

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**Y TÜPÜ İLE YAPILAN HYPOGLOSSAL-FASİYAL
ANASTOMOZ SONRASI MANUEL
STİMULASYONUN FONKSİYONEL İYİLEŞME
ÜZERİNE ETKİSİ**

Umut ÖZSOY

Doktora Tezi

Antalya, 2013

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**Y TÜPÜ İLE YAPILAN HYPOGLOSSAL-FASİYAL
ANASTOMOZ SONRASI MANUEL
STİMULASYONUN FONKSİYONEL İYİLEŞME
ÜZERİNE ETKİSİ**

Umut ÖZSOY

Doktora Tezi

**Tez Danışmanları
Doç. Dr. Levent SARIKCIOĞLU
Prof. Dr. Doychin N. ANGELOV**

**Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından
2214-Yurt Dışı Araştırma Burs Programı kapsamında desteklenmiştir**

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2013

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Enstitü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22.06.2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurulu kararı ve 23.05.2003 tarih ve 04/44 sayılı Akdeniz Üniversitesi Senato kararı gereğince “Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği” ilkesi gereğince yapılan yayın aşığıda belirtilmiştir.

Ozsoy U, Demirel BM, Hizay A, Ozsoy O, Ankerne J, Angelova S, Sarikcioglu L, Ucar Y, Angelov DN. Hypoglossal-facial anastomosis (HFA) over a 10 mm gap bridged by a Y-tube-conduit enhances neurite regrowth and reduces collateral axonal branching at the lesion site. Restor Neurol Neurosci. 2011; 29(4):227-42.

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Anatomi Doktora Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir./....../2013

Tez danışmanı : Doç. Dr. Levent SARIKCIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Nurettin OĞUZ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Muzaffer SİNDEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Mustafa SARGON
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



ONAY: Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../2013 tarih ve/..... sayılı kararıyla Kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Cerrahi gerektiren periferik sinir yaralanmalarının onarımı sonrası fonksiyonel sonuçlar genellikle yetersizdir. Çalışmamızda direk koaptasyon veya Y tüp yardımıyla yapılan HFA (HFA koaptasyon veya HFA-Y-tüp) ardından uygulanan manuel stimülasyonun (MS, haftada 5 gün 5'er dakika) aksonal yol bulma, kas reinnervasyonu ve vibrissal hareketlerin kalitesi üzerine etkisini araştırdık.

Çalışmamızda doksan altı inbred dişi sıçan kullanıldı. Y tüpü (izogenik abdominal aorta) yardımıyla yapılan HFA'da n. hypoglossus'un proksimal ucu Y tüpün uzun bacağına, n. facialis'in buccal ve zygomatic dalları da tüpün kısa bacaklarına entübüle edildi. HFA Y-tüpün ve ardından uygulanan MS'nin vibrissal motor performans, collateral aksonal dallanmanın derecesi ve nöro-musküler kavşağın innervasyon paterni üzerine etkileri HFA-koaptasyon (direk dikim) metoduyla dördüncü ayın sonunda karşılaştırıldı.

HFA-Y-tüp ile onarım metodu HFA-koaptasyonla karşılaştırıldığında, HFA-Y-tüpün kollateral dallanmayı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlendi (%21'den %11'ya). Ancak nöro-musküler kavşakta poli-innervasyonu azaltmadığı ve fonksiyonel iyileşmeyi sağlayamadığı gözlemlendi. MS'nin ardından HFA-koaptasyon grubunda motor son plak poliinnervasyon oranında azalma %(24'den %17'ye) ve motor fonksiyonlarda (amplitüt: 22°'den 28°'e, açışal hızlanma: 5.180'den 11.158'e) iyileşme görülürken, HFA-Y-tüp grubunda herhangi bir değişiklik gözlenmedi.

Çalışmamız sonucunda HFA-Y-tüp metoduyla yapılan onarım sonrasında aksonal yol bulmada bir artış gözlemlendi. Bu artış lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanmanın azalmasıyla sağlandı. Ancak bu artışa eşlik eden fonksiyonel bir iyileşme gözlenmedi. HFA-Y-tüp cerrahisi sonrası manuel stimülasyon uygulanmasının ardından da fonksiyonel bir iyileşme görülmemesi Y tüpün vibrisseal kasların poli-inervasyon paterninde iyileştirici bir etkiye sahip olmamasıyla ilişkilendirilebilir. İleriki çalışmalar morfolojik düzelmeyle birlikte fonksiyonel iyileşmeye de katkı sağlayacak yeni cerrahi metotlar ve tedaviler üzerine yoğunlaşmalıdır.

Anahtar kelimeler: Motor nöron, sinir onarımı, n. facialis, n. hypoglossus, fonksiyonel iyileşme

ABSTRACT

The outcome of severe peripheral nerve injuries requiring surgical repair (transection and suture) is usually poor. To test whether manual stimulation after direct suture or entubulation of the hypoglossal nerve into a Y-tube conduit connecting it with the zygomatic and buccal facial nerve branches would improve axonal pathfinding at the lesion site, quality of muscle reinnervation and recovery of vibrissal whisking.

Ninety six young adult female inbred rats were used. For hypoglossal-facial anastomosis (HFA) over a Y-tube (HFA-Y-tube) the proximal stump of the hypoglossal nerve was entubulated and sutured into the long arm of a Y-tube (isogeneic abdominal aorta with its bifurcation). The zygomatic and buccal facial branches were entubulated and sutured to the short arms of the Y-tube. For hypoglossal facial coaptation the proximal stump of the hypoglossal nerve was direct sutured to the distal stump of facial nerve. After HFA-Y-Tube, restoration of vibrissal motor performance, degree of collateral axonal branching at the lesion site and quality of neuro-muscular junction (NMJ) reinnervation of the manual stimulated or non stimulated animals were compared to animals receiving HFA-Coaptation (no entubulation) after 4 months.

HFA-Y-tube reduced collateral axonal branching (from 21% to 11%). However it failed to reduce the proportion of polyinnervated NMJ and did not improve functional outcome when compared to HFA-Coaptation.

Key words: Motor neuron, nerve repair, n. facialis, n. hypoglossus, functional recovery.

TEŞEKKÜR

Çok büyük emek, sabır ve özveri isteyen tez çalışmamı hazırlamada başta kendisine ait zamanımı kullanmama izin veren sevgili eşime, beni yetiştirip bu günlere getiren sevgili aileme, çalışmanın en başından en son anına kadar bitmek tükenmek bilmeyen enerjisi, sabrı, yol göstericiliği ve kararlılığı ile her zaman örnek aldığım değerli hocam Doç. Dr. Levent Sarıkcıoğlu'na, bu çalışmayı yapabilmemize imkân sağlayan, bilimsel ve manevi açıdan bize her türlü desteği veren ve kısa sürede konu üzerinde büyük yol kat etmemize imkân sağlayan ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Doychin Angelov'a, bize bir büyük olarak yol gösteren ve tecrübelerini aktaran eski tez danışmanım Prof Dr Yaşar Uçar'a, ölümüyle hepimizi derinden yaralayan insancıl tavırlarıyla gönüllerimizde taht kuran Prof. Dr. Jürgen Koebke'ye, bu çalışmaya katılan bütün proje ekibi arkadaşlarıma ve Anabilim dalımızın sayın hocaları, araştırma görevlileri ve personeline teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hypoglossal-fasiyal anastomozun klinikteki yeri	2
2.2. Hypoglossal-fasiyal anastomoz sonrası mimiklerin iyileşmesi	2
2.3. Hypoglossal-fasiyal anastomoz sonrası tam fonksiyonel iyileşmeyi engelleyen faktörler	3
2.4. N. facialis kesisi sonrası oluşan kollateral aksonal dallanmanın azaltılması için yapılan çalışmalar	3
2.5. Kas içi aksonal (terminal) filizlenmeyi azaltmak için yapılan çalışmalar	4
2.6. Çalışmamızın amacı	4
MATERYAL VE METOT	6
3.1. Denekler	6
3.2. Deney grupları	6
3.3. Cerrahi işlemler	8
3.3.1 Aorta abdominalis'in Y-tüp olarak hazırlanması	8
3.3.2 Hypoglossal ve fasiyal sinirlerin direkt anastomozu (HFA koaptasyon)	8
3.3.3 HFA Y tüp	10
3.4. Vibrisseal kasların manuel stimülasyonu	13
3.5. Sakrifikasyon öncesi yapılan işlemler	14
3.5.1 Vibrisseal motor performansının değerlendirilmesi için vibrisseal kıl hareketlerinin video kaydı	14
3.5.2 Floresan işaretleyicilerin uygulanması	15
3.6. Hayvanların sakrifikasyonu ve dokuların alınması	16
3.7. Analiz	16

3.7.1.	Vibriseal motor performansın değerlendirilmesi	16
3.7.2.	Lezyon alanındaki kollateral dallanmanın belirlenmesi	17
3.7.3.	M. levator labii superioris'in reinnervasyonunun değerlendirilmesi	19
3.8.	Veri analizi	20
BULGULAR		21
4.1.	Birinci amaç doğrultusunda elde edilen bulgular (kollateral aksonal dallanmanın azaltılması)	21
4.1.1	Kollateral aksonal dallanma	21
4.1.2.	M. levator labii superioris'in reinnervasyon paterni	21
4.1.3.	Video tabanlı görüntü analizi	22
4.2.	İkinci amaç doğrultusunda elde edilen bulgular (manuel stimülasyonun HFA-Y-Tüp sonrası etkisi)	22
4.2.1.	Kollateral aksonal dallanma	22
4.2.2.	M. levator labii superioris'in reinnervasyon paterni	23
4.2.3.	Video tabanlı görüntü analizi	23
TARTIŞMA		27
5.1.	HFA için Y tüpün kullanılması	27
5.2.	Manuel stimülasyonun HFA koaptasyon sonrası sınırlı iyileşme sağlaması ve HFA-Y-Tüp sonrası etkisiz kalmasının muhtemel sebepleri.	28
5.3.	Lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanma ile fonksiyonel iyileşme arasındaki ilişki	29
5.4.	Periferik sinir onarımı sonrası fonksiyonel iyileşmedeki zayıflığın genel sebepleri	31
5.5.	Denerve kasın tedavisi için yeni stratejiler	32
SONUÇLAR		33
KAYNAKLAR		34
ÖZGEÇMİŞ		45

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANOVA	Analysis of variance
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Cy3	Cyanine 3
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DKYK	Dış kulak yolu kıkırdağı
EMG	Electromyography
FB	Fast Blue
FGF2	Fibroblast growth factor 2
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor
HFA	Hypoglossal-fasiyal Anastomoz
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunoglobulin G
LLS	Musculus levator labii superioris
MS	Manuel stimülasyon
NGF	Nerve growth factor
NMK	Nöro muskuler kavşak
NSS	Normal sheep serum
PBS	Phosphaste buffer saline
SD	Standard deviation

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
1.1.	Serebellopontin köşede bulunan yapılara bası yapan orta büyüklükteki bir akustik nöroma görünümü	1
3.1.	Aorta Y tüpü	8
3.2.	Hypoglossal ve fasiyal sinirlerin direkt anastomozunun şematik gösterimi (HFA koaptasyon).	9
3.3.	Hypoglossal-fasiyal koaptasyon	10
3.4.	Aorta Y tüpü ile yapılan hypoglossal-fasiyal anastomoz	12
3.5.	Aorta Y tüpü ile yapılan hypoglossal-fasiyal anastomoz'un şematik gösterimi	13
3.6.	Vibrisseal kasların uyarılması	14
3.7.	Ratın vibrisseal kılıklarının dizilimi	14
3.8.	Floresan işaretleyicilerin uygulanmasının şematik gösterimi	15
3.9.	Hypoglossal sinir nükleusundaki nöronların görüntülenmesi amacıyla floresans işaretleyicilerin uygulanması	16
3.10.	Vibrisseal motor performansın biyometrik analizi	17
3.11.	Hypoglossal sinir nükleusundaki nöronların görünümü	18
3.12.	Motor son plakların görünümü	19

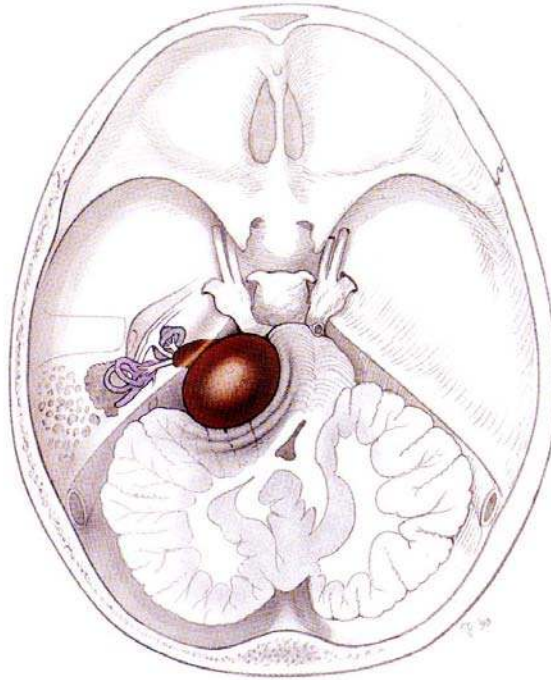
TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
3.1.	Deney grupları, sayıları ve gruplara uygulanan işlemler	7
4.1.	HFA sonrası kollateral aksonal dallanma	24
4.2.	Motor son plakların reinnervasyon paterni	25
4.3.	Vibriseal motor performansın biometrik analizi	26

GİRİŞ VE AMAÇ

N. facialis baş ve boyun yaralanmalarında en sık yaralanan sinirdir [81]. Yüz felci ve mimiklerin kaybıyla sonuçlanan fasiyal sinir hasarı genellikle şiddetli psikolojik ve ekonomik sorunlara yol açar [84]. Travma, radikal parotidektomi, petroz kemik cerrahisi, serebellopontin köşe tümörlerinin çıkarılması ve iatrojenik yaralanmalar gibi sebepler n. facialis hasarına yol açabilir [11, 40, 47, 61, 81, 108].

Periferik sinir kesisi sonrası sinirin tamir edilmesi ile ilgili olarak en iyi bilinen yöntem sinir uçlarının koaptasyonudur [88]. Ancak, mikrocerrahi ve nörootolojik tekniklerdeki büyük gelişmelere rağmen, insanda n. facialis kesisi ve koaptasyonu sonrası fonksiyonel iyileşme genellikle zayıf kalmaktadır [61, 68]. Bunun yanısıra serebellopontin köşe tümörlerinin cerrahi olarak çıkarılması sonrasında hastaların yaklaşık % 10'unda tam yüz felci gözlemlenmektedir (*Şekil 1.1*) [16, 40, 49, 61, 68, 108].



Şekil 1.1. Serebellopontin köşede bulunan yapılara bası yapan orta büyüklükteki bir akustik nöroma görünümü.

GENEL BİLGİLER

2.1. Hypoglossal-fasiyal anastomozun klinikteki yeri

HFA, n. facialis'in intrakranial veya intratemporal bölümünün hasarlandığı durumlarda sıklıkla kullanılan bir tekniktir [93, 105-106]. Yüz felcinin cerrahi tedavisinde bu alternatif tekniğin kullanılmasının sebebi n. facialis'in kendisinin onarılamayacak durumda ve konumda olmasından dolayıdır [61-62, 109].

N. facialis'in proksimal kısmının sinir koaptasyonu için uygun olmadığı durumlarda; kranial sinirlerin n. facialis'in distal kısmına transpozisyonu mümkün olan tek onarım şeklidir. Fasiyal sinirinin bu şekilde farklı bir sinir tarafından reanime edilmesi konusunda n. hypoglossus, n. accessorius, n. glossopharyngeus, plexus cervicalis'in dalları gibi pek çok sinir kaynağının kullanımı literatürde belirtilmektedir [81-82, 93, 106]. Bu sinir kaynakları içerisinde n. hypoglossus'un transpozisyonu en sık kullanılan metottur [79, 81-82, 93, 106]. Sıklıkla bu sinirin seçilmesinin nedeni cerrahi alana yakın yerleşim göstermesinden ziyade, mimik kasları ile dil kaslarının kortikal temsil alanlarının yakınlığından kaynaklanmaktadır [27, 57, 81]. Yüzün felçli tarafındaki n. hypoglossus ve n. facialis kesildikten sonra n. hypoglossus'un proksimal kısmı n. facialis'in distal kısmına direkt koapte edilir. Bu operasyon sayesinde hypoglossal sinir aksonlarının paralize mimik kaslarına gitmelerine imkan sağlanır. [3, 27, 49].

2.2. Hypoglossal-fasiyal anastomoz sonrası mimiklerin iyileşmesi

Genel olarak, insanda HFA sonrası fonksiyonel iyileşme zayıftır [79, 93, 105-106, 115-116]. Hastalarda postparalitik sendrom olarak isimlendirilen parezi, sinkinezi ve disrefleksi kaçınılmazdır [16] ve bu hastalar genellikle çiğneme, konuşma ve yutma gibi oral fonksiyon bozukluklarından şikayet ederler [29, 42, 61, 70, 81]. Ancak özellikle genç hastalarda şuuraltı gülme gibi spontan hareketler, beyin sapı ve üst motor merkezlerdeki nöronal plastisite sonucunda yeniden kazanılabilir [81].

Postparalitik sendromlu hastalarda sinkinezi ve değişken göz kırpma refleksi gözlenir [85].

Postparalitik sendromun oluşum sebepleri arasında aşağıdaki durumlar tanımlanmıştır:

1. Yanlış yönlendirilmiş reinnervasyon [61, 85, 112],
2. Bitişik fasiküllerde bulunan aksonlar arasında sinir uyarısının transaksional değişimi [61, 98]
3. Fasiyal motor nöronlara gelen sinaptik inputta değişim [17, 42, 61, 86]

2.3. Hypoglossal-fasiyal anastomoz sonrası tam fonksiyonel iyileşmeyi engelleyen faktörler

HFA sonrası fonksiyonlardaki yetersiz iyileşme kasların yanlış yönlendirilmiş (misdirection) reinnervasyonu ile ilişkilendirilir [61, 85, 112]. Yanlış yönlendirilmiş reinnervasyon başlıca iki faktöre bağlanabilir:

1. Sinir kesisi sonrası filizlenen aksonların kendi orijinal sinir fasiküllerine katılmalarındaki başarısızlık [7-8].

Kollateral aksonal dallanma olarak isimlendirilen bu durum, her bir sinir lifinden yaklaşık 25 kadar yeni sinir lifinin filizlendiği bir ortamda, sinir lifinin kendi orijinal hedefini bulmasında zorluklara neden olmaktadır. Bu kollateral dallar farklı ve genellikle de antagonist kasların innervasyonunu sağlarlar [65, 124].

2. Aksonların kas içerisinde filizlenmesi (terminal branching).

Bu tür aksonlar hedeflerine ulaşmaya kadar, başka aksonlar tarafından innerve edilmiş birçok kas lifini tekrar innerve ederler ve böylelikle geniş bir motor ünite oluştururlar [44, 107, 114, 121].

Sinir kesisi sonrası anormal reinnervasyonun (aberrant reinnervation) gerçekleştiği bilinmesine rağmen [21, 24], bu durumun nasıl engellenebileceği hakkındaki bilgiler oldukça kısıtlıdır. Fonksiyon bozukluklarını gidermek için aksonların yanlış yönelimini (misdirection) azaltmayı hedefleyen deneysel çalışmalar fassiküler ve topografik spesifiteyi sağlamada yetersiz kalmıştır. Kesilen bir sinirin proksimal ucundan köken alan aksonların, sinirin distal ucuna, doğru bir şekilde yönlendirilmesi yani orijinal hedefine gitmesi henüz tam olarak başarılamamıştır. Bu nedenle araştırmalar lezyon sonrası kollateral dallanmanın ve motor son plak poliinnervasyonunun azaltılması üzerine yoğunlaştırılmıştır [3-7, 16, 48-50, 52, 54-56]. Kesilen sinirin distal ucundan yayılan faktörlerin rejenerasyon olan sinir lifleri üzerinde nörotrofik/kemotaksik bir etki gösterdikleri rapor edilmiştir [118-120]. Sinir dokusunun rejenerasyon sırasında doğru hedefe yönelmesi spesifite olarak isimlendirilir. Literatürde farklı spesifite tipleri tanımlanmıştır. Bunlar:

1. Doku spesifitesi: Aksonun başka dokular yerine sinir dokusuna yönelmesi/rejenerasyonu
2. Organ spesifitesi: Motor veya duyuşal liflerin kendi orijinal hedef organlarına yönelmesi/rejenerasyonu
3. Topografik spesifite: Bir topografik bölgeyi innerve eden aksonun rejenerasyon sırasında orijinal bölgesine yönelmesi/rejenerasyonu [12, 118].

2.4. N. facialis kesisi sonrası oluşan kollateral aksonal dallanmanın azaltılması için yapılan çalışmalar

Önceki çalışmalarda, Streppel ve arkadaşları [111] nörotrofik faktörlerin (NGF, BDNF, FGF-2, IGF-1, CNTF, GDNF) etkisizleştirilmesinin, (nötralizasyonu) lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanmayı azaltabileceği ve böylelikle reinnervasyon kalitesini de arttırabileceği hipotezini test etmişlerdir. Anti-NGF, anti-BDNF ve anti-IGF-I'nin uygun konsantrasyonlarda lezyon

alanına eklenmeleri kollateral aksonal dallanmayı anlamlı bir şekilde düşürdüğü bildirilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak Streppel ve arkadaşları bu tip nötralize edici ajanların lezyon alanına yerleştirilmesi şeklindeki bir uygulamanın hastalara uygulanabileceğini ve iyileşmenin önünde en büyük engel olarak görülen aksonal yanlış yönlenmeyle olan ilişkisi yönünden umut verici olabileceğini görmüşlerdir [111].

Guntinas-Lichius ve arkadaşları [50] sinir hasarı sonrası fonksiyonel iyileşmeleri kötü olan sıçanların (bütün motor son plakların % 51'i), iyi olanlara (bütün motor son plakların %10'u) oranla daha yüksek poliinnervasyonlu motor son plak morfolojisi gösterdiklerini belirtmişlerdir. Buradan hareketle sinir fonksiyonlarının tekrar ve doğru bir şekilde kazanılması konusunda vibrisseal hareketlerin biometrik analizlerinin fonksiyonel iyileşmeyi işaret etmemesi, motor son plakların polinöronal reinnervasyonunun kollateral dallanmadan daha önemli bir belirleyici faktör olabileceğini bildirmişlerdir.

2.5. Kas içi aksonal (terminal) filizlenmeyi azaltmak için yapılan çalışmalar

Bu konuda doğru yorumların yapılabilmesi için sıçanlardaki vibrisseal kıl hareketlerinin ve ilgili kasları innerve eden sinir liflerinin iyi bilinmesi önemlidir. Normal fizyolojik koşullar altında sıçanların vibrisseal kıl hareketleri öne doğrudur. Bıyıkların süpürme hareketi [104, 130] saniyede 5-11 kere tekrarlanır [14, 26, 69]. Bu motor aktivitenin ana hareketi vibrisseal kılların piloerektör (foliküler) kaslar yardımıyla protraksiyon ve retraksiyondur. Bütün bu kaslar n. facialis'in r.buccalis ve r. marginalis mandibulae'si tarafından innerve edilir [33].

Kaudaldeki bıyıklar iki çeşit çizgili kas tarafından hareket ettirilirler. Bunlardan birincisi bütün bıyık kaidesini hareket ettiren, ikincisi ise her bir kıl folikülünü teker teker hareket ettiren kaslardır. En rostraldeki bıyık ikinci kas sisteminden yoksundur [33]. Bu çizgili kas lifleri kıl folikülünün rostral kısmının etrafından dolanarak onu sarar ve protraksiyon hareketinin gerçekleşmesinden sorumludur. Hareket sırasında kılın taban kısmı arkaya doğru çekilirken distal kısmını öne doğru hareket ettirir. Bu hareketin aksine, retraksiyon hareketi derin bağ dokusunun pasif elastik hareketinden kaynaklanır [33, 133]. Vibrisseal hareketler kas kasılması sayesinde rostrale doğru aktif protraksiyon hareketiyken, retraksiyon kaudale doğru pasif bir harekettir [13].

Klinik olarak sinir hasarı sonrası yumuşak doku masajının kan akışını, yüz simetrisini ve gülüşü düzelttiği gösterilmiştir [15, 30]. Ayrıca, deney hayvanlarında yapılan çalışmalar denerve m. soleus'un hafif şiddette elektriklerle uyarılmasının kas içi aksonal filizlenmeyi ve motor son plak reinnervasyonunu azalttığını göstermiştir [72]. Buradan hareketle, Guntinas-Lichius ve arkadaşları [49] vibrisseal kasların MS'sinin (haftanın 5 günü, günde 5 dakika) vibrisseal hareketleri düzelttiğini bildirmişlerdir. Bu fonksiyonel iyileşme lezyon alanında kollateral aksonal dallanmanın azalması veya miyotopinin düzelmesinden çok, motor son plakların poliinnervasyon oranının düşüşüyle ilişkilendirilmiştir [4, 49].

2.6. Çalışmamızın amacı

Çalışmamızın ilk amacı lezyon alanındaki aksonların kollateral dallanmasının azaltılmasıdır. Bu amaçla, sinir uçlarının sıkı bir dikişle bağlanması

(direkt koaptasyon) yerine, filizlenen aksonların serbest bir şekilde sinirin distal ucuna ve böylelikle hedef kaslarına gitmelerinin sağlanması planlanmıştır. Bunun için, aorta abdominalis'ten elde edilmiş Y şeklindeki bir tüp yardımıyla n. hypoglossus'un proksimal ucunun Y tüpünün uzun koluna, n. facialis'in r. zygomaticus'unun Y tüpünün üst kısa koluna ve r. buccalis'inin de Y tüpünün alt kısa koluna gelecek şekilde (HFA-Y-tüp) entübülasyonu gerçekleştirildi. Böylelikle kendi akışına bırakılmış aksonal yol bulmanın (axonal pathfinding) kollateral dallanmayı azaltması amaçlandı.

Çalışmamızın ikinci amacı ise vibrisseal kasların manuel stimülasyonunun HFA-Y-Tüp sonrası etkisinin belirlenmesidir. Çünkü daha önceki çalışmalarda direkt hypoglossal-fasiyal koaptasyon sonrası MS'nin fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı gözlemlenmiştir [49]. Bu çalışmada da bu basit fizik tedavi tekniğinin HFA-Y-tüp sonrası fonksiyonel iyileşme üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

3.1. Denekler

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden elde edilen Wistar cinsi F11 soyu inbred 96 dişi sıçan kullanıldı. Denekler, deney öncesinde ve sonrasında standart laboratuvar şartlarında (12 saat yapay gece-gündüz döngüsü ve yem-suya serbestçe ulaşım) bekletildi. Tüm deneyler Türkiye Cumhuriyeti yasa ve yönetmeliklerinin deney hayvanlarının korunmasını belirleyen hükümleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Tüm prosedürler Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Kuruluna sunulmuş ve gerekli izinler alınmıştır (B.30.2.AKD.0.01.00.00/Hay. Den. Etik-391).

3.2. Deney grupları

24 denek, Y tüpünün elde edilmesi amacıyla bifurcatio aorta abdominalis'i de içerecek şekilde aorta abdominalis'in çıkarılması için kullanıldı. Elde edilen Y şeklindeki aorta parçası 4. ve 6. gruptaki deneklere implante edildi. Geriye kalan 72 denek ise altı gruba ayrıldı. Bütün deneklere video tabanlı hareket analizi uygulanırken; her bir grupta bulunan deneklerin yarısı kollateral aksonal dallanmanın belirlenmesi, diğer yarısı ise motor son plak reinnervasyon paterninin belirlenmesi için kullanıldı (*Tablo 3.1*).

Grup 1 (Kontrol grubu): Bu denekler hypoglossal sinirin motor nükleusundaki nöron sayısının tespit edilmesi için kullanıldı.

Grup 2 (Sham grubu): Bu deneklere cerrahi stres uygulamak amacıyla sinirler ortaya çıkarıldı ve cilt kesisi dikildi

Grup 3 (HFA koaptasyon): Bu gruptaki deneklere MS uygulanmadı. Sadece hypoglossal sinir kesilerek fasiyal sinire direkt koapte edildi.

Grup 4 (HFA Y tüp): Bu gruptaki deneklere HFA-Y-tüp uygulaması sonrası MS uygulanmadı.

Grup 5 (HFA koaptasyon+ manuel stimulasyon): Bu gruptaki deneklere HFA koaptasyonu uygulanması sonrasında vibrisseal kaslara MS uygulandı

Grup 6 (HFA-Y-tüp+ manuel stimulasyon): Bu gruptaki deneklere HFA-Y-tüp uygulanması sonrasında vibrisseal kaslara MS uygulandı.

Tablo 3.1: Deney grupları, sayıları ve gruplara uygulanan işlemler.

Deney grupları	Bıyık kollarının video tabanlı hareket analizi	Lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanmanın çift retrograd işaretleme yöntemiyle belirlenmesi	Motor son plakların reinnervasyon paterni: mono-, poli- veya noninnerve
1) Kontrol	12	6	6
2) Sham	12	6	6
3) HFA-koaptasyon	12	6	6
4) HFA-Y-tüp	12	6	6
5) HFA- koaptasyon + manuel stimülasyon	12	6	6
6) HFA-Y-tüp + manuel stimülasyon	12	6	6

3.3. Cerrahi işlemler

3.3.1 Aorta abdominalis'in Y-tüp olarak hazırlanması

24 denek, Uretan'ın (1.5 g/kg, Sigma) intraperitoneal olarak enjeksiyonuyla sakrifiye edildi. Aorta abdominalis bifurcatio aortae ile birlikte disseke edilerek çıkarıldı (*Şekil 3.1 A*) ve fosfat tamponlu salin (PBS) (pH 7.4) ile yıkandı. Aortanın visseral ve parietal dallarının kesilmesi sonucu oluşan kesik damar dalları, rejenere olan hypoglossal sinirin aksonlarının dışarı çıkmasını engellemek için koterize edildi (*Şekil 3.1B*). Aorta Y tüp implantı, PBS içerisinde muhafaza edildi. Aortanın donör hayvandan çıkarılması ve sinir uçlarının aorta Y tüpüne entübüle edilmesine kadar geçen sürenin kısaltılması amacıyla, iki cerrahi ekip eş zamanlı olarak çalıştı. Bu şekilde aorta Y tüpünün *invitro* şartlardan en az şekilde etkilenmesi sağlandı.

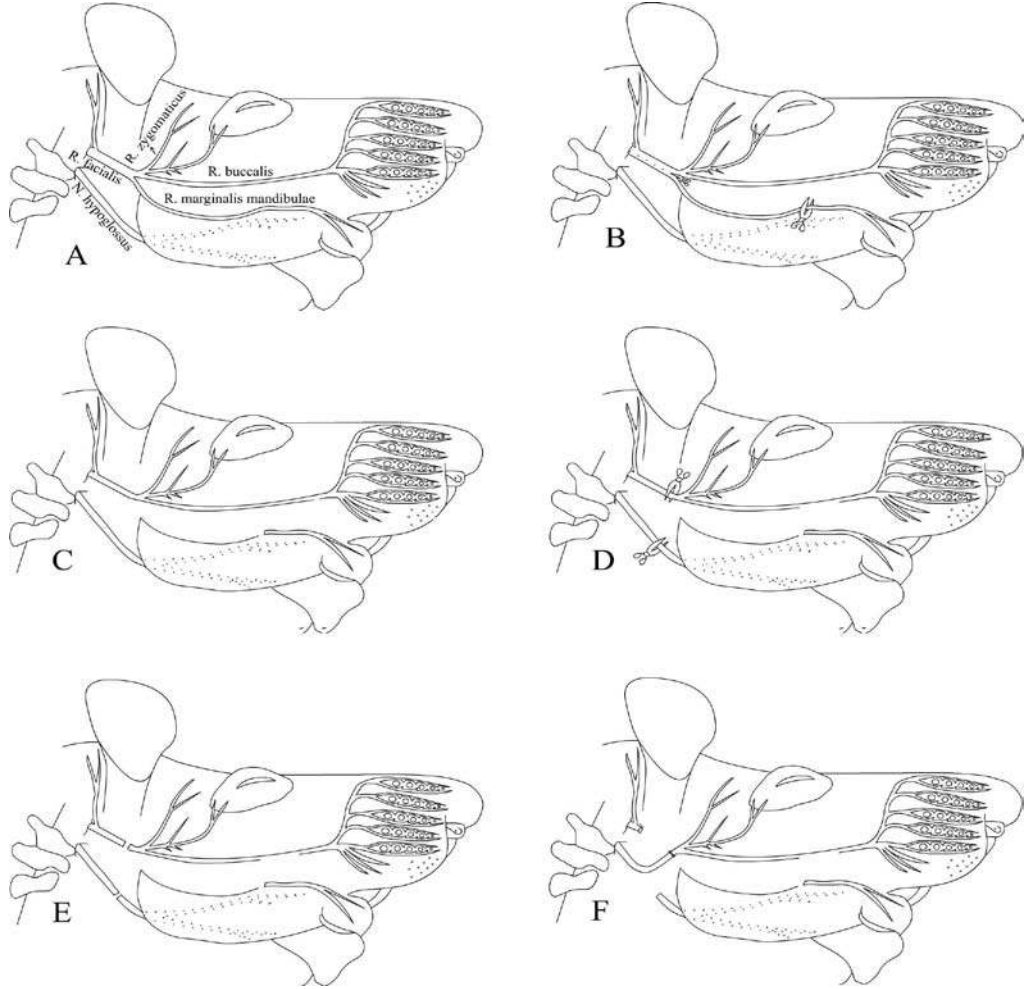


Şekil 3.1. Aorta Y tüpü

A: abdominal aortanın çıkarılmasından sonraki görünümü, **B:** lumbar arterlerin ve A. sacralis mediana'nın koterize edilmesinden sonra Y tüpünün görünümü.

3.3.2 Hypoglossal ve fasiyal sinirlerin direkt anastomozu (HFA koaptasyon)

Grup 3 ve 5'e ait 24 denek, Ketamin (100 mg/kg) ve Xylazin HCl (5 mg/kg) enjeksiyonu ile yapılan anestezi ardından kulağın arka kısmından ağız köşesine doğru seyreden bir deri insizyonu fasiyal sinirin r. buccalis'ine zarar verilmeksizin yapıldı. R. buccalis'in takibi ile r. zygomaticus, r. marginalis mandibulae ve fasiyal sinirin ana gövdesine ulaşıldı. Daha sonraki aşamada r. marginalis mandibulae mümkün olan en distal noktadan kesilerek takip edildi ve sonra fasiyal sinirin ana gövdesi içerisindeki bölümü de (fasiyal sinirin üst fasikülü içerisinde ilerleyen r. zygomaticus ve r. buccalis'e ait liflere zarar verilmemesine dikkat edilerek) fasiyal sinirin çıkış yeri seviyesine kadar takip edilip kesilerek çıkarıldı (Bu işlem sırasında fasiyal sinirin servikal dalı da marginalis mandibulae dalı ile birlikte aynı fasikülde seyretiltikleri için çıkarılmış oldu). Bu işlemin yapılması ardından fasiyal sinirin ana gövdesi foramen stylomastoideum'dan çıkış yerinden hemen sonra kesilerek 6.0 dikiş materyali ile bağlandı. Bu işlemin tamamlanması ile sadece r.zygomaticus ve r.buccalis'i



Şekil 3.2. Hypoglossal ve fasiyal sinirlerin direkt anastomozunun şematik gösterimi (HFA koaptasyon).

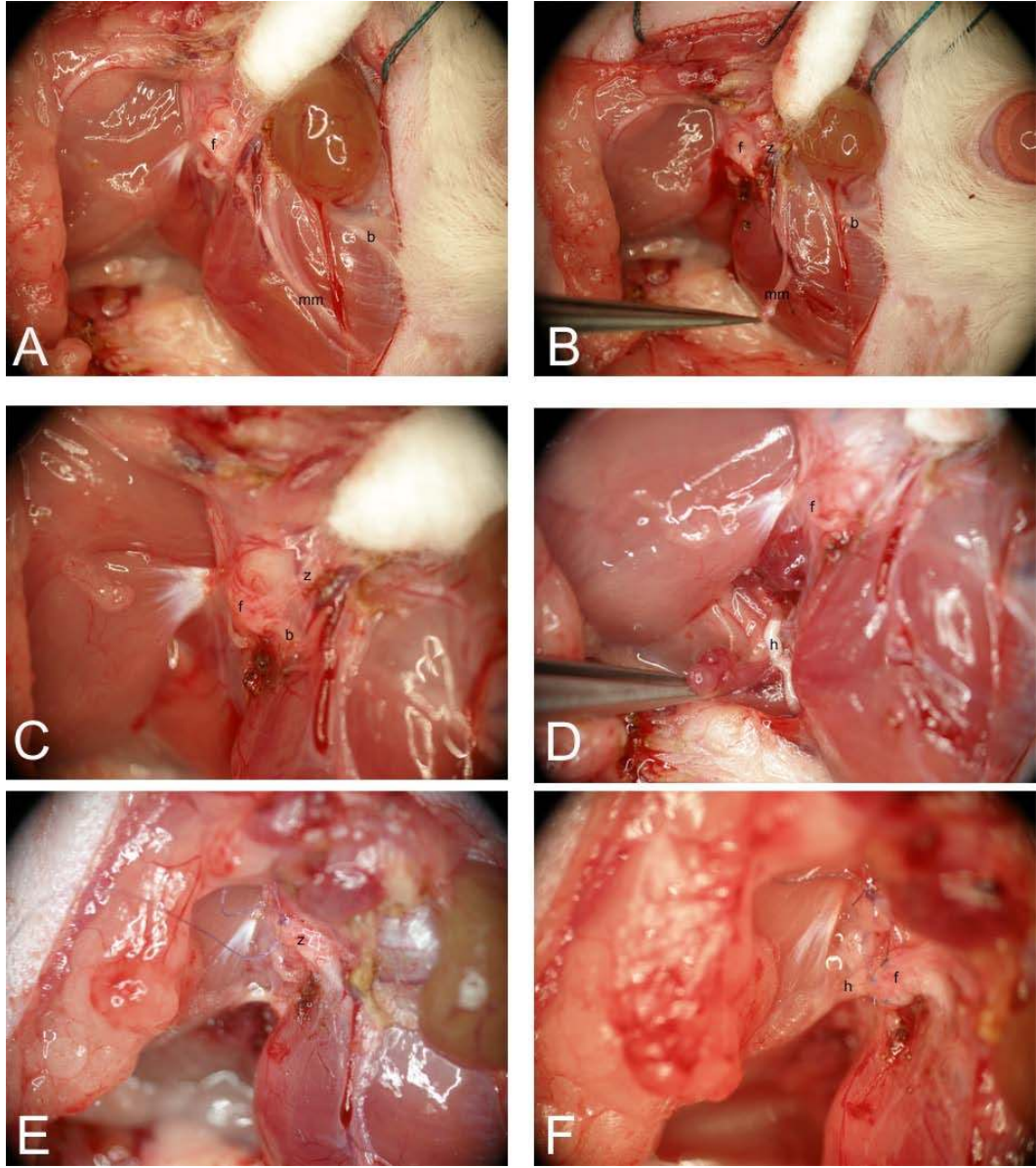
A: Normal fasiyal sinir anatomisi. **B:** R. marginalis mandibulae'nin kaldırılması. **C:** R. marginalis mandibulae'nin kaldırılması sonrası fasiyal sinir görünümü. **D:** Fasiyal sinir ana gövdesi ile hypoglossal sinirin kesilmesi. **E:** Fasiyal sinir ve dalları ile hypoglossal sinirin kesilmesi sonrası sinir dallarının görünümü. **F:** Hypoglossal ve fasiyal sinirlerin direkt anastomozu.

içeren fasiyal sinir bölümü HFA için hazır duruma getirildi.

İkinci aşamada hypoglossal sinir anastomoz için hazır duruma getirildi. Bunun için m. digastricus'un arka karnının hemen altında seyreden hypoglossal sinir çevredeki arter ve venlere zarar verilmeden çevre bağ dokusundan temizlendi. Hypoglossal sinir, ansa cervicalis'e katılan dalın ayrılma seviyesinin distalinde bir noktadan kesildi. Bu nokta hypoglossal sinirin medial ve lateral dallarına ayrıldığı noktadan hemen önceki bir seviye olarak seçildi.

Üçüncü aşamada ise hypoglossal sinirin proksimal ucu ile fasiyal sinirin distal ucu 10.0 dikiş materyali yardımı ile koapte edildi (*Şekil 3.2, Şekil 3.3A-F*). Koaptasyon işlemi sırasında iki dikiş uygulandı ve bu dikişlerin sinir liflerine zarar vermeyecek şekilde sadece epineurium'dan geçirilmesine büyük özen gösterildi. Çünkü sinir dokusunun hasarlanması dolayısıyla rejenere olamaması anlamına gelmektedir. Bu da deney sonunda motor nükleustaki nöronların

floresan işaretleyici ile işaretlenmesi sırasında daha az sayıda nöronun belirlenmesine sebebiyet verecektir.



Şekil 3.3. Hypoglossal-fasiyal koaptasyon

A- Dış kulak yolu kıkırdağının elevasyonu ve çevredeki venöz yapıların kaldırılması sonrası fasiyal sinir ve dallarının görünümü. **B-** R. marginalis mandibulae'nın kesilerek kaldırılması **C-** R. marginalis mandibulae'nın kesilerek kaldırılması sonrası görünüm. **D-** N. hypoglossus'un cerrahi alan içerisine dahil edilmesi **E-** Fasiyal sinir ana gövdesinin (R. marginalis mandibulae fasiyal sinirin ana gövdesi içerisinden ayrıldıktan sonra) proksimal kısmının bağlanması. **F-** operasyonun son aşamasında Hypoglossal-fasiyal koaptasyon görünümü. **b:** R. buccalis, **f:** N. facialis, **h:** N.hypoglossus, **mm:** R. marginalis mandibulae, **z:** R.zygomaticus

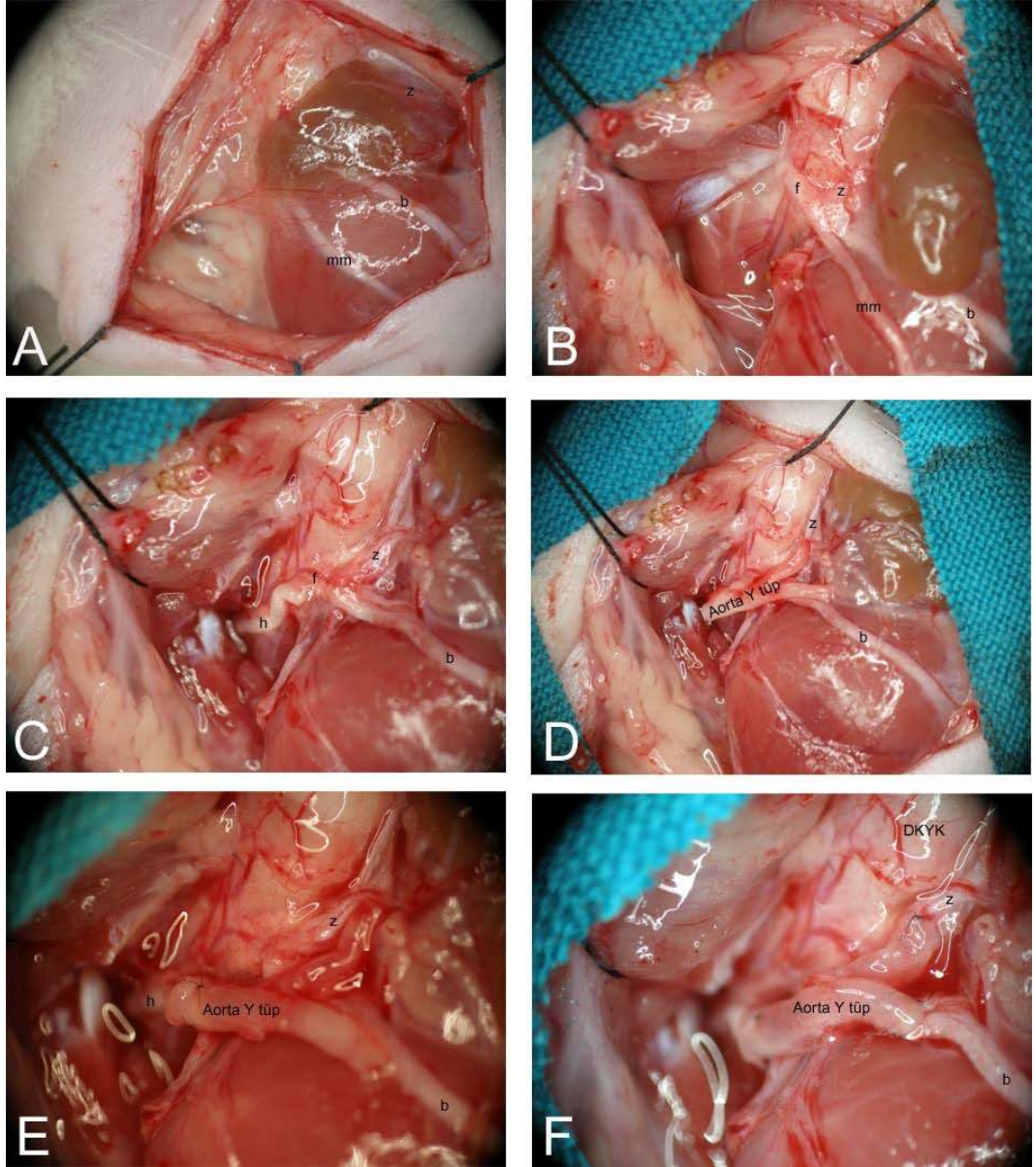
3.3.3 HFA Y tüp

Hypoglossal-fasiyal koaptasyon uygulanan deneklerde fasiyal sinirin içerisinden r.marginalis mandibulae'nın kaldırılması ardından, fasiyal sinirin ana gövdesinin bağlanması ve hypoglossal sinirin cerrahi alana dahil edilmesi

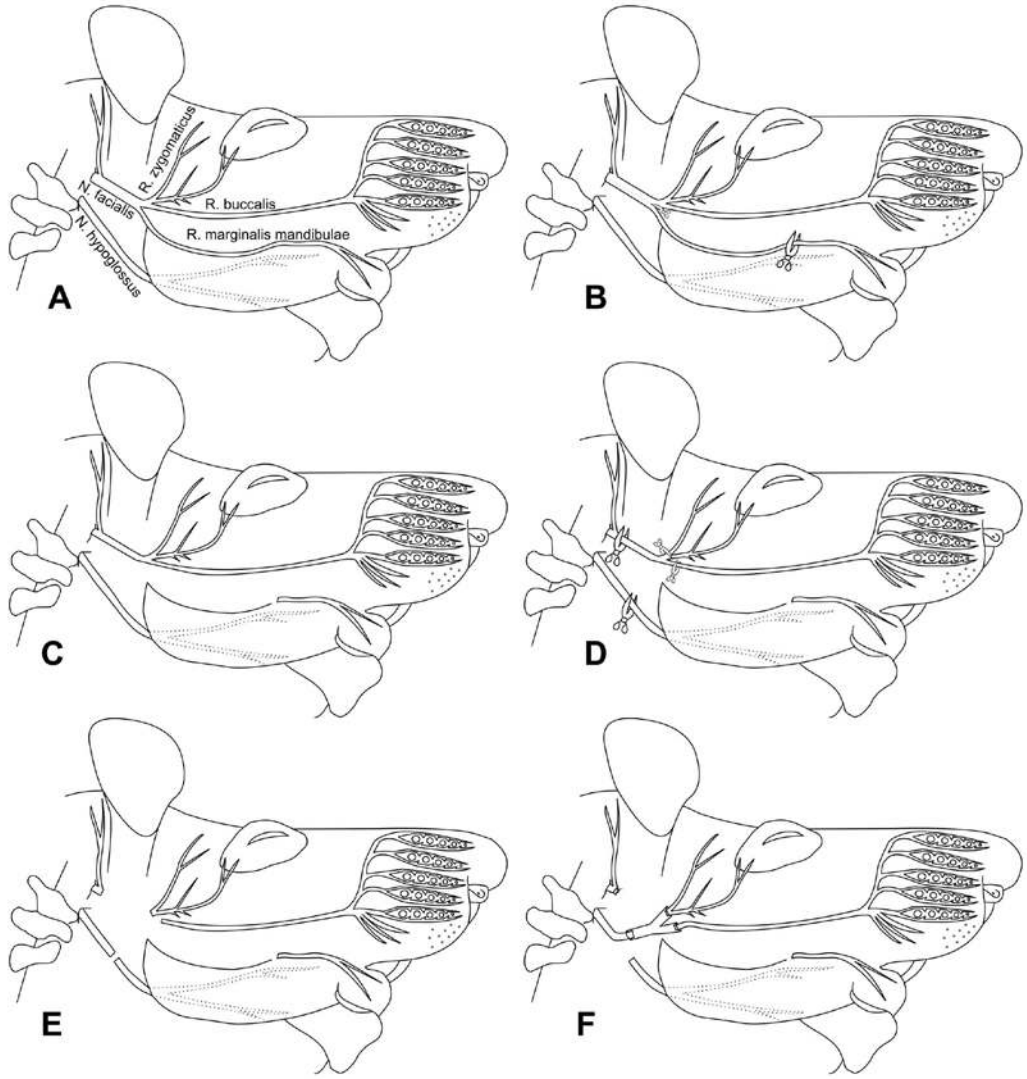
amacıyla uygulanan tüm cerrahi aşamaları bu deneklerde de uygulandı. Daha sonra Y tüpünün kısa kollarına yerleştirilecek olan r. buccalis ve r. zygomaticus, fasiyal sinirden ayrıldıkları seviyeden kesildi. Bu işlemin tamamlanması ile fasiyal sinir Y tüp implantasyonu için hazır duruma getirildi (*Şekil 3.4, Şekil 3.5*).

Hazırlanan aorta Y tüpünün uzun koluna hypoglossal sinirin proksimal ucu, üst kısa koluna r. zygomaticus, alt kısa koluna ise r. buccalis entübüle edildi (*Şekil 3.4, Şekil 3.5*) ve sinir dalları aorta Y tüpünün içinden çıkmayacak şekilde ikişer dikiş uygulanarak tespiti sağlandı. Entübülasyon işlemi sırasında dikişlerin (10.0) sinir liflerine zarar vermeyecek şekilde sadece epineurium'dan geçirilmesine büyük özen gösterildi. Cerrahi işlem sonrasında sinir uçları arasındaki (hypoglossal sinir- r. zygomaticus/ r.buccalis) mesafenin 10 mm olmasına özen gösterildi. Sinir uçları arasında bırakılan mesafe ile, hypoglossal sinirden köken alacak sinir liflerinin serbest bir şekilde yön bulmasına ve böylelikle uygun hedefi ile birleşmesine olanak sağlanması amaçlandı.

Denekler üzerinde yapılan cerrahi işlemler sonrasında denekler standart kafeslerine alındı. Deneklerin uyanmalarına yakın bir zamanda deneklere Tramadol HCl (3 gün boyunca 20 mg/kg) verilerek postoperatif analjezileri sağlandı. Deneklerin karışmasını önlemek amacıyla sağ kulaklarına denek numarası yazılı olan metal birer küpe takıldı.



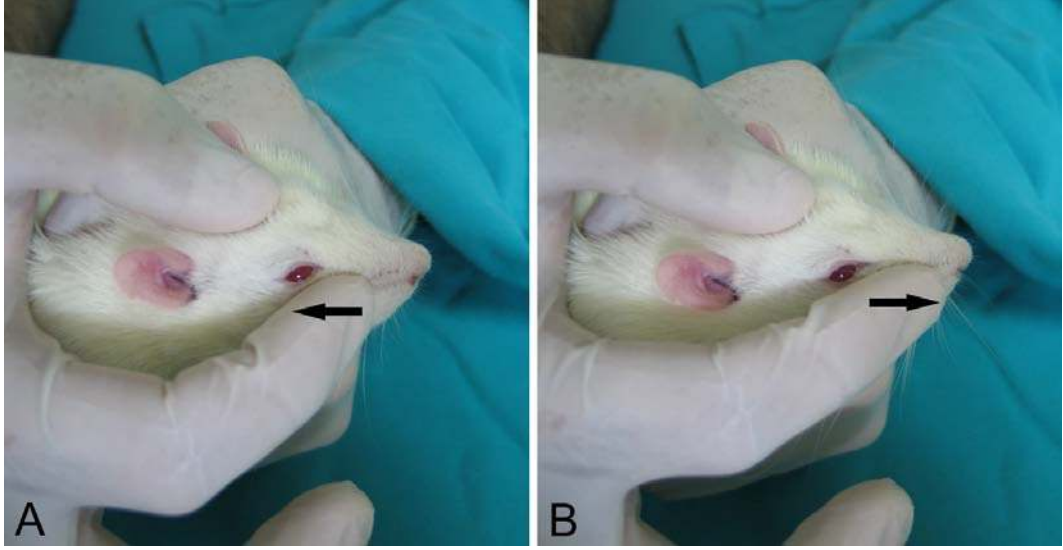
Şekil 3.4. Aorta Y tüpü ile yapılan hypoglossal-fasiyal anastomoz
A-Cilt kesisi sonrası cerrahi alanın görünümü. **B-** Dış kulak yolu kıkırdağının elevasyonu ve çevredeki venöz yapıların kaldırılması sonrası fasiyal sinir ve dallarının görünümü. **C-** N. hypoglossus'un transpozisyonu **D-** Aorta Y tüpünün cerrahi alan içerisindeki görünümü **E-** Aorta Y tüpünün uzun koluna n. hpoglossus'un iki dikiş ile entübüle edilmesi. **F-** Operasyonun son aşamasında r. zygomaticus ve r. buccalis entübüle edilmesi. **b:** R.buccalis, **f:** N. facialis, **h:** N. hypoglossus, **mm:** R. marginalis mandibulae, **z:** R. zygomaticus, **DKYK:** Dış kulak yolu kıkırdağı.



Şekil 3.5. Aorta Y tüpü ile yapılan hypoglossal-fasiyal anastomoz'un şematik gösterimi
A: Normal fasiyal sinir anatomisi. **B:** R. marginalis mandibulae'nin kaldırılması. **C:** R. marginalis mandibulae'nin kaldırılması sonrası fasiyal sinir görünümü. **D:** Fasiyal sinir ve dalları ile hypoglossal sinirin kesilmesi. **E:** Fasiyal sinir ve dalları ile hypoglossal sinirin kesilmesi sonrası sinir dallarının görünümü. **F:** Aorta Y tüpü ile hypoglossofasiyal anastomoz. Y tüpünün uzun koluna hypoglossal sinir ve kısa kollarına r. zygomaticus ve r. buccalis entübüle edilmiştir.

3.4. Vibrisseal kasların manuel stimülasyonu

Vibrisseal kasların manuel stimülasyonuna cerrahiden bir gün sonra başlandı. Grup 5 ve 6'ya ait deneklerin sağ vibrisseal kıl bölgesi haftada 5 gün 5'er dakika elle ritmik ileri doğru parmak hareketiyle uyarıldı. Elle uyarma, bıyık hareketi sırasında bıyıkların aktif protraksiyon ve pasif retraksiyon şeklindeki doğal hareketini taklit edilecek şekilde gerçekleştirildi (*Şekil 3.6*).



Şekil 3.6. Vibrisseal kasların uyarılması
A: pasif retraksiyon, B: aktif protraksiyon

3.5. Sakrifikasyon öncesi yapılan işlemler

3.5.1. Vibrisseal motor performansının değerlendirilmesi için vibrisseal kıl hareketlerinin video kaydı

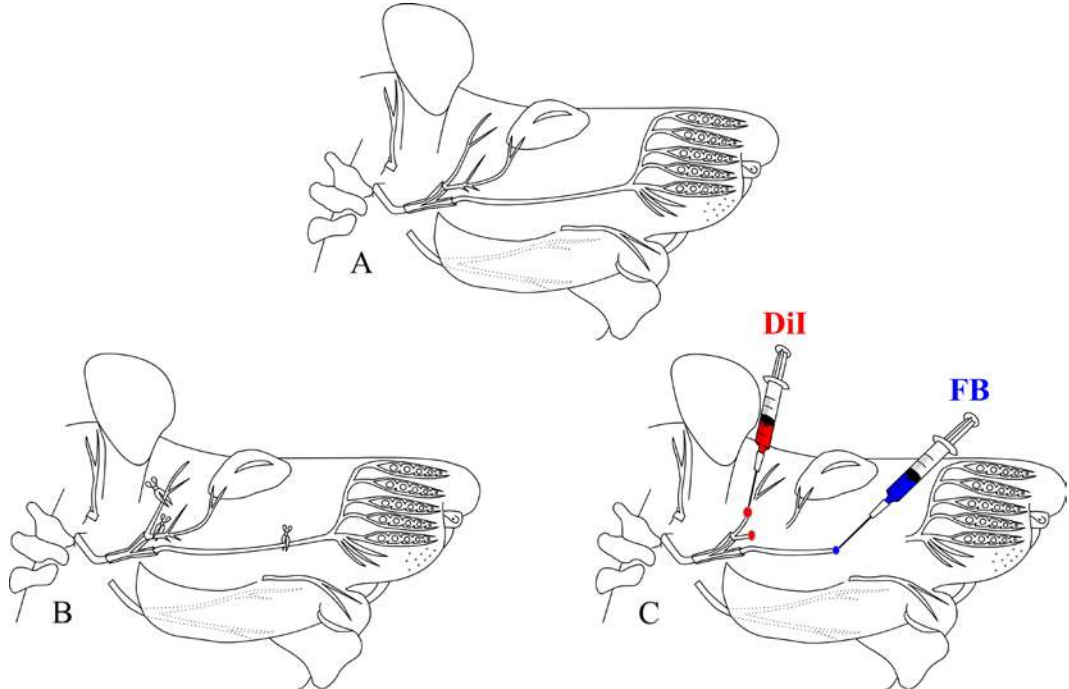
Ratlarda bıyık kılları 5 sıra şeklinde dizilmişlerdir (*Şekil 3.7*). Bu kıllardan 3. sıranın en arkadaki 2 kıl en kalın ve en uzun kıllardır. Bu nedenle, hypoglossal-fasiyal koaptasyondan dört ay sonra hafif anestezi altında denegin bu 2 kılı dışındakiler kesilerek denek video çekimine hazırlandı. Deneklerin aktif explorasyon hareketi dijital video kamerayla (Sony Handycam DCR-SR70 HDD Camcorder) kaydedildi.



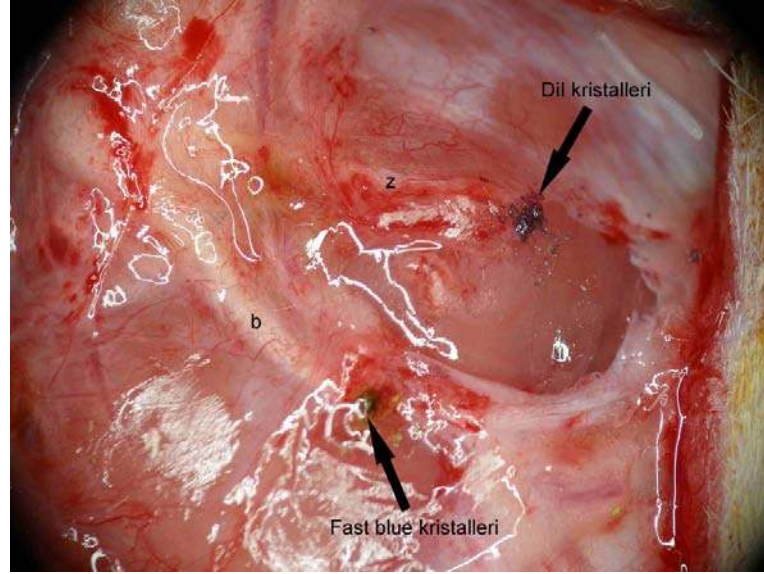
Şekil 3.7. Ratın vibrisseal kıllarının dizilimi

3.5.2. Floresan işaretleyicilerin uygulanması

Her gruptan 6 denek bu amaç için kullanıldı. Bu uygulama için denekler 4. ayın sonunda anestezi edildi. Daha sonra cilt kesisi yapılarak r. zygomaticus ve r. buccalis'e ulaşıldı. Bu dalların distal tarafları bir penset yardımıyla tutularak bir mikromakas ile proksimal kısımları kesildi. Bu aşamadan sonra proksimal kısma herhangi bir müdahalede (tutma, kesme v.b.) bulunulmadı. Distal kısımlar ise uygun miktarda kesilerek cerrahi alandan uzaklaştırıldı. Daha sonra karanlık ortamda tutulan ve gün ışığına maruz kalmasının minimum seviyede olmasına dikkat edilen 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) ve Fast Blue (FB) işaretleyicilerinin uygulamasına geçildi. Bu işaretleyicilerden DiI r. zygomaticus'a, FB ise r. buccalis'e uygulandı (*Şekil 3.8, Şekil 3.9*). Bu işaretleyicilerin kristalleri dalların proksimal kısımlarının üzerine kaplayacak şekilde sinir dalı üzerine insülin enjektörü yardımıyla bırakıldı. Kontaminasyonun önlenmesi amacıyla DiI ve FB için ayrı insülin enjektörleri kullanıldı. Kristallerin sinir üzerine bırakılması sonrasında FB işaretleyicisi hidrofilik özellikte olduğu için sinirin üzerinde bir damla şeklinde, DiI işaretleyicisi ise lipofilik özellikte olduğu için kristal şeklinde bir görünüme sahipti (*Şekil 3.9*). Bu kristallerin uygulamasından sonra denekler bir saat bu şekilde bekletildi. Bu beklemin nedeni kristallerin sinir içerisine nüfuz etmesi ve retrograd transportun başlamasıdır. Bu sürenin sonunda cerrahi alan bol serum fizyolojik ile yıkanıp kurutularak cerrahi kesi kapatıldı. Deneklerin uyanmalarına yakın bir zamanda deneklere Tramadol HCl (3 gün boyunca 20 mg/kg) verilerek postoperatif analjileri sağlandı.



Şekil 3.8. Floresan işaretleyicilerin uygulanmasının şematik gösterimi
A: 4 aylık süreçte aorta Y tüpü içerisinde rejenere olan hypoglossal sinir lifleri. **B:** R. zygomaticus ve r. buccalis'in distal bölümünün kesilmesi. **C:** FB ve DiI işaretleyicilerinin uygulanması.



Şekil 3.9. Hypoglossal sinir nükleusundaki nöronların görüntülenmesi amacıyla floresans işaretleyicilerin uygulanması
Kırmızı renkte görünen Dil kristalleri r. zygomaticus'un kesik ucunu kaplayacak şekilde yerleştirilmiştir. Sarı renkte görünen Fast Blue kristalleri r. buccalis'in kesik ucunu kaplayacak şekilde yerleştirilmiştir. **b:** r. buccalis, **z:** r. zygomaticus.

3.6. Hayvanların sakrifikasyonu ve dokuların alınması

Floresan boya kristallerinin uygulanmasından 15 gün sonra deneklere torakotomi yapılarak kalbin sol ventrikülünden girildi ve 250-300 ml 0.1M fosfat tamponu (pH:7.4) ile damar sistemi temizlendi. Bunun ardından 0.1M fosfat tamponu (pH:7.4) ile hazırlanan %4'lük paraformaldehit ile transkardial fiksasyon gerçekleştirildi. Bu işlemin sonrasında beyin sapı (nükleustaki işaretlenmiş nöronların tespiti için) ve M. levator labii superioris (LLS, polinnervasyonun tespit edilmesi için) çıkarıldı. LLS'in çıkarılması için disseksiyona gözün medial köşesinden başlandı. Kasın buradaki tutunma kısmı kesildikten sonra kas distale doğru takip edildi. Bu sırada kasın altında seyreden infraorbital sinir de kesildi. Kıl folikülleri seviyesine geldikten sonra vibrisseal kıllara ait olan kıl folikülleri derin seviyede kesildi ve kas bütün olarak çıkarıldı.

3.7. Analiz

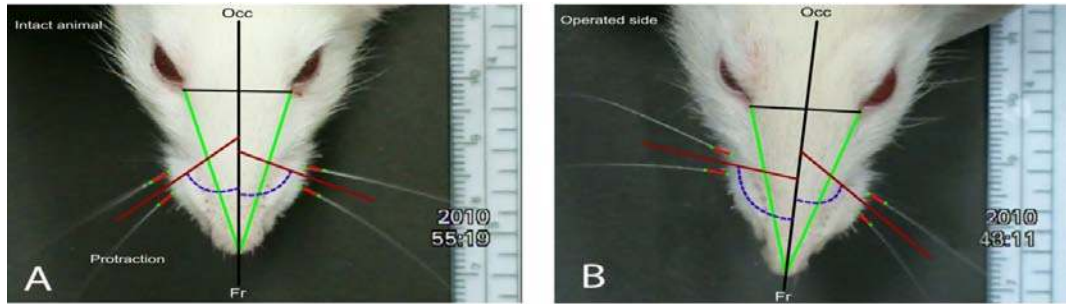
3.7.1. Vibrisseal motor performansın değerlendirilmesi

Vibrisseal motor performansın video tabanlı hareket analizi daha önceki çalışmalarda uygulanmış ve test edilmiş bir metottur [48, 56, 117]. Her denekten elde edilen video kaydından denek başının hareketsiz olduğu 1,5 saniyelik fragmanlar seçilerek biometrik analiz ile incelendi. 2D/Manual Advanced Video System (PEAK Motus 2000, PEAK Performance Technologies, Inc., Englewood, CO, USA) adlı yazılım ile yakalanan görüntüler içerisinde cerrahi uygulanmayan taraftaki en belirgin bıyık hareketinin olduğu kısım seçildi. Üç referans noktasından oluşan bir geometrik model oluşturuldu (*Şekil 3.10*). Bu noktalar:

- (i) medial sagittal hattın burun ucuna en yakın noktası (occ -burun ucu arası)
- (ii) sol gözün medial kantusuna denk gelen nokta

(iii) sağ gözün medial kantusuna denk gelen nokta
Bu model kullanılarak aşağıdaki ölçümler yapıldı.

- Frekans (saniye başına düşen protraksiyon ve retraksiyon döngüsü)
- Maximum protraksiyon sırasındaki açı (öne doğru bıyık hareketi) bıyık gövdesi ve midsagittal plan arasında kalan rostral açı derece olarak ölçülecektir. Açının küçülmesi güçlü protraksiyonu gösterecektir.
- Amplitüt (maximum retraksiyon ve protraksiyon arasındaki açının derece cinsinden değeri)
- Açısal hız (saniyedeki açı değişimi)
- Protraksiyon sırasında açısal hızlanma (protraksiyon sırasında saniye karedeki açısal hızlanmanın derece cinsinden değeri).



Şekil 3.10. Vibrisseal motor performansın biyometrik analizi
Normal (A) ve sağ tarafta cerrahi uygulanan denek (B).

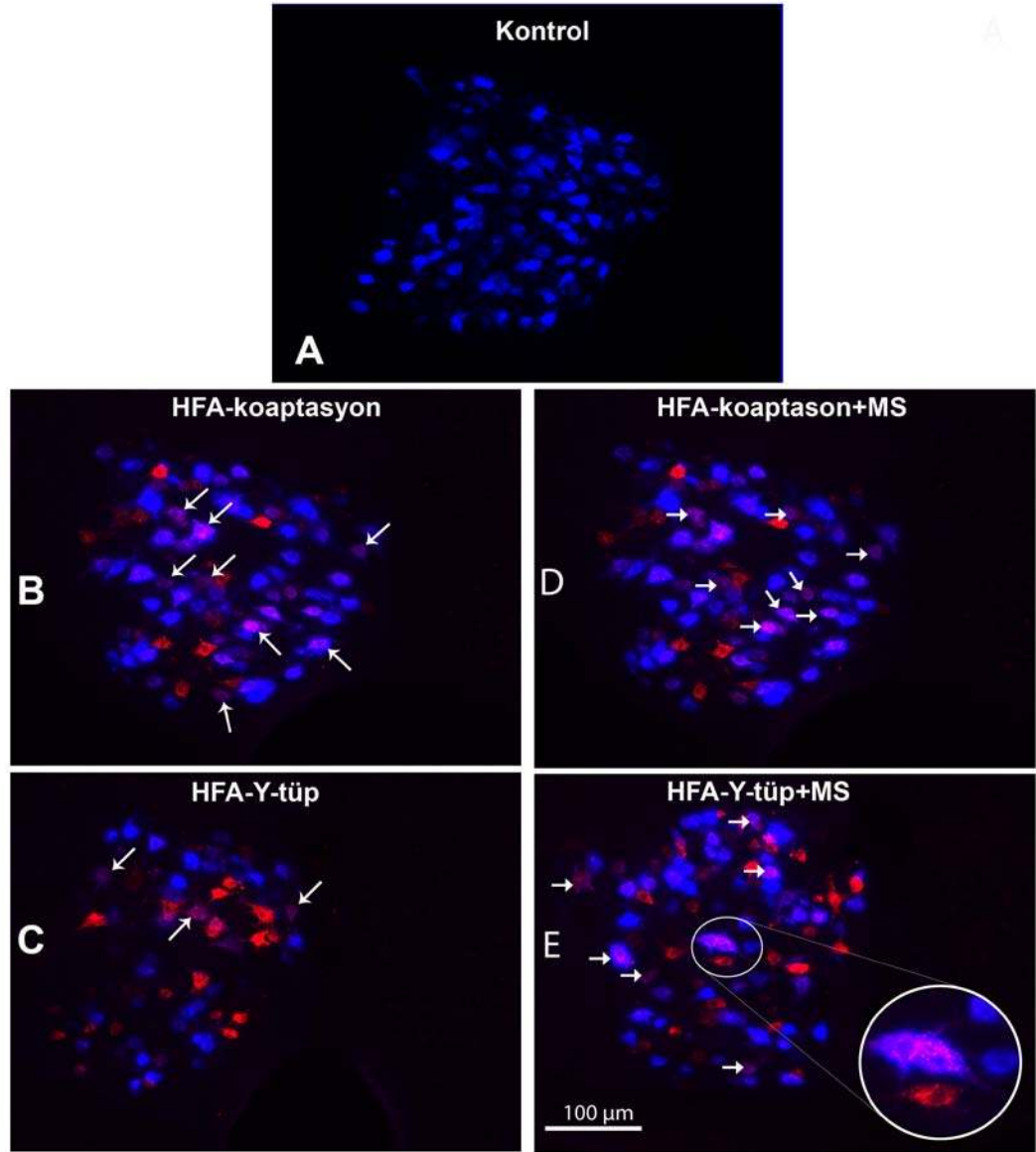
3.7.2. Lezyon alanındaki kollateral dallanmanın belirlenmesi

Lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanmanın belirlenmesi için sakrifikasyon gününde elde edilen ve analiz gününe kadar 0,1 M fosfat tamponu (pH:7,4) ile hazırlanmış olan %4'lük paraformaldehit içerisinde +4°C sıcaklıkta, karanlıkta saklanan beyin sapı dokularından vibratomla (Leica, VM1000S) 50 µm kalınlığında frontal kesitler alındı. Kesitler cam lamplara (Superfrost Plus, J1800AMNZ, Menzel-Gläser, Germany) alınarak oda sıcaklığında kurutuldu. Kesitler epifloresan mikroskop (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Germany) kullanılarak değerlendirildi. Retrograd işaretlenmiş hypoglossal motor nöronlara ait resimler CCD video kamera (Optronics DEI-470, Goleta, CA, USA) sistemiyle görüntülendi ve bu resimler ImagePro Plus 6.2 (Media Cybernetics, Baltimore, MD) ile analiz edildi.

Daha önceki çalışmalar doğrultusunda [51, 53, 89] n. hypoglossus'tan geçen her dört kesitten biri kullanıldı. Bu kesitlerde retrograd işaretlenmiş ve görünür bir çekirdeğe sahip nöronlar sayıldı.

Fast blue (FB) işaretlenmiş ve mavi floresans ışıma veren nöronlara ait vibrotom kesitleri, bu işaretlemeyi görünür kılan UV eksitasyon filtresiyle (Carl Zeiss, Filtre seti 01: Eksitasyon BP 365/12, Emisyon LP 397), DiI ile işaretlenmiş kırmızı floresans ışıma veren nöronlara ait kesitler de başka bir UV eksitasyon filtresiyle (Carl Zeiss, Filtre seti 15: Eksitasyon BP 546/12, Emisyon LP 590) görüntülendi. DiI ile işaretlenmiş motor nöronların görüntüleri üzerine FB ile işaretlenmiş motor nöron görüntüleri superimpoze edildi. Bu metot sadece DiI veya sadece FB ile işaretlenmiş motor nöronların görüntülenmesinin yanı sıra, her

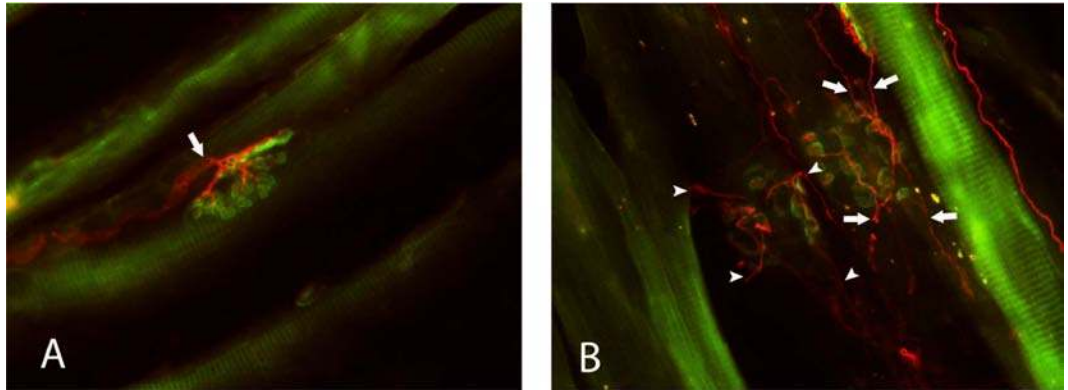
ikisiyle de çift işaretlenmiş (DiI+FB) motor nöronların tespit edilmesini de mümkün kıldı (*Şekil 3.11*). Bu şekilde işaretlenen (DiI, FB, DiI+FB) nöronlar bilgisayar ortamında sayıldı. Bu prosedür çok zaman alıcı olmasına rağmen aksonal dallanmanın derecesini (indeksini) kesin bir şekilde hesaplama imkanı sağladı. Aksonal dallanma indeksi, r.zygomaticus ve r. buccalis'in her ikisine birden dal gönderen motor nöron sayısının, bütün motor nöronların sayısına bölünmesiyle hesaplandı.



Şekil 3.11. Hypoglossal sinir nükleusundaki nöronların görünümü
A:Kontrol grubu, **B-E:** Mavi olarak görünen nöronlar Fast Blue ile işaretlenmiş ve r. buccalis'e ait nöronlardır. Kırmızı olarak görünen nöronlar DiI ile işaretlenmiş ve r. zygomaticus'a ait nöronlardır. Mor olarak görünen nöronlar ise ikili işaretlenmiş (oklar, double-labelled) nöronlardır. Yani kollateral filizlenme ile yanlış bir hedefe (r. zygomaticus ve r. buccalis'in her ikisine birden) yönelmiş olan nöronlardır.

3.7.3. M. levator labii superioris'in reinnervasyonunun değerlendirilmesi

Dördüncü postoperatif ayın sonunda bütün gruplardan arta kalan altışar denek hedef kas reinnervasyonunun değerlendirmesi için kullanıldı. LLS çıkarıldıktan sonra PBS içerisinde hazırlanan %20 sükröz çözeltisi içerisinde kriyokoruma için üç gün bekletildi ve kriyostatla (Microm HM500 OM) 30 µm kalınlığında longitudinal kesitler alındı. Bu şekilde total kas kitlesinden 32-37 kesit elde edildi. Alınan kesitler elektrostatik çekimle kesitlerin üzerine yapışmasını sağlayan SuperFrost Plus slaytlar (Art. No. J1800AMNZ, Menzel-Gläser, Germany) üzerine alındı. İmmun boyamaya işleminin başlatıldığı güne kadar slaytlar -80°C de saklandı. Kas örnekleme Fraksiyoner prensibi uyarınca yapıldı. Başlangıç kesitinden itibaren iki kesit atılarak üçüncü kesit alınması ile (1, 4, 7,10... veya 2, 5, 8, 11... vb.) elde edilen kesit serisi immunohistokimyasal ve histokimyasal boyama işlemine alındı. Boyama için slaytlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 3x10 dk 0,1 M PBS (pH 7,4) de yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalara karşı PBS içerisinde %0,2 Triton X-100 (Sigma), %0,02 sodium azide (Merck, Darmstadt, Germany) ve %5 normal sheep serum (NSS) ile 30 dk boyunca oda sıcaklığında bloklandı. Kesitler daha sonra PBS içerisinde 1:2500'e dilüe edilmiş ve %0,5 lambda-carrageenan (Sigma) ve % 0,02sodium azide içeren birinci antikor (rabbit polyclonal against neuronal class III β-tubulin, Covance, No. PRB- 435P) ile 4°C de bir gece inkübe edildi. Bütün bu işlemler kapaklı cam küvetlerde (20 slaytlık ve 250 ml kapasiteli, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) gerçekleştirildi. Ertesi sabah slaytlar oda sıcaklığında yukarıda belirtildiği gibi yıkandı. Ardından, PBS lambda carrageenan içerisinde 1:200 oranında seyreltilmiş ikinci antikor (Cy3-conjugated sheep antirabbit IgG) ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Bundan sonraki bütün aşamalar karanlıkta gerçekleştirildi. Aynı yıkama işleminin ardından kesitler PBS-sodium azide solüsyonu içerisinde 1:385 oranında seyreltilmiş Alexa Fluor 488-conjuge alpha-bungarotoxin (Molecular Probes) ile gece boyunca inkübe edildi. Son yıkama işleminden sonra kesitler oda sıcaklığında kurutuldu ve üzerleri kapatıldı. Kesitler “rhodamine” (No. 15, Carl Zeiss) ve “fluorescein” (No. 9, Carl Zeiss) filtreleriyle Axioskop 50 epiflorasan mikroskopta incelendi.



Şekil 3.12. Motor son plakların görünümü

Monoinnerv (A), Poliinnerv (B) motor son plak görünümü. Yeşil renk bungarotoxin ile işaretlenen motor son plağı, kırmızı ise beta tubulin ile işaretlenen ve motor son plağı innerv eden sinir liflerini (oklar ve ok başları) göstermektedir.

Motor son plak innervasyon paterni, motor son plaklara (alpha-bungarotoxin ile boyanmış asetilkolin reseptörü) giren aksonların (β -tubulin ile boyanmış) sayısına göre (tek bir aksonun girdiği son plaklar monoinnervasyon, iki veya daha fazla aksonun girdiği son plaklar poliinnervasyon hiçbir aksonun girmediği son plaklar ise noninnervasyon) değerlendirilerek yapıldı. (*Şekil 3.12 A-C*). Bu sayımlar 40 büyütmede kör gözlem şeklinde yapıldı.

3.8. Veri analizi

Elde edilen veriler, Mann-Whitney testi veya normal dağılıma uyan değerler için tek yönlü varyans analizi (ardından Tukey's Post Hoc Testi) veya normal dağılıma uymayan değerler için Kruskal-Wallis (ardından Dunnett's post-hoc test) ile analiz edildi. Anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak belirlendi. Tüm analizlerde GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, Calif) adlı yazılım kullanıldı.

BULGULAR

4.1. Birinci amaç doğrultusunda elde edilen bulgular (kollateral aksonal dallanmanın azaltılması)

4.1.1 Kollateral aksonal dallanma

Her iki tip HFA sonrasında (koaptasyon veya Y-tüp) hedef kasın anormal reinnervasyonu ile karakterize olan iki büyük değişiklik gözlemlendi. Birinci olarak nucleus nervi hypoglossi'nin myotopik organizasyonunun kaybolduğu tespit edildi. Örnek olarak hypoglossal perikaryonların, dorsal (r. lateralis n. hypoglossi'nin projekte olduğu kısım) ve ventral subnükleuslara (r. medialis n. hypoglossi'nin projekte olduğu kısım) ayrılmadığı gözlemlendi. Somatotopinin kaybolmasının (*Şekil 3.11*) sebebi n. hypoglossus'un lateral ve medial dallarına ayrılma yerinin proksimalinden kesilmesinden dolayı bu dalara ait yeni büyüyen aksonların doğru hedeflerine yönlenebilmeleri olarak yorumlandı.

İkinci olarak lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanmadan dolayı nucleus nervi hypoglossi'nin her tarafında çift boyanmış (DiI+FB) perikaryonlar (*Şekil 3.11*'de oklar) tespit edildi. HFA koaptasyon grubunda (Grup 3) DiI ile işaretlenmiş 2372 ± 471 , FB ile işaretlenmiş 2014 ± 621 , ve DiI+FB ile çift işaretlenmiş 941 ± 441 perikaryon sayıldı. Dolayısıyla lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanma oranı $\%21 \pm 7$ olarak hesaplandı. Buna karşın HFA Y tüp grubunda (Grup 4) DiI ile işaretlenmiş 2137 ± 914 , FB ile işaretlenmiş 1232 ± 671 , ve DiI+FB ile çift işaretlenmiş 419 ± 373 perikaryon sayıldı. Lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanma oranı $\%11 \pm 6$ olarak hesaplandı. İki grup arasındaki veriler değerlendirildiğinde, HFA Y tüp sonrası grubunda lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanma oranının istatistiksel olarak düşük olduğu tespit edildi (*Tablo 4.1*, Grup 3 ve 4). Bu nedenle, Y tüp yardımıyla yapılan HFA'nın kollateral aksonal dallanma derecesini etkili bir şekilde azalttığı tespit edildi.

4.1.2. M. levator labii superioris'in reinnervasyon paterni

Kas reinnervasyon kalitesi LLS'nin reinnervasyon paterninin tespiti ile değerlendirildi. Kontrol grubunda, bütün motor son plakların herbirinin tek bir akson tarafından innerve edildiği tespit edildi ve bu innerveasyon paterni monoinnervasyon olarak değerlendirildi (*Şekil 3.12 A*). Her iki tip HFA sonrasında (koaptasyon veya Y-tüp) çok sayıda poliinnervasyon motor son plak (iki veya daha fazla akson tarafından innerve edilen) gözlemlendi (*Şekil 3.12 B*). Reinnervasyon paterninin tespiti amacıyla yapmış olduğumuz sayımlar sonucunda LLS'nin HFA koaptasyon grubunda (Grup 3) poliinnervasyon oranı $\%24 \pm 3$; HFA Y tüp grubunda (Grup 4) ise $\%22 \pm 4$ olarak tespit edildi. Her iki onarım şeklinin poliinnervasyon oranları üzerine anlamlı bir etkisi ($p > 0.05$) tespit edilmedi (*Tablo*

4.2, Grup 3 ve 4). Sonuç olarak, Y tüp yardımıyla yapılan HFA'nın LLS'nin reinnervasyon kalitesini arttırmadığı tespit edildi.

4.1.3. Video tabanlı görüntü analizi

"N. facialis kesim modeli"nin en önemli avantajı operasyon sonrası vibrisseal ritmik hareketlerin felcinin ve ardından göreceli iyileşmesinin gözlemlenebilmesidir.

4.1.3.1. Davranışsal vibrisseal bıyık hareketlerinin gözlemlenmesi

Fasiyal sinirin kesilmesi ile oluşan denervasyon sonrası yaklaşık olarak ilk on gün süresince vibrisseal kılların kaudal konumda hareketsiz olarak kaldığı tespit edildi. Operasyondan 10-14 gün sonra tedaviden bağımsız olarak vibrisseal kılların protraksiyon sırasında ağız civarına kadar ulaştığı gözlemlendi.

4.1.3.2. Bıyık hareketlerinin biometrik analizleri

4.1.3.2.1. Kontrol grubu

Eksplorasyon hareketi sırasında bıyıkların 6 Hz frekansla geri hareket ettiği ölçüldü. Maksimum protraksiyon açısı 65°, amplitüt ise 64° olarak ölçüldü. Bu hareketlerin sagittal açısal hızı 1200°/saniye ve sagittal açısal hızlanması da 65000°/saniye² olarak tespit edildi (*Tablo 4.3*, Grup 1).

4.1.3.2.2. Hypoglossal-fasiyal anastomoz uygulanan gruplar

HFA koaptasyon (Grup 3) ve HFA Y tüp grubuna (Grup 4) ait sıçanların analiz sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fonksiyonel bozukluğun belirgin olduğu tespit edildi. Buna göre maximum protraksiyon açısında artış (kontrol grubuna göre +%30; *Şekil 3.10*), amplitütte düşüş (-70%); bunun yanı sıra protraksiyon sırasında açısal hız ve hızlanmada düşüş (-75%) gözlemlendi. Bu durum, operasyon sonrası aktif protraksiyon fazı sırasında yetersiz vibrisseal kas fonksiyonlarına sebep olduğu şeklinde yorumlandı. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde her iki HFA tamirinden dört ay sonra bile vibrisseal kıl hareketlerinin fonksiyonlarının şiddetli bir şekilde bozulduğu gözlemlendi (*Tablo 4.3*, Grup 3 ve 4). Sonuç olarak, Y tüp yardımıyla yapılan HFA'nın vibrisseal kıl hareketlerini iyileştirmediği tespit edildi.

4.2. İkinci amaç doğrultusunda elde edilen bulgular (manuel stimülasyonun HFA-Y-Tüp sonrası etkisi)

4.2.1. Kollateral aksonal dallanma

HFA koaptasyon + MS grubunda (Grup 5) 1. postoperatif günden itibaren dört ay süreyle uygulanan MS sonrası nucleus nervi hypoglossi'nin myotopik organizasyonunun bozulduğu gözlemlendi. Aynı sonuçlar HFA Y tüp + MS grubu (Grup 6) için de geçerliydi. Myotopinin bozulmasının nedeninin tek bir kesilmiş aksondan filizlenen çok sayıda kollateral dalın farklı hedeflere yönelmesi ve bu şekilde farklı floresan işaretleyiciyi kendi motor nöronuna taşıması sonucu gerçekleştiği şeklinde yorumlandı. MS sonrası her iki grupta da kollateral

dallanma derecesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p>0.05$) tespit edilmedi (*Tablo 4.1*). Sonuç olarak, iki tip HFA sonrası uygulanan MS'nin lezyon alanındaki aksonların kollateral dallanmasını azaltmadığı tespit edildi.

4.2.2. M. levator labii superioris'in reinnervasyon paterni

HFA Y tüp sonrası uygulanan MS'nin motor son plakların poliinnervasyon derecesini düşürmediği ($p>0.05$) tespit edildi (*Tablo 4.2*, Grup 4 ve 6). Ancak HFA koaptasyon sonrası uygulanan MS'nin motor son plakların poliinnervasyon derecesini düşürdüğü ($p<0.05$) gözlemlendi. Mono ve noninnerve son plakların oranında ise bir değişiklik olmadığı ($p>0.05$) saptandı (*Tablo 4.2*, Grup 3 ve 5). Bu bulgular, HFA Y tüp sonrası yapılan MS'nin LLS'nin reinnervasyon paterni üzerinde etkisi olmadığını göstermektedir.

4.2.3.Video tabanlı görüntü analizi

HFA Y tüp sonrası uygulanan MS'nin fonksiyonel iyileşme üzerinde olumlu bir etki sağlayamadığı ve bu deneklerin biometrik değerlerinde de bir değişiklik yapmadığı tespit edildi (*Tablo 4.3*, Grup 4 ve 6). Buna karşın, HFA koaptasyon sonrası uygulanan MS'nin vibrisseal hareketin amplitüdünü ($22^{\circ}\pm 3^{\circ}$ den $28^{\circ}\pm 5^{\circ}$ 'ye), açısal hızlanmayı (5180 ± 3493 'den 11158 ± 7940 'a) arttırdığı tespit edildi (*Tablo 4.3*, Grup 3 ve 5). Buna rağmen, her iki cerrahi uygulama sonrasında da büyük fonksiyonel eksiklikler gözlemlendi. MS ile HFA koaptasyon sonrası kısmi bir iyileşme olmasına rağmen, tam bir fonksiyonel iyileşme sağlanamadı. Sonuç olarak, HFA Y tüp sonrası uygulanan MS'nin vibrisseal kıl hareketlerinde düzelme sağlamadığı tespit edildi.

Tablo 4.1: HFA sonrası kollateral aksonal dallanma

Kontrol, sham, HFA koaptasyon ve HFA-Y-tüp sonrası manüel stimulyonlu veya stimulyonsuz gruplarda, n. zygomaticus (DiI) veya sadece r. buccalis'ine (FB) projekte olan n.hypoglossus'a ait motor nöronların sayısı. Beşinci kolondaki yüzde değerleri, n. facialis'in r. zygomaticus ve r. buccalis dallarının iksine birden projekte olan (DiI+FB) n.hypoglossus'a ait motor nöronların yüzdesidir. Bu durum kollateral aksonal dallanma olarak isimlendirilir. Deneklere ait dokular 112'nci post operatif günde uygulanan çift retrograd işaretlemiden 10 gün sonra analiz edildi. HFA koaptasyon (Grup 3 ve 5) veya HFA-Y-Tüp (Grup 4 ve 6) sonrası uygulanan manüel stimulyon anlamlı bir farka sebep olmamıştır. Manüel stimulyon uygulanmayan HFA-koaptasyon ve HFA-Y-Tüp (Grup 3 ve 4) gruplarına ait ortalama değerlerin arasındaki anlamlı fark (ANOVA Tukey's test, $p < 0.05$ veya Kruskal-Wallis, Dunn's test $p < 0.05$) # ile gösterilmiştir.

Deney grupları	Sadece r. zygomaticus'a projekte olan nöronlar (DiI)	Sadece r. buccalis'e projekte olan nöronlar (FB)	R. zygomaticus ve r. marginalis mandibulae'ye projekte olan nöronlar (DiI+FB)	Kollateral aksonal dallanma derecesi (DiI+FB oranı)
1) Kontrol	0	0	0	0
2) Sham	0	0	0	0
3) HFA-Koaptasyon	2372 ± 471	2014 ± 621	941 ± 441	21 ± 7
4) HFA-Y-tüp	2137 ± 914	1232 ± 671	419 ± 373	11 ± 6 #
5) HFA- Koaptasyon + MS	1409 ± 448	1555 ± 316	621 ± 170	21 ± 4
6) HFA-Y-tüp + MS	1980 ± 724	1610 ± 601	590 ± 390	16 ± 9

Tablo 4.2: Motor son plakların reinnervasyon paterni

Kontrol, sham, HFA koaptasyon ve HFA-Y-tüp sonrası manüel stimulyonlu veya stimulyonsuz gruplarda vibriseal kaslara ait motor son plakların reinnervasyon paterni. Stimulyon uygulanmamış HFA- Koaptasyon ve HFA-Y-Tüp grupları arasında (Grup 3ve 4) veya stimüle edilmiş ve edilmemiş HFA-Y-tüp grupları arasında (Grup 4 ve 6) anlamlı bir fark bulunmadı (ANOVA Tukey's test, $p < 0.05$ veya Kruskal-Wallis, Dunn's test $p < 0.05$). Stimüle edilmiş ve edilmemiş HFA koaptasyon uygulanan gruplar (Grup 3 ve 5) arasındaki anlamlı fark # ile gösterilmiştir. Stimüle edilmiş gruplar arasındaki (Grup 5 ve 6) anlamlı fark & ile belirtilmiştir. Kontrol ve sham grubuna ait değerler referans değerlerdir ve analize katılmamışlardır. **NMK:** Nöro muskuler kavşak

Deney grupları	Mono-innerv NNM oranı (yüzde)	Poli-innerv NNM oranı (yüzde)	Non-innerv NNM oranı (yüzde)
1) Kontrol	100	0	0
2) Sham	100	0	0
3) HFA-Koaptasyon	75 ± 2	24 ± 3	1 ± 2
4) HFA-Y-tüp	77 ± 4	22 ± 4	1 ± 2
5) HFA- Koaptasyon + MS	81 ± 3	17 ± 3 #	2 ± 2
6) HFA-Y-tüp + MS	75 ± 4 &	24 ± 4 &	1 ± 2

Tablo 4.3: Vibriseal motor performansın biometrik analizi

Kontrol, sham, HFA koaptasyon ve HFA-Y-tüp sonrası manüel stimulyonlu veya stimulyonsuz gruplarda vibriseal motor performansın biometrik analizi. HFA-Koaptasyon ve HFA-Y-Tüp grupları (Grup 3 ve 4) ve stimüle edilmiş veya edilmemiş HFA-Y-Tüp grupları (Grup 4 ve 6) arasında anlamlı fark yoktur. Kontrol grubundan anlamlı farklı HFA-Koaptasyon ve HFA-Y-Tüp gruplarına ait ortalamalar * ile gösterilmiştir (ANOVA Tukey's test, $p < 0.05$ veya Kruskal-Wallis, Dunn's test $p < 0.05$). Stimüle edilmiş veya edilmemiş HFA-Koaptasyon grupları (Grup 3 ve 5) arasındaki anlamlı farklar # ile gösterilmiştir. Stimüle edilmiş HFA-Y-Tüp ve HFA-Koaptasyon grupları (Grup 5 ve 6) arasındaki anlamlı fark & ile gösterilmiştir.

Deney grupları	Frekans (Hz)	Maximum protraksiyondaki açı (derece olarak)	Amplitüt (derece olarak)	Protraksiyon sırasında açılal hız (derece/saniye)	Protraksiyon sırasında açılal hızlanma (derece/saniye ²)
1) Kontrol	7,3 ± 1,3	65 ± 9	64 ± 8	1.213 ± 268	63.584 ± 41.329
2) Sham	7 ± 1	64 ± 18	62 ± 15	1.109 ± 564	65.832 ± 38.084
3) HFA-Koaptasyon	3,8 ± 1,6 *	91 ± 11 *	22 ± 3 *	218 ± 112 *	5.180 ± 3.493 *
4) HFA-Y-tüp	4 ± 1,8 *	99 ± 11 *	22 ± 6 *	198 ± 95 *	5.130 ± 4.112 *
5) HFA- Koaptasyon + MS	5,5 ± 3	83 ± 12 *	28 ± 5 **	316 ± 143 *	11.158 ± 7940 **
6) HFA-Y-tüp + MS	4,3 ± 2 *	103 ± 11 **	21 ± 4 **	234 ± 132 *	6.430 ± 3677 *

TARTIŞMA

Bu çalışma, her iki hypoglossal-fasiyal sinir tamiri yöntemi sonrası sınırlı iyileşmenin görüldüğüne ve bunun nedeninin sinir liflerinin yanlış yönlendirilmesi (kollateral aksonal dallanma) olduğuna dair deneysel deliller sunmaktadır. İki sinir ucu arasına bir tüp konularak sinir uçları arasındaki baskının azaltıldığı literatürde bildirilmiştir [80]. Çalışmamızda, aorta Y tüpü kullanılarak proksimal sinir ucundan kaynaklanan kollateral aksonal dallanmanın azaltılması başarılmıştır. Ancak, aorta Y tüpünün kullanıldığı bu deneklerde (Grup 4) reinerve olan vibrisseal kasların fonksiyonlarının HFA koaptasyonu yapılan deneklerdeki gibi zayıf kaldığı (Grup 3) gözlenmiştir.

Kas liflerindeki motor son plakların birden fazla sinir lifi tarafından innerve edilmesinin fonksiyonel bozukluğa neden olacağı bildirilmiştir [50]. Daha sonra yapılan bir çalışmada Guntinas-Lichius ve arkadaşları [49] HFA koaptasyon metoduyla tamir uygulanan gruplarda MS'nin vibrisseal fonksiyonların iyileşmesi üzerinde olumlu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Bulgularımız her iki çalışmayı da desteklemektedir. Ancak, bu bulgulardan farklı olarak, çalışmalarımız sonucunda HFA Y tüp sonrası uygulanan MS'nin vibrisseal kas fonksiyonu üzerinde etkisinin olmadığını saptadık.

5.1. HFA için Y tüpün kullanılması

Bifurcatio aortae'nin sinir için iki ayrı yol sunan Y tüp olarak kullanılması yeni bir metot değildir. Daha önceki çalışmalarda bir tercih hakkı verildiğinde aksonların sinir dokusuna kıyasla sinir olmayan dokuya yönelme gibi bir tercihlerinin olmadığını ve dolayısıyla temas ile yol bulmanın nörotropizime tercih edildiği iddia edilmiştir [126-129]. Aslında, ilk bakışta, Y tüp aracılığı ile aksonal yol bulmada sağlanan gelişme en basit tanımıyla r. zygomaticus ve r. buccalis'in Y tüpün kısa kollarına takılarak fiziksel bir avantaj sağlanmasıdır [59]. N. medianus'un intranöral topografisi duyu, motor ve miks aksonlar içeren fasiküllerin topografisinin tanımlanması için asetilkolinesteraz boyamasıyla araştırılmıştır [113]. Ayrıca, n. facialis'in ekstratemporal kısmının intranöral fasiküler topografisi yine metotla ortaya çıkarılmıştır ve bu teorik olarak mikro cerrahi yoluyla yapılan düzenlemeleri kolaylaştırmaktadır. Ancak, n. facialis aksonlarının intranöral topografisi anatomik treysirler kullanılarak belirlenmelidir. Ama yine de, truncus nervi facialis içerisinde r. zygomaticus'a ait liflerin en üste seyrederken, r. buccalis'e ait liflerin ona bitişik olarak aşağıda seyrettikleri bilinmektedir. Basitçe söylemek gerekirse rejenere olan zygomatic ve buccal aksonlar distaldeki r. zygomaticus ve r. buccalis'e ulaşabilmek için Y tüpün doğru kısa koluna takılmalıdır. Ancak deneysel olarak fasiküllerin cerrahi gibi fiziksel müdahalelerle düzenlenmesi yol bulmanın artırılmasını sağlamasına rağmen klinik sonuçlar hayal kırıcıdır [45, 49]. Aslında klinik veriler periferik sinir onarımı sırasında doğru aksonal yönlendirme için fiziksel müdahalelerle yapılan düzenlemelerin tek başına yetersiz olduğunu göstermektedir. Dahası YFP fareler ile yapılan güncel bir çalışmada rejenere olan aksonların bir fasikül seçmeden

önce hatırı sayılır uzunluktaki mesafeleri geçip distal sinir ucuna ulaştığı ve dolayısıyla cerrahi yeniden yapılandırmaların etkisiz kaldığı gösterilmiştir [134].

Weiss'in kantitatiften çok kalitatif olan ve allogenik greftler kullanılmasıyla güvenilirliğine gölge düşmüş çalışmalarıyla ortaya konulan temas ile aksonal yönelme çalışmaları tartışmaya açık hale gelmiştir [126-129]. Çünkü rejenere aksonların nöral olmayan dokudan ziyade nöral dokuya doğru çekildiği gibi nörotropizm hipotezine ilk kez güvenilir kanıtlar sunan Forssman'nın orjinal çalışması giderek desteklenmektedir [38]. Örneğin primatlarda rejenere olan aksonlara alternatif hedefler sunmak için femoral sinir kesisi ardından sikon Y tüp kullanılan [76] veya sıçanda sikon Y tüpün yanısıra aorta Y tüp hemografları kullanılan çalışmalarla [74, 91-92] nörotropizm vasıtasıyla belirgin bir şekilde yön seçimi yapılabildiği ortaya konmuştur. Periferik sinir defektlerini düzeltmede köprü olarak kullanılan muhtelif biyolojik materyalin arasından arter [25] ve ven [35-37, 60, 67] greftlere hatırı sayılır bir önem verilmektedir. Bu yapıların rejenere olan aksonların yönelmesini düzenlediği, hasarlı sinir ucundan salınan nörotrofik ve nörotropik faktörlerin difüzyonunu sağladığı ve fibröz doku infiltrasyonunu engellediği anlaşılmaktadır [60]. Dahası sikon tüple karşılaştırıldığında aortik dokunun kendisinin rejenerasyonu düzenleyen faktörleri sağlayan bir kaynak olduğu görülmüştür [132]. Bizim bulgularımız izogenik aorta Y tüpün güvenli bir periferik sinir rejenerasyonu sağladığını ve bunu 5 ile 10 mm ye kadar boşluklar üzerinden yaptığını belirten yaygın görüşü deteklemektedir [19-20, 75, 94-95, 102].

5.2. Manuel stimülasyonun HFA koaptasyon sonrası sınırlı iyileşme sağlaması ve HFA-Y-Tüp sonrası etkisiz kalmasının muhtemel sebepleri

İnsanlar üzerindeki klinik uygulamalarda HFA sonrası fonksiyonel iyileşme optimal düzeyin altındadır ve sonuçlar operasyon sonrası terapiyle yalnızca sınırlı olarak geliştirilebilir [110]. Fasiyal-fasiyal koaptasyon sonrası uygulanan MS'nin büyük hareketlerinde tam iyileşmeye sebep olduğu bildirilmiştir [2]. Buna karşın, hypoglossal-fasiyal koaptasyon sonrası uygulamış olduğumuz MS'nin büyük hareketlerini tam iyileştirmediği sadece sınırlı bir düzelmeye sebep olduğu tarafımızdan tespit edilmiştir. Bunun en önemli sebebinin ise hypoglossal-fasiyal koaptasyonun fasiyal-fasiyal koaptasyon'dan daha fazla rejenerasyon süresine ihtiyaç duyması olabilir.

Fasiyal-fasiyal koaptasyon ile karşılaştırıldığında, HFA koaptasyon ve HFA-Y-Tüp sonrası hypoglossal sinirin adaptasyonunun daha zor olduğu ve sinir tamiri sonrası daha yoğun yara dokusunun olduğu kanısındayız. Ayrıca fasiyal-fasiyal koaptasyon sonrası daha az kollateral dallanmanın olduğu, bu durumun hypoglossal-fasiyal koaptasyon sonrası daha karmaşık olduğu söylenebilir [105-106].

Çalışmamızda HFA koaptasyon grubunun aksine HFA- Y-tube sonrası MS uygulanmasına rağmen büyük hareketlerinde kısmi de olsa bir düzelme olmamasını, 10 mm uzunluğunda bir sinir parçasının çıkarılmasını, kesik uçların tüp içerisine sokulmasını, üç sinir dikiş bölgesinin bulunmasını, daha yoğun skar

dokusu oluşumunu içeren ve dolayısıyla sinir için nispeten daha zorlu bir operasyon olan bu cerrahi yaklaşımdan kaynaklandığını düşünmekteyiz. İkinci sebep olarak da rejenere olan aksonların Y tüpü içerisindeki boşluğu geçebilmek için daha fazla zamana ihtiyaç duymaları gösterilebilir.

Yetişkin sıçanlarda hypoglossal-fasiyal koaptasyon sonrası yapılan nöron sayımları hypoglossal motor nöronların %100 oranında canlı kaldığını göstermiştir [125]. Sıçanlarda yapılan önceki çalışmalar kesilen hypoglossal aksonların fasiyal sinir içinde ilerleyebildiğini, LLS'den alınan nöromiyografik kayıtlar hypoglossal-fasiyal koaptasyon'dan sonra ilk EMG yanıtının en erken 21 gün sonra 1-2 m/saniye sinir iletim hızına sahip olduğunu, sinir ileti hızının devamlı olarak artarak 8 hafta sonra operasyon öncesinin %50'sine (26.3 ± 1.3 m/s) ulaştığı bildirilmektedir [105-106]. Bıyık kaslarına ulaşan hypoglossal motornöronların hızla artış gösterdiği ve iki ayın sonunda vibrisseal kasların reinnervasyonunu neredeyse tamamladığı bildirilmiştir [99]. O halde, neden HFA sonrası fonksiyonel iyileşme fasiyal-fasiyal anastomozdan daha kötüdür? Bunun muhtemel açıklaması fasiyal ve hypoglossal motornöronların farklı fizyolojik davranışlarıdır. Hypoglossal motornöronların aktivitesi solunumla düzenlenir ve bu nöronlar üst solunum yollarının açık kalmasına yardım etmelerinin yanı sıra solunumun hemostazına da katkı sağlarlar [105-106]. Bu nöronların deşarj frekansı dakikada 5.2 ± 0.6 defadır (yaklaşık 0.12 Hz) [87]. Eğer HFA sonrası bu frekans sürdürülürse n. hypoglossus'tan innerve olan mimik kasları solunumla ilgili uyarılara cevap olarak 12 saniyede bir kasılacaktır. Eksplorasyon hareketi sırasında sıçanlar bıyıklarını ileriye ve geriye doğru 7 Hz ve ek olarak tremor tarzında da 9 Hz'le hareket ettirdikleri [103] dikkate alındığında bu frekansın vibrisseal kasların orijinal siniri olan ve ritmik olarak uyarı üretmeyen n. facialis'in frekansından çok düşük olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bıyık hareketini sağlayan foliküler kasların afferentlerinin sinir devresi spontan hypoglossal motor aktivite tarafından yeterli şekilde sağlanamıyor olabilir [32]. Sonuç olarak, normal aktivitesinin altında çalışan kaslar reinnervasyonu uyaran faktörlerin salınımını sürdürüyor ve bu da kas içi dallanmayı artırıyor olabilir [72]. Bu açıklamaların HFA ve fasiyal-fasiyal anastomoz arasındaki farklılıkları açıklamada yeterli olmamasına rağmen (pharynx kaslarını innerve eden nöron havuzu çok küçüktür), göz önünde bulundurulmasının yararlı olacağını düşünüyoruz.

5.3. Lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanma ile fonksiyonel iyileşme arasındaki ilişki

Tartışılması gereken en önemli konu lezyon alanına ait morfolojik bulgular ve lezyon sonrası fonksiyonel iyileşme değerleri arasındaki çelişkilerdir. Bu çelişkinin teknik sebeplere bağlanamayacak ölçüde olduğunu düşünüyoruz. Aksine, uygulanan metodun güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği birçok çalışmada kanıtlanmıştır [6, 31, 48, 111]. Çoklu retrograd işaretleme tekniği yıllar önce tanımlanmış ve kollateral aksonal dallanma ve yanlış yönlendirilmenin düzeltilmesini sağlayacak etkili yolların bulunmasını amaçlayan çalışmalarda kullanılmıştır [6, 31, 48, 111]. Aynı şekilde fonksiyonların biyometrik analiz metodu da birçok çalışmada kullanılmıştır [56, 117]. Mevcut sonuçlar, reinnervasyonla ilgili

deneysel çalışmalarda yapı ve fonksiyonların eş zamanlı olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

Literatür taramaları bu tür kombine çalışmaların kas innervasyon araştırmaları alanında kuraldan çok bir istisna olduğunu göstermektedir [71, 83, 96, 122, 135]. Fonksiyonel iyileşmeyi sınırlayan mekanizmalar hakkındaki mevcut bilgiler birbirleriyle nedensel olarak hiç bir zaman ilişkilendirilmemiş yapısal ve fonksiyonel olarak çalışılmış olayların, birbirinden bağımsız olarak analitik karşılaştırılması üzerine kurulmuştur. Fonksiyonel iyileştirmeyi sınırladığı varsayılan faktörlerin üzerinde yeni deneysel yaklaşımların planlanması gereklidir.

Rejenere olan aksonların yanlış hedefe yönleneceği kesilen aksonların kollateral dallanması ve kollateral dalların farklı sinir fasikülleri içinde rastgele yönelmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [24, 90]. Sonuç olarak, bu çalışmada da gösterildiği gibi kasların miyotopik organizasyonu nucleus nervi hypoglossi'de de kaybolur. Hypoglossal nükleustaki motor nöronlardan bazıları doğru hedeflerle, bazıları yanlış hedeflerle veya bazıları da her iki hedefle de temas kurarlar (*Tablo 4.1*). Bu anatomik bulguların mantıksal sonucu koordineli kas hareketlerinin yok olabileceğidir. Yanlış reinnerve olan motor nöronlar iyileşme sağlanana kadar yanlış hedeflere yanlış zamanlamayla uyarılar gönderecektir. Bu varsayım çok kabul görmektedir ve aksonal yanlış yönleneceğinin düzeltilmesi, tedaviye yönelik araştırmaların ana hedefidir [23, 78].

Çalışmamızın sonuçları yanlış yönlenecek reinnervasyon olayının bir parçası olan kollateral aksonal dallanmanın önemini sorgulamaktadır. HFA Y tüp grubunda dallanmamış motornöron oranının yaklaşık %90; buna karşılık HFA koaptasyon grubunda %80 olarak tespit edilmesine karşın %10'luk fark oranında fonksiyonlar üzerinde pozitif bir etki saptanamamıştır.

Daha önce ters yapı-fonksiyon ilişkisi Sprague-Dawley türü kör sıçanlarda fasiyal-fasiyal anastomoz yaklaşımı kullanılarak gözlenmiştir [117]. Bu tip hayvanlarda görme yeteneği düzgün sıçanlarda olduğu gibi hedef reinnervasyonunun zayıflığı ve yoğun kollateral dallanma retrograd işaretleme metodu ile gösterilmiştir. Ancak video tabanlı hareket analiz sonuçları kör sıçanlarda vibrissal hareketlerin iyileşmesinin neredeyse mükemmel olduğunu göstermektedir. Benzer çelişkiler siyatik siniri onarmak amacıyla farklı tüpler kullanan ve sinir kesisi sonrası sıçanda lokomotor aktivite ve reinnervasyon doğruluğunu çalışan Valero-Cabre ve Navarro tarafından da gözlenmiştir [122]. Bu çalışmamızın sonucunda da fonksiyonel düzelme ile kollateral aksonal dallanmanın azalması arasında bir bağlantının olmadığı söylenebilir.

Aksonal yanlış yönleneceğinin ikincil öneme sahip olduğunu varsayan çalışmalar motor ünitenin fizyolojisini ve plastisitesini birçok açıdan göz önünde bulundurmalıdır. Günlük aktivite sırasındaki kas kullanımı hareket sırasında bu kası innerve eden motor nöronların göreceli olarak az bir kısmının aktivasyonunu gerektirir [58]. Bunun yanı sıra motor aktivite, normal koşullar altında farklı hücre havuzlarının kullanımına izin veren, birçok devre tarafından kontrol edilir. Motor

nöronların iki değişken faz aktivitesi vardır. Örneğin, bir eklemden ritmik hareketleri sağlamak için antagonist kasların innerve edilmesinin yanında, aynı grup hücrelerin eklemi sabitlerken agonist kasların eş zamanlı aktivitesini gerektirir. Buna ilaveten, kas tendon transferi yapılan hastalarda olduğu gibi motor çekirdekdeki hücreler yeni fonksiyonel kullanımlar için eğitilebilirler [46, 64, 131]. İnsanda tek bir motor ünitenin iyileşmesi feedback EMG çalışmalarıyla belirtilen, azalan kontrol mekanizmalarıyla değiştirilebilir [47]. Bu düşünce temelinde hacim olarak küçültülmüş fakat doğru projekte olan motornöron havuzunun fizyolojik olarak yeterli kas kasılmasının kontrolünde daha etkili olacağı speküle edilebilir. Anormal innervasyona sahip hücrelerin aktiviteleri spinal refleks mekanizmaları ve supraspinal kontrol devreleri tarafından azaltılabilir veya değiştirilebilir. Çalışmamızdan elde edilen bulguların 4 ay ile sınırlı olması nedeniyle tespit ettiğimiz fonksiyon bozukluğunun, yukarıda tarif edilen mekanizmalar sayesinde ileriki dönemlerde düzeltilebileceği kanısındayız. Bu sebeple daha uzun takip süresini içeren çalışmaların planlanması gerektiği düşüncesindeyiz.

5.4. Periferik sinir onarımı sonrası fonksiyonel iyileşmedeki zayıflığın genel sebepleri

Kas liflerinin devamlı bir şekilde poliinnerve edilmesi fonksiyonel iyileşmeyi sınırlı kılan faktörlerden biridir [10, 39, 41, 44, 100, 114, 121]. Rejenere olan aksonlar hedeflerine giderken birçok yanlış hedefi innerve etmek üzere fazladan filizlenmeler (terminal veya kasiçi) gösterirler ve dolayısıyla yeni ve daha geniş motor üniteler oluştururlar [107]. Motor son plakların birden fazla motor nöron tarafından (poliinnerve) reinnervasyonu, senkronize olmayan kas hareketlerine neden olur [18, 97].

Normal gelişim sırasında tek bir kas lifine ait motor son plakların farklı nöronlar tarafından innerve edilmesi geçici bir durumdur. Buna karşın, reinnervasyon sonrası oluşan polinöronal innervasyon sinir-kas temasının sağlanmasından sonra uzun süre kalıcıdır [18, 34, 43, 63, 66, 77, 97]. Bu kalıcı anormal innervasyonun zararlı olup olmadığı veya ne derece zararlı olduğu konusunda bir araştırma literatürde bildirilmemiştir. Genel mantık kuralları iki veya daha fazla motor sinir lifi tarafından innerve edilen ve dolayısıyla senkronize olmayan kas liflerinin performansının fizyolojik olarak avantajlı olamayacağını düşündürmektedir. Çalışmamızda, hedef kas olarak LLS'nin innervasyon paterni araştırıldı. Kas içi aksonal dallanmanın sebep olduğu normal dışı yoğun sinir ağı ve yaklaşık %25 poliinnerve motor son plak varlığı, kasın hipernörotizasyonu olarak kabul edildi.

Fonksiyonel iyileşmeyi sınırlayan bir diğer faktör de denervasyon ve ardından innervasyon sonrası dolaşımda, kas kitlesinde ve bağ dokusunda oluşan değişikliklerdir. Tam denervasyon sonrası uzun dönemde kasın membran özellikleri de değişir ve göreceli olarak elektriksel uyarılara duyarsız hale gelir [101]. Hastalarda tam denervasyon sonrası oluşacak olan rejenerasyon için hareket etme potansiyeline sahip bir kas bırakmak ve bu amaçla kasın içerisindeki fibrozisi en aza indirmenin önemli olduğu kanısındayız.

5.5. Denerve kasın tedavisi için yeni stratejiler

Periferik sinir hasarı sonrası fonksiyonların geri kazanılması ve denerve kasın tedavisi için, onarıcı cerrahi ve rehabilitasyon en önemli iki faktördür [73]. Bu amaçla, elektriksel uyarmı tartışma konusudur [2]. Kasın elektriksel uyarmı ile kesilen sinirin elektriksel uyarmı arasındaki farkın birbirinden ayrılması önemlidir. Örneğin, kesilmiş n. femoralis'in proksimal ucunun elektriksel uyarmının aksonal rejenerasyonu özellikle ilk fazda hızlandırdığı ve yanlış reinnervasyonu azalttığı bildirilmektedir [1, 22]. Denerve m. soleus'un elektriksel uyarmının kas içi dallanmayı ve motor son plak poliinnervasyonunu azaltmasından dolayı faydalı olduğu da gösterilmiştir [72]. Öte yandan, tam denerve kas liflerinin sürekli elektriksel uyarmının motor son plak üretimi için gerekli olan kimyasal sinyalleri baskıladığı ve aynı zamanda denerve kas liflerinin kendi elektriksel aktivitelerini düşürdüğü için zararlı etkiler gösterdiği ve buna ek olarak elektriksel uyarmı kaynaklı fibrilasyonun sağlam motor sinirlerin de filizlenmesini uyardığı vurgulanmaktadır [28]. Elektriksel uyarmı, istemli kasların aşırı kullanımını uyarmakta ve denerve kas liflerinin reinnervasyonu için gerekli kimyasal araçların baskılanmasına da sebep olmaktadır Elektriksel uyarmı bu yüzden yüz felcinin tedavisinde kullanılan bir metot değildir. Henüz mekanizması bilinmemesine rağmen, akustik nöroma, Bell paralizi, Ramsey-Hunt sendromu, fasiyal sinir anastomozu sonrasında fonksiyonel iyileşmeyi sağlamak için daha doğal bir yaklaşım olan ve "fasiyal yeniden eğitime" olarak isimlendirilen yeni bir metot tanımlanmıştır [9, 123]. Fasiyal ve hypoglossal sinirlerin kortikal temsil alanlarının yakın olması sebebiyle "fasiyal yeniden eğitime" adlı metot doğrultusunda hypoglossal sinirin fasiyal sinir fonksiyonlarını yeniden öğrenmesi ve böylece fonksiyonel iyileşmenin erken bir dönemde oluşabileceğini düşünmekteyiz. Klinik kullanımı sık olan ve çalışmamıza temel oluşturan bu modelin ileride yapılacak çalışmalarda daha detaylı bir şekilde araştırılması gerektiğini düşünüyoruz.

SONUÇLAR

Hypoglossal-fasiyal anastomozun Y tüp kullanılarak yapılması sonucunda aksonal yol bulmada önemli bir düzelme olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebi de lezyon alanındaki kollateral aksonal dallanmadaki azalmadır. Ancak, aksonal dallanmadaki bu azalma vibrisseal kıl hareketlerinde bir iyileşmeye sebep olmamıştır. Bunun muhtemel sebebi de Y tüp uygulamasının, sinir kesisi sonrası motor son plakların polinöronal reinnervasyonunu azaltmada etkisiz kalmasıdır.

Ayrıca, MS'nin daha önceki çalışmalarda da gösterilen hypoglossal-fasiyal koaptasyon sonrası oluşan vibrisseal fonksiyon bozukluklarını düzeltici etkisi de literatür bilgilerine uymaktadır. Ancak, MS'nin bu etkisinin HFA'nın Y tüp kullanılarak yapılması ardından ortadan kalktığı saptanmıştır.

Bütün bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; morfolojik ve fonksiyonel iyileşmeyi engelleyen temel mekanizmaların aydınlatılması ve yeni tedavi stratejilerinin ortaya çıkarılması gerekliliği önem kazanmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1 Al-Majed, A.A., et al., Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci*, 2000. 20(7): p. 2602-8.
- 2 Angelov, D.N., et al., Mechanical stimulation of paralyzed vibrissal muscles following facial nerve injury in adult rat promotes full recovery of whisking. *Neurobiol Dis*, 2007. 26(1): p. 229-42.
- 3 Angelov, D.N., et al., Recovery of original nerve supply after hypoglossal-facial anastomosis causes permanent motor hyperinnervation of the whisker-pad muscles in the rat. *J Comp Neurol*, 1993. 338(2): p. 214-24.
- 4 Angelov, D.N., et al., Axonal Branching and Recovery of Coordinated Muscle Activity after Transection of the Facial Nerve in Adult Rats, in *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*, F.F. Beck, et al., Editors. 2005, Springer Verlag: Berlin Heidelberg. p. 3-25.
- 5 Angelov, D.N., et al., Nimodipine accelerates axonal sprouting after surgical repair of rat facial nerve. *J Neurosci*, 1996. 16(3): p. 1041-8.
- 6 Angelov, D.N., et al., Contralateral trigeminal nerve lesion reduces polyneuronal muscle innervation after facial nerve repair in rats. *Eur J Neurosci*, 1999. 11(4): p. 1369-78.
- 7 Anonsen, C.K., et al., Assessment of facial reinnervation by use of chronic electromyographic monitoring. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1986. 94(1): p. 32-6.
- 8 Baker, R.S., et al., Aberrant reinnervation of facial musculature in a subhuman primate: a correlative analysis of eyelid kinematics, muscle synkinesis, and motoneuron localization. *Neurology*, 1994. 44(11): p. 2165-73.
- 9 Barbara, M., et al., Early rehabilitation of facial nerve deficit after acoustic neuroma surgery. *Acta Otolaryngol*, 2003. 123(8): p. 932-5.
- 10 Barry, J.A. and R.R. Ribchester, Persistent polyneuronal innervation in partially denervated rat muscle after reinnervation and recovery from prolonged nerve conduction block. *J Neurosci*, 1995. 15(10): p. 6327-39.
- 11 Bascom, D.A., et al., Facial nerve repair: a retrospective review. *Facial Plast Surg*, 2000. 16(4): p. 309-13.

- 12 Battiston, B., et al., Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery*, 2005. 25(4): p. 258-67.
- 13 Berg, R.W. and D. Kleinfeld, Rhythmic whisking by rat: retraction as well as protraction of the vibrissae is under active muscular control. *J Neurophysiol*, 2003. 89(1): p. 104-17.
- 14 Bermejo, R., et al., Conditioned whisking in the rat. *Somatosens Mot Res*, 1996. 13(3-4): p. 225-33.
- 15 Beurskens, The functional rehabilitation of facial muscles and facial expression., ed. D. Castro. 1990, Amsterdam: Kugler Publications. 509–511.
- 16 Bischoff, A., et al., Manual stimulation of the orbicularis oculi muscle improves eyelid closure after facial nerve injury in adult rats. *Muscle Nerve*, 2009. 39(2): p. 197-205.
- 17 Bratzlavsky, M. and H. vander Eecken, Altered synaptic organization in facial nucleus following facial nerve regeneration: an electrophysiological study in man. *Ann Neurol*, 1977. 2(1): p. 71-3.
- 18 Brown, M.C., et al., An assessment of the spread of the signal for terminal sprouting within and between muscles. *Brain Res*, 1981. 210(1-2): p. 145-51.
- 19 Brushart, T.M., Neurotropism and neurotrophism. *J Hand Surg Am*, 1987. 12(5 Pt 1): p. 808-9.
- 20 Brushart, T.M., Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *J Neurosci*, 1988. 8(3): p. 1026-31.
- 21 Brushart, T.M., et al., Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *J Neurosci*, 1998. 18(21): p. 8674-81.
- 22 Brushart, T.M., et al., Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci*, 2002. 22(15): p. 6631-8.
- 23 Brushart, T.M. and M.M. Mesulam, Alteration in connections between muscle and anterior horn motoneurons after peripheral nerve repair. *Science*, 1980. 208(4444): p. 603-5.
- 24 Brushart, T.M. and W.A.t. Seiler, Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol*, 1987. 97(2): p. 289-300.

- 25 Büngner, O., Ueber die Degenerations- und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen. *Beitr pathol Anat allg Pathol.* , 1891. 10: p. 21-393.
- 26 Carvell, G.E. and D.J. Simons, Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci*, 1990. 10(8): p. 2638-48.
- 27 Chen, Y.S., et al., Histological rearrangement in the facial nerve and central nuclei following immediate and delayed hypoglossal-facial nerve anastomosis. *Acta Otolaryngol*, 2000. 120(4): p. 551-6.
- 28 Cohan, C.S. and S.B. Kater, Suppression of neurite elongation and growth cone motility by electrical activity. *Science*, 1986. 232(4758): p. 1638-40.
- 29 Conley, J. and D.C. Baker, Hypoglossal-facial nerve anastomosis for reinnervation of the paralyzed face. *Plast Reconstr Surg*, 1979. 63(1): p. 63-72.
- 30 Coulson, S.E., Physiotherapy rehabilitation following facial nerve paresis, in *The Facial Palsies. Complementary Approaches*, C.H.G. Beurskens, et al., Editors. 2005, Lemma Publishers: Utrecht. p. 263-74.
- 31 Dohm, S., et al., Local application of extracellular matrix proteins fails to reduce the number of axonal branches after varying reconstructive surgery on rat facial nerve. *Restor Neurol Neurosci*, 2000. 16(2): p. 117-126.
- 32 Dorfl, J., The musculature of the mystacial vibrissae of the white mouse. *J Anat*, 1982. 135(Pt 1): p. 147-54.
- 33 Dorfl, J., The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat*, 1985. 142: p. 173-84.
- 34 Esslen, E., Electromyographic findings on two types of misdirection of regenerating axons. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1960. 12: p. 738-41.
- 35 Fansa, H., et al., Successful implantation of Schwann cells in acellular muscles. *J Reconstr Microsurg*, 1999. 15(1): p. 61-5.
- 36 Fansa, H., et al., Tissue Engineering of Peripheral Nerves: A Comparison of Venous and Acellular Muscle Grafts with Cultured Schwann Cells. *Plast Reconstr Surg*, 2001. 107(2): p. 495-496.
- 37 Fansa, H., et al., Influence of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on nerve autografts and tissue-engineered nerve grafts. *Muscle Nerve*, 2002. 26(1): p. 87-93.

- 38 Forssman, J., Über den Ursachen, welche die Wachstumsrichtung der peripheren Nerven fasern bei der Regeneration bestimmen. Beitr Pathol Anat., 1898. 24: p. 55.
- 39 Friede, R.L. and R. Bischhausen, The precise geometry of large internodes. J Neurol Sci, 1980. 48(3): p. 367-81.
- 40 Gharabaghi, A., et al., Hirnnervenausfälle durch ungewöhnliche Schädelbasisläsionen des Sinus cavernosus. Hno, 2007. 55(4): p. 278-80.
- 41 Gorio, A., et al., Muscle reinnervation--II. Sprouting, synapse formation and repression. Neuroscience, 1983. 8(3): p. 403-16.
- 42 Graeber, M.B., K. Bise, and P. Mehraein, Synaptic stripping in the human facial nucleus. Acta Neuropathol, 1993. 86(2): p. 179-81.
- 43 Grant, G.A., et al., Delayed facial palsy after resection of vestibular schwannoma. J Neurosurg, 2002. 97(1): p. 93-6.
- 44 Grimby, G., et al., Muscle adaptive changes in post-polio subjects. Scand J Rehabil Med, 1989. 21(1): p. 19-26.
- 45 Grosheva, M., et al., Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation does not improve quality of muscle reinnervation or recovery of motor function after facial nerve transection in rats. Biol Chem, 2008. 389(7): p. 873-88.
- 46 Gruart, A., et al., Motoneuron adaptability to new motor tasks following two types of facial-facial anastomosis in cats. Brain, 2003. 126(Pt 1): p. 115-33.
- 47 Guntinas-Lichius, O., The facial nerve in the presence of a head and neck neoplasm: assessment and outcome after surgical management. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. 12(2): p. 133-41.
- 48 Guntinas-Lichius, O., et al., Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. Exp Neurol, 2001. 172(1): p. 70-80.
- 49 Guntinas-Lichius, O., et al., Manual stimulation of facial muscles improves functional recovery after hypoglossal-facial anastomosis and interpositional nerve grafting of the facial nerve in adult rats. Neurobiol Dis, 2007. 28(1): p. 101-12.
- 50 Guntinas-Lichius, O., et al., Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. Eur J Neurosci, 2005. 21(2): p. 391-402.

- 51 Guntinas-Lichius, O., et al., Simplified nerve cell counting in the rat brainstem with the physical disector using a drawing-microscope. *J Microsc*, 1993. 172(Pt 2): p. 177-80.
- 52 Guntinas-Lichius, O., et al., Differences in glial, synaptic and motoneuron responses in the facial nucleus of the rat brainstem following facial nerve resection and nerve suture reanastomosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1994. 251(7): p. 410-7.
- 53 Guntinas-Lichius, O., et al., Quantitative image analysis of the chromatolysis in rat facial and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell Tissue Res*, 1996. 286(3): p. 537-41.
- 54 Guntinas-Lichius, O., et al., Effect of delayed facial-facial nerve suture on facial nerve regeneration. A horseradish peroxidase tracing study in the rat. *Acta Otolaryngol*, 1997. 117(5): p. 670-4.
- 55 Guntinas-Lichius, O., M. Streppel, and E. Stennert, Postoperative functional evaluation of different reanimation techniques for facial nerve repair. *Am J Surg*, 2006. 191(1): p. 61-7.
- 56 Guntinas-Lichius, O., et al., Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *J Neurosci*, 2002. 22(16): p. 7121-31.
- 57 Hammerschlag, P.E., Facial reanimation with jump interpositional graft hypoglossal facial anastomosis and hypoglossal facial anastomosis: evolution in management of facial paralysis. *Laryngoscope*, 1999. 109(2 Pt 2 Suppl 90): p. 1-23.
- 58 Hennig, R. and T. Lomo, Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature*, 1985. 314(6007): p. 164-6.
- 59 Hizay, A., et al., Use of a Y-tube conduit after facial nerve injury reduces collateral axonal branching at the lesion site but neither reduces polyinnervation of motor endplates nor improves functional recovery. *Neurosurgery*, 2012. 70(6): p. 1544-56; discussion 1556.
- 60 Hudson, T.W., G.R. Evans, and C.E. Schmidt, Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Orthop Clin North Am*, 2000. 31(3): p. 485-98.
- 61 Hundeshagen, G., Effect of mechanical stimulation of the vibrissal muscles on the recovery of whisking after hypoglossal-facial nerve anastomosis (HFA) in adult rats., in *Department of Anatomy*. 2006, University of Cologne: Cologne.

- 62 Hwang, K., S.G. Kim, and D.J. Kim, Facial-hypoglossal nerve anastomosis using laser nerve welding. *J Craniofac Surg*, 2006. 17(4): p. 687-91.
- 63 Ijkema-Paassen, J., M.F. Meek, and A. Gramsbergen, Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve*, 2002. 25(6): p. 891-7.
- 64 Illert, M., et al., Forearm muscles of man can reverse their function after tendon transfers: an electromyographic study. *Neurosci Lett*, 1986. 67(2): p. 129-34.
- 65 Ito, M. and M. Kudo, Reinnervation by axon collaterals from single facial motoneurons to multiple muscle targets following axotomy in the adult guinea pig. *Acta Anat (Basel)*, 1994. 151(2): p. 124-30.
- 66 Jergovic, D., et al., Changes in a rat facial muscle after facial nerve injury and repair. *Muscle Nerve*, 2001. 24(9): p. 1202-12.
- 67 Johnson, E.O. and P.N. Soucacos, Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. *Injury*, 2008. 39 Suppl 3: p. S30-6.
- 68 Kerrebijn, J.D. and J.L. Freeman, Facial nerve reconstruction: outcome and failures. *J Otolaryngol*, 1998. 27(4): p. 183-6.
- 69 Komisaruk, B.R., Synchrony between limbic system theta activity and rhythmical behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol*, 1970. 70(3): p. 482-92.
- 70 Kunihiro, T., K. Higashino, and J. Kanzaki, Classic hypoglossal-facial nerve anastomosis after acoustic neuroma resection. A review of 46 cases. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2003. 65(1): p. 1-6.
- 71 Li, Y., P. Decherchi, and G. Raisman, Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J Neurosci*, 2003. 23(3): p. 727-31.
- 72 Love, F.M., Y.J. Son, and W.J. Thompson, Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J Neurobiol*, 2003. 54(4): p. 566-76.
- 73 Lundborg, G., Richard P. Bunge memorial lecture. Nerve injury and repair--a challenge to the plastic brain. *J Peripher Nerv Syst*, 2003. 8(4): p. 209-26.

- 74 Lundborg, G., et al., Tissue specificity in nerve regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg*, 1986. 20(3): p. 279-83.
- 75 Lundborg, G., et al., Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early results from a prospective, randomized, clinical study. *J Hand Surg Am*, 1997. 22(1): p. 99-106.
- 76 Mackinnon, S.E., et al., A study of neurotrophism in a primate model. *J Hand Surg Am*, 1986. 11(6): p. 888-94.
- 77 Mackinnon, S.E., A.L. Dellon, and J.P. O'Brien, Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve*, 1991. 14(11): p. 1116-22.
- 78 Madison, R.D., et al., Factors contributing to preferential motor reinnervation in the primate peripheral nervous system. *J Neurosci*, 1999. 19(24): p. 11007-16.
- 79 Manni, J.J., et al., Reanimation of the paralyzed face by indirect hypoglossal-facial nerve anastomosis. *Am J Surg*, 2001. 182(3): p. 268-73.
- 80 Martins, R.S., et al., Influence of Suture on Peripheral Nerve Regeneration and Collagen Production at the Site of Neurorrhaphy: An Experimental Study. *Neurosurgery*, 2010.
- 81 May, M. and B.M. Schaitkin, *The facial nerve*. Second ed. 2000, New York: Thieme. 551-633.
- 82 May, M., S.M. Sobol, and S.J. Mester, Hypoglossal-facial nerve interpositional-jump graft for facial reanimation without tongue atrophy. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1991. 104(6): p. 818-25.
- 83 Merkler, D., et al., Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J Neurosci*, 2001. 21(10): p. 3665-73.
- 84 Miehke, A., [Reconstruction of function in vocal cord paralysis. Round table discussion]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*, 1986. 65(1): p. 1-4.
- 85 Montserrat, L. and M. Benito, Facial synkinesis and aberrant regeneration of facial nerve. *Adv Neurol*, 1988. 49: p. 211-24.
- 86 Moran, C.J. and J.G. Neely, Patterns of facial nerve synkinesis. *Laryngoscope*, 1996. 106(12 Pt 1): p. 1491-6.
- 87 Morin, D., R. Monteau, and G. Hilaire, Compared effects of serotonin on cervical and hypoglossal inspiratory activities: an in vitro study in the newborn rat. *J Physiol*, 1992. 451: p. 605-29.

- 88 Naff, N.J. and J.M. Ecklund, History of peripheral nerve surgery techniques. *Neurosurg Clin N Am*, 2001. 12(1): p. 197-209, x.
- 89 Neiss, W.F., et al., The hypoglossal-facial anastomosis as model of neuronal plasticity in the rat. *Ann Anat*, 1992. 174(5): p. 419-33.
- 90 Nguyen, Q.T., J.R. Sanes, and J.W. Lichtman, Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci*, 2002. 5(9): p. 861-7.
- 91 Ochi, M., et al., Experimental evidence of selective axonal regeneration in allogenic and isogenic Y-chambers. *Exp Neurol*, 1992. 115(2): p. 260-5.
- 92 Ochi, M., et al., Further experimental evidence of selective nerve regeneration in aortic Y-chambers. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 1994. 28(2): p. 137-41.
- 93 Ozsoy, U., et al., The hypoglossal-facial nerve repair as a method to improve recovery of motor function after facial nerve injury. . *Ann Anat*, 2011. 193(4): p. 304-313.
- 94 Politis, M.J., Specificity in mammalian peripheral nerve regeneration at the level of the nerve trunk. *Brain Res*, 1985. 328(2): p. 271-6.
- 95 Politis, M.J., K. Ederle, and P.S. Spencer, Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res*, 1982. 253(1-2): p. 1-12.
- 96 Ramon-Cueto, A., et al., Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*, 2000. 25(2): p. 425-35.
- 97 Rich, M.M. and J.W. Lichtman, In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. *J Neurosci*, 1989. 9(5): p. 1781-805.
- 98 Sadjadpour, K., Postfacial palsy phenomena: faulty nerve regeneration or ephaptic transmission? *Brain Res*, 1975. 95(2-3): p. 403-6.
- 99 Schneider, i., Development of the nerve conduction velocity after hypoglossal–facial nerve anastomosis: an electro-neurographic study. *Eur. Arch. Oto-rhino-laryngol*, 1994. Suppl. S (1994): p. 392.
- 100 Schröder, J.M., Die Hyperneurotisation Büngnerscher Bänder bei der experimentallen Isoniazid Neuropathie: Phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Virchows Arch. Abt*, 1968. B1 (1968): p. 131-156.

- 101 Schwarting, S., et al., Morphology of denervated human facial muscles. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 1984. 46(5): p. 248-56.
- 102 Seckel, B.R., et al., Target-specific nerve regeneration through a nerve guide in the rat. Plast Reconstr Surg, 1986. 78(6): p. 793-800.
- 103 Semba, K. and M.D. Egger, The facial "motor" nerve of the rat: control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. J Comp Neurol, 1986. 247(2): p. 144-58.
- 104 Semba, K., H. Szechtman, and B.R. Komisaruk, Synchrony among rhythmical facial tremor, neocortical 'alpha' waves, and thalamic non-sensory neuronal bursts in intact awake rats. Brain Res, 1980. 195(2): p. 281-98.
- 105 Skouras, E. and D.N. Angelov, Experimental studies on post-transectional facial nerve regrowth and functional recovery of paralyzed muscles of the face in rats and mice. Anatomy 2010. 4: p. 1-27.
- 106 Skouras, E., et al., Intrinsic and therapeutic factors determining the recovery of motor function after peripheral nerve transection. Ann Anat, 2011. 193(4): p. 286-303.
- 107 Son, Y.J., J.T. Trachtenberg, and W.J. Thompson, Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. Trends Neurosci, 1996. 19(7): p. 280-5.
- 108 Sood, S., et al., Hypoglossal-facial nerve anastomosis: assessment of clinical results and patient benefit for facial nerve palsy following acoustic neuroma excision. Clin Otolaryngol Allied Sci, 2000. 25(3): p. 219-26.
- 109 Stennert, E., I. Hypoglossal facial anastomosis: its significance for modern facial surgery. II. Combined approach in extratemporal facial nerve reconstruction. Clin Plast Surg, 1979. 6(3): p. 471-86.
- 110 Stennert, E., Limberg, C.H., Central connections between fifth, seventh, and twelfth cranial nerves and their clinical significance., in Disorders of the Facial Nerve, M.D. Graham, House, W.F., Editor. 1982, Raven Press: New York. p. 57-65.
- 111 Streppel, M., et al., Focal application of neutralizing antibodies to soluble neurotrophic factors reduces collateral axonal branching after peripheral nerve lesion. Eur J Neurosci, 2002. 15(8): p. 1327-42.
- 112 Sumner, A.J., Aberrant reinnervation. Muscle Nerve, 1990. 13(9): p. 801-3.

- 113 Sun, K., et al., Three-dimensional reconstruction and visualization of the median nerve from serial tissue sections. *Microsurgery*, 2009. 29(7): p. 573-7.
- 114 Tam, S.L. and T. Gordon, Mechanisms controlling axonal sprouting at the neuromuscular junction. *J Neurocytol*, 2003. 32(5-8): p. 961-74.
- 115 Tankere, F., et al., Hypoglossal-facial nerve anastomosis: dynamic insight into the cross-innervation phenomenon. *Neurology*, 2003. 61(5): p. 693-5.
- 116 Tankere, F., et al., [The hypoglossal-facial anastomosis in man. A model for studying peripheral and central nervous system plasticity]. *Rev Med Liege*, 2004. 59 Suppl 1: p. 91-103.
- 117 Tomov, T.L., et al., An example of neural plasticity evoked by putative behavioral demand and early use of vibrissal hairs after facial nerve transection. *Exp Neurol*, 2002. 178(2): p. 207-18.
- 118 Tos, P., et al., Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. *Microsurgery*, 2000. 20(2): p. 65-71.
- 119 Tos, P., et al., Comparison of fresh and predegenerated muscle-vein-combined guides for the repair of rat median nerve. *Microsurgery*, 2007. 27(1): p. 48-55.
- 120 Tos, P., et al., Use of muscle-vein-combined Y-chambers for repair of multiple nerve lesions: experimental results. *Microsurgery*, 2004. 24(6): p. 459-64.
- 121 Trojan, D.A., D. Gendron, and N.R. Cashman, Electrophysiology and electrodiagnosis of the post-polio motor unit. *Orthopedics*, 1991. 14(12): p. 1353-61.
- 122 Valero-Cabre, A. and X. Navarro, Changes in crossed spinal reflexes after peripheral nerve injury and repair. *J Neurophysiol*, 2002. 87(4): p. 1763-71.
- 123 VanSwearingen, J.M. and J.S. Brach, Changes in facial movement and synkinesis with facial neuromuscular reeducation. *Plast Reconstr Surg*, 2003. 111(7): p. 2370-5.
- 124 Vleggeert-Lankamp, C.L., et al., Type grouping in skeletal muscles after experimental reinnervation: another explanation. *Eur J Neurosci*, 2005. 21(5): p. 1249-56.

- 125 Watson, W.E., An autoradiographic study of the incorporation of nucleic-acid precursors by neurones and glia during nerve regeneration. *J Physiol*, 1965. 180(4): p. 741-53.
- 126 Weiss, p., The technology of nerve regeneration: a review of sutureless tubulation and related methods of nerve repair. *J Neurosurg*, 1944. 1(6): p. 400.
- 127 Weiss, P. and A. Hoag, Competitive reinnervation of rat muscles by their own and foreign nerves. *J Neurophysiol*, 1946. 9: p. 413-8.
- 128 Weiss, P. and A. Taylor, Histomechanical analysis of nerve reunion in the rat after tubular splicing. *Arch Surg*, 1943. 47(5): p. 419-447.
- 129 Weiss, P. and A. Taylor, Further experimental evidence against "neurotropism" in nerve regeneration. . *J Exp Zoology*, 1944. 95(2): p. 233-257.
- 130 Welker, W.I., Analysis of sniffing of the albino rat. *Behaviour*, 1964. 22: p. 223-244.
- 131 Wiedemann, E., et al., [Functional electromyography analysis of radial replacement operation]. *Orthopade*, 1997. 26(8): p. 673-83.
- 132 Williams, L.R., Rat aorta isografts possess nerve regeneration-promoting properties in silicone Y chambers. *Exp Neurol*, 1987. 97(3): p. 555-63.
- 133 Wineski, L.E., Facial morphology and vibrissal movement in the golden hamster. *J Morphol*, 1985. 183(2): p. 199-217.
- 134 Witzel, C., C. Rohde, and T.M. Brushart, Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *J Comp Neurol*, 2005. 485(3): p. 183-90.
- 135 Z'Graggen, W.J., et al., Functional recovery and enhanced corticofugal plasticity after unilateral pyramidal tract lesion and blockade of myelin-associated neurite growth inhibitors in adult rats. *J Neurosci*, 1998. 18(12): p. 4744-57.

ÖZGEÇMİŞ

Umut ÖZSOY 02.07.1979 tarihinde Erzurum’da doğdu. İlköğrenimini Erzurum Aliravi İlkokulunda tamamladı. 1997 yılında Erzurum Anadolu Lisesin’den mezun oldu. Lisans öğrenimini 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü’nde tamamladı. 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde Anatomi yüksek Lisans Eğitime başladı ve “Dennerve ve innerve böbrekte organın iskemi reperfüzyon hasarına cevabı” konulu tezini 2006 yılında bitirerek aynı yıl Doktora eğitimine başladı. 2010-2011 yılları arasında kazandığı TUBİTAK bursuyla doktora tez çalışmalarını yapmak üzere Federal Almanya Cumhuriyeti Köln üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Enstitüsü’nde çalıştı. Halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı’nda Araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır