

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

PERİFERİK SİNİR YARALANMALARININ ONARIMINDA
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA’NIN
SİNİR REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. YAKUP SARIGÜNEY

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. REHA YAVUZER

ANKARA – 2006

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın yapılabilmesinde büyük katkıları olan, fikir aşamasından itibaren her basamakta bilimsel ve teknik bilgilerinden faydalandığım, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Reha Yavuzer'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda, tez çalışmalarım sırasında, değerli görüşlerini ve hoşgörülerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kenan Atabay'a, Sayın Prof. Dr. M. Cemalettin Çelebi'ye, Sayın Prof. Dr. Seyhan Çenetoğlu'na, mikrocerrahi konusunda bana büyük katkıları olan Sayın Doç. Dr. Sühan Ayhan ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Selahattin Özmen'e, yardımları ve işgücü ile çalışmanın yürütülmesine destek olan Dr. Yücel Demir'e, Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nın olanaklarından yararlanmamı sağlayan Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi Tıbbi ve Cerrahi Komisyonu üyelerine, trombositten zengin plazma hazırlanması aşamasındaki hassas ve özverili çalışmalarından dolayı Çocuk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. İdil Yenicesu'ya ve Eczacılık Fakültesinin olanaklarından yararlanmamı sağlayan Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Fethi Şahin'e, elektromiyografik çalışmalara destek olan Nöroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Hayrünisa Bolay'a, histopatolojik değerlendirmelere ışık tutan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Çiğdem Elmas'a, istatistiksel incelemelerdeki katkılarından dolayı Dr. Elif Durukan'a, başta Sayın Vet. Dr. Şeyda Diker olmak üzere çalışmanın gerçekleştirildiği Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinin tüm çalışanlarına ve desteklerini her zaman hissettiğim tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ	1
II.	GENEL BİLGİLER	4
III.	GEREÇ ve YÖNTEM	41
IV.	BULGULAR	61
V.	TARTIŞMA ve SONUÇ	85
VII.	ÖZET	98
VIII.	KAYNAKLAR	100

GİRİŞ

Periferik sinirler, medulla spinalisteki motor nöronların, dorsal ganglionlardaki duyu nöronların ve sempatik ganglionlardaki sempatik nöronların gövdelerinin aksonal uzantılarından oluşan ve sonlandıkları hedef organa göre motor, duyu veya otonomik fonksiyonları olan yapılardır (77).

Periferik sinir yaralanmalarına neden olan faktörler içerisinde en sık karşılaşılan etkenin travma olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, iskemik olaylar, enfeksiyon, inflamasyon, iyonize radyasyon, traksiyon, eksternal kompresyon, yanık ve elektrik çarpması gibi etkenlerde periferik sinir hasarında rol oynayabilmektedir. Yaralanmanın nedeninden bağımsız olarak sinir dokusunda iyileşmenin tam olmaması veya sinirin anormal rejenerasyonu, sıklıkla fonksiyonel kayıp ve ağrı ile sonuçlanmaktadır (78). Bu nedenle periferik sinir yaralanmaları sonrasında tedavideki ana amaç, sinir bütünlüğünü tekrar sağlayarak iletimin geri dönüşünü sağlamak ve kaybolan motor veya duyu fonksiyonlarını tekrar yerine koymaktır. Periferik sinir yaralanmalarının tedavisindeki temel prensip, skar ve fibrotik dokunun eksize edilmesi, sinir uçlarının tazelenmesi ve gerginlik olmaksızın sinir uçlarının bir araya getirilerek anastomoz edilmesidir. Tedavide, fonksiyonların maksimum düzeyde geri dönüşünü sağlamak için aksonların uygun doğrultuda distal güdüğe yönlendirmelerini sağlamak gerekmektedir.

Yaralanma sonrasında sinir uçları arasında defekt bulunmaması ve uçların gerginlik olmadan bir araya getirilebilmesi primer onarıma olanak sağlamaktadır. Primer onarımın mümkün olduğu durumlarda bile, onarım bölgesinde gelişen fibrozis ve rejenerasyonun epinöriyum dışına çıkmasıyla meydana gelen nöroma oluşumu, rejenerasyonu olumsuz yönde etkileyebilir ve fonksiyonların dönüşü yeterli düzeyde olmayabilir (23). Günümüze kadar bu alanda yapılmış sayısız çalışma olmasına rağmen, onarım hattında skar dokusunun azaltılması

ve uygun doğrultuda aksonal rejenerasyonun sağlanması için yapılan çalışmalar halen rekonstrüktif cerrahinin en önemli araştırma konularından biri olmaya devam etmektedir. Cerrahi başarıyı artırmak için farklı onarım teknikleri (61,66,68) ve farklı dikiş materyalleri tanımlanmış (25,42); onarım alanına manyetik alan (27,135), lazer (86), radyasyon (45) veya hiperbarik oksijen uygulaması (46) gibi yöntemler denenmiş; sistemik olarak kullanılan birçok ilaç veya hormonun (55,50,87) bu alandaki etkisi araştırılmıştır. Onarım hattında kesik sinir uçlarının epinöral tüp (5,6,8,32,133), arter (130), ven (71), fasya (65), omentum (24), prezerve dura (120), pseudosinovya (79) ve kollajen film (109) gibi non-sentetik materyaller ile sarılması ya da bu amaçla laktat polimerleri (80), polietilen (80), kauçuk (22), tantalyum (22) ve silikon (41) gibi sentetik materyaller kullanılması denenmiş, fakat rutin klinik uygulamaya geçememiştir.

Bunların yanında, üzerinde çalışılan bir diğer konu da, aynı amaçla anastomoz sonrası onarım hattına topikal olarak uygulanan tedaviler ile ilgilidir. Tiroid hormonu (123), insan amnion sıvısı (99), hyalüronik asit (100,124), aprotinin (44), mitomisin C (53), sinir büyüme faktörü (NGF) gibi nörotrofik faktörler (38) ve diğer birçok büyüme faktörü bu kapsamda denenilen maddelerden yalnızca birkaçıdır.

Trombositten zengin plazma (PRP), son yıllarda klinik kullanıma giren ve özellikle kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle maksillofasiyal cerrahide kullanım alanı bulmuş olan biyolojik bir üründür. İçerisinde çok sayıda büyüme faktörü olduğu bilinen bu ürün, trombositlerin yoğunlaştırılması ve içeriklerindeki büyüme faktörlerini salgılamaları için aktive edilmeleri temeline dayanmaktadır (2). Trombositten zengin plazma ameliyat öncesi dönemde hastadan alınan kandan otolog olarak hazırlanmaktadır ve uygulanma sonrasında ortama salınan büyüme faktörleri, uygulama alanında oluşan fibrin pıhtı içerisinde kalarak lokal etkilerini uzun süre gösterebilmektedir. Trombositten zengin plazma içerisinde

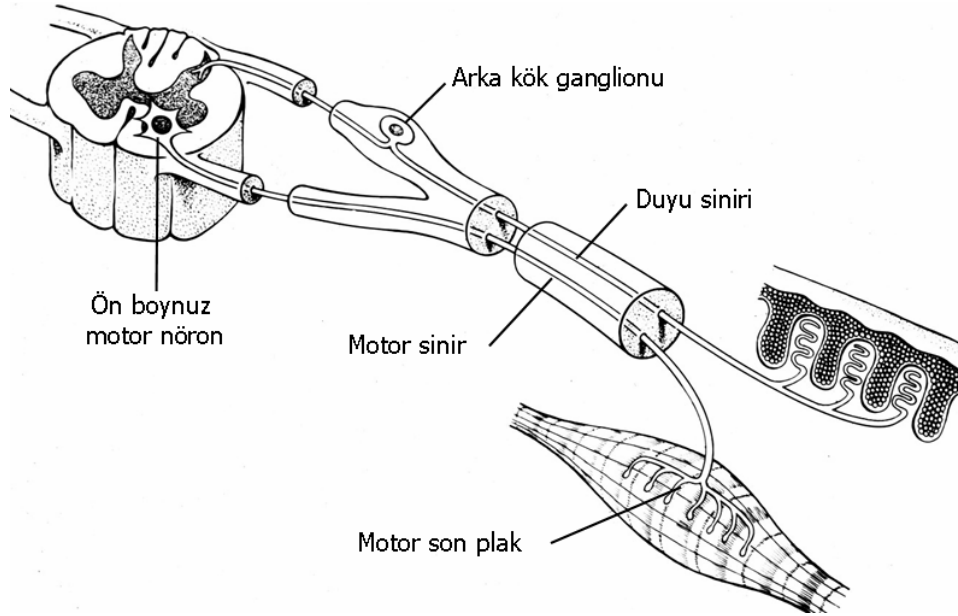
bulunduğu bilinen başlıca bŸyŸme faktŸrleri, platelet kŸkenli bŸyŸme faktŸrŸ (PDGF), ‘transforming’ bŸyŸme faktŸrŸ- β (TGF- β), fibroblast bŸyŸme faktŸrŸ (FGF), vaskŸler endotelyal bŸyŸme faktŸrŸ (VEGF), insŸlin kaynaklı bŸyŸme faktŸrŸ-I (IGF-I), platelet kŸkenli endotelyal hŸcre bŸyŸme faktŸrŸ (PDEGF), interlŸkin-1 (IL-1) ve trombosit aktive edici faktŸr-4 (PAF-4) dŸr (1,37). Bu bŸyŸme faktŸrleri arasından PDGF, FGF, VEGF ve IGF-I’in sinir rejenerasyonu Ÿzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (59,60,62,98,125). Bu faktŸrlerin rekombinan yolla hazırlanmış formlarının pahalı olması ve laminin, kolajen veya metilselŸloz gibi ek taşıyıcı ara maddeler Ÿzerinde uygulanmaya ihtiyaç duymaları en Ÿnemli dezavantajlarıdır (126).

Bu çalışmada, içerisinde yŸksek oranda bŸyŸme faktŸrleri içerdiği bilinen trombositte zengin plazmanın sinir iyileşmesi Ÿzerine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Klasik yŸntemlere nazaran daha az dikiş sayısı ile birlikte trombositte zengin plazma uygulanmasının, sinir rejenerasyonunu ve fonksiyonel iyileşmeyi artıracadı, daha az skar dokusu ve nŸroma oluşumuna neden olacadı ŸngŸrŸlmŸřtŸr.

GENEL BİLGİLER

PERİFERİK SİNİR ANATOMİSİ

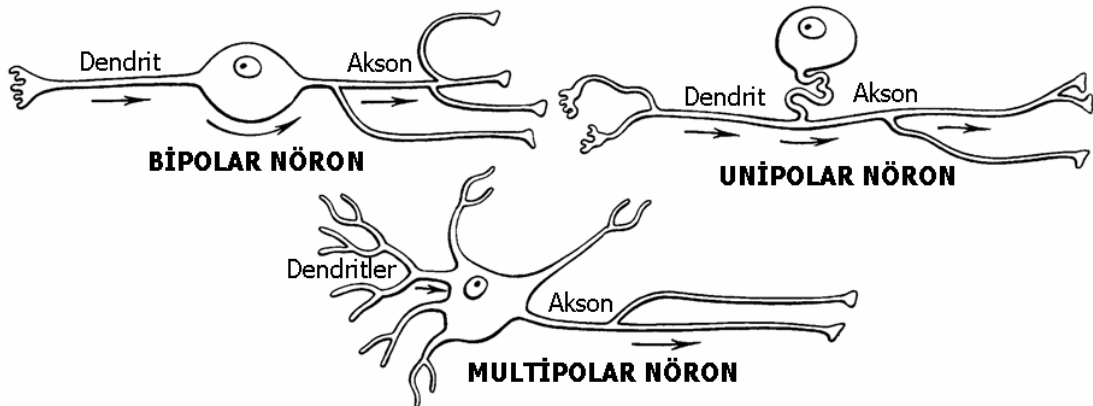
Periferik sinir sistemi, santral sinir sistemi ile periferik hedef organlar arasında çift yönlü uyarı iletimini sağlayan, bu sayede motor, duyu ve otonomik fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir sistemdir. Motor, duyu ve otonom olmak üzere 3 tip periferik sinir bulunmaktadır. Bunlardan motor sinirlerin hücre gövdeleri medulla spinalis ön boynuzunda, duyu sinirlerinin hücre gövdeleri ise dorsal spinal arka kökler içerisinde yerleşmiştir. Duyusal ve motor lifler içeren periferik sinirler, dorsal ve ventral spinal köklerin birleşmesinden oluşmaktadır (Şekil 1). Otonom sinir sistemine ait nöronlar ise santral sinir sistemi içinde ve dışında bulunan, nükleus ve ganglionlarda toplanmışlardır.



Şekil 1: Periferik sinirlerin hücre gövdelerinin yerleşimi. (Myers RR. Morphology of the peripheral nervous system and its relationship to neuropathic pain. Anesthesia: Biologic Foundations, Yaksh TL, Lynch III C, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ (eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, s: 487, 1998)

Perikaryon olarak da adlandırılan sinir hücre gövdesi, temel fonksiyonel ünite olan sinir liflerinin beslenmesini, korunmasını ve devamlılığını sağlayan kompozit bir yapıdır. Sinir hücresi içerisinde bulunan temel organellerden biri granüllü endoplazmik retikulumdur. Nissl cisimciği olarak da bilinen bu yapı protein sentezinden sorumludur. Sitoplazma içerisinde bulunan diğer önemli bir yapıda, dendrit ve aksonların sonlarına kadar uzanan, nörotübül ve nörofilamentlerden oluşan nörofibrillerdir. Bunlar metabolitlerin taşınmasında, hücre şeklinin korunması ve desteklenmesinde görev alan yapılardır.

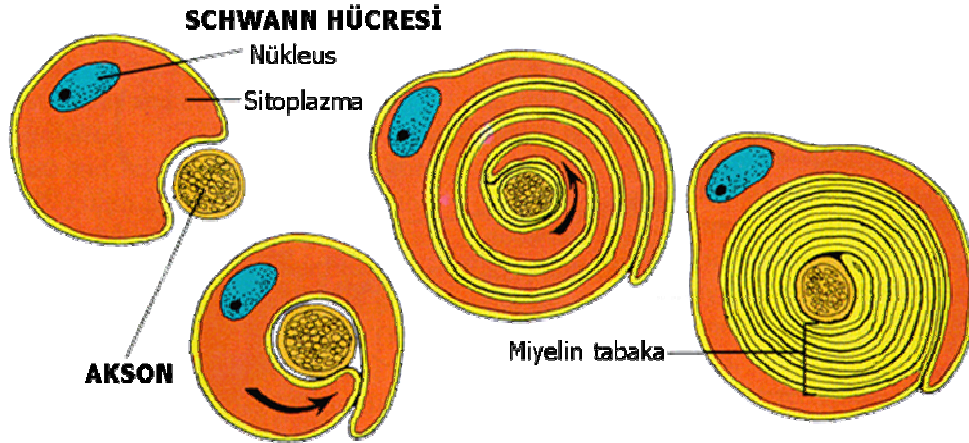
Sinir hücre gövdesinden çıkan ve nispeten kısa olan uzantılar dendrit olarak tanımlanırlar. Dendritler, çevreden gelen uyarıların hücre gövdesine iletilmesinden ve nöronlar arasındaki bağlantının sağlanmasından sorumlu olan yapılardır. Aksonlar ise tek ve daha uzun olan uzantılardır. Aksonların primer görevi sinirsel uyarıyı periferdeki kas dokusuna aksiyon potansiyeli olarak taşımaktır. Genellikle düzgün konturlu ve uniform yapıda olan aksonların ortalama çapları 1-24 μm arasında değişmekte iken uzunlukları 50 μm 'den birkaç metreye kadar uzayabilir. Nöronlar bu uzantılarının sayısı, uzunluk ve şekline göre unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (**Şekil 2**).



Şekil 2: Uzantılarına göre nöronların sınıflandırılması (Berry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous system. Gray's anatomy. 38th ed. Williams P.L. Churchill Livingstone, Edingburgh, s:904,1995)

Aksonlar diğer dendrit, akson ya da perikaryonlar ile sinaps yapan yan dallar verebilirler. Fakat teledendria olarak adlandırılan bu dallanmalar hücre gövdesine yakın kısımlarda gözlenmez. Akson boyunca süreklilik gösteren plazma membranı “aksolemma” olarak isimlendirilmektedir. Hücre stoplazmasının akson içerisindeki eşdeğeri ise “aksoplazma” adını almıştır. Aksoplazma, akson içerisinde bulunan çeşitli proteinler, hücre iskeletini oluşturan mikrotübüller ve nörofilamanları içeren ara maddeden oluşmaktadır (114). Buna karşı hücre gövdesi ve dendritlerde bulunan Nissl cisimcikleri aksonlarda bulunmaz.

Schwann hücreleri akson çevresindeki alanda iyon dengenin sağlanmasına, nörotransmitterlerin dağılımına ve aksolemma boyunca sodyum kanallarının yerleşimine katkıda bulunan hücrelerdir. Periferik sinir sisteminin uydu hücreleri olan Schwann hücreleri, aynı zamanda akson çevresinde konsantrik karakterde proteofosfolipid bir tabaka olan miyelin kılıfını hazırlarlar (Şekil 3).



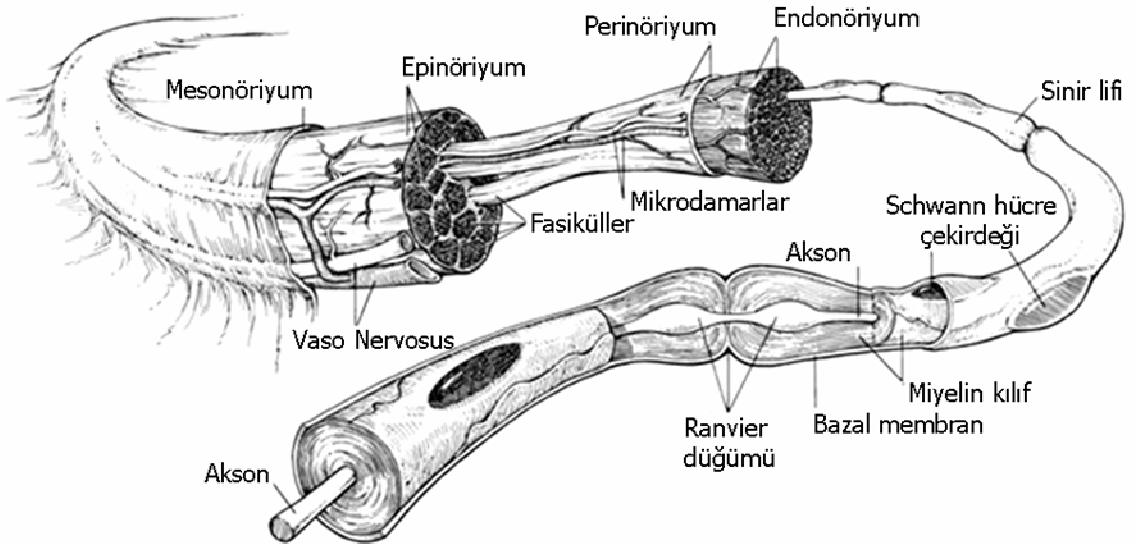
Şekil 3: Periferik sinirin miyelin yapısı. (Myers RR. Morphology of the peripheral nervous system and its relationship to neuropathic pain. Anesthesia: Biologic Foundations, Yaksh TL, Lynch III C, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ (eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, s: 505, 1998)

Sinir lifleri miyelinli ya da miyelinsiz olabilmesine rağmen, her sinir lifinde aksonlar mutlaka uç uca dizilmiş Schwann hücreleri ile sarılmışlardır. Miyelinli liflerde her akson tek bir Schwann hücresi tarafından sarılırken, miyelinsiz liflerde bir Schwann hücresi birden fazla aksonu çevrelemektedir. Ayrıca Schwann hücreleri tarafından üretilen ve temel olarak ekstraselüler matriks proteinlerinden (kollajen tip IV ve laminin) oluşan bir bazal membran sinir lifini çevrelemektedir ve bu laminar yapının rejenerasyon için önemi büyüktür (29).

Miyelin kılıfın gelişimi gestasyonun 12-18. haftalarında başlamaktadır ve doğum sonrası da değişken hızlarda devam etmektedir. Miyelin esas olarak santral sinir sisteminde oligodentrositlerin, periferik sinir sisteminde ise Schwann hücrelerinin plazma membranlarından oluşmaktadır. Miyelinin yapısı diğer plazma membranlarına benzemekle birlikte, içeriği nedeniyle diğerlerinden farklıdır. Biyokimyasal olarak % 75 lipid ve % 25 proteinden meydana gelmektedir. Miyelin tabaka içerisinde bulunan lipidlerin % 20-30'unu oluşturan kolesterol multilameller yapının stabilizasyonunu sağlamaktadır. Miyelin içeriğindeki diğer lipidler ise glikolipit yapısında olan galaktoserebrosid, sülfatid ve gangliosidlerdir. Benzer şekilde periferik sinirlerin miyelin yapısı ile santral sinir sistemi miyelini arasında da farklar bulunmaktadır. Periferik miyelin dokusunda santraldekine göre sfingomiyelin, kolin ve gliserofosfatid oranı daha fazla, galaktoserebrozid oranı ise daha azdır. Periferik sinir sistemi miyelininin % 20-30'unu oluşturan proteinler, çoğunlukla glikoprotein yapısındadır. Po, PMP22, MAG, epitelyal kadherin ve periaksin baskın olarak bulunan glikoproteinlerdir (39).

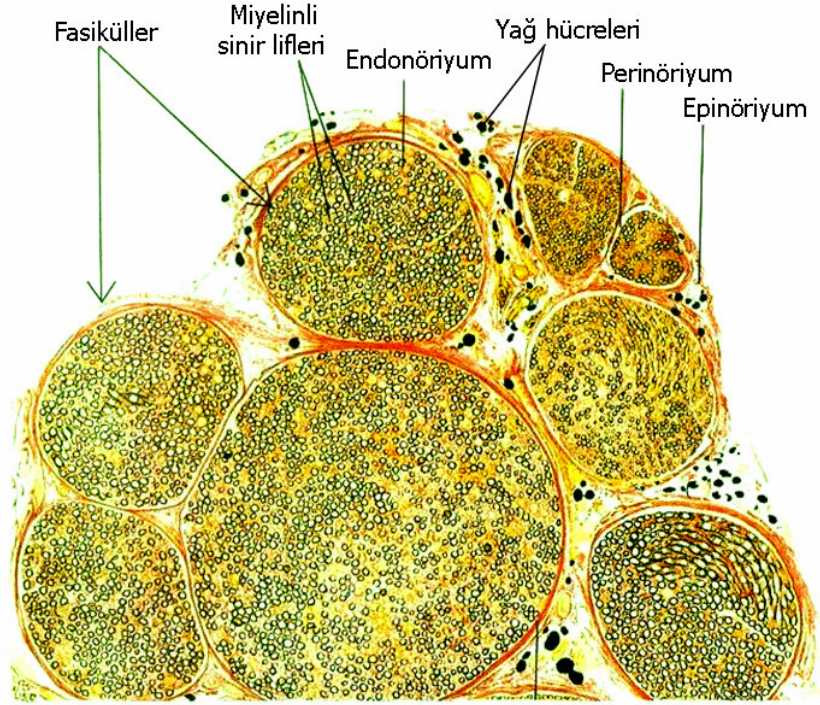
Büyük çaplı somatik sinir liflerinin hemen hepsi miyelinli iken, 1 µm'den küçük aksonlar genellikle miyelinsizdir. Memelilerde dorsal spinal köklerin ve kutanöz sinirlerin yaklaşık %75'i, kas liflerinin %50'si ve postganglionik otonomik liflerin tamamına yakını miyelinsizdir. Bir sinirin miyelinli olması, aksiyon potansiyelinin iletim hızını artırmaktadır.

Sinir lifleri iletim hızları ve çaplarına göre 3 gruba ayrılmışlardır. Bunlardan A grubu lifler, miyelinli somatik afferent ve efferent liflerden oluşur. B grubu lifler ise miyelinli otonomik pregangliyonik lifleri içerir. C grubu lifler, en ince çaplı ve en yavaş iletim sağlayan liflerdir. Miyelinsiz somatik ve viseral afferent lifler ile postgangliyonik lifler bu gruptadır. Miyelinli liflerde, akson boyunca dizilim gösteren Schwann hücreleri arasında miyelin kılıfı olmayan 1 μm 'lik alanlar mevcuttur (Şekil 4). Miyelin kılıf boyunca iletilen impulslar “Ranvier düğümü” adı verilen bu alanlarda bir sıçrama (saltatorik iletim) yaparak bir sonraki miyelin kılıfa geçerler (64). Ranvier düğümünde, sinir elemanları buraya gelen akımı artırıcı yapıdadırlar. Bu bölgede bulunan mitokondri gibi enerji üreten hücre elemanlarının sayısı normal alanlara oranla 5 kat fazladır. Her iki Ranvier düğümü arasında kalan ve aksonun tek bir Schwann hücresi ile temasta olduğu bölgeye ise “internod” adı verilir. Sinir lifinin çapıyla orantılı olarak internodal mesafe 150 μm ile 1500 μm arasında değişkenlik gösterir (64).



Şekil 4: Normal periferik sinir anatomisi. (Brandt KE, Mackinnon SE: Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery, 5.th ed, Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM. (eds) Lippincott-Raven, Philadelphia s:80, 1997)

Sinir kesit alanının % 25-85 kadarını bağ dokusu oluşturmaktadır ve bu oran sinire ve yer aldığı bölgeye göre değişmektedir. Eklem bölgelerinde bu oranın arttığı bilinmektedir. Periferik sinirler 3 ayrı destek bağ doku tabakası ile çevrenmişlerdir (**Şekil 5**). Her bir sinir lifi, en içte endonörium adı verilen mezoderm kaynaklı bir bağ doku ile çevrenmektedir. Endonörium, mukopolisakkarit temel madde içerisinde yer alan kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve kapiller sistemden oluşan bir bağ dokudur. Buna karşın elastin içermemektedir. Sinir liflerinin bir araya gelerek oluşturduğu yapıya ise fasikül denilmektedir. Her fasikül mekanik olarak sağlam, dens bir lameller tabaka olan perinörium ile sarılmıştır. Perinörium, yassı perinöral hücreler tarafından oluşturulmuş olan çok katlı bir tabakadır ve travmalara karşı bir bariyer görevi görerek endonöral boşluğu korur (72,103). Perinörium aynı zamanda kan-sinir bariyerinden sorumlu olan yapıdır.

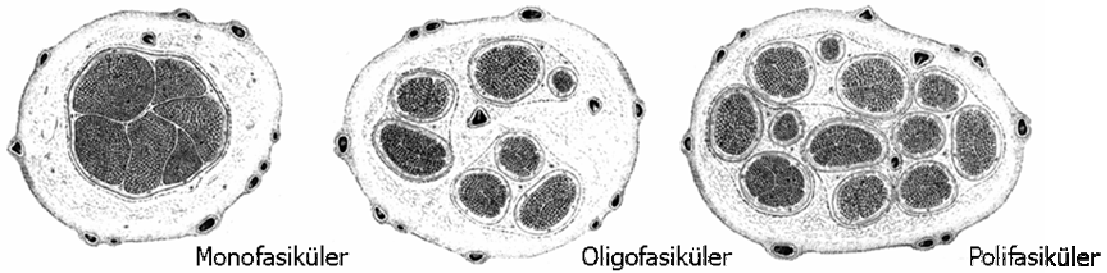


Şekil 5: Sinir kılıfları (Berry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous system. Gray's anatomy. 38th ed. Williams P.L. Churchill Livingstone, Edingburgh, s: 947, 1995)

Sinir kılıflarının en dış tabakasını oluşturan bağ doku ise epinörium adını almaktadır. Epinörium kollajen tip I ve III, fibroblastlar ve değişen oranlarda yağ dokusundan meydana gelmiştir. Epinöriumun görevi, fasikülleri ekstremitelerdeki travmalardan korumaktır. Bu nedenle özellikle eklem bölgelerinde daha kalın bir yapıya sahiptir. Epinöriumun kalınlığı sinirin tipi, seviyesi ve bireylere göre farklılık göstermektedir. Toplam sinir kesit alanının % 35-75'i arasında değişen bu kalınlık distale gittikçe azalmaktadır. Fonksiyonel olarak iki tabakadan oluşan epinöriumun derin tabakaları “internal (interfasiküler) epinörium” olarak adlandırılır ve bu tabaka fasiküllerin etrafını tek tek sararak fasikülleri gevşekçe bir arada tutar. “Eksternal (epifasiküler) epinörium” ise daha dışta yer alan, fasiküller üzerinden kolaylıkla ayrılabilen ve paranörium olarak da bilinen bağ dokusu yapısında bir kılıftır (120).

Periferik sinirler fasiküler yapılarına göre üç ana gruba ayrılırlar (**Şekil 6**).

1. Monofasiküler sinir: Birçok sinir lifi içeren tek bir fasikül bulunur.
2. Oligofasiküler sinir: Birkaç büyük fasikülden oluşan sinirdir.
3. Polifasiküler sinir: Çok sayıda fasikül mevcuttur. Fasiküller gruplar halinde veya grup oluşturmaksızın bir arada bulunabilirler.



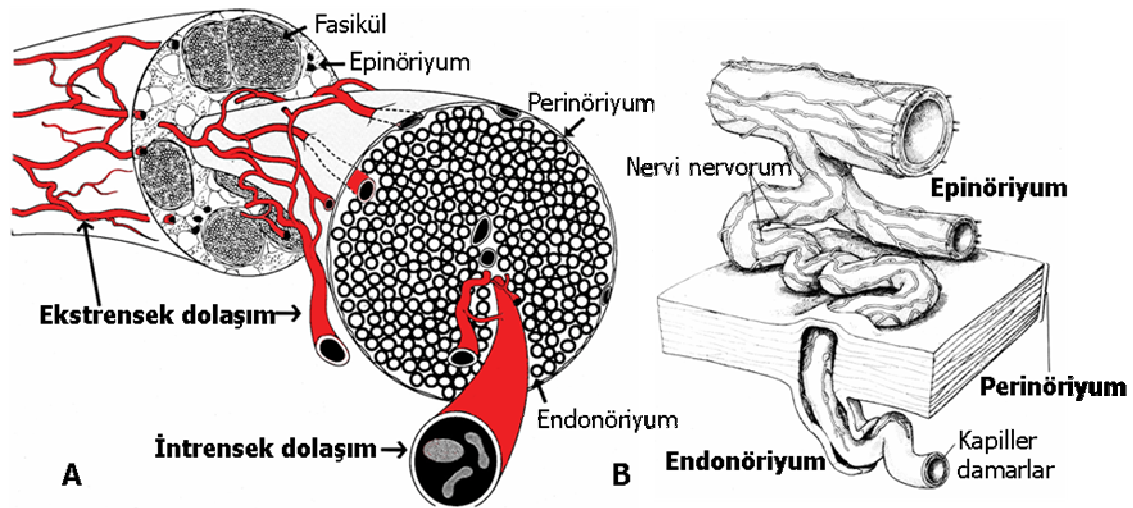
Şekil 6: Periferik sinirlerin fasiküler yapılarına göre sınıflandırılması (Lundborg G. The nerve trunk. Nerve injury and repair. Churchill Livingstone, NY, s: 198, 1988)

PERİFERİK SINIR MİKROVASKÜLER ANATOMİSİ

Periferik sinirlerde uyarı iletimi ve aksonal transport için gerekli olan enerji, epinöriyum, perinöriyum ve endonöriyum tabakalarında bulunan ve birbirleriyle ileri derecede bağlantıları olan bir vasküler sistem sayesinde sağlanmaktadır (47).

Periferik sinirlerin vaskülarizasyonunda ekstrensek ve intrensek olmak üzere başlıca iki sistem görev almaktadır (Şekil 7A).

Ekstrensek sistem, sinirin dış yüzeyindeki gevşek adventisyal doku içerisinde bulunan damarlardan oluşmaktadır. Vasa nervorum olarak adlandırılan bu damarlar, sinirlere yandaş olarak seyreden damarlardan gelen besleyici dalcıklardır ve mezonöriyum denilen gevşek bir kılıf içerisinde seyretnmektedirler.



Şekil 7: Periferik sinirlerin mikrovasküler dolaşımı. (Myers RR. Morphology of the peripheral nervous system and its relationship to neuropathic pain. Anesthesia: Biologic Foundations, Yaksh TL, Lynch III C, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ (eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, s: 490-491, 1998'den değiştirilerek)

Mezonöriyum, kan damarlarını ve epinöriyumu çevreleyen ayrı, gevşek bir kılıf olarak tanımlanmış olmasına rağmen, ayrı yapı olmayıp bir diseksiyon artefaktı olabileceği de ileri sürülmüştür (18). Mezonöriyum içerisinde longitudinal olarak uzanan damarlar, mezonöriyumu delerek intrensek sistem ile bağlantılar yaparlar. İntrensek sistem ise epinöriyum, perinöriyum ve endonöriyum içerisinde yer alan vasküler pleksuslardan meydana gelmektedir. Bu iki sistem arasındaki denge ve kompanzatuvar mekanizmalar siniri vasküler dolaşım problemlerine karşı korumaktadır (7).

Epinöriyumun derin ve yüzeyel katları içerisinde uzanım gösteren epinöral damarlar, her fasikül veya fasikül demetine besleyici dallar gönderirken aynı zamanda değişik seviyelerde perinöral vasküler pleksus ile de anastomozlar yapmaktadır. Uzunlamasına seyreden perinöral damarlar birçok alanda oblik olarak perinöriyumun iç tabakasını delerek endonöral aralığa geçerler ve endonöral vasküler pleksusu oluştururlar. Endonöral vasküler pleksustaki kapillerlerin çapı, kas lifleri içerisindeki 3-6 μm 'lik kapillerler ile kıyaslandığında oldukça geniştir. 6-10 μm çapındaki bu kapillerlerin sıkı endotelial bağlantıları, kan-sinir bariyerinin korunmasında önem arz etmektedir. Endonöral vasküler yatak, fasiküller boyunca devamlı bir anastomotik ağ oluşturmaktadır ve bu sayede sabit bir fasiküler kan akımı sağlanmaktadır (75). Bu bölgedeki dolaşım, perinöriyumun daha dış tabakalarında geçerli olan sempatik inervasyonun aksine lokal perfüzyon basıncı ile dengede tutulmaktadır (94). Periferik sinirler içerisinde longitudinal olarak uzanım gösteren bu vasküler sistemler aynı zamanda sinüzoidal bir yapıya da sahiptirler (**Şekil 7B**). Bu sinüzoidal yapı, vasküler sistemin gerilme tarzı travmalarda hasar görmesini engellemektedir (94)

Klasik bir lenfatik sistem bulunmasa da, perinöriyumun dışında ve endonöriyumun içinde lenfatiklere benzer taşıma görevi yapan kanalların varlığı bilinmektedir. Ancak bunların epinöral alandaki gerçek lenfatiklerle bağlantılı olmadığı düşünülmektedir.

PERİFERİK SİNİR YARALANMALARI

Periferik sinir yaralanmaları çeşitli nedenlerle oluşabilmektedir. Önemli olan travmanın sinirin içyapısında oluşturduğu hasarın derecesidir. Oluşan sinir hasarı, yaralanmanın mekanizması ve hastanın yaşı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Yaralanmanın mekanizmasında, yaralanmaya neden olan mekanik etkinin keskin, künt, avulzif veya kompresif olması ve sinir hasarına sinir defektinin eşlik edip etmemesi önemli faktörlerdir. Elde edilecek olan iyileşme düzeyi de, yaralanmanın derecesi ile yakından ilişkilidir.

Periferik sinir yaralanmalarına ait ilk sınıflandırma 1941 yılında Cohen tarafından yapılmıştır ve daha sonra bu sınıflandırma 1947 yılında Seddon tarafından popüler hale getirilmiştir. Seddon sinir hasarını nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak 3 gruba ayırmıştır (120).

1. Nöropraksi: En hafif şekildir. Periferik sinirde geçici fonksiyon kaybı olarak tanımlanmıştır. Lokal bir iletim bloğu mevcuttur ve motor fonksiyon tutulumu duyu fonksiyonlarının tutulumundan daha fazladır. Deneysel ve klinik gözlemler nöropraksi gelişiminden birden çok mekanizmanın sorumlu olabileceğini göstermektedir ve demiyelinizasyon bu etkenlerden birisidir. Klinikte geçici kompresyon, traksiyon ve künt travma nöropraksiye neden olabilmektedir. Genellikle cerrahi bir lezyon değildir ve sinir ortalama 6-8 hafta içerisinde tam olarak normal hale döner.

2. Aksonotmezis: Aksonotmezis durumunda, periferik sinirde bölgesel olarak sadece miyelin kılıf ve akson devamlılığında bir kesilme mevcuttur. Schwann hücrelerinin bazal membranı, endonörium, perinörium ve epinörium sağlamdır. Bu tür bir yaralanma sonrasında şayet hücre ölmez ise, lezyon seviyesinin distal ucunda Wallerian dejenerasyon ve proksimal ucunda aksonal tomurcuklanma görülür (112). Endonöral doku ve bazal membran, Schwann hücreleri için kılavuz tüp görevi görerek onların yeni kolonlar oluşturacak şekilde prolifer

olmalarını sağlar. Bağ doku bütünlüğü korunduğu için aksonun proksimalden distale ilerlemesi kolaydır. Prognoz genellikle iyidir ve fonksiyonların geri dönüşü tamdır. İyileşme süresi hastanın yaşına, uç organa, lezyonlar arasındaki mesafeye ve rejenerasyon hızına bağlı olarak değişmektedir. Rejenerasyon günde 1-2 mm hızla ilerlemesine rağmen, iyileşme süresinde uyarılamayan kaslarda denervasyon atrofi gelişebilmektedir.

3. Nörotmezis: Sinir devamlılığının tamamen kesintiye uğradığı nörotmezis durumunda proksimaldeki kesik aksonların Schwann hücrelerince oluşturulan tüplere girmesi mümkün değildir ve cerrahi onarım yapılmazsa genellikle bir fonksiyonel gelişme beklenmez. Lezyonun distalinde denervasyon ve tüm fonksiyonlarda kayıp ortaya çıkmaktadır. Etiyolojik faktör sinirde tam kat bir kesi olabileceği gibi, iletimi tamamen engelleyen bir tümör veya skar dokusu da olabilir. Nörotmezisde cerrahi onarım yapılmaması durumunda proksimal uçtaki aksonal rejenerasyon nöroma oluşumuna neden olacaktır.

Sunderland 1951 yılında periferik sinir yaralanmalarını 5 derecede değerlendiren yeni bir sınıflandırma önermiştir (**Şekil 8**).

1. derece hasar: Seddon sınıflamasındaki nöropraksiye eşdeğer olan bu tip hasarda, sinir dokusunun bütünlüğü devam etmektedir. Aksonlar ve sinir kılıf yapıları intaktır. Ancak travma alanındaki sinir segmentinde iletim kaybı söz konusudur. Elektrofizyolojik olarak tespit edilebilen bu iletim bloğu, sadece lezyon alanında sınırlıdır ve distalde iletim normaldir. Motor fonksiyonlarda daha fazla olmak üzere duyu ve motor kayıp gözlenir. Klinikte turnike kullanımı gibi lokal basınç yaratan durumlar ve kompresyon nöropatilerin erken dönemlerinde ortaya çıkan sinir hasarı bu grupta incelenmektedir. Altı, sekiz hafta içinde aksonal iletim tam olarak düzelir.

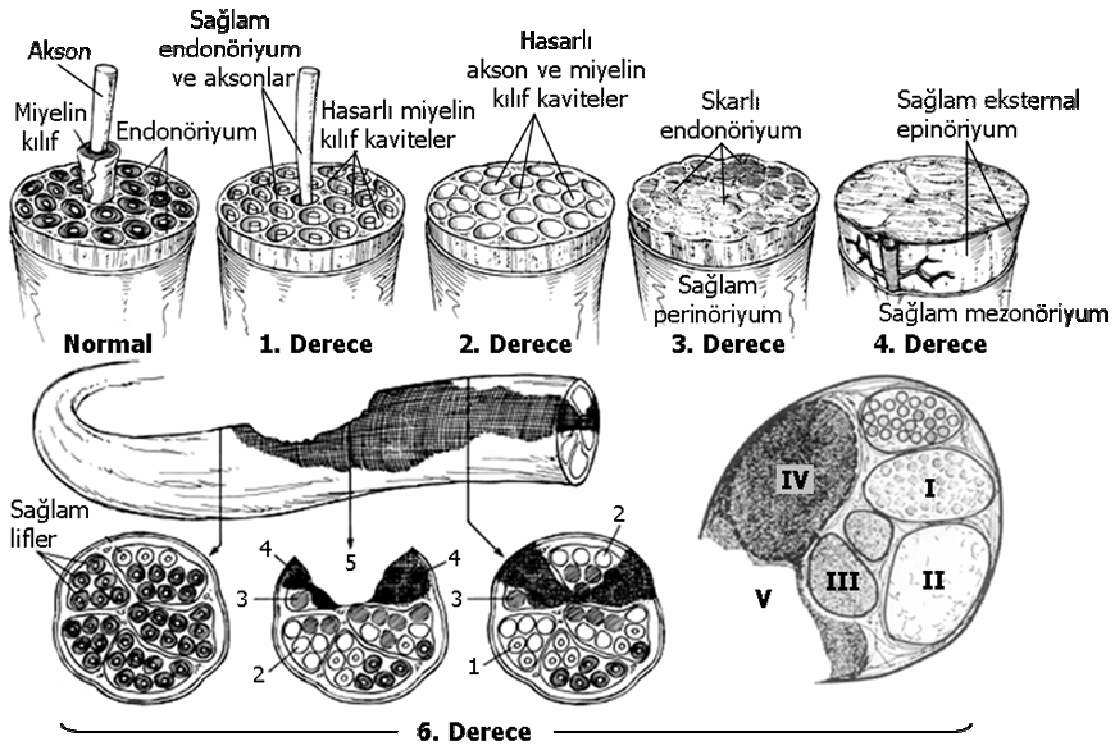
2. derece hasar: Seddon'un sınıflamasındaki aksonotmeze eşdeğerdir. Sinir kılıf yapıları sağlam olmakla birlikte, akson bütünlüğü kesintiye uğramıştır ve distal segmentte Wallerian dejenerasyon gelişir. Schwann hücre kılıfı sağlam olduğundan prognozu iyidir. Ancak iyileşme 1. derece hasara oranla daha uzun süre alır.

3. derece hasar: Epinöriyum ve perinöriyum sağlam, ancak Schwann hücre kılıfı, endonöriyum ve aksonun devamlılığı bozulmuştur. Akson distalinde Wallerian dejenerasyon izlenir. Endonöriyum ve Schwann hücre kılıfının hasarlı olması nedeniyle iyileşme tam olmaz. Rejenerasyon sırasında nöroma oluşması veya motor lifler ile duysal liflerin karışması sık görülen bir sorundur. Genellikle işlevsiz bir nöroma ile iyileşen üçüncü derece yaralanmaların ikinci derece yaralanmalardan klinik farkı, çok uzun sürede iyileşmesi nedeniyle motor fonksiyon yetersizliği ve duyularda dezoryantasyondur. Bu tür yaralanmalar Seddon sınıflandırmasındaki aksonotmezis ve nörotmezis karışımı olarak da kabul edilebilir. Ilımlı bir üçüncü derece lezyon söz konusu olduğunda intrafasiküler alanda minimal bir fibrozis ve önemli derecede rejenerasyon gözlenecektir, bu da aksonotmeze karşılık gelmektedir. Buna karşın şiddetli bir üçüncü derece hasar, rejenerasyonu engelleyen fibroze neden olacağından nörotmezis olarak kabul edilebilir.

4. derece hasar: Epinöriyum dışındaki tüm tabakaların devamlılığı bozulmuştur. Fiziksel olarak sinir bütünlüğü devam etmekle birlikte skar dokusunun yarattığı blok rejenerasyonu engeller ve yaralanma seviyesinde nöroma oluşumuna neden olur. Spontan iyileşme görülebilmese rağmen tedavi uygulanmadığında fonksiyonel dönüş nadiren gerçekleşir. Bu nedenle cerrahi onarım gereklidir.

5. derece hasar: Seddon'un sınıflamasındaki nörotmeze eşdeğerdir. Genellikle penetran travmalar sonrasında görülür ve sinir devamlılığı tam olarak kesintiye uğramıştır. İyileşme için cerrahi tedavi şarttır.

Son olarak da Mackinnon bu sınıflandırmaya 6. derece sinir hasarı adı altında bir ekleme yapmıştır (76). Bu tip yaralanmada sinir boyunca değişik seviyelerde ve farklı derecelerde sinir hasarlarının bir arada bulunması söz konusudur. Özellikle ezici tipte yaralanmalarda ortaya çıkmaktadır. Tedavisinde intranöral nöroliz ile sağlam fasiküllere zarar vermeden 4. ve 5. derecede hasarlı fasiküllerin cerrahi onarımı gerekmektedir.



Şekil 8: Periferik sinir yaralanmalarının sınıflandırılması (Brandt KE ve Mackinnon SE: Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery. Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM. (eds) Lippincott-Raven, Philadelphia, s:82, 1997 ve Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. Ann. Plast. Surg. 22: 257-64, 1989' dan değiştirilerek)

PERİFERİK SİNİR CERRAHİSİ

TARİHÇE

Periferik sinir sistemine ait ilk veriler Hippocrates'e (MÖ 460-370) kadar uzanmaktadır, fakat sinir kesilerinin duysal ve motor kayba yol açtığını ilk olarak bildiren Galen (MS 130-200) olmuştur (119). Periferik sinirlerin dikilmesi ile ilgili ilk kayıtlar ise William'a (13. yy) aittir (120). Kesilmiş bir sinirde, sinir uçlarının karşılıklı olarak onarımı ilk kez Ferrara (1608) tarafından gerçekleştirilmiştir (77). Ondokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru, bugünkü bilgilerle bağdaşmayan çeşitli sinir onarım teknikleri tanımlanmış, ancak bunlar kullanıma girmemiştir. Kayıtlara geçen ilk başarılı sinir onarımı ise 1847 yılında Paget tarafından gerçekleştirilmiştir (120). Sinir defektlerini sinir greftleri ile onarma fikri ilk kez Philippeaux ve Vulpian tarafından ortaya atılmış, ilk klinik uygulama ise 1878 yılında Albert tarafından yapılmıştır. Bu konuda ilk başarılı sonuç ancak 20. yüzyılın başlarında Mayo-Robson tarafından yayınlanmıştır (77).

Yirminci yüzyılın başlarında sinir onarımlarındaki başarı oranı artmaya başlamış, birinci ve ikinci dünya savaşları nedeniyle büyük gelişmeler kaydedilmiştir. 1963 yılında operasyon mikroskoplarının kullanıma girmesi de sinir cerrahisi açısından önemli bir dönüm noktası olmuştur (91). Mikrocerrahi tekniklerin gelişmesi ile birlikte sinir cerrahisinde gözlenen önemli ilerlemelerden birisi de, 1967 yılında Bora tarafından gerçekleştirilen perinöral onarımın keşfidir (15).

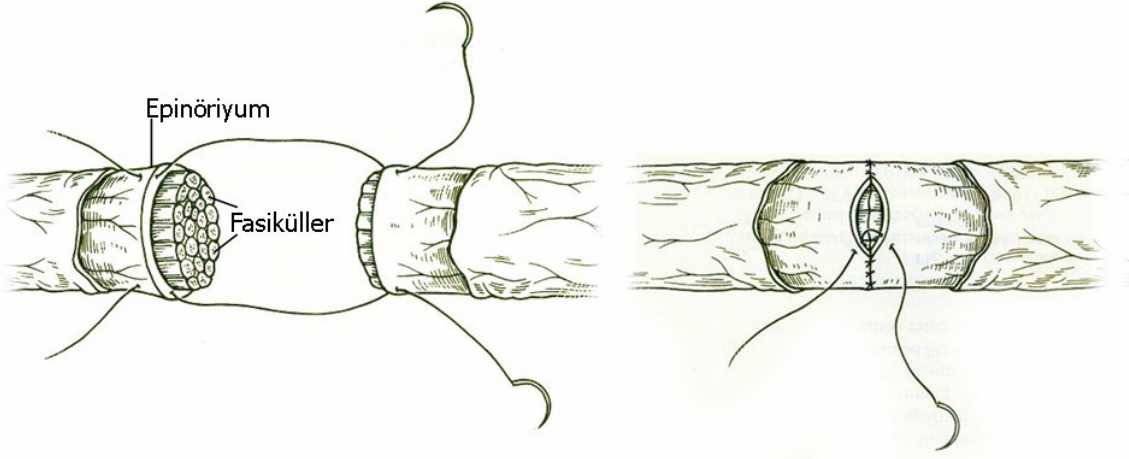
Periferik sinir yaralanmalarının tedavisi ile ilgili literatür, dikiş ile onarım teknikleri, fibrin yapıştırıcı kullanımları, onarım hattının tübülizasyon materyalleri ile desteklenmesi ve onarım alanına uygulanan ek topikal tedaviler gibi konularda çok sayıda çalışma içermektedir. Bu alandaki çalışmaların sinir rejenerasyonu ile ilgili moleküler mekanizmaların tam olarak anlaşılmasına kadar süreceği de kesindir.

ONARIM TEKNİKLERİ

Yaralanmış bir sinirde onarımın hedefi, fonksiyonel ileti ünitesi olan fasiküllerde devamlılığın sağlanması için bu yapıların cerrahi olarak doğru konumlarda karşılıklı getirilmesi, yani sinir uçlarının 'koaptasyonu'dur (11,92).

Sinir onarımı için en uygun zaman yaralanmadan sonraki mümkün olan en erken dönemdir. Erken dönemde fasiküler dizilimin ve epinöral damarların, proksimal ve distal uçların doğru olarak karşı karşıya getirilmesinde yol gösterici etkileri vardır. Ayrıca yaralanma sonrası erken dönemde gerginlik minimaldir. Daha geç dönemlerde ise proksimal ve distal sinir segmentlerinde retraksiyon ve sinir uçlarında skar dokusu gelişir. Bu dönemde onarım sırasında genellikle gerginlik söz konusudur. Ek olarak, zaman geçtikçe hedef organlarda atrofiler gelişmeye başlar ve geri dönüşü olmayan kas hücre kayıpları olur. Denervasyon süresinin 18-24 aya kadar uzadığı durumlarda kas dokusunda geri dönüşümsüz değişiklikler geliştiği ve sinir onarımı sağlansa bile motor fonksiyonların geri dönmediği bilinmektedir (131). Buna karşın duyu organların denervasyona daha dirençli olduğu bildirilmiştir (74).

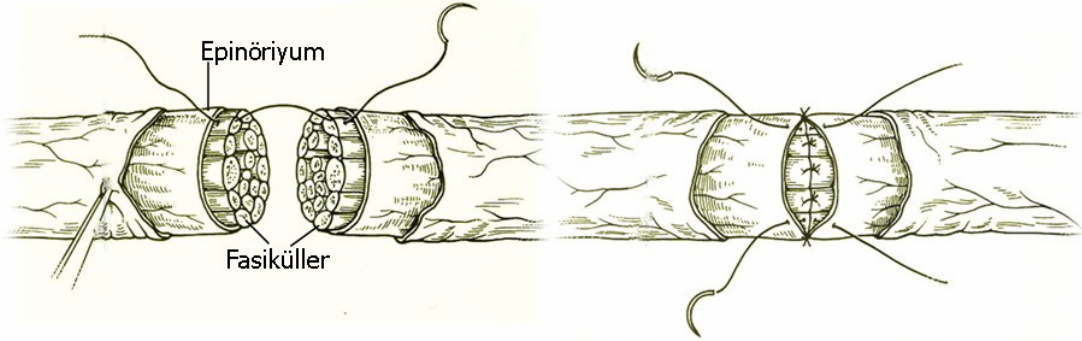
1. Epinöral Onarım: Klinikte en sık kullanılan onarım tekniğidir. Dikiş proksimal ve distal uçlardaki epinöriumdan geçer (**Şekil 9**). Sinir uçlarının uygun pozisyonda karşı karşıya gelmesini sağlamak için longitudinal seyreden kan damarları ve fasiküller karşılıklı getirilmeye çalışılır (131). Kalın sinirlerde 8/0, ince sinirlerde 9/0 veya 10/0 dikişler tercih edilir. Dikiş materyali olarak emilen ya da emilmeyen dikişler kullanılabilir. Dikiş sayısı sinir uçlarını yaklaştıracak ve gerginlik yaratmayacak şekilde, mümkün olan en az sayıda olmalı ve fasiküller dikiş aralarından çıkmamalıdır.



Şekil 9: Epinöral onarım (Birch R, Bonney G, Wynn Parry CB. Surgical disorders of the peripheral nerves, 1st ed. Churchill Livingstone, Edingburgh, s:23, 1998)

Epinöral onarımın kısa sürmesi ve basit olması en önemli avantajlarıdır. Ayrıca cerrahi müdahale sırasında sinir içi yapılara ek zarar verilmez ve sinir içerisinde reaksiyona neden olabilecek dikiş materyali olmaz. Yöntemin en önemli dezavantajı ise, eş fasiküllerin her zaman karşılıklı gelememesidir. Ufak bir gerginlik bile fasiküller arasında açıklık oluşmasına neden olabilir. Yapılan araştırmalar fasiküller arasında açıklık, üst-üste binme ve katlanma olmasının başarısızlığa yol açtığını göstermektedir.

2. Perinöral (Fasiküler) Onarım: Perinöral onarım ilk kez 1967 yılında Bora tarafından tanımlanmış olan bir tekniktir (15). Optimal eşleşmeyi sağlayabilmek için proksimal ve distal sinir uçlarındaki eş fasiküllerin birbirlerine dikilmesi amaçlanır (**Şekil 10**). Fasiküler onarımda her fasikülün 2-4 adet dikiş ile tutturulması genellikle yeterli olmaktadır ve bu sayede fasiküllerin hatalı yönlenmesi engellenebilmektedir.



Şekil 10: Perinöral onarım (Birch R, Bonney G, Wynn Parry CB. Surgical disorders of the peripheral nerves, 1st ed. Churchill Livingstone, Edingburgh, s:23, 1998)

Tekniğin en önemli ve zor yönü fasiküllerin uygun eşlerini saptamaktır. Bunun için de sinirin fasiküler dağılımını bilmek gerekmektedir. Yaralanmadan sonraki ilk 72 saatte yapılan ameliyatlarda, intraoperatif elektrodiagnostik yöntemler ile fasiküler dağılımı tanımlamak mümkün olabilmektedir. Duyusal liflerin hatalı fasiküler onarımına bağlı olarak oluşacak fonksiyon kayıpları kortikal yeniden tanımlama ile önlenebilmektedir. Ancak motor aksonların duysal aksonlara veya interfasiküler epinöriyuma yönelmesi durumunda fonksiyon kaybı kaçınılmaz olmaktadır (75).

Perinöral dikiş tekniğinin en önemli dezavantajı, sinir içine konulan dikiş materyalinin yarattığı yabancı cisim reaksiyonu ve ek diseksiyonlar sonucu artan intranöral fibrozis riskidir. Ayrıca bu yöntem diğerlerine nazaran daha fazla zaman almaktadır.

Yapılan çalışmalar epinöral ve perinöral dikiş tekniklerinin birbirlerine bariz bir üstünlüğünün olmadığını göstermiştir (11,74). “Grup fasiküler onarım” terimi ise fasiküllerin gruplar halinde karşılıklı olarak dikilmesi için kullanılan bir terimdir.

3. Epiperinöral Onarım: Her iki yöntemin birleşimi olan bu teknik, 1964 yılında Edshage tarafından tanımlanmıştır. Teknik olarak epinöral dikiş tekniğine benzemekle beraber, dikişler karşılıklı olarak perinöral tabakadan da geçilmektedir. Epinöral dikişlerin yeterli fasikül uyumu sağlayamadıkları, buna karşın perinöral dikişlerin ise hem aşırı intranöral diseksiyon, hem de içerdeki dikiş materyalleri nedeniyle fazla skar oluşumuna yol açtıkları düşüncesinden ortaya çıkmıştır. Buna rağmen intranöral travma riski yüksektir.

4. Diğer Yöntemler: Periferik sinir yaralanmalarının cerrahi onarımında kullanılan dikiş materyalleri ve cerrahi manipülasyon sırasındaki travmaya ikincil gelişen fibrozis, dikiş kullanılmadan yapılacak olan onarım yöntemleri üzerinde bir arayışa neden olmuştur.

Lazer ile onarım bu yöntemlerden biridir. Burada kesik sinir uçları yaklaştırılarak iki tespit dikişi konulduktan sonra, lazer ışınları ile uçlar birbirine tespit edilir. Anastomoz sağlandıktan sonra tespit dikişleri alınabilir. Bu yöntemin, aksonların tüp dışına çıkmasını önlediği belirtilmektedir, ancak ne ölçüde tensil kuvvet sağladığı tartışmalıdır (34).

Fibrin yapıştırıcı da sinir onarımında kullanılan bir biyomateryaldir. Bu konuda yapılan deneysel çalışmalar iki adet dikiş konulduktan sonra fibrin yapıştırıcı kullanılmasının daha uygun olduğunu göstermektedir (113). Ancak onarım bölgesinde inflamatuvar reaksiyonu artırması ve yeterli tensil kuvvet sağlayamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Menovsky tarafından rat siyatik siniri üzerinde yapılan bir çalışmada lazer, fibrin yapıştırıcı ve epinöral dikiş teknikleri karşılaştırılmış ve fonksiyonel iyileşme açısından tekniklerin birbirlerinden üstün olmadıkları gösterilmiştir (89).

Sinir anastomozu için siyanoakrilat kullanılmasının da dikişle yapılan onarıma nazaran bir üstünlüğünün olmadığı, hatta materyalin histotoksitesinin ve uzun dönemde gelişen skar dokusunun önemli derecede dezavantaj yarattığı bildirilmiştir.

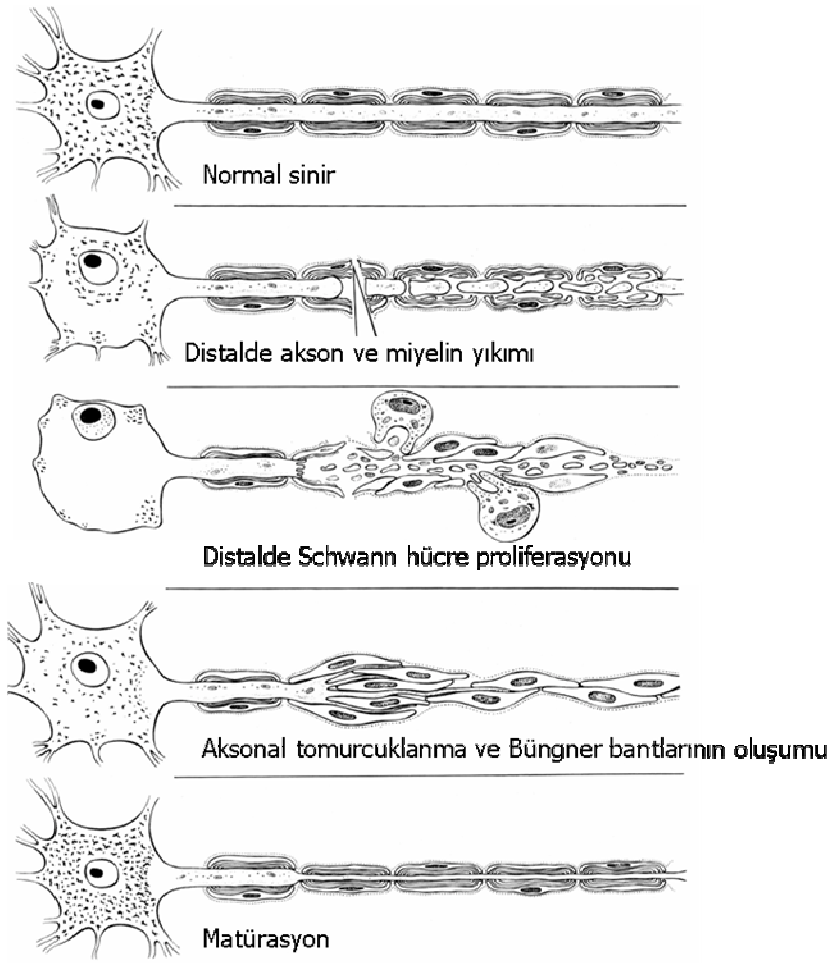
SİNİR DEJENERASYONU VE REJENERASYONU

Periferik sinir yaralanmalarında, yaralanma bölgesine ek olarak, yaralanma bölgesinin proksimalinde, distalinde ve hücre gövdesinde birtakım yapısal ve işlevsel değişiklikler ortaya çıkar (**Şekil 11**).

Aksonal yaralanma sonrasında sinir hücresinde meydana gelen değişiklikler kromatoliz olarak tanımlanmaktadır. Bu süreçte hücre gövdesinde oluşan tipik yanıt, hücre hacminin artması, hücre çekirdeğinin perifere doğru yer değiştirmesi ve sitoplazmadaki bazofilik materyalin ortadan kalkmasıdır. Hücre içerisinde protein sentezinin arttığını gösteren bu bulgu, RNA konsantrasyonunun artmasına bağlıdır. Aynı zamanda nükleik asitlerin ve lipidlerin sentezi için gerekli olan glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enzim aktivitesinde artış gözlenir. Protein sentezindeki artış, iyileşme ve rejenerasyona hazırlık yönünde şekillenmektedir. Nörofilaman ve mikrotübüler yapıdaki proteinlerin, aktin, tübülün ve peripherin'in sentezi artarken; transport fonksiyonu için gerekli proteinlerin sentezi azalmaktadır. Hücrede meydana gelen reaksiyonun şiddeti, lezyonun yerleşim yerine ve tipine göre değişkenlik göstermektedir. Hücre gövdesine çok yakın yaralanmalarda, lezyon hücre ölümüne neden olabilmektedir.

Yaralanma seviyesinin proksimaline bakıldığında, bu bölgedeki aksonlarda birkaç internodal segment boyunca ilerleyebilen bir dejenerasyon olduğu görülür. Buna retrograd dejenerasyon adı verilir ve bu segmentte endonöriyum boş bir tüp haline gelir. Yaralanmayı takip eden birkaç gün içerisinde, bu segmentte distale doğru ilerleyen terminal ve kollateral aksonal tomurcuklanmalar oluşmaya başlar. Kollateral tomurcuklar aksonun sağlam olduğu bölgedeki Ranvier düğümlerinden köken alırken, terminal tomurcuklar ise zedelenen aksonun proksimal ucundan rejenerasyon konisi şeklinde gelişmektedir. Bu dönemde oluşan rejenerasyon üniteleri, çok sayıda miyelinsiz akson demetlerinden oluşmaktadır. Proksimal

güdükteki kesik akson uçları, mini fasiküller halinde gruplar oluştururlar ve buna “kompartman fenomeni” denir (75). Rejenere olan aksonal tomurcukların uç kısımlarına ise “büyüme konisi” adı verilir. Büyüme konisinin büyüme ve gelişme için gerekli çok sayıda veziküller içerdiği bilinmektedir. Büyüme konisi, sivri uç şeklinde (filopodia) veya membranları geçecek şekilde (lamellopodia) hareket edebilir (48). Schwann hücre kolonları ve Schwann hücre bazal laminası, büyüme ve hareketin etkin bir şekilde gerçekleşmesi için uygun bir ortam sağlarlar.



Şekil 11: Sinir dejenerasyon ve rejenerasyonu. (Lundborg G. The nerve trunk. Nerve injury and repair. Churchill Livingstone, New York, s: 151, 1988)

Distal sinir segmentindeki aksonlarda ve miyelin kılıfta meydana gelen hücresel olaylar ise Wallerian dejenerasyon olarak adlandırılmaktadır. Waller isimli araştırmacı tarafından tanımlanan bu dejenerasyon süreci, distal sinir segmentinde hücre gövdesi ile olan bağlantının kaybolmasına bağlı olarak gelişen yapısal ve fonksiyonel bütünlük kaybı ile karakterizedir. Bu bölgede akson ve miyelin kılıf, makrofajlar ve Schwann hücreleri tarafından fagosite edilirler. Hücre iskeletini oluşturan nörofilamentöz yapılar ve mikrotübüller, granüler ve amorf yapılar haline dönüşürler. Dejenerasyon sürecini başlatan mekanizmanın aksonlar içerisinde artan kalsiyum konsantrasyonu olduğu düşünülmektedir. Normalde akson ile endonöral ortam arasındaki kalsiyum konsantrasyonu farkı, aktif kalsiyum pompası sayesinde dengede tutulmaktadır ve hücre içindeki düşük kalsiyum seviyesi korunmaktadır. Fakat aksonal hasar oluştuğunda artan hücre içi kalsiyum, proteazların aktivasyonuna yol açarak akson içerisinde proteolizi başlatmaktadır.

Dejenerasyon sürecinde aksonun internodal bölgesinde segmental miyelin kaybı ortaya çıkmaktadır. Schwann hücreleri tarafından parçalanmış miyelin daha sonra makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortamdaki uzaklaştırılmaktadır.

Schwann hücreleri de yaralanmayı takip eden bu dejenerasyondan etkilenmektedirler ve sinir rejenerasyonunda önemli bir yer tutarlar. Aksonotomiyi takiben Schwann hücresi nükleusu daha yuvarlak ve belirgin bir görünüm kazanırken, sitoplazma nispeten daha saydam bir hal almaktadır. Yaralanmayı takip eden ilk 24 saat içerisinde Schwann hücresi proliferasyonu başlar ve proliferasyon yapan Schwann hücreleri “Büngner bantları” adı verilen longitudinal dizilimler gösterirler. Bu hücreler aksonal tomurcukları içine alarak, gelişen rejenerasyonun aksonların çevresinde bir miyelin kılıf meydana getirirler (73). Bununla birlikte, aksonlar için fiziksel bir konduit oluşturmaları yanında, aksonal gelişmeyi destekleyen ekstraselüler proteinleri salgılamak görevini de üstlenmişlerdir.

Proksimal ve distal sinir güdükleri arasında gerçekleşen kimyasal ve hücresele reaksiyonlar, sinir rejenerasyonunun kalitesi açısından çok önemlidir. Yaralanmanın erken fazında, bu mesafede eksudasyon, hücre proliferasyonu ve kollajen depolanması olmaktadır. Kan hücreleri ve makrofajları içeren eksuda, aralığı doldurarak fibrin pıhtı oluşumunu sağlamaktadır. Birkaç gün içinde kapillerlerin ve epinöral kökenli fibroblastların bu aralığa göçü gözlenir ve burada rol alan fibroblastların proliferere olmaları oldukça uzun zaman alır. Kollajen depolanması proliferere olan fibroblast ve Schwann hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Üretilen endonöral kollajen, oluşacak olan yeni miyelin kılıfın bazal membranını oluşturmak üzere şekillenir.

Tüm bu aşamalarda kemotaksis ve nörotrofik faktörler önemli rol oynamaktadır. 1905 yılında Cajal, distal sinir segmentindeki bazı maddelerin rejenere olan sinir liflerini kendilerine yönlendirdiğini gözlemlemiştir. Nörotropizm olarak adlandırılan bu olaydan sorumlu olan faktörler, proliferere olan Schwann hücreleri tarafından sentezlenen ve hücresele adezyon molekülleri (CAM) olarak adlandırılan bir takım molekülleridir. Bu moleküllerden bilinen en belli başlıcaları L1, N-CAM (nöral hücre adezyon molekülü), N-caderin ve Po proteinidir. Bu moleküllerden N-caderin dışında kalanlar, rejenere aksonlar ile Schwann hücre kolonları arasındaki temasın sağlanmasından sorumludur. N-caderin ise Schwann hücreleri üzerinde düzenleyici etki gösterir ve aksonlar ile Schwann hücreleri arasında temas kurulmasını sağlar. Ayrıca, N-caderin'in sinir hücre kültürleri üzerindeki etkisini inceleyen deneysel çalışmalar, bu maddenin rejenere olan aksonlarda büyümeyi hızlandırıcı etkisi olduğunu da ortaya koymuştur (14). Schwann hücreleri tarafından üretilen bazal membran ise, tip IV kollajen matriks içerisinde laminin gibi çok güçlü bir adezyon molekülü içermektedir. Tüm bu hücresele adezyon moleküllerinin sentezi, özellikle dejenerasyon sırasında oluşan demiyelinizasyon evresinde artmaktadır (81).

REJENERASYON ÜZERİNE ETKİLİ BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Yaralanma sonrasında aksonların canlılıklarını sürdürmesinde ve aksonal büyümede etkili olan endojen kaynaklı çok sayıda faktör tanımlanmıştır. Akson ile Schwann hücresi arasındaki ilişkinin bozulması bu faktörlerin sentez ve salınmasına neden olmaktadır. Sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı büyüme faktörü (BDGF), nörotropin-3 ve nörotropin-4/5 gibi nörotropinler ile silier nörotrofik faktör (CNTF), lökemi inhibitör faktör (LIF) ve interlekin-6 (IL-6) gibi nöropoetik sitokinler birlikte ‘nörotrofik faktörler’ olarak anılmaktadırlar. Bunların yanı sıra fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF I ve II), “transforming” büyüme faktörü (TGF) ve onunla ilişkili olan glia kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), tümör nekroz faktörü (TNF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) de sinir rejenerasyonunun değişik aşamalarda etkileri olan faktörlerdir (29,38,134).

Bunlar içerisinde üzerinde en çok çalışılan madde NGF olmuştur. NGF ilk tanımlanmış olan nörotrofik faktördür ve sinir sistemi üzerinde değişken etkileri vardır. 26 kD ağırlığındaki bu polipeptid, yaralanma sonrasında Schwann hücreleri, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından sentezlenerek ortama salınır. NGF’nin sinir rejenerasyonundaki 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. NGF büyüme faktörü olarak anılmasına rağmen, mitojenik özelliği olmayan bir faktördür. Sinir hücrelerinin yaşamlarını sürdürmelerini ve sinir liflerinin gelişmesini desteklemektedir.

Etkileri üzerinde farklı görüşler bildirilmiş olmasına rağmen, çok sayıda çalışma dışarıdan uygulanan NGF’nin motor nöronlar üzerine etkisi olmadığını göstermektedir

(26,38,110,134). Duyusal arka kök ganglionlarının yaşayabilirliği üzerindeki etkisi kanıtlanmış olan NGF'nin, ancak fibronektin ile birlikte kullanılması durumunda motor nöronlar üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (51,128).

Bir diğer nörotrofik faktör olan beyin kaynaklı büyüme faktörü (BDGF), NGF ile benzer bir moleküler yapıya sahiptir. Yaralanma sonrasında NGF'ye benzer şekilde Schwann hücrelerindeki miktarı artar ve sinir hücreleri üzerinde büyümeyi düzenleyici etki gösterir. BDGF'nin siyatik sinir onarım alanına kollajen tüp içerisinde uygulanmasının fonksiyonel iyileştirmeyi hızlandığı gösterilmiştir (122).

Nörotropin-3 ve nörotropin-4/5 de yapısal olarak BDGF' ye benzeyen ve sinir hücreleri üzerinde apoptozu önleyici etkileri olan nötrofik faktörlerdir. Nörotropin-3' ün spinal kord yaralanmalarında rejenerasyonu artırdığı, nörotropin-4/5'in invitro ortamda iskelet kası nörotizasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu saptanmıştır (17,111).

Silier nörotrofik faktör (CNTF) sağlam Schwann hücrelerinde yüksek düzeylerde bulunan, yapısal özellikler ve reseptörü bakımından NGF'den farklı olan bir nörotrofik proteindir. Yaralanma sonrasında ortamda artan CNTF'nin aksonal büyümeyi hızlandığı ve motor nöron ölümünü engellediği, yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. CNTF aynı zamanda nöron kaynaklı bir miyojenik faktör olarak da kabul edilmektedir. Tedavi amacıyla uygulanan CNTF, kaslarda denervasyona bağlı gelişen atrofiyi azaltmakta ve kas gücünün yeniden kazanılmasına yardımcı olmaktadır (38).

Klasik nörotrofik faktörler dışında kalan bazı büyüme faktörleri de sinir rejenerasyonu üzerine etkilidirler ve rejenerasyonu artırıcı etkilerinden faydalanmak amacıyla kullanılabilirler.

Fibroblast büyüme faktörü (FGF), santral ve periferik sinir sisteminde astrositler, nöronlar ve mikrogliyal hücreler tarafından sentezlenen potent mitojenik etkili bir proteindir. Asidik (aFGF veya FGF-I) ve bazik (bFGF veya FGF-II) olmak üzere başlıca iki tipi vardır. Asidik formunun, periferik sinir yaralanması sonrasında hücre gövdesinde sentezlendiği ve proksimal akson ucunda miktarının arttığı bilinmektedir. Dışardan uygulanan yüksek yoğunluktaki rekombinan FGF-I'in spinal kord ve periferik sinirlerde aksonal rejenerasyonu artırdığı gösterilmiştir (62, 90). Laird ve ark., rat siyatik sinirinde oluşturdukları ezilme tarzı yaralanma için onarım alanına uygulanan tek doz FGF-I ile sistemik olarak düzenli uygulanan FGF-I'in etkilerini karşılaştırmışlar ve her iki durumda da motor ve duysal sinir liflerinde gözlenen rejenerasyonun kontrol gruplarına oranla belirgin olarak fazla olduğunu saptamışlardır (62). Davis ve ark. FGF-I'nin bu etkisini gösterebilmesi için ortama forskolin eklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir (31). Danielsenn ve arkadaşları ise FGF-II'nin sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve bu faktörün Schwann hücreleri için mitojen etki göstererek sinir rejenerasyonunu artırdığını belirtmişlerdir (30). Hansson'da PDGF ile birlikte uyguladığı FGF-I ve FGF-II'nin rejenerasyonu benzer şekilde artırdığını saptamıştır (47).

Benzer şekilde insülin benzeri büyüme faktörlerinin de (IGF I ve II) lokal uygulamaları sonrasında duysal ve motor liflerde rejenerasyonu artırdıkları elektrofizyolojik testler ile gösterilmiştir (95). Kanje ve arkadaşları rat siyatik sinir modeli üzerinde yaptıkları çalışma sonrasında, ozmotik pompa ile uyguladıkları IGF-I'in rejenere olan liflerden hücre içerisine alındığını, retrograd transport ile hücre gövdesine taşındığını ve burada rejenerasyon için gerekli proteinlerin sentezini artırdığını belirtmişlerdir (59,60). Tiangco ve ark. da uç yan sinir anastomozunda değişen oranlarda IGF-I kullanmış ve rejenerasyonun kontrol grubuna göre artış gösterdiğini ancak konsantrasyonun belli bir yerden sonra arttırılmasının

rejenerasyonu daha fazla arttıramadığını saptamışlardır (121). Ishii ve ark. ise, IGF-II'nin sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve çalışmaları sonucunda bu faktörün duyuşal ve motor sinirlerin her ikisi üzerinde de olumlu etki gösterdiğini saptamışlardır (54). Hansson, IGF-I ve IGF-II'yi, PDGF ile birlikte uygulamış ve her ikisinin de rejenerasyon üzerinde pozitif etkileri olduğunu saptamıştır. Aynı araştırmacı IGF-I ve PDGF bileşiminin IGF-II ve PDGF birleşimine oranla daha etkili olduğunu da belirtmiştir (47). Oudega ve ark. ise rat spinal kordu üzerine uyguladıkları IGF-I ve PDGF bileşiminin aksonal rejenerasyonu azalttığını, fakat miyelinizasyonu artırdığını tespit etmişlerdir (98).

TGF- α ve TNF- β ise Schwann hücreleri ve makrofajların her ikisinden de salınan faktörlerdir. Bu faktörler Wallerian dejenerasyonunu hızlandırırken, aynı zamanda differansiye olmamış miyelinsiz Schwann hücrelerinin çoğalmasını da sağlayarak rejenerasyonun gelişmesine katkıda bulunurlar (43,106). Sinir iyileşmesinde Schwann hücreleri üzerinde etkili bir faktör olan TGF- β 'nın dışarıdan tedavi amacıyla kullanılması Sulaiman ve arkadaşları tarafından denemiştir. Araştırmacılar in-vitro ortamda TGF- β ile inkübe edilen Schwann hücrelerinin sinir onarım alanına uygulanmasının rejenere akson sayısını kontrol grubuna oranla 2 kat artırdığını bildirmişlerdir (118).

Lin ve arkadaşları VEGF'in pelvik ganglionlardan elde edilen sinir hücre kültürleri üzerinde nörotropik etkisini olduğunu ve rejenerasyonu olumlu yönde etkilediğini bulmuşlardır (67). Sondell ve arkadaşları da servikal ganglionlardan elde ettikleri hücre kültürleri üzerinde benzer bir çalışma yapmışlar ve VEGF'in aksonal büyümeyi indükleyen etkisi yanında, nöronlar ve Schwann hücreleri üzerinde mitojenik etkisinin de olduğunu belirtmişlerdir (116).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF) sinir rejenerasyonu üzerindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, tam ayrılma veya ezilme tarzı yaralanmalardan sonra

proksimal sinir segmentinde miktarının arttığı ve Schwann hücreleri üzerinde mitojenik etkisi olduğu gösterilmiştir (97,38). Wells ve arkadaşları periferik sinir defekti modelinde uyguladıkları PDGF ve IGF-I kombine tedavisinin aksonal rejenerasyonu önemli derecede artırdığını belirtmişlerdir (126). Oya ve ark. PDGF'nin rejenerasyon üzerindeki olumlu etkilerini, aksonlar ve Schwann hücreleri arasındaki ilişkiyi sağlamasına bağlamışlardır (97).

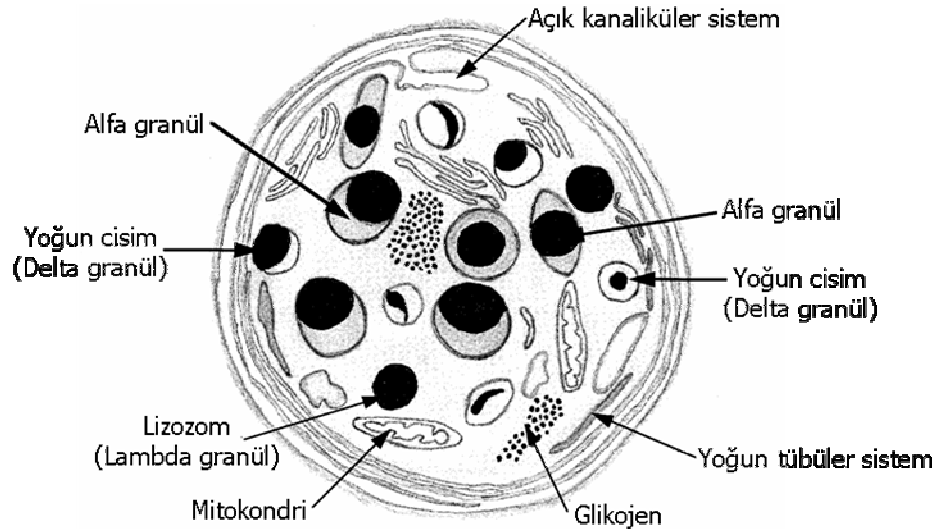
Sinir iyileşmesi sırasında ortamda artan EGF miktarı, bu faktörün de sinir rejenerasyonunda rolü olduğuna işaret etmektedir (81). Fakat tedavi amacıyla dışarıdan EGF uygulamasının etkilerini araştıran Dubuissou ve arkadaşları, çalışmaları sonucunda, yarattıkları sinir defekti modelinde EGF'nin rejenerasyon üzerinde herhangi etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (35).

Hücre dışı matriks proteinleri rejenerasyon aşamasında hücreler arasındaki ilişkinin sağlanması için gerekli olan glikoproteinlerdir. Fibronektin ve laminin gibi matriks proteinleri Schwann hücrelerinin bazal membran yapısında bulunan ve nörit oluşumunda önemli görevleri olan glikoproteinlerdir. Bu glikoproteinlerin de lokal uygulanmaları sonrasında aksonal büyümeyi destekledikleri bilinmektedir (99,100).

Sinir iyileşmesi üzerine etkili büyüme faktörleri ile ilgili çalışmalar yalnızca bu moleküllerin rekombinan formlarını kullanarak gerçekleştirilmemiştir. İnsan amnion sıvısının anastomoz sonrası sinir onarım hattına lokal olarak uygulanmasının sinir rejenerasyonunu artırdığı saptayan Özgenel ve arkadaşları, bu etkiyi insan amnion sıvısı içerisinde bulunan NGF, IGF ve FGF gibi büyüme faktörleri ile fibronektin ve laminin gibi ekstraselüler makromoleküllere bağlamışlardır (101). Aynı araştırmacılar tek doz uygulanan hyalüronik asit solüsyonunun da farklı mekanizmalar ile benzer etkileri gösterdiğini belirtmişlerdir (100).

TROMBOSİTLERİN GENEL YAPISI ve İÇERİKLERİ

Trombositler 2-4 μm çapında , disk biçiminde ve çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Bu yapılar kemik iliğindeki polipoid dev hücreler olan megakaryositler tarafından üretilirler ve periferik kan dolaşımına girdikten sonra yaklaşık 10 gün kadar yaşarlar. Trombositler periferik yaymada soluk mavi boyanan ve “hyalomer” adı verilen şeffaf bir periferik bölge ile mor boyanan ve granüllerin yerleştiği “granülomer” adı verilen merkezi kısımlardan oluşur. Trombositler, plazma membranının sitoplazma içerisine parmak şeklinde uzantılarından oluşan ve “açık kanaliküler sistem” adı verilen bir kanal sistemine sahiptirler. Bu sistem sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmasını sağlayan fonksiyonel bir yapıdır. Hyalomer bölgesi içerisinde “yoğun tübüler sistem” adı verilen ikinci bir kanal sistemi daha bulunmaktadır. Bu kanalikül sistemi, primer olarak trombosit aktivasyonu için gerekli olan kalsiyum iyonlarını depolar. Ayrıca tromboksan gibi prostanooidlerin sentezi bu tübüler sistem üzerinde gerçekleştirilir (Şekil 12).



Şekil 12: Trombositlerin temel yapısı ve içerikleri. (Rendu F, Brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. Platelets 12(5): s:262, 2001)

Trombositlerde hücre membranına yakın olarak yerleşmiş olan ve aktin içeren mikroflamanlar bulunmaktadır. Bu yapıların görevi trombosit hareketini sağlamak ve trombositlerin birbirlerine yapışmaları esnasında filopod ve yüzey uzantılarının oluşmasını sağlamaktır.

Trombosit membranının dış yüzeyinde bulunan glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin 15-20 nm'lik tabaka ise trombosit adezyonunu sağlamaktadır (58). Merkezi granülomer bölgesinde değişik özellikte granüller, az sayıda mitokondri ve glikojen partikülleri yer almaktadır. Trombositlerde elektron mikroskopik incelemeler ile birbirlerinden ayırt edilebilen başlıca 3 tip granül bulunmaktadır. Alfa, delta ve lambda granüller olarak adlandırılan bu granüllerden ışık mikroskop ile görülebilen granüllerin büyük çoğunluğu alfa granüllerdir. Değişik boyut ve içeriklere sahip olan bu granüllerin işlevleri de birbirlerinden farklıdır (105) (**Tablo 1**).

Tablo 1: Trombosit granüllerinin içerikleri

Delta granül	Alfa granül	Lambda granül
Nükleotidler - ATP, ADP - GTP, GDP	Yapışkan glikoproteinler Fibronectin, Vitronectin, vWF, Trombospondin	Asit proteazlar - Katepsin D, E - Karboksipeptidazlar - Kollajenaz - Asit fosfataz - Arilsülfataz
Aminler - Serotonin - Histamin	Hemostaz faktörleri Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII, Kininojenler, Protein S, Plasminojen	Glikohidrolazlar - Heparinaz - Diğerleri
	Hücrel mitojenler PDGF, TGF-β, ECGF, EGF, FGF-II, VEGF, IGF-II, IL-β	
	Proteoglikanlar βTG, PF4, HRGP, PBP, CTAP-III, NAP-II	
	Proteaz inhibitörleri Albumin ve immünglobülinler	

Alfa granüller: 300-500 nm çapında olan bu granüller diğerlerine oranla çok daha heterojen bir içeriğe sahiptirler. Boyut ve sayıları nedeniyle trombositlerin majör granülleri olarak kabul edilirler. Küresel veya oval şekilli bu granüllerde, koyu renkli görünen alanlarda proteoglikanlar yer alırken, daha açık renkli periferel zonda von Willebrand Factor (vWF) gibi plazma proteinleri ve tübüler yapılar yer almaktadırlar. Alfa granüller içerisinde bulunan proteinlerin bir kısmı megakaryosit maturasyonu sırasında sentezlenmektedirler ve bunlar erken dönemde görülebilirler. Buna karşın diğer bazı proteinler, megakaryosit veya trombosit aşamasında plazmadan endositoz yolu ile alınarak depolanmaktadırlar. Bu yolla depolanan albumin ve immunglobulin gibi proteinlerin granül içerisindeki yoğunluğu oldukça düşük seviyelerde kalmaktadır.

Alfa granüller hemostaz, inflamasyon, yara iyileşmesi ve hücre-matriks etkileşimi üzerinde kritik öneme sahip çok sayıda protein molekül içermektedirler.

Delta granüller (yoğun cisimler): 250-300 nm çapa sahip olan bu granüller elektron mikroskopta ışınları yoğun olarak absorbe etmeleri nedeniyle dens görünmektedirler. Bu nedenle delta granüller “yoğun cisimler” olarak da adlandırılırlar. Kalsiyum iyonları, pirofosfat, ADP ve ATP gibi protein olmayan molekülleri içeren granüllerdir. Delta granüller ayrıca serotonin deposu olarak da görev yapmaktadırlar ve içeriklerindeki serotonin miktarının plazmadan yaklaşık 100 kat fazla olduğu bilinmektedir.

Lambda granüller (lizozomlar): Sadece lizozomal enzimler içeren bu veziküllerin çapları 175-250 nm arasında değişmektedir. Bu enzimler, bakterisidal etkileri yanında plazminin tamir fazından sonra bölgedeki pıhtıyı eriterek ortadan kaldırması sürecinde de görev alan enzimlerdir.

TROMBOSİTLERDE BULUNAN BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): İlk olarak fibroblast ve düz kas hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinden dolayı “trombosit kaynaklı mitojen” olarak tanımlanmıştır. Yaralanma sonrasında erken dönemde doku konsantrasyonu artan faktörlerden birisidir. PDGF, A ve B olmak üzere iki farklı polipeptit zincirinin değişken kombinasyonlar ile birleşmesinden oluşur ve bu nedenle de dokularda AA, AB ve BB şeklinde üç farklı izoform şeklinde bulunur. PDGF hedef dokuda bağlandığı reseptörlerde tirozin α ve β reseptörleri olarak iki şekildedir. PDGF’nin tüm formları α reseptörüne bağlanabilirken, PDGF-BB sinyali iletimi yalnızca β reseptörlerini kullanmaktadır (52).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü primer olarak trombositlerden salınan bir büyüme faktörü olmakla birlikte, aynı zamanda makrofajlar, endotelyal hücreler, fibroblastlar ve keratinositler tarafından da sentezlenerek salınılmaktadırlar. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü fibroblastlar, düz kas hücreleri ve endotelyal hücreler üzerinde kemoatraktan ve mitojenik etki göstermekte, aynı zamanda bu hücreleri fibronektin ve hiyalüronik asit sentezi için stimüle etmektedir. PDGF’nin bu hücreler üzerindeki β reseptör aktivasyonu fibroblast proliferasyonu, kollajen birikimi ve anjiogeneze öncülük eder.

PDGF doku yaralanması sonrası tespit edilen ilk faktörlerden birisidir. Erken dönemde insülin benzeri büyüme hormonu gibi diğer faktörlerin sentez ve salınımını da indükler. Rekombinan yolla elde edilen PDGF’nin, cerrahi yaralarda tensil gücü artırdığı, kronik yaralarda iyileşmeyi hızlandırdığı ve fleksör tendon onarımlarından sonra topikal olarak uygulandığında mekanik gücü artırdığı saptanmıştır (52). Ayrıca yapılan klinik çalışmalar, bası yaraları ve diyabetik ayak ülserlerinde de kullanılabileceğini işaret etmektedir (107,129).

“Transforming” büyüme faktör- β (TGF- β): İlk olarak 1983 yılında plasenta kaynaklı olarak elde edilmiş ve kültür ortamında fibroblastların proliferasyonunu sağladığı bulunmuştur. TGF- β farklı dokularda üç farklı izoform şeklinde bulunmaktadır. (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) ve bu formların polipeptit dizilimleri %60 oranında aynıdır. Hedef hücrelerde RI, RII ve RIII olarak adlandırılan membran reseptörlerine bağlandıklarında, hücre içi serin-treonin protein kinaz aktivasyonuna neden olurlar.

TGF- β vücuttaki tüm hücreler tarafından sentezlenebilen ve yine tüm hücrelerce duyarlı olunan bir faktördür. Bununla birlikte, TGF- β ’nın her hücre tipindeki cevabı farklıdır. Genel olarak hücre döngüsünün regülasyonunda, embriogeneze ve organ gelişiminde etkili bir faktördür. Yara iyileşmesi aşamalarında, TGF- β trombositlerden başka lenfositler, makrofajlar, endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, epitelyal hücreler ve fibroblastlardan da salgılanmaktadır. Yara yerinde kemotaktik ve anjiogenezi hızlandırıcı etkisi vardır. Ayrıca kollajen, fibronektin ve glikozaminoglikanlar gibi birçok matriks proteininin sentezini regüle eder (13).

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I): Aminoasit dizilimi insan proinsülinine benzediğinden bu adı almıştır. IGF ailesinin diğer üyesi olan IGF-II ile %50 homolog dizilime sahiptir. IGF-I sekresyon sonrasında dokularda lokal olarak etki gösterebildiği gibi, sistemik dolaşıma katılarak uzak organlarda endokrin etkiler de gösterebilmektedir. Lokal olarak etki gösterebilmesi için bağlanabileceği altı farklı reseptörü bulunmaktadır ki bunlardan IGFBP-3 baskın olarak bulunanıdır. Bu reseptörle etkileşim, hücre içi tirozin kinaz yolunu tetiklemektedir.

Dolaşımda bulunan IGF-I’ in kaynağı büyük ölçüde karaciğer dokusudur. Buna karşın dokularda lokal olarak etki gösteren IGF-I, keratinosit, osteoblast ve fibroblast gibi değişik hücreler tarafından üretilir. Hücre kültürleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar IGF-I’in

fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, çizgili kas hücreleri, epitelyal hücreler, tiroid hücreleri ve nöronlar gibi birçok hücre üzerinde mitojenik olduğunu göstermektedir.

Dolaşımda bulunan IGF-I'in hücresele seviyedeki anabolik etkileri yalnızca protein sentezini artırmakla sınırlı değildir. Periferel hücrelerde glikoz ie alımını ve glikojen sentezini sağlamak, nöronların yaşıyabilirliğini, miyelin sentezini ve kemik rejenerasyonunu artırmak gibi görevleri de bulunmaktadır (52).

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF veya FGF-II): İlk kez sığır hipofizinden elde edilmiş olan bFGF'in, fibroblastlar üzerindeki mitojenik etkisi gösterilmiştir. Daha sonra anjiogenez, yara iyileşmesi ve embriyolojik gelişim gibi hücresele süreçlerde modülatör rolü olduğu saptanmıştır. Heparine bağlanan büyüme faktörleri grubundan olan bFGF, heparin dışında hücre yüzeyinde veya ekstraselüler matriks içerisinde bulunan heparan-sülfat proteoglikanlara da bağlı olarak bulunmaktadır. Hücresele aralıktaki bulunan bu proteoglikanların yıkımı, ortamdaki serbest bFGF miktarının artmasına neden olur ve serbest bFGF hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlerine (FGFR1-4) bağlanarak hücre içi sinyal iletimini sağlar.

Bazik fibroblast büyüme faktörü temel olarak endotelyal hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, kondrositler ve mast hücreleri tarafından sentez edilerek salınır. bFGF'nin hücre tipleri üzerindeki etkisi de değişkendir. Yara iyileşmesi sürecinde özellikle olarak keratinositlerin migrasyon ve proliferasyonu artırmaktadır. Aynı zamanda fibroblastlardan kollajenaz enziminin salınımını ve kapiller endotelyal hücrelerin proliferasyonunu stimüle ederek, anjiogenezis için ortam yaratır (117).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF): Tümör anjiogenezis üzerindeki etkileri nedeniyle 1983 yılında tanımlanmış olan bir büyüme faktörüdür. Tümör hücreleri tarafından salınan VEGF'in, vasküler endotelyal hücrelerin geçirgenliğini artırdığı, bu

nedenle hücreler arası mesafede ve vücut boşluklarında sıvı birikimine neden olduğu saptanmıştır. Bu nedenle ilk olarak ‘vasküler permeabilite faktörü’ olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları bunu takip eden çok sayıda çalışma, bu gruba ait izoformların ve spesifik reseptörlerin tanımlanmasını sağlamıştır. Vasküler endotelial büyüme faktörünün şu an için bilinen farklı büyüklüklerde beş adet izoformu mevcuttur. Benzer biyolojik etkilere sahip 121, 145, 165, 189 ve 206 formlarından baskın olarak bulunanları VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅ formlarıdır. VEGF hücreler arası mesafede kollagenaz ve geletinaz aktivasyonu ile vasküler bazal membranın yıkımı tetikler, böylelikle anjiogenezin erken basamaklarını hızlandırır. Anjiogenez için gerekli α -integrinlerin ekspresyonunu sağlar. Vazodilatasyon, vasküler geçirgenlikte artış, endotelial hücre proliferasyonu ve monosit migrasyonu, VEGF varlığında hızlanan diğer biyolojik süreçlerdir. İlk olarak tümör hücreleri tarafından sentez edildiği bulunmasına rağmen, nötrofiller, trombositler, keratinositler ve astrositler gibi birçok farklı hücre tipi tarafından da doku hipoksisine ve düşük glukoz değerlerine cevap olarak salınır. Klinikte, iskemik yaralar üzerine topikal olarak uygulanan VEGF’in yara iyileşmesini geliştirdiği ve ekstremitelere olan kan akımını artırdığı tespit edilmiştir (28).

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA

Trombositlerin hemostaz sürecindeki etkin fonksiyonlarının keşfedilmesi çok eskilere dayanmasına rağmen, yara iyileşmesi üzerindeki etkileri yakın zamanlarda tespit edilmiştir. Dolaşımdaki trombositler, aktive olmaları durumunda alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıdaki büyüme faktörünü ortama salmaktadırlar. Benzer şekilde invitro ortamda da aktive edilebilmektedirler. Yüksek yoğunlukta trombositin trombin ile aktive edilmesi, mitojenik faktörler yönünden zengin bir plazma elde edilebilmesini sağlamaktadır ki, bu son ürün “trombositten zengin plazma” olarak adlandırılır.

HAZIRLANIŞ

Literatürde trombositten zengin plazma (platelet rich plasma - PRP), trombosit jel (platelet gel) ve büyüme faktörlerinden zengin plazma (plasma rich in growth factors) gibi farklı isimlendirmeler ile karşımıza çıkan PRP, otolog olarak hazırlanabildiği gibi allojenik kan ürünlerinden de hazırlanabilmektedir. Fakat viral hastalık riski allojenik kan ürünleri kullanılması durumunda göz önüne alınması gereken önemli bir sorundur. Trombositten zengin plazma hazırlanması için piyasada bulunan hazır kit ve sistemlerden farklı oranlarda trombosit ve büyüme faktörleri içeren ürünler elde edilebilmesine rağmen, tümü temel olarak aynı prensiple çalışmaktadır.

Hastadan antikoagülan solüsyon içerisine alınan 45-60 cc kan, seri santrifüj işlemlerinden geçirildikten sonra kırmızı kan hücreleri (RBC), trombositten fakir plazma (platelet poor plasma - PPP) ve trombosit konsantresi olarak ayrıştırılmakta ve trombosit konsantresi dışındakiler yeniden hastaya verilmektedir. Bu aşamada elde edilen trombosit konsantresindeki trombosit sayısının, değişken olmakla birlikte eşzamanlı kan trombosit değerinden 3-8 kat fazla olduğu bildirilmiştir (21,83). Elde edilen trombosit konsantresini aktive etmek için ortama kalsiyum ve trombin ilavesi yapmak gerekmektedir. Bu aşamada sığır kaynaklı trombin kullanılabileceği gibi, bazı ticari sistemler hazırlanış aşamaları sırasında plazmadan otolog olarak da trombin elde edilebilmektedirler. Hazırlanan trombosit konsantresi ile kalsiyum ve trombin içeren solüsyonun cerrahi saha üzerine birlikte uygulanmaları, bölgede pıhtı formasyonu ile başlayacak olan trombosit aktivasyonunu tetiklemektedir. Oluşan pıhtı içerisindeki aktive trombositler, alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıda büyüme faktörünü ortama salgıladıklarında, bu faktörler uygulama sahası içerisinde büyüme faktörlerinden zengin bir mikroçevrenin oluşmasını sağlamaktadır.

KULLANIM ALANLARI

Fibrinli biyomateryallere trombosit ilave edilmesi doksanlı yılların sonunda tanımlanmıştır ve bu girişim günümüze kadar yapılmış olan birçok farklı klinik ve deneysel çalışmaya öncü olmuştur. PRP ilk olarak Whitman ve arkadaşları tarafından osteointegre titanyum implantlar ile yapılan maksillofasiyal rekonstrüksiyon ameliyatlarında kullanılmıştır (127). Daha sonra Marx ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada, mandibular defekt rekonstrüksiyonu için kullandıkları kansellöz kemik greftleri üzerine PRP uygulamışlar ve PRP'nin kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri olduğunu tespit etmişlerdir (83). Sonraları, bunu takip eden çok sayıda çalışmanın amacı, PRP'nin hazırlanış aşamalarını geliştirmek ve kullanım alanlarını genişletmek olmuştur.

Maksillofasiyal ve periodontal cerrahi: PRP'nin ilk olarak kemik rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkilerinin tespit edilmesi, öncelikle maksillofasiyal cerrahi ve diş cerrahisi alanında klinik kullanıma girmesine neden olmuştur. Trombositten zengin plazma invitro ortamda fetal osteoblast-benzeri hücrelerin rejenerasyon ve fonksiyonel aktivitesini artırmak yanında, aynı zamanda mezenkimal kök hücrelerinin bölgeye migrasyonunu da sağlamaktadır. Klinikte mandibular defektlerin tedavisinde kemik greft ile birlikte uygulanan PRP'nin kemik biçimlenmesinin hız ve derecesini artırdığı ve bunu trombositlerden salınan PDGF ve TGF- β aracılığıyla sağladığı bildirilmiştir (83). Siebrecht ve ark. poröz hidroksiapatit greftler içerisine olan kemik ilerlemesinin PRP ile artırılabilirdiğini göstermişlerdir (115). Yine maksiler sinüs yükseltilmesinde, periodontal defektlerde ve dental implant cerrahisinde klinik kullanıma girmiştir (84).

Ortopedik cerrahi: Spinal füzyon ameliyatlarında titanyum implantlar etrafında uygulanan PRP kemik rejenerasyonunu artırmaktadır (70).

Oküler cerrahi: Maküladaki tam kat eksikliklerin tedavisinde ve retinal yaranamalarda proliferatif hücre cevabını artırdığı bildirilmiştir (40)

Estetik cerrahi: Jackson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, abdominoplasti sonrası flep altına uyguladıkları PRP'nin, seroma gelişimini belirgin derecede azalttığını bulmuşlardır (56). Man ve arkadaşları yüz germe, meme küçültme ve meme büyültme gibi kozmetik ameliyatlarda PRP kullanıldığında, ameliyat zamanının kısaldığını, dren gereksiniminin ortadan kalktığını ve ameliyat sonrası dönemde gelişen ödem ve ağrıların azaldığını belirtmiştir. Aynı çalışmacılar lazer ile yüz gençleştirme sonrasında uyguladıkları PRP'nin biyolojik bir örtü gibi davrandığına da dikkat çekmişlerdir (82).

Rekonstrüktif cerrahi: Trombositten zengin plazmanın kronik ülserlerin ve iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanımını üzerine yapılan çok sayıda klinik çalışma, PRP'nin yara yerinde vaskülarizasyonu, epitelizasyonu ve granülasyonu artırdığı bildirmektedir (21,85). Diyabetik ülserlerde, arteriyel ya da venöz vasküler yetmezliğe bağlı ülserlerde ve bası yaralarında, iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi tespit edilen PRP'nin, otoimmün hastalıklara bağlı ülserlerin tedavisinde ise etkili olmadığı belirtilmektedir (35). Trombositten zengin plazmanın tendon iyileşmesi üzerindeki etkileri araştıran Aspenberg ve arkadaşları da, PRP kullanımının tendon iyileşmesini hızlandığını saptamışlardır (4). Bu bulgu daha sonra Anitua ve arkadaşlarının tendon hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmalar ile de desteklenmiştir (3).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 45 adet Wistar tipi dişi sıçan kullanılarak gerçekleştirildi. Bu hayvanlardan 5'i yalnızca trombositten zengin plazma hazırlanması aşamasında donör olarak kullanıldı ve cerrahi işlemler diğer 40 hayvan üzerinde gerçekleştirildi.

Kan alınması ve diğer cerrahi işlemler 50 mg/kg Ketamine-HCl (Alfamine®-im) ve 9 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile sağlanan anestezi altında gerçekleştirildi. Trombositten zengin plazmanın hazırlanması için gerekli olan kan, hayvanların intrakardiyak yoldan tüm vücut kanlarının alınması ile elde edildi ve işlem sonrasında yüksek doz fenobarbital ile ötenazi uygulandı.

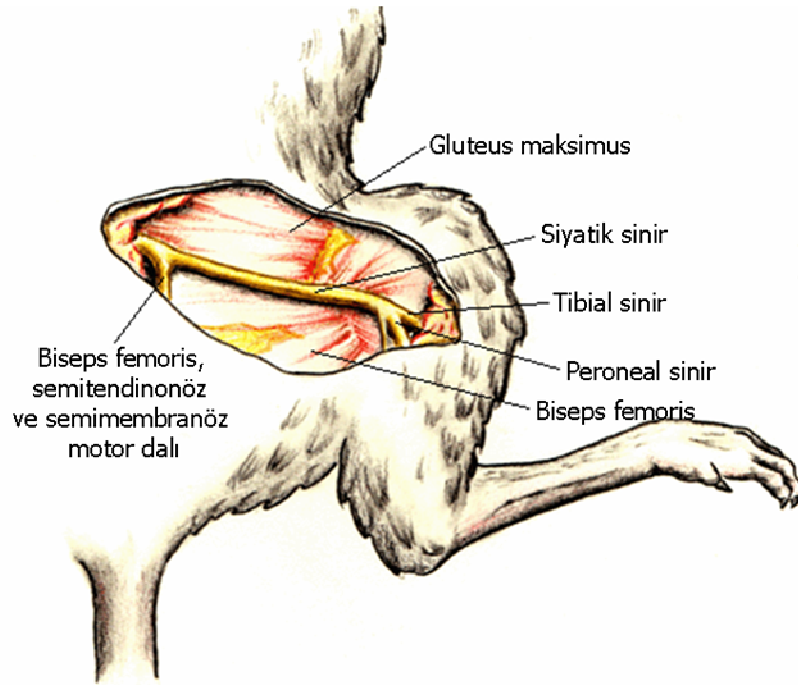
Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından ve standart mikrocerrahi teknikler uygulanarak gerçekleştirildi. Cerrahi girişim sağlamak amacı ile hayvanlara özel tespit tahtaları üzerinde uygun pozisyonlar verildi ve işlemler operasyon mikroskobu (OPMI 9FC, Zeiss, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm gruplarda sağ arka ekstremité çalışma için kullanıldı, ameliyat yapılmayan sol arka ekstremité ise kontrol olarak korundu.

Hayvanlar postoperatif dönemde standart laboratuvar şartlarında, uzman veteriner kontrolünde, 5'erli gruplar halinde kafeslerde izlendi, yem ve su ihtiyaçları düzenli olarak karşılandı. Günlük bakımları sırasında insizyon bölgelerine povidone iyot ile pansuman yapıldı. Yara yerinde enfeksiyon gelişen hayvanlar ayrı kafeslere alınarak izole edildi.

Cerrahi işlemler siyatik sinir üzerinde gerçekleştirildi.

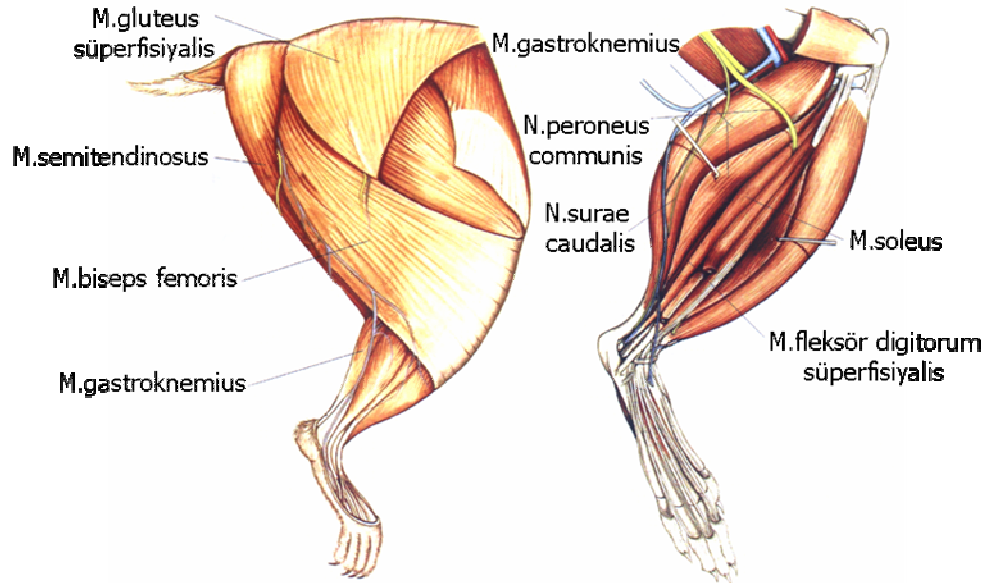
SIYATİK SİNİR ANATOMİSİ

Siyatik sinir L₄, L₅, L₆ ve S₁'den gelen spinal sinirlerin oluşturduğu lumbo-sakral trunkustan çıkar ve sıçanlardaki en kalın periferik sinirdir. Değişkenlik göstermekle birlikte sıklıkla L₅, L₆ ve S₁'den kaynaklanan liflerin birleşmesinden oluşmaktadır. Pelvis içerisinde siyatik sinir adını alıp, iskiyumun dorsal kenarı ile kuyruk sokumu arasındaki derin olukta ilerler ve siyatik çentikten çıktıktan sonra piriform kasın ventralinde seyrederek Sırt derisinin yarıya yakın kısmını ve arka bacak kaslarının çoğunu inerve eden siyatik sinirin ana gövdesi piriform kas seviyesinin 1-2 mm aşağısında kuadratus femoris kasının üzerinden ilerleyerek abduktör femoris fasyasının üzerinde oblik olarak bacağa doğru iner. Piriformis seviyesinde siyatığın ana gövdesiyle birlikte çıkan ince bir dalcık ventrale doğru kuadratus femoris altından geçer ve biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kaslarının motor inervasyonunu sağlar (Şekil 13).



Şekil 13: Sıçan siyatik sinir anatomisi. Siyatik sinirin fleksör kas grubuna verdiği motor dal ile terminal dallanma noktası arasındaki mesafe yaklaşık 2 cm uzunluğundadır.

Siyatik sinir, diz eklemi seviyesinin yaklaşık yarım santimetre üzerinde ventrale doğru seyreden kalın tibial sinir ve dorsale doğru seyreden ince peroneal (fibular) sinir dallarına ayrılır (**Şekil 14**). Peroneal sinir daha aşağıya doğru gastroknemiusun lateral karnını ve derin parmak fleksörlerini çaprazlayıp önce daha ince olan peroneus longus dalını verir ve daha sonra yüzeysel ve derin peroneal sinirlere ayrılarak sonlanır. Yüzeysel dal peroneus longus ve brevis kaslarını ve parmak ekstansörlerini inerve edip, ayak sırtı ve parmaklarının bir bölümünün duyusunu sağlar. Derin dal ise tibialis anterior ve uzun parmak ekstansörlerini inerve ederek ikinci parmak arası bölgeye ulaşır. Ventrale doğru uzanan tibial sinir ise, ilk dalı olan sural siniri, ayırım noktasının 1-2 mm proksimalinde popliteaya girmeden hemen önce gastroknemiusun iki başı arasında verir ve plantaris, soleus, gastroknemiuslar, fleksör hallusis longus, fleksör digitorum longus ve tibialis posteriorları inerve eder. Bu dallardan hemen sonra ayak bileğinin üzerinde lateral ve medial plantar sinirlere ayrılarak sonlanır.



Şekil 14: Sıçan arka bacağının kas, sinir ve damar yapıları (Popesko P, Rajtova R, Horak J: A colour atlas of small laboratory animals volume 2, Rat, mouse, hamster. Wolfe s:306-440, 1988)

ÇALIŞMA GRUPLARI

Cerrahi işlemler 40 adet sıçanda 5 ayrı grup oluşturularak gerçekleştirildi.

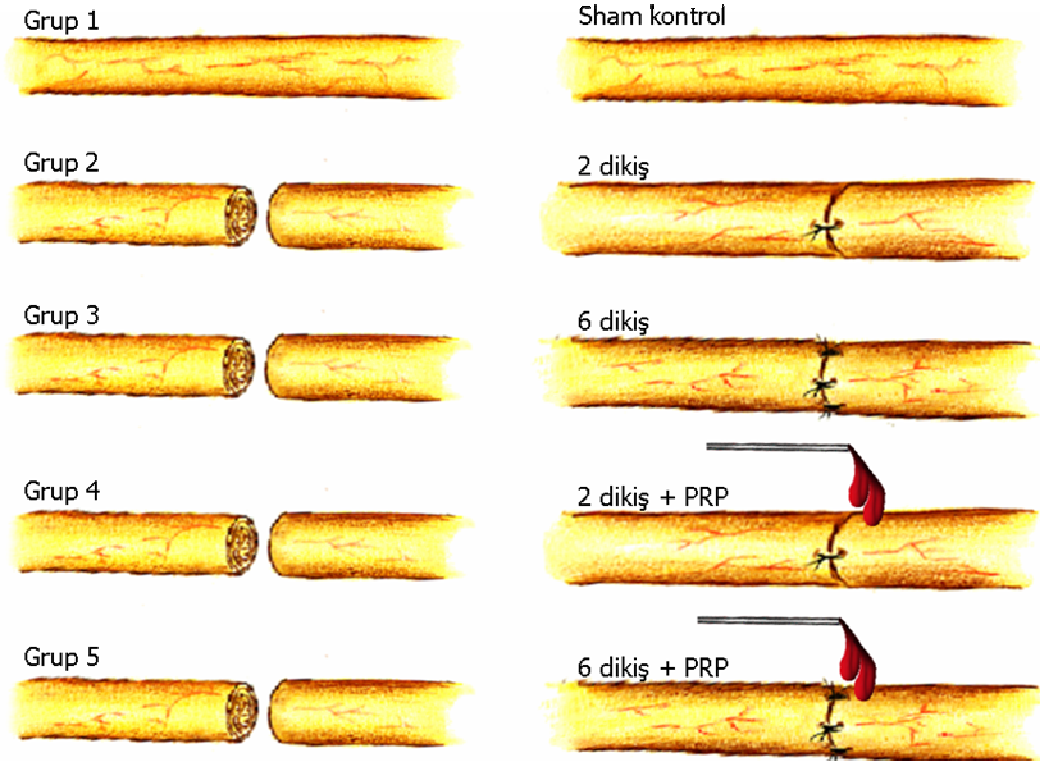
Grup 1: Sham kontrol (n=4). Eksternal sirkumferensiyel nöroliz.

Grup 2: Kontrol grubu I (n=8): İki adet epinöral dikiş ile onarım.

Grup 3: Kontrol grubu II (n=8): Altı adet epinöral dikiş ile onarım.

Grup 4: Deney grubu I (n=10): İki adet epinöral dikiş ile onarım ve PRP uygulanması

Grup 5: Deney grubu II (n=10): Altı adet epinöral dikiş ile onarım ve PRP uygulanması



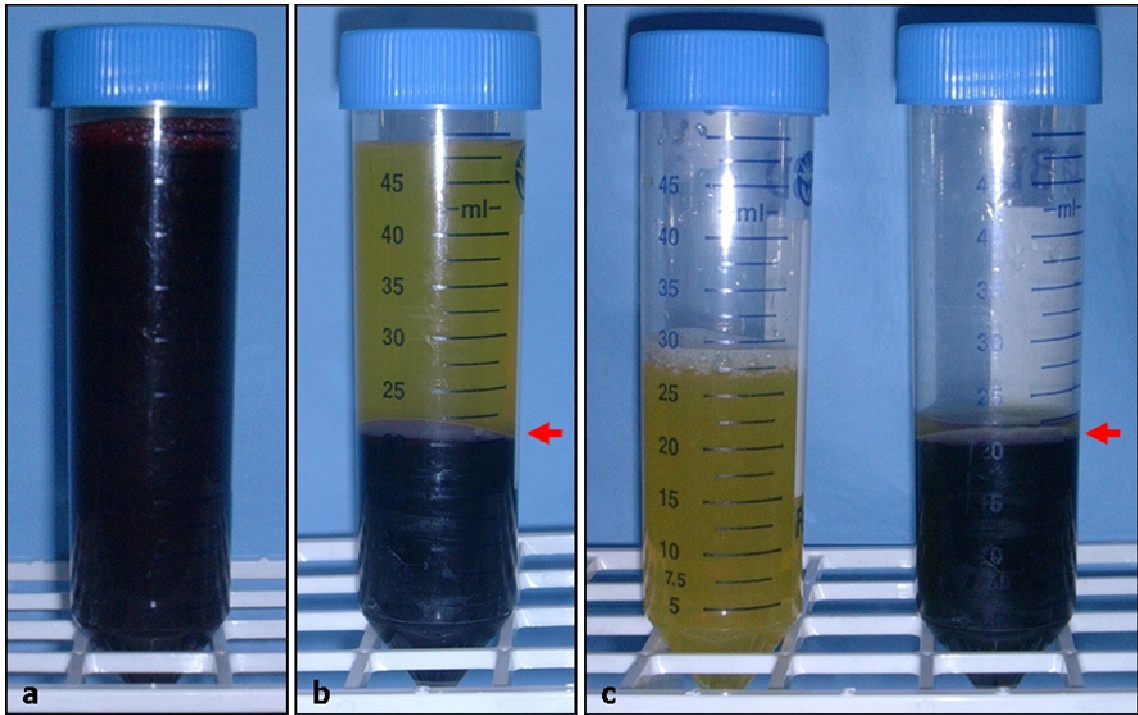
Şekil 15: Çalışma gruplarının şematik gösterimi.

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN HAZIRLANMASI

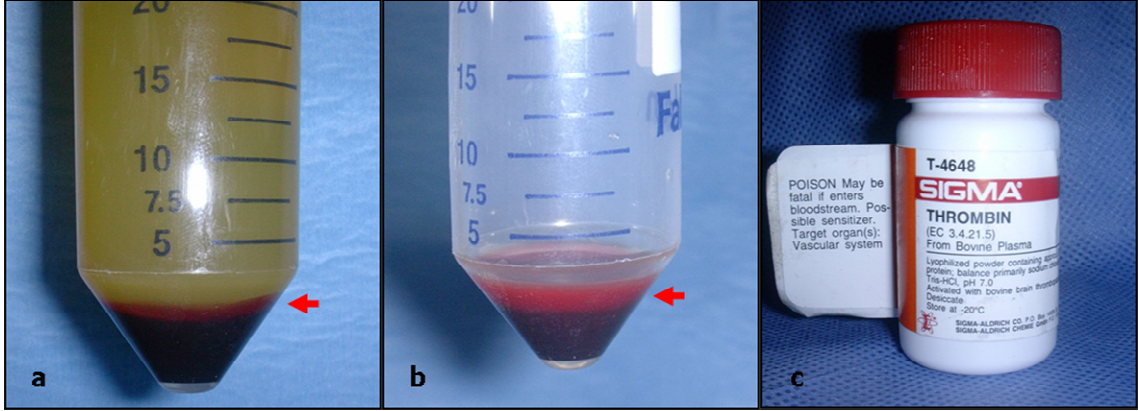
Trombositten zengin plazma (PRP) hazırlanmasında gerekli olan kanın elde edilmesi için, donör olarak seçilen ve sonrasında herhangi bir cerrahi işlem uygulanmayacak olan 5 adet sıçan kullanıldı. Ketamine-HCl (Alfamine®-im) ve Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile sağlanan anestezi altında, intrakardiyak kanülizasyon ile bu hayvanların tüm vücut kanları alındı ve sonrasında yüksek doz fenobarbital ile ötenazi işlemi uygulandı. Beş donör sıçandan elde edilen toplam 40 cc kan, koagülasyonu önlemek amacıyla eklenen 8 cc sitrat-fosfat-dekstroz (CPD) solüsyonu ile birlikte santrifüj işlemi için uygun olan bir plastik tüp içerisinde toplandı (**Şekil 16a**). Bu aşamada kullanılan CPD solüsyonu, kan merkezlerinde rutin olarak kullanılan üçlü kan torbaları (Baxter Healthcare Corp, USA) içerisinde elde edildi. Kullanılan CPD solüsyonu 26 mg/ml sodyum sitrat dihidrat, 25 mg/ml dekstrozu monohidrat, 2,9 mg/ml sitrik asit ve 2,2 mg/ml monobazik sodyum fosfat monohidrat içermekte idi.

Toplanan kan santrifüj cihazında (Heraeus Cryfuge 6000i, Kendro Laboratory Products, Germany), 22 °C derece sıcaklıkta ve 220 g devirde 20 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu. Bu ilk santrifüj işlemi eritrositlerin tüpün en alt kısmında toplanmasını ve üstte kalan plazma, trombosit ve lökositlerden ayrışmasını sağladı. İlk santrifüj işlemi sonrasında üstte toplanan açık sarı renkli plazma ile en altta biriken eritrositlerin arasında, trombositlerin ve beyaz kürelerin oluşturduğu ince bir ara tabaka (“buffy coat”) izlendi (**Şekil 16b**). Üstte biriken plazma ayrı bir tüp içerisine alındı (**Şekil 16c**) ve trombositleri içeren ara tabaka da bu plazma üzerine eklendi. Bu ayrıştırma işlemi sırasında bir miktar eritrositin de ara tabakaya karışmasına izin verildi. Plazma ile trombositleri içeren bu tüp, ikinci kez 480 g devirde 20 dakika boyunca santrifüj edildi. İkinci santrifüj işlemi ilk ayrıştırma sırasında arta kalan eritrositlerin dibeye çökmesini, trombositlerin bu eritrositler üzerinde yeniden ince bir tabaka oluşturmasını ve açık sarı renkli trombositten fakir plazmanın (PPP) en üstte

toplanmasını sağladı (**Şekil 17a**). İkinci santrifüj sonrasında oluşan trombosit konsantresi ve PPP ayrıştırılarak farklı tüpler içerisinde toplandı (**Şekil 17b**). Daha sonra mevcut trombosit konsantresi üzerine PPP eklenerek PRP elde edildi. Literatürdeki benzer çalışmalar (4) ve daha önce yaptığımız ön çalışmada, bu yöntem ile elde edilen trombosit konsantresinin, 5 cc PPP ile seyreltildiğinde yaklaşık $1,5 \times 10^{12}$ trombosit/L oranında trombosit içerdiği tespit edildiğinden, bu çalışmada da belirtilen oranda seyreltilme işlemi yapıldı. Sonuçta PRP içerisinde elde edilen trombosit sayısı, normal kan trombosit sayısından ($0,2-1 \times 10^{12}$ trombosit/L) yaklaşık 2,5 kat fazla idi (12).



Şekil 16: Trombositten zengin plazmanın hazırlanması. **a)** Donör sıçanlardan elde edilen ve antikoagülan solüsyon ile birlikte 48 cc olan kan, plastik bir tüp içerisinde toplandı; **b)** İlk santrifüj sonrası plazma ve kırmızı kan hücreleri ayrışırken trombositler ve lökositler bu iki katman arasında ince bir tabaka oluşturdular (işaretli alan, trombositleri de içeren bu ara tabakayı göstermektedir); **c)** Plazmanın uzaklaştırılmasından sonra ara tabakanın görünümü.



Şekil 17: Trombositten zengin plazmanın hazırlanması. **a)** İkinci santrifüj işlemi sonrasında iki tabaka arasında yer alan trombosit konsantresi (ok); **b)** PPP'nin uzaklaştırılmasından sonra eritrositler ve trombosit konsantresi (ok); **c)** PRP'nin aktive edilmesi için kullanılan sığır kaynaklı trombin preparatı.

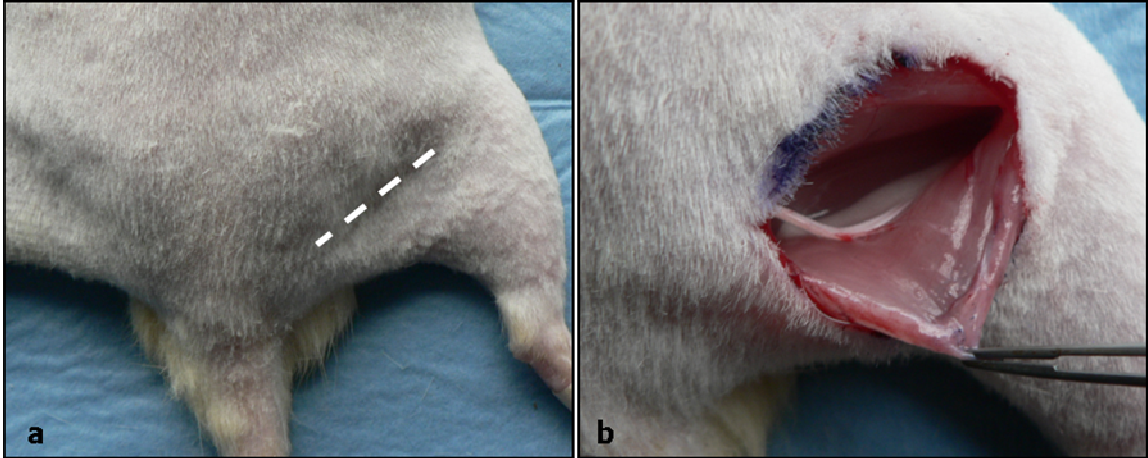
Elde edilen trombositten zengin plazma, içerisinde lökositleri de barındırdığından ve çalışma kapsamında her bir hayvana otolog ürün kullanımı mümkün olmadığından graft versus host reaksiyonunu azaltmak amacıyla ışınlama işlemine alındı ve 25 Gy ışınlanarak lenfosit inaktivasyonu sağlandı.

PRP'nin aktive edilmesi için sığır kaynaklı trombin preparatı kullanıldı (Thrombin, Sigma-Aldrich, Almanya). 1000 ünite/ml oranında trombin içeren toz ürün, 5 ml % 10'luk kalsiyum klorür ile sulandırılarak 200 ünite/ml oranında trombin solüsyonu oluşturuldu.

Elde edilen PRP ve trombin solüsyonundan deney gruplarındaki her bir sinir onarımı üzerine 0,1 ml PRP ve 12,5 µml (2,5 ünite) trombin solüsyonu birlikte uygulandı. Böylelikle PRP ve trombin solüsyonunun operasyon sahasında etkileşimleri ve bu sayede trombositlerin kalsiyum iyonları varlığında trombin ile aktive olmaları sağlandı.

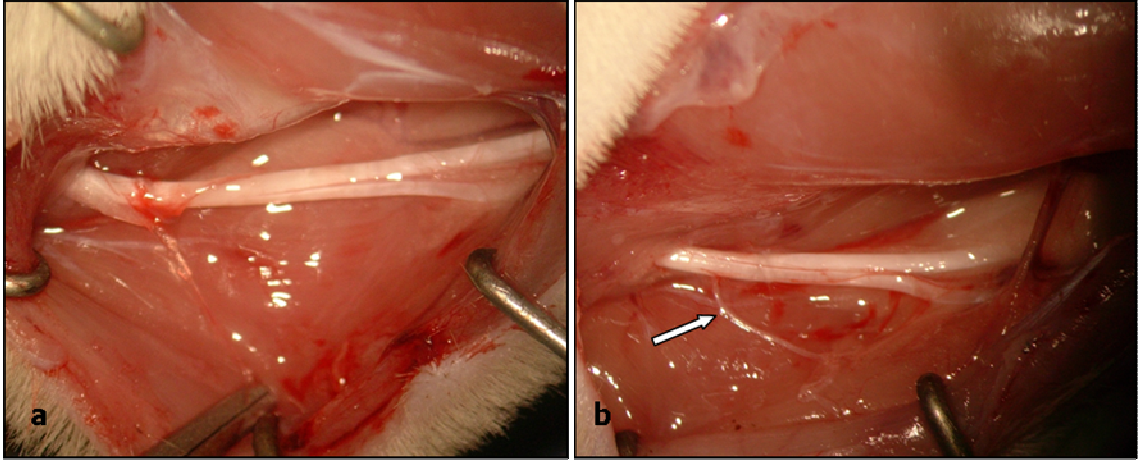
CERRAHİ TEKNİK

Deneklere 50 mg/kg Ketamine-HCl (Alfamine®-im) ve 9 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile anestezi uygulandı. Gluteal ve uyluk bölgeleri traş edildikten sonra, prone pozisyonda ayakları tespit edildi ve povidon iodine ile cerrahi alan temizliği yapıldı. Sağ alt ekstremitede kalça eklemi katlantısını izleyecek şekilde oblik gluteal insizyon yapıldı ve cilt kenarları ekarte edilerek biceps femoris kasına ulaşıldı (**Şekil 18a**). Biceps femoris kası, femur ve diz eklemi posterior sınırı boyunca künt diseksiyonla açıldı ve kenarları ekarte edilerek siyatik sinir ortaya çıkarıldı (**Şekil 18b**).



Şekil 18: Siyatik sinir diseksiyonu. **a)** Cilt insizyonunun planlanması; **b)** Biceps femoris kasının künt diseksiyon ile açılması sonucu sinirin ortaya konması.

Daha sonra sinir ince uçlu bir diseksiyon makası yardımıyla, siyatik çentikten popliteal alandaki dallanma bölgesine kadar çevre dokulardan serbestleştirildi (**Şekil 19a**). 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 19b**).



Şekil 19: Siyatik sinir diseksiyonu. **a)** Siyatik sinirin çevre dokulardan serbestleştirilmesi; **b)** Siyatik sinirin fleksör kas grubuna verdiği motor dal (ok).

Siyatik sinirin çevre dokulardan serbestleştirilmesinden sonraki basamaklar gruplara göre planlandı (**Şekil 21**).

Grup 1: Sham kontrol (n=4). Bu grupta siyatik sinire yönelik ek bir cerrahi işlem uygulanmadı.

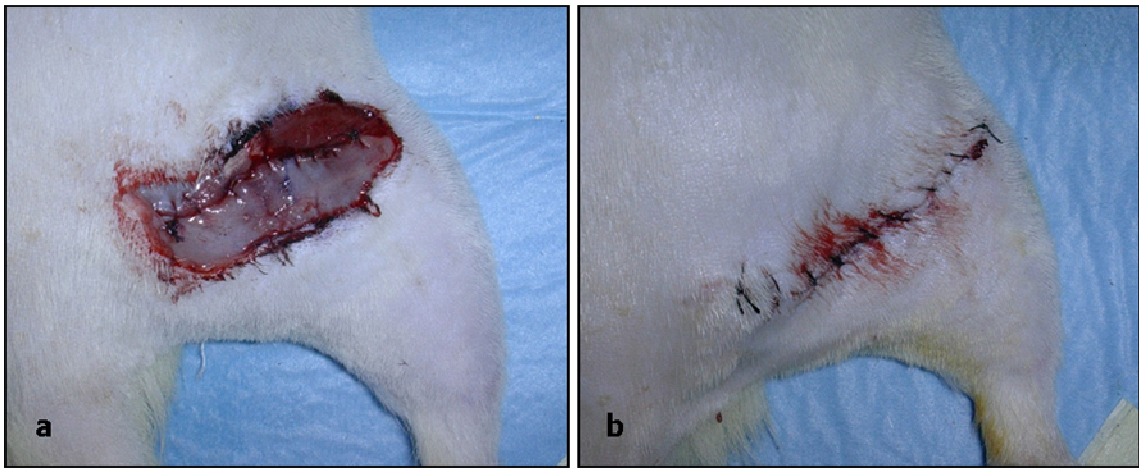
Grup 2: Kontrol grubu I (n=8): Siyatik sinir, koaptasyon seviyesi olarak belirlenen tibial ve peroneal sinirlerin ayırım noktasının 1 cm proksimalinden keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesildi. Serbest sinir uçları 10/0 Ethilon dikiş (W2870) kullanılarak 180 derece açılarla geçilen iki adet epinöral dikiş ile onarıldı.

Grup 3: Kontrol grubu II (n=8): Siyatik sinir, koaptasyon seviyesi olarak belirlenen tibial ve peroneal sinirlerin ayırım noktasının 1 cm proksimalinden keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesildi. Serbest sinir uçları 10/0 Ethilon dikiş (W2870) kullanılarak 60 derece açılarla geçilen 6 adet epinöral dikiş ile onarıldı.

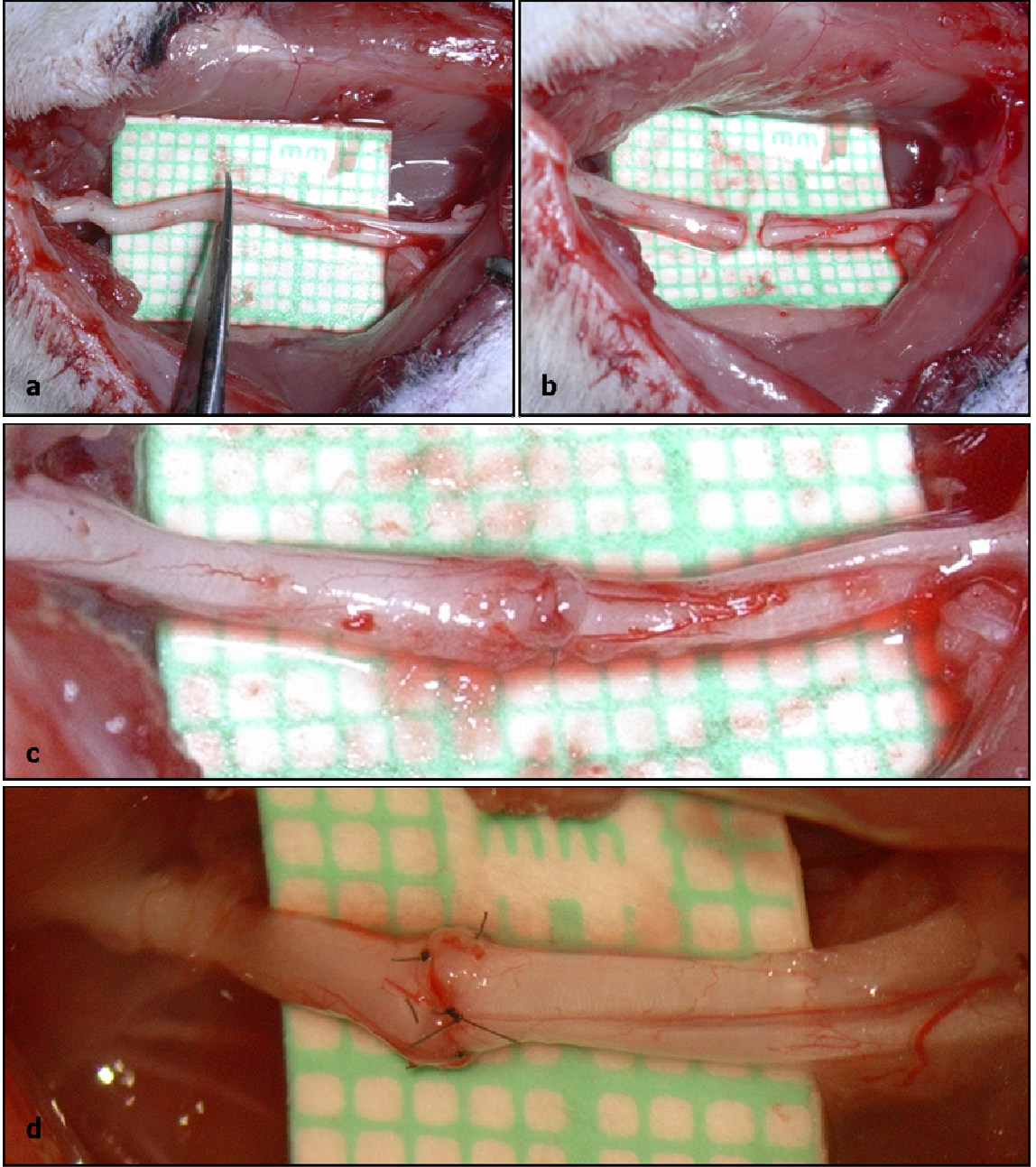
Grup 4: Deney grubu I (n=10): Siyatik sinir, koaptasyon seviyesi olarak belirlenen tibial ve peroneal sinirlerin ayırım noktasının 1 cm proksimalinden keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesildi. Serbest sinir uçları 10/0 Ethilon dikiş (W2870) kullanılarak 180 derece açılarla geçilen iki adet epinöral dikiş ile onarıldı. Daha sonra onarım alanı üzerine hazırlanmış olan PRP ve trombin solüsyonu (0,1 ml ve 12,5 µml) uygulandı.

Grup 5: Deney grubu II (n=10): Siyatik sinir, koaptasyon seviyesi olarak belirlenen tibial ve peroneal sinirlerin ayırım noktasının 1 cm proksimalinden keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesildi. Serbest sinir uçları 10/0 Ethilon dikiş (W2870) kullanılarak 60 derece açılarla geçilen 6 adet epinöral dikiş ile onarıldı. Daha sonra onarım alanı üzerine hazırlanmış olan PRP ve trombin solüsyonu (0,1 ml ve 12,5 µml) uygulandı.

Tüm deneklerde, sinirler ile ilgili cerrahi işlemlerin tamamlanmasının ardından, kaslar 5/0 vicryl, cilt ise 5/0 ipek dikiş kullanılarak devamlı dikiş tekniği ile onarıldı (**Şekil 20**). İnsizyon alanına povidone iyot ile pansuman yapılan hayvanların vücut ısıları korunarak anesteziden uyanmaları beklenildi.



Şekil 20: İşlemlerin bitmesinin ardından **a)** kaslar 5/0 vicryl; **b)** cilt 5/0 ipek dikiş kullanılarak devamlı teknik ile onarıldı.



Şekil 21: Deney ve kontrol gruplarında uygulanan cerrahi işlem. **a)** Siyatik sinirin koaptasyon seviyesinden keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesilmesi; **b)** Kesilmiş olan sinir uçları; **c)** 180 derece açılar ile geçilen iki adet epinöral dikiş ile onarım; **d)** 60 derece açılar ile geçilen altı adet epinöral dikiş ile onarım.

DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

Üç aylık takip süresi içerisinde Grup 3’den 1, Grup 4 ve 5’ den ise 3 adet hayvan ölüm veya otomutilasyon nedeniyle çalışma dışı kaldı. Bu nedenle çalışmaya 3. ayın sonunda sağlıklı olan 33 hayvanın değerlendirmesi ile devam edildi.

A. GENEL DEĞERLENDİRME

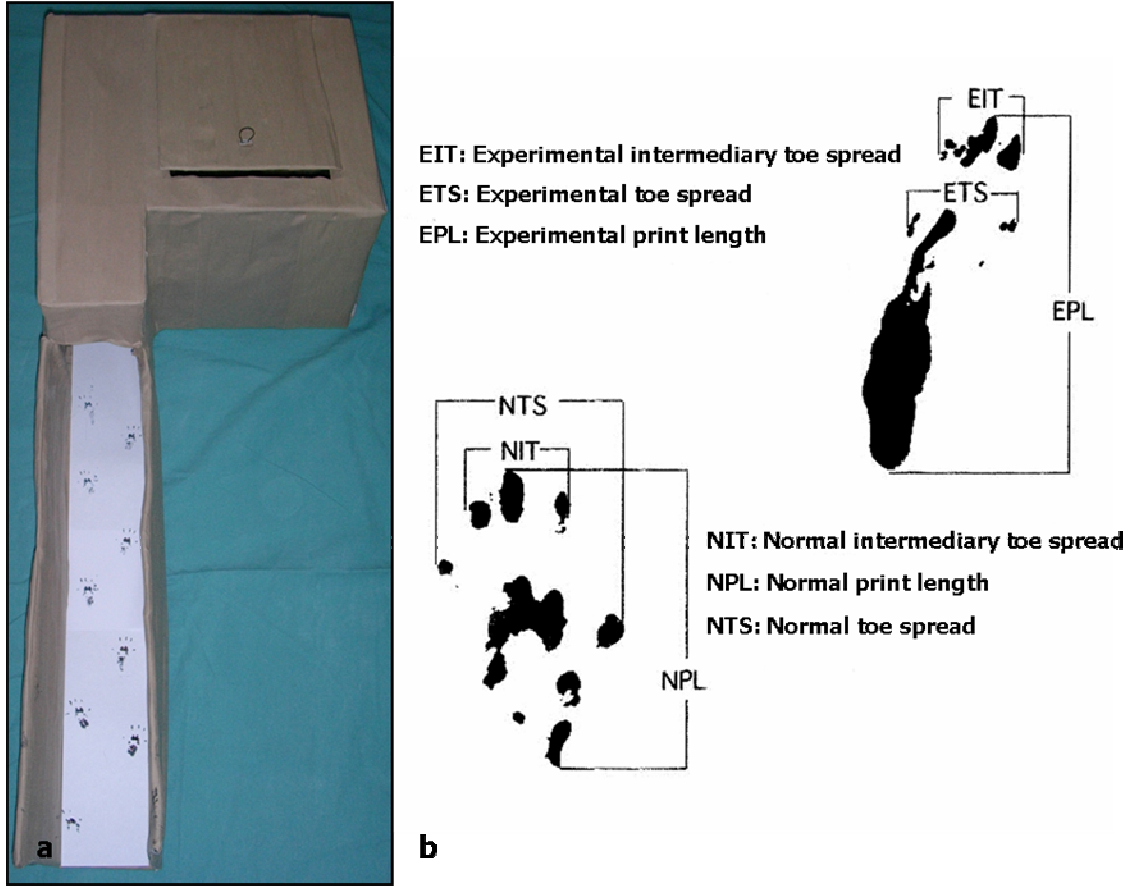
Değerlendirmeye alınan hayvanlarda çalışma sürecinde gözlenen genel değişiklikler belirlendi.

B. FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME

Grupların fonksiyonel değerlendirilmesinde yürüme analizi (“walking-track” analiz) ve elektromiyografi (EMG) kullanıldı. Yürüme analizi ile deneklerin geç postoperatif (90.gün) siyatik fonksiyon indeksleri hesaplandı. Ayrıca postoperatif 90. günde ameliyat yapılan ve yapılmayan bacaklarda gastroknemius kaslarına EMG yapıldı.

B.1 -Yürüme Analizi ve Siyatik Fonksiyon İndeksi

Sıçanların aynı doğrultuda yürümelerini sağlamak amacı ile 8,2 cm eninde, 42 cm boyunda, kenarları 12 cm yüksekliğinde bir kulvarı olan ve karanlık oda şeklinde sonlanan bir düzenek hazırlandı (20). Yürüme kulvarının içine 8,2 x 42 cm boyutlarında A3 fotokopi kâğıtlarından kesilen beyaz kâğıt şeritler yerleştirildi. Sıçanların her iki arka ayakları siyah mürekkep emdirilmiş ıstampaya bastırıldı ve hazırlanan kulvarda yürütülerek arka ayak izleri kaydedildi (102) (**Şekil 22a**). 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 (**Şekil 22b**).



Şekil 22: Siyatik fonksiyon indeksinin hesaplanması **a)** kullanılan yürüme kulvarı; **b)** PL (“print length”), TS (“toe spread”) ve IT’ nin (“intermediate toe spread”) deneysel (E) ve kontrol (N) ekstremiteler için ölçüm şekli.

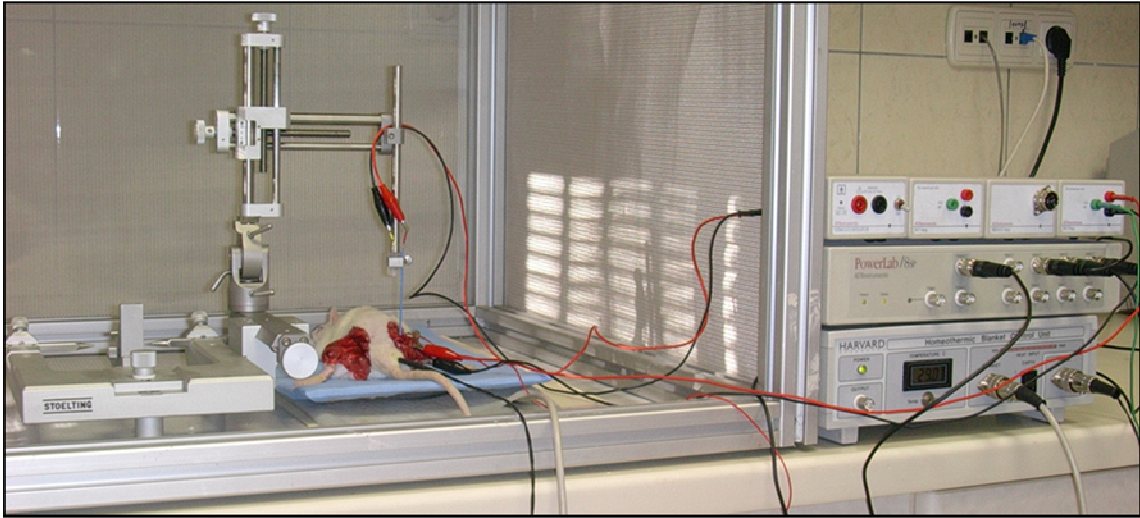
Ölçümler sonucu elde edilen değerler siyatik fonksiyonel indeks skalasına uyarlandı (9). Bain, Mackinnon ve Hunter tarafından geliştirilen bu multiple lineer regresyon formülü yardımıyla Siyatik Fonksiyon İndeksleri (SFİ) hesaplandı (Şekil 23). Elde edilen SFİ değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel farklılık olup olmadığı araştırıldı.

$$SFİ = -38,3 \frac{(EPL-NPL)}{NPL} + 109,5 \frac{(ETS-NTS)}{NTS} + 13,3 \frac{(EIT-NIT)}{NIT} - 8,8$$

Şekil 23: Siyatik fonksiyon indeksinin hesaplanması için kullanılan formül.

B.2 - Elektromiyografik Değerlendirme (EMG)

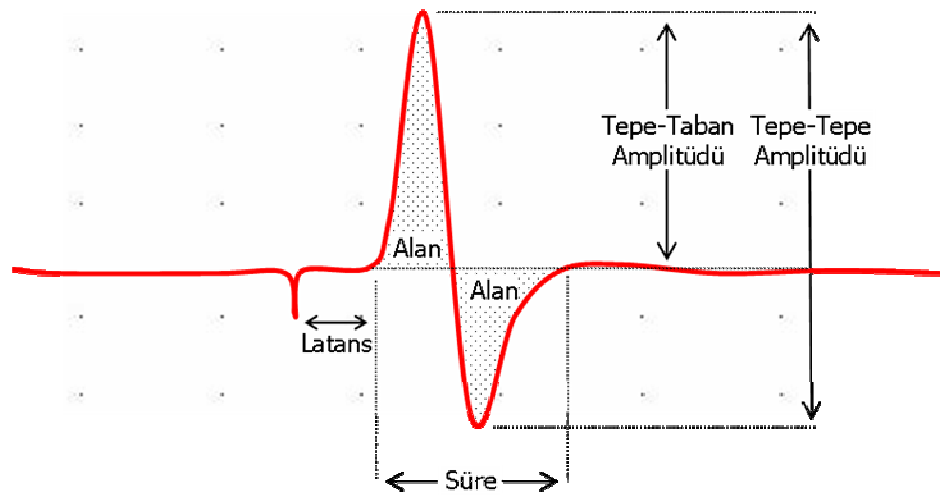
Postoperatif 3. ayda, yürüme analizlerinin tamamlanmasının ardından tüm sıçanlar elektrofizyolojik değerlendirmeye alındılar. EMG işlemleri faraday kafesi içerisinde sterotaksi cihazı yardımıyla gerçekleştirildi ve işlemler için Powerlab elektromiyografi cihazı (AD Instruments, USA) ile Scope v3.7 (AD Instruments, USA) bilgisayar yazılımı kullanıldı (Şekil 24). Ayrıca değerlendirme sırasında hayvanın vücut ısını sabit tutmak amacıyla, homeotermik ısı kontrol ünitesinden (Harvard Apparatus, USA) yararlanıldı. Vücut ısını $37 \pm 0,1$ derecede sabit tutan bu sistem dâhilinde, hayvanın altına bir ısıtıcı battaniye yerleştirildi ve vücut ısısi rektal prob yardımıyla ölçüldü.



Şekil 24: Elektromiyografi işlemi için kullanılan EMG ve sterotaksi cihazı.

Değerlendirmeye alınan hayvanlarda anestezi, kas içi enjeksiyonların sonuçları etkileyebileceği göz önüne alınarak intraperitoneal yoldan verilen 50 mg/kg Ketamine-HCl (Alfamine®) ile sağlandı. İlk cerrahi işleme benzer şekilde siyatik sinir çevre dokulardan serbestleştirildi ve koaptasyon hattı bulundu. Gastroknemius kasına ulaşmak için, biceps

femoris kası insersiyosundan keskin diseksiyon ile ayrılarak posteriora ekarte edildi. Ayrıca parazitik uyarımı engellemek amacı ile peroneal sinirin gastroknemiusa komşuluk gösteren kısmı eksize edildi. Hayvanın sırt bölgesinde cilt altında açılan bir tünele 2 mm çaplı, Ag-AgCl disk elektrod topraklama olarak yerleştirildi. Sinir uyarımları siyatik sinir üzerinden, koaptasyon hattının 1 cm proksimalinden, anot-katod arası uzaklığı 2 mm olan termoplastik materyale gömülü bipolar tungsten metal elektrotlar ile yapıldı. Kayıtlar ise aktif elektrot kasın göbeğine, referans elektrot ise kasın tendonuna yerleştirilerek alındı. Gastrokneimus kasının maksimum büyüklükte birleşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP=compound maximal action potential) ölçülerek, bu potansiyelin amplitüdü ve alanı hesaplandı (**Şekil 25**). Ayrıca supramaksimal uyarım ile elde edilen CMAP’ de, uyarımdan sonra defleksiyonunun başlangıcına kadar geçen zaman “latans” olarak değerlendirildi. Deney uygulanan sağ ve sağlam olan kontrol sol bacaklardaki gastroknemius kaslarının CMAP’lerinin amplitüd, alan ve latans değerleri ölçülerek deneysel bacak/kontrol bacak oranları hesaplandı ve oranlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.



Şekil 25: Elektromiyografi kaydında değerlendirilen parametreler.

C. KASLARIN HİSTOMORFOMETRİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Fonksiyonel analizleri tamamlanan deneklerde her iki bacadaki gastroknemius kasları anestezinin devam ettiği süre içerisinde eksize edildi ve kasların renk ve görünüm açısından makroskopik incelemeleri, ıslak ağırlıklarının ölçümü ve kantitatif histomorfometrik değerlendirilmeleri yapıldı.

C.1 - Makroskopi

Gastroknemius kaslarında denervasyona bağlı olarak gelişen atrofik değişiklikler makroskopik olarak değerlendirildi.

C.2 - Kas Ağırlık Ölçümü

Siyatik sinirin bir dalı olan tibial sinir ile inerve edilen gastroknemius kası her iki arka ekstremitede eksize edilerek ıslak kas ağırlığı hassas dijital terazi (Sartorius, Almanya) ile ölçüldü. Her hayvanda, deney yapılan sağ bacak gastroknemius kas ağırlığı, opere edilmeyen sol bacadaki gastroknemius kas ağırlığına bölünerek iyileşme oranı hesaplandı (Şekil 26). Gruplar arasında iyileşme oranları açısından istatistiksel farklılık arandı.

$$\text{Kas iyileşme oranı (\%)} = \frac{\text{Sağ bacak gastroknemius kas ağırlığı}}{\text{Sol bacak gastroknemius kas ağırlığı}} \times 100$$

Şekil 26: Kas ağırlıkları yardımıyla kas iyileşme oranının hesaplanması.

C.3 – Mikroskopi

Işık mikroskobunda incelenmesi amacıyla, %10'luk formaldehit içerisinde saklanan gastroknemius kaslarının karın bölgesinden 2 milimetrelik transvers kesitler alındı. Kesitler aynı solüsyon içinde 48 saat tutulduktan sonra, yoğunluğu giderek artan alkol solüsyonları ve

xylene içinde dehidrate edilerek parafin içine gömüldü. Bu parafin bloklardan 5-7 µm kalınlığında alınan transvers kesitler hematoxilen-eozin ile boyandı.

C.4 – Kantitatif Histomorfometri

Histomorfometrik değerlendirme için her kas preparatından x200 büyütme altında 5'er alandan dijital fotoğraflar alındı. Kas kesitlerinin incelenmesinde, bilgisayar ortamına veri aktarımına olanak sağlayan Leica DM 4000 dijital ışık mikroskobu (Leica Microsystems, Almanya) ve elde edilen görüntülerden lif kalınlıklarının ölçülmesi için Adobe Photoshop CS2 ve UTHSCA Image Tool v3.0 (The University of Texas Health Science Center, San Antonio) bilgisayar yazılımları kullanıldı.

Kas liflerinin değerlendirilmesine, alanın içine tam olarak giren kas lifleri dahil edildi. Alan içerisindeki kas liflerinin en dar ve en geniş çap uzunlukları ölçüldü ve bu iki değer aritmetik ortalaması hesaplanarak ortalama kas lifi çapı hesaplandı.

Ölçümler normal ve opere edilen taraftaki gastroknemius kas preparatlarının en az 5 alanını ve en az 200 lifini içerecek sayıda yapıldı. Kas liflerinin ortalama çapı açısından operatif ve nonoperatif bacak gastroknemius kasları istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

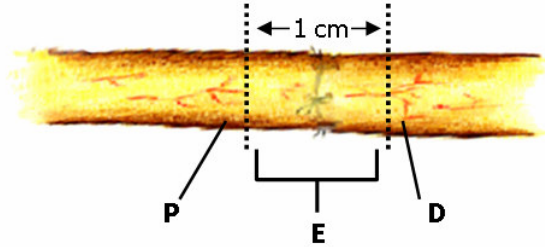
D. SİNİRLERİN HİSTOMORFOMETRİK DEĞERLENDİRİLMESİ

D.1 - Makroskopi

Deneklerin siyatik sinirlerinde görülen makroskopik değişiklikler belirlendi. Sinirlerin serbestleştirilmeleri sırasında çevre dokulara yapışıklık gösterip göstermedikleri ve koaptasyon hattında makroskopik olarak görülebilen bir skar olup olmadığı değerlendirildi.

D.2 - Mikroskopi

Normal siyatik sinirlerin tek bölgesinden ve opere edilen ekstremitelerdeki siyatik sinirlerin üç farklı bölgesinden doku örnekleri alındı (**Şekil 27**).



Şekil 27: Sinir onarımı yapılan gruplarda koaptasyon alanını içeren 1cm'lik sinir segmentinde (E) epinöral skar doku indeksi hesaplanırken, proksimal (P) ve distal alanlarda (P) sinir rejenerasyonu kantitatif olarak değerlendirildi.

Cerrahi uygulanan sinirlerde koaptasyon alanını içeren 1 cm'lik sinir segmenti, skar dokusu ve epinöral kalınlaşma açısından incelenmek üzere eksize edildi. Sham kontrol grubunda ve normal ekstremitelerde siyatik sinirlerinde ise doku örnekleri bu segmente karşılık gelen alanlardan alındı. % 10'luk formol solüsyonu içerisinde fikse edilen ve daha sonra parafin blok içerisinde gömülen sinirlerden longitudinal planda 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Bu kesitler epinöral dokudaki kollajeni gösterebilmek için Masson-trikrom ile boyandı.

Sinir rejenerasyonunun değerlendirilmesi için normal ekstremitelerdeki siyatik sinirlerden ve opere edilen ekstremitelerdeki siyatik sinirlerin koaptasyon alanı dışında kalan proksimal ve distal bölgelerinden alınan örnekler Karnovsky solüsyonu içine konuldu. Hazırlanan örnekler bir gece Karnovsky fiksatif solüsyonunda bekletildikten sonra osmiyum tetroksit solüsyonu içinde fikse edildiler. Doku örnekleri %30'dan %100'e kadar artan

konsantrasyonlardaki etanol solüsyonunda dehidrate edildikten sonra 30 dakika propilenoksitte bekletildi. Daha sonrada Araldite CY212 + Araldite HY 964 + BDMA + Dibutyl Phthalate karışımı ile propilen oksitin eşit miktarlarından oluşan karışımı içinde bir gece +4 °C’de bekletildi. Araldite CY212 + Araldite HY 964 + BDMA + Dibutyl Phthalate karışımı içine gömülen doku örnekleri, önce 24 saat boyunca 45 °C, sonra da 48 saat boyunca 60 °C sıcaklıkta etüv içinde tutularak bloklandı. Araldite gömülen bu sinir dokularından Reichert Supernova Ultramicrotome ile transvers planda, 1 µm kalınlığında, yarı ince kesitler alındı ve toluidine mavisi ile boyandı.

D.3 - Kantitatif Histomorfometri

Longitudinal planda hazırlanmış kesitlerde, sinir çevresinde daha koyu boyanan epinöral skar dokusunun kalınlığı bilgisayar ortamında ve x4 büyütme altında, Leica Qwin image analyser yazılımı (Leica Microsystems, Germany) kullanılarak ölçüldü. Ölçümler sinir trasesi boyunca en az 10 farklı noktadan tekrar edildi ve elde edilen değerler sinirin transvers çapına oranlanarak kontrol sol bacak ve deney gruplarındaki her bir sinir için epinöral skar doku indeksi değeri hesaplandı (Şekil 28).

$$\text{Epinöral Skar Doku İndeksi} = \frac{\text{Epinöral Skar Doku Kalınlığı}}{\text{Sinir Transvers Çapı}}$$

Şekil 28: Sinir kesitlerinden epinöral skar doku indeksinin hesaplanması.

Ayrıca proksimal ve distal alanlardan hazırlanan her sinir kesitinin x100 büyütme altında incelenen 6 farklı alanından kaydedilen dijital görüntüler bilgisayar ortamında görüntü analiz sistemi kullanılarak değerlendirildi. Sinir kesitlerinin değerlendirilmesinde Leica DM 4000 dijital ışık mikroskobu (Leica Microsystems, Almanya) ve elde edilen görüntülerden

ölçüm yapmak için Adobe Photoshop CS2 ve UTHSCA Image Tool v3.0 bilgisayar yazılımları (The University of Texas Health Science Center, San Antonio) kullanıldı.

Sayıma, alanın içine tam olarak giren miyelinli aksonlar dâhil edildi. Her bir sinir örneği kesitinin 6 farklı alanında miyelinli sinir sayıları belirlendi ve x4 büyütme altında ölçülen toplam sinir kesit alanı yardımıyla toplam miyelinli akson sayısı hesaplandı (**Şekil 29**). Ayrıca inceleme alanına tam olarak giren sinir liflerinin ve aksonların en büyük ve en küçük çapları ölçülerek ortalama sinir lifi çapları, ortalama akson çapları ve ortalama g-oranları (akson çapı/ sinir lifi çapı) hesaplandı.

$$\text{Toplam Miyelinli Akson Sayısı} = \frac{\text{Sinir Kesit Alanı}}{\text{Değerlendirilen Alan}} \times \frac{\text{Değerlendirilen Alandaki Miyelinli Akson Sayısı}}{\text{Değerlendirilen Alan}}$$

Şekil 29: Sinir kesitlerinden toplam miyelinli akson sayısının hesaplanması.

E. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Değerlendirilen tüm parametrelerden elde edilen verilen istatistiksel değerlendirme için SPSS for Windows v.10.0 programına (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) aktarıldı. Grupları arasında parametreler açısından genel karşılaştırma, non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Bu test ile elde edilen anlamlı sonuçlar, parametreler açısından gruplar arasında bir fark olup olmadığını gösterdi. Ayrıca her parametre açısından gruplar kendi aralarında da karşılaştırıldı ve bu aşamada bağımsız değişkenler için çift yönlü non-parametrik bir test olan Mann Whitney-U testi kullanıldı. Değerlendirmelerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

A. GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

Üç aylık takip süresi sonunda 7 hayvan ölüm veya otomutilasyon nedeniyle çalışma dışı kaldı ve değerlendirmeye sağlıklı olan 33 hayvan dâhil edildi. Sham kontrol grubu dışında kalan diğer tüm gruplarda cerrahi sonrasında opere edilen alt ekstremitede tam motor paralizi gelişti. Üçüncü ay sonunda tüm gruplarda paralizilerde kısmi düzelme olduğu ve minimal kas atrofilerinin geliştiği gözlenirken, siyatik sinirin tam kat kesilerek iki dikişle onarıldığı deney grubundaki 2 sıçanda parsiyel otomutilasyon geliştiği saptandı.

B. FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

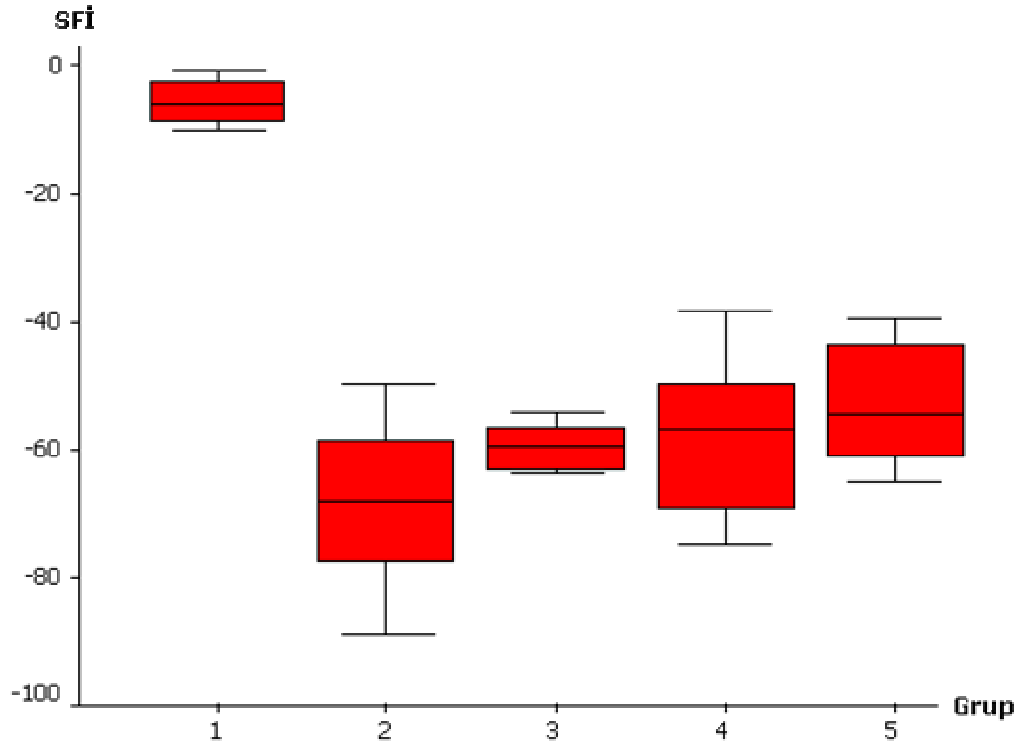
B.1 -Yürüme Analizi ve Siyatik Fonksiyon İndeksi Bulguları

Tüm gruplarda üçüncü ayda yürüme analizi yapıldı ve siyatik fonksiyon indeksi değerleri (SFİ) saptandı. SFİ değerleri Grup 1’de ortalama $-5,63 \pm 4,10$, Grup 2’de ortalama $-68,25 \pm 13,35$, Grup 3’de ortalama $-61,31 \pm 12,21$, Grup 4’de ortalama $-58,22 \pm 13,57$ ve Grup 5’de ortalama $-52,51 \pm 10,26$ idi (**Tablo 2**).

Tablo 2: Deneklerin Siyatik Fonksiyon İndeks (SFİ) değerleri

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	-10,16	-79,90	-59,15	-73,57	-59,15
2	-7,44	-49,81	-45,31	-56,95	-45,31
3	-4,31	-88,73	-54,08	-46,84	-42,08
4	-0,64	-50,82	-62,46	-38,23	-62,44
5		-67,45	-85,23	-64,65	-54,32
6		-68,34	-63,45	-52,78	-64,89
7		-74,82	-59,48	-74,56	-39,41
8		-66,15			
Ort±SD	-5,63±4,10	-68,25±13,35	-61,31±12,21	-58,22±13,57	-52,51±10,26

Siyatik fonksiyon indeksi açısından gruplar arasındaki farklar değerlendirildiğinde, sham kontrol grubu ile diğer deney grupları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$). Sinir koaptasyonu uygulanan grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında ise, yalnızca Grup 2 ve Grup 5 arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,02$) görüldü. Diğer deney grupları arasında siyatik fonksiyon indeksleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (**Şekil 30**).



Şekil 30: Gruplar arasında ortalama SFİ değerlerinin karşılaştırılması (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,01$).
- Grup 2 ile Grup 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,02$).
- Grup 2-3, 2-4, 3-4 ve 4-5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

B.2 - Elektromiyografik Değerlendirme Bulguları

Üçüncü ay sonunda tüm deneklere elektromiyografi yapılmasına rağmen, işlem sırasında ölmesi nedeniyle Grup 2'deki bir denekten veri elde edilemedi. Siyatik sinirden uyarılar verilerek operatif ve kontrol bacak gastroknemius kaslarının bileşik kas aksiyon potansiyellerinin latans, amplitüd ve alanları ölçüldü. Deney tarafındaki kaslardan elde edilen ölçümler, kontrol bacak ölçümlerine oranlanarak iyileşme oranları hesaplandı (**Tablo 3**).

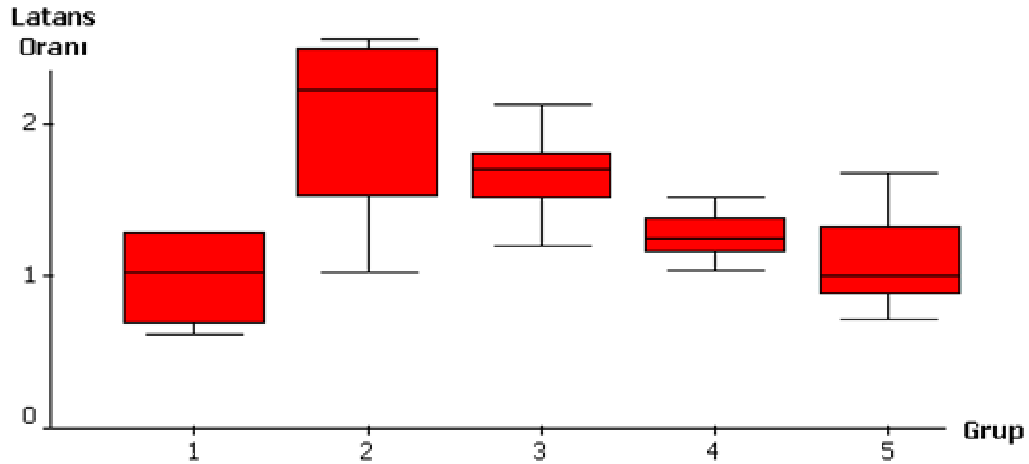
Tablo 3: Elektromiyografik değerlendirme sonuçları

Operatif bacak/kontrol bacak kasılma latansı oranları					
Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	1,28	1,02	1,87	1,96	1,24
2	1,28	2,22	2,12	1,25	0,78
3	0,77	2,42	1,20	1,03	1,68
4	0,62	2,56	1,46	1,16	1,00
5		1,85	1,70	1,25	0,71
6		1,21	1,59	1,52	1,40
7		4,30	1,73	1,15	1,00
Ort±SD	0,99 ± 0,34	2,23 ± 1,09	1,67 ± 0,29	1,33 ± 0,31	1,12 ± 0,35

Operatif bacak/ kontrol bacak kasılma amplitüdü oranları					
Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	1,00	0,85	0,98	0,17	0,87
2	0,98	0,70	0,73	0,29	0,96
3	1,30	0,97	0,60	0,74	0,40
4	0,89	0,27	0,44	0,85	0,40
5		0,09	0,55	0,58	0,50
6		0,35	0,64	0,43	0,88
7		0,22	0,68	0,50	0,41
Ort±SD	1,04 ± 0,18	0,49 ± 0,34	0,66 ± 0,17	0,51 ± 0,24	0,63 ± 0,26

Operatif bacak/ kontrol bacak kasılma eğrisi alan oranları					
Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,92	0,29	0,65	0,46	0,67
2	0,96	0,82	0,83	0,63	0,72
3	1,12	0,70	0,75	0,81	0,57
4	0,87	0,14	0,53	0,63	0,59
5		0,41	0,63	0,59	0,44
6		0,43	0,70	0,30	0,84
7		0,27	0,65	0,54	0,63
Ort±SD	0,97 ± 0,11	0,44 ± 0,24	0,68 ± 0,09	0,57 ± 0,16	0,64 ± 0,13

Gastroknemius kası operatif bacak/deneysel bacak **kasılma latansı** oranı Grup 1’de ortalama $0,99 \pm 0,34$, Grup 2’de ortalama $2,23 \pm 1,09$, Grup 3’de ortalama $1,67 \pm 0,29$, Grup 4’de ortalama $1,33 \pm 0,31$ ve Grup 5’de ortalama $1,12 \pm 0,35$ olarak hesaplandı. Kasılma latansı oranları açısından sham kontrol grubu olan Grup 1 en kısa latans değerine sahip olan gruptu. Sinir onarımı yapılan gruplardan Grup 2 ve 3’ün sham kontrol grubundan farklı olduğu saptandı (Grup 1 ile 2 için $p=0,05$ ve Grup 1 ile 3 için $p=0,02$). Buna karşın Grup 4 ve 5’in latans değerleri sham kontrol grubuna yakındı ($p>0,05$). Sinir onarımı yapılan grupların kendi aralarında karşılaştırmalarında ise Grup 5 ile Grup 2 ve 3 arasında saptanan farkların anlamlı olduğu (Grup 5 ile 2 için $p=0,02$ ve Grup 5 ile 3 için $p=0,01$), buna karşın diğer gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlam taşımadığı saptandı ($p>0,05$) (**Şekil 31**).

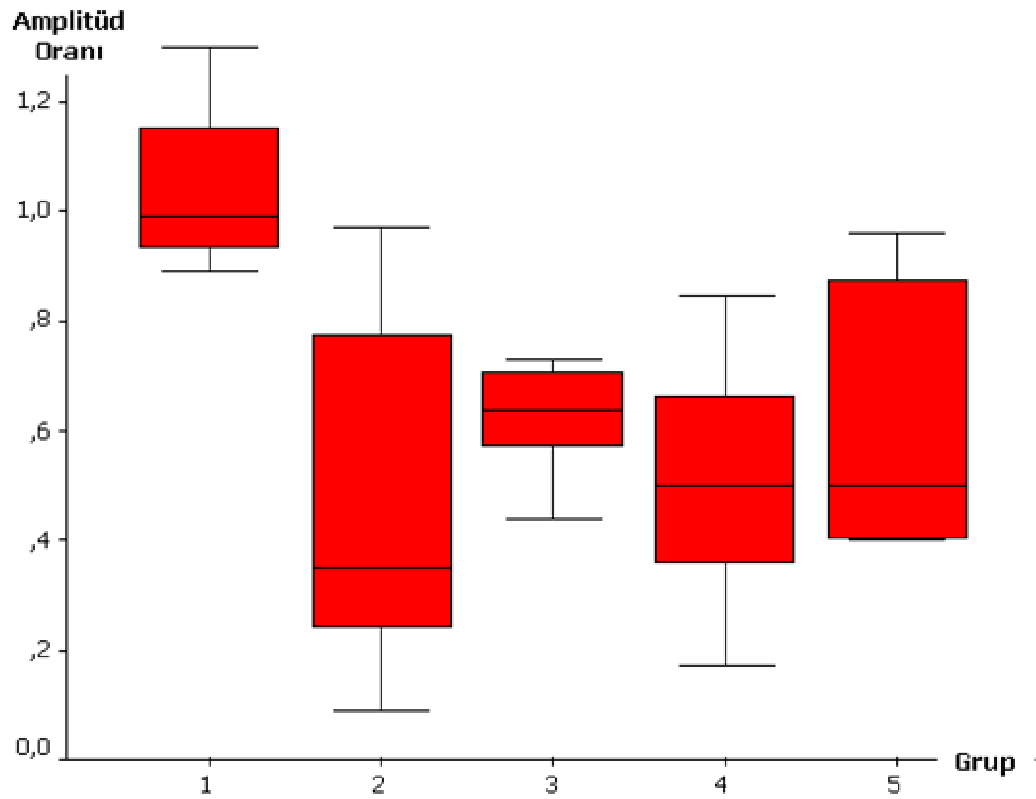


Şekil 31: Deneysel bacak/kontrol bacak latans oranları (Mann-Whitney U):

- Grup 1-2 ve 1-3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,05$ ve $p=0,02$).
- Grup 2 ile Grup 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,02$).
- Grup 3 ile Grup 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,01$).
- Grup 1-4, 1-5, 2-3, 2-4, 3-4 ve 4-5 arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

Gastroknemius kası operatif bacak/deneysel bacak **kasılma amplitüdü** oranı Grup 1’de ortalama $1,04 \pm 0,18$, Grup 2’de ortalama $0,49 \pm 0,34$, Grup 3’de ortalama $0,66 \pm 0,17$, Grup 4’de ortalama $0,51 \pm 0,24$ ve Grup 5’de $0,63 \pm 0,26$ olarak hesaplandı.

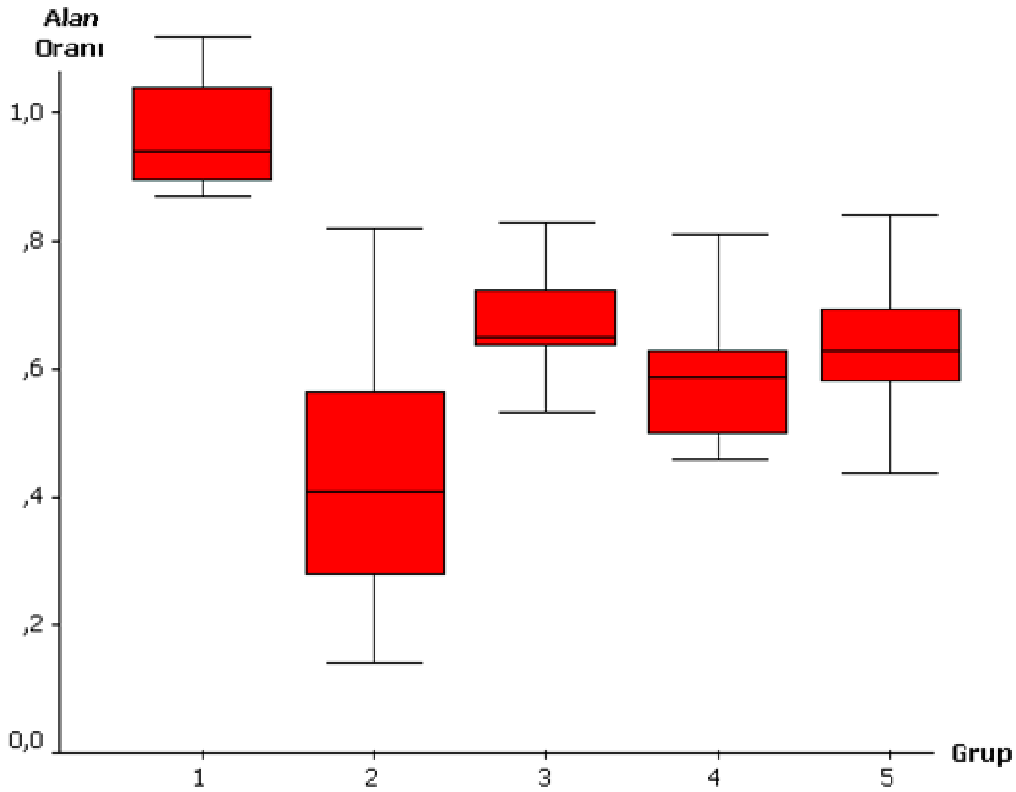
Kasılma amplitüdü oranları açısından sham kontrol grubu ile diğer deney grupları arasında saptanan farklar istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0,01$), koaptasyon uygulanan grupların birbirleri ile karşılaştırılmasında belirgin bir fark saptanmadı ($p > 0,05$) (**Şekil 32**).



Şekil 32: Deneysel bacak/kontrol bacak kasılma amplitüdü oranları (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$).
- Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Gastroknemius kası operatif bacak/deneysel bacak **kasılma eğrisi alanı oranı** Grup 1’de ortalama $0,97 \pm 0,11$, Grup 2’de ortalama $0,44 \pm 0,24$, Grup 3’de ortalama $0,68 \pm 0,09$, Grup 4’de ortalama $0,57 \pm 0,16$ ve Grup 5’de ortalama $0,64 \pm 0,13$ olarak hesaplandı. Kasılma eğrisi alanı oranları açısından sham kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak belirgin fark olduğu ($p<0,01$), buna karşın diğer deney grupları arasındaki farkların anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$) (**Şekil 33**).



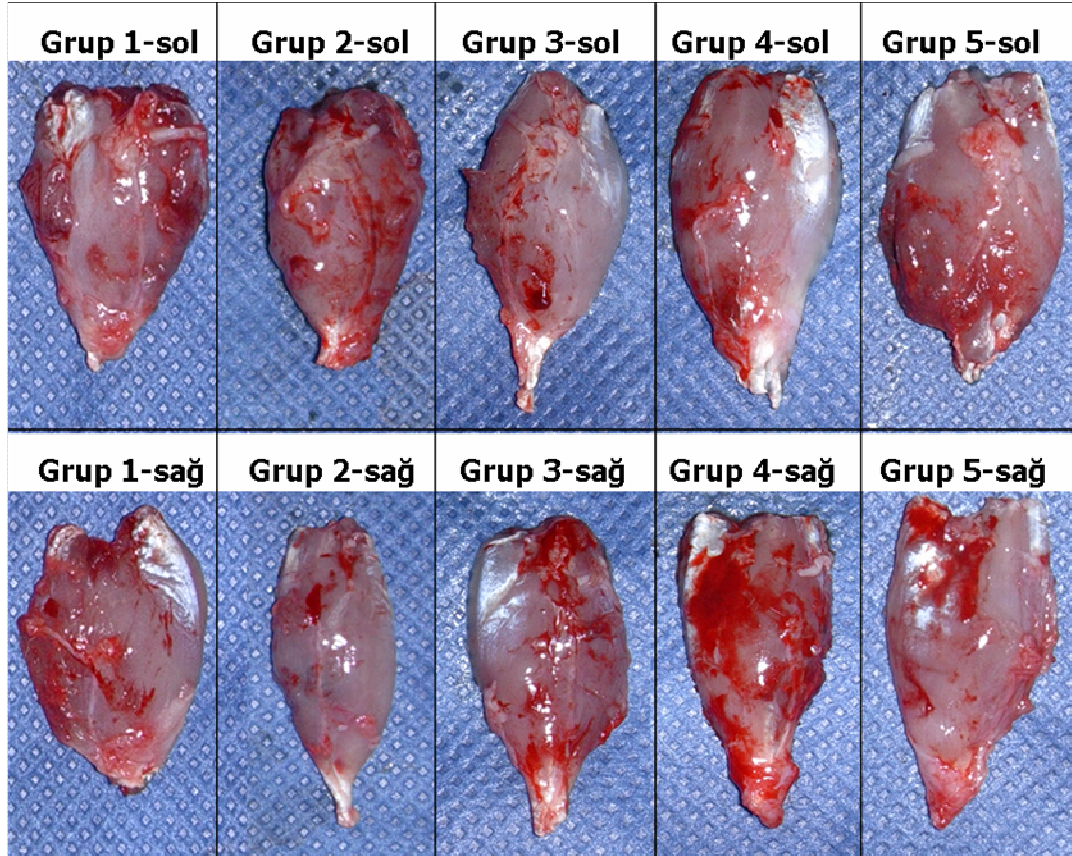
Şekil 33: Deneysel bacak/kontrol bacak kasılma eğrisi alanı oranları (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,01$).
- Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

C. KASLARIN HİSTOMORFOMETRİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

C.1 - Makroskopi

Tüm gruplarda kontrol sol bacak gastroknemius kaslarının makroskopik görünümü normaldi ve gruplar arasında belirgin fark yoktu. Deneysel sağ bacak gastroknemius kaslarında ise Grup 2’de daha belirgin olmak üzere minimal atrofik görünüm mevcut idi (Şekil 34).



Şekil 34: Gruplara göre kontrol sol bacak ve deneysel sağ bacak gastroknemius kaslarının makroskopik görünümü. Deneysel bacak gastroknemius kasları arasında Grup 2’de gözlenen atrofi diğer gruplara nazaran daha belirgindi.

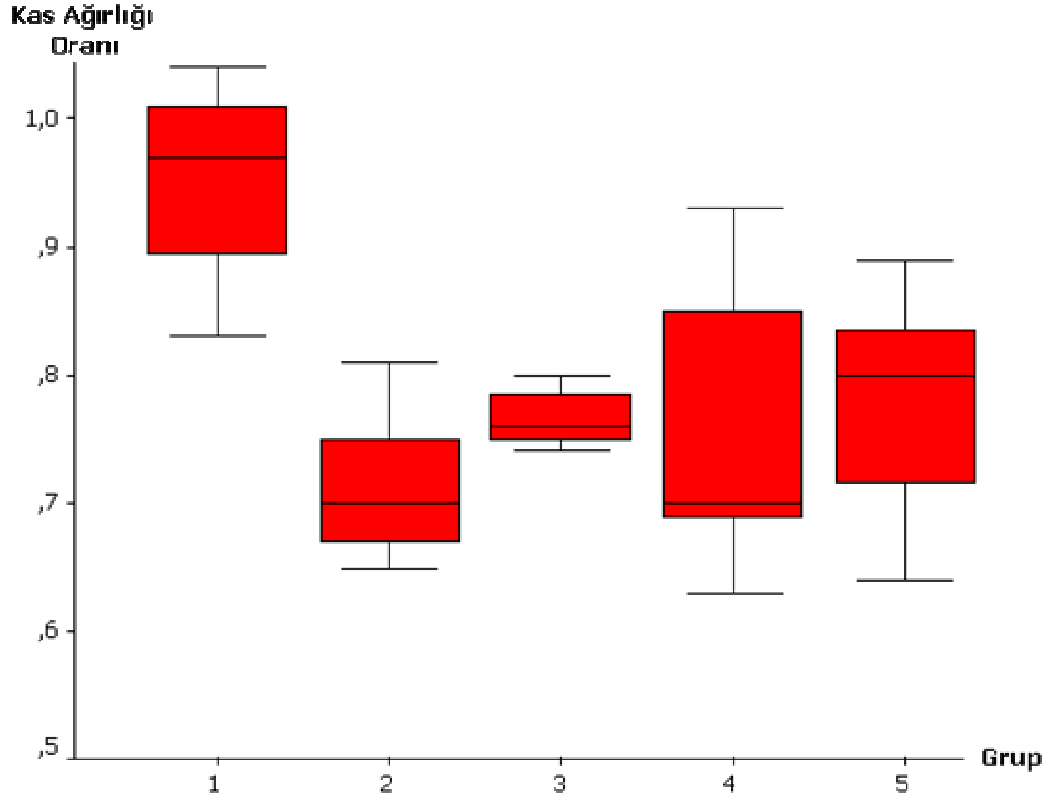
C.2 - Islak Kas Ağırlıkları

Tüm gruplarda deney uygulanan sağ bacak gastroknemius kası ıslak ağırlığı, kontrol sol bacak gastroknemius kası ıslak ağırlığına oranlanarak kas iyileşme oranları hesaplandı. Kas iyileşme oranları Grup 1’de ortalama $0,95 \pm 0,08$, Grup 2’de ortalama $0,71 \pm 0,05$, Grup 3’de ortalama $0,75 \pm 0,10$, Grup 4’de ortalama $0,76 \pm 0,11$ ve Grup 5’de ortalama $0,77 \pm 0,09$ idi (**Tablo 6**).

Tablo 6: Gastroknemius kası deneysel bacak/kontrol bacak kas ağırlık oranları

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	1,04	0,66	0,76	0,93	0,78
2	0,98	0,70	0,90	0,68	0,84
3	0,83	0,79	0,77	0,90	0,64
4	0,96	0,68	0,80	0,80	0,65
5		0,70	0,55	0,70	0,80
6		0,65	0,74	0,70	0,89
7		0,71	0,76	0,63	0,83
8		0,81			
Ort$\pm$SD	$0,95 \pm 0,08$	$0,71 \pm 0,05$	$0,75 \pm 0,10$	$0,76 \pm 0,11$	$0,77 \pm 0,09$

Deneysel bacak/kontrol bacak kas ağırlık oranı açısından Grup 1’in diğer deney gruplarından belirgin derecede farklı olduğu ($p < 0,01$), buna karşın diğer deney grupları arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı saptandı ($p > 0,05$) (**Şekil 35**).

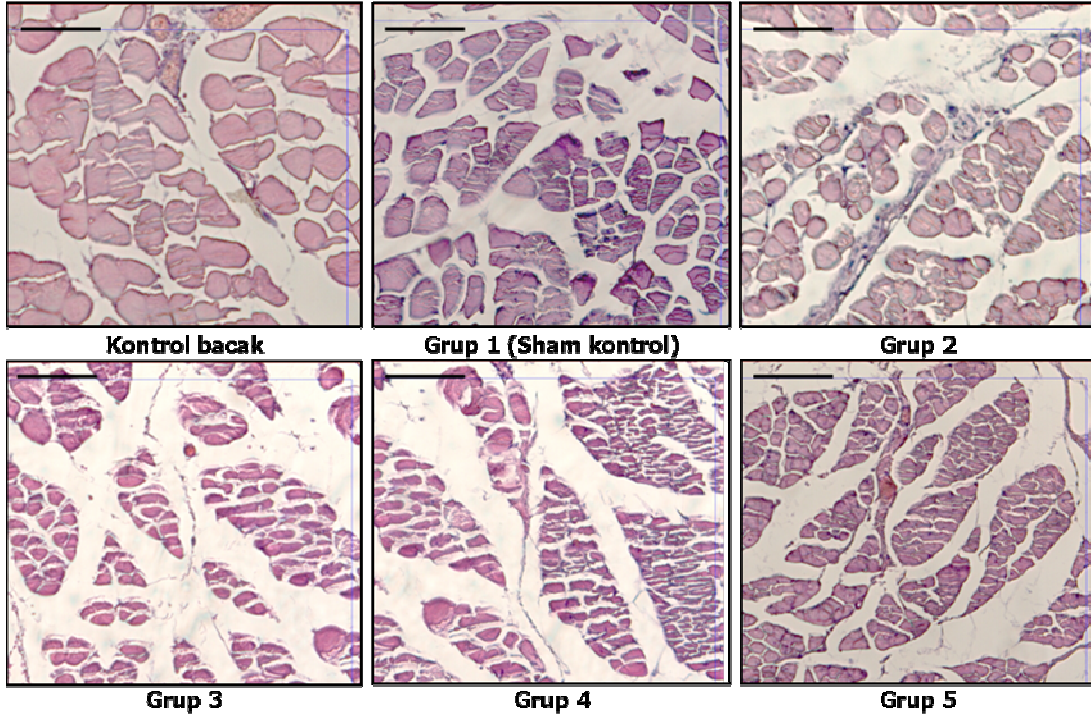


Şekil 35: Deneysel bacak ağırlığı/kontrol bacak kas ağırlığı oranları (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$).
- Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$).

C.3 - Mikroskopi

Gastroknemius kaslarının mikroskopik incelenmesinde kontrol sol bacak grubu ile Grup 1 arasında fark saptanmadı ve koaptasyon uygulanan gruplardan alınan kas örneklerinin bu kontrol gruplarına oranla daha küçük çaplı ve atrofik lifler içerdiği gözlemlendi. Koaptasyon uygulanan grupların arasında ise belirgin bir fark saptanmadı. (Şekil 36).



Şekil 36: Gastrocnemius kaslarının mikroskopik görünümü. (Hematoksilen-eozin, gösterge çizelgesi= 100 μ m).

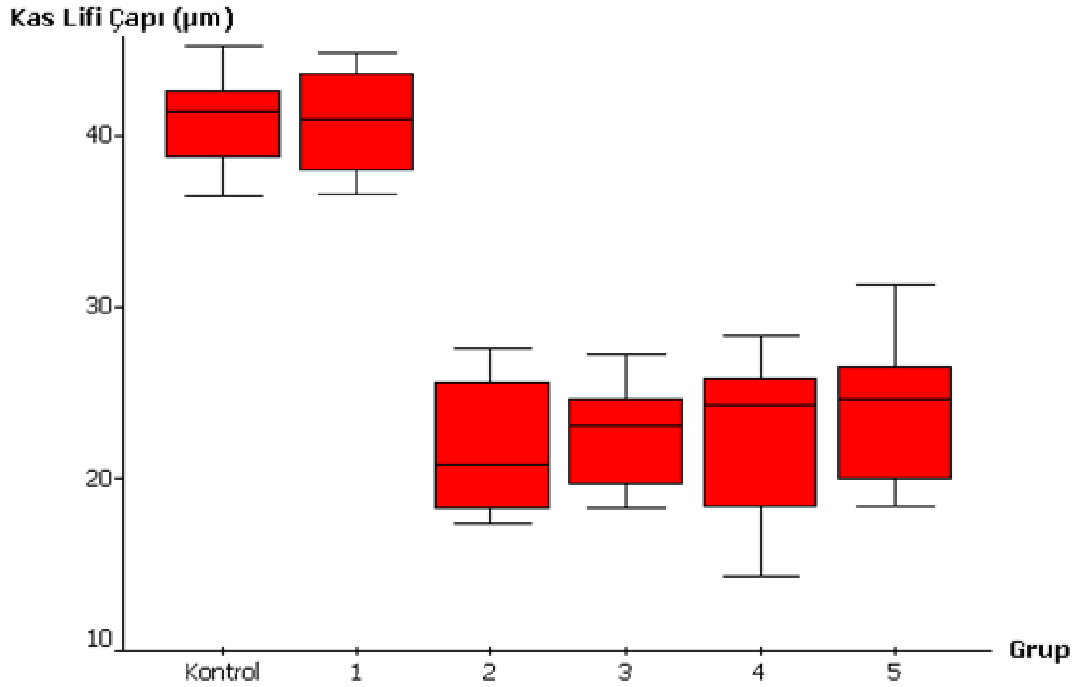
C.4 - Kantitatif Histomorfometri

Gastrocnemius kası ortalama lif çapları kontrol bacakta $41,01 \pm 2,79 \mu$ m, Grup 1’de $40,80 \pm 3,58 \mu$ m, Grup 2’de $21,83 \pm 4,03 \mu$ m, Grup 3’de $22,49 \pm 3,36 \mu$ m, Grup 4’de $22,17 \pm 5,25 \mu$ m ve Grup 5’de $23,86 \pm 4,63 \mu$ m idi (**Tablo 7**).

Ortalama lif çapı açısından kontrol bacak ile sham kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Buna karşın, bu gruplar ile sinir onarımı uygulanan gruplar arasındaki fark belirgindi ($p<0,01$). Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (**Şekil 37**).

Tablo 7: Gastroknemius kası ortalama lif çapları (µm)

Denek	Kontrol	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	40,43	42,54	22,36	23,12	24,36	26,35
2	36,48	39,41	18,36	19,35	19,44	18,38
3	41,32	44,74	26,47	24,25	27,25	31,25
4	42,46	36,54	18,25	18,24	17,23	19,44
5	38,71		17,44	25,14	14,36	24,55
6	45,23		24,85	20,05	24,26	26,54
7	42,58		19,36	27,33	28,31	20,56
8	37,51		27,56			
9	44,05					
10	41,36					
Ort±SD	41,01±2,79	40,80±3,58	21,83±4,03	22,49±3,36	22,17±5,25	23,86±4,63

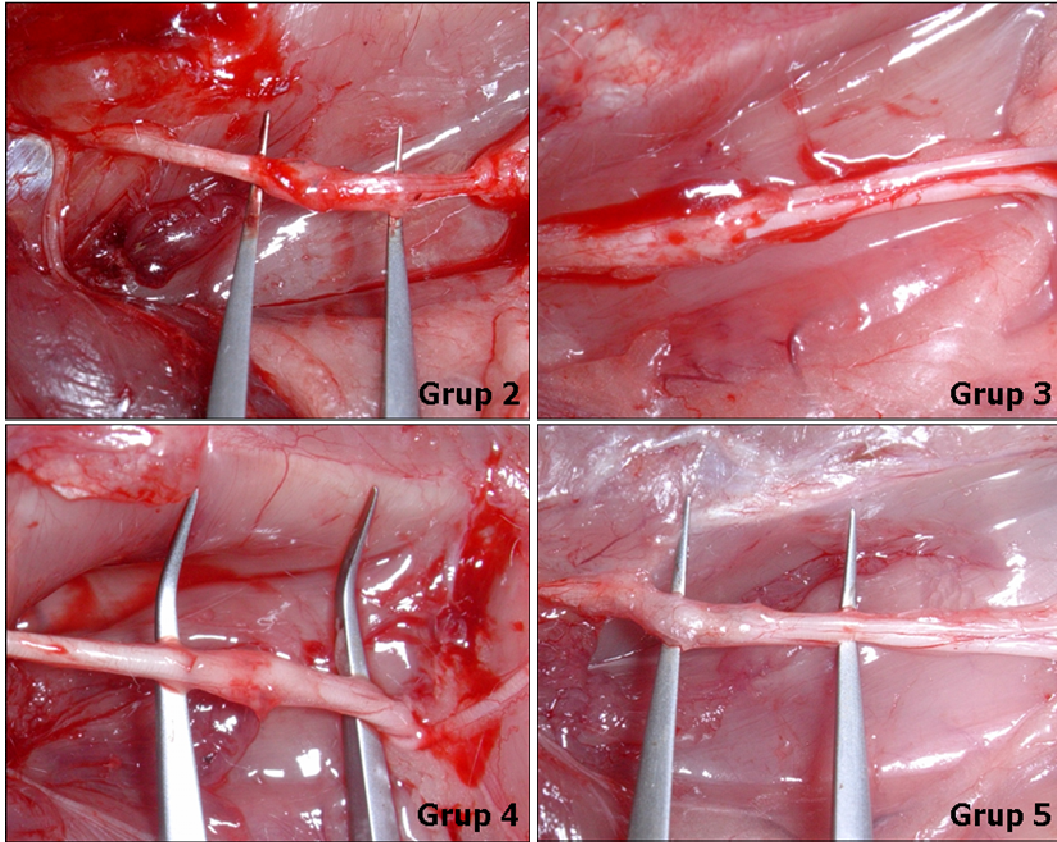
**Şekil 37:** Ortalama kas lifi çapları açısından grupların karşılaştırılması (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile kontrol bacak arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Grup 1 ile cerrahi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,01$).
- Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

D. SİNİRLERİN HİSTOMORFOMETRİK DEĞERLENDİRİLMESİ

D.1 - Makroskopi

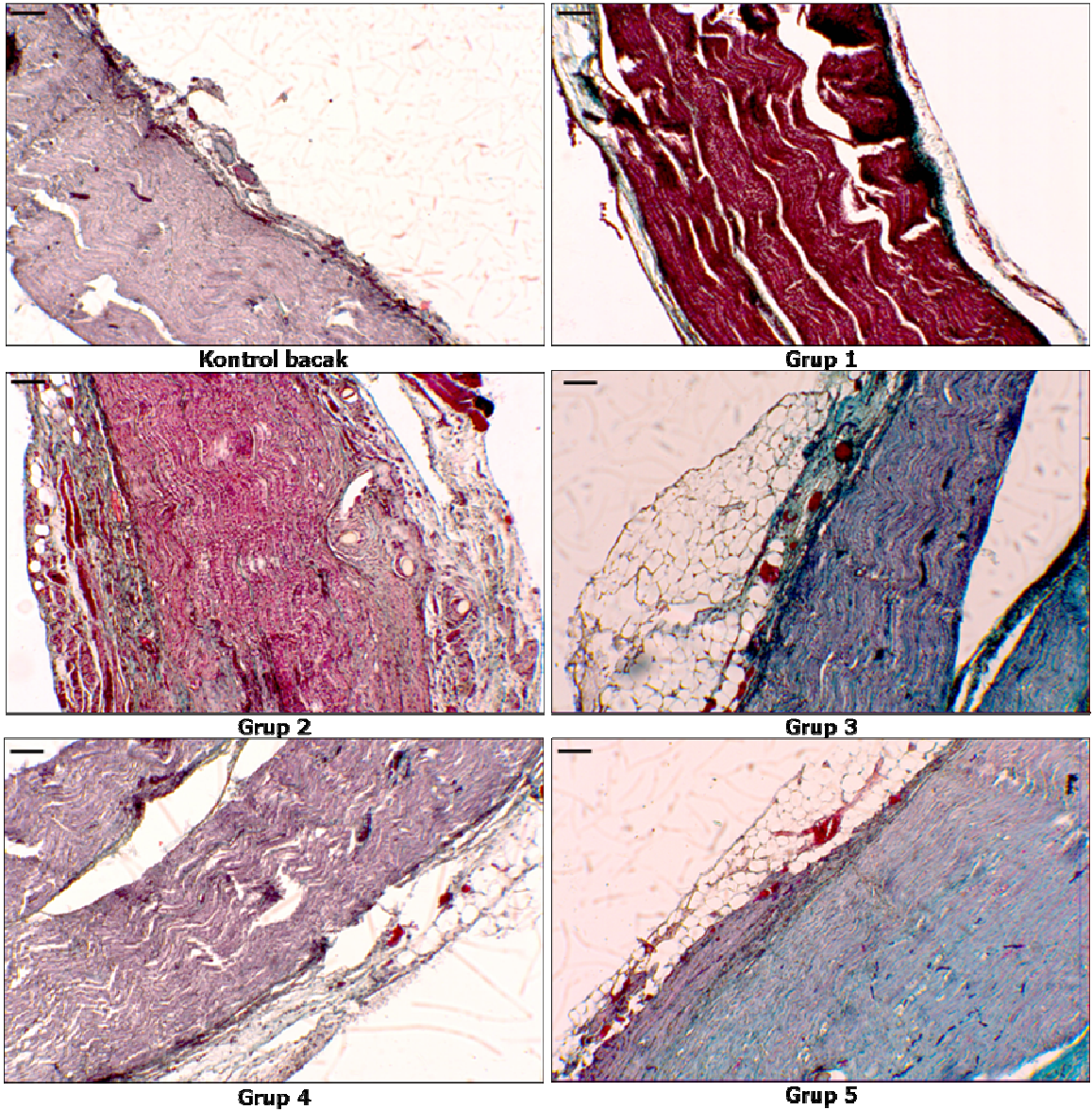
Sham kontrol grubunda siyatik sinir trasesi boyunca herhangi bir değişiklik yoktu. Cerrahi uygulanan gruplarda ise koaptasyon seviyelerinde dikişler görülebiliyordu ve bir dolgunluk mevcuttu. Tüm gruplarda sinir diseksiyonu künt diseksiyon ile kolaylıkla yapılabilirdi ve keskin diseksiyona gereksinim olmadı. Hiç bir anastomoz hattında ayrılma veya nöroma oluşumu saptanmadı. Sinirlerin renk ve konturları normaldi. Koaptasyon uygulanan gruplarda anastomoz hattında sinirin çevre dokulara gösterdiği yapışıklık açısından gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmedi (**Şekil 38**).



Şekil 38: Cerrahi uygulanan siyatik sinirlerde koaptasyon hattının makroskopik görünümü.

D.2 - Epinöral skar dokusunun mikroskopik değeriendirilmesi

Hazırlanan sinir kesitlerinde, sham kontrol grubunun nonoperatif kontrol bacadan alınan örneklere benzer olduğu görüldü. Sinir onarımı yapılan tüm gruplarda sham kontrol grubuna oranla sinir çevresinde belirgin bir kalınlaşma olduğu dikkat çekti (Şekil 39).



Şekil 39: Kontrol bacak ve operatif gruplarda epinöral skar dokusunun değeriendirilmesi. Epinöral skar dokusunun, onarım yapılan gruplarda (Grup 2, 3, 4 ve 5) diğeri gruplara oranla belirgin olarak daha kalın olduğu gözlemlendi (Masson-Trikrom, gösterge çizelgesi=100 µm).

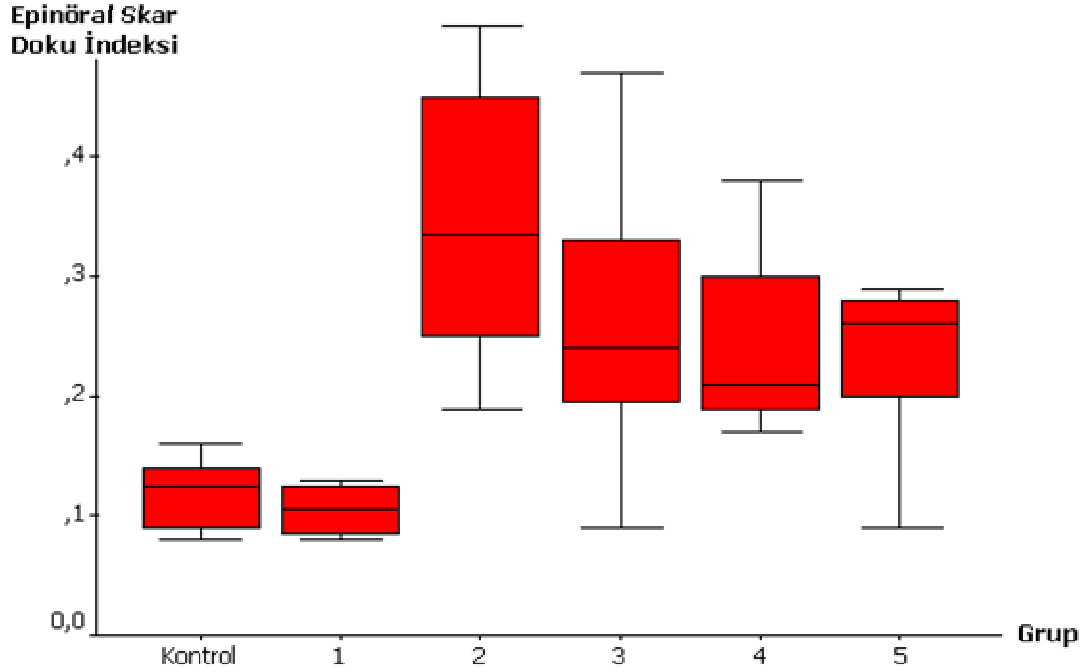
D.3 - Epinöral skar dokusunun kantitatif değerlendirilmesi

Epinöral skar doku indeksi kontrol sol bacakta ortalama $0,13 \pm 0,04$, Grup 1’de ortalama $0,10 \pm 0,02$, Grup 2’de ortalama $0,35 \pm 0,11$, Grup 3’de ortalama $0,26 \pm 0,12$, Grup 4’de ortalama $0,25 \pm 0,07$ ve Grup 5’de ortalama $0,23 \pm 0,07$ idi (**Tablo 8**).

Tablo 8: Kontrol bacak ve operatif gruplarda epinöral skar doku indeksi değerleri

Denek	Kontrol	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,13	0,09	0,32	0,21	0,29	0,28
2	0,11	0,08	0,51	0,32	0,31	0,28
3	0,16	0,12	0,26	0,09	0,19	0,21
4	0,08	0,13	0,47	0,34	0,21	0,29
5	0,12		0,19	0,24	0,38	0,09
6	0,13		0,43	0,47	0,17	0,26
7	0,14		0,24	0,18	0,19	0,19
8	0,09		0,35			
9	0,23					
10	0,08					
Ort±SD	0,13±0,04	0,10±0,02	0,35±0,11	0,26±0,12	0,25±0,07	0,23±0,07

Gruplar arası istatistiksel değerlendirilme sonucunda, Grup 1’in epinöral skar doku indeksi ortalamasının kontrol bacak ortalaması ile benzer olduğu saptandı ($p>0,05$). Buna karşın sinir onarımı uygulanan gruplardaki epinöral skar doku indeksi değerleri kontrol sol bacağına göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Sham kontrol grubu ve cerrahi uygulanan gruplar arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı idi (Grup 1 ve 2 için $p=0,007$, Grup 1 ve 3 için $p=0,029$, Grup 1 ve 4 için $p=0,008$ ve Grup 1 ve 5 için $p=0,029$). Sinir onarımı uygulanan grupların kendi aralarında karşılaştırılmalarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (**Şekil 40**).

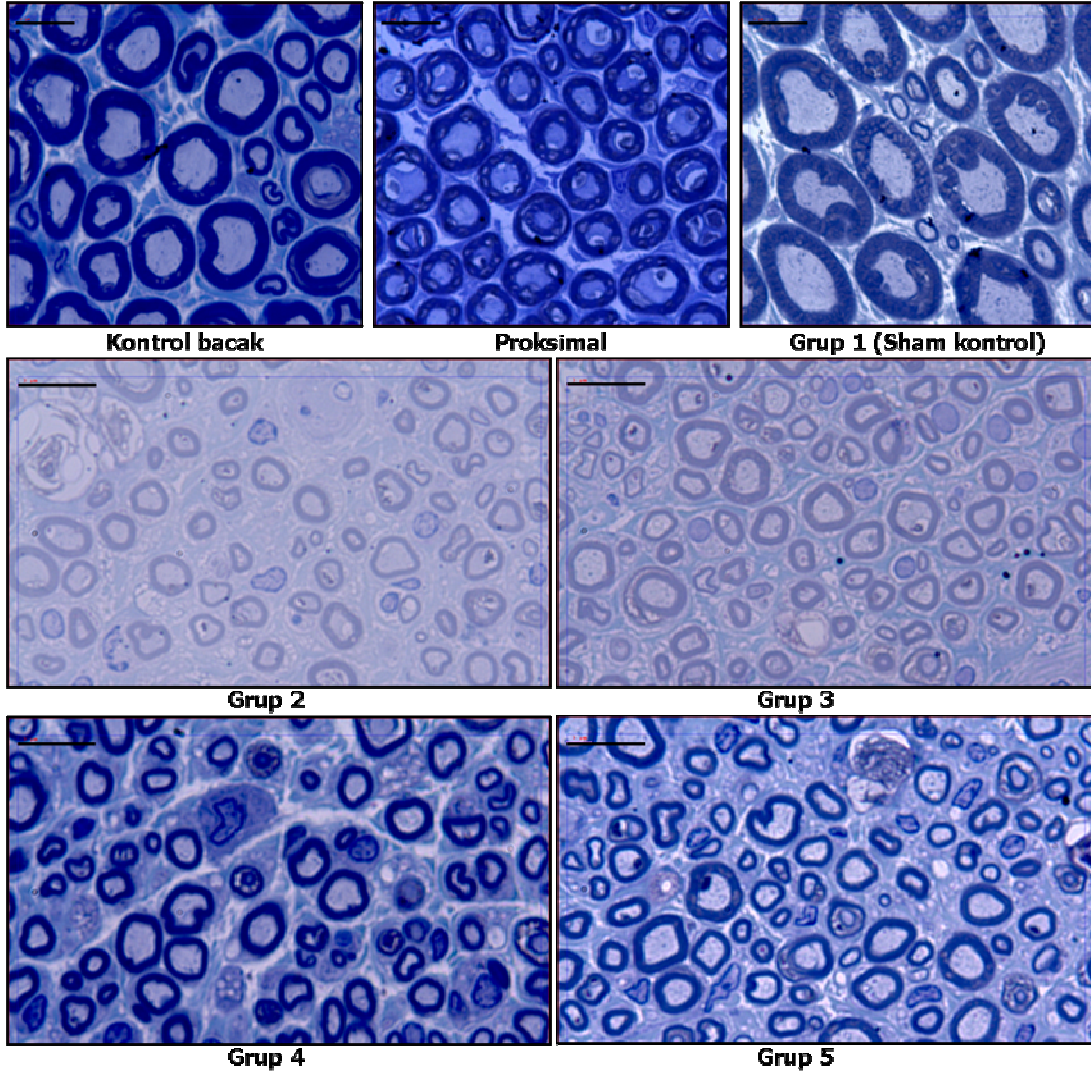


Şekil 40: Epinöral skar doku indeksi değerlerinin karşılaştırılması (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile kontrol bacak arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Grup 1 diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).
- Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

D.4 - Sinir rejenerasyonunun mikroskopik değerlendirilmesi

Kontrol bacak siyatik sinir ile kıyaslandığında, sinir onarımı yapılan grupların proksimal sinir uçlarında miyelinli akson sayılarının arttığı, Grup 1'in ise aksonal yapılar açısından kontrol bacak siniri ile benzer özellikler taşıdığı gözlemlendi. Anastomoz distalinden alınan örneklerde ise sinir onarımı uygulanan gruplarda bol miktarda rejenere küçük çaplı miyelinli akson izlendi. Bu aksonlarda yer yer miyelin dejenerasyonu da izlenmekte idi. (Şekil 41).



Şekil 41: Kontrol bacak ve deney gruplarında hazırlanan sinir kesitlerinden aksonal rejenerasyonun değerlendirilmesi (Toluidine Blue, gösterge çizelgesi=10 µm).

D.5 - Sinir rejenerasyonunun kantitatif değerlendirilmesi

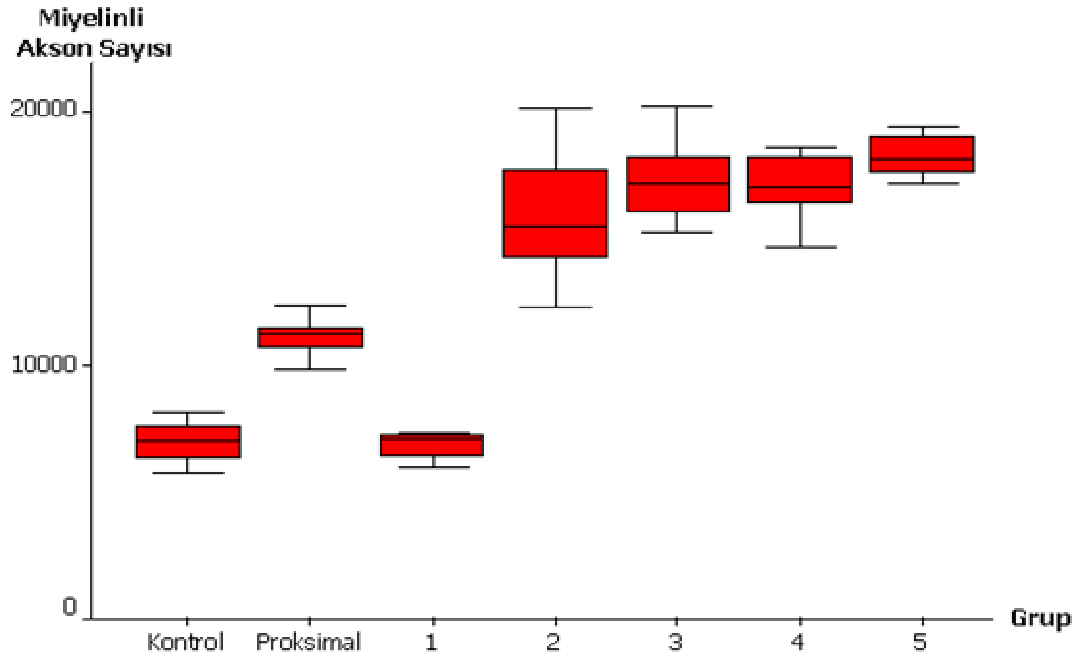
Kontrol bacak ile cerrahi uygulanan sinirlerin proksimal ve distallerinden hazırlanan sinir kesitlerinde, toplam miyelinli akson sayısı, miyelinli sinir liflerin ortalama çapları, ortalama akson çapları, g-oranı değerleri ve ortalama miyelin kalınlıkları hesaplandı.

Toplam miyelinli akson sayısı, kontrol sol bacak için ortalama 6996 ± 768 , anastomoz proksimali için ortalama 11228 ± 929 , Grup 1 için ortalama 6882 ± 578 , Grup 2 için ortalama 15915 ± 2743 , Grup 3 için ortalama 17328 ± 1744 , Grup 4 için 17684 ± 2592 ve Grup 5 için ortalama 18031 ± 1339 olarak hesaplandı (**Tablo 9**).

Tablo 9: Kontrol ve deneysel bacaklarda toplam miyelinli akson sayıları

Denek	Kontrol	Proksimal	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	6212	12365	7318	12289	15274	17006	18146
2	6367	11499	7208	19716	15812	18635	19402
3	5832	9865	6959	13479	17607	14681	15416
4	7945	10724	6044	15478	20226	22840	18635
5	7145	13012		15465	18842	16547	19369
6	8120	11236		15752	16356	16258	17158
7	7628	10245		15000	17180	17824	18095
8	6455	11245		20145			
9	7251	10842					
10	7008	11244					
Ort $\pm$ SD	6996 ± 768	11228 ± 929	6882 ± 578	15915 ± 2743	17328 ± 1744	17684 ± 2592	18031 ± 1339

Toplam miyelinli akson sayısı açısından sham kontrol grubu ile kontrol sol baktan elde edilen sonuçlar arasında fark saptanmadı ($p>0,05$). Anastomoz proksimalinden yapılan sinir sayımı ise Grup 1 ve kontrol sol bacak sonuçlarına göre anlamlı derecede yüksek idi ($p<0,01$). Sinir onarımı yapılan gruplardaki toplam miyelinli akson sayısı, kontrol bacak, anastomoz proksimali ve Grup 1'e oranla belirgin derecede yüksek idi ($p<0,01$). Sinir onarımı yapılan grupların birbirleri ile karşılaştırılmasında ise gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (**Şekil 42**).



Şekil 42: Miyelinli akson sayıları açısından grupların karşılaştırılması (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile kontrol bacak arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Grup 1 ile proksimal sayım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Grup 1 ile 2, 3, 4, 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,01$).
- Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p>0,05$).

Ortalama miyelinli sinir lifi çapı, kontrol sol bacakta $8,80 \pm 0,80 \mu\text{m}$, anastomoz proksimalinde $8,17 \pm 1,29 \mu\text{m}$, Grup 1'de $8,64 \pm 0,88 \mu\text{m}$, Grup 2'de $3,66 \pm 0,87 \mu\text{m}$, Grup 3'de $3,93 \pm 0,32 \mu\text{m}$, Grup 4'de $4,13 \pm 0,7 \mu\text{m}$ ve Grup 5'de $4,43 \pm 0,49 \mu\text{m}$ idi.

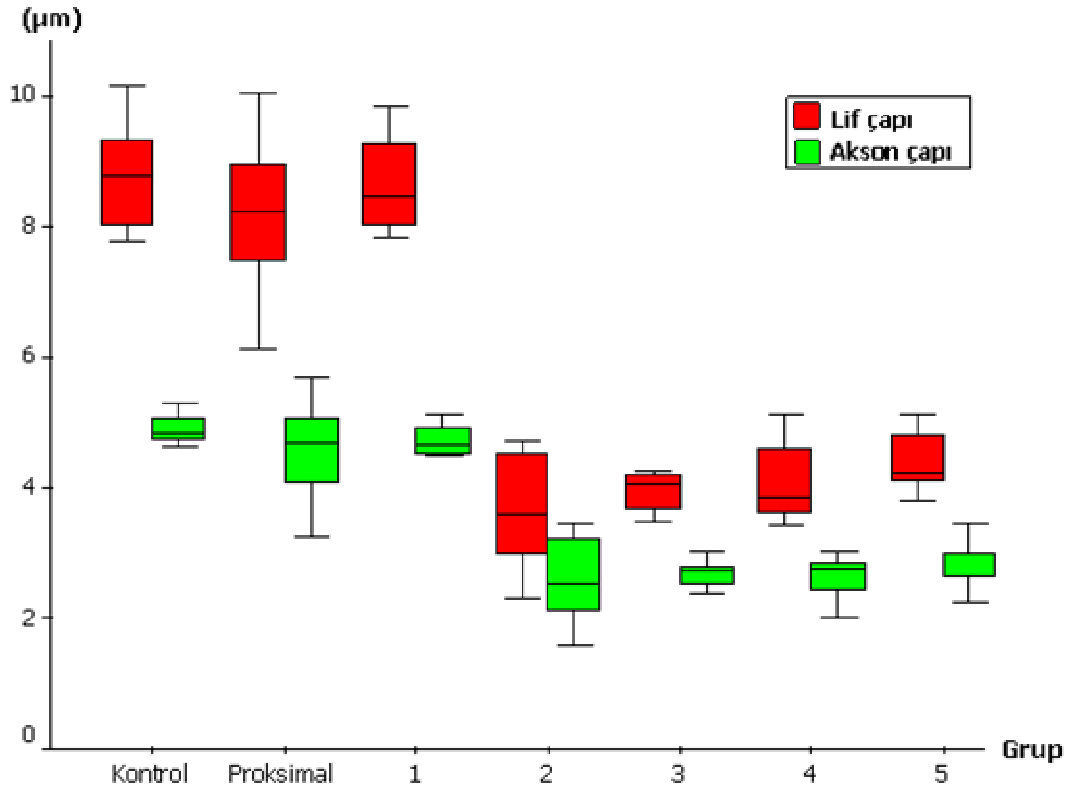
Ortalama akson çapı, kontrol sol bacakta $4,83 \pm 0,37 \mu\text{m}$, anastomoz proksimalinde $3,60 \pm 1,12 \mu\text{m}$, Grup 1'de $4,73 \pm 0,28 \mu\text{m}$, Grup 2'de $2,60 \pm 0,6 \mu\text{m}$, Grup 3'de $2,68 \pm 0,22 \mu\text{m}$, Grup 4'de $2,64 \pm 0,35 \mu\text{m}$ ve Grup 5'de $2,80 \pm 0,40 \mu\text{m}$ idi (**Tablo 10**).

Tablo 10: Kontrol ve deneysel bacaklarda sinir lifi ve akson çapı sonuçları

Ortalama miyelinli sinir lifi çapı (µm)							
Denek	Kontrol	Proksimal	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	9,34	7,57	7,82	4,73	4,05	3,71	4,25
2	8,84	8,95	8,23	4,49	4,26	3,43	3,82
3	10,18	10,03	8,68	4,57	3,47	5,13	5,14
4	8,47	9,75	9,86	3,64	3,58	3,56	4,56
5	8,72	6,14		3,58	3,77	4,21	4,13
6	7,78	8,83		2,86	4,14	5,06	5,03
7	8,86	8,53		3,13	4,24	3,85	4,14
8	9,87	7,49		2,31			
9	7,95	6,47					
10	8,04	7,95					
Ort±SD	8,80±0,80	8,17±1,29	8,64±0,88	3,66±0,87	3,93±0,32	4,13±0,7	4,43±0,49

Ortalama akson çapı (µm)							
Denek	Kontrol	Proksimal	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	5,08	3,70	4,59	3,45	3,03	2,59	2,76
2	4,83	4,72	4,48	3,05	2,85	2,33	2,25
3	5,29	5,21	4,73	3,38	2,39	3,02	3,44
4	4,65	5,70	5,13	2,25	2,64	2,02	2,64
5	4,75	3,28		2,79	2,41	2,82	2,64
6	3,92	4,86		2,14	2,73	2,93	3,26
7	4,82	5,07		2,15	2,75	2,77	2,64
8	5,13	4,66		1,61			
9	4,87	4,11					
10	5,02	4,57					
Ort±SD	4,83±0,37	3,60±1,12	4,73±0,28	2,60±0,6	2,68±0,22	2,64±0,35	2,80±0,40

Ortalama miyelinli sinir lifi ve akson çapı açısından kontrol bacak, Grup 1 ve proksimal sinir örnekleri arasında fark saptanmadı ($p>0,05$). Buna karşın bu gruplardaki ortalama lif ve akson çapları, sinir onarımı yapılan Grup 2, 3, 4 ve 5' e oranla anlamlı derecede yüksek idi ($p<0,01$). Sinir onarımı yapılan grupların kendi aralarında karşılaştırmaları sonucunda ortalama sinir lifi ve akson çapları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 43).



Şekil 43: Miyelinli sinir lifi çapları ve akson çaplarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U):

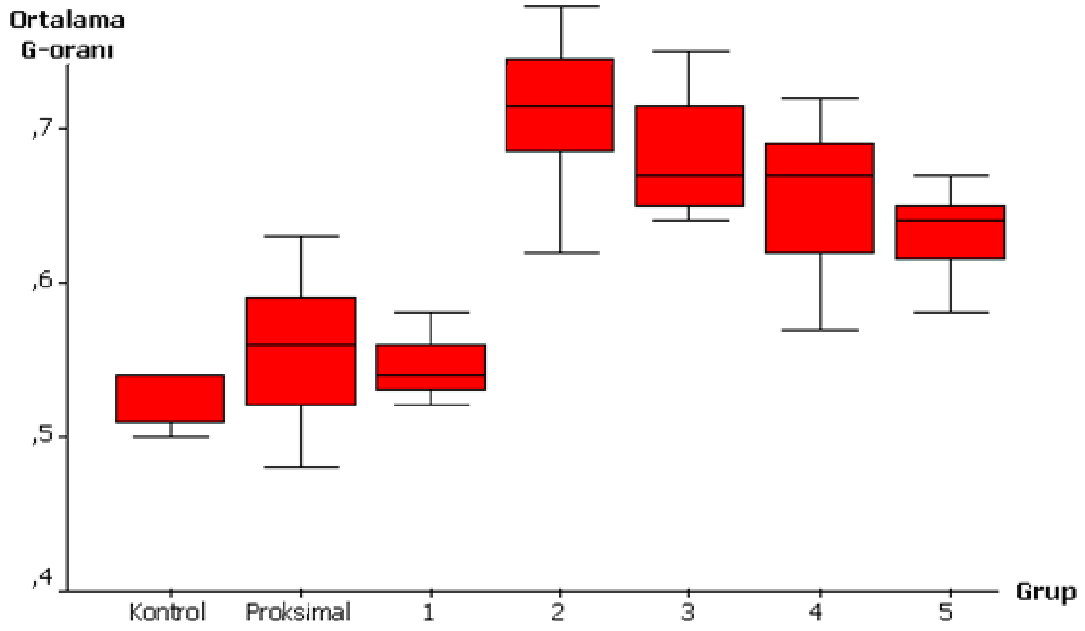
- Grup 1 ile kontrol bacak arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$).
- Grup 1 ile proksimal sayım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$).
- Grup 1 ile 2, 3, 4, 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$).
- Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Ortalama g-oranı değerleri, kontrol sol bacakta $0,55 \pm 0,03$, anastomoz proksimalinde $0,61 \pm 0,07$, Grup 1’de $0,54 \pm 0,02$, Grup 2’de $0,7 \pm 0,04$, Grup 3’de $0,68 \pm 0,04$, Grup 4’de $0,65 \pm 0,05$ ve Grup 5’de $0,63 \pm 0,03$ idi (**Tablo 11**).

Tablo 11: Kontrol ve deneysel bacaklarda g-oranı sonuçları

Denek	Kontrol	Proksimal	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,54	0,48	0,59	0,73	0,75	0,70	0,65
2	0,55	0,52	0,54	0,68	0,67	0,68	0,59
3	0,52	0,51	0,54	0,74	0,69	0,59	0,67
4	0,55	0,58	0,52	0,62	0,74	0,57	0,58
5	0,54	0,53		0,78	0,64	0,67	0,64
6	0,50	0,55		0,75	0,66	0,68	0,65
7	0,54	0,59		0,69	0,65	0,72	0,64
8	0,52	0,62		0,70			
9	0,61	0,63					
10	0,62	0,57					
Ort±SD	0,55±0,03	0,61±0,07	0,54±0,02	0,7±0,04	0,68±0,04	0,65±0,05	0,63±0,03

Ortalama g-oranı değerleri açısından gruplar arasında yapılan karşılaştırmada kontrol bacak, Grup 1 ve proksimal sinir örnekleri arasında fark saptanmadı ($p>0,05$). Grup 2, 3, 4 ve 5’ e ait g-oranı değerleri ise bu gruplara göre belirgin olarak daha yüksek idi ($p<0,01$). Sinir onarımı yapılan grupların kendi aralarında karşılaştırmaları sonucunda ise Grup 5 ile Grup 2 ve Grup 5 ile Grup 3 arasında saptanan farkların anlamlı olduğu (Grup 2 ve 5 için $p=0,08$ ve Grup 3 ve 5 için $p=0,02$), buna karşın diğer gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlam taşımadığı saptandı ($p>0,05$) (**Şekil 44**).



Şekil 44: Ortalama g-oranları açısından grupların karşılaştırılması (Mann-Whitney U):

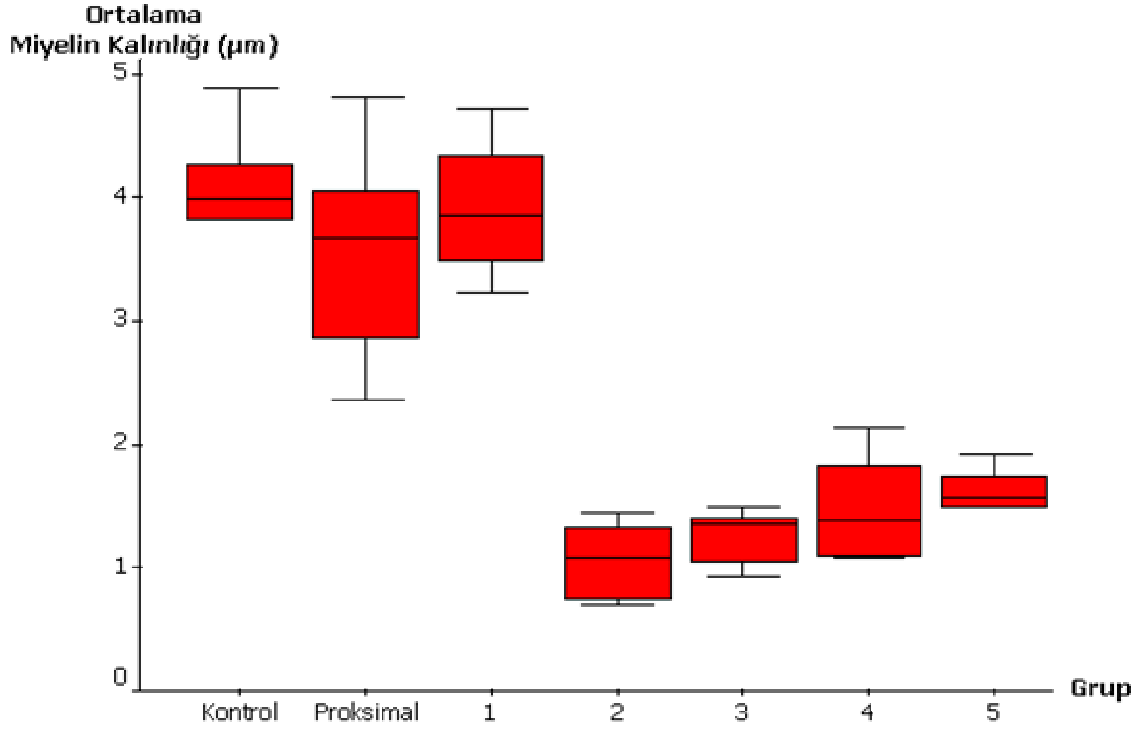
- Grup 1 ile kontrol bacak arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Grup 1 ile proksimal sayım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Grup 1 ile 2, 3, 4, 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,01$).
- Grup 2 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,08$).
- Grup 3 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,02$).
- Grup 2-3, 2-4, 3-4, 4-5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

Ortalama miyelin kalınlığı, kontrol sol bacakta $3,97 \pm 0,6 \mu\text{m}$, anastomoz proksimalinde $3,58 \pm 0,74 \mu\text{m}$, Grup 1’de $3,92 \pm 0,62 \mu\text{m}$, Grup 2’de $1,06 \pm 0,3 \mu\text{m}$, Grup 3’de $1,24 \pm 0,22 \mu\text{m}$, Grup 4’de $1,50 \pm 0,45 \mu\text{m}$ ve Grup 5’de $1,63 \pm 0,16 \mu\text{m}$ idi (**Tablo 12**).

Tablo 12: Kontrol ve deneysel bacaklarda miyelin kalınlığı sonuçları

Denek	Kontrol	Proksimal	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	4,26	3,87	3,23	1,28	1,02	1,12	1,49
2	4,01	4,23	3,75	1,44	1,41	1,10	1,57
3	4,89	4,82	3,95	1,19	1,08	2,11	1,70
4	3,82	4,05	4,73	1,39	0,94	1,54	1,92
5	3,97	2,86		0,79	1,36	1,39	1,49
6	3,86	3,97		0,72	1,41	2,13	1,77
7	4,04	3,46		0,98	1,49	1,08	1,50
8	4,74	2,83		0,70			
9	3,08	2,36					
10	3,02	3,38					
Ort±SD	3,97±0,6	3,58±0,74	3,92±0,62	1,06±0,3	1,24±0,22	1,50±0,45	1,63±0,16

Ortalama miyelin kalınlıkları açısından gruplar arasında yapılan karşılaştırmada yine kontrol bacak, Grup 1 ve proksimal sinir örnekleri arasında fark saptanmadı ($p>0,05$). Cerrahi uygulanan deney gruplarındaki miyelin kalınlığı değerleri ise, bu gruplara göre belirgin olarak daha düşük idi ($p<0,02$). Sinir onarımı yapılan grupların kendi aralarında karşılaştırmaları sonucunda ise Grup 5 ile Grup 2 ve Grup 5 ile Grup 3 arasında saptanan farkların anlamlı olduğu (Grup 2 ve 5 için $p=0,001$ ve Grup 3 ve 5 için $p=0,003$), buna karşın diğer gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlam taşımadığı saptandı ($p>0,05$) (**Şekil 45**).



Şekil 45: Ortalama miyelin kalınlıklarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile kontrol bacak arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Grup 1 ile proksimal sayım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Grup 1 ile 2, 3, 4, 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,01$).
- Grup 2 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,001$).
- Grup 3 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,003$).
- Grup 2-3, 2-4, 3-4, 4-5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda, yaralanma sonrasında meydana gelen anatomik, histolojik ve patolojik olayların anlaşılması, moleküler düzeyde gelişen değişikliklerin keşfi ve gelişen rekonstrüktif yöntemler, periferik sinir yaralanmalarının tedavisine önemli katkı sağlamıştır. Buna rağmen periferik sinir yaralanmalarının tedavisi klinikte önemli bir sorun olmaya devam etmekte, tedavi protokolü ve sonuçlar üzerinde tam bir uzlaşma sağlanamamaktadır. Travma, cerrahi, tümör, kompresyon, inflamatuvar durumlar ya da enfeksiyonlar gibi nedenlerle ortaya çıkabilen periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde ana amaç sinirin bağlantılı olduğu son organ (kas, duyu cisimcikleri vb.) fonksiyonlarının en az kayıpla yerine konulmasıdır. Bunun için sinir bütünlüğünün tekrar sağlanması ve iletimin geri döndürülmesi gerekmektedir.

Sinir bütünlüğünde segmental bir kayıp olması nedeniyle primer onarımın mümkün olmadığı durumlar dışında, periferik sinir yaralanmalarının tedavisindeki altın standart sinir uçlarının primer olarak koapte edilmesidir. Primer sinir koaptasyonu, skar ve fibrotik dokuların eksize edilmesini takiben sinir uçlarının tazelenerek gerginlik olmaksızın bir araya getirilmesini kapsayan ve sinir defektleri ile kıyaslandığında nispeten kolay olan bir cerrahi prosedürdür. Buna rağmen primer sinir onarımlarında dahi, tedavi için gerekli tüm şartların uygun olarak yerine getirilmesi öngörülen fonksiyonel iyileşmenin kazanılması için yeterli olamayabilmektedir. Yaralanmaya ikincil olarak gelişecek sinir hücresi ölümü, denervasyon süresince gelişecek son organ atrofisi ya da yavaş, yetersiz ve uygun olmayan doğrultuda büyüyen aksonlar periferik sinir cerrahisindeki başarısızlığın ana nedenleri olarak sayılabilirler. Diğer yandan onarım bölgesinde gelişecek epinöral skar dokusu da primer sinir onarımlarından sonra iyileşmeyi olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Sinir rejenerasyonunu geliştirmeyi amaçlayan çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu amaçla sinir anastomozlarında farklı dikiş materyalleri ve teknikleri denenmiş

(61,66,68,22,23,25), daha sonraları dikiş materyalleri ve sayısının iyileşmeyi olumsuz yönde etkilediği düşüncesi ile sinir uçlarının doku yapıştırıcıları ya da lazer ile anastomoz edilmesi fikri gündeme gelmiştir (86,132,89). Onarım alanına manyetik alan (27), radyasyon (45) veya hiperbarik oksijen uygulaması (46) gibi yöntemlerin skar oluşumu ve rejenerasyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bunların yanında onarım alanında sinir uçlarının kan damarı (71,130), fasya (65), epinöral tüp (5,6,8,32,133), dura (120), pseudosinovial (79) ve kollajen film (109) gibi biyolojik materyaller ya da polietilen ve poliglaktin gibi çok sayıda sentetik membranlar ile sarılması ile de sinir rejenerasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Rejenerasyonun ve iyileşmenin hızlandırılması için sarf edilen çaba sadece uygulanan teknik üzerindeki değişiklikler veya kullanılan ek materyaller ile sınırlı kalmamış, bu amaçla cerrahiye ek olarak çok sayıda ilaç, hormon ve faktörün de sistemik ya da lokal kullanımı denenmiştir. Tiroid hormonu (123), insan amnion sıvısı (99), hyalüronik asit (100,124), aprotinin (44), mitomisin C (53), kollajenaz (108) ve sinir büyüme faktörü gibi nörotrofik faktörler (38) bu amaçla kullanılan maddelerden yalnızca birkaçıdır. Hemen hiçbirisi yaygın olarak klinik kullanıma girmemesine rağmen gelişen teknik imkânların sinir rejenerasyonunun moleküler düzeydeki temellerini daha anlaşılır kılması, halen çok sayıda çalışmanın bu alana yönelmesine neden olmaktadır. Bu kapsamdaki çalışmaların ortak noktası, dışarıdan eklenen biyolojik maddeler ile travmaya uğramış aksonların etrafındaki mikroçevrenin ve bu sayede sinir rejenerasyonunun hücresel düzeyde değiştirilmesidir.

Sinir rejenerasyonu üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, rejenerasyon alanında miktarı artan ve sinir dokusunun yaşayabilirliği ya da rejenerasyon kapasitesi üzerinde etkileri olan çok sayıda peptidin gösterilmesi mümkün olmuştur (69). Genel olarak nörotrofik faktörler ismi ile anılan bu tür peptidlerin, dışarıdan tedavi amacıyla uygulanan rekombinan

formlarının da sinir hücresinin yaşayabilirliğini artırdığı ve aksonal büyümeyi hızlandığı bilinmektedir (43,59,60,62,106).

Rekombinan yolla elde edilmiş olan büyüme faktörlerinin sinir rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkilerinden yola çıkan bazı araştırmacılar, bu faktörlerin birçoğunu doğal olarak içerdiği bilinen insan amnion sıvısı ile de benzer sonuçlara ulaşmışlardır. Özgenel ve ark. sinir onarım alanına uygulanan insan amnion sıvısının sinir rejenerasyonunu artırdığını saptamışlar ve bu etkiyi insan amnion sıvısının içerdiği çok sayıdaki büyüme faktörüne bağlamışlardır (100). Bizim çalışmamızda da, içerisinde çok sayıda büyüme faktörü bulunduğu bilinen trombositten zengin plazmanın (PRP), primer sinir anastomoz alanına lokal olarak uygulanması durumunda, rejenerasyon ve fonksiyonel iyileşme üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Trombositten zengin plazma, trombositlerin invitro ortamda yoğunlaştırılması ve uygulandıkları alanda alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıdaki büyüme faktörünü salgılamaları için aktive edilmeleri esasına dayanan bir biyolojik üründür. PRP içerisinde bulunan belli başlı büyüme faktörleri ve bunların sinir rejenerasyonu üzerindeki etkileri **Tablo 11**'de özetlenmiştir.

Tablo 13: PRP içerisinde bulunan bazı büyüme faktörleri ve rejenerasyon üzerine etkileri

Faktör	Sinir rejenerasyonu üzerine olan etki
PDGF	Schwann hücreleri üzerinde mitojenik etki gösterir
IGF-I	Aksonal büyümeyi indükler
TGF- β	Aksonal büyümeyi indükler
FGF-II	Aksonal büyümeyi indükler, Schwann hücreleri için mitojenik
VEGF	Aksonal büyümeyi indükler, Schwann hücreleri için mitojenik
EGF	Tartışmalı
Fibronektin	Aksonal büyümeyi indükler, Schwann hücre bazal laminasında bulunur

Rejenerasyon üzerine etkileri araştırılan maddelerin primer sinir onarımlarında ya da sinir defekti modellerinde kullanılması farklı sonuçlar verebilmektedir. Welch ve ark. periferik sinir defekti modelinde kullanılan PDGF ve IGF-I kombinasyonunun rejenerasyon üzerinde olumlu etkileri olduğunu, buna karşın primer onarım modelinde kullanılan aynı faktörlerin benzer etkiyi göstermediğini gözlemişlerdir (125). Yazarlar bu bulgularını, sinir uçlarının arada defekt olmadan sıkı bir şekilde bir araya gelmesi durumunda mekanik faktörlerin ön plana çıkmasına ve bu etkinin kullanılan faktörlere bağlı olarak gelişecek trofik etkiye göre daha baskın olmasına bağlamışlardır. Welch ve ark. primer sinir onarım modelinin trofik faktörlerin rejenerasyon üzerindeki etkilerini araştırmak için uygun bir model olmadığını belirtse de, bu modeli kullanan bir çok çalışmada trofik faktörlerin olumlu etkilerini göstermek mümkün olmuştur (57,100,110,123). Primer sinir anastomozu, periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde şartların uygun olması durumunda öncelikle tercih edilecek yöntemlerin başında gelmektedir. Bu nedenle de çalışmamızda primer sinir anastomoz modeli kullanılmıştır ve PRP'nin etkisi farklı dikiş sayıları ile yapılan primer onarımlar üzerinde araştırılmıştır.

Cerrahiye ek olarak onarım alanına lokal olarak uygulanan ekzojen faktörlerin tamamına yakını, onarım alanında uzun süre etki gösterebilmek için tekrarlayan uygulamalara, bazı taşıyıcılara (gelfoam veya fibrin yapıştırıcı), sentetik ya da organik tüplere veya devamlı salınım sağlayan ozmotik pompalara ihtiyaç duymaktadırlar (93,132). Bu amaçla uygulanan ek prosedürlerin her birinin farklı ek sorunlar yaratma riski bulunmaktadır. Örneğin kullanılacak sentetik pompa ya da tüplerin enfeksiyon, yabancı cisim reaksiyonu veya aşırı skar oluşumu gibi riskleri beraberinde getirdikleri bilinmektedir. Anastomoz alanını çevreleyen tüplerin çevre dokudan gelişen vaskülarizasyonu engellediği ve sinir dokusunun dolaşımı üzerinde olumsuz etkisi olduğu belirtilmiştir (96). Bununla birlikte yapılmış olan

birçok çalışmada rejenerasyon üzerindeki etkileri araştırılan glikoprotein yapısındaki çok sayıda faktörün, tek doz kullanımları ile de olumlu sonuçlar elde edilebilmiştir (100,101). Yapılan farklı iki çalışmada tek doz uygulanan FGF-I ve IGF-II'nin, 3. günde maksimum etki gösterdiği ve etkilerini yaklaşık 1 hafta devam ettirdikleri bulunmuştur (62, 95) Bu kapsamda kullanılan maddelerin sinir çevresindeki mikroçevrenin değişmesine neden olduğu ve bu sayede aksonal rejenerasyonu artırdığı belirtilmektedir (101). Bu çalışmada da sinir iyileşmesi üzerine etkileri araştırılan PRP, cerrahi sonrası tek doz olarak uygulanmıştır ve onarım alanına uygulanan bu PRP içerisindeki trombositler, trombin ile aktive olduklarında sinir çevresinde bir fibrin pıhtı oluşturmuşlardır. Oluşan bu pıhtı, trombositlerden salınan çok sayıdaki faktörün de uygulandıkları alanda kalmasına ve rejenerasyon alanında nispeten daha uzun süre etki göstermelerine neden olmuştur. Wong ve ark. gibi birçok araştırmacının da, büyüme faktörlerini uygulamada taşıyıcı olarak fibrin yapıştırıcı kullanmasındaki amaç, uygulanan alanda lokal ve uzun süreli etki sağlamaktır. Aspenberg ve arkadaşlarının tendon iyileşmesi üzerine yaptıkları çalışma da bunu destekler yöndedir. Yazarlar, rat aşil tendonunda PRP'nin iyileşme üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, PRP'nin uygulanmadan sonra 4 hafta süre ile etkisini devam ettirdiğini bildirmişlerdir (4).

Deneysel periferik sinir çalışmalarında iyileşmesinin değerlendirilmesi için çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bunlar içerisinde 1982 yılında Medinaceli tarafından tanımlanmış olan ve daha sonra Bain, Mackinnon ve Hunter tarafından değiştirilen yürüme analizi, eski olmasına rağmen popülerliğini hiç kaybetmeyen bir yöntemdir (9,88). Fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için sıkça kullanılan yürüme analizi, doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir bir değerlendirme yöntemi olarak geniş kabul görmektedir. Buna rağmen ratların total paralizi olan ekstremitelerini ısırmaları sonucu gelişen otomutilasyon

değerlendirme aşamasında güçlük yaratmaktadır. Bizim çalışmamızda da fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi amacıyla yürüme analizleri yapılmış fakat SFİ'nin değerlendirilmesi mümkün olmayacak düzeyde otomutilasyon gelişen hayvanlar çalışma dışı bırakılmıştır. Yapılan SFİ ölçümlerinde sham kontrol grubuna ait değerlerin, diğer deney gruplarından belirgin derecede yüksek olduğu ($p<0,01$), buna karşın sinir koaptasyonu uygulanan grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında ise yalnızca Grup 2 ve 5 arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,02$).

Elektromiyografi ise periferik sinir rejenerasyonun değerlendirilmesinde çok daha önemli yeri olan bir inceleme yöntemidir. Kas liflerinden geçen aksiyon potansiyelinin oluşturduğu elektrik sinyallerinin bir amplikatör aracılığı ile büyütülerek incelenmesi esasına dayanan bu yöntem, klinikte birçok sinir ve kas hastalığının teşhis edilmesinde kullanılmaktadır. İnceleme sonucunda elde edilen temel değerler oluşturulan bileşik kas aksiyon potansiyelinin latans, amplitüd ve alan değerleridir. Bunlardan amplitüd, aktif kas liflerinin elektroda ulaşabilen depolarizasyon değeridir ve uyarılan olan en geniş motor ünite ile ilgili bilgi verir (19). Bu nedenle amplitüd değeri doğrudan aktif nöron sayısı ile ilişkilidir. Latans değeri ise uyarım ile kasılma potansiyelinin başlaması arasında geçen zamandır ve miyelinizasyon için önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir (10). Bileşik kas aksiyon potansiyelinin süresi ve amplitüdün çarpımı da, alan ölçümü olarak değerlendirilen bir diğer parametredir ve alan ölçümü geniş bir bölgede yayılmış olan liflerin aktivitesi hakkında bilgi verdiğinden değerlidir. Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlar içerisinde cerrahi deney grupları arasında amplitüd ve alan ölçümleri açısından fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Buna karşın, 6 adet epinöral dikiş ile onarım yapılan ve PRP uygulanan Grup 5'e ait latans değerlerinin, aynı dikiş sayısı kullanılan ve PRP uygulanmayan Grup 3'e oranla belirgin derecede kısa olduğu saptanmıştır ($p=0,01$). Yine elde edilen latans değerleri arasında en uzun

latans değerine sahip olan grubun, yalnızca 2 adet epinöral dikiş ile onarım yapılan Grup 2 olduğu dikkat çekmiştir. Ancak 2 adet dikiş ile onarım yapılan gruplar arasında, PRP'nin olumlu etkisi gözlenmekle birlikte, latans açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Grup 2: $2,23 \pm 1,09$, Grup 4: $1,33 \pm 0,31$, $p>0,05$). Bu bulgular, PRP kullanımının özellikle onarımın 6 adet epinöral dikiş ile yapıldığı durumlarda latans süresini kısalttığı, dolayısıyla miyelinizasyonu artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Sinirlerin histomorfometrik incelenmesi ile ölçülen miyelin kalınlığı değerleri de elektromiyografik inceleme sonucu elde edilen bu verileri desteklemektedir. Ölçülen miyelin kalınlıklarının karşılaştırılması sonucunda, Grup 3 ve 5 arasında saptanan anlamlı farkın ($p=0,003$), Grup 2 ve Grup 4 arasında olmadığı ($p>0,05$) bulunmuştur.

Denervasyon ve bunu takip eden reinnervasyon sürecinden sonra hedef kas dokusunda meydana gelen yapısal değişikliklerin incelenmesi, periferik sinir rejenerasyonun değerlendirilmesinde sıkça kullanılan bir diğer yöntemdir. Çalışmamızda da siyatik sinir ile innerve olan gastroknemius kasında gözlenen yapısal değişiklikler incelenmiş ve gruplar arasında makroskobik, mikroskobik ve histomorfometrik değerlendirilme parametreleri açısından fark aranmıştır. Kas dokusunda meydana gelen yapısal değişiklikleri yansıtan tüm bu parametreler açısından cerrahi uygulanan deney gruplarının sham kontrol grubundan anlamlı derecede farklı olduğu saptanmıştır. Buna karşın sinir onarımı yapılan tüm grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında, makroskobik olarak Grup 2'den alınan kas örneklerinin daha atrofik görünümde olduğu; mikroskobik inceleme, kas ağılıkları ve histomorfometrik değerlendirmeler açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

Sinir onarım alanında oluşacak skar dokusunu azaltmaya yönelik yapılacak girişimlerin sinir rejenerasyonunu geliştireceğine inanan birçok araştırmacı, epinöral skar

dokusunun aksonal büyüme engel olması yanında sinirin çevre dokulara yapışmasına ve hareketliliğini kaybetmesine neden olduğunu, bunun da traksiyon yaralanması ve iskemiye zemin hazırladığını belirtmektedirler (44). Buna karşın Rydevik ve ark. yaptıkları çalışmada, kollajenaz enzimi kullanarak epinöral skar oluşumunun azaltılmasının, uzun dönemde sinir rejenerasyonu üzerine bir etkisi olmadığını saptamışlardır (108). Yazarlar, sinir çevresinde oluşan skarın yalnızca iyileşmenin erken dönemlerini etkilediğini ve rejenerasyonun önemli bir kısmının skar dokusu oluşmadan tamamlandığını belirtmişlerdir. Trombositten zengin plazmanın yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştıran çalışmalarda ise, PRP'nin özellikle içerdiği TGF- β ve PDGF nedeniyle hücre dışı matriks birikimine neden olduğu ve bağ doku hücre proliferasyonunu artırdığı belirtilmiştir. Bunun aksine, Anitua ve ark. titanyum implantlar üzerine uyguladıkları PRP'nin inflamasyonu azalttığını gözlemlemişlerdir (2). Bu nedenlerden ötürü çalışmamızda sinir çevresinde oluşan epinöral skar dokusunun ve bunun aksonal rejenerasyona etkisinin değerlendirilmesi de amaçlandı. Daha önce yapılmış olan çalışmalar sinir onarımı sonrasında epinöral skar dokusunun oluşması için 6 haftalık bir sürenin yeterli olduğuna, fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için ise 3 aylık bir iyileşme dönemine gereksinim olduğuna dikkat çekmektedir (27). Bu nedenle bizim çalışmamızda da değerlendirme için fonksiyonel iyileşmenin tamamlandığı 3. ayın sonu beklenmiştir. Değerlendirme aşamasında, tüm gruplarda cilt insizyonlarının sorunsuz olarak iyileştiği ve ciltte ya da kasta ayrılma olmadığı gözlenmiştir. Yine tüm gruplarda sinirlerin diseksiyonu için keskin diseksiyona gereksinim olmamış ve künt diseksiyon ile sinir izolasyonu yapılabilmiştir. Çalışmamızda epinöral skar dokusunun histolojik değerlendirilmesi sonucu, sinir onarımı yapılan tüm grupların sham kontrol grubundan belirgin olarak fazla skar oluşumu gösterdiği saptanmıştır ($p<0,01$). Ayrıca, elde edilen

histolojik bulgular dikiş sayısından bağımsız olarak, PRP kullanımının epinöral skar doku oluşumu üzerinde olumlu ya da olumsuz herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Primer sinir anastomozu sırasında kullanılan epinöral dikiş sayısı, sinirin çapına ve uçlar arasındaki gerime bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak kabul edilen görüş sinir uçları arasında gerginlik oluşturmayacak şekilde mümkün olan en az sayıda dikiş kullanarak anastomoz yapmaktır. Giddins ve ark. kadavra median siniri üzerinde yaptıkları ve kullanılan farklı kalınlıktaki dikiş materyallerinin tensil güç üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, median sinir onarımı için 9-12 adet dikiş kullanmışlardır (42). Ploncard ise, ratlar üzerinde yaptığı ve farklı epinöral dikiş tekniklerini karşılaştırdığı çalışması sonrasında, 8 adet epinöral dikiş kullanılarak yapılan sinir onarımlarının 4 adet epinöral dikiş kullanımına oranla elektrofizyolojik ve histolojik olarak daha iyi sonuçlar verdiğini saptamıştır (104). Harris ve ark. uçlar arasındaki gerilimi ortadan kaldıracak şekilde mümkün olan en az sayıda dikiş kullanmanın, oluşacak olan epinöral skar dokusunu azaltmak açısından önemli olduğunu ve onarım alanında oluşacak olan fizyolojik fibrin pıhtının sinir uçlarının uygun doğrultuda kalmasına büyük ölçüde katkı sağlayacağını vurgulamışlardır (49). Esas amacı sinir onarımlarında kullanılacak en uygun dikiş sayısının saptanması olmamasına rağmen, yaptığımız çalışmanın sonuçlarından 2 ve 6 adet dikiş kullanılarak yapılan epinöral onarımlarını karşılaştırmak da mümkün olmuştur. PRP uygulanmayan ve 2 adet epinöral dikiş ile onarım yapılan Grup 2 ile PRP uygulanmayan ve 6 adet epinöral dikiş ile onarım yapılan Grup 3'ün karşılaştırıldığı tüm değerlendirme parametreleri, bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını göstermektedir ($p>0,05$).

Sinirlerin histomorfometrik değerlendirmesi aşamasında anastomoz distalinden yapılan sinir sayımları, ortalama sinir lifi çapları ve ortalama akson çapları açısından cerrahi uygulanan deney grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Akson çapının sinir lifi çapına oranlanması ile elde edilen ve rejenere olan sinir liflerinin matürasyonunu gösteren önemli bir parametre de g-oranı'dır. Çalışmamızda cerrahi uygulanan gruplardan elde edilen g-oranı değerleri sham kontrol grubuna ve kontrol sol bacağı oranla belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Sinir onarımı yapılan cerrahi deney grupları arasında ise, Grup 5'in Grup 2 ve 3'den anlamlı derecede farklı olduğu (Grup 2 ile 5 için $p=0,008$ ve Grup 3 ile 5 için $p=0,02$), diğer gruplar arasındaki farkların ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

Birçok büyüme faktörünün sinir rejenerasyonu üzerine olan etkisi doz bağımlıdır ve ideal konsantrasyonlarda rejenerasyonu artırıcı etki gösteren birçok büyüme faktörü, yüksek dozda uygulanmaları durumunda sinir rejenerasyonunu inhibe edebilmektedirler (16). Bu nedenle uygulanan PRP içerisindeki büyüme faktörlerinin düzeyleri önem taşımaktadır ve düzeyler için en önemli belirleyicilerden birisi hazırlanma yöntemidir.

Trombositten zengin plazma hazırlanmasında kullanılabilecek çok sayıda yöntem tanımlanmış olmasına rağmen, klinik kullanımda sıklıkla bu amaç için tasarlanmış olan otomatik cihazlar ve hazır kitler kullanılmaktadır (Harvest Smart PReP system, Friadent-Schütze PRP kit vb.). Bu tür sistemlerin en önemli üstünlüğü, işlemlerin kısa sürede tamamlanabilmesi ve steril şartların daha kolay sağlanabilmesidir. Bizim çalışmamızda ise daha önce Aspenberg ve arkadaşlarının da ratlardan PRP hazırlamak için kullandığı tüp yöntemi kullanılmıştır (4). Bu yönteminin diğer hücre ayırıcı sistemler gibi rutin kan bankası yöntemlerinden ya da otomatik sistemlerden farklı olduğu yönler bulunmakla birlikte, yeterli düzeyde büyüme faktörü sağlayabildiği bilinmektedir. Zimmerman ve ark. klinikte farklı yöntemler ile hazırladıkları PRP örneklerini karşılaştırmışlar ve tüp yöntemi ile elde edilen trombosit sayısının diğer yöntemlere oranla daha düşük olduğunu, fakat büyüme faktörü düzeylerinin bundan etkilenmediğini belirtmişlerdir (136). Yazarlar bu bulguyu, tüp yöntemi

ile elde edilen PRP'nin içerisinde kalan yüksek sayıdaki beyaz kürelere ve bunların içerdiği büyüme faktörlerine bağlamışlardır. Bizim çalışmamızda ratlarda otolog PRP hazırlanmasının güçlüğü nedeniyle allojenik PRP hazırlanması tercih edilmiştir. Bu nedenle de hazırlanan PRP örneklerinin beyaz küre inaktivasyonu için ışınlaması gerekmiştir. Bu ışınlama işlemi beyaz küreler ile birlikte bunlardan kaynaklanacak büyüme faktörlerinin bir kısmının da kaybedilmesine neden olmuş ve diğer yöntemlere göre daha az oranda büyüme faktörü elde edilebilmiştir. Bu durum otolog olarak uygun şartlarda hazırlanacak olan PRP ile burada elde edilene oranla daha etkin bir iyileşme elde edilebileceğini düşündürmektedir.

Trombositten zengin plazma içerisindeki trombosit sayısının, sonuçta elde edilecek büyüme faktörlerinin konsantrasyonları ile doğrudan ilişkili olduğu ve faktör düzeylerinin donörün yaşı ve cinsiyetinden de etkilendiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda hücre ayırıcı sistem ile trombosit sayısının 8 kat artırılması sonrasında, PRP içerisindeki büyüme faktörlerinden PDGF'nin 5,15 kat, TGF- β 'nin 3,4 kat, VEGF'in 6,16 kat, EGF'nin 3,64 kat ve IGF-I'in 1,07 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir (37).

Deneyisel modellerde ratlardan kan alınması sırasında meydana gelen travmanın bile, trombosit aktivasyonuna neden olarak büyüme faktörlerinin invitro ortamda kaybedilmesine yol açabileceği belirtilmektedir (4). Tüm bu açılardan bakıldığında, farklı donörlerden hazırlanan PRP örneklerinin farklı oranlarda büyüme faktörleri içerebilmesi, yapılacak karşılaştırmalı çalışmaların standardizasyonunu güçleştirmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, kullanılan PRP içerisindeki büyüme faktörü konsantrasyonları ölçülmemiş olmasına rağmen, tüm deney gruplarında hazırlanmış olan tek bir ürün kullanılmıştır. Seri santrüfuj işlemleri sonrasında elde edilen trombosit konsantresi plazma ile seyreltilerek, litrede yaklaşık $1,5 \times 10^{12}$ trombosit içeren PRP elde edilmiş ve her denekte cerrahi sahaya eşit miktarlarda PRP

uygulanmıştır (0,1 ml PRP ve 2,5 ünite trombin). Bu uygulama deney grupları arasında oluşabilecek standardizasyon sorununun kısmen de olsa önüne geçmiştir.

Klinikte kullanımı gittikçe yaygınlaşan PRP ile ilgili dikkat edilmesi bazı önemli noktalar bulunmaktadır. Örneğin, düşük trombosit sayısına sahip olan hastalarda kullanılması durumunda etkinliğinin düşük olabileceği ya da daha yüksek miktarda kullanılması gerektiği göz ardı edilmemelidir. Yine teorik olarak aspirin gibi trombosit fonksiyonlarını önleyici ilaçların PRP'nin etkinliğinin azalmasına neden olacağı düşünülebilir. Özellikle trombotik risk faktörleri olan hastalar için önemli bir diğer hususta, trombositlerden salınan büyüme faktörleri dışındaki çok sayıda protrombotik mikropartiküllerdir (doku faktörü vb.). Geniş damarlar çevresindeki uygulamalar, bu partiküllerin kan dolaşımına karışma ihtimalinden dolayı dikkatli olmayı gerektirir. Son olarak, kullanılan trombin solüsyonuna ilişkin risklerin olduğunu da bilmek gerekir. PRP'nin aktivasyonu için gerekli olan trombin solüsyonu genellikle sığır kaynaklı trombin preparatlardan elde edilmektedir ve bu trombine karşı gelişebilecek antikorlar ölümcül koagülopatilere neden olabilmektedir. Buna rağmen, trombin solüsyonunun otolog olarak hazırlanması da mümkündür. Bu amaçla geliştirilmiş sistemler (activAT cihazı, Dideco, a Sorin Group Company, Mirandola, İtalya) daha düşük konsantrasyonda olmakla birlikte donör kanından otolog trombin elde edilmesini sağlamaktadırlar ve bu sayede sığır kaynaklı trombin ile oluşabilecek sorunların önüne geçmektedirler (63). Otolog trombin ise, hazırlık aşamasında alkol kullanılmasını gerektirmesi dışında bir risk faktörü taşımamaktadır. Nitekim bu sistem ile hazırlanan trombin içerisinde bulunan % 1,18 oranındaki etanolün, spinal cerrahiler sırasında çevre sinir dokular üzerinde negatif bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (33).

Sonuç olarak, sinir rejenerasyonu üzerinde etkileri olduğu bilinen çok sayıda büyüme faktörü bulunmaktadır ve PRP bu büyüme faktörlerinin birçoğunu içermektedir. Farklı birçok

alandaki etkisi gösterilmiş olmasına rağmen, bu çalışma PRP'nin sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerini ortaya koyan ilk çalışmadır ve elde edilen bulgular, PRP'nin sinir rejenerasyonunu artırmak amacıyla kullanılabilecek bir ürün olduğu düşündürmektedir.

Elde edilen bulgulardan, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte 6 dikiş ile onarım yapılan grupların 2 dikişle onarım yapılan gruplara oranla daha iyi bir iyileşme gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca gerek 2 dikiş gerekse 6 dikiş ek olarak kullanılan PRP'nin sinir rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediği, fakat miyelin kalınlığı ve latans değerleri gibi değişkenler göz önüne alındığında bu etkinin yalnızca 6 dikiş ile birlikte kullanılan PRP grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda primer onarıma olanak sağlayan sinir yaralanmaları için önerilebilecek olan tedavi yaklaşımı, iyileşmenin hızlandırılması ve niteliğinin artırılması için 6 adet epinöral dikiş ile onarım yapılması ve cerrahi alana ek olarak topikal PRP uygulanmasıdır.

Rekombinan yolla hazırlanmış büyüme faktörlerine kıyasla ucuz olması ve özellikle hazır sistemler kullanıldığında kısa sürede, otolog olarak hazırlanabilmesi PRP'nin üstün yanlarıdır. Öte yandan PRP'nin rejenerasyon üzerindeki etkisi içeriğinde bulunan faktörlerin birbirleri ile olan etkileşimlerinin sonucuna bağlıdır ve bu etkinin sağlanması için gerekli en uygun trombosit sayısını ve büyüme faktörleri düzeylerini ortaya koyacak ileri çalışmalara gereksinim vardır. PRP'nin deneysel hayvan modellerinde sinir rejenerasyonu üzerine olan etkilerin klinik uygulamalara uyarlanabilmesi, bu amaçla yapılacak ek klinik çalışmaları da gerektirmektedir.

ÖZET

Periferik sinir yaralanmalarından sonra sinir hücresinde gözlenen değişiklikleri inceleyen ve rejenerasyonun geliştirilmesi için yeni yöntemler tanımlamayı amaçlayan çok sayıda deneysel çalışma olmasına rağmen, sinir yaralanmaları önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada, içerisinde yüksek oranda büyüme faktörleri içeren trombositten zengin plazmanın (PRP) sinir iyileşmesi üzerine olan etkinliğini araştırmak amaçlanmıştır.

PRP, 5 adet Wistar tipi dişi sıçandan intrakardiyak girişim yolu ile elde edilen kandan hazırlandı. PRP içerisinde trombositler $1,5 \times 10^{12}$ trombosit/L oranında konsantre edildi. Hazırlanan PRP operasyon sahasına trombin ile birlikte uygulandı.

Cerrahi işlemler için 40 adet Wistar tipi dişi sıçan kullanıldı. Ketamin (50 mg/kg-IM) anestezisi kullanılarak, sağ arka ekstremitede çalışıldı. Hayvanlar 5 gruba ayrıldı. Grup 1 (n=4): Siyatik sinir, siyatik çentikten bifurkasyona kadar olan çevre dokulardan serbestleştirildi ve sinire ek bir işlem yapılmadı. Diğer cerrahi gruplarda sinir bifurkasyonun 1 cm proksimalinden keskin bir mikromakas ile kesildi. Grup 2 (n=8): 2 adet epinöral sütür ile onarım, Grup 3 (n=8): 6 adet epinöral sütür ile onarım, Grup 4 (n=10): 2 adet epinöral sütür ile onarım + PRP ve Grup 5 (n=10): 6 adet epinöral sütür ile onarım + PRP.

Postoperatif 90. günde deneklere yürüme analizi ve elektromiyografi yapıldı. Denekler kurban edilerek ıslak kas ağırlığı, kas ve sinir histomorfometrik analizleri yapıldı. Veriler Mann Whitney-U yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Siyatik fonksiyon indeksi sonuçlarına göre Grup 2 ve Grup 5 arasındaki fark anlamlı idi ($p=0,02$). PRP uygulanan grupların elektromiyografide daha kısa latans değerine sahip oldukları ($p<0,02$) ve histolojide daha kalın miyelin tabakası içerdikleri bulundu ($p<0,01$). Epinöral skar doku indeksi, ıslak kas ağırlıkları ve kas histomorfometrik değerlendirmesi açısından sonuçlar Grup 4 ve Grup 5’de Grup 2 ve Grup 3’e göre daha iyiydi, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı iyileşme farkı saptanmadı.

Sonuç olarak PRP kolaylıkla hazırlanabilen bir üründür ve sonuçlar ratlarda tek doz uygulanan PRP’nin sinir iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. Bu etki muhtemelen trombositlerin aktivasyonu ile ortama salınan büyüme faktörlerine bağlıdır.

SUMMARY

Nerve injuries still represent a major problem, although a substantial amount of experimental work concerning basic behavior of the neuron after injury and new ways to improve regeneration have been described. We aimed to study the effect of platelet rich plasma (PRP) that includes concentrated growth factors in peripheral nerve healing.

The PRP was prepared from the blood of five Wistar type female rats by intracardiac puncture. The platelets were concentrated up to 1.5×10^{12} platelet/L and were applied on the surgical area with thrombin.

Forty Wistar type female rats were used for surgical procedures. We studied on the right hind-limbs of the animals under ketamine-HCl anesthesia. The animals were separated into five groups. Group 1 (n=4): The right sciatic nerve was only dissected from the sciatic notch to the bifurcation. In all other surgical groups, the nerve was transected at 1 cm proximal to the bifurcation with a sharp pair of microscissors. The nerve repair was performed as follows: Group 2 (n=8): Epineural repair with 2 sutures, Group 3 (n=8): Epineural repair with 6 sutures, Group 4 (n=10): Epineural repair with 2 sutures + PRP and Group 5 (n=10): Epineural repair with 6 sutures + PRP.

Walking track analysis and electromyographic studies were performed 3 months postoperatively. Thereafter, animals were sacrificed and histomorphometric analyses of the muscle and nerve tissue were done. Mann Whitney-U test was used for the statistical analysis.

The results of sciatic function indices revealed a statistically significant difference between the Group 2 and 5 ($p=0.02$). The groups that were exposed to PRP have shorter latency time in electromyography ($p<0.02$) and thicker myelin layer in histological evaluation ($p<0.01$). Group 4 and 5 were favorable than Group 2 and 3 when evaluated for epineural scar tissue index, muscle weights and histomorphometric analysis of muscle, but the differences between the groups were not significant ($p>0.05$).

In conclusion, PRP is a product that can be easily prepared and the result show that single injection of platelet concentrate can improve nerve healing in rats. This effect is probably due to the growth factors that are released from the platelets during activation.

KAYNAKLAR

- 1) Aghaloo TL., Moy PK., Freymiller EG., Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects, a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 60(10), 1176-81, (2002).
- 2) Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P., Nurden AT., Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 91(1), 4-15, (2004).
- 3) Anitua E., Andia I., Sanchez M., Azofra J., del Mar Zaldueño M., de la Fuente M., Nurden P., Nurden AT., Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.*, 23(2), 281-6, (2005).
- 4) Aspenberg P., Virchenko O., Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.*, 75(1), 93-9, (2004).
- 5) Atabay K., Hong C., Heil BV., Bentz ML., Futrell JW., The use of “sliding epineural sheath tube” for repair of peripheral nerve defects. *Surgical Forum*, 45, 719-22, (1994).
- 6) Atabay K., Hong C., Heil BV., Bentz ML., Futrell JW., The use of “sliding epineural sheath tube” for repair of peripheral nerve defects. *Plastic Surgical Forum*, 18, 121-3, (1995).
- 7) Ayhan S., *Periferik sinir defektlerinin onarımında turnover epineural sheath tube’ün sinir rejenerasyonuna etkisi*, (Uzmanlık Tezi), Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, (1998).
- 8) Ayhan S., Yavuzer R., Latifoğlu O., Atabay K., Use of the turnover epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. *J Reconstr Microsurg.*, 16(5), 371-7, (2000).

- 9) Bain JR., Mackinnon SE., Hunter DA., Functional evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.*, 83, 129-38, (1989).
- 10) Baykal S., Boz C., Cakır E., Baytan SH., Karakus M., Kuzeyli K., The effects of pentoxifylline in experimental nerve injury. *Turk J Med Sci.*, 32, 207-10, (2002).
- 11) Bayramiçli M., Sinirde mikrocerrahi çalışması, *Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma Doku ve Organ Nakli Modelleri*. Argos, İstanbul, (2005) Pp: 339-366.
- 12) Bayramiçli M., Laboratuvar sıçanının biyolojik özellikleri ve bakım koşulları, *Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma Doku ve Organ Nakli Modelleri*. Argos, İstanbul, (2005) Pp: 101-118.
- 13) Bennett NT., Schultz GS., Growth factors and wound healing, biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.*, 165(6), 728-37, (1993).
- 14) Bixby JL., Zhang R., Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol.*, 110(4), 1253-60, (1990).
- 15) Bora FW., Peripheral nerve repair in cats. The fascicular stitch. *J Bone joint Surg.* 49A, 659, (1967).
- 16) Boyd JG., Gordon T., A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci.*, 15(4), 613-26. (2002).
- 17) Braun S., Croizat B., Lagrange MC., Warter JM., Poindron P., Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures. *J Neurol Sci.*, 136, 17-23, (1996).

- 18) Brandt KE., Mackinnon SE., Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 5th edition, eds: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM., Lippincott-Raven, Philadelphia (1997). P: 79.
- 19) Bronzino JD., *The biomedical engineering handbook*. Second edition. CRC Press, Florida, (2000). Pp: 141-50.
- 20) Brown CJ., Mackinnon SE., Evans PJ., Bain JR., Makino AP., Hunter DA., Hare GMT., Self evaluation of walking tract measurement using a sciatic function index. *Microsurgery*. 10, 226-35, (1989).
- 21) Brissett AE., Hom DB., The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.*, 11(4), 245-50, (2003).
- 22) Buehler MJ., Seaber AV., Urbaniak JR., The relationship of functional return to varying methods of nerve repair. *J Reconstr Microsurg.*, 6, 61-69, (1990).
- 23) Brushart TM., Tarlov EC., Mesulam MM., Specifity of muscle reinnervation after epineural and individual fascicular suture of the rat sciatic nerve *J Hand Surg.*, 8, 248-53, (1983).
- 24) Castaneda F., Kinne RK., Omental graft improves functional recovery of transected peripheral nerve. *Muscle Nerve*, 26(4), 527-32, (2002).
- 25) Cham RB., Peimer CA., Howard CS., Walsh WP., Eckert BS., Absorbable versus nonabsorbable suture for microneuorrhaphy. *J Hand Surg (Am).*, 9, 434-40, (1984).
- 26) Chen YS., Wang-Bennett LT., Coker NJ.. Facial nerve regeneration in the silicone chamber, the influence of nerve growth factor. *Exp Neurol.*, 103(1), 52-60, (1989).

- 27) Cordeiro PG., Seckel BR., Miller CD., Gross PT., Wise RE., Effect of a high-intensity static magnetic field on sciatic nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 83(2), 301-8. (1989).
- 28) Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA, Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg.*, 134(2), 200-5, (1999).
- 29) Dahlin LB., The biology of nerve injury and repair. *J Am Soc Surg Hand.*, 4(3), 143-55, (2004).
- 30) Danielsen N., Pettmann B., Vahlsing HL., Manthorpe M., Varon S., Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J Neurosci Res.*, 20(3), 320-30, (1988).
- 31) Davis JB., Stroobant P., Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol.*, 110(4), 1353-60, (1990).
- 32) Demirciler N., *Periferik sinir kesilerinin onarımında “sliding epineural sheet tube”ün rejenerasyona katkısı.* (Uzmanlık Tezi), Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, (1996).
- 33) De Somer F., De Brauwier V., Vandekerckhove M., Ducatelle R., Uyttendaele D., Van Nooten G., Can autologous thrombin with a rest fraction of ethanol be used safely for activation of concentrated autologous platelets applied on nerves? *Eur Spine J.*, Jun 17, (2005). [Epub ahead of print]
- 34) Diao E., Peimer CA., Sutureless methods of nerve repair. *Operative Nerve Repair and Reconstruction.* ed: Gelberman RH, JB Lippincott, Philadelphia (1991). Pp: 305-311.

- 35) Dubuissou AS., Beuermann RW., Kline DG., Sciatic nerve regeneration across gaps within collagen chambers, the influence of epidermal growth factor. *J Reconstr Microsurg.*, 9(5), 341-6, (1993).
- 36) Dugrillon A., Klüter H., Topical application of platelets for improved wound healing. *Blood Therapies in Med.*, 3(1), 21-26, (2002).
- 37) Eppley BL., Woodell JE., Higgins J., Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma, implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.*, 114(6), 1502-8, (2004).
- 38) Frostick SP., Yin Q., Kemp GJ., Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery.*, 18(7), 397-405, (1998).
- 39) Garbay B., Heape AM., Sargueil F., et al, Myelin synthesis in peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.*, 61, 267-304, (2000).
- 40) Gehring S., Hoerauf H., Laqua H., Kirchner H., Kluter H., Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*, 39(2), 144-8, (1999).
- 41) Gibson KL., Daniloff DVM., Daniloff JK., Comparison of sciatic nerve regeneration through silicone tubes and allografts. *Microsurgery.* 10, 126-9, (1989).
- 42) Giddins GE., Wade PJ., Amis AA., Primary nerve repair, strength of repair with different gauges of nylon suture material. *J Hand Surg (Br).*, 14, 301-2, (1989).
- 43) Gordon T., Sulaiman O., Boyd JG., Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.*, 8(4), 236-250, (2003).

- 44) Gorgulu A., Imer M., Simsek O., Sencer A., Kutlu K., Cobanoglu S., The effect of aprotinin on extraneural scarring in peripheral nerve surgery, an experimental study. *Acta Neurochir.*, 140(12), 1303-7, (1998).
- 45) Gorgulu A., Uzal C., Doganay L., Imer M., Eliuz K., Cobanoglu S., The effect of low-dose external beam radiation on extraneural scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Neurosurgery*, 53(6), 1389-95, (2003).
- 46) Haapaniemi T., Nylander G., Kanje M., Dahlin L., Hyperbaric oxygen treatment enhances regeneration of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol.*, 149(2), 433-8. (1998).
- 47) Hansson HA., Insulin-like growth factors and nerve regeneration. *Ann N Y Acad Sci.*, 692, 161-71, (1993).
- 48) Hare GMT., Evans PJ., Mackinnon SE., Best TJ., Bain JR., Szalai JP., Hunter DA., Walking tract analysis, a long term assesment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg.*, 89, 251-8, (1992).
- 49) Harris ME., Tindall SC., Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am.*, 2(1), 93-104. (1991).
- 50) Hart AM., Terenghi G., Kellerth JO., Wiberg M., Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. *Neuroscience*. 125(1), 91-101, (2004).
- 51) He CL., Chen ZW., Chen ZR., Enhancement of motor regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery*. 13, 151-4, (1998).

- 52) Hsu C., Chang J., Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg [Am]*., 29(4), 551-63, (2004).
- 53) Ilbay K., Etus V., Yildiz K., Ilbay G., Ceylan S., Topical application of mitomycin C prevents epineural scar formation in rats. *Neurosurg Rev.*, 28(2), 148-53, (2005).
- 54) Ishii DN., Glazner GW., Whalen LR., Regulation of peripheral nerve regeneration by insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci.*, 692, 172-82. (1993).
- 55) Islamov RR., Hendricks WA., Jones RJ., Lyall GJ., Spanier NS., Murashov AK., 17Beta-estradiol stimulates regeneration of sciatic nerve in female mice. *Brain Res.*, 943(2), 283-6, (2002).
- 56) Jackson RF., Using platelet rich plasma to promote healing and prevent seroma formation in abdominoplasty procedures. *Am J Cosm Surg.*, 20(4), 185-95, (2003).
- 57) Jubran M., Widenfalk J., Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors. *Exp Neurol.*, 181(2), 204-12, (2003).
- 58) Junquera LC., Carneiro J., Kelley RO., Blood cell, *Basic Histology*. Appleton, Lange (1992). Pp: 294-5.
- 59) Kanje M., Skottner A., Lundborg G., Sjoberg J., Does insulin-like growth factor I (IGF-I) trigger the cell body reaction in the rat sciatic nerve. *Brain Res.*, 563(1-2), 285-7, (1991).
- 60) Kanje M., Skottner A., Sjoberg J., Lundborg G., Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res.*, 486(2), 396-8, (1989).

- 61) Kayıkcıoğlu A., Karamursel S., Demirci M., Erdem S., Kecik A., A new epineural nerve repair technique with external metallic circle. *Surg Neurol.*, 62(5), 387-92, (2004).
- 62) Laird JM., Mason GS., Thomas KA., Hargreaves RJ., Hill RG., Acidic fibroblast growth factor stimulates motor and sensory axon regeneration after sciatic nerve crush in the rat. *Neuroscience.*, 65(1), 209-16, (1995).
- 63) Landesberg R., Moses M., Karparkin M., Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg.*, 56(9), 1116-7. (1998).
- 64) Lawrence HB., Cells and Tissue, *Gray's Anatomy*. 38th edition, ed: Williams PL., Churchill Livingstone, Edinburgh (1995). Pp: 17-90.
- 65) Lee S., deMacedo AR., Chan E., Wolf P., Han K., Li SJ., Efficacy of polyglycolic acid microsutures in peripheral nerve anastomoses in the rat, 1. Epineural suture. *Microsurgery.*, 4, 120-3, (1983).
- 66) Levinthal R., Brown WJ., Rand RW., Comparison of fascicular, interfascicular and epineural suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. *J Neurosurg.*, 47, 744-50, (1977).
- 67) Lin G., Chen KC., Hsieh PS., Yeh CH., Lue TF., Lin CS., Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor and neurotrophins on cultured major pelvic ganglia. *BJU Int.*, 92(6), 631-5, (2003).
- 68) Lolley RD., Bose WJ., Bastian F., Bassam B., Meyer FN., Anderson LD., Vein, silastic and polyglycolic acid fine mesh, a comparative study in peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg.*, 35, 266-71, (1995).

- 69) Longo FM., Hayman EG., Davis GE., Ruoslahti E., Engvall E., Manthorpe M., Varon S., Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. *Brain Res.*, 309(1), 105-17, (1984)
- 70) Lowery GL., Kulkarni S., Pennisi AE., Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone*. 25(2 Suppl), 47S-50S. (1999).
- 71) Ludberg G., Hasson HA., Nerve regeneration through performed pseudosynovial tubes. A preliminary report of a new experimental model for studying the regeneration and reorganization capacity of peripheral nerve tissue. *J Hand Surg.*, 5, 35-8, (1980).
- 72) Lundborg G., The nerve trunk, *Nerve injury and repair*. Churchill Livingstone, New York, (1988). Pp: 32-63.
- 73) Lundborg G., *Nerve Injury and Repair*, Churchill Livingstone, New York (1988). Pp: 149-95.
- 74) Lundborg G., Nerve regeneration and repair, A review. *Acta Orthop Scand.*, 58, 145-69, (1987).
- 75) Lundborg G., Dahlin LB., Structure and function of peripheral nerve, *Operative Nerve Repair and Reconstruction*. ed: Gelberman RH. JB Lippincott, Philadelphia (1991). Pp: 3-15.
- 76) Mackinnon SE, New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg.*, 22, 257, (1989).
- 77) Mackinnon SE., Surgical management of the peripheral nerve gap. *Clin Plast Surg.*, 16, 587-603, (1989)

- 78) Mackinnon SE., Dellon A.L., Hudson AR., Hunter DA., Nerve regeneration through a pseudosynovial sheath in a primate model. *Plast Reconstr Surg.*, 75, 833-41, (1985).
- 79) Mackinnon SE., Dellon AL., Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg.*, 85, 419-24, (1990).
- 80) Madison R., daSaliva CF., Dikkes P., Chiu TH., Sidman RL., Peripheral nerve regeneration with entubulation repair, comparison of biodegradable nerve vs. polyethylene tubes and effects of a laminin-containing gel. *Exp Neurol.*, 95, 378-90, (1987).
- 81) Maggi SP., Lowe JB., Mackinnon SE., Pathophysiology of the nerve injury. *Clin Plast Surg.*, 30, 109-26, (2003).
- 82) Man D., Plosker H., Winland-Brown JE., The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.*, 107(1), 229-37, (2001).
- 83) Marx RE., Carlson ER., Eichstaedt RM., Schimmele SR., Strauss JE., Georgeff KR., Platelet-rich plasma, growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 85(6), 638-46, (1998).
- 84) Maiorana C., Sommariva L., Brivio P., Sigurta D., Santoro F., Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma, preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 23(3), 227-35, (2003).

- 85) Mazzucco L., Medici D., Serra M., Panizza R., Rivara G., Orecchia S., Libener R., Cattana E., Levis A., Betta PG., Borzini P., The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds, a pilot study. *Transfusion.*, 44(7), 1013-8, (2004).
- 86) Menovsky T., Beek JF., Carbon dioxide laser-assisted nerve repair, effect of solder and suture material on nerve regeneration in rat sciatic nerve. *Microsurgery*, 23(2), 109-16, (2003).
- 87) Mattsson P., Aldskogius H., Svensson M., Nimodipine-induced improved survival rate of facial motor neurons following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *J Neurosurg.*, 90(4), 760-5, (1999).
- 88) de 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.*, 77(3), 634-43, (1982).
- 89) Menovsky T., Beek JF., Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves, a comparative functional, histological and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg.*, 95(4), 694-9, (2001).
- 90) Midha R., Munro CA., Dalton PD., Tator CH., Shoichet MS., Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg.*, 99(3), 555-65, (2003).
- 91) Molander H., Engkvist O., Hugglund J., Nerve repair using a polyglactin tube and nerve graft, an experimental study in the rabbit. *Biomaterials*, 4, 276-80, (1983).

- 92) Millesi H., Microsurgical repair of peripheral nerves, *Plastic Surgery*, 4th edition. eds: Smith JW., Aston SJ., Little Brown, Boston (1991). Pp: 1053-74.
- 93) Muller H., Williams LR., Varon S., Nerve regeneration chamber, evaluation of exogenous agents applied by multiple injections. *Brain Res.*, 413(2), 320-6, (1987).
- 94) Myers RR., Morphology of the peripheral nervous system and its relationship to neuropathic pain. *Anesthesia, Biologic Foundations*, eds: Yaksh TL., Lynch III C., Zapol WM., Maze M., Biebuyck JF., Saidman LJ., Lippincott Raven, Philadelphia, (1998). Pp: 483-514.
- 95) Near SL., Whalen LR., Miller JA., Ishii DN., Insulin-like growth factor II stimulates motor nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(24), 11716-20, (1992).
- 96) Odaka M., Uchiyama Y., Oka Y., Tamaki T., Evaluation of morphological and functional regeneration of rat nerve-muscle units after temporary and permanent tubulization. *Muscle Nerve*, 28(2), 194-203, (2003).
- 97) Oya T., Zhao YL., Takagawa K., Kawaguchi M., Shirakawa K., Yamauchi T., Sasahara M., Platelet-derived growth factor-b expression induced after rat peripheral nerve injuries. *Glia*, 38(4), 303-12, (2002).
- 98) Oudega M., Xu XM., Guenard V., Kleitman N., Bunge MB., A combination of insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor enhances myelination but diminishes axonal regeneration into Schwann cell grafts in the adult rat spinal cord. *Glia*, 19(3), 247-58, (1997).

- 99) Ozgenel GY., Filiz G., Combined application of human amniotic membrane wrapping and hyaluronic acid injection in epineurectomized rat sciatic nerve. *J Reconstr Microsurg.*, 20(2), 153-7, (2004).
- 100) Ozgenel GY., Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery*, 23(6), 575-81, (2003).
- 101) Ozgenel GY., Filiz G., Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *J Neurosurg.*, 98(2), 371-7, (2003).
- 102) Ozmen S., Ayhan S., Latifoglu O., Siemionow M., Stamp and paper method, a superior technique for the walking track analysis. *Plast Reconstr Surg.*, 109(5), 1760-1, (2002).
- 103) Özmen S., *Uç-yan sinir anastomozunda alıcı sinir distal ucunda epinörüm rezeksiyonunun rejenerasyona etkisi.* (Uzmanlık Tezi), Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, (2002).
- 104) Ploncard P., Comparative study of circumferential nerve suture using the operating microscope. Electrophysiological and histological control. *Acta Neurochir (Wien).*, 34(1-4), 175-83. (1976).
- 105) Rendu F., Brohard-Bohn B., The platelet release reaction, granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12(5), 261-73, (2001).
- 106) Ridley AJ., Davis JB., Stroobant P., Land H., Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol.*, 109(6), 3419-24, (1989).

- 107) Robson MC., Phillips LG., Thomason A., Altrock BW., Pence PC., Heggers JP., et al., Recombinant human platelet-derived growth factor-BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Ann Plast Surg.*, 29(3), 193-201, (1992).
- 108) Rydevik M., Bergstrom F., Mitts C., Danielsen N., Locally-applied collagenase and regeneration of transected and repaired rat sciatic nerves. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.*, 36(4), 193-6. (2002).
- 109) Terzis JK., Smith KL., Repair and grafting of the peripheral nerve, *Plastic Surgery*. ed: Mc Charty JG., WB Saunders, Philadelphia, (1990). Pp: 630-81.
- 110) Santos X., Rodrigo J., Hontanilla B., Bilbao G., Local administration of neurotrophic growth factor in subcutaneous silicon chambers enhances the regeneration of the sensory component of the rat sciatic nerve. *Microsurgery*, 19(6), 275-80. (1999).
- 111) Schnell L., Schneider R., Kolbeck R., Barde YA., Schwab ME., Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature*, 367, 170-3, (1994).
- 112) Seckle B., Enhancement of the peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve*, 13, 785-800, 1990.
- 113) Smahel J., Meyer VE., Bachem U., Glueing of peripheral nerves with fibrin, experimental studies. *J Reconstr Microsurg.*, 3, 211-20, (1987).
- 114) Snell RS., *Clinical Neuroanatomy for Medical Students*. Second edition. Little Brown and Company, Boston, (1990). Pp: 47-75.

- 115) Siebrecht MA., De Rooij PP., Arm DM., Olsson ML., Aspenberg P., Platelet concentrate increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite. *Orthopedics*, 25(2), 169-72, (2002).
- 116) Sondell M., Lundborg G., Kanje M., Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci.*, 19(14), 5731-40, (1999).
- 117) Steed DL., Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg.*, 25(3), 397-405, (1998).
- 118) Sulaiman OA., Gordon T., Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. *Glia*, 37(3), 206-18, (2002).
- 119) Terzis JK., Smith KL., Repair and grafting of the peripheral nerve, *Plastic Surgery*, ed: Mc Charty JG. WB Saunders, Philadelphia (1990) Pp: 630-81, 1990.
- 120) Thomas PK., Berthold CH., Ochoa J., Microscopic anatomy of the peripheral nervous system, *Peripheral Neuropathy.*, 3rd edition. ed: Dyck P., WB Saunders, Philadelphia (1993). Pp: 28-80.
- 121) Tiangco DA., Papakonstantineu KC., Mullinax KA., Terzis JK., IGF-I and end-to-side nerve repair, a dose-response study. *J Reconstr Microsurg.*, 17(4), 247-56, (2001).
- 122) Utley DS., Lewin SL., Cheng ET., Verity AN., Sierra D., Terris DJ., Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 122(4), 407-13, (1996).

- 123) Voinesco F., Glauser L., Kraftsik R., Barakat-Walter I., Local administration of thyroid hormones in silicone chamber increases regeneration of rat transected sciatic nerve. *Exp Neurol.*, 150(1), 69-81, (1998).
- 124) Wang KK., Nemeth IR., Seckel BR., Chakalis-Haley DP., Swann DA., Kuo JW., Bryan DJ., Cetrulo CL. Jr., Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery*, 18(4), 270-5, (1998).
- 125) Welch JA., Kraus KH., Wells MR., Blunt DG., Weremowitz J., Effect of combined administration of insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor on the regeneration of transected and anastomosed sciatic nerve in rats. *Am J Vet Res.*, 58(9), 1033-7, (1997).
- 126) Wells MR., Kraus K., Batter DK., Blunt DG., Weremowitz J., Lynch SE., Antoniades HN., Hansson HA., Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes, a comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. *Exp Neurol.*, 146(2), 395-402, (1997).
- 127) Whitman DH., Berry RL., Green DM., Platelet gel, an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.*, 55(11), 1294-9, (1997).
- 128) Whitworth IH., Brown RA., Dore CJ., Anand P., Green CJ., Terenghi G., Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. *J Hand Surg [Br]*, 21(4), 514-22, (1996).
- 129) Wieman TJ., Smiell JM., Su Y., Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic

neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care*, 21(5), 822-7, (1998).

130) Wilgis EFS., Brushart TM., Nerve repair, *Operative Hand Surgery*, 3rd edition. ed: Green DP., Churchill Livingstone, New York, (1993). Pp: 1315-40.

131) Wilgis EFS., Nerve repair and grafting, *Operative Hand Surgery*, ed: Green DP., Churchill Livingstone, New York, (1982). Pp: 915-38.

132) Wong C., Inman E., Spaethe R., Helgersson S., Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb Haemost.*, 89(3), 573-82. (2003).

133) Yavuzer R., Ayhan S., Latifoğlu O., Atabay K., Turnover epineural sheath tube for primary repair of peripheral nerves. *Ann Plast Surg.*, 48(4), 392-400, (2002).

134) Yin Q., Kemp GJ., Frostick SP., Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg [Br]*, 23(4), 433-7, (1998).

135) Zienowicz RJ., Thomas BA., Kurtz WH., Orgel MG., A multivariate approach to the treatment of peripheral nerve transection injury, the role of electromagnetic field therapy. *Plast Reconstr Surg.*, 87, 122-9, (1991).

136) Zimmermann R., Jakubietz R., Jakubietz M., Strasser E., Schlegel A., Wiltfang J., Eckstein R., Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion*, 41(10), 1217-24. (2001).

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığının 22.06.2005 tarih ve B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/67–8577 sayılı izni ve Tübitak Sağlık Bilimleri Araştırma Grubunun 105S300 (SBAG-HD-56) numaralı desteği ile gerçekleştirilmiştir.