang, Z., et al. *Ex vivo transfer of the decorin gene into rat glomerulus via a mesangial cell vector suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis*. Exp. Mol. Pathol. 2005; 78, 17–24
- 60-Giri SN, DM Hyde, RK Braun W, et al. *Antifibrotic effect of decorin in a bleomycin hamster model of lung fibrosis*. Biochem. Pharmacol. 1997;54:1205–1216.
- 61-Esmaeili M, Berry M, Logan A, et al. *Decorin treatment of spinal cord injury*. Neural Regen. Res. 2014; 9:1653–1656
- 62- Li Y, Li J, Zhu J, et al: *Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration*. Mol Ther 2007; 15:1616-1622.
- 63- Arıncı K, Elhan A. Periferik Sinir Sistemi. İçinde: *Anatomi. 2. Cilt. 3. Baskı*. Ankara: Güneş Kitabevi, 2001: s. 178.
- 64-Guvencer M, Iyem C, Akyer P, et al. *Anatomic considerations and the relationship between the piriformis muscle and the sciatic nerve*. Surg Radiol Anat 2008, 30: 467–74
- 65-Vloka JD, Hadzic A, April EW, et al. *The Division of the Sciatic Nerve in the Popliteal Fossa: Anatomical Implications for Popliteal Nerve Blockade*. Anesth Analg 2001; 92: 215-7.
- 66-Yıldırım M. Regio Glutealis. İçinde: *Topografik Anatomi. 2. Baskı*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: s.106.
- 67-Vloka JD, Hadzic A, Lesser JB, et al. *A Common Epineural Sheath for the Nerves in the Popliteal Fossa and Its Possible Implications for Sciatic Nerve Block*. Anesth Analg 1997; 84: 387-90.
- 68-Walsh RN, Cummins RA. *The open field test: a critical review*. Psychol. Bull. 1976;83:482–504.
- 69-Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, et al. *A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazpoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field*. Neurosci. Biobehav. Rev. 2001;25:235–260.
- 70- Jones BJ, Roberts DJ. *The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod*. J. Pharm. Pharmacol. 1968;20:302–304.

- 71-Eddy NB, Leimbach D. *Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines.* J Pharmacol Exp Ther. 1953;107:385–93
- 72- Ozmen, S, Ayhan S, Latifoglu O, et al. *Stamp and paper method: a superior technique for the walking track analysis.* Plast. Reconstr. Surg. 2002; 109: 1760 – 1761
- 73- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. *Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat.* Plast Reconstr Surg 1989; 83: 129–38.
- 74-De Medinaceli L: *Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions.* J Neurosci Methods 1995;58: 29–37.
- 75- Ozay R, Bekar A, Kocaeli H, Karli N, Filiz G, Ulus I.H. *Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats*Surg Neurol, 2007; 68: 615-622
- 76-Uzun T, Toptas O, Saylan A, et al. *Evaluation and comparison of the effects of artesunate, dexamethasone, and tacrolimus on sciatic nerve regeneration.* J Oral Maxillofac Surg. 2019;77(5):1092.e1–1092.e12.
- 77- Karahan G, Kaya H, Erdogan MA, Yigitturk G, Gokyayla E, Erbas O. *Effects of Trimetazidine on Nerve Regeneration in a Rat Sciatic Nerve Injury Model* Bratisl Lek Listy. 2019;120(10):777-782.
- 78- Caglayan Sozmen S, Karaman M, Cilaker Micili S, Isik S, Arikan Ayyildiz Z, Bagriyanik A, et al. *Resveratrol ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like lesions through effects on the epithelium.* PeerJ. 2016;4:e1889
- 79-Wiberg M, Terenghi G *Will it be possible to produce peripheral nerves?* Surg Technol Int 2003;11:303–310.
- 80-Rivlin M, Miller A, Tulipan J, et al. *Patterns of production of collagen-rich deposits in peripheral nerves in response to injury: A pilot study in a rabbit model.* Brain Behav 2017;7:e00659.
- 81-Vejtsada R, Sagot Y, Kato AC *Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo.* Eur J Neurosci 1995; 7:108–115.
- 82-Kretschmer, T, Antoniadis, G, Braun, V, Rath, S. A, Richter HP, *Evaluation of iatrogenic lesions in 722 surgically treated cases of peripheral nerve trauma.* Journal of Neurosurgery, 2001; 94:905–912.

- 83-Campbell WW. *Evaluation and management of peripheral nerve injury*. Clin Neurophysiol. 2008;119:1951–1965
- 84-Ruijs AC, Jaquet JB, Kalmijn S, et al. *Median and ulnar nerve injuries:a meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair*. Plast Reconstr Surg. 2005;116(2):484–494.
- 85-Angius D, Wang H, Spinner RJ, Gutierrez-Cotto Y, Yaszemski MJ, Windebank AJ. *A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds*. Biomaterials. 2012; 33:8034-9.
- 86-Toia F, Giesen T, Giovanoli P, Calcagni M. *A systematic review of animal models for experimental neuroma*. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2015; 68:1447-63
- 87-Tos P, Ronchi G, Papalia I, Sallen V, Legagneux J, Geuna S, et al. Chapter 4: *Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: Part I-experimental models*. Int Rev Neurobiol 2009; 87:47-79
- 88-Varejão AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. *Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration*. Neurol Res 2004; 26:186-94.
- 89-Burnett MG, Zager EL, *Pathophysiology of peripheral nerve injury: A brief review*. Neurosurgical Focus, 2004; 16:1-7
- 90-Sakurai, M.,& Miyasaka, Y. *Neural fibrosis and the effect of neurolysis*. The Journal of Bone and Joint Surgery,1996: 68: 483–488
- 91-Novikov LN, Novikova LN, Holmberg P, Kellerth J-O *Exogenous brain-derived neurotrophic factor regulates the synaptic composition of axonally lesioned and normal adult rat motoneurons*. Neuroscience 2000;100: 171–181.
- 92-Tandrup T, Woolf CJ, Coggeshall RE. *Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve*. J Comp Neurol 2000; 422: 172–180.
- 93-Shaw Wilgis EF: *Clinical aspect of nerve gliding in the upper extremity*. In: Hunter JM, Schneider LH, Mackin EJ (eds). Tendon and Nerve Surgery in the Hand. St. Louis, C.V. Mosby, Inc. 1997: 121-124
- 94-Vural E, Yilmaz M, Ilbay K, Ilbay G. *Prevention of epidural fibrosis in rats by local administration of mitomycin C or daunorubicin*. Turk Neurosurg. 2016;26:291-296.

- 95- Gorgulu A, Imer M, Simsek O, Sencer A, Kutlu K, Cobanoglu S: *The effect of aprotinin on extraneural scarring in peripheral nerve surgery: An experimental study.* Acta Neurochir. 1998; 140:1303-1307
- 96-Petersen J, Russel L, Andrus K, MacKinnon M, Silver J, Kliot M, *Reduction of extraneural scarring by ADCON-T/N after surgical intervention.* Neurosurgery 1996; 38: 976-84
- 97-Ozgenel GY, Filiz G. *Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats.* J Neurosurg 2003; 98:371–377.
- 98- Di Summa PG, Schiraldi L, Cherubino M, Oranges DM, Kalbermatten DF, Raffoul W, Madduri S. *Adipose derived stem cells reduce fibrosis and promote nerve regeneration in rats.* Anat Rec2018; 301:1714–1721.
- 99-Çetinalp NE, Albayrak SB, Ismailoğlu Ö, Temiz NÇ, Solmaz İ, Tanrıöver G, Demir N: *Topical Application of Cyclosporine Reduces Epineurial Fibrosis: Gross Postsurgical, Histopathological and Ultrastructural Analysis in a Rat Sciatic Nerve Model.* Turk Neurosurg.2017;27(6):969-974
- 100-Que J, Cao Q, Sui T, Du S, Zhang A, Kong D, Cao X: *Tacrolimus reduces scar formation and promotes sciatic nerve regeneration.* Neural Regen Res2012; 7(32):2500-2506.
- 101-Jia S, Zhao Y, Law M, Galiano R and Mustoe TA: *The effects of collagenase ointment on the prevention of hypertrophic scarring in a rabbit ear scarring model: A pilot study.* Wounds, 2011; 23:160-165.
- 102-Boudko SP, Engel J and Bächinger HP: *The crucial role of trimerization domains in collagen folding.* Int J Biochem Cell Biol 2012; 44: 21-32.
- 103-Bhagal RK, Stoica CM, McGaha TL and Bona CA: *Molecular aspects of regulation of collagen gene expression in fibrosis.* J Clin Immunol2005; 25: 592-603,
- 104-Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB and Bolander ME : *Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur.* J Cell Biol 1990; 110: 2195-2207.
- 105-Hou XH, Cao B, Liu HQ, Wang YZ, Bai SF and Chen H: *Effects of osthole on apoptosis and TGF-beta1 of hypertrophic scar fibroblasts.* J Asian Nat Prod Res2009; 11: 663-669.

- 106-Waddington SN, Crossley R, Sheard V, Howe SJ, Buckley SM, Coughlan L, Gilham DE, Hawkins RE and McKay TR: *Gene delivery of a mutant TGF β 3 reduces markers of scar tissue formation after cutaneous wounding*. Mol Ther 2010; 18: 2104-2111.
- 107-Peltonen J, Kähäri L, Jaakkola S, Kähäri VM, Varga J, Uitto J and Jimenez SA: *Evaluation of transforming growth factor beta and type I procollagen gene expression in fibrotic skin diseases by in situ hybridization*. J Invest Dermatol 1990; 94:365-371.
- 108-Wang X, Smith P, Pu LL, Kim YJ, Ko F and Robson MC: *Exogenous transforming growth factor beta(2) modulates collagen I and collagen III synthesis in proliferative scar xenografts in nude rats*. J Surg Res 1999; 87: 194-200.
- 109-Schaefer L, Iozzo RV, *Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction*, J. Biol. Chem. 2008; 283: 21305–21309.
- 110-Jarvelainen JH, Sainio A, Wight TN, *Pivotal role for decorin in angiogenesis*, MatrixBiol. 2015; 43:15–26
- 111-Krusius T, Ruoslahti E. *Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A 1986;83:7683–7.
- 112-Mann DM, Yamaguchi Y, Bourdon MA, Ruoslahti E. *Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem 1990;265:5317–23.
- 113-Iozzo RV. *The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth*. Crit Rev Biochem Mol Biol 1997;32:141–74.
- 114-Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV. *Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis*. J Biol Chem 1996;271:31767–70
- 115-Bartolini B, Thelin MA, Svensson L, Ghiselli G, van Kuppevelt TH, Malmström A, et al. *Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate affects directional migration of aortic smooth muscle cells*. PLoS One 2013;8:e66704.
- 116-Stock C, Jungmann O, Seidler DG. *Decorin and chondroitin-6 sulfate inhibit B16V melanoma cell migration and invasion by cellular acidification*. J Cell Physiol 2011;226:2641–50.
- 117-Mohan RR, Tovey JC, Sharma A, Schultz GS, Cowden JW, Tandon A. *Targeted decorin gene therapy delivered with adeno-associated virus effectively retards corneal neovascularization in vivo*. PLoS One 2011;6:e26432.

- 118-Järvinen TA, *Design of target-seeking antifibrotic compounds*, Methods in Enzymology, 2012; 509: 243–261.
- 119-Järvinen TA, Ruoslahti E, *Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010; 107: 21671–21676
- 120-Järvinen TA, Ruoslahti E, *Targeted antiscarring therapy for tissue injuries*, Advances in Wound Care, 2013; 2:50-54
- 121-Järvinen TA, Ruoslahti E, *Molecular changes in the vasculature of injured tissues*, The American Journal of Pathology, 2007; 171:702-711
- 122-Gupta N, Al-Saikhani FI, Patel B, Rashid J, Ahsan F, *Fasudil and SOD packaged in peptide-studded-liposomes: properties, pharmacokinetics and ex-vivo targeting to isolated perfused rat lungs*, International Journal of Pharmaceutics, 2015; 488: 33-43
- 123- Kean TJ, Duesler L, Young RG. et al, *Development of a peptide-targeted, myocardial ischemia-homing, mesenchymal stem cell*, Journal of Drug Targeting, 2012; 20: 23-32
- 124-Kean TJ, Lin, P., Caplan, A. I. & Dennis, J. E. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies and Immune Modulation. Stem Cells Int 2013, 732–742
- 125-Chouhan G, Moakes RJA, Esmaili M, Hill LJ, de Cogan F, Hardwicke J, Rauz S, Logan A, Grover LM. *A self-healing hydrogel eye drop for the sustained delivery of decorin to prevent corneal scarring*. Biomaterials. 2019;210:41–50.
- 126-Huttenlocher A, Werb Z, Tremble P, Huhtala P, Rosenberg L, Damsky CH. *Decorin regulates collagenase gene expression in fibroblasts adhering to vitronectin*. Matrix Biol 1996;15:239–50.
- 127-Schönherr E, Schaefer L, O'Connell BC, Kresse H. *Matrix metalloproteinase expression by endothelial cells in collagen lattices changes during co-culture with fibroblasts and upon induction of decorin expression*. J Cell Physiol 2001; 187:37–47.
- 128-Mazor R, Alsaigh T, Shaked H, Altshuler AE, Pocock ES, Kistler EB, et al. *Matrix metalloproteinase-1-mediated upregulation of vascular endothelial growth factor-2 in endothelial cells*. J Biol Chem 2013;288:598–607.

- 129-Zhang Z, Li XJ, Liu Y, Zhang X, Li YY and Xu WS: *Recombinant human decorin inhibits cell proliferation and downregulates TGF-beta1 production in hypertrophic scar fibroblasts*. Burns , 2007; 33: 634-641
- 130-Wang P, Liu X, Xu P, Lu J, Wang R, Mu W. *Decorin reduces hypertrophic scarring through inhibition of the TGF-beta1/Smad signaling pathway in a rat osteomyelitis model*. Exp Ther Med 2016;12:2102–8.
- 131-Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F and Huard J: *The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration*. Am J Sports Med 2001; 29: 394-402.
- 132-Dahai Xiao, Yunxiang Lu, Lei Zhu, Tangzhao Liang, Zhe Wang, Jianhua Ren, Ronghan He, Kun Wang, *Anti-osteosarcoma property of decorin-modified titanium surface: A novel strategy to inhibit oncogenic potential of osteosarcoma cells*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020; 25:110034
- 133-Patel HH, Kharat AR *Comparative study of free enzyme & immobilized enzyme on BSA digestion* Int. J. Pharm. Sci. Res., 2012; 3 (12), pp. 5015-5023
- 134-Xiaotian Jia, Chao Chen, Lin Chen, Cong Yu, Tadashi Kondo *Decorin as a prognostic biomarker in patients with malignant peripheral nerve sheath tumors* Oncology Letters 2019; 17: 3517-3522
- 135-Davies JE, Tang X, Denning JW, Archibald SJ, Davies SJ, *Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries*. Eur J Neurosci 2004; 19:1226-1242.
- 136- Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A, *Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration*. Glia 2004; 46:225-251.
- 137- Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J, *Functional regeneration beyond the glial scar*. Exp Neurol 2014; 253:197-207
- 138-Kundi S, Bicknell R, Ahmed Z, *The role of angiogenic and wound-healing factors after spinal cord injury in mammals*. Neurosci Res 2013; 76:1-9.
- 139-Mei F, Christin Chong SY, Chan JR, *Myelin-based inhibitors of oligodendrocyte myelination: clues from axonal growth and regeneration*. Neurosci Bull 2013; 29:177-188.

- 140-Ozay R, Turkoglu E, Gurer B, et al. *Does decorin protect neuronal tissue via its antioxidant and antiinflammatory activity from traumatic brain injury? An experimental study.* World Neurosurg. 2017;97:407–415.
- 141-Liu RM, Desai LP. *Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis.* Redox Biol. 2015; 6:565-577.
- 142-Jain M, Rivera S, Monclus EA, Synenki L, Zirk A, Eisenbart J, et al. *Mitochondrial reactive Oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling.* J Biol Chem. 2013;288: 770-777.
- 143-Bermpohl D, You Z, Lo EH, Kim HH, Whalen MJ. *TNF alpha and Fas mediate tissue damage and functional outcome after traumatic brain injury in mice.* J Cereb Blood Flow Metab. 2007; 27:1806-1818.
- 144-Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. *Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release.* Biochem J. 1997; 15:809-814.
- 145-Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, et al. *Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis.* Muscle Nerve. 2003;28:365-372.
- 146-Logan A, Baird A, Berry M: *Decorin attenuates gliotic scar formation in the rat cerebral hemisphere.* Exp Neurol 1999; 159: 504–510.
- 147-Hoque N, Thoresen M, Aquilina K, Hogan S, Whitelaw A. *Decorin and Colchicine as Potential Treatments for Post-Haemorrhagic Ventricular Dilatation in a Neonatal Rat Model.* Neonatology. 2011; 100:271–276.
- 148-Turkoglu E, Dinc C, Tuncer C, Oktay M, Serbes G, Sekerci Z. *Use of decorin to prevent epidural fibrosis in a post-laminectomy rat model.* Eur J Pharmacol 2013; 724C:86–91
- 149-Zheng F, Lu W, Wu F, Li H, Hu X and Zhang F: *Recombinant decorin ameliorates the pulmonary structure alterations by downregulating transforming growth factor-beta1/SMADS signaling in the diabetic rats.* Endocr Res. 2010; 35:35–49.
- 150-Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. *Wound repair and regeneration.* Nature. 2008; 453:314–21.
- 151-Coger V, Million N, Rehbock C, Sures B, Nachev M, Barcikowski S, Wistuba N, Strauß S, Vogt PM, *Tissue concentrations of zinc, iron, copper and magnesium during the*

phases of full thickness wound healing in a rodent model. Biol Trace Elem Res 2019; 191:167–176.

152-Järvinen TA, Prince S, Decorin: *A Growth Factor Antagonist for Tumor Growth Inhibition*, Biomed. Res Int 2015; 654765.

