



## Trombositten zengin Fibrinin periferik sinir iyileşmesi üzerindeki histopatolojik etkileri

Hasan Metineren<sup>1</sup>, Turan Cihan Dülgeroğlu<sup>2</sup>, Mehmet Hüseyin Metineren<sup>3</sup>

1 Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji AD, Kütahya, Türkiye ORCID: 0000-0002-5671-6273

2 Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji AD, Kütahya, Türkiye ORCID: 0000-0002-9661-5418

3 Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD, Kütahya, Türkiye ORCID: 0000-0002-4305-045X

Geliş: 21.02.2017 Revizyon: 19.07.2017 Kabul Tarihi: 31.07.2017

### Özet

**Amaç:** Sinir iyileşmesini hızlandırmak ve kalitesini artırmak için çeşitli materyallerle deneysel çalışmalar yapılmıştır. Çalışmamızın amacı trombositten zengin fibrinin (TZF) siyatik sinir iyileşmesi üzerindeki histopatolojik etkilerini deneysel rat modelinde araştırmaktır.

**Yöntemler:** 16 Sprague Dawley rat randomize iki guruba (8 kontrol, 8 TZF) ayrıldı. Tüm ratların siyatik sinirleri kesilip 2mm defektlilik olarak tekrar onarıldı. TZF gurubunda defektif bölgeye TZF sarıldı. 6 haftanın sonunda ratlar sakrifiye edilerek histolojik ve immüno-histokimyasal metotlarla TZF nin kontrol gurubuna göre sinir onarımına katkısı araştırıldı.

**Sonuç:** TZF gurubunun histolojik skorları, kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu(P=0.001). TZF sinirlerde aksonal devamlılık mevcuttu. Kontrol grubunda defektin tamamen iyileşmediği yada fibröz/granülasyon dokuyla iyileştiği gözlemlendi. Bol miktarda hücreli içerik ve büyüme faktörü ihtiva eden TZF sinir iyileşmesine olumlu katkı sağlamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Trombositten zengin fibrin, sinir iyileşmesi, deneysel rat modeli, histopatoloji

DOI: 10.5798/dicletip.338997

**Yazışma Adresi / Correspondence:** Hasan Metineren, Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Evliya Çelebi Eğitim Araştırma Hastanesi İstiklal Cad. Okmeydanı Cd. 43040 Kütahya, Türkiye e-mail: [drhmetin19@gmail.com](mailto:drhmetin19@gmail.com)

## Histopathological effects of Platelet rich fibrin on peripheral nerve healing

### Abstract

Objectives: Experimental studies have been carried out with various materials in order to accelerate and improve the quality of nerve healing. Purpose of our study to investigate the histopathological effects of platelet rich fibrin (PRF) on sciatic nerve healing in an experimental rat model.

Methods: 16 Sprague Dawley rats were randomly divided into the two groups (8 controls, 8 PRF). The sciatic nerves of all rats were transected and repaired with a 2 mm defect. In the PRF group, the defective zone was surrounded with PRF. Both group rats were sacrificed and histopathologically examined at the end of 6 weeks.

Result: PRF group histological scores were statistically significant (P = 0.001) compared to the control group. Axonal continuity was present in the PRF group nerves. In the control group, improvement of the defect with granulation texture was observed.

Conclusion: PRF, which contains abundant amounts of cellular content and growth factors, provides a positive contribution to nerve healing.

**Keywords:** platelet rich fibrin, neural healing, experimental rat model, histopathology

## GİRİŞ

Periferik sinir yaralanması sonrası iyileşmenin süresi ve kalitesi çok önemlidir. Uzun süren iyileşmeler eklem sertlikleri ve kas atrofileri gibi istenmeyen durumlarla sonuçlanabilir. Yeterli iyileşme olmaması ise ekstremitelerde fonksiyon kaybına neden olabilmektedir<sup>1</sup>. Periferik sinir iyileşmesinin hızlı ve kaliteli olması için günümüzde birçok biyomateryal kullanılmaktadır. Çoğunlukla yüksek maliyetli bu materyallerin alerjik reaksiyon, enfeksiyon gibi komplikasyonları da olmaktadır. Trombositten zengin biyomateryaller; trombositten zengin plazma (TZP) ve trombositten zengin fibrin (TZF) büyüme faktörü, hücresel içerik ve sitokinlerden zengin yapısı sayesinde birçok dokunun iyileşmesine olumlu etkisi gösterilmiştir. Trombositten zengin fibrin taze tam kanın santrifüj edilmesiyle elde edilen fibrin ağdır ve ilk defa Choukroun tarafından tanımlanan ikinci kuşak bir trombosit konsantrasyonudur<sup>2</sup>. TZF'nin içerdiği büyüme faktörlerinden bazıları; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü- b1 (TGF-b1), epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I ve II) ve damar endoteli

büyüme faktörüdür (VEGF). Özellikle travma sonrası trombosit granüllerinden salınan bu büyüme faktörleri hücre çoğalması, farklılaşması, kemotaksis, yeni damar oluşumu ve yara iyileşmesini teşvik etmektedir<sup>3</sup>. TZF trombositten zengin plazmadan farklı olarak herhangi bir antikoagülan ilave edilmeden çabuk ve ucuz bir şekilde elde edilmektedir<sup>4</sup>. TZF'nin çeşitli dokularda etkileri deneysel olarak gösterilmiştir<sup>5</sup>. Ancak halen literatürde sınırlı bilgi mevcuttur.

Çalışmamızda amacımız TZF'nin periferik sinir iyileşmesi üzerine etkisinin deneysel rat modelinde histopatolojik olarak incelemektir.

## YÖNTEMLER

Çalışmada Sprague Dawley cinsi 250-300 gram ağırlığında 20 adet erkek rat kullanılmıştır. Çalışma için üniversite "Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu" onayı alınmıştır (No: 04.01.2014-Tarih: 09/01/2014). 4 rat TZF elde etmek için kullanıldı. Geri kalan 16 rat ise randomize TZF ve kontrol gurupları olmak üzere 2 guruba ayrıldı.

### Trombositten Zengin Fibrin'in elde edilmesi

4 adet rattan anestezi altında (intraperitoneal ketamin 50 mg/kg) (KETALAR 50 mg, Pfizer/ ABD) ve ksilazin hidroklorid 10 mg/kg (Rompun 100mg, Bayer/ Almanya)) intrakardiyak kan (rat başına ortalama 3-5ml) alındı. Elde edilen kan standart kuru cam tüplerde 2700 dev/dk da 12 dakika satrifüj edilerek TZF elde edildi. TZF rezidüel kandan ayrıştırıldı ve 2x5 mm'lik 8 eşit parçaya bölündü ve dış ortamdan izole edildi ve taze olarak kullanıldı (Resim 1).

### Cerrahi yöntem

Ratlara intraperitoneal genel anestezi ve analjezi (intraperitoneal ketamin 50 mg/kg ve ksilazin hidroklorid 10 mg/kg) verildikten sonra tüm ratların sağ alt ekstremiteleri traş edildi ve klorheksidin glukonat ile antisepsi uygulandı. Cilt insizyonu sonrası gluteal kaslar aralanıp siyatik sinir bulundu ve diseke edildikten sonra ortasından düzgün bir biçimde kesildi. Tüm ratların siyatik sinirleri 2mm gap bırakılarak 8/0 polipropilen suturele tamir edildi (Resim 2). TZF gurubunda tamir hattı çevresine TZF sarıldı ve kesi kapatıldı. Ratlar Dumlupınar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde 4'er li guruplar halinde polikarbon kafeslerde; 12 saat gün ışığı, 12 saat karanlık sıklısta ve 20-22 °C sıcaklıktaki odalarda, rat peleti ve su ile beslenerek 6 hafta boyunca barındırıldı. 6haftanın sonunda her iki guruptaki ratlar intraperitoneal yüksek doz ketamin ile sakrifiye edilerek siyatik sinirler çıkarıldı. %10'luk formaldehid solüsyonu içinde 24 saat fikse edildi. Fikse edilen spesmenler normal salin solüsyonu ile yıkandıktan sonra seri etanol banyoları ile dehidrate edildi. Ksilan banyosu sonrası parafin içine gömülen spesmenlerden 4 mikrometrelik (4µm) kesitler alınarak boyandı.

### İmmüno-histokimyasal inceleme

Siyatik sinir spesmenleri dehydrate edilip paraffin içine gömüldü. Hematoksilen & eosin,

S100 (DAKO Z0311 ABD), nöronal büyüme faktörü (NGF DAKO, M 3507 ABD) ve Kollajen(DAKO, M 0785 ABD) antikoları ile immune boyama yapıldı. Kromojen (AEC, Vector lab. ABD). Guruplar hakkında bilgisi olmayan bir patolog (M.H.M.) tarafından tamir bölgeleri esas alınarak ışık mikroskopi (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) incelemesi ve histolojik skorlama yapıldı (Tablo 1)<sup>6</sup>.

**Tablo 1.** Semikantitatif Histolojik değerlendirme tablosu

Sinirin Rejenerasyon Derecesi ve Kriterler		Puanlama
Tamir bölgesinin her iki tarafındaki aksonal devamlılık	Devamlılık zayıf, organize olmayan aksonal proliferasyon	1
	Orta	2
	İyileşme bölgesinde tam devamlılık	3
<b>Fibroblast veya kollajen mevcudiyeti</b>	Yoğun	1
	Orta	2
	Normal	3
<b>Myelin Kılıf</b>	Yok ya da zayıf	1
	Vakuoller ve zayıf	2
	Sirküler ve homojen	3
<b>Enflamatuvar hücre sayısı</b>	≥10	1
	1-9	2
	Yok	3
<b>Kapiller yapı</b>	≥6	1
	3-6	2
	1-3	3
<b>Toplam</b>		<b>15</b>

### İstatistiksel Değerlendirme

Değişkenlerin analizinde SPSS 22.0(IBM Corp. NY ABD) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi, varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Kontrol ve TZF guruplarının nicel verilere göre karşılaştırılmasında Independent-Samples T testi Bootstrap sonuçlarıyla birlikte kullanıldı. Nicel değişkenler tablolarda ortalama ± std. (standart sapma) ve Range (Maksimum-Minimum) kategorik değişkenler ise n(%) olarak gösterildi. Değişkenler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup p değeri 0,05 ten küçük anlamlı kabul edildi.

**Tablo 2.** TZF ve Kontrol gruplarının skorlarının değerlendirilmesi

Gruplar	Sinir Rejenerasyon Skoru			P değeri
	Ortalama $\pm$ SD.	Minimum	Maximum	
Kontrol	6,38 $\pm$ 1,51	5	9	
TZF	12,50 $\pm$ 1,60	10	15	<b>0,001</b>
Toplam	9,44 $\pm$ 3,50	5	15	

SD:standartdeviasyon

## BULGULAR

TZF grubunun sinir rejenerasyon skorları ortalaması (12,5 $\pm$ 1,6), kontrol grubunun ortalamasından (6,38 $\pm$ 1,51) daha yüksek olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P=0,001) (Tablo 2, Resim 3,4). Kontrol grubu kesitlerinde makrofaj, nötrofil ve lökositlerden oluşan çok sayıda enflamatuar hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Aksonal dejenerasyon ve tamir gapinin fibrozis ve granülasyon dokusu ile iyileştiği bazı spesmenlerde ise defektif olarak kaldığı görüldü. Kesitlerin çoğunda aksonal devamlılık yoktu (Resim 5).

TZF grubunda tamir bölgesinde aksonal liflerde düzenlilik ve devamlılık belirgindi (Resim 6). Yabancı cisim granulomu dışında enflamatuar hücre gözlenmezken her iki grupta miyelin kılıf iyileşmesinde anlamlı histopatolojik fark yoktu.



**Resim 1.** Trombositten zengin fibrin

## TARTIŞMA

Tendon, sinir gibi yapılarda tamir sonrası en büyük sorunlardan birisi gap oluşmasıdır. Oluşan gap tendonda tekrar kopmaya sinirde ise fibrozis ile iyileşme sonrası ileti bozukluğuna neden olmaktadır<sup>7</sup>. Sinir iletimindeki yetersizlik ekstremitelerde fonksiyon kaybının başlıca nedenlerindedir. Bu nedenle günümüzde periferik sinir tamiri sonrası iyileşmeye yardımcı materyaller sıkça kullanılmaktadır<sup>8</sup>. Literatürde TZP'nin sinir rejenerasyonu üzerine etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma vardır<sup>9,10</sup>. Bu çalışmada 2. nesil trombosit zengin materyal olan TZF'nin siyatik sinir iyileşme modelindeki etkilerini histolojik ve immuno-histokimyasal olarak araştırdık. Çalışmamız TZF'nin periferik sinir iyileşmesinde hızlandırıcı ve tamamlayıcı etkiyi histopatolojik olarak göstermektedir. Şenses ve ark. TZF ile yaptıkları siyatik sinir modelinde elektrofizyolojik, fonksiyonel ve histopatolojik değerlendirme yapmışlar ve TZF ile anlamlı sonuç elde edememişlerdir<sup>11</sup>. TZF ile TZP nin karşılaştırıldığı bir çalışmada 10 mm kadar olan defektlerde her iki materyalin de sinir iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir<sup>12</sup>. TZP fibrin membran ile yapılan bir rat siyatik sinir çalışmasında 6 haftanın sonunda elektrofizyolojik olarak anlamlı iyileşme bulunurken histolojik olarak aksonal rejenerasyonun arttığı ve adeta sinir iyileşmede yol gösterici özellikte olduğu

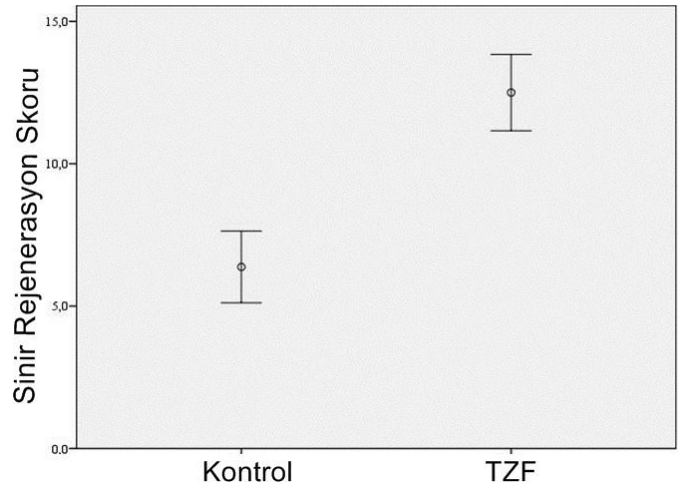


**Resim 2.** Cerrahi prosedür ve TZF uygulanması

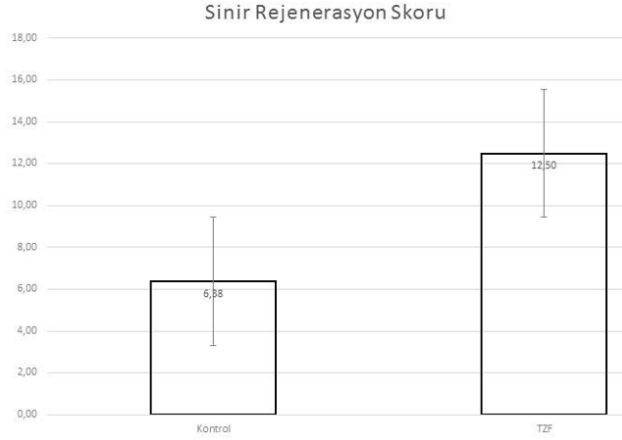
belirtilmiştir<sup>13</sup>. Gerek çalışma süresi gerekse elde edilen histolojik sonuçlar bakımından çalışmamız literatürle uyumlu bulunmuştur. TZF canlıda en az morbidite ve immünolojik yanıt oluşturan ve aynı zamanda düşük maliyetle kök hücrenin nakledilebildiği biyomateryeldir<sup>14,15</sup>. TZF içerisinde bulunan İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) reseptörleri, periferik sinir aksonlarında, sinir sonlanmalarında, motor sinirlerin Schwann hücre gövdelerinde bulunur. IGF-1 sinirin uzamasını tetiklemekte ayrıca motor, duysal ve sempatik sinirlerde apoptozisi önlemektedir<sup>16,17</sup>. Yine TZF içinde bulunan Dönüştürücü büyüme faktörü 2-3 (TGF-2-3) Schwann hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında kilit rol oynamaktadır<sup>18</sup>. Sinir içi damarsal yapılar her ne kadar iyileşme esnasında istenmese de fibrin matriks içerisindeki VEGF damarlanmayı tetiklemektedir<sup>19,20</sup>. Dohan ve ark. TZF'nin beraber kütüre edildiği doku hücrelerini üretme eğilimi gösterdiğini bulmuşlardır<sup>21</sup>. Bu da TZF'nin farklı dokulardaki iyileştirme başarısını izah etmede yardımcıdır.

Çalışmamız TZF'nin histopatolojik etkilerini gözlemek amacıyla dizayn edilmiştir. Elektrofizyolojik ve fonksiyonel çalışma

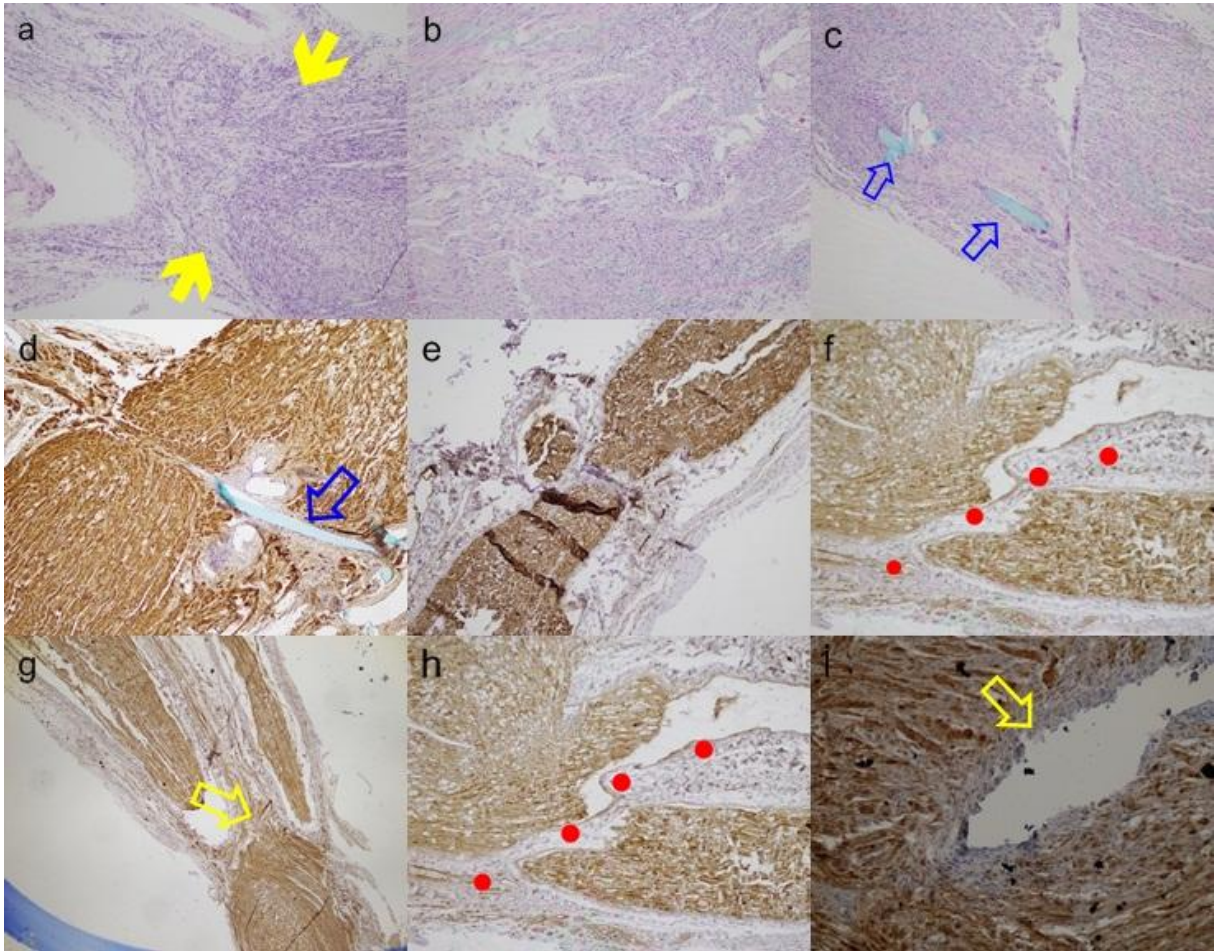
yapılmamış olması eleştirilebilir. TZF'nin etkilerini gözlemek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuç olarak TZF içeriğindeki hücresel komponentler, sitokinler ve büyüme faktörleriyle sinir doku iyileşmesine olumlu katkı sağlamaktadır.



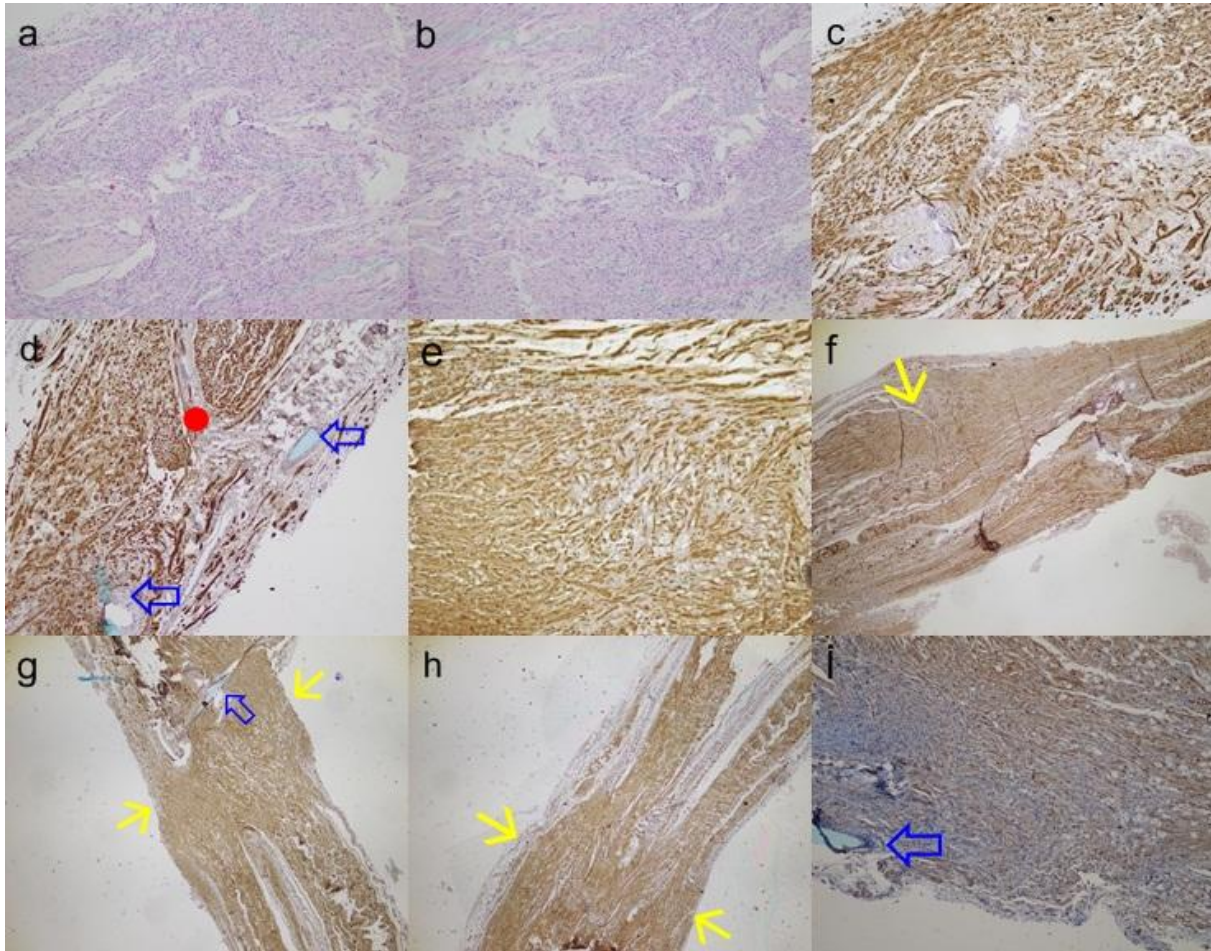
**Resim 3.** Her iki grubun skorlarının karşılaştırılması



**Resim 4.** Sinir rejenerasyon skorları



**Resim 5.** Kontrol grubu histopatolojik değerlendirme. a: Tamir bölgesi düzensiz aksonal devamlılık sarı ok, H&E X40, b: H&E X40, c: kısmen iyileşmiş tamir bölgesi ve yabancı cisim granülomu mor oklar (sütür materyali) H&E X100, d: S100 X40 kısmen iyileşmiş tamir bölgesi ve yabancı cisim granülomu, e: S100 X40, f: Fibrozis/granülasyonla iyileşmiş tamir bölgesi kırmızı noktalar NGF X100 g: X40, h: Fibrozis/granülasyonla iyileşmiş tamir bölgesi kırmızı noktalar NGF X100, i: İyileşmemiş Gap Kollajen X200



**Resim 6.** Tzf grubu histopatolojik değerlendirme.a ve b: İyileşmiş tamir bölgesi kısmen düzenli aksonal devamlılık H&E X40, c:S100X100, d:Kısmen devamlı aksonlar, fibrozis/granülom (kırmızı nokta), yabancı cisim granülomu (mor oklar)S100 X40, e:S100 X200. Tamamen iyileşmiş sinir tamir hattı; (sarı oklar), f,g,h: NGF X40, i: X100 Kollajen

**Çıkar Çatışması Beyanı:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma her hangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

**Declaration of Conflicting Interests:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** No financial support was received.

#### KAYNAKLAR

1. Noble J, Munro CA, Prasad VS, et al. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. J Trauma 1998; 45:116–22.
2. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet. s.l.: concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101:299-303.
3. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G. Growth factor levels in platelet rich plasma and correlation with donor age, sex and platelet count. J Craniomaxillofac Surg 2002; 30:97–102.
4. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates from pure

- platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology* 2009; 27:158-67.
5. Sean M. O'Connell, Theresa Impeduglia, Karen Hessler, et al. Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. *Wound Repair and Regeneration* 2008;16:749-56.
  6. Klopffleisch R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology—a systematic review. *BMC Vet Res* 2013; 9:123.
  7. Giddins GE, Wade PJ, Amis AA. Primary nerve repair: strength of repair with different gauges of nylon suture material. *J Hand Surg Br.* 1989; 14:301-2.
  8. Panagopoulos GN, Megaloikonomos PD, Mavrogenis AF. The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration. *Orthopedics.* 2016; 25:1-16.
  9. Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C. Effect of platelet-rich plasma on peripheral nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 2008;24:159–67.
  10. Piskin A, Kaplan S, Aktas A, et al. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: An electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. *Microsurgery* 2009; 29:144–53.
  11. Şenses F, Önder ME, Koçyiğit ID, et al. Effect of Platelet-Rich Fibrin on Peripheral Nerve Regeneration. *J Craniofac Surg.* 2016;27: 1759-64.
  12. Lichtenfels M, Colomé L, Sebben AD, et al. Effect of Platelet Rich Plasma and Platelet Rich Fibrin on sciatic nerve regeneration in a rat model. *Microsurgery* 2013; 33: 383-90.
  13. Giannessi E, Coli A, Stornelli MR, et al. An autologously generated platelet-rich plasma suturable membrane may enhance peripheral nerve regeneration after neurotmesis in an acute injury model of sciatic nerve neurotmesis. *J Reconstr Microsurg.* 2014; 30: 617-26.
  14. Uysal AC, Mizuno H. Tendon regeneration and repair with adipose derived stem cells. *Current stem cell research & therapy* 2010; 5:161-7.
  15. Ehrenfest D, David M. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors* 2009; 27:63-9.
  16. Apel PJ, Ma J, Callahan M, et al. Effect of locally delivered IGF-1 on nerve regeneration during aging: an experimental study in rats. *Muscle Nerve* 2010; 41:335-41.
  17. Koriyama Y, Homma K, Sugitani K, et al. Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration. *Neurochem Int* 2007; 50:749-56.
  18. Haas SL, Fitzner B, Jaster R, et al. Transforming growth factor-beta induces nerve growth factor expression in pancreatic stellate cells by activation of the ALK-5 pathway. *Growth Factors* 2009; 27:289-99.
  19. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effect on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 2006; 101:299-303.
  20. Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue—beyond blood vessels. *Exp Neurol* 2004; 187:246-53.
  21. Dohan D M, Diss A, Odin G, et al. In vitro effects of Choukroun's PRF on human gingival fibroblasts, dermal pre-keratinocytes, preadipocytes and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 2009; 108:341-52.