

8

Dr. Rifat AKDAĞ¹, Dr. Ali DALGIÇ²¹Bursa Şevket Yılmaz Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Bursa; ²Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara

DENEYSSEL SİYATİK SİNİR TRAVMA MODELLERİ

GENEL BAKIŞ

Kullandığımız tedavi yöntemlerinden bir çoğu ampirik bulguların birikmesi ile oluşan tecrübelerden oluşur. Homojen gruplar oluşturamamak, hastalığın görülme sıklığı/dağılımı gibi etmenlerin istatistiksel incelemeleri etkilemesi, randomize – çift kör çalışma yapmakta karşılaşılan etik, ekonomik ve teknik sorunlar klinik çalışmaların uygulanabilirliğini sınırlamaktadır. Sonuçta klinik araştırmalar deneysel hayvan modellerine yönelmektedir. William Russel ve Rex Burch (1959), deneysel hayvan çalışmalarında uyulması önerilen temel ilkeleri “3R” (Replacement, Reduction, Refinement) olarak özetlemişlerdir (1,2).

Etik Unsurlar

Deneysel hayvan çalışmalarında bilimsel değerini yanı sıra etik yönlerinin de göz önünde tutulması gereklidir. Tom Regan 1984 de yayınladığı “The case of animal rights” adlı kitabında filogenetik olarak yüksek hayvanlara karşı ahlaki sorumluluklarımız olduğu belirtmiştir. Diğer yandan, bu deneyler aracılığı ile hem insanlar hem de diğer hayvanların hastalıkları ve bunların tedavileri konusunda önemli bilgiler sağladığı kabul edilmelidir. Ancak “deney” olarak görülse de bu hayvanların bir canlı olduğu unutulmamalı ve aşağıdaki öneriler dikkate alınmalıdır (1)

1. Çalışmanın bilimsel kalitesi ve yöntemin doğruluğu ortaya konmadıkça, etik kurullar hayvan deneylerine izin vermemelidir.

2. Deneyin alternatif bir yöntemle (hücre kültürü, in-vitro ortam vs) yapılması olası ise (daha pahalı bile olsa) yöntemin değiştirilmesi önerilmelidir.
3. Deney sırasında türün kendine özgü davranışları engellenmemelidir.
4. Hayvanların çekeceği ağrı ve sıkıntı gibi durumları engellemek konusunda hassas olmalıdır.

Çoğu deneysel çalışma için sıçanlar uygun hayvanlardır. İnsan fizyolojisine en yakın

sonuçların alındığı hayvanlar maymunlardır (2,4). Deneysel siyatik sinir araştırmaları için kullanılan başlıca deney hayvanları: Kobay (Guinea Pig), Fare (Balb/C ya da Swiss Webster; 20-50 g), Sıçan/rat (Wistar ya da Sprague-Dawley; 250-450 gr), Tavşan (Yeni Zelanda Tavşanı; 2.5-3.5 kg), Köpek (melez köpekler-beagle; 10-12 kg), Koyun, Tavuk, Domuz (York-shire, Alman), Maymun (primat)

Memeli sınıfından olan sıçanlar, insan ile oldukça benzer bir periferik sinir sistemi yapısı göstermektedir. Dolayısıyla deneysel çalışmalar için; sıçan siyatik siniri uygun bir örnektir. Özellikle ağrı ve hasar sonrası rejenerasyon çalışmalarında sinir dağılımının iyi bilinmesi, sinir uzunluklarının ölçülebilir olması avantaj sağlar. Her deney modelinin özelliğine göre fonksiyon kayıplarının değerlendirilmesi kolay ve her laboratuvarda uygulanabilir özellikler taşımaktadır (4). Sıçan modeli, maliyetinin düşük olması, bakımı ve taşınması kolay olması ve cerrahi enfeksiyonlara dayanıklı olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. Allotransplantasyon ve

ksenotransplantasyon çalışmalarında, immünolojik özellikleri tanımlanmış sıçan modelleri güvenilir modeller oluşturmaktadır.

Sıçan Siyatik Sinir Anatomisi

Periferik sinirler içinde en kalın ve uzun sinir olma özelliği nedeniyle N. ischiadicus (Siyatik Sinir) sıçanlar ile ilgili yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Siyatik sinir plexus sacralis'den çıkar (5). İnsanda plexus sacralis, dördüncü lomber spinal sinirin ön dalından da katılan liflerle birlikte beşinci lomberden üçüncü sakrale kadar olan tüm spinal sinirlerin ön dallarını içerir (6). Sıçanda sakral pleksus oluşumu oldukça farklıdır; dördüncü lomber spinal sinirin ön dalının bir bölümü ile beşinci lomber sinirin ön dalı ve altıncı lomber spinal sinirin ön dalının bir bölümünden oluşur. Daha kaudalde kalan spinal sinirlerin ön dalları plexus pudendus'u oluşturur (7). Sakral pleksusu oluşturacak lifler birleşerek truncus lumbosacralis'i oluştururlar ve altıncı lomber spinal sinirin geriye kalan liflerine paralel olarak kaudale doğru uzanırlar. Truncus lumbosacralis'den ayrılan Siyatik sinir, L4, L5 ve L6 spinal segmentlerden lifler içerir. L5, L6 ve S1 siyatik sinirlerinin ön dallarından oluştuğunu bildiren kaynaklar da vardır (7). Pelvis içinde, sakrumun önünde siyatik oluştuktan sonra n. pudendus ve aralarında a.glutea inferior olacak şekilde iskium'un dorsal kenarında yer alan incisura ischiadica'dan gluteal bölgeye geçerek pelvis boşluğunu terk ederler (Şekil 1).

SIÇAN SİYATİK SİNİRİNDE DENEY MODELLERİ

Sıçan siyatik siniri, mikroskopik yapısı ve hasara karşı yanıtı ile insan siyatik siniri ile benzer özelliklere sahiptir (8). Sıçan siyatik sinir modelleri periferik sinirlerin rejenerasyonunu anlamamızda çok önemli bilgiler sağlar. Fakat bazı dezavantajlarından da söz etmek gerekir; kendi kendine hasar verme (autotomy), uzuv kontraksiyonları ve cilt ülserleri.

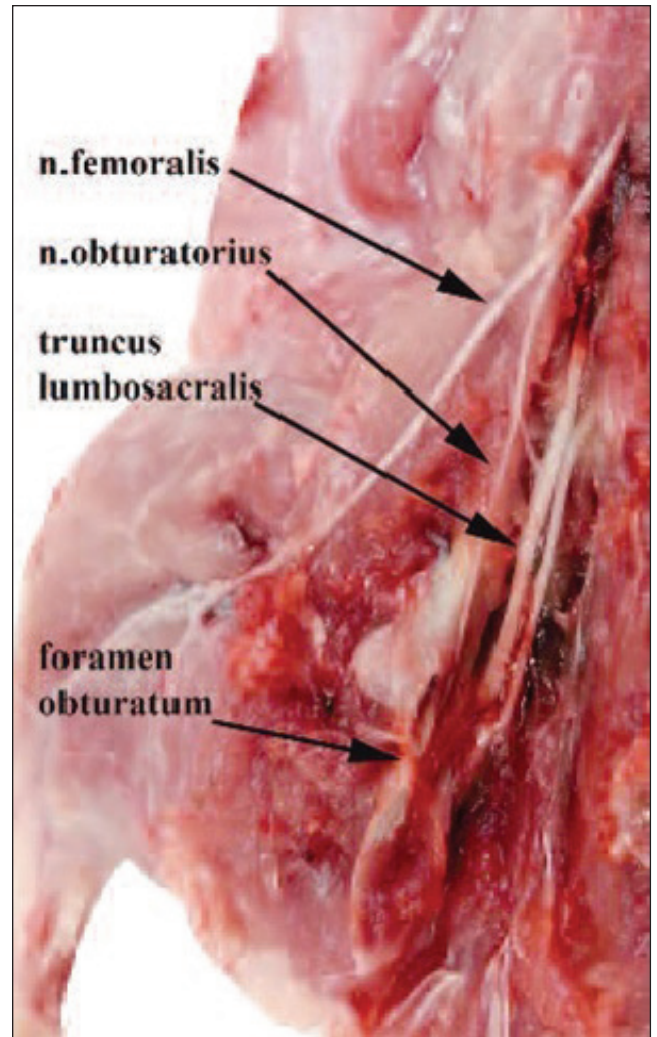
Penetran yaralanma, Ezilme Tipi, traksiyon, iskemi ve daha az olarak ta termal, radyasyon ile vibrasyon gibi etyolojik faktörler periferik sinir hasar yöntemlerinden bazılarıdır. Kompresyon ve deformasyon periferik sinir iskemisine neden olabilir. Bu yüzden hasarlanma bu iki etyolojik faktörün birlikteliğinden kaynaklanabilir. Genel olarak uzun kemik kırıkları ve kesici alet yaralanmaları en yaygın (yaklaşık olarak sinir yaralanmalarının %30'u) periferik sinir travmasıdır (9).

Deneysel rejenerasyonu çalışmalarında, 2 ana sinir lezyonu hedeflenir.

1. Aksonotmesiz: Sinir bütünlüğünde bozulma oluşturmadan, sinir liflerinin iletiminde bozulma yaratılması,
2. Nörotmesiz: Sinirin tam kesisi sonrası sinir onarımı yapılması. Sinir hasarlanmalarında en popüler sınıflandırma, Sunderland'in sinirin lezyonun ağırlığına göre 5 dereceye ayırdığı sınıflamadır (10).

Ezilme Tipi Hasarlanma

Ezilme Tipi hasarlanma, paraestezi, ağrı, total paraliziye kadar kompresyon travmasının süresine ve büyük-



Şekil 1: Karın ön duvarı, karın-pelvis organları, retroperitoneal yapı ve kaslar uzaklaştırıldıktan sonra lumbosakral sinir yapılarının görünüşü. Foramen obturatum'un os pubis'e ait ön bölümü kesilerek uzaklaştırılmıştır.

lüğüne bağlı olarak geniş bir aralıkta semptom verir. Litaretürde deneysel Ezilme Tipi hasarlanma modelinde forceps veya klip kullanılarak yapılır. Hasarlanmada fiziksel travma ve iskemi sonucu oluşan hipoksi önemli nedenlerdendir. Bu lezyonların patofizyolojisi tam olarak bilinmemektedir; bunların iskemiye mi yoksa sinir liflerinin mekanik deformasyonuna mı bağlı olduğu tartışmalıdır.

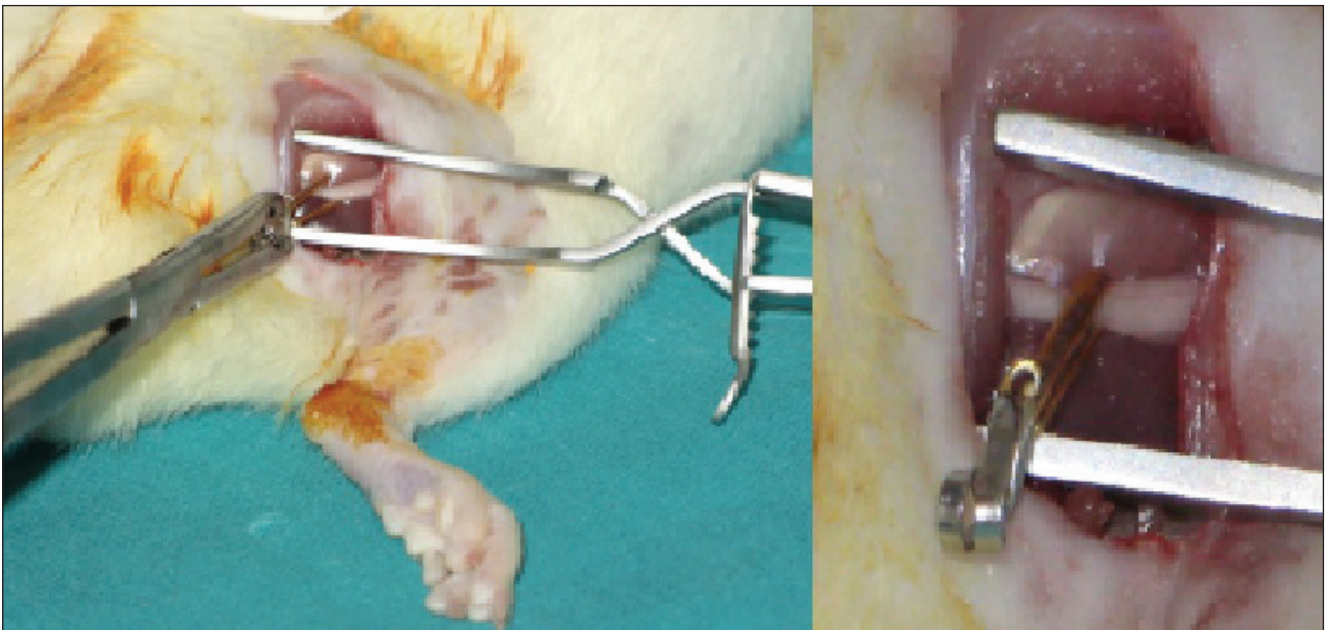
Ezilme Tipi hasarlanmaya bağlı çok sayıda çalışma vardır ve bazı yazarlarda akut yaralanmada hasarlanma süresinin yanı sıra hasarlanma büyüklüğünün sinirin fonksiyonel iyileşme derecesi üzerine etkisini araştırmışlardır (11). Bazı yazarlar bu standart sorunu çözmek için kompresyon aletleri geliştirme girişiminde bulunmuşlardır (12-14). Chen ve ark. sıçanlar için geliştirdiği yeni bir kompresyon aletinde 1 newtonda yalnızca nöropraksia, 5 Newtondan 150 Newtona kadarda aksonotimesiz yaptığını göstermiştir (12). Bridge ve ark. gümüş forceps ve hemostatik klipsler ile 15 ile 60 saniye arasında çeşitli sayılarda hasarlanma yapmışlar ve aksonotimesiz lehine güvenilir veriler almışlardır(13). Sarıkcıoğlu ve ark. aksonotimesiz hasarı için Yaşargil anevrizma klipi ile (50 gr/cm sıkıştırma kuvveti) sinire 5, 10 ve 20 dakikalık kompresyonlar yapmışlar (14); sinir hasarı ve sonraki iyileşme ile arasında güçlü ilişki bulmuşlar ve Yaşargil anevrizma klipini standart deneysel Ezilme Tipi hasarlanması yapmak için iyi bir araç olarak önermişlerdir (Şekil 2).

Cerrahi Teknik

Denekler, bir gece önceden aç bırakılır ve deneye başlamadan tartılır. Cerrahi işlemler genel anestezi altında gerçekleştirilir ve bu amaçla deneklere Xylocaine 10mg/kg ve Ketamin Hidroklorür 50 mg/kg karıştırılarak intraperitoneal olarak verilmesi yeterlidir (15).

Kalçada Siyatik sinirin seyrini ortaya çıkarmak için sıçan pron pozisyonunda yatırılarak diseksiyon edilmelidir. Cilt altında hissedilen os femoris'in hemen altından paralel yapılacak bir cilt kesisi ile başlanır. Uyluk ve kalça bölgesinde derinin kaldırılması ile m. gluteus maximus, m. biceps femoris ve m. tensor fascia lata ortaya çıkar. M. biceps femoris'in künt diseksiyon ile liflerin seyri boyunca os femoris'e paralel olarak ayrılması sonucu Siyatik sinire ulaşmak mümkündür. Siyatik sinir mezoneriumu ile birlikte korunarak çevre dokulardan dikkatli bir şekilde, traksiyonel hasar oluşturmamaya özen göstererek diseksiyon edilir (16).

Künt travma (anevrizma klipi veya pens yardımı ile), sinir kesisi, greft, defekt oluşturmak (10-15 mm) gibi modeller tanımlanmıştır (4). Deney sonuçları genellikle histolojik, elektrofizyolojik ve fonksiyonel ölçütler ile değerlendirilir. Siyatik sinir hasarı oluşturulduktan sonra kesi anatomik olarak kapatılır. Travma uygulamasının ardından çalışmanın içeriği ve amacına göre belli bir süre sonra sıçanlara yeniden anestezi verilerek mevcut kesi yeniden açılır. Hasarlı siyatik



Şekil 2: Siyatik sinirin Yaşargil anevrizma klipi ile kompresyonu.

sinir segmenti ortaya konarak histopatolojik inceleme yapılmak üzere proksimal ve distalini de içine alacak şekilde örnek alınır. Deney sonunda sıçanlar pentobarbital ile sakrifiye edilir.

Mikroskopik İnceleme

Histopatolojik inceleme için; 1 mm'lük parçalara bölünen doku örnekleri 0.1M fosfat tamponlu %2.5'lik gluteraldehitte (pH 7.4) 2 saat tespit edilir. Tespit süresi bitiminde tampon ile 3 kez yıkanan dokular 1 saat %1'lik osmiyum tetraoksit etkin bırakılarak post fiksasyonları yapılır. Süre bitiminde dereceli alkol serilerinden geçirilen dokuların dehidrate olmaları sağlanır. Son olarak propilen oksite etkin bırakılan dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyali ile blok haline getirilmiş durumdadır. 56C'lık etüvde 48 saat polimerize edilen bloklardan yarı-ince kesitler alınarak toluidin blue ile boyanmış ve ışık mikroskopta incelenir. İşaretlenen bölgelerden alınan ince kesitler uranil asetat-kurşun sitrat ile boyanarak elektron mikroskopta (TEM) değerlendirilebilir.

Kesi Hasarlanması

Sinir kesi hasarlanması diğer hasarlanma çeşitlerinden daha şiddetlidir ve bütün sinir bölümlerinde önemli değişikliklere yol açar. Nörotomesizin farklı formları tarif edilmiştir ve bunlar önemli farklı sonuçlar doğurabilirler. Tam ve parsiyel sinir kesilerini takip eden hayvan nöropatik ağrı modelleri rapor edilmiştir. Bennet ve ark, Seltzer ve ark, Kim and Chung tarafından geliştirilen parsiyel sinir kesisi modelleri bir çok araştırmacı tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (17-19). Total siyatik sinir kesisi modelinde siyatik trifurkasyonu belirlenir ve trifurkasyonun proksimalinden 3-0 veya 5-0 ipe sıkıca bağlanır. Ligatürün distalinden sinir tamamen kesilir. Cilt altı ve cilt dikilerek operasyon tamamlanır (20). Siyatik sinir total kesisi sonrasında sinirin proksimal güdüğünde nöroma gelişir. Kesinin distalinde Wallerian dejenerasyon oluşur. Sinir hasarı onarımı kısmen gerçekleşene kadar (3-4 hafta) devam eden motor güçsüzlük nedeniyle allodini ve hiperaljezi bulgularını değerlendirmek güçtür (21).

İskemik Hasarlanma

Periferik sinir sistemi oldukça gelişmiş kollaterallere sahip vasküler sistem tarafından beslenir. Periferik sinirler bu gelişmiş anastomoz sisteminden dolayı iskemiyeye dirençlidir. Bu yüzden deneysel çalışmalarda erken dönem iske mi girişimleri genellikle başarısızdır. İske mi modellerinde Mitsui ve ark. abdominal aorta,

sağ iliak ve femoral arter ve tüm görülebilen kollateral damarları bağlayarak sağ siyatik sinirin kanlanmasını 3 saat boyunca keserek iskemik yaralanma yapmıştır (22). Saray ve ark. yalnızca femoral arter ve veni inguinal ligamentin tam distalinden 3 saat bağlayarak hem sinir iskemisi hemde reperfüzyon hasarlanmasını araştırmıştır (23).

Sinir Onarım Teknikleri

Sinir onarımında yüz güldürücü sonuçların elde edilmesi yakın zamanda cerrahi tekniklerin gelişmesiyle ivme kazansa da, klinik sonuçlar halen istenilen düzeyde değildir. Çeşitli klinik ve deneysel araştırmalar göstermiştir ki, başarılı bir fonksiyonel iyileşme için hedef organ reinnervasyonunun sağlanması en önemli noktadır. Sinirin total kesisini takiben primer gerilimsiz uç-uca onarım en tercih edilen yöntemdir. Ancak kesik sinir uçları arasında aralık arzu edilenden fazlaysa, primer ucuca nörorafi sinir uçlarının retraksiyonu olacağından dolayı tercih edilmez. Böyle durumlarda, sinir otogrefti ile onarım altın standarttır. Ancak donör saha morbiditesi sebebiyle ancak sınırlı boyutlarda otogreft elde edilebilmektedir (24).

Sinir kesisi ve sinir dokusu kaybıyla giden sinir kesilerinde iyileşmeyi hızlandırmak için çeşitli deneysel çalışmalar literatürde tanımlanmıştır. Bu çalışmalar genel anlamda sinir allogrefti, sinir kondüitleri, çeşitli farmakolojik ve nörotrofik ajanlarla ya da hücre transplantasyonu ile desteklenmiş sinir iyileşmesidir. Literatürde sinir iyileşmesindeki bir diğer tartışmalı konu ise sinir onarımının tipidir. Örneğin; Ucuca, uç-yan, ters uç-yan sinir onarımları arası kıyaslamalar güncelliğini korumaktadır (25).

KAYNAKLAR

1. Van Zupthen LFM, Baumans V, Beynen AC (ed), çeviri editörü: Tayfun İde: Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri. Medipres, Ankara, 2003
2. Oğur R, Tekbaş ÖF (ed): Laboratuvar Hayvanları El Kitabı. Hipokrat Medikal Yayın Dağıtım. Ankara, 2001.
3. Roach HI, Shearer JR, Archer C: The choice of an experimental model. A guide for research workers. J Bone Joint Surg Br 71(4): 549-53, 1989.
4. Bayramçılı M (ed): Deneysel Mikrocerrahi. Argos, İstanbul, 2005.
5. Gelderd JB, Chopin SF. The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. Anat Rec 188(1):45-47, 1977.

6. Bennet GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produce disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107, 1988.
7. Mundy AR. True pelvis, pelvic floor and perineum. In: Standring S, eds. *Gray's Anatomy*. 39th ed. London:Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p.1456-8.
8. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg* 75:384-8, 1985.
9. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve* 23:863-73, 2000.
10. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 74: 491-516, 1951.
11. Rydevik B, Lundborg G. Permeability of intraneural microvessels and perineurium follo-wing acute, graded experimental nerve compression. *Scand J Plast Reconstr Surg* 11: 179-87, 1977.
12. Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. The influence of magnitude and duration of Ezilme Tipi load on functional recovery of the peripheral nerve. *J Reconstr Microsurg* 9: 299-306, 1993.
13. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, et al. Nerve Crush injuries: A model for axonotmesis. *Exp Neurol* 127: 284-90, 1994.
14. Sarikcioglu L, Ozkan O. Yasargil-Phynox aneurysm clip: a simple and reliable device for making a peripheral nerve injury. *Int J Neurosci* 2003;113(4):455-64.
15. Zhang YL, Zhang PB, Qiu SD, Liu Y, Tian YF, Wang Y Effects of ketamine-midazolam anesthesia on the expression of NMDA and AMPA receptor subunit in the peri-infarction of rat brain. *Chin Med J (Engl)* 119: 1555-62, 2006.
16. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy and embryology of the laboratory rat .Wörthsee BioMed Verlag; 1986.p.128-32.
17. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-63, 1992.
18. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205-18, 1990.
19. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107, 1988.
20. Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-11, 1979.
21. Colleoni M, Sacerdote P. Murine models of human neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta*1802: 924-33, 2010.
22. Mitsui Y, Schmelzer JD, Zollman PJ, Kihara M, Low PA. Hypothermic neuroprotection of peripheral nerve of rats from ischaemia-reperfusion injury. *Brain*122:161-9, 1999.
23. Saray A, Can B, Akbiyik F, Askar I. Ischaemia-reperfusion injury of the peripheral nerve: An experimental study. *Microsurgery*19: 374-80, 1999.
24. Höke A, Brushart T. Introduction to special issue: Challenges and opportunities for in the peripheral nervous system. *Exp Neurol* 2010;223(1):1-4.
25. Weber RV, Mackinnon SE. Bridging the neural gap. *Clin Plast Surg* 2005;32(4):605-16