



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI
BAŞKANLIĞI

ADİPÖZ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN,
PERİFERİK SİNİR REJENERASYONUNA ETKİSİNİN
SAPTANMASI

DR. PERÇİN CAŞKAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR – 2011



T.C

DICLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİMDALI

**ADİPÖZ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN,
PERİFERİK SİNİR REJENERASYONUNA ETKİSİNİN
SAPTANMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR.PERÇİN CAŞKAN

DANIŞMAN

DOÇ.DR. MEHMET BOZKURT

Bu çalışma, “Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Komisyonu” tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 10-TF-101)
“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

DİYARBAKIR 2011

ÖNSÖZ

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki eğitimim süresince, tez konumun seçimi ve yürütülmesi aşamalarında, bilgi, destek ve sabrını esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Doç.Dr. Mehmet Bozkurt'a;

Can arkadaşım Karanfil Yörük'e;

Nice maddi manevi zorluklar arasında bugünlere gelmemi sağlayan canım anneme ve hep kral kalacak yakışıklı babama;

Hep, o iyi ki var dediğim, kardeşim Elçin'e;

Sonsuz gurur duyduğum, eşim Emin Caşkan'a;

Teşekkür ederim...

ÖZET

Periferik sinir hasarları; kazalar, kesici delici alet yaralanmaları gibi travmalar sonrasında sık görülen ve özellikle tam kesiler, gecikmiş ve yetersiz onarımlar sonucunda ilerleyici kas atrofisi ve yetersiz fonksiyonel geri dönüş ile sonuçlanan dramatik tablolardır.

Son zamanlarda, literatürde periferik sinir onarımları için farklı cerrahi teknikler dışında alternatif yöntemler de yer almaya başlamıştır.

Kök hücre uygulamaları bu bağlamda, son zamanlarda tüm tıp camiasının üzerinde durduğu ve her yıl yüzlerce yeni çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir.

Pluripotent ve sınırsız yenilenme kapasiteleri nedeniyle kök hücrelerin, doku mühendisliğinde gelecek vadetmesi ve farklı rekonstrüktif prosedürler için önemli gelişmelere izin vermesi beklenir.

Çalışmamızda, deneysel siyatik sinir yaralanmasında adipöz kaynaklı yeşil floresan proteini (YFP) işaretli mezenkimal kök hücre (ADSCs) uygulamasının, fonksiyonel analizler, histomorfometrik ve biyokimyasal incelemelerle periferik sinir rejenerasyonuna etkisinin saptanması amaçlandı.

Deneysel 4 Wistar grubu (n:8) tasarlandı: Ratların sol siyatik sinirinde oluşturulan 1 cm'lik defektler, 1.grup dışında oluşturulan epinöral kılıf içerisine ADSCs uygulamasıyla rekonstrükte edildi.

Fonksiyonel geri dönüş Walking Track analizi ile değerlendirildi. Siyatik sinir ve gastroknemius kasının histomorfometrik çalışmaları, postoperatif 4.ayında yapıldı.

Çalışmamızın sonunda tüm klinik, biyokimyasal ve histomorfometrik analizler, ADSCs uygulamasının periferik sinir rejenerasyonuna, kök hücrenin nöral diferansiyasyonu, yeni akson üretimi ve myelin formasyonunu destekler şekilde olumlu etkisi olduğunu gösterdi. Bu etki muhtemelen ADSCs hücrelerin nöronal diferansiyasyonu ve ortama salınan nörotropik faktörlere bağlıdır. ADSCs uygulamalarının periferik sinir rejenerasyonu üzerine olan etkilerinin klinik uygulamalara uyarlanabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ANAHTAR KELİMELER; Periferik Sinir, Rejenerasyon, Adipöz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre, Plastisite, Yürüme izi.

ABSTRACT

Peripheral nerve damages are seen commonly after accidents, sharp objects injuries and particularly as a result of complete transection, delayed and incomplete surgery; they are dramatic views result in progressive muscle atrophy and inadequate functional recovery.

Recently, new methods have started to take place besides the different surgery techniques for peripheral nerve repairing in literature.

In this context, Stem cells applies have become one of the most popular topics of medicine recently, and hundreds of studies are being published every year.

Stem cells, because of their pluripotentiality and unlimited capacity for self-renewal, project great promise for tissue engineering and are expected to allow significant advances for distinct reconstructive procedures.

In our study, the effects of the green fluorescent protein (GFP) marked adipose derived mesenchymal stem cells (ADSCs) application were aimed research by functional analysis, histomorphometric and biochemical evaluation on experimental sciatic nerve injury to peripheral nerve regeneration.

Experimental 4 Wistar groups (n:8) was designed: A nerve defect of 1 cm was constructed in the left sciatic nerve of the rats was reconstructed with ADSCs application in epineural cover built out of first group.

Functional recovery was evaluated by walking track analysis. Histomorphometric studies of the sciatic nerves and gastrocnemius muscles were also performed in postoperative fourth month.

In conclusion; All clinic, biochemical and histomorphometric analysis showed that ADSCs application has a positive effect on supporting peripheral nerve regeneration, stem cells neural differentiation, axon production and myelin formation. This effect is probably due to the neurotrophic factors that are released from the ADSCs during activation. Further study will help to clarify the relative advantages of ADSCs applications on peripheral nerve regeneration.

KEYWORDS; Peripheral Nerve, Regeneration, Adipose derived mesenchymal stem cells, Plasticity, Walking Track.

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK	
BOŞ SAYFA.....	
İÇ KAPAK SAYFASI.....	
ÖNSÖZ	i
TÜRKÇE ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Periferik Sinir.....	3
2.1.1. Periferik sinir histolojisi.....	3
2.1.2.1. Periferik sinir mikrostrüktürel anatomisi.....	4
2.1.2.2. Sıçanda siyatik sinir anatomisi.....	6
2.1.3. Periferik sinirin mikrovaskularitesi.....	7
2.2. Periferik Sinir Yaralanmaları.....	8
2.2.1. Sinir yaralanması ve iyileşme biyolojisi.....	8
2.2.2. Aksonal büyümeyi etkileyen faktörler.....	13

2.3. Periferik Sinir Onarımı.....	: 16
2.3.1. Periferik sinir onarımının tarihçesi	: 16
2.3.2. Periferik sinir onarım prensipleri ve koaptasyon yöntemleri.....	: 18
2.4. Kök Hücre Kavramı.....	: 24
2.4.1 Kök hücre plastisitesi.....	: 26
2.4.2.1 Mezenkimal kök hücre.....	: 27
2.4.2.2 Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücre.....	: 30
2.4.3 Kök hücre çalışmalarını tarihçesi.....	: 32
2.4.4 Doku mühendisliği.....	: 34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	: 35
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma.....	: 35
3.2. sAD-MKH'lerin İzolasyonu, İşaretlenmesi ve Kültüre Hazırlanması....	:36
3.3. Kök Hücrelerin Aplikasyona Hazır Hale Getirilmesi.....	: 44
3.4. Cerrahi Teknik.....	: 45
3.5. Makroskopik Değerlendirme.....	: 52
3.6. Fonksiyonel Değerlendirme.....	: 53
3.6.1. Yürüme (Walking track) analizi	: 53
3.6.2. Elektrofizyolojik değerlendirme	: 57
3.6.3. Nosiseptif WRL.....	: 58
3.7. Dokuların Alınması ve Sakrifikasyon	: 59

3.7.1. Fiksasyon ve doku takip Aşamaları	60
3.7.2. Elektron mikroskopik takip ve görüntüleme.....	61
3.7.3. İmmunhistokimyasal boyama ve değerlendirme.....	63
3.8. İstatistiksel Değerlendirme.....	64
4. BULGULAR.....	65
5. TARTIŞMA.....	76
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	89
7. KAYNAKLAR.....	90
8. EKLER.....	108
BOŞ SAYFA.....	109
ARKA DIŞ KAPAK	

KISALTMA LİSTESİ

PSS; Periferik sinir sistemi

EMG; Elektromiyografi

NGF; Nerve Growth Factor

NT; Nörotrofin

Trk; Tirozin Kinaz

CNTF; Cilier Neurotrophic Factor

BDNF; Brain Derived Neurotrophic Factor

TGF; Transforming Growth Fctor

LIF; Lösemi inhibe edici faktör

EKH; Embriyonik kök hücre

YKH; Yetişkin kök hücre

MKH; Mezenkimal kök hücre

sAD-MKH; Sıçan adipöz doku mezenkimal kök hücre

DMEM; Dulbecco' s modified Eagle' s medium

FBS; Fetal Bovin Serum

İHK; İmmunhistokimyasal

İF; İmmunfloresan

P; Pasaj

GFP; Yeşil Floresan Proteini

FITC; Floresan izotiyosiyonat

PE; Fikoeritrin

SFI; Siyatik fonksiyonel indeks

SEM; Scanning Elektron Mikroskopisi

BMAP; Bileşik Motor Aksiyon Potansiyeli

ENMG; Elektronöromyografi

Ark; Arkadaşları

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Periferik sinir histolojisi.

Şekil 2. Sinir hücre anatomisi.

Şekil 3. Sıçanda siyatik sinir anatomisi.

Şekil 4. Periferik sinir kesisi sonrası rejenerasyon süreçleri.

Şekil 5. Periferik sinir lezyonlarında Sunderland sınıflaması.

Şekil 6. Sinir epinöral onarım tekniği.

Şekil 7. Sinir fasiküler onarım tekniği.

Şekil 8. Sinir yanlış fasikül eşleştirilmesi.

Şekil 9. Periferik sinirde keskin bir cisim kesisi sonra oluşan fizyolojik değişiklikler.

Şekil 10. Kök hücre tipleri.

Şekil 11. Kemik iliğindeki stromal ve kök hücrelerin farklılaşması.

Şekil 12. Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sistematik olarak differansiyasyonu.

Şekil 13. Adipöz dokudan, adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücre elde edilmesi.

Şekil 14. Pasaj 3'deki sAD-MKH'lerin akım sitometri verileri.

Şekil 15. Shaking işlemi.

Şekil 16. Kök hücrelerin besiyeri ile sulandırılması.

Şekil 17. Aplikasyona hazır adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücreler.

Şekil 18. Cerrahi insizyon sahasının işaretlenmesi.

Şekil 19. Rat sol siyatik sinir eksplorasyonu.

Şekil 20. Rat sol siyatik sinir transeksiyonu.

Şekil 21. 1 cm lik sol siyatik sinirin ekstirpasyonu.

Şekil 22. 1 cm lik sol siyatik sinir parçasının ölçümü.

Şekil 23. 1 cm lik sol siyatik sinirin 3 fasikülünden arındırılması.

Şekil 24. Denek siyatik sinir defektinin şematize edilmesi.

Şekil 25. Çıkarılan parçanın defasikülize edilmesinin şematize edilmesi.

Şekil 26. Boş epinöral tüpün proksimal ve distal güdük sahalarına tubularizasyonu.

Şekil 27. Epinöral tüp içine yaklaşık 1.5 milyon Ü. sAD-MKH enjeksiyonu.

Şekil 28. Tisseel Kit fibrin doku yapıştırıcısı.

Şekil 29. Aplikasyona hazır Tisseel Kit .

Şekil 30. Anastomoz sahalarına kök hücre enjeksiyonu sonrası extratubulizasyonu önlemek için tisseel kit uygulanmış siyatik sinir görüntüsü.

Şekil 31. Kas ve ciltaltı postoperatif onarılmış denek.

Şekil 32. Tam kat cilt insizyonunun kapatılması.

Şekil 33. Herhangi bir muameleye maruz kalmamış sağlıklı bir denek arka ekstremiteleri.

Şekil 34. Postoperatif 2.ay tırnaklarda körelme izlenen bir denek.

Şekil 35. Bilateral gastrocnemius kası ve siyatik sinir karşılaştırılmalı makroskobik görüntüsü.

Şekil 36. Yürüme koridoru.

Şekil 37. Sağlam denek footprint.

Şekil 38. Opere edilmiş denek postoperatif erken dönem footprint.

Şekil 39. SFI formülündeki değerlerin tespitinin şematize edilmesi.

Şekil 40. Siyatik Fonksiyonel İndeks formülü.

Şekil 41. Birleşik aksiyon potansiyeli parametreleri.

Şekil 42. Elektrofizyolojik değerlendirmenin bilgisayara aktarılması.

Şekil 43. Sağlam taraf gastrocnemius kası ve siyatik sinirinin blok halinde çıkarılması.

Şekil 44. Kardiyak ponksiyon ile biyokimyasal numune alınması.

Şekil 45. Grup 1 de GFP ve Vimentin ile boyanmış sol siyatik sinir immunfloresan staining.

Şekil 46. Grup 2 de GFP ve Nöroflament ile boyanmış deneysel taraf gastrocnemius kası.

Şekil 47. Grup 3 te overlay olmuş, çift antikorla boyanmış nöral hücreler.

Şekil 48. Grup 4 te hem Vimentin hem GFP boyanmış, akson yapısına katılmış kök hücreler.

Şekil 49. Akson oluşumuna katılmış kök hücrelerin immuofloresan görüntülenmesi.

Şekil 50. Deneysel taraf gastrocnemius kasına ulaşmış sAD-MKH lerin immunfloresan görüntülenmesi.

Şekil 51. Periferik sinir sonlanmaları.

Şekil 52. Periferik sinir rejenerasyon süreci.

Şekil 53. Kök hücrenin çoğalma veya differansiyasyon kararı.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Denek grupları ve uygulama prosedürlerinin şematize edilmesi.

Tablo 2. IF/IHC antikor paneli.

Tablo 3. Tüm grupların bacak kas ağırlık oranları ve uyluk çevresi farkları standart sapmaları.

Tablo 4. Tüm grupların gastrocnemius kası deneysel ve kontrol bacak kas ağırlık oranlarının kıyaslanması.

Tablo 5. 21.gün SFI analizleri açısından gruplar arası farklılıkların dağılımı.

Tablo 6. 2. Ay SFI analizleri açısından gruplar arası farklılıkların dağılımı.

Tablo 7. 4. Ay SFI analizleri açısından gruplar arası farklılıkların dağılımı.

Tablo 8. EMG deneysel bacak/kontrol bacak kasılma amplitüd oranları.

Tablo 9. EMG gruplar arası kasılma amplitüd ve latans oranlarının standart sapmaları.

Tablo 10. WSRL değerlerinin gruplar arası istatistiki kıyaslaması.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Periferik sinir hasarları, özellikle üst ekstremité yaralanmalarına sıklıkla eşlik eden, kişide fiziksel olduğu kadar psikososyal ve ekonomik problemlere de yol açan bir durumdur (1,3,4). Genellikle pahalı bakım, yüklü hastane masrafları, sekeller sonrası işgücü kaybı, fonksiyonel kayıplara bağılı sosyal olarak dışlanma, yüzbinlerce bireyin kısıtlı kaliteyle yaşamlarına devam etmesi periferik sinir yaralanmasının cerrahi tedavisiyle ilgili yeni gelişmeler ve tedavide multidisipliner yaklaşımlar bu konuyu giderek daha ilgi çekici kılmaktadır.

Günümüzde, mikrocerrahi uygulamalarının yaygınlaşması, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerin gelişmesi, periferik sinir yaralanmalarında, sinir onarımının başarısını büyük oranda arttırmıştır (2,4). Periferik sinir kesisi sonrası, akson rejenerasyonunun temel mekanizmaları hakkındaki bilgi birikimi giderek artmaktadır (5).

Aksonal tomurcuklanmayı başlatarak rejenerasyonu sağlayan mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır. Rejenerasyon işlemi aksonlar, nöronal olmayan hücreler ve ekstrasellüler elemanlar rol oynar (6). Diğer taraftan yaralanma bölgesindeki nörotrofik (humoral) ve nörotropik faktörlerin rejenerasyon etkileri, deneysel olarak yoğun şekilde araştırılmaktadır (7-14). Periferik sinir onarımında hedef, sinir ve kasta kalıcı hasar oluşmadan erken dönemde tedavi sürecini başlatmak, reinnervasyon sağlanana kadar kasın kontraktıl yeteneğini sürdürmesini sağlamaktır.

Sinir tamirinin primer olarak yapılmasının; kesi hatlarının belirgin olması, kolay diseksiyon yapılabilmesi, sinirlerde retraksiyon olmaması, tek ameliyat gerektirmesi gibi avantajları varken, sekonder olarak yapılmasının ise; ameliyatın elektif şartlarda yapılabilmesi, enfeksiyon riskinin azalması, bu süre içinde etraf yumuşak dokuların iyileşmesi, epinöryumun kalınlaşıp kolay suture edilebilecek hale gelmesi ve demarkasyon hattının belirginleşmesi gibi

avantajları vardır (15-18). Ancak primer onarımla daha başarılı sonuçlar elde edildiği literatürde belirtilmektedir.

Nöroma gelişimi geç dönem sorunlarından olup erken dönemde ve defektif sinirlerde özellikle farklı tubulizasyon yöntemlerinin denenmesine yol açmıştır (19-23).

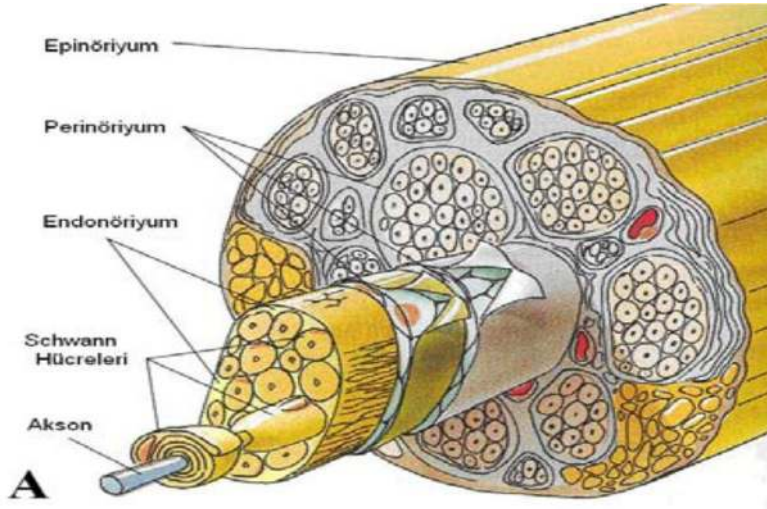
Son araştırmalar, kök hücrenin, merkezi ve periferik sinir dokusu rejenerasyonunda tatmin edici sonuçlar verebileceğini invitro olarak ispatlanmış olmasına rağmen birçok ülkede hukuki engellere takılması insan çalışmaları ve klinik uygulamaları kısıtlamıştır (24). Kök hücrenin, merkezi sinir sistemine kıyasla daha az rejenerasyon çalışması içeren periferik sinir yaralanmalarında, adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrenin anastomoz hattında bulunmasının iyileşme hızı ve kalitesini olumlu yönde etkileyeceği düşünülmektedir (25,26). Alınacak olumlu sonuçların, periferik sinir yaralanmaları ve fonksiyonel serbest kas transferi sırasında yapılan nörorafide önemli katkılar sağlayacağını düşünüyoruz. Bu çalışmanın amacı; periferik sinir hasarının geri dönüşünde etkili olabileceği düşünülen adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrenin etkinliğinin kısa ve uzun vadede değerlendirilerek, tedavi seçeneği olarak ortaya konması ve farklı yeni belirteçler kullanılarak rejenerasyon takibinin yapılabileceğinin gösterilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periferik Sinir

2.1.1. Periferik sinir histolojisi

Periferik sinir sistemi, nöronlar, destekleyici bağ dokusu, hücre elemanları ve son organlardan oluşan kompleks bir yapıdır. Periferik sinirler, embriyolojik dönemde ektoderm tabakasından gelişir. Gestasyonun üçüncü ve dördüncü haftalarında nöral krest hücreleri nöroektodermi oluştururlar ve mezoderm içine göç ederler. Burada dorsal kök gangliyonlarına, schwann hücrelerine ve diğer nöroblastik hücrelere dönüşürler. Schwann hücreleri, periferik sinir sisteminin destekleyici hücreleridir. Fetal dönemin yaklaşık dördüncü ayında schwann hücreleri bu dağılan aksonların myelinizasyonuna başlarlar (27). Periferik sinir sisteminde sinir lifleri sinirleri oluşturmak üzere demetler halinde grup oluştururlar (Şekil 1). Bu nedenle içerdikleri myelin ve kollajen içeriği nedeniyle beyaz, homojen ve parlak bir görünüm sergilerler.



Şekil 1. Periferik sinir histolojisi (Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2001: 204)

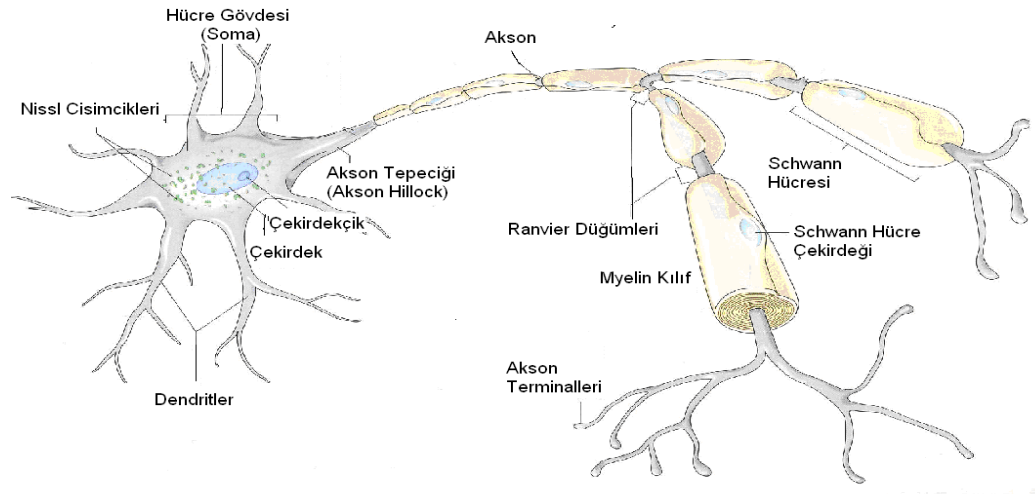
Periferik sinirler, endoneurium, perineurium ve epineurium adı verilen bağ dokusu kılıfları tarafından sarılmışlardır. Sinirler dıştan **epinöryum** denen lenf, kan damarı ve yağ hücrelerininide içeren tıkız bağ dokusundan oluşan fibröz bir kılıf, her demet çevresinde yassılaştırmış epitelyum benzeri hücrelerden oluşan ve intranöral basıncı koruyan **perinöryum** ve schwann hücreleri tarafından sarılmış akson kılıfı ve tip 4 kollajen fibrillerden oluşan **endonöryum** dan meydana gelir (28-31). Perinöryum, yaprağındaki her tabakada bulunan hücreler kenarlarından sıkı bağlantılarla birbirine tutunmuştur. Bu şekilde düzenlenmiş olması perinöryumu, pek çok makromolekülün geçmesine izin vermeyen ve sinir liflerini dışarıdan gelebilecek saldırılara karşı koruyabilecek bir engel durumuna getirir. Epinöryumun ise fibroblastlardan zengin olması, travma sonrası sinir elastikiyetinin azalmasına yol açar.

2.1.2.1. Periferik sinir mikrostrüktürel anatomisi

Sinir sistemi, santral ve periferik sinir sistemi olarak 2 ye ayrılır. Beyin ve omurilik, santral sinir sistemini; kraniyal, spinal sinirler ve gangliyonlar ise periferik sinir sistemini oluştururlar. Periferik sinir sisteminde afferent lifler, gelişmiş reseptör sistemleri ile çevreden alınan uyarıları santral sinir sistemine iletirlerken, efferent lifler ise santral sinir sisteminin çeşitli kademelerinde oluşan uyarıları son organlara iletmektedir (32-34).

Merkezi sinir sistemindeki nöron topluluklarına **nükleus** denirken, periferik sinir sistemindeki nöron topluluklarına **ganglion** denir. Aynı şekilde merkezi sinir sistemindeki akson topluluklarına **traktus**, periferik sinir sistemindeki akson topluluklarına ise **sinir** denir. **Gangliyonlar**, bağ dokusu tarafından desteklenen nöron hücre gövdeleriyle glia hücrelerini içeren oval yapılardır, sinir uyarılarının aktarımında dağıtım istasyonu olarak görev alırlar. Bir periferik sinir; duysal, motor ve sempatik, parasempatik liflerden oluşur.

Aksonlar, myelinli veya myelinsiz yapıda olabilirler (35,36). Aksonlar kalınlaştıkça kılıf hücresi giderek daha fazla sayıda kat yapar ve akson boyunca komşu schwann hücreleri arasında **Ranvier boğumları** denen boşlukları içeren ve aksonu endonöryumun ekstrasellüler kompartmanından ayırmakla yükümlü **myelin kılıfları** oluşturur (2,37-39). Bu bölgelerde adhezyon molekülleri ve sodyum iyon kanalları bulunur. Ranvier boğumları, elektriksel iletinin aktarılmasından sorumludur ve böylece elektriksel iletinin akson boyunca hızlandırılmasını sağlar (Şekil 2).



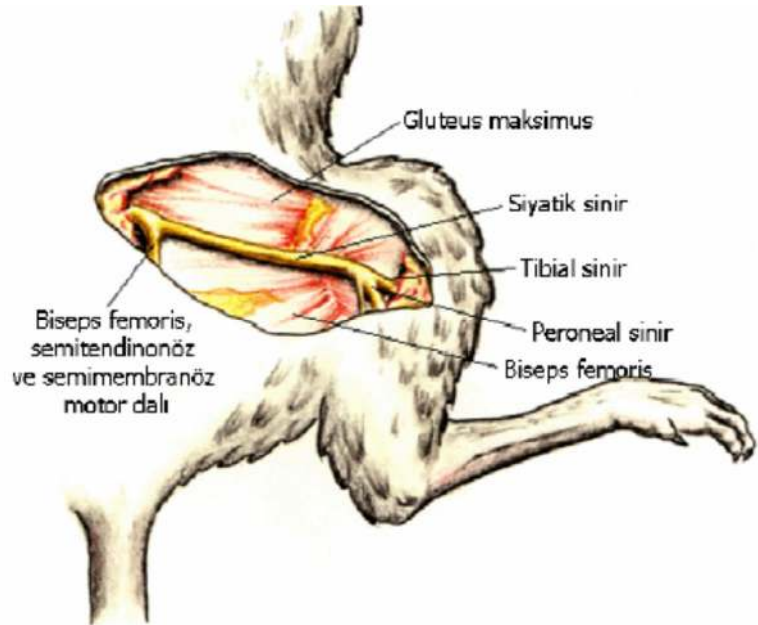
Şekil 2. Sinir hücre anatomisi. (Shier D, Butler J, Lewis R. Hole's Essentials of human anatomy and physiology. 9th ed. New York: McGraw Hill, 2006:393)

Nöronlar fonksiyonel rollerine göre, motor nöronlar, duyuşal nöronlar ve inter nöronlar olmak üzere 3'e ayrılır . Motor nöronun hücresel gövdesi spinal kordun ön boynuzunda lokalize ve motor son plaklarda sonlanır iken, duyuşal nöronlar arka kök ganglionunda bulunurlar ve özelleşmiş reseptörlerde sonlanırlar. Periferik sinir lifleri yapı ve fonksiyonuna göre başka bir sınıflamada ise **A B, C** olmak üzere 3 gruba ayrılır. A ve B lifleri miyelinli kalın liflerdir (5,40-44). Kalın miyelinli liflerde ileti hızı ince liflere oranla daha fazladır. A lifleri 2.5-22 μm çapları arasında, B lifleri ise ortalama 3 μm çapındadır. C lifleri ise 0.2-1.6 μm arasında çapa sahip olup miyelinli değildir. A liflerinde iletim en hızlı olup saniyede 100 metreye ulaşabilmektedir.

B lifleri miyelinli olmasına rağmen iletim hızı A liflerine göre çok daha yavaştır ve genelde 3-5 m/sn aralığındadır.

2.1.2.2. Sıçanda siyatik sinir anatomisi

Deneyisel sinir mikrocerrahisi çalışmalarında kullanılmak üzere sıçanda mandibular sinir, brakial pleksus sinirleri ve siyatik sinir dallarında modeller geliştirilmiştir. Bunlar arasında hem çalışma kolaylığı hemde işlevsel geridönüşün izlenmesi açısından siyatik sinir ve dalları yaygın kabul görmektedir (2,27,40). Çalışmamızda kullanılan rat siyatik sinir modeline göz atarsak, siyatik sinirin, lumbosakral trunkustan çıkan ve bol varyasyon gösterebilmekle beraber sıklıkla L4, L5, L6 ve S1 spinal sinirlerin füzyonu ile oluşan en kalın periferik sinir olduğunu görüyoruz. Pelvis minör içinde siyatik sinir adını alarak iskiyum dorsal kenarı ile kuyruk sokumu arasındaki derin olukta ilerleyen ana dal, siyatik çentikten çıktıktan sonra piriform kasın ventralinde seyrederek ve uyluk arkasına ilerler bu aşamadan sonra sırt derisinin yarıya yakın kısmını ve arka bacak kaslarının çoğunu innerve eder.



Şekil 3. Sıçanda siyatik sinir anatomisi.

İlk önce biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kaslarını innerve eden ince bir motor dal verir daha sonra diz ekleminin yaklaşık yarım santimetre proksimalinde tibial, peroneal (fibular) ve bunlardan hemen önce sural olarak 3 dala ayrılır (Şekil 3). Sonuç olarak siyatik sinir, common peroneal ve tibial sinir olmak üzere 2 ana dal ve küçük sensoryal 1 dal içeren polifasiküler bir sinirdir.

2.1.3. Periferik sinirin mikrovaskularitesi

Periferik sinir kanlanması oldukça zengindir. Endonöryum kapiller yapılar açısından zengindir ve perinöryumdaki damarlar oblik olarak seyredip endonöryuma girerler. Buradaki kapiller endotel hücreler, **kan-sinir bariyeri** görevi görürler. Geniş ağ oluşturan uzun plexuslar nedeniyle periferik sinirler, uzun mesafeli mobilizasyonlarına rağmen beslenmelerini korurlar (41). Siniri saran bağ dokusu katlantılarının her birinde diğerleriyle bağlantılı olan vasküler bir ağ vardır. Her gangliyon bir sinir girerken bir başkası çıkar. Bu şekilde organize olmuş periferik sinirler efektör yapıya yaklaşıncas fasikulusların ayrılmasıyla dallanır ve plexusları meydana getirir. Periferik sinirlerin içerdiği fasikül sayısı çeşitli bölgelerde farklı olabilir. Bir periferik sinirin yaralanması sonrası **greftleme** yapılabilmesi bu fasiküler yapının bilinmesini gerektirmektedir (42,43). Dolayısıyla, greft olarak kullanılacak olan donör sinirinde fasikül sayısının ve bu fasiküllerin yerleşiminin de bilinmesi rejenerasyonun başarıyla sonuçlanmasında önemli bir faktördür.

Periferik sinirlerde klasik bir lenfatik sistem yoktur; ancak perinöryum dışında ve endonöryum içinde lenfatiklere benzer taşıma görevi yapan kanalların olduğu bilinmektedir. Endonöral boşlukta klasik bir lenfatik sistem olmadığı için, travma sonrasında oluşan ödem erken dönemde fasikül içerisindeki basıncı arttırarak, sinirin normal fonksiyonunun devamı için gereken **mikroçevreyi** bozar (14,15).

İleri evrede ise fibrozis ve skar oluşumu ile problem yaratır. Normalde endonöral damarlar geçirgen değildir, ancak travma sonucu geçirgenliklerinin artması ile oluşan endonöral ödem, yine endonöral mikrodolaşım ile temizlenir.

2.2. Periferik Sinir Yaralanmaları

Yaralanma mekanizmaları gerilme, laserasyon ve kompresyon tipi başta olmak üzere periferik sinir yaralanmaları 3 şekilde meydana gelir. Bunların içinde en sık görüleni ise gerilme tipi yaralanmalardır. Periferik sinirler, endonöryumlarından dolayı elastiktir, fakat sinire uygulanan çekme, sinirin gerilme kapasitesinin üzerine çıkarsa, yaralanma meydana gelebilir (1,3,7). Laserasyon tipi yaralanmalar ise, ciddi sinir yaralanması vakalarının %30 unu oluşturan bıçak, cam ve benzeri kesici delici aletlerle, trafik kazaları ve multitravmalara sekonderde gelişebilen yaralanmalardır. Kompresyon tipi yaralanmalar ise daha nadir görülen, nöronal elemanların yırtılmadığı tuzak nöropatiler, alçı sıkıştırması, kompartman sendromu gibi durumlarda gelişebilen yaralanmalardır (13). Bunlar dışında enfeksiyonlar, AIDS, elektrik ve termal yanıklar, diyabet, amiloidoz vs de mevcut tedavisi oldukça güç periferik sinir yaralanmalarına neden olabilir.

2.2.1. Sinir yaralanması ve iyileşme biyolojisi

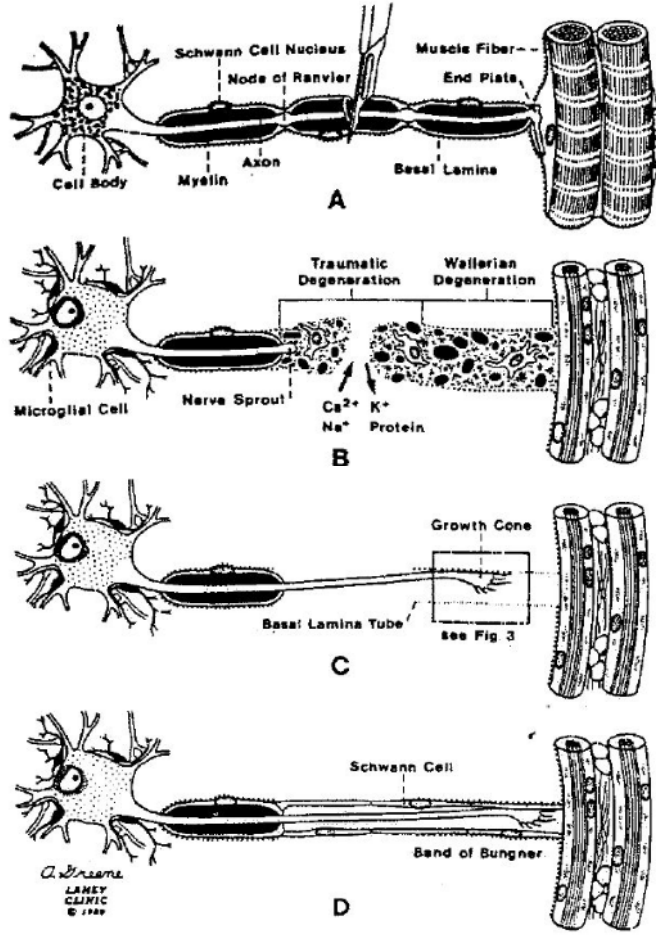
Periferik sinir yaralanmalarında mikrocerrahi onarımların klinik uygulamaya girmesine rağmen, hedef organda işlevsel iyileşmenin istenilen düzeye ulaşamaması, sinir yaralanması ve iyileşmesinin biyolojisi üzerindeki çalışmaların artmasına neden olmuştur (14). Erişkin kuşların beyinde bulunan nöronların bölünebildiği gösterilmesine karşın, memelilerdeki nöronlar genellikle bölünemez ve hasar kalıcı kayıp anlamına gelir.

Merkezi sinir sistemindeki nöron uzantıları çok dar sınırlar içinde perikaryonlarının sentez aktivitesi aracılığıyla büyüyerek, periferik sinir sistemi lifleride perikaryonları hasar görmediği sürece yenilenebilir.

Akson yaralanması perikaryonda bazı değişikliklere yol açar. Bunlar arasında **kromatoliz**, yani stoplazmadaki bazofililiğin azalması ile sonuçlanan nissle maddesinin dağılması; perikaryon hacminde artış; çekirdeğin perikaryonda kenara çekilmesi yer almaktadır. Aksonun sinir gövdesine yakın parçası kısa bir mesafede bozunur ama artıklar makrofajlar tarafından temizlenir temizlenmez büyüme başlar. Makrofajlar, sinir büyümesini kolaylaştırıcı maddeler salgılamaya iten İnterlökin-1 i üretirler. Hasarın diğer tarafında kalan sinir uzantısında hem akson hemde myelin kılıf tamamen bozunur ve artıkları nöron çevresindeki kılıflar dışında makrofajlar tarafından temizlenir (8). Bu olumsuz değişiklikler sırasında schwann hücreleride kalan bağ dokusu yaprağı içinde çoğalarak sert hücre sütunları oluştururlar (Şekil 4).

Onarımın işlevsel olarak etkin olması için liflerin ve schwann hücrelerinin oluşturduğu sütunların doğru yere yönelmesi gerekir (44). Bununla birlikte hasar görmüş karışık bir sinirde, yenilenen duysal lifler, motor liflerin bulunduğu motor son plağa bağlı sütunlara doğru büyüdüğünde kasın işlevi tam olarak geri dönmeyecektir (45). Ağır sinir hasarları ve tam kesilerde meydana gelen değişiklikler şu şekildedir;

- 1- Kesinin distalinde; sekonder dejenerasyon veya **Wallerian dejenerasyon**: Myelin kılıfta parçalanma ve belirli oranda irreversibl aksonal harabiyet.
- 2- Kesinin proksimalinde; aksonal reaksiyon: Akson güdüğünde tomurcuklanma (bu ayaksı çıkıntılar distalde çeşitli etkenlerin vasıtasıyla yollarını bularak uzamaya, schwann hücreleri ve nöral tüplerle bağ kurmayı sağlar), myelin kılıfta harabiyet.
- 3- Sinir hücre gövdesinde; perikaryonda Nissle cisimciklerinin kaybı, nöral şişme ve nöronal ölüm.



Şekil 4. Periferik sinir kesisi sonrası rejenerasyon süreçleri. A- Sinir kesisi sonrası hücre gövdesindeki değişiklikler, B- Travmatik ve Wallerian dejenerasyonu, C- Büyüme konisi oluşumu, D- Büyüme konisinden gelişen sinir liflerinin schwann hücresi tarafından miyelin kılıf ile sarılması.(Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. Muscle& Nerve. 1990;(13):156)

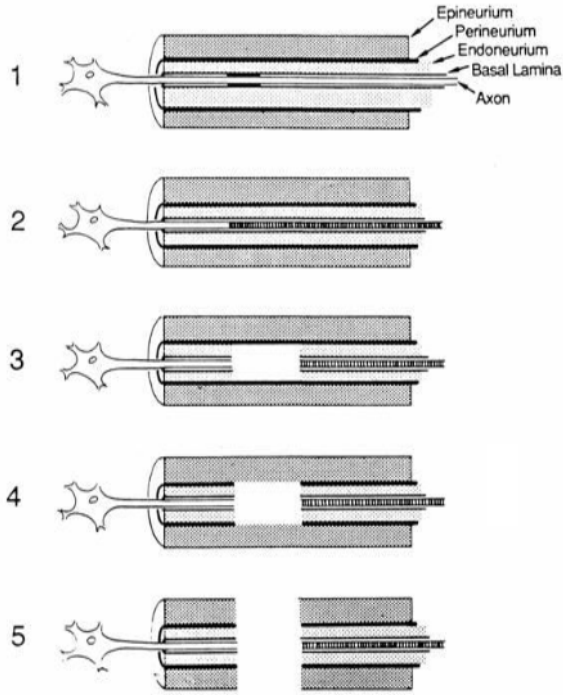
Sinir yaralanmalarında; yapısal hasarın boyutunun değerlendirildiği, altta yatan travma mekanizmasının tanımlandığı, fonksiyonel sonucun önceden bilindiği ve uygun tedavi planının oluşturulduğu; Seddon'un 1947 de 2. dünya savaşı deneyimlerine dayanarak ortaya koyduğu ve 1951 de Sunderland tarafından geliştirilen iki önemli kabul görmüş sınıflandırma mevcuttur (43,46).

Seddon sınıflandırması:

1-Nöropraksi: Hafif derecede kompresyon, iskemi, sinir gerilmesi veya kontüzyon hasarı sonrası meydana gelen akut demyelinizasyon sonrası fokal iletim bloğudur. Elektrofizyolojik incelemede aksonal devamlılığın saptanması tanıda önemlidir. Palpasyon ve inspeksiyonla sinir normaldir, hatta mikroskopide de aksonal devamlılık olmasına rağmen, sinirde lokalize bir iletim bozukluğu mevcut olup, motor paraliziye, duyusal ve sempatik fonksiyon bozukluğu eşlik etmemektedir (7). Buna örnek olarak, uzun süre bacak bacak üstüne atmak sonucu oluşan peroneal sinir felci ve cumartesi gecesi felci verilebilir. Bu klinik tablo yeni myelin yapımını takiben kendiliğinden düzelir.

2-Aksonotmezis: PSS'nde akson ve myelin devamlılığının kaybına rağmen destek dokunun korunduğu, hasarın distalinde Wallerian dejenerasyonun olduğu, proksimalinde ise akson, myelin çapın ve iletinin azaldığı daha ciddi bir yaralanma türüdür (47). Endonöral tüpler ve bazal membran intakt kaldığı için iyi prognozla iyileşir. Fonksiyonun geri dönmesi için geçmesi gereken süre, aksonal rejenerasyon ve hedef dokudaki reinnervasyon sürecinin hızına bağlıdır.

3-Nörotmezis: Periferik sinir yaralanmasının en şiddetli formudur. Sinirin ve destek dokularının traksiyon ya da lacerasyon sonucu anatomik bütünlüğünün tamamen kaybolmasıdır. Cerrahi sinir koaptasyonu olmadan iyileşme olması mümkün değildir.



Şekil 5. Periferik sinir lezyonlarında Sunderland sınıflaması. (Mc Carthy, Plastic Surgery General Principles, 1990, s.656)

Sunderland sınıflandırması:

1.derece yaralanma (nöropraksi): Segmental demiyelinizasyon olmasına sekonder travma alanındaki sinir segmentinde iletim kaybı mevcuttur. Remyelinizasyon süreci sonrasında iyileşme tamdır.

2.derece yaralanma (aksonotmezis): Bağ dokusu kılıf yapıları sağlam olmasına karşın aksonal bütünlük kesintiye uğramıştır. Distal segmentte Wallerian dejenerasyon gelişir. Motor son organların bozulmadan, denervasyon sürecini tolere edebildiği sürece iyileşme tamdır.

3.derece yaralanma (aksonotmezis): Schwann hücre kılıfı, endonörium ve akson devamlılığı bozulmuş olmasına karşın epinörium ve perinörium korunmuştur.

Akson distalinde Wallerian dejenerasyon ve endonöral fibrozis oluşmaktadır. Rejenerasyon sırasında nöroma oluşumu ya da motor ve duyu liflerin yanlış eşleşmeleri kötü fonksiyonel sonuçlara neden olabilir.

4.derece yaralanma (nörotmezis): Epinörium dışındaki tüm tabakaların devamlılığı bozulmuştur. Yaralanma bölgesinde fibrozis ve tam bir skar dokusu vardır. Fiziksel olarak sinir bütünlüğü devam etmekle birlikte, oluşacak skar dokusunun yaratacağı blok, sinir rejenerasyonunu engeller ve hasar bölgesinde nöroma oluşumuna neden olur. Skar dokusu kaldırılmadan iyileşme mümkün değildir.

5.derece yaralanma (nörotmezis): Epinöral kılıf yaralanmasını da içeren, sinir devamlılığının tamamen ortadan kalktığı, cerrahi onarım yapılmadan iyileşmenin mümkün olmadığı çok ciddi yaralanmalardır.

Sunderland sınıflamasına, 1992 yılında MacKinnon, altıncı bir madde eklemiş; bunu da

6. derece yaralanma(neuroma in continuity): Bazı liflerdeki ileti blokları ve akson kaybının beraber görülmesi ile oluşan, aynı periferik sinir içerisindeki bazı fasikül veya liflerde mikst tip yaralanmalardır. Periferik sinir içindeki tüm yapılarda çeşitli seviyelerde meydana gelen derecelendirmesi ve tedavisi çok zor olan hasar olarak tanımlamıştır. Özellikle ezici tipte yaralanmalarda ortaya çıkmaktadır ve tedavisinde intranöral nöroliz ile sağlam fasiküllere zarar vermeden 4. ve 5. derecede hasarlı fasiküllerin cerrahi onarımı gerekmektedir (Şekil 5).

2.2.2. Aksonal büyümeyi etkileyen faktörler

Bilinen nörotropik faktörlerin ve reseptörlerinin pek çoğu gelişmekte olan ya da yetişkin nöral hücrelerde bulunmaktadır (5,6). Sinir sistemine yönelik bir yaralanma, amacı onarıcı veya rejeneratif işlevleri artırmak olan NGF gibi endojen büyüme faktörlerinin artışı ile sonuçlanır (5,48-52).

Yaralanmaya cevap olarak bazı trofik faktörlerin ve/veya reseptörlerinin sentezindeki değişiklikler, nörotropik faktörlerin uygulanması ile nöronların hayatta kalmalarının ve rejeneratif dallanmalarının arttığı rapor edilmiştir. Nörotropik faktörler, nöronların yaşamını devam ettirmesi ve aksonal canlılık için ihtiyaç duyduğu bir polipeptid ailesidir (53,54). Akson ile Schwann hücresi arasındaki ilişkinin bozulması bu faktörlerin sentez ve salınmasına neden olmaktadır. Embriyonik yaşam boyunca nöronların gelişim ve olgunlaşmalarına katkıda bulundukları ve sinir yaralanmalarından sonra da rejenerasyonu illettikleri rapor edilmiştir. Nörotropik faktörler 3 ana gruba ayrılır;

Birinci grup; NGF, BDNF, NT-3 ve NT-4/5'i içeren nörotropinlerdir. Bunlar trk ailesinin (trk A,B,C) tirozin kinaz reseptörlerine etki eden küçük temel polipeptidlerdir.

İkinci grup; CNTF ve LIF'i içeren nörokinlerdir.

Üçüncü grup ; TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 ve GDNF'yi içeren TGF- β ailesidir.

NGF, ilk ve en iyi tanımlanan sinir kökenli büyüme faktörüdür. NGF üretildiğinde, spesifik reseptörlerine bağlanarak sinir terminalleri tarafından alınır ve sinir hücre gövdesine retrograd aksonal transport yoluyla iletilir. NGF'nin rejenerasyondaki rolü, Schwann hücrelerine etki ederek göç etmelerini ve aksonal çıkıntılara yapışmalarını sağlamaktır. Ayrıca ortamda yeterli düzeyde NGF bulunmadığında makrofajlar tarafından gerçekleştirilen miyelin fagositozu da azalır ve rejenerasyon bu durumdan olumsuz yönde etkilenir (56). Tropik faktörlerin ilgili reseptörüne bağlanması, reseptör otofosforilasyonuna yol açar. Bu da reseptörlerin hedef proteinlerdeki fosforile tirozin uçlarına bağlanmasını sağlar. Sonuçta hücre büyümesini ve farklılaşmasını uyaran proteinler aktive olur (12,55). Sadece yüksek affiniteli reseptör içeren (trkA) nöronlar NGF'e yanıt verebilir.

Motor nöronlarda trkB ve trkC reseptörleri bulunduğu ve trkA reseptörü olmadığı için NGF motor nöronlar üzerinde etkili değildir. BDNF, trkB ve trkC üzerinden, NT-3, trkC üzerinden ve NT-4/5, trkB üzerinden etkilerini gösterir.

BDNF, In vitro olarak nöral krest ve duyu nöronlarının yaşamını düzenler. Siyatik sinir yaralanmasını izleyen 72 saat sonra siyatik sinir ve gastrocnemius kasında artış gösterir.

NT-3, Normal akson ve schwann hücresi etkileşimini düzenleme fonksiyonu olan bu peptid, sinir yaralanmasını izleyen süreçte düşmeye başlar ve rejenerasyon tamamlanınca normal düzeye gelir. Nöromusküler eşik fonksiyonlarını düzenler. Motor nöronları doğal hücre ölümünden korur.

NT-4, NT-5, Apoptozu önleyen proteinlerdir. BDNF ile aynı reseptöre bağlanıp siyatik sinir yaralanmasını izleyen 6-24 saat sonra siyatik sinir ve gastrocnemius kasında artış gösterir.

NT-6: Bu ailenin en son bulunan üyesidir. NGF ile aşırı yapısal benzerliği vardır.

CNTF, Sağlam siyatik sinir Schwann hücrelerinde, yüksek konsantrasyonda bulunur ve in vitro koşullarda, motor ve duyu nöronlarda artmış metabolik aktivite ile beraber, her iki tip sinirde de aksonal tomurcuklanmayı artırır. Aksotomilerden sonra, distal güdükte CNTF mRNA seviyeleri hızla düşer ve akson tekrar rejenere olana kadar bir artış görülmez. Tedavi amacıyla uygulandığında, kaslarda denervasyon atrofisini azaltmakta ve kas gücünün yeniden kazanılmasına yardımcı olmaktadır.

LIF, IL6 ailesine ait bir sitokindir. Diğer nörotrofik faktörler gibi retrograd taşınarak, arka kök ganglionlarındaki nöronları etkiler. Sinir hasarı sonrasında retrograd bu taşınma işlemi, CNTF ile beraber artar.

Retinoik Asit Vitamin A türevleri olan retinoidler, embriyogenesis sırasında, çeşitli hücre tiplerinin farklılaşması ve proliferasyonunun düzenlenmesinde kritik rol oynar Retinoik Asitinde in vitro fare embriyonik kök hücrelerin nöral doku farklılaşmasını indükleyici etkisi bilinmektedir.

TGF- β , Çeşitli hücre tipleri üzerine olan geniş spektrumlu bir biyolojik aktiviteye sahip bu aile Schwann hücre çoğalması ve farklılaşması üzerine etkilidir. Normal siyatik sinir yapısında Schwann hücrelerinin stoplazmalarında ağırlıkla TGF- β 1 ile TGF- β 3 ve az miktarda TGF- β 2 şeklinde mevcuttur.

GDNF, Birçok motor nöron için nörotrofik bir hormondur. Periferik sinir hasarı sonrası iskelet kasında da düzeyleri artar ve retrograd olarak motor nöronlara taşınır. Schwann hücreleri tarafından sentezlenir ve bu hücreler üzerine güçlü trofik etkisi ile periferik sinir iyileşmesinde de rol alır.

2.3. Periferik Sinir Onarımı

2.3.1. Periferik sinir onarımının tarihçesi

Akut sinir yaralanmalarının tarihçesi 3500 yıl öncesine dayanır. İncil'e göre (Genesis 32:25-33) Jacop'un, melekle savaşırken kalçasındaki travmatik çıkığa bağlı siyatik sinir hasarı olduğu bilinmektedir. MS.130'da Galen, dini engellerle kadavra çalışması yapamamasına rağmen gerçekleştirdiği birçok hayvan deneyi ile PSS'nin detaylı anatomisini tariflemiştir. Golgi ve Cajal 1906 da sinir hücrelerinin sinir sistemi ile bağıntısını açıklayan savlarıyla Nobel almışlardır. Periferik sinir rejenerasyonu ilk olarak Cruikshank tarafından öne sürülmüş olup bunu Haighton'un yaptığı çalışmalar takip etmiştir. 19.yy'da distal sinir güdüğündeki aksonların nereden kaynaklandığı tartışılmış, Waller'in öncülük ettiği grup tarafından bu liflerin proksimal liflerin uzantısı olduğu öne sürülmüştür (3,57).

Periferik sinir cerrahisinin tarihine baktığımızda, Galen in 150 li yıllarda tendon ve sinir ayrımını ortaya koymasının ardından 9. yüzyılda Arap cerrahlar tarafından periferik sinir kesilerinin suturasyonu denenmiş, temel sinir onarımı tekniklerinin tanımlanması ise 18.yy ı, geliştirilmesi ise 1. Dünya savaşı yıllarını bulmuştur. Periferik sinir onarımının cerrahi tedavisi son iki yüz yıldır gerçekleştirilmektedir. 19.yy da sinirin mikroskobik anatomisinin ortaya konması da, sinir iyileşmesinin daha iyi anlaşılmasına yardım etmiştir. Sinirin tübüler yapısını Du Trochet; sinir kılıfının hücresel komponentlerini Schwann; ince yapısını von Gerlach, Nissl, Waldeyer; aksonları Golgi; myelini Weigert; tarifledi. Periferik sinir cerrahisinin makroanatomisi ve sinir rejenerasyonunun esaslarının anlaşılması 20.yüzyıl başlarını bulmuştur.

Koaptasyon tekniklerine bakıldığında ilk tarifi 17.yüzyılda Gabriele Ferrara tarafından verildiğini ve dikişlerin kırmızı şaraba yatırılmış tendonla atılmış olduğu görülür (21,58). Epinöral sütün Hueter tarafından bulunması 1873, Tubulizasyon tekniğinin Gluck tarafından tanımlanması 1880, operasyon mikroskoplarının kullanıma girmesi 1963 ve ardından Bora tarafından İnterfasiküler tekniğin ortaya konması 1967 tarihini bulmuştur (20). Periferik sinir cerrahisinde, bugün modern sinir cerrahisinin temelini oluşturan ilk bilimsel çalışmalar Seddon tarafından 1948 yılında yapılmıştır. Seddon, sinir hasar mekanizmalarının, yaralanma derecelerinin, takip ve tedavi seçeneklerinin üzerine çalışmalar yapmış ve sinir hasar derecesini belirtmek için Seddon sınıflamasını geliştirmiştir. Sunderland, 1945 ile 1968 yılları arasında yaptığı pek çok çalışmada, sinir hasar mekanizmalarını daha da detaylandırmış ve çeşitli onarım tekniklerini geliştirmiştir (60). 20.yy da üzerinde geliştirilen uç-uca onarım teknikleri yanında Seimionow ve ark.'nın 2001 de tanımladığı uç-içe onarım tekniğide diğer tekniklerden birkaç farkla öne çıkmıştır (61). Ülkemizde ise aynı şekilde periferik sinir cerrahisine yönelik ilk olgular 15. Yüzyılda Şerefeddin Sabuncuğlu tarafından kaleme alınan "Cerrahiyetul Haniye" adlı eserde bildirilmiştir. Sabuncuoğlu, siyatalji için siyatik sinirlere koterizasyon yapıldığı, buna bağlı olarak da sinir hasarı ile başvuran hastaları olduğunu bildirmiştir (57,59).

1. Dünya Savaşı dönemlerine gelindiğinde ise Gülhane’de Cerrahi Klinik Şefi Prof. Dr. Murat Cankat, savaşa askeri operatör olarak katılmış, dönemin diğer cerrahları gibi cerrahi deneyimlerinin ve bu arada periferik sinir cerrahisi girişimlerinin büyük kısmını savaş cerrahisi üzerinde geliştirmiştir. Murat Bey’in 1947 de kaleme aldığı “Muhit Sinirleri Cerrahisi” adlı kitap ülkemizde periferik sinir cerrahisi alanında yazılmış ilk eser özelliğini korumaktadır.

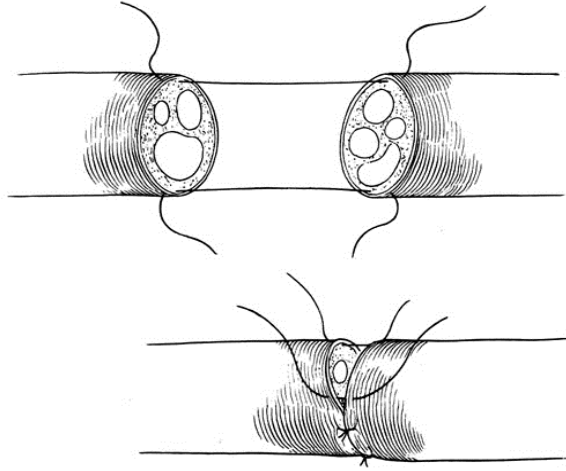
2.3.2. Periferik sinir onarım prensipleri ve koaptasyon yöntemleri

Periferik sinir yaralanmalarının onarımında operasyon zamanlaması önemlidir. Sinir yaralanmasının hemen ardından ilk 5 gün içinde yapılan onarıma “primer onarım”, 5-7. günler arasında yapılabilecek “geç primer onarım”, 1 haftayı aşan onarımlara ise “sekonder onarım” adı verilir (62). Sinir onarımı için en uygun zaman yaralanmadan sonraki mümkün olan en erken dönemdir. Erken dönemde fasiküler dizilimin proksimal ve distal uçlarının karşı karşıya getirilmesi halinde gerginlik minimal olur. Daha geç dönemlerde ise segmentlerde retraksiyon ve sinir uçlarında skar dokusu gelişir. Bu dönemde onarım sırasında genellikle gerginlik söz konusudur. Ek olarak, zaman geçtikçe hedef organlarda atrofi gelişir ve irreversibl kas hücre kayıpları olur. Bir diğer önemli faktör ise rejenere olan aksonların uygun hedef organlara yönlendirilmesidir. Bu şartta en iyi şekilde proksimal uçtaki aksonların distal uçtaki ilgili Schwann hücre tüplerine cerrahi olarak karşı karşıya getirilmesi ve bunun mümkün olduğunca tansiyonsuz yapılması ile sağlanır.

Sinirlerin koaptasyonu (karşılıklı olarak uç uca getirilmesi) ile ilgili olarak pek çok teknik tanımlanmıştır.

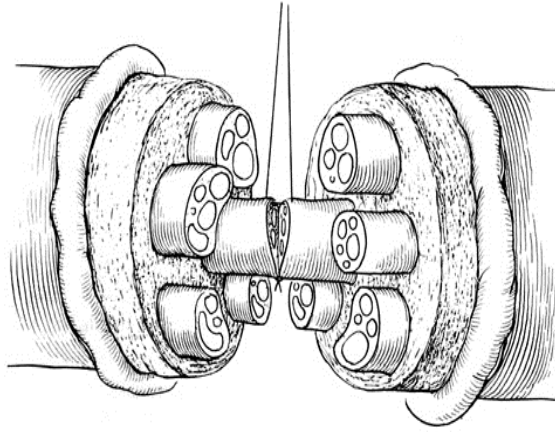
Uç-uca onarım tekniklerinden

- 1- Epinöral onarım tekniği: Distal ve proksimal karşılıklı güdüklerin epinöryumlarının birbirine dikilmesidir. Klinikte en sık kullanılan yöntemdir. Asıl dikkat edilmesi gereken şey, sinir ağızlaştırılırken 10/0 ile 25 büyütme altında içerdeki fasiküllerin tam olarak karşılıklı gelmesini sağlayacak en az sayıda ve çok sıkı olmayan dikişler konmasıdır (Şekil 6). Araya yumuşak doku girmemesine ve sinir fasiküllerinin dışarıya taşmamasına özen gösterilmelidir. Teknik olarak kolay, operasyon zamanının kısa olması, daha az büyütme ile yapılabilmesi, intranöral içeriğin intakt kalması bu tekniğin avantajlarıdır. Dezavantajları ise; tam bir fasiküler uyum sağlamaması, sinir dokusunda defekt olmasa bile sinirlerin retraksiyonu nedeniyle arada gap oluşumuna neden olabilmesi ve teknik eğitimi almamış kişilercede uygulanabilir bir teknik olmasıdır.



Şekil 6. Sinir epinöral onarım tekniği.(Grenn DP, Hotchkiss RN, Peterson WC, Nerve repair and grafting, Grenn's Operative Hand Surgery, Churchill, Livingstone, s1387; 1993)

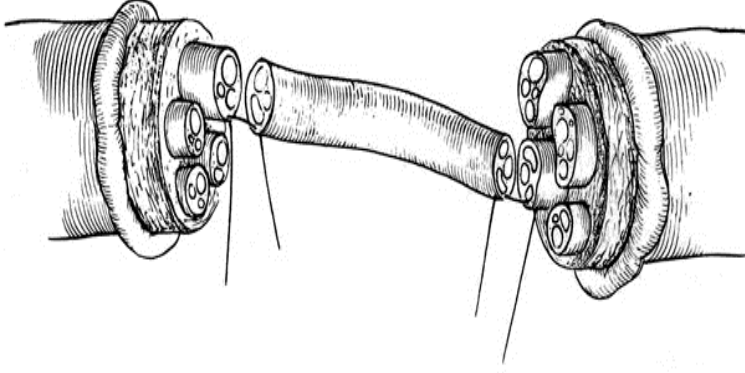
- 2- Perinöral (Fasiküler) onarım tekniği: Fasiküller tek tek karşılıklı getirilerek perinöryum tabakaları birbirine dikilir (Şekil 7). Fasiküler onarımda her fasikülün 25 büyütme altında 10/0 suturla 2-4 adet dikiş ile tutturulması genellikle idealidir. Avantajları; daha iyi fasiküler uyum sağlaması ve dolayısıyla motor ve duysal iyileşme şansının daha çok olmasıdır. Dezavantajları ise operasyon zamanı daha uzun olması, anastomoz sahasında fazla sutur doğal olarak daha fazla fibrozis oluşmasıdır.



Şekil 7. Sinir fasiküler onarım tekniği. (Grenn DP, Hotchkiss RN, Peterson WC, Nerve repair and grafting, Grenn's Operative Hand Surgery, Churchill, Livingstone, s1387; 1993)

- 3- Grup fasiküler onarım tekniği: Proksimal ve distal güdükler incelenerek güdüklerdeki fasiküller değerlendirilir ve 3-4 mm disseksiyon sonrası mümkün olan en az dikiş ile fasikül gruplarına karşılıklı koaptasyon yapılır. Motor ve duyu liflerinin tanımlanabildiği daha distal sinir lezyonlarında bu tip onarım fonksiyonel homojenite gösteren fasikül dizilimi sağlar.

4- Epiperinöral onarım tekniği: Teknik olarak epinöral tekniğe benzemekle beraber, proksimal ve distal güdük karşılıklı olarak epinöral geçilen suturlar, perinöral tabakadan da geçilmektedir. 25 büyütme altında 10/0 sutur ile 4 adet dikiş yeterlidir. Bu yöntemin üstünlüğü aşırı intranöral diseksiyon gerektirmemesi ve az sayıda dikişle fasikül oryantasyonunu sağlayabilmesidir.



Şekil 8. Sinir yanlış fasikül eşleştirilmesi. (Grenn DP, Hotchkiss RN, Peterson WC, Nerve repair and grafting, Grenn's Operative Hand Surgery, Churchill, Livingstone, s1387; 1993)

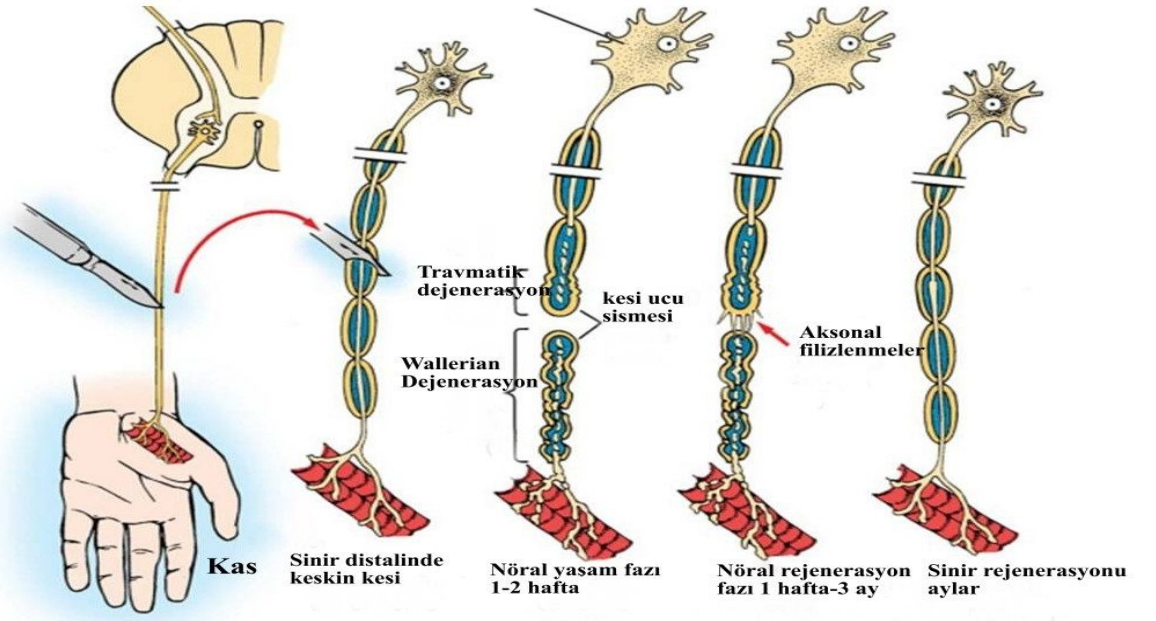
Daha sonrasında uç-yan, yan-yan onarım teknikleri ve Sieminow ve ark. larının geliştirdiği Sleeve tekniği koaptasyon yöntemleri arasına girmiştir (61,63,64).

5- Diğer yöntemler: Koaptasyon için kullanılan sutur materyalleri ve cerrahi manipülasyon sırasındaki travmaya sekonder gelişen fibrozis, sutur kullanılmadan yapılacak olan onarım yöntemleri üzerinde bir arayışa neden olmuştur. Lazer ile onarım bu yöntemlerden biridir. Burada kesik segmentler 2 sutur ile karşılıklı getirilerek sonrasında lazer ışınları ile uçlar birbirine tespit edilir.

Bu yönteme klinisyenleri yönlendiren aksonların dışarı çıkmasını engelleyen bir yöntem olmasıdır ancak bu yöntemle uçlar arasında yeterli gerim sağlanamadığı gösterilmiştir. Siyanoakrilatlar ve fibrin doku yapıştırıcılarıda koaptasyon amacıyla kullanılan diğer materyallerdir (65-76). Ancak onarım sahasında inflamatuvar reaksiyon oluşturmaları ve yeterli tensil kuvveti sağlayamaması sadece normalde dirençsiz primer sinir onarımlarında tek başına fibrin doku yapıştırıcılarının kullanımını konvansiyonel sutur teknikleri içine sokmuştur (72,74).

Aksonların rejenerasyonu sırasında manipulasyonuda mümkün olan trofik etkileşimler söz konusu olabilir (53,54). Ne kadar da genel mikrocerrahi uygulamalarının erken dönemde sinir onarımlarında büyük fayda sağladığı bir dönemde olsakta birçok periferik sinir hasarının sinir gövdeler arasında gap ile sonuçlandığı bilinmektedir (55). Cerrahi onarım sinirde oluşan gap aralığı, ratlarda 1 cm, insandışı primatlarda ise 3 cm olduğunda fonksiyonel geri dönüş açısından olumsuz sonuçlara haizdir (şekil 8) . Periferik sinirler, 10-15 mm gibi kısa sinir defekti söz konusu ise rejenere olma kapasitesine sahiptirler (şekil 9). Sinir uçları arası defekt arttıa iyileşme de olumsuz etkilenir. Onarım sahasında gerginlik ucuca suturu zorlaştırdığı gibi postoperatif gerilme ve onarım sahasında ayrılmaya neden olabilir.

Bu durumlar, 2 segment arasına sinir grefti yerleştirilmesi yada konduit uygulaması gibi yöntemleri akla getirmiştir. Periferik sinir onarımında ; Allogreftler, xenogreftler, kan damarı, kas dokusu, tp membran ve diğer biyolojik aktif materyaller olduğu kadar kollajen, dekalsifiye silikon tüp, kemik tp, naylon fiber tp, poliüretan tp gibi sentetik alternatif yöntemler arayışına gidilmiştir.



Şekil 9. Periferik sinirde keskin bir cisim kesisi sonra oluşan fizyolojik değişiklikler. (Jobe M.T. and Martinez S.F. (2007): Chapter 59. Peripheral Nerve Injuries. Edt: Canale S.T. Campbell's Operative Orthopaedics 11th edition, Mosby, Philadelphia PA, 3636-3797)

Bu materyaller, sinir rejenerasyonunda tüp oluşumunu sağlayarak aksonal filizlerin bir doğrultuda ilerlemesine katkı sağlar (67,83,84). Otojen materyaller vücut dokularıyla iyi uyum sağlarken tubuler kollaps, kötü rejenerasyon, skar dokusu oluşumu ve iskemi sonrası adezyon gibi potansiyel komplikasyonlar içermektedir. Biyolojik olmayan materyallerin ise vücut içinde yıkılma sorunu olmazken yabancı cisim reaksiyonu oluşturma riskleri mevcuttur.

En başarılı anastomozlarda bile, büyük sayılarda akson, yanlış yönlendirilmiş olduğundan, periferik sinirin yaralanma öncesindeki haline göre çok farklı sensorial ve motor innervasyon ortaya çıkar. Bu nedenle ameliyat sonrası rehabilitasyon başarı şansını arttırmak için kaçınılmazdır.

2.4. Kök Hücre Kavramı

Kök hücre, son yıllarda tıbbın en çok üzerinde durduğu, her yıl yüzlerce çalışmanın yapıldığı bir konudur (86,87). Kök hücre uygulamaları günümüzde onko-hematolojik, nörolojik, immünolojik ve metabolik hastalıkların tedavi alternatifleri arasına girmişken, doku mühendisliğinde kök hücre kullanımları başta olmak üzere plastik ve rekonstrüktif cerrahide de tedavi şemalarına girmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (89,99).

Kök hücreler iki farklı kaynaktan elde edilebilirler (88,93,94);

1- Embriyonik Kök Hücreler (EKH): Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilir. Pluripotenttirler. Embriyonik gelişim sürecinde dokuların temel kaynağıdır.

2- Embriyonik Olmayan Kök Hücreler: Farklılaşmış kaynaklardan elde edilir. Multipotenttirler. Köken aldıkları özelleşmiş doku ve ilişkili diğer dokular gelişir.

- Erişkin kök hücreleri
- Fötal kök hücreleri
- Partenot hücreleri (partenogenezis)
- Kadavradan elde edilen kök hücreler olmak üzere gruplandırılabilir.

Son yıllarda Erişkin Kök Hücrelerin, içinde bulundukları dokudan farklı diğer çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yani “Plastisite” veya “transdiferasyon” yeteneklerinin bulunduğu ispatlanmıştır (89) (Şekil 10).

Erişkin kök hücreleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır.

I – Hematopoetik Kök Hücreler

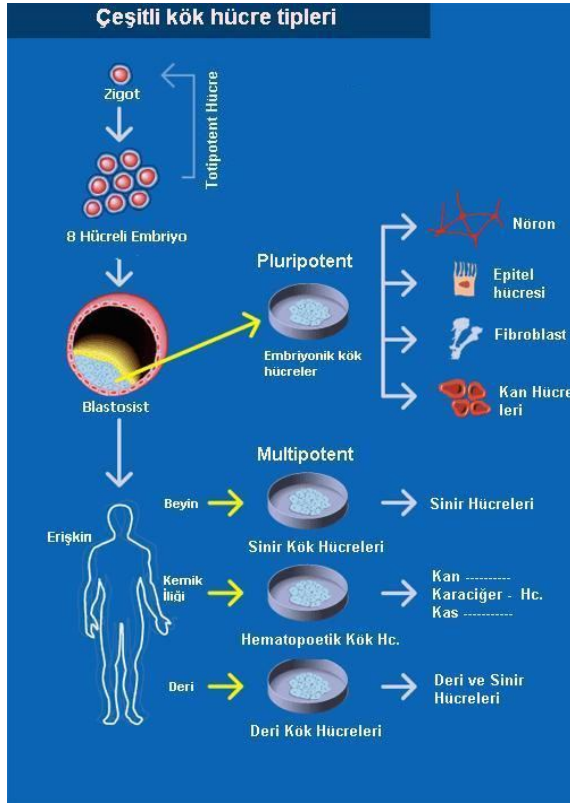
a – Kemik İliği Kök Hücreleri

b – Periferik Kan Kök hücreleri

c – Göbek Kordon Kanı Kök Hücreleri

II – Stromal (Mezenkimal) Kök Hücreler

III – Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri



Şekil 10. Kök hücre tipleri. (Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Sharipo, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science, 282: 1145)

Kök hücre sahasındaki araştırmacılar, bu hücrelerin tedavi amaçlı olarak kullanılmasının önünü açacak olan geniş yelpazedeki araştırmaların peşinden koşmuşlardır. Mezenkimal kök hücrelerin birçok klinik alanda klinik kullanım potansiyeli mevcuttur. Kemik doku tamiri, osteoporoz, kırık onarımı, dejeneratif nöron hastalıkları, kardiyak rejenerasyon, kemik iliği transplantasyonları, konjenital genetik hastalıklar ve sinir hasarlarının onarımı bunlar arasındadır (100,101). Özellikle doku mühendisliğinde kök hücreler kullanılarak elde edilen başarılar, plastik cerrahide geleceğe ışık tutmaktadır.

Bunlara ilaveten kök hücrelerin vadettiği büyük potansiyele rağmen çözölmeyi bekleyen pek çok sorunlarıda bulunmaktadır (176,177);

1. Transplantasyonun başarılı olabilmesi için tüm kök hücrelerin farklılaşması gerekir. Aksi durumda sürekli bölünme ve çoğalma yeteneği taşıyan tek farklılaşmamış kök hücrenin bile varlığı tümör oluşumuyla sonuçlanabilir.
2. Allojen transplantasyondan sonra farklılaşmış kök hücreler alıcı immün sistemi tarafından kendinden olarak tanımadığı zaman immünolojik cevap, verici hücrelerin alıcıya dahil olmasını engelleyebilir. Bu durumda immünsupresif tedavi veya değişik MHC zemini içeren geniş bir progenitör hücre havuzuna sahip olmak ve transplantasyon için uygun olanların kullanılması iyi olabilir.
3. Bazı mezenkimal hücre serilerini başlatan ajan ve faktörler bilinmesine rağmen serilerin gelişimini düzenleyen moleküllerin detaylarının araştırılması gereklidir. Ek olarak mezenkimal hücre kültürleri donöre özgü sitokin seviyeleri gösterir. Böylece doku mühendisliği uygulamaları hastaya özgü serileri uyarıcı ve düzenleyici faktör dozları gerektirebilir.
4. Kök hücre çalışmaları, alıcıya hücre türevlerinin nasıl, nereye ve ne zaman verileceğini ortaya koymalıdır. Aynı zamanda bu hücrelerin potansiyellerinin değişip değişmeyeceği, istenen forma ulaşabilmek için yapısal çatıya ihtiyaç olup olmadığı ve genetik olarak nasıl değişeceği mevzuu net bir şekilde tartışılmalıdır.

2.4.1 Kök hücre plastisitesi

Kök hücrelerini diğer hücrelerden ayıran 5 ölçüt ortaya konmuştur;

- 1- Kök hücreler özelleşmemişlerdir.
- 2- Kök hücreler uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneğine sahiptirler.

- 3- Kök hücreler, hasar gören alıcı dokuya nakli sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilmelidirler.
- 4- Kök hücrelerden elde edilen bir yavru hücre, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir.
- 5- Kök hücreleri invivo ortamda doku hasarı olmadığı durumlarda bile farklılaşmış kuşaklara katkı sağlayabilir.

Teorik olarak embriyonik kök hücreler, hiç farklılaşmamış aşamada invitro olarak sonsuza kadar saklanabilir ve vücudun herhangi bir doku veya hücreğine farklılaşması için yönlendirilebilirler. Normalde kendileri çoğalamayan sinir, kas ve kan hücrelerinden farklı olarak kök hücreleri çok sayıda bölünebilir ve çoğalabilirler. Olgun bir organizmada kök hücre popülasyonunun çoğalmasını ve özgün bir dokunun tamirini gerektiren kadar bu hücrelerin farklılaşmadan kalmalarını sağlayan sinyallerin anlaşılması, önemli bir araştırma sahasıdır.

2.4.2.1 Mezenkimal kök hücre

Erişkin kemik iliği stroması kaynaklı mezenkimal hücreler ilk olarak kemik iliğinden izole edilmiş olmalarına rağmen günümüzde kıkırdak, adipöz doku, kordon kanı, plasenta, göbek kordonu, amniyos sıvısı, dental pulpa, periodental ligament, periferik kan, dermis bağ dokusu ve iskelet kaslarında izole edilebilmektedirler. Hücresel farklılaşma potansiyelleri, gen ekspresyon profilleri, yüzey işaretçileri, bölünebilme sayıları bakımından farklılıklara sahiptir (103-105). Bilindiği kadarı ile mezenkimal kök hücreler CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, SH3, Stro-1, CD39, CD49e ($\alpha 5$ -integrin) gibi belirteçleri eksprese ederken, CD34, CD14, CD11b, CD45 gibi belirteçleri eksprese etmezler (106,107).

Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Açısından Avantajları (108-111):

- Konnektif doku kökenli olmaları nedeniyle stromal destek sağlayarak ilgili doku hücrelerinin gelişimine ve fonksiyonuna katkı sağlamaları,

- Farklılaşma yeteneklerinin fazla olması;

a) Kendi köken aldığı konnektif doku hücreleri olan kas, yağ, kemik, kıkırdak, stromal hücreler, tendon, ligament gibi

b) Diğer doku hücrelerine farklılaşma özelliği (transdifferansiasyon): Nöron, hepatik, pankreatik hücre gibi

- Hasarlı hücre ile füzyon yeteneklerinin olması,

- Biyoaktif maddeler, çözünür faktörler (büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler gibi) salgılayarak hasarlı hücre / doku tamirine katkı sağlaması,

- Migrasyon özellikleri sayesinde hasarlı dokuya ulaşabilmeleri,

- İmmünsupresif / non-immünojenik özellikte olmaları,

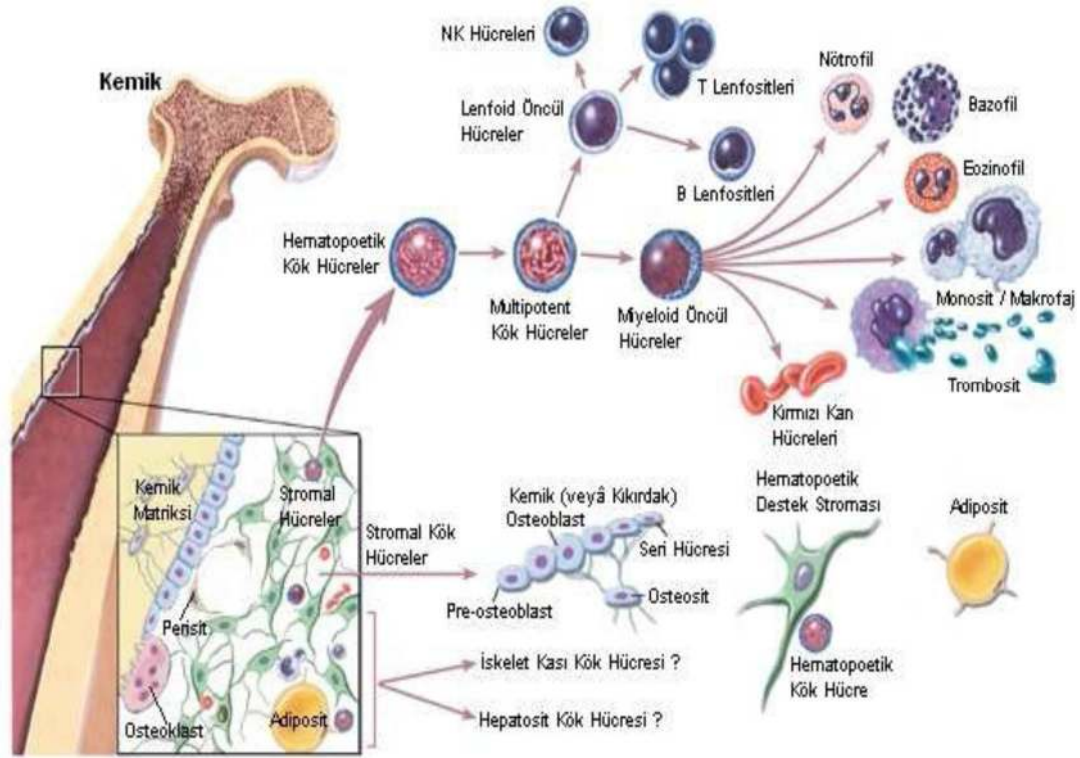
- Anjiojenik, antiapoptotik, antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle doku onarımına katkıları,

- Gen transferi kolaylığı ve dayanıklı olmaları nedeniyle gen tedavisi için uygun olmaları,

- Enzimler salgılayarak kalıtsal hastalıklardaki enzim defektlerinin yerine konulabilme potansiyeli bulunması;

MKH'lerin öne çıkmasını sağlamaktadır. Araştırmacılar, verici hücrelerine retrovirüsler kullanarak GFP sorumlu reseptör genini yerleştirmişlerdir. Bu geni eksprese eden hücreler, parlak yeşil renk veren bir proteinin üretilmesini sağlar ve hücre klonlarını izlemek ve tanımlamak için kullanılır.

Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun **mikroçevre** koşullarında başta konnektif doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır (98,109,110). Caplan ve ark.'nın ardından çeşitli araştırmacılar in vitro koşullarda uygun stimulanlarla osteojenik, adipojenik, kondrojenik ,miyojenik farklılaşma kapasitelerini ve hemotopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir (96). İlerleyen zamanda MKH'lerden pankreas beta hücreleri, hepatosit, endotel ve epitelooid hücrelere dönüşüm olduğu, yine uygun koşullar sağlandığında, nöronal hücreler (nöron, glial hücre, astrosit) geliştiğinde gösterilmiştir (Şekil 11). Bunlar içinde, özellikle nörona farklılaşmanın mümkün olup olmadığı halen tartışmalıdır. Uygun stimulanlarla nöronal morfolojiye sahip ve nöronal antijenleri taşıyan hücreler görülmekle beraber bu hücrelerin gerçek nöron özelliklerinde ve fonksiyonunda olduğu kanıtlanmamıştır.



Şekil 11. Kemik iliğindeki stromal ve kök hücrelerin farklılaşması.

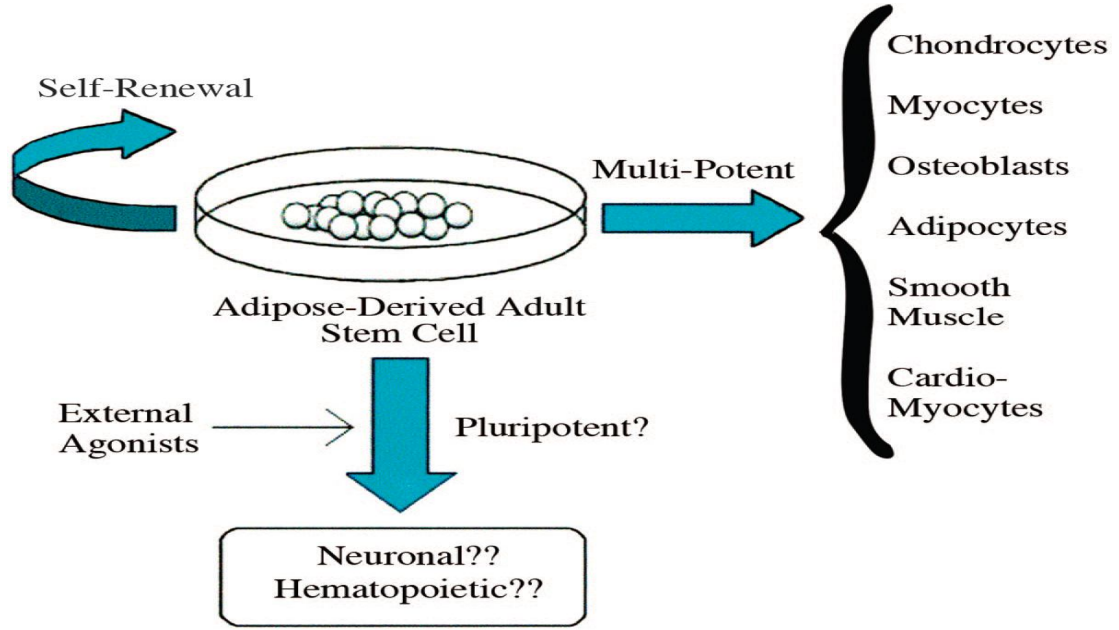
Farklılaşma çalışmalarında hedeflenen farklılaşmış hücrelere dönüşüm olup olmadığını göstermek için histokimyasal, immünhistokimyasal veya immünfloresan yöntemler kullanılarak özgül işaretler araştırılır. Ayrıca ekspresyon analizleri ile de farklılaşmalar teyit edilir ve kantitatif yöntemlerle de karşılaştırmalı analizler yapılabilir.

Mezenkimal kök hücreler, biyolojik özellikleri nedeniyle hasarlı organ tamiri için önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu hücrelerin yaygın kullanımını zorlaştıran en önemli faktör, dokularda çok az sayıda olmaları nedeniyle klinik kullanım için in vitro olarak çoğaltılmaları gereğidir. Araştırma amaçlı çoğaltılmaları kolaylıkla mümkün olduğu halde, klinik uygulamaya uygun MKH geliştirilmesi, uluslararası standartta hücresel tedavi altyapısını gerektirmesi nedeniyle oldukça iddialı bir tedavi yaklaşımıdır.

Yakın bir gelecekte, mezenkimal kök hücre biyolojisine ilişkin soru işaretlerinin kaybolması ve böylelikle yeni tedavi alternatifleri için faz-2 ve faz-3 klinik çalışmalarına geçilmesi ümit edilmektedir.

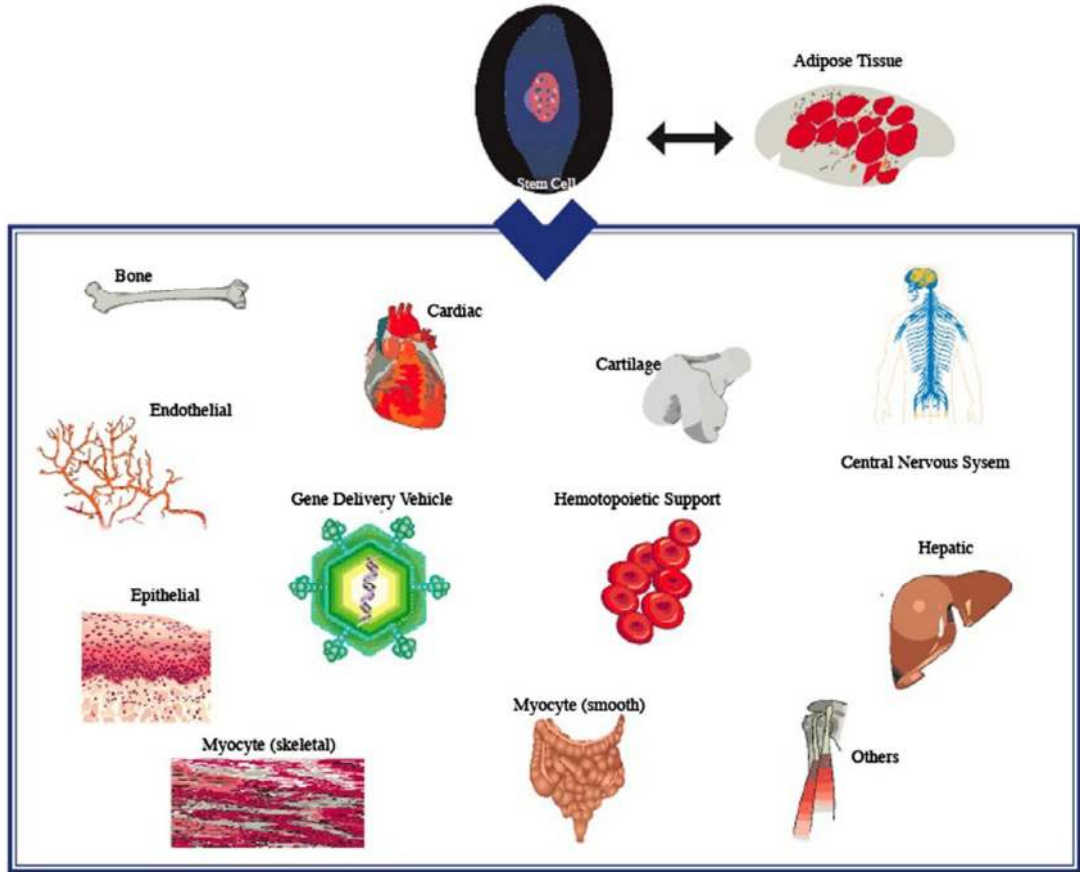
2.4.2.2 Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücre

Adipöz doku, aynı kemik iliği gibi embriyonik mezodermden kaynaklanan heterojen stromal kök hücre kaynağıdır (111)(Şekil 12). Bu stromal hücreler, aralarında daha az farklılaşmış olduğu düşünülen stromal damarsal hücrelerinde olduğu, olgunlaşmanın çeşitli aşamalarındaki adiposit hücrelerini içermektedir (Şekil 12).



Şekil 12. Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sistematik olarak differansiyasyonu.(Horwitz E. Stem cell plasticity: A new image of the bone marrow stem cell. Curr Opin Pediatr. 2002;15:32)

Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin immunhistokimyasal analizleri üzerine şu ana kadar olan çalışmalarda ; Nestin, Desmin, Vimentin, Beta tubulin, Aktin(c-2), Alfa-düz kas aktin, Osteonektin, Osteokalsin, M2193, BMP4, MEPE, Miyozin II zincir, Fibronektin, GFAP, Beta 3 tubulin, OCT-3, SSEA-4 differansiyasyon markerları kullanılmıştır (112,113).



Şekil 13. Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklı hücrelere dönüşüm potansiyeli. (Bruce A.B, Mette F, Christine G, Bindiya P, Cynthia R. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. Methods. 2008;45:115–120.)

2.4.3 Kök hücre çalışmalarının tarihçesi

- 1960'lar J.Altman ve G.Das tarafından yetişkinlerde nörogenez görüldüğüne dair ilk kanıtlar (beyinde kök hücre aktiviteleri) rapor edilmiştir (86).
- 1963 McCulloch ve Till sıçan kemik iliği hücrelerinin kendilerini yenileyebildiğini göstermişlerdir.
- 1969 İki kardeş arasında başarıyla kemik iliği nakli gerçekleştirilmiştir.
- 1978 İnsan kord kanında hematopoietik kök hücreler keşfedilmiştir.

- 1978 İlk IVF bebek İngilterede doğdu.
- 1981 Sıçan blastokistinin iç hücre kitlesinden embriyonik kök hücreler elde edilmiştir.
- 1992 Nöral kök hücrelerin in vitro kültürü yapılmıştır.
- 1994 İnsan embriyonik kök hücreleri izole edilmiştir.
- 1995 A.B.D. Başkanı Clinton insan embriyosu ile ilgili çalışmaları yasaklayan yasayı imzalamıştır.
- 1997 Löseminin hematopoietik kök hücrelerden köken aldığı anlaşılmıştır ve kanser kök hücreleri ile ilgili ilk doğrudan kanıt elde edilmiştir.
- 1998 J.Thomson ilk embriyonik kök hücre kültürünü yapmıştır.
- 2000 Adult kök hücrelerin plastisite yeteneği rapor edilmiştir.
- 2003 S.Shi yetişkin kök hücre kaynağı olarak çocukların ilk dişlerinin kullanılabileceğini keşfetmiştir.
- 2004 H.Woo-Suk insan ookistinden bir kaç insan embriyonik kök hücre hattı yarattığını iddia etmiştir.
- 2005 Türkiye Bilimler Akademisi kök hücre konulu bir rapor yayınlamıştır.
- 2005 Eylül Ülkemizde embriyonik kök hücre çalışmaları yasaklanmıştır.
- 2007 A.Atala amniyotik sıvıdan kök hücre elde ettiğini rapor etmiştir.

2.4.4 Doku mühendisliği

Canlı hücrelerin genellikle polimerlerden oluşan destek, iskelet tabaka (scaffold) üzerinde bu hücrelerin ve dokunun biyolojik işleyiş ve organizasyonunun oluşturulmasına yönelik multidisipliner bir bilim olan doku mühendisliği, temelinde hücre kültürü çalışmalarında olduğu gibi canlı hücreler, matriks oluşumu ve hücre differansiyasyonuna dayanır (113,114). Son zamanlarda iyileşmeyen nöronal hasarlara yönelik geliştirilen sinir doku mühendisliği kök hücre kullanımınıda içerir. Sinirin 3 boyutlu yapılanmasını örnek alan çalışmalar ile, üç boyutlu, gözenekli, lifsi ya da üzerinde kanallar olan zarlar geliştirilmiştir (116). Geliştirilen bu yapay sinir dokusunun doğal nöronal yapıyı taklit edecek boyutta lifler ve mikrodeseenli polimerik zarlardan oluşan hücre taşıyıcıları kullanarak hücrelerin yönlendirilmesi aşaması hala üzerinde araştırmaların devam ettiği bir konudur (117-128).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Çalışmaya, Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu(DEHEK) tarafından onay alındıktan hemen sonra başlanmıştır(31.05.2010/17). Çalışmamızda kullanılan bütün deney hayvanları Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkez (DÜSAM)'inden temin edildi. Ratların gruplandırılması Tablo 1 de gösterildiği şekilde yapıldı. 32 adet normal motor aktiviteye ve %87 homojeniteye sahip, 250-300 gr. ağırlığında Wistar albino dişi rat kullanılarak, 4 eşit grup oluşturuldu (n:8). Preoperatif 3 gün boyunca ratların ortama adapte olması sağlandı. Bununla birlikte preoperatif 6 saat boyunca su ve yem kısıtlaması yapıldı (129).

Çalışma grupları:

Her grupta randomizasyon yöntemine göre seçilen 8'er rat olmak üzere 4 grup olarak tasarlandı (130).

- Grup 1 (n=8): Kontrol grubu; Sıçan sol siyatik sinirde oluşturulan 1 cm lik defektin yalnızca epinöral kılıftan oluşan tüpe konan 4 adet dikişle onarıldığı 4. ayda sakrifiye edilen grup.
- Grup 2 (n=8): Sıçan sol siyatik sinirde oluşturulan 1 cm lik defektin, epinöral kılıftan oluşan tüpe konan 4 adet dikişle onarılmasına ek olarak tüp içi sAD-MKH enjeksiyonu yapılan, 21. günde sakrifiye edilen grup.
- Grup 3 (n=8): Sıçan sol siyatik sinirde oluşturulan 1 cm lik defektin, epinöral kılıftan oluşan tüpe konan 4 adet dikişle onarılmasına ek olarak tüp içi sAD-MKH enjeksiyonu yapılan, 2.ayda sakrifiye edilen grup.
- Grup 4 (n=8): Sıçan sol siyatik sinirde oluşturulan 1 cm lik defektin, epinöral kılıftan oluşan tüpe konan 4 adet dikişle onarılmasına ek olarak tüp içi sAD-MKH enjeksiyonu yapılan, 4. ayda sakrifiye edilen grup.

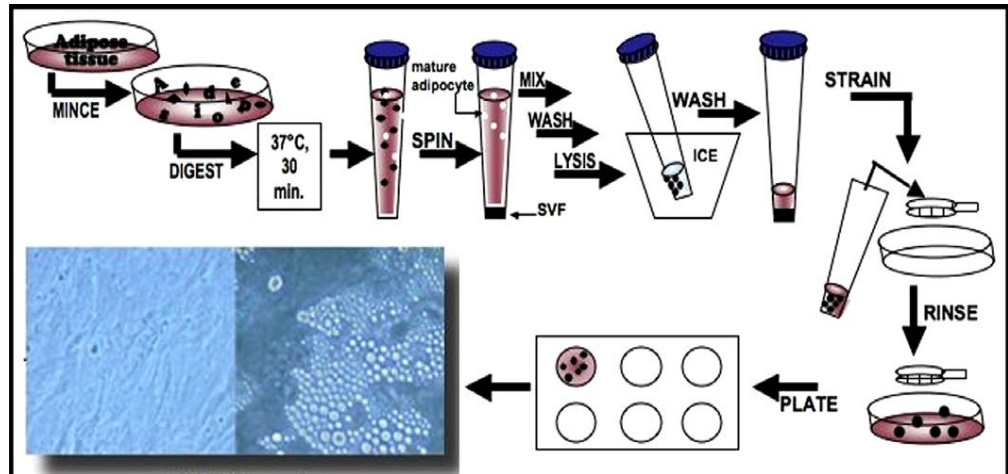
Tablo 1. Denek grupları ve uygulama prosedürlerinin şematize edilmesi.

Gruplar	Denek sayısı	Uygulama	Walking Track ve uyluk çevresi ölçümleri	Sakrifikasyon zamanı	Elektrofizyolojik inceleme
1. Grup	8 (1 ex)	1cm EpinöralTubulizasyon	21.gün- 2.ay- 4.ay	4.ay	4.ay
2. Grup	8 (1 ex)	1cm Epinöral Tubulizasyon ve intra tubal sAD-MKH uygulaması	21.gün	21.gün	21.gün
3. Grup	8 (1ex)	1cm Epinöral Tubulizasyon ve intra tubal sAD-MKH uygulaması	21.gün- 2.ay	2.ay	2.ay
4. Grup	8 (1ex)	1cm Epinöral Tubulizasyon ve intra tubal sAD-MKH uygulaması	21.gün- 2.ay-4.ay	4.ay	4.ay

3.2. sAD-MKH'lerin İzolasyonu, İşaretlenmesi ve Kültüre Hazırlanması

Sıçan adipoz dokusundan MKH'lerin izolasyonu için; laboratuara gelen adipoz doku %1 oranında penisilin-streptomisin içeren HBSS ile birkaç kez yıkama işleminden geçirilerek makasla 1cm³lik küçük parçalara ayrıldı. Yıkama işleminden sonra dokular kuru bir petriye alınıp makas yardımıyla mins edilerek ve üzerine Ca ve Mg içermeyen HBSS ile hazırlanmış %0.075'lik tip 1 kollajenaz solüsyonundan 2ml koyularak doku örnekleri 15ml'lik falkonda toplandı. Son volüm, kollajenazla 5ml'ye tamamlanıp 37°C çalkalamalı su banyosunda 60dk bekletildi.

İnkübasyon sonunda üzerine 5ml HBSS eklenerek 1800rpm'de 10dk santrifüj sonrasında süpernatant atılıp pelet 5ml HBSS ile sulandırılarak 70 µm'lik hücre süzgeci ile süzüldü ve tekrar 1300rpm 'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet üzerine 5ml lysing solüsyon eklenip oda ısısında 5dk bekletildi. Süre sonunda 5ml HBSS eklenerek 1800rpm'de 10dk santrifüj etme işlemi iki kez tekrarlanıp süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pelet üzerine %15 oranında FBS ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren α-MEM kültür besiyerinden 1ml eklenip pipetaj yapılarak 25cm² 'lik kültür kabına ekim yapıldı (Şekil 13) . Gerekli miktarda kültür besiyeri koyulduktan sonra 37⁰C, %5 CO₂ ve nemli ortamda kültüre edildi ve 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek yüzen tüm hücreler uzaklaştırıldı. Haftada iki kez besiyeri değişimi tekrarlandı.



Şekil 13. Adipöz dokudan, adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücre elde edilmesi. (Bruce A.B, Mette F, Christine G, Bindiya P, Cynthia R. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. Methods. 2008;45:115–120)

Flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edilecekler ve bu ilk pasaj (sub-kültür) olarak değerlendirildi. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlanarak 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlandı (118,120,122).

sAD- MKH'lerin Karakterizasyonu:

Sıçan adipoz dokusundan elde edilen MKH'ler kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde izole edildi ve yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelendi. İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik analiz ve immünsitokimyasal işaretleme (İmmunhistokimyasal İşaretleme (İHK) ve İmmunfloresan İşaretleme (İF)) çalışmaları gerçekleştirildi. Gen ekspresyonları, RT-PCR ile belirlendi. Sad-MKH'ler in vitro differansiyasyon kapasitelerinin belirlenmesi için; adipojenik, osteojenik, kondrojenik nörojenik ve hepatojenik farklılaşmaya alındı (125,126).

İmmunfenotipleme:

Akım sitometrik Analiz:

Analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (P1'den P5'e kadar) ve FACS Calibur akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi (92,93). Hücreler, tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra (yaklaşık olarak 8×10^6 hücre) PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikorlar (CD45, CD3, CD90, CD29, CD11b, CD44, CD71, CD106, CD73) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek inkübe edildi (oda ısısında-karanlıkta-45 dak.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edilerek (5dk. 1780rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edilip hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutuldu ve analizi BD Cell Quest TM software programı ile gerçekleştirildi.

İmmünsitokimyasal İşaretleme:

sAD-MKH'lerin immünsitokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P3'de poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (Culture-Chamber- slide-8 well (24/pk)) ekilmiş 2×10^5 hücre/kuyucuk ile gerçekleştirildi. Tutunmanın sağlanması için bir gece inkübasyonun ardından İHK ve İF teknikler kullanılarak Tablo 2 ' ki antikor paneli çalışıldı (Tablo 2).

Tablo 2. IF/IHC antikor paneli.

Primer Antikor	Sekonder Antikor	Reaktivite	Uygulama	Kaynak	Katalog #
Alfa Smooth Muscle Actin Ab-1 (Clone 1A4)	Mouse	r	IF,IHC	Thermo Scientific	MS-113-P
Actin (C-2)	Mouse	r	IF,IHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-8432
CD 34 (C-18)	Goat	r	IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-7045
CD 45 (H-230)	Rabbit	r	IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-25590
CD 105 (Endoglin)	Goat	r	IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-19793
CD146	Rabbit	r	IHC	Abcam	ab75769
Fibronectin (EP5)	Mouse	r	IF,IHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-8422
Nestin R	Mouse	r	IF,IHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-33677
Vimentin (C-20)	Goat	r	IF,IHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-7557

İmmunhistokimyasal İşaretleme (İHC)

İmmunohistokimyasal çalışmalarda, Ultravision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent,HRP (RTU) ve ABC Staining System (for use goat primary antibodies) immunohistokimya kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler PBS'le yıkandıktan sonra metanolle 20 dk. fikse edilecektir. PBS (İnvitrogen) ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok (Normal Sera) serum içeren PBS'de 30dk. inkübe edilerek verilen uygun dilüsyon oranlarında hazırlanan primer antikorlar eklenip oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkama işleminden sonra immunohistokimyasal kit prosedürü aynen uygulanıp son aşamada AEC kromojenle (AEC (RED) Substrat Kit) enzim kompleksi görünür hale getirilecek, Hematoxylin,Gill's Formulation 2 ile çekirdek zıt boyaması gerçekleştirilip kurutulan preparatlar Crystal Mounting Medium ile kapatılıp Leica DMI 4000 Microsystems ışık mikroskopunda analiz edilip görüntülendi (Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır).

İmmunfloresan İşaretleme (İF):

Hücreler metanolle fiske edilip PBS ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok serum içeren PBS'de 30dk. inkübe edildi ve Antibody Diluent ile uygun oranlarında dilue edilen primer antikorlar eklenerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3X2dk yıkama işleminden sonra immunfluoresans çalışmalar için uygun floresans işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30dk. inkübe edildi, son aşama nükleer boya içeren kapatma medyum (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatılarak floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

MKH'lerin GFP ile işaretlenmesi

Plazmid DNA İzolasyonu

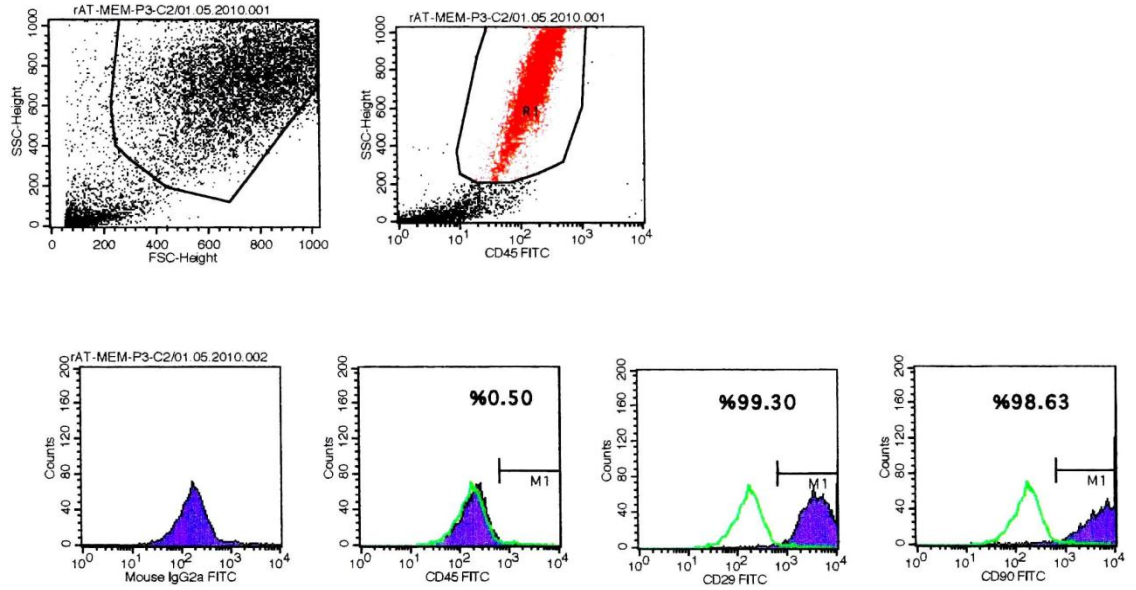
Yüksek kalitede plazmid DNA izolasyonu, ayırma ve saflaştırma işlemleri sonrasında E.coli 'den toksik lipopolisakkaritler gelmemesi için EndoFree Plazmid Maxi Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Seçici katı besi ortamından yeni çoğalmış tek bir koloni alınıp ve 2-5 ml uygun antibiyotik içeren LB broth (Luria Bertani) sıvı besi ortamına ekilerek 8 saat boyunca 300 dak/dev ve 37 °C 'de çoğaltıldı. 250 ml seçici LB ortamı 1 ml içerisinde bakteri çoğalmış ortam ile inoküle edilecek ve aynı koşullarda 12-16 saat bekletildi (114). Hücreler 6000xg hızda 15 dakika boyunca 4 °C 'de döndürölerek toplandı ve 10 ml P1 tampon çözeltisi içerisinde homojen hale getirip oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmeden önce 10 ml Tampon P2 eklenip sertçe 4-6 kez ters çevrilerek karıştırıldı. 10 ml buzda soğutulmuş P3 tamponu eklenerek 4-6 kez ters çevrilip karışım QIAfilter şırıngasına aktarılarak ve 10 dakika bekletildikten sonra filtreden geirtilerek 50 ml tüp içerisine aktarılıp 2,5 ml ER tamponu eklendi ve 30 dk buzda bekletildi. 10 ml QBT tampon çözeltisi ile önceden dengelenmiş QIAGEN-tip 500 kolonuna karışım eklenip süzölmesi beklendi. 2 kez kolon 30 ml QC tamponu ile yıkandı ve 15 ml QN tamponu içerisinde DNA özölde (124). Plazmid DNA 'sı 10,5 ml izopropanol eklenerek 4 °C 'de, 30 dakika boyunca asgari 15,000xg hızla öktürölde, DNA 5 ml endotoksin içermeyen %70 etanol içerisinde yıkanıp 10 dk asgari 15,000xg hızla öktürölcektir. Yıkanmış plazmid DNA 'sı oda sıcaklığında 5-10 dakika kurutulduktan sonra endotoksin içermeyen TE tamponu içerisinde istenilen hacimde özölde.

GFP Gen Transformasyonu:

Gen aktarımı elektroporasyon yöntemini temel alan Neon Transfection Sistemi, 10 µl Neon Kit ve 100 µl Neon Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Yüksek kalitede (endotoksin içermeyen) plazmid DNA 'sı 1–5 µg/µl konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde hazırlandı, MKH'ler ise deneyin olacağı günde % 70-90 konflüente ulaşacak şekilde (transfeksiyon başına $0,5-1 \times 10^6$ hücre) çoğaltıldı. Deney gününde hücreler kültür kabından kaldırıldı ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS'le yıkanıp, 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edilip "Resuspension Buffer R" tampon çözeltisi ile son hücre yoğunluğu 1 ml başına $1,0 \times 10^7$ hücre olacak şekilde hazırlanacaktır. 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine 2 ml serum içeren, seçici antibiyotik içermeyen (penisilin içerebilir, eğer seçici değil ise) uygun besiyeri eklenip ve 37°C 'de 5% CO₂ sirkülizasyonu olan nemli ortamda inkübe edildi (Transfeksiyon parametreleri daha önceden optimize edildiği değerlere göre ayarlandı). Steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine transfeksiyon başına 2- 4 µg plazmid DNA 'sı ve plazmid DNA 'sı bulunan tüp içerisine transfeksiyon başına DNA ile birlikte 10 µl olacak miktarda hücre aktarılıp Neon™ Pipeti ile yavaşça tüp içerisine 10 µl DNA-hücre süspansiyonunun çekilerek ve ucundaki hücre-DNA karışımı ile birlikte Neon™ Pipet İstasyonu içerisinde bulunan ve 3 ml elektrolit tamponu eklenmiş tüpe yerleştirildi. Belirtilen ayarlarda sistem elektrik akımını (atımını/şokunu) uygulanıp, gen aktarılmış hücreler hemen önceden ısıtılmış serum içeren ama seçici antibiyotik içermeyen besi ortamına aktarıldı, hücreler 37°C 'de nemlendirilmiş CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Transformasyon sonrası 3. günde (transient/geçici ekspresyon) ortam değiştirilerek besi ortamı tazelendi, ancak bu noktadan itibaren antibiyotik (pGFP için G418, Kat. No. 11811-098) eklendi. Kalıcı olarak gen ekspresyonu istendiği için 5-10 pasaj boyunca hücreler antibiyotik direncine göre seçildi.

sAD-MKH'lerin immunofenotipik özellikleri

Her alt kültürleme işleminden sonra ayrılan yaklaşık 1×10^6 hücre ile gerçekleştirilen akış sitometri incelemeleri (P1'den P5'e kadar) sonucunda, sAD-MKH'lerin ilk altkültür işleminden itibaren hematopoetik hücre belirtecini (CD45) eksprese etmedikleri, buna karşın MKH'ler için sıklıkla kullanılan CD29 ve CD90 için yüksek düzeylerde pozitif oldukları tespit edilmiştir.

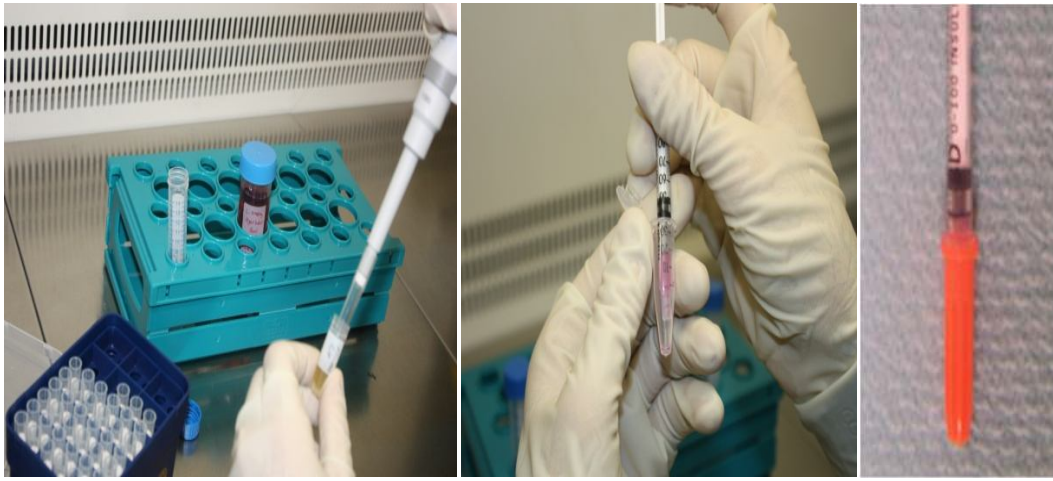


Şekil 14. Pasaj 3'deki sAD-MKH'lerin akım sitometri verileri.

P3'deki sAD-MKH kültürünün MKH'ler açısından daha homojen olduğu düşünülmektedir (Şekil 14). Bu nedenle, İHK ve İF çalışmalarının çoğu ve farklılaştırma çalışmaları bu pasajdaki hücrelerle gerçekleştirilmiştir.

3.3. Kök Hücrelerin Aplikasyona Hazır Hale Getirilmesi

GFP işaretli Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücreler KÖGEM/ Kocaeli Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezinden konik vida kapaklı 15 ml'lik falkon tüpler içinde sıvı nitrojen tankında freez formu ile transfer edildi. Çözme işlemi için hızlı çözme tekniği kullanıldı.



Şekil 15. Shaking işlemi.

Şekil 16. Kök hücrelerin besiyeri ile sulandırılması.

Şekil 17. Aplikasyona hazır adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücreler.

Sıvı nitrojen içerisinde çıkartılan kryptüpler doğrudan 37C deki su banyosuna alındı. İçerik hafifçe çalkalanarak çözüldükten sonra, 1000 mikrolitre MEM/LDME/RPMI-1640 besiyeri ile sulandırıldı (Şekil 15). 1500 rpm de 5 dakika santrifüjleme sonrası oluşan süpernatant atılarak alt kısımda kalan pelete 1 ml daha besiyeri eklendi ve aynı protokol tekrarlandı (Şekil 16). Hücrelerin üzerinde kalan fazla sıvı pipetle çekilerek her birinin üzerine 0,4 ml besiyeri eklendi. Pipetle shaking yapılması sonrasında epinöral tüp içerisine enjekte edeceğimiz Hamilton kateterlerine ayrı ayrı çekilerek her bir kateterde ortalama 1,5 milyon sAD-MKH gelecek şekilde enjeksiyon formları hazırlandı (Şekil 17).

3.4. Cerrahi Teknik

Cerrahi işlemler, 90 mg/kg Ketamine-HCl (Ketalar®) ve 10 mg/kg Xylazin HCl (Rompun®) karışımı ile ratların karın boşluğunun sol alt yarısından intraperitoneal yolla sağlanan anestezi altında gerçekleştirildi. Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından ve standart mikrocerrahi teknikler uygulanarak gerçekleştirildi. Cerrahi girişim sağlamak amacı ile hayvanlar özel tespit tahtaları üzerinde tespit edilip uygun pozisyonlar verilerek işlemler operasyon mikroskobu (OPMI-VARIO 700 /Carl Zeiss/ Germany) ile gerçekleştirildi. Tüm gruplarda sol arka ekstremitte çalışma için kullanılırken ameliyat yapılmayan sağ arka ekstremitte ise kontrol olarak korundu. Sıçanlar, gluteal ve uyluk bölgeleri traş edildikten sonra, prone pozisyonda ayakları tespit edildi ve povidon iodine ile cerrahi alan temizliği yapıldı (Şekil 18). Sol arka ekstremitte kalça eklemi katlantısını izleyecek şekilde oblik gluteal insizyon çıplak gözle yapıldı ve cilt kenarları ekarte edilerek biceps femoris kasına ulaşıldı. Biceps femoris kası, femur ve diz eklemi posterior sınırı boyunca künt diseksiyonla açıldı ve uyluk fleksör ve extansör grup kasları arasından diseksiyon derinleştirilerek siyatik sinire ulaşıldı. Daha sonra sinir, ince uçlu bir diseksiyon makası yardımıyla, siyatik çentikten popliteal alandaki dallanma bölgesine kadar çevre dokulardan serbestleştirildi.

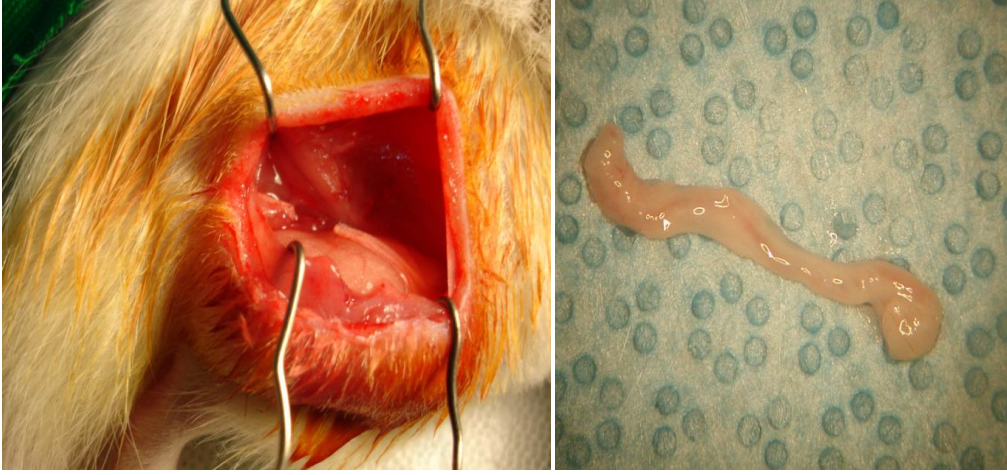


Şekil 18. Cerrahi insizyon sahasının işaretlenmesi.



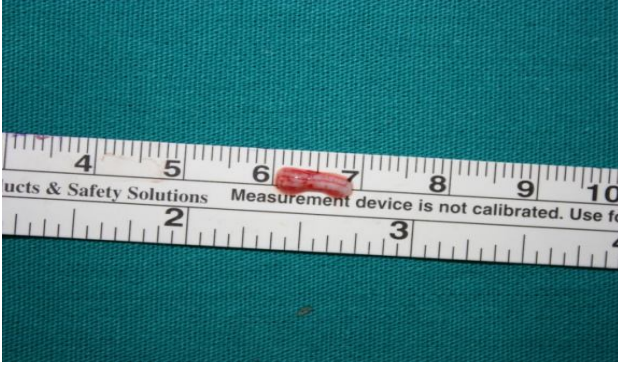
Şekil 19. Rat sol siyatik sinir eksplorasyonu.

Bu aşamada popliteal dallanma noktasının yaklaşık 2 cm proksimalinde siyatik sinirden ayrılan ve biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kasların inervasyonunu sağlayan ince motor dal, çalışma alanını genişletmek amacı ile kesilerek feda edildi (Şekil 19). Kaslar, otomatik ekartör ile ekarte edilerek sinir bifurkasyonunun proksimalinde kalacak şekilde disseke edilen sinirin altına kesi sırasında diğer dokuların zarar görmemesi ve keskin düz kesi yapılabilmesi için ince steril plastik plak konuldu. Siyatik çentikten 0.5 cm çıkışını takiben milimetrik kağıt ile 1 cm ölçülen sinir segmenti (Williams ve arkadaşlarının tariflediği 1 cm'lik siyatik sinir defekti), 16x büyütme altında proksimalde ve popliteal dallanmanın 0.5 cm yukarısından , 15 numara bisturi ile “clean-cut” temiz kesi oluşturularak çıkarıldı (131) (Şekil 20,21). Tüm gruplarda ekstirpe edilen 1 cm lik siyatik sinir segmenti, izotonik dolu bir tase atılarak içerdiği 3 adet fasikül 16x büyütme altında epinöral kılıfı zedelemekten izotonik perinöral enjeksiyonları yardımıyla çıkarıldı (Şekil 22,23).

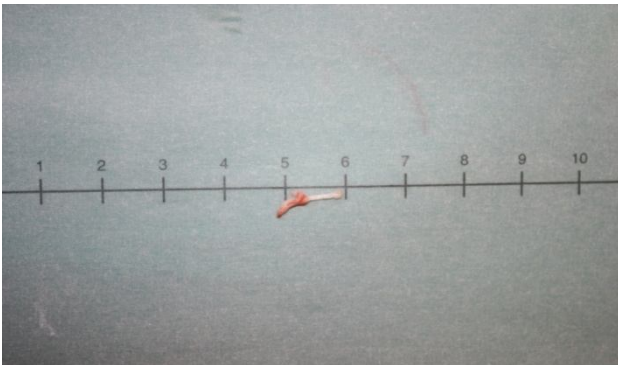


Şekil 20. Rat sol siyatik sinir transeksiyonu.

Şekil 21. 1 cm lik sol siyatik sinir parçasının mikroskopik büyütülmüş şekli.

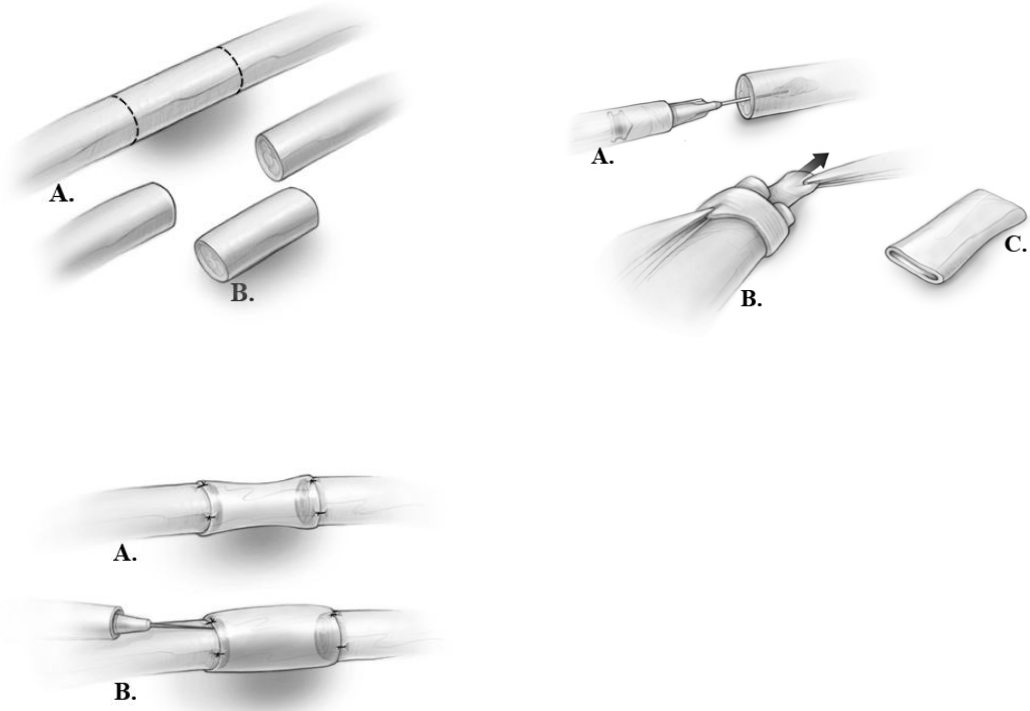


Şekil 22. 1 cm lik sol siyatik sinir parçasının ölçümü.



Şekil 23. 1 cm lik sol siyatik sinirin 3 fasikülünden arındırılması.

Sadece epinöral örtüden oluşan tüp, proksimal ve distal güdük sahalarındaki fasiküllere mikroforsepsler aracılığıyla ağızlaştırılarak, 25x büyütme altında 10/0 nylon (10/0 Doğsan Dylon®) sutur materyali ile epinöral, eşit aralıklı geçilen dört dikiş ile koaptasyonlar tamamlandı.



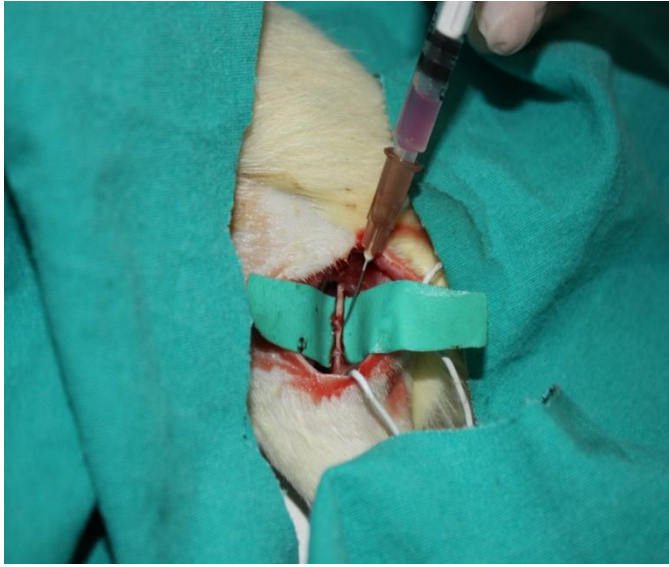
Şekil 24. Denek siyatik sinir defektinin şematize edilmesi.

Şekil 25. Çıkarılan parçanın defasikülize edilmesinin şematize edilmesi.

Şekil 26. Boş epinöral tüpün proksimal ve distal güdük sahalarına tubularizasyonu.

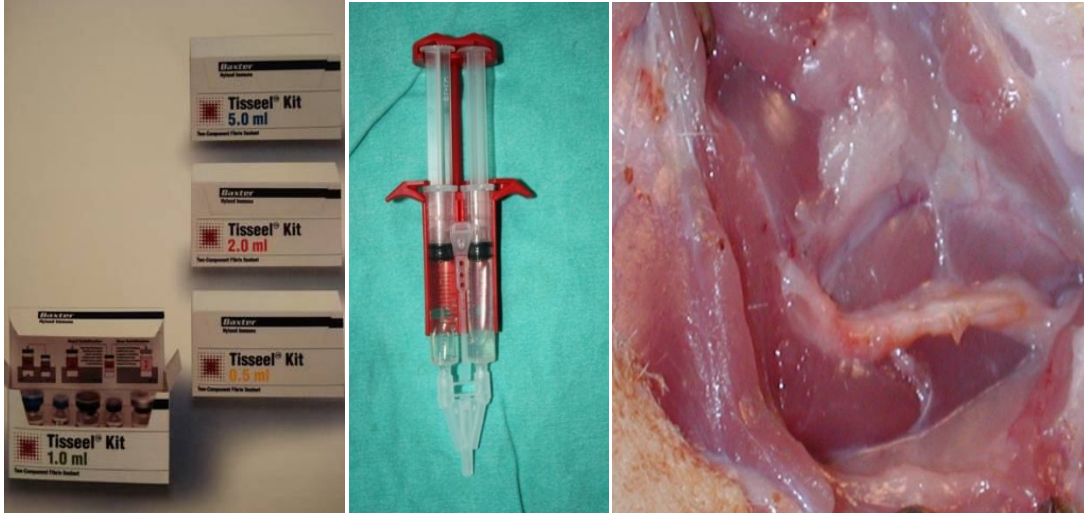
1.grup dışında tüm gruplarda, oluşturulan epinöral tüp içerisine kateterizasyonla yaklaşık 1.5 milyonar ünite sAD-MKH enjekte edildi (Şekil 27).

Kök hücre enjeksiyonu sonrası proksimal ve distal koaptasyon sahalarından kök hücre kaçışını önlemek ve anastomozu desteklemek amacıyla Tisseel® Kit VH Fibrin Sealant (Baxter) uygulandı (Şekil 28,29). Bu bir doku yapıştırıcısı olup 1. Tüpte; Fibrinojen, Faktör 13, Fibronektin, Aprotinin, Plasminojen, 2. Tüpte; Kalsiyum ve Trombin olmak üzere 2 ayrı tüpün karıştırılmasıyla elde edilmektedir.



Şekil 27. Epinöral tüp içine yaklaşık 1.5 milyon Ü. sAD-MKH enjeksiyonu.

Herhangibir denekte anestezi ek doz uygulamasına gerek duyulmadan operasyonlar, sağlanmış olan anestezi süresinde tamamlandı. Operasyonlar sırasında anestezi derinliği klinik olarak değerlendirildi, solunum ve kalp atışları düzenli aralıklarla kontrol edildi. Deneklerde koaptasyonların tamamlanmasının ardından, operasyon sahası izotonikle yıkanarak, kaslar 4/0 vicryl, cilt ise 5/0 ipek sutur materyali kullanılarak devamlı dikiş tekniği ile onarıldı (Şekil 31,32). İnsizyon alanına povidone iyot ile pansuman yapıp, OpSite® sprej (Smith & Nephew) sıkıldı.

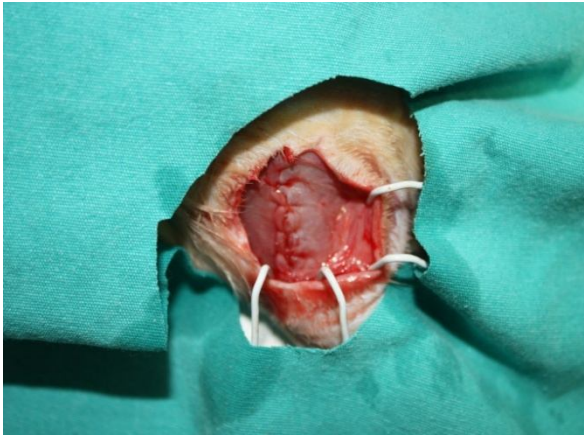


Şekil 28. Tisseel Kit fibrin doku yapıştırıcısı.

Şekil 29. Aplikasyona hazır Tisseel Kit .

Şekil 30. Anastomoz sahalarına kök hücre enjeksiyonu sonrası extratubulizasyonu önlemek için tisseel kit uygulanmış siyatik sinir görüntüsü.

Her sıçanın operasyonunun ardından mikrocerrahi aletler yıkandı ve %2 Gluteraldehit solusyonunda (Cidex®) 15 dakika bekletilerek sterilizasyon sağlandı. Aletler bol steril %0.09 izotonik NaCl ile durulanarak yeniden kullanıldı.



Şekil 31. Kas ve ciltaltı postoperatif onarılmış denek.



Şekil 32. Tam kat cilt insizyonunun kapatılması.

Postoperatif dönem:

Deneklerin vücut ısıları korunarak anesteziden uyanmaları beklenildi. Postoperatif dönemde 2. gruptan 1 rat uyanmadı, exitus kabul edilerek çalışma dışı bırakıldı. Hayvanlar postoperatif dönemde standart laboratuvar şartlarında, uzman veteriner kontrolünde, tek tek kafeslere yerleştirilerek vücut sıcaklıkları uygun ekipmanlarla korunarak izlendi, pelet yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak karşılandı. Ameliyat sonrası dönemde günlük takiplerde insizyon alanlarına epitelizasyon tamamlanana kadar povidon iyodin ile pansumana devam edildi. Otokanibalizasyonu engellemek için deneysel taraf arka ayağa her grup sakrifiye edilene kadar her gün, iritan tadı olan oje (Trind® anti-bite nail repair, Ned ilaç kozmetik) sürüldü. Ratlar tüm işlemler sırasında ayrı ayrı tarihsel kayıt altına alındı ve etiketlendi.

3.5. Makroskopik Değerlendirme

21. gün 2. ay ve 4. ayın sonunda sakrifiye edilmemiş olan tüm gruplardaki sıçanların gözle incelenmesinde, normal bacak postürü, yere ayak yada topuk basma özellikleri (Şekil 33), bacak fleksör kaslarında atrofi gelişip gelişmediği (Şekil 34), bası yaralarının olup olmadığına bakıldı, ayrıca insizyon hattı özelliklerine (enfeksiyon, kronik yara vb.) dikkat edildi.



Şekil 33. Herhangi bir muameleye maruz kalmamış sağlıklı bir denek arka ekstremiteleri.

Şekil 34. Postoperatif 2.ay tırnaklarda körelme izlenen bir denek.

Şekil 35. Bilateral gastrocnemius kası ve siyatik sinir karşılaştırılmalı makroskopik görüntüsü.

Haftalık sol uyluk çevresi ölçümleri yapılarak kaydedildi. Uyluk çevresi ölçümleri sakrifikasyon öncesinde diğer arka ekstremit uyluk çevreleri ile kıyaslanarak istatistiki olarak incelendi (132,133).

Tüm denekler anestezi altında prone pozisyonda iken siyatik sinir ekstirpasyonlarını takiben deney (sol) tarafı ve kontrol (sağ) taraf gastrocnemius kasları, medial başı medial epikondilden lateral başı lateral epikondilden ve distali tuber kalkanei den ayrılarak total olarak bisturi ile kesilerek eksize edildi, hassas terazi ile tartıldı (Şekil 35). Ortalama ağırlıkları sağlam tarafta 3.5-4 gr arası, deney tarafında ise 2.1-2.9 gr arasında seyrediyordu. Gastrocnemius kası deneysel/ kontrol bacak kas ağırlık oranları kıyaslandı.

3.6. Fonksiyonel Değerlendirme

Siyatik sinir rejenerasyonunun fonksiyonel takibinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (134-139). Bu yöntemler arasında siyatik sinir fonksiyon indeksi, başparmak yayılma testi, ekstensör postural zorlama, nosiseptif fonksiyon testi, gastokinemius ve soleus ağırlık ve/veya hacim ölçümü ve kinematik ölçümler sayılabilir.

3.6.1. Yürüme (Walking track) analizi

Walking Track analizi, siyatik sinir yaralanmasından sonra fonksiyonel iyileşmeyi ölçmek amacıyla, non-invaziv motor iyileşmeyi gösteren ve yaygın olarak kullanılan bir metoddur.

Medicaneli ve arkadaşları 1982 de ilk bu metodu tanımladıklarında yürüme koridorunun tabanında Xray film sererek, ratların pençelerini developer denen solusyona boyayarak yürüme sırasında görüntü kaydetmişlerdir (136,137). Daha sonra bu tip çalışmalarda A4 beyaz kağıt, vazelin, mürekkep vs gibi nontoksik materyaller kullanılarak teknik, Dijkstra ,Bervar ve arkadaşları tarafından 2000 li yıllarda video kayıtlarıyla desteklenmiştir.

Benzer bir fonksiyonel analiz, peroneal ve posterior tibial sinir lezyonları içinde Bain tarafından geliştirilmiştir (148).

Çalışmamızda sıçanların aynı doğrultuda yürümelerini sağlamak için 9.2 cm eninde 110 cm uzunluğunda, kenarları 13 cm yükseklikte olan ve karanlık oda ile sonlanan buna benzer bir yürüme kulvarı düzeneği hazırlandı. Yürüme koridorunun bir metre uzağına ve koridorla aynı yükseklikte olacak şekilde bir video kamera (Canon EOS 550 D) yerleştirildi. Çevreden gelecek ışık yansımalarını engellemek için yürüme koridoru ve kameranın etrafı ışık geçirmeyen siyah bir örtü ile kapatıldı. Kayıtlar alınmadan önce hayvanlar birkaç kez yürüyüş kulvarında eğitim amaçlı yürütüldü ve hayvanlar kapalı barınağa doğru yürümeyi öğrendikten sonra kulvar zeminine grup ve güne göre ayrı etiketlenirilmiş A4 kağıtları yerleştirilerek ayak izleri alındı (143,144)(Şekil36).



Şekil 36. Yürüme koridoru.

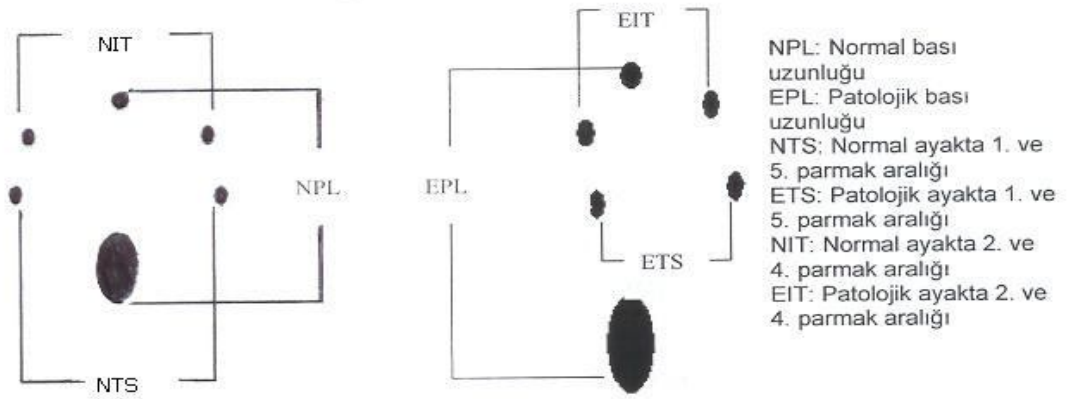
Mürekkebin dağılması, sıçanların yürüme sırasındaki ürinasyonu sonucu izlerin ıslanması ve sıçanın kuyruk hareketleri ile izlerin dağılması durumunda, düzgün ayak izi alınana kadar yürütme işlemi tekrarlandı. Çalışma sırasında sıçanların yürüme paternleri ve adım sikluslarının tüm fazları kaydedildi. Ölçümler için düzgün ve net baskılı ayak izleri seçildi (Şekil 37). Siyatik fonksiyonel indeks ölçümleri için veriler; hem bilgisayar ortamına aktarılan bilgisayar görüntülerinden, hemde klasik yöntemle deneysel taraf ve sağlam olan kontrol tarafından alınan ayak izlerinden elde edildi (Şekil38).

Yürüme analizi; tüm deney gruplarına 21. gün, 2. grubun sakrifikasyonu sonrası 1,3 ve 4. gruba 2. ay, 3. grubunda sakrifikasyonu sonrası 1 ve 4. gruplara 4. ay tekrarlanarak kayda alındı (140-141).



Şekil 37. Sağlam denek footprint.

Şekil 38. Opere edilmiş denek postoperatif erken dönem footprint.



Şekil 39. SFI formülündeki değerlerin tespitinin şematize edilmesi.

Elde edilen veriler, Bain-Mackinnon-Hunter, Siyatik Fonksiyon indeksi (SFI) formülüne yerleştirildi (Şekil 40) .

$$SFI = - 38.3 \times PLF + 109.5 \times TSF + 13.3 \times ITF - 8.8$$

$$SFI = -38.3 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

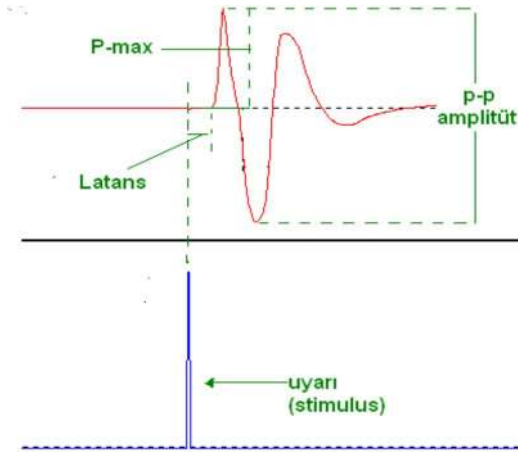
Şekil 40. Siyatik Fonksiyonel İndeks formülü.

Kağıt şeritteki en belirgin ve uygun ayak izleri kullanılarak ayak izlerinde, topuk ile parmak ucu arasındaki mesafe [print length (PL)], birinci ve beşinci parmaklar arasındaki mesafe [toe spread (TS)], ikinci ve dördüncü parmaklar arasındaki mesafe [intermediate toe spread (IT)] milimetrik cetvel aracılığıyla ölçüldü ve deneysel taraf (E), kontrol taraf (N) ile belirtildi (142-147).

SFI ;O değerinde normal kabul edilirken, - 100 e yaklaştıkça siyatik sinir fonksiyonunda totale yakın kayıp olarak değerlendirildi, sonuçlar istatistiki olarak değerlendirildi.

3.6.2. Elektrofizyolojik değerlendirme

Elektrofizyolojik incelemeler sinir yaralanmalarında, spesifik olarak iğne şeklindeki elektrotun çevresindeki kas fibrillerinde depolarizasyon ve repolarizasyon sonucu oluşan aksiyon potansiyelini ölçmek için kullanılan yöntemlerdir (148,149). Birleşik kas aksiyon potansiyeli parametrelerinden distal latans hızı yani aksiyon potansiyeli gelişinceye kadar geçen süre, sinir myelin kılıfının devamlılığı, amplitüd ise sinir lifindeki aksonların sayısı ve bütünlüğü hakkında fikir vermektedir (150-152). Sinir liflerinin kalın ve myelinli olması ve aksonlar tarafından hızlı iletilmesi amplitüd ve ileti hızı üzerine o kadar etkilidir ki bu iki parametre sinirin toplam işlevi yerine, en hızlı ve en fazla myelin içeren sinir liflerinin işlevini gösterir (Şekil 41). Spontan EMG amplitüdü siyatik sinir kesisi sonrası her 3 kastada (gastrocnemius, soleus, tibialis anterior) hızlıca düştüğü izlendi. Akson ve myelin kılıf kaybı ve distalde Wallerian dejenerasyonla ilerleyen ağır periferik sinir hasarında , kesi distalinde yapılan uyarımda sinir aksiyon potansiyeli özellikle akut dönemde elde edilmesine rağmen, kesi proksimalinden yapılan uyarımda aksiyon potansiyeli elde edilemez.



Şekil 41. Birleşik aksiyon potansiyeli parametreleri.

Şekil 42. Elektrofizyolojik değerlendirmenin bilgisayara aktarılması.

Proje dahilinde tüm ratlara operasyon öncesi elektrofizyolojik inceleme yapıldı, distalde sinir iletimleri normal olarak kaydedildi. 21. gün, 2. ay ve 4. aylarda sakrifikasyonlarından hemen önce ölçümleri tekrarlanarak istatistiki inceleme için distal latans ve amplitüd değerleri kayda alındı. Sinir ileti çalışmaları, daha önce bildirilmiş protokollar çerçevesinde, sıçanların hangi gruba ait oldukları tarafından bilinmeden aynı nörofizyolog tarafından ve aynı cihaz ile yapıldı (Şekil 42). Ratların vücut sıcaklığı 37 derecede muhafaza edilerek 1mg/kg anestezi altında ölçüme gidildi, kas gevşetici yapılmadı. Kayıt için paslanmaz çelik iğne elektrotlar kullanıldı. Bipolar elektrotlardan aktif elektrod gastrokinemus kası içine, referans elektrod ise aynı kasın tendonu üzerine yerleştirilerek perkütan yolla gastrocnemius kası aksiyon potansiyeli ölçüldü. Distalde ayak bileğinin hemen üzerinde ve siyatik yarıktaki olmak üzere iki noktada elektriksel uyarı verildi. Elde edilen BMAP distal latansları ve amplitüdları kayda alındı. Distal latans süresinde uzama ve amplitüdde düşme, aksonal dejenerasyon ve demyelinizasyon lehine yorumlandı.

3.6.3. Nosiseptif WRL

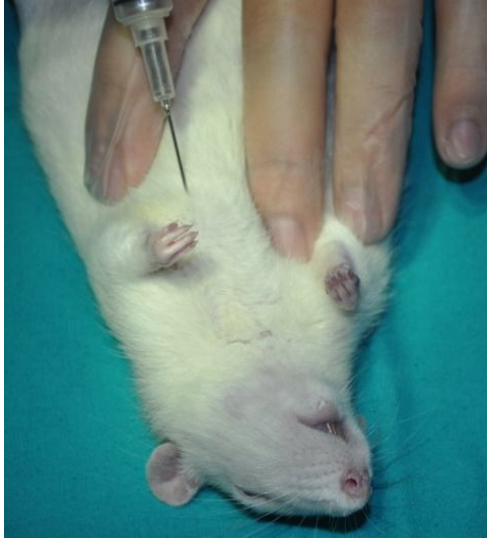
Bu test, ratların arka ekstremitelerinde duyu fonksiyonunu değerlendirmek için Masters ve ark. tarafından tasarlanmış olup 56 dereceye kadar ısıtılmış sıcak plakaya, rat arka ayaklarının temas ettirilmesi ve arka ekstremitelerini çekme sürelerinin saniye cinsinden kaydedilmesine dayalı bir yöntemdir (132). Normal sıçanlar ayaklarını bu sıcak plakadan 4 saniye ya da daha az sürede çekmektedirler. Bizim çalışmamızda WRL, sıcak plakaya temas ile arka ayak geri çekilmesi arasında geçen süre olarak tanımlandı ve bu süre, bir kronometre vasıtasıyla ölçüldü. Etkilenen bacaklarda sensitizasyonun yanılığa yolaçmasını engellemek için iki dakika ara ile test 3 kez tekrar edildi ve her 3 latans değerinin ortalaması alınarak WRL kayıtları yapıldı. Cilt hasarını engellemek için Varejao ve ark.'nın belirttikleri gibi, sıcak uyarının sonlandırılma zamanı 12 saniye kabul edildi, 12 saniye süreyle sıcaklık uygulanıp cevap alınamayanlar için WRL değerleri 12 kaydedildi (145).

3.7. Dokuların Alınması ve Sakrifikasyon Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları

21. gün 2. grup, 2. ay 3. grup, 4. ay 1. ve 4. grup olmak üzere çalışma dışı 4 rat dışında kalan 28 rat, yine aynı şekilde intraperitoneal ketamin anestezisi altında, alışılmış bölge temizliği ve cerrahi hazırlıkları takiben eski insizyon sahasından girilerek sinir onarım bölgesine ulaşıldı. Deneklerden 6-10x büyütme altında ince film şeklinde bir nedbe ile kaplı olduğu sahadan onarım hattının 1 cm proksimal ve distalinide içerecek şekilde normal sinir segmentlerine ulaşılarak sinir spesimenleri alındı (153). Ardından proksimal femura yapışma yerinden aşile dek uzanan tüm gastrocnemius kaslarında çıkarılarak kuru ağırlıkları tartıldı ve histolomorfometrik ve immunhistokimyasal incelemeler için tamponlanmış %10'luk nötral formaldehit (Merck) içine alındı. Aynı işlemler kontrol sağ arka ekstremitte siyatik sinir ve gastrocnemius kasınada uygulandı (Şekil 43). Karışmaması için alınan sinir numunelerinin proksimallerine, 9/0 naylon ile işaret sütürü konuldu.



Şekil 43. Sağlam taraf gastrocnemius kası ve siyatik sinirinin blok halinde çıkarılması.



Şekil 44. Kardiyak ponksiyon ile biyokimyasal numune alınması.

Sıçanların servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmelerinin ardından, deneklerin kan numuneleri biyokimyasal çalışmalar için, kalp atımları parmak ucuyla palpe edilerek, ksifoid altından 30 derece açıyla girilip 22 G enjektörle kapalı kardiyak ponksiyon yoluyla EDTA lı biyokimya ve hemogram tüpü olmak üzere her rat için 2 tüpe alındı (Şekil44).

3.7.1. Fiksasyon ve doku takip Aşamaları

28 rattan, deneysel protokol uygulanan sol ve kontrol sağ taraftan alınan sinir ve gastrocnemius kas örneklerinden diseksiyon mikroskobu kullanılarak yaklaşık 5 mm kesitler şeklinde, tamponlanmış %10'luk nötral formaldehit (Merck) içine alındı ve gruplara göre etiketlendi. Fikse olmaları için 24-48 saat beklendikten sonra doku takip işlemine başlandı (154). Öncelikle bir gece boyunca akarsuda yıkama yapıldı. Fiksatiften arındırılan dokular yükselen derecelerdeki alkollerden (Merck) geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra şeffaflaşmaları için ksilol (Merck) içerisinde bekletildi. Gömme işlemi için 65 °C'lik etüvde, 1:1 oranında ksilol-parafin ve parafin içerisinde bekletildikten sonra parafin bloklara gömüldü.

Takip sırasında kullanılan kimyasallar ve süreleri şu şekildedir:

<u>Kullanılan kimyasal</u>	<u>Süre</u>
Çeşme suyunda yıkama	1 gece
%50'lik etil alkol	2 saat
%70'lik etil alkol	1 saat
%80'lik etil alkol	1 saat
%90'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
Ksilol	1-10 dk
Ksilol-Parafin	1-10 dk
Parafin	3 saat

Elde edilen parafin bloklardan Leica marka kızaklı mikrotomda 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler rutin histolojik incelemeler için normal lamlara, immünohistokimyasal incelemeler için Poly-L-lysine kaplı lamlara (Thermo Scientific) alındı. Her bir bloktan Mason-Tricrome ve Hematoksilen Eozin boyamaları için 2 şer adet preparat hazırlandı. Boyanan sinir kesitleri, kameralı binoküler mikroskop aracılığıyla fotoğraflandı. İşaretlenen fasiküller içerisinde bulunan sinirler otomatik olarak sistem tarafından sayıldı. Ayrıca işaretlenen alanların mikrometre kare cinsinden alanları tespit edildi

3.7.2. Elektron mikroskopik takip ve görüntüleme

Deney çalışma gruplarından elde edilen siyatik sinirden alınmış dokular, elektron mikroskopik inceleme için 1X1mm³ ebatında alındı ve % 2,5'lük tamponlanmış gluteraldehit içerisinde 12 saat tespit edildi. Tespitten sonraki birinci gün; korneal dokular tampon solüsyonlarda her biri 15 dakika olmak üzere 3 kez yıkandı.

Daha sonra 2 saat boyunca osmiyum tetroksit içinde bekletildi. Osmiyum tetroksitten çıkarılan dokular, her biri 10'ar dakika olmak üzere, 2 kez tamponlu solüsyonlarda yıkandı. Daha sonra dokular sırasıyla % 30'luk, % 50'lik alkol içerisinde, her biri 15 dakika olmak üzere, 2'şer kez bekletildi. En son olarak % 70'lik alkole alınıp bir gece beklendi. İkinci gün; uranil asetat solüsyonunda dokular 2 saat boyunca buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkarılan dokular, her biri 30 dakika olmak üzere 2 kez % 90'lık alkolde ve % 100'lük alkolde bekletildi. İkışer kez, 30 dakikalık propilen oksit aşamasından sonra dokular, Propilen oksit+Araldit (1:1) solüsyonuna bırakılıp bir gece boyunca infiltrasyon sağlandı.

Uranil boyama solüsyonunun filtre kağıdından süzüldü. 3. gün; dokular oda ısısında, rotatörde, saf araldit içerisinde 2 saat boyunca çevrildi. Bu sürenin sonunda dokular gömme kapsülleri içerisine gömüldü. Gömülen dokular 45° C'ye ayarlanmış etüve bırakıldı. Etüvün ısısı 24 saat sonra 60° C'ye yükseltildi. Etüvün kapağı açılmaksızın bir 24 saat daha beklendi Üçüncü günün sonunda yine etüvün kapağı açılmaksızın, etüvün ısısı düşürülüp, oda ısısına gelmesi sağlandı. Daha sonra, dokular etüvden çıkarılıp, yarı ince kesitleri alınmaya hazır hale getirilmiş oldu. Yarı ince hazırlanan kesitler lam üzerine alınarak Toluidin mavisi ile boyandı. Yarı ince kesitler Olympus CX21 ışık mikroskobunda değerlendirilerek bakılacak siyatik sinir aksonları ve schwann hücrelerinin yeri tespit edildi. İstenilen bölgenin dışında kalan yerler trim cihazı ile traşlanıp, siyatik sinir alanlarının kesitlerde kalması sağlandı. İnce kesitler LEICA ultracut R ultramikrotomunda kesilerek bakır gridler üzerine alındı. Gridlere alınan ince kesitler 1 gün boyunca oda ısısında bekletildi. Ertesi gün uranil asetat içinde 40 dakika bekletildi. Ardından 3 kez distile su ile yıkandı. Daha sonra kurşun sitrat içinde 5 dakika bekletilip, 3 kez distile su ile yıkandı. Kontrast boyanan ince dokular JEOL Jem 1400 elektron mikroskobunda incelendi ve Gatan CCD kamera ile görüntülendi.

3.7.3. İmmunhistokimyasal boyama ve değerlendirme

Deneyin sonunda, uygulama yapılan sol siyatik sinirden 5mm'lik kesitler alınıp nötral tamponlanmış formalin (%10, Merck) solüsyonu içine alınarak fiksasyon işlemi sağlandı. Bununla birlikte, sol gastroknemius kasından 1X1cm³'lük kesitler alınıp benzer şekilde fikse edildi. Ayrıca her bir ratın sağ siyatik ve sağ gastroknemius kası için de aynı işlemler izlendi. Fiksasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra akar su altında yaklaşık olarak 12 saat boyunca, dokuların yıkanması sağlandı. Ardından sırasıyla, %30, %50, %70, %80, %90 ve %96'lık alkollerde 8 saat bekletilen dokular absolut alkol içerisinde 2X30 dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Saydamlaştırma ve alkolü dokudan uzaklaştırmak için 2X15 dakika ksilol kullanıldı. İnfiltrasyon için 58C° de ayarlanmış etüvde 2x1 saat parafin içinde bekletilen dokular daha sonra parafine gömülüp, bloklandı (155,156). Her bir parafin bloktan, tam otomatik, rotary mikrotom(Leica RM 2265, Germany) yardımıyla 4-6µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler alındıktan sonra, bir gece 37C° etüvde bekletilen dokular, 58C° ye ayarlanmış etüve alınıp bir saat kadar bekletildi. Ardından 2X15 dakika ksilolden geçirildi. 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve %80'lik alkol serilerinden geçirildi. 2X5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, antijen retrieval işlemi için önerilen Sitrat Buffer solüsyonuna(Thermo Scientific) alınıp, düdüklü tencerede 45 dakika kaynatıldı. Düdüklü tencereden çıkarılan kesitler, doğrudan oda sıcaklığında soğumaları için 20 dakika kadar bekletildi. 2X5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, kurulanıp, dokunun olduğu yer silikon kalem vasıtasıyla çevrenip, sınırlandı. İmmunohistokimya barına dizilen, kesitlerin üzerine 3X3dakika Fosfat Tamponlu Salin'de (Sigma) damlatıldı. Bu sırada immunohistokimya barına nemliliği sağlamak için daha önceden hazırlanan sıcak su konuldu. Kesitlerin üzerindeki PBS alınıp üzerine Hidrojen peroksit blokaj solüsyonu(1ml %30 H₂O₂ + 9ml metanol) damlatılıp 20 dakika inkübe edildi.

Nonspesifik antikor bağlanmasını engellemek için normal (sc-2043 Santacruz) ve normal donkey serum (sc-2044) solüsyonları damlatılan dokular PBS-Tween 20 (Thermo Scientific) solüsyonunda yıkandı. Bloklama işleminin hemen ardından immunohistokimya barı üzerinde yer alan kesitlere, GFP primer antikor (Santacruz ,sc-9996) ve Vimentin primer antikoru (Santacruz ,sc-7557) ikili olarak, bununla birlikte GFP+NF (Santacruz ,sc-12980) ikili antikorları damlatılarak +4 °C'de bir gece bekletildi. Sonraki gün oda ısısında yaklaşık 2 saat kadar bekletilen kesitlerin üzerine,keçi anti-mouse IgG-FITC(Santacruz,sc-2010) ve donke-anti keçi,IgG-TR(Santacruz,sc-2783) sekonder antikorlar eklenerek bir saat oda ısısında ve karanlık ortamda bekletildi. 3X5 dakika PBS ile yıkanan kesitler ardından, DAPI ile kapatıldı ve değerlendirilip, mikrografları elde edildi.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizlerde SPSS 11.0 (Chicago, ill., USA) programı kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Çoklu grupların karşılaştırılmasında nonparametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile kullanıldı. Test sonucunun anlamlı çıktığı durumunda grupların ikili olarak karşılaştırılmasında bağımsız değişkenler için çift yönlü nonparametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

1 ve 3. gruptan 1'er rat sol arka ekstremitelerinde tırnak kaybı ve bası yarası izlenmesi üzerine çalışma dışı bırakıldı. Cerrahi sonrası ilk haftada yapılan değerlendirmede anestezi verilmeden sol ayak tabanlarını yürürken yere basmadıkları, bunun yerine sol ayak topukları üzerinde yürüdükleri, sol ayaklarını invertte durumda tuttukları ve ağırlı uyararla sol arka ekstremitelerini hareket ettirmedikleri gözlemlendi. Bu durum sol siyatik sinirde tam kesi oluşturma amacına uygun prosedür uygulandığı lehine yorumlandı. Ayak bileklerinde ve parmaklarda doğrusal fleksiyon kaybı mevcuttu. Tüm gruplarda yara iyileşmesi sorunsuz oldu. Ödem, şişlik ısı artışı, yara yerinde aşırı kızarıklık, hipertrofik skar ve keloid izlenmedi. Grup 4'te 4. ayda kas atrofisi diğer bacağıyla kıyasla hafif-orta düzeyde bulundu. Yine 4. ayda Grup 4'teki sıçanlarda normal yürüyüş paternine yakın yürüyüş ve ayağı çekme hareketi izlendi.

Tablo 3. Tüm grupların bacak kas ağırlık oranları ve uyluk çevresi farkları standart sapmaları.

Gruplar (n=7)	Bacak Kas Ağırlık Oranları	Uyluk Çevresi Farkı (cm)
Grup 1	0.71±0.04	2.00±0.14
Grup 2	0.75±0.05	1.74±0.33
Grup 3	0.77±0.06	1.87±0.16
Grup 4	0.81±0.07	1.41±0.11

21. gün muayenelerinde tüm grupların sol uyluk fleksör grup kaslarında diğer ekstremiteye oranla hızlı bir atrofi olduğu izlendi. 21. gün uyluk çevresi farkları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı fark yoktu (Tablo 3). Tüm grupların sakrifikasyon öncesi uyluk çevresi farkları kıyaslandığında 4. ayda Grup 1 ve 4 arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.01$).

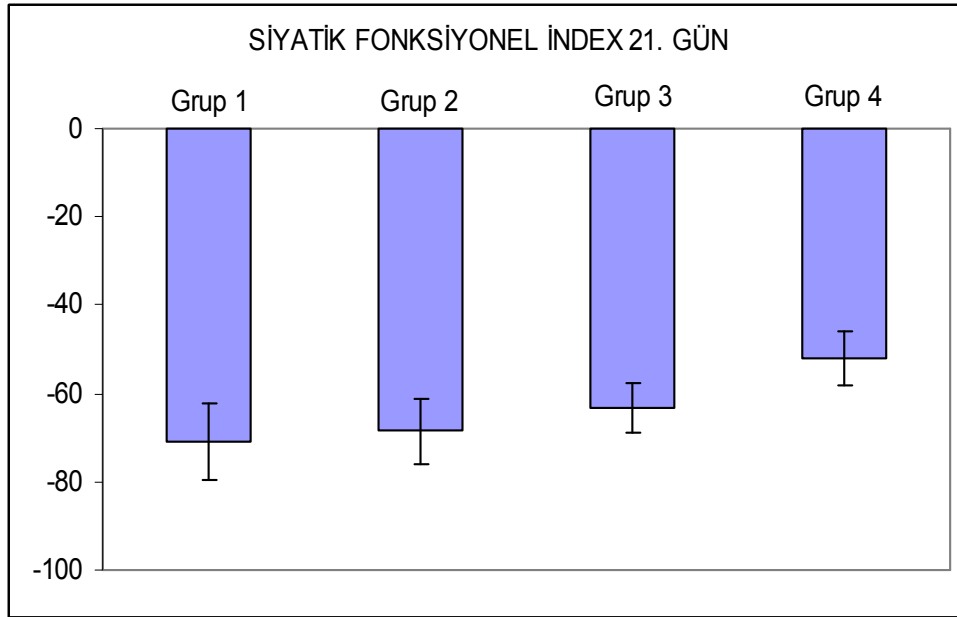
Tablo 4. Tüm grupların gastrocnemius kası deneysel ve kontrol bacak kas ağırlık oranlarının kıyaslanması.

GASTROCNEMIUS KASI DENEYSEL / KONTROL BACAK KAS AĞIRLIK ORANLARI				
Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
1	0,66	0,73	0,76	0,82
2	0,72	0,74	0,78	0,78
3	0,70	0,69	0,68	0,67
4	0,71	0,72	0,72	0,80
5	0,80	0,84	0,84	0,86
6	0,68	0,78	0,83	0,84
7	0,70	0,72	0,77	0,89

Tüm gruplar deneysel sol gastrocnemius kasları total çıkarılıp ağırlıkları kontrol olan sağ tarafa oranlandığında Grup 1 in oranlarının diğer 3 gruptan az olmasına rağmen yalnızca 4. ay Grup 1 ve Grup 4 arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Diğer grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi (Tablo 4).

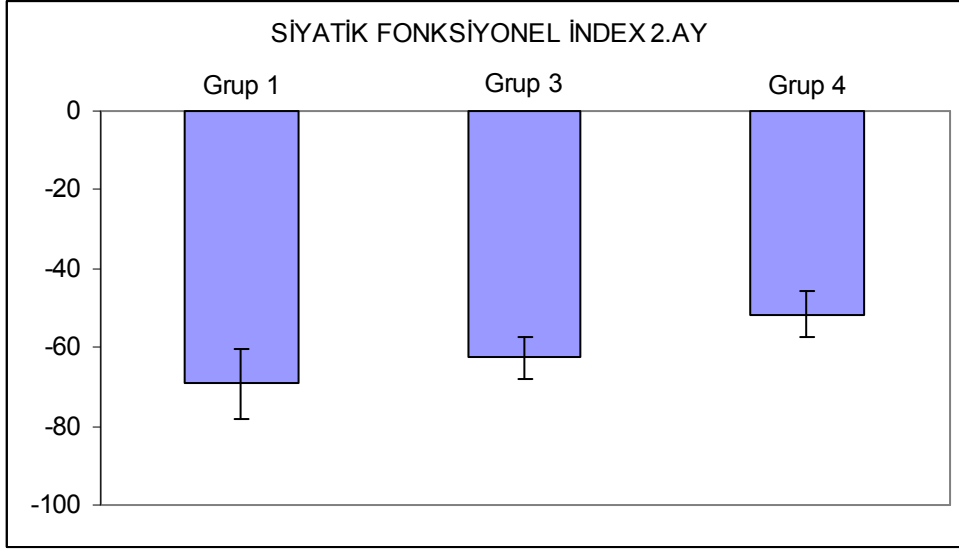
SFI değerleri 21. günde; Grup 1'de ortalama -70.80 ± 8.69 , Grup 2'de ortalama -68.45 ± 7.37 , Grup 3'de ortalama -63.33 ± 5.65 , Grup 4'de ortalama -51.98 ± 5.94 idi. Siyatik fonksiyon indeksi açısından gruplar arasındaki farklar değerlendirildiğinde, Grup 4 ile diğer deney grupları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark olduğu saptandı ($p < 0,01$) (Tablo 5). 21. gün değerlendirmelerinde Grup 1, Grup 2, Grup 3 n ise kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$).

Tablo 5. 21. Gün SFI analizleri açısından gruplar arası farklılıkların dağılımı.



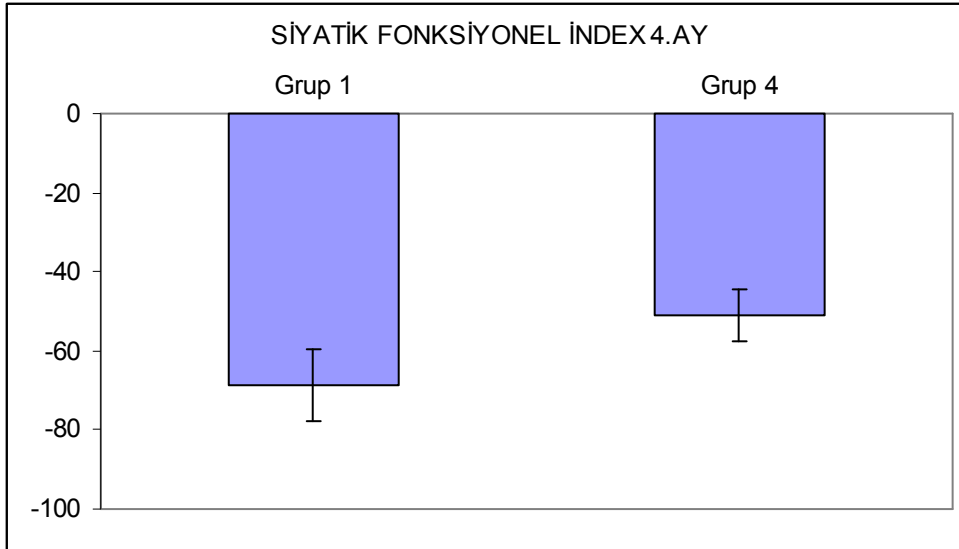
SFI değerleri 2. ay sonuçlarında ise geriye kalan 3 gruptan Grup 4 n yine diğer gruplardan belirgin olarak farklı olduğu ($p < 0,01$), Grup 1 ve Grup 3 arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmadığı gözlendi ($p > 0.05$) (Tablo 6).

Tablo 6. 2. Ay SFI analizleri açısından gruplar arası farklılıkların dağılımı.



SFI değerleri, 4. ayda geriye kalan boş epinöral tüp ile onarılan Grup 1(-68.79±9.02 SD) ve adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücre enjekte edilen Grup 4 (-50.89±6.60 SD) kıyaslandığında, Grup 4 ün anlamlı şekilde rejenerasyonu destekler şekilde fonksiyonel geri kazanımı olduğu sonucuna varmamızı sağladı ($p<0.01$) (Tablo 7).

Tablo 7. 4. Ay SFI analizleri açısından gruplar arası farklılıkların dağılımı.



Sol siyatik sinirlerde ENMG ölçümleri ile normal BMAP ve distal latans değerleri ölçüldü. Deneysel bacak, kontrol bacak kasılma amplitüd ve latans oranları kaydedildi.

Gruplar kasılma amplitüd değerleri açısından karşılaştırıldığında Grup 4 te en yüksek sonuçlar alındığı, Grup 2 ve Grup 3 ün birbirinden çok farklı olmadığı ve Grup 4 e oranla daha düşük değerler alındığı görülmüştür. Kruskal–Wallis testi ile değerlendirildiğinde istatistiki olarak Grup 1, diğer gruplardan 0.22 ± 0.05 SD ve $p < 0.01$ değerleri ile anlamlı olarak düşük bulunurken, Grup 3 ve Grup 4 arasında anlamlı bir fark olmadığı izlendi (Tablo 8).

Tablo 8. EMG deneysel bacak/kontrol bacak kasılma amplitüd oranları.

EMG/DENEYSEL BACAK/KONTROL BACAK KASILMA AMPLITUD ORANLARI				
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
1	0,17	0,22	0,63	0,89
2	0,26	0,34	0,53	0,56
3	0,23	0,39	0,56	0,72
4	0,19	0,31	0,61	0,63
5	0,31	0,40	0,41	0,49
6	0,20	0,42	0,42	0,43
7	0,21	0,29	0,34	0,52

Kasılma latans oranları karşılaştırıldığında Grup 1 in, tüm gruplardan yüksek latans değerleri almış olduğu görülmesine rağmen tüm gruplar arasında istatistiki olarak latans değerleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 9).

Tablo 9. EMG gruplar arası kasılma amplitüd ve latans oranlarının standart sapmaları.

Gruplar (n=7)	Kasılma Amplitüd Oranları	Kasılma Latansı Oranları
Grup 1	0.22±0.05	2.33±0.94
Grup 2	0.34±0.07	2.27±0.92
Grup 3	0.50±0.11	2.08±0.81
Grup 4	0.61±0.16	1.52±0.28

Geri çekme refleksi açısından Mann-Whitney U testi kullanılarak 2 li grup karşılaştırmalarında 21. gün sonuçlarında Grup 1 ve Grup 2 arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). 2. ay değerlendirmelerinde Grup 3 ve Grup 4, 4. ay değerlendirmelerinde ise Grup 4 değerleri anlamlı olarak düşük izlendi ($p<0.01$). Grup 1 in 21. gün, 2. ay ve 4. ay geri çekme refleksi açısından ortalama değerleri, cevapsızlık değerinin 12 olduğunda göz önüne alınırsa 11.50 ± 0.50 olarak bulundu. Grup 4 için ise bu değer sonuçları 5.64 ± 0.75 bulunarak sensorinöral geridönüş lehine yorumlandı (Tablo 10).

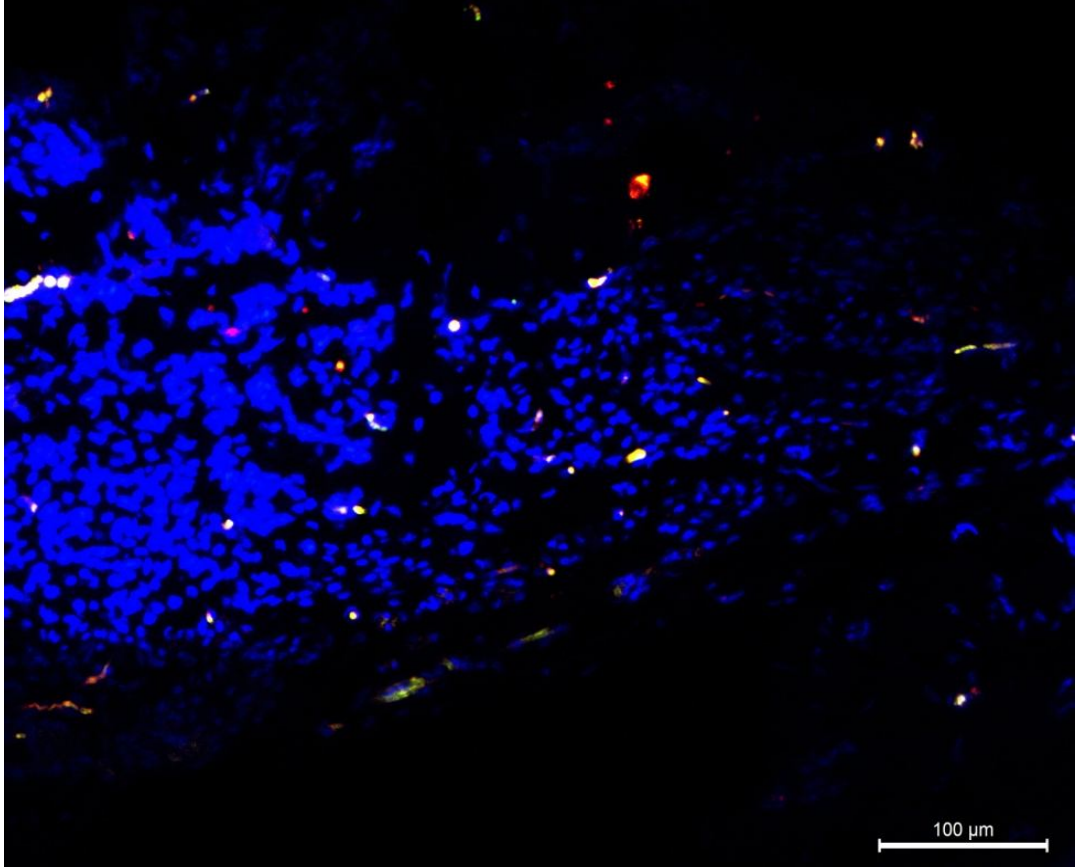
Tablo 10. WSRL değerlerinin gruplar arası istatistiki kıyaslaması.

p değerleri	Geri ekme Refleksi Sonuçları
KW testi	=0
Grup 1- Grup 2	>0.05
Grup 1- Grup 3	<0.01
Grup 1- Grup 4	<0.01
Grup 2- Grup 3	<0.01
Grup 2- Grup 4	<0.01
Grup 3- Grup 4	<0.01

İmmunhistokimyasal alışmalar için ise hem deneysel hem kontrol grup siyatik sinir ve gastrocnemius kası karşılaştırmalı incelendi. Çalışmada kırmızı ile boyanan sahalar Vimentin (+) ve Nöroflament (+) hücreleri, yeşil ile boyananlar GFP (+) hücreleri, sadece mavi çekirdek izlenen görüntüler ise DAPI (+) hücreleri işaret etmektedir. Her şekil için bar çubuğu ölçütü sol alt yanda belirtilmiştir.

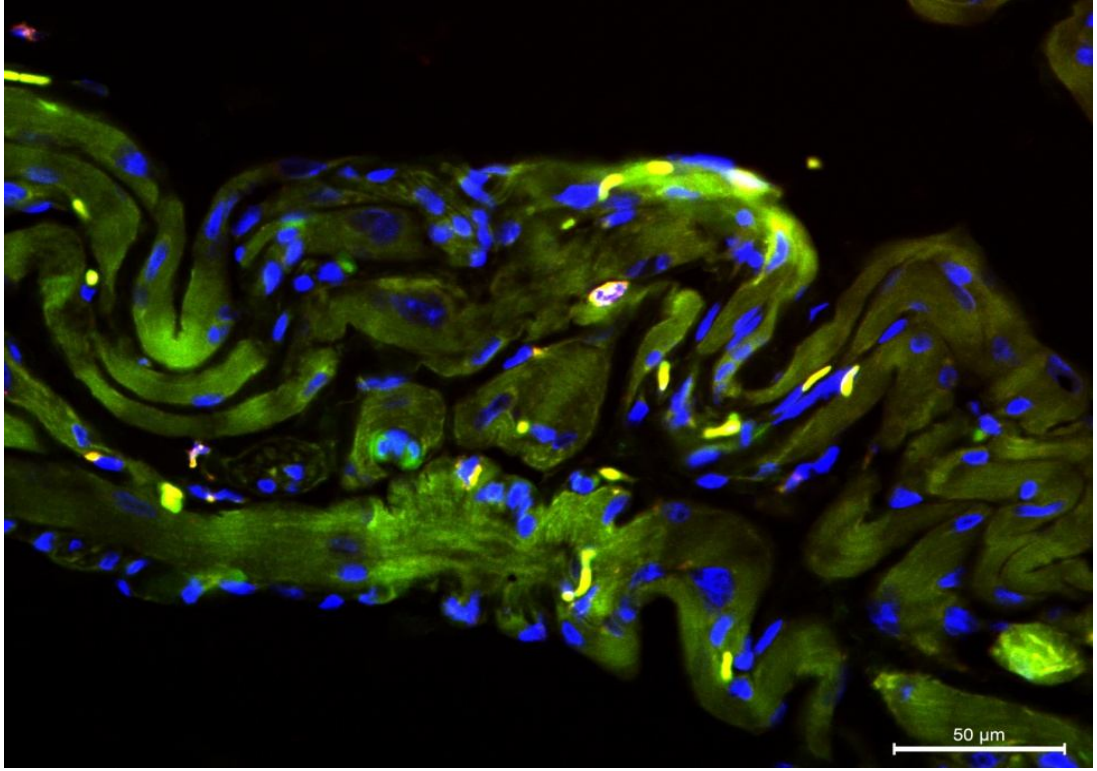
Grup 1 deneysel siyatik sinir incelemelerinde sadece mavi çekirdekler yani baskın DAPI (+) hücreler gözlenmiştir.

GFP primer antikoru ve Vimentin primer antikoru ikili olarak, bununla birlikte GFP+NF ikili antikorları damlatılarak yapılan immunhistokimyasal tarama sonucunda Grup 1 de herhangi bir GFP boyanan hücreye rastlanmamıştır (Şekil 45).

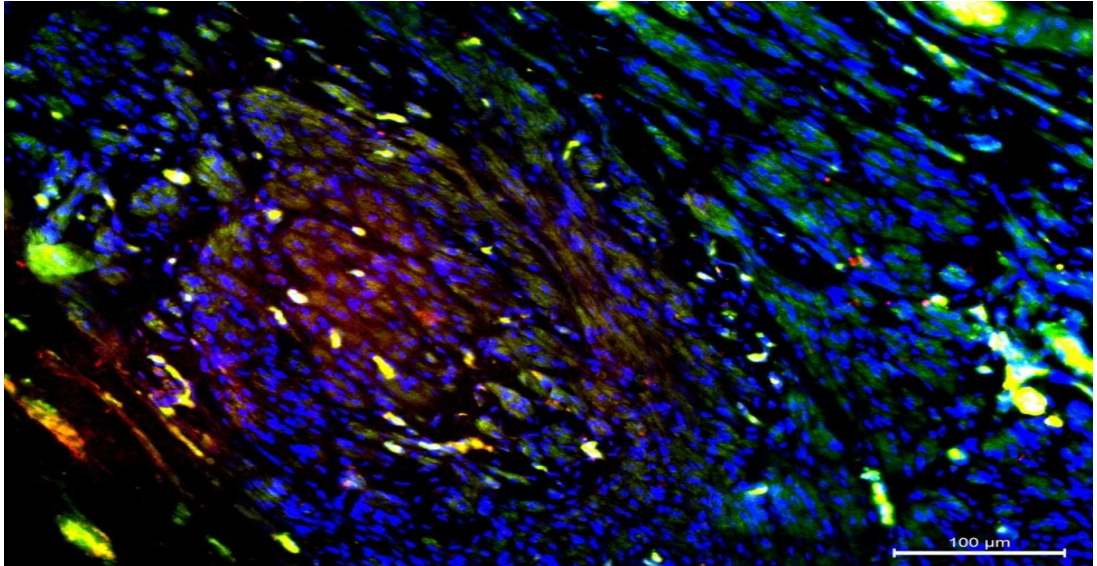


Şekil 45. Grup 1 de GFP ve Vimentin ile boyanmış sol siyatik sinir immunfloresan staining.

Grup 2 nin deneysel taraf siyatik sinir ve gastrocnemius kası incelemelerinde, tek tek GFP(+) hücrelerin tüp içinde ve kasta gözlenmiş olmasına rağmen aksonal bir yapı yada nöral öncül bir hücreye rastlanmamıştır (Şekil46).

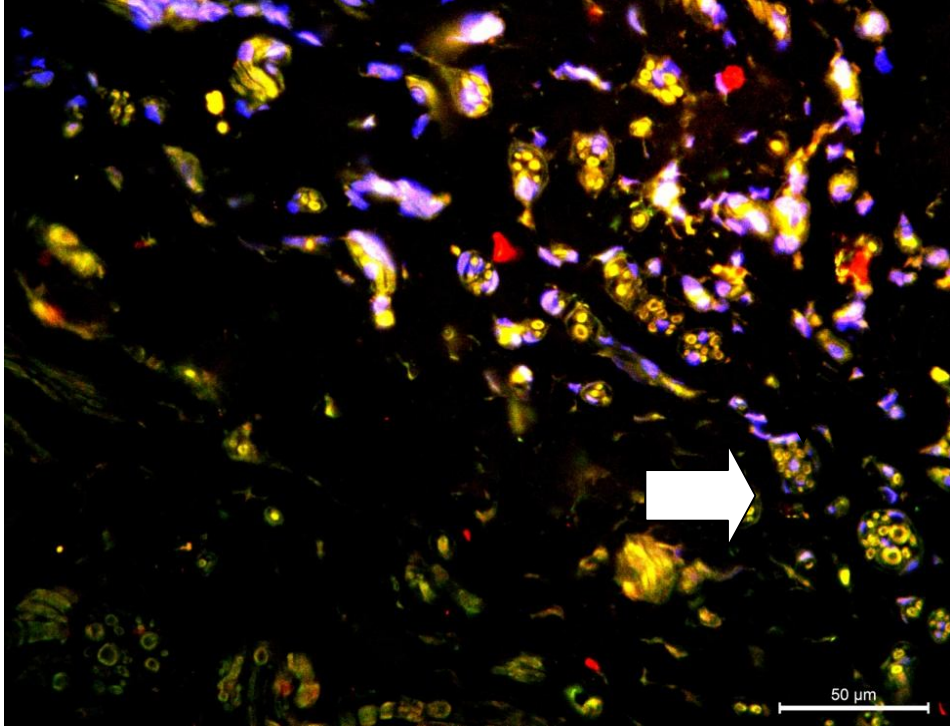


Şekil 46. Grup 2 de GFP ve Nöroflament ile boyanmış deneysel taraf gastrocnemius
Grup 3 te akson boyama marker ı olan Nöroflament ve immunfloresan GFP
antikoru ile boyanan hücreler azda olsa aksonal yapıya katılıyor izlendi.



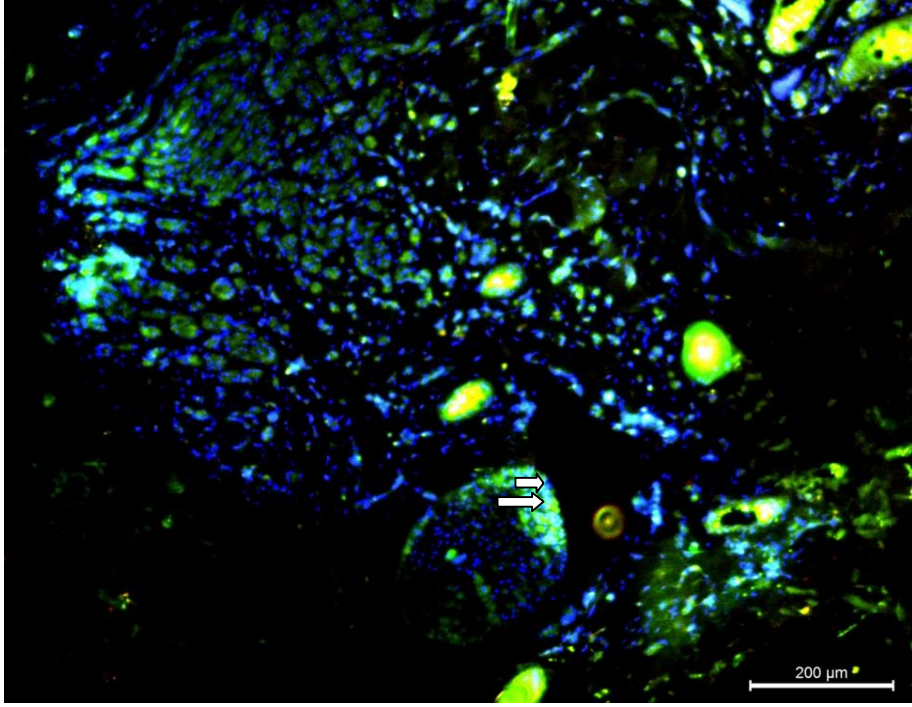
Şekil 47. Grup 3 te overlay olmuş, çift antikorla boyanmış nöral hücreler.

Grup 4 te ise nöral öncül hücrelerin tek tek gözlemlenmesi (Şekil 48), uygulanan sAD-MKH lerin nöronal farklılaşmayı uyardığı ve hatta adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerimizin direkt akson yapısına katıldığı lehine yorumlanmıştır (şekil49).

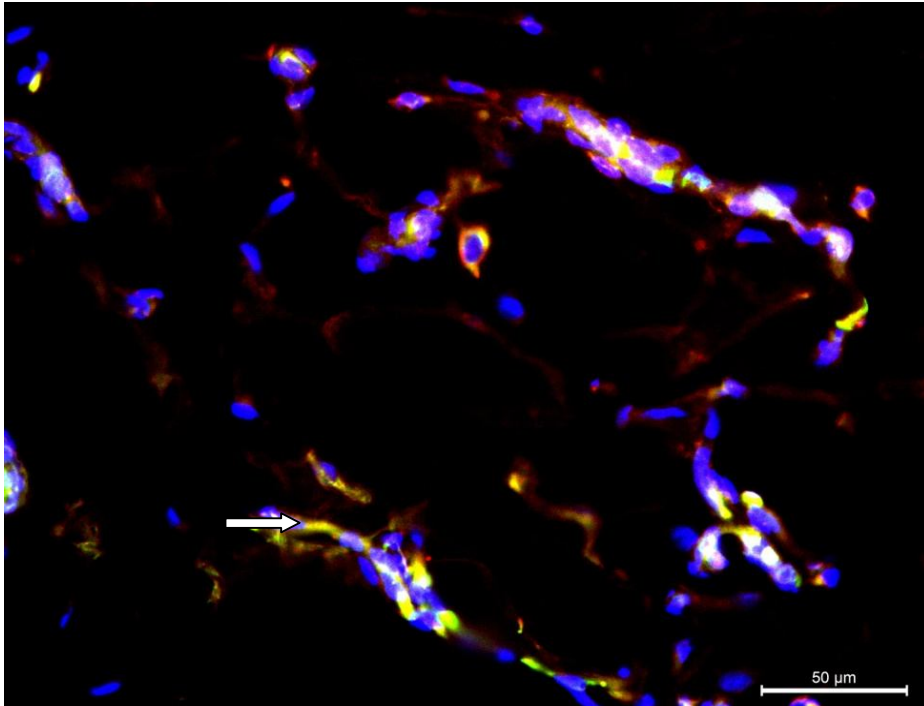


Şekil 48. Grup 4 te hem Vimentin hem GFP boyanmış, akson yapısına katılmış kök hücreler.

Yine aynı şekilde Grup 4 deneklerin sol taraf gastrocnemius kası kesitlerinde double antikörle boyanan kök hücrelerin görülmesi, fasikülden arındırılarak oluşturulan tüpü geçerek kasa kadar ulaştığına dalalettir (Şekil49, 50).



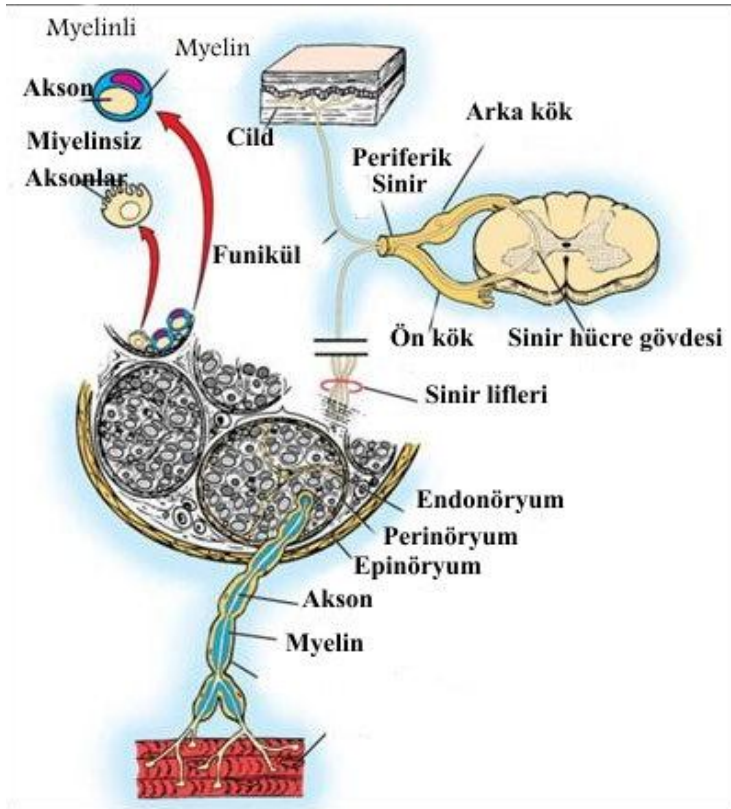
Şekil 49. Akson oluşumuna katılmış kök hücrelerin immufluoresan görüntülenmesi.



Şekil 50. Deneysel taraf gastrocnemius kasına ulaşmış sAD-MKH lerin immunfluoresan görüntülenmesi.

5. TARTIŞMA

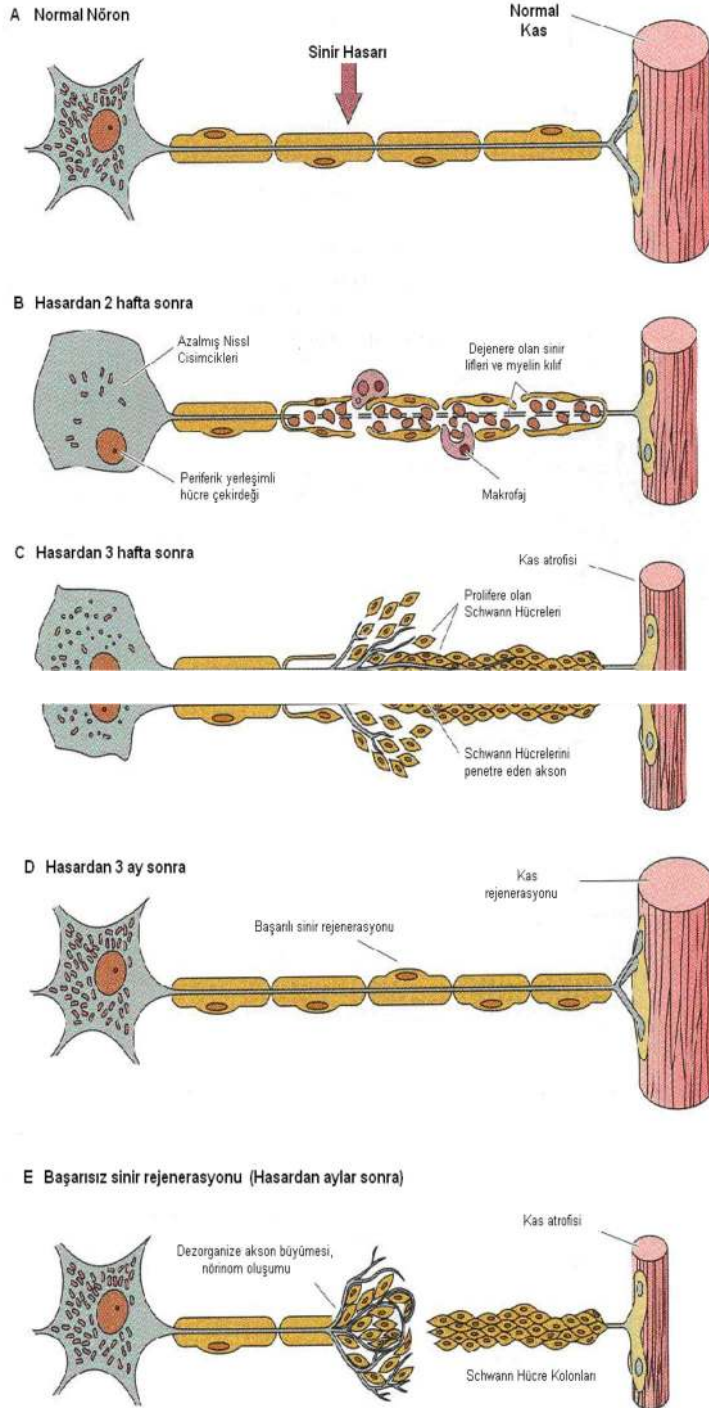
Bu çalışmada, sıçan adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin nöronal farklılaşma kapasitesi, zaman ile korele incelenmiştir. Bugüne kadar sAD-MKH in nöronal farklılaşma ile ilgili çalışmalar yapılmasına karşın periferik sinir üzerinde bu tip çalışma sayısı azdır. Periferik sinir yaralanmaları klinisyenleri uzun yıllardır meşgul eden ve sıklıkla uzun dönemde işlevsel kayıplarla sonuçlanan klinik ve toplumsal bir tablodur (1,5,17,32). Sinir rejenerasyonunu arttırmak adına yapılabilecek müdahalelere ilişkin geniş çaplı deneysel çalışmalara rağmen iyileşme sonuçları nadiren tatmin edicidir. Sinir rejenerasyonunun başarısı karmaşık bir sürecin birkaç basamağının tamamlanmasına bağlıdır (9,13,14). Rejenerasyon myelinli aksondan kaynaklanan ve endonöral tüp içerisine doğru ilerleyen aksonal filizlenmelerden oluşmaktadır (Şekil 51).



Şekil 51. Periferik sinir sonlanmaları. (Jobe M.T. and Martinez S.F. (2007): Chapter 59. Peripheral Nerve Injuries. Edt: Canale ST. Campbell's Operative Orthopaedics 11th edition, Mosby, Philadelphia PA, 3636-3797).

Kesilen aksonlar, travmayı takiben ilk 6 saat içinde rejenere olmaya başlar. Aksonal uzantıların gelişmesi ile karakterize rejenerasyon olayında, kollajenin de içinde yer aldığı çeşitli ekstrasellüler matriks komponentlerinin sinir liflerine destek sağlamak ve myelinizasyonu başlatmak gibi bazı önemli işlevleri olduğu kabul edilmektedir. Periferdeki sinir ucundan aksonlar “filizlenmekte” ve yaralanma bölgesini geçerek distale uzanmaktadır (34,56,57). Ancak bu aksonların hepsi distal uca ulaşamaz ve kendi üzerlerine kıvrılarak Schwann hücreleri ve bağ dokusu ile beraber nöroma oluştururlar. Nöromalar, sinir gövdesi içinde kaldıklarında "neuroma-in-continuity“ adını alırlar ve yaptıkları baskı ile fonksiyonel rejenerasyon sağlayacak aksonları da engellerler. Periferik sinirin aksonal devamlılığını kesintiye uğratan yaralanmalarda dejenerasyon ile sonuçlanır. Sinirin distalinde Wallerian dejenerasyon akson ile birlikte myelinin parçalanması ile oluşur (59,66).

Hücre artışı, trofik faktörlerin üretimi, ekstrasellüler matriks molekül sentezi, remyelinizasyon, mikroçevre stabilizasyonu ve immünmodulasyon kök hücre implantasyonu sonrası muhtemel rejenerasyon mekanizmaları arasındadır (162,174,178). Normal durumda sinir rejenerasyonu, aynı sinir hücreleri tarafından innerve edilen hedef hücrelerin trofik etkisine bağlıdır (11,39). Trofik faktörler (örneğin NGF) retrograd aksonal transport yoluyla taşınır ve sinir hücrelerinin temel aktivite ve yaşamını sürdürmesinde kullanılır. NGF, ilk keşfedilen nöronal büyüme faktörü olup, sinir yaralanmalarında üzerinde en çok çalışma yapılan nörotropik faktörlerden birisidir (9,10). Normalde NGF, sinir gövdesinde düşük konsantrasyonda mevcuttur ancak sinir kesisini takiben NGF, protein ve mRNA düzeyi hasarlı periferik sinirde artar.



Şekil 52. Periferik sinir rejenerasyon süreci. (Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2001:216)

Periferik sinirler, travmalar, neoplazmlar, enfeksiyonlar, kompresyon durumları, cerrahi müdahaleler gibi çok çeşitli nedenlerden dolayı zarar görebilmektedir (3,12). Yaralanmanın etiyolojik özelliğine, şiddetine, yaralanmanın bulunduğu anatomik lokalizasyona göre farklı şekillerde onarımlar yapılabilir (17,18). Primer onarım için epinöral, fasiküler, grup fasiküler..vs farklı teknikler tanımlanmış olmasına rağmen, gecikmiş, sekonder onarıma bırakılmış, nöroma veya gap oluşmuş periferik sinirler hala onarım gücünü taşımaya devam etmektedir.

Periferik sinir rejenerasyonuna ilişkin şu ana kadarki çalışmalarda köpek, tavşan, maymun vs değişik deney hayvanları kullanılmış olmasına rağmen, sıklıkla deneysel model olarak sıçan kullanılır. Sıçanda siyatik sinirin multipl işlevli, çok kas innervasyonlu olması, insan sinirlerindeki lezyonların modelize edilmesini olanaklı kılmaktadır (37,41). Onun dışında sıçanın üretimi ve bakımı nispeten kolay, sinir histolojik yapısı insanınki ile yakın benzerlik göstermektedir. Bu modelin önemli avantajları; ratlarda yara yeri iyileşmesinin oldukça hızlı, siyatik sinir diseksiyonunun kolay, postoperatif bakımın genelde sorunsuz, rejenerasyonun göreceli olarak saptanabilir olması, tam kesiden ezilme modeline kadar birkaç travma seçeneğinin bulunması, çalışma maliyetinin düşük olmasıdır (2). Bu nedenle çalışmamız için sıçan üzerinde siyatik sinir transeksiyon modeli kullanıldı.

Periferik sinirler sekonder onarıma bırakıldığında aksonun rejenerasyon yeteneği artarken end organlar progressif atrofiye gider. İnsan periferik sinirinde defekt 3 cm veya daha fazla ise ya da 8/0 numaralı sütür materyali ile konan sütürler sinir sonlanmalarını bir arada tutamıyorsa greft ile onarım endikasyonu konmaktadır. Dijital sinir onarımında ise metakarpofalangeal ekleme 60 derece fleksiyonda ve interfalangeal eklemleri tam ekstansiyonda iken 10/0 ile atılan sütürler sinir sonlanmalarını bir arada tutamıyorsa defekt olduğu kabul edilir ve greft endikasyonu konur.

Çalışmamızın başında sıçan periferik siniri üzerinde oluşturacağımız defekt uzunluğu için literatüre gözettığımızda 0,3 cm sonrasında tansiyonun giderek arttığı, 0,9 cm sonrasında defektlerin ise tolere edilemediği, fonksiyonel geri dönüşlerinin çok kötü olduğunu ve 0,9 cm üzerindeki defektlerin onarımı için çeşitli otogreft ve konduit uygulamaları gerektiğini gördük (15,18,163). Histomorfometrik ve fonksiyonel rejenerasyonun maksimum izlenmesi için minimal tansiyon ile onarım gerektiği esasına dayanarak defekt miktarı 1 cm olarak belirlendi (92,131). Günümüzde sinir defektleri için ise sinir sonlanmaları arasında otolog sinir greftlerinin kullanımı skar, nöroma oluşumu, donör saha fonksiyon kaybı, operasyon ve anestezi süresinin uzaması ve boyut farklılıkları gibi dezavantajlarına rağmen en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir.

Sunderland ve Ray ideal sinir grefti şartlarını şöyle belirtmişlerdir (43,44);

1. İnterfasiküler konnektif doku az olmalı,
2. Fasiküller ayrı ve birbirine paralel olmalı veya interfasiküler bağlantılar az olmalı,
3. Kabul edilebilir bir lokalizasyonda olmalı,
4. Uzun dal vermeyen bir segment olmalı,
5. Aksonlar büyük kalibreli olmalı,
6. Uzunluğu boyunca büyük çapta olmalı,
7. Duyu donör alanında duyu defekti minimal olmalı ve bası yüzeylerinde skar bırakmamalıdır.

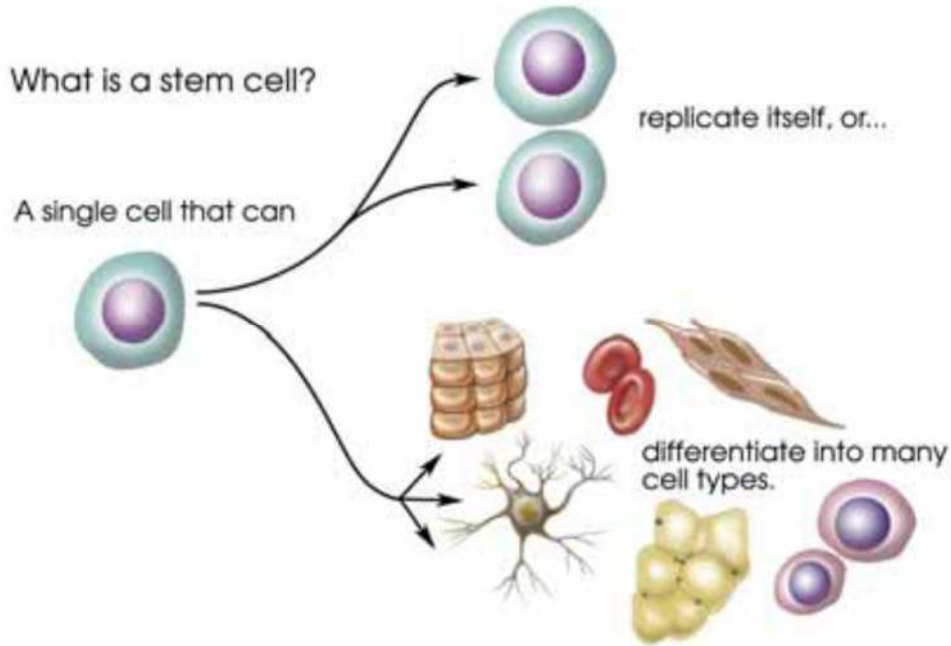
Gap oluşmuş periferik sinir yaralanmaları, nöroma eksizyonları sonrası yada gecikmiş onarımlarda nöral dokunun yerine konması yada nöral büyüme faktörleri için bir köprü arayışı sistemi, konduit (sinir tüpü) uygulamalarına itmiştir (166,168,169). Konduit; endonöral tüpün işlevini yerine getirmesi istenilen bir çeşit ara maddedir. Bu amaçla damar, kas dokusu gibi otojen yapılar kullanılmıştır. Bunlarla ilgili de pek çok sorunla karşılaşmıştır.

Damarların içleri boş ve duvarları ince olduğundan kollabe olmuşlardır. Kas dokusu ise uzarken saçılan akson filizlerinin tutunacağı bir yapı oluşturmuş ve nöromalar ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu kanalların içinde aksone destek yapı olmadığından uzama bir noktaya kadar olmakta ve sonra durmaktadır (18,20,23,40). Bunun için ek olarak hücre eklenmesi, silikon gibi sentetik materyallerin kullanılması ise yabancı cisim reaksiyonuna neden olmuştur. Biomühendislik alanının desteğiyle yeni yeni yön bulan konduit seçimleri için değişik biyouyumlu sentetik materyaller kullanılmaktadır. Sunderland, rejenere olan aksonlar için uygun iletkenler oluşturmada, bazal membran veya orijinal endonöral tüplerin önemini vurgulamıştır(43,44). Bu aşamada doğal bir kılıfında kullanılabileceği fikrindende yola çıkarak deneğin kendi epinöryumu boş bir kılıf haline getirilip tamamen nöral dokudan arındırılarak literatürde daha önce kullanılmayan bir tüp konduit model tasarlandı. Uygulama sırasında, epinöral kılıfın tüp haline getirilmesinin, donör saha sıkıntısı, aplikasyon güçlüğü, kılıfın proksimal ve distal devamlılığının sağlanmasının mikroskop altında bile patent olarak korunmasının zor olduğu farkedildi. Epinöryumun doğal bir kılıf olması, konduit (sinir tüpü) uygulamaları gibi maliyetli olmaması, deneysel hayvan çalışmalarında rejenerasyon materyalleri ile doldurulmaya müsait olması epinöral tüpün avantajları olarak belirlendi. Sinir onarım bölgesinde histolojik olarak çok sayıda akson görülebilmektedir ancak bu aksonlar uygun reseptörlere ulaşmadıkları takdirde fonksiyonel iyileşme tam olmamaktadır. Ancak yeterli sayıda ve nitelikte akson, doğru duysal/motor hedefe ulaşır ve rejenere liflerin santral sinir sistemi ile entegrasyonu sağlanırsa fonksiyonel iyileşme oluşmaktadır (16,29,63) . Periferik sinir defektlerinin rekonstrüksiyonunda fonksiyonların iyileşmesi çok sayıda lokal ve sistemik faktöre bağlıdır.

Oluşturulan 1 cm defekti kapatmak için literatürde otojen ven greftleri, arteryel lümen greftleri, denatüre kas fiberleri, fasyal ve snoviyal kılıflar kullanılmış olmasına rağmen otojen kaynaklı köprülerin, rejenerasyona olumlu etkileri gözönüne alınarak Atabay ve ark. tarafından daha önce bir epinöral tüpün kaydırılması ile tasarlanan örneğe benzer teşkil edecek şekilde epinöral bir tüpün oluşturulması planlandı (40,60,65,164-169,171). Ve 1 cm lik siyatik sinir parçasının 3 geniş fasikülünde tamamen sıyrılarak boş kılıf mikroskop altında 40 büyütme ile yerine end to end tekniğe uygun olarak dikildi (20-22). Defekt olup olmamasına göre periferik sinir kesilerinin onarımında end to end, end to side, sleeve..vs farklı teknikler tanımlanmış, fakat sadece epinöral örtüden oluşan bir kılıfın tubulizasyona ve doldurulmaya uygun şekilde olması için end to end onarım tekniği uygun görüldü (19-22,42,63,67,69). Yalnızca karşılıklı epinöryumdan geçilerek lümenide olan bir tüp köprü elde edildi. Bu şekilde konduit vs benzeri köprüleme yöntemlerinde çap uygunsuzluğununda bertaraf edilebileceği düşünüldü. Benzeri proksimal epinöral kılıfın ters çevrilerek tubulize edilmesi, Ayhan ve ark. tarafından 2000 senesinde, distal kısmın tubulize edilmesi ise Chatdokmaiprai ve ark. tarafından 2006 senesinde ortaya konmuştur (20,170). Her 2 teknikte amaç donör saha ve verici sinir morbiditesinin azaltılması, fazla sütür ihtiyacının, fibrozisin minimize edilmesi ve operasyon süresinin kısaltılmasıdır. Rejenerasyon sürecini takipte bu tip tasarlanan tubulizasyonların doldurulmasında rejenerasyonu başlatmak, süreci hızlandırmak ve köprünün diğer tarafına ulaşan nöral hücrelerin yeni nöral dokunun oluşumunu sağlaması için türlü nörotrofik faktörler, embriyonel kök hücreler, growth faktörler kullanılmıştır. Uygunsuz şekilde buluşan aksonlar dejenerasyona uğrar.

Rejenere sinir sonlanmalarından gelen akson filizlerinin aksonal migrasyonu sağlayacak iskelet yapıyı oluşturabilmesi, ekstrasellüler matriks içeriğine sahip olması ve gereğinde çeşitli büyüme faktörlerinin yada kök hücrelerin takviyesi eşliğinde kullanılabilmesi bu tip epinöral kılıf şeklinde tasarlanan bir modelin anlamlı olduğu sonucuna varmamızı sağladı. Biyolojik olarak geçirgen oluşu salınan nörotrofik faktörlerin diffüzyonuna ve kök hücrelerin çoğalıp differansiye olmasına izin vermesi ve buna karşılık fibröz dokunun infiltrasyonunu engelleyebilecek yapıda olması açısından da avantaj sağladığı kanaatindeyiz.

Kök hücre plastisitesi bilinen ve kanıtlanmış bir yetenektir (102-110). Yalnız bir kök hücrenin hangi hücreye dönüşeceğini hücre çekirdeğindeki genler sayesinde belirlenmektedir. Diğer hücreler ölünce veya hasar görünce, kök hücreler hangi hücre türüne ihtiyaç varsa o hücreye dönüşür ve bu işlem sırasında bazı genler daha aktif hale gelirken, bazıları da baskılanır (107,108).



Şekil 53. Kök hücrenin çoğalma veya differansiyasyon kararı.

Son yıllarda MKH'lerin potansiyel klinik kullanımları ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (89). İnvitro olarak gösterilen, MKH'lerin farklılaşma potansiyellerine dayalı bu çalışmalar, büyük defektlerin kapatılmasındaki sorunların aşılması için doku mühendisliği çalışmaları ile kombine edilmiştir. Bu konuda son yıllarda geliştirilen bioreaktör uygulamaları ile hücreler scaffoldlar içine sürekli olarak doldurulmakta, besin destekleri sağlanmakta ve spesifik fiziksel uyarıların verilmesi ile doku büyüme ve gelişmesi elde edilmektedir (45,65,116). Ayrıca doku iyileşmesinin mekanizmaları daha iyi anlaşıldıkça indüktif bir kısım materyaller ile yapılan kültürlerle veya gen transferi yöntemlerinin eklenmesi ile daha iyi sonuçlar bildirilmektedir. Bu gün gelinen noktada kök hücre uygulamaları gelecekteki tedavi modalitelerini etkileyecek gibi görünmektedir. Bu fikirden yola çıkılarak rejenerasyon takibinde tubul içinde adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücre enjeksiyonunu düşündük ve oluşturduğumuz tüp içine son 3 grupta GFP işaretli sAD-MKH enjeksiyonu yaptık. GFP işaretleme immunfloresan takibi için uygun görüldü. Doku ve hücrelerde yer alan bir molekülü in situ olarak lokalize edebilmek için, bu moleküle karşı özel yöntemlerle hazırlanmış enzim veya flüoresan işaretli antikoları karanlık alan ya da ışık mikroskopik düzeyde kullanılması tekniği immünohistokimyasal analiz olarak bilinmektedir. Antijen-antikor birleşme reaksiyonundaki yüksek duyarlılığa dayalı bu yöntemle doku ve hücre komponentlerinin yerleşimleri kolaylıkla belirlenebilmektedir. sAD-MKH enjeksiyonu sonrasında en çok karşılaştığımız sorun hücrelerin extratubularize olmasıydı, bu aşamada literatürde sinir sütürlene alternatifleri olarak bile fibrin glue kullanılabileceği saptanması üzerine deneklere kök hücre enjeksiyonu sonrası anastomoz sahalarına fibrin doku yapıştırıcı uygulanarak extratubularizasyon minimize edildi (68-76). Bir hendikap olarak doku yapıştırıcısının anastomoz sahasına yapışan kök hücrelerin mobilizasyonun engelleyebileceği düşünüldü. Sakrifikasyon sırasında fibrin doku yapıştırıcısının siniri çevre kas dokularınada yapıştırarak eksplorasyonu zorlaştırdığı fark edildi.

Operasyon sonrası 21. Günde fonksiyonel değerlendirme sürecine geçildi. Sensorial testler, elektrofizyolojik çalışmalar ve walking track analizleri literatüre uygun olarak gerçekleştirildi (139,142,146).

Makroskobik muayenede, metatarsofalangeal eklemden başlayarak arka ekstremitte kontraktür ölçümleri, uyluk çaplarının karşılıklı her 2 ekstremitede kıyaslanması nörotize olmayan ekstremitelerin göstergesi olabilir (172,173). Çalışmamızda uyluk çapları her 2 ekstremitede her denek için ayrı ayrı oranlanıp 1 den düşük çıkan tüm veriler kıyaslandığında Grup 1 in anlamlı olarak diğer gruplardan farklı olduğu görüldü.

Motor fonksiyon değerlendirmesinde kullanılan birkaç yöntemden biri olan Toe spread testte puanlama 0 ile 3 arasında değişmekte olup, 0 puan hareket olmadığına, 1 puan harekete ilişkin herhangi bir işarete, 2 puan abduksiyon hareketine, 3 puan ise abduksiyon ve ekstansiyon hareketine denk gelir (136). Duyarlılığı yüksek, tasarımı ve uygulaması kolay yürüme yolu analizi ile, sıçanlarda izole periferik sinir lezyonlarında, sinir iyileşmesinin güvenilir ve doğru olarak takibi mümkündür.

Motor fonksiyonun geri dönüşünü saptamak için çalışmamızda güvenli, tekrarlanabilir ve kolay uygulanıp hesaplanabilir bir yöntem olan Siyatik Fonksiyonel İndeks skalası kullanıldı. SFI analizinde Medinaceli sonrası birçok araştırmacı tarafından farklı formülize edilmiştir (133-147). Deneklerin arka ekstremitelerinin mürekkepli ıslak ıstampaya bastırılarak footprint analizlerinin alınması Özmen ve ark. tarafından ortaya konmuştur (134). Buna rağmen ratların total paralizi olan ekstremitelerini ısırma sonucu gelişen ve değerlendirmeyi olanaksız kılan otomutilasyon nedeniyle 1 rat çalışma dışı bırakılmıştır. Yapılan SFI ölçümlerinde sAD-MKH uygulanıp 4. ay incelemeye alınan Grup 4 ile diğer deney grupları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$).

Sinir sensoryal geri dönüşün tespiti için Geri Çekme, Pin- Prick test kullanılan testler arasındadır. Pin-Prick testte ağırlı uyaran sonrası, seviyeye göre (ayak parmakları, diz, ayak bileği eklem seviyesi vs) 0 ile 3 puan arasında puanlama yapılırken, 0 puan hissin olmadığına, 1 puan diz üzerinde bir seviyeye karşılık gelen his, 2 puan diz ile ayak bileği arasında, 3 puan ayak bileğinin distalinde his saptanmasına işarettir. Kolay uygulanabilir olması nedeniyle çalışmamızda sensoryal fonksiyonu değerlendirmek için Geri çekme testi kullanıldı. Tüm gruplar, sakrifikasyon önceki günlerde teste tabi tutularak puanlamalar kaydedildi. Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak anlaşıldı (145,146). Geri Çekme testinde Varejao ve ark.'nın belirttikleri gibi uygulamayı olumsuz kabul edip bitirme sınırı 12 saniye iken Grup 1 için bu değerler 11 ve 12 olarak kaydedildi. 4. ayda değerlendirilen Grup 4 te ise ortalama 6 sn olarak kaydedilmesi anlamlı geri dönüş lehine yorumlandı. Duysal, motor ve sempatik liflerden oluşan periferik sinir lifleri dorsal kök ganglionlarında, anterior motor boynuzda ve sempatik ganglionlarda yerleşimli sinir hücre gövdelerinin uzantılarıdır. Bu lifler elektriksel ileti taşıyan aksonlardan oluşur. Bundan yola çıkılarak kas liflerinden geçen aksiyon potansiyelinin oluşturduğu elektrik sinyallerinin bir amplikatör aracılığı ile büyütülerek incelenmesi esasına dayanan bu elektrofizyolojik yöntemler geliştirilmiştir. Çalışmamızda gastrocnemius kası üzerinde deneklerin preoperatif ve postoperatif elektrofizyolojik incelemeleride alınmıştır (79,83,85). ENMG' de sivri amplitüd, kısa distal latans, polifazik motor ileti potansiyelinin gözlenmesi tamir ve reinnervasyon belirtileridir. Elektrofizyolojik çalışmalar, amplitüd, latans ve ileti hızı gibi ölçümleri içeren, sinir iyileşmesinin farklı dönemlerinde aksonların iyileşmesine yönelik bilgiler sağlamasına karşın, yaralanma sonrası erken dönemde aksonlar hedef organa ulaşmadığı için, bu yöntemin sağladığı bulgular yetersiz kalabilmektedir.

Bu değerlendirme sırasında en çok zorlandığımız teknik sorun sıçana uygun elektrod bulamamamız ve çalışmayı tekrarlamaya çalışırken deneklerin vücut ısılarının düşmesi idi.

Siyatik sinirde 1cm'lik defekt oluşturduktan sonra sinir segmentlerinden arındırıp yerine boş epinöral tüp ile rekonstruksiyon yaptığımız Grup 1 deneklerinde yapılan makroskopik, mikroskopik ve elektrofizyolojik çalışmalarda literatürle benzer sonuçlar alınmıştır. Bilateral güdük sahasının gerisinden alınan numunelerin histolojik tetkiklerinde sinir dokusunun tüp içinde bulunmaması bu 1 cm'lik defektin sıçanlarda kritik defekt olduğu ve kendi kendine rejenere olmayacağını göstermektedir.

Kas ve sinir dokusu numunelerinin sakrifikasyon sonrası hassas tartıda ağırlıklarının kıyaslanması 4. Grubun en az atrofiyle sonuçlandığını göstermiştir. Numunelerin histopatolojik incelemelerinde SEM ile aksonal yapı Grup 4 te daha çok olmak üzere Grup 3 tede seçilebilmiştir. GFP işaretli sAD-MKH hücrelerinin immünsitokimyasal takibinde ise, sAD-MKH in pluripotent karakteri korunmuş, hücrelerin spontan farklılaşma ve nöronal farklılaşma özellikleri incelenmiştir.

Embriyonik gelişim süresince kök hücrelerin gelişimini ve farklılaşmasını belirleyen en önemli faktörlerden biri bulunduğu çevredir (92). Hücre içinde bulunduğu çevre maruz kaldığı sinyal moleküllerine göre farklılaşmaya başlar. Bu sinyal molekülleri hücrenin mikroçevresini oluşturur. Nöral hücre öncülleri; nöroflament antikoruyla belirlenmiştir. Elde ettiğimiz farklılaşan hücre popülasyonunun içinde mezenkimal ve/veya mezodermal hücre olup olmadığı sırasıyla vimentin antikoruyla gösterilmiştir. Bu çalışmada, sAD-MKH in epinöral tüp içinde nöronal hücrelere farklılaşmayı uyardığı immünsitokimya yöntemi ile gösterilmiştir. sAD-MKH in nöronal farklılaşmayı zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak etkilediği de elde edilen diğer bir sonuçtur.

Post operatif 4. ayda yapılan eksplorasyonda Grup 4 deneklerinde, operasyon sahasında fibrozis ve inflamasyonun minimal olduğu, koaptasyon hatlarının yalnızca nonabsorbable sûtür materyalleri ile seçilebilecek kadar güzel iyileşmiş olduğu izlendi. Bu grupta deney hayvanlarının bacak kaslarındaki atrofinin az olması iyileşmenin daha iyi olduğunu mikroskopik ve elektrofizyolojik değerlendirmelerden önce belli etmiştir. Yapılan SEM ve immunfloresan çalışmalarında en fazla miyelinli ve miyelinsiz akson yoğunluğunun bu grupta gözlenmiş olması istatistiksel verilerinde desteğiyle, literatürle uygunluk gösteren ve beklenen bir durumdur. Adipöz doku, kemik iliği ve birçok hematopoietik dokudan izole edilebilen MKH'lerin uygun mikroçevre ile çeşitli dokulara farklılaşabileceği immunhistokimyasal olarak gösterilmiştir ama buna rağmen nöronal rejenerasyonu gösteren parametrelerin çoğu histopatolojik yöntemler olup yeniden yapılanmanın kök hücre plastisitesi ve transdiferansiyasyona mı yoksa verilen kök hücrelerin sağladığı destek doku ortamında endojen nöronal progenitör hücrelerin hızlanmış diferansiyasyonuna mı bağlı olduğunu ayırt ettirici duyarlılıkta değildir.

Sonuç olarak ;

- Rejenere olan aksonların bir kılıf içinde belirli bir yönde uzanması sağlanarak nöroma oluşumunun önüne geçilebileceği
- Epinöral kılıf sayesinde nörotrofik faktörler ve kök hücre karışımının hasarlı sinire daha fazla etkileşim sağlayacağı
- Aksonlar arasındaki oryantasyon kaybının minimize edileceği
- Rejenerasyon kapasitesi artırılmış aksonların, daha iyi fonksiyonel geri kazanım sağlayarak, işe ve gündelik işlerini bireyin kendisinin yapabilmesi için geri dönüş süresini kısaltacağı
- Çalışmamızda elde edilen olumlu sonuçların klinik uygulamalar için basamak teşkil ederek konu hakkında araştırma yapanları cesaretlendireceği kanaatindeyiz

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Deneysel siyatik sinir kesisinde, Adipöz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre uygulamasının rejenerasyona etkilerinin, footprint analizi gibi klinik yöntemler elektron mikroskopik, immunhistokimyasal ve histomorfometrik yöntemlerle araştırılmasının amaçlandığı bu çalışma sonucunda; adipöz doku kökenli mezenkimal kök hücrenin, periferik aksonal rejenerasyona anlamlı olarak pozitif etkisi saptandı. İmmunhistokimyasal çalışmalarda GFP işaretli sAD-MKH hücrelerin yeni aksonal tüp oluşturmalarının yanında rejenerasyon zincirini tetikleyip gastrocnemius kasına dek uzandığı floresan yöntemiyle tespit edildi. Uyarılan kök hücreler nöronal hücrelere farklılaşmışlar ve oluşan hücreler immun boyama yöntemi ile gösterilmiştir. İmmun boyama ile meydana gelen nöronal hücrelerin kesin yüzdelerini vermek mümkün olmamıştır. Özellikle postoperatif 4. ayda sakrifiye edilen kök hücre uygulanmayan 1. Grup ve kök hücre uygulanan 4. Grup arasında, 1. grubun yürüme testi, kas atrofisinin kas ağırlık tartımı, makroskopik ve uyluk ölçümleri ile de periferik sinirinin rejenerasyon olamayacak kadar defektif olduğu sonucuna varmamızı sağladı. Grup 4 ise hem elektrofizyolojik hemde walking track analizlerinde en iyi sonuçları alırken, kas atrofisi bilateral kıyaslamalı olarak en az izlendi. Bu sonuç, rejeneratif ve reperatif tıp tan medet uman periferik sinir hasarlı birçok hastanın toplumsal yükünün azaltılıp, birim zamana düşen işgücünün arttırılabilmesi ve fonksiyonel kayıplarının geri getirilebilmesi için bir mesafe olarak kaydedildi. Bu şekilde bu tip hasarların periferik sinir rehabilitasyonu, sosyal ve psikolojik boyutları için yapılan harcamalar minimize edilebilir, mezenkimal kök hücrelerin potansiyel klinik kullanım avantajlarının ortaya konması yanında, periferik sinir hasarlarında kök hücre tedavilerinin daha bilinçli yapılması sağlanabilir. Periferik sinirin kök hücre sayesinde iyileşmesi konusunda elde edilecek ayrıntılı veriler ve bu konudaki mekanizmaların tam olarak anlaşılmasından sonra, ileri doku mühendisliği uygulamaları ile sinir rejenerasyonu konusunda daha gelişmiş modellerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Secer HI, Danayemez MK. Periferik sinir yaralanmaları ve cerrahisi. Ed: Korfali E, Zileli M, Temel Noroşirurji, 1st ed. pp.1763-1790, Türk Nöroşirurji Derneği, Ankara, 2010.
- 2- Bayram İçli M. MD. Laboratuvar Sıçanının Anatomisi. Deneysel Mikrocerrahi. pp.489-561, ARGOS, 1.Baskı.
- 3- Bozkurt G, Benli K. Periferik sinir yaralanmaları. In: Benli K. (editor) Temel Nöroşirurji. 1st ed. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Basımevi, 2004; 319-346.
- 4- Hirasawa Y. Basic research on peripheral nerve injury and regeneration. Ed: Hirasawa Y, Treatment of Nerve Injury and Entrapment Neuropathy. pp: 1-11, Springer-Verlag, Tokyo, 2005.
- 5- Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. J Anat. 1999;194:1-14.
- 6- Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. Microsurgery. 1998;18:397-405.
- 7- Seddon HJ: Peripheral nerve injuries. Medical Research Council Special Report Series No. 282 London: Her Majesty's Stationery Office. 1954.
- 8- Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. J Anat. 1999;194:1-14.
- 9- Lundborg G, Longo FM, Varon S. Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. Brain Res 1982;232:157–161.
- 10-Mackinnon SE, Dellon AL. Selection of Optimal Axon Ratio for Nerve Regeneration. Ann. Plast. Surg. 1989;23:129–134.
- 11-Janecka IP. Peripheral nerve regeneration: an experimental study. Laryngoscope. 1987;97(8 Pt 1):942-950.

- 12-Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg [Br]*. 1998;23(4):433-437.
- 13-Griffin JW, Hoffman PN. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system. Ed: Dyck P, Thomas PK, *Peripheral neuropathy*. 3rd. pp.361-376, WB Saunders, Philadelphia, USA, 1993.
- 14-Fu YS, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol. Neuro*. 1997;14:67-116.
- 15-L Dvali, S Mackinnon. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clinics in plastic surgery*, Elsevier, USA, 2003.
- 16-Makwana M, Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS Journal*. 2005;272:2628-2638.
- 17-Isaacs j. Treatment of acute peripheral nerve injuries: Current conceptst. *J Hand Surg Am*. 2010;35:491-497.
- 18-Thomas MB. Nerve Repair and Grafting. In: Green DP, HotchkissRN, Pederson WC, eds. *Green's Operative Hand Surgery*. Philadelphia Churchill Livingstone, 1999;1381-404.
- 19-Lubiatowski P, Unsal FM, Nair D, Ozer K, Siemionow M. The epineural sleeve technique for nerve graft reconstruction enhances nerve recovery. *Microsurgery*. 2008;28(3):160-167.
- 20-Ayhan S, Yavuzer R, Latifoğlu O, Atabay K. Use of the turnover epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. *J Reconstr Microsurg*. 2000;16(5):371-377.
- 21-Matsuyama T. Peripheral nerve repair and grafting techniques:a review. *Neurol Med Chir*. 2000;40:187-199.
- 22-Shenaq SM, Kim JYS. Repair and grafting of peripheral nevres. Ed: Mathes SJ, *Plastic surgery*. 2nd ed, Volume 1. pp. 719–743, Saunders Elsevier, Philadelphia, USA, 2006.

- 23-Brusthart TM. Nerve Repair and Grafting. Ed: Green DP, Oper Hand Surg volume II. pp:1381-1403, Churchill Livingstone, New York ,1999.
- 24-Kök Hücrelerin Kullanım Alanları, Kök hücre araştırmalarında güncel kavramlar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları. 2006;7:14–21.
- 25-Pfendler KC, Kawase E. The Potential of Stem Cells. Obstet. Gynecol Surg. 2003;58-3:197.
- 26-Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della PA, Abatangelo G, Cortivo R. Neural potential of adipose stem cells. Discov Med. 2010 Jul;10(50):37-43.
- 27-Altun Ü. Periferik sinir cerrahisinde kullanılan bazı donör sinirlerin ışık mikroskopik düzeyde incelenmesi. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Yüksek Lisans tezi, Antalya, 2007.
- 28-Sarioğlu AC: Periferik sinir cerrahisinde son gelişmeler. İ.Ü.Tıp Fakültesi Mecmuası. 1983;46:192-197.
- 29-Midha R, Mackay MS: Peripheral nerve suture techniques, in Rengachary SS (ed): Neurosurgical Operative Atlas. Chicago, AANA Publishing, 1999, pp 261–269.
- 30-Akbay A. Periferik Sinirin Mikroanatomisi ve Sinir Kesilerinde Uygulanan Cerrahi Teknikler. Türk Nörosirürji Dergisi. 2005;15(3):198-201.
- 31-Lin KY, Posnick JC, Al-Qattan MM, Vajsa J, Becker LE. Fetal nerve healing; an experimental study. Plast Reconstr Surg. 1994;93:1323-1333.
- 32-Canale TS ed. Campbells's Operative Orthopaedics 10th ed. vol 4, 3221-3246.
- 33-Thomas PK, Berthold CH, Ochoa J. Microsurgical anatomy of the peripheral nervous system. In: Dyck PJ, Thomas PK, eds, Peripheral neuropathy, Philadelphia: W.B. Saunders, 1993: pp. 28–91.

- 34-Sarıgüney Y. Periferik Sinir Yaralanmalarının Onarımında Trombositten Zengin Plazma'nın Sinir Rejenerasyonu Üzerine Etkisi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Uzmanlık Tezi, Ankara, 2006.
- 35-Myers RR. Anatomy and microanatomy of peripheral nerve. Neurosurg Clin N Am. 1991;2:1-20.
- 36-Dellon AL, Mackinnon SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. Microsurgery. 1989;10(3):220-225.
- 37-<http://ink.primate.wisc.edu/~thomson>
- 38-Kuffler DP. Ultrasound imaging of regenerating rat sciatic nerves in situ. J Neurosci Methods. 2010;3:6.
- 39-Erb DE, Mora RJ, Bunge RP: Reinnervation of adult rat gastrocnemius muscle by embryonic motoneurons transplanted into the axotomized tibial nerve. Exp Neurol. 1993;124:372-76.
- 40-Junqueira CL, Carneiro J. Basic Histology, Tenth Edition. Ed: Abrahamsohn PA, Nerve tissue. pp. 172-187, McGraw-Hill Companies, 2003.
- 41-Tetik C, Erol B, Çabukoğlu C, Ünsal M. Sıçan siyatik sinir modelinde fonksiyonel değerlendirme yöntemlerinin yeni bir sistemle karşılaştırılması. Acta Orthop Traumatol Turc. 2000;34:523-527.
- 42-Akbay A. Periferik Sinir Mikroanatomisi ve Sinir kesilerinde Uygulanan Cerrahi teknikler. Türk Nöroşirurji Dergisi. 2005;15 (3):198-201.
- 43-Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. Brain. 1951;74:491-516.
- 44-Sunderland S. The connective tissue of peripheral nerves. Brain. 1965;88:841-854.
- 45-Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. Muscle Nerve Supplement. 2000;9:33-38.
- 46-Culmsee C, Mattson MP. p53 in neuronal apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2005;Jun10;331(3):761-777.

- 47-Myckatyn TM, Mackinnon SE. Microsurgical Repair of Peripheral Nerves and Nerve Grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery, Sixth Edition by Charles H. Thorne. S:75, 2007.
- 48-Pleasure D, Bora WF, Lane J, Prockop D. Regeneration after nerve transection: effect of inhibition of collagen synthesis. *Exp. Neurol.* 1974;45:72-78.
- 49-Funakoshi H, Risling M, Carlstedt T, Lendahl U, Timmusk T, Metsis M, Yamamoto Y, Ibanez CF. Targeted expression of a multifunctional chimeric neurotrophin in the lesioned sciatic nerve accelerates regeneration of sensory and motor axons. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:5269-5274.
- 50-Caplan A.I, Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.* 2006;1(5):1076-1084.
- 51-Gu SH, Xu WD, Li XK, Ochiya T, Wang Y. Regenerated Host Axons Form Synapses with Neurons Derived from Neural Stem Cells Transplanted into Peripheral Nerves. *Journ Inter Med Res.* 2010;38:1721–1729.
- 52-Bannerman P, Ara J, Hahn A, Hong L, McCauley E, Friesen K, Pleasure D. Peripheral nerve regeneration is delayed in neuropilin 2-deficient mice. *J Neurosci Res.* 2008;Nov 1;86(14):3163-3169.
- 53-Kiryu-Seo S, Hirayama T, Kato R, Kiyama H. Noxa is a critical mediator of p53-dependent motor neuron death after nerve injury in adult mouse. *J Neurosci.* 2005;Feb9;25(6):1442-1447.
- 54-Nishio Y, Nishihira J, Ishibashi T, Kato H, Minami A. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in peripheral nerve regeneration: anti-MIF antibody induces delay of nerve regeneration and the apoptosis of Schwann cells. *Mol Med.* 2002;Sep;8(9):509-520.
- 55-Dodla MC, Bellamkonda RV. Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminin and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps. *Biomaterials.* 2008;Jan;29(1):33-46.

- 56- Fine EG, Decosterd I, Papaloizos M, Zurn AD, Aebischer P. GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur J Neurosci.* 2002;Feb;15(4):589-601.
- 57-Kim BS, Yoo JJ, Atala A. Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. *J Biomed Mater Res.* 2004;68A;201-209.
- 58-Naderi S, Güçlü B. Periferik sinir cerrahisinin tarihçesi. Ed: Demircan N, Zileli M, Periferik sinir cerrahisi, 1st ed. Pp.1-6, Ankara: Türk Nöroşirurji Derneği, Ankara, 2008.
- 59-Fernandez E, Pallini R, Lauretti L, Scogna A. Neurosurgery of the peripheral nervous system: injuries, degeneration and regeneration of the peripheral nerves. *Surg Neurol.* 1997;48:446-447.
- 60-Siemionow M, Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009;Chapter:8,87:141-172.
- 61-Siemionow M, Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E. Epineural Sleeve Neurorrhaphy: Surgical Technique And Functional Results- Preliminary Report. *Ann Plas Surg.* 2002;48:3–10.
- 62-Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, China. 2008;83-93.
- 63-Demirciler N. Periferik sinir kesilerinin onarımında “sliding epineural sheet tube” ün rejenerasyona katkısı. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Uzmanlık Tezi, Ankara, 1996.
- 64-Ayhan S. Periferik sinir defektlerinin onarımında turnover epineural sheath tube’ün sinir rejenerasyonuna etkisi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Uzmanlık Tezi, Ankara, 1998.
- 65-Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomater.* 2005;25:1583-1592.

- 66-Jubran M, Widenfalk J. Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors. *Exp Neurol*. 2003;181(2):204–212.
- 67-T. Kiyotani, M. Teramachi, Y. Takimoto, T. Nakamura, Y. Shimizu, K. Endo, Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid–collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves, *Brain Res*. 740 (1996)66–74.
- 68-İyigün Ö, Şekerci Z, Taşçı N, Cantürk F, Marangoz C. Siyatik sinirin doku yapıştırıcısı ve suture ile epinöral anastomozunun elektrofizyolojik olarak karşılaştırılması. *OMÜ Tıp Dergisi*. 1991;8/4:340-342.
- 69-Alpay, U, Yaman S, Kuran İ, Aydın H: Periferik sinir onarım sonuçlarımız. 3. El Cerrahi ve Rekonstruktif Kongresi, 1994;s:120-121.
- 70-Silva D, Coelho J, Frazilio F, Odashiro A. End-to-side nerve repair using fibrin glue in rats. *Acta Cir Bras*. 2010 Mar-Apr;25(2).
- 71-Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation - Part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment. *J Reconstr Microsurg*. 2006;22(2):123-128.
- 72-Feldman MD, Sataloff RT, Epstein G, Ballas SK. Autologous fibrin tissue adhesive for peripheral nerve anastomosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987 Sep;113(9):963-967.
- 73-Suri A, Mehta VS, Sarkar C. Microneural anastomosis with fibrin glue: an experimental study. *Neurol India*. 2002 Mar;50(1):23-26.
- 74-Tomas M, Johan F. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological and morphometric study in the rat sciatic nerve. *Journal of Neurosurgery*. 2001 Oct;95/4:694-699.
- 75-Gosk J, Knakiewicz M, Wiacek R, Reichert P. The use of the fibrin glue in the peripheral nerves reconstructions. *Polim Med*. 2006;36(2):11-15.

- 76-Benfrech E, Alnot JY, Henin D. Experimental study of nerve sutures and grafts of the sciatic nerve in the rat using fibrin glue. *Ann Chir Main* 1989;8:296-299.
- 77-Polder Tw: Pathophysiology of peripheral nerve injury and repair. Palmer JD(ed): *The manuel of Neurosurgery*, Edinburg: Churchill Livingstone, 777-789, 1996.
- 78-Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. Conventional versus epineural sleeve neurorrhaphy technique: Functional and histomorphometric analysis. *Ann Plast Surg* 2002;49:397–403.
- 79-Menovsky T & Beek J.F. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological, and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg.* 2001;95:694–699.
- 80-Zhou S. Anastomosis of peripheral nerve by fibrin glue. *Zhonghua Wai.* 1990;28:682-92.
- 81-Zhang C, Gu Y, Chen L. Experimental study of fibrin glue with epineural anchor suture to repair peripheral nerves. *Zhonggu Xiu.* 1998;12:129-32.
- 82-Hems TEJ, Glasby MA. Comparison of different methods of repair of long peripheral nerve defects: en experimental study. *Br J Plast Surg.* 1992;45:497-502.
- 83-Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg.* 2000;25:391–414.
- 84-Lundborg G. *Nerve Injury and Repair*, Churcill Livingstone, New York, 1988.

- 85-Burhanoğlu AD, Köse A, Koç MN, Alhan B, Karabulut İ, Can B, Balkancı B, Şensöz Ö, Ayyıldız G. Periferik Sinir Onarımında Siyanoakrilat Glue ve Mikrosütür Uygulamasının Histomorfometrik ve Tensinometrik Yöntemlerle Karşılaştırılması. 30.Türk plastik rekonstrüktif ve estetik cerrahi ulusal kongresi, Antalya, 15-18 Ekim 2008.
- 86-Karaöz E, Ovalı E . Kök Hücreler. Derya Kitabevi, Trabzon, 2004.
- 87-Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulsom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. Mol Pathol, 56:86-96, 2003.
- 88-Vats A, Tolley NS, Polak JM et al. Stem cells: sources and applications. Clin Otolaryngol. 2002;27:227-232.
- 89-Lakshmipathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. Blood. Rev. 2005;19:29-38.
- 90-Gardner RL. Stem cells: potency, plasticity and public perception. J Anat. 2002;200:277-282.
- 91-Conrad C, Huss R. Adult Stem Cell Lines in Regenerative Medicine and Reconstructive Surgery. Journ Surg Res. 2005;124:201–208.
- 92-Bakke AC. The principles of flow cytometry. Lab Med. 2001;32:207-211.
- 93- Givan AL. Principles of flow cytometry: an overview. Methods Cell Biol. 2001;63:19-50.
- 94-Cui L, Jiang J, Wei L, Zhou X, Fraser JL, Snider BJ, Yu PS. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. Stem Cells. 2007;May;26(5):1356-1365.
- 95-<http://stemcells.nih.gov/>
- 96- <http://www.news.wisc.edu/packages/stemcells/>
- 97-<http://stemcells.nih.gov/info/basics>
- 98-<http://www.stemcellresearchfoundation.org/>
- 99-<http://www.stemcells.wisc.edu/>

- 100- Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue: Isolation, Characterization, and Differentiation Potentialities. *Bull Exp Biol Med.* 2005;140(1):138-143.
- 101- Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez-Corrochano R, Diaz-Gonzalez D, Reimers D. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res.* 2002;24:634-638.
- 102- Short B, Brouard N, Scott TO. Mesenchymal Stem Cells. *Arch of Medi Res.* 2003;34:565-571.
- 103- Walsh S, Midha R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus.* 2009;Feb;26(2):E2.
- 104- Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, Lieberman JR. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng.* 2005;11(1-2):120-129.
- 105- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Apr;36(4):568-584.
- 106- Goel RK, Suri V, Suri A, Sarkar C, Mohanty S, Sharma MC, Yadav PK, Srivastava A. Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve. *J Clin Neurosci.* 2009;16(9):1211-1217.
- 107- Yamakawa T, Kakinoki R, Ikeguchi R, Nakayama K, Morimoto Y, Nakamura T. Nerve regeneration promoted in a tube with vascularity containing bone marrow-derived cells. *Cell Transplant.* 2007;16(8):811-822.
- 108- Keilhoff G, Stang F, Goehl A, Wolf G, Fansa H. Transdifferentiated mesenchymal stem cells as alternative therapy in supporting nerve regeneration and myelination. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;Oct-Nov;26(7-8):1235-1252.

- 109- Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, Igura K, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2011Apr;112(4):1206-1218.
- 110- Shi Y, Zhou L, Tian J, et al. Transplantation of neural stem cells overexpressing glia-derived neurotrophic factor promotes facial nerve regeneration. *Acta Otolaryngol*. 2008;17:1–9.
- 111- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):132-41. Review.
- 112- Bunnell B.A, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45. 2008;3;115–120.
- 113- Fernyhough ME, Hausman GJ, Guan LL, Okine E, Moore SS, Dodson MV. Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368(3):455–457.
- 114- Erba P, Terenghi G, Kingham PJ. Neural Differentiation and Therapeutic Potential of Adipose Tissue Derived Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009;Nov 26.
- 115- Di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009;Oct 12.
- 116- Shen C-C, Yang Y-C, Liu B-S. 2011. Peripheral nerve repair of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in a biodegradable reinforced nerve conduit. *J Biomed Mater Res Part A* 2011;00A:000–000.

- 117- Scholz T, Sumart A, BS, Krichevsk A, Evans G. Neuronal Differentiation of Human Adipose Tissue–Derived Stem Cells for Peripheral Nerve Regeneration In Vivo. *Arch Surg*. 2011;146(6):666-674.
- 118- Dhar S, Yoon ES, Kachgal S, Evans GR. Long-term maintenance of neuronally differentiated human adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Eng*. 2007;13:2625-2632.
- 119- Fujimura J, Ogawa R, Mizuno H, Fukunaga Y, Suzuki H. Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333:116–121.
- 120- Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, et al. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*. 2007;207:267-274.
- 121- Liqing Y, Jia G, Jiqing C, Ran G, Fei C, et al. Directed differentiation of motor neuron cell-like cells from human adipose-derived stem cells in vitro. *NeuroReport*. 2011;22:370-373.
- 122- Kang, SK, Bae YC, Kim HK, Baik SY. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol*. 2003;183:355.
- 123- Marchesi C, Pluderi M, Colleoni F, Belicchi M, Meregalli M, Farini A, Parolini D, Draghi L, Fruguglietti ME, Gavina M, Porretti L, Cattaneo A, Battistelli M, Prella A, Moggio M, Borsa S, Bello L, Spagnoli D, Gaini SM, Tanzi MC, Bresolin N, Grimoldi N, Torrente Y. Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. *Glia*. 2007;Mar;55(4):425-438.
- 124- Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:6052–6063.
- 125- Bruce A.B, Mette F, Christine G, Bindiya P, Cynthia R. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45:115-120.

- 126- Kuhbier JW, Weyand B, Radtke C, Vogt PM, Kasper C, Reimers K. Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2010 Jan 21.
- 127- Evans GD. Peripheral Nerve Injury: A Review and Approach to Tissue Engineered Constructs. *The Anatomical Record*. 2001;263:396.
- 128- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279–4295.
- 129- Committee on care and use of laboratory animals of the institute of laboratory animal resources commission on life sciences: Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication, Bethesda, Public Health Services, National Institute of Health; 1985.
- 130- Dahlin L, Lungborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clinics of North Am*. 2001;12:2.
- 131- Williams LR, Longo FM, Powel HC et al. Spatial temporal process of peripheral nerve regenerations within a silicone chamber; parameters for assay. *J Comp Neurol*. 1983;218: 460-470.
- 132- Varejao AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods. For the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res*. 2004;26(2):186-194.
- 133- Wong AY, Scott JJ. Functional recovery following direct or graft repair of nerve gaps in the rat. *Exp Neurol*. 1995;114(3):364-366.
- 134- Ozmen S, Ayhan S, Latifoğlu O, Siemionow M. Stamp and paper method: a superior technique for the walking track analysis. *Plast Reconstr Surg*. 2002;Apr15;109(5):1760-1761.
- 135- Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98:1264-1271.

- 136- Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982;77:634-643.
- 137- De Medicanelli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neur*. 1982;77:634-643.
- 138- Varejao AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Blulas-Cruz J. Methods for experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res*. 2004;26:186-194.
- 139- Martins RS, Gilberto M, Plese JPP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006;64(3-B):750-756.
- 140- Shen N, Zhu J. Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. *Microsurgery* 1995;16:552-555.
- 141- Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98:1264-71.
- 142- Bozkurt A, Deumens R, Scheffel J, O'Dey DM, Weis J, Joosten EA, Führmann T, Brook GA, Pallua N. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. *J Neurosci Methods*. 2008;Aug15;173(1):91-98.
- 143- Deumens R, Jaken RJ, Marcus MA, Joosten EA. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *J Neurosci Methods*. 2007;164(1):120-130.
- 144- Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, et al. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89:251–258.
- 145- Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods* 2001;108:1-9.

- 146- Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods* 2000;96:89-96.
- 147- Bervar M. Video analysis of standing an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods* 2000;102:109-116.
- 148- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:129-136.
- 149- Quan D, Bird S. Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nerve injuries. *Orthopaedic Journal*. 1999;12:45-51.
- 150- Friedman WA: The electrophysiology of peripheral nerve injuries. *Neurosurgery Clin N Am* 2: 4356, 1991.
- 151- Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst*. 2003; 8:236-250.
- 152- Taniuchi M, Clark HB, Schweitzer JB, Johnson EM. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J Neurosci*. 1998;Feb;8(2):664-681.
- 153- Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1985a;75:384-388.
- 154- Walsh SK, Gordon T, Addas BM, Kemp SW, Midha R. Skin-derived precursor cells enhance peripheral nerve regeneration following chronic denervation. *Exp Neurol*. 2009;5:27.

- 155- WC Grabb, JW Smith, SJ Aston, RW Beasley. Ed:Lipincot-Raven, Grabb and Smith's Plastic Surgery. pp:79- 89, New York, 1997.
- 156- Deshpande DM, Kim YS, Martinez T, et al. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol*. 2006;60:32–44.
- 157- Masters DB, Berde CB, Dutta SK, Griggs CT, Hu D, Kupsky W, Langer R. Prolonged regional nerve blockade by controlled release of local anesthetic from a biodegradable polymer matrix. *Anesthesiology*. 1993;79(2):340–346.
- 158- Hu D, Hu R, Berde CB. Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade. *Anesthesiology*. 1997;86(4):957–965.
- 159- Shir Y, Zeltser R, Vatine JJ, Carmi G, Belfer I, Zangen A, Overstreet D, Raber P, Seltzer Z. Correlation of intact sensibility and neuropathic pain-related behaviors in eight inbred and outbred rat strains and selection lines. *Pain*. 2001;90(1–2):75–82.
- 160- Sheng CY, Liang HC, Chuan TC, Hsin CT, Chiang CW, Li HC, Hsu YC. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*. 2000;21:1541-1547.
- 161- Dinh P, Hazel A, Palispis W, Suryadevara S, Gupta R. Functional assessment after sciatic nerve injury in a rat model. *Microsurg*. 2009;29:644-649.
- 162- Ruiter GCW, Malessy MJA, Alaid AO, Spinner RJ, Engelstad JK, Sorenson EJ. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. *Exp Neurol*. 2008;211:339-350.

- 163- Ian R, Sunderland P, Brenner M, Singham J. Effect of tension on nerve regeneration in rat sciatic nerve transection model. *Ann Plast Surg.* 2004;53:382-387.
- 164- Stevenson TR, Kadhiresan VA, Faulkner JA. Tubular nerve guide and epineural repair: comparison of techniques for neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg.* 1994;10(3):171–174.
- 165- Nicoli Aldini N, Perego G, Cella GD, Maltarello MC, Fini M, Rocca M, Gardin R. Effectiveness of a bioabsorbable conduit in the repair of peripheral nerves. *Biomaterials.* 1996;17(10):959–962.
- 166- Foidart-Desalle M, Dubuisson A, Lejeune A, Severyns A, Manassis Y, Delree P, Crielaard JM, Basleer R, Lejeune G. Sciatic nerve regeneration through venous or nervous grafts in the rat. *Exp Neurol.* 1997;148:236 – 246.
- 167- Giardino R, Nicoli Aldini N, Perego G, Cella G, Maltarello MC, Fini M, Rocca M, Giavaresi G. Biological and synthetic conduits in peripheral nerve repair: a comparative experimental study. *Int J Artif Organs.* 1995;18(4):225–230.
- 168- Suematsu N. Tubulation for peripheral nerve gap: its history and possibility. *Microsurg.* 1989;10:71–74.
- 169- Dellon AL. Use of a silicone tube for the reconstruction of a nerve injury. *J Hand Surg.* 1994;19:271.
- 170- Chatdokmaiprai C, Suwansingh W, Worapongpaiboon S. The turnover distal epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. *J Med Assoc Thai.* 2006;89(5):663-669.

171- Atabay K, Hong C, Heil BV. The use of "Sliding epineurial sheath tube" for repair of peripheral nerve defects. *Plast Surg Forum*. 1995;18:121-123.

172- Aguayo AJ. Schwann cell survival in auto-, allo- and xenografts. Ed: Gorio A, Millesi H, Mingrino S. *Post-traumatic peripheral nerve regeneration: Experimental basis and clinical implications*. pp:319-321. New York:Raven Press; 1981.

173- Aguayo AJ, Bray GM. Experimental nerve grafts. Ed: Jewett D, McCarroll. *Nerve Repair and Regeneration*. pp:68-75, Its clinical and experimental basis. St. Louis:CV Mosby. 1976.

174 – Lauren E, Kokai BS, Rubin P. The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116:1453.

175- Bae KS, Park JB, Kim HS, Kim DS. Neuron-like differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J*. 2011;52(3):401-412.

176- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage Potential Of Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999;284:318.

177- Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal Stem Cells: building blocks for molecular medicine in 21. century. *Trends Mol Med*. 2001;7:259.

EKLER

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

PROF. DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

(DÜHADEK)

ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO	ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ
31.05.2010	1	1	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Bozkurt

KARAR

"Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrenin periferik sinir rejenerasyonuna etkisinin saptanması" konulu çalışma Etik Kurulumuzca görüşülmüş olup çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

(2010-17)

GÖREVİ	ADI-SOYADI	BÖLÜMÜ	EVET	HAYIR	İMZA
Başkan Raportör	Prof. Dr. M. Serdar KEMALOĞLU	Tıp Fak. Beyin Cerr ABD	X		
Üye	Prof.Dr. Ahmet ONAY	Fen FAK. Biyoloji ABD	X		
Üye	Doç. Dr. Muzaffer TAŞ	Veteriner Fak. Dölerme ve Suni Tohumlama ABD	X		
Üye	Yrd. Doç. Dr. M.Kemal BAŞARALI	Tıp Fak. Biyokimya ABD	X		
Üye	Yrd. Doç. Dr. Berna GÜNEY SARUHAN	Veteriner Fak.Histoloji ve Embriyoloji ABD	X		
Üye	Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman ABAKAY	Tıp Fak.Göğüs Hastalıkları ABD	X		
Üye	Yrd. Doç. Dr. Harun ALP	Veteriner Fak.Farmakoloji ve Toksikoloji ABD	X		
Üye	Ebubekir ERMIŞ	Yenişehir İlçe Milli Eğitim Şube Müdürü	X		
Üye	Süleyman DAZ	Avukat	X		

Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin PAYZIN Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM)

Tel: 0 412 248 83 31 (4062) Fax: 2488431

E-Posta: dusam@dicle.edu.tr Elektronik Ağ: www.dicle.edu.tr/merkez/sagmer

