



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**SİSTEMİK RİFAMPİSİN TEDAVİSİNİN TRAVMATİK
İNFERİOR ALVEOLAR SİNİR HASARI SONRASI
REJENERATİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

NURETTİN DİKER

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL 2017

TEŞEKKÜR

Bugün bulunduğum akademik noktaya sayesinde geldiğim; bilimin ne olduğunu, hangi yolla elde edilebileceğini ve araştırma etiğini öğrenmemi sağlayan, hayatım boyunca gerek bilimsel gerek hayatla ilgili öğretilerinden faydalanacağım tez danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç’a teşekkür ederim. Bilimsel çalışmalarına destekleri ve doktora eğitimin boyunca bana kattıklarından ötürü Bölüm Başkanım Prof. Dr. Gürkan Öztürk’e teşekkür ederim.

Altı sene önceki ilk laboratuvar çalışmalarından bugüne kadar her noktada yardımını yanımda hissettiğim Burak Çağlayan’a, bilgisiyle her sorunun çözümünü sağlayan Dr. Berrak Çağlayan’a, her konuda desteğini hissettiğim Taha Keleştemur, Mustafa Çağlar Beker, Esra Yalçın ve Aysun Dilden’e teşekkür ederim. Özellikle çalışmamın deneysel kısmında bütün samimiyetleriyle yardımına koşan Arman Dalay ve Serdar Altunay’a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

MEDİTAM bünyesinde çalışan Ali Şenbahçe ve Musa Ekrem Özdemir olmak üzere tezin birçok aşamasında bana yardımcı olan, fikir alışverişinde bulunduğum bütün İstanbul Medipol Üniversitesi çalışanlarına teşekkür ederim.

Bana verdikleri çalışma disiplini ve ülkem için faydalı olma bilinci ile bulunduğum yere gelmemi ve üretmekten keyif almamı sağlayan, her zorlukta yanımda olan sevgili aileme ve bu süreçte sabırla beni destekleyen müstakbel eşim Burcu Fırat’a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. İAS ve TG Anatomisi	5
4.2. İAS Hasarının Etiyolojileri	5
4.2.1. Yirmi Yaş Dişi Çekimi.....	5
4.2.2. Dental İmplant Uygulamaları.....	6
4.2.3. Oral Patolojiler.....	6
4.2.4. Ortognatik Cerrahi Girişimler.....	6
4.2.5. Mandibula Kırıkları.....	6
4.3. İAS Hasarının Güncel Tedavi Yöntemleri.....	7
4.4. Periferik Sinir Hasarının Patofizyolojisi	9
4.5. Rifampisin ve Nöroprotektif Etkiler	12
5. MATERYAL VE METOD	14
5.1. İAS Hasarı Modeli... ..	14
5.2. Aksotomi Sonrası Hücresel Değişikliklerin İncelenmesi.....	16
5.3. İAS'nin TG'deki Somatotopik Organizasyonunun Belirlenmesi.....	17
5.4. Sistemik Rifampisin Tedavisinin Uygulanması.....	19
5.5. FG İle Hedef Doku Reinnervasyonunun Değerlendirilmesi.....	20
5.6. Elektron Mikroskopi Değerlendirmesi.....	20
5.7. İstatistiksel Yöntem.....	21
6. BULGULAR	22

6.1. İAS Aksotomisi Sonrası Hücresel Değişiklikler.....	22
6.1.1. Hasarın Distalindeki Sinir Segmentinin Hücresel Durumu.....	22
6.1.2. Hasarın Proksimalindeki Sinir Segmentinin Hücresel Durumu.....	23
6.1.3. TG'deki Hücre Gövdesi Sayısı.....	24
6.2. İAS'nin TG İçerisindeki Somatotopik Organizasyonu.....	25
6.3. Rifampisin Tedavisi Sonrası Hedef Doku Reinnervasyonu.....	27
6.4. Rifampisin Tedavisi Sonrası İAS'nin Histolojik ve Histomorfometrik Olarak Değerlendirmesi.....	29
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
8. KAYNAKLAR.....	39
9. ETİK KURUL ONAYI.....	45
10. ÖZGEÇMİŞ.....	46

KISALTMALAR LİSTESİ

Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
c-FLIP	Cellular FLICE-inhibitory protein
cIAP2	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3
DMSO	Dimetil sülfoksil
FG	Fluorogold
İAS	İnferior alveolar sinir
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI	Propidium iodide
TG	Trigeminal Ganglion

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 6.1.1.1. : Hasarın distalinde kalan sinir segmentindeki akson ve schwan hücresi yoğunluğunun zamana bağlı değişimi.....	23
Şekil 6.1.2.1. : Hasarın proksimalinde kalan sinir segmentindeki akson ve schwan hücresi yoğunluğunun zamana bağlı değişimi.....	24
Şekil 6.1.3.1. : TG mandibular dalındaki hücre gövdesi yoğunluğunun zamana bağlı değişimi	25
Şekil 6.2.1. : İAS'nin TG'deki somatotopik organizasyonu.....	27
Şekil 6.3.1. : Farklı grupların ortalama FG pozitif hücre sayıları.....	29
Şekil 6.4.1. : Aksonların “g-oranı” dağılımları.....	32



RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.1.1. : İAS hasarı modeli.....	15
Resim 5.2.1. : Sinir kesitlerindeki hücresel durumun değerlendirilmesi.....	17
Resim 5.2.2. : TG kesitlerindeki hücre gövdesi yoğunluğunun belirlenmesi.....	17
Resim 5.3.1. : TG kesitlerinde İAS hücre gövdesi yoğunluğunun değerlendirilmesi.....	19
Resim 6.3.1. : TG kesitlerinde FG pozitif hücrelerin görüntüleri.....	28
Resim 6.4.1. : Negatif Kontrol grubuna ait elektron mikroskopu kesitleri.....	30
Resim 6.4.2. : 5 mg/kg rifampisin grubuna ait elektron mikroskopu kesitleri.....	31
Resim 6.4.3. : 20 mg/kg rifampisin grubuna ait elektron mikroskopu kesitleri.....	31



1. ÖZET

SİSTEMİK RİFAMPİSİN TEDAVİSİNİN TRAVMATİK İNFERİOR ALVEOLAR SİNİR HASARI SONRASI REJENERATİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Antibakteriyel bir ajan olan rifampisin nöröprotektif etkileri yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı; inferior alveolar sinirde (İAS) oluşturulan sinir hasarı sonrası aksonal ve hücre gövdesi düzeyindeki zamana bağlı değişikliklerin değerlendirilmesi, İAS'ye ait hücre gövdelerinin trigeminal gangliondaki (TG) somatotopik organizasyonunun belirlenmesi ve sistemik rifampisin tedavisinin İAS rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirmesidir. Aksonal ve hücre gövdesindeki değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla 25 sıçana İAS hasarı oluşturuldu ve hasarı takip eden 1., 3., 7., 14., ve 28. günlerde sakrifiye edilen hayvanların sinir ve TG dokularında incelemeler yapıldı. İAS'nin somatotopik organizasyonunun belirlenmesi amacıyla 2 adet sıçanın İAS'lerine bilateral fluorogold enjeksiyonu yapılarak takip eden 5. günde sakrifiye edilip TG seri kesitlerinde FG pozitif hücre yoğunluğu tespit edildi. Rifampisin İAS hasarı sonrası etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 24 adet sıçanın İAS'inde bası tipinde hasar oluşturuldu. Sıçanlar rastgele üç gruba ayrıldı; bir gruba taşıyıcı çözelti, bir gruba 5 mg/kg rifampisin, bir gruba 20 mg/kg rifampisin gün aşırı intraperitoneal enjeksiyonla uygulandı. Hasarı takip eden 24. günde, mental foramen üzerine FG enjeksiyonu yapıldı. Dört haftanın sonunda sıçanlar sakrifiye edildi ve inferior alveolar sinirler ve trigeminal ganglionlar çıkartıldı. Sinir örneklerinin histolojik ve histomorfometrik incelemeleri yapıp TG bölümlerinde FG pozitif hücreler sayıldı. FG pozitif hücre sayısı, 20 mg/kg rifampisin uygulanan grupta ($p=0.001$) ve 5 mg/kg rifampisin uygulanan grupta ($p=0.037$) kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Optimum g-oranlı akson yüzdesi, kontrol grubunda her iki rifampisin tedavi grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p=0.004$). Günlük 5 mg/kg ve 20 mg/kg dozunda sistemik rifampisin tedavisi sıçanların inferior alveolar sinir rejenerasyonunu arttırmıştır. İAS'ye ait hücre gövdeleri yoğun olarak TG'nin postero-lateralinde bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: bası hasarı, inferior alveolar sinir, rifampisin, sinir rejenerasyonu, trigeminal ganglion

2. ABSTRACT

EVALUATION OF REGENERATIVE EFFECTS OF SYSTEMIC RIFAMPICIN TREATMENT AFTER TRAUMATIC INFERIOR ALVEOLAR NERVE INJURY

Rifampicin is an antibacterial agent that was associated with neuroprotective effects. The aim of the present study was to evaluate the time-dependent changes in the axons and cell bodies following the inferior alveolar nerve (IAN) injury, to determine the somatotopic organization of the cell bodies of IAN in the trigeminal ganglion and to assess the effects of systemic rifampicin treatment on the regeneration of IAN. To investigate the alterations in the axons and cell body, rats (n=25) were subjected to IAN injury. Animals were euthanized on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 28th days following IAN injury and the changes in nerve and TG structures were examined. For the evaluation of the somatotopic organization of IAN cell bodies in TG, fluorogold (FG) was bilaterally injected to the IANs of two rats and 5 days later, TGs were harvested and number of FG positive cells were counted. Crush injury was induced in the IAN of 24 rats to evaluate the effects of rifampicin following IAN injury. Animals were randomly divided into three groups; vehicle, 5mg/kg rifampicin or 20 mg/kg rifampicin were administered daily using intraperitoneal injections. FG was injected over the mental foramen on the twenty-fourth day after the injury. At the end of four weeks, rats were sacrificed and inferior alveolar nerves and trigeminal ganglions were harvested. Histologic and histomorphometric examination of the nerve samples were performed and FG positive cells were counted in the trigeminal ganglion sections. FG positive cells were significantly higher in the 20 mg/kg rifampicin group ($p=0.001$) and 5 mg/kg rifampicin group ($p=0.037$) when compared with the control group. The percentage of axons with optimum g-ratio was significantly lower in the control group than both of the rifampicin treatment groups ($p=0.004$). Systemic rifampicin treatment with a daily dose of 5 mg/kg or 20 mg/kg enhances inferior alveolar nerve regeneration in the rats. Our data also showed that cell bodies of the inferior alveolar nerve were predominantly located on the posterior-lateral part of the trigeminal ganglion.

Keywords: crush injury, inferior alveolar nerve, nerve regeneration, rifampicin, trigeminal ganglion

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Trigeminal sinir hasarları sıklıkla orofasiyal disfonksiyon, duyu kaybı ve nöropatik ağrı gibi sekellere neden olurlar (1). En sık karşılaşılan İAS hasarı nedeni yüz bölgesini içeren kontüzyonlar ve maksillomandibular kırıklardır. Sıklıkla İAS ve infraorbital sinir etkilenmektedir ve hastaların %35-50'sinde kalıcı duyu kaybı oluşmaktadır (2). Travmanın yanında dental implant uygulamaları, lokal anestezi enjeksiyonları, gömülü diş çekimleri ve çene yüz deformitelerinin düzeltilmesi amacıyla uygulanan osteotomiler sırasında da bu sinirler hasara uğrayabilmektedir. Bu girişimlerin sıklığı göz önüne alındığında birçok hasta trigeminal sinir dallarının hasarları ve buna bağlı gelişen disfonksiyonlar sonucunda hayat kalitelerinde ciddi kayıplar yaşamaktadır. Sinir devamlılığının bozulduğu durumlarda sinirin cerrahi onarımı ilk tercih edilen tedavi yöntemi olsa da bu tedavi sonucunda elde edilen fonksiyonel kazanımlar yeterli olmamaktadır. Birçok çalışmada cerrahi tedavilere ek olarak rejeneratif ajanlar denenmiş, fakat bu ajanların hiçbirisi klinik uygulamada yer bulamamıştır (3).

Mikobakteriyel enfeksiyonların eliminasyonunda etkin bir şekilde kullanılan rifampisin'in nöroprotektif etkileri yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur. Hasar sonrası sistemik rifampisin terapisi ve moleküler etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar sonucunda mitokondri kaynaklı sitokrom c salgılanmasını, mikrogial aktivasyonu, glutamat nörotoksisitesini ve oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiştir (4). Farklı sinir sistemi komponentleri üzerinde rejeneratif etkileri ortaya konmuş rifampisin'in periferik sinir hasarı sonrası etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu tezde ilk olarak İAS hasarı sonucunda hasarın proksimal ve distalinde kalan sinir segmentlerindeki ve TG'deki hücresel değişikliklerin zamana bağlı değişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanında İAS hücre gövdelerinin TG içerisindeki dağılımı da incelenerek, TG'nin farklı bölgelerindeki İAS hücre gövdesi yoğunluklarının hesaplanması ve somatotopik organizasyonunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kısımdan elde edilecek bilgilerin İAS hasarı ve farklı rejeneratif ajanların kullanıldığı çalışmalara katkı sağlayacağı umulmaktadır. Tezin son kısmında sistemik rifampisin tedavisinin farklı dozlardaki uygulamalarının İAS hasarı sonrası rejeneratif etkileri değerlendirilmiştir. Birçok farklı modelde

rejeneratif etkileri ortaya konan rifampisinin İAS hasarı sonrasında değerlendirilmesi ile rifampisinin periferel sinir hasarı sonrası rejeneratif etkileri üzerine yapılacak araştırmalara öncülük edeceği ve potansiyel etkilerinin gözlenmesi durumunda İAS hasarı sonucu yaşam kalitesinde kayıplar olan hastaların tedavi sonuçlarının ve fonksiyonel geri dönüşlerinin arttırılabileceği düşünölmektedir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. İAS ve TG Anatomisi

Beşinci kafa çifti olan TG'nin 3 adet ana dalı bulunmaktadır. Bu üç daldan hem motor hem duyu liflerini taşıyan mandibular sinir alt çene ve etrafı dokuların duyu iletilerinin santral sinir sistemine taşınmasında ve çiğneme kaslarının innervasyonunda görev almaktadır. Mandibular sinirin en büyük dalı olan İAS mandibula ramusunun medial yüzünde mandibular foramenden giriş yapıp, mental foramenden çıkarak dudak mukozası içerisine dağılır. Kanal içerisindeki seyri sırasından kanal üstünde bulunan mandibular posterior dişlerin pulpa ve periodonsiyumlarının duyu innervasyonunu alır.

4.2. İAS Hasarının Etiyolojileri

Periferal duyu siniri hasarlarının; hastanın yaşlı olduğu durumlarda, hasarın oluşma zamanı ve hastanın değerlendirilmesi arasındaki zamanın uzadığı durumlarda, maruz kalınan hasarın fazla olması durumunda ve hasarın hücre gövdesine daha yakın olduğu durumlarda kalıcı olma riskinin arttığı ifade edilmiştir (5). İatrojenik sinir hasarı oluşan hastaların yaşam kalitesinde düşüş olduğu, psikolojik durumlarının ve sosyal hayatlarının etkilendiği gösterilmiştir (6). Hastaların genellikle fonksiyonel ve estetik sonuçlar beklediği, elektif cerrahi işlemler sonucunda sinir hasarına bağlı disfonksiyonları kabullenmekte başarısız oldukları gösterilmiştir (7). Çene-yüz bölgesindeki duyu değişiklikleri ve ağrı; hastanın konuşma, yemek yeme, traş olma, diş fırçalama ve benzeri birçok günlük fonksiyonunu etkilemektedir (8).

4.2.1. Yirmi Yaş Dişi Çekimi

Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde 5 ila 10 milyon yirmi yaş diş çekimi yapıldığı düşünülmektedir (9). Yirmi yaş dişinin çekimine bağlı oluşabilecek sinir hasarları yumuşak dokunun ekarte edilmesi sırasında çekiştirilmesi, basıyla ezilmesi ve tamamen kopması sonucu oluşabilir (10). 449 vaka takibinin yapıldığı çalışma sonucunda yirmi yaş diş çekimi sonrası İAS hasarı sıklığının %5 olduğu rapor edilmiştir (1). Cerrahi kaynaklı oluşabilecek parestezi için risk faktörleri; cerrahın deneyimi, dişin angülasyonu ve dişin vertikal olarak kesilmesi olarak sıralanmıştır (11). Sinir hasarı sonucu oluşan sekellerin çoğu geçici olmakla birlikte 6-9 aydan

daha uzun süren parestezi miktarının %0,4 olduğu rapor edilmiştir (11). Yirmi yaş diş çekimi sonrası kalıcı İAS hasarı oranı düşük olsa da her yıl opere edilen hasta sayısı düşünüldüğünde birçok hasta bu durumdan etkilenmektedir.

4.2.2. Dental İmplant Uygulamaları

Manibular kemiğe yapılan implant uygulamaları sırasında anatomik sınırlamalara yeterince dikkat edilmemesi sonucunda İAS hasarı oluşabilmektedir ve mandibulaya yapılan implant uygulamaları sonrasında duysal değişim sıklığı %37 olarak rapor edilmiştir (12). Bu hasarların çoğunun dental implantların İAS'e yaptığı bası sonucu ortaya çıktığı ve implantların çıkartılması veya yeniden pozisyonlandırılmasıyla geri dönüş sağlandığı ifade edilmiştir. İmplant cerrahisi sonrasında oluşabilecek kalıcı hasarların implant boşluğunun hazırlanması sırasında oluşabileceği ve bu komplikasyonun cerrahi öncesi yapılacak detaylı planlama ve hasta değerlendirmesi ile önlenebileceği ifade edilmiştir (13).

4.2.3. Oral Patolojiler

Yirmi yaş dişiyle ilişkili kist ve abselerin varlığının, diş çekimi sonrası nörolojik komplikasyon oranını arttırdığı rapor edilmiştir (14). Bunun yanında çene yüz bölgesini ilgilendiren patolojiler kendilerinin yaptığı bası ile ve infiltrasyon sonucu veya cerrahileri sırasında sinirin direkt hasar görmesi nedeni ile nöro-sensoriyel sorunlar ortaya çıkabilmektedir (15).

4.2.4. Ortognatik Cerrahi Girişimler

Alt çeneye yapılan osteotomiler ile dento-fasiyel anomalilerin onarıldığı bilateral sagittal split osteotomi cerrahileri sırasında gözle tespit edilen bir hasar olmasa da İAS'yi etkileyen hipoestezi ve dizestezi sıklıkla gözlenmektedir (16). Alt dudak ve mental bölgede ortaya çıkan bu nörolojik disfonksiyonların sıklığı %11,9 olarak rapor edilmiştir (17).

4.2.5. Mandibula Kırıkları

Mental foramen ve mandibular foramen arasındaki kırıklar sıklıkla İAS hasarına neden olarak paresteziyle sonuçlanmaktadır. Bu hasar, kırığı oluşturan primer travmayla ortaya çıkabileceği gibi kırığın manüplasyonu veya fiksasyonu sırasında

da ortaya çıkabilmektedir (18). Travma sonrası ilk 24 saatte kliniğe başvuran hastaların %86,7'sinde duyuşal değişiklikler tespit edilmiş, takip dönemi sonunda bu hastaların %23,3'ünde bu duyuşal değişikliklerin devam ettiği rapor edilmiştir. Kırık segmentler arasındaki yer değişikliğinin 5 mm'nin altında olduğu vakalarda duyuşal değişikliklerdeki geriye dönüşün, 5 mm'nin üstünde olan vakalardan istatistiksel anlamlı olarak daha fazla olduğu ve erken girişimin kalıcı duyuşal değişiklikleri azaltmaya yardımcı olabileceği rapor edilmiştir (19).

4.3. İAS Hasarının Güncel Tedavi Yöntemleri

İAS'nin travma, hastalık veya bilinmeyen bir nedenden ötürü disfonksiyonu hastalar için tedirgin edici bir durumdur. Duyusal değişiklikler ve/veya ağrı hastalarda hoşnutsuzluk yaratır. Bu durum mandibulanın, dudak ve yanağın bir kısmının ve oral mukozanın fonksiyonunu etkileyebilir. Duyusal değişiklikler sonucu ağrı, hastanın istemsiz olarak dudak ve yanağını ısırması, besin ve sıvıların ağızda tutulamaması ve uyararla yanma duyusu oluşumu gibi durumlar ortaya çıkabilir (20). Somatosensöriyel yolların hasarı sinir iletilsinin arttığı allodini ve hiperaleji gibi durumlara veya sinir iletilsinin azaldığı hipoestezi veya anestezi gibi durumlara neden olabilir (21). Sinir hasarı ve diğer sinir sistemi hastalıklarının önemli bir sekeli nöral dejenerasyondur. Periferik sinir hasarı ile indüklenen anormal duyular progresif nörodejeneratif hastalık olarak değerlendirilmiştir (22).

Hasar sonucu gelişen fonksiyonel eksiklik üç nöral mekanizma ile kompanse olur; denerve olan hedef dokunun rejenere olan aksonlarla tekrar innerve edilmesi, yakınındaki hasar görmeyen aksonların kolateral dallanmaları ve sinir sisteminin kaybedilen fonksiyonla alakalı kısmının tekrar remodele olması (23). Fakat birçok çalışma sonucunda bu mekanizmaların tek başlarına tatmin edici fonksiyonel geri dönüşü sağlayamadığı ifade edilmiştir (24). Hasar sonrasında devamlılığı bozulan sinirlerin rejenere olarak fonksiyonunu geri kazanması kişinin yaşına, etkilenen sinir dalına, hasarın yeri ve hasarın tipine, yapılan cerrahi müdahalenin tipine ve zamanlamasına ayrıca aksonun rejenere olurken hasarlı sahada ne kadar yol alacağına bağlıdır. Bu nedenle sinir kesisi onarılmaz ise veya sinir segmentleri arasında geniş bir boşluk kalıyor ise duyu reseptörlerinin efektif reinnervasyonunun zayıf olacağı öngörülebilir. İnsanlarda genellikle 2 cm den uzun defektlerde ortalama

nörolojik geri dönüşün olacağı fakat 4 cm ve daha uzun defektlerde geri dönüşün minimal olabileceği ifade edilmiştir (25).

Coulthard ve ark. (26) yaptıkları Cochrane derlemesinde iatrojenik İAS hasarı sonrası uygulanabilecek tedavi girişimlerini 3 kategori altında sınıflamışlardır:

- 1- Cerrahi: Sinirin açığa çıkarılması, eksternal nöroliz, internal nöroliz, nörorapi, nöroma eksizyonu, tübülüzasyon, greftleme ve lazer.
- 2- Medikal: Sistemik medikasyonlar (analjezikler, antidepresanlar, antiepileptikler, steroidler), topikal ajanlar (analjezikler, anestetikler).
- 3- Psikolojik: Danışmanlık, akapunktur, kognitif davranışsal terapi, rahatlama terapisi, davranışsal modifikasyonlar, hipnoz.

Cerrahi tedaviler özellikle sinir devamlılığının kesintiye uğradığı sinir travmalarında endikedir. Hasarın boyutuna ve tipine göre uygulanması gereken tedavi değişiklik göstermektedir. Sinir dokusunda kayıpların olmadığı durumlarda periferik sinirin rekonstrüksiyonu için mikrocerrahi ile uç-uca birleştirme gibi uygulamalar yapılabilmektedir. Sinir dokusunda kayıpların olduğu durumlarda trigeminal sinir dallarında kullanılacak greftler için altın standart otojen elde edilenler, sural sinir veya auricular sinirdir (33). Bu metodun dezavantajları; alıcı saha morbiditesi, greftin limitli uzunlukta elde edilebilmesi ve potansiyel nöroma formasyonudur (34). Otojen greftlemenin sınırlılıkları alternatif sinir rekonstrüksiyonu metodlarının araştırılmasına neden olmuştur.

Sinir rekonstrüksiyonu için üretilen, rejenere olan aksonlara rehberlik oluşturacak kanallar için rezorbe olan sentetik materyallerin kullanımı başarılı sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu greft materyalleri için geçirgenlik, şişme miktarı ve rezorpsiyon hızı önemli parametrelerdir. Bu greft materyalleri içeriğindeki kollajen gibi nörostimulasyon yapabilen ekstrasellüler matriks proteinleri, rejenerasyonu artırıcı etki gösterebilirler. Nörotropik faktörler nöronal büyümeyi, dallanmaları ve hasarlı akson uçları arasında yeni bağlantıları arttırabilir. Büyüme faktörleri olarak; fibroblast büyüme faktörü, sinir büyüme faktörü veya nörotropinler (Nörotropin 3-4-5) kullanılabilir (35). Büyüme faktörleri nanopartiküller, mikropartiküller veya hidrojel ile taşınabilir. Bu greft materyalleri içerisindeki destek hücreler rejenerasyonu arttırabilir. Bu hücrelere mezenşimal kök hücreler ve nöral kök

hücreler örnek verilebilir (36). Bu greft materyallerinin optimizasyonu için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır ve özellikle trigeminal sinir için bu greftlerin etkileri tam olarak incelenmemiştir. Nanomateriyaller doğal dokuların birçok özelliğini taklit edebilmektedir ve bugünkü tedavi limitasyonlarını çözebileceği düşünülmektedir.

Düşük enerji seviyeli lazer tedavisi, sinir hasarı sonrasında kısa sürede uygulandığında başarılı sonuçlar göstermiştir (30). Hasar sonrası geç uygulamalarında düşük enerji seviyeli lazer tedavisi rejenerasyon parametrelerinde bir miktar iyileşme sağlayabilmiştir (31). Lazer tedavisinin yirmi yaş dış çekimi sonrasında duysal değişiklikler üzerine bir miktar etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (32).

Medikal tedaviler daha çok hasar sonrası oluşan duyu değişikliklerinin tedavisi için kullanılmaktadır. Duyu sinirleri hasarı sonrası gözlenen ağrılı durumların tedavisinde ilk tercih farmakolojik tedavidir. Akut ağrı parasetamol, non-steroidal antienflamatuar ilaçlar ve/veya morfin ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilir. Post-operatif ağrının kalıcı nöropatik ağrıya dönüşmesi durumunda gabapentin veya karbamazepin gibi antiepileptik ilaçlar kullanılabilir (27). Bu ilaçların oluşturabileceği sersemlik, ağız kuruluğu, negatif duygu-durum değişiklikleri gibi yan etkiler hastanın yaşam kalitesini etkileyebilir. Lokal anestezi gibi non-invazif tedavi yöntemleri sinir hasarı sonrası oluşan ağrının uzun dönem tedavisi için kullanılmıştır. Bu nöral terapi artan sıklıklarla, defalarca tekrarlanmalıdır. Lokal anestezinin bu etkisi sempatik sinir dallanmalarının engellenmesine (28) ve pro-inflamatuar etkilerine bağlanmıştır (29).

Psikolojik tedaviler ise rejenerasyona ve sinir hasarına bağlı oluşan disfonksiyonlar üzerine direkt etkileri olmayan fakat hastanın bu disfonksiyonlarla yaşamasını kolaylaştıracak psikolojik desteği içeren tedavilerdir.

İnsanlar üzerinde uygulanan tedavilerin algılanan duyu miktarını arttırdığı ve daha az ağrı oluşumunu sağladığı gösterilmiştir. Fakat sinir rejenerasyonu üzerine etkileri ile alakalı yeterli veri bulunmamaktadır.

Günümüzde, yetişkinlerdeki ciddi sinir yaralanmalarını takiben tamamen geri dönüş sağlayacak bir onarım tekniği bulunmamaktadır ve yalnızca cerrahi onarım

teknikleri ile elde edilen sonuçların daha iyiye taşınamayacağı düşünülmektedir (24). Bu nedenle, aksonal rejenerasyonu tetikleyecek, selektif hedef seçilimini sağlayacak ve gerekli santral organizasyonu sağlayacak yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

4.4. Periferal Sinir Hasarının Patofizyolojisi

Sinir devamlılığının bozulması sonucunda hasarın distalinde kalan akson kısmı hücre gövdesinden ayrılarak dejenere olur. Akson devamlılığı kesintiye uğrayan hücre gövdesi nöronal reaksiyon ve kromatoliz adı verilen çeşitli fenotipik değişiklikler geçirir. Wallerian dejenerasyon sonucunda hasarın distalinde sağ kalan nöronların hedef dokuya ilerlemesi için uygun bir hücresel ortam yaratılırken, nöronal reaksiyon terminolojik olarak rejenerasyon ve aksonal rejenerasyon için gerekli, hücre gövdesindeki metabolik değişiklikleri ifade eder. Rejenerasyon fonksiyonel olarak; dejenerasyonla kaybedilen, hasarın distalindeki sinir segmentinin yenilenmesini, hedef dokunun reinnervasyonunun sağlanmasını ve fonksiyonun geri kazanılmasını içerir (23).

Periferal sinir liflerinin devamlılığını bozan hasar sonrasında hasarın distalinde kalan akson ve myelin kılıflar Wallerian dejenerasyon süreciyle ortadan kaldırılır. Bu dejenerasyon retrograd olarak proksimal sinir segmentinin ufak bir kısmını da etkiler. Dejenerasyon son ürünleri Schwann hücreleri ve infiltre olan makrofajların ortak çalışması ile elimine edilir (37). Myelin kılıfların eliminasyonu periferal sinirlerdeki “myelin ilişkili protein” gibi rejenerasyon inhibe edici faktörlerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Hasarın distalindeki Schwann hücreleri dejenere olan aksonlardan ortaya çıkan proteinler ve makrofajlardan salınan sitokinlerle uyarılarak proliferer olur (38). Prolifere olan Schwann hücreleri endonöral tüpler içerisinde sıralanarak, rejenere olan aksonları destekleyecek Büngner bantlarını oluşturur. Schwann hücresi sayısındaki artış hızı hasar sonrası 3. günde en yükseğe ulaşırken 2-3 hafta içerisinde azalarak devam eder ve üç katı sayıya ulaşır (39).

Hasarın proksimalinde, hasar gören aksonlardan ortaya çıkan, lokal faktörler tarafından indüklenen büyüme konileri uygun bir yolak bulduklarında hedef doku yönünde uzamaya başlarlar (40). Distal sinir segmenti gibi rehberlik sağlayan yapıların yokluğunda rejenere olan aksonlar bir bölgede kümelenerek, immatür

aksonal projeksiyonlar ve bağ dokudan oluşan nöromalar oluştururlar (41). Rejenere olan aksonlar distal sinir segmentine ulaşırsa endonöral tüpler içerisinde, Schwann hücreleri bazal laminalarını rehber alarak hedef dokuya ilerleyen rejeneratif birimleri oluştururlar. Aksonal rejenerasyon başlangıçta çok yavaşken, hasarı takip eden 3-4 günde sabit bir değere ulaşır. Aksonal rejenerasyonu stimüle ve kontrol eden faktörlerin birçok kaynağı vardır, fakat en çok hasarın lokal durumundan etkilenmektedir. Aksonal rejenerasyon, dejenere olan sinir segmentindeki Schwann hücreleri ve ekstraselüler matriksten sağlanan yeterli miktarda trofik ve tropik faktör varlığında gerçekleşir (42).

Sinir rejenerasyonu ve hedef dokuların fonksiyonel reinnervasyonundaki başarı öncelikle hasar gören aksonun hayatta kalarak rejeneratif fenotipe dönmesine bağlıdır. Periferik sinirin kesisi sonrasında ilk sekel, hasar gören nöronların canlılığını koruyamaması nedeniyle ortaya çıkar. Siyatik sinir hasarı sonrasında dorsal kök ganglionundaki duyu sinirlerinin %10 ila %30 oranında ölümlerinin gerçekleştiği ve küçük nöronların büyük nöronlardan daha çok etkilendiği rapor edilmiştir (43). Hasarla ilişkili motor nöron ölümlerinin ise %0 ila %10 oranında olduğu ve az sayıdaki nöronun etkilendiği rapor edilmiştir (44). Hasar sonrası nöronal ölümün gerçekleşmesi; yaş, hasarın düzeyi, hasarın hücre gövdesine yakınlığı gibi faktörlere bağlıdır. Yetişkin nöronların immatür nöronlara göre daha dayanıklı olduğu (45), hücre gövdesine yakın hasarların uzak hasarlara göre daha çok nöron ölümüne neden olduğu ve rejenerasyonun engellendiği durumlarda nöronların ölüm sürecinin uzadığı (46) ve daha çok nöronun durumdan etkilendiği rapor edilmiştir (47). Sinir hasarını takiben, nöronlardaki vakuolizasyon ve apoptotik hücre ölümünün ilk bir ayda dereceli olarak arttığı sonraki 6 aylık süreçte giderek azaldığı sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (48).

Aksotomi sonrasında hücre gövdesinde görülen en belirgin değişiklikler Nissl cisimciklerinin kaybolması (kromatolizis), çekirdeklerdeki yer değişikliği, hücre ve çekirdeklerdeki büyüme ve dentritlerdeki geri çekilmedir (23). Hasar sonrası hücre gövdesinde gerçekleşecek değişiklikler hasarın boyutundan, hasarın hücre gövdesine mesafesinden, nöronun cinsinden ve yaştan etkilenmektedir. Nicel görüntü analizlerinin yapıldığı çalışmalarda, kranial sinir kesisini takip eden 8. saatte kromatolizisin başladığı ve hasar sonrası 3. ayda geri dönüşün tamamen

sağlanamadığı gösterilmiştir. Reinnervasyonun sağlanamadığı durumlarda kromatolizis reaksiyonunun daha yoğun ve uzun süreli olduğu gösterilmiştir (49). Sinir avülsiyonunu takiben motor nöronlarda belirgin kromatolizis olduğu ve bir kısmının apoptotik hücre ölümüne gittiği gösterilmiştir. Bu durum aksotomi sonrası nöronal reaksiyon olarak kromatolizisin başladığı ve nöronun ya hayatta kalarak rejeneratif yapı kazanmasıyla ya da nöronun apoptozuyla sonuçlandığı şeklinde yorumlanmıştır (50). Kromatolizisten apoptozise geçiş, perikaryon içerisindeki metabolik aktif mitokondri ve aksondaki nükleik asitler ve proteinlerin oksidatif hasarıyla aynı zamanda gerçekleşmektedir. Diğer taraftan aksonların rejenere olarak hedef dokuları reinnerve etmesiyle nöronlar normal fonksiyon ve morfolojisine geri dönerler (51).

Ribozom kümelenmelerinin ortadan kalkması artan protein senteziyle ilişkilidir ve kromatolizisin hasarlı nöronun anabolik cevabının göstergesi olduğu düşünülür. Bu tespit aksotomi sonrası nöronlarda azalan DNA sentezi, artan RNA sentezi, sitoplazmaya transfer edilen RNA miktarındaki artış ve hücre protein içeriğindeki artış ile desteklenmiştir (23).

4.5. Rifampisin ve Nöroprotektif Etkileri

Son yıllarda yapılan çalışmalarla antibiyotiklerin antimikrobiyel etkilerinin yanında mitokondriyal kaynaklı sitokrom c salgılanmasını, mikrogial aktivasyonu, glutamat nörotoksitesini ve oksidatif stresi engelleyerek nöroprotektif etkiler oluşturduğu ortaya konmuştur (52). Rifampisin rifamisin'in yarı sentetik bir türevidir. Geniş spektrumlu bu antibiyotik *Nocardia mediterranei*'nin fermantasyon ürünüdür. Rifampisinin en temel yapısını alifatik ansa zincirleri tarafından oluşturulan naftohidrokinon kromoforu oluşturur (53). Rifampisin uygulamasını takip eden 1-4 saat içerisinde maksimum serum konsantrasyonuna ulaşır ve plazma yarılanma ömrü 2-5 saattir (54). İlacın kan-beyin bariyerinden geçişinden yapısında bulunan lipofilik ansa zinciri sorumludur (55).

Nörodejeneratif hastalıklarda reaktif oksijen ürünlerinin endojen antioksidan mekanizmalarla kontrol edilememesi sonucu nöronal hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Rifampisinin moleküler yapısında bulunan naftohidrokinon zinciriyle serbest radikal uzaklaştırıcı rol üstlenerek, ilacın nöroprotektif etkilerini ortaya

çıkarttığı düşünülmektedir (53). Buna ek olarak rifampisinin pro-apoptotik Bax miktarını azalttığı, anti-apoptotik B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-XL) ve iskemi ile oluşan hücre ölümünü durdurmada önemli rol oynayan X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), Baculoviral IAP repeat-containing protein3 (cIAP2), Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) gibi anti-apoptotik gen ürünlerinin miktarını arttırdığı gösterilmiştir (56). Rifampisinin serbest radikal uzaklaştırıcı etkisi elektron spin rezonans spektrometrik analizi ile gösterilmiştir (57). Rifampisinin antioksidatif özelliklerinin yanında diğer nöroprotektif mekanizmaları da incelenmiştir. Gollapudi ve ark. (58) rifampisinin kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu ve apoptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bunun yanında rifampisinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler üzerine etkileriyle de programlanmış hücre ölümünü durdurduğu gösterilmiştir (58).

Rifampisinin dopaminerjik nöronlar üzerindeki nöroprotektif etkileri in vivo 1-metil-4-fenilpridium intoksikasyonu modeliyle değerlendirilmiştir (59). Çalışma sonucunda rifampisinin değişik konsantrasyonlarda hayatta kalan dopaminerjik nöron sayısını arttırdığı tespit edilmiştir. Xu ve ark. (60) artan dozla beraber rifampisin ön tedavisinin hücre sağ kalımının arttığı ve alfa-sinüklein ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Çalışmalar lipopolisakkaritlerle stimüle edilen BV2 mikrogial hücrelerine uygulanan rifampisin tedavisiyle pro-inflamatuar mediatörlerin inhibe edildiği gösterilmiştir (61). Rifampisinin immün modülatör rolünü toll-like reseptör 2 miktarındaki azalmadan sorumlu olabilecek nükleer faktör-kappa B'nin süpresyonunu sağlayarak (52) ve mitojen aktive protein kinaz miktarını azaltarak (61) ortaya koyduğunu gösteren çalışmalar vardır. Bu bilgiler ışığında rifampisinin parkinson hastalığında anti-inflamatuar bir ilaç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

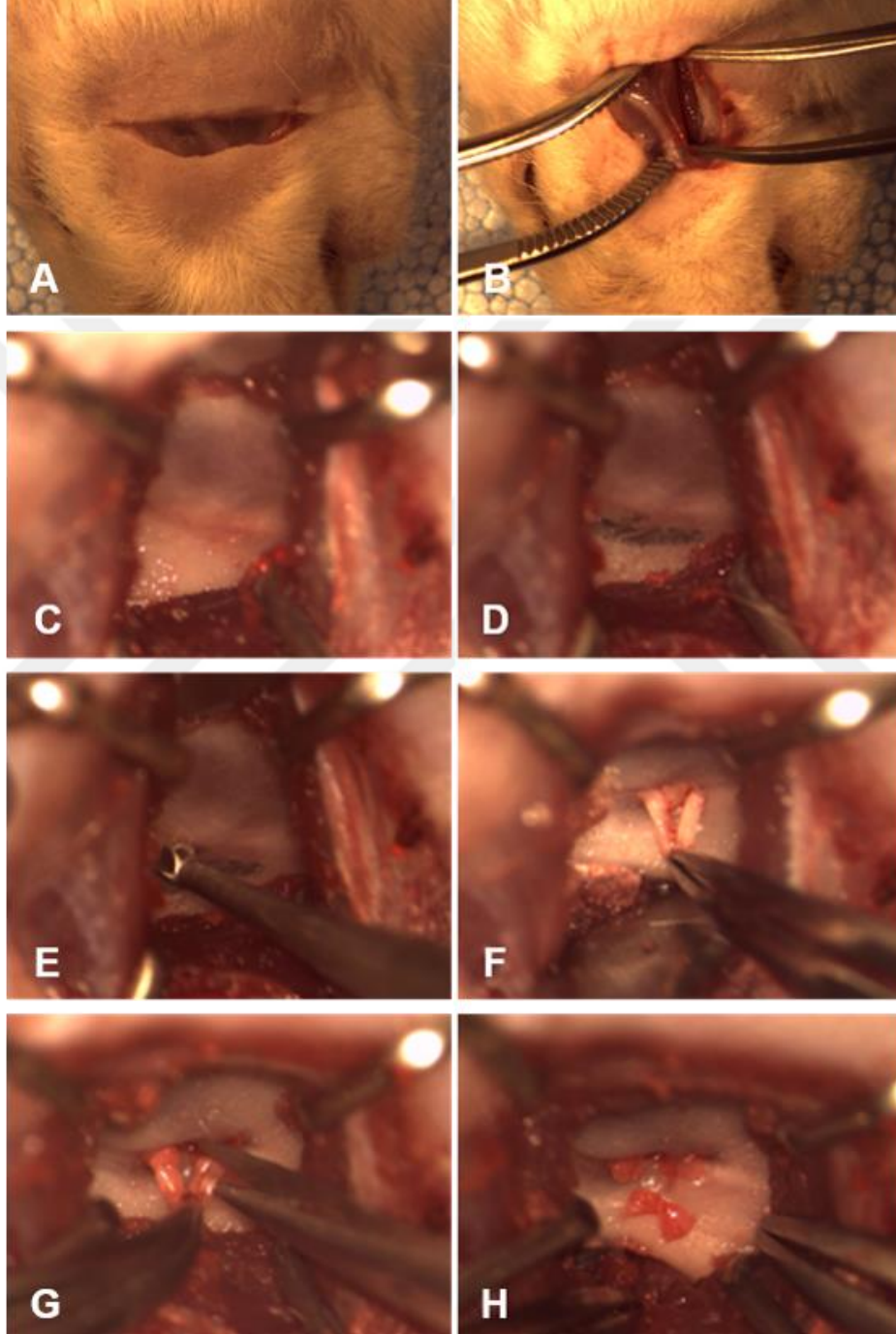
5. MATERYAL VE METOD

5.1. İAS Hasarı Modeli

İAS hasarı sonrasındaki sinir segmentlerindeki ve TG'deki hücresel değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla yirmi beş adet, yetişkin, erkek, Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır. Deneysel girişimler İstanbul Medipol Üniversitesi yerel etik komitesi tarafından onaylanmıştır. Tüm hayvanların bakımı sıcaklığı (22 ± 10 ° C) ve nemin % 40-50 aralığında sabit tutulduğu, 12:12 saat aydınlık/karanlık rejimi altında yapıldı. Hayvanların su ve standart laboratuvar yemine sınırsız ulaşımı sağlandı. Hayvanların post-operatif rahatsızlıklarını en aza indirmek ve kullanılan hayvan sayısını azaltmak için çaba gösterildi.

Yirmi beş sıçana unilateral sinir kesisi uygulandı. Sıçanların anestezisi intramusküler ketamin (60 mg/kg) ve rompun (6 mg/kg) kombinasyonu ile sağlandı. İşlem sırasında hayvanlar yan yatar pozisyonda operasyon masasına sabitlendi. Operasyon sırasındaki anatomik belirteçler için Naftel ve ark. (62) Sparague-Dawley sıçanlardaki mandibular molar dişleri innerve eden sinirler için seri frozen-sectionlar ile yaptıkları anatomik çalışma baz alındı. Yirmi beş adet sıçanın sol İAS'lerine kesi uygulanıp sağ İAS'lerine kesi yapılmadan bırakıldı. Sıçanların yanakları tıraş edilerek povidon iyot solüsyonu ile dezenfekte edildi. Sol gözün lateral kantusunun 5 mm aşağısından başlayan 1,5 cm'lik cilt kesisi yapıldı (Resim 5.1.1.-A). Masseter kasının künt diseksiyonu parotis bezinin tükrük kanalının altından sivri uçlu mikro forseps ile gerçekleştirildi (Bahadır D 105.00, Samsun, Turkey) (Resim 5.1.1.-B). Künt diseksiyon sonrası ekartasyon için enjektör uçlarından elde ettiğimiz ekartörler bantlarla operasyon masasına sabitlenerek kullanıldı. Sıçanların İAS'si İAS'nin mandibulaya giriş yeri üzerinde bulunan kemik çıkıntısının anteriorundaki sulkus altında seyretmektedir (Resim 5.1.1.-C). Bu sulkus kalemle işaretlenip (Resim 5.1.1.-D) sonrasında kanal lateralindeki kortikal kemik tur motoru ve tungsten-karbit frezlerle, serum fizyolojik soğutması altında kaldırıldı (Resim 5.1.1.-E). İAS'nin kanala giriş yerinin yaklaşık 2 mm rostralinde, keser dişin apikeline tekabül eden seviyede İAS mental ve keser sinir dallarına ayrılmaktadır. Sinir kesisi bu dallanmanın hemen proksimalinde sinirin tek dal olarak devam ettiği noktadan başlatıldı (Resim 5.1.1.-F) ve bu noktadan distale doğru 1 mm'lik sinir parçası mikro

makaslar (Bahadır C 102.00 Samsun, Türkiye) ile kesilerek çıkartıldı (Resim 5.1.1.- G) ve hasar oluşturuldu. Sinirin segmental hasarı sonrasında masseter derin ve yüzeysel olarak 4.0 vikril (Ethicon, Minhan, Çin) ile suture edildi. Cilt kesisi ise 4.0 ipek (Dogsan medical products, Trabzon, Türkiye) ile suture edildi.



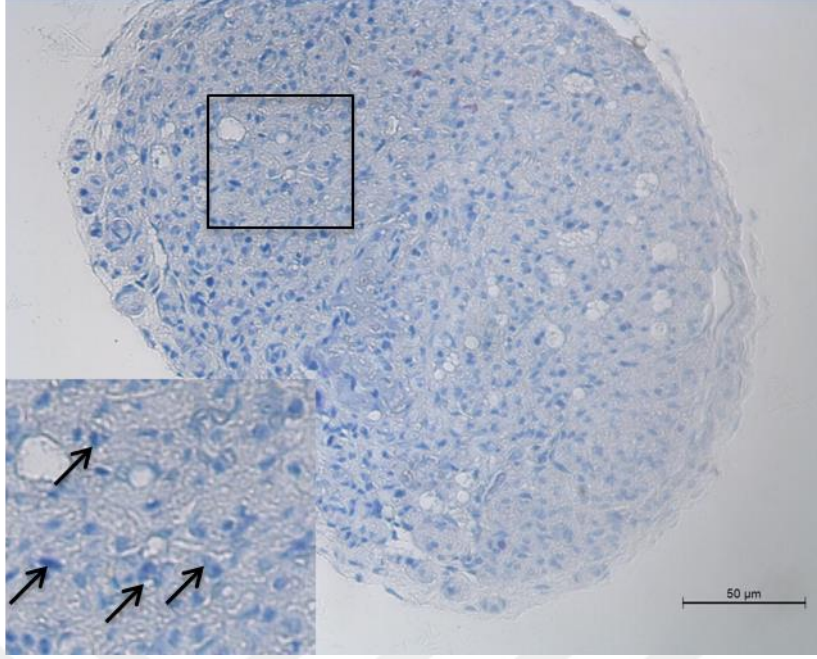
Resim 5.1.1. : İAS hasarı modeli. A) Cilt üzerine yapılan vertikal kesi. B) Masseter kasının künt diseksiyonu. C) Ramus lateraline ulaşılması. D) Mandibular kanal lateralinin belirlenmesi. E) Mandibular kanal lateralinde bulunan kemiğin kaldırılması. F) İAS'e ulaşımın sağlanması. G) Sinirde 1 mm'lik segmental hasarın oluşturulması. H) Hasar sonrası görünüm.

5.2. Aksotomi Sonrası Hücresel Değişikliklerin İncelenmesi

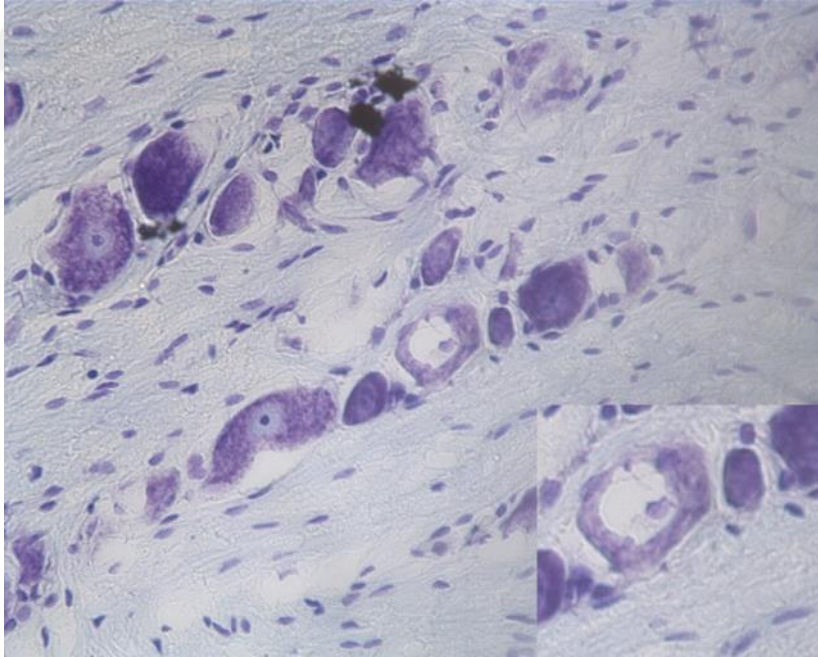
Unilateral aksotomileri yapılan sıçanlar randomize olarak beş gruba ayrıldı. Sıçanlar cerrahiyi takip eden 1., 3., 7., 14. ve 28. (her grup için n=5) günlerde yüksek doz genel anestezi altında sakrifiye edildi. Hasarın oluşturulduğu sol İAS'nin distalinde ve proksimalinde kalan sinir kısımları ve sol TG'ler çıkartıldı. Kontrol grubu olarak ise her gruptan randomize olarak seçilen bir hayvanın sağ taraftaki İAS'nin sol tarafta aksotomi uygulanan seviyesinin distal ve proksimalinde kalan kısımları ve sağ TG'leri çıkartıldı. TG'ler sıçanların kraniumları ve beyinleri superiordan yaklaşımla kaldırılıp, kafa kaidesi üzerinden konumlanan TG'ler üç dalıyla beraber incelenmek üzere çıkartıldı.

Hasarın distalinde ve proksimalinde kalan sinir örnekleri nötral formaldehit ile fikse edildi. Sinir örnekleri alkol serilerinden geçirilerek parafin bloklar içerisine gömüldü. Sinir örnekleri parafin bloklar içerisinde aksiyel kesitleri alınacak şekilde pozisyonlandırıldı. Histolojik analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için doku örneklerinin mikrotom (RM 2245; Leica, Wetzlar, Almanya) ile 4 µm kalınlığında kesitleri alındı. Kesitler toluidin mavisi ile boyandı. Sinirin bütün alanındaki bütünlüğünü koruyan akson ve Schwann hücreleri mikroskop (DM 4000B; Leica, Wetzlar, Almanya) ve yazılım (Stereo Investigator 7.0; MicroBrightField, Williston, Vt) yardımıyla sayıldı (Resim 5.2.1.).

TG'ler paraformaldehit (%4) ile fikse edildi ve fosfat tampon (0.1 mol/L, pH 7.4) ile hazırlanmış %10'luk süktrozda bir gece bekletildi. Ganglionlar beyin sapı üzerindeki anatomik pozisyonlarına ve kesit alımı sırasında üç dalının aynı kesitte izlenebilmesi dikkate alınarak doku dondurma materyalleri içerisine gömüldü. Kroystat ile kesitleri alınana kadar dondurulan dokular -80 C° de saklandı. TG'lerin 10 µm kalınlığında seri kesitleri alınarak pozitif yüklü slaytlara aktarıldı. Kesitler kretil viyole ile boyanarak seri kesitlerdeki İAS hücre gövdesinden yoğun bölgelerdeki hücre gövdeleri ışık mikroskop (DM 4000B; Leica, Wetzlar, Almanya) ve yazılım (Stereo Investigator 7.0; MicroBrightField, Williston, Vt) yardımıyla sayıldı (Resim 5.2.2.). Bu değerlendirme sırasında çalışmanın ilerleyen kısmında ortaya konan İAS hücre gövdelerinin haritalaması verilerinden faydalandı.



Resim 5.2.1. : Sinir kesitlerindeki hücresel durumun değerlendirilmesi. Hasar sonrası 28. günde distal sinir segmentinden alınan örnek kesit. Siyah oklar: Schwann hücreleri.

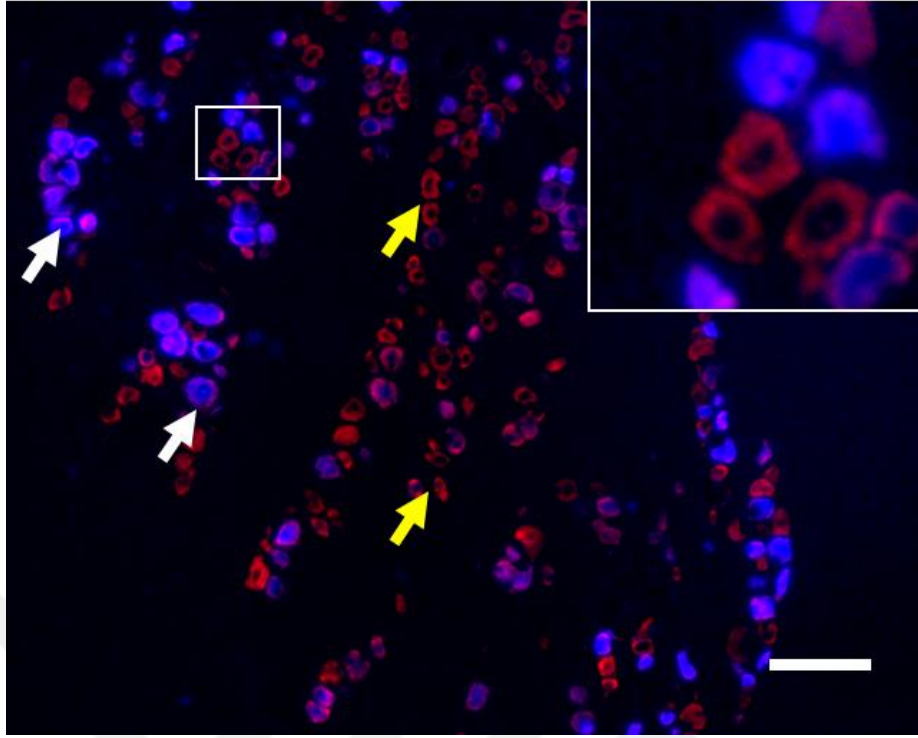


Resim 5.2.2. : TG kesitlerinde hücre gövdesi yoğunluğunun belirlenmesi. Hasar sonrası 1. günde alınan TG kesitlerindeki hücresel durum.

5.3. İAS'nin TG'deki Somatotopik Organizasyonunun Belirlenmesi

İAS'nin TG içerisindeki somatotopik organizasyonunun belirlenmesi amacıyla iki adet, dişi, yetişkin Sprague-Dawley tipi sıçan kullanıldı. İAS aksonlarının

retrograt olarak işaretlenebilmesi için FG (SC-358883, Santa Cruz, Heidelberg, Almanya) kullanıldı. Anestezi ve operasyon protokolleri İAS hasarı modeli başlığı altında anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi, fakat FG enjeksiyonunun yapılacağı yer olarak İAS'in mandibular foramenden giriş yaptığı yer tercih edildi. Bu amaçla, mandibular foramenin ramus lateralindeki iz düşümü üzerindeki kemik uzaklaştırılarak bu noktadan FG enjeksiyonu yapıldı. Böylece enjeksiyon mental ve keser dallarına ayrılmadan ve mandibular kanal içerisinde aksesuar dallarını vermeden, İAS'nin ana dalı içerisine yapılması sağlandı. 2 µl FG, 4 dakika içerisinde Hamilton enjektörüne (Microliter #701, Ghironda, Romanya) adapte edilen mikropipetlerin yardımıyla enjekte edildi. Bu aşamada pamuk peletler enjeksiyonun proksimaline yerleştirilerek FG'nin dokular arasındaki difüzyonuna bağlı hatalı pozitif boyamalar minimize edilmeye çalışıldı. Enjeksiyon sonrası 5. günde hayvanlar yüksek doz anestezi altında kurban edildi ve bilateral ganglionları çıkartıldı. Aksotomi sonrası hücresel değişikliklerin incelenmesi başlığı altında anlatılan doku takibi ve kesitleme işlemleri TG'ler için tekrarlandı. Her 4. kesit pozitif yüklü lamlar üzerine alınarak propidium iodide (PI) ile boyandı. Toz PI (P4170, Sigma Aldrich, ABD) ile hazırlanmış 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözelti fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 1:1000 oranında seyreltilti. Pozitif yüklü lamlar 5 dakika boyunca, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda, otomatik çalkalayıcı kullanılarak 1 µl/ml final konsantrasyonundaki çözelti içerisinde inkübe edildi. FG pozitif hücrelerin değerlendirilmesi amacıyla 405 nm filtre altında fotoğraflanan kesitlerin PI boyamalarının değerlendirilmesi için 561 nm filtre altında da fotoğrafları çekildi. Alınan fotoğraflar birleştirilerek PI ile boyanan hücrelerin hangilerinin FG ile işaretlendiği belirlendi. FG ile retrograt olarak işaretlenen İAS'ye ait hücre gövdeleri kırmızı içerisinde mavi görüntü verirken İAS'ye ait olmayan hücreler sadece kırmızı olarak gözlemlendi (Resim 5.3.1.). İAS hücre gövdelerinin dağılımı ve yoğunluğu her 4 kesitte bir (40 µm aralıkla), kesit içerisindeki bütün alanda değerlendirildi.



Resim 5.3.1. : TG kesitlerinde İAS hücre gövdesi yoğunluğunun değerlendirilmesi. Beyaz ok: İAS'e ait, FG pozitif hücre gövdeleri. Sarı ok: Sadece PI ile boyanmış diğer hücre gövdeleri (Bar: 100µm).

5.4. Sistemik Rifampisin Tedavisinin Uygulanması

Rifampisin tedavisinin İAS hasarı sonrası rejenerasyona etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 24 adet, Sprague-Dawley cinsi, yetişkin, dişi sıçan kullanıldı. Sinir hasarının oluşturulması amacıyla hasar modeli başlığı altında anlatılan yöntem ile İAS'ye ulaşım sağlandıktan sonra İAS mandibular foramenin 2 mm distaline denk gelen, İAS ana dalının mental ve keser sinir dallarına ayrılmadan önceki kısmında mikro forseps ile 30 saniye boyunca sıkıştırılarak bası tipi hasar oluşturuldu.

Rifampisin çözeltisi %3'lük dimetil sülfoksil (DMSO) içerisinde çözülerek hazırlandı. Kilogram başına eşit hacimlerde sıvı enjeksiyonunun sağlanabilmesi amacıyla, aynı hacimdeki solüsyonda farklı miktarlarda rifampisin çözülerek bu çözelti kilogram başına 5 mg ve 20 mg olacak şekilde hazırlandı. Negatif kontrol grubunun enjeksiyonlarında rifampisin içermeyen %3'lük DMSO kullanıldı. Solüsyonlar kullanılmadan önce vortekslenerek solüsyonların homojenitesi sağlandı. Hayvanlar operasyondan önce rastgele 5 mg/kg rifampisin tedavisi grubu (n=8), 20 mg/kg rifampisin tedavisi grubu (n=8) ve negatif kontrol grubu (n=8) olarak üç gruba

ayrıldı. Sinir hasarı uygulanmadan 15 dakika önce, dahil olduğu grubuna göre enjeksiyonları yapılan hayvanların enjeksiyonlarına cerrahiyi takip eden 27 gün boyunca, gün aşırı devam edildi. Enjeksiyonlar intraperitoneal olarak uygulandı.

5.5. FG ile Hedef Doku Reinnervasyonunun Değerlendirilmesi

Sistemik rifampisin tedavisinin değerlendirildiği aşamada rejenere olan aksonların hedef dokuyla morfolojik bağlantıları FG ile değerlendirildi. Sinir hasarının oluşturulmasını takip eden 24. günde sıçanlar aynı yöntemle anestezi altına alınarak yan yatar pozisyonda operasyon masasına sabitlendi. Hamilton enjektörlerine uyumlanan cam mikropipetler yardımıyla FG enjeksiyonları gerçekleştirildi. Sol mental foramen üzerindeki cildin, rejenere olan aksonlar tarafından reinnervasyonunun değerlendirilmesi amacıyla serum fizyolojik içerisinde çözünmüş %4 lük, 5 µl FG beş dakika içerisinde mukoza altına enjekte edildi. FG enjeksiyonunu takip eden 4. günde (sinir hasarını takip eden 28. gün) sıçanlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Sol TG'ler olabildiğince çabuk çıkarılarak 0.1 M PBS de çözünmüş %4'lük paraformaldehitte 24 saat boyunca fikse edildi. Ganglionlar %10'luk sükröz çözeltisine aktararak bir gece bekletildikten sonra doku dondurma materyalleri (Tissue-tek, Sakura Finetek, Breisgau, Almanya) içerisine gömüldü. TG'ler sagittal ekseninde kryostat yardımıyla 10 µm kalınlığında kesildi. TG'lerin medialden laterale olacak şekilde seri kesitleri alındı. Her 10. kesit analiz için incelendi ve kesitlerdeki FG pozitif hücreler sayıldı. Kesitlerde gözlenen bütün FG pozitif hücreler sayılarak her hayvan için bir kesitteki ortalama FG pozitif hücre sayısı belirlendi.

5.6. Elektron Mikroskopi Değerlendirmesi

Yirmi sekizinci günün sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen, hasarın distalindeki sinir dokuları fosfat tamponlu (pH 7.3) %2,5 glutraldehit (Sigma-Aldrich Co.) içeren solüsyonda, oda sıcaklığında, iki saat fikse edildi. %1 osmium tetraoksit ile post-fiksasyonu yapılan dokular alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Propilen oksitten geçirilen doku örnekleri araldite CY 212 (Ciba-Geigy), süksinik anhidrit (Sigma-Aldrich Co), benzildimetil amin (Poly Sciences Inc.) ve dibütülfalat (Sigma-Aldrich Co.) içerisine gömüldü. Yarı ince kesitler toludin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda (DM 500 Leica, Germany) değerlendirildi. Uygun

kesitlerin seçimi sonrasında ince kesitler alınarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı (Sigma-Aldrich Co.). İki adet histolog tarafından elektron mikroskobunda değerlendirildi (Leo 906 E Carl Zeiss, Germany).

Histomorfometrik analiz yarı ince kesitler üzerinden x1000 büyütmedeki görüntülerde myelinli aksonların “g-oranları” hesaplanarak gerçekleştirildi. Her gruptan randomize olarak 200 kadar akson değerlendirildi. Değerlendirmeler İAS’lerin transvers kesitleri randomize seçilerek gerçekleştirildi. “g-oranları” akson iç çapının myelinle beraber ölçülen akson kalınlığına bölünmesiyle bulundu. Yapısal ve fonksiyonel olarak optimal “g-oranı” 0.55-0.69 aralığı kabul edildi (63). Sonuçlar 0-0.49, 0.50-0.54, 0.55-0.69, 0.7-1 aralıklarında sınıflandırılarak değerlendirildi. Ölçümler Tantan 76 (Başkent Üniversitesi Biyofizik Departmanı, Ankara, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu program sinir araştırmalarında “g-oranı” ölçümleri için özel olarak geliştirilmiştir.

5.7. İstatistiksel Yöntem

Aksotomi sonrası değerlendirilen Schwann hücresi sayısı, akson sayısı ve TG’lerdeki hücre gövdesi sayılarının istatistik değerlendirmesi amacıyla tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Sistemik rifampisin tedavisi uygulanan sıçanlardan değerlendirilen FG pozitif hücre sayısının negatif kontrol grubu ve farklı dozlardaki tedavi gruplarıyla karşılaştırılması amacıyla yine tek yönlü varyans analizi kullanıldı.

“g-oranı” sonuçları sayı (n) ve yüzde (%) olarak belirtildi. Kategorik veriler Fisher’s Exact Test ve Ki Kare testi ile analiz edildi. Beklenen frekansların 5’ten küçük olduğu durumlarda Monte Carlo Simülasyon yöntemi kullanıldı. Bütün parametreler için $p < 0,05$ düzeyi istatistik olarak anlamlı kabul edildi. Veriler SPSS istatistik paket programında (Version 17, Chicago IL, USA) değerlendirildi.

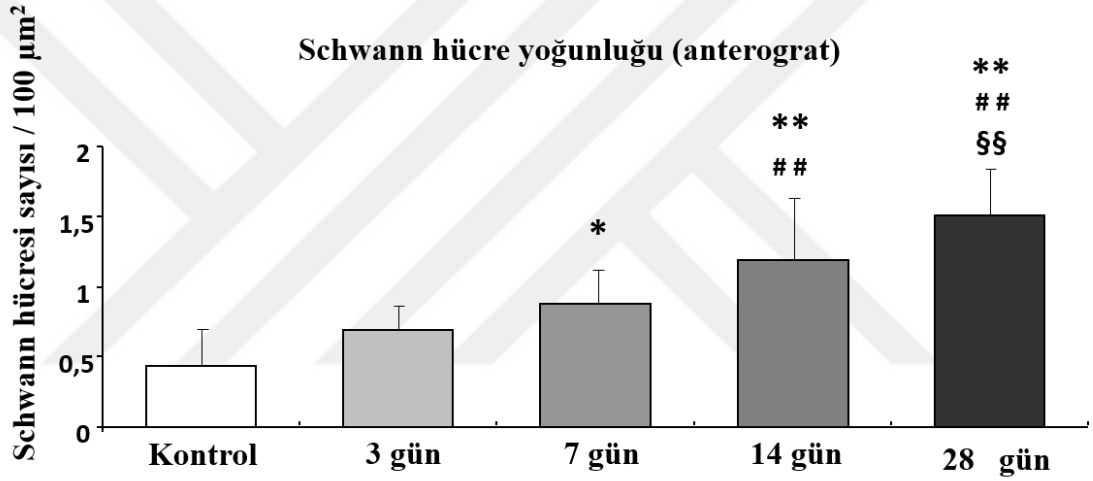
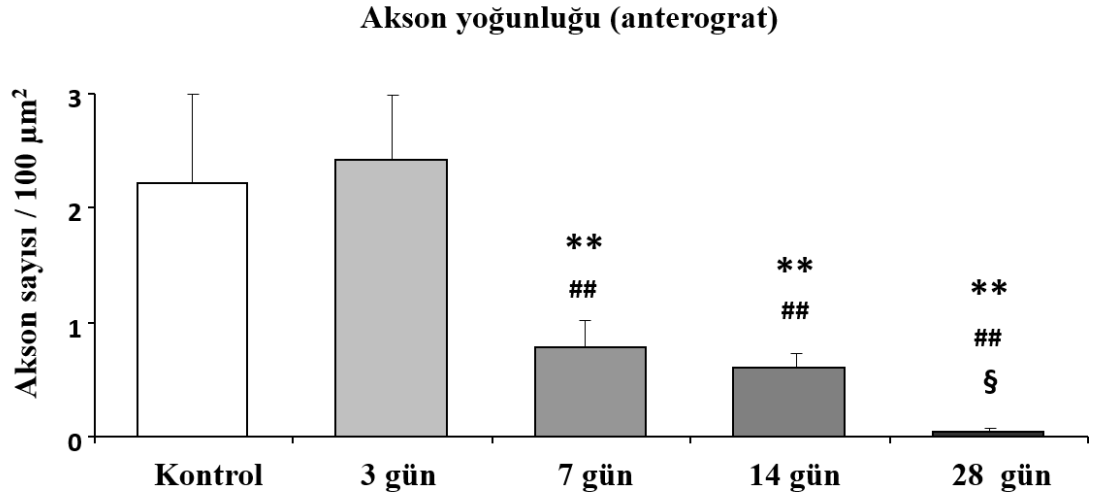
6. BULGULAR

6.1. İAS Aksotomisi Sonrası Hücresel Değişiklikler

6.1.1. Hasarın Distalindeki Sinir Segmentinin Hücresel Durumu

Sinirin transvers kesitlerindeki bütün aksonlar sayıldı ve total alana bölünerek birim alandaki akson yoğunluğu hesaplandı. Hasarın distalinde kalan sinir segmentinde akson yoğunluğunda hasar sonrası 3. günde istatistiksel anlamlı bir değişiklik gözlenmezken hasarı takip eden 7. günde aksonal yoğunluk kontrol grubu ve 3. günle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.01$). Akson yoğunluğundaki en belirgin değişiklik 3. ve 7. günler arasında olmuştur. Hasarı takip eden 14. ve 28. günlerdeki aksonal yoğunluk da kontrol ve 3. gün gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak daha az bulunmuştur ($p<0.01$). Buna ek olarak hasarı takip eden 7. gün ve 28. gün arasındaki akson yoğunluğu da istatistiksel anlamlı olarak farklılık göstermiştir ($p<0.05$). Hasarı takip eden gün sayısı arttıkça sinirin içerisindeki aksonların organizasyonel yapısındaki bozulma artış göstermiştir (Şekil 6.1.1.1.).

Hasarın distalinde kalan sinir segmentinde Schwann hücresi yoğunluğu Wallerian dejenerasyonda beklendiği şekilde 3-7 gün aralığında artmıştır (Şekil 6.1.1.1.). Kontrol grubuyla 3. gün gruplarının karşılaştırılmasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Hasarı takip eden 7. günde Schwann hücresi yoğunluğu istatistiksel anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$). 14. ve 28. günlerde gözlenen Schwann hücresi yoğunluğu kontrol grubu ve 3. gün Schwann hücresi yoğunluğundan daha fazla bulunmuştur ($p<0.01$). Bunun yanında 28. gündeki Schwann hücresi yoğunluğu 7. gündeki Schwann hücresi sayısından anlamlı olarak fazla bulunmuştur ($p<0.01$).



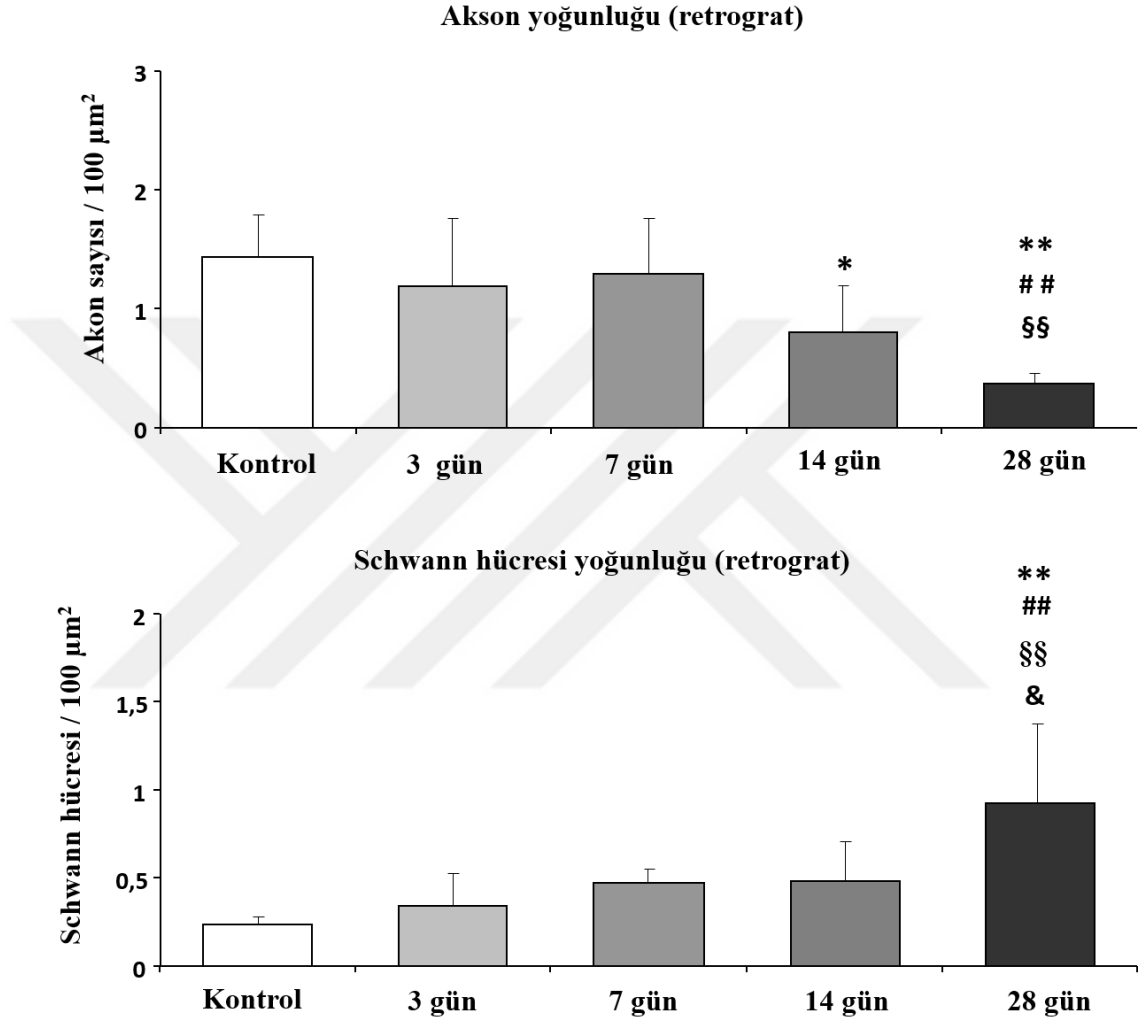
Şekil 6.1.1.1. : Hasarın distalinde kalan sinir segmentindeki akson ve Schwann hücresi yoğunluğunun zamana bağlı değişimi. * kontrol grubuyla istatistiksel anlamlı farklılığı, # 3.gün grubuyla istatistiksel anlamlı farklılığı, § 7. gün ile istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir. Tek işaret $p<0.05$ değerleri için, çift işaretler $p<0.01$ değerleri için kullanılmıştır.

6.1.2. Hasarın Proksimalindeki Sinir Segmentinin Hücresel Durumu

Hasarın proksimalindeki sinir segmentinde distal segmentle karşılaştırıldığında akson sayısındaki azalma gecikmiş olarak gözlenmiştir. Günlerin ilerlemesiyle ilişkili olarak kontrol grubuyla karşılaştırılmasında ilk anlamlı farklılık 14. günlük grupta gözlenmiştir ($p<0.05$). 28. günde dejenerasyon daha belirgin hale gelip kontrol, 3.gün ve 7. günle aralarındaki farklılık istatistiksel anlamlıdır (Şekil 6.1.2.1.).

Schwann hücresi yoğunluğundaki artış özellikle 14-28 gün aralığında belirgindir. Hasarı takip eden 28. günde alınan örneklerin Schwann hücresi

yoğunluğu ile 7. ve 14. günlerde alınan örneklerin Schwann hücresi yoğunluğuna göre anlamlı olarak daha çoktur ($p<0.05$). 28 günlük grubun kontrol ve 3. gün gruplarına göre Schwann hücresi yoğunluğundaki artış istatistiksel olarak daha belirgindir ($p<0.01$) (Şekil 6.1.2.1.).

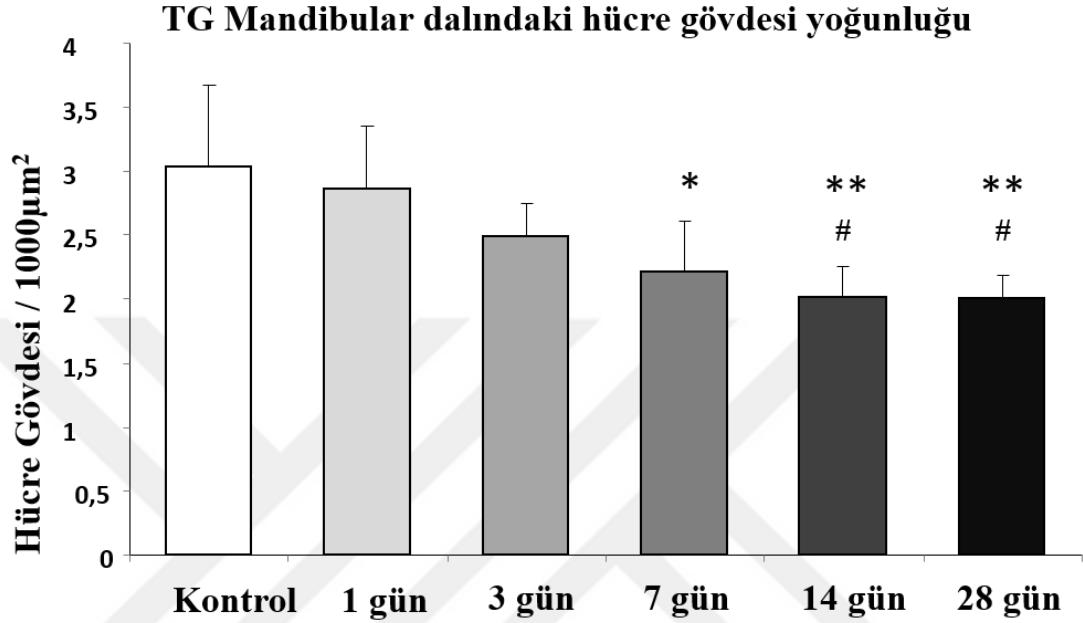


Şekil 6.1.2.1. : Hasarın proksimalinde kalan sinir segmentindeki akson ve Schwann hücresi yoğunluğunun zamana bağlı değişimi. * kontrol grubuyla istatistiksel anlamlı farklılığı, # 3.gün grubuyla istatistiksel anlamlı farklılığı, § 7. gün ile istatistiksel anlamlı farklılığı, & 14. gün ile istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir. Tek işaret $p<0.05$ değerleri için, çift işaretler $p<0.01$ değerleri için kullanılmıştır.

6.1.3. TG'deki Hücre Gövdesi Sayısı

Aksotomi sonrasında TG hücre gövdelerinde ölüm gözlenmiştir. Hasar sonrası takip eden günlerde hücre gövdesi yoğunluğu giderek azalmıştır. 7. gün grubu ve kontrol grubu hücre yoğunluğu arasındaki fark istatistiksel anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 14. ve 28. gün gruplarının hücre gövdesi yoğunluğundaki

azalma daha belirgin hale gelmiştir ($p<0.01$). Hasarı takip eden 1. gündeki kesitlerin hücre gövdesi yoğunluğu ile 14. ve 28. günlerdeki hücre gövdesi yoğunluğu arasında da istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 6.1.3.1.).

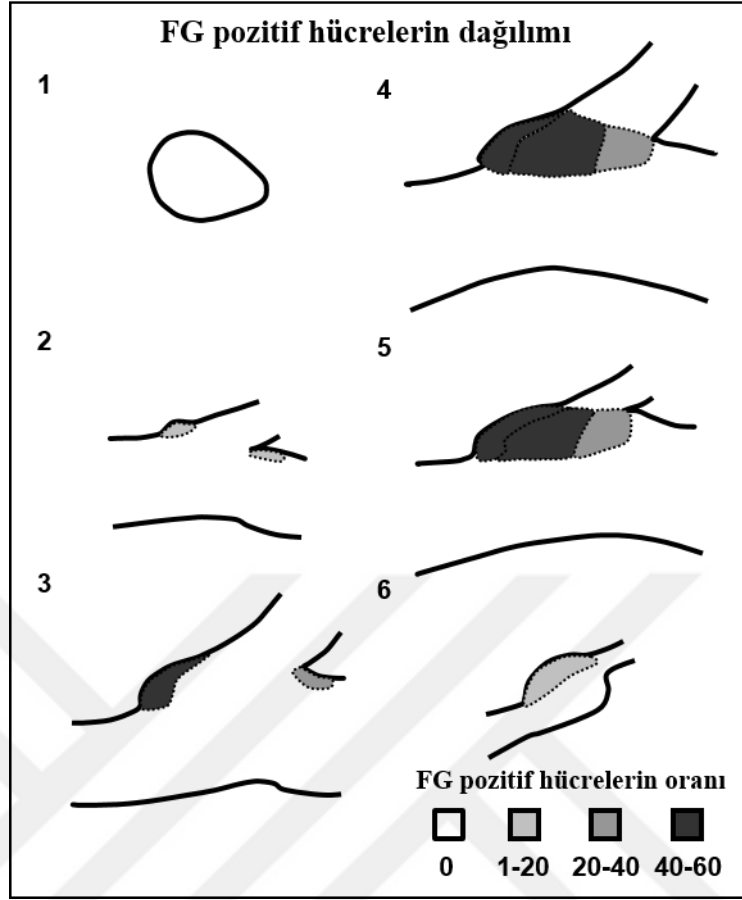


Şekil 6.1.3.1. : TG mandibular dalındaki hücre gövdesi yoğunluğunun zamana bağlı değişimi. * kontrol grubuyla istatistiksel anlamlı farklılığı, # 3.gün grubuyla istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmektedir. Tek işaret $p<0.05$ değerleri için, çift işaretler $p<0.01$ değerleri için kullanılmıştır.

6.2. İAS'nin TG İçerisindeki Somatotopik Organizasyonu

40 µm aralıklarla alınan kesitlerinde İAS hücre gövdesinin bölgesel yoğunlukları hesaplanarak şematize edilmiştir. TG'nin medialinden lateraline doğru elde edilen bu şemalardan 6 tanesi temsili olarak Şekil 6.2.1.'de gösterilmiştir. TG'nin medial kenarından elde edilen ilk kesitlerde yalnızca oftalmik-maksiller dal kesit içerisinde kalmıştır. Mandibular dalın daha lateralde konulanması nedeniyle FG pozitif hücreler bu kısımda gözlenmemiştir (Şekil 6.2.1.-1). İkinci temsili kesitte görüldüğü üzere kesitlerin daha mediale ilerlemesiyle TG'nin mandibular dalı incelenen kesitlerde görünür hale gelmiştir. Mandibular dalın posterior lateral kısmında yoğunluk açısından da az olan birkaç İAS'ye ait hücre gövdesine rastlanmıştır. Fakat beklenenden farklı olarak, mandibular ve oftalmik-maksiller dalların ayırım kısmının superiorunda az miktarda İAS'ye ait hücre gövdesine rastlanmıştır (Şekil 6.2.1.-2).

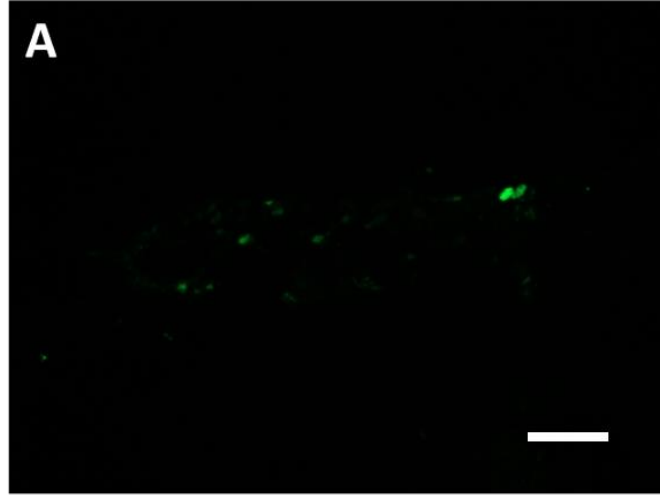
TG'nin daha medial kısmının temsil edildiği üçüncü kesitte mandibular dalın postero-lateralindeki İAS'ye ait hücre gövdesi yoğunluğunda artış olduğu ve furkasyonun superiorunda bulunan FG pozitif hücreleri bu seviyede de görülmeye devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 6.2.1.-3). Dördüncü temsili kesit yaklaşık olarak TG'nin ortasına tekabül etmektedir. Bu kesitte İAS'ye ait hücre gövdesi yoğunluğunun mandibular dalın posteriorunda halen daha yoğun olduğu, fakat anteriora doğru azalan yoğunluklarla da olsa oftalmik-maksiller dal komşuluğuna doğru uzadığı görülmektedir (Şekil 6.2.1.-4). TG'nin lateral kısmını temsil eden beşinci kesitte dördüncü kesite benzer şekilde, yine posteriora FG pozitif hücrelerin yoğun olduğu ve anteriora ilerledikçe yoğunluğun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 6.2.1.-5). Son kesit TG'nin en lateral kısmını temsil etmektedir ve bu kısımda oftalmik-maksiller dal kesitin dışında kalmıştır. Mandibular dalın postero-lateralinde düşük yoğunlukta İAS hücre gövdelerine rastlanmıştır (Şekil 6.2.1.-6).



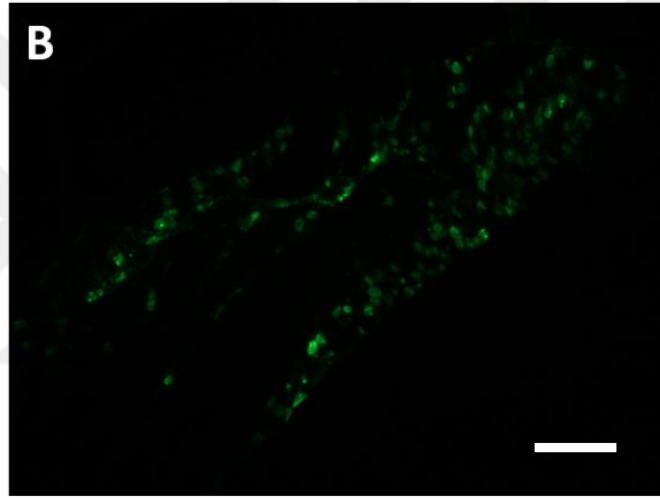
Şekil 6.2.1. : İAS'in TG'deki somatotopik organizasyonu. Kesitler 1-6 sıralamasıyla 1'den 6'ya doğru, TG'nin medialinden lateraline doğru ilerlemektedir.

6.3. Rifampisin Tedavisi Sonrası Hedef Doku Reinnervasyonu

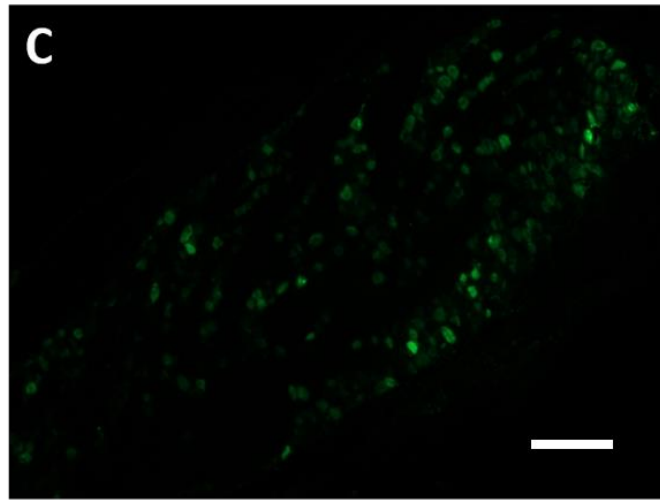
Sıçanların mental foramenleri üzerinde bulunan mukoza ve cildin reinnervasyonu, FG enjeksiyonunu takiben TG kesitlerinde FG pozitif hücre sayısının değerlendirilmesiyle bulunmuştur (Resim 6.3.1.). 5 mg/kg sistemik rifampisin tedavisi gören grubun TG'lerinden alınan kesitlerdeki FG pozitif hücre sayısı ($49,65 \pm 19,57$) negatif kontrol grubu TG'lerinden alınan kesitlerdeki FG pozitif hücre sayısından ($22,14 \pm 13,59$) istatistiksel anlamlı olarak fazla bulunmuştur ($p=0.037$). 20 mg/kg sistemik rifampisin tedavisi gören grubun TG'lerinden alınan kesitlerdeki FG pozitif hücre sayısı da ($65,27 \pm 24,22$) negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak fazladır ($p=0.001$). 5 mg/kg ve 20 mg/kg sistemik rifampisin tedavisi alan hayvanların sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.280$) (Şekil 6.3.1.).



Kontrol

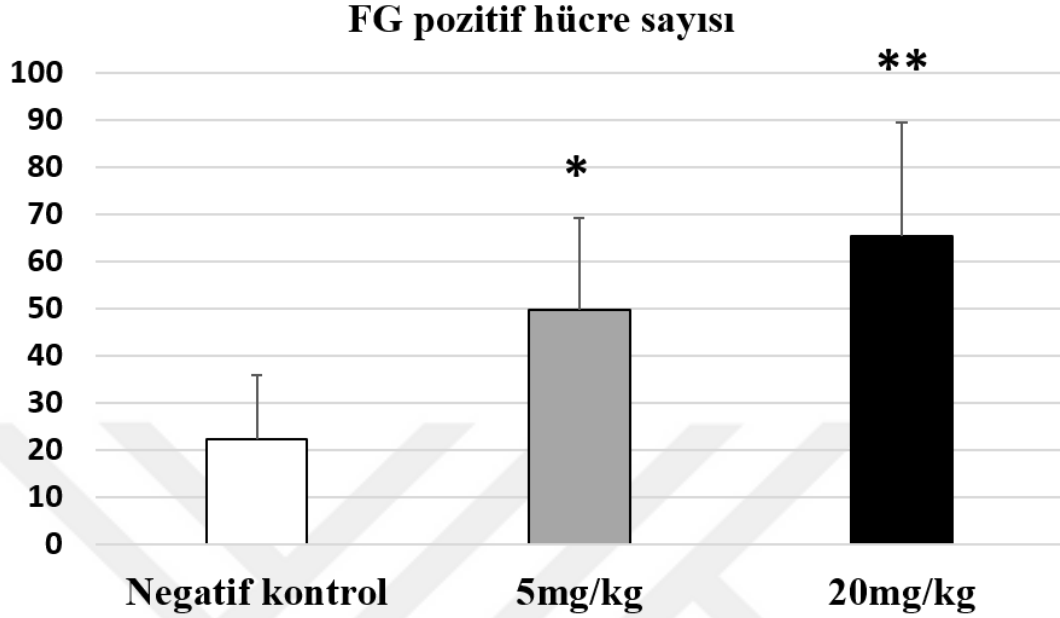


5 mg/kg



20 mg/kg

Resim 6.3.1. : TG kesitlerinde FG pozitif hücrelerin görüntüleri (Bar=200 μ m).



Şekil 6.3.1. : Farklı grupların ortalama FG pozitif hücre sayıları. * negatif kontrol grubuyla istatistiksel anlamlı farklılığı ifade etmek için kullanılmıştır. Tek işaret $p<0.05$ değerleri için, çift işaretler $p<0.01$ değerleri için kullanılmıştır.

6.4. Rifampisin Tedavisi Sonrası İAS'nin Histolojik ve Histomorfometrik Olarak Değerlendirmesi

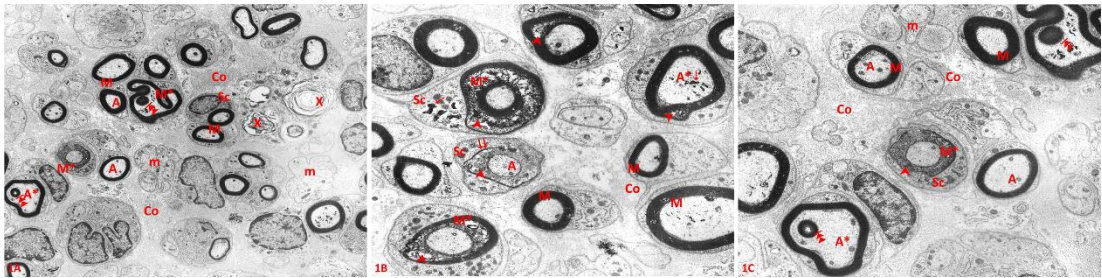
Negatif kontrol grubunda yapılan histolojik değerlendirmelerde miyelinsiz sinir lifleri, miyelinli liflerde akson, miyelin yoğunluğu, Schwann hücreleri, ara bağ dokusu değerlendirildi. Negatif kontrol grubunda küçük büyütme fotoğrafta normal yoğunlukta miyelinle sarılı aksonlar ile birlikte farklı dejeneratif özellik sergileyen sinir lifleri ayırt edildi. Ara bağ dokusunda makrofajlar tarafından sindirilmiş miyelin artıkları, miyelinsiz sinir liflerinde şişme ve kollagen liflerin yoğun olduğu görüldü (Şekil 6.4.1.-1A). Büyük büyütme fotoğraflarda yapılan değerlendirmede doku genelinde aksonlar normal yapısını korurken bazı liflerde miyelin kılıfta ayrılmalar ile birlikte granüler görünüm izlendi. Bu alanda remiyelinizasyon evresinde olan aksonda da granüler görümlü dejeneratif değişikliklerin varlığı saptandı (Şekil 6.4.1.-1B). Aynı grupta miyelin kılıfın akson sitoplazmasına penetre olduğu alanlar izlendi (Şekil 6.4.1.-1C). Doku genelinde poliaksonal Schwann hücreleri saptandı. Poliaksonal Schwann hücreleri, miyelin kılıftaki hasarlar ve remiyelinizasyon

evresindeki liflerde görülen dejeneratif değişiklikler nedeniyle bu grupta iyileşmenin sağlıklı ilerlemediği tespit edildi.

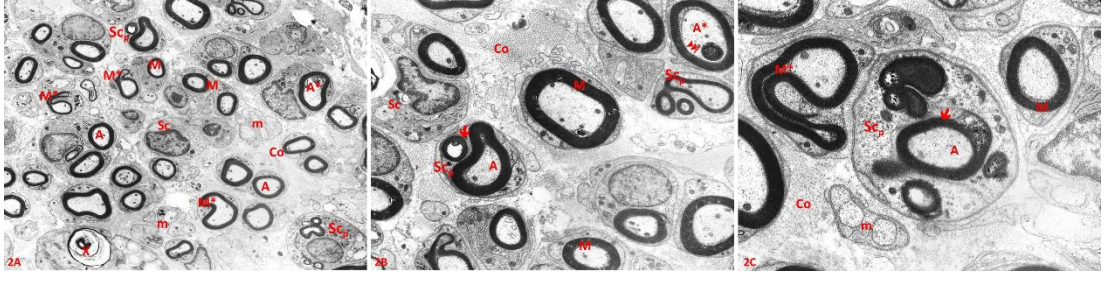
Travma sonrası günlük 5 mg/kg rifampisin uygulanan grupta yapılan değerlendirmede kontrol grubuna göre belirgin bir farklılık saptanmadı. Küçük büyütme fotoğrafta normal yapı ve yoğunluktaki miyelinli sinir liflerinin yanı sıra anormal şekilli ince miyelinli sinir lifleri ayırt edildi. Bazı noktalarda miyelin akson temasının yitirildiği görüldü. Poliaksomal Schwann hücreleri, miyelinsiz sinir liflerinde şişme ve kollajen liflerin bu grupta da yoğun olduğu izlendi (Şekil 6.4.2.-2A, 2B, 2C).

Travma sonrası 20 mg/kg rifampisin uygulanan grupta normal yoğunlukta ve düzenlenimde olan miyelinli sinir liflerinin yanı sıra bazı bölgelerde anormal şekilli ince miyelinli sinir lifleri ve miyelin kılıfta ayrılmaların varlığı saptandı. Ara bağ dokusunda diğer gruplarda olduğu gibi makrofajlar tarafından sindirilen miyelin artıkları, miyelinsiz sinir liflerinde şişme ve kollajen lif yoğunluğu belirgindi (Şekil 6.4.3.-3A). Büyük büyütme fotoğraflarda bazı aksonlarda sitoplazmada e- yoğun odaklar görüldü (Şekil 6.4.3.-3B). Farklı alan değerlendirmesinde birkaç aksonda miyelin kılıfın akson sitoplazmasına penetre olduğu saptandı (Şekil 6.4.3.-3C).

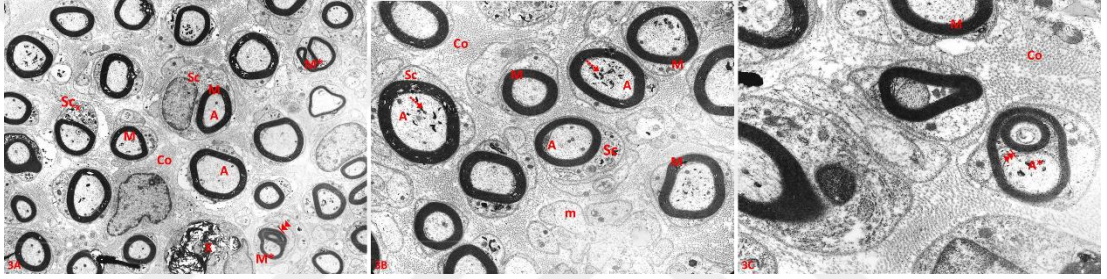
Sonuçta histolojik olarak travma kaynaklı yapısal değişikliklerde sistemik rifampisin uygulamasının histolojik değerlendirmede olumlu ya da olumsuz bir etkisinin olmadığı izlendi. Fakat rifampisin tedavisi alan gruplarda myelinin organizasyonel yapısının daha düzenli olduğu tespit edildi.



Resim 6.4.1.: Negatif kontrol grubuna ait elektron mikroskobu kesitleri. M:Normal yapıdaki miyelin kılıf, M*: Dejeneratif miyelin kılıf, m: miyelinlinsiz sinir lifi, A: Normal düzenlenim gösteren akson, A*: Dejeneratif özellik sergileyen akson, ►; akson sitoplazmasındaki miyelin yapısı, Sc; Schwann hücresi, X: Miyelin artıklar, Co; Kollajen lifler, ►; miyelin kılıfta ayrılma, ⇌; remiyelinizasyon evresinde dejnerasyon, (Uranyl Asetat& Kurşun Sitrata, 1A-2156X,1B,1C-6000X).

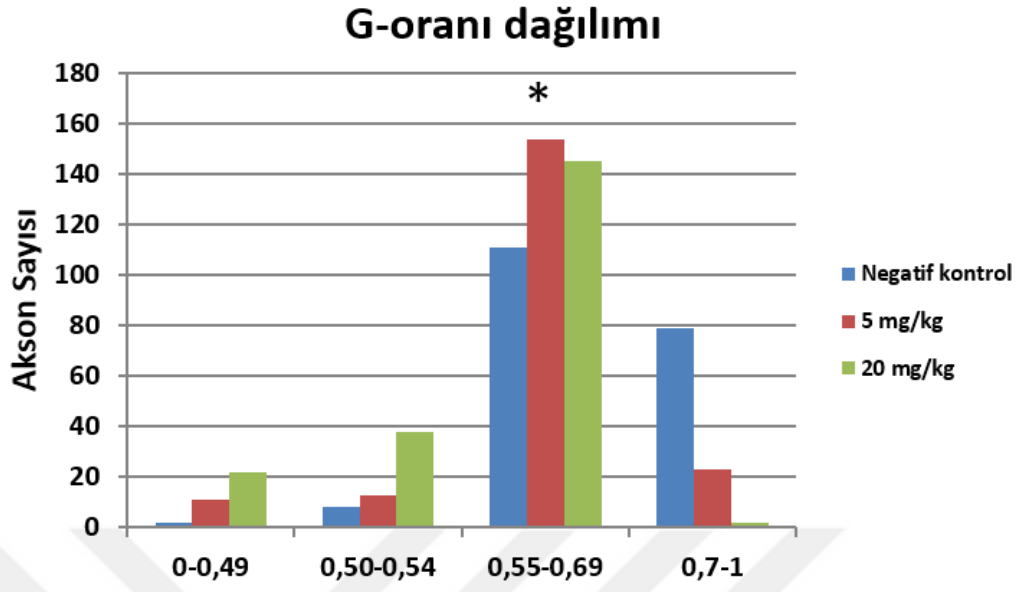


Resim 6.4.2.: 5 mg/kg rifampisin tedavisi grubuna ait elektron mikroskopu kesitleri. M:Normal yapıdaki miyelin kılıf, M*: Dejeneratif miyelin kılıf, m: miyelinlinsiz sinir lifi, A: Normal düzenlenim gösteren akson, A*: Dejeneratif özellik sergileyen akson, ►; akson sitoplazmasındaki miyelin yapısı, Sc; Schwann hücresi, Scp; Poliaksomal Schwann hücresi, X: Miyelin artıklar, Co; Kollajen lifler, ►; miyelin kılıfta ayrılma, ⇌; remiyelinizasyon evresinde dejnerasyon, (Uranil Asetat& Kurşun Sitrat, 2A-2156X,2B-6000X,2C-10000X).



Resim 6.4.3.: 20 mg/kg rifampisin tedavisi grubuna ait elektron mikroskopu kesitleri. M:Normal yapıdaki miyelin kılıf, M*: Dejeneratif miyelin kılıf, m: miyelinlinsiz sinir lifi, A: Normal düzenlenim gösteren akson, A*: Dejeneratif özellik sergileyen akson, ►; akson sitoplazmasındaki miyelin yapısı, Sc; Schwann hücresi, Scp; Poliaksomal Schwann hücresi, X: Miyelin artıklar, Co; Kollajen lifler, ►; miyelin kılıfta ayrılma, ⇌; remiyelinizasyon evresinde dejnerasyon, (Uranil Asetat& Kurşun Sitrat, 3A-2156X, 3B-6000X, 3C-10000X).

Histomorfometrik analiz dahilinde farklı gruplardan elde edilen kesit örneklerindeki aksonların “g oranları” hesaplandı. Optimum g-oranı aralığı altında ve üstünde kalan aralıklarla beraber oransal olarak karşılaştırıldı (Şekil 6.4.1.). İstatistik analiz sonucunda optimum “g-oranı” aralığı olan 0.55-0.69 aralığındaki akson sayısı oranının negatif kontrol grubunda diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı olarak daha az olduğu tespit edildi (p=0.004).



Şekil 6.4.1. : Aksonların "g-oranı" dağılımları. 0,55-0,69 "g-oranı" aralığında negatif kontrol grubuna ait akson sayısı diğer gruplara göre istatistiksel anlamı olarak daha azdır.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tezde İAS'de oluşturulan segmental hasarın; hasarın distal ve proksimalindeki sinir segmentlerinde zamana bağlı oluşturduğu hücresel değişiklikler, standart histolojik boyamalar ile akson ve Schwann hücresi yoğunluğu üzerinden değerlendirildi. Buna ilaveten TG'deki hücre yoğunluğu, İAS hücre gövdelerinden yoğun olan bölgelerde sayılarak değerlendirildi. İAS hücre gövdelerinin lokalizasyonu ve TG içerisindeki somatotopik organizasyonunun değerlendirilmesi amacıyla İAS ana dalı içerisine retrograd tracer olan FG uygulaması yapılarak sakrifikasyon sonrası elde edilen kesitlerde PI ile boyama yapılarak FG pozitif hücrelerin kesitteki diğer hücreler içerisindeki yoğunluğunun incelenebilmesi de sağlandı. Tezin son kısmında İAS hasarı modeli ile bası tipi hasar indüklenerek 5 mg/kg ve 20 mg/kg dozlardaki sistemik rifampisin uygulamasının rejenerasyon üzerinde etkileri histolojik, histomorfometrik ve hedef dokunun fonksiyonel reinnervasyonu düzeyinde incelendi. Histolojik ve histomorfometrik değerlendirme amacıyla hasarın 5 mm distalinden alınan sinir örnekleri değerlendirilirken, hedef dokunun fonksiyonel reinnervasyonunun değerlendirilmesinde sakrifikasyondan 4 gün önce hedef dokuya enjekte edilen FG sonrası TG'deki FG pozitif hücre sayısı değerlendirildi. Histomorfometrik değerlendirilme amacıyla akson iç çapının myelin kalınlığıyla beraber hesaplanan çapına oranıyla elde edilen “g-oranı” değerleri sınıflandırılarak, farklı sınıflar içerisindeki akson sayıları gruplar arasında karşılaştırıldı.

Wallerian dejenerasyonun periferik sinir hasarına karşı gelişen doğal bir immün cevap olduğu önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Kan dolaşımından bölgeye gelen immün sistem hücreleri ve bölgedeki makrofajlar dejenere olan aksonun ortamdaki uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Birçok immün yanıtta merkezi rolü üstlenen makrofajlara ek olarak Wallerian dejenerasyon sürecinde Schwann hücreleri de önemli roller üstlenmektedir. Hasar sonrasında Schwann hücreleri aksonal hasara cevap olarak interlekin-1 α , interlekin-1 β ve tümör nekrozu faktör- α üretimini artırarak dejenerasyonun inflamatuvar fazını başlatırlar (64). Schwann hücreleri hasarlı alana immün hücreleri çekerken hasardan 2 gün sonra prolifer olmaya başlarlar ve dejenere olan aksonların fagositozu hasarı

takip eden 3.-4. gün aralığında başlar ve 2-3 hafta içerisinde sayıları 3 katına ulaşır (39). Bu tezde ise kemik içinde seyreden ve tamamen duyu liflerinden oluşan İAS aksotomisi sonrasındaki aksonal temizlenme hızının ve Schwann hücresi proliferasyonunun zamana bağlı değişimi değerlendirilmiştir. Bu tez sonucunda İAS hasarını takip eden 3. günde Schwann hücresi yoğunluğunda artış gözlenmiştir fakat değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Zaman içerisinde Wallerian dejenerasyonla uyumlu olarak Schwann hücresi sayısı başlangıç düzeyinin 3-4 katına ulaşmıştır. Bununla beraber akson yoğunluğu da Schwann hücresindeki artışla uyumlu olarak azalmış, bu yoğunluktaki en belirgin düşüş 3-7 gün aralığında görülmüştür. 14. günde kesitlerde halen daha aksonların gözükmemesi dejenere aksonların temizlenmesi sürecinin Schwann hücresi proliferasyonundan daha yavaş ilerlediğini göstermiştir. Sinir kesitlerinde dejenere olan aksonların hasarın distal kısmından uzaklaştırılmasında önemli roller üstlenen makrofajların kesitlerde gözlenememesi, kemik içi seyri sırasında hasara uğrayan İAS'nin rejeneratif sürecinde görev alacak hücrelerin yumuşak dokuyla çevrili bir periferik sinire göre farklılıklar gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Curtis ve ark. (65) da kemik içinde bulunan sinirlerin yumuşak dokularla çevrili sinirlerden ayrı olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Terim olarak Wallerian dejenerasyon genellikle hasarın distalinde bulunan sinir kısmı için kullanılmaktadır. Wallerian dejenerasyonla hasarın distalinde hayatta kalan nöronların aksonal uzantılarını hedef dokuya iletilebileceği, uygun hücre ortam sağlanmaya çalışılırken hasarın proksimalindeki nöronlarda hayatta kalmayı, rejenerasyonu ve aksonal uzamaları sağlayacak metabolik değişiklikler gözlenir. Hasar gören nöronlarda 56. güne kadar "growth associated protein-43" miktarında artışın gözlenmesi bu tezi desteklemektedir (66). Çalışmamız sonucunda akson yoğunluğunda anlamlı değişim 14. ve 28. günlerde gözlenmiştir. Akson yoğunluğundaki değişimle uyumlu olarak Schwann hücresindeki artış da hasar sonrası 28. güne yaklaşıldığında belirgindir.

Hasarın derecesiyle ilişkili olarak nöronal cevabın rejeneratif bir cevaptan nekroza kadar değişen bir yelpazede olabileceği bilinmektedir. Çalışmamızın ilk kısmında İAS'nin 1 mm'lik segmental rezeksiyonunun oluşturduğu hücresel cevap aynı zamanda TG'de de değerlendirilmiştir. İlk kısımdaki bu değerlendirme için

gerekli olan İAS hücre gövdelerinin TG'deki lokalizasyon bilgisine literatürden tam anlamıyla ulaşamadığı için, çalışmamızın bir parçası olarak İAS'nin TG'deki somatotopik organizasyonun değerlendirilmesi eklenmiştir. Sinirde aksotomi veya segmental hasarla en uyumlu nöral cevaplar kromatoliz, nükleer kutuplanma, hücre ve çekirdekteki genişleme ve dentritlerdeki retraksiyondur (67). Çalışmamız sonucunda da İAS hücre gövdelerinin yoğun olduğu bölgelerde hasarı takip eden günlerdeki zamana bağlı değişim tespit edilmiştir. 7. günü takip eden zamanlardaki yoğunluğun kontrol grubuna göre anlamlı olarak az olduğu tespit edilmiştir. 14. ve 28. günler arasındaki farkın az olmasıyla hücre sayısında değişiklikle sonuçlanacak cevabın ilk 2 hafta içerisinde oluşacağı sonucuna varılabilir.

Trigeminal sistem içerisinde bulunan üç farklı duyu sinirinin somatotopik ve fonksiyonel ayrımı beyin sapı ve korteks boyunca korunmaktadır (68). Daha önceki çalışmalarda somatotopik organizasyonun değerlendirilmesi amacıyla mekanik ve termal uyaranların TG ve spinal trigeminal gangliondaki fonksiyonel manyetik rezonans görüntülemeleri kullanılmıştır (68). Trigeminal sistemi oluşturan nöral yapıların ve aksonal yolların değerlendirilmesi için post-mortem histolojik teknikler ve kontrast manyetik rezonans görüntüleme teknikleri kullanılmıştır (69),(70). TG'nin somatotopik organizasyonu gerek cerrahlar gerekse araştırmacılar tarafından güncel olarak incelenen bir konudur. Submandibular bezi innerve eden duyu sinirlerinin lokalizasyonu horseradish-peroksidaz ile retrograd tracing yapılarak belirlenmiştir (71). Launay ve ark. (72) ise korneal duyu sinirlerinin TG'deki somatotopik organizasyonunun değerlendirilmesi amacıyla retrograd tracer uygulamasını doku şeffaflandırma ve üç boyutlu görüntülemeyle kombine etmiş ve korneal duyu innervasyonunun TG'nin dorsomedial kısmındaki hücrelerde sınırlı olduğunu ifade etmişlerdir. Chai ve ark. (73) trigeminal nevralji tedavisi için uyguladıkları radio frekans termokoagülasyon işleminin optimizasyonu için TG'nin üç boyutlu somatotopik organizasyonunun bilinmesi gerektiğini vurgulamıştır. Bu amaçla 3 dalına farklı tracerlar verip histolojik kesitlerin üç boyutlu rekonstrüksiyonunu yaparak değerlendirmelerde bulunmuşlardır. Sonuç olarak oftalmik sinir hücre gövdelerinin anterio-medial kısımda bulundukları, maksiller sinir hücre gövdelerinin ganglionun ortasında lokalize olduğu, mandibular sinir hücre gövdelerinin ise ganglionun posterio-lateral kısmında bulunduğu tespit edilmiştir.

Mandibular dala ait hücre gövdelerinin posterio-lateralinden medial kısma doğru da dağıldığı, bu kısımda maksiller sinire ait hücre gövdelerinin bir kısmıyla üst üste geldiği rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda mandibular sinirin bir dalı olan İAS tek başına değerlendirilmiştir. Sonuç olarak İAS hücre gövdelerinin TG'nin mandibular dalına yakın komşuluğundaki posterio-lateral kısmında yoğunlaştığı, fakat ganglionun daha medial kısmında anteriora doğru da dağıldığı gözlenmiştir. Ganglionun medial kısmında mandibular sinir ile oftalmik-maksiller dal arasındaki furkasyonun süperiorunda, az yoğunluklu olsa da FG pozitif nöronların olması farklı sinir dallarına ait hücre gövdelerinin beklenenden daha fazla iç içe görülebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda rutin somatotopik organizasyon çalışmalarına ek olarak İAS'e ait hücre gövdelerinin, bulundukları bölgedeki yoğunlukları da hesaba katılarak şematize edilmiştir. İAS, mandibular sinirin en büyük duyu siniri dalı olsa da birçok ufak sinir dalı mandibular sinire dahil olmaktadır. Figürlerde gösterilen İAS'ye ait olmayan hücre gövdelerinin birincil kaynağı mandibular sinire ait diğer sinir dallarının hücre gövdeleri olabileceği gibi, FG'nin infiltre olamadığı İAS dallarının da hesaplanan yoğunluk üzerinde bir miktar etkili olmuş olabileceği düşünülmektedir.

Launay ve ark. (72) doku şeffaflaştırma ve standart doku kesitleri üzerinden yapılan hücre sayımını korneal duyu sinirlerine uyguladıkları retrograt tracer sonrası TG'lerde değerlendirilmiştir. Her bir fare ganglionunun kontrüksiyonu için 25 ila 30 adet kesit gerektiği ve her ganglion için hücre miktarının manuel metotlarla sayılmasının 1 saat sürdüğü belirtilmiştir. Doku şeffaflaştırma sonrasında üç boyutlu görüntüleme yöntemiyle 24 saat içerisinde yüksek çözünürlüklü görüntülerin elde edilebileceği fakat klasik histolojik değerlendirmeler sırasında oluşan doku küçülmesinin bu yöntemle de gerçekleşeceği ifade edilmiştir.

İAS ile ilgili çalışmalarda TG kesitleri üzerinden yapılan değerlendirmeler sıkça kullanılmaktadır. Daha önce gerçekleştirilmiş çalışmaların bir kısmında sadece boyama yöntemleri kullanılmış, bir kısmında ise retrograt tracerlar kullanılarak boyama sonuçlarının ilgili sinirin hücre gövdelerini içerecek şekilde değerlendirilmesi sağlanmıştır. Tracer kullanılmadan yapılan çalışmaların bir kısmında ganglionlar morfolojik olarak bölümlendirilerek ilgili bölüm içerisinde değerlendirmeler yapılmıştır (74). Çalışmamız sonucunda farklı sinir dallarına ait

hücre gövdelerinin içe içe bulunabileceğinin gösterilmesi, çalışmaların değerlendirilmesi sırasında sadece sinirin anatomik yakınlığı ile belirlenen bölgelerdeki hücrelerin değerlendirilmesinin çelişkili sonuçlara neden olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda yapılan somatotopik organizasyon sonuçları İAS hücre gövdelerinin dağılımı hakkında bilgi sağlasa da TG'de olduğu gibi ganglion içerisinde farklı sinir dallarına ait hücre gövdelerinin bir arada bulunduğu durumlarda üzerinde çalışılan nöronların retrograt tracer ile işaretlenerek bu hücreler üzerinde incelemeler yapılması daha doğru sonuçlar ortaya koyacaktır. TG'ye benzer yapıya sahip ganglionların somatotopik organizasyonlarının belirlenmesi ile yapılacak çalışmalara rehberlik etmesi, daha güvenilir sonuçların elde edilmesi sağlanacaktır.

Son yıllarda antibiyotikler üzerine yapılan çalışmalar antibiyotik etkinliklerinin yanında, mitokondri kaynaklı sitokrom c miktarını, mikrogial aktivasyonu, glutamat nörotoksitesini ve oksidatif stresi azaltmak gibi sinir dokusu üzerine koruyucu etkilerine dikkat çekmiştir (52),(75). Rifampisin genellikle tüberküloz, lepra gibi mikobakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. İlacın lipofilik ansa zinciriyle kan-beyin bariyerinden geçebildiği (55) ve oral kullanımını takiben sinir dokularında birikimi deneysel olarak gösterilmiştir (76). Rifampisin yapısında bulunan naptohidrokinon halkası sayesinde ortamdaki hidroksil radikali miktarını azaltarak nörotoksiteyi inhibe eder (77). Optik sinir hasarı modelinde değerlendirilen rifampisinin pro-apoptotik Bax ekspresyonunu azalttığı ve anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL ekspresyonunu arttırdığı çalışmalarla gösterilmiştir (59). Gollapudi ve ark. (58) rifampisinin antioksidatif etkilerinin yanında kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu glukokortikoid reseptör aktivasyonu yolağıyla inhibe ederek apoptozu engelledikleri gösterilmiştir. Lipopolisakkaritler ile uyarılan BV2 mikrogial hücrelerindeki pro-inflamatuar mediatör üretiminin rifampisinin ile inhibe olabildiği gösterilmiştir (61). Rifampisinin immunomodülatör rolünün değerlendirildiği bir çalışmada rifampisinin nükleer faktör kappa B miktarını azalttığı ve bu durumun toll benzeri reseptör 2 miktarındaki ve mitojen aktiveli protein kinaz fosforilasyonundaki azalmanın nedeni olabileceği belirtilmiştir (61).

Sinir sistemi dokularında tetiklediği hücresel moleküler değişiklikler ve farklı hasar ve dejeneratif modellerdeki uygulamalarından elde edilen sonuçlar

değerlendirildiğinde rifampisinin potansiyel nörorejeneratif etkileri ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada daha önce değerlendirilmemiş olan, rifampisinin periferik sinir sistemi rejenerasyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla sıçanlarda oluşturulan bası tip hasar sonrasında negatif kontrol, 5 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün şeklinde üç grup oluşturularak bu gruplardan elde edilen sinir örnekleri 28. gün sonunda değerlendirilmiştir. Rejenere olan aksonların hedef dokuyla oluşturdukları fonksiyonel bağlantılar FG ile değerlendirilmiş ve her iki doz grubunda da rifampisin tedavisi sonunda daha fazla fonksiyonel bağlantı elde edildiği gösterilmiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak negatif kontrol grubundaki optimum g-oranına sahip akson sayısının, 5 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün gruplarındaki optimum g-oranına sahip akson sayısından istatistiksel olarak daha az olduğu tespit edilmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan histolojik değerlendirmelerde kesitlerin hücresel durumları değerlendirilmiş ve gruplar arasında belirgin farklılıkların olmadığı, rejenere olan myelinlerin tedavi gruplarında göreceli olarak daha organize olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen bilgiler doğrultusunda, rifampisinin periferik sinir rejenerasyonuna katkı sağlayabilecek bir rejeneratif ajan olduğu, fakat bu rejenerasyon sırasında tetiklediği moleküler ve hücresel süreçlerin ayrıntılı olarak belirlenebilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara gerek olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle çene-yüz cerrahisi kliniklerinde baş-boyun bölgesinde sinir yaralanması yaşayarak yaşam kalitesi olumsuz yönde etkilenmiş hastalar üzerinde başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için, moleküler-hücresel süreçleri belirleyecek çalışmalara ek olarak farklı faz çalışmalarının da yapılması gerekmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Hillerup S: Iatrogenic injury to oral branches of the trigeminal nerve: records of 449 cases. *Clin Oral Investig.* 11: 133–142, 2007.
2. Marchena JM, Padwa BL, Kaban LB: Sensory abnormalities associated with mandibular fractures: incidence and natural history. *J Oral Maxillofac Surg.* 56: 822-5-6, 1998.
3. Houschyar KS, Momeni A, Pyles MN, Cha JY, Maan ZN, Duscher D et al.: The Role of Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair. *Plast Surg Int.* 2016: 1–8, 2016.
4. Yulug B, Hanoglu L, Kilic E, Schabitz WR: RIFAMPICIN: An antibiotic with brain protective function. *Brain Res Bull.* 107: 37–42, 2014.
5. Renton T, Yilmaz Z: Managing iatrogenic trigeminal nerve injury: A case series and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 41: 629–637, 2012.
6. Lam NP, Donoff RB, Kaban LB, Dodson TB: Patient satisfaction after trigeminal nerve repair. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 95: 538–543, 2003.
7. Kiyak HA, Beach BH, Worthington P, Taylor T, Bolender C, Evans J: Psychological impact of osseointegrated dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 5: 61–9, 1990.
8. Ziccardi VB, Zuniga JR: Nerve Injuries After Third Molar Removal. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 19: 105–115, 2007.
9. Friedman JW: The prophylactic extraction of third molars: A public health hazard. *Am J Public Health.* 97: 1554–1559, 2007.
10. Girard KR: Considerations in the management of damage to the mandibular nerve. *J Am Dent Assoc.* 98: 65–71, 1979.
11. Valmaseda-Castellon E, Berini-Aytes L, Gay-Escoda C: Inferior alveolar nerve damage after lower third molar surgical extraction: A prospective study of 1117 surgical extractions. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 92: 377–383, 2001.
12. Ellies LG, Hawker PB: The prevalence of altered sensation associated with implant surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 8: 674–9, 1993.
13. Moore PA, Haas DA: Paresthesias in Dentistry. *Dent Clin North Am.* 54: 715–730, 2010.
14. Costantinides F, Biasotto M, Gregori D, Maglione M, Lenarda R Di: "Abscess" as a perioperative risk factor for paresthesia after third molar extraction under general anesthesia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 107: e8–e13, 2009.
15. Sumer M, Baş B, Yıldız L: Inferior alveolar nerve paresthesia caused by a

- dentigerous cyst associated with three teeth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 12: E388-E390, 2007.
16. Kobayashi D, Nishizawa D, Takasaki Y, Kasai S, Kakizawa T, Ikeda K, Fukuda K: Genome-wide Association Study of Sensory Disturbances in the Inferior Alveolar Nerve after Bilateral Sagittal Split Ramus Osteotomy. *Mol Pain* 9: 1744-8069-9–34, 2013.
 17. Friscia M, Sbordone C, Petrocelli M, Vaira LA, Attanasi F, Cassandro FM et al.: Complications after orthognathic surgery: our experience on 423 cases. *Oral Maxillofac Surg* 21: 171–177, 2017.
 18. Halpern LR, Kaban LB, Dodson TB: Perioperative neurosensory changes associated with treatment of mandibular fractures. *J Oral Maxillofac Surg* 62: 576–81, 2004.
 19. Yadav S, Mittal HC, Malik S, Dhupar V, Sachdeva A: Post-traumatic and postoperative neurosensory deficits of the inferior alveolar nerve in mandibular fracture : a prospective study. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*.42: 259–264, 2016.
 20. Rosén A, Tardast A, Shi T-J: How Far Have We Come in the Field of Nerve Regeneration After Trigeminal Nerve Injury? *Curr oral Heal reports*. 3: 309–313, 2016.
 21. Svensson P, Baad-Hansen L, Pigg M, List T, Eliav E, Ettlin D et al. Special Interest Group of Oro-facial Pain: Guidelines and recommendations for assessment of somatosensory function in oro-facial pain conditions--a taskforce report. *J Oral Rehabil*. 38: 366–94, 2011.
 22. Zimmermann M: Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 429: 23–37, 2001.
 23. Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A: Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. 82: 163–201, 2007.
 24. Lundborg G: A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am*. 25: 391–414, 2000.
 25. Reyes O, Sosa I, Kuffler DP: Promoting neurological recovery following a traumatic peripheral nerve injury. *P R Health Sci J*. 24: 215–23, 2005.
 26. Coulthard P, Kushnerev E, Jm Y, Walsh T, Patel N, Bailey E, Tf R: Interventions for iatrogenic inferior alveolar and lingual nerve injury. *Cochrane Database Syst Rev*. 16, 2014.
 27. Ren K, Dubner R: Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*. 16: 1267–1276, 2010.
 28. Takatori M, Kuroda Y, Hirose M: Local anesthetics suppress nerve growth factor-mediated neurite outgrowth by inhibition of tyrosine kinase activity of TrkA. *Anesth Analg*. 102: 462–7, 2006.

29. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M: Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand.* 50: 265–282, 2006.
30. Miloro M, Repasky M: Low-level laser effect on neurosensory recovery after sagittal ramus osteotomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 89: 12–8, 2000.
31. Leung YY, Fung PP-L, Cheung LK: Treatment modalities of neurosensory deficit after lower third molar surgery: a systematic review. *J Oral Maxillofac Surg.* 70: 768–78, 2012.
32. Ozen T, Orhan K, Gorur I, Ozturk A: Efficacy of low level laser therapy on neurosensory recovery after injury to the inferior alveolar nerve. *Head Face Med.* 2: 3, 2006.
33. Bagheri SC, Meyer RA: Management of Mandibular Nerve Injuries from Dental Implants. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin.* 19: 47–61, 2011.
34. Pindrik J, Belzberg AJ: Peripheral nerve surgery: primer for the imagers. *Neuroimaging Clin N Am* 24: 193–210, 2014.
35. Keefe K, Sheikh I, Smith G: Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci.* 18: 548, 2017.
36. Dadon-Nachum M, Sadan O, Srugo I, Melamed E, Offen D: Differentiated Mesenchymal Stem Cells for Sciatic Nerve Injury. *Stem Cell Rev Reports.* 7: 664–671, 2011.
37. Stoll G, Müller HW: Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.* 9: 313–325, 1999.
38. Karanth S, Yang G, Yeh J, Richardson PM: Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Exp Neurol.* 202: 161–6, 2006.
39. Salonen V, Aho H, Røyttä M, Peltonen J: Quantitation of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. *Acta Neuropathol.* 75: 331–336, 1988.
40. Kato S, Ide C: Axonal sprouting at the node of Ranvier of the peripheral nerve disconnected with the cell body. *Restor Neurol Neurosci.* 6: 181–7, 1994.
41. Fried K, Govrin-Lippmann R, Rosenthal F, Ellisman MH, Devor M: Ultrastructure of afferent axon endings in a neuroma. *J Neurocytol.* 20: 682–701, 1991.
42. Verdu E, Navarro X: Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin and muscle after peripheral nerve injury. *Exp Neurol.* 146: 187–98, 1997.
43. Tandrup T, Woolf CJ, Coggeshall RE: Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J Comp Neurol.* 422:

172–80, 2000.

44. Valero-Cabré A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X, Neiss WF: Peripheral and Spinal Motor Reorganization after Nerve Injury and Repair. *J Neurotrauma*. 21: 95–108, 2004.
45. Lowrie MB, Lavalette D, Charlotte ED: Time Course of Motoneuron Death after Neonatal Sciatic Nerve Crush in the Rat. *Dev Neurosci*. 16: 279–284, 1994.
46. Ygge J: Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. *Brain Res*. 478: 193–5, 1989.
47. Törnqvist E, Aldskogius H: Motoneuron survival is not affected by the proximo-distal level of axotomy but by the possibility of regenerating axons to gain access to the distal nerve stump. *J Neurosci Res*. 39: 159–165, 1994.
48. Groves MJ, An SF, Giometto B, Scaravilli F: Inhibition of sensory neuron apoptosis and prevention of loss by NT-3 administration following axotomy. *Exp Neurol*. 155: 284–94, 1999.
49. Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Schulte E, Stennert E: Quantitative image analysis of the chromatolysis in rat facial and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell Tissue Res*. 286: 537–41, 1996.
50. Martin LJ, Kaiser A, Price AC: Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. *J Neurobiol*. 40: 185–201, 1999.
51. Bowe CM, Evans NH, Vlacha V: Progressive morphological abnormalities observed in rat spinal motor neurons at extended intervals after axonal regeneration. *J Comp Neurol*. 321: 576–90, 1992.
52. Kim H-S, Suh Y-H: Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res*. 196: 168–179, 2009.
53. Tomiyama T, Shoji A, Kataoka K, Suwa Y, Asano S, Kaneko H, Endo N: Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger. *J Biol Chem*. 271: 6839–44, 1996.
54. Acocella G: Clinical pharmacokinetics of rifampicin. *Clin Pharmacokinet*. 3: 108–27.
55. Mindermann T, Landolt H, Zimmerli W, Rajacic Z, Gratzl O: Penetration of rifampicin into the brain tissue and cerebral extracellular space of rats. *J Antimicrob Chemother*. 31: 731–7, 1993.
56. Yulug B, Kilic Ü, Kilic E, Bähr M: Rifampicin attenuates brain damage in focal ischemia. *Brain Res*. 996: 76–80, 2004.
57. Karunakar N, Prabhakar M, Krishna D: Determination of Antioxidant Activity

- of Some Drugs Using High-pressure Liquid Chromatography. *Arzneimittelforschung*. 53: 254–259, 2011.
58. Gollapudi S, Jaidka S, Gupta S: Molecular basis of rifampicin-induced inhibition of anti-CD95-induced apoptosis of peripheral blood T lymphocytes: the role of CD95 ligand and FLIPs. *J Clin Immunol*. 23: 11–22, 2003.
 59. Kilic U, Kilic E, Lingor P, Yulug B, Bähr M: Rifampicin inhibits neurodegeneration in the optic nerve transection model in vivo and after 1-methyl-4-phenylpyridinium intoxication in vitro. *Acta Neuropathol*. 108: 65–8, 2004.
 60. Xu J, Wei C, Xu C, Bennett MC, Zhang G, Li F, Tao E: Rifampicin protects PC12 cells against MPP⁺-induced apoptosis and inhibits the expression of an alpha-Synuclein multimer. *Brain Res*. 1139: 220–5, 2007.
 61. Bi W, Zhu L, Jing X, Liang Y, Tao E: Rifampicin and Parkinson's disease. *Neurol Sci*. 34: 137–141, 2013.
 62. Naftel JP, Richards LP, Pan M, Bernanke JM: Course and composition of the nerves that supply the mandibular teeth of the rat. *Anat Rec*. 256: 433–447, 1999.
 63. Germanà G, Muglia U, Santoro M, Abbate F, Laurà R, Gugliotta MA, Vita G, Ciriaco E: Morphometric analysis of sciatic nerve and its main branches in the rabbit. *Biol Struct Morphog*. 4: 11–5, 1992.
 64. Shamash S, Shamash S, Reichert F, Rotshenker S: The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, interleukin-1beta. *J Neurosci*. 2002;22 3052–60.
 65. Curtis NJ, Owen E, Walker DM, Zoellner H: Comparison of microsuture, interpositional nerve graft, and laser solder weld repair of the rat inferior alveolar nerve. *J Oral Maxillofac Surg*. 69: e246–e255, 2011.
 66. Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E, Miki K, Tachibana T, Noguchi K: Differential regulation of alpha- and beta-CGRP mRNAs within oculomotor, trochlear, abducens, and trigeminal motoneurons in response to axotomy. *Brain Res Mol Brain Res*. 63: 304–15, 1999.
 67. Kreutzberg GW: *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology*. Oxford: Oxford University Press, 1995.
 68. DaSilva AFM, Becerra L, Makris N, Strassman AM, Gonzalez RG, Geatrakis N, Borsook D: Somatotopic activation in the human trigeminal pain pathway. *J Neurosci*. 22: 8183–92, 2002.
 69. Yousry I, Moriggl B, Schmid UD, Naidich TP, Yousry TA: Trigeminal ganglion and its divisions: detailed anatomic MR imaging with contrast-enhanced 3D constructive interference in the steady state sequences. *AJNR Am J Neuroradiol*. 26: 1128–35, 2005.
 70. Ziyal IM, Sekhar LN, Özgen T: The Trigeminal Nerve and Ganglion: An Anatomical, Histological, and Radiological Study Addressing the

Transtrigeminal Approach. *Surg Neurol.* 61: 564-73, 2004

71. Kobashi M, Ichikawa H, Kobashi M, Funahashi M: The origin of sensory nerve fibers that innervate the submandibular salivary gland in the rat. *Brain Res.* 1060: 184–187, 2005.
72. Launay P, Godefroy D, Khabou H, Rostene W, Goazigo AR: Combined 3DISCO clearing method , retrograde tracer and ultramicroscopy to map corneal neurons in a whole adult mouse trigeminal ganglion. *Exp Eye Res.* 319: 136–143, 2015.
73. Chai Y, Chen M, Zhang W, Zhang W: Somatotopic Organization of Trigeminal Ganglion : Three-dimensional Reconstruction of Three Divisions. *J Craniofac Surg.* 25: 1882–1884, 2014.
74. Chudler EH, Anderson LC, Byers MR: Trigeminal ganglion neuronal activity and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity after inferior alveolar nerve crush in the adult rat. *Pain.* 73: 141–149, 1997.
75. Hashimoto K: Microglial activation in schizophrenia and minocycline treatment. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 32: 1758–1759, 2008.
76. Guebre-Xabier M, Shannon EJ, Kazen R, Kebret Z, Frommel D: Early detection of rifampin in human nerve tissue after an oral dose of 600 milligrams. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 1866–1870, 1995.
77. Tomiyama T, Shoji A, Kataoka J, Suwa Y, Asano S, Kaneko H, Endo N: Inhibition of Amyloid β Protein Aggregation and Neurotoxicity by Rifampicin. *J Biol Chem.* 271: 6839–6844, 1996.

9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
03/05/2017	17		Araş. Gör. Nurettin DİKER

“Sistemik Rifampisin Tedavisinin Travmatik İnferior Alveolar Sinir Hasarı Sonrası Rejeneratif Etkilerinin Değerlendirilmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 9 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

10.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nurettin	Soyadı	Diker
Doğum Yeri	Üsküdar	Doğum Tarihi	15.06.1989
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	15721383998
E-mail	dikernurettin7tp@gmail.com	Tel	544 316 7471

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
Yüksek Lisans	Yeditepe Üniversitesi	2013
Lisans	Yeditepe Üniversitesi	2013
Lise	Eskişehir Anadolu Listesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Başkent Üniversitesi	2013 - 2017
2.			
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu

ÜDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
82,5								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	95,2	95,5	76,2
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	Çok iyi
SPSS	Orta
G-Power	Orta

Uluslararası Yayınlar

- 1- Deniz E. Arslan A., Diker N., Olgaç V.; Evaluation of light-emitting diode photobiomodulation on bone healing of rat calvarial defects.

Uluslararası Sözlü Bildiriler

- 1- 2015, 22nd ICOMS international congress, Diker N., Koroglu T., Gulsever S., Yilmaz Akcay E., Oguz Y.; Effects Of Hyaluronic Acid And Alloplastic Bone Graft Combination On Bone Regeneration
- 2- 2015, 22nd ICOMS international congress, Yazicioglu D., Diker N., Helvacioğlu F., Oguz Y. Effects of 660nm and 808 nm low level laser therapy on regeneration of inferior alveolar nerve crush injury.
- 3- 2016, 23rd EACMFS international congress, Diker N., Bayram B.; Feasibility of Carbon Fiber Reinforced Polymer Fixation Plates for Treatment of Atrophic Mandibular Fracture: A Finite Element Analysis
- 4- 2016, 23rd EACMFS international congress, Diker N., Yazicioglu D., Helvacioğlu F., Dagdelen C., Oguz Y.; Evaluation of Low Level Laser Therapy on Bone Healing of Diabetic Rats: A Histomorphometric Study.
- 5- 2017, 23rd ICOMS international congress, Diker N., Hevlacioğlu F., Kilic E.; Systemic rifampicin treatment accelerates inferior alveolar nerve regeneration: an experimental animal study.
- 6- 2017, 23rd ICOMS international congress, Bayram B., Diker N., Akdeniz S., Helvecioğlu F., Tekindal M.A., Erdem R.; Effects of platelet-rich fibrin on sciatic nerve regeneration: a histomorphometric study.

Ulusal Sözlü Bildiriler

- 1- 2014, 8th AÇBİD international congress, Diker N., Bayram B., Soydan S.S., Uckan S.; Current Treatment Procedures for Oral and Maxillofacial Nerve Injuries; And Clinical Significances of Treatments
- 2- 2014, 8th AÇBİD international congress, Deniz E, Arslan A, Diker N., Olgaç V, Kılıç E.; Evaluation of light-emitting diode photobiomodulation on bone healing of rat calvarial defects
- 3- 2014, AÇBİD- BAOMS international joint congress, Diker N., Sarıcan H., Yetişti A.I., Cumbul A., Kilic E; Effects of Graft Augmentation Combined with Erythropoietin on the Regeneration and Vascularization of Calvarial Bone Defect
- 4- 2015, 9th AÇBİD international congress, Diker N., Akdeniz S.S., Bulmuş B., Yılmaz Akçay E., Araz K.; Mixed Radiolucent-Radiopaque Lesions In The Mandibular Posterior Region: A Case Series
- 5- 2016, 10th AÇBİD international congress, Altıparmak N., Diker N., Bayram B., Araz K. Efficacy of Ice Pack Therapy in Impacted Third Molar Surgery: A Randomized Controlled Clinical Trial

- 6- 2017, 11th AÇBİD international congress, Diker N., Altıparmak N., Akdeniz S., Bayram B., Uçkan İ.S., Alveolar Ridge Augmentation with Titanium Mesh Versus Autogenous Onlay Bone Graft: Evaluation of Post-Operative Complications.

Ulusal Poster Bildiler

- 1- 2015, 9th AÇBİD international congress, Diker N., Tuncer N.I., Kaya B., Bayram B., Borman H. Interdisciplinary Treatment of a Bilateral Cleft Lip and Palate: A Case Report
- 2- 2015, 9th AÇBİD international congress, Diker N., Akdeniz S., Deniz K., Yılmaz Akçay E.; Two different treatment procedures for central giant cell granuloma of mandible.
- 3- 2015, 9th AÇBİD international congress, Diker N., Koroglu T., Çınar D, Oguz Y.; Implant borne dental rehabilitation after reconstruction of mandible with free iliac bone graft: a case report.
- 4- 2016, 10th AÇBİD international congress, Fırat B., Diker N.; Immediate Restoration of single implant that placed immediately after tooth extraction: a case series.
- 5- 2016, 10th AÇBİD international congress, Diker N., Ergir P., Çetinşahin C., Ufuk Ateş İ.; Prosthodontic Rehabilitation Of The Edentulous Patient Using All-On-Four Implant Concept: A Case Report
- 6- 2016, 10th AÇBİD international congress, Diker N., Altıparmak N., Bayram B.; Management Of Malunited Bilateral Mandibular Condylar Fractures With BSSO: A Case Report
- 7- 2016, 10th AÇBİD international congress, Diker N., Bayram B., Gökçe B., Kaya B., Şahinoğlu Z. Surgical Treatment of Macroglossia with Key-Hole Design: A Case Report.
- 8- 2017, Oral Diagnoz Ve Radyoloji 7. Uluslararası Kongresi. Aydın Ü., Cubuk S., Diker N., Akçay E.Y.; Nazopalatin Kanal Kisti Ve Ön Kesici Dişlerde Travma Hikayesi: Olgu Bildirimi.

Sertifikalar

Deney hayvanları kullanım sertifikası (Yeditepe Üniversitesi-2012)

Ödüller

2016: AÇBİD 10th international congress of Oral and Maxillofacial Surgery, Trainee exam first place award

2015: AÇBİD 9th international congress of Oral and Maxillofacial Surgery, Trainee exam first place award

2013: 3rd Virtual Dental Congress, Student research presentation first place award

2012: ADA (American Dentistry Association) Annual Session in San Francisco,
Travel Grant from DENTSPLY

2012: Turkish Dental Association, Student research competition, first place

