

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**SİYATİK SİNİR'İ BESLEYEN VASA NERVORUM'UN
KALDIRILMASI SONRASI OLUŞAN DEJENERASYON
ALANLARININ MORFOMETRİK İNCELENMESİ VE
FK506'NİN BU DEJENERASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

Arzu HİZAY

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2009

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**SİYATİK SİNİR'İ BESLEYEN VASA NERVORUM'UN
KALDIRILMASI SONRASI OLUŞAN DEJENERASYON
ALANLARININ MORFOMETRİK İNCELENMESİ VE
FK506'NİN BU DEJENERASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

Arzu HİZAY

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Levent SARIKCIOĞLU**

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
(Proje no: 2008.02.0122.003) tarafından desteklenmiştir

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir.”

Antalya, 2009

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Anatomi Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir./..../2010

- Tez danışmanı : Doç. Dr. Levent SARIKCIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Nurettin OĞUZ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Bikem SÜZEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Muzaffer SİNDEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
- Üye : Doç.Dr. Koray COŞKUNFIRAT
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahisi Anabilim Dalı

ONAY: Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/..../2010 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Sinir ezisi, kesisi ve greftleme gibi pek çok yaralanma modelleri üzerinde FK506'nın nöroprotektif etkileri çalışılmıştır. Ancak, FK506'nın fokal dejenerasyon veya iskemi üzerine etkilerinin araştırılması ile ilgili literatürde az çalışma mevcuttur. Çalışmamızda, siyatik sinirde fokal dejenerasyon sonrası, rejenerasyonu artırma potansiyeli olan FK506'nın etkisinin araştırılması ve FK506'nın dejenerasyon görülen alanlarda olumlu etkisinin olacağı hipotezinin test edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, *Rattus norvegicus* türü yetişkin 48 erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Denekler, kontrol, sham, FK506 (+) ve FK506 (-) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. FK506 (+) ve FK506 (-) deney gruplarında siyatik sinirde epinöral devaskularizasyon uygulanmıştır. Birinci postoperatif günden itibaren dört hafta boyunca FK506 (+) deneklere günlük subkutan enjeksiyonlar halinde FK506 tedavisi uygulanmıştır. Siyatik sinir rejenerasyonu, yürüme pattern analizi, pinch test, ışık ve elektron mikroskopi ile analiz edilmiştir. Preoperatif günde yürüme patern analizi sonucunda elde edilen siyatik fonksiyon indeksi (SFI) değerlerinde deney grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). 3. ve 4. postoperatif haftada, kontrol grubu ile FK506 (+) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p<0.05$). Pinch test sonucunda kontrol ve sham gruplarında geri çekme refleksine tam yanıt alınmıştır (Grade 3). FK506 (+) deney gruplarında geri çekme refleksine tam yanıt 3. haftada alınmıştır. Aynı haftada FK506 (-) deney gruplarında bu reflekse FK506 (+) gruplarına kıyasla daha düşük bir yanıt alınmıştır. FK506 (-) deney gruplarından tam yanıtın alındığı hafta ise 4. hafta olarak tespit edilmiştir. Morfometrik değerlendirme sonucunda epinöral devaskularizasyon uygulanan FK506 (-) ve FK506 (+) deney gruplarında dejenerasyon görülen alanların total sinir alanına göre yüzdeleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında iki grup arası anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). FK506'nın sinir rejenerasyonu üzerine olan etkileri literatürde ayrıntılı bir şekilde yer almaktadır. Ancak bu sonuçlar sinirin ezi, kesi gibi travmatik yaralanmalarına ve beynin iskemik hasarlarına dayanmaktadır. Çalışmamızda FK506'nın siyatik sinirin epinöral damarlarının devaskularizasyonu sonucu oluşturulan fokal dejenerasyon üzerine yararlı etkisi tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Siyatik sinir, devaskularizasyon, rejenerasyon, FK506.

ABSTRACT

Several kinds of injury models, such as crush, transection, and graft repair have been well studied in terms of neuroprotective effect of FK506. However, definitive experimental studies are lacking on focal degeneration or ischemia. In the present study, our goal was to investigate the effect of FK506 on recovery of the sciatic nerve after focal ischemia produced by stripping of the epineurial vessels. A total number of 48 Wistar rats were used for this purpose and divided into four groups (control, sham-operated, FK506-treated, Vehicle-treated). Sciatic nerves were approached by femoral and gluteal muscle splitting. Then, epineurial vessels around the sciatic nerve were stripped in the FK506-treated and Vehicle-treated groups. After operation, FK506 administration was performed from the first to the end of the fourth postoperative week. Sciatic nerve regeneration was tested by walking track analysis, pinch test, light and electron microscopy. In the preoperative day, SFI values of the experimental group showed no significant difference ($p>0.05$) compared with the control group. However there was no statistical significance between FK506-treated and control group ($p<0.05$) in the 3rd and 4th postoperative week. In control and sham-operated groups, withdrawal responses to pinch were full (Grade 3). The onset day of full response (Grade 3) of withdrawal to pinch stimulation was in the 3rd postoperative week in six animals of the FK506-treated group. However, in the same postoperative week, six animals of the vehicle-treated group exhibited Grade 1, and four animals exhibited Grade 2 withdrawal response. So onset day of the withdrawal response in the vehicle-treated group was in the 4th postoperative week. Morphometric analysis revealed that there was no statistically difference between FK506 (+) and vehicle-treated groups by comparing the ratio of the degeneration area/total nerve area. It has been generally accepted that FK506 promotes nerve regeneration and enhances neurite outgrowth. However beneficial effect of the FK506 is generally based on the results on traumatic (crush, cut), and ischemic brain damages. In the present study we found that FK506 had a beneficial effect on focal degeneration produced by stripping of the epineurial vessels.

Key words: sciatic nerve, vascular stripping, regeneration, FK506

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Periferik sinir anatomisi	2
2.1.1. Konnektif yapı	2
2.1.2. Damarsal yapı	2
2.2. Periferik sinir yaralanması	4
2.2.1. Periferik sinir yaralanması için deneysel modeller	5
2.2.2. Periferik sinir yaralanması ile ilgili sınıflamalar	5
2.2.2.1. Seddon sınıflaması	5
2.2.2.2. Sunderland sınıflaması	5
2.3. FK506 (Tacrolimus, Prograf)	7
MATERYAL VE METOT	
3.1. Denekler	8
3.2. Deney grupları	8
3.3. Epinöral devaskularizasyon (Vascular stripping)	8
3.4. FK506 uygulaması	10
3.5. Deneklerin sakrifasyonu	10
3.6. Değerlendirme testleri	10
3.6.1. Motor fonksiyon testi (Yürüme patern analizi)	10
3.6.2. Duyusal fonksiyon testi (Pinch test)	11
3.6.3. Elektron mikroskopik inceleme	11
3.7. Morfometrik analiz	12
3.8. Veri analizi	12
BULGULAR	
4.1. SFI değerleri	13
4.2. Pinch test bulguları	13
4.3. Işık ve elektron mikroskopik değerlendirme	14

4.4. Dejenerasyon görülen alanların morfometrik değerlendirilmesi	17
TARTIŞMA	
5.1. Sinirin vasküler kaynaklı hasarları	18
5.2. FK506 dozu	19
5.3. FK506 'nın fokal dejenerasyon üzerine etkisi	19
SONUÇ	21
KAYNAKLAR	22
ÖZGEÇMİŞ	26

SİMGELER VE KISALTMALAR

- FKBP-12** : FK506 binding protein
- GAP-43** : Growth associated protein 43
- CsA** : Siklosporin A
- SFI** : Siyatik fonksiyon indeksi
- PL** : Print length (topuk ile 3. parmağın uç kısmı arasındaki mesafe)
- TS** : Toe spreading (1. ve 5. parmak arası mesafe)
- ITS** : Intermediate toe spreading (2. ve 4. parmak arası mesafe)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Periferik sinirleri besleyen damarların organizasyonu	4
2.2. Sunderland sınıflamasının beş derecesi	6
3.1. Epinöral devaskülarizasyon öncesi siyatik sinir görünümü	9
3.2. Epinöral devaskülarizasyon sonrası siyatik sinir görünümü	9
3.3. Sıçan ayak izleri kullanılarak elde edilen ölçümler	11
3.4. Fokal dejenerasyon görülen alanların morfometrik değerlendirilmesi ve bu alanların mikrometre kare cinsinden ölçülmesi	12
4.1. Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası elde edilen SFI değerleri	13
4.2. Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası tam geri çekme refleksi (Grade 3) gösteren denek sayıları	14
4.3. Epinöral devaskülarizasyon uygulanan gruplardaki siyatik sinirlerin ışık mikroskopik görünümleri	15
4.4. FK506 (+) ve FK506 (-) deney gruplarında siyatik sinirin elektron mikroskopik görünümü	16
4.5. Fasiküler dejenerasyon gösteren siyatik sinir görünümü	17

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
3.2.1. Deney grupları	8

GİRİŞ VE AMAÇ

İş ve trafik kazaları ülkemizde ve dünyada önemli derecede sağlık sorunlarına sebep olan olaylardır. Bu kazalar, özellikle çalışan ve genç insanları etkileyen, önemli can kayıplarına, sakatlıklara ve maddi kayıplara neden olan sorunlardır. Bu kazalarda lokomotor sistem elemanları önemli ölçüde etkilenir. Locomotor sistemin mekanik dayanıklılığı fizyolojik koşullarda oldukça yüksek olmasına rağmen, sistemin yapısal bütünlüğünü bozan bir travmanın, periferik sinir sistemi, kardiovasküler sistem elemanları üzerinde de sorunlara yol açması sık karşılaşılan bir durumdur. Periferik sinir sisteminin bu şekilde travma ile hasarlanması sonrası iyileşmesi iyi derecede mikrocerrahi tekniklerinin var olmasına karşın genellikle kötüdür [43].

Periferik sinir travmaları sonucu sinirin kendi bütünlüğünün bozulması yanında siniri besleyen yapıların da travmadan etkilenmesi sık görülen bir durumdur. Ayrıca sinirin travmaya uğraması esnasında veya sonrasında sinirin etrafında veya içerisinde bulunan ve siniri besleme rolünü üstlenen vasa nervorum'un bu travmadan etkilenip etkilenmediği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak sinirin iyi bir şekilde iyileşmesi ve fonksiyonunu yerine getirebilmesi için intakt bir damarsal ağın varlığı gereklidir.

Literatürde, FK506'nın çeşitli sinir modelleri üzerinde ve çeşitli dozlarda yapılan deneysel çalışmalarda sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu etkilerinin olduğu konusunda pekçok rapor mevcuttur. Bu çalışmada siyatik sinir üzerinde epinöral devaskülarizasyon uygulanması sonrası oluşturulan fokal dejenerasyon modeli üzerine FK506 uygulamasının periferik sinir fonksiyonu ve ultrastrüktürü üzerine olan etkisinin de araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Periferik sinir

Vücut, içinden ya da dış çevreden alınan uyarıları sinir sistemi aracılığıyla algılar, değerlendirir ve hedef dokuda bir cevap oluşturur. Alınan farklı uyarılar karşısında motor bir hareket ya da kimyasal salgılama yolu ile organizmanın yanıtını düzenleyen bu hücrelere sinir hücresi (nöron) adı verilir. Sinir hücrelerinin bir araya gelerek oluşturduğu sistem ise sinir sistemi olarak isimlendirilir. Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Merkezi sinir sistemi, beyin ve medulla spinalis'ten oluşur. Periferik sinir sistemi ise 12 çift kranial sinir ve 31 çift spinal sinir ile ganglionlardan oluşmaktadır [2, 8, 21, 24, 33, 38, 44, 46, 49].

2.1.1. Konnektif yapı

Periferik siniri saran kılıflar bağ dokusu kaynaklıdır ve bu kılıflar epinörium, endonörium ve perinörium olarak isimlendirilirler. Sinir lifleri gerilmeye ve basınca oldukça hassas olduklarından dolayı bu bağ doku tabakaları sinirin dış etkenlere karşı korunması için önemlidir. Her bir sinir lifi endonörium ile sarılıdır. Endonörium, longitudinal yerleşimli kollajen lifler içerir. Birkaç sinir lifi bir araya gelerek perinörium ile sarılır ve böylece bir sinir demeti (fasikül) meydana gelir. Perinörium, fibroblast kaynaklı yassılaştırmış poligonal hücrelerden oluşan lameller bir yapıya sahiptir. Yüzeyel lameller geçirgen özelliğe sahipken; derin lameller kan-sinir bariyeri içeren damarsal yapılara sahiptirler. Perinörium aynı zamanda longitudinal gerim kuvvetlerinin etkisi altındadır. Sinirin gerilmeye karşı direncinin önemli bir bölümü bu bağ dokusu kılıfı ile gerçekleşmektedir. Epinörium ise birden fazla sinir demetini saran gevşek areolar bağ dokusudur. Epinörium, fibroblast, kollajen ve yağ hücreleri içerir. İçerdiği yağ hücreleri, travmalara karşı bir yastık görevi görür [2, 8, 21, 24, 33, 38, 44, 46, 49].

2.1.2. Damarsal yapı

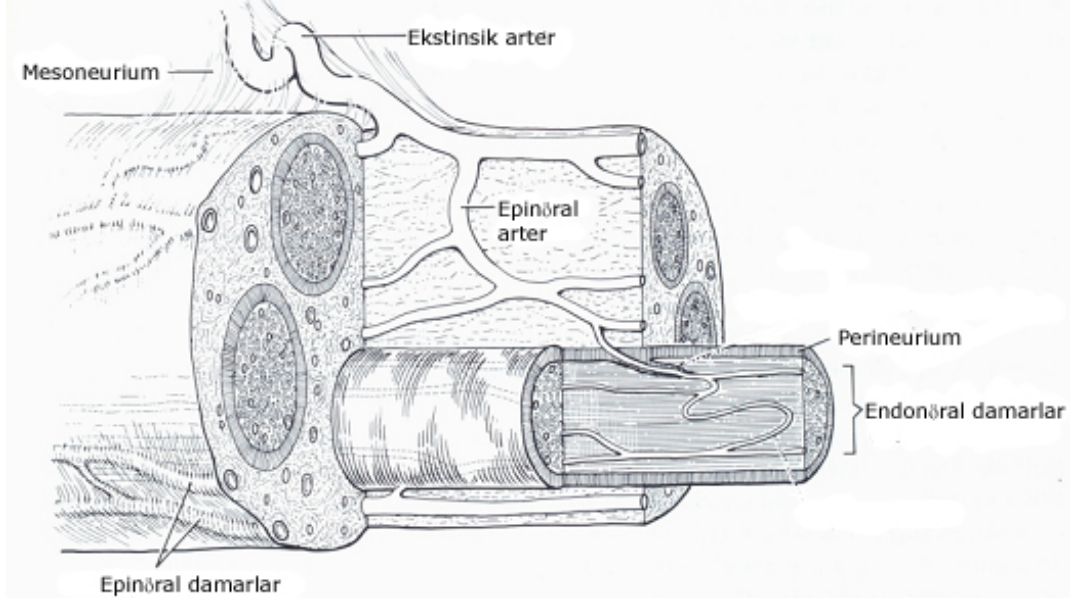
Bir sinir hücresinin fonksiyonunu devam ettirebilmesi için yeterli ve devamlı oksijen desteğine gereksinimi vardır. Periferik sinirin farklı segmentleri ve farklı tabakaları arasında iyi gelişmiş kollateral dallar tarafından oluşturulan geniş damar pleksusları vardır [1, 6, 7, 9, 29]. Bu damar pleksusları, ekstrasik ve intrinsik sistem olarak isimlendirilen iki fonksiyonel bölümden oluşur [29]. Ekstrasik sistem, değişen çapta ve genellikle komşu büyük arter ve venlerden köken alan segmental damarlardan oluşur. Ek olarak, önemli miktarda kan desteği, kas perforatorları ve periosteal damarlardan sağlanır. Bu besleyici damarlar, sinirin epinörium tabakasına ulaştığında dallara (inen ve çıkan) ayrılarak; sinirin bütün tabakalarında intranöral pleksusu oluştururlar [49]. Damarlar, epinörium'un derin ve yüzeyel tabakalarında yerleşim gösterirler. Bu damarlar, perinöriumdaki damar ağları ile çok fazla anastomoz yaparlar. Perinöral pleksustaki anastomotik damarlar perinöriumdan endonöral tabakaya oblik olarak uzanırlar [49] (Şekil 2.1).

Ekstrinsik sistemden köken alan venler genel olarak arterlere yandaşlık ederler. Doku içinde yer alan bu arter ve venler kıvrıntılı bir seyir izlerler. Bu özellik, damarların sinirin gerimi sırasında hareket serbestliğine olanak sağlar [27]. Epinöriumdaki intranöral damarlar sempatik sinir sistemi tarafından innerve edilir ve buradaki sinir lifleri besleyici damarlara yakın seyrederekler [6, 25, 35].

İntrinsik intranöral damar sistemi, ekstrinsik besleyici damarların sinir içerisine girdiği noktadan başlar. Bu dallar, epinörium içinde longitudinal olarak uzanarak; geniş damar ağlarını oluştururlar. Bu damarlarda, kan akımı predominant paterne sahip değildir (ters yönde kan akımlarının aynı damarın farklı noktalarında aynı anda oluşabileceği bildirilmiştir) [6]. Anastomozlar, çoğunlukla arteriol-arteriol, venül-venül, ve arteriol- venül arasında bulunur. Epinöriumdaki damarsal ağın, kan ihtiyacına göre geniş hacimdeki kanı yeniden yönlendirebileceği ve böylece yüksek adaptasyon kapasitesine sahip bir sistem olduğu bildirilmiştir [7]. Benzer organizasyon, perinöral damarlarda da vardır. Endonöriumun primer kapiller pleksusu ve birbirleri ile çeşitli anastomozlar yapan pekçok longitudinal damar vardır (Şekil 2.1). Bu birleştirici damarlar, sinir içerisinde oblik seyir izlerler ve perinöral bağ dokusunun bir kısmını da üzerlerinde taşırlar [10, 49].

Her bir fasikülde endonöral damar ağı kılcal kan damarlarından oluşmaktadır [6, 7, 25, 26]. Bu endonöral damar yatağı sinirin uzunluğu boyunca devam eder. Endonöriumdaki damarların merkezi sinir sistemi damarlanması ile fonksiyonel ve yapısal olarak benzerlik gösterdikleri bildirilmiştir [29]. Endonöral damarlar birbirleri ile anastomoz yaparlar ve normal şartlar altında vasküler yatağın bazı bölümleri her zaman fonksiyoneldir. *In vivo* deneylerde, vasküler yatağın tam perfüzyonunun sadece hafif mekanik travma ve sinire ılık serum fizyolojik uygulandığı zaman gerçekleştiği bildirilmiştir [49].

Kan-sinir bariyeri, kan içerisinde bulunan bazı maddelerin geçişine izin verir. Epinöral kan damarlarında proteinler damar duvarından kolayca geçerler. Endonöral damarlarda ise endotel boyunca protein geçişi ya çok azdır ya da hiç yoktur [35, 49].



Şekil 2.1. Periferik siniri besleyen damarların organizasyonu [49].

2.2. Periferik sinir yaralanması

Periferik sinirler, pekçok nedenden dolayı hasara uğrayabilirler. Bu nedenler arasında mekanik, termal, iskemik, ışınal (radyasyon), elektriksel ve kimyasal etkenler yer almaktadır [29, 49]. Bu etkenler içerisinde en sık olanı travmatik yaralanmalardır. Periferik sinir yaralanmaları, kişinin fonksiyonlarını ileri derecede kısıtlayabilmesi, sosyoekonomik ve psikolojik durumunu etkileyebilme potansiyelinden dolayı pekçok araştırmacı tarafından çalışma konusu yapılmış bir alandır. Bu çalışmalarda temel amaç, periferik sinir yaralanması sonrası sinir iyileşmesinin (fonksiyonun geri dönüşü) en kısa sürede sağlanmasıdır. Bu iyileşmenin hızlı ve istenilen şekilde olması hasarın tipine ve uygulanan tedavi stratejisine bağlıdır [36].

Periferik sinir yaralanmaları, ilgili vücut segmentinde motor, duyu ve otonomik fonksiyonlarda kısmi veya tam kayıp ile sonuçlanır [13]. Reinnervasyon, hasarlanan aksonun kollateral dallarının ya da aksonun kendisinin rejenerasyonu ile gerçekleşmektedir. Periferik sinir yaralanmasından sonra akson ve myelin kılıf lezyonun distaline doğru degrade olur. Dejenere yapılar, makrofaj infiltrasyonu ve Schwann hücreleri ile elimine edilir. Bu sürece, Wallerian dejenerasyon adı verilir. Aksonal rejenerasyon, dejenere sinirin ekstrasellüler matriksinden, makrofajlar ve Schwann hücresinden salınan trofik ve tropik faktörlere gereksinim duymaktadır [29, 46].

Periferik sinir harabiyeti, uygulanan ezi süresine ve kuvvetine bağlı olarak farklı şiddette olabilir. Bu şiddetin düzeyine konnektif dokusunda bir etkisi vardır. Örneğin, fazla miktardaki bir bağ dokusu ile sarılı polifasiküler sinirler, az miktarda bağ dokusu ile sarılı tek fasikül içeren sinirlere göre daha az oranda eziden etkilenirler. Fasikül içerisindeki liflerin çapları da önemli bir faktördür. Büyük çaplı lifler, küçük çaplı liflere göre ezi ve iskemiye daha fazla duyarlıdır. Ayrıca, kalın perinörrium içerisine gömülü küçük lifler, ince

perinörium içerisine gömülü kalın liflere oranla daha az oranda eziye duyarlıdırlar [28, 29].

2.2.1. Periferik sinir yaralanması için deneysel modeller

Periferik sinir rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda, pek çok hayvan türü, sinir modeli ve yaralanma tipleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda kemirgenlerden; özellikle fare ve sıçanlardan yararlanılmıştır. Bu denekler üzerinde çok çeşitli sinir lezyonları çalışılmıştır. Bu sinirler arasında, siyatik, femoral, fasiyal, median ve ulnar sinirler sayılabilir. Periferik sinir yaralanmaları ile ilgili çalışmalarda siyatik sinir modeli en yaygın olarak tercih edilen modeldir [31, 34].

2.2.2. Periferik sinir yaralanması ile ilgili sınıflamalar

Periferik sinir hasarının tipi ile ilgili günümüzde 2 farklı sınıflama yaygın olarak kullanılmaktadır [29, 47, 49]. Bunlar:

2.2.2.1. Seddon sınıflaması

Seddon sınıflaması, hasarın doğasına göre yapılmıştır. Bu sınıflama kapsamında üç terimden bahsedilir [49]. Bunlar:

Nöropraksi: Periferik sinir dejenerasyonu olmaksızın sinir paralizinin görüldüğü durumları tanımlar.

Aksonotmezis: Sinir dokusunun ciddi yaralanmalarını tanımlar, ancak epinörium ve diğer çevre destek dokuları korunmuş ya da çok az hasar görmüştür.

Nörotmezis: Periferik sinir bütünlüğünün devamlılığını kaybettiği (kesildiği) durumları tanımlar. Anatomik bütünlük bozulabilir ya da epinöral kılıf devamlılık gösterebilir.

2.2.2.2. Sunderland sınıflaması

Sunderland sınıflaması, sinir harabiyetinin yapısal ve histolojik sonuçlarına ve fonksiyon kaybına göre yapılmıştır [47, 49]. Bu sınıflama kapsamında beş dereceden bahsedilir.

1. derece yaralanma: Akson ve diğer yapılar korunurken yaralanma bölgesinde iletim bloğu mevcuttur (Şekil 2.2). Bu sınıflama Seddon'un tanımladığı Nöropraksi'ye uyar.

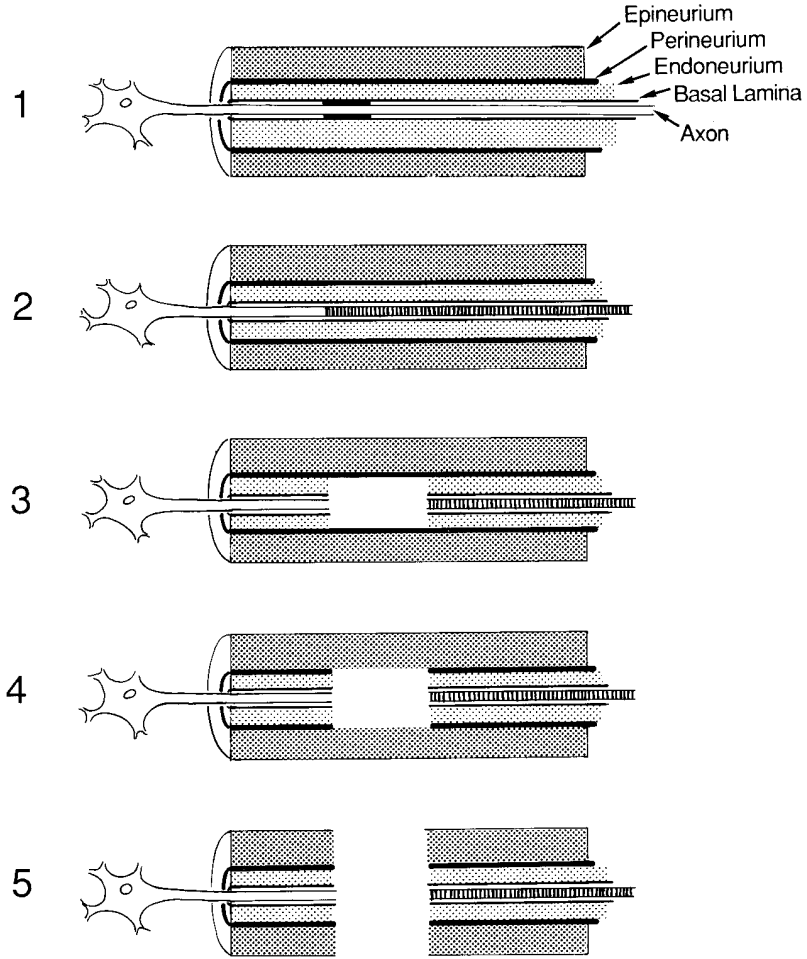
2. derece yaralanma: Yaralanma bölgesinde akson yapısı bozulur, hasar bölgesinin distalinde ve belki de biraz proksimalinde Wallerian dejenerasyonu görülür. Aksonların genel düzeni bozulmamıştır. Sinirin geri kalan yapıları sağlamdır ve endonöral tüplerin devamlılığı vardır (Şekil 2.2)

3. derece yaralanma: Aksonal yapıda bozulma ve Wallerian dejenerasyonun yanı sıra endonöral tüplerin de bütünlüğü bozulmuştur. Bu nedenle rejenerasyon gösteren aksonların uygun olmayan hedefle gitme potansiyelleri vardır (Şekil 2.2).

4. derece yaralanma: Sinir gövdesinin bütünlüğünün korunmasına rağmen yaralanan segmenti fibröz doku kaplar. Schwann hücreleri ve rejenere olan aksonlar genişleyerek nörinom oluşturabilir. Bu yaralanmada, sinir devamlılığı korunurken iç yapı tamamen bozulmuştur (Şekil 2.2). 2., 3, ve 4. derece yaralanma Seddon'un tanımladığı aksonotmezis'e uyar.

5. derece yaralanma: Sinir gövdesinin devamlılığının kaybolması anlamına gelir (Şekil 2.2).

6. derece yaralanma: 1988 yılında Mackinnon [30] tarafından Sunderland sınıflamasına eklenmiştir. Bu yaralanma çeşidi, yukarıdaki yaralanma derecelerinin birlikte bulunduğu durumları tanımlar.



Şekil 2.2.Sunderland sınıflamasının beş derecesi. 1: 1. derece yaralanma, 2: 2. derece yaralanma, 3: 3. derece yaralanma, 4: 4. derece yaralanma, 5: 5. derece yaralanma [47].

2.3. FK506 (Tacrolimus, Prograf)

FK506 (Jenerik adı: Tacrolimus, Ticari adı: Prograf), Japonya'nın Tsukuba bölgesinde bulunan *Streptomyces tsukubaensis*'in fermentasyonu sonucu oluşan makrolid lakton yapısında güçlü immünsüpresif özelliğe sahip bir ajandır [19, 41]. İlk kez Kino ve ark. [22] tarafından izole edilmiştir. İmmünsüpresyon oluşturma konusunda FK506 ve Siklosporin A (CsA) çok sık kullanılan ajanlardır. İlk zamanlar CsA bu amaçla kullanılırken FK506'nın CsA'ya oranla daha az toksik ve etki gücünün daha fazla olması nedeniyle günümüzde FK506, CsA'nın yerine geçmiştir [52].

FK506'nın karaciğer, böbrek, kemik iliği, kalp, ince bağırsak, akciğer, cilt, kornea transplantasyon modelleri ile yapılan çalışmalarda konak ve transplant dokunun yaşamını uzattığı gösterilmiştir [14]. FK506'nın etki mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır. Ancak FK506 T-lenfosit aktivasyonunu inhibe ederek immünsüpresyon gerçekleştirdiği bilinmektedir. Ayrıca, FK506'nın FKBP-12 olarak bilinen hücre içi proteine (FK506 binding protein) bağlanmak suretiyle etkili olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca FKBP-12 + FK506 + kalsiyum + kalmodulin + kalsinörin kompleksi oluştuktan sonra ve kalsinörinin fosfataz aktivitesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir. Böylece, T-lenfosit aktivasyonunun inhibisyonu (immünsüpresyon) gerçekleştiği bildirilmiştir [14].

FK506'nın immünsüpresif olarak kullanılması sırasında rastlantısal olarak sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu etkisinin olduğu da tespit edilmiştir. Bu etkisi, aksonal rejenerasyon oranını (doza bağımlı şekilde) ve fonksiyonel iyileşme hızını artırma şeklindedir [51-53]. Ayrıca, nörit gelişimini de arttırdığı *in vitro* olarak gösterilmiştir [49]. Sinir rejenerasyonu üzerine etkisi önceleri FKBP-12 ile ilişkili olduğu düşünülmüş ancak sonradan bu nörotropik etkinin FKBP-52 üzerinden yürüdüğü gösterilmiştir [32]. Bu nörotrofik etkinin immünsüpresyondan farklı bir mekanizma altında yürütüldüğü kabul edilmektedir [14].

İmmünofilinler merkezi ve periferik sinir sistemlerinde de yoğun olarak bulunurlar [17, 52]. Siyatik sinir yaralanmalarında FK506'nın doza bağımlı olarak aksonal rejenerasyon hızını arttırdığı gösterilmesinden sonra FKBP türleri ve etki mekanizmaları üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bir çalışmada daha önceden sinir rejenerasyonunu arttırdığı gösterilen steroid hormonların (glukokortikoidler, östrojenler ve androjenler) davranışı ile nöroimmünofilin ligantlar (örn. FK506) arasında bağlantı araştırılmıştır [45]. Ayrıca FK506'nın büyüme konisinde (growth cone) bulunan GAP-43 miktarında artışa neden olduğu bildirilmiştir. Bu artışında sinir filizlenmesini indüklediği bildirilmektedir [20, 50].

MATERYAL VE METOT

3.1. Denekler

Çalışmamızda, 48 *Rattus norvegicus* türü yetişkin erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler 12 saat gece, 12 saat gündüz siklusunda ve her kafeste 4 denek olacak şekilde sınırsız yem ve su ile beslenmişlerdir. Denekler üzerinde yapılan tüm işlemler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan bakım-kullanım ve hayvan etik kurulu tarafından değerlendirilmiş ve onaylanmıştır (2008/27).

3.2. Deney grupları

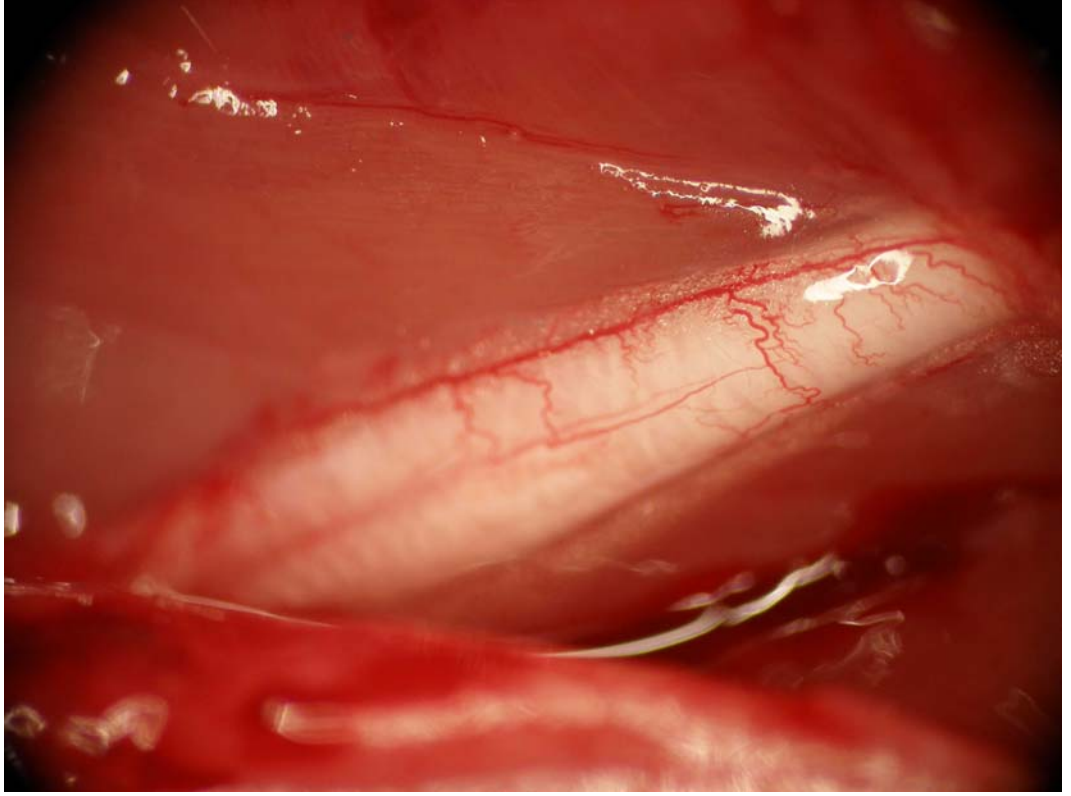
Çalışmamızda kullanılan denekler aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde sınıflanmıştır. Tüm deneklerin ortalama 300-350 gram arasında olmasına dikkat edilmiştir.

Tablo 3.2.1: Deney grupları.

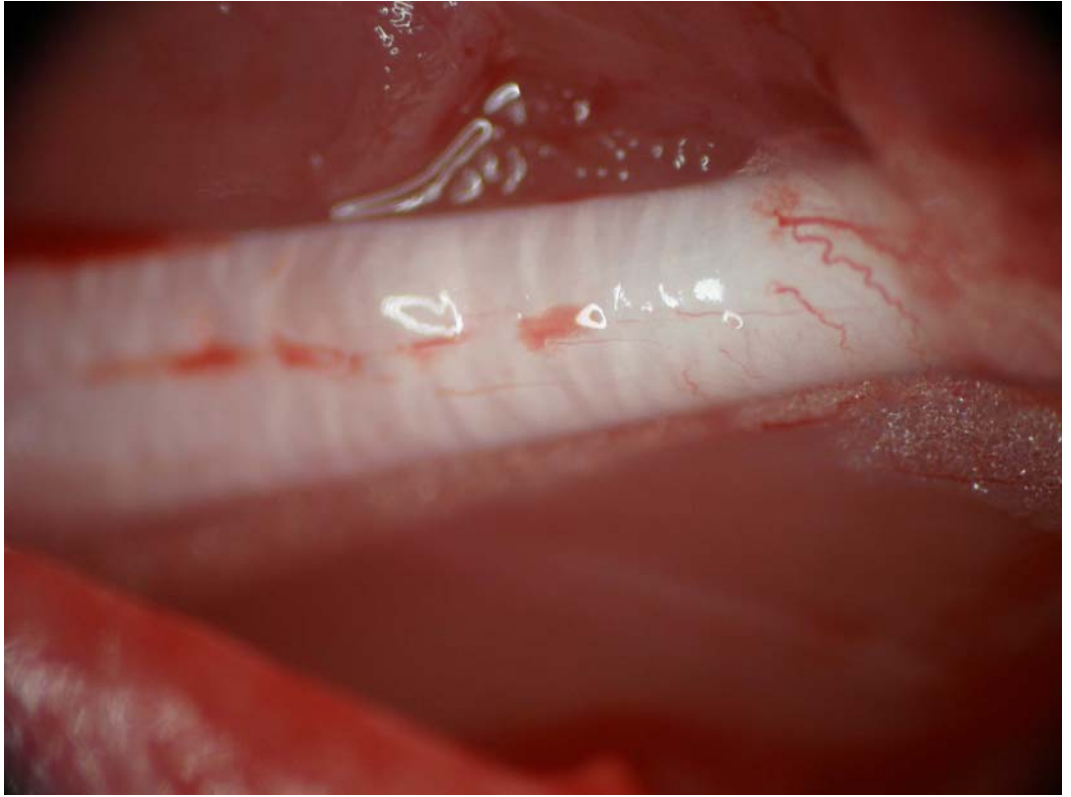
Grup Adı	Denek Sayısı
Kontrol	12
Sham	12
FK506 (+)	12
FK506 (-)	12

3.3. Epinöral devaskülarizasyon (Vascular stripping)

Cerrahi işlem öncesinde deneklerin anestezisi, ksilazin HCl (15 mg/kg) ve ketamin (100 mg/kg) karışımı ile intraperitoneal enjeksiyon halinde uygulanmıştır. Sol uyluğun arka ve yan yüzü traşlanarak antiseptik solusyon ile temizlenmiş ve uyluğun dış yanına bir deri insizyonu yapılmıştır. Fiberoptik aydınlatmalı operasyon mikroskobu (Olympus, SZ61) altında uyluk kasları arasından girilerek siyatik sinir ve dallarına ulaşılmıştır. Dikkatli bir diseksiyon ile siyatik sinir, etrafındaki konnektif dokudan 3-3.5 cm uzunluğunda izole edilmiştir (Şekil 3.1). Bu aşamadan sonra, siyatik siniri besleyen epinöral damarlara (vasa nervorum) 2-2.5 cm uzunluğunda devaskülarizasyon uygulanmıştır (Şekil 3.2). Bu işlem esnasında, epinöruma zarar verilmemesine dikkat edilmiştir. Epinöral devaskülarizasyon uygulanmış alan, yakın çevresinde bulunan kasa iki dikiş (alt ve üst seviyeye) atılarak işaretlenmiştir. Cerrahi işlem sonrasında, kesi 3.0 dikiş materyali ile dikilerek kapatılmış ve denekler postoperatif bakım odasında iyileşmeye bırakılmıştır. Denekler üzerinde yapılan cerrahi işlemler sonrasında denekler standart kafeslerine alındıktan sonra deneklerin uyanmalarına yakın bir zamanda deneklere Tramadol HCl (3 gün boyunca 20 mg/kg) verilerek postoperatif analjezileri sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Epinöral devaskülarizasyon öncesi siyatik sinir görünümü.



Şekil 3.2. Epinöral devaskülarizasyon sonrası siyatik sinir görünümü.

3.4. FK506 uygulaması

FK506 tedavisi, subkutan enjeksiyon yoluyla (ense derisinden) 5 mg/kg dozunda ayarlanarak verilmiştir. Deneklerin haftalık kilo ölçümleri yapılarak kiloları ile orantılı olarak FK506 tedavisi gerçekleştirilmiştir. İlk enjeksiyon, cerrahi operasyon sonrası birinci postoperatif günde gerçekleştirilmiş ve bu tedavi dört hafta boyunca hergün sabah saatlerinde (10:00-11:00 arası) FK506 (+) deneklere uygulanmıştır. FK506 (-) deneklere ise aynı hacimde serum fizyolojik uygulanmıştır.

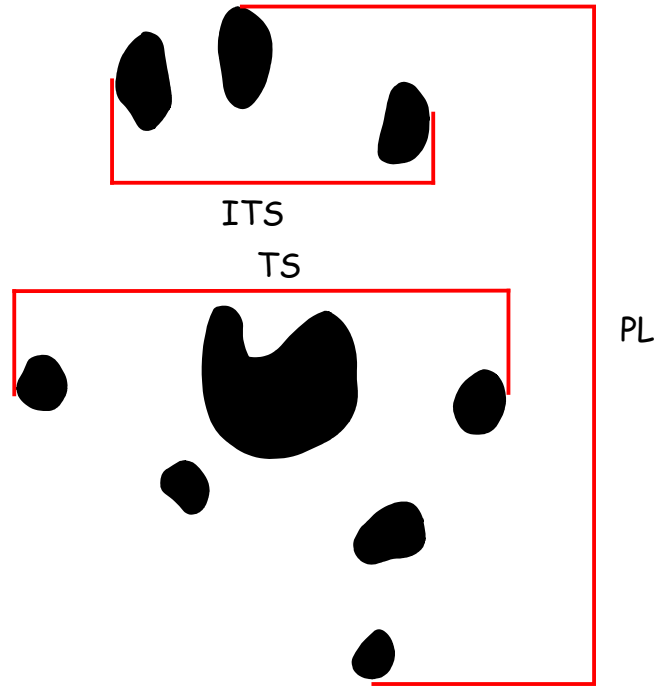
3.5. Deneklerin sakrifiyonu

Dördüncü postoperatif haftanın sonunda denekler 15 mg/kg Xylazin HCl ve 100 mg/kg Ketamin ile intraperitoneal enjeksiyon yoluyla anestezileri gerçekleştirilerek torakotomi yapılmış ve kalbe ulaşılmıştır. Transkardial perfüzyon işlemi için, kalbin sol ventrikülüne bir kanül ile girilmiş ve sağ atriuma bir delik açılmıştır. Transkardial perfüzyon için 250 ml 0.1 M fosfat tamponu kullanılmıştır. Perfüzyon işlemi sırasında kanın akması ve verilen perfüzyon solüsyonunun renginin değişmediğinin görülmesi ile perfüzyon işleminin başarı bir şekilde tamamlandığı anlaşılmıştır. Perfüzyondan sonraki fiksasyon basamağında her bir hayvan için 250 ml %4 paraformaldehit ve %2 glutaraldehit karışımı kullanılmıştır. Perfüzyon ve fiksasyon işlemi tamamlandıktan sonra siyatik sinir örnekleri alınarak deneğin ötenazisi gerçekleştirilmiştir.

3.6. Değerlendirme testleri

3.6.1. Motor fonksiyon testi (Yürüme patern analizi)

Çalışmamızda motor fonksiyon, yürüme patern analizi ile değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucu siyatik fonksiyon indeksi (SFI) hesaplanmıştır. SFI değerinin hesaplanmasında üç farklı parametre kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır (PL: topuk ile üçüncü parmağın uç kısmı arasındaki mesafe, TS: birinci ve beşinci ayak parmakları arasındaki mesafe, ITS: ikinci ve dördüncü parmaklar arasındaki mesafe) (Şekil 3.3). Siyatik fonksiyon indeksinin hesaplanması için deneklerin arka ayakları mürekkepli stampa üzerine bastırıldıktan sonra 80 cm uzunluğunda, 7 cm genişliğinde, 10 derecelik eğime sahip bir yürüme bandı üzerinde yürütülmüşlerdir. Zemine bir fotokopi kağıdı yerleştirilerek ayak izlerinin kağıda çıkması sağlanmıştır. Elde edilen ayak izleri değerleri Bain ve arkadaşlarının [4] tarif ettikleri matematik formülasyonuna konularak siyatik fonksiyon indeksi hesaplanmıştır. Yürüme patern analizi için 0., 1., 7., 14., 21., 28. günlerde alınan ayak izleri kullanılarak siyatik fonksiyon indeksi hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Sıçan ayak izleri kullanılarak elde edilen ölçümler.

3.6.2. Duyusal fonksiyon testi (Pinch test)

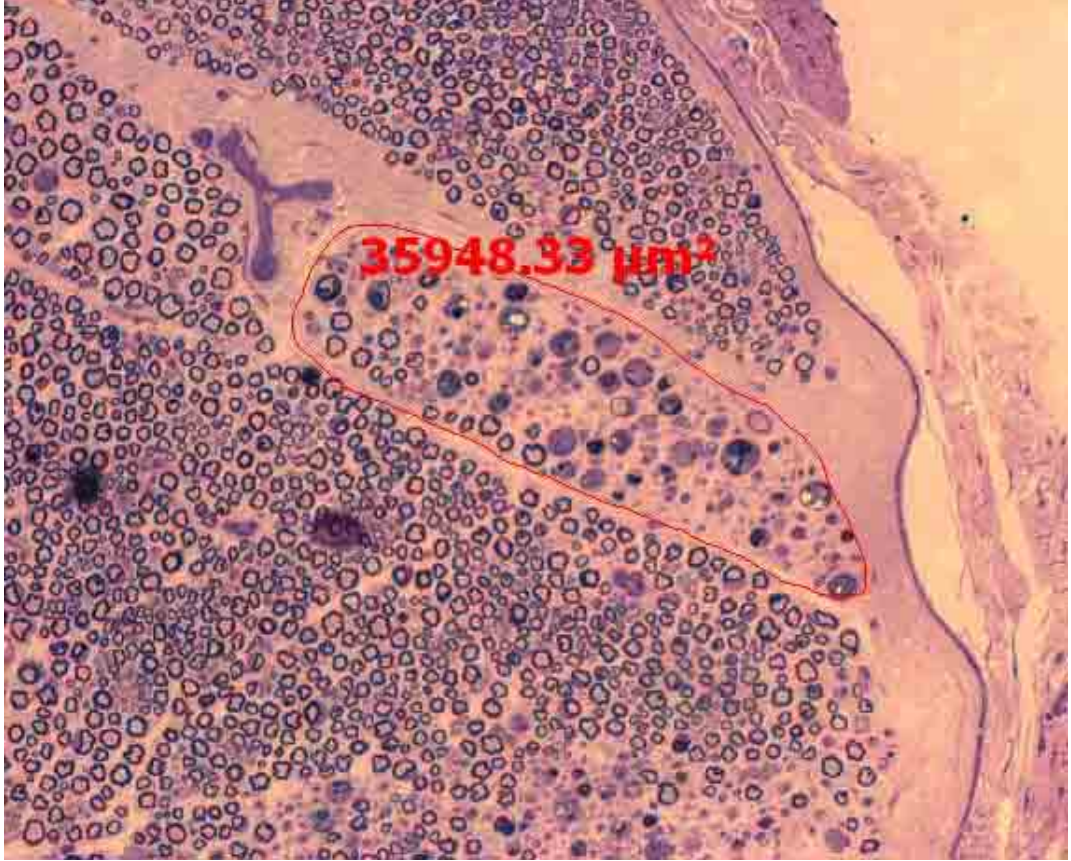
Duyusal fonksiyonun iyileşmesi, Pinch test ile analiz edilmiştir. Bu test için denek fazla bir strese maruz bırakılmadan tutularak ayak taban derisi bir penset yardımı ile kısırılmıştır. Bu kısırmaya (çimdiğe) karşı oluşturulan cevaba geri çekme refleksi (foot withdrawal) adı verilmektedir. Ayak taban derisinde, deneklerin geri çekme refleksini gösterdiği alanlar tespit edilerek; bu teste verilen cevap not edilmiştir. Fonksiyonel iyileşmeyi değerlendirmek için geri çekme refleksine cevap vermeyen denekler için Grade 0, hafif derecede cevap veren denekler için Grade 1, orta derecede geri çekme refleksi gösteren denekler için Grade 2 ve tam bir yanıt gösteren denekler için de Grade 3 olmak üzere derecelendirme yapılmıştır. Geri çekme refleksi ile cevap veren rat sayıları her grup için 0., 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde kaydedilmiştir.

3.6.3. Işık ve Elektron mikroskopik inceleme

Dördüncü haftanın sonunda sakrifiye edilen deneklerden alınan siyatik sinir örnekleri, 0.1 M Sorenson fosfat tamponunda (pH 7.2) hazırlanmış %4'lük gluteraldehit solusyonunda 4 °C de iki saat süreyle fikse edilmişlerdir. Fiksasyondan sonra aynı tampon içinde yıkanan örnekler, %2'lik Osmium tetraoksit (OsO₄) solusyonunda 1 saat bekletilerek postfiksasyon yapılmıştır. Örnekler, Etil alkol serisinden geçirilip dehidratasyonları sağlandıktan sonra Araldit CY212 içine gömülerek bloklanmıştır. Bloklardan alınan 1 mikrometre kalınlığındaki yarı ince kesitler, %1'lik toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopta; 40-60 nanometre kalınlığındaki ince kesitler ise elektron mikroskopik analiz için kontrastlanarak Tıp Fakültesi Elektron Mikroskopik Görüntü Analiz Ünitesinde (TEMGA) incelenmiştir.

3.6.4. Morfometrik Analiz

Siyatik sinir örnekleri, kamera (Carl Zeiss Axiocam) ataçmanlı bir binoküler mikroskop (Axioskop 2 plus) aracılığıyla fotoğraflandı. Elde edilen görüntüler Axiovision Release 4.2 (06-2004) işletim sistemi kullanılarak fokal dejenerasyon görülen alanlar işaretlendi (Şekil 3.4). İşaretlenen alanların mikrometre kare cinsinden alanları ölçüldü.



Şekil 3.4. Fokal dejenerasyon görülen alanların morfometrik değerlendirilmesi ve bu alanların mikrometre kare cinsinden ölçülmesi.

3.7. Veri analizi

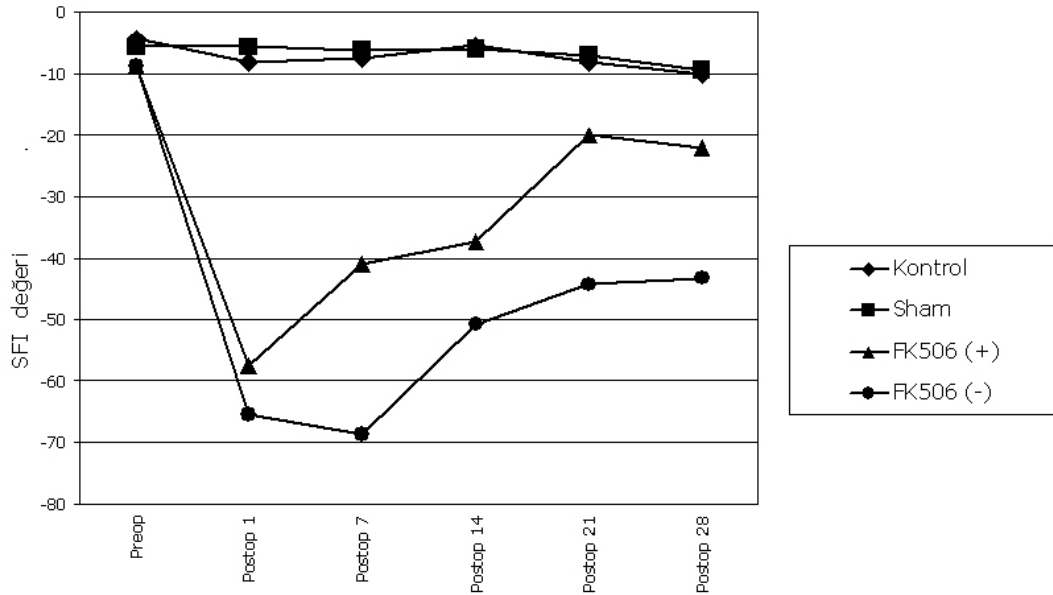
Yürüme patern analizinden elde edilen veriler her bir grup için SFI olarak (ortalama \pm standart sapma) hesaplandıktan sonra gruplar arasında istatistiksel anlamlılık için iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (student t), SFI verilerinin kaydedildiği günlerde gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (Post Hoc test olarak Tukey testi) kullanılmıştır. Pinch test verileri Ki-kare testi, morfometrik analiz ile elde edilen veriler ise student t testi ile değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler için SPSS (versiyon 11.0) programı kullanılmış ve anlamlılık düzeyi tüm testler için 0.05 olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

FK506 (+) ve FK506 (-) gruplarından ikişer denek 1. postoperatif haftada ölüm sebebiyle çalışmadan çıkarılmıştır. Geriye kalan FK506 (+) ve FK506 (-) deneklerde ise cerrahi sonrası herhangi bir ototomi belirtisi, kilo kaybı, davranışsal değişiklik ve deri değişikliği, yara enfeksiyonu gibi durumlar gözlenmemiştir. Deney süresince FK506 (-) deneklerin 304 ± 21 gr, FK506 (+) deneklerin ise 270 ± 7 gr ağırlığa sahip oldukları tespit edildi.

4.1. SFI değerleri

Cerrahi uygulanan deney gruplarında PL (topuk ile üçüncü parmağın uç kısmı arasındaki mesafe) değerleri artmış, TS (birinci ve beşinci ayak parmakları arasındaki mesafe) ve ITS (ikinci ve dördüncü parmaklar arasındaki mesafe) değerleri ise azalmıştır. Cerrahi operasyon öncesi deney gruplarında SFI (siyatik fonksiyon indeksi) değerleri kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir ($p > 0.05$). Postoperatif 1. gün SFI değerleri, kontrol, sham, FK506 (+) ve FK506 (-) gruplarında sırasıyla -8.2 ± 1.3 , -5.6 ± 2.1 , -65.3 ± 4.7 , -57.4 ± 8.3 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1). SFI degerindeki -50 'lik düzeye FK506 (+) ve FK506 (-) gruplarda sırasıyla 7. ve 21. postoperatif günde ulaşılmıştır. 21. ve 28. postoperatif günlerde FK506 (+) grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bununla birlikte aynı postoperatif günlerde kontrol grubu ile FK506 (-) grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$).

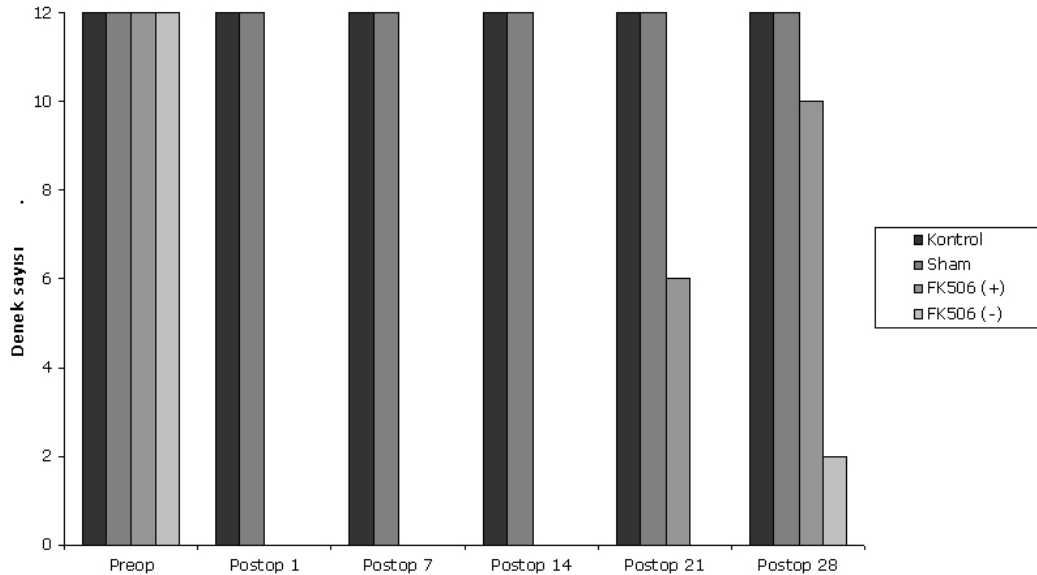


Şekil 4.1 Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası elde edilen SFI değerleri.

4.2. Pinch test bulguları

Kontrol ve sham grubunda pinch test cevabı preoperatif ve postoperatif haftalarda tam geri çekme refleksi (Grade 3) olarak tespit edildi. FK506 (+) gruptaki tam geri çekme refleksinin (Grade 3) görülmeye başlanması 3. postoperatif haftada gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bu haftada bu cevabı gösteren denek sayısı altı olarak tespit edilmiştir. Bu grubun geri kalan deneklerde ise orta derecede geri çekme refleksi (Grade 2) gözlenmiştir. Buna karşın, aynı postoperatif haftada FK506 (-) gruptaki deneklerden 6 denekte hafif derecede geri çekme refleksi (Grade 1), 4 denekte ise orta derecede geri çekme refleksi (Grade 2) gözlenmiştir. 3. postoperatif haftada FK506 (+) ve FK506 (-) deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$).

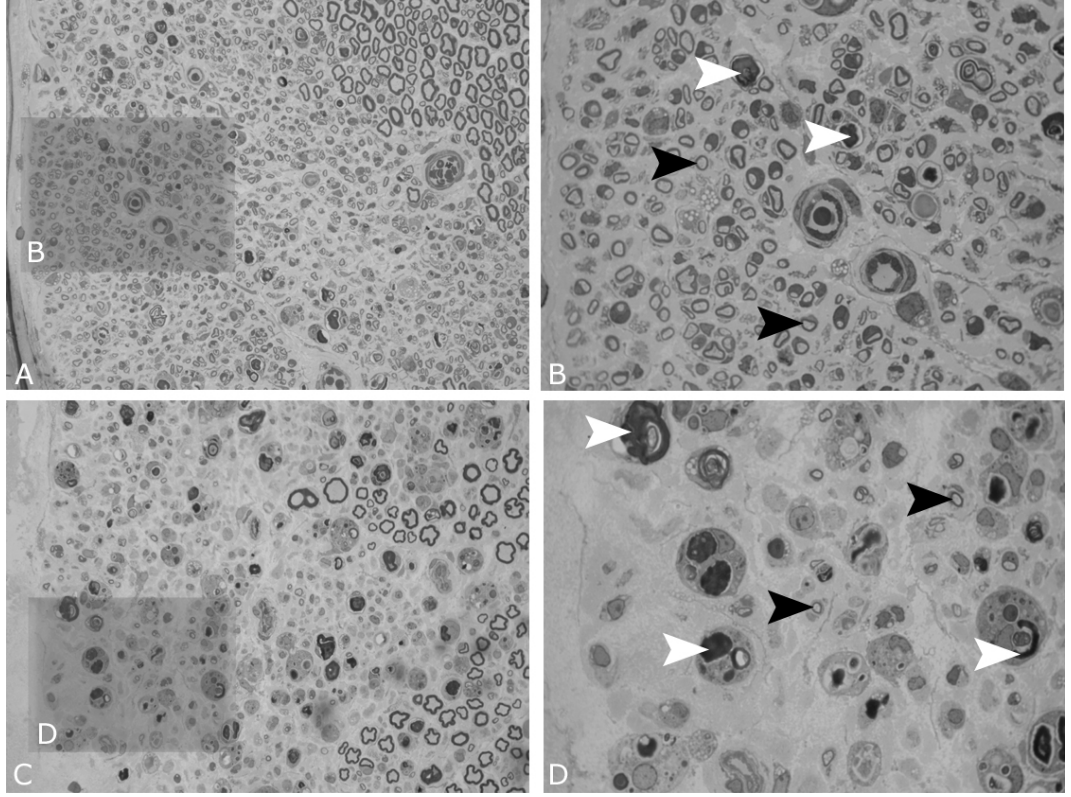
4. postoperatif haftada FK506 (+) grubundaki bütün deneklerden tam bir yanıt alınmıştır. Buna karşın, FK506 (-) grupta bulunan deneklerden sadece 2 denekten tam bir geri çekme yanıtı (Grade 3) alınmıştır. Sonuçta, FK506 (-) gruptaki tam geri çekme refleksinin (Grade 3) görülmeye başlanmasının 4. postoperatif hafta içinde gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2). 3. postoperatif haftada hafif derecede geri çekme refleksi (Grade 1) gösteren deneklerin 4. postoperatif haftada da aynı yanıtı gösterdikleri tespit edilmiştir. Aynı bulgu orta derecede geri çekme refleksi (Grade 2) gösteren denekler iki denek içinde geçerlidir. Bu postoperatif haftada da FK506 (+) ve FK506 (-) deney grupları grup arasında pinch teste tam yanıt veren denek sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4.2. Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası tam geri çekme refleksi (Grade 3) gösteren denek sayıları.

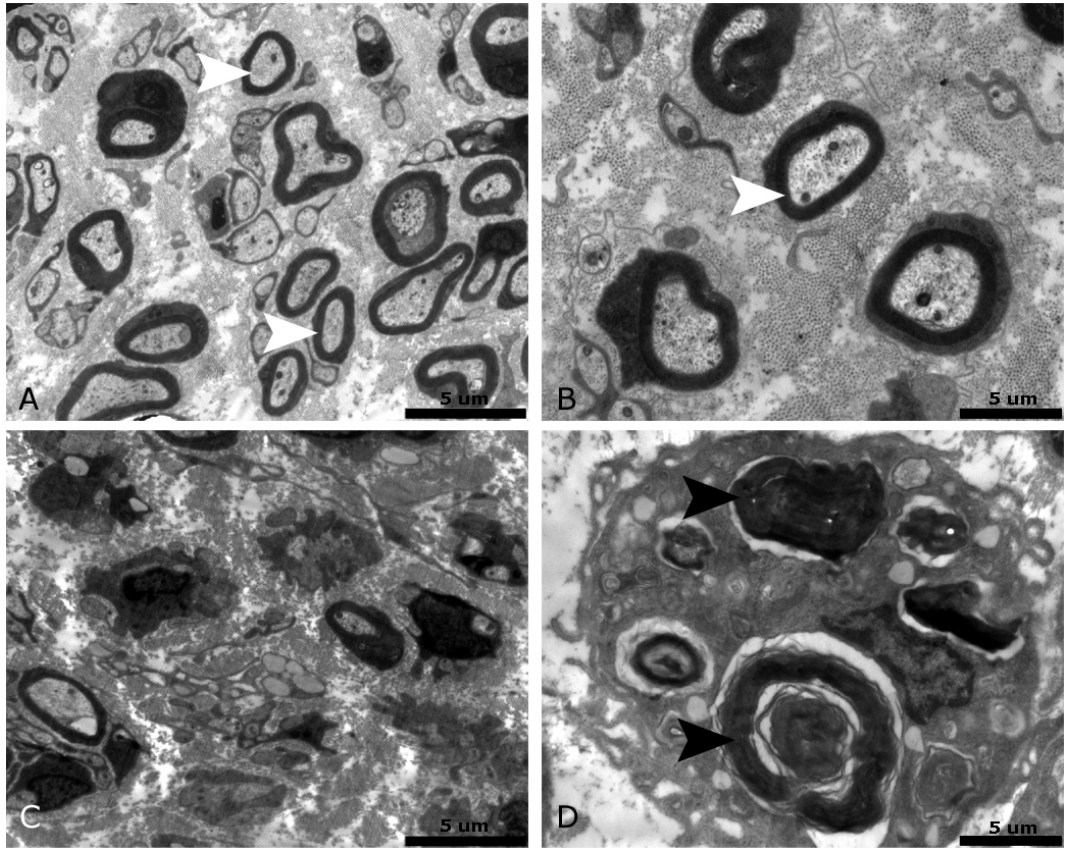
4.3. Işık ve Elektron mikroskopik değerlendirme

Kontrol ve sham gruplarının ışık mikroskopik değerlendirmesinde myelinli ve myelinsiz sinir lifleri içeren normal bir siyatik sinir yapısı gözlenmiş ve myelin deformasyonu, hasarlanmış bir sinir lifi yapısına rastlanılmamıştır. Buna karşın, FK506 (+) ve FK506 (-) deney gruplarından elde edilen siyatik sinir örneklerinde özellikle sinir dokusunun periferik kısımlarında (subperinöral alanlar) dejeneratif alanlar gözlenmiştir (Şekil 4.3, 4.4). Birçok myelin rezidüsü içeren bu dejeneratif alanların bazı sinir örneklerinde fasiküler bir lokalizasyon gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.5). Siyatik sinirin merkezi kısmında (sentrifasiküler alan) yer alan fasiküllerin her iki deney grubunda da normal bir endonörium yapısına sahip oldukları tespit edildi.

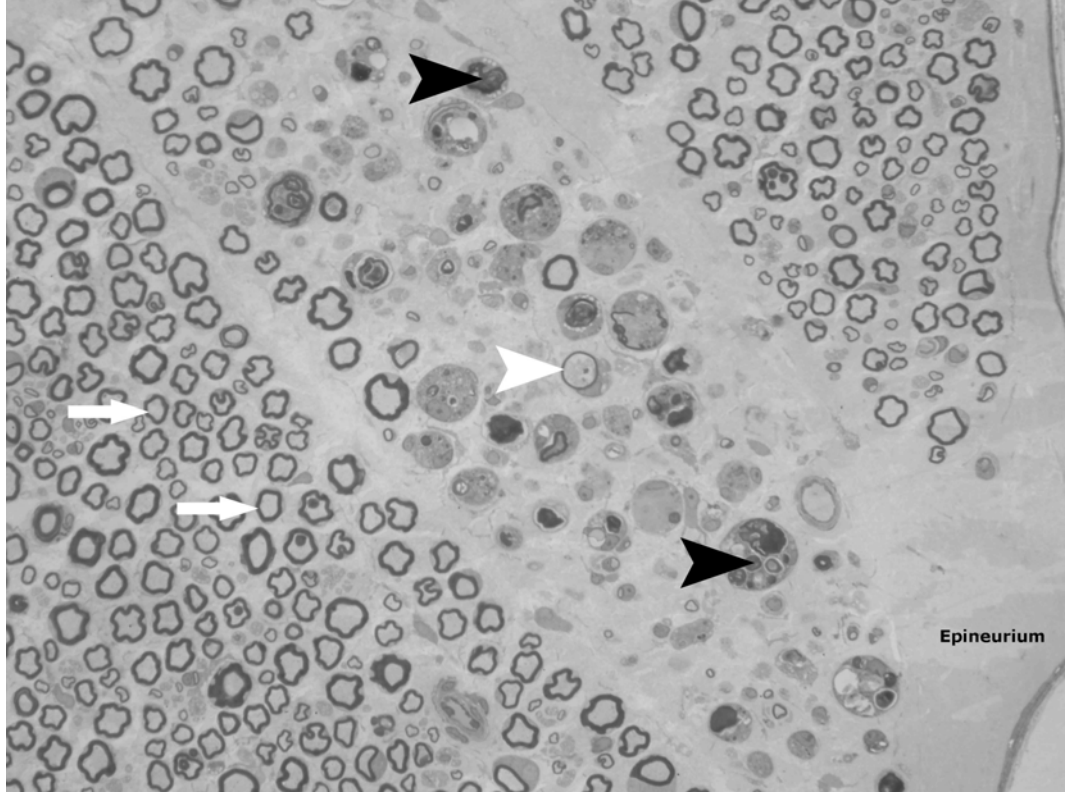


Şekil 4.3. Epinöral devaskularizasyon uygulanan gruptaki siyatik sinirlerin ışık mikroskopik görüntüleri. **A:** FK506 (+) grupta subperinöral alandaki myelin debris. **B:** A panelinde gösterilen alanın büyütülmüş görünümü. **C:** FK506 (-) grupta siyatik sinirin subperinöral alanındaki myelin debris. **D:** C panelinde gösterilen alanın büyütülmüş görünümü. Beyaz ok başı myelin rezidülerini, siyah ok başı ise remyelinize olan sinir liflerini göstermektedir.

Elektron mikroskopik değerlendirme, ışık mikroskopi bulgularının destenlendiği saptanmıştır. Elektron mikroskopik değerlendirme sonucunda kontrol ve sham grubunda ödemli bir görünüme rastlanmamıştır. Myelinli ve myelinsiz sinir liflerinin düzgün bir şekilde görüldüğü tespit edilmiştir. FK506 (-) grupta myelin rezidüsü içeren pekçok fagositik aktiviteye sahip hücreler (makrofaj ve schwann hücreleri) gözlenmiştir. Bu grubun, FK506 (+) gruba kıyasla daha fazla oranda fagositik hücre infiltrasyonu gösterdiği tespit edilmiştir. FK506 (+) grubunda yeni oluşmaya başlamış ince myelin kılıflara sahip çok sayıda myelinli sinir lifi gözlenmiştir. Bu myelin kılıflarının FK506 (-) gruba kıyasla daha kalın ve iyi formda görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. FK506 (+) ve FK506 (-) deney gruplarında siyatik sinirin elektron mikroskopik görünümü. **A:** FK506 (+) deney grubunda siyatik sinir görünümü. Beyaz ok başı remyelinize sinir liflerini göstermektedir. **B:** A panelinde görülen remyelinize sinir liflerinin büyütülmüş görünümü. **C:** FK506 (-) deney grubunda siyatik sinir görünümü. **D:** FK506 (-) deney grubunda myelin rezidüleri içeren fagositik hücre (makrofaj veya Schwann hücresi) görünümü.



Şekil 4.5.Fasiküler dejenerasyon gösteren siyatik sinir görünümü. Siyak ok başı myelin rezidüllerini, beyaz ok başı ise remyelinize sinir liflerini, beyaz ok ise myelinize sinir liflerini göstermektedir.

4.4. Dejenerasyon görülen alanların morfometrik değerlendirilmesi

Epinöral devaskularizasyon sonrası oluşan dejenerasyon alanları morfometrik olarak değerlendirilmiştir. Epinöral devaskularizasyon uygulanan gruplar değerlendirildiğinde FK506 (+) grupta total sinir alanı $909582 \pm 189941 \mu\text{m}^2$; FK506 (-) grupta ise $901681 \pm 122587 \mu\text{m}^2$ olduğu tespit edildi. Dejenerasyon görülen alanların total sinir alanına göre yüzdeleri FK506 (+) grupta $\%25.7 \pm 13.1$; FK506 (-) grupta ise $\%26.5 \pm 11.4$ olarak hesaplanmıştır. Verilerin istatistiksel analizleri neticesinde iki grup arasında anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

5.1 Sinirin vasküler kaynaklı hasarları

Sinir çeşitli etkenlerden dolayı hasarlanabileceği bildirilmiştir [49]. Bu hasar tiplerinden en sık olanı travmatik sinir hasarlarıdır. Akut periferik sinir harabiyeti oluşturmak için literatürde çeşitli araçlar kullanılmıştır [11, 12, 42]. Bu hasar yöntemlerinin çoğunluğu travmatik bir dejenerasyon oluşturmak içindir. Özellikle farklı şiddetlerde kuvvet uygulayan forsepsler ve anevrizma klipleri bu amaçla kullanılmıştır. Farklı kuvvetler uygulayan aletlerin her denekte standardize bir kuvvet uygulaması için bazı standardizasyon çalışmaları da yapılmıştır [5].

Periferik sinirler son derece iyi gelişmiş damarsal yapıya sahiptirler. Bu damarlar sinirlere oksijen desteği sağlayarak, hücre devamlılığının sürdürülmesi için gerekli olan enerjiyi ve impuls iletiminde gerekli olan membran potansiyelinin onarımını ve devamlılığını sağlamaktadırlar [49]. Uzun süreli anoksi veya kronik hipoksi irreversibl hasara yolaçabilir. Kas güçsüzlüğü, ağrı, parestezi, hipersensitivite ve duyu kaybı iskemik sinir lezyonlarında ortaya çıkabilen semptomlardır. İskemik sinir yaralanması, temel olarak anoksi süresi ile ilişkilidir ve Sunderland'in ilk dört yaralanma derecesine uyar [49].

Sinir iskemisi, üç farklı patolojik süreçten (geniş damar oklüzyonu, arteriolar anjiyopati, kılcal damarları tutan hastalıklar) dolayı ortaya çıkabilir. 50-400 mikrometre çapındaki arteriollerini tutan patolojik durumlar öncelikle epinöral dolaşımı etkilerler ve poliarteritis nodosa, romatoid artrit, tromboangitis obliterans (Buerger hastalığı), Churg-Strauss sendromu, Wegener granülomatozisi gibi nekrotizan anjiyopatik hastalıkları içerirler. Bu hastalıklarda epinöral arteriollerin etkilenmesi ve süreç içerisinde sinir hasarının meydana gelmesi izlenebilmektedir. Sarıkcıoğlu ve ark. [40] epinöral damarların sinir beslenmesindeki rolü üzerine yaptıkları bir çalışmada epinöral devaskülarizasyon oluşturmuşlar; ve bunun sonucunda subperinöral alanda dejenerasyon gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu modelin uygulanmasının, vaskülit gibi epinöral damarları tutan hastalıkların simüle edilmesi için uygun bir model olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda Sarıkcıoğlu ve arkadaşlarının [40] tarif ettikleri epinöral devaskülarizasyon modeli uygulanmış ve benzer şekilde subperinöral alanda dejenerasyon gözlenmiştir. Bu model kullanılarak FK506'nın fokal dejenerasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçta FK506'nın dejenerasyon görülen alanın büyüklüğünü değiştirme yönünde bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

5.2 FK506 dozu

Immunsupresif ajan olan FK506'nın periferik sinir yaralanmasından sonra, *in vivo* ortamda aksonal rejenerasyonu oranını arttırdığı bilinmektedir [15, 18, 19, 23]. Bu bağlamda, sinir rejenerasyonunu artırma potansiyeli olan FK506'nın literatürde bildirilen doz aralığı 0.05-10 mg/kg dır. FK506, oral, intramuskuler, intratekal, intravenöz ve subkutanöz olmak üzere farklı veriliş yolları da tanımlanmıştır [39]. Intratekal veriliş yolu ise çok düşük dozda FK506 verilmesi için kullanılmıştır [41]. Fakat sinir rejenerasyonunu maksimum oranda sağlayan optimal FK506 dozu araştırmacılar tarafından hala tartışılmaktadır.

Wang ve ark. [52] sinir rejenerasyonu için subkutan yolla 2, 5 ve 10mg/kg dozunda FK506 uygulamasının etkisi araştırılmışlar ve FK506'nın doza bağlı olarak sinir rejenerasyon oranını arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca, günlük 5mg/kg dozunda uygulanan FK506'nın fonksiyonel iyileşmeyi maksimum oranda arttırdığını; buna karşın 10 mg/kg dozun ise sinir rejenerasyonunda daha az etkili olduğunu rapor etmişlerdir [52]. Fansa ve ark. [15] sinir greftlemesi uygulanmış deneklere 0.3 mg/kg ve 0.6 mg/kg FK506 tedavisi uygulamışlar ve her iki dozda da FK506 uygulanan deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla rejenere akson miktarında maksimum oranda artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu dozların dışında çok düşük bir doz olarak sayılabilecek FK506 dozu Sarıkcıoğlu ve ark. [41] tarafından uygulanmıştır. Sarıkcıoğlu ve ark. [41] siyatik sinir ezisi sonrası 0.05 mg/kg dozda FK506'yı intratekal yolla uygulamışlar ve sonuçta sinir rejenerasyonu üzerine yararlı bir etki saptamışlardır. Literatürde tanımlanan farklı dozdaki FK506'nın farklı sonuçlar oluşturmasını da FK506'nın veriliş yoluna bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, epinöral devaskularizasyon sonrası siyatik sinir rejenerasyonu için günlük subkutan yolla 5mg/kg dozunda uygulanan FK506'nın fokal iskemik dejenerasyon üzerine yararlı etki gösterdiği tespit edilmiştir.

5.3 FK506'nın fokal dejenerasyon üzerine etkisi

FK506'nın nöroprotektif, antiiskemik, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilerinin olduğu literatürde bildirilmiştir [16]. Bununla birlikte fokal ve global iskemik beyin hasarı üzerine FK506 etkileri ayrıntılı bir şekilde bildirmiş olmasına karşın bu etkisinin hangi mekanizma ile oluştuğu açık değildir. Furuichi ve ark. [16] tek doz FK506 uygulamasının beyin infarkt alanını azaltmasının yanında uzun sürede nörolojik kaybı iyileştirdiğinin bildirmişlerdir. Ayrıca iskemi sonrası FK506 uygulaması için terapötik iyileşme zamanı (therapeutic time window) olduğu tanımlanmıştır [3, 48]. Takamatsu ve ark. [48] FK506'nın güçlü bir protektif etkiye sahip olduğunu ve terapötik iyileşme zamanı adı verilen etkinin oluşmasında iskeminin başlamasından en az üç saat içerisinde verilmesinin yararlı olduğunu bildirmişlerdir. Arii ve arkadaşları [3] ise bu etkinin oluşmasında iskeminin başlamasından 60-120 dakika içerisinde FK506'nın verilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Çalışmamızda bu iskeminin başlamasından bir gün sonra FK506 verilmeye başlanmasından dolayı terapötik iyileşme zamanı ile ilgili bir veri elde edilmemiştir.

Çalışmamızda epinöral devaskularizasyon sonrası dejenerasyon görülen alanların total sinir alanına göre yüzdeleri FK506 (+) grupta 25.7 ± 13.1 ; FK506

(-) grupta ise 26.5 ± 11.4 olarak hesaplanmıştır. Verilerin istatistiksel analizleri neticesinde iki grup arasında anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Bu veri FK506'nın oluşan dejenerasyon alanının azaltılmasına değil bu alandaki sinir liflerinin myelinizasyon seviyesine etki ederek nöroprotektif bir etki gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmamızda FK506'nın fokal sinir dejenerasyonu üzerine yararlı etkisi elektron mikroskopik değerlendirme ve fonksiyonel testlerle gösterilmiştir. Bu analizlerde en çarpıcı bulgu siyatik fonksiyon indeksinin -50 değerinin FK506 verilen grupta daha erken görülmesidir. Verilerin karşılaştırılmasında, FK506 (+) ve FK506 (-) deney gruplarında sırasıyla 7. ve 21. postoperatif günlerde -50 değerinin SFI değerine ulaşıldığı tespit edilmiştir. FK506 uygulaması sonrası immünsupresyon nedeniyle myelin kaybının önlenmesi ve böylece nöroprotektif bir etkinin oluşması muhtemeldir. Bu nedenle, FK506 (+) deney grubunda FK506 (-) deney grubuna göre -50 SFI değerine ulaşılmasının bu nöroprotektif etkinin bir kanıtı olduğunu düşünmekteyiz.

SONUÇ

Periferik sinir yaralanması sonrası, nöroprotektif ve nörotrofik nitelikte çeşitli moleküllerin sentezinde bir artışın olduğu bilinmektedir. Ayrıca, aksonal yaralanma bir seri moleküler, ultrastrüktürel ve hüresel yanıtın oluşmasını sağlar [37]. Sinir dejenerasyonu oluşturma ile ilgili olarak pekçok yöntem tarif edilmiştir. Bu farklı yöntemlerin uygulanması sonrasında periferik sinirde farklı cevapların oluşması kaçınılmazdır. Çalışmamızda, siyatik sinirin fokal iskemik dejenerasyonu oluşturulmuştur.

FK506'nın sinir rejenerasyonu üzerine olan etkileri literatürde ayrıntılı bir şekilde yer almaktadır. Ancak bu sonuçlar sinirin ezi, kesi gibi travmatik yaralanmalarına ve beynin iskemik hasarlarına dayanmaktadır. Çalışmamızda FK506'nın siyatik sinirin fokal iskemik dejenerasyon üzerine olan yararlı etkisi tespit edilmiştir. Daha önce bu yönde bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. İleriki çalışmalarda FK506 ile ilişkili moleküller için spesifik markerler veya rejenere Schwann hücrelerine, makrofajlara ve aksonlara spesifik markerler kullanılarak FK506'nın aksonal rejenerasyon üzerine etkisi araştırılması gerektiğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Adams WE (1942) The blood supply of nerves: I. Historical review. *J Anat*, 76:323-41.
2. Akkın SM (2003) Periferik Sinir Sistemine Giriş. In: *Sistematik Anatomi* (Gökmen GF eds), İzmir, s:783-784.
3. Arii T, Kamiya T, Arii K, Ueda M, Nito C, Katsura KI, Katayama Y (2001) Neuroprotective effect of immunosuppressant FK506 in transient focal ischemia in rat: therapeutic time window for FK506 in transient focal ischemia. *Neurol Res*, 23:755-60.
4. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA (1989) Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 83:129-38.
5. Beer GM, Steurer J, Meyer VE (2001) Standardizing nerve crushes with a non-serrated clamp. *J Reconstr Microsurg*, 17:531-4.
6. Bell MA, Weddell AG (1984) A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve in the rat, man and other mammals. *Brain*, 107 (Pt 3):871-98.
7. Bell MA, Weddell AG (1984) A morphometric study of intrafascicular vessels of mammalian sciatic nerve. *Muscle Nerve*, 7:524-34.
8. Berry MM, Standring SM, Bannister LH (1995) Nervous system. In: *Gray's Anatomy* (Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ eds), New York, s:945-948.
9. Blunt JM (1957) Functional and clinical implications of the vascular anatomy of peripheral nerves. *Postgrad Med J*, 33:68.
10. Burkel WE (1967) The histological fine structure of perineurium. *Anat Rec*, 158:177-89.
11. Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR (1993) The influence of magnitude and duration of crush load on functional recovery of the peripheral nerve. *J Reconstr Microsurg*, 9:299-306; discussion 306-7.
12. De Koning P, Brakkee JH, Gispens WH (1986) Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function: beneficial effects of melanocortins. *J Neurol Sci*, 74:237-246.
13. Dellon AL, Mackinnon SE (1989) Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg*, 23:197-202.
14. Duygulu E (2001) Takrolimus'un (FK506) periferik sinir iyileşmesi üzerine etkisi (rat siyatik sinir modeli ile deneysel bir çalışma). Akdeniz Üniversitesi.

15. Fansa H, Keilhoff G, Altmann S, Plogmeier K, Wolf G, Schneider W (1999) The effect of the immunosuppressant FK 506 on peripheral nerve regeneration following nerve grafting. *J Hand Surg [Br]*, 24:38-42.
16. Furuichi Y, Maeda M, Moriguchi A, Sawamoto T, Kawamura A, Matsuoka N, Mutoh S, Yanagihara T (2003) Tacrolimus, a potential neuroprotective agent, ameliorates ischemic brain damage and neurologic deficits after focal cerebral ischemia in nonhuman primates. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23:1183-94.
17. Gold BG (1997) FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol Neurobiol*, 15:285-306.
18. Gold BG, Gordon HS, Wang MS (1999) Efficacy of delayed or discontinuous FK506 administrations on nerve regeneration in the rat sciatic nerve crush model: lack of evidence for a conditioning lesion-like effect. *Neurosci Lett*, 267:33-6.
19. Gold BG, Katoh K, Storm-Dickerson T (1995) The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci*, 15:7509-16.
20. Gold BG, Yew JY, Zeleny-Pooley M (1998) The immunosuppressant FK506 increases GAP-43 mRNA levels in axotomized sensory neurons. *Neurosci Lett*, 241:25-8.
21. Goss CM (1973) *Gray's Anatomy (Anatomy of the Human Body)*. Twenty-ninth American Edition ed., Lea & Febiger, Philadelphia, s:960-963.
22. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, et al. (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)*, 40:1256-65.
23. Lee M, Doolabh VB, Mackinnon SE, Jost S (2000) FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve*, 23:633-40.
24. Lockhart RD, Hamilton GF, Fyfe FW (1965) *Anatomy of the human body*. Special low-price edition ed., Faber and Faber Limited, London, s:284.
25. Lundborg G (1970) Ischemic nerve injury. Experimental studies on intraneural microvascular pathophysiology and nerve function in a limb subjected to temporary circulatory arrest. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*, 6:3-113.
26. Lundborg G (1975) Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. *J Bone Joint Surg Am*, 57:938-48.
27. Lundborg G (1979) The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: structural and functional aspects. *J Hand Surg [Am]*, 4:34-41.
28. Lundborg G, Dahlin L (1996) Anatomy, function, and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression. Review. *Hand Clin*, 12:185-193.
29. Lundborg G, Dahlin LB (1992) The pathophysiology of nerve compression. *Hand Clin*, 8:215-27.
30. Mackinnon S, Dellon AL (1988) *Surgery of the peripheral nerve*. ed., Thieme Medical Publishers, New York, s:18.
31. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA (1985) Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 75:384-8.

32. Madison R, da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL (1985) Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol*, 88:767-72.
33. Moore KL (1992) *Clinically Oriented Anatomy. International Third Edition ed.*, s:512-525.
34. Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R (1998) Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve*, 21:1095-7.
35. Nordin M, Frankel VH (2001) *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System. Third ed.*, s:126-131.
36. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M (2001) Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg*, 17:69-75.
37. Raivich G, Makwana M (2007) The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways. *Brain Res Rev*, 53:287-311.
38. Rydevik B, Lundborg G, Olmarker K, Myers RR (2001) Biomechanics of Peripheral Nerves and Spinal Nerve Roots. In: *Basic Biomechanics Of The Musculoskeletal System* (Nordin M, Frankel VH eds), New York, s:126-131.
39. Sarikcioglu L, Demir N, Akar Y, Demirtop A (2009) Effect of intrathecal FK506 administration on intraorbital optic nerve crush: an ultrastructural study. *Can J Ophthalmol*, 44:427-30.
40. Sarikcioglu L, Demirel BM, Demir N, Yildirim FB, Demirtop A, Oguz N (2008) Morphological and ultrastructural analysis of the watershed zones after stripping of the vasa nervorum. *Int j Neurosci*, 118:1145-55.
41. Sarikcioglu L, Duygulu E, Aydin H, Gurer EI, Ozkan O, Tuzuner S (2006) Effects of intrathecal administration of FK506 after sciatic nerve crush injury. *J Reconstr Microsurg*, 22:649-54.
42. Sarikcioglu L, Ozkan O (2003) Yasargil-Phynox aneurysm clip: a simple and reliable device for making a peripheral nerve injury. *Int J Neurosci*, 113:455-64.
43. Sarikcioglu L (2003) Siatik sinir ezisi uygulanmış ratlarda immobilizasyonun aksonal rejenerasyon üzerine etkisi. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
44. Snell RS (1992) *Clinical Anatomy for Medical Students. 4th edition ed.*, Little, Brown and Company, Boston/Toronto/London, s:442-447.
45. Steiner JP, Dawson TM, Fotuhi M, Glatt CE, Snowman AM, Cohen N, Snyder SH (1992) High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature*, 358:584-7.
46. Stewart JD (2003) Peripheral nerve fascicles: anatomy and clinical relevance. *Muscle Nerve*, 28:525-41.
47. Sunderland S (1990) The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*, 13:771-84.
48. Takamatsu H, Tsukada H, Noda A, Kakiuchi T, Nishiyama S, Nishimura S, Umemura K (2001) FK506 attenuates early ischemic neuronal death in a monkey model of stroke. *J Nucl Med*, 42:1833-40.

49. Terzis JK, Smith KL (1990) *The Peripheral Nerve Structure, Function and Reconstruction*. ed., Raven Press, New York, s:15-18.
50. Udina E, Ceballos D, Gold BG, Navarro X (2003) FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers. *Exp Neurol*, 183:220-31.
51. Udina E, Ceballos D, Verdu E, Gold BG, Navarro X (2002) Bimodal dose-dependence of FK506 on the rate of axonal regeneration in mouse peripheral nerve. *Muscle Nerve*, 26:348-55.
52. Wang MS, Zeleny-Pooley M, Gold BG (1997) Comparative dose-dependence study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther*, 282:1084-93.
53. Yang RK, Lowe JB, 3rd, Sobol JB, Sen SK, Hunter DA, Mackinnon SE (2003) Dose-dependent effects of FK506 on neuroregeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg*, 112:1832-40.

ÖZGEÇMİŞ

Arzu HİZAY, 28.05.1984 tarihinde Antalya’da doğdu. İlk öğrenimini Gazi Mustafa Kemal İlkokulu ve Sefa Akın İlköğretim Okulu’nda, orta öğrenimini Muratpaşa Lisesinde tamamladı. Lisans eğitimini 2001-2006 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji/Zooloji bölümünde tamandıktan sonra, 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalında, Anatomi Yüksek Lisans Programına başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.