

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DUYUSAL SİNİR DEFEKTLERİNİN
ONARIMINDA MOTOR SİNİR KÖPRÜSÜ KULLANIMININ
CİLTTEKİ ETKİLERİNİN ANTİ-NEURAL-CELL ADHESİON
MOLECULE (NCAM) KULLANILARAK SAPTANMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr.Soner ÇİVİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şükrü AYKOL**

**ANKARA
Mart 2009**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DUYUSAL SİNİR DEFEKTLERİNİN
ONARIMINDA MOTOR SİNİR KÖPRÜSÜ KULLANIMININ
CİLTTEKİ ETKİLERİNİN ANTİ-NEURAL-CELL ADHESİON
MOLECULE (NCAM) KULLANILARAK SAPTANMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr.Soner ÇİVİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Şükrü AYKOL**

**ANKARA
Mart 2009**

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki juri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09.02.2009



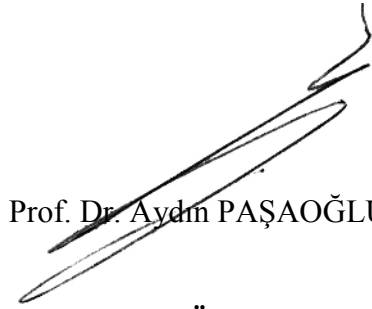
Prof. Dr. Şükrü AYKOL

BAŞKAN



Prof. Dr. Necdet ÇEVİKER

ÜYE



Prof. Dr. Aydın PAŞAOĞLU

ÜYE



Prof. Dr. M. Kemali BAYKANER

ÜYE



Doç. Dr. A. Memduh KAYMAZ

ÜYE

TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu Beyin ve Sinir Cerrahisi Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Şükrü AYKOL başta olmak üzere Anabilim Dalı Öğretim Üyelerim Prof. Dr. Necdet ÇEVİKER, Prof. Dr. Aydın PAŞAOĞLU, Prof. Dr. M. Kemali BAYKANER, Prof. Dr. Toygun ORBAY, Doç.Dr. Fikret DOĞULU ile tez çalışmam esnasında tüm desteğini yanımda hissettiğim Doç. Dr. A. Memduh KAYMAZ'a ve Doç.Dr. Gökhan KURT ile deneyimleriyle gece gündüz hep arkamda olduğunu hissettiren Yrd. Doç. Dr. Ö. Hakan EMMEZ'e, bu deneysel çalışmanın histopatolojik incelemelerini yapan Prof. Dr. F. Figen KAYMAZ'a, mevcut çalışmanın deney aşamasında emeği geçen Dr. Emre DURDAĞ, , Dr. Mehmet TÖNGE, Dr. Emrah EGEMEN ile zorlu asistanlık sürecimin her anında yanımda olup destek ve dostluğunu esirgemeyen Dr. Alp Özgün BÖRCEK ile Uzm. Dr. Özgür KARDEŞ'e ve tüm hekim, hemşire ve personel arkadaşlarım ile son olarakta bugünlere gelebilmemde maddi, manevi her türlü destekleriyle hep yanımda olan annem Suat ÇİVİ ve babam Süheyl ÇİVİ'ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Tablolar	vii
Şekiller.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Tarihçe.....	3
2.2 Periferik Sinir Histolojisi.....	4
2.3. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması	7
2.4. Periferik Sinir Hasarlanmasını Takiben Gelişen Olaylar	8
2.5. Periferik Sinir Onarım Teknikleri	11
2.6. Sinir Onarım Modellerinde Nörotrofik Faktörler ve Sinir Rejenerasyonunu Değerlendirme	17
2.7. Neural – Cell Adezyon Molekülü (NCAM).....	21
2.8. Sinir Rejenerasyonunu Değerlendirmek İçin Gerekli Süre	22
2.9. Çalışmanın Amacı	23
3. GEREÇ YÖNTEM.....	26
3.1. Cerrahi İşlemler	26
3.2. Duyusal Fonksiyon Testi.....	33
3.3 Histolojik Değerlendirme	35
3.4 İstatistiksel Analiz	39

4. BULGULAR	40
4.1 Duyusal Fonksiyon Testi	40
4.2. Histomorfometrik Analiz	41
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇLAR	55
7. KAYNAKLAR.....	57
8. ÖZET	70
9. SUMMARY	72
10. ÖZGEÇMİŞ.....	74
11 ETİK KURUL ONAYI	75

TABLÖLAR

Tablo 1. Sinir yaralanmalarında sınıflama	8
Tablo 2. Vaskülarize sinir grefti olarak kullanılabilecek donör sinirler ve arterleri	14
Tablo 3. Nörotrofik faktörler	20
Tablo 4. A Grubundaki deney hayvanlarının cilt çimdikleme testi sonuçları ...	34
Tablo 5. B Grubundaki sür al sinirinde defekt oluşturulan ve serbest sinir uçları komşu kaslar içine gömülen deney hayvanlarındaki cilt çimdikleme testi sonuçları.....	34
Tablo 6. C Grubundaki sür al sinirde defekt oluşturulup uç- uca koaptasyon metodu kullanılarak opere edilen deney hayvanlarındaki cilt çimdikleme testi sonuçları.....	34
Tablo 7. D grubundaki defektli sür al sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire uç-yan olarak koapte edilerek sür al sinir defekti tibial sinir köprüsü ile onarılmış olan deney hayvanlarındaki cilt çimdikleme testi sonuçları	35
Tablo 8. A Grubundaki deney hayvanlarında sür al sinirin innerve ettiği cilt bölgelerinde ekprese olan Anti-NCAM ile işaretlenmiş serbest sinir sonlanmalarının sayısal değerleri	37
Tablo 9. B Grubundaki deney hayvanlarında sür al sinirin innerve ettiği cilt bölgelerinde ekprese olan ve Anti-NCAM ile işaretlenmiş serbest sinir sonlanmalarının sayısal değerleri	37

Tablo 10. C Grubundaki deney hayvanlarında sür al sinirin innerve ettiği cilt bölgelerinde ekprese olan ve Anti-NCAM ile işaretlenmiş serbest sinir sonlanmalarının sayısal değ erleri	38
Tablo 11. D Grubundaki deney hayvanlarında sür al sinirin innerve ettiği cilt bölgelerinde ekprese olan ve Anti-NCAM ile işaretlenmiş serbest sinir sonlanmalarının sayısal değ erleri	38
Tablo 12. Cilt ç imdikleme test bulguları	40
Tablo 13. Kruskal Wallis testi	45
Tablo 14. Dunn testinden elde edilen p değ erleri	46

ŞEKİLLER

Şekil 1. Periferik sinir anatomisi (horizontal kesit)	7
Şekil 2. Periferik sinir rejenerasyon süreçleri	11
Şekil 3. Siyatik sinir ve ana dallarının görünümü	27
Şekil 4. Tibial ve peroneal sinirlerin uygun şekilde zarar verilmeksizin ortamdan uzaklaştırılmasını takiben intakt süral sinirin görünümü.....	28
Şekil 5. Kesik süral sinir proksimal ve distal güdüklerin görünümü	29
Şekil 6. Süral sinir uç-uca koaptasyon	29
Şekil 7. Peroneal sinirin uzaklaştırılmasından sonra defektif süral sinirin görünümü.....	30
Şekil 8. Tibial sinire süral sinir distal güdüğünün end-to-side koapte edilmiş hali	31
Şekil 9. Defektli süral sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire klasik end-to-side koaptasyon metodu kullanılarak opere edilmiş deney hayvanı	31
Şekil 10. Defektli süral sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire klasik end-to-side koaptasyon metodu kullanılarak opere edilmiş deney hayvanı	32
Şekil 11. Defektli süral sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire klasik end-to-side koaptasyon metodu kullanılarak opere edilmiş deney hayvanı	32
Şekil 12. Cilt çimdikleme test bulgularının şematik görünümü.....	41

Şekil 13. A grubunda okla işaretli anti-NCAM pozitif serbest sinir sonlanmalarına ait mikrograf.....	42
Şekil 14. B grubunda okla işaretli anti-NCAM pozitif serbest sinir sonlanmalarına ait mikrograf.....	43
Şekil 15. C grubunda okla işaretli anti-NCAM pozitif serbest sinir sonlanmalarına ait mikrograf)	44
Şekil 16. D grubunda okla işaretli anti-NCAM pozitif serbest sinir sonlanmalarına ait mikrograf.....	45
Şekil 17. NCAM ekspresyonun her grup için bulunan ortalama değerlerinin şematik dağılımı	46

1. GİRİŞ

Bu yüzyılın başında sağlam sinir ve yaralı sinir arasında end-to-side koaptasyonun (uç-yan sinir onarımı) cerrahi olarak yaratılması yaklaşımı ortaya atılmıştır. Fikir, donör sinirin innerve ettiği bölgenin innervasyonu bozulmadan daha önceden denerve olan bölgenin reinnervasyonunu kollateral oluşumu ile sağlamaktır. Bu metodun ikinci bir olası faydası ise kısa mesafe reinnervasyonu için uzun sinir greftlerinden kaçınılmasıdır. End-to-side koaptasyonun onarıcı potansiyeli birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. End-to-side koaptasyon çalışmalarında periferik kökten motor ve duyuşal aksonların büyümesi gözlenmiştir. Kesilmiş bir sinirin end-to-side onarımı fonksiyonel motor innervasyonun oluşmasını sağladığı da gösterilmiştir. Birleşim yerinde epinörium ve perinöriumun çıkartılması reinnervasyon şansını attırdığı düşünülmektedir, ancak aksini savunan çalışmalarda mevcuttur.

Bununla beraber end-to-side koaptasyon ile yaratılan sinir bağlantısında duyuşal iyileşmeyi araştıran çalışmalar hala sınırlı olup, sıçanlardaki sürat sinir hasarlanmalarını onarmada, tibial sinirin motor sinir köprüsü olarak kullanıldığı çalışmalardaki etkinliğin gösterilmesinde; koaptasyon bölgesindeki aksonal rejenerasyonu histomorfometrik olarak belirleme, elektrofizyolojik testler ve nosiseptif cilt çimdikleme testi ile ayak derisinde ağrı duyarlılığının iyileşmesini gösterme parametreleri kullanılmış ve ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada ratlardaki duyuşal sinir defektlerinin onarımında motor sinir köprüsü kullanımının; denerve cilt bölgesindeki etkilerinin NCAM (Anti-neural cell adhesion molecule) kullanılarak saptanması amaçlanmış olup, bu konuyla

ilgili daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirilecek çalışmada süral sinir defektini onarmada, tibial sinirin köprü olarak kullanıldığı end-to-side koaptasyon (uç-yan anastomoz) tekniğini; opere edilmemiş, süral sinirde defekt oluşturulmuş ve süral sinir defekti uç-uca onarılmış rat gruplarında karşılaştırmak ve etkinliğini ciltteki serbest sinir sonlanmalarında test etmek amaçlanmıştır. End organ (cilt) etkilerini test etmek amacıyla tüm nöronlardan erken ve geç gelişimsel dönemde eksprese olan, nöronlarla komşuluğu bulunan ve tüm hücrelerle bağlantısı bulunan NCAM aktivitesi kullanılacaktır. Çalışmanın temel amacı denerve alanlara sahip ratlardaki NCAM aktivitesinin innerve ve reinnerve olduğu düşünülen cilt bölgelerine sahip ratlardaki NCAM aktivitesiyle karşılaştırmaktır.

Ağrıya karşı cilt duyarlılığını test etmede nosiseptif cilt çimdikleme testi (skin pinch test) kullanılarak daha önce yapılmış araştırmalarda haritalanmış süral sinir innervasyon alanındaki denervasyon ve reinnervasyon başarısıda test edilerek araştırmayı güçlendirmek bir başka amaç olarak öngörülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Periferik sinirler omurgadan cilt, adale ve organlara uzanan ve oldukça uzun seyirleri nedeniyle değişik bölgelerde travmaya maruz kalan, benzeri olmayan yapılardır (1). Periferik sinirler mekanik, termal, kimyasal, konjenital ve patolojik nedenlere bağlı olarak yaralanabilirler. Sinir onarımındaki başarısızlık duyu kaybına, kaslarda fonksiyon kaybına ve ağrılı nöropatlilere neden olmaktadır (2).

Periferik sinir yaralanmalarının tamir edilebileceği 200 yıldan beri bilinmektedir (3). Kayıtlı tıp tarihine bakıldığında, Galen (M.S. 2.YY) zamanında sinir rejenerasyonunun mümkün olmadığı düşünülüyordu. Sinir onarımı konsepti tanımlandıktan sonra pek çok cerrahi teknik de buna paralel olarak denenmiş ve geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları; epinöral flep sütürleme, sütürden önce sinirlerin tanjansiyel olarak bölünmesi ve side-to-side onarımdır.

Zaman içerisinde 1795 yılında Haighton, 1842 yılında Muller periferik sinir cerrahisi konusunda oldukça değerli çalışmalar yapmış ve yayınlamışlardır (4). 1847 yılında 11 yaşındaki bir hastanın median sinirinin dikilmesi ve tam bir iyileşmenin sağlanması sinir onarımı hakkında bilinen ilk girişimdir ve Paget tarafından yayınlanmıştır (5). Waller, kurbağaların hipoglossal ve glossofaringeal sinirlerinde travma distalindeki değişiklikleri tarif etmiş ve distal güdükte meydana gelen “Wallerian Dejenerasyon” sürecini tanımlamıştır (3,5). Daha sonra Hueter tarafından periferik sinirde epinöral onarım metodu tanımlanmıştır (6). Takiben, 1906 yılında Cajal tarafından gümüş boyama yöntemiyle aksonal

rejenerasyonun varlığı gösterilmiştir (7). Ancak sinir onarımında sürekli ve tutarlı bir sonucun alınmaması 19. yüzyıl boyunca bu alandaki ilginin fazlaca artmamasına neden olmuştur.

Silas Weir Mitchell, 1.inci dünya savaşı sırasındaki sinir yaralanmalarıyla ilgili deneyimlerini ‘‘Injuries of Nerves’’ isimli kitabında toplamıştır. İkinci dünya savaşı sırasında ise Sir Herbert Seddon ve Barnes Woodhall primer sinir onarımı, sekonder sinir onarımı ve sinir greftlemede sonuçları ve çeşitliliği üzerinde çalışmışlardır. Sir Sydney Sunderland, sinir cerrahisi ile uğraşan klinisyenlere oldukça önemli katkılar sağlayan, periferik sinirlerin iç yapısı hakkında ayrıntılı bilgiler sunmuştur (4).

2.2. Periferik Sinir Histolojisi

Sinir lifleri ektodermal orijinli, özel kılıflarla sarılmış aksonlardan ibarettir. Sinir lifleri demetleri beynin ve spinal kordun traktuslarını ve periferik sinirleri oluşturur. Sinir liflerinin kılıfları, liflerin santral veya periferik sinir sisteminde oluşumuna göre farklılıklar gösterir. Erişkin sinir dokusundaki çoğu akson, kılıf hücrelerinin tek ya da birden fazla katları ile kaplıdır. Periferik sinir liflerinde bu kılıfı; schwann hücreleri, santral sinir liflerindeyse oligodendrositler oluşturur. Küçük çaplı aksonlar çoğunlukla myelinsiz sinir lifleridir. Gittikçe kalınlaşan aksonlar genellikle artan sayılardaki konsantrik hücre kılıflarıyla sarılmıştır. Myelin kılıflar tarafından sarılmış olan liflere myelinli sinir lifleri denir (8). Sinir impulsunun aksonal iletimi büyük çaplı ve kalın myelin kılıflı aksonlarda daha hızlıdır. Periferik sinir fibrilleri, çaplarına ve ileti hızlarına göre 3 gruba ayrılırlar:

Grup A sinir fibrilleri; 1-20 μm çaplarında ve ileti hızları 5-120 m/sn olan myelinli somatik afferent ve efferent sinir fibrilleridir.

Grup B sinir fibrilleri; 1-3 μm çapında , ileti hızı 3-15 m/sn olan myelinli, efferent preganglionik, otonomik sinir fibrilleridir.

Grup C sinir fibrilleri; 0,5- 2 μm çapında , 0,5- 2 m/sn ileti hızında, myelinsiz, efferent postganglionik otonomik sinir fibrilleridir (9).

Periferik sinir sisteminde sinir lifleri sinirleri oluşturmak üzere gruplar halinde toplanır. Birkaç çok ince myelinsiz lifden oluşan sinir dışında, sinirler myelin kapsamları nedeniyle beyaz renkte görülürler (8). Sinir fibrilleri, yoğun konnektif doku tarafından sarılmıştır. Periferik sinirlerin konnektif doku stroması, lokalizasyona da bağlı olarak, 3 tabakadan oluşur; Epinörium, perinörium, endonörium (10).

Epinörium: İnternal epinörium sinirleri ve tek tek fasikülleri sarar. Vasküler yapılar sinire bu tabakadan girerler. İnternal epinörium dış basınçlara karşı yastıklama görevi görür. Eksternal epinörium ise longitudinal ve lateral hareketlere izin verir. Ayrıca epinöriumda fibroblastlar bulunur, bu hücreler enflamasyona cevap verir ve epinöriumu kalınlaştırır (3,11).

Perinörium: Fasikülleri sarar. Kollojen ve elastik lifler içerir. Kan-beyin bariyerinin devamı gibi fonksiyon göstererek difüzyonu kısıtlar, intranöral iyonik çevrenin stabilitesini korur, enfeksiyonun yayılmasını engeller (3,12,13).

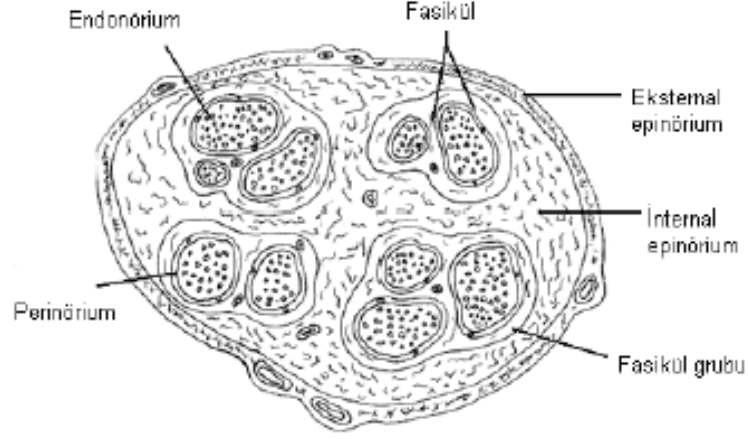
Endonörium: Kollajenöz bir doku olup, perinöriumun iç tarafındadır ve aksonları sarar. Bu tabakada elastin lifler yoktur ve fibroblastlar çok az sayıdadır.

Endonöral tüp yapısına katılır. Bu yapıya Schwann hücrelerinin oluşturduğu miyelinli aksonlarda dahildir (3,14).

Fasikül: Cerrahi olarak girişim yapılabilen en küçük sinir ünitesidir. Endonörium tarafından sarılmış akson gruplarından oluşur. Fasiküller, kendi içinde sinirin uzun aksı boyunca giden alt birimlere (aksonlara) ayrılamazlar; çünkü aksonlar arası bağlantılarla oluşan intranöral pleksus yapısı mevcuttur (3,14)

Fasikül grubu: Üç-altı fasikülün bir araya gelmesiyle oluşan fasikül gruplarında, fasiküller arasında epinörium bulunmaz. Bu grupların etrafı internal epinöriumla sarılır. İnterfasiküler bağlantılara rağmen, fasikül grupları tek tek fasiküllere ayrılabilirler. Modern periferik sinir cerrahisinde, fasikül grupların anatomisinin bilinmesi son derece önemlidir (3,14).

Periferik sinir sisteminin temel hücresel yapıları ise nöronlar ve Schwann hücreleridir. Nöron, bir hücre gövdesi ve hedef organa ulaşan aksonal uzantıdan oluşur. Motor nöronun hücresel gövdesi spinal kordun ön boynuzunda lokalize iken, duyuşal nöronlar arka kök ganglionunda bulunurlar. Schwann hücreleri aksonal çıkıntıları sararlar (14).



Şekil 1. Periferik sinir anatomisi (horizontal kesit)

2.3. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması

Sinir yaralanmalarının sınıflaması 1947 yılında Seddon ve 1951 yılında Sunderland tarafından yapılmıştır (15,16). Sinir yaralanmaları hasarlanan sinir komponentlerine, fonksiyona ve spontan iyileşme olup olmasına göre sınıflandırılır (Tablo-1).

Yaralanmanın derecesinin bilinmesi tedavinin belirlenmesi açısından önemlidir. Nöropraksi kompresyon hasarı sonrası meydana gelen akut bir demyelinizasyon durumudur. Aksonal devamlılık vardır, ancak ileti yoktur. Bu durum yeni myelin yapımına kadar (saatler, haftalar içerisinde) klinik yansımaları korur, daha sonra kendiliğinden düzelir. Tam motor paralizi mevcuttur, duyu ve sempatik fonksiyonlar genellikle korunmuştur. Aksonotmezis, endonöral tüplerin intakt kaldığı ancak aksonal devamlılığın kaybolduğu ve distalde Wallerian dejenerasyonun olduğu daha ciddi bir yaralanma türüdür.

Fonksiyonun geri dönmesi için geçmesi gereken süre, aksonal rejenerasyon ve hedef dokudaki reinnervasyon sürecinin hızına bağlıdır (17).

Tablo 1. Sinir yaralanmalarında sınıflama (2,14).

SEDDON	SUNDERLAND	
Nöropraksi	1.derece yaralanma	• Nöropraksi • Lokal miyelin hasarı • Dejenerasyon yok
Aksonotmezis	2.derece yaralanma	• Endonöral tüp korunmuş • Aksonal dejenerasyon var
	3. derece yaralanma	• Endonöral tüp dejenere • Perinörium intakt • Aksonal dejenerasyon var
	4. derece yaralanma	• Sadece eksternal epinörium intakt
Nörotmezis	5. derece yaralanma	• Sinir tamamen ayrılmıştır

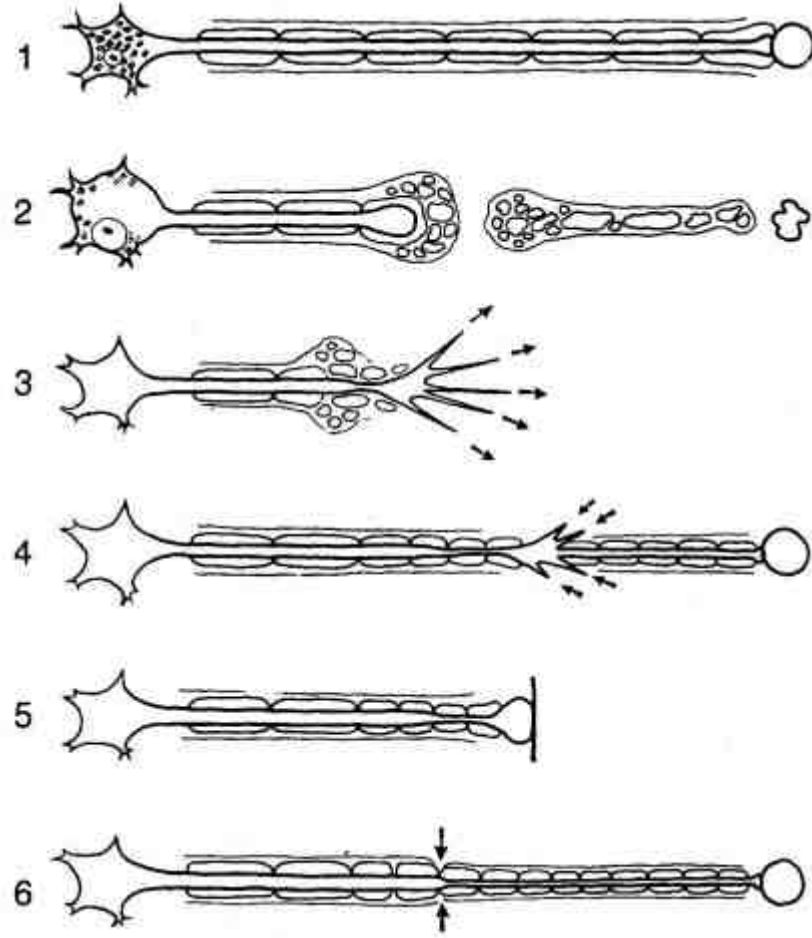
2.4. Periferik Sinir Hasarlanmasını Takiben Gelişen Olaylar

Periferik sinirin şiddetli yaralanması sonucunda, yaralanmanın şiddetine bağlı oranda distal (wallerian) ve proksimal aksonal dejenerasyon oluşur (Şekil 2.1). Eğer yaralanma nöron ölümüne yol açmazsa, başarısızlıkla veya etkili fonksiyonel restorasyonla sonuçlanabilecek rejenerasyon süreci başlar. Aksonal devamlılığı kesintiye uğratmaya yetecek orandaki yaralanmalarda dejenerasyon oluşur. Distal sinirin wallerian dejenerasyonu, aksonal ayrılma noktasından, sinirin nihai sonlandığı noktaya kadar akson ve çevreleyen myelinin parçalanması ile oluşur (18,19).

Aksonal kesintinin proksimalinde akson son korunan internoda kadar sınırlı bir dejenerasyona gider. Aksonal dejenerasyon distal güdükte gözlenene benzer (20). Sinir rejenerasyonu, proksimal güdükten dışa büyüme şeklinde olur ve bu, dejenere distal sinirin otorejenerasyonu şeklinde değildir. Yirmidört saate kadar değişebilen bir süre sonrasında proksimal kesik akson ucu büyüme konisi şeklinde bir çıkıntı yapar (Şekil 2.2). İleriye doğru büyüme, akson ucundan proksimale doğru birkaç segmentlik Ranvier boğumundan ve büyüme konisinden dalların filizlenmesiyle birlikte uç kısmın ilerlemesiyle oluşur (20, 21). Yirmidört saatin sonunda birkaç filiz yaralanma alanına ulaşır ve gelişen skarın yaralanma alanına penetrasyonu, ikinci veya üçüncü gün gerçekleşir. Proksimal güdükten dışarı aksonal filizlenmeye, terminal uydu hücrelerden köken alan Schwann hücreleri eşlik eder (22). Büyüme konisi proksimal kesik aksonun ucundaki aksoplazmik büyüme alanıdır, internal aktin filamentler ve miyozin içerir ve membranı dışa çıkıntı yapan, ameboid tarzda kasılan pek çok filopod içerir (18,23). İleri doğru hareketin kısmen bu filopodal çıkıntılarla oluşturulduğu gözükmektedir.

Filopod tarafından uygun bir tutunacak madde (Schwann hücre membranı gibi) algılandığında yapışma oluşur. Membranlar arası geçiş olayı ile internal aktin filamentler kararlı hale gelir ve retraksiyon oluştuğunda büyüme konisi ileri doğru çekilir. Akson ve içerikleri tutunmuş filopoda doğru itilir ve akson aynı doğrultuda uzar (24,25). Bir aksondan birçok filopod, sinir fiberinden aşağıya bu şekilde gelişebilir, veya gelişigüzel şekilde dallanabilir veya geriye kendine doğru büyüyebilirler. Hedef organla bir filiz bağlantı kurduğunda, diğer filizler dejenere

olur ve tek bir akson olgunlaşır (22) (Şekil 2.3). Bu tek akson proksimalden distale Schwann hücreleriyle sarılır, ve sadece birkaç aksonun eski endonöral tabakaya girdiği görülür. Rejenere filizler, yeni schwann hücre ara yüzeyi boyunca ilerlerler. Myelinizasyon uç organ değil, ana akson tarafından belirlenir (26). Büyüme yönü ve büyüme konisinin şekli, güzergahı üzerindeki mekanik faktörlerden etkilenir. Geçilemez bir skar, ilerleyen aksonun büyüme yönünde değişikliklere veya dallanmasına sebep olur (24) (Şekil 2.4). Bununla birlikte büyüme konisinin dokuları delerek geçme yeteneğini artıran proteaz (plazminojen aktivatörleri) salgıladığı yönünde deliller mevcuttur (27). İdeal olarak üzerinden geçilecek skarın olmaması, ilerleyen aksonun, uygun uç organa rehberlik edecek olan longitudinal düzenlenmiş schwann hücrelerinin bulunduğu distal güdüğe doğru büyümesini sağlar. Schwann hücreleri periferik sinir hasarını takiben bir yandan da aksonal rejenerasyon ve maturasyonun sağlanması amacıyla “Nerve Growth Factor” (NGF), “İnsulin-like Growth Factor” (IGF-1), “Ciliary Neurotrophic Factor” (CNTF) ve “Brain-derived Neurotrophic Factor” (BDNF) isimli faktörlerin sentez ve salınımında rol alırlar, ayrıca ekstrasellüler proteinleri sentezlerler (28,29).



Şekil 2. Periferik sinir rejenerasyon süreçleri

2.5. Periferik Sinir Onarım Teknikleri

Yaralanmış periferik sinirin onarım tekniğinin planlanmasında, sinirin fonksiyonel önemi, duysal ve motor liflerinin oranı, fasiküllerin sayısı ve çapı ile epinöral dokunun miktarı önemli rol oynar. Periferik sinir onarımında, uç-uca onarım altın standarttır. Uç-uca periferik sinir onarımı, “epinöral suture”, “grup fasiküler suture” ya da “tek tek fasiküler suture” gibi birkaç farklı yöntemle yapılabilir. Epinöral suture tekniğinde, kesik sinirin proksimal ve distal güdükleri çevre dokulardan serbestleştirilir. Epinöral damarlar ya da uygun çaptaki fasikül

grupları gibi devamlılığı olan anatomik yapılar karşılıklı getirilir ve güdüklerin epinöriumları birbirine sütüre edilir. Fasiküler grup tekniğinde, proksimal ve distal güdükteki fasikül grupları intranöral diseksiyonla ortaya çıkarılır. Her iki uçtaki uygun gruplar karşılıklı getirilerek fasikül grubu etrafındaki internal epinöriumlar karşılıklı sütüre edilir. Tek tek fasiküler sütür tekniğinde ise, intranöral diseksiyonla fasiküller ortaya çıkarılır ve fasiküller karşılıklı tek tek sütüre edilir. Bu işlem epinöral sütürle de desteklenebilir (3,11,14).

Uç-uca onarımın mümkün olmadığı, defektli periferik sinir yaralanmalarında en yaygın olarak kullanılan teknik otojen sinir greftleri ile onarımdır (30). Otojen sinir greftinin kullanılmasının amacı, bazal lamina ile birlikte Schwann hücrelerini içeren bir tüp sağlanmasıdır. Böylece proksimal sinir ucundan rejenere olan aksonlar bu tüp aracılığıyla distal güdüğe ulaşırlar. Distal güdüğe ulaştıktan sonra, bunun içinde ilerleyerek hedef organa varırlar. Schwann hücrelerinin sentezlediği nörotrofik faktörlerin de bu rejenerasyona katkısı olduğu düşünülür (2). Graftler ilk 2-3 gün çevreden difüzyonla beslenirler. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, 4.-5. günlerde greft revaskülarizasyonunun maksimuma ulaştığı gösterilmiştir (31,32). Klinik uygulamada en sık kullanılan otojen sinir grefti sürül siniridir. Longitudinal bir insizyon yada küçük transvers insizyonlarla 40 cm'ye kadar greft alınabileceği bildirilmiştir (33). Postoperatif dönemde ayak lateralinde hipoestezi ortaya çıkar; bu nedenle preoperatif dönemde lokal anestetiklerle sürül sinir bloğu yapılarak, hastaya ameliyat sonrası oluşacak duyuşal defektin gösterilmesi önerilir. Ayrıca donör sinir sahasında oluşan nöroma da sık rastlanan bir morbiditedir (14). Ön-koldaki duyuşal sinirler de greft

materyali olarak kullanılabilirler (34). Medial antebrakial kutanöz sinirden 10 cm, lateral antebrakial kutanöz sinirden 20 cm'ye kadar sinir grefti elde edilebilir (34,35). Ancak bu sinirlerin greft olarak alınmasından sonra önkol radial ve ulnar tarafında, bazen tenar bölgeye de yayılabilen duyu kaybı ortaya çıkar. Bu durum, özellikle median sinir kesisinin de eşlik ettiği vakalarda istenmeyen bir durumdur. Defektin boyutu ve greftin fasiküler yapısı, kullanılabilecek greft seçeneklerini kısıtlayabilir. Greftin çapı arttıkça perfüzyon ve revaskülarizasyon oranı azalır, greft nekrozu riski artar. Kullanılabilecek maksimum greft uzunluğu ile ilgili kesin bir bilgi bulunmamakla birlikte, 1,5-7 cm olması gerektiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (33,35,36).

Sinirdeki defekt büyük ise yada kötü vaskülarize alıcı yatağa greft konması gerekiyorsa vaskülarize sinir greftleri tercih edilir. Vaskülarize ulnar sinir ve vaskülarize süral sinir greftleri en popüler olanlarıdır (36,37). Vaskülarize sinir greftleri tek bir trunkal greft gibi kullanılabileceği gibi yine aynı pedikülden beslenen 2 ya da 3 paralel kablo greft gibi uygulanabilir (38). Vaskülarize sinir grefti için önerilen donör sinirler Tablo-2'de belirtilmiştir (14, 33). Vaskülarize sinir greftlerinin klinik kullanımı oldukça kısıtlıdır; çünkü büyük arterlerin harcanması gerekebilir ya da eşlik eden arter çok ince olduğunda teknik olarak uygulama güçleşir. Vaskülarize sinir greftlerinin, vaskülarize olmayan greftlere sinir iyileşmesi açısından bir üstünlüğü olduğunu belirten yayın literatürde mevcut değildir. Ama sinir defektinin büyük olduğu durumlarda, masif deri defektlerinde ve alıcı alanın vaskülarizasyonu kötü olduğunda ise vaskülarize sinir grefti kullanımı gerekmektedir (2).

Tablo 2. Vaskülarize sinir grefti olarak kullanılabilecek donör sinirler ve arterleri

Donör sinir	Besleyici arter
Süperfisial radial	Radial arter
Ulnar	Superior ulnar kollateral arter
Süral	Süperfisial süral arter
Anterior tibial	Anterior tibial arter
Süperfisial peroneal	Süperfisial peroneal
Safenöz	Safenöz arter

Defektli periferik sinirlerin onarımında otojen ven grefti kullanımı uygulanan diğer bir yöntemdir. Chiu ve Strauch tarafından duyusal sinir defektinin onarımında ven grefti kullanılmasıyla başarılı duyusal reinnervasyon bildirilmiştir (39).

Daha sonraki deneysel ve klinik çalışmalarda, uzun ven greftlerindeki kollaps nedeniyle iyi sonuçların ancak 3 cm ve altındaki sinir defektlerinin onarımından elde edilebildiği gösterilmiştir (40). Bazı araştırmacılar ven greftlerindeki kollapsı engellemek amacıyla ven greftinin içini parçalanmış sinir (41-43) ya da kas dokusu (44,45) ile doldurarak kullanmışlar; ancak bu kombine teknikle de en iyi sonuçlar 3 cm'nin altındaki defektlerde elde edilmiştir (41,42,44).

Son 20 yılda, sinir defektlerinin onarımında sentetik tüplerin kullanıldığı deneysel ve klinik çalışmalar yapılmıştır. Dahlin ve Lundborg 5 mm'nin altındaki defektlerde silikon tüp kullanarak başarılı sonuçlar bildirmişlerdir (46). Stanec, politetrafloretilen tüp kullanarak üst eksterimeteda başarılı sonuç bildirirken; Pitta inferior alveolar ve lingual sinir defektinin onarımı sonrasında, bu yöntemle

iyileşmenin yeterli olmadığını gözlemlemiştir (47,48). Silikon polimer tüp kullanımı sonrası meydana gelebilen yabancı cisim reaksiyonu nedeniyle sentetik materyallerin çok küçük defektlerde kullanılmasını öneren yayınlar da mevcuttur (49). Yabancı cisim reaksiyonlarının görülmesiyle birlikte poliglikolikasitten üretilen emilebilir materyaller kullanılmaya başlanmıştır (50). Bu materyaller geçirgen olmamaları nedeniyle uzun defektlerin onarımında kullanılamazlar. Bu materyallerin kullanımı ancak 5 mm'nin altındaki defektlerde alternatif bir yöntemdir (7).

Büyük bir periferik sinirin ciddi derecede hasarlandığı durumlarda rekonstrüktif nörocerrahide proksimal sinir kökü duysal veya motor aksonların kaynağı olamaz. Bu tarz yaralanmalar sonrasında çapraz sinir transferi bir çeşit iyileşme sağlayabilir. Bu prosedür ile donör nöronları kendi orijinal hedeflerini unutup başka bir bölgeye yönelmeye zorlanırlar.

Bu yüzyılın başında sağlam sinir ve yaralı sinir arasında end-to-side koaptasyonun cerrahi olarak yaratılması yaklaşımı ortaya atılmıştır. Fikir donör sinirin innerve ettiği bölgenin innervasyonu bozulmadan, önceden denerve olan bölgenin reinnervasyonunu kollateral oluşumu ile sağlamaktır. Bu metodun ikinci bir potansiyel faydası ise kısa mesafe reinnervasyonu için uzun sinir greftlerinden kaçınılmasıdır (51). Bu fikir yaklaşık 100 yıl önce ortaya atılmasına rağmen (52), 1994'te Viterbo'nun end-to-side koaptasyon sonrası distal sinir güdüğünde aksonal rejenerasyon olduğunu bildirmesine kadar önemsenmemiştir (53,54). Viterbo ve ark. sıçanlarda uyguladıkları end-to-side koaptasyon modelinde, kesilmiş peroneal sinirin distal ucunu komşu intakt tibial sinire epinöral pencere açarak koapte

etmişlerdir ve bu model en çok uygulanan end-to-side koaptasyon modeli olagelmıştır (55).

Son 10 yılda end-to-side koaptasyon ile ilgili birçok deneysel çalışma yayınlanmıştır. Kalliainen (56), Zhang (57) ve Zhao (58) proksimal sinir güdüğünü çeşitli yöntemlerle ortamdan uzaklaştıran modeller tasarlamışlardır. Proksimal sinir güdüğünü ortamdan uzaklaştırmadaki amaç, distal uçtaki rejenerasyona katkısını engellemek ve distal uçtaki rejenerasyonun sağlam sinirden kaynaklandığını göstermektir. Lundborg (59) ve Terzis (60) donör ve alıcı sinirler arasında end-to-side koapte edilmiş sinir grefti kullanmışlardır. Caplan (61) ve Berteli (62) sıçanlarda, ağırlı nöromaların tedavisine yönelik üst ekstremité modelleri tasarlamışlardır. End-to-side sinir onarımı ile ilgili klinik çalışmalar ise oldukça sınırlıdır ve genellikle olgu sunumu tarzındadır (62,63).

Viterbo (64) ve Matsuda (65) fasial paralizi onarımında, Kostakoglu (63), Luo (66) ve Mennen (67) üst ekstremitédeki sinir yaralanmalarının onarımında end-to-side koaptasyon tekniği ile başarılı sonuçlar bildirmişlerdir. 1998'de Mennen tarafından yayınlanan 39 vakalık seri bu konudaki en geniş klinik çalışmadır (67). End-to-side sinir koaptasyonu ile ilgili çalışmaların artmasıyla birlikte, rejenere olarak hedef organı reinerve eden aksonların kaynağı tartışma konusu olmuştur. Bazı otörler rejenere aksonların kaynağı olarak komşu donör sinirden kollateral olarak filizlenen aksonları gösterirken (58,68), bir kısmı da epinöral pencere açılırken hasarlanan donör sinir fasiküllerini göstermektedirler (60,69). McCallister ve ark. defektli sinirin proksimal ve distal ucunu komşu intakt sinire epinöral pencere açarak end-to-side olarak koapte etmiş ve proksimal sinir ucundan rejenere

olan aksonların intakt sinirin epineuriumunu kullanarak distal sinir güdüğüne ulaştığını bildirmişlerdir (70). Özbek ve ark. tarafından yapılan çalışmada benzer bir model kullanılmış, ancak bu modelde epinöral pencere açılmamasına rağmen benzer sonuçlar elde edilmistir (71). Bu deneysel çalışmalarda peroneal sinir defektinin onarımında tibial sinir köprü olarak kullanılmıştır. Tibial sinir motor aksonlar içerdigi için peroneal sinirde motor fonksiyonun düzelmesini sağlayan aksonların kaynağı net olarak anlaşılamamıştır. Bu aksonlar peroneal sinirin proksimal ucundan rejenere olabileceği gibi, tibial sinirden aksopal filizlenme yoluyla da rejenere olmuş olabilir. Deneysel araştırmalarda oluşturulan sinir köprülerinde rejenere olan aksonların primer kaynağı hala açıklığa kavuşturulamamıştır.

2.6. Sinir Onarım Modellerinde Nörotrofik Faktörler ve Sinir Rejenerasyonunu Değerlendirme

Periferik sinirlerde meydana gelen total kesi yaralanmalarından sonra kesinin proksimalinde en distaldeki Ranvier düğümlerinden başlayan aksopal tomurcuklanmalar kesinin distaline girer ve hedef organla temas sağlamaya çalışılır. Aksonların distale hedef organa doğru ilerlemelerini hızlandıran en önemli etken, kesinin distalinde oluşan Wallerian dejenerasyonu ile buradan ve distal hedef organdan salınan nörotrofik faktörlerdir (72,73). Wallerian dejenerasyonda yaralanmanın distalindeki aksoplasma ve myelin temizlenir. Bu işlem kalsiyuma bağlı proteolitik enzimlerle yapılır, akson rejenerasyonu için yol hazırlanır. Wallerian dejenerasyon, makrofajların artması ve Schwann hücrelerinin proliferasyonunun tetiklenmesi ile başlar. Bu proliferasyon 3. gün pik yapar, 2

hafta sürer. Artan makrofajlar Schwann hücre tüpü debrislerini temizlerler . Aynı zamanda “interleukin-1” (IL-1) üreterek jenerasyon için gerekli olan “Nerve Growth Factor”(NGF), “insülin- Like Growth Factor” (ILGF) gibi nörotrofik faktörlerin salınması için stimulus yaratırlar. Prolifere olan Schwann hücreleri bazal membran tarafından sınırlanarak longitudinal kolonlar şeklinde birleşerek "Bunger bandı" nı oluştururlar. Bu destek hücreleri olarak da anılan makrofajlar ve Schwann hücreleri, laminin, fibronektin, NCAM gibi yapısal ve adeziv ekstrasellüler matriks moleküllerini üretirler . Aynı zamanda Schwann hücreleri de nörotrofik faktörler algırlar. Bunger bandı rejenere olan akson için kontakt etkileşim yaratır ve aksonun distale doğru ilerlemesini sağlar. Bu arada Schwann hücreleri üzerindeki reseptör sayısı da artar . Yapılan deneysel çalışmalarda Mitomisin C uygulanarak destek hücrelerinin proliferasyonu engellendiğinde, sinirlerde rejenerasyonun olmadığı görülmüştür.

Schwann hücreleri ve makrofajlar, periferik sinir rejenerasyonu için zorunlu hücreler olup, rejenerasyon sürecinde sayıları artar, biyoaktif moleküller salgırlar ve akson migrasyonu için gerekli olan iskelet yapıyı oluştururlar. Sinir yaralanması sonrası bifazik tarzda bir nörotrofik faktör olan “Nerve Growth Factor” (NGF) sentezlenir. İlk sentezlenme fazı, proksimal ve distal sinir uçlarında gerçekleşir ve yaralanmadan sonraki ilk 6 saatte olur. İkinci faz ise, yaralanmadan 2-3 gün sonra proliferen olan makrofaj ve Schwann hücrelerinin sayılarının artması ile korele olarak görülür.

Tıpkı NGF gibi diğer nörotrofik faktörler de, sinirin içinde olup yaralanma sonrası az miktarda açığa çıkarlar. Bunlar bir döngü başlatırlar ve pek çok

kaynaktan nörotrofik faktör salınır (Tablo-3). Denervasyon sonrası zamanla kas atrofisi ve bunun fonksiyonel sonuçları insanlarda ve hayvanlarda deneysel olarak çalışılmıştır. Periferik sinir rejenerasyonu gen terapi modellerinin gelişmesi ile karakteristik genetik markerlar tespit edilmiştir. Sinir yaralanması sonrasında belirli genlerin ekspresyonunda upregülasyon olduğu bilinmektedir. Bu genler primer cevap genleri (“primary response genes”, “immediate early genes”(İEG), “early response genes) olarak adlandırılırlar. Büyüme faktörleri yaralanma sonrasında verildiğinde İEG ekspresyonu engellenmiş olur. İEG ekspresyonu sonrasında intrasellüler Ca^{+2} ve CAMP artar.

İEG’lerden bazıları şunlardır; c-fos, c-jun ve jun-B. Sinir yaralanması ve ölümüne eşlik eden genlere diğer örnekler ise SGP-2 ve hsp-70’tir. Sinir yaralanmasını takiben sinirde ya ölüm ya atrofi ya da geri dönüş olur. Yaralanmış sinirin geri dönüşü büyüme ile ilgili genlerin ekspresyonu (growth related genes) ve çevresel büyüme ve yaşam sinyallerine bağlıdır.

Tablo 3. Nörotrofik faktörler

Nörotropinler	• Nerve Growth Factor (NGF) • Brain Derived Neurotrophic Factor (BDGF) • Nörotrofin 3 / 4 / 5 / 6
Nöropoetik Cytokinler	• İnterleukin –6 (IL – 6) • Central Nerve Trophic Factor (CNTF)
Fibroblast Growth Factor (FGF)	• Asidic • Basic
Diğerleri	• Insulin Like Growth Factor (ILGF) • Epidermal Growth Factor (EGF) • Leukemia Inhibiting Factor • Glial Derived Norötrophic Factor (GDGF) • Platelet Derived Nörotropic Factor (PDGF)

Çevresel faktörler nörotrofik faktörleri ve “neurite - promoting faktör” leri içerir. Gen terapi teknikleri ile nörotrofik faktörler ve “neurite -promoting faktör” ler elde edilerek sinir iyileşmesine pozitif katkıda bulunulur (2).

Deneysel sinir onarımı modellerinde sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için histoloji, morfometri, elektron mikroskopi, sinir ileti hızı ölçümü, kas kitlesi ölçümü ve elektromiyografi yöntemleri kullanılmaktadır (55). Fonksiyonel değerlendirme amacıyla da, yürüme analizi sonucu elde edilen siyatik fonksiyonel indeks ve peroneal fonksiyonel indeks (PFİ) kullanılmaktadır (74,75). Duyu

fonksiyonlarını değerlendirmek içinde cilt çimdikleme (skin pinch test) testi uygulanmaktadır (51).

2.7. Neural-Cell Adezyon Molekülü (NCAM)

Hücre adezyon moleküllerinin immünglobülin süperailesi yapısal olarak immünglobülin proteinleri ile yakın ilişki içindedir. Bu aile; ICAM (intrasellüler adezyon molekülü), NCAM (nöral hücre adezyon molekülü) ve NgCAM (nöral-gliyal adezyon molekülü)'n içeren yüzün üzerinde üyeye sahiptir. NCAM (CD56) ve NgCAM kalsiyumdan bağımsız adezyon molekülleridir. İlk hücre adezyon molekülü olması ile karakterize olan NCAM, gelişimin çok erken evrelerinde tüm nöronlar tarafından ve aynı zamanda glia, iskelet kası ve doğal katil hücrelerinden (NK) de eksprese edilir . Komşu hücreler üzerine homofilik olarak bağlanırlar ve nöral gelişim boyunca çok çeşitli fonksiyonları mevcuttur. Bu önemli fonksiyonlarından biri, nöronal dışa büyüme esnasında gelişmekte olan nöritleri bir arada tutmak ve nöral bağlantıları sağlamaktır. Gelişim ve plastisite sürecinde NCAM'ın adheziv özellikleri, regüle karbonhidrat ve polisiyalik asit (PSA) varlığında düzenlenir. Moleküle PSA'nın posttranslasyonel olarak eklenmesinin (NCAM-PSA), ğrenme ve hafıza fonksiyonu sürecinde sinaptik plastisiteye ve sinir rejenerasyonu mekanizmasına yol açtığı düşünülmektedir (76).

NCAM'ın nörit dışa büyümesini, fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) ve p59Fyn iletim yolu üzerinden etki ettiği düşünülmektedir. Anatomik patolojide, patologlar CD56 (NCAM)'yı belli tümörleri tanımak için immnohistokimyada kullanırlar. CD56 ile pozitif boyanan normal hücreler

arasında NK (natural killer) hücreleri, aktive T hücreleri, beyin, serebellum ve nöroendokrin dokular bulunur. CD56 pozitif tümörler: Myelom, myeloid lösemi, nöroendokrin tümörler, Wilms tümörü, erişkin nöroblastom, NK/T hücre lenfomaları, pankreatik asiner hücre karsinomu, feokromatisoma ve küçük hücreli akciğer karsinomudur. NCAM ayrıca deneysel antibiyotik temelli immünoterapide hedef molekül olarakta kullanılmıştır (77-81).

2.8. Sinir Rejenerasyonunu Değerlendirmek İçin Gerekli Süre

Sinir rejenerasyon sürecinin başarı ya da başarısızlıkla sonuçlanması hastanın yaşına, kesinin proksimal ya da distalde olmasına ve maksimum şartlar ve tekniklerle tamir yapılması gibi çevresel ve hücresel etkilere bağlıdır. Bu süreç, rejenere aksonların tamir sahasına kadar ilerlemesi, tamir sahasını geçmesi, distal güdükte hedef organa doğru ilerlemesi ve hedef organla aksonların yeniden bağlantı kurmaya başlaması ve fonksiyonel iyileşme basamaklarından oluşur. İnsan radial sinirinde yapılan bir çalışmada, dikiş işleminden sonra aksonların tamir sahasını geçmesi için geçen süre 4-5 hafta bulunmuştur. Belirtilen süreler en iyi şartlar için geçerlidir. Kesinin proksimalde olması ve tamir bölgesinde olabilecek perinöral fibrozisle iyileşme, rejenerasyonu yavaşlatarak sürenin daha da uzamasına neden olur (82-84).

Yapılan bir koaptasyon çalışmasında; alıcı nervus peronealis aracılı akson tomurcuklanmasına bağlı rezidü dokunma duyusunun ilgili innervasyon bölgesindeki değerlendirmelerinde 4 ile 9 ay arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Akson sayımları, bileşik aksiyon potansiyelleri ölçümleri ve retrograd sinir işaretlemesi göstermiştir ki; myelinli duyusal

aksonların ve myelinsiz aksonların alıcı sinir aracılı tomurcuklanması sırasıyla 2 ve 4 ayda büyük oranda tamamlanır ve sonraki en az 9 ay süresince sabit kalır (85). Yapılan değişik deneysel araştırmalarda, ratlardaki periferik sinir rejenerasyonun değerlendirmek için 12 hafta ideal süre olarak kabul edilmiştir (86-88).

2.9. Çalışmanın Amacı

Bu yüzyılın başında sağlam sinir ve yaralı sinir arasında end-to-side koaptasyonun cerrahi olarak yaratılması yaklaşımı ortaya atıldı. Fikir donör sinirin innerve ettiği bölgenin innervasyonu bozulmadan daha önceden denerve olan bölgenin reinnervasyonunu kollateral oluşumu ile sağlamaktır. Bu metodun ikinci bir olası faydası ise kısa mesafe reinnervasyonu için uzun sinir greftlerinden kaçınılmasıdır. İlerleyen yıllarda end-to-side koaptasyon (terminolateral nörorafi) bilimsel yayınlara; Viterbo ve arkadaşları ile Lundborg ve arkadaşları tarafından tekrar sokulana kadar minimum dikkat çekmişti. Bundan sonra end-to-side koaptasyonun onarıcı potansiyeli birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. End-to-side koaptasyon çalışmalarında periferik kökten motor ve duysal aksonların büyümesi gözlenmiştir. Kesilmiş bir sinirin end-to-side onarımı fonksiyonel motor innervasyonun oluşmasını sağladığı da gösterilmiştir. Birleşim yerinde epinörium ve perinöriumun çıkartılması reinnervasyon şansını attırdığı düşünülmektedir; ancak aksini savunan çalışmalarda mevcuttur. Yapılan bir deneysel çalışmada; dorsal kök ganglionlarındaki nöronal hücre kolonları ve spinal kordun motor sinir kolonları, distal sinirin rekonstrüksiyonu esnasında enjekte edilen belirteç ile işaretlenmiştir. İşaretlenmiş nöronlardan duysal

olanların motor olanlardan daha fazla miktarda olması nedeni ile, duyuşal nöronların distal kökte kollateral dallanmalarının daha fazla olduğu gösterilmiştir (51).

Bununla beraber end-to-side koaptasyon ile yaratılan sinir bağlantısında duyuşal iyileşmeyi araştıran çalışmalar hala sınırlıdır. Sıçanlardaki süral sinir hasarlanmalarında tibial sinirin motor sinir köprüsü olarak kullanıldığı çalışmalarda; çalışmanın etkinliği koaptasyon bölgesindeki aksonal rejenerasyonu histomorfometrik olarak gösterme, elektrofizyolojik testler ve nosiseptif cilt çimdikleme testi ile ayak derisinde ağrı duyarlılığının iyileşmesini belirleme parametreleri kullanılmış ve ilişkilendirilmiştir (51,89).

Daha önce yapılan bir çalışmada uç-yan koaptasyonu takiben dönör kasın yapısı ve fonksiyonu incelenirken denerve kas gruplarını tanımlamak için NCAM'e yönelik immünohistokimyasal boyama yapılmış ve elde edilen sonuçlar diğer parametreler ile ilişkilendirilmiştir (90).

Bu çalışmada ratlardaki duyuşal sinir defektlerinin onarımında motor sinir köprüsü kullanımının; denerve cilt bölgesindeki serbest sinir sonlanmalarına etkilerinin neural cell adhesion molecule (NCAM) kullanılarak saptanması amaçlanmış olup; bu konuyla ilgili daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirilecek çalışmada süral sinir defektini onarmada, tibial sinirin köprü olarak kullanıldığı end-to-side koaptasyon tekniğini; opere edilmemiş, süral sinirde defekt oluşturulmuş ve süral sinir defekti uç-uca onarılmış rat gruplarında karşılaştırmak ve etkililiğini ciltteki serbest sinir sonlanmalarında test etmek amaçlanmıştır. End organ (cilt) etkilerini test etmek

amacıyla tüm nöronlardan erken ve geç gelişimsel dönemde eksprese olan ve nöronlarla komşuluğu bulunan tüm hücrelerle bağlantısı bulunan NCAM aktivitesi kullanılacaktır. Çalışmanın temel amacı denerve alanlara sahip ratlardaki NCAM aktivitesinin innerve ve reinnerve olduğu düşünülen cilt bölgelerine sahip ratlardaki NCAM aktivitesiyle karşılaştırmaktır. Süral sinir aksonlarının %95 duyuşal olmasından dolayı bu sinir tibial sinirle uç-yan koapte edilmiş ve duyuşal sinirlerde meydana gelen defektlerin; motor sinir köprüleri kullanılarak uygulanan uç-yan koaptasyon metodu ile onarılabileceğini ve reinnervasyonun sağlanabileceğini göstermek amaçlanmıştır.

Ağrıya karşı cilt duyarlılığını test etmede nosiseptif cilt çimdikleme testi kullanılarak daha önce yapılmış araştırmalarda haritalanmış süral sinir innervasyon alanındaki denervasyon ve reinnervasyon başarısında test edilerek araştırmayı güçlendirmek bir başka amaç olarak öngörülmüştür (51,91).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın izniyle Gazi Üniversitesi Laboratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)'nden elde edilen, 300-350 gr ağırlığında, Sprague-Dawley cinsi 32 adet erkek sıçan kullanıldı ve standart laboratuar koşulları altında çalışıldı. Hayvanlar standart yem ile beslendi ve su verildi. Sıçanlar her bir grupta 8 hayvan olacak şekilde dört gruba ayrıldı.

3.1. Cerrahi işlemler

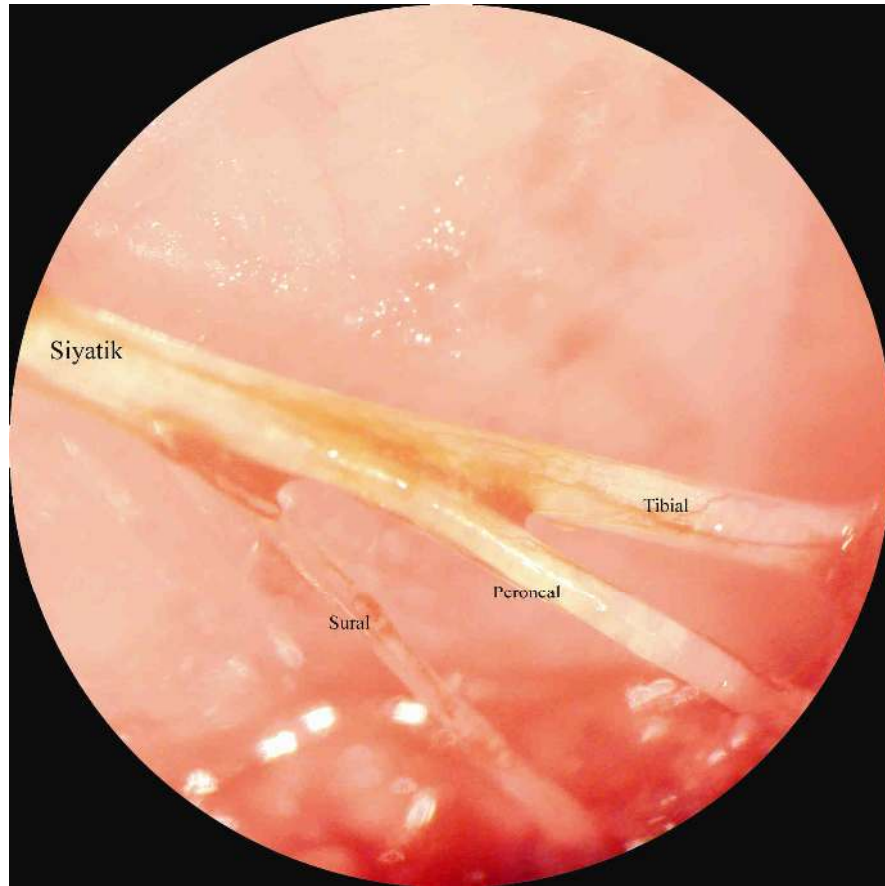
Tüm sıçanlara, 50mg/kg ketamin HCL (Ketalar Flakon, Pfizer Warner Lambert, İstanbul) ve 5mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer İlaç San., İstanbul) kombinasyonunun intramusküler enjeksiyonuyla gerçekleştirildi. Anestezinin idamesi gerektiğinde ilk dozun 1/3'ü miktarda ketamin HCL, intramusküler yoldan kullanıldı. Cerrahi işlemler cerrahi mikroskop (Zeiss Opmi 9-FC, West Germany) eşliğinde mikrocerrahi teknik kullanılarak gerçekleştirildi. Anesteziyi takiben, sıçanların sağ bacakları povidone iodine (Glividon, Bikar İlaç San, İstanbul) solüsyonu ile temizlendikten sonra girişim yapılacak saha açık kalacak şekilde üzeri steril örtü ile örtüldü. Cilt ve gluteal kas insizyonlarını takiben siyatik sinir ve dalları olan tibial, peroneal ve sürul sinirler bulunarak disseke edildi (Şekil-3). Daha sonra yapılan cerrahi işleme göre deney hayvanları 8'li gruplar halinde 4 gruba ayrıldı.

A Grubu: Opere edilmeyen deney hayvanları grubu (n=8)

B Grubu: Sural sinirinde defekt oluşturulan ve serbest sinir uçları komşu kaslar içine gömülen deney hayvanları grubu (n=8)

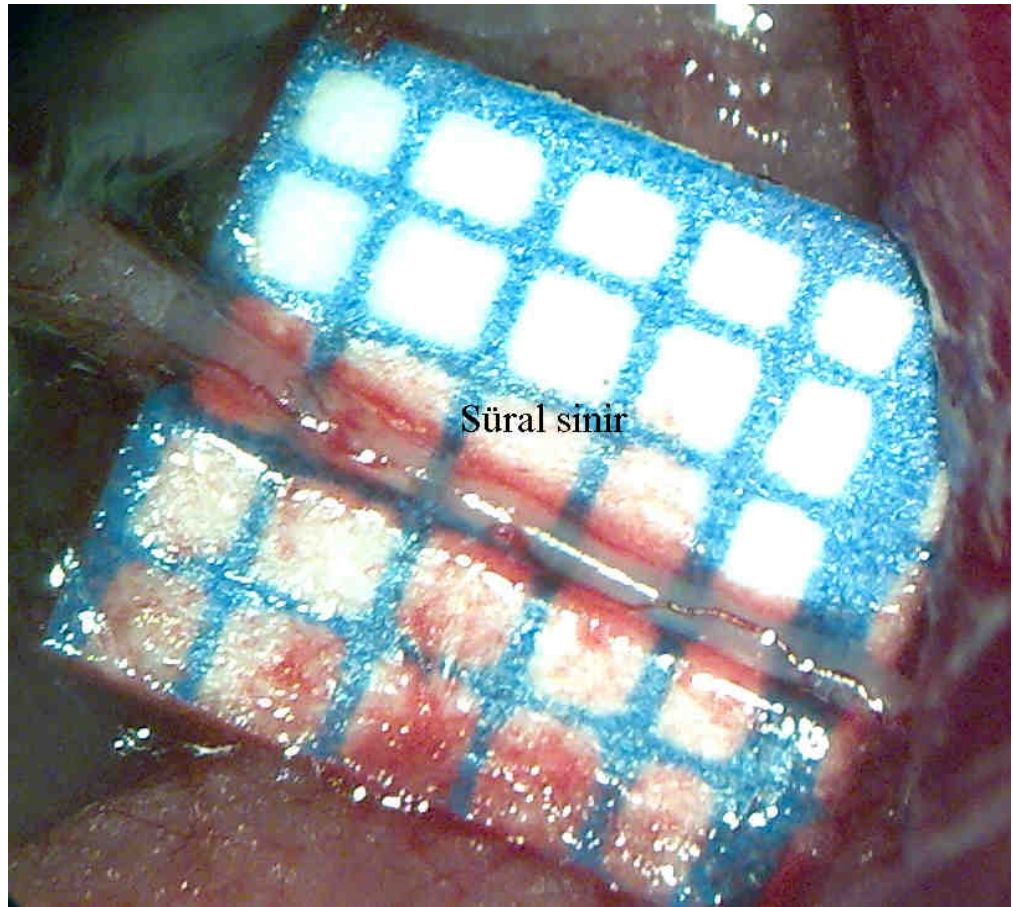
C Grubu: Sural sinirde defekt oluşturulup uç-uca koaptasyon metodu kullanılarak opere edilen deney hayvanları grubu (n=8)

D grubu: Defektli sural sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire end-to-side olarak koapte edilerek sural sinir defekti tibial sinir köprüsü ile onarılmış olan deney hayvanları grubu (n=8)

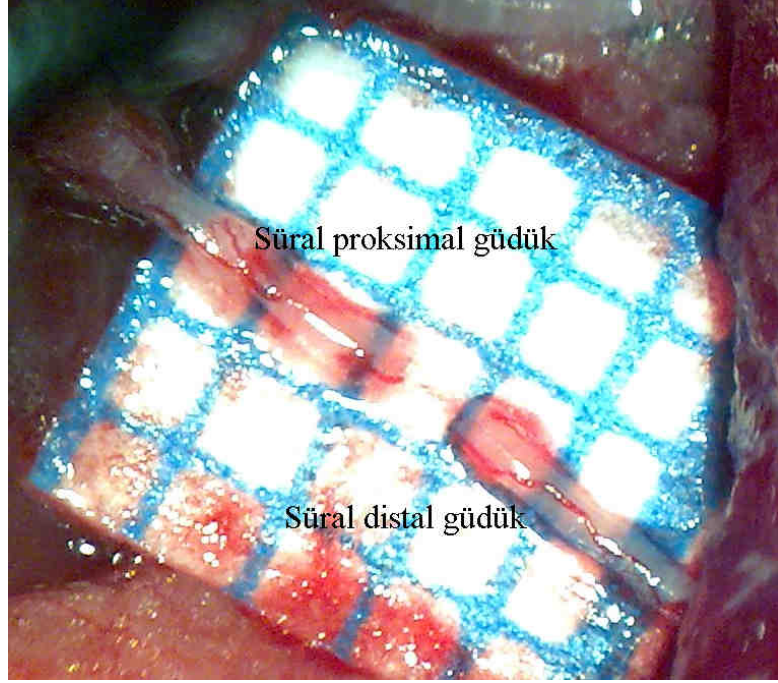


Şekil 3. Siyatik sinir ve ana dalları olan peroneal , tibial ve sural sinirin görünümü

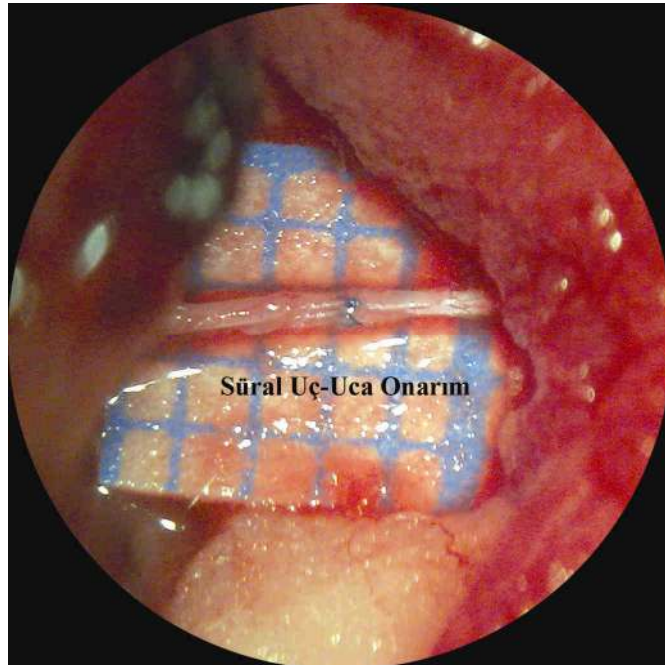
Süral sinir, bifurkasyonun yaklaşık 1 cm distalinden 15 nolu bisturi ile düzgünce kesildi ve proksimal ve distal sinir uçlarının epinöriumları korunarak onarım için uygun hale getirildi. Uç-uca koaptasyon çalışmasının rahat yapılabilmesi için peroneal ve tibial sinir ortamdan zarar verilmeksizin uygunca uzaklaştırıldı (Şekil4,5,6).



Şekil 4. Tibial ve peroneal sinirlerin uygun şekilde zarar verilmeksizin ortamdan uzaklaştırılmasını takiben intakt süral sinirin görünümü



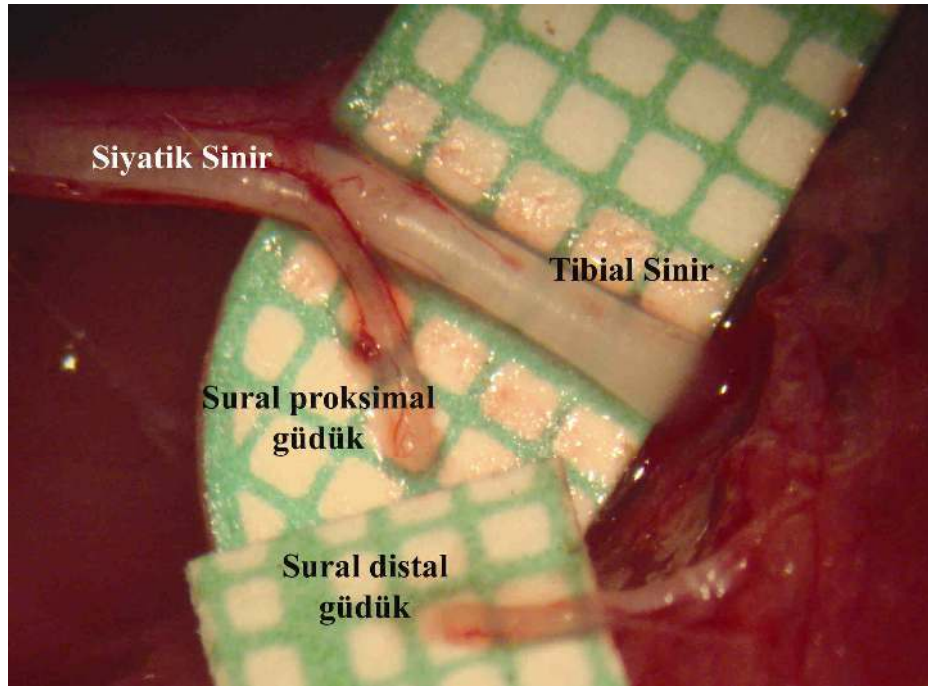
Şekil 5. Kesik süral sinir proksimal ve distal güdüklerin görünümü



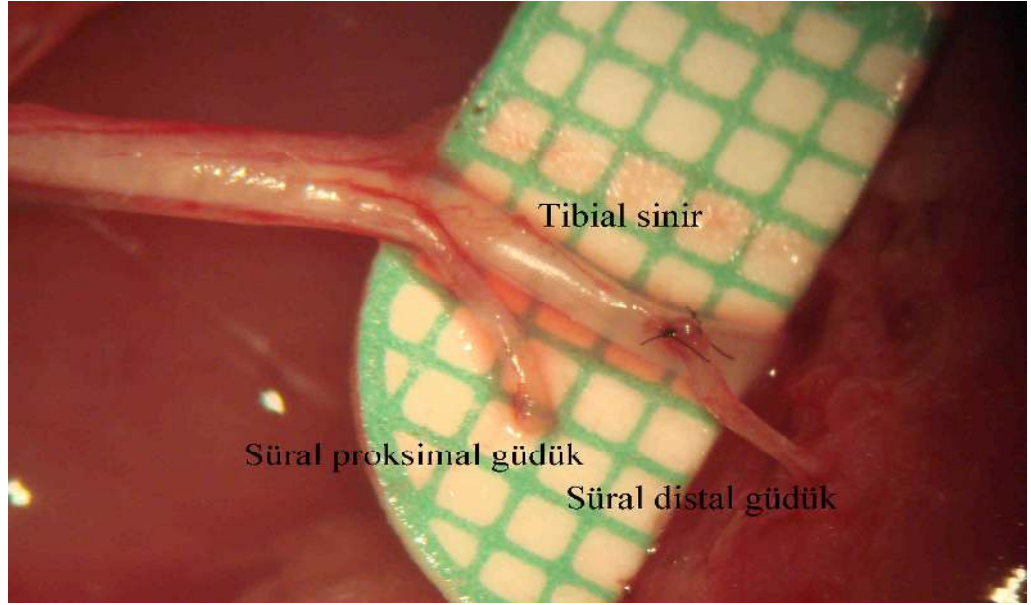
Şekil 6. Süral sinir uç-uca koaptasyon

Sural ve tibial sinir arasında yapılan end-to-side koaptasyonlar, tibial sinirin epinöriumuna pencere açılmaksızın yapıldı. Çalışmanın rahat yapılabilmesi için peroneal sinir hasar verilmeksizin ortamdaki uygun bir şekilde uzaklaştırıldı.

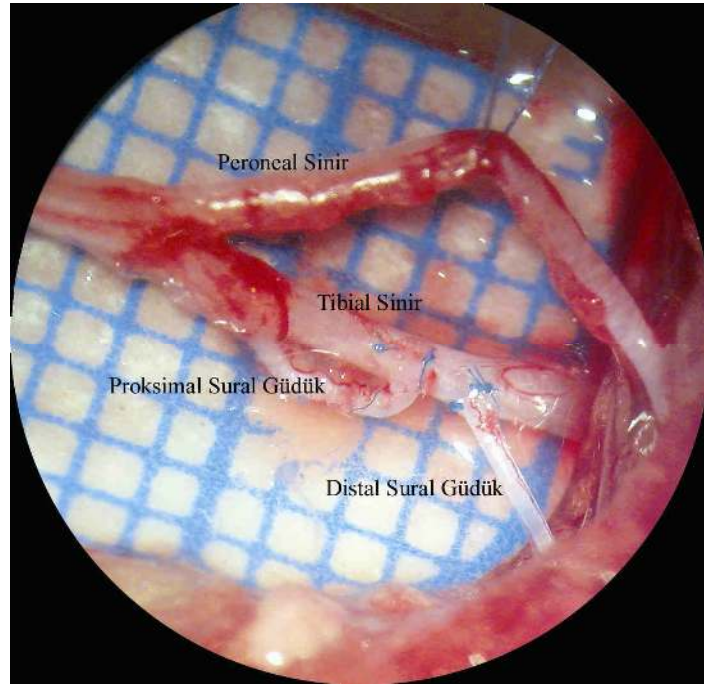
Koaptasyonlar yapılırken 10/0 naylon iplik (Ethilon 10/0, Ethicon Ltd U.K.) kullanıldı, cilt insizyonları 4/0 naylon iplik (Propilen 4/0, Dogsan) kapatıldı.(Şekil 7,8,9,10,11)



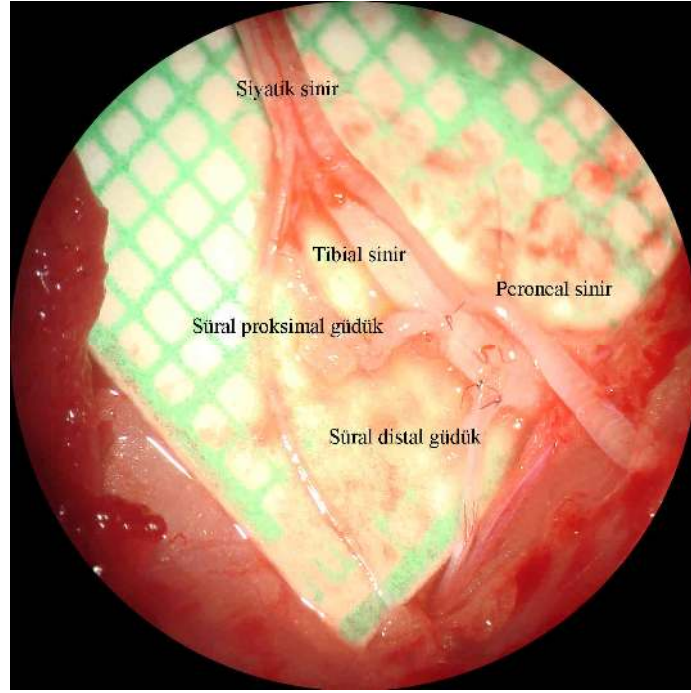
Şekil 7. Peroneal sinirin uzaklaştırılmasından sonra defektif sural sinirin görünümü



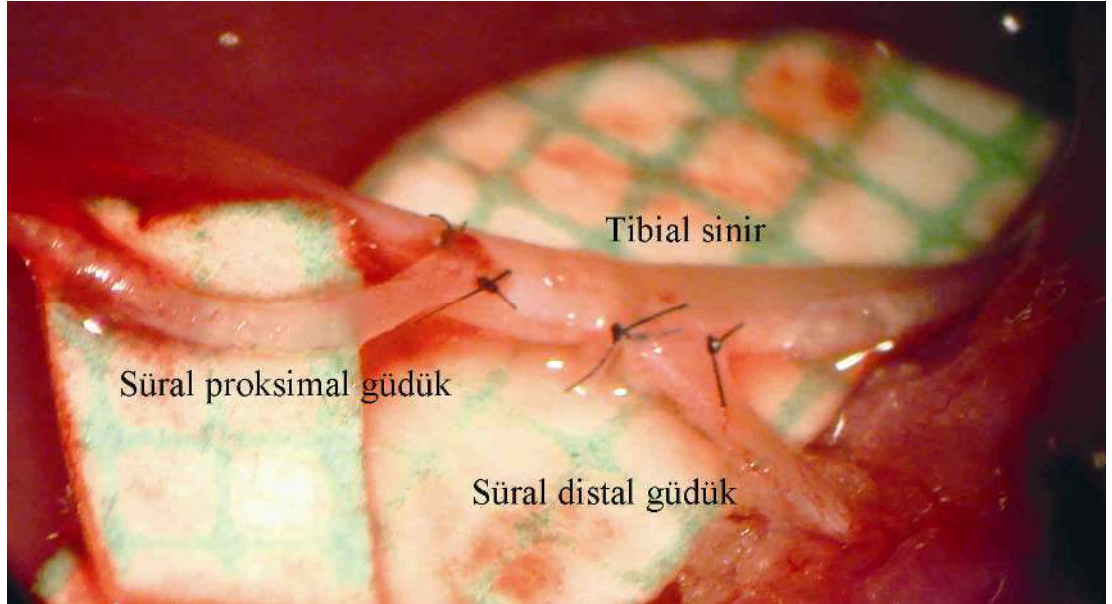
Şekil 8. Tibial sinire sural sinir distal güdüğünün end-to-side koapte edilmiş hali



Şekil 9. Defektli sural sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire klasik end-to-side koaptasyon metodu kullanılarak onarılmış deney hayvanı



Şekil 10. Defektli süral sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire klasik end-to-side koaptasyon metodu kullanılarak opere edilmiş deney hayvanı



Şekil 11. Defektli süral sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire klasik end-to-side koaptasyon metodu kullanılarak opere edilmiş deney hayvanı

Onikinci haftanın sonunda hayvanlar süral sinir innervasyon alanındaki ağrı duyarlılığını ve bu bölgedeki serbest sinir sonlanmalarındaki NCAM ekspresyonunu sayısal olarak değerlendirmek için immünohistokimyasal değerlendirmeye alındı. Bu amaçla sırasıyla aŗađıdaki iŗlemler yapıldı.

3.2. Duyusal Fonksiyon Testi:

Nosiseptif cilt çimdikleme testi (skin pinch test) ayak derisinde ağrı duyarlılığının iyileŗmesini belirlemede kullanılır. Süral sinir dermatomuna uyan cilt bölgesine klip (Yaŗargil-phynox anevrizma klibi; kapanma basıncı 188gr/cm², tolerans ağırlığı 162-198 gr/cm²), kullanılarak uyaran ( imdik) verildi. Uyaran vermek için klip kullanılmasının nedeni standart basınç uygulamak ve tekrarlayan kullanımlarda kapanıŗ basıncında değeriklik olmaması idi. Cilt  imdikleme testine karŗı verilen geri çekme refleksi (foot withdrawal) yanıtı her gruptaki hayvanlar için ayrı ayrı kaydedildi. Bacakta geri çekme refleksi gözlenmesi olumlu yanıt, gözlenmemesi olumsuz yanıt olarak kabul edildi ve ilgili cilt bölgesindeki innervasyon hakkında bilgi sağlamak amaçlandı.

Bu test cerrahinin 1. günü yapılmıŗ ve 4., 8. ve 12. haftalarda tekrarlanmıŗtır. Her bir grup içindeki deney hayvanları için elde edilen yanıtlar ayrı ayrı kaydedilmiŗtir (Tablo 4,5,6,7).

Tablo 4. A Grubundaki deney hayvanlarının cilt çimdikleme testi sonuçları

DENEKLER	1.GÜN	4.HAFTA	8. HAFTA	12. HAFTA
1 NOLU HAYVAN	+	+	+	+
2 NOLU HAYVAN	+	+	+	+
3 NOLU HAYVAN	+	+	+	+
4 NOLU HAYVAN	+	+	+	+
5 NOLU HAYVAN	+	+	+	+
6 NOLU HAYVAN	+	+	+	+
7 NOLU HAYVAN	+	+	+	+
8 NOLU HAYVAN	+	+	+	+

+ =POZİTİF YANIT - =NEGATİF YANIT

Tablo 5. B Grubundaki deney hayvanlarının cilt çimdikleme testi sonuçları

DENEKLER	1.GÜN	4.HAFTA	8. HAFTA	12. HAFTA
1 NOLU HAYVAN	-	-	-	-
2 NOLU HAYVAN	-	-	-	-
3 NOLU HAYVAN	-	-	-	-
4 NOLU HAYVAN	-	-	-	-
5NOLU HAYVAN	-	-	-	-
6NOLU HAYVAN	-	-	-	-
7NOLU HAYVAN	-	-	-	-
8NOLU HAYVAN	-	-	-	-

+ =POZİTİF YANIT - =NEGATİF YANIT

Tablo 6. C Grubundaki deney hayvanlarının cilt çimdikleme testi sonuçları

DENEKLER	1.GÜN	4.HAFTA	8. HAFTA	12. HAFTA
1 NOLU HAYVAN	-	-	+	+
2 NOLU HAYVAN	-	-	-	-
3 NOLU HAYVAN	-	+	+	+
4 NOLU HAYVAN	-	+	+	+
5NOLU HAYVAN	-	-	+	+
6NOLU HAYVAN	-	-	-	+
7NOLU HAYVAN	-	-	+	+
8NOLU HAYVAN	-	-	-	+

+ =POZİTİF YANIT - =NEGATİF YANIT

Tablo 7. D grubundaki deney hayvanlarının cilt çimdikleme testi sonuçları

DENEKLER	1.GÜN	4.HAFTA	8. HAFTA	12. HAFTA
1 NOLU HAYVAN	-	-	+	+
2 NOLU HAYVAN	-	-	-	+
3 NOLU HAYVAN	-	+	+	+
4 NOLU HAYVAN	-	+	+	-
5NOLU HAYVAN	-	+	+	+
6NOLU HAYVAN	-	-	-	+
7NOLU HAYVAN	-	-	-	+
8NOLU HAYVAN	-	-	-	+

+ =POZİTİF YANIT - =NEGATİF YANIT

3.3. Histolojik Değerlendirme:

Duyusal fonksiyon testlerinin yapılmasını takiben, hayvanlar yüksek doz anestezi madde ile sakrifiye edildi ve sürül sinirinin innerve ettiği cilt-ciltaltı bölgesi belirlendikten sonra bu bölgeden 0.5x0.5cm lik örnek alınarak %10 luk pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat ile tamponize edilmiş formaldehit içinde 3 gün süreyle tespit edildi. Dereceli etanol solüsyonları içinden geçirilerek dehidrate edilen dokular parafin içine gömülerek bloklandı. Hazırlanan bloklardan 4µ kalınlığında kesitler siyalinize lamalar (DakoCytomation S3003) üzerine alındı. Deparafinizasyondan sonra indirekt immunohistokimya tekniği uygulandı. Bu teknikte deparafinizasyondan sonra, önce kesitler dereceli etanol solüsyonları içinden geçirilerek rehidrate edildi. %3 lük hidrojen peroksit ile blokajdan sonra primer antikor olarak anti-NCAM (Anti-Neural cell adhesion molecule, Chemicon Kat no: AB5032) ve sekonder antikor olarak anti-polyvalent, HRP (Lab Vision TP-060) ve kromojen olarak da (Lab Vision UltraVisionPlus detection system DAB plus substrate system TA-125) kullanıldı. Anti- NCAM ile işaretli her kesitten x 20 büyütmede 5 farklı alan fotoğraflandı (Leica kamera DC490,

Germany) ve bu alanlarda anti-NCAM işaretli serbest sinir sonlanmaları ışık mikroskobu (Leica DM 6000B mikroskop, Germany) yardımıyla sayıldı (Tablo 8, 9, 10, 11).

Tablo 8. A Grubundaki deney hayvanlarında sür al sinir in innerve ettiği cilt bölgelerinde ekprese olan Anti-NCAM ile işaretlenmiş serbest sinir sonlanmalarının sayısal değ erleri

DENEKLER	1 NOLU ALAN	2 NOLU ALAN	3 NOLU ALAN	4 NOLU ALAN	5 NOLU ALAN
1 NOLU HAYVAN	34	35	21	32	38
2 NOLU HAYVAN	34	40	22	17	28
3 NOLU HAYVAN	27	22	29	21	21
4 NOLU HAYVAN	54	15	19	19	30
5NOLU HAYVAN	26	23	32	30	26
6NOLU HAYVAN	19	34	15	48	45
7NOLU HAYVAN	21	13	24	17	17
8NOLU HAYVAN	22	12	25	16	18

Tablo 9. B Grubundaki deney hayvanlarında sür al sinir in innerve ettiği cilt bölgelerinde ekprese olan ve Anti-NCAM ile işaretlenmiş serbest sinir sonlanmalarının sayısal değ erleri

DENEKLER	1 NOLU ALAN	2 NOLU ALAN	3 NOLU ALAN	4 NOLU ALAN	5 NOLU ALAN
1 NOLU HAYVAN	20	3	15	3	2
2 NOLU HAYVAN	10	5	6	7	14
3 NOLU HAYVAN	10	5	15	9	12
4 NOLU HAYVAN	6	4	7	6	9
5NOLU HAYVAN	11	17	7	7	5
6NOLU HAYVAN	11	12	14	9	11
7NOLU HAYVAN	3	6	5	10	3
8NOLU HAYVAN	4	7	12	10	8

Tablo 10. C Grubundaki deney hayvanlarında süräl sinirin innerve ettiği cilt bölgelerinde ekprese olan ve Anti-NCAM ile işaretlenmiş serbest sinir sonlanmalarının sayısal değeri

DENEKLER	1 NOLU ALAN	2 NOLU ALAN	3 NOLU ALAN	4 NOLU ALAN	5 NOLU ALAN
1 NOLU HAYVAN	2	4	2	3	2
2 NOLU HAYVAN	5	9	4	6	17
3 NOLU HAYVAN	42	15	5	16	45
4 NOLU HAYVAN	5	5	5	6	8
5NOLU HAYVAN	14	13	6	20	5
6NOLU HAYVAN	12	10	11	5	6
7NOLU HAYVAN	7	5	3	10	2
8NOLU HAYVAN	11	15	8	8	6

Tablo 11. D Grubundaki deney hayvanlarında süräl sinirin innerve ettiği cilt bölgelerinde ekprese olan ve Anti-NCAM ile işaretlenmiş serbest sinir sonlanmalarının sayısal değeri

DENEKLER	1 NOLU ALAN	2 NOLU ALAN	3 NOLU ALAN	4 NOLU ALAN	5 NOLU ALAN
1 NOLU HAYVAN	4	10	20	9	9
2 NOLU HAYVAN	16	6	7	16	13
3 NOLU HAYVAN	21	15	9	16	33
4 NOLU HAYVAN	24	27	14	22	15
5NOLU HAYVAN	14	17	18	14	13
6NOLU HAYVAN	16	15	15	11	9
7NOLU HAYVAN	10	17	15	20	27
8NOLU HAYVAN	22	28	18	21	19

3.4. İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel analizler Windows için SPSS 15.0 programı kullanılarak yapıldı. Serbest sinir uçlarından ekprese olan NCAM için sayımı yapılan beş farklı alandan elde olunan değerlerin ortalamaları alınarak; gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Gruplar arası ikili karşılaştırmalar için Dunn testi kullanıldı. Cilt çimdikleme testinin zaman içindeki karşılaştırması ise Cochran Q testi ile yapıldı. P değeri 0,05'in altındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

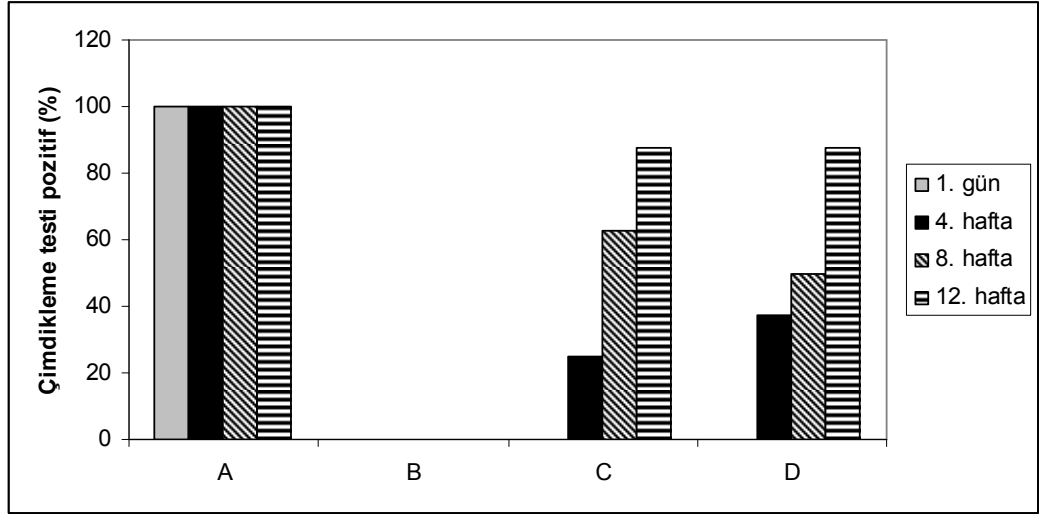
4.1. Duyusal fonksiyon testi:

Deneye katılan tüm hayvanlara postoperatif 1.gün, 4.hafta, 8.hafta ve 12.hafta sonunda yapılan cilt çimdikleme testi sonunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; A ve B gruplarında değişim olmadığı için istatistiksel test yapılamazken A grubundaki tüm hayvanlarda olumlu yanıt alınmış olup B grubundaki tüm hayvanlarda olumsuz yanıt alınmıştır. Bu sonuçlara göre; innerve kabul edilen A grubunda duyusal fonksiyon %100 iken, denerve kabul edilen B grubunda duyusal fonksiyon %0 olarak bulunmuştur. C ve D gruplarında yapılan istatistiksel analize göre; duyusal fonksiyon testinin uygulanma zamanına göre verilen yanıtta değişim anlamlı bulunmuştur (C grubunda $p=0,002$, D grubunda $p=0,009$). C ve D gruplarının duyusal fonksiyon testine verdiği yanıtlar arasında ise fark bulunmamıştır(Tablo-12).

Tablo 12. Cilt çimdikleme testi bulguları

	1. Gün	4. hafta	8. hafta	12. hafta
A	%100 olumlu	%100 olumlu	%100 olumlu	%100 olumlu
B	%100 olumsuz	%100 olumsuz	%100 olumsuz	%100 olumsuz
C	%0 olumlu	%25 olumlu	%62,5 olumlu	%87,5 olumlu
D	%0 olumlu	%37,5 olumlu	%50 olumlu	%87,5 olumlu

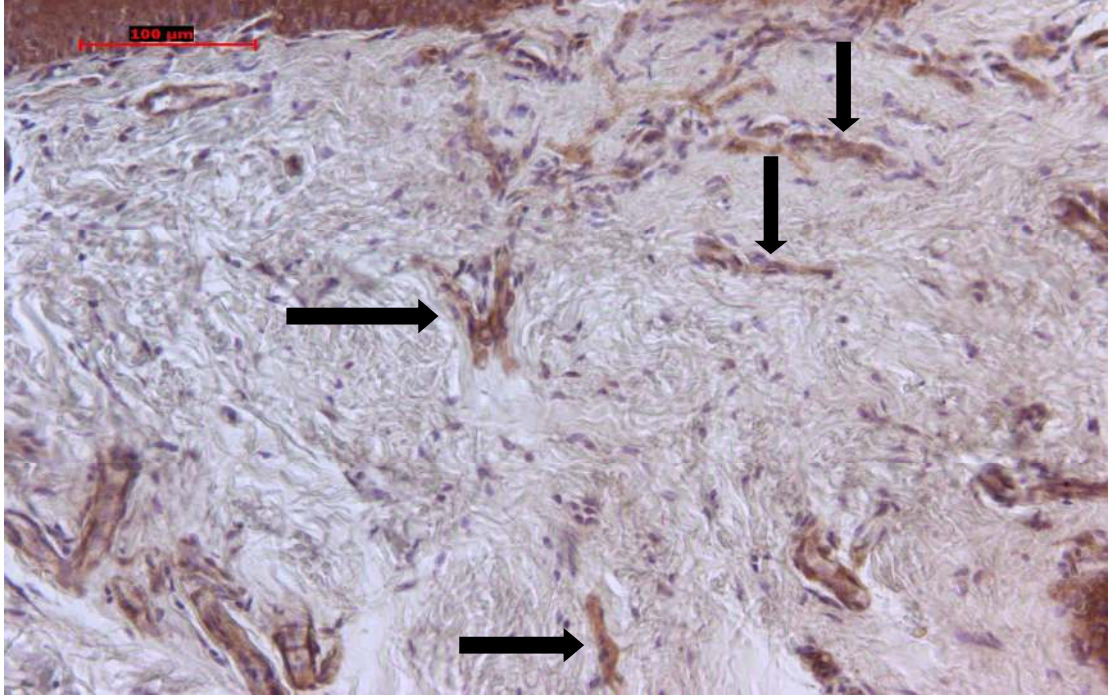
C grubunda $p=0,002$, D grubunda $p=0,009$. (Cochran Q testi)



Şekil 12. Cilt çimdikleme testi bulgularının şematik görünümü

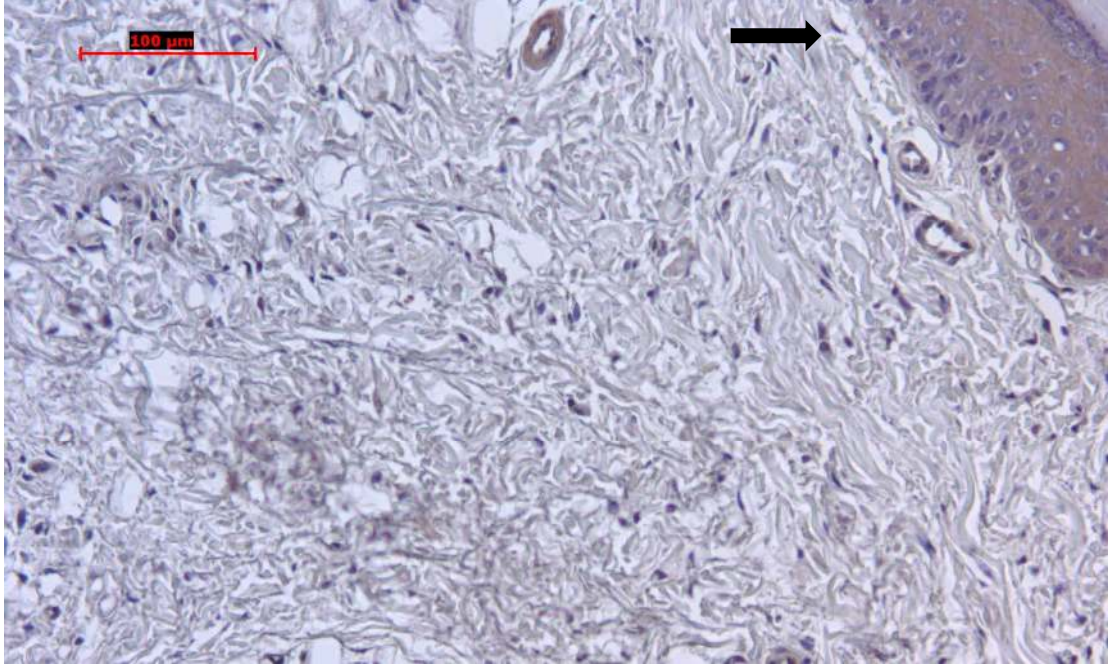
4.2.Histomorfometrik Analiz: Histomorfometrik değerlendirmede elde edilen değerlere göre gruplar arasında farklılık bulunmuştur ($p=0,00009$). Gruplar arasındaki farkı bulabilmek için yapılan ikili karşılaştırmalardan elde edilen değerler dikkate alındığında A-B, A-C, B-D ve C-D grupları arasındaki farklılık anlamlı idi.

Opere edilmeyen ve innerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubundaki (A Grubu) NCAM ekspresyonu; sürü sinirinde defekt oluşturulan ve denerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubuna (B Grubu) göre anlamlı farklılık taşımaktaydı ($p=0,0000356$).



Şekil 13. A grubuna ait mikrografta okla işaretli Anti-NCAM pozitif serbest sinir sonlanmaları izlenmektedir. (Orijinal büyütme, x20, indirekt immunohistokimya)

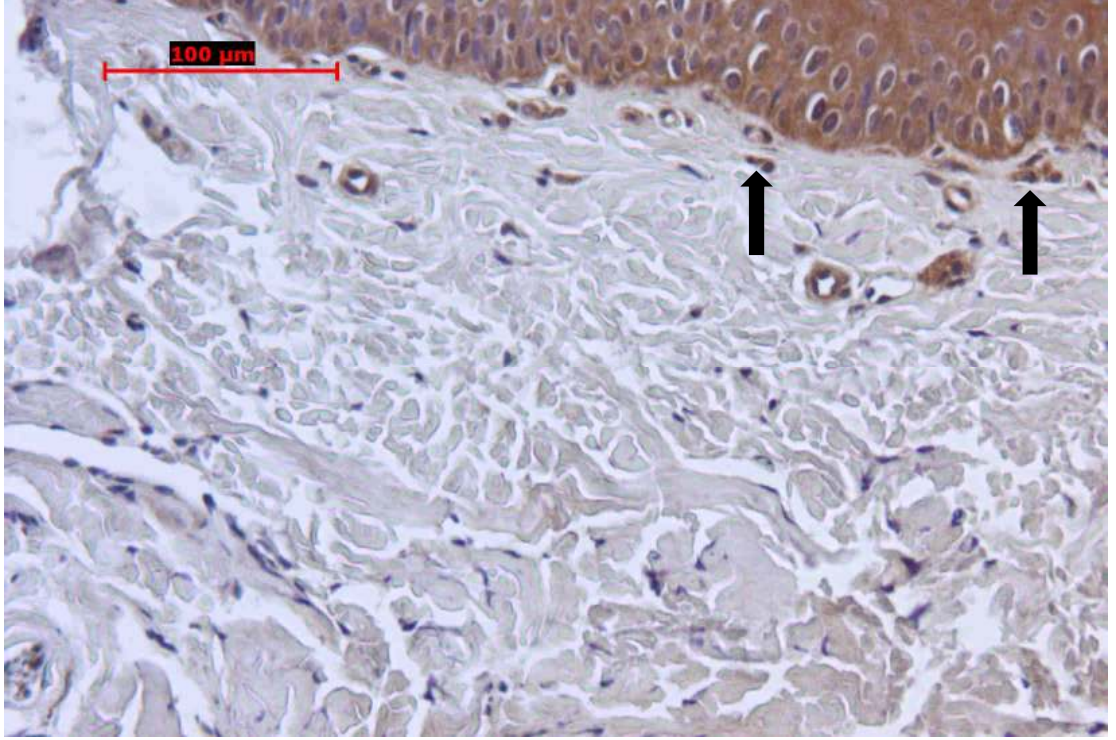
Opere edilmeyen ve innerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubundaki (A Grubu) NCAM ekspresyonu; sürüal sinirde defekt oluşturulup uç-uca koaptasyon metodu kullanılarak opere edilip reinnervasyon amaçlanan deney hayvanları grubuna (C Grubu) göre anlamlı fark taşımaktaydı ($p=0,0001$).



Şekil 14. B grubuna ait mikrografta okla işaretli Anti-NCAM pozitif serbest sinir sonlanması izlenmektedir. (Orijinal büyütme, x20, indirekt immunohistokimya)

Opere edilmeyen ve innerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubundaki (A Grubu) NCAM ekspresyonu; Defektli süral sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire uç-yan olarak koapte edilerek süral sinir defekti tibial sinir köprüsü ile onarılmış olan ve reinnervasyon amaçlanan deney hayvanları grubundaki(D Grubu) NCAM ekspresyonu arasında anlamlı fark yoktu.

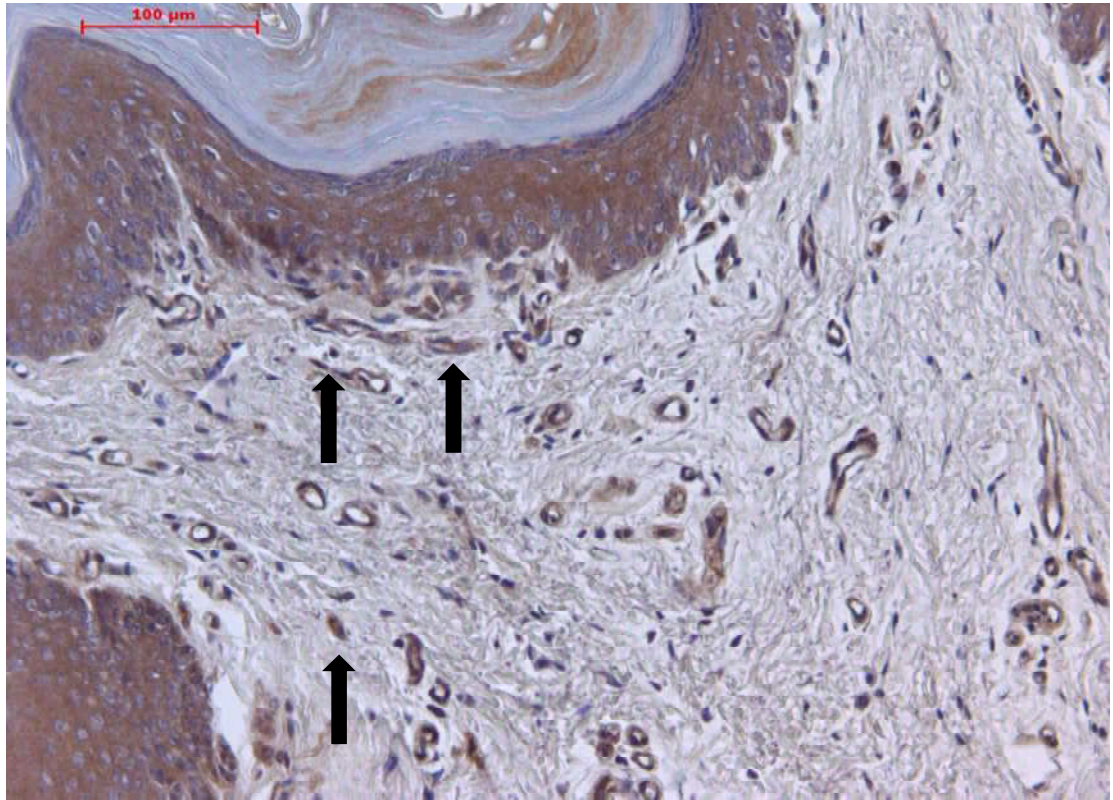
Süral sinirinde defekt oluşturularak denerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubundaki (B Grubu) NCAM ekspresyonu ile süral sinirde defekt oluşturulup uç-uca koaptasyon metodu kullanılarak reinnervasyon amaçlanan deney hayvanları grubundaki (C Grubu) NCAM ekspresyonu arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0,401$).



Şekil 15. C grubuna ait mikrografta okla işaretli Anti-NCAM pozitif serbest sinir sonlanmaları izlenmektedir. (Orijinal büyütme, x20, indirekt immunohistokimya)

Süral sinirinde defekt oluşturularak denerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubundaki (B Grubu) NCAM ekspresyonu ile defektli süral sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire uç-yan olarak koapte edilerek süral sinir defekti tibial sinir köprüsü ile onarılmış olan ve reinnervasyon amaçlanan deney hayvanları grubundaki (D Grubu) NCAM ekspresyonu arasındaki fark anlamlı idi ($p=0,0085$).

Süral sinirde defekt oluşturulup uç-uca koaptasyon metodu kullanılarak reinnervasyon amaçlanan deney hayvanları grubundaki (C Grubu) NCAM ekspresyonu ile defektli süral sinirin proksimal ve distal uçları intakt tibial sinire uç-yan olarak koapte edilerek süral sinir defekti tibial sinir köprüsü ile onarılmış olan ve reinnervasyon amaçlanan deney hayvanları grubundaki (D Grubu) NCAM ekspresyonu arasındaki fark anlamlı idi ($p=0,016$).



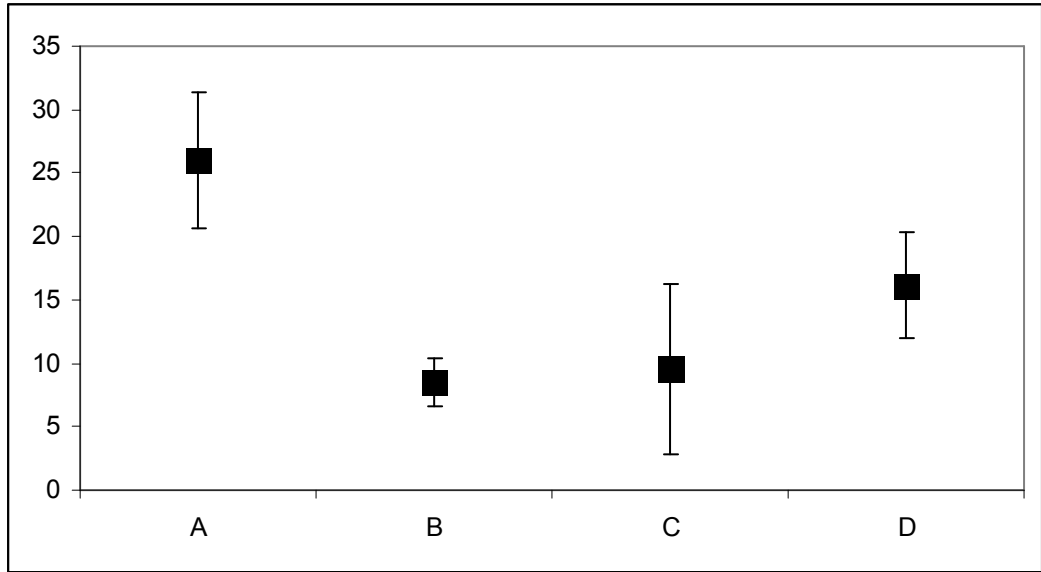
Şekil 16. D grubuna ait mikrografta okla işaretli Anti-NCAM pozitif serbest sinir sonlanmaları izlenmektedir. (Orijinal büyütme, x20, indirekt immunohistokimya)

Tablo 13. Kruskal Wallis testi ($p=0,00009$)

Grup	n	Ort±Std. sapma	Median	Minimum	Maksimum
A	8	26,1±5,3	27,4	18,4	32,2
B	8	8,5±1,9	8,5	5,4	11,4
C	8	9,6±6,7	8,5	2,6	24,6
D	8	16,1±4,2	16,5	10,4	21,6

Tablo 14. Dunn testinden elde edilen p değerleri

Grup karşılaştırmaları	P değerleri
A-B	p=0,0000356
A-C	p=0,0001
A-D	p=0,0563
B-C	p=0,401
B-D	p=0,0085
C-D	p=0,016



Şekil 17. NCAM ekspresyonun her grup için bulunan ortalama değerlerinin şematik dağılımı

5. TARTIŞMA

Uç-yan sinir onarımı, uzun segmental sinir defektleri ya da proksimal sinir güdüğünün bulunamadığı sinir yaralanmalarının onarımında kullanılan bir metottur. İlk kez Ballance ve ark. tarafından bildirilmiş olup, Viterbo'nun başarılı sonuçları bildirmesi ile popülerize olmuştur (53,54). Bazı otörlerin, bu yöntemi sinir onarımına alternatif bir yol olarak kabul etmesine karşın, bir kısmı da bu yöntem sonucu duysal ve motor fonksiyonda sınırlı bir iyileşme olduğunu ileri sürmüştür (68,92,93). Motor aksonların, duysal aksonlara göre daha iyi bir rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (94).

Travmayı takiben, periferik sinir aksonlarının, santral sinir aksonlarına göre daha iyi rejenere olduğu gösterilmiştir. Lezyonun distalindeki sinir segmentinde makrofajlar tarafından miyelin kılıfının yıkılmasından sonra, schwann hücre kolonları oluşur ve rejenere olan aksonlar schwann hücre yüzeylerini izlerler. Distal sinir güdüğündeki schwann hücreleri tarafından salınan nörotrofik hormonların, periferik sinir rejenerasyonunu indüklediği bildirilmiştir (60,28).

Periferik sinir rejenerasyonu ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına rağmen, end-to-side koaptasyon yapılarak onarılan saf bir duyu sinirinin innervasyon alanındaki serbest sinir sonlanmalarındaki NCAM ekspresyonu ile ilgili çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma yapılırken şu hipotezler ortaya konulmuş ve deneysel olarak desteklenmeye çalışılmıştır.

1. İnnerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubu ile denerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubu arasında ilgili cilt bölgesindeki serbest sinir sonlanmalarında NCAM ekspresyonu açısından anlamlı fark olacağı öngörülmüştür.

2. Opere edilmeyen deney hayvanları grubu ile reinnerve edilen deney hayvanları grubu arasında ilgili cilt bölgesindeki serbest sinir sonlanmalarında NCAM ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmayacağı öngörülmüştür.

3. Deneyssel olarak denervasyon yaratılan deney hayvanları grubu ile reinnerve edilen deney hayvanları grubu arasında ilgili cilt bölgesindeki serbest sinir sonlanmalarında NCAM ekspresyonu açısından anlamlı farklılık olacağı öngörülmüştür.

4. İnnerve ve reinnerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubunda duyuusal fonksiyon testine olumlu yanıt alınması beklenirken; denerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubunda olumsuz yanıt alınacağı düşünölmüştür.

5. Reinnerve edilen deney hayvanlarındaki duyuusal fonksiyon testine verilen yanıt, operasyon sonrasındaki ilerleyen zaman içerisinde olumlu yönde ilerlemesi beklenmiştir.

NCAM (CD56) kalsiyumdan bağımsız adezyon molekülüdür. İlk hücre adezyon molekülü olması ile karakterize olan NCAM, gelişimin çok erken evrelerinde tüm nöronlar tarafından ve aynı zamanda glia, iskelet kası ve doğal katil hücrelerinden (NK) de eksprese edilir . Komşu hücreler üzerine homofilik olarak bağlanırlar ve nöral gelişim boyunca çok çeşitli fonksiyonları mevcuttur.

Bu önemli fonksiyonlarından biri, nöronal dışı büyüme esnasında gelişmekte olan nöritleri bir arada tutmak ve nöral bağlantıları sağlamaktır.

Gelişim ve plastisite sürecinde NCAM'ın adheziv özellikleri, regüle karbonhidrat ve polisialik asit (PSA) varlığında düzenlenir. Moleküle PSA'nın posttranslasyonel olarak eklenmesinin (NCAM-PSA), öğrenme ve hafıza fonksiyonu sürecinde sinaptik plastisiteye ve sinir rejenerasyonu mekanizmasına yol açtığı düşünülmektedir (79). CD56 (NCAM)'yı belli tümörleri tanımak için immünohistokimya kullanırlar. CD56 ile pozitif boyanan normal hücreler arasında NK hücreleri, aktive T hücreleri, beyin, serebellum ve nöroendokrin dokular bulunur (81).

Yaptığımız çalışmada innerve cilt bölgelerine sahip A grubundaki deney hayvanları ile denerve cilt bölgelerine sahip B grubundaki deney hayvanlarının NCAM ekspresyonu anlamlı olarak farklı idi. A grubundaki NCAM ekspresyonu B grubundan belirgin olarak fazla bulundu. A grubundaki deney hayvanlarında aksonal devamlılık mevcutken; B grubundaki deney hayvanlarında aksonal devamlılık deneysel olarak yok edildi. Böylece denerve cilt bölgelerindeki nöral bağlantıların devamlılığı ve NCAM ekspresyonu azalmış oldu. Daha önceki çalışmalarda da NCAM'ın fonksiyonları içerisinde akson büyümesi, hücre migrasyonu, sinaptik plastisite, nöronal büyüme, nöronal dışı büyüme esnasında gelişmekte olan nöritleri bir arada tutmak ve nöral bağlantıları sağlamak ile sinaptogenez olduğu gösterilmiştir (76,95). Çalışmamızın bu kısmında elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmaları destekler nitelikteydi. Bu iki gruptaki deney hayvanları duyuşal fonksiyon testine (cilt çimdikleme testi) tabi tutulduğunda ise

A grubundaki tüm hayvanlarda olumlu yanıt alınırken, B grubundaki tüm hayvanlarda olumsuz yanıt alınmıştır. Her iki grupta sonuçlar beklenildiği gibi zaman içerisinde değişmezken; B grubundaki hayvanlarda amaçlanan denervasyonun başarılı olduğunun göstergesi olarak kabul edildi. Bu sonuçta; daha önce yapılmış çalışmalarda gösterilen sürül sinir innervasyon alanının doğruluğunu ve denerve cilt bölgelerindeki duyuşal fonksiyon testinin (cilt çimdikleme testi) olumsuz olacağı savını destekler nitelikteydi (51,85,91).

Yapılan istatistiksel çalışmaya göre A grubundaki NCAM ekspresyonu; C grubuna göre anlamlı fark gözlenirken, D grubuna göre anlamlı fark saptanmadı. Bu sonuç NCAM ekspresyonunun end-to-side koaptasyon grubunda (D grubu) uç-uca koaptasyon grubuna (C grubu) göre belirgin olarak arttığını göstermekteydi. Bu gruplara yapılan duyuşal fonksiyon testinin (cilt çimdikleme testi) sonuçlarına bakıldığında onikinci haftanın sonunda iki grup arasında fark bulunmazken reinnervasyonun uç-uca koaptasyon (C grubu) grubunda zaman içerisinde daha erken iyileşme gösterdiği saptandı. Duyuşal fonksiyon testine göre reinnervasyon her iki grupta sağlanmışken; NCAM ekspresyonu end-to-side koaptasyonu destekler nitelikteydi. Yine B ve C grupları arasında NCAM ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmamış olması ile B ve D grupları arasında NCAM ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmuş olmasıda bunu destekler nitelikteydi. C ve D gruplarının NCAM ekspresyonu açısından yapılan istatistiksel analizde yine end-to-side koaptasyonu destekler nitelikteydi.

Bu sonuçlara göre innerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubu ile denerve cilt bölgelerine sahip deney hayvanları grubu arasındaki ilgili cilt

bölgesindeki serbest sinir sonlanmalarında NCAM ekspresyonu açısından anlamlı fark olacağı hipotezi desteklenmiş oldu. Ancak A grubu ile C ve D grupları arasındaki NCAM ekspresyonu açısından yapılan karşılaştırmalar ile; B grubu ile C ve D grupları arasındaki NCAM ekspresyonu açısından yapılan karşılaştırmalarda C grubu öngörülen hipotezin dışında kalmıştır.

Yapılan bir çalışmada end-to side koaptasyon sonrası akut dönemdeki (2.hafta) denerve kas gruplarını göstermek için NCAM ekspresyonu kullanılmış ve denerve kas gruplarında NCAM ekspresyonunda 5 kat artış izlenmiş (90). Ancak bizim yaptığımız çalışmada denerve cilt bölgelerindeki serbest sinir sonlanmalarından elde edilen NCAM ekspresyonunda belirgin azalma izlenmişken; uç-uca koaptasyon metodu ile reinnerve edilen cilt bölgelerinde NCAM ekspresyonu anlamlı olarak artmamış ancak end-to-side koaptasyon metodu kullanılarak reinnerve edilen cilt bölgelerindeki NCAM ekspresyonu anlamlı artış sergilemiştir. Periferik sinir onarımında uç-uca onarım altın standarttır ve uç-uca onarımın mümkün olmadığı durumlarda end-to-side onarım alternatif onarım metodu olarak geliştirilmiştir (96). Ancak bizim yaptığımız çalışmada NCAM ekspresyonu açısından end-to-side koaptasyon metodu daha anlamlı sonuçlar vermiştir. .

Daha önce yapılan değişik çalışmalarda; end-to-side koaptasyon yapılan intakt komşu sinirin aksonlarından kollateral olarak tomurcuklanan yeni aksonların, rejenere aksonların kaynağı olabileceği öne sürülmüştür (97). Motor sinir defektinin onarımında saf bir duyuşal sinir kullanılarak yapılan bir başka çalışmada; rejenere olarak distal sinir güdüğüne ulaşan ve fonksiyonel iyileşmeyi

sağlayan aksonların kaynağının sadece proksimal sinir güdüğü olabileceği görüşü ileri sürülmüştür (96). Bizim yaptığımız çalışmada da reinnerve edilen her iki grupta (C ve D grubu) duyuusal fonksiyon testlerinde başarı sağlanmışken; NCAM ekspresyonunun uç-uca anastomoz grubunda artmamış olması yeni rejenere olan aksonların kaynağının sadece proksimal uç olması olarak düşünülebilir. Yaptığımız çalışmanın end-to-side koaptasyon grubunda ise rejenere olan aksonların kaynağının proksimal süral sinir güdüğü ile birlikte köprü olarak kullanılan tibial sinir olabileceği ve NCAM ekspresyonunun bu nedenle daha fazla olduğu düşünülmüştür.

End-to-side sinir onarımında motor aksonların, duyuusal aksonlara göre daha iyi bir rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu bildiren çalışmaların tersine duyuusal aksonlarda daha iyi rejenerasyon olduğunu bildiren çalışmalarda mevcuttur (94,98). Bizim yaptığımız çalışma ile, duyuusal sinir defektini onarmada kullanılan end-to-side onarım metodunun başarısını; duyuusal fonksiyon testi ile desteklenmiş NCAM ekspresyonuyla göstermede yararlı olduğu düşüncesi ortaya çıkmıştır.

Duyu siniri tamirinin sonucu, sadece tamir sırasındaki fasiküllerin düzenlenmesine bağlı değildir. İdeal olan, kesik sinir fibrilleri tamirden sonra kesi alanını geçip orijinal duyu son (end) organına ulaşmasıdır. Ancak birçok fibril yaralanma öncesine göre farklı duyu son organında sonlanır. Örneğin, yapılan bir çalışmada görülmüştür ki N. medianus'un bilek seviyesindeki kesisi onarıldığında ikinci parmak distal falanks radial kısmının vibrasyon duyusunu taşıyan lifler üçüncü parmak distal falanks ulnar kısmındaki “Paciniain corpuskülleri”ne

ulaşmıştır. Beyin hızla ilerleyen fibrillerden gelen yeni uyarıları alır ve topografik çevreye göre anlamlandırır. Bu olaya "duyusal yeniden öğrenim-sensory reeducation" denir (3,7,99). NCAM, sinir sisteminin gelişim ve plastisitesinde önemli bir rol oynayan hücre adezyon molekülü olarak bilinir. NCAM ve onun posttranslasyonel formu PSA–NCAM, öğrenme ve hafızaya almanın işleyiş biçimine önemle dahil olur ve salınım düzeyleri stresin kiplemesine oldukça hassas olarak bilinir (100). Bu çalışmalardan yola çıkılarak bizim yaptığımız çalışmada duyusal yeniden öğrenim sürecinin end-to-side koaptasyon grubundaki deney hayvanlarında uç-uca onarım grubundaki deney hayvanlarına oranla daha fazla meydana geldiğı ve NCAM ekspresyonundaki artışı açıklayabileceğı de düşünölebilir.

Mudge'nin yaptığı bir çalışmada; NCAM immatür Schwann hücrelerinde bulunurken olgun hücrelerinde bulunamamıştır (101). Yine yapılan bir başka çalışmada embriyonik kasin NCAM salgıladığı ancak olgun hücrenin salgılamadığı bildirilmiştir (102). Yaptığımız çalışmada uç-uca koaptasyon yapılan deney hayvanlarında end-to side koaptasyon grubuna göre duyusal fonksiyon testlerinde daha hızlı iyileşme izlenirken NCAM ekspresyonunda belirgin düşöklük saptanması; uç-uca sinir onarımında daha hızlı sinir rejenerasyonunun sağlandığı, end-to-side sinir onarımında ise iyileşme sürecinin daha yavaş ilerlediğinin bir göstergesi olabileceğı düşöncesini ortaya çıkarmıştır.

Daha önce yapılmış pek çok çalışmada periferik sinir onarımında uç-uca onarımın altın standart olarak belirtilmesi ve end-to side sinir onarımının uç-uca onarımın mümkün olmadığı durumlarda alternatif yöntem olarak gösterilmesi;

NCAM ekspresyonu açısından bizim yaptığımız çalışma ile uyuşmamaktaydı. Ancak bu konuda yapılmış fazla çalışma olmaması ve NCAM ekspresyonunun end-to-side onarım ile anlamlı artış göstermesi, yaptığımız çalışma ile üzerinde durulması ve tartışılması gereken bir konu haline gelmiştir.

Daha önce yapılmış tüm çalışmalar ile birlikte yaptığımız çalışmayı beraber değerlendirildiğimizde, periferik sinir onarımı yöntemlerinde; nörotrofik faktörler, onarım teknikleriyle ilişkilendirilmesi gereken ve üzerinde durulması önem arz eden bir konu olma özelliğini korumaktadır.

6. SONUÇLAR

- Yapılan duyuşal fonksiyon testinde (cilt çimdikleme testi) innerve kabul edilen opere edilmemiş deney hayvanları grubunda (A Grubu); tüm zaman ve tüm hayvanlarda olumlu yanıt alındı.
- Yapılan duyuşal fonksiyon testinde (cilt çimdikleme testi) denerve kabul edilen B grubundaki deney hayvanlarında; tüm zaman ve tüm hayvanlarda olumsuz yanıt alındı.
- Yapılan duyuşal fonksiyon testinde (cilt çimdikleme testi) reinnerve kabul edilen C (reinnerve, uç-uca koaptasyon) ve D (reinnerve, end-to-side koaptasyon) grubundaki deney hayvanlarında zaman içerisinde olumsuz yanıtıtan olumlu yanıtı doğru gidiş izlendi
- C grubundaki deney hayvanlarının duyuşal fonksiyon testine zaman içerisinde verdiğı yanıt D grubundaki deney hayvanlarına göre daha hızlı gelişim gösterdi; ancak süreç sonunda her iki grupta yanıtıları eşitlendi (%87,5 olumlu).
- Duyuşal fonksiyon testine reinnerve kabul edilen deney hayvanlarının verdiğı yanıt; yapılan uç-uca ve end-to-side koaptasyonun başarısının bir göstergesi olarak kabul edildi.
- Yapılan immünohistokimyasal incelemede A grubundaki (innerve) NCAM ekspresyonu B grubuna göre anlamlı farklılık taşıııyordu.
- Yapılan immünohistokimyasal incelemede A grubundaki (innerve) NCAM ekspresyonu; C grubuna göre anlamlı fark taşııııyken, D grubuna göre farkı

istatistiksel olarak anlamsızdı. Bu sonuca göre end-to-side koaptasyon NCAM ekspresyonunun anlamlılığı açısından uç-uca koaptasyona göre üstünlük taşımaktaydı.

- D grubu ile B ve C gruplarının NCAM ekspresyonu açısından karşılaştırmalarında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunması; end-to-side koaptasyonun NCAM ekspresyonunun anlamlılığı açısından uç-uca koaptasyona göre üstünlüğünün bir diğer göstergesi olarak kabul edildi.

7.KAYNAKLAR

1. Benli K. Temel Nöroşirürji.Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara: 2004;319
2. Avcı G, Akan M, Yıldırım S. Sinir Onarımı ve Greftleme. T Klin J Med Sci. 2002; 22: 428-437
3. Thomas MB. Nerve Repair and Grafting. In: Green DP, HotchkissRN, Pederson WC, eds. Green's Operative Hand Surgery. Philadelphia Churchill Livingstone, 1999; 1381-1404.
4. Aksoy K. Temel Nöroşirürji. Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları. Ankara: 2005; 1262
5. Terzis JK, Smith KL. Repair and Grafting of the Peripheral nerve, in Mc.Carthy JG (ed). Plastic Surgery, Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1990; 630-697.
6. Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair. Journal of Reconstructive Microsurgery. 1997; 13(3): 215-225.
7. Lundborg G. A 25-Year Perspective of Peripheral Nerve Surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. J. Hand Surg 2000; 25(3): 391-41
8. Erdoğan D. Sinir Dokusu. Junqueira LC, Carneriro J, Kelley RO, ed. Temel Histoloji .İstanbul: Barış Kitabevi, 1993;196
9. Snell RS. Organization of the nervous system. In: Snell RS,(ed). Clinical Neuroanatomy. Boston. Little, Brown.1992;.1

- 10.** Bell MA, Weddell AG. A morphometric study of intrafascicular vessels of mammalian sciatic nerve. *Muscle Nerve*. 1984; 7: 524.
- 11.** Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve and nerve injury. *Muscle Nerve*. 1990; 13: 771-784.
- 12.** Frykman KG, Adams J, Bowen WW. Neurolysis. *Orthop Clin North Am*. 1981; 12(2): 325-342.
- 13.** Lundborg G, Dahlin JB. Structure and function of peripheral nerve. *Operative nerve repair and reconstruction*. Gelberman RH (ed). Philadelphia, JB Lippincott, 1991;10.
- 14.** Payne SH. Nerve repair and grafting in the upper extremity. *J South Orthop Assoc*. 2001; 10(3): 173-189
- 15.** Lundborg G. Nerve regeneration and repair: A review. *Acta Orthop Scand*. 1987; 58: 145-169.
- 16.** Brandt KE, Mackinnon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Aston SJ, Beasley RW, Tho CHM, eds. *Grabb and Smith's Plastic Surgery* Philadelphia. Lippincott-Raven. 1997; 79-90.
- 17.** Burnett RK, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: A brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16 (5): E1.
- 18.** Selzer ME. Regeneration of peripheral nerve. Sumner AJ. (Ed.): *The Physiology of Peripheral Nerve Disease*. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 1980; 358-431.

19. Thomas PK, Landon DN, King RHM. Normal structure of the peripheral nerve. Adams JH, and Corcellis J, Duchon LW (Eds.): Greenfield's Neuropathology. New York, John Wiley, Sons. 1984.
20. Matson DD. Early neurolysis in the treatment of peripheral nerves due to faulty injection of antibiotics. N. Eng. J. Med. 1950; 242 - 973
21. Forman DS., Berenberg RA. Regeneration of motor axons in the rat sciatic nerve studied by labeling with axonally transported radioactive proteins. Brain Res. 1978; 156- 213
22. Spencer PS. Morphology of the injured peripheral nerve. Daniel RK., Terzis JK. (Ed): Reconstructive Microsurgery. Boston, Little Brown and Company. 1977; 342-349.
23. Letourneau PC. Immunocytochemical evidence for colocalization in neurite growth cones of actin and myosin and their relationship to cell-substratum adhesions. Dev. Biol. 1981; 85:113.
24. Weiss P. The technology of nerve regeneration: A review. Sutureless tubulation and related methods of nerve repair. J. Neurosurg. 1944 ; 1:400.
25. Letourneau PC. Cell to substratum adhesions and guidance of axonal elongation. Dev. Biol. 1975; 4:92.
26. Cabaud HE, Rodkey WG, Nemeth TJ. Progressive ultrastructural changes after peripheral nerve transection and repair. J. Hand. Surg. 1982; (7a): 353.
27. Krystosek A, Seeds NW. Plasminogen activator release at the neural growth cone. Science. 1982; 213: 1532.

28. Mccallister WV, Tang P, Smith J. Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in an endto-side model. *The Journal of Hand Surgery*. 2001; 26A (3): 478-488.
29. Reimer M, Moller K, Sundler F, Hannibal J, Fahrenkrug J, Kanje M. Increased expression, axonal transport and release of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the cultured rat vagus nerve. *Neuroscience*. 1999; 88 (1):213–222.
30. Paassen JI, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transsection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004; 25:1583-1592.
31. Daly PJ, Wood MB. Endoneural and epineural blood flow evaluation with free vascularized and conventional nerve grafts in the canine. *J Reconstr Microsurg*. 1985; 2: 45-49.
32. Lux P, Breidenbach W, Firrell J. Determination of temporal changes in blood flow in vascularized and nonvascularized nerve grafts in the dog. *J Reconstr Microsurg*. 1988; 82: 133-144.
33. Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clin*. 2000; 16(1): 73-91.
34. Nunley JA, Ugino MR, Goldner RD, Regan N, Urbaniak JR. Use of the anterior branch of the medial antebrachial cutaneous nerve as a graft for the repair of defects of the digital nerve. *J Bone Joint Surg Am*. 1989; 71: 563-567.
35. Tenny JR, Lewis RC: Digital nerve grafting for traumatic defects. use of the lateral antebrachial cutaneous nerve. *J Bone Joint Surg Am*. 1984; 66: 1375-1379.

- 36.** Breidenbach WC. Vascularized nerve grafts. A practical approach. *Orthop Clin North Am.* 1988; 19: 81-9.
- 37.** Breidenbach WC, Terzis JK. Vascularized nerve grafts: an experimental and clinical review. *Annals Plast Surg.* 1987; 18(2): 137-146.
- 38.** Terzis JK, Breidenbach WC. The anatomy of free vascularized nerve grafts. In: Terzis JK, ed. *Microreconstruction of nerve injuries.* Philadelphia: WB Saunders, 1987; 101-16.
- 39.** Chiu DT, Strauch B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3cm or less. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 86: 928-934.
- 40.** Chiu DT. Autogenous venous nerve conduits. A review. *Hand Clin.* 1999; 15: 667-671.
- 41.** Tang JB. Group fascicular vein grafts with interposition of nerve slices for long ulnar nerve defects: report of three cases. *Microsurgery.* 1993; 14: 404- 408.
- 42.** Tang JB. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. *J Reconstr Microsurg.* 1995; 11: 21-26.
- 43.** Keskin M, Akbas H, Uysal OA, Canan S, Ayyıldız M, Agar E, Kaplan S. Enhancement of nerve regeneration and orientation across a gap with a nerve graft within a vein conduit graft: A functional, stereological and electrophysiological study. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 113: 1372-1379.
- 44.** Battiston B, Tos P, Cushway T, Geuna S. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. I. Clinical results. *Microsurgery.* 2000; 20: 32-36.

45. Battiston B, Tos P, Geuna S, Giacobini- Robechi MG, Guglielmone R. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts. II. Morphological analysis of regeneration. *Microsurgery*. 2000; 20: 37-41.
46. Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin North Am*. 2001; 12: 341-352.
47. Stanec S, Stanec Z. Reconstruction of upper-extremity peripheral nerve injuries with ePTFE conduits. *J Reconstr Microsurg*. 1998; 14: 227-232.
48. Pitta MC, Wolford LM, Mehra P, Hopkin J. Use of Gore-Tex tubing as a conduit for inferior alveolar and lingual nerve repair: experience with 6 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 59: 493-496.
49. Dahlin LB, Anagnostaki L, Lundborg G. Tissue response to silicone tubes used to repair human median and ulnar nerves. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2001; 35: 29-34.
50. Mackinnon SE, Dellon AL. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg*. 1990; 85: 419- 424.
51. Kovacic U, Bajrovic F, Sketelj J. Recovery of cutaneous pain sensitivity after end-to-side nerve repair in the rat. *J Neurosurg*. 1999; 91:857–862,
52. Ballance CA, Ballance HA, Stewart P. Remark on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J*. 1903; 2: 1009-1013.
53. Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni A. End-to-side neurorrhaphy with removal of the epineurial sheath: An experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg* 1994; 94: 1038-1047.

54. Viterbo F, Trindade JC, Hoshino KH, Mazzoni A. Two end-to-side neurorrhaphies and nerve graft with removal of the epineural sheath: experimental study in rats. *Br J Plast Surg* 1994; 47: 75-80.
55. Al-Quattan MM. Terminolateral neurorrhaphy: review of experimental and clinical studies. *J Reconstr Microsurg*. 2001; 17(2): 99-108.
56. Kalliainen LK, Cederna PS, Kuzon WM. Mechanical function of muscle reinnervated by end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 103:1919-1927.
57. Zhang F, Cheng C, Chin B, Ho PR, Weibel TJ, Lineaweaver WC, Buncke HJ. Results of terminolateral neurorrhaphy to original and adjacent nerve. *Microsurgery*. 1998; 18: 276-281.
58. Zhao JZ, Chen ZW, Chen TY. Nerve regeneration after terminolateral neurorrhaphy: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg*. 1997; 13: 31-37.
59. Lundborg G, Zhao Q, Kanje M, Danielsen N, Kerns JM. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis?. *J Hand Surg*. 1994; 19B: 227-282.
60. Okajima S, Terzis JK. Ultrastructure of early axonal regeneration in an end-to-side neurorrhaphy model. *J Reconstr Microsurg*. 2000; 16: 313-326.
61. Caplan J, Tiangco DA, Terzis JK. Effects of IGF-II in a new end-to side model. *J Reconstr Microsurg*. 1999; 15: 351-358.
62. Berteli JA, dos Santos ARS, Calixto JB. Is axonal sprouting able to transverse the conjonctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor, sensory study of end-to-side nerve anastomosis. *J Reconstr Microsurg*. 1996; 12: 559-563.

- 63.** Kostakoglu N. Motor and sensory innervation in the and an end-to-side median to ulnar nerve coaptation in the forearm. *Br J Plast Surg.* 1999; 52: 404-407.
- 64.** Viterbo F, Fraciosi LF, Pathares A. Nerve grafting end-to-side neurorrhaphies connecting the phrenic nerve to the brachial plexus (letter). *Plast Reconstr Surg.* 1995; 96: 494-495.
- 65.** Matsuda H, Hata Y, Osamu I. Battal NM. End-to-side nerve coaptation: clinical applications for cross face nerve grafts (Abstract). *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13: 376.
- 66.** Luo YX. Preliminary investigation of treatment of ulnar nerve defect by end-to-side neurorrhaphy (Abstract). *Plast Reconstr Surg.* 1998; 102: 2528.
- 67.** Mennen U. End-to-side nerve suture in the human patient. *Hand Surg.* 1998; 3: 7-15.
- 68.** Noah EM, Williams A, Jorgenson C, Skoulis TG, Terzis JK. End-to-side neurorrhaphy: A histological and morphometric study of axonal sprouting into an end-to-side nerve graft. *J Reconstr Microsurg.* 1997; 13: 99-106.
- 69.** Rovak JM, Cederna PS, Kuzon W. Terminolateral neurorrhaphy: A review of the literature. *J Reconstr Microsurg.* 2001; 17(8): 615-623.
- 70.** McCallister WV, Cober SR, Norman A, Trumble TE. Using intact nerve to bridge peripheral nerve defects: An alternative to the use of nerve grafts. *J Hand Surg.* 2001; 26A: 315-325.

71. Özbek S, Özcan M, Noyan B, Kurt MA, Tirelioglu S, Bozkurt C, Karaca K, Filiz G. End-to-Side Nerve Coaptation: Is an additional proximal coaptation useful when available?. *Ann Plast Surg.* 2005; 55(3): 281-288.
72. Myers RR. Anatomy and microanatomy of peripheral nerve. *Neurosurg Clin N Am.* 1991;2:1-20.
73. Lundborg G, Dahlin L, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 1994; 10: 345-54.
74. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA RT. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83 (1): 129-136.
75. Varejavo ASP, Meek MF, Ferreira AJA. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods.* 2001; 108: 1–9.
76. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science.* 1987;15: 236(4803): 799-806.
77. Suzuki M, Angata K, Nakayama J, Fukuda M. Polysialic acid and mucin type o-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. *J Biol Chem.* 2003;278 (49): 49459–68.

78. Becker, CG., Artola A., Gerardy-Schahn, R., Becker T., Welzl H., Schachner M. . The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res.*1996; 15: 45 (2): 143–52.
79. Stoenica L, Senkov O, Gerardy-Schahn R, Weinhold B, Schachner M, Dityatev A. In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid. *Eur J Neurosci.* 2006;23 (9): 2255–64.
80. Senkov O, Sun M, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Schachner M, Dityatev A. Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in induction of long-term potentiation and memory acquisition and consolidation in a fear-conditioning paradigm. *J. Neurosci.* 2006; 26 (42): 10888–10989.
81. Jensen M, Berthold F. Targeting the neural cell adhesion molecule in cancer. *Cancer Lett.* 2007; 258 (1): 9–21.
82. Mackinnon SE. Peripheral nerve injuries. In: Light TR, editor. *Hand surgery update 2*. Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1999; 199-210.
83. McQuarrie IG. Clinical signs of peripheral nerve regeneration. In: Wilkins RH, Rengachary SS, editors. *Neurosurgery*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1996; 3199-203.

- 84.** Brushart TM. Peripheral nerve biology. In: Light TR, editor. Hand surgery update a. Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1999; 171-82.
- 85.** Kovacic U, Tomsic M, Sketelj J, Bajrovic FF. Collateral sprouting of sensory axons after end-to-side nerve coaptation—a longitudinal study in the rat. *Exp Neurol*. 2007 Feb; 203(2): 358-69.
- 86.** Kayıkçıoğlu A. A new epineural nerve repair technique: Oblique nerve coaptation. *Ann Plast Surg*. 1999; 43(5): 506-12.
- 87.** Ma WQ, Zhang SC, Li M, Yan YB, Ni CR. Experimental study of peripheral nerve grafts for repairing of chronic spinal cord injury in adult rats. *Zhongguo Gu Shang*. 2008 ;21(7):519-21.
- 88.** Wu F, Xing D, Peng Z, Rao T. Enhanced rat sciatic nerve regeneration through silicon tubes implanted with valproic acid. *J Reconstr Microsurg*. 2008 ; 24(4): 267-76.
- 89.** Özbek S, Kurt MA. Simultaneous end-to-side coaptations of two severed nerves to a single healthy nerve in rats. *J Neurosurg Spine*. 2006 Jan; 4(1): 43-50.
- 90.** Cederna PS, Kalliaainen LK, Urbanchek MG, Rovak JM, Kuzon WM Jr. "Donor" muscle structure and function after end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 107(3): 789-96.

- 91.** Fajko Bajrovic, Janez Sketelj. Extent of Nociceptive Dermatomes in Adult Rats Is Not Primarily Maintained by Axonal Competition. *Experimental Neurology*. 1998;15–121.
- 92.** Tarasidis G, Watanabe O, Mackinnon S-E. End-to-side neurorrhaphy resulting in limited sensory axonal regeneration model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997; 106: 506-512.
- 93.** Shah MH, Kasabian AK, Karp NS, Kolker AR, Dublin BA, Zhang L, et al. Axonal regeneration through an autogeneuous nerve bypass. An experimental study in rats. *Ann Plast Surg*. 1997; 38: 408-415.
- 94.** Tham SKJ, Morrison WA. Motor collateral sprouting through an end-to-side nerve repair. *J Hand Surg(Am)*.1998; 23: 844-851.
- 95.** Pillai-Nair N, Panicker AK, Rodriguiz RM, Gilmore KL, Demyanenko GP, Huang JZ, et al. Neural Cell Adhesion Molecule-Secreting Transgenic Mice Display Abnormalities in GABAergic Interneurons and Alterations in Behavior. *The Journal of Neuroscience*. 2005; 4 ; 25(18): 4659-4671
- 96.** Tirelioğlu S. Motor sinir defektlerinin onarımında duyuşal sinir köprüşü kullanımı. Uzmanlık Tezi. Bursa: Uludağ Üniversitesi,2005
- 97.** Zhang Z, Soucacos PN, Bo J, Beris AE. Evaluation of collateral sprouting after end-to-side nerve coaptation using a fluorescent double-labeling technique. *Microsurg* 1999; 19: 281-286.

- 98.** Al-Qattan MM, Al-Thunyan A. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurorrhaphy. *J Plast Surg (Br)* 1998;51(3): 238-42.
- 99.** Callahan AD. Methods of compensation and reeducation for sensory dysfunction. In: Hunter JM, Mackin EJ, Callahan AD, eds. *Rehabilitation of the hand*. St Louis: C Mosby, 1995: 701-4.
- 100.** Bisaz R, Conboy L, Sandi C. Learning under stress: A role for the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neurobiol Learn Mem*. 2008; 17.
- 101.** Mudge AW. Schwann cells induce morphological transformation of sensory neurones in vitro. *Nature*. 1984; 24-30; 309(5966): 367-9.
- 102.** Maier CE, Watanabe M, Singer M, McQuarrie IG, Sunshine J, Rutishauser U. Expression and function of neural cell adhesion molecule during limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83(21): 8395-9.

8. ÖZET

*Ratlarda Duyusal Sinir Defektlerinin Onarımında Motor Sinir Köprüsü
Kullanımının Ciltteki Etkilerinin Anti-Neural-Cell Adhesion Molecule (NCAM)
Kullanılarak Saptanması*

Bu çalışmada ratlardaki duyusal sinir defektlerinin onarımında motor sinir köprüsü kullanımının; denerve cilt bölgesindeki etkilerinin neural cell adhesion molecule (NCAM) kullanılarak saptanması amaçlanmış olup; bu konuyla ilgili daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen çalışmada süral sinir defektini onarmada, tibial sinirin köprü olarak kullanıldığı end-to-side koaptasyon tekniğini; opere edilmemiş, süral sinirde defekt oluşturulmuş ve süral sinir defekti uç-uca onarılmış rat gruplarında karşılaştırmak ve etkiliğini ciltte test etmek amaçlanmıştır. End organ (cilt) etkilerini test etmek amacıyla tüm nöronlardan erken ve geç gelişimsel dönemde eksprese olan ve nöronlarla komşuluğu bulunan tüm hücrelerle bağlantısı bulunan NCAM aktivitesi kullanılmıştır. Çalışmada denerve alanlara sahip ratlardaki NCAM aktivitesi, innerve ve reinerve olduğu düşünülen cilt bölgelerine sahip ratlardaki NCAM aktivitesiyle karşılaştırılmıştır Ağrıya karşı cilt duyarlılığını test etmede cilt çimdikleme testi kullanılarak süral sinir innervasyon alanındaki denervasyon ve reinnervasyon başarısıda test edilmiştir.

Yapılan duyusal fonksiyon testi sonucunda; innerve grubun tümünde olumlu yanıt, denerve grubun tümünde olumsuz yanıt, reinerve edilen her iki grupta da %87.5 oranında olumlu yanıt alınmıştır. Yapılan immünohistokimyasal

incelemede ise; denerve edilen grup ile uç-yan koaptasyon metodu ile reinnerve edilen gruptaki NCAM ekspresyonu, innerve kabul edilen grup ile end-to side koaptasyon metodu ile reinnerve edilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş sergilemiştir.

Daha önce yapılmış pek çok çalışmada periferik sinir onarımında uç-uca onarımın altın standart olarak belirtilmesi ve end-to side sinir onarımının uç-uca onarımın mümkün olmadığı durumlarda alternatif yöntem olarak gösterilmesi; NCAM ekspresyonu açısından bizim yaptığımız çalışma ile uyuşmamaktaydı. Ancak bu konuda yapılmış fazla çalışma olmaması ve NCAM ekspresyonunun end-to-side onarım ile anlamlı artış göstermesi üzerinde durulması ve tartışılması gereken bir konu haline gelmiştir.

Anahtar kelimeler: Motor Sinir Köprüsü, NCAM, End-to-Side Koaptasyon

9. SUMMARY

Determination of the effects of motor neuron bridge using for repairments on neuronal defects to skin by using anti - neuronal cell adhesion molecule (NCAM) on rats

By this study, we aimed to determination of the effects of the usage of motor neuron bridge on skin for repairment of sensorial nerve defects by using the neural cell adhesion molecule (NCAM); furthermore, there is no other previous study on this subject. Throught this study, main purpose remains the testing and comparision of the effectiveness of end-to-side coaptation technique for repairment of sural nerve defect on skin -in which the tibial nerve is used as a bridge- in non-operated, with a defect created on sural nerve and with a sural nerve defect repaired end-to-end rat groups. “NCAM” –which is expressed by all neurons during the early and late developmental periods and is also connected with all adjacent cells- activity is used for testing the effects on end-organ (skin). In study, the NCAM activity in rats with denervated areas is compared with the NCAM activity in rats which are suggested to have innervated and reinnervated skin areas. Denervation and re-innervation in sural nerve innervation area is tested successfully by using skin pinching test for testing the sensitivity of skin against pain.

As a result of sensory functioning test; positive response in whole innervated group; negative response in denervated group and 87,5% positive response in both reinnervated groups are obtained. In immunohistochemical evaluation; the NCAM expression in denervated and reinnervated group by end-

to-side coaptation technique is found to be statistically decreased against the innervated and reinnervated group by end-to-side coaptation technique.

In peripheral nerve repair, a great number of previous studies pointed that the end-to-end repair is a gold standard and end-to-side nerve repair is an alternative method while the end-to-end repair is not possible; was not similar with our study in which we focused on NCAM expression. Hereby, lack of more studies on this subject and the mean increment of NCAM expression by end-to-side repair became objects to be discussed and emphasized.

Keywords: Motor Nerve Bridge, NCAM, End-to-side coaptation

10. ÖZGEÇMİŞ:

Dr. Soner ÇİVİ 22 Temmuz 1978 yılında Antakya'da doğdu. İlkokulu İzmir Yahya Kemal BEYATLI ilkokulunda tamamladı. Ortaokulu Konya Dumlupınar Lisesi'nde ve lise eğitimini Konya Selçuklu Lisesi'nde tamamladı. 1995 yılında eğitime başladığı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2002 yılında mezun oldu. 2002 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda eğitimine başlayan Dr. Soner ÇİVİ, İngilizce bilmektedir ve halen bu bölümde uzmanlık eğitimini sürdürmektedir.

11. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 106-20169
KONU:

06/12/2007

Sayın
Prof.Dr.Şükrü AYKOL
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-07.060 kod numaralı ve “*Ratlarda duyuşal sinir defektlerinin onarımında motor sinir köprüsü kullanımının ciltteki etkilerinin anti-neural cell adhesion molecule (NCAM) kullanılarak saptanması*” başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

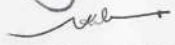
Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-07.060 and entitled “*Determination of the effects of motor neuron bridge using for repairs on neuronal defects to skin by using anti-neuronal cell adhesion molecule (NCAM) on rats*” is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

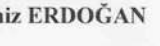
With my best regards.

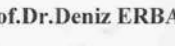

Prof.Dr. Gökhan ÇELİK
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

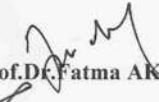

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

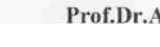

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

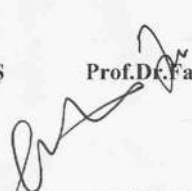

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN


Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN


Prof.Dr.Deniz ERBAŞ


Prof.Dr. Fatma AKAR


Prof.Dr.Altan DOĞAN


Uzman Dr.Sevdâ DİKER