

Lazer Mikrodiseksiyon Tekniği İle Yaralanan Periferik Duyusal Nöronlar Üzerinde Nörotrofin-3 ve Nörotrofin-4/5'in Rejeneratif Etkilerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Regenerative Effects of Neurotrophin-3 and Neurotrophin-4/5 on Peripheral Sensory Neurons Injured with Laser Microdissection Technique

Ramazan Üstün^{1,2}, Elif Kaval Oğuz²

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Van

² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sinirbilim Araştırma Birimi, Van

Yazışma Adresi / Correspondence:

Ramazan Üstün

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Zeve Kampüsü, VAN

T: +90 507 930 92 99 E-mail: ramazanustun@yyu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 04.12.2018 Kabul Tarihi / Accepted : 29.01.2019

Öz

Amaç Nörotrofin ailesinin önemli üyelerinden Nörotrofin-3 (NT3) ve Nörotrofin-4/5'in (NT4/5), mikroskop kontrollü lazer mikrodiseksiyon tekniğiyle, aksyon kesisi (aksotomi) oluşturulmuş dorsal kök gangliyon (DRG) nöronlarının hayatta kalma yeteneğini etkileyip etkilemediğini araştırmak. (*Sakarya Tıp Dergisi* 2019, 9(1):84-91)

Gereç ve Yöntem Balb/C ırkı yetişkin farelerden anestezi altında ve aseptik koşullarda DRG çıkartıldı, DRG'lerden de nöron kültürü hazırlandı. Hücre ekiminden 48 saat sonra kültürler, NT3 (50 ng/ml), NT4/5 (50 ng/ml) ve NT3+NT4/5 kombinasyonu ile muamele edildi. Nöritler gövdeden 200 µm uzaklıkta lazer ışını ile aksotomi edildi. Nöronların ölü-canlı ayrımı için propidium iyodür (PI) alım testi uygulandı. Nöronlar zaman aralıklı floresan mikroskopik görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

Bulgular PI, ölü hücrelerin çekirdeğini floresan mikroskobu altında parlak kırmızı gösterdi. Tüm deney grupları, kontrol grubuna göre 24.ve 48. saatlerde hasarlı nöronların hayatta kalma oranlarında önemli artış gerçekleştirdi (p<0,001). En fazla hayatta kalma oranı NT3+NT4 grubunda, sonra sırasıyla NT3, NT4 ve kontrol gruplarında görüldü (p<0,001). Hayatta kalma oranları 48. saatte 24. saate göre azalma gösterse de bu azalma istatistiksel olarak önemsizdi.

Sonuç NT3+NT4/5 kombinasyonu, NT3 (50 ng/ml) ve NT4/5 (50 ng/ml), in vitro aksotomi hasarı modelinde yaralı DRG nöronlarının hayatta kalma oranlarını artırmaktadır. Sunulan veriler, nörotrofik faktörlerin periferik sinirlerin mekanik yaralanmalarında terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler Dorsal kök gangliyon; duyuşal nöron; aksotomi; Nörotrofin-3; Nörotrofin-4/5

Abstract

Objective To investigate whether of Neurotrophin-3 (NT3) and Neurotrophin-4/5 (NT4/5), important members of the neurotrophin family, affect the survival ability of dorsal root ganglion (DRG) neurons that had axonal injury induced by axotomy with a microscope-controlled laser microdissection technique. (*Sakarya Med J* 2019, 9(1):84-91)

Materials and Methods DRGs were harvested from Balb/C adult mice under anesthesia and aseptic conditions. DRG neuron culture was prepared. After culturing the DRG neurons for forty-eight hours, the cultures were treated with NT3 (50 ng/ml), NT4 / 5 (50 ng/ml) and NT3+NT4/5 combination. Neurites were axotomized at 200 µm distance from the perikaryon with the microscope-controlled laser beam. A propidium iodide (PI) uptake test was performed to determine the dead-alive distinction of neurons. Neurons were visualized with a time-lapse fluorescent microscopic imaging system.

Results PI shows the dead cells' nucleus as bright red under the fluorescence microscope. All experimental groups showed a significant increase in axotomized-neurons' survival rates at 24th and 48th hours compared to control group (p<0,001). It was determined that the highest survival rate was in NT3 + NT4 group, then NT3, NT4 and control groups respectively (p<0,001). Although the survival rates decreased at the 48th hour, compared to that at 24th hour, this decrease was statistically insignificant though.

Conclusion Combination of NT3+NT4/5, NT3 (50 ng/ml) and NT4/5 (50 ng/ml) increased the survival rate of DRG neurons in vitro axotomy injury model. The data presented suggested that neurotrophic factors appears to have therapeutic potential in the mechanical injury of peripheral nerves.

Key words Dorsal root ganglion; sensory neuron; axotomy; Neurotrophin-3; Neurotrophin-4/5

GİRİŞ

Periferik sinir sisteminde kümelenen nöron toplulukları gangliyon olarak adlandırılır. Gangliyonlar, etrafları sıkı bağ dokusuyla sarılı nöron ve glia hücrelerinden oluşan yuvarlak yapılardır.¹ Duyu ve otonom gangliyon olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Duyu gangliyonu grubunda yer alan dorsal kök gangliyonlar (DRGs) komşu iki ver-tabra arkı arasında yerleşiktir. Bu gangliyonlarda yer alan nöronların temel görevi farklı duyu reseptörlerince üretilen sinyalleri merkezi sinir sistemine iletmektir.²

Periferik sinir yaralanmaları sıklıkla zayıflatıcı motor ve duysal bozukluklara neden olur. Cerrahi teknik ve re-konstrüktif seçeneklerde önemli gelişmelere rağmen, so-nuçlar genellikle zayıftır. Günümüzde periferik sinir hasa-rının tedavisi ne yazık ki yoktur.³

Nörotrofik faktörler, nöronal gelişim, nöronların hayatta kalması, proliferasyon, farklılaşma, myelinizasyon, akso-nal büyüme ve sinaptik plastisite gibi pek çok süreçte gö-rev alırlar. Nörotrofik faktörlerin rejenerasyona da katkıda buldukları bilinmektedir.^{4,5} Nörotrofin ailesinin en iyi bilinen üyeleri; sinir büyüme faktörü (NGF), beyin köken-li büyüme faktörü (BDNF), nörotrofin-3 (NT3) ve nöro-trofin-4/5 (NT4/5)'tir. Bunlara ilaveten sitokin ailesi olarak bilinen lösemi inhibe edici faktör (LIF), sillier nörotro-fik faktör (CNTF), glial hücre kökenli faktör (GDNF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) de primer duyu nöron-larının gelişimine ve yaşamlarının devamına katkıda bulu-nan diğer moleküllerdir.⁶

Genellikle iskelet kasında sentezlenen nörotrofin ailesinin bir üyesi olan NT3'ün aynı zamanda motor nöronların ge-lişimine de katkısı olduğu da bilinmektedir. NT3'ün veya onun reseptörü olan Tropomyosin receptor kinase C'nin (TrkC) ekspresyonunda meydana gelen kusurlar şiddetli duyu hasarlarına neden olurlar. NT3 geni olmayan fareler-de ileri derecede hareket kusurları meydana gelirken; bu hayvanların duyu ve sempatik nöronlarında önemli mik-tarda kayıpların olduğu gözlenir.⁷ NT3'ün aynı zamanda

embriyonik DRG nöronlarının canlılığının korunmasın-da da teşvik edici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.⁸ NT4 memeli nörotrofini iki grup tarafından klonlandığından dolayı NT-4 veya NT-5 olarak adlandırılmış, ancak daha yaygın NT 4/5 olarak anılmaktadır.⁹

Bu çalışmada; fare DRG nöron kültürlerinde, mikroskop kontrollü lazer mikrodiseksiyon tekniği kullanılarak, aksonal uzantıları hassas lazer ışını ile kesilen nöronların hayatta kalma kabiliyetini, NT3 ve NT4/5'in etkileyip et-kilemediğinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deney hayvanları

Çalışmada, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvan-ları Araştırma Ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan 6-8 haftalık Balb-C ırkı fareler kullanıldı. Deney hayvanlarının bakımı, beslenmesi ve kullanımına ilişkin tüm prosedür-ler, Avrupa Birliği Konseyinin Hayvan Deneyleri Direktifi 86/609/ECC uyarınca, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Ku-rulu tarafından onaylandı. Fareler intaperitoneal ketamin uygulamasıyla (40mg/kg) anestezi edildi, servikal transek-siyonla öldürüldü. DRG'ler aseptik koşullarda, stereo mikroskop altında çıkarıldı. Gangliyonlar, hücre kültürü yapı-lıncaya kadar soğuk RPMI 1640 vasatında bekletildi.^{10,11}

Hücre kültürünün hazırlanması

Enzimatik parçalamaya kolajenaz ile başlandı, HBSS ile yıkandı, tripsin ile enzimatik ayrıştırma gerçekleştirildi. Mekanik ayrıştırma gangliyonların tiriturasyonuyla ya-pıldı. Medyuma DNaz eklendi, 50 Hz frekansta ajitasyon işlemleri yapıldı. Santrifüj ile ayrılan hücreler çöktürüldü, pellet NBA, FCS ve tripsin inhibitörü ile muamele edildi, percoll gradienti ile nöronlar diğer hücrelerden ve doku kalıntılarından ayrıldı. Elde edilen nöronlar, NBA içinde 600 µl süspansiyon olarak bir gün öncesinde Poly-L-Lysi-ne ve laminin ile kaplanan petri kaplarına ekildi. hücreler tabana tutunduktan sonra medyum NBA ile 1,5 ml hacme tamamlandı, nöron kültürleri %5 CO2 ayarlı 37 0C sıcaklık, %100 nem sağlanan etüvde, 48 saat inkübasyona bira-

kıldı.^{10,11}

Nöronlarda canlılıkların doğrulanması

Hücre Kültürü medyumuna propidyum iyodür (7.5 µM) eklendi. Propidyum iyodür alım testi ile çekirdeği boyanmış, floresan mikroskopta parlak kırmızı renk veren hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı kabul edildi (şekil 1).

Aksotomi (akson kesisi) modelinin oluşturulması

Aksotomi için canlı nöronlar seçildi. Ayrıca canlı nöronların membranlarının deforme olmamasına, kabarcık, vakuol veya boncuklu nevitler gibi stres belirtileri göstermemesine özen gösterildi (Şekil 2a). Aksotomi için nöritlerin boyunun en az 200 µm, en kalın, en uzun nöritler olmalarına dikkat edildi (Şekil 2a). Aranılan özellikler zaman aralıklı mikroskop sisteminde (Cell Observer-Zeiss) seçildi (Şekil 2a). Aksotomi işlemi, ultraviyole (UV) lazer ünite ataçmanlı, özel invert mikroskop sistemi ile gerçekleştirildi (Şekil 2b). Bu sistem PALM Microlaser Teknolojisi ve LPMC sisteminden oluşmaktadır, sistemde lazer üretici ünite, motorize invert mikroskop (Axiovert 200M) ve kontrolleri sağlayan özel yazılımlı (RoboLPC) bilgisayar bulunmaktadır. Mikroskopta bulunan lazer ünitesi 337

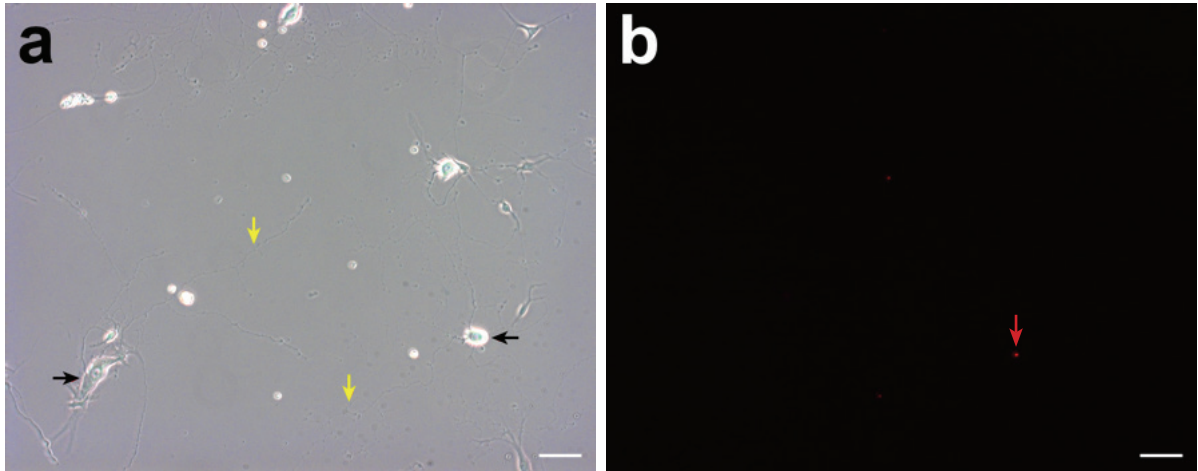
nm dalga boyunda, her biri 3 ns süren ve yaklaşık olarak 300 µJ enerji salan darbeler üretmektedir. Lazer mikrodiseksiyon sistemiyle aksotomi yapmak için 63X kuru faz kontrast objektif (Achromplan N.A. 0.75, Zeiss Almanya), lazer ışını, mikroskobu ve mikroskoba bağlı olan CCD kamerası kontrol eden bilgisayar sistemi kullanıldı.^{11,12} (Şekil 2b)

Aksotomi yapılan nöronlara tedavi amaçlı nörotrofinlerin uygulanması

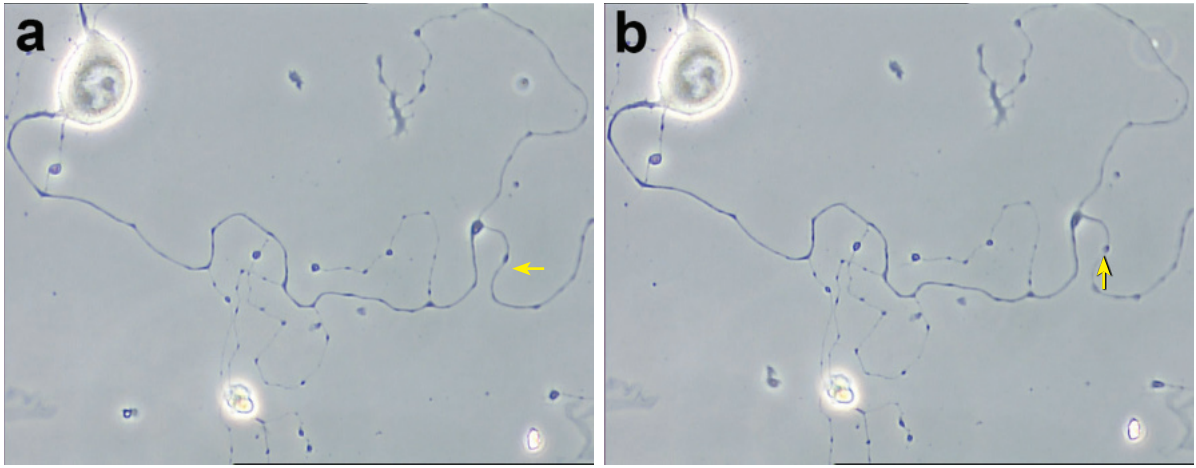
Yaralı nöronları tedavi etmek için deney gruplarına sırasıyla; NT3 (50 ng/ml), NT4/5 (50 ng/ml) ve NT3 (50 ng/ml)+NT4/5 (50 ng/ml) kombinasyonu eklendi, kontrol grubuna hiç birşey eklenmedi. Seçilen nöronların aksonları gövdeden 200 µm uzaklıktan kesildi (Şekil 2b).

Hücre takip ve görüntüleme

Aksotomi sonrası kültürler, canlı hücre (Cell Observer-Zeiss) görüntüleme (zaman aralıklı mikroskopi) sistemine transfer edildi. Görüntüleme 20X büyütme objektifle yapıldı. Sistem motorize bir invert mikroskop (Axiovert 200M) ile tüm fonksiyonların kontrol edilip programlanabildiği bilgisayar ve yazılımından oluşmaktadır. Mik-



Şekil 1. Aksotomi öncesinde nöronların ölü-canlı olduklarının tespiti. (a) Hücrelerin faz-kontrast mikroskop görüntüsü. Siyah oklar canlı DRG nöronlarını gösteriyor, sarı oklar nöron gövdesinden 200 µm uzaklıkta nörit mesafesini gösteriyor. (b) Kırmızı floresan mikroskobik görüntü. Kırmızı floresan görüntü a resminde siyah okla gösterilen nöronların ölü olmadıklarını doğruluyor. Kırmızı ok, ölü satelit hücrelerini gösteriyor. Skala bar: 50 µm



Şekil 2. Lazer mikrodiseksiyon sisteminde DRG nöronunun 63X büyütme objektifde görüntüsü. (a) aksotomi öncesi görüntü, sarı ok aksotomi yapılacak alanı gösteriyor. (b) aksotomi sonrası görüntü, sarı ok aksotomi yapılan alanı gösteriyor.

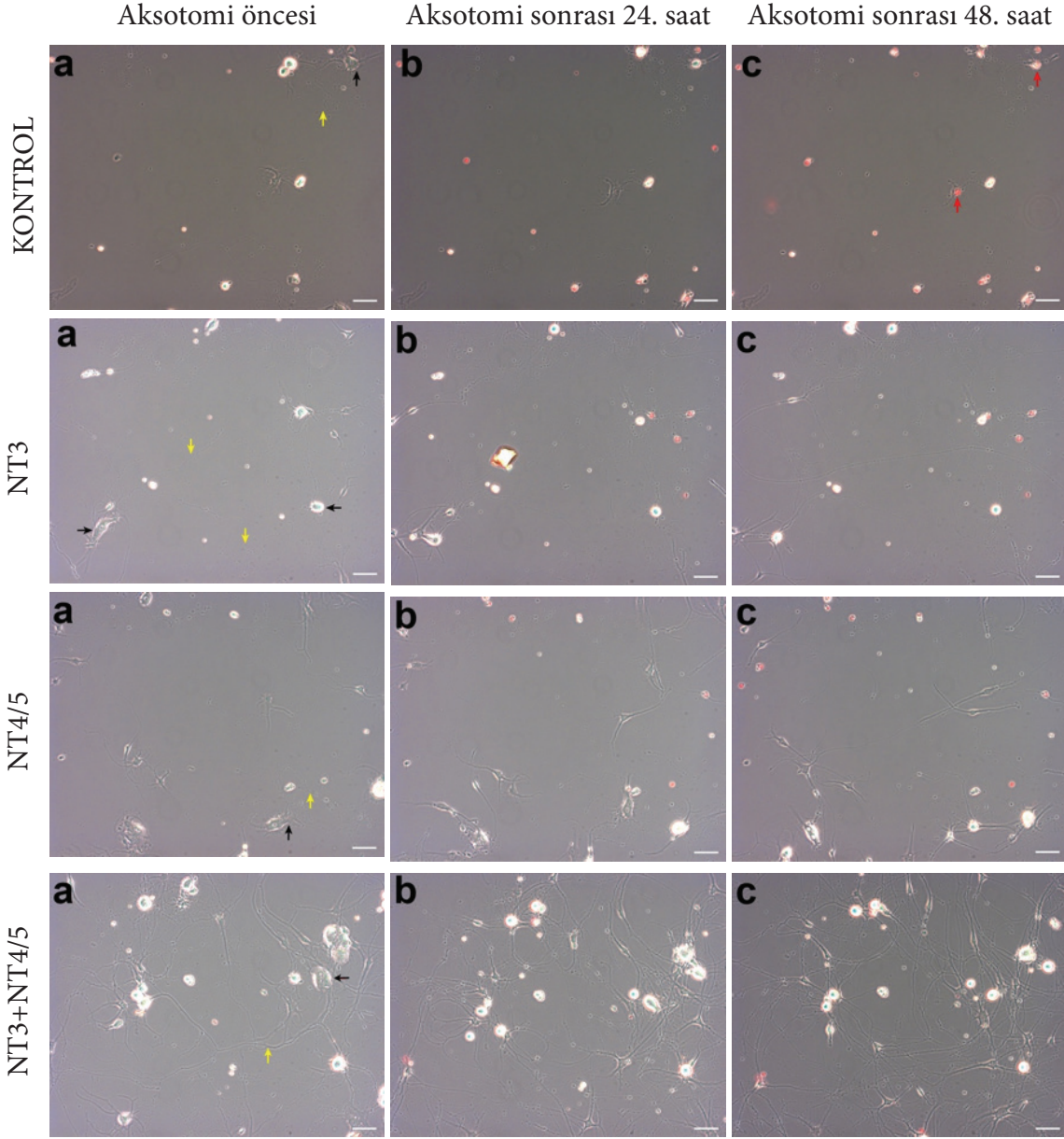
roskop üzerinde bulunan dijital kamerayla görüntüler bilgisayar ortamına aktarılabilir. Tabla üzerinde bulunan ve preparatın yerleştirildiği inkübasyon kutusu destek üniteler sayesinde hücreler için fizyolojik koşullar sağlanmaktadır (37 °C, %5 CO₂, nem). Sistemde kullanılan bilgisayar programı (Axiovision 3.1) mikroskobun tüm fonksiyonlarının bilgisayar ortamında düzenlenebilmesine olanak sağlamaktadır. Görüntülenen pozisyonlar özel bir formatla (zvi) depolanır ve bu görüntüler birleştirilerek film haline getirilebilir (24). Çalışmada görüntülemeler sırasıyla aksotomi öncesi (Şekil 3a), aksotomiden 24 saat (Şekil 3b) ve 48 saat (Şekil 3c) sonra gerçekleştirildi. Aksotomi uygulanmış hasarlı nöronların hayatta kalma oranları % olarak hesaplandı.¹³ (Şekil.4)

İstatistiksel Analiz

İstatistik hesaplamalar ve analizler için SPSS MINITAB paket programı kullanılmıştır. Görüntü analizleri 24. ve 48. saatlerde gerçekleştirildi. Gruplar arası farkın belirlenmesi amacıyla oran karşılaştırılması Z testi ile yapıldı. Çalışmada elde edilen sonuçlar tanımlayıcı istatistik olarak ortalama±standart sapma kullanılarak özetlendi ve istatistiksel anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak alındı.

BULGULAR

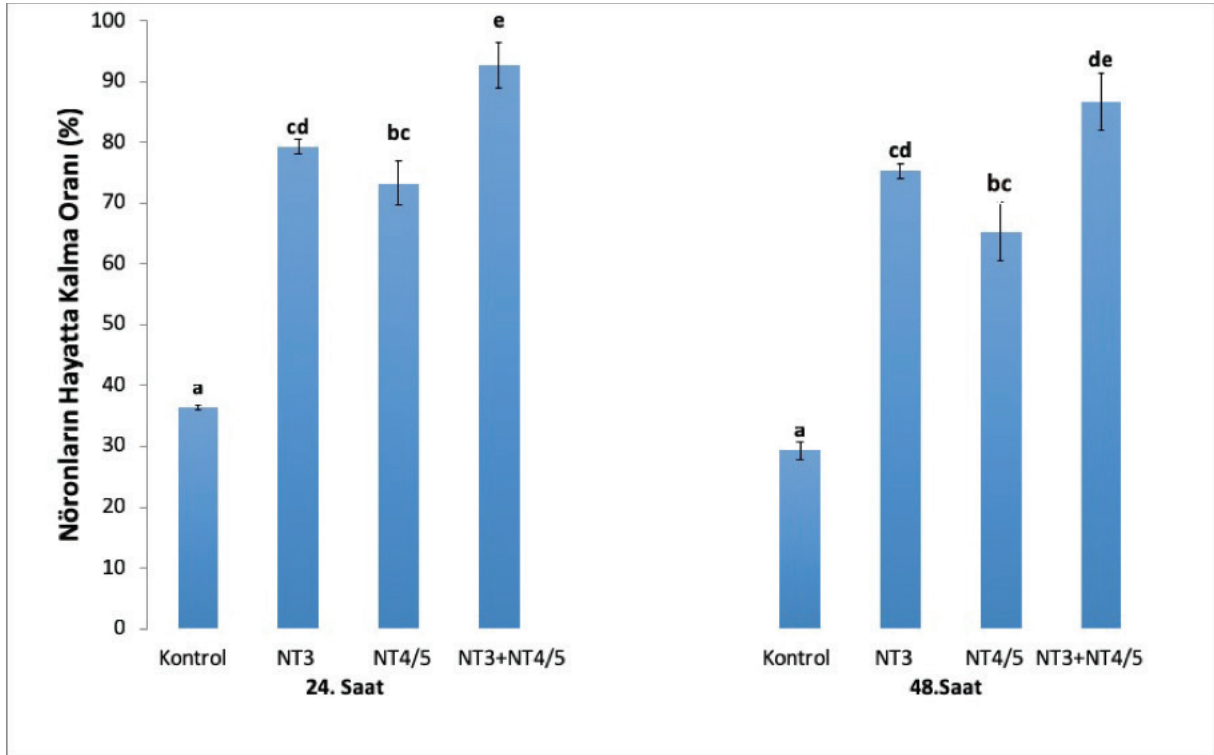
Aksonal yaralanma modeli oluşturmak için seçilen DRG nöronlarının, aksotomi öncesinde (inkübasyondan 48 saat sonra) canlı oldukları ve nöritlerini uzattıkları doğrulandı (Şekil 1). DRG nöronlarının aksonal yaralanma modeli, lazer mikro diseksiyon tekniğiyle başarıyla oluşturuldu (Şekil 2). Kontrol (aksotomi), NT3 (50 ng/mL), NT4/5 (50 ng/mL) ve NT3+NT4/5 gruplarında hücrelerde ölüm-canlılık oranları, zamana (aksotomi ve tedavi uygulamasının 24. ve 48. saatlerinde) bağlı olarak incelendi (Şekil 3). Yaralı nöronların hayatta kalma oranları tedaviden 24 saat sonra; Kontrol grubunda %36.73 (18/49), NT3 deney grubunda %80.39 (41/51), NT4/5 deney grubunda %74.00 (37/50), NT3+NT4/5 deney grubunda %94.44 (51/54) belirlendi. Tedaviden 48 saat sonra; Kontrol grubunda %28.57 (14/49), NT3 deney grubunda %76.47 (39/51), NT4/5 deney grubunda %64.00 (32/50), NT3+NT4/5 kombinasyonu deney grubunda %88.88 (48/54) saptandı (Şekil 4). Hem 24. saatte hem de 48. saatte deney grupları (NT3, NT4/5, NT3+NT4/5) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nöronların hayatta kalma oranlarında istatistiksel olarak önemli artış sağlandı (p<0,001) (Şekil 4). Deney grupları arasında yapılan karşılaştırmada NT3+NT4/5 kombinasyon grubunun, NT4/5 grubundan olan farkı hem 24.saatte (Z = 2,94; P = 0,003) hem de 48.saatte önemliydi. (Z =



Şekil 3: Yaralı nöronların tedaviye verdikleri yanıtlar. (a) Aksotomi öncesi faz-kontrast+kırmızı floresan (birleştirilmiş) görüntüler. (b) Aksotomi sonrası 24. saat birleştirilmiş görüntüler. (c) Aksotomi sonrası 48. saat birleştirilmiş görüntüler. Siyah oklar canlı nöronları, sarı oklar aksotomi yapılacak noktaları, kırmızı oklar ölen nöronları gösteriyor. Skala bar: 50 µm.

-3,10 ; $P = 0,002$). Yine NT3+NT4/5 kombinasyon grubunun, NT3 grubundan olan farkı 24.saatte önemliydi ($Z = 2,20$ $P = 0,027$), fakat 48.saatdeki farkı önemli değildi ($Z = 1,70$ $P = 0,090$). NT3 ile NT4/5 grupları arasında her iki

zaman diliminde de istatistiksel fark yoktu. Hayatta kalma oranları 48. Saatte, 24. saate göre azalma gösterse de bu azalma istatistiksel olarak önemsizdi.



Şekil 4. Aksotomi hasarlı nöronların hayatta kalma oranları. Aksonal yaralanmadan ve tedavi uygulamasından 24 saat ve 48 saat sonra hasarlı nöronların hayatta kalma oranları. Farklı harfler istatistiksel farklılığı göstermektedir ($P < 0.05$).

TARTIŞMA

Hücre Kültürü; Araştırılan konuya ilişkin daha sınırlı bilgi ve veri sunsa da hücre kültüründen alınan sonuçlar diğer fizyolojik değişkenlerden uzak olduğundan *in vivo* çalışmalara kıyasla daha optimize edilmiştir. Bu avantajı dolayısıyla hücre kültürü çalışmaları *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarına geçişte ilk basamak olarak kabul görmüştür.^{14,15}

Günümüzde etkin olarak uygulanan çok çeşitli sinir hasar modelleri mevcuttur. Bunlardan en yaygın kullanılanları siyatik sinir, optik sinir, omurilik kesileri ve kortikal yaralama gibi *in vivo* hasar modelleridir.^{16,17} *In vivo* modeller her ne kadar nöronal hasara karşı cevapları açıklamaya yardımcı olsa da yeterli değildir. Halbuki sinir hasarlarına karşı moleküler ve hücresel tepkilerin ve mekanizmaların aydınlatılmasında *in vitro* metodlar daha etkin kullanılmaktadır. Kültür ortamlarında uygulanabilen birçok *in vitro* hasar modeli bulunmaktadır; bunlardan bazıları

mikro bıçaklar, makaslar, bistüriler, cam kapillerler gibi malzemelerle mekanik hasar oluşturma modelleridir.¹⁸ Bu çalışmada uygulanan mikrolazer ışını ile aksotomi hasar modeli; daha kolay, etkin, kontrol edilebilir ve kesin bir uygulama olmakla birlikte yeni ve özgün bir tekniktir. Sistemik olarak nörit kesiminde ilk kez Higgins ve arkadaşları tarafından kullanılan bu yöntem de UV lazer ile hedeflenen nöritlerin kesimi *in vitro* ortamda yapılmıştır.^{12,13} Bu çalışmada rutin olarak kullanılan bir yöntem olan laser mikrodiseksiyon mikroskobu ile hassas ve etkin bir şekilde aksotomi gerçekleştirilmiştir.¹¹

Sinir sisteminin işlevini sağlıklı yürütebilmesi için merkezi ve periferik sinir sistemindeki nöronal bağlantıların özgün ve doğru bir şekilde kurulması gerekir. Sinir sisteminin bu görevlerini yerine getirmesinde etkili olan nörotrofik faktörler nöronların yaşam süresine, büyümesine, morfolojik değişikliklerine, nöronlar arası sinyal iletimine ve

hayatta kalmasına etki ederler.¹⁹ Nörotrofik faktör ailesinin üyeleri olan NT3 ve NT4/5'in merkezi ve periferik sinir sistemi nöronlarının canlılıklarını sürdürmelerine ve rejenerasyonlarına katkıda bulunduğu bilinmektedir.²⁰ NT3'ün kültürü yapılan dorsal kök gangliyon hücrelerinin %60'ından fazlasında canlılığın korunmasını teşvik ettiği ve trigeminal mezensefalik nukleustaki proprioseptif nöronlar gibi normalde NGF'e duyarız olan duyu nöronlarından bazılarını kurtardıkları saptanmıştır.^{21,22} Her ne kadar NT3'ün proprioseptif duyu nöronlarını seçici olarak kurtardığı bilirse de aynı zamanda yenidoğan farenin aksotomi hasarlı motor nöronlarının canlılığının devamında da destekleyici etkisinin olduğu bildirilmiştir.²³ NT4/5'in ise dopaminerjik nöronların korunmasında aktif rol oynadığı gösterilmiştir.²⁴ Ayrıca, NT4/5'in oksidatif stresin oluşturduğu hasarı azalttığı ve bu etkiye karşı korunmada aktif rol oynadığı, trkB reseptörüne bağlandığı, spinal motor nöronların ve farklı populasyonlarda yer alan duyu nöronlarının hayatiyetini de arttırdığı bildirilmiştir.²⁵

Bu çalışmada aksotomi hasarına maruz kalan yaralı DRG nöronlarının hayatta kalmalarına, NT3 ve NT4/5'in katkıda buldukları ilk kez ortaya konmuştur. Nörotrofik faktörlerin etkileri, kendi aralarında karşılaştırıldığında NT3'ün koruyucu etkisi 24. ve 48. Saatlerde NT4/5'e göre daha yüksek eğilim gösterse de aralarında istatistiksel bir fark bulunamadı. Bununla birlikte NT3+NT4/5 kombinasyonunun 24. Saatte koruyucu etkisi, NT3 ve NT4/5'in bireysel tedavilerine göre önemli oranda yüksekti, 48. saatte ise NT4/5'e göre yüksekti. NT3'ün bireysel etkisini büyük bir afiniteyle Tirozin kinaz C reseptörü üzerinden gerçekleştirdiği, daha az afiniteyle Tirozin kinaz A ve Tirozin kinaz B reseptörleri üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir.²⁶ Buna mukabil NT4/5'in etkisini Tirozin kinaz B reseptörü üzerinden gerçekleştirdiği rapor edilmiştir.²⁷ NT3+NT4/5 kombinasyonunun daha yüksek nöronal sağ kalım sağlaması, bu yeteneğin iki farklı yolak üzerinden sağlanmış olabileceğini işaret etmektedir. Trk reseptörlerine bu nörotrofinlerin bağlanması, otfosforilasyona ve aşağı akım sinyal kaskadlarının aktivasyonuna yol açar. Bu

yolaklar da nöronal sağkalımda, aksonal büyümede ve sinaptik plastisitede önemli rollere sahiptir.²⁶

SONUÇ

Deney ve kontrol gruplarındaki yaralı DRG nöronları, hayatta kalma oranları bakımından aksotomi sonrası 24. ve 48. saatlerde karşılaştırıldı. Deney (NT3, NT4/5 ve NT3+NT4/5 kombinasyon) gruplarının hayatta kalma oranları, kontrol grubundan hem 24. hem de 48. saatlerde daha yüksekti. Deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldı, NT3+NT4/5 kombinasyon grubunun hayatta kalma oranı NT4/5 grubundan hem 24. hem de 48. saatlerde daha yüksekti. NT3+NT4/5 kombinasyon grubunun hayatta kalma oranı NT3 grubundan sadece 24. saatte daha yüksekti. NT3'ün koruyucu etkisi NT4/5'e göre daha yüksek eğilim gösterse de aralarında istatistiksel bir fark yoktu. NT3 ve NT4/5 nörotrofik faktörlerinin aksotomi sonrasında yaralı nöronların hayatta kalmasını önemli oranda arttırdıkları, bu nörotrofik faktörlerin kombinasyon tedavisinin sinerji oluşturdukları ilk kez bu çalışmada ortaya konuldu. Sunulan veriler, nörotrofik faktörlerin periferik sinirlerin mekanik yaralanmalarında terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir, daha ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum S, Hudspeth AJ. *Principles of neural science*. 5th ed. New York, NY ; London: McGraw-Hill; 2013. I, 1709 p. p.
- de Luca AC, Faroni A, Reid AJ. Dorsal Root Ganglia Neurons and Differentiated Adipose-derived Stem Cells: An In Vitro Co-culture Model to Study Peripheral Nerve Regeneration. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;96.10.3791/52543.
- Tuffaha SH, Budihardjo JD, Sarhane KA, Khusheim M, Song D, Broyles JM, et al. Growth Hormone Therapy Accelerates Axonal Regeneration, Promotes Motor Reinnervation, and Reduces Muscle Atrophy following Peripheral Nerve Injury. *Plast Reconstr Surg*. 2016;137(6):1771-80.
- Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus*. 2009;26(2):E3.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(8):603-14.
- Xiao N, Le QT. Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. *Arch Immunol Ther Ex*. 2016;64(2):89-99.
- Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*. 1994;77(4):503-12.
- Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol*. 1993;123(2):455-65.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. Neurotrophin-5 - a Novel Neurotrophic Factor That Activates Trk and Trkb. *Neuron*. 1991;7(5):857-66.
- Üstün R, Oğuz EK. Degenerative effect of Ankaferd Blood Stopper® on mice peripheral sensory neurons <I>in vitro</I>. *Folia Neuropathologica*. 2018;56(1):67-74.
- Ustun R, Oğuz EK, Seker A, Korkaya H. Thymoquinone protects DRG neurons from axotomy-induced cell death. *Neurol Res*. 2018:1-8.
- Cengiz N, Ozturk G, Erdogan E, Him A, Oğuz EK. Consequences of neurite transection in vitro. *J Neurotrauma*. 2012;29(15):2465-74.
- Ozturk G, Cengiz N, Erdogan E, Him A, Oğuz EK, Yenidunya E, et al. Two distinct types of dying back axonal degeneration in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013;39(4):362-76.
- Helmrich A, Barnes D. Animal cell culture equipment and techniques. *Methods Cell Biol*. 1998;57:3-17.
- Merten OW. Introduction to animal cell culture technology-past, present and future. *Cyto-technology*. 2006;50(1-3):1-7.
- Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *Journal of Neuroscience Methods*. 2015;243:39-46.
- Tzekov R, Quezada A, Gautier M, Biggins D, Frances C, Mouzon B, et al. Repetitive mild traumatic brain injury causes optic nerve and retinal damage in a mouse model. *J Neuro-Pathol Exp Neurol*. 2014;73(4):345-61.
- Geuna S, Raimondo S, Fregnan F, Haastert-Talini K, Grothe C. In vitro models for peripheral nerve regeneration. *Eur J Neurosci*. 2016;43(3):287-96.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677-736.
- Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Tsumekawa H. Immunohistochemical detection of neurotrophin-3 and-4, and their receptors in mouse taste bud cells. *Arch Histol Cytol*. 2005;68(5):393-403.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, et al. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*. 1990;247(4949 Pt 1):1446-51.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*. 1990;344(6264):339-41.
- Li L, Oppenheim RW, Lei M, Houenou LJ. Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. *J Neurobiol*. 1994;25(7):759-66.
- Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright P, Ip NY, Lindsay RM. Overlapping and Distinct Actions of the Neurotrophins Bdnf, Nt-3, and Nt-4/5 on Cultured Dopaminergic and GABAergic Neurons of the Ventral Mesencephalon. *Journal of Neuroscience*. 1994;14(1):335-47.
- Lingor P, Unsicker K, Krieglstein K. GDNF and NT-4 protect midbrain dopaminergic neurons from toxic damage by iron and nitric oxide. *Exp Neurol*. 2000;163(1):55-62.
- Keefe KM, Sheikh IS, Smith GM. 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*. 2017, 18(3), 548.
- Malin SA, Davis BM. Postnatal Roles of GDNF Family Members in Nociceptors Plasticity. *Sheng Li Xue Bao*. 2008; 60(5):571-8.