

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ BOYUN CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

**RATLARDA REKÜRREN LARENGEAL SİNİR YARALANMASI
SONRASI MELATONİN UYGULAMASININ SİNİR
REJENERASYONUNDAKİ ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Bilgehan ÇELİK

KASIM-2021

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ BOYUN CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

**RATLARDA REKÜRREN LARENGEAL SİNİR YARALANMASI
SONRASI MELATONİN UYGULAMASININ SİNİR
REJENERASYONUNDAKİ ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Bilgehan ÇELİK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet GÜVEN**

KASIM-2021

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

*Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 05/02/2020 tarihinde onay alarak hazırlanmıştır.

*Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu Başkanlığı tarafından 2020-7-25-53 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tarih:

....../...../.....

Dr Bilgehan ÇELİK

TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi uzmanlık eğitim sürem içinde bilgi, fikir ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin son halini almasında yardımcı olan ve bana hep sabırla yaklaşan klinik şefimiz Prof. Dr. Mehmet Güven'e, uzmanlık eğitimim boyunca hem mesleki eğitimimde hem de akademik çalışmalarda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bir bilim insanı olarak her zaman örnek alacağım değerli hocalarım, Prof. Dr. Mahmut Sinan Yılmaz'a, Doç. Dr. Deniz Demir'e ve Doç. Dr. Ahmet Kara'ya, bana hayatta ve mesleğimde çok değerli katkıları olan klinik uzmanlarımız Sayın Doç. Dr. Müge Özçelik Korkmaz'a, Sayın Op. Dr. Ümit Öztaş'a, Sayın Op. Dr. Süleyman Cesur'a, Sayın Op. Dr. Fatih Turan'a, Sayın Op. Dr. Taşkın Tokat'a, Sayın Op. Dr. Cem Karataş'a, Sayın Op. Dr. Muhammed Ali Özçelik'e, Sayın Op. Dr. Oğuz Kadir Eğilmez'e, tezimin her aşamasında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Songül Doğanay'a, Dr. Öğr. Üyesi Özcan Budak'a ve asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım kıdemlilerim ve yol arkadaşlarım, Op. Dr. Sena Genç Elden'e, Dr. Necati İlhan'a, Dr. Halil Elden'e, Dr. M. Emre Gündoğan'a, Dr. A. Baran Ergül'e, Dr. Köksal Delibaş'a, Dr. Büşra Gebeş Şahiner'e, Dr. Engin Okur'a, Dr. Waheeb Daemery'e, Dr. İbrahim Halil İsmailoğlu'na ve Dr. Ahmet Faruk Erdem'e, hastane içi ve dışında hep yanımda olan dostum DKT Emrah Karacaoğlu'na klinikte ve ameliyathanede çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm hemşire, personel ve sekreter arkadaşlarıma, eğitimimde katkıları olan, ilkokulumdan üniversite mezuniyetime kadar gördüğüm tüm öğretmenlerime,

Sevgi ve emekleriyle beni bugünlere getiren, desteklerini hep arkamda hissettiğim, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçmayan üstadım babam Veysel Çelik'e, annem Emine Çelik'e ve birlikte büyüdüğüm canım kardeşim Aslıhan Çelik Çınar'a,

Hayatımı birleştirdiğim sevgiyi, hüznü paylaştığım, birlikte masa başında tezlerimizi yazdığımız ve belki de daha birçok şey başaracağımız sevgili eşim Çağla Ekin Çelik'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Saygılarımla

Dr Bilgehan Çelik

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Periferik Sinir Sisteminin Tarihçesi	4
2.2. Periferik Sinir Sistemi Embriyoloji	5
2.3. Periferik Sinir Sistemi Anatomisi	6
2.3.1. Hücre Gövdesi	7
2.3.2. Dendrit	7
2.3.3. Aksonlar	7
2.3.4. Myelin Yapısı	9
2.4. Periferik Sinir Sistemi Vaskülarizasyonu	13
2.5. Periferik Sinir Sistemi Fizyolojisi	14
2.6. Periferik Sinir Yaralanması	15
2.6.1. Seddon Sınıflaması	16
2.6.2. Sunderland Sınıflaması	17
2.6.3. Dejenerasyon	19
2.7. Sinir Rejenerasyonu	23
2.8. Periferik Sinir Onarımı	24

2.9. Sıçan Larinks ve Boyun Anatomisi	26
2.9.1. Rekürren Laringeal Sinir Anatomisi	27
2.10. Rat Larinks Histolojisi	28
2.11. Melatonin	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
3.1. Deney Hayvanları	33
3.2.Cerrahi Prosedür	36
3.3.Vokal Kord Muayenesi	38
3.4.EMG	39
3.5.Histopatolojik İnceleme	41
3.5.1.Hematoksilen -Eosin Boyama Yöntemleri	43
3.5.2.İmmünohistokimya Boyama Yöntemleri	45
3.5.3.İmmünohistokimya Boyaması Değerlendirilmesi	46
3.6.İstatistiksel Yöntemler	47
4. BULGULAR	48
4.1.Vokal Kord Muayene Bulguları	48
4.2.EMG Bulguları	51
4.3.Histolojik Bulgular	55
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ	72
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	84

KISALTMALAR

RLS: Rekürren Laringeal Sinir

VKP: Vokal Kord Paralizi

KBB: kulak burun boğaz

M.Ö: Milattan Önce

kDA: Kilodalton

P0: Myelin protein zero

Na⁺: Sodyum iyonu

K⁺: Potasyum iyonu

Cl⁻: Klor iyonu

Ca⁺²: Kalsiyum iyonu

mV: Milivolt

ms: Milisaniye

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

mm: milimetre

BKAP: Birleşik Kas Aktivasyon Potansiyeli

DSAP: Duysal Sinir Aktivasyon Potansiyeli

EMG: Elektromyografi

TC: Tiroid Kartilaj

CC: Krikoid Kartilaj AC:

Aritenoid Kartilaj LALC:

Laringeal Alar Kartilaj TA:

Tiroaritenoid Kas

L-TA: Lateral Tiroaritenoid Kas

CT: Krikotiroid Kas

LCA: Lateral Krikoaritenoid Kas

PCA: Posterior Krikoaritenoid Kas

ACA: Alar Krikoaritenoid Kas

SCA: Superior Krikoaritenoid Kas

Mg: miligram

Kg: kilogram

g: gram

G: Gauge

sn: saniye

H&E: Hematoksilen Eozin

PBS: Phosphate Buffered Saline

İ: Boyanma Derecesi

PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi

MÜP: Motor Ünite Potansiyeli

Ort: Ortalama

SS: Standart Sapma

1Ç: birinci çeyreklik

3Ç: üçüncü çeyreklik

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

PGA: Poliglikolik asit

PRP: Plateletten Zengin Plazma

NGF: Sinir Büyüme Faktörü

MAPk: Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz

SFI: Solunum Fonksiyon İndeksi

MnSOD: Mangan Süperoksit Dismutaz

TNF α :Tümör Nekroz Faktör alfa IL-6:

İnterlökin altı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Sinir Hücre Yapısı (Kuşkaya, 2014)	7
Şekil 2.2: Uzantılarına göre nöronların sınıflandırılması (Kuşkaya, 2014)	8
Şekil 2.3: Myelin protein zero adezyon molekülü yapısı (Spiryda, 1998)	10
Şekil 2.4: Schwann hücresi ve myelin kılıf oluşumu (Geyik, 2020)	11
Şekil 2.5: Sinir kılıfının tabakaları (Geyik, 2020)	11
Şekil 2.6: Periferik sinirlerin mikrovasküler dolaşımı (Terzis and Smith, 1990b, Terzis and Smith, 1990a)	13
Şekil 2.7: Hücre içi ve hücre dışı iyonların dağılımı	14
Şekil 2.8: Myelinli sinir liflerinde sıçrayıcı iletim	15
Şekil 2.9: Bir periferik sinirde kaydedilmiş aksiyon potansiyeli (Geyik, 2020)	15
Şekil 2.10: Wallerian dejenerasyonu (Sütçü, 2010)	21
Şekil 2.11: Epinöral Onarım (Geyik, 2020)	25
Şekil 2.12: Fasiküler Onarım (Geyik, 2020)	25
Şekil 2.13: Grup Fasiküler Onarım (Geyik, 2020)	25
Şekil 2.14: A, Rat larinksinin posteriordan görüntüsü. Rat larinks iskeleti tiroid kartilaj (TC), krikoid kartilaj (CC), aritenoid kartilaj (AC) ve laringeal alar kartilajdan (LALC) meydana gelir. Kasları tiroaritenoid kas (TA; lateral TA[L-TA] olarak gösterilir), krikotiroid kas (CT), lateral krikoaritenoid kas (LCA), posterior krikoaritenoid kas (PCA), alar krikoaritenoid kas (ACA) ve superior krikoaritenoid kas (SCA)'dır. B, larinks kaslarının bağlandığı bölgelerin şematik çizimi (Inagi et al., 1998)	27
Şekil 2.15: Rekürren laringeal sinirin seyri (Yurdakul, 2019)	28
Şekil 2.16: Melatonin Biyosentezi (Kandemir and Sarikcioglu, 2015)	30
Şekil 4.1: Vokal kord hareketi açısından gruplar arasındaki zamansal dağılım grafiği	50
Şekil 4.2: Anestezi altındaki denekte spontan solunum esnasında yapılan EMG kaydı. Motor ünitelerin aksiyon potansiyellerinin MÜP amplitüdlerinin normal olduğu görülmektedir.	51
Şekil 4.3: Sinir kesisinden hemen sonra alınan EMG kaydı. MÜP amplitüdlerinin olmadığı görülmektedir.	52

Şekil 4.4:İşlem sonrası üçüncü haftada alınan EMG kayıtları. Düzensiz ve düşük amplitüdlü MÜP oluştuğu görülmektedir.....	52
Şekil 4.5: İşlem sonrası altıncı haftada alınan EMG kayıtları. MÜP amplitüdlerinin altıncı haftaya kıyasla daha sık ve düzenli oluştuğu görülmektedir.	53
Şekil 4.6: EMG kaydında alınan MÜP amplitüd değerlerinin zamansal değişiminin grafikteki dağılımı	54



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Çalışma Grupları.....	34
Tablo 2: Vokal Kord Muayene Skalası	38
Tablo 3: Doku Takip Basamakları.....	42
Tablo 4: H&E Boyama Yöntemleri.....	44
Tablo 5: Dehidratasyon Yöntemi.....	45
Tablo 6: Boyanma Derecesi	47
Tablo 7: Gruplar Arasındaki 3Üçüncü ve Altıncı Hafta Vokal Kord İyileşme Oranlarının Karşılaştırması.....	49
Tablo 8: Grupların İşlem sonrası üçüncü ve altıncı haftada Saptanan MÜP Amplitüd değerleri.....	54
Tablo 9: Tüm Grupların Histolojik Olarak Değerlendirildiği Parametreler ve Histolojik Sonuçları	57

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1: Cerrahi sonrası kafeste takibi yapılan denek grubu	34
Resim 3.2: Cerrahi Aşamaları.....	37
Resim 3.3: Sol RLS Sutürasyonu Sonrası Görüntüsü.....	37
Resim 3.4: Çıkarılan Larinks ve Trakea Dokuları	38
Resim 3.5: EMG Cihazı, Otoendoskop, Soğuk Işık Kaynağı.....	40
Resim 3.6: Transoral Larengeal EMG'nin Yapılışı.....	40
Resim 3.7: Rat larinksinde yapılan EMG'de güçlü sinyaller alabilmek için iğne elektrotun yerleştirildiği bölgeler; posterior krikaritenoid kas (gri yıldız), tiroaritenoid kas (beyaz yıldız) (Tessema et al., 2008).....	41
Resim 3.8: Histolojik inceleme için çıkarılan larenks ve trakea dokuları.....	41
Resim 3.9: Doku takip cihazı.....	42
Resim 4.1: Deneklerin laringoskopik görüntüsü A: Sol vokal kord paralitik.....	50
Resim 4.2: Gruplara ait H&E periferik sinir dokusu 50 scala bar 200x görüntüleri. Siyah ok (Schwann hücreleri), kırmızı ok (piknotik çekirdekli hasarlı nöron hücresi), sarı ok(sitoplazmik vakuolizasyon), yeşil oklar(akson hasarı), mavi ok(parçalanmış sinir dokusu).....	56
Resim 4.3: Periferik sinir hasarı alanında gruplara ait P0 immünohistokimya boyanma preparatları, 50 scala bar, 200x büyütme	58
Resim 4.4: Rekürren laringeal sinir hasarı çevresinde gruplara ait bağ doku alanında Ki-67 immünohistokimya boyanma preparatları, 50 scala bar ve 200x büyütme görüntüler.....	59
Resim 4.5: Vokal kord alanında gruplara ait bağ doku alanında Ki-67 immünohistokimya boyanma preparatları, 50 scala bar ve 200x büyütme görüntüleri	60

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Rekürren laringeal sinir(RLS) hasarı anterior boyun cerrahisinde karşılaşılan önemli bir komplikasyondur. Tedavi sonrasında sinir iyileşmesi görülse de fonksiyonel sonuçlar pek de yüz güldürücü değildir. Sinir rejenerasyonu ile ilgili bir çok çalışma olmasına karşın kesin olarak etkili tedavi oluşturulamamıştır. Çalışmamızda; RLS kesisi sonrası sutürasyonun ve melatonin tedavisinin sinir rejenerasyonuna etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

YÖNTEM: Çalışmamız; 28 adet erkek Wistar Albino Rat kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneklerin sol RLS kesisi yapılmıştır. Kesi sonrası sinir onarımı sadece birinci ve dördüncü grupta yapılmıştır. Üçüncü ve dördüncü gruba altı hafta boyunca günlük 10 mg/kg intraperitoneal melatonin verilmiştir. Tüm deneklerin işlem öncesi, sonrası, üçüncü hafta ve altıncı hafta transoral laringeal EMG uygulanmış ve vokal kord hareketleri larengeal muayene ile değerlendirilmiştir. Altı hafta sonunda tüm denekler sakrifiye edilerek alınan larenks ve trakea dokusu histolojik olarak incelenmiştir.

BULGULAR: İşlem sonrası tüm deneklerde sol VKP izlendi. Altıncı haftada; birinci grupta üç ve dördüncü grupta dört denekte bilateral vokal kordları hareketli izlendi. Yapılan EMG ile üçüncü ve altıncı haftada en yüksek motor ünite potansiyeli amplitüd değeri dördüncü grupta kaydedilmiştir. Histolojik olarak dördüncü grupta diğer gruplara oranla schwann hücre sayısında artış, akson hasarında ve sitoplazmik vakuolizasyonda azalma görüldü.

SONUÇ: Çalışmamızda laringoskopik muayene, elektrofizyolojik ve histopatolojik bulgular bize melatoninin, periferik sinir iyileşmesine katkı sağladığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, Rekürren Laringeal Sinir, Reinnervasyon, Sinir Kesi Hasarı, Transoral Laringeal EMG, Vokal Kord Paralizi

SUMMARY

Evaluation of the Effect of Melatonin Administration on Nerve Regeneration After Recurrent Laryngeal Nerve Injury in Rats

INTRODUCTION AND AIM: Recurrent laryngeal nerve (RLN) injury, is an important complication encountered in anterior neck surgery. Although nerve recovery is observed after the treatment, the functional results are not very satisfactory. Although there are many studies on nerve regeneration, no definitive effective treatment has been established. In our study; We aimed to evaluate the effect of suturing and melatonin treatment on nerve regeneration after RLN incision.

METHOD: Our study; we used 28 male Wistar Albino Rats. Left RLN incision was made in all subjects. Post-incision nerve repair was performed only in the first and fourth groups. The third and fourth groups were given 10 mg/kg intraperitoneal melatonin daily for six weeks. Transoral laryngeal EMG was applied to all subjects before, after the procedure, at the third and sixth week, and vocal cord movements were evaluated by laryngeal examination. At the end of six weeks, all the subjects were sacrificed and the larynx and trachea tissues were histologically examined.

RESULTS: After the procedure, left vocal cord paralysis(VCP) was observed in all subjects. In the sixth week; Bilateral vocal cords were observed to be mobile in three subjects in the first group and four subjects in the fourth group. With EMG, the highest motor unit potential amplitude value was recorded in the fourth group in the third and sixth weeks. Histologically, an increase in the number of Schwann cells, a decrease in axon damage and cytoplasmic vacuolization were observed in the fourth group compared to the other groups.

CONCLUSION: In our study, laryngoscopic examination, electrophysiological and histopathological findings show us that melatonin contributes to peripheral nerve healing.

Key Words: Melatonin, Recurrent Laryngeal Nerve, Reinnervation, Nerve Cut Injury, Transoral Laryngeal EMG, Vocal Cord Paralysis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Rekürren Laringeal Sinir (RLS); ilk olarak ikinci yüzyılda Claude Galen tarafından tanımlanmış, daha sonra on altıncı yüzyılda insan anatomisinin kaşifi olarak gösterilen Andreas Vesalius'un kitabında yayınlanmıştır. Tiroidektomi operasyonundaki önemini ise 1938'de Lahey ve 1956'da Riddel yayınladıkları çalışmalarda bildirmişlerdir(Lal and Clark, 2005).

RLS, laringeal kaslar da dahil olmak üzere boyundaki kaslarda sonlanan ve vokal kord hareketlerini kontrol eden vagus sinirinin bir dalıdır. RLS'nin yaralanması vokal kord paralizisine neden olabilir ve bu da disfoni, hava yolu tıkanıklığı ve olası aspirasyona yol açabilir. Bu nedenle, bu tür bir yaralanma bireyin yaşam kalitesini ciddi şekilde bozabilir(Yoshimatsu et al., 2020).

RLS; travma, inflamasyon ve tümör gibi sebeplerden dolayı hasara uğrayabilir(Yoshimatsu et al., 2020). RLS hasarı, en sık tiroid cerrahisi olmak üzere ön boyun cerrahileri sonrası ortaya çıkan bir komplikasyondur(Mok et al., 2020). Chiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; tiroid kanserli hastaların %19,4'ünde tümörün RLS invazyonu yaptığını görmüşlerdir. Tümör tarafından işgal edilen sinirin eksize edilmesi gerekmektedir. Bunun sonucunda hastalarda RLS hasarı ortaya çıkar(Yoshimatsu et al., 2020). Tiroid ameliyatı; sık uygulanan ve mortalite oranı düşük olmasına rağmen ameliyatın ciddi kanama, RLS hasarı sonrası vokal kord paralizisi (VKP) ve kalsiyum düşüklüğü gibi komplikasyonları mevcuttur. RLS hasarı, tiroid cerrahisinin en sık görülen ciddi komplikasyonudur. Tiroid cerrahisi dışında görülen etyolojileri; ekstralaringeal malignite, travma, iyatrojenik nedenler ve idiyopatik vakaları içerir. Sinir hasarının sebebi ne olursa olsun cerrah tiroid hastalığında artan bu riskler karşısında RLS hasarı sonrası görülen vokal kord paralizisinin optimal yönetimi daha fazla önem kazanmaktadır(Lal and Clark, 2005). VKP; Kulak Burun Boğaz (KBB) uzmanına başvuran hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen ve sık görülen bir durumdur. Literatürde vokal kord paralizisi

oranı %0,1-1,8 iken geçici RLS paralizi %1-5 olarak bildirilmiştir(Mutlu et al., 2012).

VKP'nin fiziksel etkileri; ileri dönemde aritenoid kıkırdakta şekil bozukluğu, hareket kaybı, kas tonusunun azalması ve vokal kordun bükülmesine yol açar. Bunların sonucunda da tam olmayan glottik kapanmayla hava yolu obstrüksiyonu, ses kısıklığı ve aspirasyon ile kendini gösterir(Gözcü et al., 2004).

VKP için mevcut tedavi seçenekleri davranışsal terapiden çeşitli cerrahi yaklaşımlara kadar değişmektedir. Tedavi çoğunlukla semptomatiktir. Laringeal reinnervasyon stratejileri sıklıkla vokal kord paralizisini iyileştirecek kas tonusu sağlasa da fizyolojik vokal kord hareketini tam olarak eski haline döndürecek klinik müdahale henüz yoktur(Mok et al., 2020). Cerrahi tedavi seçenekleri; enjeksiyon laringoplasti, medializasyon tiroplastisi, aritenoid addüksiyonu ve laringeal reinnervasyon teknikleridir. Reinnervasyon teknikleri arasında primer RLS anastomozu, ansa cervicalis-RLS anastomozu, ansa cervicalis-tiroaritenoid nöral implantasyon, cervicalis-tiroaritenoid nöromuskuler pedikül, hipoglossal-RLS anastomozu bulunmaktadır. Enjeksiyon laringoplasti gibi teknikler reinnervasyon etkili olana kadar hastada rahatlama sağlamak için desteklenebilir(Lal and Clark, 2005).

Diğer tedavi seçenekleriyle karşılaştırıldığında reinnervasyon tekniklerinin birçok avantajı görülmektedir. Zaman geçtikçe vokal kord pozisyonundaki değişikliklerle kas tonusu kaybı önlenir. Gırtlak anatomisinin korunması, gelecekte laringoplasti tekniklerine ihtiyaç duyulması halinde izin verilir. Ses kalitesinin korunması da cabasıdır (Lal and Clark, 2005). Reinnervasyonun en büyük faydası; ameliyat sırasında RLS hasarı tanımlanırsa hemen müdahale edilebilmesidir.

Son yıllarda epifiz bezinin ana hormonu olan melatoninin; nöroprotektif, serbest radikalleri temizleyici, antioksidan, antiinflamatuvar ve analjezik özelliklerinin olması araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Fakat melatoninin klinik faydasını belirlemek için daha ileri deneysel ve klinik çalışmaların gerekli olduğunu not edebiliriz. Makroskopik ve mikroskopik seviyelerde melatoninin muhtemel faydaları ile eksojen melatonin uygulamasının, klinik uygulamada periferik sinir hasarını takiben periferik sinir rekonstriksiyonun ve sinir plastisitesini desteklediği açıktır (Yoshimatsu et al., 2020, Mutlu et al., 2012).

Bizim çalışmamızın amacı; melatoninin periferik sinir rejenerasyonu üzerine etkisini histolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirmek ve vokal kordun endoskopik olarak görüntülenmesi tekniklerini kullanarak vokal kord hareketleri üzerine etkileri araştırmaktır. Bu nedenle, yaşamı önemli ölçüde etkileyen RLS paralizisinin fonksiyonu geri döndürerek morbid durumları azaltmak amacındayız.



2. GENEL BİLGİLER

PERİFERİK SİNİR SİSTEMİNİN TARİHÇESİ

İlk olarak Hipokrat (MÖ 460-370) periferik sinir sistemine ait bilgiler vermesine rağmen periferik sinir hasarı ile ilgili ilk çalışmaları Galen (MÖ 130-200) yapmıştır ve periferik sinir sisteminin anatomisini çıkarmıştır. Bu dönemde sinir dokusunun hasar sonrasında iyileşmeyeceği görüşü hakimdi ta ki on yedinci yüzyıla kadar. On yedinci yüzyılda Virchow ve Swan kesi hasarı gören sinirlerin iyileştiğine inanırken on sekizinci yüzyılda kesi hasarı gören sinire sutür atılmasının iyileşmeyi olumsuz etkilediği düşünülmekteydi. Ancak Cruikshank ve Haightyon sinirin fonksiyonel iyileşme gösterebilmesi için anatomik olarak devamlılık göstermesi gerektiğini söyleyerek olumsuz düşüncelere son verdi(Benli, 2005).

On dokuzuncu yüzyılda sinir dokusunun mikroskopik anatomisi netleşince sinir tedavi metodları gelişmeye başlamıştır. Flourens tarafından 1828 yılında sinir cerrahisi ile ilgili ilk çalışmaları ortaya konmuştur. 1850 yılında August Waller bugün de hepimiz tarafından bilinen Wallerian dejenerasyonunu tariflemiştir(Garbay et al., 2000).

Golgi ve Cajal 1906 yılında sinir sisteminin yapısını ve fonksiyel anatomisini ortaya koymasıyla ilgili yaptıkları çalışmalarla Nobel ödülü almışlardır. 1917 yılında Langley ve Hashimoto perinöral sinir onarımını tanımlamıştır. Birinci Dünya Savaşı'nda karıncalanma şikayeti olan kişilerde hasar gören aksonların rejenere olması sebebiyle karıncalanma olduğunu söylemiş ve bu bulguya kendi adını vererek Tinel bulgusu demiştir. Erlanger ve Gasser 1944 yılında sinir bağlantılarının farklı fonksiyonlara sahip olduğunu ve bunları elektrofizyolojik olarak ortaya koyarak Nobel Ödülü aldı(Terzis et al., 1997).

Sinir greftleri ilk olarak 1876 yılında Eduard Albert tarafından uygulanmıştır. Birinci Dünya Savaşı'nda uygulanan sinir greftlerinin çoğunda başarısızlık hakimdi. Seddon'a göre tedavideki bu başarısızlığın ana sebebi enfeksiyondur(Safa and Buncke, 2016) (Safa and Buncke, 2016).

Modern periferik sinir cerrahisinin temeli Seddon tarafından atılmıştır. Seddon sinir yaralanma mekanizmaları, sinirin yaralanma derecelerini, sinir hasarının tanı ve tedavisi ilgili çalışmalar yapmış sinir hasarı derecelendirilmesi için kendi adını verdiği Seddon sınıflamasını geliştirmiştir. Sunderland 1945 ve 1968 yılları arasında sinir hasar mekanizmaları ile ilgili birçok çalışma yapmış ve daha önce geliştirilen mekanizmaları biraz daha detaylandırmıştır ve birçok onarım tekniği geliştirmiştir. Daha sonra Millesi ve Terzis'in yapmış olduğu modern tekniklerle periferik sinir cerrahisinin gelişmesine önemli katkıda bulunmuşlardır(Kuşkaya, 2014).

PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ EMBRİYOLOJİ

Sinir sistemi embriyolojik olarak ektodermden köken alır, sinirin çevre dokusu ise mezodermden gelişir. İlk oluşan yapı nöral plaktır. Nöral plak, başlangıçta çok katlı nöroepitel hücrelerinden oluşur. Farklı görünüme sahip nöroepitel hücreleri, ektoderm tabakasının kübik biçimindeki diğer hücrelerinden daha yukarı doğru yükselmiştir. Sonrasında bu yapının yan tarafları kabarıklık göstermeye başlar. Kabartılar zamanla yükselir, onsekiz günlük embriyoda nöral plak kalınlaşarak nöral krest oluşturur ve mezoderm içine göç ederler, daha sonra orta hatta doğru kıvrılıp nöral sulkusu oluştururlar. Periferik sinir sisteminde bulunan tüm hücreler nöral krestten köken alır. Yükselmeye devam eden sulkus nöralisin kenarları yirmi ikinci günde orta çizgi seviyesinde hem kranial, hem de kaudal yöne doğru birleşerek sulkus şekline kanal haline dönüşür ve nöral kanal oluşur. Lümen etrafında çok katlı olarak dizilmiş tek tip nöroepitel hücreleri bulunur. Sonradan farklılaşan nöroepitel hücrelerinin bir kısmı nöroblastları, bir kısmı da glioblastları oluşturur. Başlangıçta hiçbir uzantısı olmadığı için bu hücreye apolar nöroblast denir, zaman geçtikçe iki adet uzantı gelişerek hızla büyür ve primitif akson halini alır, diğer kenardaki uzantı ise dallanır ve primitif dendriti meydana getirir. Bu son haliyle hücreye multipolar nöroblast denir ve gelişerek erişkin sinir hücresi olan nöronu oluşturur. Nöroblast halinden itibaren hücre, bölünme yeteneğini kaybetmiştir. Spinal sinirler ekstremiteler tomurcukları oluşur oluşmaz ekstremitelere penetre olmaya başlar. Periferik sinirlerin miyelinizasyonundan sorumlu olan Schwann hücreleri nöral tomurcuktan köken alır, perifere doğru yönelir aksonların çevrelerine dolanarak nörolemma kılıfını

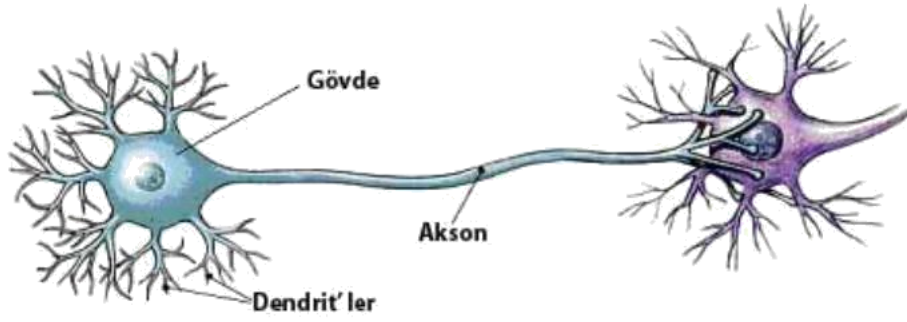
oluştururlar. Schwann hücreleri tarafından gerçekleştirilen miyelinizasyon fetal hayatın dördüncü ayından itibaren başlar(Langman and Sadler, 1990). Bu gelişme sırasında, sinir hücrelerinin gelişebilecekleri en üst düzeylere kadar gelişmeleri söz konusudur. Bu durum, sinir hücrelerinin erişkinde yenilenebilme ve çoğalabilme yeteneklerini ortadan kaldırır. Ancak ileri derecede diferansiye olmaları sinir hücrelerinin, organizmadaki tüm hücreleri kontrol eden üst düzeyde hücreler olmasını sağlar. Bu nedenle sinir dokusundan kurulmuş olan sinir sistemi, canlıyı oluşturan sistemlerin gerektiği gibi ve birbirleri ile uyum içinde çalışmalarını düzenleyen sistemdir(Kuşkaya, 2014).

Kranial sinirlerden V, VII, IX ve X, faringeal arkusları innerve eder. Bu nedenle bu arkuslardan köken alan yapılar bu kranial sinirlerle innerve edilir. Nervus vagus; dördüncü ve altıncı faringeal arkus sinirlerinin birleşmesiyle oluşur. Dördüncü faringeal arkusun siniri superior laringeal sinire dönüşür ve krikotiroid kas ve farinksin konstriktör kaslarını innerve eder. Altıncı faringeal arkusun siniri bir çok larinks kasını innerve eden rekürren laringeal sinire dönüşür(Moore and Persaud, 2009).

PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ ANATOMİSİ

Periferik sinir sistemi, merkezi organlar ile organizmanın en uzak noktasındaki yapılara kadar tüm bölgelerini birbirine bağlayan sinir sisteminin bir parçasıdır. Periferik sinirler ve bunların yolları üzerinde bulunan ganglionlar ile reseptörlerden oluşmuştur(McCarthy, 1990).

Sinir sisteminin en küçük fonksiyonel ünitesi sinir hücresidir. Diğer tüm yapılar sinir hücrelerine bağımlıdır. Sinir hücreleri dışarıdan gelen uyarıları almak, aldığı uyarıyı ilgili bölgeye iletmek, bazı hücrel reaksiyonları başlatmak, nörotransmitterleri ve diğer bilgi moleküllerini salgılamaktan sorumludurlar. Her bir sinir hücresi; hücre gövdesi, dendrit ve aksondan oluşmaktadır(Sütçü, 2010) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Sinir Hücre Yapısı (Kuşkaya, 2014)

2.1.1. Hücre Gövdesi

Hücre içi fonksiyonların, enzimatik reaksiyonların gerçekleştiği bölgedir. Çekirdek, çekirdekçik ve sitoplazmadan oluşur. Her bir sinir hücresinde bir adet çekirdek bulunurken birden fazla çekirdekçik bulunabilir. Golgi, ribozom ve granüllü endoplazmik retikulum gibi organelleri bulunur. Bu organeller sinir iyileşmesi gibi durumlarda sayıca artış göstermektedir(Terzis et al., 1997).

2.1.2. Dendrit

Hücre gövdesinde yerleşmiş ve reseptör fonksiyonu gören çok sayıdaki sitoplazmik çıkıntılardır. Dendritlerin proksimal kısımlarında Nissl cisimciği ve golgi aygıtı bulunabilir. Dendritler, çevreden gelen uyarıları hücre gövdesine iletmekle görevlidir ve bu sayede sinir hücreleri arasındaki iletişimi sağlayan hücre gövdesi uzantısıdır(Berne and Levy, 2000).

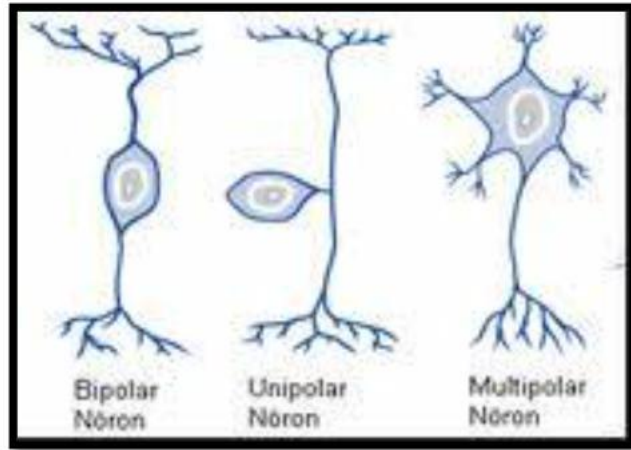
2.1.3. Aksonlar

Sinir hücrelerinin perifer ile iletişimini sağlayan hücrenin silindirik uzantısı ise aksondur. Tüm aksonlar hücre gövdesinin akson tepeciğinden çıkarak kas, sinir veya bezlere uyarı iletimini sağlarlar. Akson ile akson tepeciğinin birleştiği bölge başlangıç segmenti olarak isimlendirilir. Kısa, dar ve miyelinsiz bir kısım olan başlangıç segmenti sinir hücresine gelen birçok eksitator ve inhibitör uyarıların değerlendirildiği ve bir aksiyon potansiyelinin ya da sinir uyarısının üretilip üretilmeyeceğinin

belirlendiği bölgedir. Akson tepeciğinden sonra akson miyelinle kaplanır, çapı artar ve hedef organa kadar aynı çapta devam eder. Her bir sinir hücresinin birden fazla dendriti olmasına karşın, tek bir aksonu vardır. Aksonlar, orjinal hücre gövde çapının binlerce katı kadar uzunlukta olup periferiye uzanım gösterebilirler(Ross and Pawlina, 2006).

Sinir hücresindeki metabolik hadiseler, hücrenin gövdesinde meydana gelir; bu sebeple sinirin fonksiyonunu yerine getirebilmesi için, aksonal uzantılar ile hücre gövdesinin devamlılık göstermesi gerekir. Aksonun hücre gövdesi ile bağlantısı herhangi bir nedenle kesintiye uğrarsa, aksonda sinir fonksiyonunun devamlılığı için gereken metabolik olaylar gerçekleşemediği için, distal kısımları dejenerasyona uğrar (Terzis et al., 1997).

Nöronlar içerdikleri akson ve dendritlerin sayısı, uzunluk ve şekillerine göre unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Uzantılarına göre nöronların sınıflandırılması (Kuşkaya, 2014)

Hücredeki sitoplazmanın akson içindeki eş değeri aksoplazmadır. Aksoplazmada, birçok protein, hücrenin iskeletini oluşturan mikrotübüller ve nörofilamanlar bulunur. Bunlar yapısal bütünlüğün sağlanmasında ve aksonal iletimde önem arzederler. Aksonlar yapısal olarak miyelinli ya da miyelinsiz olabilirler. Miyelin kılıf periferik sinir sisteminde Schwann hücrelerinin plazma membranından, merkezi sinir

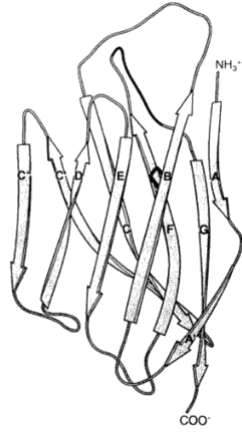
sisteminde ise oligodentrositler tarafından yapılmaktadır. Tüm sinir liflerinde aksonlar schwann hücreleri tarafından sarılmıştır (Kuşkaya, 2014).

2.1.4. Myelin Yapısı

Myelinli liflerde her schwann hücresi bir aksonu sararken, myelinsiz liflerde bir schwann hücresi birden çok aksonun etrafını sarmaktadır (Garbay et al., 2000, Terzis and Smith, 1990b).

Myelin yapısal olarak hücre membranına benzese de farklı olarak yapısının %75'i lipid, %25'i protein yapıdadır. Lipidlerin %20-30'unu oluşturan kolesterol, membran stabilizasyonunu sağlarken diğer lipidler glikoprotein yapıda olan sülfatid, gangliosid ve galaktoserebrosiddir (Garbay et al., 2000). Myelin yapısındaki proteinler ise glikoprotein yapıdadır. Proteinlerin yaklaşık %50-60'ını myelin protein zero (P0 proteini) periferik sinir sisteminde myelinin ana yapıtaşıdır. İkinci en sık olarak bulunan glikoprotein myelin basic proteindir, tüm myelin proteinlerin %10'unu oluşturur. Periferik myelin protein 22, % 5'ten daha azını oluşturmasına rağmen myelinin stabilizasyonunda önemli rol oynar (Shapiro et al., 1996).

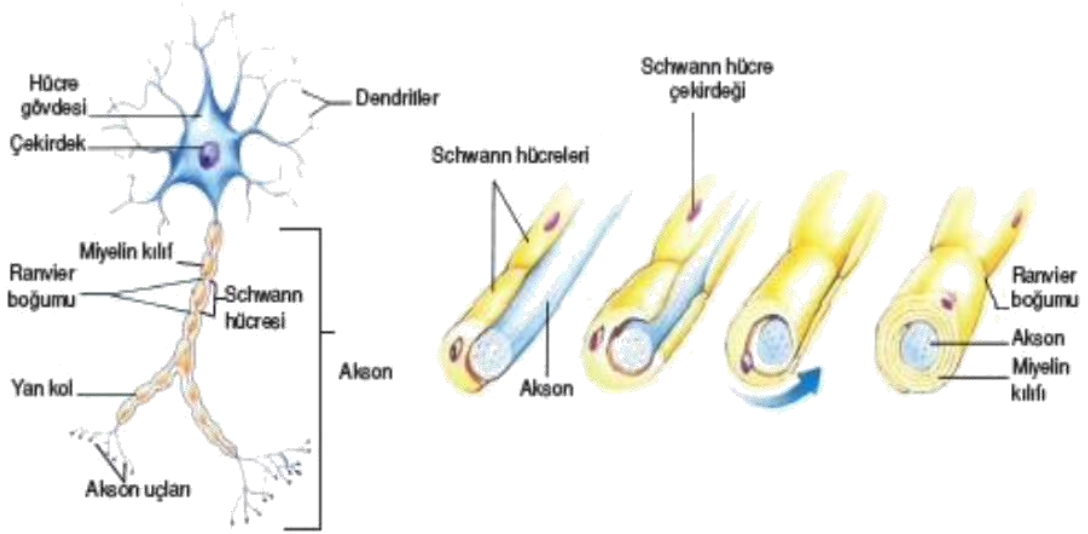
Myelin protein zero, periferik sinir sistemindeki myelinin kuru ağırlığının %20-30'unu oluşturur. Yaklaşık 28 kDa ağırlığında integral membran glikoproteinidir (Şekil 2.3). Myelinin kompakt yapısının oluşumunu sağlar. Myelinizasyon başlamadan birkaç gün önce schwann hücresinde sinirlerin aksonları ve omurilik kökleri ile temas ettiği zaman eksprese edilir. P0 ekspresyonu myelinizasyonun ilk başladığı bölgede en yüksek oranda bulunur. Ekspresyon seviyesi on dördüncü günde pik yapar, sinir olgunlaşması ve myelin yapısının tamamen oluşması sonrası sabit bir seviyeye düşer. P0 ekspresyonu bozulursa myelin yapısı tehlikeye girer (Spiryda, 1998).



Şekil 2.3: Myelin protein zero adezyon molekülü yapısı (Spiryda, 1998)

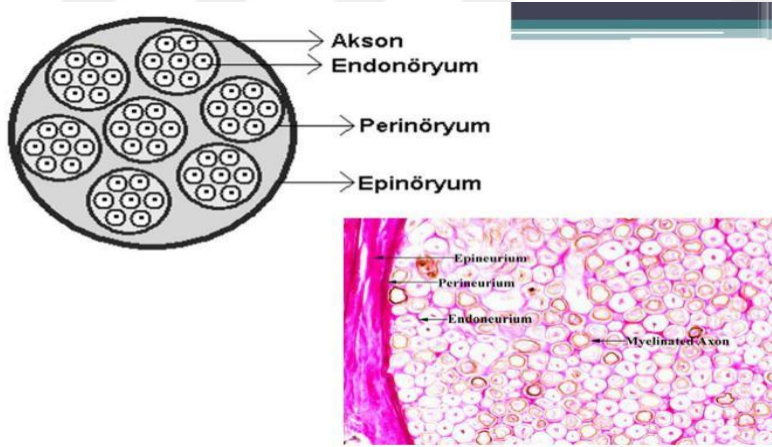
Schwann hücreleri tarafından salgılanan ekstrasellüler matriks proteinleri ile oluşturulan bazal lamina çevre düzenini sağlamaktan sorumludur. Schwann hücrelerinin ve bazal laminanın oluşturduğu Büngner bantları aksonlar için nörotropik destek sağlayarak iyileşmeye yardımcı olur. Schwann hücreleri glikoprotein yapıda olan laminin, fibronektin, heparan sülfat, entaktin ve tip 4 kollajen gibi bazal laminada bulunan bu moleküllerin sentezinde de rol almaktadır(Geyik, 2020).

Miyelinli aksonlarda Ranvier boğumu olarak adlandırılan miyelinsiz kısımlar bulunmaktadır. Sinir iletimi akson tepeciği ve Ranvier boğumları arasında sıçrayarak (saltatorik iletim) hızlı şekilde sağlanır (Terzis et al., 1997) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Schwann hücresi ve myelin kılıf oluşumu (Geyik, 2020)

Sinirin çevresini saran kılıf üç tabakadan meydana gelir. Dıştan içe sırayla epinöryum, perinöryum ve en içte endonöryum bulunur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Sinir kılıfının tabakaları (Geyik, 2020)

Epinöryum tabakası, siniri en dıştan saran ve sinir demetlerinin arasını dolduran fibröz yapıda bağ dokusudur. Fasiküler gövdeyi dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal travmalardan korumakla görevlidir. Epinöryum tabakasının yapısında elastik lifler, fibroblastlar, tip 1 ve 3 kollajen ve yağ dokusu bulunmaktadır (Geyik, 2020).

Epinöryum tabakasını fonksiyonel olarak iki bölüme ayırabiliriz. Dış bölüm, eksternal epinörium (epifasiküler epinörium) olarak da adlandırılır ve kolayca ayrılabilen dayanıklı bölümdür. İç bölüm, internal epinörium (interfasiküler epinörium) fasikülleri sımsıkı sararak gevşek bir şekilde bir arada tutar. Sinir yapısının kesit alanının %30-70'ini epinörium oluşturur ve distale doğru ilerledikçe kalınlığı azalır(Maggi et al., 2003).

Perinöryum tabakası, fasikülleri sımsıkı saran ve kan sinir bariyerini oluşturan miyelin kılıfıdır. Mekanik desteğinin yanında aynı zamanda iyon dengesini sağlayan bir bariyer görevi görür. Mekanik destek yassı perinöral hücreler tarafından sağlanır. Distal kısımda incelerek tek katlı bir yapı halini alan ve henle kılıfı olarak isimlendirilen bir hale gelir (Maggi et al., 2003).

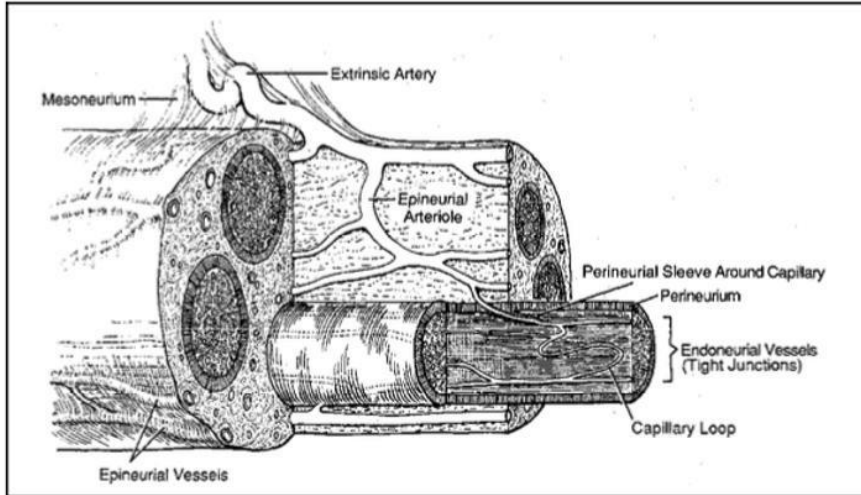
Endonöryum tabakası, ekstrasellüler matriks içine gömülmüş ince kollajen lifleri, akson ve schwann hücreleri içermektedir. Aksonlar, miyelin kılıf oluşumuna yardımcı olan schwann hücreleri tarafından kaplanmıştır. Schwann hücre zarları aksonun etrafına çepeçevre sararak çok katlı membran yapılarını meydana getirir. Miyelin kılıfı, kompakt ve kompakt olmayan miyelin bölümlerine ayrılmıştır. Kompakt olmayan bölümdeki miyelin üç yerde bulunur; elektriksel uyarının hızlı bir şekilde iletimini sağlayan ranvier boğumlarının hemen yanında, Schmidt-Lanterman yarıklarında ve iç ve dış aksonlardadır(Mizisin and Weerasuriya, 2011).

PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ VASKÜLARİZASYONU

Periferik sinirler; aksonal transport ve uyarı iletimi için gerekli olan enerjiyi sahip olduğu mikrovasküler sistem tarafından sağlar (Hansson, 1993).

Ekstresek ve intrasek olmak üzere iki sistem periferik sinirlerin vaskülarizasyonundan sorumludur (Şekil 2.6).

İntresek sistemi, epinöryum, perinöryum ve endonöryum tabakaları içerisinde yer alan vasküler pleksus oluşturur. Ekstresek ve intrasek sistem arasındaki denge ve kompensatuar mekanizmalar, siniri vasküler dolaşım problemlerine karşı korumaktadır. Ekstresek sistem ise sahip olduğu gevşek adventisyal tabakayla kaplı dış yüzeyi vasa nervorum olarak adlandırılan damarlardan oluşmaktadır. Vasa nervorum mezonöryum olarak isimlendirilen gevşek bir kılıf içinde yer alan sinirlere eşlik eden damarlardan gelen besleyici damarlardır (Hansson, 1993). Mezonöryumda longitudinal uzanan damarlar intrasek sistem ile bağlantılıdır. Epinöryumun içerisinde bulunan epinöral damarlar, her fasikül veya fasikül demetinin beslenmesini sağlarken birçok seviyede perinöral vasküler sistem ile anastomoz yapmaktadır.

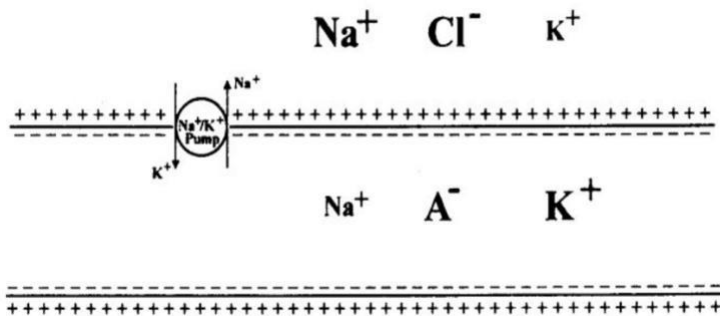


Şekil 2.6: Periferik sinirlerin mikrovasküler dolaşımı (Terzis and Smith, 1990b, Terzis and Smith, 1990a)

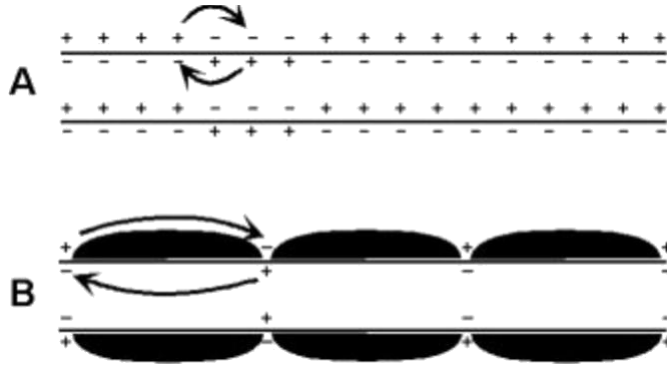
Perinöral damarlar sinir boyunca paralel seyrederken birçok alanda oblik seyir ile perinöriumun iç tabakasını aşarak endonöral aralığa geçerek endonöral vasküler pleksusu oluştururlar. Bu kapillerlerin sıkı endotelyal bağlantıları sayesinde kan sinir bariyerinin oluşumuna katkı sunarlar (Lundborg and Dahlin, 1991). Perinörium tabakasının kan dolaşımı sempatik inervasyonla dengelenirken, endonöral alandaki kan dolaşımı, lokal perfüzyon basıncı ile dengede tutulmaktadır (Myers, 1997).

PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ FİZYOLOJİSİ

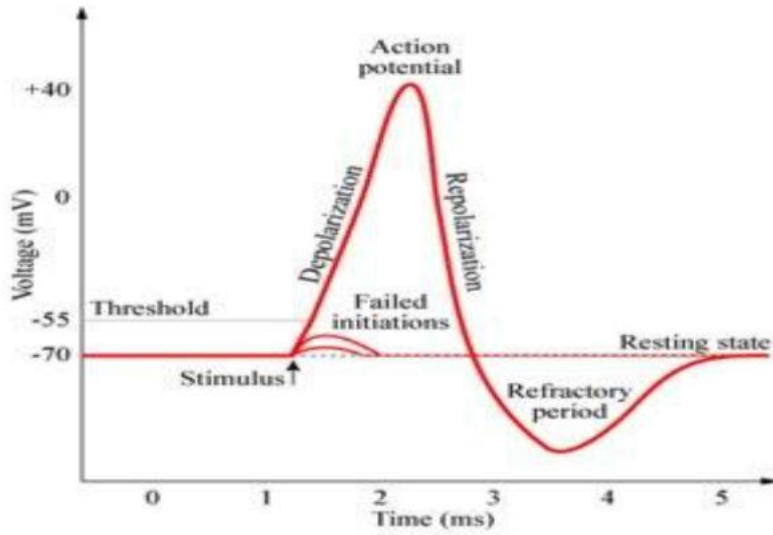
Sinir hücresinin etrafındaki yarı geçirgen olan hücre zarı, hücrenin içi ve dışı arasında membran potansiyel farkı oluşmasına sebep olur. Akson membranı sodyum iyonuna karşı geçirgen değildir. Sodyum (Na^+) membrandaki Na^+ / K^+ pompası yoluyla aktif taşıma ile transfer olur. Bunun sonucunda, hücre içinde yüksek oranda bulunan potasyum(K^+) iyonu ve diğer anyonlar, düşük oranda bulunan sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) iyonları bulunur. (Şekil 2.7) Membranın istirahat halindeki potansiyeli -70 mV'dir. Membran elektrik bir uyarı ile uyarıldığında depolarizasyon meydana gelir. Membrandaki sodyum kanallarının sodyuma karşı geçirgenliği artarak sodyum iyonu hücre içine geçer, hücre içinde ve dışında iyon dengesi sağlanınca membran potansiyeli +30mV'ye ulaşarak aksiyon potansiyelini oluşturur (Şekil 2.9). Bu potansiyel sinir lifi boyunca yayılır. Miyelinsiz sinir liflerinde potansiyelin yayılımı kesintisiz olurken, miyelinli liflerde depolarizasyon yalnızca ranvier boğumlarında olduğu için potansiyel bir boğumdan diğerine sıçrayarak ilerlemektedir (Şekil 2.8). Bu sebeple miyelinli liflerde ileti daha hızlı olur (Ertaş, 2000).



Şekil 2.7: Hücre içi ve hücre dışı iyonların dağılımı



Şekil 2.8: Myelinli sinir liflerinde sıçrayıcı iletim



Şekil 2.9: Bir periferik sinirde kaydedilmiş aksiyon potansiyeli (Geyik, 2020)

PERİFERİK SİNİR YARALANMASI

Periferik sinir dokuları termal, kimyasal, mekanik ve iskemik gibi birçok sebeple hasar görebilir. Periferik sinir hasarının en sık sebebi travmadır. Etyolojide trafik kazaları, ateşli silah yaralanmaları, kesici ve delici alet yaralanmaları söylenebilir. Travmaya uğrayan hastaların %2,8'inde periferik sinir hasarı oluşmakta ve birçoğunda uzun süreli fonksiyon kaybı yaşanmaktadır (Noble et al., 1998).

İkinci sırada; kronik basıların sebep olduğu tuzak nöropatiler (karpal tünel sendromu, ulnar sinir tuzak nöropatisi v.b.) yer almaktadır. Bunların dışında elektrik hasarı ve yanıklar, metabolik nedenler (diyabetes mellitus, üremik nöropati, amiloidoz), toksik nedenler (ilaçlar, alkol, kurşun zehirlenmesi), enfeksiyöz hastalıklar (AİDS), tümörler, radyasyon maruziyeti, herediter hastalıklar etyolojik nedenler olarak sayılabilir. Ameliyat sırasında oluşan basılar nedeniyle de periferik sinir yaralanmaları görülebilmektedir (Özer, 2013)

Periferik sinir dokusundaki bütün sinir hücreleri aynı derecede yaralanabileceği gibi yaralanmanın şiddetine veya şekline göre aynı sinir dokusu içindeki farklı sinir hücreleri farklı derecede yaralanma görülebilir. Periferik sinir onarımı sonrası iyileşmenin zamanı yaralanmanın derecesine bağlı olarak değişebilir. Klinik olarak sinir hasarının tanısı ve takibinde sınıflamalar kullanılmaktadır. Bu sayede prognoz hakkında öngörülebilir sonuçlar daha erken tahmin edilebilir (Seddon, 1943).

2.1.5. Seddon Sınıflaması

Periferik sinir hasarında ilk olarak Cohen 1941 yılında bir sınıflama önermiştir bu sınıflama Seddon tarafından 1943 yılında yeniden düzenlenerek bugün de yaygın olarak kullandığımız nöropraksi, aksonotemezis ve nörotemezis tarzındaki sınıflama şeklini almıştır.

2.1.5.1. Nöropraksi

Seddon sınıflamasına göre en hafif yaralanma şeklidir. Periferik sinirde genellikle kompresyon hasarı sonrası oluşan akut gelişen geçici bir fonksiyon kaybı olarak tanımlanır. Nöroprakside anatomik olarak sinirde bir devamlılık gözlense de miyelin kaybı durumu mevcuttur ve sinir iletimi görülmez. Kısmi motor paralizi mevcuttur, duyuşsal ve sempatik fonksiyonlar genellikle korunmuştur. Myelin yapımının yeniden kendini onarmasına kadar klinik yansımasını korur. Etyolojik faktörler ortadan kaldırıldığında iyileşme, haftalar içinde kendiliğinden gerçekleşir (Lee and Wolfe, 2000)

2.1.5.2. Aksonotemezis

Endonöryum, epinöryum, perinöryumun ve hücrelerin bazal membranının sağlam kaldığı ancak myelin kılıfta ve aksonal devamlılıkta bir kesilme görüldüğü bir durumdur. Yaralanma sonucu hasarın distalinde Wallerian dejenerasyon proksimalinde de aksonal tomurcuklanma gözlenir. Fonksiyonel geri dönüş için geçmesi gereken süre, aksonal yenilenme ve hedef dokudaki reinnervasyon sürecine bağlıdır. Rejenerasyon 1-2 mm/gün hızla ilerlemesine rağmen kaslarda denervasyona bağlı atrofi gelişebilmektedir (Lee and Wolfe, 2000)

2.1.5.3. Nörotezeis

Periferik sinir hasarının en şiddetli şeklidir. Sinirin ve sinir çevresindeki destek dokuların traksiyon veya laserasyon sonucunda devamlılığının tamamen kesintiye uğradığı ve cerrahi olarak birleştirilme yapılmazsa fonksiyonel kazancın beklenmediği hasar şeklidir. Bu tür hasar sonrasında lezyonun distalinde denervasyon ve tüm fonksiyonlarda kayıp gözlenir. Bunun sebebi sinirin tam kat kesilmesi, iletimi tamamen engelleyen tümör ve skar dokusudur. Cerrahi onarım yapılmaması halinde ise kesinin proksimalinde nöroma oluşumu gözlenir (Lee and Wolfe, 2000)

2.1.6. Sunderland Sınıflaması

Sunderland, 1951 yılında sinirde meydana gelen hasarı temel alan anatomik içerikli ve beş dereceden meydana gelen sınıflamasını ortaya koymuştur. Bu sınıflama Seddon sınıflamasının bir modifikasyonudur. Sunderland aksonometrik hasarları alt derecelere ayırmıştır ve günümüzde en çok kullanılan ikinci sınıflandırma sistemidir. Mackinnon, Sunderland Sınıflamasına altıncı derece sinir hasarını ekleyerek bu sınıflandırmayı modifiye etmiştir (Özer, 2013).

Birinci Derece Hasar: Seddon sınıflamasındaki karşılığı nöropraksidir. Akson ve sinir kılıf yapıları intakttır fakat lezyon bölgesinde sinir segmentinde iletim kaybı ve lokal demiyelinizasyon vardır. Wallerian dejenerasyon görülmez, spontan iyileşme gözlenir (Maggi et al., 2003).

İkinci Derece Hasar: Seddon sınıflamasına göre aksonotemezise eşdeğer kabul edilir. Sinir kılıf yapıları intakttır fakat aksonun bütünlüğü bozulmuştur. Distal segmentte Wallerian dejenerasyon görülür. Schwann hücresinin bazal membranı ve endonöral kılıfı sağlam olması sebebiyle prognoz iyidir ve spontan olarak iyileşir fakat birinci derece hasara göre iyileşme süresi daha uzundur.

Sunderland’a göre üçüncü, dördüncü ve beşinci derece hasarlar nörotemezise eşdeğer kabul edilmiş olup üçüncü derece endonöriyum, dördüncü derece endonöriyum ve perinöriyum, beşinci derecede endonöriyum, perinöriyum ve epinöriyum hasarı görülür (Maggi et al., 2003).

Üçüncü Derece Hasar: Seddon sınıflamasındaki aksonotemezis ve nörotemezisin bir karışımı olarak kabul edilir. Üçüncü derece hasarda, epinöriyum ve perinöriyum intakttır fakat schwann hücre kılıfı, endonöriyum ve aksonun devamlılığı kesintiye uğramıştır. İçyapıda görülen bu düzensizlik ve devamsızlık genellikle ciddi kompresyon veya hasar sonucu görülebilir. Endonöriyumdaki hasarın derecesine bağlı olarak iyileşme oluşabilir. Aksonun distalinde Wallerian dejenerasyon görülür. Bu hasarlanmada endonöriyum ve schwann hücre kılıfı zarar gördüğü için tam olarak iyileşme görülmez. İlimli bir üçüncü derece hasarda intrafasiküler alanda minimal fibrozis görülen ve ciddi rejenerasyonla iyileşme gösterebilen bu tarz hasarlar aksonotemezise karşılık gelir. Şiddetli bir üçüncü derece hasarda, rejenerasyonun oluşumunu ciddi şekilde engelleyecek fibrozis olan bu tip yaralanmalarda nörotemezis olarak kabul edilir. Rejenerasyon, ayda yaklaşık 1 cm ilerlediği kabul edilir. İyileşme sırasında nöroma oluşumu yada sinkinezi oluşumu fonksiyonel sonuçların kötü olmasına sebep olabilir. Bu durumda nöromanın ve skarın tamamının cerrahi rezeksiyonu gereklidir (Maggi et al., 2003).

Dördüncü Derece Hasar: Sinirin epinöriyum tabakası sağlamdır bunun dışındaki tüm tabakalarının devamlılığı bozulmuştur. Fiziksel olarak sinir devamlılığı korunmakla birlikte, oluşacak skar dokusunun yaratacağı blokaj sinir rejenerasyonunu engeller ve hasar alanında nöroma oluşumuna sebep olur. Spontan iyileşme çok nadir görülmesi sebebiyle cerrahi onarım önerilir. Bu tip hasarlanmada, hasarlı kısmın çıkarılarak sinir uçlarının cerrahi olarak ucuca anastomozu gerekir. Hasarın distalinde Wallerian

dejenerasyon görülür. Bu tip hasar sıklıkla gerilim, traksiyon, ezilme, koter yaralanması veya sinire yapılan yanlış enjeksiyon sonucu meydana gelir (Maggi et al., 2003).

Beşinci Derece Hasar: Sinir tamamen kesintiye uğramaktadır, epinöriyum da dahil olmak üzere sinir bütünlüğü tamamen kaybolmuştur, bu yönüyle Seddon sınıflamasındaki nörotemezise eşdeğerdir. Cerrahi onarım veya greftleme yapılmazsa iyileşme mümkün değildir. Çoğunlukla penetran travmalar sonucu meydana gelir. Bu tip yaralanmada çoğu zaman onarım bölgesinde, aksonal hedefte uygunsuzluk olması nedeniyle aksonal rejenerasyonun prognozu iyi değildir (Maggi et al., 2003).

Altıncı Derece Hasar: Mackinnon Sunderland Sınıflamasına altıncı derece sinir hasarını ekleyerek sınıflandırmayı modifiye etmiştir. Mikst tip sinir hasarı olarak da adlandırılan bu grupta, aynı sinir boyunca değişik seviyelerde ve farklı derecelerde sinir hasarları bir arada görülmektedir. Kimi liflerde akson kaybının kimi liflerde ise ileti bloğunun olduğu mikst tip yaralanmadır. Bu tür lezyonlar çok yaygın olarak görülür ve saf akson kaybı görülen lezyonlardan ayırmak için dikkatli elektrodyagnostik inceleme gerektirir. Özellikle ezici tip yaralanmalarla meydana gelir. Bazı fasiküller normaldir, bazılarında spontan iyileşme beklenir, ancak dördüncü ve beşinci derecede hasarlanmış fasiküllerde rejenerasyon mümkün değildir. Tedavisinde intranöral nöroliz ile sağlam fasiküllere zarar vermeden, dördüncü ve beşinci derece hasarlı fasiküllerin cerrahi onarımları gerekir (Dvali and Mackinnon, 2006).

2.1.7. Dejenerasyon

Periferik sinir sistemi; hem dejenerasyon hem de rejenerasyon görülebilmesi sebebiyle santral sinir sisteminden farklıdır (Santo Neto et al., 1998). Bu olayları başlatan ve devam ettiren moleküler mekanizma hala tam olarak açıklanamamıştır. Biyolojik olarak, sinir hasarının onarımı sonrası iyileşmeyi etkileyen faktörler; yaralanmanın şiddeti, yaralanma sonrası gelişen dejeneratif değişiklikler, sağlıklı kalan sinir hücrelerinin sayısı, aksonal büyümenin hızı ve kalitesi, rejenere olan aksonların uygun şekilde düzenlenmeleri, hedef organların mevcut durumudur. Klinik olarak iyileşme çoğunlukla tam olmaz ve en sık duyu ve motor fonksiyonlarda kayıp, soğuğu tolere

edememe, ağrı gibi hastanın günlük hayatını ve meslek hayatını olumsuz etkileyen belirtiler görülür (Lundborg, 2000). Yalnızca birinci derece hasarlarda, patolojik değişiklikler ya hiç yoktur ya da minimal düzeyde görülür. Daha ciddi sinir hasarlarında lezyonun görüldüğü bölgenin yanı sıra, lezyonun proksimalinde, distalinde ve sinir hücresinin gövdesinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler görülür. Yaralanma alanının distalindeki tüm miyelinli veya miyelinsiz liflerde seviyesi ne olursa olsun Wallerian dejenerasyonu görülür (Sütçü, 2010).

Periferik sinir hücresinde 3 tip hasarlanma mevcuttur.

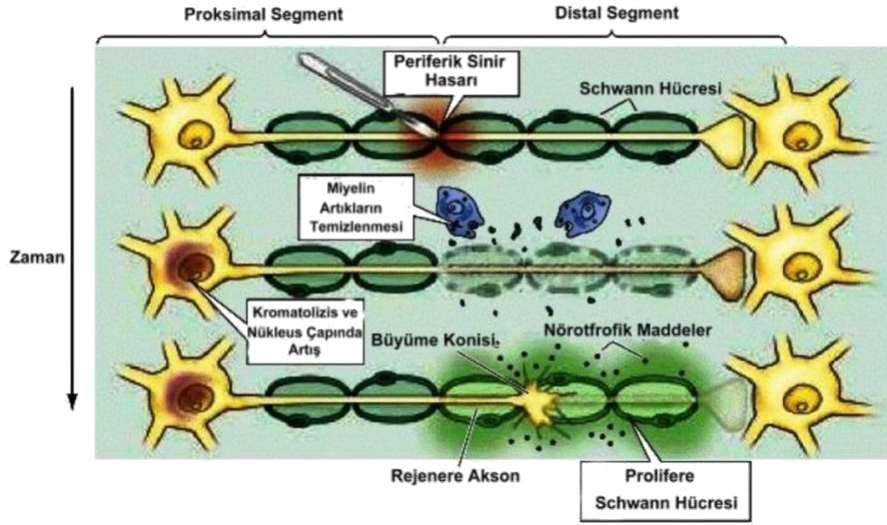
1) Wallerian dejenerasyonu

2) Aksonal dejenerasyon

3) Segmental demiyelinizasyon

2.1.7.1. Wallerian dejenerasyonu

Periferik sinirin aksonunun herhangi bir alanında hasar oluşması ve bu hasara bağlı olarak da sinir devamlılığının bozulması olarak tanımlanabilir. Hasarın distalinde akson ve aksonun etrafındaki miyelin kılıf dejenere olur, makrofajlar aracılığıyla fagosite edilir. Hasarın proksimalindeki alan ve sinir hücresinin hücre gövdesi sağlam kalır. Periferik sinir hücresinin aksonu kesintiye uğraması sebebiyle Wallerian dejenerasyonunun gelişimi belirli bir süre alır. Bu süre dört gün ile onbir gün arasında değişmektedir. Akson ne kadar distalde hasar görürse Wallerian dejenerasyonu o kadar erken başlar. Wallerian dejenerasyonunda, ilk günlerde akson hasarının distalinde kalan bölge elektriksel olarak uyarılabilir. Daha sonra hasar bölgesinin aksonun uç kısmına olan uzaklığına göre sinirin uyarılabilirliği azalır. En fazla on bir gün içinde sinir uyarılamaz hale gelir. Motor sinirlerde ise, nöromusküler kavşak periferik sinirden iki gün önce dejenere olması sebebiyle hasarın en geç dokuzuncu gününde kastan alınan cevap kaybolur. Eğer sinir kılıfının bütünlüğü korunmuş ise, dejenerasyon sonrası sinir, hasar gördüğü bölgenin distaline doğru yaklaşık 1 mm/gün hızla rejenere olur. Rejenere olan bölge aksonun ilk haline göre miyelin yapısı daha incedir ve internodal aralıklar daha kısadır (Kuşkaya, 2014) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10: Wallerian dejenerasyonu (Sütçü, 2010)

2.1.7.2. Aksonal dejenerasyon

Hasar, periferik sinirin hücre gövdesinde veya aksondadır. Çoğunlukla metabolik ve toksik sebeplerle ortaya çıkar. Hasar periferik sinir hücre gövdesini direkt etkileyen bir sebeple (poliomyelit gibi) olabileceği gibi aksonun tamamını etkileyen bir sebeple (Vincristine'in toksik etkisi) de olabilir. Periferik sinir hücresi canlılığını kaybettiye geri dönüş görülmez. Sebep aksonun devamlılığı bozulmadan ortadan kaldırılsa haftalar ya da aylar içinde akson eski fonksiyonuna kavuşabilir. Aksonun devamlılığı bozulduysa Wallerian dejenerasyonundaki gibi rejenerasyon süreci yavaş olur.

Aksonal dejenerasyonda elektrofizyolojik testlerde sinir hala uyarılabilir haldeyse, ileti hızı normal veya normale yakın değerlerde bulunurken, aksonal dejenerasyonun olduğu motor sinirde Birleşik Kas Aksiyon Potansiyeli (BKAP) amplitüdü, duysal sinirde ise Duysal Sinir Aksiyon Potansiyeli (DSAP) amplitüdü düşük izlenir. Daha ileri evrede ise, motor veya duysal sinir uyarımı sonucu hedeften potansiyel kaydedilmez. İğne elektrot ile yapılan EMG incelemesinde, aksonal dejenerasyonun onuncu gün sonrasında, denervasyonun sebep olduğu spontan potansiyeller (fibrilasyon, pozitif keskin dalga, kompleks ardışık boşalım) kaydedilir. Parsiyel dejenerasyonun olduğu durumlarda bir iki ay sonrasında nörojenik motor ünite potansiyelleri (polifazik, geniş süreli, normal veya büyük amplitüdlü) kaydedilir. Daha

ileri dönemde ise, bu potansiyelerde amplitüd artışı görülür. Maksimum kasılmada ekranda aynı anda gözlenen farklı motor ünite potansiyel sayısı azalmıştır buna seyrelme paterni denir. Prognozu en kötü olan hasarlanma tipidir (Kuşkaya, 2014).

2.1.7.3. Segmental demiyelinizasyon

Miyelinli liflerde, periferik sinir aksonunda bir hasar olmadan çevresindeki schwann hücresinde ve miyelin kılıfında hasar söz konusudur. Herediter nöropatilerde görüldüğü gibi tüm sinir boyunca demiyelinizasyon olabilir veya edinsel demiyelinizan hastalık durumlarında (Guillain-Barre Sendromu veya Kronik İnflamatuvar Demiyelinizan Polinöropati gibi) belirli bir sinir bölümünde demiyelinizasyon görülebilir. Miyelin, kendini yenileyebilen bir yapıda olması sebebiyle demiyelinizasyonun nedeni ortadan kaldırıldığında, demiyelinizasyon tamamen geri dönüşü olan bir süreçtir. Remiyelinizasyon ise demiyelinizasyon sonrasında on beş gün ile altı ay arasında tamamlanır. Bununla beraber, remiyelinizasyonun görüldüğü bölümlerde miyelin kılıf daha ince ve internodal aralıklar daha kısadır. Demiyelinize olmuş kısımda ileti hızı yavaşlar. Duysal ileti elektrofizyolojik olarak değerlendirildiğinde DSAP sıklıkla görülemez. Motor ileti değerlendirildiğinde ise sıklıkla normal ya da normale yakın amplitüdde BKAP elde edilir. Eğer demiyelinizasyon, sınırlı bir alanda ise, bunun distalinden uyarımla normal motor yada duysal cevap kaydedilebilir. Bu alanın proksimalinden uyarı yapıldığında ise ileti bloğu olarak adlandırılan demiyelinizasyonun derecesine göre yanıtı çok az olduğu veya hiç kaydedilemediği durum görülür. İğne elektrot ile yapılan EMG değerlendirmesinde, çoğunlukla spontan denervasyon aktivitesi kaydedilmezken, fibrilasyon veya pozitif keskin dalga aktivitesi görülebilir. Motor ünite potansiyelleri, kaydedildiği takdirde her dönemde normal dalga formlarını sıklıkla korurlar. Bununla beraber erken evrede polifazik motor ünite potansiyelleri nadiren kaydedilebilir (Kuşkaya, 2014).

SİNİR REJENERASYONU

Sinir hasarından sonra hasar gören sinirin distal parçası Wallerian dejenerasyona uğrar. Wallerian dejenerasyonunda yaralanmanın distalinde bulunan aksoplazma ve myelin temizlenir. Bu temizleme işlemi kalsiyuma bağımlı proteolitik enzim aktivitesi ile yapılır ve akson rejenerasyonu için zemin oluşturulur. Makrofaj sayısının artışı ve schwann hücrelerinin proliferasyonunun tetiklenmesi ile Wallerian dejenerasyon başlar. Proliferasyon üçüncü gün pik düzeyine ulaşır ve iki hafta boyunca devam eder. Artan makrofajlar schwann hücre tüpü debrislerini temizlerler (Thacker et al., 2007). Aksonal dejenerasyon, akson hasarı sonrası rejenerasyonun başlaması için önemli bir evredir. Aksonların rejenerasyon hızı türden türe farklılık gösterir. Kemirgenlerde rejenerasyon hızı 2-3,5 mm/gün iken insanlarda bu hız 1-2 mm/gündür. Schwann hücreleri, periferik sinir hasarı sonrası aksonal rejenerasyon ve maturasyonun sağlanması amacıyla growth faktörlerin sentez ve salınımında rol alırlar. Bunun dışında laminin ve fibronektin gibi ekstrasellüler natriks proteinleri ve yapısal proteinler sentezlerler. Prolifere olan Schwann hücreleri bazal membran tarafından sınırlanarak longitudinal kolonlar şeklinde birleşerek destek hücreleri olarak da anılan "Bungner bandı"nı oluştururlar. Aynı zamanda Schwann hücreleri de nörotrofik faktörler salgırlar. Bungner bandı rejenere olan akson için kontakt etkileşim yaratır ve aksonun distale doğru ilerlemesine sebep olur. Bununla birlikte Schwann hücreleri üzerindeki reseptör sayısı da artar (Çınar, 2008).

Travma sonrası altı saat içinde proksimal kısımda bulunan akson distale doğru ilerlemek için çok sayıda kollateral ve terminal tomurcuklar verir. Rejenerasyon Nerve Growth Faktör kontrolünde en distaldeki sağlam Ranvier boğumundan başlar. Bir rejenerasyon ünitesinden çıkan kollateraller farklı yönlerde ilerleyebilirler ve distal Schwann hücre tüpünde ilerleyerek farklı son organlarda sonlanabilirler. Yani kollateral tek motor aksonlar ayrı kasları reinnerve edebilir veya kollateral tek duyu aksonları ayrı duyu alanlarını innerve edebilir (Çınar, 2008).

Kesilmiş olan akson filizleri Bungner bandı boyunca distale doğru ilerler, periferik son organla ilişki kurup reinnervasyonu sağlarlar. Bir aksondan başlayıp distale uzanan filizlere "rejenerasyon ünitesi" denir. Akson rejenerasyonunun gerçekleşmesi için

distal segmentte Schwann hücresi ve bazal membran bulunması gereklidir. Bir rejenerasyon ünitesinden çıkan kollateraller distal Schwann hücre tüpünde ayrı ayrı ilerleyerek farklı son organlarda sonlanabilirler (Stacey, 2004).

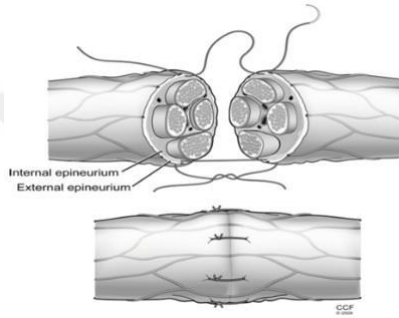
PERİFERİK SİNİR ONARIMI

Sinir hasarı künt travma şeklinde veya keskin bir cisim aracılığıyla laserasyona bağlı olarak gelişebilir. Hasar sonrası ilk 72 saat içerisinde hemen onarılan laserasyona bağlı oluşan travmalarda en iyi yöntem uç uca anastomozdur. Sinir onarımı geciktikçe yara uçları arasındaki mesafe artışı sebebiyle defektin onarılması için sinir greftine ihtiyaç duyulur. Bu durumda cerrahi başarı şansı da azalmaktadır. Normal şartlarda aksonal büyüme hızı 1 mm/gün şeklindedir. Geri dönüşümsüz kas atrofisi ile operasyona rağmen kalıcı fonksiyonel kayıp için süre 12-18 aydır.

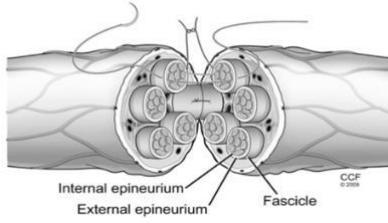
Cerrahi onarım teknikleri; nöroliz, uç uca anastomoz, sinir grefti ve sinir transferidir (Dumitru et al., 2002). Kompresyona bağlı gelişen parsiyel hasarlarda kullanılan temel teknik nörolizdir. Tam kat hasarlarda tercih edilen ve prognozu en iyi olan yöntem uç uca anastomozdur (Spinner and Kline, 2000). Cerrahinin temel gayesi sağlıklı sinir fasiküllerini bir araya getirmektir. Sinir fasikülleri gerilim olmadan uç uca getirilemiyorsa sinir grefti veya sinir transferi tercih edilir. Onarım bölgesindeki gerilim, iyileşme sırasında skar oluşumuna ve rejenere olan sinir liflerinde blokaja sebep olmaktadır. Sinir grefti olarak sentetik conduitler veya non-nöral dokular da kullanılabilir.

Sural sinir, günümüzde sinir grefti olarak en sık kullanılan sinirdir. Bunun dışında; vaskülarize sinir grefti ve ven grefti de kullanılabilir. Sinir transferi ise fonksiyonu minimal olan sağlam motor sinirlerin alınarak diğer kasların reinnervasyonunda kullanılmasına imkan veren bir metoddur. Daha yeni bir teknik olan uç yan onarım ise yaralanma distalinde bulunan bölgede, distal parçanın sağlıklı sinir dokusuna suture edilerek onarılmasına verilen addır (Diao and Vannuyen, 2000).

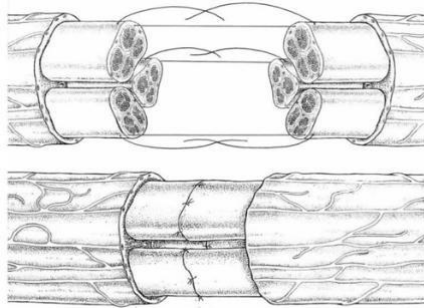
Sinirlerin primer tamiri, epinöral veya fasiküler olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Epinöral onarımda fasiküller karşılıklı getirilip mikro süturlar kullanılarak uygulanan uç-uca anastomoz tekniğidir (Şekil 2.11). Fasiküler onarımda ise, fasiküler yapılan disseksiyon ortaya konarak epinöryum kendi üzerine katlanır. Karşılıklı süturlar yerleştirilmesi yeterlidir (Şekil 2.12). Grup fasiküler yöntemde ise aynı grup duyu ve motor fasikül grupları belirlenerek eşleştirilerek suture edilir. Bu onarım tekniği çoğunlukla el bileği seviyesinin proksimalinde kullanılmaktadır (MATSUYAMA et al., 2000) (Şekil 2.13).



Şekil 2.11: Epinöral Onarım (Geyik, 2020)



Şekil 2.12: Fasiküler Onarım (Geyik, 2020)



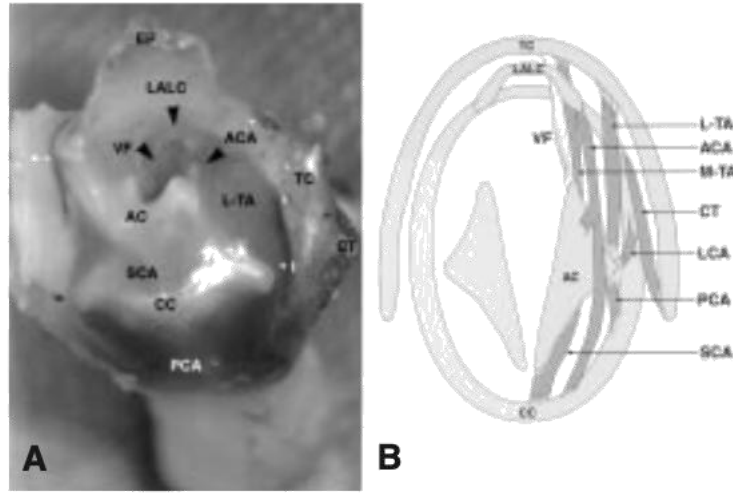
Şekil 2.13: Grup Fasiküler Onarım (Geyik, 2020)

SIÇAN LARİNK VE BOYUN ANATOMİSİ

Sıçanlar; düşük maliyetli, bulunabilirliği ve kullanım kolaylığı nedeniyle deneysel modeller için popüler laboratuvar hayvanlarıdır. Deneysel model olarak sıçan larinksini kullanan çalışmalar nadirdir (Sagartz et al., 1992).

Larinks, farinks ve trakeayı birbirine bağlayarak solunum yollarının iletken sisteminin bir parçasıdır. Alt solunum yollarına partiküllü maddelerin girmesini engellemede ve ses üretiminde önemli bir rol oynar (Smith, 1977). Aspirasyonu önlemek için; tiroaritenoid kasın kasılmasıyla aryepiglottik fold adduksiyonu sonrası aritenoid kartilaj epiglotun taban kısmına yükselir ve krikoaritenoid kasın lateral, oblik ve transvers parçalarının kasılmasıyla vokal kordlar birbirine yaklaşır.

Sıçan larinks iskeleti insan larinksindeki gibi; tiroid kıkırdak, krikoid kıkırdak ve aritenoid kıkırdaktan oluşur. İnsanlardan farklı olarak epiglot tabanına yakın vokal kordun ön yarısında kanat şeklinde ekstra bir kıkırdak mevcut, bu kıkırdağa Sagatz ve arkadaşları laringeal alar kıkırdak ismini vermiştir. Tiroaritenoid kas, krikotiroid kas, lateral krikoaritenoid kas ve posterior krikoaritenoid kas insan larinksinde olduğu gibi yerleşiktir. Tiroaritenoid kas, dikey hatta bölünerek lateral ve medial parçaları mevcuttur. İnsan larinksinde olmayan iki farklı kas mevcuttur. Alar krikoaritenoid kas olarak isimlendirilen bu kas en uzun laringeal kastır ve laringeal alar kıkırdağın anterioruna yapışır. Diğer kas ise superior krikoaritenoid kas olarak isimlendirilir. Bu kas aritenoid kıkırdağın posterior ve medialinde krikoidin tüberkülüne uzanır (Şekil 2.14) (Inagi et al., 1998).



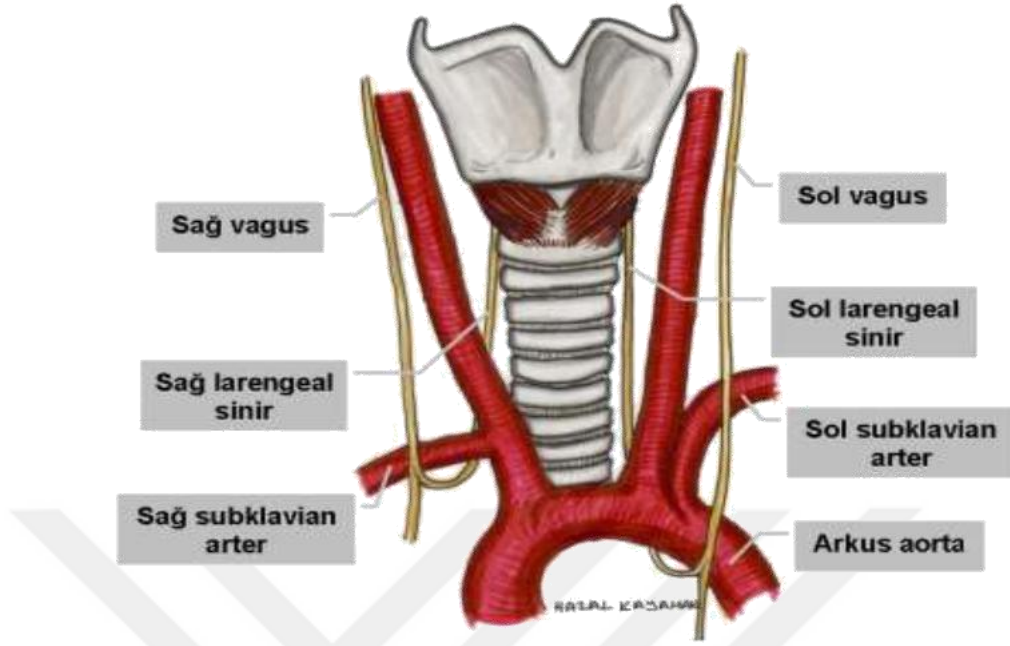
Şekil 2.14: A, Rat larinksinin posteriordan görüntüsü. Rat larinks iskeleti tiroid kartilaj (TC), krikoid kartilaj (CC), aritenoid kartilaj (AC) ve laringeal alar kartilajdan (LALC) meydana gelir. Kasları tiroaritenoid kas (TA; lateral TA[L-TA] olarak gösterilir), , krikotiroid kas (CT), lateral krikoaritenoid kas (LCA), posterior krikoaritenoid kas (PCA), alar krikoaritenoid kas (ACA) ve superior krikoaritenoid kas (SCA)'dır. B, larinks kaslarının bağlandığı bölgelerin şematik çizimi (Inagi et al., 1998)

2.1.8. Rekürren Laringeal Sinir Anatomisi

RLS; krikoaritenoid kas dışındaki tüm intrinsek laringeal motor innervasyonu ve vokal kord inferior bölgesinin duysal innervasyonunda görev alır.

Sol RLS: Sol vagus siniri, sol taraftaki subclavian arterinde önünde ilerleyerek mediasteninin üst kısmına ilerler. Sol RLS, vagustan ligamentum arteriosum alt kısmında aorto pulmoner pencere seviyesinde dallanır. Trakeoözefageal olukta yukarı yönlü bir seyir alır. Sol RLS uzunluğu, sağdan daha yüksek olması sebebiyle daha çok hasara uğramaktadır.

Sağ RLS: Mediastende vagus sağ subclavian arteri önden çaprazlayarak trakea sağında medial ve dorsal olarak ilerler. Sağ RLS, subklaviyen arterin kaudalinde vagustan ayrılır, subclavian arterin arkasında geçerek trakeoözefageal olukta yukarı yönlü seyrederek. Krikoid kıkırdak hizasında, inferior tiroid arterden gelen laringeal dalla beraber, inferior konstriktör kasın altından krikotiroid eklem posteriordan larinkse girer. (Şekil 2.15)



Şekil 2.15: Rekürren laringeal sinirin seyri (Yurdakul, 2019)

RAT LARİNKSİ HİSTOLOJİSİ

Işık mikroskopi ile larinksin incelenmesinde 5 tip epitel görülür. Bunlar; çok katlı skuamöz epitel, çok katlı skuamoid epitel, yalancı çok katlı yassı epitel ve yalancı çok katlı kübik epitelin 2 tipidir. Epiglot kıkırdağın büyük bir kısmında, ariteonid hizasında, lateral ventrikül içinde ve dorsal bölgede çok katlı skuamöz epitel bulunur. Epiglot üst kısmında yer yer tat tomurcukları da bulunur. Vokal kordlar yaklaşık 2 hücre tabakası kalınlığında skuamöz epitle çevrilidir.

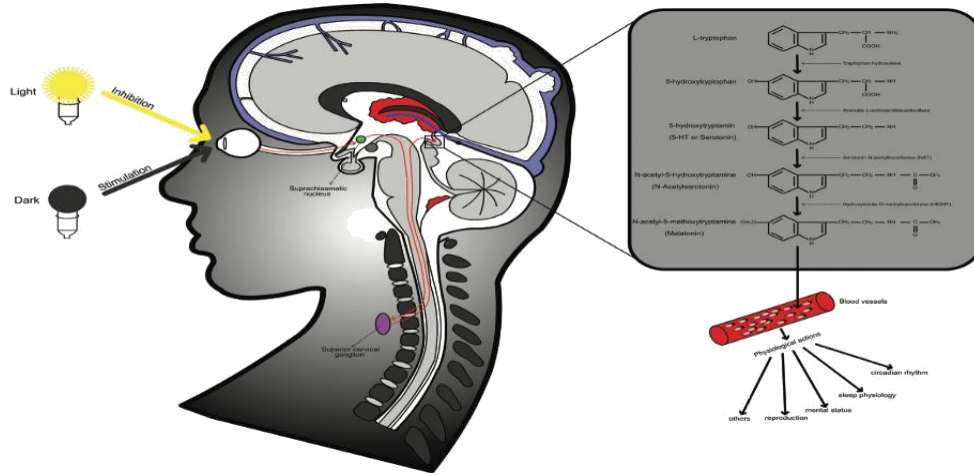
Epiglot kaudalının ön bölümünde geniş bir alanda solunum epiteli bulunur. Yalancı çok katlı kübik epitel ise skuamöz epitle solunum epiteli arasındaki geçiş bölgesinde bulunur (Çöbden, 2013).

MELATONİN

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), pineal bezden salgılanan bir nörohormondur. Lerren ve arkadaşları tarafından 1958 yılında sığır pineal bezinden izole edilen melatonin, insanlarda belli hastalıklarda deride görülen düzensiz pigmentasyonun tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Melatonin hormonu adını, kurbağa derisinde bulunan pigment hücrelerinde melanin granüllerinin agregasyonuna neden olduğu görülmesi üzerine almıştır (Sütçü, 2010, Kandemir and Sarikcioglu, 2015).

Salgılanması sirkadyen ritmin kontrolünde gerçekleşir. Gece kan düzeyi yüksek iken, gündüz kandaki seviyesi geceye göre daha düşüktür. Yüksek lipofilik ve hidrofilik özelliği sebebiyle kan beyin bariyeri ve plazma membranı gibi fiziksel bariyerleri rahatlıkla geçebilir (Kandemir and Sarikcioglu, 2015). Plazma membranını geçmesi sebebiyle hücre içi organellere direkt etki edebilme özelliğine sahiptir (Sütçü, 2010). Sekretuar organda depolanmak yerine biyosentezi sonrası kan dolaşımına salınır (Kandemir and Sarikcioglu, 2015). Antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antikarsinojen etkisi olan bir ajandır (Rateb et al., 2017).

Triptofan melatonin sentezinde önemli rol oynayan esansiyel aminoasittir. Triptofan ilk olarak triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksi triptofana dönüştürülür. 5-hidroksi triptofan dekarboksile edilerek Serotonin oluşur. Sinir uçlarından Noradrenalin salınımı sonrası N-asetil transferaz aktivitesi artar bunun sonucunda Serotonin azalırken N-asetil serotonin ve Melatonin artar (Kandemir and Sarikcioglu, 2015, Sütçü, 2010) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16: Melatonin Biyosentezi (Kandemir and Sarikcioglu, 2015)

Melatonin sentezi arttıkça, hormon pasif difüzyon yoluyla kana karışır. Karanlık ve ışığın azalması Melatonin sentezi ve salınımını uyarır. İnsanlarda melatonin salgısı karanlığın başlamasından hemen sonra artar gecenin ortasında zirveye ulaşır (gece saat 02-04 arası). Gecenin ikinci yarısında yavaş yavaş düşer. Serum melatonin konsantrasyonu yaşa bağlı olarak değişir.

Melatonin nitrik oksit sentezini azaltarak veya serbest radikallerin sinir sistemindeki destrüktif etkilerini azaltarak nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Rateb et al., 2017). Melatonin hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda diğer bazı bileşenlere göre daha güçlü serbest radikal temizleyicisi olduğu gösterilmiştir. Oksidatif hasara karşı korumada bilinen diğer antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, E vitamini) daha etkili olduğu görülmektedir. Bu sebeple dejeneratif ve proliferatif değişikliklere sebep olan bazı hastalıklarda oksidatif hasara karşı koruma sağlayabilir. Alzheimer, Parkinson ve inmenin deneysel modellerinde görülen nörodejeneratif etkiyi durdurmada etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu antioksidan etkilerinin sağlanabilmesi için gece en yüksek oranda salınan melatonin konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyon gerektirir.

Güçlü bir antioksidan olan melatonin, tekli oksijen toksisitesini önler ve glutatyon peroksidazı uyarak etki gösterir. Sitolik kinin redüktaz 2'ye yüksek afiniteli

bağlanması sebebiyle redoks tepkimelerinin kontrolünde de rol oynar. Güçlü ve çeşitli antioksidan kapasitesi göz önüne alındığında organizmanın antioksidan savunma sisteminin temel bir unsuru olduğu bildirilmiştir.

Melatonin insan vücudunda sirkadyen ritmin düzenlenmesi, uyku fizyolojisi, zihinsel durum, üreme, tümör gelişimi, yaşlanma ve diğer birçok fizyolojik süreçte önemli rol oynamaktadır.

Aksonal devamlılığın kesilmesinde kaynaklanan proksimal sinir ucundan filizlenen düzensiz sinir liflerinin oluşturduğu nöromayı azaltır. Önceki çalışmalarda eksojen verilen melatonin sinir ucunda yara oluşumunu azalttığı ve pineal bezi çıkarılan hayvanların sinir dokusundaki geranülasyon dokusunun kollajen üretimini önlediği görülerek skar dokularında azalmaya sebep olabileceği söylenebilir.

Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda periferik sinir hasarı sonrası sinir rejenerasyonunu geliştirmek için schwann hücre proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir.

İnsan çalışmalarında verilen melatonin dozları 0,1 mg ile 2000 mg arasında çok geniş bir aralıkta değişmektedir (Atik et al., 2011). İntravenöz(iv) verildikten sonra melatonin hızla dağılır ve elimine edilir (Iguchi et al., 1982). Ağızdan uygulanan melatonin biyoyararlanımı düşüktür. 0,5 mg üzerindeki melatonin dozları farmakolojik olarak terapotik kabul edilse de bu konuda net bir fikir birliği yoktur (Brzezinski, 1997). Shokouhi ve arkadaşları melatonin düşük doz (10 mg/kg) ve yüksek doz (50 mg/kg) verildiğinde düşük dozda myelin yıkımı ve aksonal değişiklikleri azalttığı görülmüş, yüksek dozda ise herhangi bir ultrastruktuel değişikliği tamamen nötralize etmiştir. 50 mg/kg'lık dozun güçlü bir nöroprotektif etkiye sahip olduğunu bildirmiştir (Rogério et al., 2002). Rogerio ve arkadaşları siyatik sinir kesisi sonrası 1, 5, 10 ve 50 mg/kg dozlarda melatonin uyguladıktan sonra neonatal omurilikte motor nöron ölümünde önemli bir düşüş bildirdiler. Bu çalışmada nöronal hayatta kalma oranı daha yüksek dozlar yerin düşük dozlarda daha yüksek olduğu gösterildi (Rogério et al., 2002). Melatonin 1-50 mg/kg dozlarda nöroprotektif etki 50-100 mg/kg dozlarda ise ölüme kadar yol açabilen komaya sebep olabileceği bildirildi (Rogério et al., 2002).

Melatoninin periferik sinir patolojilerinde yararlı etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma olmasına rağmen toksik etkisi olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Lehman ve Johnson melatonin ve Zoloftun(antidepresan) kombine kullanımlarında yüksek proteinli diyet ile birlikte kullanılması retinada melatonin/dopamin dengesizliğine yol aarak toksik optik nöropati yaptığı bildirilmiştir (Lehman and Johnson, 1999).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nde, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınarak 30/11/2020-11/01/2021 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışma esnasında 5199 numaralı “Hayvanları Koruma Kanunu” ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan deney hayvanlarının korunması, deney hayvanlarının üretim yerleri ile deney yapacak olan laboratuvarların kuruluş, çalışma, denetleme, usul ve esaslarına dair yönetmeliğine uyuldu.

Çalışmamızın cerrahi bölümü, ratların barındırılması, bakımı, beslenmesi, sakrifiye edilmesi işlemi belirli olan usul ve işleyiş esasları doğrultusunda Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmamız sırasında EMG kayıtlarının alınması Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı'nda yapıldı. Çalışmamızın histomorfolojik değerlendirilmesi, örneklerin ışık mikroskopları altında incelenmesi ve uygun histolojik yöntemlerle immunohistokimyasal incelemesi Sakarya Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. DENEY HAYVANLARI

Bu çalışmada, Sakarya Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilen yaklaşık 250-300 gram ağırlığında, erkek cinsiyete ve normal laringeal fonksiyonlara sahip 28 adet Wistar Albino Rat türü kullanıldı. Deney hayvanları uluslararası hayvan deney bakım ve deney kılavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, nem %45-65, 12 saat gündüz/gece siklusu) açık kafeslere alındı (Resim 3.1). Deney Hayvanları, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda standart koşullarda beslenerek takip edildi.



Resim 3.1: Cerrahi sonrası kafeste takibi yapılan denek grubu

Çalışmamızda dört grup ve her bir grupta yedi hayvan olacak şekilde hayvan modeli oluşturuldu (Tablo 1).

Tablo 1: Çalışma Grupları

Grup Adı	Deney Sayısı	Hayvan Yapılan İşlem
1. Grup	7	RLS Onarımı (Sutürasyon var)
2. Grup	7	RLS Hasarı (Sutürasyon yok)
3. Grup	7	RLS Hasarı (Sutürasyon yok) + Melatonin Tedavisi
4. Grup	7	RLS Onarımı (Sutürasyon var) + Melatonin Tedavisi

Grup 1; sinir onarımı kontrol grubu olarak belirlendi, sol RLS ortaya konulduktan sonra 11 numaralı bistüri yardımıyla sinir tam kat velev şeklinde kesildi. Sonrasında kesi yapılan sinir 10.0 prolén ile epinöral sutureasyona uygun olarak suture edilerek onarım yapıldı. Cerrahi saha strep kaslar ve cilt suture edilerek kapatıldı. Cerrahi sonrası takiplerinde bu gruba herhangi bir tedavi uygulanmadı.

Grup 2; sinir hasarı kontrol grubu olarak belirlendi, sol RLS ortaya konulduktan sonra 11 numaralı bistüri yardımıyla sinir tam kat velev şeklinde kesildi. Daha sonra sinir uçları karşı karşıya gelecek şekilde suture edilmeden bırakılarak cerrahi saha kapandı. Cerrahi sonrası bu gruba herhangi bir tedavi uygulanmadı.

Grup 3; Melatonin+RLS hasarı çalışma grubu olarak belirlendi, bu gruptaki hayvanlara sol RLS ortaya konulduktan sonra 11 numaralı bistüri yardımıyla sinir tam kat velev şeklinde kesildi. Daha sonra sinir uçları karşı karşıya gelecek şekilde suture edilmeden bırakılarak cerrahi saha kapandı. Cerrahi sonrası altı hafta boyunca günlük 10mg/kg dozda intraperitoneal Melatonin uygulandı.

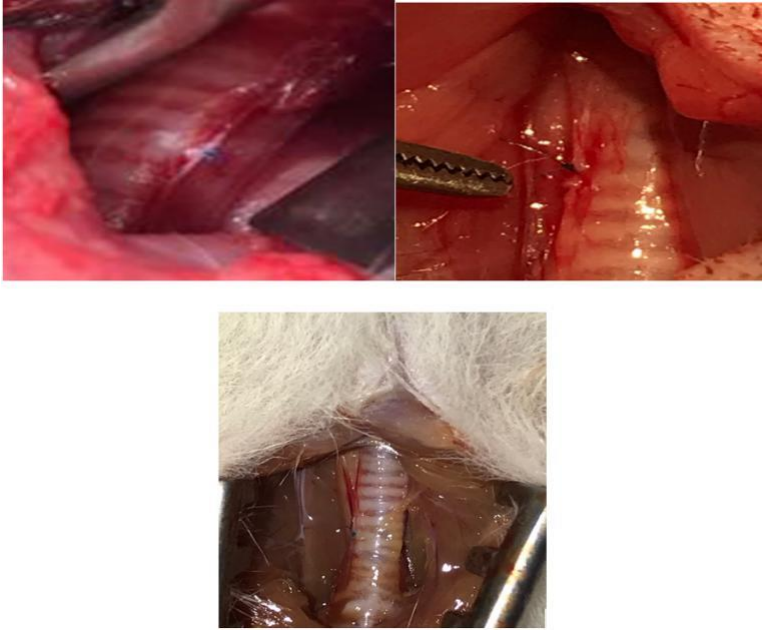
Grup 4; Melatonin+RLS hasarı onarımı çalışma grubu olarak belirlenip, bu gruptaki hayvanlara sol RLS ortaya konulduktan sonra 11 numaralı bistüri yardımıyla sinir tam kat velev şeklinde kesildi. Sonrasında kesi yapılan sinir 10.0 prolén ile epinöral sutureasyona uygun olarak suture edilerek onarım yapıldı. Cerrahi saha strep kaslar ve cilt suture edilerek kapatıldı. Cerrahi sonrası altı hafta boyunca günlük 10mg/kg dozda intraperitoneal Melatonin uygulandı.

3.2.CERRAHİ PROSEDÜR

Çalışmanın başlangıcında, her bir hayvana 4-6 saatlik gıda kısıtlamasından sonra subkutan olarak 45 mg/kg ketamin ile 5 mg/kg ksilazin enjeksiyonu yapılarak anestezi uygulandı. Tüm deney hayvanlarının operasyon öncesi laringoskopik muayenesi yapıldı. Bilateral vokal kord hareketleri normal olarak değerlendirildi. Bu sırada bazal değer olarak değerlendirilmek üzere Transoral Larengeal EMG kaydı alındı. Operasyon için hayvanın ventral boyun cerrahi bölgesi traş edildikten sonra aseptik olarak ameliyat için hazırlandı. Fareler tüm cerrahi prosedür boyunca oda havasında soludu. Saha cerrahiye uygun hale getirildikten sonra 15 numaralı bistüri ile boyun orta hatta mentumdan sternuma yaklaşık 2 cm'lik vertikal insizyon yapıldı, cilt ve ciltaltı geçilip tükrük bezleri cerrahi sahanın net olarak görüntülenmesi için nazikçe laterale ekarte edildikten sonra strep kaslar arasından orta hatta trakeaya gelindi. Bu aşamadan sonra sol rekürren laringeal sinir trakeaözefageal olukta görülüp diseke edildi. Sinir 11 numaralı bistüri ile velev tarzda kesilip daha sonra 10.0 prolen ile primer suture edildi (Resim 3.3). Bilateral rekürren sinir hasarı solunumsal yükü arttırması ve yaşamı tehdit edici olması sebebiyle tüm hayvanların sol RLS hasarı oluşturuldu. Strep kaslar ve cilt suture edildikten sonra cerrahi saha kapatılıp operasyon sonlandırıldı (Resim 3.2). Cerrahinin hemen sonrasında vokal kord üzerindeki etkiyi kontrol etmek için tüm hayvanların laringoskopik muayenesi tekrar yapılarak sol vokal kordun fiks olduğu izlendi. Cerrahinin öncesinde, hemen sonrasında, üçüncü hafta ve altıncı haftada laringoskopik muayenenin yanı sıra EMG kayıtları da tekrar alındı. Altıncı hafta sonunda hayvanlar sakrifiye edilip larenks dokusu ve trakea 6.-7. halkaya kadar histoloji değerlendirme için total eksize edildi (Resim 3.4).



Resim 3.2: Cerrahi Aşamaları



Resim 3.3: Sol RLS Sutürasyonu Sonrası Görüntüsü



Resim 3.4: Çıkarılan Larinks ve Trakea Dokuları

3.3.VOKAL KORD MUAYENESİ

Tüm hayvanlar anestezi uygulanıp cerrahi sahaya sırt üstü yatırıldıktan sonra 15 derecelik eğim verilerek ters trendelenburg pozisyonuna alındı. Dilin ön orta 1/3'lük kısmından 3.0 ipek sutür geçirilip dil daha iyi görüş alanı sağlamak amacıyla çekildi ve askıya alındı. 0 derece 3.0 otoendoskop (R11573A; Karl Storz) ile vokal kord hareketleri değerlendirildi. Vokal kord hareketinin standardizasyonu için Mok ve arkadaşlarının yapmış olduğu sübjektif bir skala ile puanlandırıldı. 0 puan; tamamen hareketsiz vokal kord, 1 puan; vokal kordda hareket kısıtlılığı, 2 puan; vokal kord tamamen hareketli olarak değerlendirildi (Mok et al., 2020) (Tablo 2).

Tablo 2: Vokal Kord Muayene Skalası

PUAN	MUAYENE
0	Hareketsiz vokal kord
1	Kısmi hareketli vokal kord
2	Hareketli vokal kord

3.4.EMG

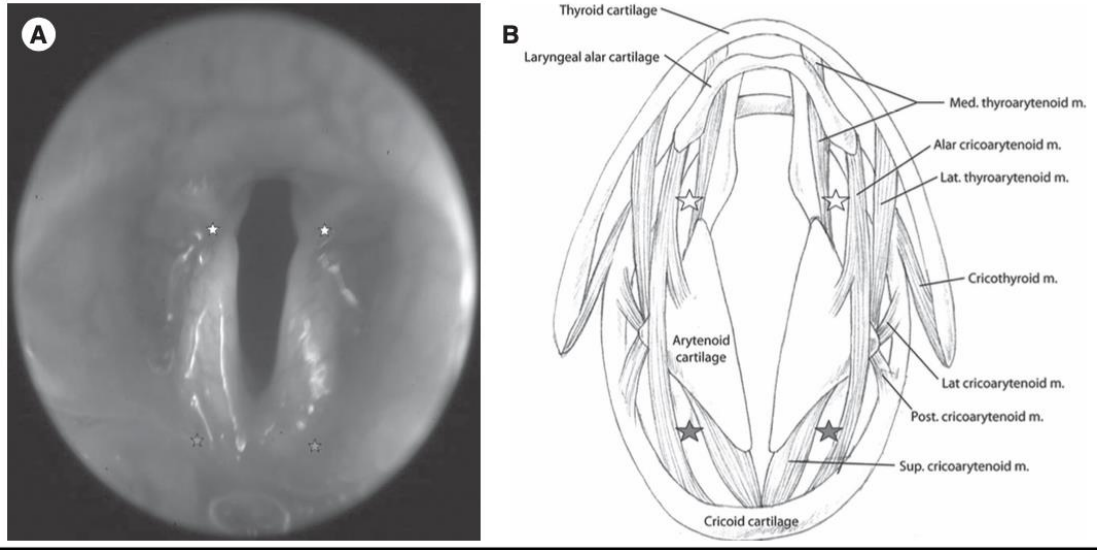
Tüm elektrofizyolojik ölçümler Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı EMG Laboratuvarı'nda yapıldı. Ratların EMG Powerlab 8/35 (ADInstruments, Avustralya) biyokayıt cihaz kullanılarak kaydedildi (Resim 3.5). Transoral Larengeal EMG'nin değerlendirilmesi, bir fizyoloji uzmanı eşliğinde kör bir şekilde yapıldı. Tüm ratlara anestezi altında uyku halindeki spontan, uyarılmamış respiratuar siklus sırasında Transoral Larengeal EMG uygulandı. Hayvanlar ameliyat masasına 15 derecelik bir eğimle sırt üstü yatırıldı. Dilin ön orta 1/3'lük kısmına 3.0 ipek sütür ile dil daha iyi görüş alanı sağlamak amacıyla çekildi ve askıya alındı. Anestezi altında vokal kord muayenesi sonrası elektrodun ağız içinde manipülasyonunu kolaylaştırmak amacıyla enjektör kapağının uç kısmı kesilip elektrot buranın içerisinden geçirilerek sabitlendi. EMG elektrodu 25mmx0,30 (1''x30G) Konsantrik iğne elektrot) operatörün sağ elinde, 0 derece 3mm çaplı (R11573A; Karl Storz) marka endoskop sol elinde olacak şekilde endoskopik muayene eşliğinde elektrod vallecülaya temas ettirildikten sonra glottis görüntülendi (Resim 3.6). Elektrot, sol vokal kord posteriorunda posterior krikoaritenoid kasa denk gelecek şekilde yerleştirildi. Elektrot yerleştirilen bölge için Tessema ve arkadaşlarının yaptığı çalışma örnek alındı (Tessema et al., 2008) (Resim 3.7). Ratın sağ pectoralis majör kasına toprak elektrodu yerleştirildi. Kayıt alınırken ekran süpürme hızı 1k (1000 örnekleme hızı)/sn duyarlılık 100 mV olarak ayarlandı. Tüm gruplar cerrahi işlem öncesinde, hemen sonrasında, üçüncü haftada ve altıncı haftada EMG kayıtları alındı. Gruplar önce EMG kayıtları açısından kendi aralarında değerlendirildi. Sonrasında tüm gruplar hasar öncesi, sonrası, üçüncü hafta ve altıncı hafta sonuçları karşılaştırıldı. EMG kayıtları motor ünite potansiyeli (MÜP) açısından karşılaştırıldı.



Resim 3.5: EMG Cihazı, Otoendoskop, Soğuk Işık Kaynağı



Resim 3.6: Transoral Larengeal EMG'nin Yapılışı



Resim 3.7: Rat larinksinde yapılan EMG’de güçlü sinyaller alabilmek için iğne elektrotun yerleştirildiği bölgeler; posterior krikoaritenoid kas (gri yıldız), tiroaritenoid kas (beyaz yıldız) (Tessema et al., 2008)

3.5.HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Tüm deney hayvanları servikal dislokasyon sonucu sakrifiye edildikten sonra larinks ve trakea dokusu çıkarıldı (Resim 3.8). Dokular %10’luk tamponlanmış nötral formaldehit solüsyonuna (Formaldehit 100 cc; Çeşme suyu 900 cc; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4 g; Na_2HPO_4 6.5 g) konularak 48 saat boyunca fikse edildi.



Resim 3.8: Histolojik inceleme için çıkarılan larenks ve trakea dokuları

Fiksasyon aşaması sonrasında dokular alkol ile dehidratasyona uğratıldı, ksilol ile şeffaflaştırma yapıldı ve parafinde gömme işlemi yapılarak rutin doku takibi işlemi

tamamlandı. Bu histolojik işlemler SLEE Mainz (Mainz, Almanya) marka doku takip cihazı kullanılarak yapıldı (Resim 3.9). Doku takip cihazında aşağıdaki protokole uygun olarak doku takip basamaklarından geçirildi (Tablo 3).



Resim 3.9: Doku takip cihazı

Tablo 3: Doku Takip Basamakları

SIRA	YAPILAN İŞLEM	SÜRE
1	%70 alkol	1 SAAT
2	%80 alkol	1 SAAT
3	%96 alkol	1 SAAT
4	%96 alkol	1 SAAT
5	%96 alkol	1 SAAT
6	Absolu alkol	1 SAAT
7	Absolu alkol	1 SAAT
8	Absolu alkol	1 SAAT
9	Ksilen	1 SAAT
10	Ksilen	1 SAAT
11	Parafin 1	2 SAAT
12	Parafin 11	2 SAAT

Doku takip işlemleri tamamlanan doku örnekleri parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan Thermo Scientific HM 355S marka mikrotom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler kullanılacak boyama yöntemlerine göre uygun lamlara alındı. Hematoksilen Eozin (H&E) (Bio-Optica, Milano, İtalya) boyama için kesitler rodajlı lamlara alınarak boyama işlemine kadar kurumak üzere oda sıcaklığında bekletildi. Kİ-67 ve Myelin Protein Zero (P0 proteini), immün reaktivitesinin belirlenmesi için kesitler polilizinli lamlara alındı boyama yöntemi için Avidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi uygulandı. Boyama işlemleri, lamlara alınan doku örneklerine deparafinizasyon işleminden geçirilip parafinden kurtarma aşaması ile başladı.

3.5.1.Hematoksilen -Eosin Boyama Yöntemleri

H&E boyama basamakları, yukarı tablodaki gibi tamamlandıktan sonra, lamlar entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenen duruma hazır hale getirildi (Tablo 4). Işık mikroskobik düzeyde sinir dokusunda schwann hücre sayısı, akson hasarı ve sitoplazmik vakuolizasyon derecelendirilmesini yapabilmek için ışık mikroskoba entegre edilmiş "NIS-Elements Imaging Software" programı kullanıldı. Slaytlar ışık mikroskobu altında 40X, 100X ve 200X büyütmelemlerde incelendi. Her deneysel gruptan sekiz bağlantılı bölüm dikkatlice seçildi ve her bir enine kesitin 6 ardışık alanı sayıldı ve ortalama değerler sayısal olarak belirlendi. H&E ile hazırlanan preparatlarda, schwann hücre sayısı, akson hasarı, stoplazmik vauolizasyon durumları incelenip sayılarak veriler oluşturuldu. Ayrıca periferik sinir yapıları incelenerek yakın ilişkili bağdoku(epinöryum) yapıları hakkında karşılaştırılmalar yapıldı.

Tablo 4: H&E Boyama Yöntemleri

Deparafinizasyon	30 dakika(Etövde)
KSİLOL-1	2 DAKİKA
KSİLOL-2	2 DAKİKA
%100 ALKOL -1	1 DAKİKA
% 100 ALKOL-2	1 DAKİKA
%96 ALKOL-1	1 DAKİKA
%96 ALKOL-2	1 DAKİKA
AKAN SU	3 DAKİKA
HEMA TOKSİLEN	3 DAKİKA
AKAN SU	3 DAKİKA
ASİT ALKOL	2*2 SANİYE
AKAN SU	3 DAKİKA
%80 ALKOL	1.5 DAKİKA
EOSİN	20 SANİYE
%96 ALKOL	2 DAKİKA
%96 ALKOL	2 DAKİKA
%100 ALKOL	2 DAKİKA
%100 ALKOL	2 DAKİKA
KSİLOL	2 DAKİKA
KSİLOL	2 DAKİKA

3.5.1.1.Deparafinizasyon

Klasik yöntemlerle kesitler deparafinize edildi. Bunun için alınan kesitler 30 dakika 59° C’ de etövde bekletildi. Sonraki gün etövden çıkarılıp oda ısısında soğumaları beklendi. 3x5 dakika Ksilol’den geçirildi. Sonrasında sırası ile aşağıdaki işlemler uygulandı.

3.5.1.2.Dehidratasyon

Dehidratasyon işlemi için, öncelikle %100'lük etanol çözeltisinden bekletildikten sonra sırasıyla %96, %80 ve %70 etanol solüsyonunda 3'er dakika bekletilir(Tablo 5).

Tablo 5: Dehidratasyon Yöntemi

%100 etanol	5 dakika
%96 etanol	3 dakika
%80 etanol	3 dakika
%70 etanol	3 dakika

Dehidratasyon işlemi devamında dokulara Antijen maskesinin kaldırılması işlemi yapıldı. Doku örneklerini taşıyan lamalar, Sitrat Tamponu Solüsyonu (Ph:6.0) içine aktarılıp Mikrodalga fırında 95-100°C'de yaklaşık 20 dakika ısıtılacak şekilde uygulandı. Lamalar mikro dalga fırından çıkarılıp soğumaları için 20 dakika bekletildi. Soğuma işleminden sonra doku örneklerinin etrafı hidrofobik kalem ile işaretlenerek boyama yapılacak alanlar belirlendi. Bu işlemi takiben doku örnekleri 3x5 dakika Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra endojen peroksit aktivitesi için blokaj işlemi yapıldı.

3.5.1.3.Blokaj

Bu basamakta non-spesifik antijenik bölgeleri bloke edildi. Doku örnekleri üzerine otomatik mikropipetle %3 lük Hydrogen Peroxide Blocking Reagent (ab64218)'dan aktarılıp 10 dakika beklendi. Bu süre sonunda oda ısısında doku örnekleri 3x5 dakika PBS ile yıkandı.

3.5.2.İmmünohistokimya Boyama Yöntemleri

Yıkama işleminden sonra dokuların üzerindeki sıvı dikkatli bir şekilde kurutma kağıdı ile alındı. Sıvısı alınan dokularda zemin boyasını engellemek için Ultra V Block solüsyonu (LabVision marka UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) ile 15 dakika muamele edildi. Bu süre sonunda oda ısısında doku örnekleri 3x5 dakika PBS ile yıkandı. Bu işlem sonrasında doku üzerindeki sıvı

kurutma kağıdı ile dikkatlice alındı. Sonrasında primer antikorlar (Kİ-67 VE P0 proteini), 1/400 dilüsyonu dikkatlice hazırlanıp, doku üzerine mikropipet ile aktarılıp yaklaşık 60 dakika oda ısısında ve nemli ortamda inkübe edildi. Primer antikor uygulamasından sonra lamalar 3x5 dakika PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra 13 dakika Biotinlated Goat anti-Rabbit (LabVision marka UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) sekonder antikoru uygulandı. Devamında lamalar 3x5 dakika PBS ile yıkama işlemi yapılacak. İşlem devamında 15 dakika Streptavidin Peroxidase (LabVision marka UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) uygulandı. Bu işlemin devamında 3x5 dakika PBS ile 10 dakika yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra 10 dakika DAB/Kromojen LabVision marka AEC Substrat System) ile karanlık ortamda dokulara uygulandı. (20ml AEC kromojen + 1,5 ml AEC substrat iyice karıştırıldı). Ardından doku örnekleri 3x5 dakika distile su ile yıkandı. Doku örnekleri Mayers Hematoksilen-Eosin de 40 saniye bekletildikten sonra akan musluk suyunda 3 dakika yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra doku örnekleri, sırası ile %70 alkolde 30 saniye, %80 alkolde 30 saniye, %96 lık alkolde 30 saniye, %100 lük alkolde 1 dakika ve son olarak 2x1 dakika ksilene aktarıldı. Ksilenden sonra preperatlar kurulanıp kapatıcı (ScyTek marka Aqueous Mounting Medium) ile kapatıldı.

3.5.3.İmmünohistokimya Boyaması Değerlendirilmesi

Rastgele seçilen beş alanda boyanma derecesi skorlaması yapıldı ve skoru en yüksek olan alan tespit edildi. Her 40x büyütme alanında en az 100 hücre işaretlendi. Kesitlerde, boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesi kriter olarak alındı. Semikantitatif bir yöntemle, skorlama yapıldı. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), +1(zayıf boyanma), +2 (orta boyanma), +3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. (Her kesit için immünohistokimyasal boyanma skorlaması, H-SCORE adı verilen ve $(I \times PC)$, (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) formülüyle hesaplanan bir skorlama algoritması kullanılarak hesap edildi (Tablo 6).

Tablo 6: Boyanma Derecesi

Boyanma Derecesi	
0	Boyanma yok
+1	Zayıf boyanma
+2	Orta boyanma
+3	Güçlü boyanma

H -SCORE: I x PC (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi)

3.6.İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 26 programından yararlanıldı. Sürekli değişkenler için ortalama, $\pm$ standart sapma, kategorik değişkenler için yüzde değerleri kullanıldı. Numerik verilerin karşılaştırılmaları izleminde öncelikle Kolmogorov Smirnov testi ile normal dağılıma uygunluk kontrol edildi. Bunun sonucunda non parametrik testlerin kullanılmasına karar verildi. Gruplar arasındaki numerik karşılaştırmalar için Kruskal Wallis, kategorik karşılaştırmalar için Ki-Kare testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık oluşması durumunda Post-Hoc analizi yapıldı. $P<0.05$ istatistiki olarak anlamlılık için yeterli kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya her bir grupta yedişer denek ve toplamda yirmi sekiz adet denek olacak şekilde başlandı. Çalışma boyunca denek sayısında herhangi bir kayıp yaşanmadı.

4.1.VOKAL KORD MUAYENE BULGULARI

İşlem öncesi çalışmaya katılan tüm deneklere laringoskopik muayene yapılarak vokal kord muayenelerinin normal olduğu gözlemlendi. Sol rekürren laringeal sinir kesisi sonrası yapılan laringoskopik muayenede ise beklenildiği gibi tüm deneklerde sol vokal kord paralizisinin olduğu görüldü.

İşlem sonrası üçüncü ve altıncı haftada tüm gruplara laringoskopik muayene yapılarak vokal kord hareketleri değerlendirildi.

Üçüncü haftadaki laringoskopik muayenede; birinci grupta bir denekte, dördüncü grupta üç denekte vokal kordun kısmi olarak hareketlendiği görüldü. İkinci ve üçüncü grupta hiçbir denekte sol vokal kord hareketi görülmedi. Üçüncü haftada sayısal olarak dördüncü grupta birinci gruba göre daha fazla sayıda denekte vokal kord hareketi gözlemlense de yapılan Fisher Exact testte iki grup arasında vokal kord hareketi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,237$).

Altıncı haftadaki laringoskopik muayenede; birinci grupta daha önce kısmi olarak sol vokal kord hareketi gözlenen denekte bu sefer vokal kord hareketi daha da iyileşerek tam hareketli görülürken bunun haricinde iki denekte yeni ortaya çıkan kısmi sol vokal kord hareketi gözlenerek toplam üç denekte sol vokal kord hareketli izlendi. Dördüncü grupta dört denekte vokal kordun hareketlendiği görülürken bu dört denneğin ikisi tam hareketli diğer ikisi ise kısmi hareketli olarak görüldü. İkinci ve üçüncü grupta da yine üçüncü haftadaki muayene bulgusunda bir değişiklik görülmeyip hiçbir denekte vokal kord hareketi izlenmedi. Altıncı haftada sayısal olarak dördüncü grupta birinci gruba göre daha fazla sayıda denekte vokal kord hareketi gözlemlense de iki grup arasında vokal

kord hareketi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,559$) (Resim 4.1).

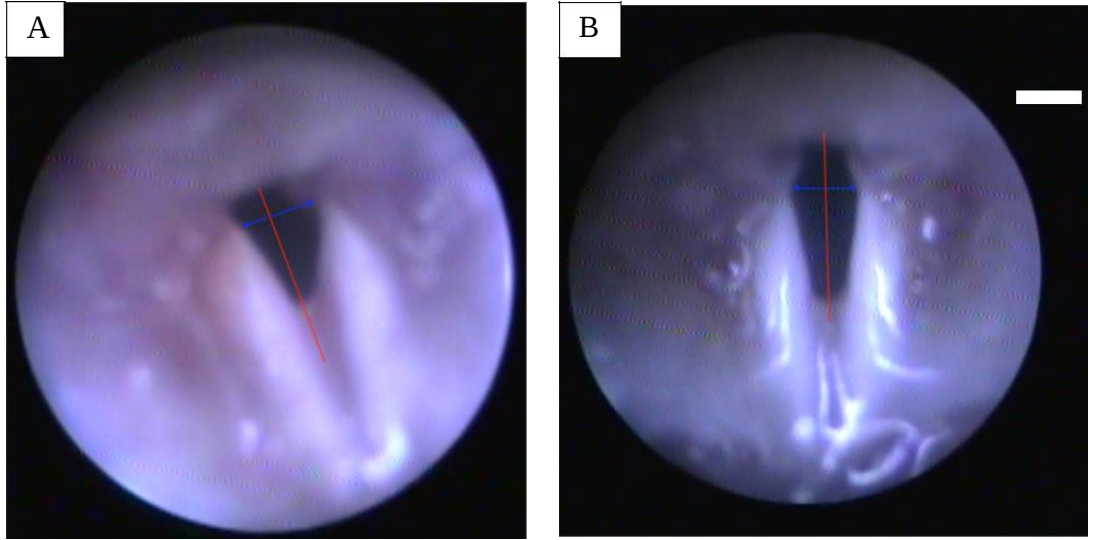
Vokal kord iyileşme yüzdeleri zamansal değerlendirildiğinde birinci grupta, üçüncü hafta bir denekte vokal kordun hareketlendiği görülürken altıncı haftada iki denekte daha iyileşme görülüp üç hayvanda vokal kord hareketi gözlenmiştir. İkinci ve üçüncü grupta, altı hafta boyunca hiçbir denekte vokal kord hareketi gözlenmedi. Dördüncü grupta, üçüncü hafta üç denekte vokal kord hareketli izlenirken altıncı haftada bir denekte daha iyileşme görülüp 4 denekte vokal kord hareketi gözlenmiştir (Tablo 7) (Şekil 4.1)

Tablo 7: Gruplar Arasındaki Üçüncü ve Altıncı Hafta Vokal Kord İyileşme Oranlarının Karşılaştırması

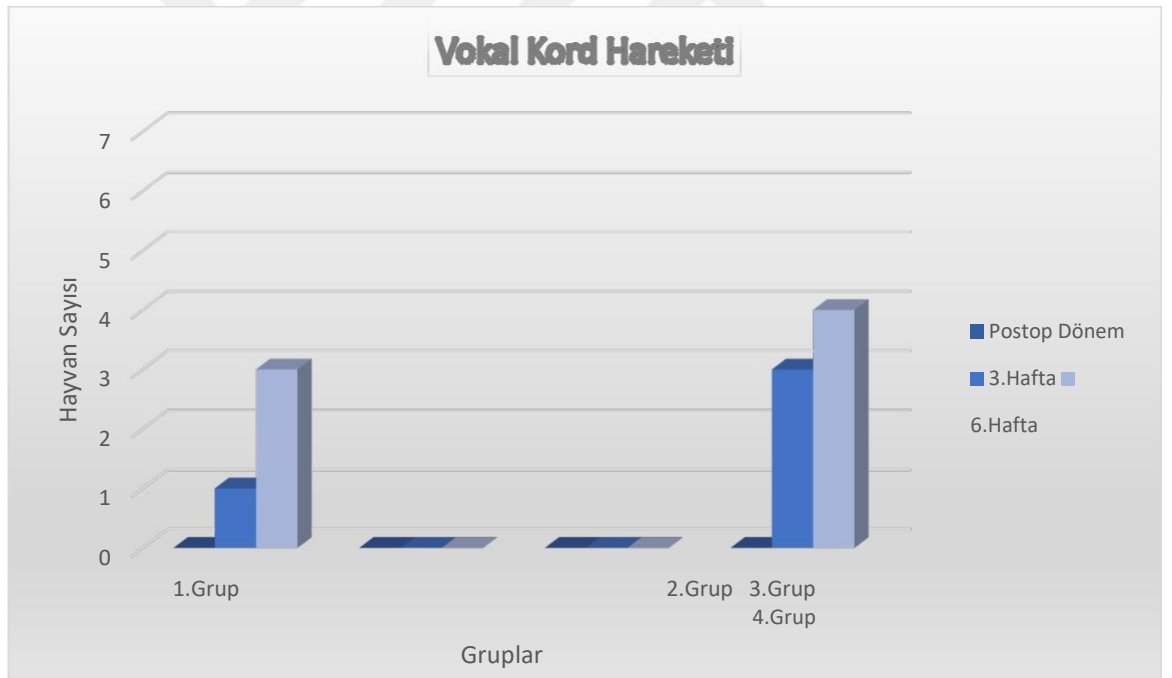
Zaman	İyileşme Şekli	1.grup n (%)	2.grup n (%)	3.grup n (%)	4.grup n (%)	p
3. Hafta Sonuçları	Parsiyel İyileşme	1 (%14,3)	0	0	3 (%42,9)	0,237*
	Tam İyileşme	0	0	0	0	
	Parsiyel/Tam İyileşme	1 (%14,3)	0	0	3 (%42,9)	0,237*
6. Hafta Sonuçları	Parsiyel İyileşme	2 (%28,6)	0	0	2 (%28,6)	0,788*
	Tam İyileşme	1 (%14,3)	0	0	2 (%28,6)	
	Parsiyel/Tam İyileşme	3 (%42,9)	0	0	4 (%57,2)	0,593*

*Ki-kare testi

n: sayı, %: Yüzde, $p<0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.



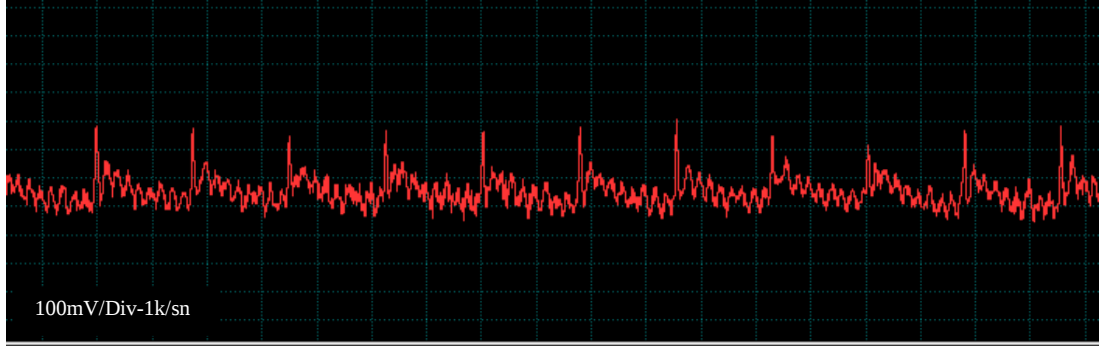
Resim 4.1: Deneklerin laringoskopik görüntüsü A: Sol vokal kord paralitik
B: Normal vokal kord hareketi



Şekil 4.1: Vokal kord hareketi açısından gruplar arasındaki zamansal dağılım grafiği

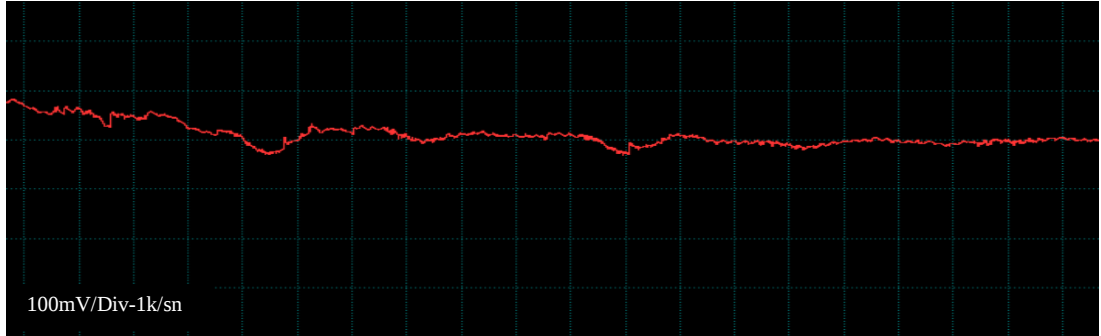
4.2.EMG BULGULARI

Deney gruplarındaki tüm deneklerin işlem öncesi yapılan Transoral Laringeal EMG’de motor ünite potansiyeli (MÜP) amplitüdü ölçüldü. İşlem öncesi tüm deneklerde bazal değer olarak MÜP amplitüd değerleri belirlendi ve bu değerler normal olarak değerlendirildi (Şekil 4.2). Dört grubun işlem öncesi yapılan EMG kaydından alınan MÜP amplitüd değerleri istatistiksel olarak Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında gruplar arasında hasar öncesi yapılan EMG kaydındaki MÜP amplitüd değerleri açısından istatistiksel fark gözlenmedi ($p=0,860$). Bu sonuçla grupların karşılaştırılabilir olduğuna karar verildi (Tablo 8).



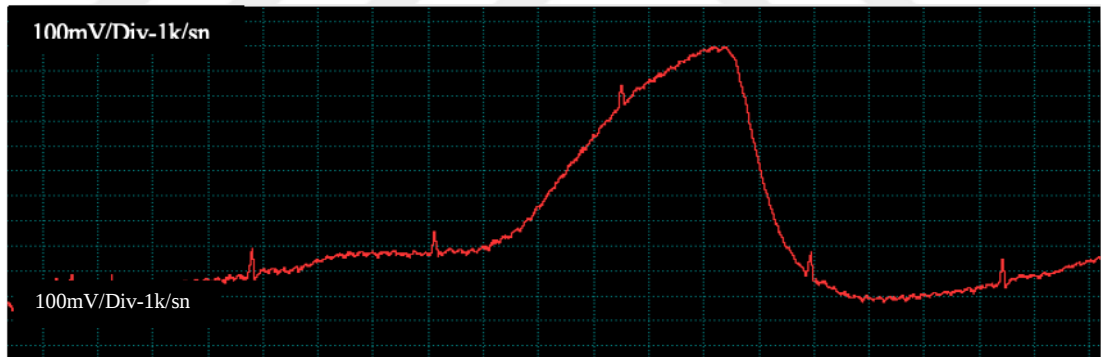
Şekil 4.2:Anestezi altındaki denekte spontan solunum esnasında yapılan EMG kaydı. Motor ünitelerin aksiyon potansiyellerinin MÜP amplitüdlerinin normal olduğu görülmektedir.

İşlem sonrası tüm deneklerin EMG kayıtları alındı ve MÜP amplitüdü olup olmadığı bakıldı. İşlem sonrası tüm deneklerde MÜP amplitüdünün kaybolduğu görüldü (Şekil 4.3).



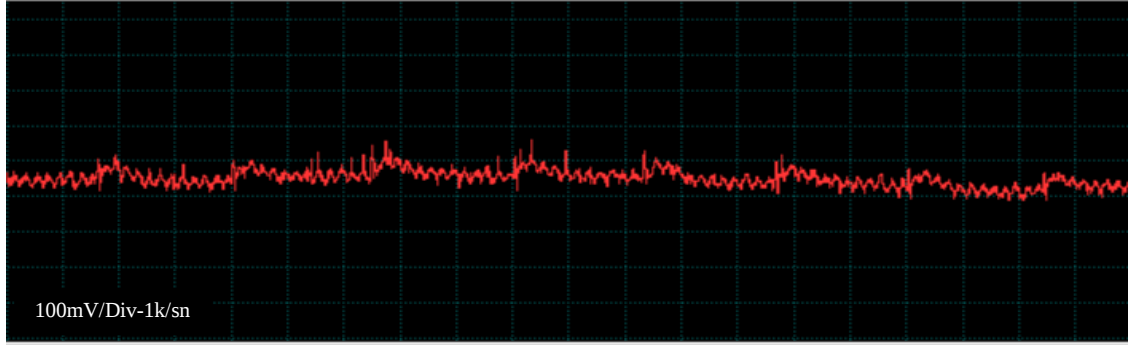
Şekil 4.3: Sinir kesisinden hemen sonra alınan EMG kaydı. MÜP amplitüdlerinin olmadığı görülmektedir.

İşlem sonrası üçüncü haftada tüm deneklere yapılan EMG kaydında endoskopik olarak vokal kord hareketi gözlenen birinci gruptaki bir denekte ve dördüncü gruptaki üç denekte düzensiz ve düşük amplitüdlü MÜP'lerin oluştuğu görüldü (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: İşlem sonrası üçüncü haftada alınan EMG kayıtları. Düzensiz ve düşük amplitüdlü MÜP oluştuğu görülmektedir.

İşlem sonrası altıncı haftada yapılan EMG kayıtlarında üçüncü haftada MÜP amplitüdü saptanan deneklerin altıncı haftadaki MÜP'lerin daha sık oluştuğu ve amplitüdlerinin ise üçüncü haftaya göre daha yüksek voltajda olduğu görüldü (Şekil 4.5). Ayrıca birinci ve dördüncü grupta altıncı hafta sonuçlarında daha fazla denekte de MÜP'lerin oluşmaya başladığı görüldü.



Şekil 4.5: İşlem sonrası altıncı haftada alınan EMG kayıtları. MÜP amplitüdlerinin altıncı haftaya kıyasla daha sık ve düzenli oluştuğu görülmektedir.

Üçüncü haftada yapılan EMG kaydında; birinci grupta endoskopik olarak sol vokal kord hareketi gözlenen bir denekte MÜP amplitüdü saptandı. Birinci gruptaki diğer deneklerde vokal kord hareketi gözlenmediği gibi EMG’de de MÜP alınamadı. Dördüncü grupta endoskopik olarak sol vokal kord hareketi gözlenen üç denekte MÜP amplitüdü saptanırken bu gruptaki sol vokal kordu hareketsiz olan dört denekte MÜP alınamadı. İkinci ve üçüncü grupta hiçbir denekte MÜP alınamadı.

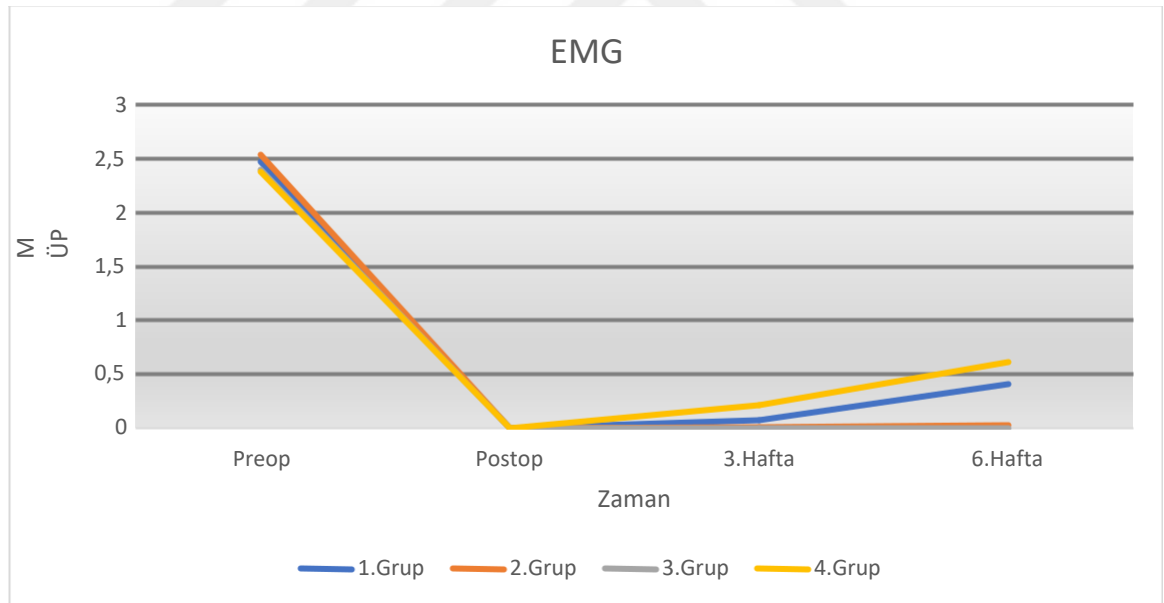
Altıncı haftada yapılan EMG kaydında; birinci grupta endoskopik olarak sol vokal kord hareketi gözlenen üç denekte MÜP amplitüdü saptanırken üçüncü haftada MÜP saptanan denekte MÜP amplitüdlerinin sıklaştığı ve voltaj değerlerinin arttığı görüldü. Dördüncü grupta endoskopik olarak sol vokal kord hareketi gözlenen dört denekte MÜP amplitüdü saptanırken üçüncü haftada MÜP saptanan deneklerde MÜP amplitüdlerinin sıklaştığı ve voltaj değerlerinin arttığı gözlemlendi. Altıncı haftada MÜP amplitüdü saptanan birinci ve dördüncü grubun MÜP amplitüd değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında dördüncü grupta MÜP saptanan denek sayısı fazla olması ve amplitüd değerlerinin yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,248$) (Şekil 4.6).

Yapılan EMG incelemesinde dördüncü grupta amplitüd değerlerinin zamansal değişimi incelendiğinde üçüncü ve altıncı haftalarda hesaplanan MÜP amplitüd değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ($p=0,021$) (Tablo 8).

Tablo 8: Grupların İşlem sonrası üçüncü ve altıncı haftada Saptanan MÜP Amplitüd değerleri

Gruplar	Preop	3. hafta	6. hafta
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
	Ortanca [1.Ç-3.Ç]	Ortanca [1.Ç-3.Ç]	Ortanca [1.Ç-3.Ç]
1.grup	2,47±0,38 2,45 [2,34-2,77]	0,456±0,00 0,00 [0,00-0,00]	0,70±0,68 0,53 [0,13-0,70]
2.grup	2,54±0,24 2,58 [2,31-2,80]	0,00±0,00 0,00 [0,00-0,00]	0,00±0,00 0,00 [0,00-0,00]
3.grup	2,40±0,29 2,41 [2,19-2,66]	0,00±0,00 0,00 [0,00-0,00]	0,00±0,00 0,00 [0,00-0,00]
4.grup	2,38±0,43 2,44 [2,09-2,65]	0,369±0,20 0,16 [0,00-0,54]	1,07±0,48 1,00 [0,65-1,57]

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, 1Ç: 1. Çeyreklik, 3Ç: 3. Çeyreklik

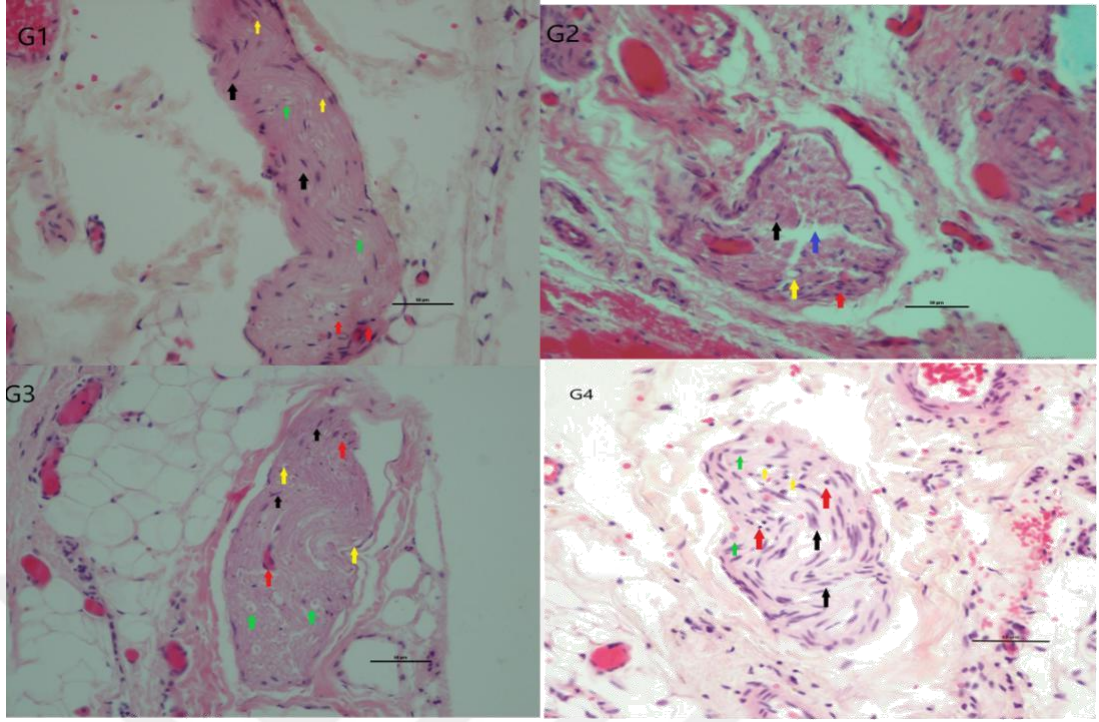


Şekil 4.6: EMG kaydında alınan MÜP amplitüd değerlerinin zamansal değişiminin grafikteki dağılımı

4.3.HİSTOLOJİK BULGULAR

Slaytlar ışıık mikroskobu altında 40X, 100X ve 200X büyütmelerde incelendi. Her deneysel gruptan sekiz bağlantılı bölüm dikkatlice seçildi ve her bir enine kesitin altı ardışık alanı sayıldı ve ortalama değerler sayısal olarak belirlendi.

Hematoksilen eozin boyama ile rekürren laringeal sinir çevresi incelendiğinde; birinci grupta, piknotik nöron hücreleri ve yer yer schwann hücreleri görülmekte. Sinir doku etrafındaki epinöryum tabakası düzenlenmeye başlamış. İkinci grupta, sinir dokuda parçalanma görülmekte. Schwann hücreleri birinci gruba göre daha az sayıdadır, ayrıca ikinci grupta hasar gören piknotik nöron hücreleri görüldü. Üçüncü grupta, schwann hücre sayıları ikinci grup haricinde diğer gruplara göre daha düşük izlendi. Üçüncü grupta epinöryum tabakası genişlemiş durumda görüldü. Dördüncü grupta, çok sayıda schwann hücresi görüldü. Çok az sayıda piknotik nöron hücresi görüldü. Epinöryum tabakası sinir doku etrafında normal düzeninde bulunmaktadır. (Resim 4.2).



Resim 4.2: Gruplara ait H&E periferik sinir dokusu 50 scala bar 200x görüntüleri. Siyah ok (Schwann hücreleri), kırmızı ok (piknotik çekirdekli hasarlı nöron hücresi), sarı ok(sitoplazmik vakuolizasyon), yeşil oklar(akson hasarı), mavi ok(parçalanmış sinir dokusu)

Schwann hücre sayısı ortalama değeri, birinci grupta $14,43 \pm 1,27$, ikinci grupta $9,00 \pm 0,82$, üçüncü grupta $11,71 \pm 0,76$, dördüncü grupta $18,00 \pm 2,24$ olarak tespit edildi. Schwann hücre sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir fark görüldü ($p < 0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında Post-Hoc analiz yapılarak hesaplandı. En küçük p değeri; ikinci ve dördüncü grubun karşılaştırılmasında görüldü ($p < 0,001$).

Akson hasarı, birinci grupta ortalama $8,00 \pm 0,82$, ikinci grupta $15,29 \pm 1,11$, üçüncü grupta $11,86 \pm 1,34$, dördüncü grupta $4,14 \pm 0,69$ olarak tespit edildi. Akson hasarı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında en küçük p değeri; ikinci ve dördüncü grubun karşılaştırılmasında görüldü ($p < 0,001$).

Sitoplazmik vakuolizasyon, birinci grupta ortalama $85,43 \pm 0,98$, ikinci grupta $11,71 \pm 1,50$, üçüncü grupta $9,29 \pm 1,80$, dördüncü grupta $3,86 \pm 0,69$ olarak tespit edildi. Sitoplazmik vakuolizasyon açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

fark olduğu görüldü ($p<0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında en küçük p değeri; ikinci ve dördüncü grubun karşılaştırılmasında görüldü ($p<0,001$) (Tablo 9).

Tablo 9: Tüm Grupların Histolojik Olarak Değerlendirildiği Parametreler ve Histolojik Sonuçları

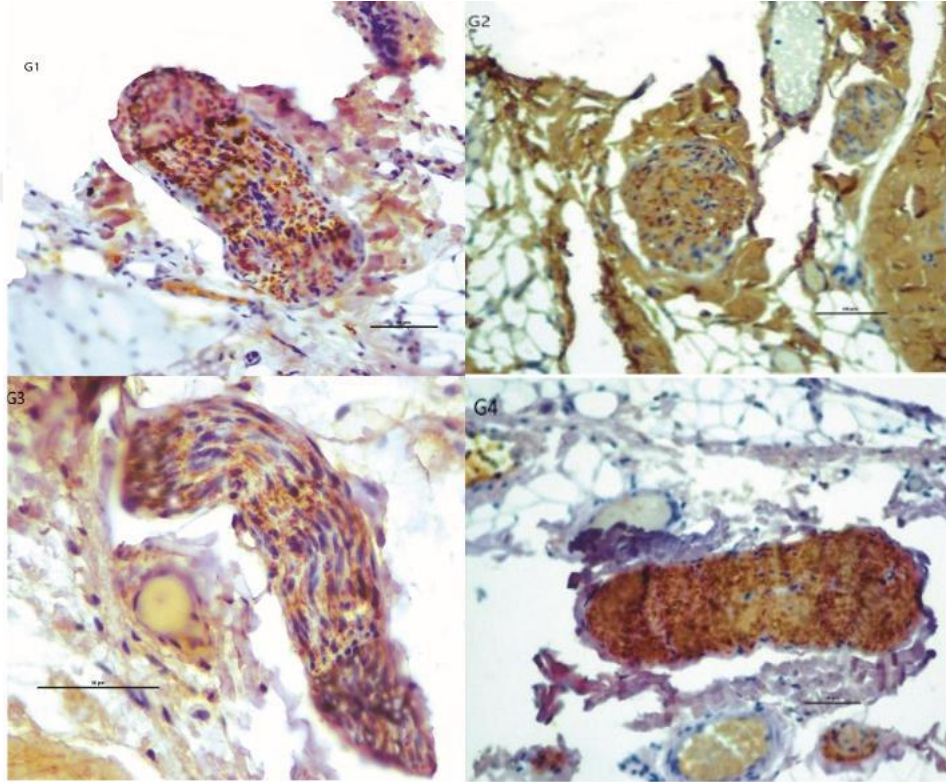
Değişkenler	1. grup Ort±SS Ortanca [1.Ç- 3.Ç]	2. grup Ort±SS Ortanca [1.Ç- 3.Ç]	3. grup Ort±SS Ortanca [1.Ç- 3.Ç]	4. grup Ort±SS Ortanca [1.Ç- 3.Ç]	P
Schwann hücre sayısı	14,43±1,27 15,00 [14,00- 15,00]	9,00±0,82 9,00 [8,00- 10,00]	11,71±0,76 12,00 [1,00- 12,00]	18,00±2,24 17,00 [16,00- 20,00]	<0,001* p ₁₋₂ =0,002 p ₁₋₃ =0,142 p ₁₋₄ =0,106 p ₂₋₃ =0,093 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ =0,002
Akson hasarı	8,00±0,82 8,00 [7,00-9,00]	15,29±1,11 15,00 [14,00- 16,00]	11,86±1,34 12,00 [11,00- 13,00]	4,14±0,69 4,00 [3,00-4,00]	<0,001** p ₁₋₂ =0,002 p ₁₋₃ =0,103 p ₁₋₄ =0,110 p ₂₋₃ =0,125 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ =0,001
Sitoplazmik vakuolizasyon	5,43±0,98 5,00 [5,00-6,00]	11,71±1,50 12,00 [10,00- 13,00]	9,29±1,80 9,00 [8,00- 11,00]	3,86±0,69 4,00 [3,00-4,00]	<0,001** p ₁₋₂ =0,002 p ₁₋₃ =0,050 p ₁₋₄ =0,186 p ₂₋₃ =0,260 p ₂₋₄ <0,001 p ₃₋₄ =0,001

*Welch Anova Testi, **Anova Testi, *** Post-Hoc Analiz

P<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, 1Ç: 1. Çeyreklik, 3Ç: 3. Çeyreklik

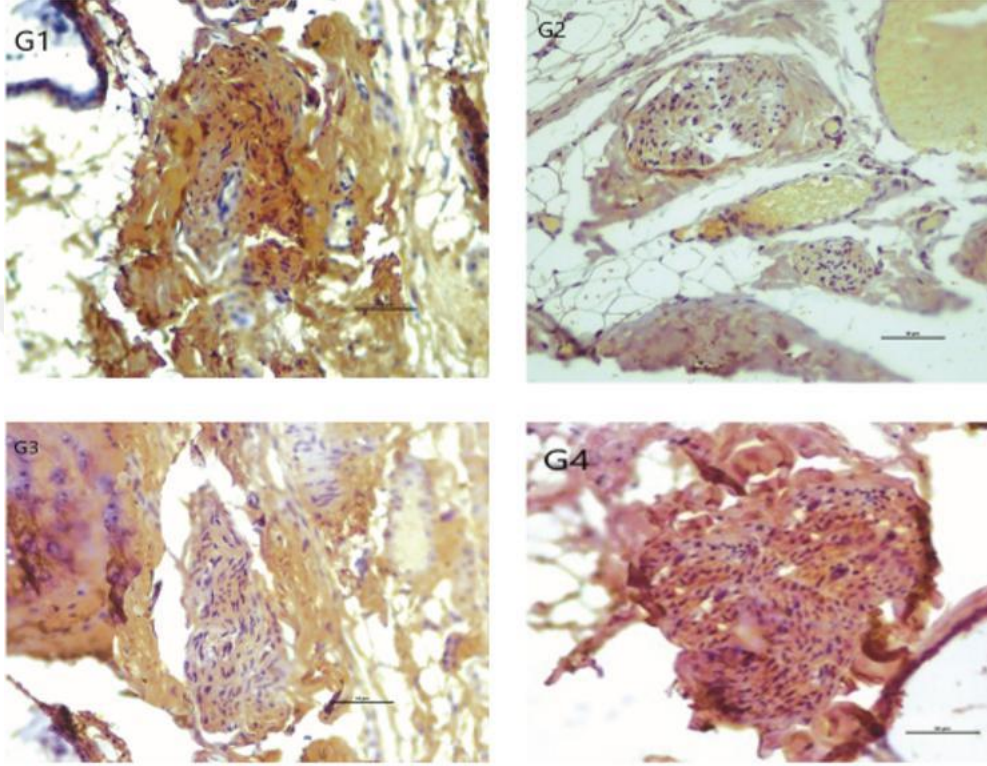
Grup 4; P0 yoğunluğu en fazla olan gruptu. Daha sonra Grup 1 ve Grup3'te P0 yoğunluğu gölenirken, en düşük P0 boyanma yoğunluğu ise Grup 2'de olduğu görüldü. 2. Grupta P0 yoğunluğunun daha düşük yoğunlukta çıkması dokudaki az sayıda görülen schwann hücre sayısı olmasından kaynaklanmaktadır (Resim 4.3).



Resim 4.3: Periferik sinir hasarı alanında gruplara ait P0 immünohistokimya boyanma preparatları, 50 scala bar, 200x büyütme

Sol rekürren laringeal sinir dokusu üzerinde P0 immünohistokimya boyanma preparatları incelendiğinde; birinci grupta $18,29 \pm 1,89$, ikinci grupta $13,86 \pm 1,21$, üçüncü grupta $13,86 \pm 1,21$, dördüncü grupta $26,57 \pm 1,81$ olarak tespit edildi. Bağ dokuda P0 değerlendirildiğinde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında en küçük p değerleri; ikinci ve dördüncü grubun karşılaştırılmasında, üçüncü ve dördüncü grubun karşılaştırılmasında görüldü ($p < 0,001$).

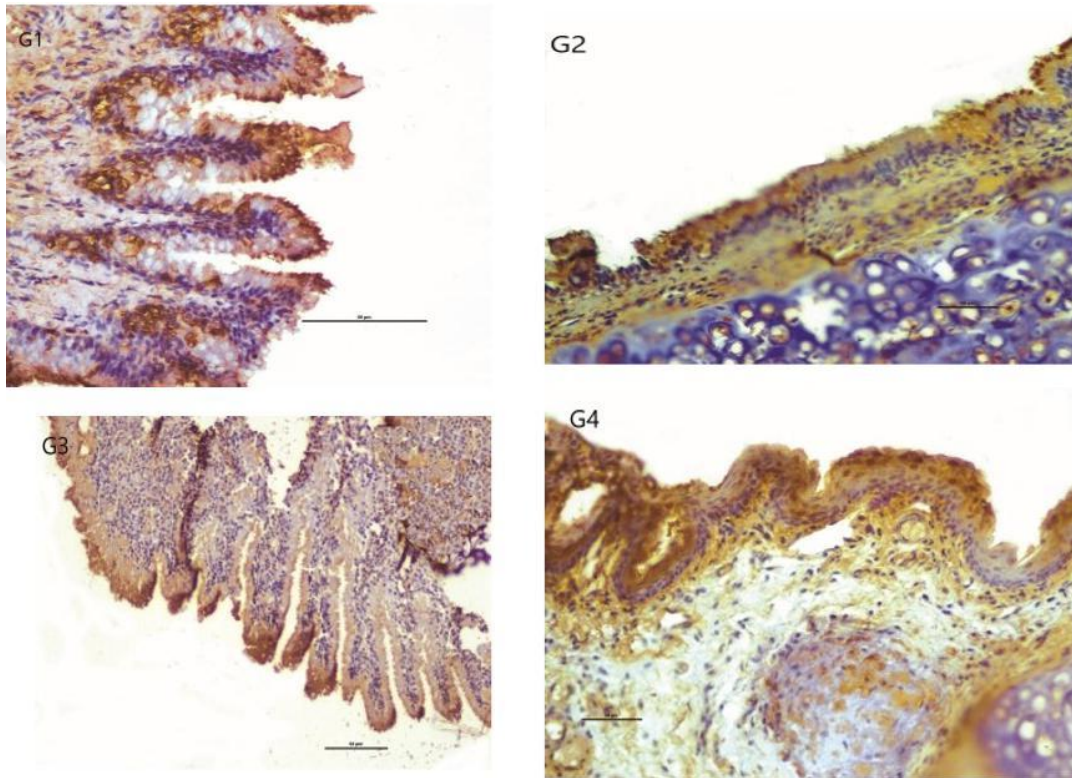
Dördüncü grupta rekürren laringeal sinir hasarı çevresinde, Ki-67 yoğunluğu en fazla olan gruptu, daha sonra sırasıyla birinci grup ve üçüncü grupta, en düşük Ki-67 boyanma yoğunluğu Grup 2 de olduğu görüldü (Resim 4.4).



Resim 4.4: Rekürren laringeal sinir hasarı çevresinde gruplara ait bağ dokusu alanında Ki-67 immünohistokimya boyanma preparatları, 50 scala bar ve 200x büyütme görüntüler

Sol rekürren laringeal sinir kesi bölgesi çevresindeki bağ dokuya ait Ki-67 immünohistokimya boyanma preparatları incelendiğinde; birinci grupta $11,71 \pm 1,11$, ikinci grupta $7,43 \pm 0,98$, üçüncü grupta $8,29 \pm 0,95$, dördüncü grupta $26,57 \pm 1,81$ olarak tespit edildi. Bağ dokuda Ki-67 değerlendirildiğinde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında en küçük p değeri; ikinci ve dördüncü grubun karşılaştırılmasında görüldü ($p < 0,001$).

Vokal kord alanında dördüncü grup, Ki-67 yoğunluğu en fazla olan gruptu, daha sonra birinci ve üçüncü grupta, en düşük Ki-67 boyanma yoğunluğu ikinci grupta olduğu görüldü. Ayrıca dördüncü grupta epitel tabakası ve altındaki bağ doku ile kas tabakası en kalını olandı. En ince tabaka ikinci gruptaydı. Daha sonra sırasıyla üçüncü ve birinci gruptaydı. Gruplarda özellikle sutüre edilen dokularda Vokal kordun daha kalın olduğu görüldü. (Resim 4.5)



Resim 4.5: Vokal kord alanında gruplara ait bağ doku alanında Ki-67 immünohistokimya boyanma preparatları, 50 scala bar ve 200x büyütme görüntüleri

Vokal kord alanında Ki-67 immünohistokimya boyanma preparatları incelendiğinde; birinci grupta $3,86 \pm 0,69$, ikinci grupta $11,29 \pm 1,25$, üçüncü grupta $13,43 \pm 0,80$, dördüncü grupta $22,14 \pm 1,46$ olarak tespit edildi. Vokal kordda Ki-67 değerlendirildiğinde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında en küçük p değeri; ikinci ve dördüncü grubun karşılaştırılmasında görüldü ($p < 0,001$) (Tablo 10).

Tablo 10: Tüm Grupların İmmüno histokimyasal İncelemede Histolojik Olarak Değerlendirildiği Parametreler ve Histolojik Sonuçlar

Değişkenler	1. grup Ort±SS Ortanca [1.Ç-3.Ç]	2. grup Ort±SS Ortanca [1.Ç-3.Ç]	3. grup Ort±SS Ortanca [1.Ç-3.Ç]	4. grup Ort±SS Ortanca [1.Ç-3.Ç]	P
Ki-67 vokal kord	20,43±1,71 20,00 [19,00-22,00]	11,29±1,25 12,00 [10,00-12,00]	13,43±0,80 14,00 [13,00-14,00]	22,14±1,46 22,00 [21,00-23,00]	<0,001* p ₁₋₂ =0,001 / p ₁₋₃ =0,038 / p ₁₋₄ =0,377 / p ₂₋₃ =0,170 / p ₂₋₄ <0,001 / p ₃₋₄ =0,003***
P0 proteini-RLS	18,29±1,89 18,00 [17,00-19,00]	13,86±1,21 14,00 [13,00-15,00]	13,86±1,21 14,00 [13,00-15,00]	26,57±1,81 26,00 [25,00-28,00]	<0,001* p ₁₋₂ =0,017 / p ₁₋₃ =0,018 / p ₁₋₄ =0,106 / p ₂₋₃ =0,016 / p ₂₋₄ <0,001 / p ₃₋₄ <0,001***
Ki-67 bağ dokusu	11,71±1,11 12,00 [11,00-13,00]	7,43±0,98 7,00 [7,00-8,00]	8,29±0,95 8,00 [8,00-9,00]	13,71±1,50 14,00 [12,00-15,00]	<0,001** p ₁₋₂ =0,003 / p ₁₋₃ =0,026 / p ₁₋₄ =0,245 p ₂₋₃ =0,441 / p ₂₋₄ <0,001 / p ₃₋₄ =0,001***

*Anova Testi, ** Kruskal Wallis H Testi, *** Post-Hoc Analiz

P<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, 1Ç: 1. Çeyreklik, 3Ç: 3. Çeyrekli

5. TARTIŞMA

İyatrojenik RLS hasarı, sıklıkla anterior boyun cerrahisinin bir komplikasyonu olup, ipsilateral vokal kord paralizi, disfaji, disfoni ve dispneye yol açan bir durumdur. Sinir iyileşmesi, vücudun diğer bölgelerinde oluşan yara iyileşmelerinden farklı olarak sinirin daha zor iyileşmesi ve iyileşme süresinin uzun olması sebebiyle hekimi ve hastayı bazı durumlarda çaresiz bırakan ve tedavi sonrası iyileşme oranı düşük olan bir durumdur.

Sinir onarımı için tedavi seçenekleri davranışsal terapiden cerrahi yaklaşımlara kadar değişmekte olup çoğunlukla semptomatik tedavi ön plandadır. RLS hasarı sonrası tedavide amaç; konuşma, yutma ve solunumun korunmasıdır. Sinir kesisi sonrası uç uca anastomoz altın standart tedavidir. Uç uca anastomozdaki amaç sinir uçlarının karşı karşıya getirilerek iyileşme sağlanmasıdır. Fakat bu şekilde dahi fonksiyonel olarak iyileşme oranları %50'yi geçmemesi sebebiyle mükemmel sonuç elde edilememektedir (Ayık, 2019). Sinirin daha hızlı iyileşmesini sağlamak için birçok farmakolojik ajan kullanılmıştır. Periferik sinir iyileşmesinde tedavi olarak kök hücre(Saïd et al., 2019), nimodipin (Hydman et al., 2007), FGF(Motoyoshi et al., 2004), PGA kollajen tüp(Suzuki et al., 2016), tymoquinone, metilprednizolon (Sereflican et al., 2016), ketorolak, PRP, aspartame(Okasha, 2016), NGF ve docosaheptaenoic acid (Esquenazi et al., 2005), mitomisin(Chen and Chang, 2010) gibi tedaviler kullanılmıştır. Tüm bu çalışmalarda ortak amaç, sinir iyileşmesini sağlayacak çevre faktörlerini iyileştirmek ve bunu yaparken rejenerasyonu hücre bazında etkilemektir. Bu sayede sinirin daha doğru ve fonksiyonel iyileşmesi sağlanacağı ön görüşü hakim olmuştur. Sinir iyileşmesi tedavisindeki bu zorluklar insanlığı yeni çalışmalara itmiştir. Gelecekte de bununla ilgili birçok çalışma yapılacağı şimdiden öngörülmektedir. Biz de çalışmamızda RLS kesi hasarı oluşturarak melatonin tedavisinin sinir iyileşmesi üzerine etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Periferik sinir hasarı ile ilgili yapılan çalışmalar genel olarak deney hayvanı modelleri oluşturularak yapılmaktadır. Bu tip çalışmalarda genel olarak sıçanlar tercih

edilmektedir. Literatürde tavşan ve diğer hayvanlarla ilgili çalışmalar bulunsa da sıçanların bakımı, üretilmesi, takibi ve deney uygulamaları daha kolay ve ekonomik olması sebebiyle biz de çalışmamızda Wistar Albino türündeki sıçanları kullanmayı tercih ettik. Sıçanlar üzerinde yapılan periferik sinir yaralanma çalışmaları genel olarak fasiyal sinir ve siyatik sinir üzerinedir. Kulak burun boğaz uygulamalarında sıklıkla karşımıza çıkan ve operasyon sırasında özellikle korunmaya çalışılan, hasarı sonrası konuşma ve yutma güçlüğü olabileceği gibi bilateral hasarında yaşamı tehdit edici olan RLS ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır. Suzuki ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada sıçan RLS kesisi sonrası Poliglikolik asit (PGA) kollajen tüpün etkinliğine bakılmış. Bir grup suture edilmiş, diğer grup sinir uçları 1mm aralık bırakılarak çevresine PGA kollajen tüp sarılmış onbeş hafta sonunda vokal kord hareketi, sinir ileti hızı ve histolojik olarak değerlendirilmiş sinir bütünlüğü makroskopik olarak görülmüş, laringeal kas atrofisi engellenmiş olsa da her iki grupta da vokal kord hareketi gözlenmemiş ve sinir ileti hızları değerlendirilememiştir (Suzuki et al., 2016). Gordon ve arkadaşları köpeklerde RLS transeksiyonu sonrası vokal kord hareketini gözlemlemişler. Vokal kord hareketinin sadece adduktif hareketi düzeldiğini belirtmişlerdir. Bunun sebebi olarak adduktif liflerin abduktif liflere oranının 4 kat fazla olduğunu söylemiştir (Gordon and McCabe, 1968). Motoyoshi ve arkadaşları RLS kesisi sonrası FGF etkinliğine bakmışlar. Doksan gün süren bu çalışmada vokal kord hareketi FGF verilen sekiz hayvanın yedisinde vokal kord hareketi gözlemişler, saline verilen diğer grupta ise sekiz hayvandan sadece üçünde vokal kord hareketi izlenmiştir (Motoyoshi et al., 2004). Old ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ratların laringoskopik anatomisinde insandan farklı olarak rat larinksinin kendine özgü anatomik varlığı gösterilmiştir. Rat larinksinin anterior posterior pozisyonu insanlardakine benzerdir ancak anatomi oluştururan bileşenlerin kapladığı alan farklılık göstermektedir. Musculomembranöz vokal kord uzunluğunun oranı vokal proçes ve aritenoid kıkırdak boyutuna göre oldukça düşüktür. Aritenoid kartilaj ve vokal proçes glottik aralığın çoğuna hakim olması sebebiyle ilk bakışta bunların gerçek vokal kord olduğu düşünülebilir. Ratlarla ilgili yapılacak larinks çalışmalarından önce bu anatomi hakkında bilgi sahibi olmak kuşkusuz önemlidir. Bu farklılığa rağmen insan modellemesinde rat larinksi kullanılabilir. (Old et al., 2011)

RLS hasarı birçok modelle yapılabilir. Sinire termal hasar verilebilir, ezilme hasarı veya kesi modeli oluşturulabilir. RLS hasarı modelleri daha çok ezilme şeklinde hasar verilerek bunun üzerinde çalışılmıştır. Bu durumda uygulama kolaylığı olmasına karşın hasar modelinin oluşturulmasında standardizasyon sağlanamaması ve tüm sinir dokularında homojen bir şekilde hasar oluşturulamaması, farklı şiddetlerde paralizi olabileceği ihtimali sebebiyle çalışmamızda kesi hasarı sonrası primer uç uca anastomoz modeli oluşturuldu. Kesi modelinin özellikle sıçanlarda çok ince şekilde bulunan RLS kesi sutürasyon tekniğinin zorluğu, mikrocerrahi gerektirmesi gibi dezavantajları bulunsa da çalışmamızda tüm cerrahi müdahaleleri tek bir cerrah tarafından yapılarak bu konudaki hata payını minimize indirmek amaçlanmıştır.

Sinir hasarı sonrası rejenerasyon hızı türler arasında değişkenlik göstermektedir. İnsanlarda akson rejenerasyon hızı 1-2 mm/gün iken kemirgenlerde 2-3,5 mm/gündür(Çınar, 2008). Kaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada siyatik siniri ezilme ve kesi hasarları uygulanmış ve melatonin tedavisinin altı hafta sonundaki etkisi değerlendirildiğinde sinir iyileşmesi açısından olumlu sonuçları göstermiştir (Kaya et al., 2013). Rateb ve arkadaşlarının çalışmasında da altı haftalık bir süre seçilerek melatonin etkinliği değerlendirilmiştir (Rateb et al., 2017). Turgut ve arkadaşları siyatik sinir hasarı oluşturulduktan sonra uygulanan melatoninin dört haftalık tedavisi sonrası nöroma formasyonunu değerlendirmiştir (Turgut et al., 2005). Edizer ve arkadaşları fasiyal sinir hasarında melatonin tedavisini değerlendirmek için on iki haftalık bir süre seçmiştir (Edizer et al., 2019). Shiotani ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ezilme, kesi ve krikoaritenoid eklem fiksasyonu uygulanan gruplardaki hayvanları otuz, doksan ve yüz seksen gün boyunca gözlemişler. Bu çalışmada ezilme hasarı uygulanan grupta tüm hayvanlarda otuzuncu gün vokal kord hareketi gözlenirken diğer gruplarda doksanıncı gün tüm hayvanlarda hareket gözlenmiştir(Shiotani et al., 2001). Tessema ve arkadaşları iki farklı şiddette ezilme hasarı oluşturarak altı haftalık bir çalışma sonrasında rejenerasyonu değerlendirmişlerdir (Tessema et al., 2009). Mori ve arkadaşları T-588 ilacının rat RLS ezilme hasarında etkinliğine bakmış dört hafta sonunda vokal kord hareketi açısından anlamlı bir fark tespit ettiklerini bildirmiştir. Buna benzer bir çalışmada Hydman ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada nimodipin verilen ve verilmeyen grupları karşılaştırdığında aksonların miyelinizasyonunu yansıtan sinirin latans süresi

açısından dört hafta sonunda hiçbir fark bildirmemiştir (Hydman et al., 2007). Sinir rejenerasyon çalışmalarında yukarıda belirtildiği gibi deney süreleri arasında farklılıklar mevcuttur. Bizim çalışmamızda literatürü tarayarak benzer çalışmalarda altı hafta sonunda sinir iyileşmesi görüldüğü için altı haftalık bir çalışma süresi belirledik.

Bizim çalışmamızda yaptığımız rekürren laringeal sinir paralizisinin vokal kord üzerine klinik etkisini değerlendirmek için laringoskopik muayene yapıldı. Cerrahi öncesi tüm hayvanlara yapılan laringoskopik muayenede bilateral vokal kord hareketli izlendi, cerrahi sonrası yapılan laringoskopik muayenede RLS hasarı verilen sol tarafta ipsilateral vokal kord paralizisi olduğu görüldü. Üçüncü ve altıncı haftada laringoskopik muayene tekrarlanarak iyileşme değerlendirildi. Değerlendirme Mok ve arkadaşlarının yaptığı üç puanlı vokal kord hareket skalası baz alınarak yapıldı. Bu skalada 0: Hareket yok, 1: Azalmış hareket, 2: Tam hareket olarak puanlandırıldı (Mok et al., 2020).

Melatonin (N asetil-5-metoksitriptamin), epifiz bezinden salgılanan molekül ağırlığı 232 olan bir moleküldür. Yüksek lipofilik ve hidrofilik özelliği olması sebebiyle kan ve vücut sıvılarına hızlıca karışabilir. Bu lipofilik özelliğinden dolayı hücre membranını kolaylıkla geçebilir ve hücre içi organellere hatta mitokondriye etki edebilen antioksidan özelliği de mevcuttur. Serbest radikaller moleküler halde bulunan oksijenin enzimatik olarak indirgenmesi sonucu açığa çıkar. Serbest radikaller hücrede lipid, karbonhidrat, DNA, protein gibi yapılara etki eder. Lipidler serbest radikaller için en ilgi çekici moleküllerdir. Lipid peroksidasyonu hücre zarının ve diğer membranlarda iyon geçirgenliğini arttırarak transmembran proteinlerinde hasara yol açar. Bu hasar sonrasında membranların iyonlara geçirgenliğini arttırarak hücre içinde iyon ve enzimatik dengesizliğe neden olur hücre içi Ca^{+2} artar, hücrede ödeme sonrasında nekroza yol açar.

Melatonin, fizyolojik olarak serbest radikalleri en güçlü şekilde temizleyebilen moleküldür. Bu etkisini serbest radikallere direkt olarak etki edebildiği gibi glutatyon peroksidaz aktivasyonunu sağlayarak da glutatyon üzerinden de gösterir. Melatoninin antioksidan özelliği birçok çalışmada bahsedilmiştir. Melatonin, mannitol, glutatyon

ve E vitamini gibi bilinen diğer antioksidanlardan oksidatif hasara karşı koruyuculukta daha etkili olduğu bildirilmiştir (Kandemir and Sarikcioglu, 2015). Melatonin kalsiyum kanallarını bloke ederek oksidatif stresi inhibe eder ve hasar görmüş sinirleri koruyabilir (Atik et al., 2011). Melatonin daha önce yapılan çalışmalarda periferik sinirlerde ezilme tarzındaki hasar sonrası iyileşmede etkili bulunmuştur (Zencirci et al., 2010). Melatonin periferik sinir kesi yaralanmalarında nöroma formasyonunu azaltarak sinir iyileşmesine etki eder (Turgut et al., 2005). Melatonin ayrıca mitogen activated protein kinase (MAPK) sinyali azaltarak median sinir hasarını azalttığı gösterilmiştir (Chiang et al., 2013). Rateb ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada melatonin verilen grupta melatonin yerine plasebo verilen gruba göre siyatik sinir hasarı iyileşmesinde kullanılan siyatik fonksiyon indeks (SFI) değerleri daha yüksek çıkmıştır. Aynı çalışmada melatoninin gece verildiği gruba gündüz verildiği gruba göre SFI değerleri anlamlı şekilde daha yüksek çıkmıştır. (Rateb et al., 2017)

Oksidatif stres ve inflamasyon, periferik sinir rejenerasyonunda en endişe verici durumlardandır. Genellikle ilk yaralanmadan sonra nöral hasara yol açarlar. Schwann hücreleri ve makrofajlar, proinflamatuvar sinyaller eksprese ederek ve aksotomize edilmiş bölgede serbest oksijen radikalleri oluşumuna yol açar (Kubo et al., 2002, Zochodne and Levy, 2005). Melatoninin periferik sinir hasarı sonrası; skar formasyonunu azalttığı, schwann hücrelerine proliferatif etkisi olduğu, reinnervasyonda motor uç plağına etki ederek nöromusküler bileşkede kollateral filizlenmeyi engellediği ve doğru sinir iyileşmesini sağladığı, nöronal hücre ölümü ve apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (Kandemir and Sarikcioglu, 2015). Otolog sinir transplantasyonu klinik pratikte altın standart tedavi metodudur. İdeal bir sinir iyileşmesi için schwann hücre proliferasyonu ile hiperplastik skar oluşumu arasında dengeyi sağlamak gereklidir. Çünkü hiperplastik skar oluşumu irreversible bir inflamasyona yol açar. Bu sebeple sinir aktivitesini korumak için oksidatif atak ve inflamasyonun düzenlenmesi gerekir. Mangan Süperoksitdismutaz (MnSOD), oksidatif stres durumunun kontrolünde rol oynayan önemli bir antioksidan enzimdir. Chang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, melatonin hipoglossal sinir hasarında MnSOD ekspresyonunu düzenlediğinden bahsedilmiştir (Chang et al., 2008). Özellikle yüksek dozlarda melatoninin nöroprotektif etkisi siyatik sinir hasarında gösterilmiştir (Shokouhi et al., 2008). Melatoninin periferik sinir hasarında

antioksidan ve antiinflamatuvar reaksiyonu artırabileceğini doğruladı ve uygun dozda melatonin uzun süreli süreçte sürekli Schwann hücre proliferasyonu, akson rejenerasyonu ve remiyelinizasyonu sağladığı bildirildi(Qian et al., 2018). Melatoninin sinir rejenerasyonundaki olumlu etkileri aksonal büyüme için gerekli olan ideal ortamı sağlayan schwann hücre proliferasyonunu indüklemesiyle bağlantılıdır (Chang et al., 2014). Melatoninin proinflamatuvar sitokin olan TNF-a ve IL-6 düzeyini önemli ölçüde azaltarak antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir (Rateb et al., 2017). Bizim yaptığımız çalışmada rekürren laringeal sinir kesisi sonrası melatonin uygulanan grupta diğer kontrol grubuna göre schwann hücre sayısında anlamlı bir artışa ve akson hasarında ciddi azalmaya yol açtığını gösterdik. Böylece melatoninin antiinflamatuvar etkisi ile sinir iyileşmesine katkı yaptığı gösterildi.

Günümüzde epinöryumdaki kollajenin epinöryumdaki fibroblastlar ve schwann hücreleri tarafından üretildiği iyi bilinmektedir (Nath et al., 1997, Siironen et al., 1992). Yapılan bir çalışmada RLS kesisi sonrası suture edilen ve sinir uçları arasında 1mm aralık bırakılarak kollajen tüple sarılan sıçanların 15 hafta sonra histolojik olarak değerlendirilmiş suture edilen grupta suture geçilen yerlerde granülasyon dokusu olduğu diğer grupta granülasyon dokusu görülmediği belirtilmiştir (Suzuki et al., 2016). Bizim çalışmamızda da iyileşen sinir çevresinde granülasyon dokusu melatonin verilemeyen gruba göre melatonin tedavisi alan grupta minimal izlendi. Melatoninin bu antiinflamatuvar etkisi sayesinde sinirin daha doğru bir şekilde iyileştiği skar formasyonunu azaltması sebebiyle fonksiyonel sonuçların daha iyi olduğu gösterildi. Melatoninin terapötik dozu ile ilgili herhangi bir konsensüs oluşmamıştır. Hayvan deneylerinde birçok farklı dozda melatonin uygulanmıştır. Shokouhi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada melatoninin düşük doz (10 mg/kg) ve yüksek doz(50mg/kg) etkilerini kıyaslamış. Düşük dozda uygulanan melatonin siyatik sinirde myelin yıkımını ve aksonal değişiklikleri azaltmış ancak yüksek dozda ultrastrüktürel değişiklikleri tama yakın nötralize etmiştir (Shokouhi et al., 2008). Atik ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada yirmibir gün boyunca 10 mg/kg Melatonin verilen grupta tedavi edilmeyen gruba göre sinir ileti hızında anlamlı bir artış gözlemlemişlerdir(Atik et al., 2011). Rogerio ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada melatoninin 1, 5, 10, 50 ve 100 mg/kg dozlarının etkileri kıyaslanmış. 50 ve 100 mg/kg dozlarında toksik etkiler, davranış değişiklikleri, kilo kaybı ve ölüm görülmüştür. 1, 5, 10 ve 50 mg/kg

dozlarında nöroprotektif açıdan ciddi bir fark gözlenmemiştir. Biz de bu çalışmalardan yola çıkarak melatonin dozunu çalışmamızda 10 mg/kg/gün olarak belirledik.

Transoral endoskopik laringeal EMG ilk olarak Thumfart ve arkadaşları tarafından bipolar elektrot ve iğne elektrot ile insan larinksinde uygulandı (Thumfart et al., 1978). İnagi ve arkadaşları sistemi biraz daha geliştirerek rat larinksinde vokal kord hareketlerini değerlendirmek için kullandı (Inagi et al., 1997). Biz de yaptığımız çalışmada Tessema ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu tekniğe uygun olarak 0 derece otoendoskop eşliğinde baskın olan elimizde EMG elektrodu diğer elimizde endoskop olacak şekilde laringeal EMG uygulaması yaptık. Bu şekilde hızlı, ekonomik, kolayca uygulanabilen ve minimal invaziv bir metod ile değerlendirme yapıldı (Tessema et al., 2008). Ezilme ve kesi yaralanmaları sonrası rekürren laringeal sinirin rejenerasyonunun takibinde EMG kullanılmış ve vokal kord hareketi görülmeden önce EMG’de polifazik motor ünite potansiyeli ve rekrutmant görülmesini reinnervasyonun kanıtı olarak gösterilmiştir (Shiotani et al., 2001). Hydman ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada nimodipin verilen ve verilmeyen grupları karşılaştırdığında aksonların myelinizasyonunu yansıtan sinirin latans süresi açısından dört hafta sonunda hiçbir fark bildirmemiştir (Hydman et al., 2007). Transoral laringeal EMG rekürren sinir hasarı sonrası vokal kord paralizinin tanısında, takibinde prognostik faktör olarak veya iyileşme aşamasını değerlendirmede kullanılabilecek elektrofizyolojik veriler sağlar. Fonskiyonel sonucun değerlendirilmesinde vokal kord hareketliliği ve sinkinezi seyri bu yöntemle aynı anda değerlendirilebilir. Birleşik kas etki potansiyelinin elektrofizyolojik değerlendirme için klinik kullanımda uygulanabilirliği olmaması transoral laringeal EMG’nin verileri klinik olarak ilgili veriler sağlayabilen spontan uyarılmamış respiratuar siklus sırasında toplanabilir. Shin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada laringeal kasların myojenik potansiyel amplitüd değerlerinin düşük olduğu ama latans ve dalga formunun normal aralıkta olduğunu göstermiş bu bilgiyle rejenerasyonun eksik olduğunu vokal kordun tam iyileşmemesinin sebebi olarak da rejenere sinir liflerinin yanlış yönlendirilmesinin sorumlu olduğunu belirtmiştir (Nahm et al., 1990).

Sitoplazmik vakuolizasyon, bakteriyel, viral veya çeşitli kimyasal maddelere maruz kalındığında memeli canlılarda gözlemlenen bir fenomendir. Sitoplazmik

vakuolizasyon genellikle hücre ölümünü işaret eder ancak hücre ölümündeki rolü halen bilinmemektedir (Shubin et al., 2016). Schwann hücrelerinin mitokondriyal dejenerasyonu ve sitoplazmik vakuolasyonu, sekiz haftalık aspartam uygulamasından sonra sıçanların frontal korteksindeki piramidal hücrelerin sitoplazmasında vakuoller gösteren önceki araştırmacılar tarafından açıklanmıştır (Omar, 2009). Sinir hasarı sonrası inflamasyon sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerin hücresel proteinlere ve DNA'ya zarar verdiği gösterilmiştir. Bunun sonucunda membranların geçirgenliğinin artmasına ve sitoplazma ve organellerdeki iyon konsantrasyonunun bozulmasına yol açar. Bu tür hasarı özellikle plazma zarının sodyum geçirgenliğinde, pompanın sodyumu ekstrüde etme kapasitesini aşan bir artış takip eder. Sodyum birikimi, hücrede su içeriğinde bir artışa yol açarak şişmesine neden olur (Engelmann, 2014). Ek olarak, hücre zarının hasarı ve aksonlarda ve Schwann hücrelerinde sitoplazmik vakuolasyon, lipid peroksidasyonunun bir sonucu olabilir (Kumar et al., 2014). Bu, hücre hasarı veya dejenerasyonunun ilk belirtisinin su birikmesi nedeniyle şişme olduğunu ve bu nedenle sitoplazmanın granüler görüldüğünü belirten Woolf'un önerisiyle uyumludur (Woolf, 2000). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada melatonin verilen grupta akson hasarı ve sitoplazmik vakuolizasyon miktarları kontrol grubuna göre sayısal olarak daha azdır ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgular melatoninin antiinflamatuvar ve antioksidan özelliğinin sinirin doğru bir şekilde ve fonksiyonel iyileşmesini sağlayarak melatoninin sinir rejenerasyonunda kullanılabileceğini desteklemiştir.

Ki-67 proliferasyon belirteci olarak kullanılan nükleer proteindir. Diğer proteinlerden farklı olarak hücre siklusunda G0 hariç tüm fazlarda (G1, S, M ve G2) bulunur. Proliferatif hücrelerin işaretlenmesinde kullanılan bir proteindir (Coşkun and Çobanoğlu, 2005). Ki-67 ekspresyonu, hücre proliferasyonunu doğrudan değerlendirmese de ekspresyonun hücre proliferasyonunun güvenilir bir belirteci olduğu gösterilmiştir (Brown et al., 2014). Hatta günümüzde kanser tanılı hastaların kemoterapiye yanıtında rutin olarak kullanılmaktadır (Chen and Chang, 2010). Çalışmamızda Ki-67'ye ait sonuçları değerlendirdiğimizde sütür ile onarılan melatonin grubunda anlamlı derecede yüksek hesaplanmıştır. Bu durum sinir onarımı ile birlikte melatoninin proliferasyonu tetikleyerek daha hızlı iyileşme sağladığını desteklemektedir.

Myelin protein zero, periferik sinir sisteminde myelinin yapısının %60'ını oluşturan proteindir. Myelinizasyonda düzenleyici görevi üstlenir (Shapiro et al., 1996). Schwann hücreleri tarafından sentezlenen integral membran glikoproteinidir, periferik sinir miyelinin ana glikoproteinini temsil eder ve periferik miyelinin yapışması ve sıkışmasında temel bir rol oynar (da Silva et al., 2015). Birçok çalışmada myelin oluşumu için gerekli olduğu ve aksonal rejenerasyonda önemli rol oynadığı gösterilmektedir. Aynı çalışmada siyatik sinire kronik bası hasarı sonucu nöral modülasyon uygulanan grupta myelin protein zero değeri daha yüksek bulunmuştur (da Silva et al., 2015). Bizim çalışmamızda melatonin tedavisi alan ve sutür ile sinir kesi onarımı yapılan grupta myelin protein zero değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu proteinin myelinizasyonu göstermesi sebebiyle melatoninin sinir iyileşmesinde ve aksonal rejenerasyonda etkili olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ

Rekürren laringeal sinir kesi yaralanmalarında cerrahi tedavi ve farmakolojik tedaviyi birarada düşünmek gerekir. Kesi tarzı yaralanmalarda mümkün olduğunca erken uç uca anastomoz yapmak gerekir. Sinir onarımı yapılmadan sadece farmakolojik tedavi ile rejenerasyonu beklemek anlamsız olacaktır. Bizim çalışmamızda sinir onarımı sonrası melatonin uygulamasının diğer benzer çalışmalarda olduğu gibi sinir rejenerasyonuna katkısı aşıkardır. Melatonin antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptozis etkisiyle reinnervasyona katkıda bulunmuştur. Bu katkı schwann hücre sayısında artış, akson hasarında azalma sağlayarak ortaya çıkmış ve sinir üzerine koruyucu etki sağlamıştır. Sitoplazmik vakuolizasyonun melatonin verilmeyen diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde az görülmesi antiapoptozis ve antioksidan etkisini göstermektedir. Aynı şekilde melatonin kullanılan grupta myelinizasyonun daha çok görüldüğü bu da sinir rejenerasyonuna katkıda bulunduğunu gösteren diğer bir etken olarak düşünülebilir. Çalışmamızda histolojik verilerimizin tamamının anlamlı çıkması daha uzun süreli yapılacak çalışmalarda daha yüksek oranda fonksiyonel sonuçların karşımıza çıkacağını düşündürmüştür.

Bilime katkı sağlamak ve sinir rejenerasyonu hakkında daha geniş serilerde çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Atik, B.,Erkutlu, I.,Tercan, M.,Buyukhatipoglu, H.,Bekerecioglu, M. and Pence, S. 2011. The effects of exogenous melatonin on peripheral nerve regeneration and collagen formation in rats. *Journal of Surgical Research*, 166, (2) 330-336.
- Ayık, G. 2019. *Akut Periferik Sinir Yaralanmalarının Rejenerasyonunda Epidermal Büyüme Faktörü Etkilerinin Tavşan Modeli Üzerinde Histolojik İncelenmesi*. Hacettepe Üniversitesi. Ankara (Doç Dr G. Huri)
- Benli, K. 2005. Periferik Sinir Cerrahisinin Önemi. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 15, (3) 196-197.
- Berne, R. M.ve Levy, M. N. 2000. Principles of physiology.
- Brown, J. R.,Digiovanna, M. P.,Killelea, B.,Lannin, D. R. and Rimm, D. L. 2014. Quantitative assessment Ki-67 score for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Laboratory investigation*, 94, (1) 98-106.
- Brzezinski, A. 1997. Melatonin in humans. *New England journal of medicine*, 336, (3) 186-195.
- Chang, H. M.,Huang, Y. L.,Lan, C. T.,Wu, U. I.,Hu, M. E. and Youn, S. C. 2008. Melatonin preserves superoxide dismutase activity in hypoglossal motoneurons of adult rats following peripheral nerve injury. *Journal of pineal research*, 44, (2) 172-180.
- Chang, H. M.,Liu, C. H.,Hsu, W. M.,Chen, L. Y.,Wang, H. P.,Wu, T. H.,Chen, K. Y.,Ho, W. H. and Liao, W. C. 2014. Proliferative effects of melatonin on Schwann cells: implication for nerve regeneration following peripheral nerve injury. *Journal of pineal research*, 56, (3) 322-332.

- Chen, T.-C. and Chang, S.-W. 2010. Effect of Mitomycin C on IL-1R Expression, IL-1-Related Hepatocyte Growth Factor Secretion and Corneal Epithelial Cell Migration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51, (3) 1389-1396.
- Chiang, R. P. Y.,Huang, C. T. and Tsai, Y. J. 2013. Melatonin reduces median nerve injury-induced mechanical hypersensitivity via inhibition of microglial p38 mitogen-activated protein kinase activation in rat cuneate nucleus. *Journal of pineal research*, 54, (2) 232-244.
- Coşkun, K. B.ve Çobanoğlu, B. 2005. Bazal hücreli karsinoma ile skuamoz hücreli karsinomanın histokimyasal özelliklerinin Bax, Bcl-2 ve Ki-67 ile belirlenmesi. *TÜRKDERM-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi*, 39, (3) 185-188.
- Çınar, Ö. 2008. *Ratlarda oluşturulan siyatik sinir travma modelinde ketorolak trometamin'in etkileri*. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi. İzmir, (Doç Dr. N. Gökmen)
- Çöbden, S. B. 2013. *Ratlardaki Akut Kord Vokal Skarlarında PRP Tedavisi*. Selçuk Üniversitesi. Uzmanlık Tezi, (Prof. Dr. Öztürk, K.)
- Da Silva, J. T.,Santos, F. M. D.,Giardini, A. C.,Martins, D. D. O.,De Oliveira, M. E.,Ciená, A. P.,Gutierrez, V. P.,Watanabe, I.-S.,Britto, L. R. G. D. and Chacur, M. 2015. Neural mobilization promotes nerve regeneration by nerve growth factor and myelin protein zero increased after sciatic nerve injury. *Growth Factors*, 33, (1) 8-13.
- Diao, E. and Vannuyen, T. 2000. Techniques for primary nerve repair. *Hand clinics*, 16, (1) 53-66, viii.
- Dumitru, D.,Amato, A. A. and Zwarts, M. J. 2002. *Electrodiagnostic medicine*. 2nd. ed. Hanley & Belfus.

- Dvali, L. and Mackinnon, S. 2006. Peripheral nerve repair and transfers. *Current Therapy in Plastic Surgery*. Elsevier Inc.
- Edizer, D. T., Dönmez, Z., Gül, M., Yiğit, Ö., Yiğitcan, B., Adatepe, T. and Uzun, N. 2019. Effects of melatonin and dexamethasone on facial nerve neurorrhaphy. *The journal of international advanced otology*, 15, (1) 43.
- Engelmann, B. J. 2014. *Cellular effects of platinum chemotherapeutics: Alterations by antidepressants and heparan sulfate proteoglycans*. Virginia Commonwealth University.
- Ertas, M. 2000. *Periferik Sinirlerin Anatomi ve Fizyolojisi, Zararlanmaları* [Online]. Available: <http://www.itfnoroloji.org/mertas/anatomofizy.htm> [Accessed].
- Esquenazi, S., Bazan, H. E., Bui, V., He, J., Kim, D. B. and Bazan, N. G. 2005. Topical combination of NGF and DHA increases rabbit corneal nerve regeneration after photorefractive keratectomy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46, (9) 3121–3127.
- Garbay, B., Heape, A., Sargueil, F. and Cassagne, C. 2000. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress in neurobiology*, 61, (3) 267–304.
- Geyik, A. 2020. *Dekarin Protein Uygulamasının Sıçan Siyatik Sinir İyileşmesi Üzerine Etkisi*. Dokuz Eylül Üniversitesi. İzmir, (Prof. Dr. H. Vayvada)
- Gordon, J. H. and McCabe, B. F. 1968. The effect of accurate neurorrhaphy on reinnervation and return of laryngeal function. *The Laryngoscope*, 78, (2) 236–250.
- Hansson, H.-A. 1993. Insulin-like growth factors and nerve regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 692, (1) 161–171.

- Hydman, J., Remahl, S., Björck, G., Svensson, M. and Mattsson, P. 2007. Nimodipine improves reinnervation and neuromuscular function after injury to the recurrent laryngeal nerve in the rat. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 116, (8) 623-630.
- Iguchi, H., Kato, K.-I. and Ibayashi, H. 1982. Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cirrhosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 54, (5) 1025-1027.
- Inagi, K., Ford, C. N., Rodriguez, A. A. and Heisey, D. M. 1997. Transoral electromyographic recordings in botulinum toxin—injected rat larynges. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 106, (11) 956-964.
- Inagi, K., Schultz, E. and Ford, C. N. 1998. An anatomic study of the rat larynx: establishing the rat model for neuromuscular function. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery*, 118, (1) 74-81.
- Kandemir, Y. B. and Sarıkçıoğlu, L. 2015. Melatonin and its therapeutic actions on peripheral nerve regeneration. *Folia morphologica*, 74, (3) 283-289.
- Kaya, Y., Sarıkçıoğlu, L., Aslan, M., Kencebay, C., Demir, N., Derin, N., Angelov, D. N. and Yıldırım, F. B. 2013. Comparison of the beneficial effect of melatonin on recovery after cut and crush sciatic nerve injury: a combined study using functional, electrophysiological, biochemical, and electron microscopic analyses. *Child's Nervous System*, 29, (3) 389-401.
- Kubo, T., Yamashita, T., Yamaguchi, A., Hosokawa, K. and Tohyama, M. 2002. Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays. *Journal of neurochemistry*, 82, (5) 1129-1136.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. and Aster, J. C. 2014. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book*, Elsevier health sciences.

- Kuşkaya, F. Ş. 2014. *Periferal Sinirrejenerasyonunda Trombinden Zengin Fibrinin Etkinliği*. Kırıkkale Üniversitesi.Kırıkkale, Doktora Tezi, (Prof. Dr. U. Tekin)
- Lal, G. and Clark, O. H. 2005. Thyroid, parathyroid and adrenal. *Schwartz's principles of surgery. 8th ed. New York (NY): McGraw-Hill*, 1395-470.
- Langman, J. and Sadler, T. W. 1990. Langman's medical embryology. *Philadelphia*, 1990, 7.
- Lee, S. K. and Wolfe, S. W. 2000. Peripheral nerve injury and repair. *JAAOS- Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 8, (4) 243-252.
- Lehman, N. L. and Johnson, L. N. 1999. Toxic optic neuropathy after concomitant use of melatonin, zoloft, and a high-protein diet. *Journal of neuro-ophthalmology: the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, 19, (4) 232-234.
- Lundborg, G. 2000. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *The Journal of hand surgery*, 25, (3) 391-414.
- Lundborg, G. and Dahlin, L. 1991. Structure and function of peripheral nerve. Operative Nerve Repair and Reconstruction. Gelberman RH. JB Lippincott, Philadelphia, USA.
- Maggi, S. P.,Lowe, J. B. and Mackinnon, S. E. 2003. Pathophysiology of nerve injury. *Clinics in plastic surgery*, 30, (2) 109-126.
- Matsuyama, T.,Mackay, M. and Midha, R. 2000. Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. *Neurologia medico-chirurgica*, 40, (4) 187-199.
- Mccarthy, J. 1990. Craniosynostosis. *Plastic surgery*.

- Mizisin, A. P. and Weerasuriya, A. 2011. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta neuropathologica*, 121, (3) 291-312.
- Mok, A.,Allen, J.,Haney, M. M.,Deninger, I.,Ballenger, B.,Caywood, V.,Osman, K. L.,Zitsch, B.,Hopewell, B. L. and Thiessen, A. 2020. A surgical mouse model for advancing laryngeal nerve regeneration strategies. *Dysphagia*, 35, (3) 419-437.
- Moore, K. L. and Persaud, T. V. N. 2009. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*, Saunders Elsevier.
- Motoyoshi, K.,Hyodo, M.,Yamagata, T. and Gyo, K. 2004. Restoring vocal fold movement after transection and immediate suturing of the recurrent laryngeal nerve with local application of basic fibroblast growth factor: an experimental study in the rat. *The Laryngoscope*, 114, (7) 1247-1252.
- Mutlu, A. T.,Berkiten, G.,Kumral, T. L.ve Uyar, Y. 2012. Tiroid cerrahisinin laringeal komplikasyonları. *Okmeydanı Tıp Dergisi*, 28, 10-19.
- Myers, R. 1997. Morphology of the peripheral nervous system and its relationship to neuropathic pain. *Anesthesia: biologic foundations*, 483, 513.
- Gözcü, N. ve Aydın U. 2004. In Thyroid Surgery, Prevention of Injury Nerves And Treatment Methods In The Case Of Injury. *Istanbul Medical Journal*, 4, 40-43
- Nahm, I.,Shin, T.and Chiba, T. 1990. Regeneration of the recurrent laryngeal nerve in the guinea pig: reorganization of motoneurons after freezing injury. *American journal of otolaryngology*, 11, (2) 90-98.
- Nath, R. K.,Mackinnon, S. E.,Jensen, J. N. and Parks, W. C. 1997. Spatial pattern of type I collagen expression in injured peripheral nerve. *Journal of neurosurgery*, 86, (5) 866-870.

- Noble, J., Munro, C. A., Prasad, V. S. and Midha, R. 1998. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 45, (1) 116-122.
- Okasha, E. F. 2016. Effect of long term-administration of aspartame on the ultrastructure of sciatic nerve. *Journal of microscopy and ultrastructure*, 4, (4) 175-183.
- Old, M. O., Oh, S. S., Feldman, E. and Hogikyan, N. D. 2011. Novel model to assess laryngeal function, innervation, and reinnervation. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 120, (5) 331-338.
- Omar, S. M. 2009. Effect of aspartame on the frontal cortex of adult male albino rats. A light and electron microscopic study. *Egypt J Histol*, 32, (2) 346-357.
- Özer, H. 2013. *Deneyisel Siyatik Sinir Yaralanmasında Poli (3-Hidroksibütirat)(Phb) Vechitosan Kaplı Tübüler Greftler ile Birlikte Mezenşimal Kök Hücre Kullanımının Aksonal rejenerasyona Etkisi*. Hacettepe Üniversitesi. Ankara, (Doç. Dr. G. Bozkurt)
- Qian, Y., Han, Q., Zhao, X., Song, J., Cheng, Y., Fang, Z., Ouyang, Y., Yuan, W. E. and Fan, C. 2018. 3D melatonin nerve scaffold reduces oxidative stress and inflammation and increases autophagy in peripheral nerve regeneration. *Journal of pineal research*, 65, (4) e12516.
- Rateb, E. E., Amin, S. N., El-Tablawy, N., Rashed, L. A. Rogério, F., De Souza Queiroz, L., Teixeira, S. A., Oliveira, A. L., De Nucci, G. and Langone, F. 2002. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. *Brain research*, 926, (1-2) 33-41.
- Ross, M. H. and Pawlina, W. 2006. *Histology*, Lippincott Williams & Wilkins.

- Safa, B. and Buncke, G. 2016. Autograft substitutes: conduits and processed nerve allografts. *Hand clinics*, 32, (2) 127-140.
- Sagartz, J. W., Madarasz, A. J., Forsell, M. A., Burger, G. T., Ayres, P. H. and Coggins, C. R. 1992. Histological sectioning of the rodent larynx for inhalation toxicity testing. *Toxicologic pathology*, 20, (1) 118-121.
- Säid, Z., Pauline, C., Claire, B., Celia, D., Jean-Paul, M. and Nicolas, B.-M. 2019. Olfactory ecto-mesenchymal stem cells in laryngeal nerve regeneration in rats. *Journal of Voice*.
- Santo Neto, H., Somazz, M. C., Marques, M. J. and Teodori, R. M. 1998. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local anaesthetic pretreatment. *British journal of plastic surgery*, 51, (7) 555-560.
- Seddon, H. 1943. Three types of nerve injury. *Brain*, 66, (4) 237-288.
- Sereflican, M., Yurttas, V., Ozyalvacli, G., Terzi, E. H., Turkoglu, S. A., Yildiz, S., Ilgaz, Y., Seyhan, S., Oral, M. and Dagli, M. 2016. The histopathological and electrophysiological effects of thymoquinone and methylprednisolone in a rabbit traumatic facial nerve paralysis model. *American journal of otolaryngology*, 37, (5) 407-415.
- Shapiro, L., Doyle, J. P., Hensley, P., Colman, D. R. and Hendrickson, W. A. 1996. Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron*, 17, (3) 435-449.
- Shiotani, A., Nakagawa, H. and Flint, P. W. 2001. Modulation of myosin heavy chains in rat laryngeal muscle. *The Laryngoscope*, 111, (3) 472-477.
- Shokouhi, G., Tubbs, R. S., Shoja, M. M., Hadidchi, S., Ghorbanihaghjo, A., Roshangar, L., Farahani, R. M., Mesgari, M. and Oakes, W. J. 2008. Neuroprotective

effects of high-dose vs low-dose melatonin after blunt sciatic nerve injury. *Child's Nervous System*, 24, (1) 111–117.

Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M. and Kostrov, S. V. 2016. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, 7, (34) 55863.

Siironen, J., Sandberg, M., Vuorinen, V. and R  ytt  , M. 1992. Expression of type I and     collagens and fibronectin after transection of rat sciatic nerve. Reinnervation compared with denervation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 67, (1) 80–87.

Smith, G. 1977. Structure of the normal rat larynx. *Laboratory animals*, 11, (4) 223–228.

Spinner, R. J. and Kline, D. G. 2000. Surgery for peripheral nerve and brachial plexus injuries or other nerve lesions. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 23, (5) 680–695.

Spiryda, L. 1998. Myelin protein zero and membrane adhesion. *Journal of neuroscience research*, 54, (2) 137–146.

Stacey, E. 2004. Mills ed. Histology for pathologists. Lippincott Williams&Wilkins 2004: 245.

Suzuki, H., Araki, K., Matsui, T., Tomifuji, M., Yamashita, T., Kobayashi, Y. and Shiotani, A. 2016. Value of a novel PGA-collagen tube on recurrent laryngeal nerve regeneration in a rat model. *The Laryngoscope*, 126, (7) E233–E239.

S  t   , M. 2010. *Periferik Sinir Kesisinde Farklı Onarım Zamanlarında Melatoninin Sinir İyile  mesine Olan Etkisinin İncelenmesi*. Selçuk Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, Konya, (Yrd. Do  . Dr. M. Keskin)

- Terzis, J. and Smith, K. 1990a. Repair and grafting of the peripheral nerve. *Plastic surgery*, 3, 630-698.
- Terzis, J. and Smith, K. 1990b. *The peripheral nerve: structure, function, and reconstruction*, Raven Press.
- Terzis, J. K., Sun, D. D. and Thanos, P. K. 1997. Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair. *Journal of reconstructive microsurgery*, 13, (03) 215-225.
- Tessema, B., Pitman, M. J., Roark, R. M., Berzofsky, C., Sharma, S. and Schaefer, S. D. 2008. Evaluation of functional recovery of recurrent laryngeal nerve using transoral laryngeal bipolar electromyography: a rat model. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 117, (8) 604-608.
- Tessema, B., Roark, R. M., Pitman, M. J., Weissbrod, P., Sharma, S. and Schaefer, S. D. 2009. Observations of recurrent laryngeal nerve injury and recovery using a rat model. *The Laryngoscope*, 119, (8) 1644-1651.
- Thacker, M. A., Clark, A. K., Marchand, F. and McMahon, S. B. 2007. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesthesia & Analgesia*, 105, (3) 838-847.
- Thumfart, W., Steiner, W. and Jaumann, M. 1978. Lupenendoskopische Elektromyographie des Musculus crico-arytaenoideus dorsalis (Posticus) am wachen Patienten. *Archives of oto-rhino-laryngology*, 219, (2) 492-493.
- Turgut, M., Uyanikgil, Y., Baka, M., Tunç, A. T., Yavaşoğlu, A., Yurtseven, M. E. and Kaplan, S. 2005. Pinealectomy exaggerates and melatonin treatment suppresses neuroma formation of transected sciatic nerve in rats: gross morphological, histological and stereological analysis. *Journal of pineal research*, 38, (4) 284-291.

Woolf, N. 2000. *Cell, Tissue and Disease: The Basis of Pathology*.

Yoshimatsu, M., Nakamura, R., Kishimoto, Y., Yurie, H., Hayashi, Y., Kaba, S., Ohnishi, H., Yamashita, M., Tateya, I. and Omori, K.. 2020. Recurrent laryngeal nerve regeneration using a self-assembling peptide hydrogel. *The Laryngoscope*, 130, (10) 2420–2427.

Yurdakul, U. H. 2019. *Sıçanlarda Rekürren Larengeal Sinirde Ezilme Hasarı Sonrası Kök Hücre Uygulamasının Sinir Rejenerasyonuna Etkisi*. Erciyes Üniversitesi Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri, (Dr. Öğr. Üyesi A. Vural)

Zencirci, S. G., Bilgin, M. D. and Yaraneri, H. 2010. Electrophysiological and theoretical analysis of melatonin in peripheral nerve crush injury. *Journal of neuroscience methods*, 191, (2) 277–282.

Zochodne, D. and Levy, D. 2005. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 51, (3) 255–267.