

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PERİFERİK SİNİR DEFEKTLERİNİN TEDAVİSİNDE
ALLOJEN DAMAR GREFTİ İÇERİSİNE PRP VE
HYALURONİK ASİT ENJEKSİYONLARININ SİNİR
REJENERASYONUNDAKİ ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ahmet Hamdi AYTEKİN
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Cemal FIRAT**

MALATYA – 2014

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PERİFERİK SİNİR DEFİKTLERİNİN TEDAVİSİNDE
ALLOJEN DAMAR GREFTİ İÇERİSİNE PRP VE
HYALURONİK ASİT ENJEKSİYONLARININ SİNİR
REJENERASYONUNDAKİ ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ahmet Hamdi AYTEKİN
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Cemal FIRAT**

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın yapılabilmesinde ve eğitimim her aşamasında her türlü bilgi, tecrübe ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Cemal Fırat'a, ihtisasım boyunca maddi ve manevi olarak desteklerini esirgemeyen bölüm başkanımız Prof.Dr. Bilge Türk Bilen'e, mesleki ve bilimsel yönden kendilerine çok şey borçlu olduğum hocalarım Sayın Prof.Dr. Hıdır Kılınç ve Sayın Prof.Dr. Yusuf Kenan Çoban'a,

Patoloji Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Adile Ferda Dağlı'ya, aynı klinikte çalışmaktan dolayı her zaman gurur duyduğum, iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olan Yrd.Doç.Dr.Serkan Erbatur'a, Yrd.Doç.Dr.Yılmaz Geyik'e ve Dr. Göçmen Aslan'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca benden sevgi ve dualarını eksik etmeyen anneme, babama ve eşime bir kez daha

Teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Tarihçe	3
2.2. Periferik Sinir Anatomisi	4
2.2.1. Sinir Hücresi (Nöron).....	6
2.2.2. Akson	7
2.2.3. Aksonal İletim.....	8
2.2.4. Schwann Hücreleri ve Myelin Kılıf.....	8
2.2.5. Bağ Doku Yapısı	9
2.2.6. Sinir Vasküler Yapısı	11
2.3. Periferik Sinir Yaralanmaları.....	14
2.3.1. Seddon Sınıflaması	16
2.3.2. Sunderland Sınıflaması	17
2.4. Sinir Dejenerasyonu Ve Rejenerasyonu	18
2.4.1. Sinir Hücre Gövdesi	18
2.4.2. Proksimal Segment	21
2.4.3. Distal Segment.....	22
2.5. Sinir Konduitleri	23

2.5.1. Otolog Doku Greftleri	25
2.5.1.1. Sinir Greftleri	25
2.5.1.2. Ven Greftleri	25
2.5.1.3. Kas Greftleri	26
2.5.1.4. Epinöral Kılıf.....	27
2.5.1.5. Tendon Greftleri	27
2.5.1.6. Mezotelyal Çember	27
2.5.2. Nonotolog /Asellüler Greftler	28
2.5.2.1. İnce Barsak Mukozası	29
2.5.2.2. Amnion Tüp.....	30
2.5.3. Sentetik Olmayan Moleküllerden Oluşan Materyaller.....	30
2.6. Sinir İyileşmesinde Mikroçevrenin Restorasyonu Ve Büyüme Faktörlerinin Etkileri	31
2.6.1. Sinir İyileşmesinde Makrofaj ve Schwann Hücrelerinin Rolü.....	31
2.6.2. Sinir İyileşmesinde Nörotrofik Faktörlerin Rolü.....	33
2.6.2.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF).....	34
2.6.2.2. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF).....	35
2.6.2.3. Nörotrofin-3 (NT-3)	35
2.6.2.4. Nörotrofin-4/5 (NT-4/5)	36
2.6.2.5. Nörotrofin-6 (NT-6)	36
2.6.2.6. Silier Nörotrofik Faktör (CNTF).....	36
2.6.2.7. Lökemi İnhibitör Faktör (LIF)	37
2.6.2.8. Glia Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF)	37
2.6.3. Schwann Hücre İmplantasyonu.....	38
2.7. Trombositten Zengin Plazma (TZP)	38
2.7.1. Trombositler	39

2.7.2. Trombositlerde Bulunan Büyüme Faktörleri	42
2.7.2.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	42
2.7.2.2. "Transforming" Büyüme Faktör- β (TGF- β)	43
2.7.2.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I (IGF-I).....	45
2.7.2.4. Fibroblast Büyüme Faktörü 1 ve 2 (FGF-1 ve FGF-2)	46
2.7.2.5. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	47
2.7.2.6. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	48
2.7.3. TZIP Hazırlanışı	49
2.7.4. TZIP Çalışma Prensipleri	50
2.7.5. Trombosit Zengin Plazmanın Kullanım Alanları	51
2.7.5.1 Maksillofasial Ve Periodontal Cerrahi.....	51
2.7.5.2. Oküler Cerrahi.....	52
2.7.5.3 Estetik Cerrahi.....	52
2.7.5.4. Rekonstrüktif Cerrahi.....	52
2.7.5.6. By-pass Cerrahisi	53
2.8. Hyaluronik Asit (HA).....	53
2.8.1. Eksojen Uygulanan Hyaluronik Asidin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi....	53
2.9. Rat Siyatik Sinir Anatomisi	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM	57
4. BULGULAR.....	65
5. TARTIŞMA	96
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	105
7. ÖZET	107
8. SUMMARY	109
9. KAYNAKLAR.....	111

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1: Trombosit granüllerinin içerikleri.....	41
Tablo 2: Siyatik fonksiyon indeksinin hesaplanmasında kullanılan yürüme şablonu.....	62
Tablo 3: Bain-Mackinnon-Hunter siyatik fonksiyon indeksi formülü.....	62
Tablo 4: Deneklerin Siyatik Fonksiyon indeks (SFi) değerleri.....	65
Tablo 5: Gruplar arasında_ortalama SFi değerlerinin karşılaştırılması.....	66
Tablo 6: Deneklerin latans değerleri(ms).....	67
Tablo 7: Deneklerin amplitüt değerleri(mv).....	68
Tablo 8: Gruplar arasında ortalama latans değerlerinin karşılaştırılması.....	69
Tablo 9: Gruplar arasında ortalama amplitüd değerlerinin karşılaştırılması... 69	
Tablo 10: Deneklerin Miyelinizasyon Oranları (Miyelinli akson yok = 0, Nadir miyelinli akson=1,Seyrek, düzensiz, ince miyelinli akson = 2, Sık, düzenli, kalın miyelinli akson=3).....	70
Tablo 11: Deneklerin Fibrozis Oranları (Fibrozis yok = 0, Hafif fibrozis=1, Orta derecede fibrozis = 2, Ağır fibrozis =3).....	71
Tablo 12: Deneklerin Ödem Miktarları (Ödem yok = 0, Hafif ödem=1, Orta derecede ödem = 2, Yaygın ödem =3).....	72
Tablo 13: Deneklerin Mast Hücre Yoğunluğu (Mast Hücresi yok = 0, 1-2 mast hücresi =1, 3-4 mast hücresi = 2, 5 ve daha fazla mast hücresi =3).....	73
Tablo 14: Proksimal Anastomoz Ortalama Myelinizasyon Değerleri.....	78
Tablo 15: Proksimal Anastomoz Ortalama Fibrozis Değerleri.....	79
Tablo 16: Proksimal Anastomoz Ortalama Ödem Değerleri.....	80
Tablo 17: Proksimal Anastomoz Ortalama Mast Hücre Yoğunluğu Değerleri. 81	
Tablo 18: Deneklerin Greft Myelinizasyon Oranları.....	85
Tablo 19: Deneklerin Greft Fibrozis Oranları	86
Tablo 20: Deneklerin Greft Ödem Oranları	87
Tablo 21: Deneklerin Greft Mast Hücre Yoğunluğu Oranları	88
Tablo 22 : Deneklerin Distal Anastomoz Distali Myelinizasyon Oranları.....	92
Tablo 23 : Deneklerin Distal Anastomoz Distali Fibrozis Oranları.....	93
Tablo 24 : Deneklerin Distal Anastomoz Distali Ödem Oranları.....	94
Tablo 25 : Deneklerin Distal Anastomoz Distali Mast Hücre Oranları.....	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Normal periferik sinir anatomisi.....	5
Şekil 2: Nöronların uzantılarına göre sınıflandırılması	7
Şekil 3: Periferik sinir bağ doku yapısı.....	10
Şekil 4: Periferik sinir vasküler yapısı	13
Şekil 5: Periferik sinir yaralanmalarında Mackinnon tarafından önerilen Sunderland sınıflandırmasının şematik görünümü.....	15
Şekil 6: Periferik sinir dejenerasyon ve rejenerasyonu.....	20
Şekil 7: Santrifüj işlemi yapıldıktan sonra kanın tabakalara ayrılmış halinin şematik görünümü.....	50
Şekil 8: Rat siyatik sinir anatomisi.....	56

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Sadece otogreft ile yapılan onarım.....	58
Resim 2: Allojen aorta greftinin defekte adaptasyonu.....	59
Resim 3: Allojen aorta grefti içerisine HA enjeksiyonu.....	59
Resim 4: Allojen aorta greftine PRP enjeksiyonu.....	60
Resim 5: FosfotungstikAsit-Hematoksilen (PTAH) X50, Mason Trichrom X50, Giemsa X20.....	74
Resim 6: A: PTAH X50, B: Mason Trichrom X50, C: Giemsa X20.....	75
Resim 7: PTAH X50, Mason Trichrom X50, Giemsa X20.....	76
Resim 8: PTAH X20, Mason Trichrom X50, Giemsa X20.....	77
Resim 9: PTAH X12.6, Mason Trichrom X12.6, Giemsa X25.2.....	82
Resim 10: PTAH X12.6, Mason Trichrom X12.6, Giemsa X25.2.....	83
Resim 11: PTAH X12.6, Mason trichrom X12.6, Giemsa X25.2.....	84
Resim 12: PTAH X12.6, Mason trichrom X12.6, Giemsa X25.2.....	89
Resim 13: PTAH X12.6, Mason Trichrom X12.6, Giemsa X25.2.....	90
Resim 14: PTAH X12.6, Mason Trichrom X12.6, Giemsa X25.2.....	91

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

NGF	: Nerve Growth Factor
ILGF	: İnsülin- Like Growth Factor
MAG	: Miyelin İlişkili Glikoprotein
EMG	: Elektromiyografi
TEM	: Transmission Elektron Mikroskop
CNTF	: Ciliary Neurotrphic Factor
BDNF	: Brain Derived Neurotrphic Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
TGF	: Tümör Growth Factor
PGA	: Poliglikolik asit
SFİ	: Siyatik Fonksiyon İndeksi
PL	: Print Length
TS	: Toe Spread
IT	: Intermediate Toe Spread
IL-1	: İnterleukin-1
PRP	: Trombositten Zengin Plazma (Platelet Rich Plasma)
HA	: Hyalüronik Asit
PTAH	: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen
Mv	: Milivolt
Mm	: Milimetre
v.b	: ve benzeri
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Sigma
μ	: Mikro

1. GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmaları genellikle mekanik, kimyasal, termal ve patolojik nedenlere bağlı olarak meydana gelir ve bu yaralanmaların tedavisi günümüzde halen önemli bir sorun teşkil etmektedir. Sinir yaralanmalarından sonra istenilen fonksiyonel sonuçların elde edilmesi amacıyla bir çok klinik ve deneysel çalışma yapılmaktadır. Bu amaçla geliştirilen mikroenstrumanlar, kondüit tüpler, rejenerasyonu arttıran büyüme stimülatörleri gibi mikrocerrahi yöntemlerin yanı sıra moleküler biyolojideki gelişmeler periferik sinir onarımında başarı oranını arttırmıştır.

Herhangi bir nedenle periferik sinir yaralanması sonrası meydana gelen anormal rejenerasyon veya sinir dokusundaki tam olmayan iyileşme fonksiyon kaybı ve ağrı ile sonuçlanacağından sinir bütünlüğünün sağlanması, böylece duyu veya motor fonksiyonların geri kazanılması tedavideki esas amaçtır.

Periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde temel prensip, skar veya fibrotik dokuların eksize edilip, proksimal ve distal sinir uçlarının tazelenmesi ve gerginlik olmayacak şekilde nörotrofik faktörlerin de onarım hattında korunduğu uç uca koaptasyon yöntemidir. Primer onarımın mümkün olmadığı sinir defektlerinde ise altın standard otogreft olmakla birlikte, skar, nöroma ve donör alanda denervasyon gibi istenmeyen sonuçlar görülebilmektedir. Primer ve otogreftler ile yapılan sinir onarımlarının, fonksiyonel sonuçlarını arttırmak ve morbiditeyi azaltmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Bu amaçla primer sinir onarımında anastomoz hattına topikal olarak sinir büyüme faktörü (NGF) gibi çeşitli nörotrofik faktörler (1), mitomisin C (2),

aprotinin (3), tiroid hormonu (4), insan amnion sıvısı (5), hyaluronik asit (6,7) ve trombositten zengin plazma (8) gibi bir çok ajan denenmiştir.

Bunlardan trombositten zengin plazma (PRP), son yıllarda klinik kullanıma giren ve özellikle kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri nedeniyle maksillofasiyal cerrahide geniş kullanım alanı bulan biyolojik bir üründür. Çok sayıda büyüme faktörü içerdiği bilinen bu ürün, trombositlerin yoğunlaştırılması ve içerisindeki büyüme faktörlerini salgılamaları için aktive edilmeleri esasına dayanmaktadır (9). İçerdiği çok sayıda büyüme faktöründen özellikle PDGF, FGF, VEGF ve IGF-I'in sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (10)

Bir diğer popüler ajan ise Hyalüronik asittir (HA). Skar dokusunu önleyici etkisi nedeniyle gerek klinik gerekse deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır. HA, yumuşak bağ dokusunun ekstrasellüler matriksinde ve insanda sinoviyal sıvılarda bol miktarda bulunan, doğrusal tek zincirli glikozaminoglikan polimeridir. HA'in lenfositlerin migrasyonu, proliferasyonu ve kemotaksisini azaltması, granülositlerin fagositozu ve makrofaj motilitesi üzerine inhibe edici etkileri nedeniyle topikal HA uygulamasının periferik sinir onarım hattında oluşacak epinöral ve ekstranöral skar formasyonunu önleyerek sinir rejenerasyonunu kolaylaştıracağı düşünülmektedir (11,12).

Bu çalışmada, yüksek oranda büyüme faktörü içeriğine sahip olan trombositten zengin plazmanın (PRP) ve skar oluşumunu azaltarak sinir rejenerasyonuna olumlu yönde etkilerinin olduğu bilinen hyalüronik asitin otogreftle onarılmış periferik sinir defektlerinde sinir rejenerasyonuna etkilerinin histopatolojik ve fonksiyonel yöntemler ile değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Periferik sinir sistemine ait ilk tanımlamalar Hippokrat'a (MÖ 460–370) ait olmasına karşın, periferik sinir yaralanmaları üzerine ilk çalışmaları Galen (MS 130–200) yaparak, bazı sinirlerin kesilmesi sonrası his duyusunda, bazılarında ise kas gücünde azalma olduğunu saptamıştır. Periferik sinir sutürasyonuna ait ilk kayıtlar 13. yüzyılda William Saliceto'ya aittir. Sinir sistemi ile ilgili detaylı bilgiler ise 16. ve 17. yüzyıllardan sonra elde edilmeye başlamıştır. Glisson (1597–1677) uyarılabilir doğalarını keşfetmiş, Van Leewenhoek (1632–1723) ise mikroskopik yapılarını tanımlamıştır. Fontana (1730–1805) akson ve myelin kılıfyapısını detaylandırmıştır. Fonksiyonel yapıya yönelik en erken çalışmalardan biri Galvani'ye (1737–1798) aittir. Galvani yaptığı kurbağa deneylerinde, sinir liflerinin elektrik stimülasyonuna yanıt verdiğini saptamıştır. Anatomik organizasyonlarının ve sinir hücreleri ile ilgili detayların tanımlanması, 18. Yüzyılın başlarında Bell, Magendie, Remark ve Von Purkinje gibi çeşitli araştırmacılar ile sağlanmıştır. Schwann isimli araştırmacı 1839'da Schwann hücresini tanımlayarak kendi adını vermiştir (13).

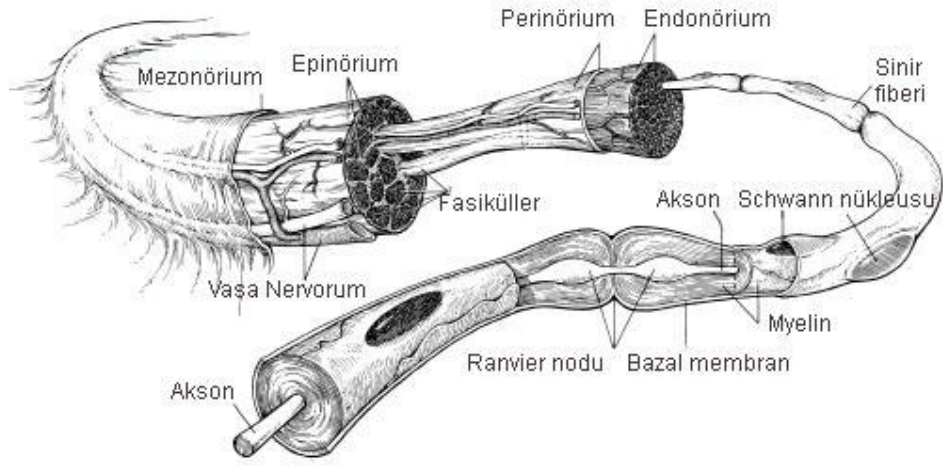
Sinirin primer onarımı ile ilgili en erken kayıtlardan biri Paget'ye aittir. Paget, 1847 yılında 11 yaşında bir hastanın median sinir kesisini primer onarmış ve fonksiyonel geri dönüşün tam olduğunu göstermiştir (18). Waller, 1850 yılında sinir hasarını anlamaya yönelik çalışmalar yapmış ve bu çalışmalar sonucunda, aksonların hasar alanı distalinde dejenere, proksimalinde ise rejenere olmaya başladıklarını saptamıştır. Aynı yıllarda Bernard, kürar ile nöromüsküler blokaj konusunda yaptığı çalışmalar ile sinir iletiminin

biyokimyasal temelleri hakkında ilk bilgileri ortaya koymuştur (13). Golgi ve Cajal, 1906 yılında sinir sisteminin birbirine fonksiyonel olarak bağlı sinir hücrelerinden oluşan bir ağdan ibaret olduğunu açıklayan çalışmaları ile Nobel ödülünü almışlardır. Sherrington ise, 1906 yılında sinaps adı verilen sinir hücrelerinin fonksiyonel bağlantı noktalarını tanımlamıştır. Bir başka Nobel ödülünü ise Erlanger ve Gasser, 1944 yılında her bir sinir hücresinin ve bağlantılarının farklılaşmış fonksiyonları olduğunu tanımlayarak ve bunların fonksiyonlarını açıklayan elektrofizyolojik çalışmalar yaparak almışlardır. Bu bilgileri kullanarak 1948 yılında Hodes, Larrabee ve German isimli araştırmacılar klinikte uygulanabilir elektrofizyolojik sinir testlerini geliştirmişlerdir (13).

Periferik sinir cerrahisinde, bugün modern sinir cerrahisinin temelini oluşturan ilk bilimsel çalışmalar Seddon tarafından 1948 yılında yapılmıştır. Seddon, sinir hasar mekanizmalarının, yaralanma derecelerinin, takip ve tedavi seçeneklerinin üzerine çalışmalar yapmış ve sinir hasar derecesini belirtmek için Seddon sınıflamasını geliştirmiştir. Sunderland, 1945 ile 1968 yılları arasında yaptığı pek çok çalışmada, sinir hasar mekanizmalarını daha da detaylandırmış ve çeşitli onarım tekniklerini geliştirmiştir. Ek olarak periferik sinir internal topografik anatomisi üzerine de incelemeler yapmıştır (13). Periferik sinir cerrahisinin gelişimine, Millesi sinir onarımında gerginliğin olumsuz etkilerini vurgulayarak; Terzis ise tedavi tekniklerini geliştirip çeşitlendirerek önemli katkılarda bulunmuşlardır (13).

2.2. Periferik Sinir Anatomisi

Periferik sinir sistemi sinir hücrelerinin, destek bağ dokunun, hücresel elemanların ve uç organların birlikte hareket ettiği karmaşık bir yapıdır. (18). (Şekil 1)

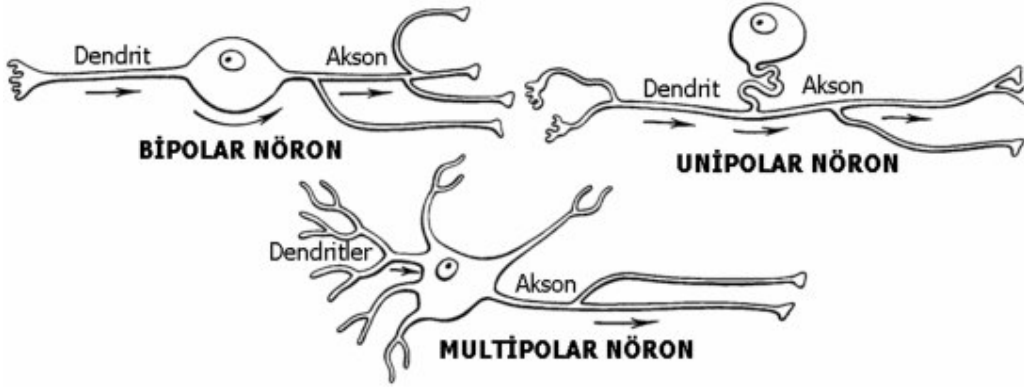


Şekil 1: Normal Periferik Sinir Anatomisi (Brandt KE, Mackinnon SE: Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery, 5th ed. Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM. (eds) Lippincott-Raven, Philadelphia s:80, 1997)

2.2.1. Sinir Hücresi (Nöron)

Sinir sistemini fonksiyonel ünitesi sinir hücresidir (nöron). Her bir sinir hücresi hücre gövdesi (perikaryon, soma), dendrit ve akson olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Motor sinirlerin hücre gövdeleri omurilik ön boynuzda, duyu sinirlerinin ise arka kök ganglionlarında yerleşiktir.

Hücre gövdesinde yerleşik reseptör fonksiyonu gören çok sayıdaki sitoplazmik çıkıntı dendrit olarak adlandırılır. Dendritler, çevreden gelen uyarıları hücre gövdesine iletirler ve nöronlar arasındaki iletişimi sağlarlar. Sinir hücrelerinin perifer ile iletişimini sağlayan uzantı ise aksondur. Sıklıkla her bir sinir hücresinin pek çok dendriti olmasına karşın, tek bir aksonu vardır. Aksonlar, orijinal hücre gövde çapının binlerce katı kadar uzunlukta perifer uzanım gösterebilirler. Sinir hücresinde metabolik olaylar, hücre gövdesinde gerçekleşir; bu nedenle sinirin fonksiyonunu yapabilmesi için, periferik aksonal uzantılar ile sinir gövdesinin devamlılık göstermesi gerekir. Aksonun gövde ile ilişkisi herhangi bir nedenle kesintiye uğrarsa, aksonda sinir fonksiyonunun devamlılığı için gereken metabolik olaylar gerçekleşemediği için, distal kısımları dejenerasyona uğrar (13,14). Her bir sinir hücresi içerisinde tek bir çekirdek ve birden fazla çekirdekçik bulunur. En belirgin sitoplazmik organeller golgi cisimcikleri ve mitokondrilerdir. Bu organeller nöronal uyarı iletiminde enerji kaynakları olarak görev yaparlar. Bazofilik Nissl cisimcikleri ve granüllü endoplazmik retikulum da gövde de mevcuttur ve bu yapılar, sinir rejenerasyonu gibi metabolik hızın arttığı durumlarda sayıca artış gösterirler (13). Nöronlar içerdikleri akson ve dendritlerin sayısı, uzunluk ve şekillerine göre unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. (Şekil 2)



Şekil 2: Nöronların uzantılarına göre sınıflandırılması (Berry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous System. Gray's Anatomy. 38th ed. Williams P.L. Churchill Livingstone, Edingburgh, s:904, 1995)

2.2.2. Akson

Hücre gövdesinden huni şeklinde bir genişleme (akson tepeciği, akson hillock) ile çıkan sinir uzantısıdır. Akson boyunca devamlılık gösteren, yüksek fosfolipid içeriği olan ve istirahat potansiyelinin devamlılığını sağlayabilecek özelliklere sahip üç katlı aksolemma adı verilen bir zarla çevrilidir (13). Hücre sitoplazmasının akson içerisindeki eş değeri aksoplazmadır. Aksoplazmada, çeşitli proteinler, hücre iskeletini oluşturan mikrotübüller ve nörofilamanlar bulunur. Bunlar yapısal bütünlüğün devamının sağlanmasında ve aksonal iletimde önem taşırlar. Aksonlar, myelinli ya da myelinsiz olabilirler. Myelin kılıf periferik sinir sisteminde Schwann hücreleri tarafından yapılır (18). Aksoplazma içerisinde mitokondri, düz endoplazmik retikulum, lizozom ve veziküller gibi organellerin bulunmasına karşın, protein sentezi yapabilen golgi cisimcikleri ya da granüllü endoplazmik retikulumlar yoktur. Bu nedenle canlılıklarını koruyabilmek için hücre gövdesi ile devamlılıklarının korunması gerekir (13). Sinirin akson terminalinde, başka bir sinir hücresi, kas ya da salgı bezi ile yaptığı bağlantıya sinaps adı verilir. Sinaps ile sinir üzerinde ilerleyen uyarı hedef organa iletilmiş olur (18).

2.2.3. Aksonal İletim

Aksonal iletim sistemi, Ca-Mg ATPaz ile sağlanan ATP'ye bağımlı bir sistemdir. Aksonal taşıma iki yönlüdür. Anterograd (somatofugal) taşıma ile sinir hücre gövdesinde sentezlenen pek çok madde farklı hızlarda akson boyunca taşınır. İki farklı hızda anterograd taşıma vardır:

1.Yavaş taşıma: 1–6 mm/gün hız ile aksonların sitoskeletal elemanları taşınır. Aktin, tübülün gibi mikrotübül proteinleri, nörofilaman ve mikrofilamanlar bu yolla taşınırlar.

2. Hızlı taşıma: Yaklaşık 400 mm/gün hız ile glikoprotein, lipid gibi hücre zarı bileşenleri, çeşitli enzimler ve nörotransmitter içeren veziküller taşınır. Retrograd (somatopedal) taşıma, akson terminalinden hücre gövdesine doğru olan taşıma sistemidir. Ortalama hız 240 mm/gün kadardır. Retrograd taşıma ile nörotransmitter veziküllerinin ve intra-aksonal proteinlerin geri dönüşümü sağlanır. Ayrıca akson terminalindeki ya da kesilmiş akson ucundaki sinir büyüme faktörü gibi nörotrofik faktörler ve herpes simpleks, polio gibi virüsler de geriye doğru taşınabilirler (13,14,15).

2.2.4. Schwann Hücreleri ve Myelin Kılıf

Schwann hücreleri, akson etrafında yer alan, iyon dengesinin sağlanmasına, nörotransmitterlerin dağılımına ve aksolomma boyunca sodyum kanallarının yerleşimine katkıda bulunan hücrelerdir. Nöroektodermal kökenli bu hücreler, periferik sinir sisteminin uydu hücreleridir ve akson çevresinde konsantrik karakterde fosfolipid bir tabaka olan myelin kılıfını sentezlerler. Myelinli ya da myelinsiz olsun, her sinir lifinde aksonlar ucuca dizilmiş Schwann hücreleri ile sarılmışlardır. Myelinli liflerde her bir Schwann hücresi tek bir aksonu çevrelerken, myelinsiz liflerde bir Schwann hücresi birden fazla aksonu çevrelemektedir. Ayrıca Schwann hücreleri tip 4 kollajen ve lamininden oluşan bir bazal membran üretirler ve bu da sinir lifini çevreler. Bu bazal membranın sinir rejenerasyonundaki rolü çok önemlidir, özellikle sinir rejenerasyonu sırasında, yeni büyümekte olan aksonal tomurcukların distal sinir güdüğüne uzanımları sırasında rehberlik görevi görür (13). Myelin yapısı diğer hücre zarlarına benzemesine karşın içeriği farklıdır. Biyokimyasal olarak %75 lipid ve %25 proteinden meydana gelir. Myelin tabaka içerisinde bulunan lipidlerin %20

ila %30'unu oluşturan kolesterol, multilamellar yapının stabilizasyonunu sağlamaktadır. Myelin içeriğindeki diğer lipidler, glikolipid yapısında olan galaktoserebrozid, sülfatid ve gangliosiddir. Myelin kılıfının %25'ini oluşturan proteinler ise glikoprotein yapısında olup; bunların başlıcaları protein zero (Po), periferik myelin protein 22 kDa (PMP) (16), myelin ilişkili glikoprotein (MAG), epiteliyal kadherin ve periaksindir (17). Büyük çaplı sinirlerin hemen hepsi myelinli iken, çapı 1 mikrometreden (μm) küçük aksonlar genellikle myelinsizdir. Memelilerde dorsal spinal köklerin ve kutanöz sinirlerin yaklaşık %75'i, kasa giden liflerin %50'si ve postganglionik otonomik liflerin tamamına yakını myelinsizdir. Myelinli aksonların da myelinsiz kısımları vardır. Bu kısımlar, iki Schwann hücresi arasında kalan bölge olan Ranvier düğümleri ve akson çıkış bölgesi olan akson tepeciğidir. Bu bölgeler sinir ileti hızı açısından önem taşır. Ranvier düğümleri, uyarının sıçrayıcı (saltatuar) şekilde iletimi ile çok hızlı taşınmasını sağlar (13,18). Bir sinirin myelinli olması aksiyon potansiyelinin iletim hızını arttırmaktadır. Myelin kılıfın kalınlığı da iletim hızını etkiler. Myelinsiz liflerde çap 0.2–1.5 μm ve iletim hızı 0.4–2.0 m/sn (metre/saniye) iken; kalın myelinli sinirlerde çap 12–20 μm ve iletim 72–120 m/sn gibi yüksek hızlardadır (18). Sinir lifleri iletim hızları ve çaplarına göre 3 gruba ayrılır (13):

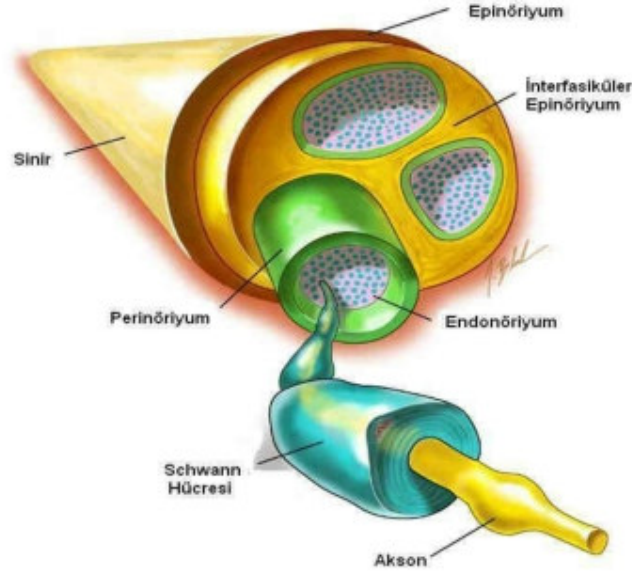
-A grubu lifler: Myelinli somatik afferent ve efferent liflerdir. Çapları 2.5–22 μm , ileti hızları 15–100 m/sn arasındadır.

- B grubu lifler: Myelinli otonomik preganglionik liflerdir. Çapları 3 μm , ileti hızları 3–15 m/sn kadardır.

-C grubu lifler: Myelinsiz somatik ve visseral afferent lifler ile postganglionik liflerdir. Çapları 0.2–1.5 μm , ileti hızları 0.3–1.6 m/sn kadardır.

2.2.5. Bağ Doku Yapısı

Periferik sinirler birbirinden bağımsız 3 farklı destek doku ile çevrelenmiştir: epinörium, perinörium, endonörium. (Şekil 3) Her bir sinir lifi, en içte endonörium denen mezoderm kaynaklı bir bağ doku ile çevrelenmiştir.



Şekil 3: Periferik sinir bağ doku yapısı

Endonöriyum, mukopolisakkarit ana madde içerisinde yer alan kollajen ve retiküler liflerden, fibroblast, makrofaj, mast hücreleri gibi hücrelerden ve kapiller sistemden oluşan bir bağ dokudur; elastin içermez ve sinir lifi boyunca uzunlamasına organize olmuştur. Endonöriyumun çevrelediği alan içerisindeki bölge sinir işlevleri için uygun bir ortam sağlar (13,15). Myelinli ve myelinsiz sinir liflerinin bir araya gelerek oluşturduğu yapı fasiküldür. Her fasikülü çevreleyen bağ dokuya perinöriyum adı verilir. Yassı perinöral hücreler tarafından oluşturulmuş çok katlı bir tabaka olup, travmalara karşı asıl koruyuculuğu üstlenir. Bu koruyucu fonksiyonun yanı sıra, kan-sinir bariyerini oluşturur. Perinöral kılıf sinirin distaline doğru gidildikçe incelik ve en distalde hücre tabakası tek kat kalır. Perinöriyum, epinöral damarlar ile endonöral damarları birleştiren anastomotik arteriol ve venüllerle delinir (15). Kan-sinir bariyeri, perinöral hücreler ile endonöriyumdaki endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı noktalarından meydana gelir. Bu bariyer, endonöriyum içindeki aksonal çevre ile vücuttaki ekstrasellüler boşluğu ayıran bir difüzyon bariyeri olup, aksonlar için uygun fizikokimyasal mikroçevreyi sağlar. Travmaya ve iskemiye karşı oldukça

dirençlidir. Bu bariyer bir şekilde zarar görürse, periferik sinir sistemi zararlı maddelere karşı savunmasız kalır ve endonöral ödem gelişir. Ezilme tarzı sinir yaralanmalarında kan-sinir bariyerinin bozulduğu ve yaklaşık yedinci günde aşamalı olarak tekrar düzeldiği gözlenmiştir (18). Sinir kılıfının en dış tabakası epinöriumdur.

Epinörium tip 1 ve tip 3 kollajen liflerden, elastik liflerden, fibroblastlardan ve değişen oranlarda yağ dokudan meydana gelir. Esas görevi, fasikülleri ekstremitelerin hareketi esnasında travmalara karşı korumaktır. Bu nedenle özellikle eklem bölgelerinde oldukça kalındır (14,15). Fonksiyonel olarak epinörium iki tabakadan oluşur. Derin tabaka internal (interfasiküler) epinörium olup, fasikülleri tek tek sarar ve bunları gevşek şekilde bir arada tutar. Eksternal (epifasiküler) epinörium, en dışta yer alan ve fasiküllerin üzerinden kolaylıkla sıyrılabilen bağ doku yapısıdır. Epinöriumun kalınlığı kişiden kişiye, sinirden sinire ve sinir kesitinin alındığı bölgeye göre kesit alanının %25-%75'i arasında değişir. Ekstremitelerde yüzeysel seyreden ya da eklemleri geçen sinir kısımlarında bağ doku daha kalındır, bunun nedeni de tekrarlayan travmalara karşı koruyuculuğu arttırmaktır (13,15). Epinöriumda sinirin beslenmesini sağlayan vasküler bir ağ bulunmaktadır. Lenfatik yapılar da yine bu tabaka içinde uzanır (13).

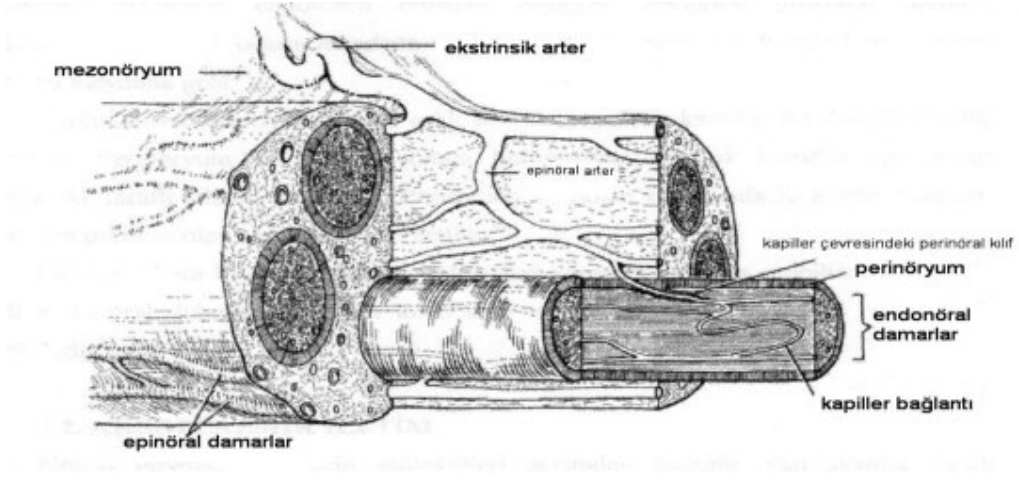
2.2.6. Sinir Vasküler Yapısı

Periferik sinirlerin vasküler yapısı ile ilgili detaylar, 1878 yılında Ranvier ve 1890 yılında Quenu ile Lejars isimli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. İnsanların çeşitli sinirlerinde vasküler yapıların detayları, Sunderland tarafından incelenmiştir. Vital mikroskopik yöntemlerin günümüzde gelişmesi ile deneysel hayvan modellerinde, in vivo olarak intranöral mikrovasküler yapının ve fonksiyonlarının incelenmesi mümkün olmuştur (19). Sinir hücrelerinde, normal fonksiyonların devamlılığının sağlanabilmesi için yeterli oksijen desteği ile aerobik metabolizmalarının korunması önem taşır. Periferik sinirlerde uyarı iletimi ve aksonal taşıma için gerekli olan enerji, epinörium, perinörium ve endonörium tabakalarında bulunan ve birbiri ile yakın bağlantılı olan bir vasküler ağ sayesinde sağlanır (20). (Şekil 4) Periferik sinirlerde oldukça zengin bir damarlanma mevcuttur. Ekstrensik ve intrensik

olmak üzere, birbiriyle bütünleşmiş olarak çalışan, ancak fonksiyonel olarak birbirinden bağımsız iki ayrı sistem bulunmaktadır. Ekstrensik sistem, sinirin dış yüzeyindeki gevşek bağ doku içerisinde bulunan damarlardan oluşur. Bu bölgeye vaza nervorum denir ve bu dallar mezonörium denen gevşek bağ doku kılıfı içerisinde uzanırlar. Vaza nervorumlar sinirlere yandaş seyreden damarlardan gelen besleyici dallardan oluşur. Ayrıca kasa giden perforan damarlar ve periosteal damarlar da bu sisteme katkıda bulunurlar. Bu sistem sempatik uyarılar ve lokal ilaçlardan etkilenir. Mezonöriumda uzunlamasına seyreden damarlar mezonöriyumu yer yer delerek, intrinsik sistemle anastomozlar yaparlar. İntrensik sistem, epinörium, perinörium ve endonörium içerisinde yer alan vasküler pleksuslardan meydana gelir. Bu sistem metabolik olaylardan, sempatik uyarılardan ve lokal ilaçlardan etkilenmez. Bu iki sistem arasındaki dengeleyici bazı mekanizmalar, siniri vasküler problemlere karşı korur (13,14,19,20). Epinöriumun derin ve yüzeysel katları içerisinde uzanım gösteren epinöral damarlar, her fasiküle besleyici dallar gönderirken, değişik seviyelerde perinöral vasküler pleksuslarla da anastomozlar yaparlar. Uzunlamasına seyreden perinöral damarlar, birçok alanda oblik olarak perinöriumun iç tabakasını delerek endonöral aralığa geçerler ve endonöral vasküler pleksusu oluştururlar. Endonöral vasküler yatak, fasiküller boyunca devamlı anastomotik ağlar oluşturur ve bu sayede sabit bir fasiküler kan akımı sağlanır. Bu bölgedeki dolaşım, perinöriumun daha dış tabakalarında geçerli olan sempatik innervasyonun aksine, lokal perfüzyon basıncı ile dengede tutulmaktadır (14, 15, 20). Periferik sinirlerdeki damarlar, sinüzoidal ve kıvrımlı bir yapıya sahiptirler. Bu sinüzoidal ve kıvrımlı yapısal özellikleri sayesinde, vasküler sistem gerilme tipi travmalarda hasardan korunur (13, 15, 20).

Periferik sinirlerde klasik bir lenfatik sistem yoktur; ancak perinörium dışında ve endonörium içinde lenfatiklere benzer taşıma görevi yapan kanalların olduğu bilinmektedir. Endonöral boşlukta klasik bir lenfatik sistem olmadığı için, travma sonrasında oluşan ödem erken dönemde fasikül içerisindeki basıncı arttırarak, sinirin normal fonksiyonunun devamı için gereken mikroçevreyi bozar. İleri evrede ise fibrozis ve skar oluşumu ile problem yaratır. Normalde endonöral damarlar geçirgen değildir, ancak travma sonucu

geçirgenliklerinin artması ile oluşan endonöral ödem, yine endonöral mikrodolaşım ile temizlenir (19).

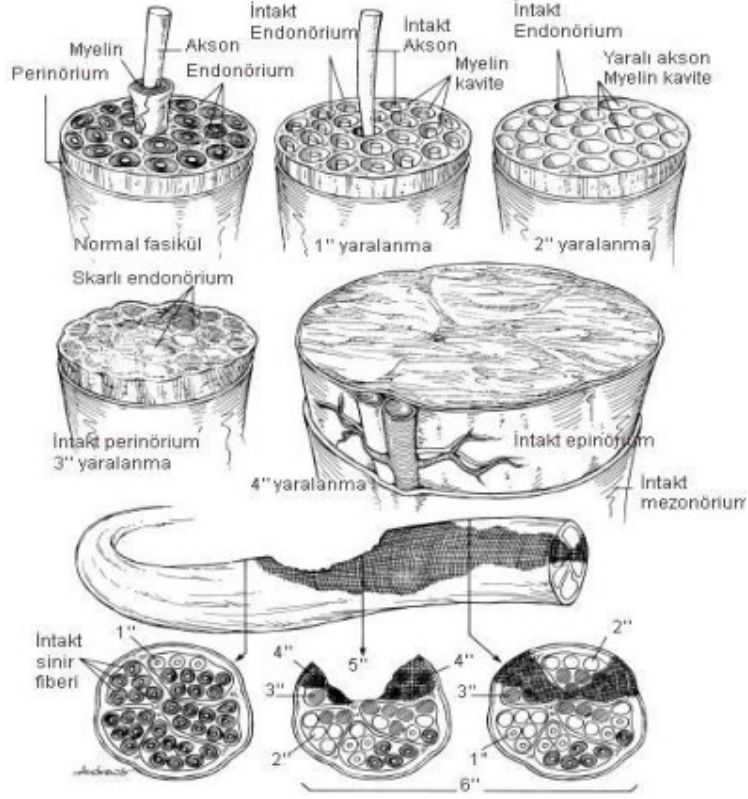


Şekil 4: Periferik sinir vasküler yapısı

2.3. Periferik Sinir Yaralanmaları

Periferik sinirler pek çok değişik travma şekli ile yaralanabilirler. Periferik sinir hasarına neden olan en sık yaralanma şekli, gerilim tipi yaralanmalardır. Periferik sinirler, kollajen içeren endonöriyumları sayesinde belli bir elastikiyete sahiptirler; ancak traksiyon kuvveti sinirin esneme kapasitesini aşarsa bu tip hasar meydana gelir. İkinci sıklıkta laserasyonlar gelir ve bu tip yaralanma sıklıkla bıçak gibi penetran bir aletle oluşur. Tam kesi oluşabileceği gibi, sıklıkla sinir elemanlarından bazılarında devamlılığın korunduğu tarzda görülür. Kompresyon tipi yaralanmalar ise yine sık görülür. Sinir devamlılığının korunmuş olmasına karşın, hem duyu hem de motor kayıp oluşabilir. Patofizyolojisi tam açıklanamamıştır, ancak muhtemel mekanizma mekanik kompresyon sonucunda oluşan iskemidir (21).

Yaralanma şekli ne olursa olsun, oluşan sinir hasarının onarımı ve fonksiyonların tam geri kazanımı cerrahi bir problem olmaya devam etmektedir. Travmanın şeklinin yanı sıra, sinir içyapısında oluşan hasar derecesi de elde edilecek iyileşme düzeyi ile yakın ilişkilidir (14, 22). Periferik sinir yaralanmaları ile ilgili ilk sınıflama, Seddon tarafından 1948 yılında yapılmıştır. Bu sınıflamada 3 tip sinir hasarı tanımlanmıştır: nöropraksi, aksonotimezis, nörotimezis. Sunderland, 1951 yılında bu sınıflamayı detaylandırarak, 1 ile 5 arasında değişen 5 grup sinir yaralanma tipi tanımlamıştır. 1988 yılında Mackinnon birkaç tip sinir hasarını bir arada içeren 6. Derece sinir hasarını bu sınıflamaya dahil etmiştir (13,15). (Şekil 5)



Şekil 5: Periferik sinir yaralanmalarında Mackinnon tarafından önerilen Sunderland sınıflandırmasının şematik görünümü

2.3.1. Seddon Sınıflaması

Nöropraksi: Geçici segmental iletim bloğu ile karakterize olup, anatomi bütünlük ve aksonal devamlılık korunmuştur (31). Spontan iyileşir ve iyileşme tam olur, ancak iyileşme zamanı 5 gün ila 3 ay arasında değişir (ortalama 6–8 hafta). Histolojik olarak en sık demyelinizasyon görülür (15). Sinir yapısı ve yaralanma distalindeki kasların uyarılabilirliği korunduğu için dejenerasyon görülmez (14). Geçici kompresyon, traksiyon ve künt travma ile oluşabilir. Örnek olarak turnike paralizi ve cumartesi gecesi paralizi (Saturday night palsy) gösterilebilir. Aksonal bir hasar olmadığı için, sinir tomurcuklanmasını (rejenerasyonu) gösteren Tinel bulgusu yoktur (15).

Aksonotomezis: Ciddi kompresyon veya gerilim tipi yaralanmalarda, aksonal devamlılıkta bozulma oluşabilir. Sadece myelin kılıf ve akson devamlılığında bir kesinti vardır; Schwann hücreleri bazal membranı, endonörium, perinörium ve epinörium sağlamdır. Böyle bir yaralanma sonrası eğer sinir hücresi ölmezse, lezyon seviyesi distalinde Wallerian dejenerasyon, proksimalinde ise aksonal tomurcuklanma görülür. Endonöral doku ve bazal membran, Schwann hücreleri için kılavuz tüp görevi görerek prolifer olmalarını sağlar (23) Destek bağ dokular sağlam olduğu için prognoz iyidir ve fonksiyonel geri dönüş tamdır. İyileşme süresi hastanın yaşına, uç organa, lezyon ile uç organ arası mesafeye ve rejenerasyon hızına bağlı olarak değişmektedir. Rejenerasyon günde 1–2 mm hızla olur, ancak iyileşme süresince uyarılmayan kaslarda denervasyon atrofi gelişebilir (13,23). Endonöral kılıf bütünlüğü korunduğu için aksonlarda yanlış yöne büyüme olmaz. Spontan rejenerasyon beklenen bu tip yaralanmada Tinel bulgusu vardır ve aksonal rejenerasyon ilerledikçe, bu bulgu da distale doğru ilerler (15).

Nörotomezis: En ciddi yaralanmalardır. Anatomik olarak sinirde ciddi bir hasar vardır. Distalde daha fazla olmak üzere, hem distalde hem de proksimalde dejenerasyon vardır. Sinir elemanlarının bazılarının ya da tamamının devamlılığı bozulmuştur. Endonörium, perinörium ve epinörium hasarlanmıştır. Sunderland bu gruptaki lezyonları, kılıfların katılımlarına göre 3., 4., 5. tip hasarlar olmak üzere ayrı ayrı sınıflamıştır. Spontan rejenerasyon

mümkün olmadığı için cerrahi onarım şarttır (13,14). Lezyon distalinde denervasyona bağlı tüm fonksiyonlarda kayıp izlenir. Etiyolojik faktör tam kat bir kesi olabileceği gibi, iletimi engelleyen ya da siniri infiltre eden bir tümör veya skar dokusu da olabilir. Sinir devamlılığı bazı durumlarda görülebilirse de, sinirin iç yapısındaki bozulma nedeniyle sinirde fonksiyon yoktur. Sinir fasikülünün iç yapısı, aksonlardaki yıkım ve Wallerian dejenerasyon nedeniyle bozulur. Endonöral kılıf bütünlüğü de çeşitli derecelerde bozulur ve ek olarak kanama, ödem, inflamatuvar reaksiyonlar sonucu fibrozis kaçınılmaz hale gelir (24).

2.3.2. Sunderland Sınıflaması

1. derece hasar: Seddon sınıflamasındaki nöropraksiye eşdeğerdir. Akson ve sinir kılıf yapıları sağlamdır; ancak travma alanındaki sinir segmentinde iletim kaybı ve demyelinizasyon vardır. Spontan iyileşir (15, 24).

2. derece hasar: Seddon sınıflamasında aksonotimezise karşılık gelir. Sinir kılıf yapıları sağlamdır; ancak akson bütünlüğü kesintiye uğramıştır. Distal segmentte Wallerian dejenerasyon gelişir. Schwann hücre bazal membranı ve endonöral kılıf sağlam olduğu için prognoz iyidir ve spontan iyileşir (15).

3. derece hasar: Epinöriyum ve perinöriyum sağlamdır, ancak Schwann hücre kılıfı, endonöriyum ve akson devamlılığı bozulmuştur. Akson distalinde Wallerian dejenerasyon izlenir. Endonöriyum ve Schwann hücre kılıfı hasarlandığı için iyileşme tam olmaz (15,24). Bu grup yaralanmalar Seddon sınıflamasındaki aksonotimezis ve nörotimezisin bir karışımı olarak kabul edilirler. İlimli bir 3. derece hasar intrafasiküler alanda minimal fibrozis ve iyi derecede rejenerasyonla iyileşebilir ki, bu tarz lezyonlar aksonotimezise karşılık gelir. Buna karşın şiddetli bir 3. derece hasarda, rejenerasyonu engelleyecek şekilde fibrozis oluşabileceği için, böyle bir yaralanma nörotimezis olarak kabul edilir. Rejenerasyon, ayda yaklaşık 1 cm ilerler ve bu klinikte ilerleyen Tinel bulgusu ile takip edilebilir. Rejenerasyon sırasında nörom oluşumu ya da motor ve duyu liflerin yanlış eşleşmeleri kötü fonksiyonel sonuçlara neden olabilir (13, 24).

4. derece hasar: Epinöriyum dışındaki tüm tabakaların devamlılığı bozulmuştur. Fiziksel olarak sinir bütünlüğü devam etmekle birlikte, oluşacak skar dokusunun yaratacağı blok sinir rejenerasyonunu engeller ve hasar

bölgesinde nörinom oluşumuna neden olur. Spontan iyileşme görülebilmemesine karşın oldukça nadir olduğu için cerrahi onarım önerilir. Bu tip hasarlanmada, hasarlı kısmın eksize edilerek sinir uçlarına cerrahi olarak ucuca suture edilmeleri gerekir (13,24). Tinel bulgusu hasar bölgesinde mevcuttur, ancak rejenerasyon skar dokusu ile engellendiğinden distale ilerlemez. Lezyon distalinde Wallerian dejenerasyon vardır. Bu tip hasar sıklıkla gerilim, traksiyon, ezilme, koter yaralanması veya sinire yapılan yanlış enjeksiyon sonucu meydana gelir (15).

5. derece hasar: Epinörium da dahil sinir devamlılığı tam olarak kaybolmuştur ve cerrahi onarım şarttır. Cerrahi onarım olmaksızın iyileşme mümkün değildir. Sıklıkla penetran travmalar ile meydana gelir (13,15). Mackinnon bu sınıflamaya 6. Derece sinir hasarı şeklinde bir ekleme yapmıştır. Mikst tip sinir hasarı denen bu grupta, sinir boyunca değişik seviyelerde ve farklı derecelerde sinir hasarları bir aradadır. Özellikle ezici tip yaralanmalarla meydana gelir. Bazı fasiküller normaldir, bazılarında spontan iyileşme beklenir, ancak 4. ve 5. Derecede hasarlanmış fasiküllerde rejenerasyon mümkün değildir. Tedavisinde intranöral nöroliz ile sağlam fasiküllere zarar vermeden, 4. ve 5. Derece hasarlı fasiküllerin cerrahi onarımları gerekir (15).

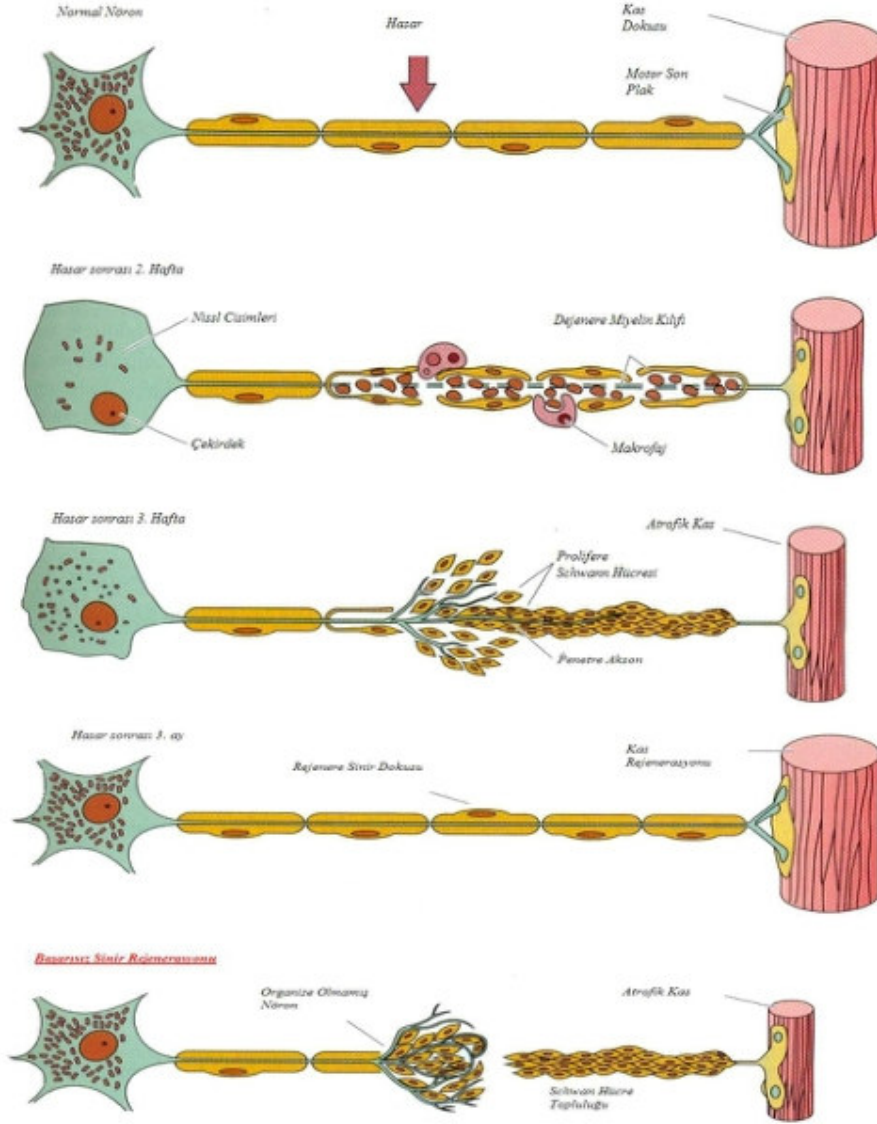
2.4. Sinir Dejenerasyonu Ve Rejenerasyonu

Sinir yaralanması sonrası klinik olarak iyileşme sıklıkla tam olmaz ve en sık zayıf ya da anormal duyu, motor fonksiyonlarda kayıp, soğuk intoleransı, ağrı gibi hastanın sosyal hayatını ve iş hayatını etkileyen olumsuz belirtilerle seyreder (24). Periferik sinir yaralanmalarında, yaralanma bölgesinin yanı sıra, yaralanma bölgesinin proksimalinde, distalinde ve sinir hücresinin gövdesinde bir takım yapısal ve işlevsel değişiklikler meydana gelir. Hasar distalindeki tüm myelinli veya myelinsiz lifler Wallerian dejenerasyona uğrar (25)

2.4.1. Sinir Hücre Gövdesi

Aksonal yaralanma sonrasında, altı saat içerisinde sinir hücre gövdesinde hacim artar, hücre çekirdeği perifere doğru yer değiştirir, nissl cisimcikleri ve granüllü endoplazmik retikulumlar yıkılır ve sitoplazmanın yapısı değişir. Bu değişikliklerin tümüne birden 'kromatoliz' denir. Bu reaksiyonel değişiklikler hasar sonrası 2 ila 3. Haftalarda en yüksek değerine ulaşır. Bu

değişikliklerin amacı kaybolan aksoplazmik hacmi yerine koyabilmektir. RNA içeren yapılarda, protein sentezindeki hızlanmayı yansıtacak şekilde bir artış olur (14, 21). Rejenere olan akson tomurcuklarının oluşturdukları büyüme konisinin ana komponenti olan aktin, tubulin ve akson büyümesi için gereken yapısal proteinlerin (growth-associated proteins;GAPs) sentezi artarken, transport fonksiyonunda rolü olan nörofilaman proteinlerinin sentezi azalır. Özellikle GAP 43, akson boyunca taşınan bir fosfoproteindir ve rejenere olmakta olan aksonlardaki büyüme konilerinde, akson hasarı sonrası miktarı yaklaşık 100 kat artar, rejenerasyon tamamlandıktan sonra normal düzeyine döner (22). Sinir hasarı sonrasında ortaya çıkan kromatoliz, temel olarak rejenerasyonu göstermekle birlikte, aynı zamanda sinir hücresinin travmadan ne şiddetle etkilendiğinin de bir göstergesidir ve geniş aksoplazmik hacim kayıplarında oluşan kromatoliz ile hücre onarım mekanizmaları başlasa bile, hücre ölümü meydana gelebilir (24). Sinir hücresinde oluşan bu değişikliklerin derecesi, hasarın şiddeti ve yaralanmanın ne kadar proksimalde olduğu ile ilişkilidir. Hücre gövdesine çok yakın yaralanmalar hücre ölümüne neden olabilir (13, 21). Maggie ve ark.'nın (15) rat siyatik sinir kesisi ile yaptıkları çalışmada, hasar proksimalde yerleşirse nöron kayıp oranı %27 saptanırken, hasar distalde olduğunda nöron kaybı %7'lere kadar düşmektedir. Hücre ölümü duyu nöronları için daha tipiktir. Duyu hücre gövdelerinde gerçekleşen hücre ölümünün, hasar sonrası ilk 24 saat içinde gerçekleştiğine dair çeşitli bilgiler vardır ve bu bilgiler ışığında tedavinin ilk 24 saat içerisinde başlaması gerekmektedir. Motor nöronlarda duyu nöronları ile kıyaslandığında hücre ölümü daha az gerçekleşmektedir (22). Dorsal kök ganglionlarında aksonotomezis tipi yaralanmalar sonrasında, apoptozis ilişkili hücre ölümü insidansı %20 ile %50 arasında değişmektedir (24).



Şekil 6: Periferik sinir dejenerasyon ve rejenerasyonu

2.4.2. Proksimal Segment

Aksonal yaralanma seviyesinin proksimalinde, birkaç internodal segment boyunca ilerleyen ve distal segmenttekine benzer bir dejenerasyon görülür. 24 saatlik bir latent period sonrası, proksimal kesik uçta terminal ve kollateral aksonal tomurcuklanmalar meydana gelir. Anterograd ilerleyen bu büyümede, kollateral tomurcuklar aksonun sağlam olduğu Ranvier düğümlerinden köken alırken, terminal tomurcuklar zedelenecek aksonun proksimal ucundan çıkar. Hasarlanmış sinirde akson ucundan tomurcuklanma ilk 6 saat içinde başlamasına karşın, bu ilk tomurcuklar genelde rezorbe olurlar. İnternal sitoskeletal yapıları olan kalıcı tomurcuklar, genelde ilk 24 saatin sonunda belirmeye başlarlar. Bu şekilde uzanan her bir tomurcuğa 'rejenerasyon ünitesi' denir. Her bir tomurcuğun ucundaki kısma ise 'büyüme konisi' denir (13,14). Büyüme konisi, düz endoplazmik retikulum, mikrotübül, mikrofilaman, mitokondri, lizozom ve diğer veziküler yapılardan zengindir. Aktin filamanları ve myozin içerir. Bu yapılar, büyüme konisinin filapoid çıkıntılar yaparak hareketli olmasını sağlar. Distal sinir segmentindeki Schwann hücre kolonları (Büngner bantları) ve Schwann hücrelerinin bazal laminaları, büyüme konisinin ilerlemesi için uygun ortam sağlarlar. Büyüme konisinin, Schwann hücre bazal laminasında bulunan fibronektin ve laminine affinitesi vardır ve aksonal tomurcukların büyüme yönünü belirleyen faktörlerden biri de bu affinedir (13,15). Periferik sinir rejenerasyon kapasitesini, ilk kez Cajal isimli araştırmacı 1928 yılında kedilerin omuriliklerinde yaptığı çalışmalarda göstermiştir. Aksotomiye takiben proksimal uçta pek çok tomurcuğun oluştuğunu ve bunların distale uzanarak rejenerasyonu sağladığını saptamıştır. Cajal ayrıca rejenerasyon olan aksonların, diğer dokulardan ziyade distal sinir segmentine doğru tercih edilir bir büyüme patterni gösterdiklerini de ortaya koymuştur (nörotropizm) (24). Aksonal tomurcukların sayısı zamanla azalır, bazıları distal segment ile bağlantı yaparken; diğerleri regrese olur. Bağlantıyı yapabilenler mature olurlar. Uç organlardan salgılanan trofik maddeler bu yönlendirmeyi düzenlerler (14).

2.4.3. Distal Segment

Distal sinir segmentinde akson ve myelin kılıfta meydana gelen hücresel dejeneratif değişikliklere 'Wallerian dejenerasyon' denir. İlk kez 1850 yılında Waller isimli araştırmacı kurbağa hipoglossal sinirinde, sinirin kesilmesi sonrasında distal segmentte oluşan değişiklikleri gözlemlemiş ve bu dejeneratif sürece Wallerian dejenerasyon ismini vermiştir. Wallerian dejenerasyon ile akson ve myelin kökenli maddelerin temizlenmesi sağlanırken, rejenere olan aksonun büyümesi için uygun ortam oluşturulur. Prolifere ve diferansiye olan pluripotent Schwann hücreleri, bazal lamina boyunca dizilerek Büngner bantlarını oluştururlar. Ortada oluşan içi boş tüp yapısına endonöral tüp denir (22, 26). Aksoplazmik hücresel iskelet, proteolitik enzimler ile yıkılır. Bu işlem kalsiyum bağımlıdır. Aksoplazmada nörofilaman yıkımı, kalsiyum ile aktive olan proteolitik enzimlerle meydana gelir. Myelin, Schwann hücreleri ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bu fiziksel değişikliklerin büyük bir kısmı ilk birkaç hafta içerisinde tamamlanır, ancak tüm debrisin temizlenmesi birkaç ayı bulur (14,22). Özel radyografik tekniklerle, Schwann hücre proliferasyonunun üçüncü günde en yüksek değerlere ulaştığı ve hasar sonrası ikinci haftanın sonuna dek azalarak devam ettiği gösterilmiştir (14). Endonöral tüp kılıfı, Schwann hücre bazal laminalarında kollajen birikimine sekonder kalınlaşmaya başlar ve giderek distal segmentte endonöral tüpün genişliği azalır. Eğer endonöral tüp rejenere olan akson ile penetre olamazsa, ilerleyici fibrozis sonucunda tüp tamamen oblitere olur. Endonöral tüpler, hasarlanma sonrası ilk 3 ay içinde orijinal çaplarının %10-20'si kadar bir oranda daralır (21). Tomurcuklar proksimal sinir güdüğünden distale doğru ilerlerler. Bu hareketlenme sinir iyileşmesinin başarısını etkileyen en önemli olaydır. Bazı tomurcuklar bağ doku içersine doğru uzanabilirler ki, bu nörinom oluşumu ile sonuçlanır. Tomurcuklar Büngner bantlarını takip ederek, perifere doğru uzanıp hedeflerini bulurlar. Başlangıçta proksimal segmentteki tomurcuklanan akson sayısı, distal segmentteki mevcut akson sayısından daha fazladır, ancak zaman içerisinde periferik bağlantıyı yapamayan tomurcuklar dejenere olur ve akson sayıları eşitlenir (14, 21). Hayvan deneylerinde distal segmentin rejenerasyon hızının nörotomezis tipi yaralanma sonrası 2.0–3.5 mm/gün, aksonomezis tipi yaralanma sonrası 3.0–

4.5 mm/gün olduğu saptanmıştır. İnsanlarda ise ortalama aksonal rejenerasyon hızı günde 1–2 mm'dir (14). Proksimalden distale doğru ilerledikçe rejenerasyon hızı azalmaktadır. Rejenerasyon hızı, hasar alanının sinir hücre gövdesine uzaklığı ile ters orantılıdır (13).

2.5. Sinir Konduitleri

Sinir defektlerinin tedavisinde altın standart, otolog sinir grefti kullanımudur (28,29). Vücutta alınacak yeterli miktarda sinir grefti bulunmaması ve donör alan morbiditesi nedeniyle birçok otolog ve nonotolog sinir konduit modeli geliştirilmiştir. Bir sinir konduiti sinir hasarının proksimal ucunda aksonal filizlenmeye izin vermeli, distal uçtan salınan büyüme faktörlerinin difüzyonunu sağlamalı ve skar formasyonuna engel olmalıdır. Bu amaçlar çerçevesinde, araştırmalar, mevcut olan doğal ve sentetik materyallere odaklanmışlardır. Ancak bu materyallerin otolog sinir greftlerinin performansını yakalaması sağlanamamıştır. Son zamanlarda, eldeki materyalleri kombine ederek yeni sinir konduitleri oluşturulmaya ve sentetik olmayan nonotolog konduitlere karşı oluşan immün cevabı minimize etmeye çalışılmaktadır (30). Günümüze kadar araştırılmış sinir konduitlerinin listesi aşağıda verilmiştir.

Sinir greftleri ve sinir konduit materyalleri:

Otolog doku greftleri

1. Sinir greftleri (27,28)
2. Ven greftleri (30)
3. Kas greftleri (31)
4. Epinöral kılıf (32)
5. Tendon greftleri (33)
6. Mezotelial çember (34)

Nonotolog /asellüler greftler

1. Allogreft ve immunsupresyon (35)
 2. Asellüler allogreftler ve xenogreftler
- Termal desellülerizasyon (36)

Radyasyon tedavisi (37)

Kimyasal desellülerizasyon (38)

3.İnce barsak mukozası (39,40)

4.Amnion zarı (41,42)

Sentetik olmayan moleküllerden oluşan materyaller

1. Ekstrasellüler Matriks (ESM) proteini içeren materyaller

Fibronektin (43)

Laminin (44)

Kollajen (45)

2. Hyaluronik asid bazlı materyaller (46)

3. Fibrin / fibrinojen (47)

4. Diğer materyaller (aljinat, agaroz...) (48-49)

Sentetik materyaller

1. Emilebilen sentetik materyaller

Poli(laktik asid) (PLA) (50)

Poli(laktik-ko-glikolik asid) PLGA (51)

Poli(kaprolaktone) (52,53)

Poli(üretan) (54)

Poli(organo)fosfazen (55)

Poli(3-hidroksibutirat) (56)

Poli(etilen glikol) "glue" (57)

Biodegradable cam (58,59)

2. Elektriksel aktif materyaller

Piezoelektrik (60)

Elektriksel konduksiyon (61)

3. Emilemeyen sentetik materyaller

Silikon (62,63)

Gore-Tex veya ePTFE (64-65)

2.5.1. Otolog Doku Greftleri

Otolog doku greftlerinin sinir defekti onarımında geniş bir kullanım alanı mevcuttur. Otolog doku greftlerinin doku uygunluğunun yapay dokulardan daha iyi olması, daha az toksik olmaları, hücre adezyon ve migrasyonunu destekleyen yapılarının olması gibi avantajları vardır. Bunların yanında, elde edilmelerinde potansiyel zorluklar içermektedirler. Şimdiye kadar yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda birbirinden çok farklı otolog doku grefti, sinir defektlerinin onarımında denenmiştir.

2.5.1.1. Sinir Greftleri

Otolog doku greftleri arasında sinir defeklerinin onarımında en iyi sonuçları veren sinir greftleridir ve bu alandaki tedavilerde altın standart olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle araştırılan bir konduit modeli öncelikle sinir greftiyle karşılaştırılmalıdır. Ancak insan vücudunda sınırlı sayıda sinir grefti bulunması, geniş defekleri tamir etmede zorluklar çıkarmaktadır. Duyusal sinirin farklı fasiküler yapısı ve geniş çaplı sinir greftlerinde nekroz oluşması karşılaşılan diğer problemlerdir. Sinir greftleri, sural ya da safenöz sinir gibi birkaç kutanöz sinirden elde edilebilir. En çok kullanılan sinir grefti, sural sinirdir. 40 cm uzunluğunda alınabildiği ve 2-3 cm çapa kadar ulaşan sinir greftleri elde edilebildiği rapor edilmiştir (66).

2.5.1.2. Ven Greftleri

Ven greftlerinin, küçük sinir defektlerinin tedavisinde kullanımı oldukça popülerdir. Sinir kılıfına benzer bir doku kompozisyonuna sahip olması, sinir rejnerasyonuna izin vermesi ve önemli nörotropik faktörleri sağlaması avantajları arasındadır. Lamininden çok zengin bir bazal tabakası bulunmaktadır. Media tabakası da anlamlı derecede laminin içermektedir. Adventisya ise primer olarak kollajenden oluşmaktadır. Ven konduit içerisinde başarılı bir şekilde sinir rejnerasyonunun ilerlediği, fare ve tavşan deneylerinde gösterilmiştir (67,68). Otolog ven greftlerinde 3 cm'ye kadar sinir

rejenerasyonun ilerlediği saptanmıştır (69). Daha uzun sinir defeklerinde sinir rejenerasyonu yetersiz kalmaktadır. Bu yetersizliğin temel faktörleri olarak; Schwann hücrelerinin konduit içerisinde eksikliği, ven greftinin zamanla kollabe olması ve fibrozis olarak sayılır. Bu nedenle 3 cm'den uzun sinir defektlerinde ven grefti konduitinin kullanılması önerilmemektedir (70,71). 1.5 cm üzerindeki sinir defektlerinde ven greftleri kullanıldığında bu greftlerin içerisinde ilerleyen aksonların sayısı ve çapında azalma gözlenmiştir. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için metal spiral destekler kullanılması, kollajen içeren maddelerin ven lümenine yerleştirilmesi (72) ve ven grefti ortasına sinir segmenti eklemek için çalışmalar yapılmıştır (73). Ven greftlerinin diğer bir dezavantajıda ven kapakçıklarıdır. Ters yönlü ven kapakçıkları aksonun ilerlemesine engel olabilir ve nöroma formasyonu ile sonuçlanacak onarımlar ortaya çıkabilir (68). Bunu engellemek için donör venlerin valvsiz alanları greft olarak seçilebilir ya da ven ters çevrilerek kullanılır.

2.5.1.3. Kas Greftleri

Periferik sinir rejenerasyonunda bazal lamina, sinirin rejenerasyon için tercih edeceği bir extrasellüler matrix içerirse, sinir rejenerasyonu için çok uygun bir iskelet yapı sağlanmış olur. Kas tüpleri, Schwann hücrelerinin proksimal uçtan migrasyonu ve distal uçtan salınan nörotropik faktörlerin proksimal uca ulaşımı için açık bir pasaj sağlar. Denatüre kas greftlerinin deneysel çalışmalarda 4 cm' ye kadar olan periferik sinir defektinin onarımında etkili olduğu gösterilmiştir (74,75). Bazı araştırmacılar, kas bazal lamina greftlerinin sinir tamirinde sinir greftleri kadar başarılı olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle duyuusal yeniden yapılanmada önemli avantajlar sağlamaktadırlar (76). Bu amaçla; soleus ve adduktor magnus (74), masseter (75), ekstensör kauda internus kası (77), grasilis (78), gluteus maksimus (79) kasları kullanılmıştır. Denatüre kası elde etmek için ardışık dondurma ve çözme işleri uygulanır. Kas dokusu farklı kimyasal solüsyonlara maruz bırakılır (74,80). Kas greftlerinin bir diğer kullanımı da, diğer tübülerize otolog greftlerin içerisine (ven greft, tendon grefti) extrasellüler matrix olarak yerleştirilerek kullanımınıdır. Bu kullanım ile ilgili başlangıçta olumlu çalışmalar bulunsa da, son zamanlarda kontrol gruplarına üstün olmadıkları gösterilmiştir (81,82)

2.5.1.4. Epinöral Kılıf

Epinöral kılıf tüpün 3 şekilde kullanımı tarif edilmiştir. Bunlar; epinöral kaydırma (83), epinöral turnover (84), tüp rezeksiyonu ve reformasyonudur (32). Ratların sayitik sinirlerinde yapılan çalışmalarda 7 ile 10 mm civarındaki sinir defektleri onarılabilmektedir. Donör alan morbiditesi olarak epinöriumda minimal adezyon saptanmıştır. Ancak bunun ileti hızına ya da sinir gövdesine bir zararı olmadığı belirtilmiştir. Donör alan, epinöriuma benzer bir tabakayla tekrar kaplanmıştır. Bu tekniğin nöral orjinli bir yapıyla sinir defektini onarımı, tamir alanına yakın donör alan kullanılması ve proksimal uçtan ayarlanabilir bir uzunluktan alınma gibi avantajları olsa da disseksiyonda ve epinöral kaydırmada teknik zorlukları vardır (84).

2.5.1.5. Tendon Greftleri

Otolog bir sinir konduiti arayışı içerisinde olan araştırmacılar, tendon greftlerini de bu amaçla denemişlerdir. Ancak bu konudaki araştırmalar deneysel çalışmalardan ileriye götürülememiştir. Başlangıçta izole tendon grefti şeklinde olan kullanımlar, sonradan yerini tendonun (Chitosan) şitosan denen maddeyle bir film şerit gibi sarılmasıyla elde edilen tübüllerin kullanımına bırakmıştır. Şitosanın tek amacı tendona şekil vermek değildir. Laminin isimli protein, çok güçlü bir hücre adezyon molekülüdür ve sinir rejenerasyonuna izin verdiği saptanmıştır. Ancak bu proteinin, büyük bir molekül olması nedeniyle elde edilmesi zordur. Aynı zamanda laminin kanserojenik yapıdadır. Ancak b proteinin nörojenik çeşitli zincirleri üretilip sinir rejenerasyonu için kullanılabilir. Bu amaçla kullanılan “YIGSR, IKVAV” peptidleri şitosan yüzeyine kovalan bağlarla bağlanabilirler. Böylece şitosanlı tendon, sinir rejenerasyonu için elverişli bir ortama sahip olur. Ancak bu karmaşık kimyasal tepkimelerle elde edilen yeni conduit deney hayvanlarında sadece 15 mm’lik sinir defektlerinde başarılı olmuştur (85).

2.5.1.6. Mezotelyal Çember

Mezotelyal çember oluşturmak için ince metal spiral ile çevrili silikon tüp, ratların sırtına subkutan olarak implante edilmiştir. 3-4 hafta sonra silikon etrafında mezotelyal döşeme oluşmuştur. Silikon çıkarıldıktan sonra mezotelyal çember elde edilmiştir. Elde edilen mezotelyal tüp, rat siyatik sinirlerindeki 10

mm'lik defektlerin onarımlarında kullanılmıştır (34). Sinir defekti bölgesinde iyi derecede sinir rejenerasyonu saptanmıştır. Sinir morfolojisi ve iletim hızı otolog sinir greftleri ile karşılaştırılabilir düzeyde tespit edilmiş. Bunun nedeni, in vitro çalışmalarla ortaya konan NGF ile aynı nörotrofik etkiye sahip olan mezotelyal çember sıvısının varlığına bağlanmıştır (86). Mezotelyal kılıf tekniği ayrıca primat modellerde kullanılmıştır. Maymunların unlar sinirlerinde 3 cm defekt oluşturulmuş ve psödokılıf ile onarılmıştır. Histolojik incelemede 3 cm'lik defekt boyunca rejenerasyon olduğu gözlenmiştir. Morfolojik olarak sinir greftinden farklı olmasına rağmen, rejenerasyonun kalitesinin benzer olduğu iddia edilmiştir. Duyusal reseptörlerde de innervasyon varlığı gösterilmiştir.

2.5.2. Nonotolog /Asellüler Greftler

Otolog dokuların sinir konduiti olarak kullanımlarındaki kısıtlamalardan dolayı çalışmalar, nonotolog doku ve ekstrasellüler matrikse dayalı materyallerin kullanımlarına yoğunlaşmıştır. Allojenik ve ksenojenik dokuların kullanımının, geniş doku örnekleri alınabilmesi ve hastada donör alan morbiditesi oluşturulmaması gibi önemli avantajları vardır. Bununla birlikte bu dokuların kullanımı, bazı hastalıkların geçiş riskinin bulunması ve eşzamanlı immunosupresyon kullanımı ya da immünojenik komponenti ortadan kaldıracak işlemlerin uygulanması gibi dezavantajları da beraberinde getirmektedir. İntakt nonotolog dokuların, klinik kullanım için daha az immünojenik hale getirilmeleri ile ilgili birçok yöntem üzerinde çalışılmıştır. Bu metotlar, immünojenik hücrelerin destrüksiyonu ya da uzaklaştırılması ve boşluklar arasında bulunan ekstrasellüler matriksin (ESM) korunması üzerine odaklanılmışlardır. Termal teknikler (36), radyasyon (37) ve kimyasal işlemler (38) immünojenitenin azaltılması için geliştirilen metotların başlıcalarıdır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanı termal tekniklerdir. Termal teknikler, temel olarak hücreleri öldürüp parçalara ayırmak için dondurma ve çözme işlemlerinin ardışık uygulamalarında ibarettir. Sinir greftlerinin termal teknikle işlenmesi sonucunda nonimmünojenik hale geldiği gösterilmiştir. Bununla birlikte bu teknikte ESM tipik olarak hasara uğramakta ve hücre kalıntıları implantın yerleştirilmesi sonrası gelişen inflamasyonla tam olarak uzaklaştırılamamaktadır. Radyasyon uygulanmasında ise ESM üzerinde rölatif olarak daha az hasar meydana gelmekte, ancak sellüler komponentlerin uzaklaştırılması konusunda yetersiz kalmaktadır.

Hücresel debrisin tam olarak uzaklaştırılması konusunda daha etkili bulunan birkaç kimyasal teknik geliştirilmiştir. Özellikle son zamanlardaki yaklaşımla deterjan kombinasyonlarının kullanımı ile hücresel arınmanın iyi bir şekilde gerçekleştirildiği ve ESM yapılarının korunduğu gösterilmiştir (29). Bu üç teknik de, daha önce başka hastalıkların tedavisi için kullanılan başka dokulardan edinilen deneyimlerle (87) geliştirilmeye çalışılmakta ancak geline son nokta ideal bir sinir grefti modeli oluşturmak için yeterli olmamaktadır.

2.5.2.1. İnce Barsak Mukozası

Ratların ince bağırsağında kollajen ve lamininden zengin olan seroza tabakası, lümen oluşturacak şekilde ters çevrilmiştir. Segmenter sarkolemmanın lizise uğraması için dondurma ve eritme işlemleri uygulanmıştır. Membran antiijenleri %70 ETOH ile denature edilmiştir. 10 mm'lik rat siyatik sinir defektlerine bu bağırsak segmenti ile onarım uygulanmıştır. Lümen içerisine açıklığı korumak için salin enjekte edilmiştir. Otolog sinir grefti ile karşılaştırıldığında barsak segmenti ile hızlı iletim hızı ve sayıca daha fazla akson elde edilmiştir (88). Başka bir uygulama da ince barsak submukozasının konduit olarak kullanımınıdır. İntralüminal mukoza ve seroza intakt bir ince barsak submukozası elde edilmesi için kazanmıştır. Daha sonar ince barsak submukozası silindir ve rulo halindeki kullanımları, 7 mm defekt oluşturularak rat siyatik sinirlerinde uygulanmıştır. Asellüler rulo haline getirilmiş ince barsak submukozası greft olarak kullanıldığı zaman, rejenerasyon gözlenmiştir. İnce barsak submukozasına schwann hücreleri implante edildiği zaman artmış rejenerasyon saptanmış ve otolog sinir grefti ile elde edilen fonksiyonel iyileşmeye ulaşan iyileşme oranları saptanmıştır. Rulo şeklindeki yapı silindirik konduitlere göre daha geniş yüzey sağlamakta olup aksonal rejenerasyona daha çok imkan sağlamaktadır. Hatta bu yapı, geçirgenliği ve aksonal migrasyon kapasitesi bilinen, daha çok ekstrasellüler matriks içeren bir molekül olsa dahi rulo şeklindeki ince barsak submukozasına üstlülük gösterememiştir. Ancak rulo halindeki konduitte, lamellalar arasındaki alanın kollabe olmasını önleyecek herhangi bir spacer bulunmamaktadır.

2.5.2.2. Amnion Tüp

İnsan amniyotik membranı kollajen, laminin, fibronektin ve diğer bazal membran komponentlerinden zengindir. Çok düşük antijeniteye sahip hazır doğal bir materyaldir. Amniyotik tabaka fetal yüz iç tarafa bakacak şekilde rulo haline getirilerek 10 mm uzunluğunda siyatik sinir defekti olan ratlarda kullanılmıştır (89). Neovaskularitesi olan normal çaplı düzgün bir sinir dokusunun defekti geçtiği görülmüştür. Morfolojik ve fonksiyonel sinir rejenerasyonun otogreft konduitler ile karşılaştırılabilir özellikte olduğu tespit edilmiştir. 25 mm'lik siyatik sinir defekti olan tavşan modellerinde amniyotik tüp konduite NGF/Hyaluronik asit uygulanmasının, daha fazla aksonal rejenerasyon kapasitesi içerdiği gözlenmiştir (90).

2.5.3. Sentetik Olmayan Moleküllerden Oluşan Materyaller

Araştırmaların büyük bir bölümü de saflaştırılmış ESM proteinlerinin ve glikozaminoglikanların sinir konduiti olarak kullanım potansiyellerine odaklanmıştır. ESM proteini olarak en çok araştırılan moleküller; laminin, kollajen ve fibronektindir (91,92). Bu moleküllerin aksonal tamir ve ilerlemede rol oynayabildikleri gösterilmiştir. Bunların dışında ESM proteini olan çoğu proteoglikan ve glikozaminoglikanlarında nöral aktiviteyi düzenledikleri ve nöral uzamayı sağladıkları bilinmektedir (93,94). Bu ESM komponentleri, nöral köprü için aday olarak görünmektedirler. Laminin, fibronektin ve kollajenin bir sinir konduiti olarak kullanımları ile ilgili deneysel çalışmalar vardır (43,45,95,96). Örneğin içerisine laminin, fibronektin ve kollajen doldurulmuş silikon tüplerin boş silikon tüplerine göre 10 mm'lik rat siyatik sinirinde aksonal rejenerasyon üzerine daha olumlu etkileri olduğu görülmüştür (97,98). Yine mat ya da standart fibronektin konduitler, rat siyatik sinirlerinde 10 mm'lik defektte iyi sonuçlar vermiştir. Kollajen filamanlar ratlarda 20-30 mm'lik defektlerde kullanılmışlardır (45). Yine manyetik alan kullanılarak ayrıştırılmış kollajen fibrillerinden oluşan konduitlerin, randomize kollajen fibrillerine göre daha avantajlı olduğu belirtilmiştir (46). Porlu kollajen glikozaminoglikan içeren kollajen tüplerin ise Schwann hücre migrasyonu ve nöral migrasyon yönlerinden daha avantajlı sonuçları olduğu rapor edilmiştir (99). Hyaluronik asid (46), fibrinojen (47), fibrin

jel (68), peptid çatı (99), aljinat (48), agaroz (100) ve şitosan (69) sinir tamiri yönünden araştırılmış diğer moleküllerdir.

2.6. Sinir İyileşmesinde Mikroçevrenin Restorasyonu Ve Büyüme Faktörlerinin Etkileri

Sinir rejenerasyonunda optimal iyileşme için mikroçevrenin restorasyonunun sağlanması gereklidir. Basit tübülizasyonun başarısı, iki sinir ucu arasındaki mesafeye bağlıdır. Distal sinir ucu, uzayan aksonlar için onlara yol gösterici kemotaktik bir çekim oluşturur. Bu tropizm defekt uzunluğu ile ters orantılıdır ve 0.8 – 1.0 cm den fazla olan aralıklarda rejenerasyon aksonlarda etkili olamamaktadır. Konduitlerde Schwann hücreleri, proksimal sinir ucundan distal sinir ucuna doğru göç etmektedir. Ancak daha uzun sinir defektlerinde, Schwann hücre göçü ve sonuçta oluşan myelinizasyon sınırlıdır. Konduitlerin uzunluğunu ilgilendiren diğer bir durumda konduitin, elastisitesi düşük olan venlerde görüldüğü gibi kollabe olmasıdır. Farelerde 6 mm (101), ratlarda 15 mm (102,103), tavşanlarda 30 mm (69) ve insanlarda 50 mm'den (104) daha büyük defektlerde başarısızlık gözlenmiştir. Bunu engellemek ve uzun defektlerde daha iyi iyileşme sağlamak için sinir konduitleri değişik yöntemlerle mikroçevre restorasyonuna maruz bırakılmıştır.

2.6.1. Sinir İyileşmesinde Makrofaj ve Schwann Hücrelerinin Rolü

Normal bir periferik sinirde, makrofajlar, normal endonöral hücre topluluğunun %5'inden azını oluşturmaktadır. Sinirin kesi ya da ezilme şeklinde hasarlanmasından sonra endonöral hücre içeriği hızla artar. Bu hücrelerin bir kısmı Schwann hücreleri, fibroblast ve endotel hücreleri iken, bir kısmı da distal güdükte hasar alanına infiltre olan myelomonositik hücrelerdir (106). Hasar sonrası proliferasyon yapan Schwann hücreleri, farklılaşarak bazal lamina üzerinde dizilirler. Schwann hücre proliferasyonu ile makrofajların bölgeye toplanması eş zamanlı seyreder; bu da Schwann hücre proliferasyonunda makrofajların tetikleyici bir rolü olduğunu göstermektedir. Normal periferik sinirde NGF ve NGF reseptörü çok az bulunur, ancak makrofaj göçü ile interlökin-1 (IL-1) seviyesi artar; bu da Schwann hücresinde NGF transkripsiyonunu ve NGF reseptör dancitesini artırır. NGF reseptör ekspresyonu, aksonal kontakt ile kontrol edilmekte olup; distal güdükle temas sağlandığında Schwann

hücrelerindeki reseptör sayıları azalmaktadır. Ek olarak myelini sindiren makrofajların, Schwann hücreleri için mitojenik olan PDGF ve FGF sentezledikleri de saptanmıştır (22, 24, 26). Nöral rejenerasyonda rol alan nörotrofinler; NGF, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain derived neurotrophic factor, BDNF), nörotrofin-3, nörotrofin-4, epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF), IGF-1 ve 2, glial kökenli nörotrofik faktör (Glial derived neurotrophic factor, GDNF)dür. NGF, Schwann hücreleri tarafından aksonal hasara cevap olarak salınırlar ve NGF reseptörlerine bağlanırlar. Bu şekilde aksonun büyüme konisinde rejenerasyonu desteklerler (15). Aksonal rejenerasyon, sinir elemanları dışındaki diğer bağ doku yapılarından ziyade, akson distal güdüğüne doğru tercih edilir bir büyüme gerçekleştirir, ki bu olay 'nörotropizm' olarak adlandırılır. Bu aksonlarca tercih edilir büyüme yönü, salınan çeşitli nörotrofik faktörler ve Schwann hücrelerinin migrasyonu ile sağlanır (22). Aksotomiden sonra, distal sinir güdüğündeki Schwann hücrelerinde hücresel adezyon molekülleri artmaktadır. Özellikle glikoprotein L-1, nöral hücre adezyon molekülü ve N-kaderin artmakta ve bunlar da akson tomurcuklarının nörotropizmini desteklemektedir (15). Ayrıca NGF reseptörlerinin de hücre yüzey adezyon molekülü olarak etki ettiği, NGF'ün ise akson üzerinde oluşan NGF reseptörleri ve Schwann hücreleri arasında köprü oluşturarak sinir hücrelerine destek verdiği düşünülmektedir (26). Sinir hasarı sonrası, Schwann hücreleri NGF dışında IGF-1, silier nörotrofik faktör (Ciliary neurotrophic factor, CNTF) ve DNF gibi büyüme faktörleri de oluşturarak büyümeye katkı sağlarlar (24). Makrofajlar profesyonel fagositik hücrelerdir ve sinir hasarı sonrası primer görevleri myelin debrisin temizlenmesidir. Deneysel çalışmalarda, makrofajların endonöriyuma infiltrasyonu engellendiğinde, dejenerasyon evresinin akut fazında Schwann hücreleri tarafından myelinin yıkımı gerçekleşmemekte ve debrisin temizlenmesi oldukça yavaş olmaktadır. Benzer şekilde, deneysel olarak Schwann hücrelerinin bölünmeleri bloke edilirse, yine sinir dejenerasyonu ve takip eden rejenerasyon oldukça yavaş seyrederek (105). Makrofajlar kadar etkin olmamakla beraber, Schwann hücreleri de fagositik etkili davranarak myelin yıkımına yardım ederler. Schwann hücrelerinin hasar sonrası major histokompatibilite antijeni (MHC) klas 2 pozitif hale gelerek, myelinin bazı komponentlerini makrofajlara sunup, makrofajları

daha da etkin hale getirdikleri saptanmıştır. Benzer şekilde myelin debrisini fagosite eden makrofajlar da, myelin kökenli ürünleri Schwann hücrelerine sunarak, bu hücrelere mitojenik etki ederler ve bu artıkların remyelinizasyonda kullanımını sağlarlar (26, 105). Aktive makrofajlar ayrıca hasar alanına endotel hücre migrasyonunu da artırırlar. Tümör nekrozis faktör (TNF) gibi kapiller endotelial hücrelerin davranışlarını etkileyen bazı büyüme faktörlerinin sentez ve sekresyonunu uyararak anjiogenezisi desteklerler (105). Büngner bantlarının bazal laminaları, diğer bazal laminalar gibi bol miktarda laminin ve fibronektin içerir. Bu iki molekül, kültürlerde akson tomurcuklarının büyümesinde oldukça etkili faktörler olarak saptanmışlardır (24, 26). Sonuç olarak Schwann hücreleri rejenerasyonu üç farklı yolla destekler. Birincisi hücre yüzey adezyon moleküllerinin sentezinin artırılması, ikincisi laminin, fibronektin, heparan sülfat gibi ekstrasellüler matris proteinlerini içeren bazal membranın oluşturulması ve üçüncüsü sinir büyümesini destekleyen pek çok büyüme faktörü ve reseptörlerinin üretimini artırılmasıdır (107).

2.6.2. Sinir İyileşmesinde Nörotrofik Faktörlerin Rolü

Son yıllarda sinir iyileşmesinde nörotrofik faktörlerin önemi üzerinde sıklıkla durulmaya başlanmıştır. Hasarlanmış sinirde ve hedef organlarda bu faktörler, travma sonrası ortaya çıkarak ve akson boyunca retrograd taşınıp sinir rejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Pek çok deneysel çalışmada, bu faktörlerin sinir hasarında kullanımıyla, sinir hücre yaşayabilirliğinde ve aksonal büyümede artış saptanmıştır (24,107). Yaralanma sonrasında aksonların canlılıklarını sürdürmelerinde ve aksonal büyümede etkili olan endojen kaynaklı çok sayıda faktör tanımlanmıştır. Akson ile Schwann hücreleri arasındaki ilişkinin bozulması, bu faktörlerin sentez ve salınımında artışa neden olmaktadır. Nörotrofik faktörler reseptörlerine göre 2 gruptur.

Birinci gruba oluşturan nörotrofinler, NGF, BDNF, nörotrofin-3, nörotrofin-4/5 ve son yıllarda bulunan nörotrofin-6'dır.

İkinci grup ise nöropoetik sitokinler olarak anılır ve bu grupta CNTF, lökemi inhibitör faktör (Leukemia inhibitory factor, LIF) ve interlekin-6 (IL-6) bulunmaktadır. Bunların yanı sıra, sinir rejenerasyonunun değişik aşamalarında etkili olan, FGF, IGF-1 ve 2, TGF, GDNF, TNF, VEGF, EGF ve PDGF gibi

büyüme faktörleri de vardır (24,107). Nörotrofinler 'trk' olarak adlandırılan yüksek affiniteli tirozin kinaz reseptörlerine ve 'p75' olarak adlandırılan düşük affiniteli NGF reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler. Reseptörlerle etkileşim sonucu hücre içi sinyaller iletilir ve hücre cevabı oluşur. Farklı nörotrofinlere spesifik olan, üç farklı trk reseptörü saptanmıştır. Sadece yüksek affiniteli reseptör içeren (trkA) nöronlar NGF'e yanıt verebilir. Motor nöronlarda trkB ve trkC reseptörleri bulunduğu ve trkA reseptörü olmadığı için NGF motor nöronlar üzerinde etkili değildir. BDNF, trkB ve trkC üzerinden, NT-3, trkC üzerinden ve NT-4/5, trkB üzerinden etkilerini gösterir (23,24,107).

2.6.2.1. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

Levi-Montalcini ve Hamburger tarafından 1951 yılında ilk tanımlanmış nörotrofik faktördür. Glikozillenmemiş, 26 kDa ağırlığında, homodimerik bir polipeptittir. İlk olarak erkek fare tükrük bezinden elde edilmiş olan NGF, sinir sistemi üzerinde pek çok değişik etkiye sahiptir. Sinir hasarı sonrası makrofaj, Schwann hücreleri ve fibroblastlardan sentezlenerek ortama salınmaktadır. Yapılan deneylerde, NGF kullanımı ile doğal ya da deneysel olarak indüklenmiş hücre ölümünü sempatik ve duyuşal nöronlarda geri döndüğü ve ek olarak anti-NGF antikörlerinin, in vivo olarak sempatik sinir gelişimini bloke ettiğı gösterilmiştir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında, NGF ile aksonal tomurcukların büyüme yönünün de etkilendiğı saptanmıştır. Sempatik ve duyuşal nöronlar, normal gelişimleri için de NGF'e ihtiyaç duyarlar, ancak parasempatik ve motor nöronlara etkisi yoktur (107). NGF mRNA, normalde erişkin sıçan siyatik sinirinde çok düşük düzeylerde bulunur; ancak deneysel sinir hasarı sonrası düzeyi hızla artar. Bu artışta, aktive olup siniri infiltre eden makrofajların ortamda arttırdığı IL-1 seviyeleri mediatör olarak etkilidir (106). Zhuk ve ark. (108), NGF uygulaması ile aksotomilerden sonra görülen santral kromatoliz ve hasarlı nöron ölümünde azalma, protein sentezi, fosforilasyonu ve kollateral lif tomurcuklanmasında artış saptamışlardır. Kesilmiş siyatik sinir distal segmentinde, NGF'de keskin bir artış oluşarak sinir rejenerasyonunu hızlandırmaktadır. Lee ve ark.'nın (109) sıçan siyatik sinirinde yaptıkları çalışmada, kontrollü NGF salınımının aksonal rejenerasyonu doz bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür. Sinir ezilme yaralanması ya da aksotomilerden sonra, NGF uygulanması ile myelinize akson sayısında ve myelin kalınlığında artış

venöral internal organizasyonun daha düzgün olduğu ve sinir rejenerasyonunu hızlandığı, pek çok deneysel çalışmada gösterilmiştir (110,111). Duyusal arka kök ganglionlarının yaşayabilirliği üzerindeki etkisi kanıtlanmış olan NGF, fibronektin ile beraber kullanıldığında motor nöronlar üzerinde de etkili olabildiği gösterilmiştir (111,112).

2.6.2.2. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)

İlk kez 1982 yılında bulunmasına karşın, moleküler tekniklerle karakterize edilmesi uzun yıllar almıştır. NGF ile benzer bir moleküler yapıya sahip, 120 aminoasitli bir polipeptittir. Daha çok trkB olmak üzere, hem trkB hem de trkC reseptörlerine bağlanabilir. Sinir hasarı sonrası, Schwann hücrelerinde ve hedef organ olan kasta miktarı artar, retrograd olarak sinir hücre gövdesine taşınır (106,112). Yapılan çalışmalarda, aksotomi sonrası omurilik ön boynuzda yerleşik motor sinir hücre ölümünü azalttığı, periferik sinir rejenerasyonunu ve remyelinizasyonunu arttırdığı, ek olarak hücre kültürü çalışmalarında da, motor nöronların yaşayabilirliğini arttırdığı saptanmıştır (113,114). Zhang ve ark.'nın (115) sıçanlarda periferik sinir hasarı oluşturdukları deneysel çalışmalarında, BDN ile periferik sinir rejenerasyonu ve remyelinizasyonunda oluşan düzelmeyen, anti-BDNF antikoru verildiğinde bloke olduğu görülmüş ve sinir rejenerasyonu için endojen BDNF'ün gerekli olduğu ortaya konmuştur. Boyd ve ark. (116), BDNF'ün periferik sinir rejenerasyonu üzerine etkisinin doza bağımlı bifazik olduğunu öne sürmüşlerdir. Düşük dozlarda (0,5–2 µg/gün) uygulandığında motor akson rejenerasyonunu hızlandırmasına karşın, yüksek dozlarda (12–20 µg/gün) rejenerasyonu inhibe ettiği görülmüştür. Ancak bu doz bağımlı mekanizma henüz net olarak çözülememiştir.

2.6.2.3. Nörotrofin–3 (NT–3)

BDNF ve NGF ile yapısal benzerlik gösteren 119 aminoasitli dimerik yapıllı bir polipeptit olup, hem santral sinir sisteminde, hem de periferik sinir sisteminde bolca bulunur. Tercihen trkC reseptörlerine bağlanır. Duyusal ve parasempatik nöronlarda yaşayabilirliği ve diferansiasyon destekler. İnvitro motor nöron yaşayabilirliği üzerine güçlü etkileri vardır. Nöromüsküler eşik fonksiyonlarını düzenler. Motor nöronları doğal hücre ölümünden korur. Ayrıca

periferik sinir rejenerasyonunda da etkileri vardır. Spinal kord yaralanmalarında, NT-3 enjeksiyonu ile kortikospinal yollarda rejeneratif tomurcuklanmada artış olduğu gösterilmiştir (107,112).

2.6.2.4. Nörotrofin-4/5 (NT-4/5)

NGF ile yapısal benzerlik gösteren, 130 aminoasitli dimerik bir polipeptittir. Tercihen trkB reseptörlerine bağlanır. Hasarlanmış retinal ganglion hücrelerinin yaşayabilirliğini desteklediği, motor nöron yaşayabilirliği için güçlü destekleyici etkilerinin olduğu, motor nöronların iskelet kası innervasyon kapasitelerini arttırdığı saptanmıştır (112). Yin ve ark.'nın (117), fibrin yapıştırıcının NT-4/5 için taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı sıçan siyatik sinir kesi modelinde, aksotomi sonrası periferik sinir rejenerasyonunda NT-4/5'in etkili olduğu gösterilmiştir.

2.6.2.5. Nörotrofin-6 (NT-6)

Nörotrofin ailesinin en son bulunmuş olan üyesi olup, bu da NGF ile yapısal benzerlik gösterir. Henüz yeterli deneysel çalışma yapılmamıştır; ancak sınırlı sayıdaki deneylerde sempatik ve duyuşal nöronlarda etkili olduğu görülmüştür. Motor nöronlardaki etkisi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır (112).

2.6.2.6. Silier Nörotrofik Faktör (CNTF)

Sağlıklı periferik sinirlerde Schwann hücrelerinde ve santral sinir sisteminde astrositlerde bol miktarda bulunan ve yapısal olarak NGF'den farklı yapıda bir nöroaktif sitokindir. CNTF, motor ve duyuşal nöronlarda artmış metabolik aktivite ile beraber, her iki tip sinirde de aksonal tomurcuklanmayı artırır. Aksotomilerden sonra, distal güdükte CNTF mRNA seviyeleri hızla düşer ve akson tekrar rejenere olana kadar bir artış görülmez. Sinir rejenerasyonuna CNTF'de artış eşlik eder ve CNTF seviyelerinin devamlılığı için, aksonların glial hücrelerle temas etmesinin kritik önemi olduğuna işaret eder. CNTF ile in vitro olarak, aksotomilerden sonra motor nöronların yaşayabilirliğinin de artış saptanmış olmasına karşın, trofik desteği henüz açıklığa kavuşmamıştır. Hasara yanıt olarak glial hücrelerden salındığı düşünülmektedir. CNTF aynı zamanda, nöron kaynaklı bir myojenik faktör olarak da düşünülmektedir. Tedavi amacıyla uygulandığında, kaslarda denervasyona bağlı gelişen atrofiyi

azaltmakta ve kas gücünün yeniden kazanılmasına yardımcı olmaktadır (106, 107). CNTF'ün, bazik FGF, BDNF ve NGF ile sinerjistik etki gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. McCallister ve ark.'nın (118), sıçan periferik sinirinde yaptıkları çalışmada aksotomi sonrası CNTF ve NGF beraber uygulandığında, aksonal rejenerasyonda artış olduğu görülmüştür.

2.6.2.7. Lökemi İnhibitör Faktör (LIF)

Yamamori ve ark. tarafından 1989 yılında bulunan, periferik sinirlerin yaşayabilirliğini destekleyen bir diğer büyüme faktörüdür. İn vitro çalışmalarda, sempatik nöronlardaki aktivitesinin CNTF ile oldukça benzer olduğu ve CNTF ile benzer sinyal yollarını kullandığı saptanmıştır. Diğer nörotrofik faktörler gibi retrograd taşınarak, arka kök ganglionlarındaki nöronları etkiler. Sinir hasarı sonrasında retrograd bu taşınma işlemi, CNTF ile beraber artar. Schwann hücreleri tarafından üretildiği düşünülmektedir. Aksotomize sinirlere LIF uygulandığında, sinir rejenerasyonunun ve myelinizasyonunun artmasının yanı sıra, kas kitlesinde ve kasılma gücünde de artış olduğu saptanmıştır (107). Kurek ve ark. (119) tarafından LIF üretimi baskılanmış farelerle yapılan deneyde, kas rejenerasyonunun belirgin şekilde azaldığı, ancak bu durumun LIF infüzyonu ile düzeldiği gözlenmiştir. Sıçanlarda, omurilik hasarı sonrasında kullanımı ile akson rejenerasyonunda artış ve lökomotor fonksiyonlarda düzelme olduğu saptanmıştır (120).

2.6.2.8. Glia Kaynaklı Nörotrofik Faktör (GDNF)

İlk kez 1993 yılında bulunduğu dopaminerjik nöronlarda etkili olduğu düşünülmüş, ancak sonradan yapılan çalışmalarda pek çok nöron popülasyonunda potent bir nörotrofik faktör olduğu saptanmıştır. Embryonik sıçan omurilik motor nöronlarından elde edilebilir. Bunların kolinerjik maturasyonunu desteklerken, hem duyusal hem de motor nöronların, doğal ya da travmaya bağlı hücre ölümünü azaltır. Schwann hücreleri tarafından sentezlenir ve bu hücreler üzerine güçlü trofik etkisi ile periferik sinir iyileşmesinde de rol alır. Deneysel olarak, sıçan siyatik sinir hasarında kullanılmış ve rejenerasyonun arttığı saptanmıştır (106). Periferik sinir hasarı sonrası iskelet kasında da düzeyleri artar ve retrograd olarak motor nöronlara

taşınır; hem in vivo hem de in vitro olarak motor nöronların yaşayabilirliği üzerindeki etkisi gösterilmiştir (107).

2.6.3. Schwann Hücre İmplantasyonu

Schwann hücreleri, uzayan rejenere aksonların içerisinde geçtiği ve periferik hedeflerine ulaştıkları önemli bir mikroçevre ögesidir. Schwann hücreleri mitozunu ve göçünü artıran veya greftin schwann hücreleri ile dolmasını sağlayan durumlar grefter boyunca gözlenen aksonal rejenerasyon oranını artıracak ve sinir iyileşmesine katkıda bulunacaktır. Canlı Schwann hücresi içeren sinir konduitleri, 10 mm uzunluğundaki defektlerin onarımında kullanılmıştır. Schwann hücrelerinin polyethylene tüp iç duvarına tek katlı tabaka şeklinde döşenme ve yine kas greftine enjekte edilme şeklindeki uygulamaları, ratlarda 20 mm.'lik periferik sinir defektlerinde başarılı olmuştur (78). Tavşanlarda jelatin içerisine schwann hücresi suspanse edilmiş polyglycolik asit konduitleri ve otojen schwann hücresi ile suspanse edilmiş ven greftleri 30 mm üzerindeki gaplerin onarımında kullanılmıştır (121). Otojen schwann hücrelerinin izolasyonu sonrası venöz konduitlere konularak yapılan 2 aşamalı işlem ile 60 mm'lik tavşan peroneal sinir defekti onarımında histolojik olarak mükemmel sonuçlar elde edilmiş (122). Ancak fonksiyonel değerlendirme yapılmamıştır. Bir başka önemli nokta ise schwann hücrelerinin sağkalımı ve çoğalmasındır. Bu noktada NGF'nin üretiminin Schwann hücrelerin uygulamalarında schwann hücrelerinin besinlere yarışmalı bir şekilde ulaşımıyla sonuçlanan schwann hücre dansitesinin ayarlanmasında önemli rolü vardır.

2.7. Trombositten Zengin Plazma (TZP)

TZP, bazal değerlerde daha yüksek seviyelerde trombosit içeren otolog plazma kısmıdır (124). Bu küçük miktarlardaki plazmanın içerisinde trombositler, kandaki diğer hücresel elemanlardan ayrılarak konsantre şekilde bulunurlar. TZP, bazal plazma değerlerinden 3 ila 5 kat fazla trombosit içermektedir. Normal kan trombosit sayısı milimetreküpte 150.000–400.000'dir. Hazırlanma tekniği ve kullanılan cihazlara göre değişkenlik göstermekle birlikte, TZP için standart istenilen trombosit değeri milimetreküpte 1.000.000'dur (123).

TZP içerdiği bu yüksek miktardaki trombosit içeriğine bağlı olarak, pıhtılaşma faktörlerinin tümünü ve büyüme faktörlerini konsantre bir şekilde

içerir. Büyüme faktörü olarak başlıca PDGF, TGF- β , VEGF, EGF ve IGF içermektedir (14, 16, 18). TZP'nın etkisi, içerdiği bu büyüme faktörlerinin sinerjistik bir etkisi şeklinde ortaya çıkmaktadır (123). TZP içerisinde mevcut büyüme faktörü dışındaki bazı maddelerin de, onarım işlevi gören hücreler üzerinde etkili olduğu ortaya konmuştur. Örneğin, serotonin, fibroblastik hücre bölünmesinde etkiliyken; fibrin ve trombin onarım işlevi gören hücrelerin proliferasyonunu ve migrasyonunu arttırmaktadır (123). Hayvan çalışmalarında, özellikle küçük hayvanlarda, TZP hazırlamak için gereken kanı aynı hayvandan almak mümkün olamamaktadır; dolayısıyla böyle deneylerde kullanılan TZP, otolog değil homolog hazırlanmaktadır. Bu nedenle oluşabilecek immün reaksiyonlara bağlı olarak, deneylerde yanlış-negatif sonuçlar oluşabilir. Gerçek TZP mutlaka otolog hazırlanmalıdır (124). TZP uygun şekilde hazırlanıp antikoagülanlarla muamele edildikten sonra, içerisindeki trombositler 8 saat canlılıklarını koruyabilirler. TZP içerisindeki trombositlerin etkin olabilmeleri için, kullanım esnasında ya da kullanımdan hemen önce aktive edilmeleri gerekir. Bu amaçla en sık kullanılanlar sığır trombinini ve kalsiyumdur (124).

2.7.1. Trombositler

Trombositler, megakaryositlerin sitoplazmik parçalarıdır. Beyaz kan hücreleri olup kemik iliğinde oluşurlar. En küçük kan hücreleridir ve yuvarlak ya da oval şekilli olabilirler. Ortalama çapları 2 μm 'dir. Fosfolipid iki tabaka arasında glikoprotein, glikolipit ve kolesterolden oluşan üçüncü bir tabakayı içeren, trilaminar bir hücre zarları vardır. Hücre zarının en dış yüzeyinde glikoprotein, glikolipit ve mukopolisakkaritlerden oluşan ve 'glikokaliks' adı verilen bir yapı mevcuttur. Bu yapı trombosit adezyon ve agregasyonunda rol alır. Sitoplazmalarında mitokondri, mikrotübül, granüller (alfa, delta, lambda) gibi organeller içermelerine karşın, hücre çekirdekleri yoktur. Sitoplazmalarında bulunan glikojen partikülleri, trombosit metabolizmasının için önem taşır. Trombositlerin hücre zarı, sitoplazma içerisinde parmak şeklinde uzantılardan oluşan ve 'açık kanaliküler sistem' adı verilen bir kanal sistemine sahiptir. Bu sistem, sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmalarını sağlayan fonksiyonel bir yapıdır. Diğer bir sistem olan 'yoğun tübüler sistem' ise, kapalı bir kanaliküler sistem olup, trombosit aktivasyonu için gereken kalsiyum iyonlarını depolar. Ayrıca tromboksan gibi prostoglandinlerin

sentezinde rol alır (125). Trombosit hücre iskeletinin %20-%30 kadarını, hücre zarına yakın yerleşim gösteren aktin mikrofilamanları oluşturur. Trombositler aktive olduklarında, hücre iskeleti yapısında değişiklikler meydana gelir; aktin mikrofilamanları hücre hareketi ve agregasyonu sağlayan, 'filapod' adı verilen yüzey çıkıntılarını oluştururlar. Hücre iskeletinde bulunan bir diğer protein yapı mikrotubullerdir ve aktivasyon sırasında oluşan trombosit şekil değişikliklerinden sorumludurlar (125). Trombositlerin sitoplazmalarında, çoğu alfa (α) granül olmak üzere, delta (δ) ve lambda (λ) granülleri bulunur. Bu granüllerin içerikleri ve işlevleri birbirlerinden farklıdır. Her bir trombositte, ortalama 50–80 adet α -granül mevcuttur. Alfa granülleri 300–500 nm çapında olup, çoğu hemostaz ve doku iyileşmesinde kritik önemi olan otuzdan fazla biyoaktif protein ve büyüme faktörü içerirler. Delta (δ) granülleri, 250–300 nm çapa sahip olup elektron mikroskopta ışığı yoğun olarak absorbe etmeleri nedeniyle dens görünürler ve bu nedenle 'yoğun cisimler' olarak da adlandırılırlar. Kalsiyum iyonları, pirofosfat, ATP, ADP gibi protein olmayan moleküllerin yanı sıra, normal plazma konsantrasyonununun 100 katı kadar fazla serotonin içerirler. Lambda (λ) granülleri, lizozomlar olup, çapları 175–250 nm arasında değişen ve lizozomal enzimleri içeren veziküllerdir. Bu granüllerin bakterisidal etkilerinin yanı sıra, pıhtılaşma sürecinde oluşan fazla pıhtıyı da eritici rolleri vardır (125). Alfa granüllerinde, önceden sentezlenip depolanmış olan büyüme faktörleri, trombositlerin aktive olmaları sonucu degranülasyon ile ortama salınarak, hedef hücrelerdeki reseptörlerine bağlanıp hücre içine sinyal iletimi ile fonksiyonlarını gerçekleştirirler (124). Trombositlerin α -granüllerinde bulunan biyoaktif proteinler: PDGF, TGF, platelet faktör 4 (PF-4), IL-1, trombosit kökenli anjiyogenetik faktör (PDAF), VEGF, EGF, trombosit kökenli endotelial büyüme faktörü (PDEGF), epitelial hücre büyüme faktörü (ECGF), IGF. Trombositlerin alfa granüllerinde büyüme faktörü olmayan bileşenler de vardır. Osteokalsin (Oc), osteonektin (On), vitronektin (Vn), trombospondin-1 (TSP-1), adenosin difosfat (ADP), trombosit aktive edici faktör (PAF), Von Willibrand faktör (VWF), serotonin gibi bu bileşenlerin trombosit adezyonu, aktivasyonu ve fibroblast proliferasyonunda çeşitli rolleri vardır (123,125). Kandaki ortalama değerleri ise, milimetreküpde 140.000 ila 400.000 arasında değişir. Dolaşımda yaklaşık 10 gün kadar kalırlar ve daha sonra retikuloendotelial sistem makrofajları

tarafından dolaşımdan temizlenirler. Trombositlerin en önemli fonksiyonları, hemostaz ve yara iyileşmesi üzerinedir. Doku hasar alanında trombositler agrege olup aktive olarak, subendoteliyal ve kapiller bazal membranındaki kollajene bağlanırlar. ADP ve trombin ile agregasyon artar ve sonuçta trombosit tıkaç meydana gelir. Ekstrensik ve intrinsik koagülasyon kaskadı ile kan pıhtısı oluşarak kanamanın durması sağlanır. Yara iyileşmesinde ise, trombosit aktivasyonu sonucu ortama salınan büyüme faktörleri, hücre göçünü, proliferasyonu, farklılaşmayı ve matris sentezini artırır. Yara iyileşmesinin tüm fazlarında trombositlerin etkileri vardır (124).

Tablo 1: Trombosit granüllerinin içerikleri

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

2.7.2. Trombositlerde Bulunan Büyüme Faktörleri

2.7.2.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

İlk olarak fibroblast ve düz kas hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinden dolayı “trombosit kaynaklı mitojen” olarak tanımlanmıştır. Disülfid bağı ile birbirine bağlı, 30–32 kDa ağırlığında, A ve B zinciri olarak adlandırılan iki polipeptitten oluşur. A ve B zincirlerinin olgun formları yaklaşık 100 aminoasit içerir ve bu aminoasitlerin 50 kadarı birbiri ile aynıdır. Dokularda AA, AB ve BB şeklinde üç farklı izoform şeklinde bulunur. PDGF hedef dokuda bağlandığı reseptörlerde tirozin α ve β reseptörleri olarak iki şekildedir. PDGF'nin tüm formları α reseptörüne bağlanabilirken, PDGF-BB sinyal iletimi yalnızca β reseptörlerini kullanmaktadır (126). PDGF'nin bu hücreler üzerindeki β reseptör aktivasyonu fibroblast proliferasyonu, kollajen birikimi ve anjiogeneze öncülük eder.

Yaralanma sonrasında erken dönemde doku konsantrasyonu artan faktörlerden birisidir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü primer olarak trombositlerden salınan bir büyüme faktörü olmakla birlikte, aynı zamanda makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar ve keratinositler tarafından da sentezlenerek salınmaktadır.

Klasik hedef hücreleri, her iki reseptörü de içeren fibroblastlar ve düz kas hücreleri olmasına karşın, glial öncü hücreleri, trombositleri ve endotel hücrelerini de etkiler. İn vivo olarak embriyonik gelişimde, santral sinir sistemi gelişiminde, vasküler sistem gelişiminde, doku homeostazında ve yara iyileşmesinde çeşitli görevleri vardır (127). PDGF, fibroblast ve düz kas hücrelerine güçlü mitojenik etkisinin yanı sıra, nötrofil ve makrofajların kemotaksisini artırır. Fibronektin, proteoglikan, hyaluronik asit gibi ekstra-sellüler matriks proteinlerinin üretimini de uyarır (128).

PDGF, Yara iyileşmesine cevapta en erken ortaya çıkan faktördür. Pek çok deneysel çalışmada PDGF ile granülasyon dokusunun, epitelizasyonun ve neovaskularizasyonun arttığı, yara iyileşme sürecinin değişmeksizin, iyileşme hızının arttığı ortaya konmuştur (129). Kronik yaralarda, nöropatik ve diyabetik ülserlerde etkinliği gösterilmiş ve bu alanda FDA onayı almış tek büyüme faktörü preparatıdır (129). Bağ doku hücrelerinde büyümeyi düzenleyici,

kemotaktik ve proliferatif etkileri olan PDGF, ayrıca nöral krest kökenli hücrelerin gelişiminde de büyümeyi düzenleyen bir faktör olarak önem taşır.

Santral sinir sistemi nöronları PDGFsentezlerler ve hasar sonrası bu nöronlarda PDGF reseptör sayısı artar. PDGF'ün hem in vivo hem de in vitro olarak nöronal düzenlenmede etkili nörotrofik bir faktör olduğu gözlenmiştir (130). Santral sinir sisteminde PDGF etkinliği üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur (131,132). Ohno ve ark. (131), yeni doğan sıçanlarda beyin iskemisinden sonra PDGF-B miktarının arttığını ve bu artışın nöroprotektif etkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Allomargot ve ark. (132), sıçan beynine tek doz PDGF mikroenjeksiyonu ile oligodendrositlerin stimülasyonuna bağlı olarak in vivo remyelinizasyonda artış olduğunu saptamışlardır. Periferik sinir sisteminde de PDGF etkilerini incelemek için yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Özellikle sinir hasarı sonrası Schwann hücrelerinde, hem PDGF reseptörleri, hem de PDGF miktarı artmaktadır ve Schwann hücrelerinin yaşayabilirliğini desteklediği, aksonal rejenerasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir (130, 133). Oya ve ark. (130), sıçan siyatik sinirinde ezilme tarzı yaralanma ile oluşturdukları periferik sinir hasarında, PDGF-B zincir mRNA'sında hem proksimal hemde distal segmentte artış olduğunu ve bu artışın da Schwann hücre kaynaklı olduğunu saptamışlardır. Schwann hücresi sitoplazmasında artan PDGF miktarının, akson büyümesi ilerledikçe muhtemelen kullanıma bağlı azaldığını ve akson ile Schwann hücresi arasındaki ilişkinin rejenerasyonda çok önemli olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.7.2.2. “Transforming” Büyüme Faktör- β (TGF- β)

İlk olarak 1983 yılında plasenta kaynaklı elde edilmiş ve kültür ortamında fibroblast proliferasyonunu sağladığı görülmüştür. Asidik yapılı, 25 kDa ağırlığında bir büyüme faktörü olup, orijinal olarak normal hücreleri malign hücrelere çevirdiği düşünüldüğü için bu isim konmuştur; ancak daha sonra malign dönüşüm etkisi olmadığı anlaşılmıştır. TGF- β farklı dokularda üç farklı izoform şeklinde bulunmaktadır. (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) ve bu formların polipeptit dizilimleri %60 oranında aynıdır. Hedef hücrelerde RI, RII ve RIII olarak adlandırılan membran reseptörlerine bağlandıklarında, hücre içi serin-treonin protein kinaz aktivasyonuna neden olurlar.

TGF- β vücutta trombosit, makrofaj, lenfosit, fibroblast, kemik hücreleri ve keratinositler gibi pek çok farklı hücreden sentezlenebilir ve hemen hemen tüm hücrelerin duyarlı oldukları bir faktördür; ancak her hücre tipinin bu faktöre yanıtı farklılık gösterir. Genel olarak hücre döngüsünün regülasyonunda, embriyogenezde ve organ gelişiminde etkili bir faktördür.

Makrofajlardan kendi salınımını regüle ederken, monositleri FGF, PDGF gibi diğer büyüme faktörlerinin salınımı için uyarır. Yara iyileşmesinin geç fazı olan güçlenme ve remodeling fazında da etkileri vardır. Yara yerinde kemotaktik ve angiogenezi hızlandırıcı etkisi vardır. Ayrıca kollajen, fibronektin ve glikozaminoglikanlar gibi birçok matriks proteininin sentezini regüle eder (134). İnflamatuar hücre kemotaksisini, ekstra-sellüler matriks sentezini, fibroblastlarda fibronektin ve kollajen üretimini stimüle eder. Özellikle yara iyileşmesinde esas görevi olan hücrelerin proliferasyonu, diferansiasyonu ve gen ekspresyonunu etkileyerek, bazı fibrotik hastalıkların da patogenezinde rol alır. Ekstra-sellüler matrikse mitojenik, kemotaktik ve anabolik etkileri olup, inflammatuar ve immun cevabın hem hücresel hem de humoral basamaklarında rol alır (127). Yapılan hayvan çalışmalarında, atların ekstremitte distallerinde yerleşik kısmi ya da tam kalınlıklı yaralarda, sıçanlarda timpanik zar perforasyonlarında etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca kronik ülser, hipertrofik skarve farelerde intestinal mukozal ülserlerin iyileşmesinde olumlu etkileri görülmüştür (127, 176). Sıçan dorsal cilt insizyon modeli ile yapılan başka bir çalışmada ise, PDGF ile sinerjistik etki göstererek yara iyileşmesini hızlandırdığı ve yara gerilim kuvvetini arttırdığı saptanmıştır (128).

TGF- β hücre tipine, büyüme koşullarına ve ortamda bulunan diğer büyüme faktörlerine göre, çeşitli hücrelere stimülatör ya da inhibitör etkiler gösterebilir. Bu grup içinden TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin, in vitro sıçan Schwann hücreleri için güçlü etkili mitojenik ajanlar olduğu ortaya konmuştur. TGF- β 1, adenilat siklazı uyarıcı forskolin ile sinerjistik etki göstererek, Schwann hücrelerindeki mitojenik etkisini ortaya koyar (135). Sinir hasarından sonra ortama gelen makrofajlar ve Schwann hücrelerinden salınır. Kendi nörotrofik etkisinin yanı sıra, pek çok nörotrofik faktörün, özellikle de motor nöronlar için potent bir nörotrofik faktör olan GDNF'ün, fonksiyonlarını gösterebilmesi için TGF- β 'ya ihtiyaç duyduğu gözlenmiştir. Sulaiman ve ark. (136), kronik

denervasyonda dışardan TGF- β verilmesi ile in vivo olarak Schwann hücre proliferasyonunda ölçülebilir bir artış saptamışlardır.

2.7.2.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I (IGF-I)

Aminoasit dizilimleri insan proinsülinine benzediğinden dolayı bu ismi almışlardır. Somatomedinler olarak da anılırlar. Primer olarak karaciğerde üretilmelerine karşın, otokrin uyarı ile tüm vücut dokularında üretilirler. Doku büyümesi, gelişimi ve rejenerasyonunda etkileri vardır. Büyüme hormonu etkisini IGF-1 üzerinden göstermektedir. IGF-1'in hücresele seviyedeki anabolik etkileri, sadece protein sentezini arttırmak değildir; aynı zamanda periferik hücrelerde glikoz içe alımını, glikojen sentezini, nöron yaşayabilirliğini, myelin sentezini artırır ve kemik iyileşmesinde de olumlu etkileri vardır. Embriyonel gelişimde ise IGF-2 daha etkin olarak rol oynar (127). Deneysel olarak diyabetik hayvanlarda, steroid kullanımı ile inflamatuvar yanıtı baskılanmış hayvanlarda ve yanık yaralarında olumlu etkileri olduğu görülmüştür (127). PDGF ve IGF-1 beraber kullanıldıklarında sinerjistik etki ile yara iyileşmesini desteklemektedirler (137).

Santral, periferik ve otonom sinir sistemi gelişiminde önemli rol oynamalarının yanı sıra, sıçanlarda siyatik sinir yaralanma modellerinde, periferik sinir rejenerasyonunu destekleyici etkileri de ortaya konmuştur. Reaktif Schwann hücrelerinin IGF-1 ve IGF-2 için temel kaynak olduğu düşünülmektedir. IGF için spesifik reseptörler (tip 1 IGF reseptörleri), Schwann hücreleri, büyüme konileri ve motor nöron aksonları boyunca bulunur ve IGF-1, sağlıklı sinirlerde düşük düzeylerde bulunmasına karşın, sinir hasarı sonrası 2. haftada Schwann hücrelerinde pik değerlere ulaşır. Sjalberg ve ark.'nın (138) sıçan siyatik sinir donma hasarı modelinde, lokal IGF-1 infüzyonu ile aksonal tomurcukların büyümelerinin uyarıldığı ve rejenerasyonun hızlandığı gösterilmiştir. Kanje ve ark. (139) ise sıçan siyatik sinir ezilme tarzı yaralanma modelinde, miniozmotik pompalar ile IGF-1 lokal olarak uygulanmış ve sinir rejenerasyonunda artış gözlenmiştir. Bu artış IGF-1'i bloke eden spesifik antikolar kullanıldığında inhibe olmuştur. IGF-2 erişkin sıçanlarda beyin ve omurilikte bol miktarda bulunmaktadır. Kaslarda IGF-2 gen ekspresyonu, nöromüsküler sinaps gelişimi ve rejenerasyonla yakın ilişkili olmasının yanı sıra,

kültüre nöroblastlarda, duyuşal, sempatik ve motor nöronlarda, aksonal tomurcukların büyümelerini de desteklemektedir. Near ve ark.'nın (18), motor akson rejenerasyonunu inceledikleri sıçan sıyatik sinir ezilme tarzı yaralanma modelinde, motor akson rejenerasyonunda artış olduğu saptanmıştır ve bu artış anti-IGF-2 anti-serumu ile baskılanmıştır. Benzer şekilde Pu ve ark.'nın (140) yaptığı çalışmada, neonatal sıçanlarda sıyatik sinire aksotomi yapılmasından sonra IGF-2 uygulandığında, motor nöron ölümleri azalırken, bu koruyucu etkinin anti-IGF anti-serumu ile ortadan kalktığı saptanmıştır.

2.7.2.4. Fibroblast Büyüme Faktörü 1 ve 2 (FGF-1 ve FGF-2)

İlk olarak sığır hipofiz bezinden elde edilmiştir. Aminoasitleri benzer, ancak izoelektrik potansiyelleri farklı olan iki proteini içerir: FGF-1 asidik fibroblast büyüme faktörü, FGF-2 bazik fibroblast büyüme faktörü. Serbest FGF-2 hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlerine (FGFR1-4) bağlanarak hücre içi sinyal iletimini sağlar. Endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, nöral hücreler ve keratinositler tarafından üretilebilirler ve ikisi de mezoderm ve nöroektoderm kökenli hücreler için kuvvetli mitojenik etkilidir.

Yara iyileşmesinde rolü olan endotel hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, epitelyum hücreleri, kondrositler ve myoblastlar gibi pek çok hücrede, proliferasyonu ve migrasyonu stimüle ederler. Kollajen, fibronektin, proteoglikan sentezini arttıırırlar (127). Çeşitli hayvan çalışmalarında, her iki faktörün de hücre migrasyonunu, neovaskularizasyonu, granülasyon dokusu oluşumunu, yara gerilim kuvvetini arttırdığı ve epitelizasyonu hızlandırdığı görülmüştür (127).

FGF-2, FGF-1' den 10 kat daha güçlü olacak şekilde anjiogenezisi uyarırken; FGF-1'in de periferik sinir rejenerasyonunu desteklediği saptanmıştır (127). FGF-1 ve FGF-2'nin mezodermal ve nöroektodermal dokuların büyüme ve gelişmelerinde, özellikle anjiogenez ve Schwann hücre proliferasyonunda önemli düzenleyici rolleri vardır. Her iki faktör de, nöral dokularda bol miktarda bulunur ve sinir sisteminin gelişiminde, fonksiyonlarında, nöronal büyüme ve farklılaşmada rolleri vardır (141). FGF-1, nöron gövdesinde sentezlenir ve akson boyunca anterograd taşınır, bu nedenle aksotomiden sonra dejenerasyona giden distal güdükte, FGF-1 seviyelerinde ilerleyici bir düşme

meydana gelir. FGF–1, santral ve periferik nöronlarda yaşayabilirliği ve diferansiasyonu destekler. İn vivo FGF–1 uygulaması sonrasında hem periferik sinirlerde hem de omurilikte, aksotomi sonrası aksonal rejenerasyonda hızlanma gözlenmiştir (142). FGF–2, nöral hücreler için güçlü etkili bir nörotrofik faktördür. Santral sinir sistemi ve periferik sinir sisteminin farklı bölgelerinden alınan nöronlardan yapılan hücre kültürlerinde, nöron yaşayabilirliğini ve aksonal tomurcukların uzanımlarını desteklediği gözlenmiştir. Ayrıca bu faktör astrosit, oligodendrosit ve Schwann hücrelerinin de proliferasyonunu uyarıcı etkilere sahiptir. Ekzojen uygulanan FGF–2, Schwann hücre bazal laminaına bağlanır ve bazal lamina boyunca rejenerasyon olan aksonların büyümelerini hızlandırır (143).

2.7.2.5. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Tümör angiogenezi üzerindeki etkisi nedeniyle, 1983 yılında tanımlanmış bir faktördür. Tümör hücrelerince salınan VEGF vasküler endotel hücre geçirgenliğini artırarak, hücreler arası mesafe ve vücut boşluklarında sıvı birikimine neden olmaktadır ve bu nedenle 'vasküler permeabilite faktörü' olarak tanımlanmıştır (143). Homodimerik yapıda, 34–46 kDa ağırlığına, glikoprotein yapıda bir faktör olup, plasental büyüme faktörü ve PDGF ile yapısal benzerlik gösterir. Endotel hücreleri için, spesifik mitojenite ve kemoatraktivite ile in vivo güçlü angiogenik etki gösterir. Endotel hücreleri, tümör hücreleri, makrofaj, perisit, düz kas hücreleri, lenfosit, granülosit, monosit ve megakaryosit gibi pek çok farklı hücrede sentezlenebilir.

İnsanlarda, yara ve kırık iyileşmesi sırasında normal olarak salgılanmaktadır. Direkt VEGF uygulaması ile endotel hücrelerinde permeabilite, büyüme ve migrasyon artar ve yara iyileşmesi sırasında endotel hücrelerinin ekstrasellüler matrikse migrasyonunu uyararak, angiogenezi önemli ölçüde artırır (127). Yaralanma sonrası hasar bölgesinde, VEGF ve VEGF mRNA hızla artar ve bu artıştan birincil olarak nötrofil ve fibroblastlar sorumludur. Yaralanma alanında vasküler zedelenmeye bağlı oksijen miktarı azalır; oluşan hipoksi VEGF mRNA'sını güçlü şekilde stimüle eder. VEGF'ün, tavşan kulağında oluşturulan dermal yaralarda ve sıçan cildinde granülasyon dokusu birikimini ve iyileşmeyi hızlandırdığı gözlenmiştir (127).

Sinir sisteminde de, VEGF'ün beyinin kapillerlerce zengin alanlarındaki nöronlarda ve hipoksi sonrası retina glial hücrelerinde mevcut olduğu gözlenmiştir. Spinal kord hasarı sonrası, astrositlerde VEGF sentezi artmaktadır. VEGF yüksek affinite ile fetal karaciğer kinaz reseptörlerine (flk-1) bağlanmaktadır ve bu reseptörlerin, nöronlar ile Schwann hücrelerinde de mevcut olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla VEGF, flk-1 reseptörleri aracılığı ile, sinir sisteminde hasar sonrası çeşitli olumlu etkiler göstermektedir. (145). Mariann ve ark.'nın (15) yaptıkları sinir kültürü çalışmasında, ortama VEGF eklenmesi ile aksonal büyümede, Schwann hücre yaşayabilirliği ve diferansiasyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Hobson ve ark. (146), sıçan sferik sinirinde oluşturdukları boşluğa VEGF içeren silikon çember yerleştirmişler ve doz bağımlı olarak VEGF ile vaskularizasyonun ve buna bağlı olarak da sinir rejenerasyonunun hızlandığını gözlemlemişlerdir.

2.7.2.6. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

İlk kez 1962 yılında Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibuler bezinden izole edilmiştir. Birçok memeli türünün doku ve vücut sıvılarında bulunan mitojenik etkili bir polipeptittir. Endotel hücreleri, fibroblastlar ve sinir sistemi destek doku hücreleri için mitojeniktir (127, 147). Primer olarak trombositlerde üretilir, ancak makrofaj ve monositlerde de bulunur. Tükürük bezleri, duodenal bezler, böbreklerde, idrar ve sütte bolca bulunur. Yara iyileşmesinin erken fazında yüksek konsantrasyonlara ulaşır. EGF reseptörlerinin uyarımı ile hücre adezyonu, matriks düzenleyici proteinazların ekspresyonu ve hücre hareketleri artar. EGF, yaraya keratinositlerin migrasyonunu artırarak epitelizasyonu hızlandırırken, yaranın fazla kontraksiyonunu da engelleyerek skar oluşumunu azaltır.

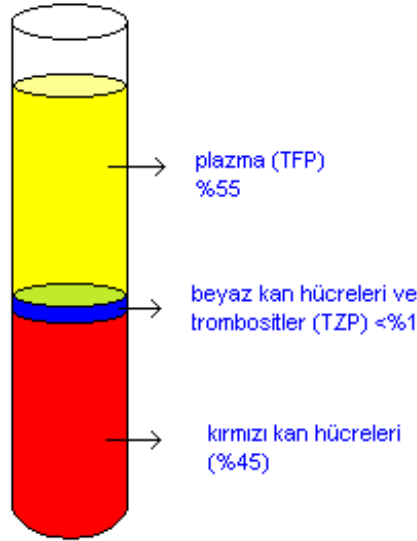
Sinir iyileşmesi sırasında ortamda artan EGF miktarı, bu faktörün sinir iyileşmesinde de etkili olabileceğini göstermektedir. Santral sinir sistemi nöronlarını içeren doku kültüründe,EGF uygulaması ile aksonal rejenerasyonda artış saptanmıştır (148). Sinir rejenerasyonunu destekleyebileceği yönündeki olumlu çalışmaların yanı sıra; Dubuisson ve ark.'nın (149) yaptıkları çalışmada oluşturulan sinir defektine dışarıdan uygulanan EGF'ün, sinir iyileşmesinde etkisi olmadığı görülmüştür. Tüm bu faktörleri, çeşitli kombinasyonlarda

kullanılarak yapılan bazı sinir çalışmaları da mevcuttur. Welch ve ark.(10) IGF-1 ve PDGF kombinasyonunu, sıçan siyatik sinirini kesip ucuca sütüre ettikten sonra tek doz olarak kullanmışlar, ancak 6haftalık takip sonucunda rejenerasyonda bir artış saptayamamışlardır ve bunu ucuca temas eden sinirlerde trofik etkinin baskılanmasına bağlamışlardır. Buna karşın Oudega ve ark. (13), aynı kombinasyonu sıçan omuriliğinde kullanmışlar ve rejenera olan aksonlarda, aksonal rejenerasyonu etkilemediğini ancak myelinizasyonu arttırdığını tespit etmişlerdir. Wells ve ark.'larının (150) yaptıkları başka bir çalışmada ise, sıçan siyatik sinirinde oluşturulan 8 milimetrelık defekte, yine aynı faktörleri içeren farklı biyolojik yapılarda tüpler yerleştirilmiş ve aksonal rejenerasyonun ölçülebilir şekilde hızlandığı saptanmıştır. Meier ve ark. (151) kesilmiş sıçan siyatik sinirinde yaptıkları çalışmada, Schwann hücrelerinin yaşamlarını ve trofik aktivitelerini devam ettirebilmek için çeşitli büyüme faktörlerine ihtiyaç duyduklarını öne sürmüştür; IGF, NT-3 ve PDGF- BB desteği ile artış saptadıkları etkinliklerde, bu faktörlerin bloke edilmesi ile akson rejenerasyonu ve Schwann hücre yaşayabilirliğinde ciddi azalma gözlemlenmiştir. Hücre dışı matriks proteinleri, rejenerasyon sırasında hücreler arası ilişkinin sağlanabilmesi için gereken glikoproteinlerdir. Fibronektin ve laminin gibi matriks proteinleri Schwann hücrelerinin bazal membran yapısında bulunan ve aksonal tomurcukların oluşumunda ve büyümesinde önemli görevleri olan glikoproteinlerdir. Bu glikoproteinlerin de, deneysel çalışmalarda lokal uygulanmaları sonrasında aksonal büyümeyi destekledikleri bilinmektedir. Rejenera olan aksonların, laminin ve fibronektin içeren bazal laminaya affiniteleri vardır (24, 152,153). Fibronektin ayrıca Schwann hücre adezyonunu ve migrasyonunu uyararak, bu hücrelerin proliferasyonunu da desteklemektedir.

2.7.3. TZP Hazırlanışı

Antikoagüle edilmiş kan santrifuj edildiğinde 3 tabaka ortaya çıkmaktadır. En altta kırmızı kan hücrelerinden zengin tabaka (dansite:1.09), ortada trombositler ve beyaz kürelerden oluşan tabaka (TZP) (dansite:1.06) ve en üstte plazma (trombositten fakir plazma- TFP) (dansite:1.03) şeklinde katmanlar ayırt edilir. (Şekil 7) Santrifüj sırasında trombosit parçalanması önlenmeli ve trombosit zarının bütünlüğü korunmalıdır. Aksi takdirde trombositler aktive

olarak büyüme faktörlerini salgırlar ve biyolojik olarak inaktif bir TZP elde edilmiş olur. Standart laboratuvar santrifüj makineleri ile TZP hazırlamak mümkün olmasına karşın, bu teknikte birkaç santrifüj işlemi ve çoklu transfer gerekir ki, bu işlemde trombosit fragmantasyonunu engellemek, sterilitiyi sağlamak ve elde edilen plazmadaki trombosit miktarını belirlemek güçtür. TZP hazırlamak için geliştirilmiş ve kullanılmakta olan çeşitli standart hücre ayırıcı aletler mevcuttur (124, 154).



Şekil 7: Santrifüj işlemi yapıldıktan sonra kanın tabakalara ayrılmış halinin şematik görünümü

2.7.4. TZP Çalışma Prensibi

Trombosit α -granüllerindeki önceden sentezlenip depolanmış büyüme faktörleri, trombositlerin aktive olması sonucu degranülasyon ile ortama salınır. Bu salınım işlemi pıhtılaşma sırasında ilk 10 dakika içinde başlar ve ilk 1 saat içinde sentezlenmiş bu büyüme faktörlerinin %95'ten fazlası salınır. Bu ilk deşarj sonrasında, trombositler hayat döngüleri olan 7 gün boyunca ek büyüme faktörü sentezine ve salınımına devam ederler (124). Büyüme faktörleri, hedef hücrelerdeki (mezenkimal hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri, epidermal hücreler vs.) reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyal iletimi ile fonksiyonlarını gerçekleştirirler. TZP direkt hücre farklılaşması yaratmaz, ancak kök hücreler ve

öncü hücrelerde hücre farklılaşmasını sağlayan morfogenez faktörlere cevabı artırır (123,124). Otojen olarak hazırlandığı için, hastalık geçirme ve reaksiyon oluşturma riski yoktur. Aktive edilmesi için kullanılan sığır trombinine karşı alerji riski olmasına karşın, çok küçük dozlarda kullanıldığı için (yaklaşık 200 ünite), sistemik dolaşıma geçmeden uygulama yerinde tüketilip makrofajlarca artıkları temizlenir. Ayrıca pH'sı (6.5–6.7) normal pıhtınıninkinden (7.0–7.2) daha düşük olduğu için bakteriyel kontaminasyona da dirençlidir (123,124).

2.7.5. Trombositten Zengin Plazmanın Kullanım Alanları

TZP ilk olarak Whitman ve arkadaşları tarafından osteointegre titanyum implantlar ile yapılan maksillofasiyal rekonstrüksiyon ameliyatlarında kullanılmıştır (155). Daha sonra Marx ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada, mandibular defekt rekonstrüksiyonu için kullandıkları kansellöz kemik greftleri üzerine PRP uygulamışlar ve PRP'nin kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri olduğunu tespit etmişlerdir (156).

2.7.5.1 Maksillofasiyal Ve Periodontal Cerrahi

PRP'nin ilk olarak kemik rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkilerinin tespit edilmesi, öncelikle maksillofasiyal cerrahi ve diş cerrahisi alanında klinik kullanıma girmesine neden olmuştur. Trombositten zengin plazma invitro ortamda fetal osteoblast-benzeri hücrelerin rejenerasyon ve fonksiyonel aktivitesini artırmak yanında, aynı zamanda mezenkimal kök hücrelerinin bölgeye migrasyonunu da sağlamaktadır. Klinikte mandibular defektlerin tedavisinde kemik greft ile birlikte uygulanan PRP'nin kemik biçimlenmesinin hız ve derecesini artırdığı ve bunu trombositlerden salınan PDGF ve TGF- β aracılığıyla sağladığı bildirilmiştir (156). Siebrecht ve ark. Poröz hidroksiapatit greftler içerisine olan kemik ilerlemesinin PRP ile artırılabilirliğini göstermişlerdir (157). Yine maksiler sinüs yükseltilmesinde, periodontal defektlerde ve dental implant cerrahisinde klinik kullanıma girmiştir (158).

2.7.5.2. Oküler Cerrahi

Maküladaki tam kat eksikliklerin tedavisinde ve retinal yaralanmalarda proliferatif hücre cevabını artırdığı bildirilmiştir (159).

2.7.5.3 Estetik Cerrahi

Jackson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, abdominoplasti sonrası flep altına uyguladıkları PRP'nin, seroma gelişimini belirgin derecede azalttığını bulmuşlardır (160). Man ve arkadaşları yüz germe, meme küçültme ve meme büyültme gibi kozmetik ameliyatlarda PRP kullanıldığında, ameliyat zamanının kısaldığını, dren gereksiniminin ortadan kalktığını ve ameliyat sonrası dönemde gelişen ödem ve ağrıların azaldığını belirtmiştir. Aynı çalışmacılar lazer ile yüz gençleştirme sonrasında uyguladıkları PRP'nin biyolojik bir örtü gibi davrandığına da dikkat çekmişlerdir (161).

2.7.5.4. Rekonstrüktif Cerrahi

Trombositten zengin plazmanın kronik ülserlerin ve iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanımını üzerine yapılan çok sayıda klinik çalışma, PRP'nin yara yerinde vaskülarizasyonu, epitelizasyonu ve granülasyonu artırdığı bildirmektedir (162, 163). Diyabetik ülserlerde, arteriyel ya da venöz vasküler yetmezliğe bağlı ülserlerde ve bası yaralarında, iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi tespit edilen PRP'nin, otoimmün hastalıklara bağlı ülserlerin tedavisinde ise etkili olmadığı belirtilmektedir (149). Trombositten zengin plazmanın tendon iyileşmesi üzerindeki etkileri araştıran Aspenberg ve arkadaşları da, PRP kullanımının tendon iyileşmesini hızlandırdığını saptamışlardır (164). Bu bulgu daha sonra Anitua ve arkadaşlarının tendon hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmalar ile desteklenmiştir (165). Sinir iyileşmesi üzerine TZP kullanılarak yapılmış fazla çalışma mevcut değildir. Özellikle PDGF'ün nörotrofik aktivitesi gösterildikten sonra, TZP'nin sinir iyileşmesinde de etkili olabileceği üzerinde durulmaya başlanmıştır. Farrag ve ark.'nın (166) sıçan fasiyal sinir rejenerasyonu modelinde, kesi ve onarım hattına TZP uygulanmış ve takip sonucu TZP uygulanan grupta fonksiyonel sonuçların daha iyi olduğu gözlenmiştir. Sarıgüney'in tez çalışmasında ise (8), sıçan siyatik sinirin kesilip epinöral onarım yapılan alanına, TZP tek doz şeklinde uygulanmış ve sinir rejenerasyonunun olumlu yönde etkilendiği saptanmıştır.

2.7.5.5.Ortopedik Cerrahi

Spinal füzyon ameliyatlarında titanyum implantlar etrafında uyuglanan PRP kemik rejenerasyonunu artırmaktadır. Lowery ve ark. (167) büyüme faktörlerinden zengin TZP kullanımı ile lomber omurilik bölgesinde kemik füzyonunda erken maturasyon elde etmişlerdir.

2.7.5.6. By-pass Cerrahisi

Del Rossi ve ark. (168), kardiyo-pulmoner by-pass cerrahisi sonrası otolog TZP infüzyonu ile postoperatif dönemde daha kolay kanama kontrolü ve hematolojik parametrelerde düzelme sağlanabileceğini bildirmişlerdir.

2.8. Hyaluronik Asit (HA)

HA, glukuronik asit, n-asetilglukozamin disakkaritlerinin lineer polimeridir. İlk olarak gözün vitröz cisminde keşfedilmiştir. Ancak ardından eklemelerin sinoviyal sıvısı ve deri gibi birçok vücut bölgesinde keşfedilmiştir. Vücuttaki birçok hücre; hücre sikluslarının belirli bir noktasında HA sentezleyebilme kapasitesine sahiptir. Bu durum, HA'in çeşitli temel biyolojik süreçlerde fonksiyonu olduğunu akla getirmektedir. HA'in doku onarım süreçleri ile ilişkili olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Bu ilişkiye dair bulgular birçok kaynaktan gelmektedir (169). Kendine özgü hidroskopik ve viskoelastik özellikleri nedeniyle HA hücrelerin ekstrasellüler matriks (ECM) komponentleri ile etkileşerek mikro ve makro çevreyi değiştirirler (169). HA, eşsiz fizikokimyasal özellikleri ve daha önemlisi saf formunun immünojenitesinin olmaması nedeniyle özellikle göz ve eklem cerrahisinde yıllardır tıbbi uygulama alanı bulmuştur. Daha yakın bir zamanda doku onarım amaçlı yaralara eksojen HA uygulanması bildirilmiştir. HA içeren biyomateryaller de ortaya çıkmıştır (170).

2.8.1. Eksojen Uygulanan Hyaluronik Asidin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi

Pek çok çalışma HA'in yara iyileşmesi üzerine pozitif etkisinin olduğunu göstermiştir. Hayvan deneylerinde yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Korneada eksojen uygulamasının iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir (171). İnsan amniotik sıvısında 2. trimesterde HA'in ve hyaluronik asit stimüle edici aktivatörün yüksek olması bu dönemde yapılan fetal uygulamaların skarsız

iyileştiğini göstermiştir (169). HA'in tendon onarımı sonrasında oluşan yapışıklıkları önlemede etkili olduğu, venöz ülser gibi kronik yaralarda uygulanmasının iyileşmeyi uyardığı gösterilmiştir (172, 173). Birçok kronik yarada, kronik doku hasarının serbest O₂ radikalleri ve matriks yıkan enzimler nedeniyle uzayan enflamasyonun bir sonucu olduğu kabul edilmektedir (171). HA'in doku onarımındaki fonksiyonunun kompleks olduğu ve birçok özelliğinden herhangi birine spesifik olarak bağlanamayacağı açıktır. Ancak kimyasal ve biyolojik çalışmaların sonuçlarına bakıldığında yara iyileşmesinin birçok evresinde HA'in mekanik rolü olduğu ileri sürülebilir (170, 174).

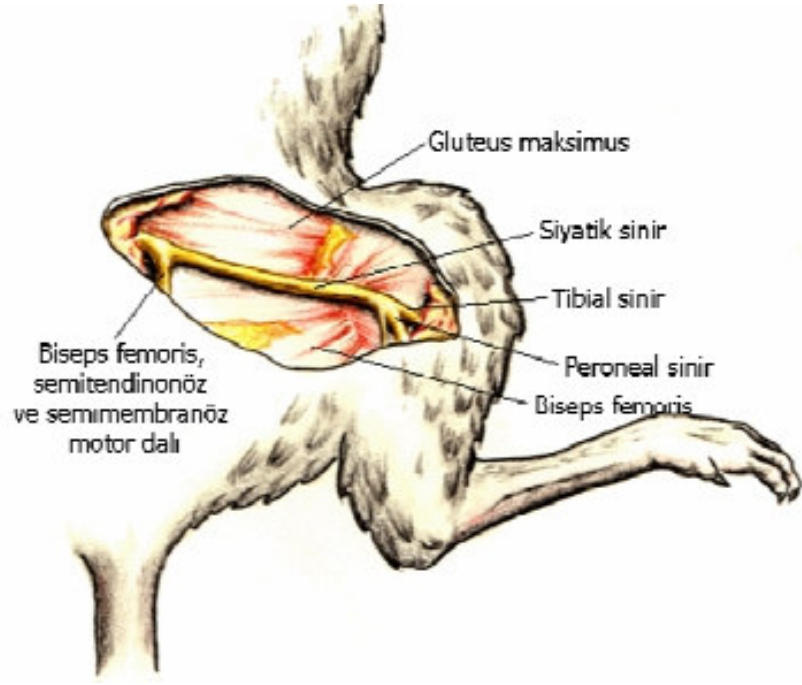
Granülasyon doku matriksi hyaluronik asiden zengindir. HA granülasyon dokusu oluşumu için gerekli olan çeşitli hücre fonksiyonlarına katkıda bulunabilir, hücre migrasyonunu kolaylaştırır. Ayrıca enflamasyonun başlaması da granülasyon dokusu için önemlidir (171).

Enflamasyon granülasyon doku oluşumunun ayrılmaz bir parçası olsa da normal doku onarımının yürüyebilmesi için enflamasyonun hafifletilmesi ya da düzenlenmesi gerekir. Oluşan ilk granülasyon dokusu son derece enflamatuardır ve yıkıcı enzimlerle düzenlenen aşırı bir doku değişimi vardır. Ayrıca reaktif O₂ metabolitleri de inflamatuvar hücreler tarafından salınır. Granülasyon dokusunun stabilizasyonuna izin vermek için enflamasyonun hafifletilmesi gerekir. Enflamasyon-stimulasyon fonksiyonuna ek olarak HA'in enflamasyon düzenleyici fonksiyonu vardır. HA, hücreleri serbest radikal hasarına karşı korumaktadır. Büyük poli iyonik polimerlerin fizikokimyasal özelliği olarak serbest radikal yakalayıcı özelliği aracılığı ile bunu gerçekleştirebilmektedir. Serbest radikal yakalayıcı rolüne ek olarak enflamasyonun biyolojik maddeleriyle olan spesifik etkileşimleri nedeniyle HA inflamatuvar aktivasyonda inhibe edici olarak görev yapmaktadır (169).

2.9. Rat Siyatik Sinir Anatomisi

Siyatik sinir L4, L5, L6 ve S1'den gelen spinal sinirlerin oluşturduğu lumbo-sakral trunkustan çıkar. Değişkenlik göstermekle birlikte L5, L6 ve S1'den kaynaklanan liflerin birleşmesinden oluşmaktadır. Pelvis içerisinde siyatik sinir adını alıp, iskiyumun dorsal kenarı ile kuyruk sokumu arasındaki derin olukta ilerler ve siyatik çentikten çıktıktan sonra piriform kasın ventralinde

seyreder. Sırt derisinin yarıya yakın kısmını ve arka bacak kaslarının çoğunu innerve eden siyatik sinirin ana gövdesi piriform kas seviyesinin 1-2 mm aşağısında kuadratus femoris kasının üzerinden ilerleyerek abduktor femoris fasyasının üzerinde oblik olarak bacağa doğru iner. Piriformis seviyesinde siyatik sinirin ana gövdesiyle birlikte çıkan ince bir dalcık ventrale doğru kuadratus femoris altından geçer ve biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kaslarının motor inervasyonunu sağlar. Siyatik sinir, diz eklemi seviyesinin yaklaşık yarım santimetre üzerinde ventrale doğru seyreden kalın tibial sinir ve dorsale doğru seyreden ince peroneal (fibular) sinir dallarına ayrılır. Peroneal sinir daha aşağıya doğru gastroknemiusun lateral karnını ve derin parmak fleksörlerini çaprazlayıp önce daha ince olan peroneus longus dalını verir ve daha sonra yüzeysel ve derin peroneal sinirlere ayrılarak sonlanır. Yüzeysel dal peroneus longus ve brevis kaslarını ve parmak ekstansörlerini inerve edip, ayak sırtı ve parmaklarının bir bölümünün duyusunu sağlar. Derin dal ise tibialis anterior ve uzun parmak ekstansörlerini inerve ederek ikinci parmak arası bölgeye ulaşır. Ventrale doğru uzanan tibial sinirse, ilk dalı olan sural siniri, ayırım noktasının 1-2 mm proksimalinde popliteaya girmeden hemen önce gastroknemiusun iki başı arasında verir ve plantaris, soleus, gastroknemiuslar, fleksör hallucis longus, fleksör digitorum longus ve tibialis posteriorları inerve eder. Bu dallardan hemen sonra ayak bileğinin üzerinde lateral ve medial plantar sinirlere ayrılarak sonlanır. (Şekil 8)



Şekil 8: Rat siyatik sinir anatomisi. (Sarıgüney Y: Periferik Sinir Yaralanmalarının Onarımında Trombositten Zengin Plazma'nın Sinir Rejenerasyonu Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, S: 42 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan 11.01.2012 tarihli onay (2012/A-07) ile İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, 1 yaş civarı 20 adet Wistar Albino tipi erkek rat kullanıldı ve bu hayvanlardan 2 adet erkek rat PRP ve aort grefti elde edilebilmesi için donör olarak kullanıldı.

Ratların anestezisi 10 mg/kg Xylazine (Alfazine %2 20 mg/ml, Bayer) ve 100 mg/kg ketamin (Ketalar 50 mg/ml, Pfizer) kombinasyonu ile intraperitoneal uygulanarak sağlandı. Trombositten zengin plazmanın hazırlanması için gerekli olan kan, donör hayvanların intrakardiyak yoldan tüm vücut kanlarının alınması ile elde edildi.

Anestezi altında sıçan yüz üstü pozisyonda operasyon masasına yatırılarak tespit edildi. Cerrahi saha tüylerden temizlendikten sonra cilt ve cilt altı geçilerek kaslar splite edildi ve siyatik sinire ulaşıp siyatik sinir diseke edildi. Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından ve operasyon mikroskobu altında standart mikrocerrahi teknikler uygulanarak gerçekleştirildi.

Ratlar operasyon öncesi ve sonrası dönemde standart laboratuvar şartlarında, uzman veteriner kontrolünde, 3'erli gruplar halinde kafeslerde izlendi, yem ve su ihtiyaçları düzenli olarak karşılandı. Günlük bakımları sırasında insizyon bölgelerine povidone iyot ile pansuman yapıldı.

Deneyde kullanılan tüm ratlara 12 hafta sonunda yürüme testi ve EMG analizi yapıldı. Yüksek doz anestezi madde verilerek sakrifiye edilen ratların siyatik sinirinden histomorfometrik analiz için biyopsi alındı.

GRUPLAR

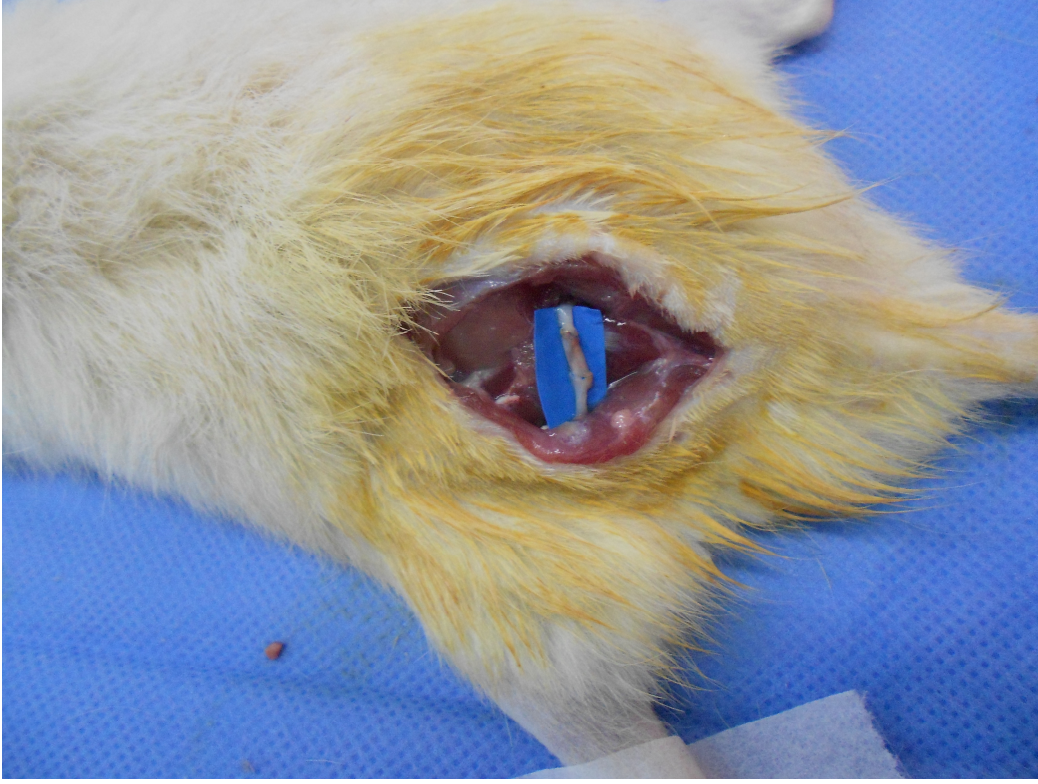
Her grupta 6 adet rat olacak şekilde, rastgele seçim yapılarak 3 grup oluşturuldu. Tüm grupların sol siyatik sinirlerinde çalışıldı. Sağ siyatik sinirlere ise dokunulmadı ve kontrol grubu olarak kullanıldı. (n=6)

Grup 1 (n=6): Kontrol grubu, siyatik sinirde 1 cm'lik sinir segmenti eksize edildikten sonra tekrar aynı yerine uç-uca otogreft olarak 10/0 naylon suture ile epinöral olarak adapte edildi. Ek olarak herhangi bir uygulama yapılmadı Resim(1).



Resim 1: Sadece otogreft ile yapılan onarım

Grup 2 (n=6): Hyalüronik asit (HA) grubu, siyatik sinirde 1 cm'lik sinir segmenti eksize edildikten sonra oluşan defekte 1 cm uzunluğunda aort grefti 10/0 naylon suture ile epinöral olarak adapte edildi. Ardından 0.3 ml HA aort greftine enjekte edildi. (Resim 2,3)

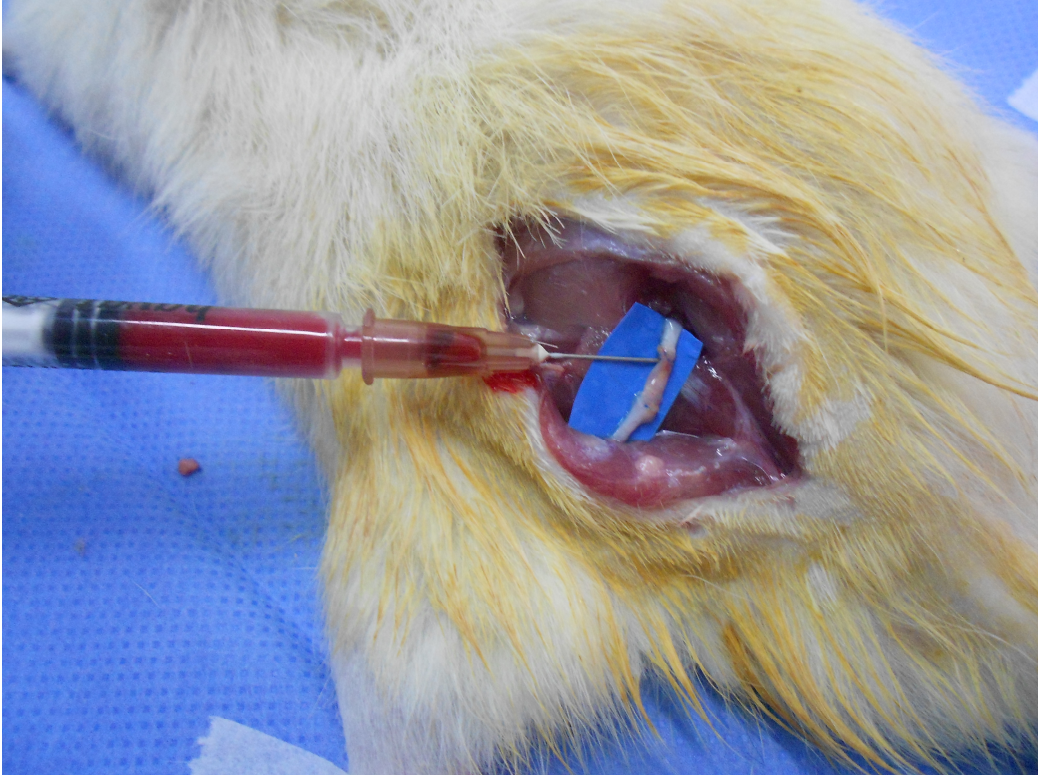


Resim 2: Allojen aorta greftinin defekte adaptasyonu



Resim 3: Allojen aorta grefti içersine HA enjeksiyonu

Grup 3: Trombositten Zengin Plazma (PRP) grubu, siyatik sinirde 1 cm'lik sinir segmenti eksize edildikten sonra oluşan defekte 1 cm uzunluğunda aort grefti 10/0 naylon sütür ile epinöral olarak adapte edildi. Ardından 0.3 ml PRP aort greftine enjekte edildi. (Resim 4)



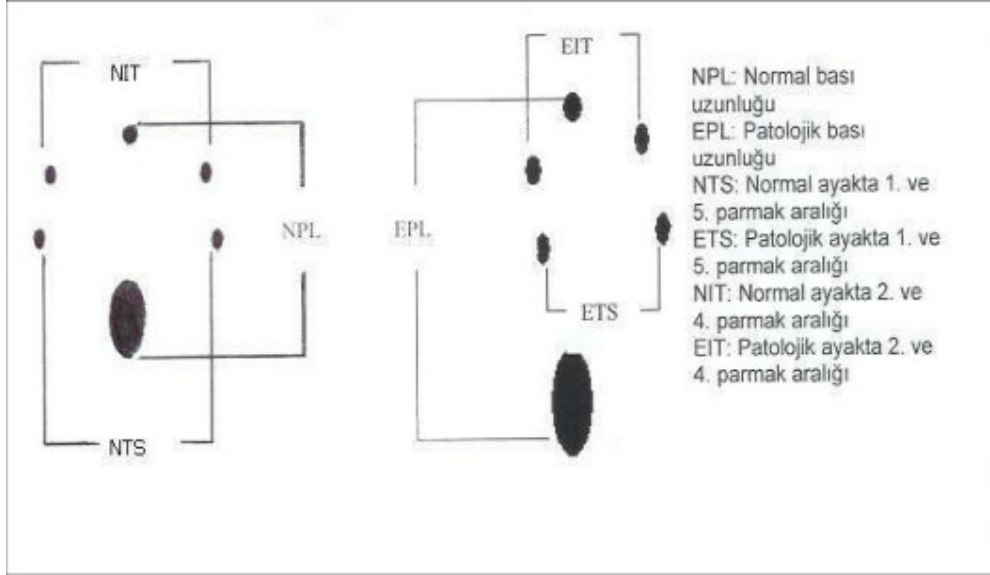
Resim 4: Allojen aorta greftine PRP enjeksiyonu

DEĞERLENDİRME

Deney protokolüne uygun şekilde tüm gruplardaki ratların sol alt ekstremitelerine uygulanan cerrahi işlemi takiben 12 hafta sonra; önce yürüme testi uygulandı ardından her iki alt ekstremiteye elektromiyografi (EMG) yapıldı. Tüm denekler sakrifiye edildikten sonra sol siyatik sinirlerin proksimalinden, greft ve distal anastomozun 10 mm distalinden histopatolojik inceleme için örnekler alındı.

Yürüme Analizi ve Siyatik Fonksiyon İndeksi:

Tüm ratlar 12. hafta sonunda 10x10x100 cm boyutlarında yürüme kulvarı olan ve karanlık oda şeklinde sonlanan yürüme düzeneği hazırlandı. Yürüme kulvarına her rat için ayrı emici kağıt yerleştirildikten sonra, her iki arka ayaklar siyah mürekkep emdirilmiş ıstampaya bastırılarak yürütüldü. Kâğıt üzerinde oluşan arka ayak izleri kaydedildi ve ölçümler yapıldı.



Tablo 2: Siyatik fonksiyon indeksinin hesaplanmasında kullanılan yürüme şablonu

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

Tablo 3: Bain-Mackinnon-Hunter siyatik fonksiyon indeksi formülü

Her rat için elde edilen kağıt şeritteki ayak izlerinde, topuk ile üçüncü parmak ucu arasındaki mesafe [print length (PL)], birinci ve beşinci parmaklar arasındaki mesafe [toe spread (TS)], ikinci ve dördüncü parmaklar arasındaki mesafe [intermediate toe spread (IT)] yürüme Şablonundaki (Tablo 3) gibi milimetrik cetvel yardımıyla ölçüldü.

Ölçümler sonucu elde edilen veriler siyatik fonksiyonel indeks formülüne uyarlandı. Bain-Mackinnon ve Hunter tarafından geliştirilen bu çoklu lineer regresyon formülü yardımıyla Siyatik fonksiyon İndeksleri (SFİ) hesaplandı

(Tablo 4). Elde edilen SFİ değerleri gruplar arasındaki farklılıklar açısından istatistiksel olarak değerlendirildi. Siyatik Fonksiyon İndeksinin sıfır olması normal fonksiyon, -100 olması ise tam kaybı olarak değerlendirilmektedir.

Elektromiyografik Değerlendirme (EMG):

Deneklerin EMG değerlendirmeleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Nöroloji Ana Bilim Dalı tarafından yapıldı. Postoperatif 12. hafta sonunda, yürüme analizlerinin tamamlanmasından sonra tüm sıçanlar kapalı iğne tekniği ile elektrofizyolojik değerlendirmeye alındı. Deęerlendirmeye alınan hayvanlarda anestezi, kas içi enjeksiyonların sonuçları etkileyebileceği göz önüne alınarak, intraperitoneal yoldan verilen 50 mg/kg Ketamine-HCl (Alfamine®) ile sağlandı. Deney uygulanan sol ve sağlam olan kontrol sağ bacaklardaki gastroknemius kaslarının CMAP'(CMAP=compound maximal action potential) lerinin amplitüd ve latans değerleri ölçülerek deneysel bacak/kontrol bacak oranları hesaplandı ve oranlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Histomorfometrik Değerlendirme:

Tüm ratların, 12. hafta sonunda işlem yapılan sol taraf siyatik sinirlerden; proksimal anastomoz, greft ve distal anastomoz distali olacak şekilde 3 bölgeden alınan sinir dokusu örnekleri ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit ile 24 saat tespit edildi. Tespit işlemi sonrasında sinir dokusu örnekleri rutin histolojik doku takip prosedüründen geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 6 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Lamlar üzerine alınan kesitler Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH), Giemsa ve Mason ile boyandıktan sonra Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sistemi (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) ile incelenerek fotoğraflar çekildi. İncelenen kesitlerde miyelinizasyon (miyelinli akson yok = 0, nadir miyelinli akson = 1, seyrek, düzensiz, ince miyelinli akson = 2, sık, düzenli, kalın miyelinli akson = 3), fibrozis (fibrozis yok = 0, hafif fibrozis = 1, orta derecede fibrozis = 2, yoğun fibrozis = 3), ödem (ödem yok = 0, hafif ödem = 1, orta derecede ödem = 2,

yaygın ödem = 3) ve mast hücreleri yoğunluğu (x40 objektif büyütme alanında), (mast hücreleri yok = 0, 1-2 mast hücreleri = 1, 3-4 mast hücreleri = 2, 5 ve daha fazla mast hücreleri = 3) olacak şekilde skorlandı.

İstatistiksel Yöntemler:

Tüm denek gruplarının fonksiyonel ve histomorfolojik olarak değerlendirilmesi ile elde edilen veriler, istatistiksel değerlendirme için SPSS for Windows v.15.0 programına (Statistical Package for the Social Sciences) aktarıldı. Gruplar arasındaki farklılıkların genel karşılaştırması non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar da Mann Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmelerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

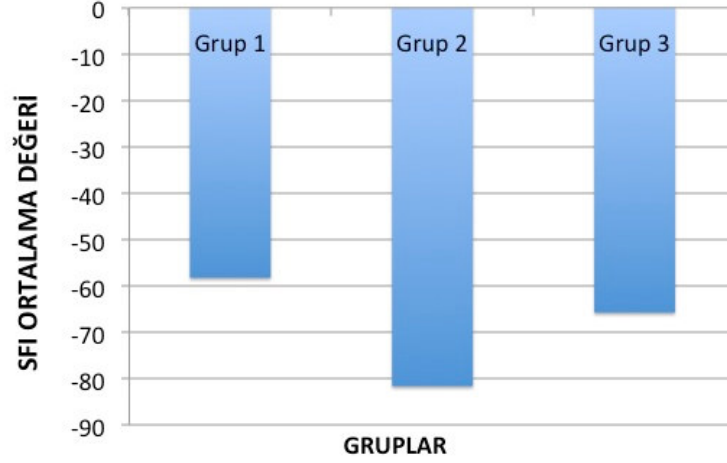
Yürüme Yolu Analizi:

12. hafta sonunda tüm gruplara yürüme yolu analizi yapıldı. Veriler kaydedildikten sonra Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFİ) değerleri hesaplandı. SFİ değerleri Grup 1 de ortalama $-58,24 \pm 4,85$, Grup 2 de ortalama $-81,63 \pm 3,72$, Grup 3 de ortalama $-65,74 \pm 3,23$ olarak hesaplandı. (Tablo 4).

DENEK	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3
1	-63.52	-80.45	-66.25
2	-50.05	-81.89	-60.57
3	-63.65	-86.29	-68.47
4	-58.76	-76.29	-63.21
5	-59.21	-86.35	-65.54
6	-54.27	-78.56	-70.43
ORTALAMA	-58.24	-81.63	-65.74
SD	4.85	3.7 2	3.2 3

Tablo 4: Deneklerin Siyatik Fonksiyon indeks (SFİ) değerleri

Gruplar arasında SFI'leri Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde değerleri otogreft kullanılan Grup 1 ile Grup 2, Grup 3 arasında anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi ($p=0.001$). (Tablo 5)



Tablo 5: Gruplar arasında_ortalama SFI değerlerinin karşılaştırılması.

- Grup 1,2,3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. ($p=0.001$)
- Grup 1-2, grup 2-3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. ($p=0.004$)
- Grup 1-3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. ($p=0.025$)

Elektromiyografik Değerlendirme (EMG):

Deneklerin tümüne 12. hafta sonunda yürüme analizlerinin tamamlanmasını takiben kapalı iğne tekniği ile elektrofizyolojik değerlendirme yapıldı. Latans süreleri Grup 1 de ortalama $1,67\pm 0,2$, Grup 2 de ortalama $3,10\pm 0,68$, Grup 3 de ortalama $1,77\pm 0,18$ iken kontrol grubunda ise ortalama $1,21\pm 0,07$ olarak hesaplandı. (Tablo 6).

DENEK	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	KONTROL
1	1.72	2.3	1.82	1.25
2	1.56	3.4	1.68	1.35
3	1.48	4.2	1.61	1.15
4	1.42	2.2	1.54	1.20
5	1.85	3.2	2.05	1.25
6	2.01	3.3	1.95	1.10
ORTALAMA	1.67	3.1	1.77	1.21
SD	0.2	0.68	0.18	0.07

Tablo 6: Deneklerin latans değerleri(ms).

Gruplar arasında, latans ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlendi. ($p < 0.001$) Gruplar ikişer ikişer Mann-Whitney U testiyle değerlendirildiğinde ise;

- Grup 1-2, Grup 2-3, Grup 1 ile kontrol grubu, Grup 2 ile kontrol grubu ve Grup 3 ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. ($p=0.004$)
- Grup 1-3 arasında anlamlı fark bulunmadı. ($p=0.423$)

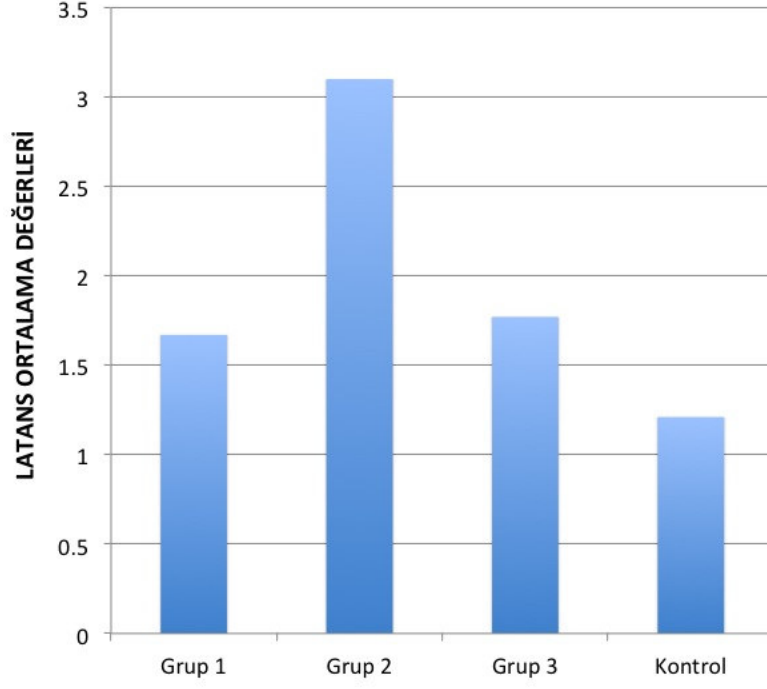
Amplitüt değerleri Grup 1 de ortalama $11,2\pm0,84$, grup 2 de ortalama $3,85\pm0,75$, grup 3 de ortalama $6,45\pm0,96$ iken kontrol grubunda ise ortalama $17,08\pm3,95$ larak hesaplandı (Tablo 7)

DENEK	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	KONTROL
1	11.2	2.8	7	17
2	10.1	3.2	5.3	19
3	12.3	5.1	5.4	15.4
4	10.2	4.2	6	16
5	12.1	3.6	8	18.1
6	11.3	4.2	7	17
ORTALAMA	11.2	3.85	6.45	17.08
SD	0.84	0.75	0.96	3.95

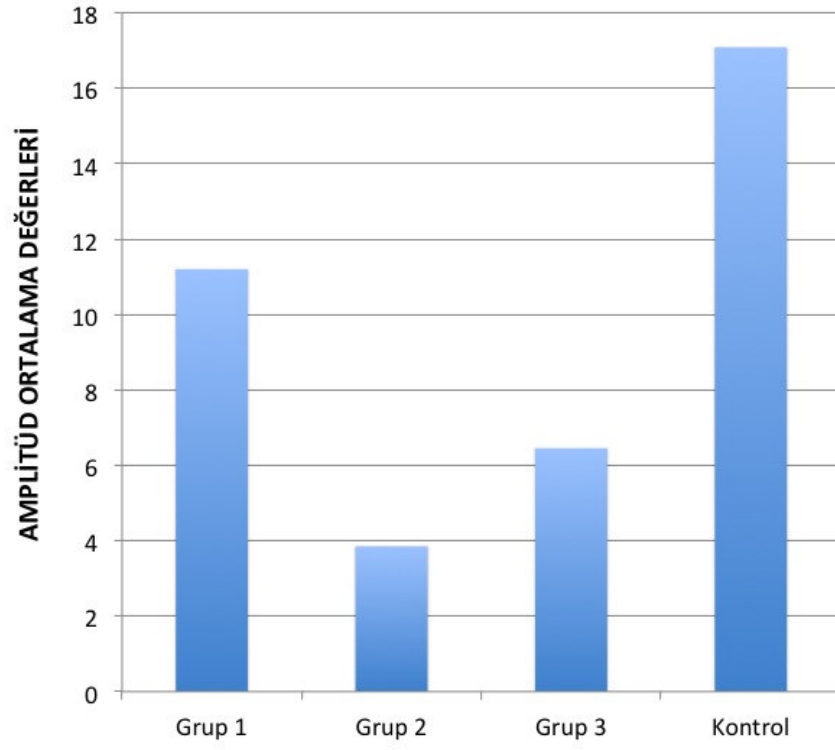
Tablo 7: Deneklerin amplitüt değerleri(mv).

Tüm gruplar arasında amplitüt ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildi ve kontrol grubu ile diğer deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlendi. ($p<0.001$) Gruplar ikişerli olarak Mann Whitney U testi ile değerlendirildiğinde ise,

Grup 1-2, Grup 1-3, Grup 1- kontrol grubu, Grup 2-3, Grup 2- kontrol grubu ve Grup 3 ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p=0.004$)



Tablo 8: Gruplar arasında ortalama latans değerlerinin karşılaştırılması



Tablo 9: Gruplar arasında ortalama amplitüd değerlerinin karşılaştırılması

Histomorfolojik Değerlendirme:

Deney gruplarındaki tüm ratların cerrahi işlem yapılan sol siyatik sinirlerinden 12. hafta sonunda proksimal kısım, greft ve distal anastomozun 10 mm distal kısmından olacak şekilde 3 bölgeden alınan sinir dokusu örnekleri alındı. Kesitler, Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH), Giemsa ve Mason boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında histopatolojik inceleme yapıldı. Yapılan incelemede kesitlerdeki myelinizasyon, ödem, fibrozis ve mast hücre miktarları değerlendirildi.

GRUPLAR	DENEK	PROKSİMAL ANASTOMOZ	GREFT	DİSTAL ANASTOMOZ DİSTALİ
GRUP 1	1	3	2	2
	2	2	2	1
	3	2	1	1
	4	3	2	2
	5	3	1	1
	6	3	2	2
	ORTALAMA	2.66	1.66	1.5
	SD	0.47	0.47	0.5
GRUP 2	1	1	0	0
	2	2	1	1
	3	1	1	0
	4	1	0	0
	5	2	1	1
	6	1	0	0
	ORTALAMA	1.33	0.5	0.33
	SD	0.47	0.5	0.47
GRUP 3	1	2	1	0
	2	3	2	2
	3	2	1	1
	4	2	1	1
	5	2	1	1
	6	2	1	1
	ORTALAMA	2.16	1.16	1
	SD	0.37	0.37	0.57

Tablo 10: Deneklerin Miyelinizasyon Oranları (Miyelinli akson yok = 0, Nadir miyelinli akson=1,Seyrek, düzensiz, ince miyelinli akson = 2, Sık, düzenli, kalın miyelinli akson=3)

GRUPLAR	DENEK	PROKSİMAL ANASTOMOZ	GREFT	DİSTAL ANASTOMOZ DİSTALİ
GRUP 1	1	0	1	1
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	1	0
	5	1	0	0
	6	0	0	0
	ORTALAMA	0.16	0.33	0.16
	SD	0.37	0.47	0.37
GRUP 2	1	0	0	0
	2	2	1	2
	3	0	1	1
	4	1	0	0
	5	0	1	1
	6	0	0	1
	ORTALAMA	0.5	0.5	0.83
	SD	0.76	0.5	0.68
GRUP 3	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	1	1	1
	4	0	1	1
	5	0	0	0
	6	1	1	1
	ORTALAMA	0.33	0.5	0.5
	SD	0.47	0.5	0.5

Tablo 11: Deneklerin Fibrozis Oranları (Fibrozis yok = 0, Hafif fibrozis=1, Orta derecede fibrozis = 2, Ağır fibrozis =3)

GRUPLAR	DENEK	PROKSİMAL ANASTOMOZ	GREFT	DİSTAL ANASTOMOZ DİSTALİ
GRUP 1	1	0	1	1
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	1	0
	5	1	1	1
	6	0	0	0
	ORTALAMA	0.16	0.5	0.33
	SD	0.37	0.5	0.47
GRUP 2	1	0	1	1
	2	2	2	2
	3	0	1	1
	4	1	1	1
	5	0	1	1
	6	0	0	1
	ORTALAMA	0.5	1	1.16
	SD	0.76	0.57	0.37
GRUP 3	1	0	0	1
	2	0	0	0
	3	1	1	1
	4	0	1	1
	5	0	0	0
	6	1	1	1
	ORTALAMA	0.33	0.5	0.66
	SD	0.47	0.5	0.47

Tablo 12: Deneklerin Ödem Miktarları (Ödem yok = 0, Hafif ödem=1, Orta derecede ödem = 2, Yaygın ödem =3)

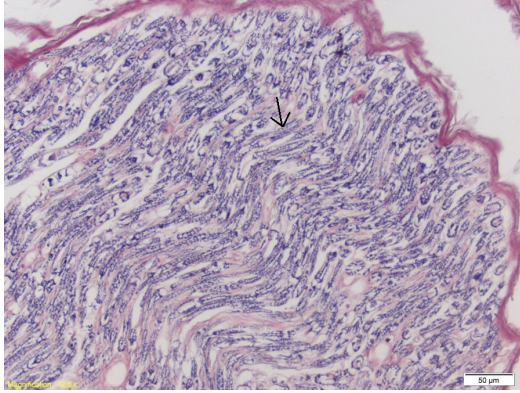
GRUPLAR	DENEK	PROKSİMAL ANASTOMOZ	GREFT	DİSTAL ANASTOMOZ DİSTALİ
GRUP 1	1	0	1	1
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
	5	1	1	1
	6	0	0	0
	ORTALAMA	0.16	0.33	0.33
	SD	0.37	0.47	0.47
GRUP 2	1	0	1	1
	2	1	2	2
	3	0	1	1
	4	1	1	1
	5	0	1	1
	6	0	0	1
	ORTALAMA	0.33	1	1.16
	SD	0.47	0.57	0.37
GRUP 3	1	0	0	1
	2	0	0	0
	3	0	1	1
	4	0	0	1
	5	0	0	0
	6	1	1	1
	ORTALAMA	0.16	0.33	0.66
	SD	0.37	0.47	0.47

Tablo 13: Deneklerin Mast Hücre Yoğunluğu (Mast Hücresi yok = 0, 1-2 mast hücresi =1, 3-4 mast hücresi = 2, 5 ve daha fazla mast hücresi =3)

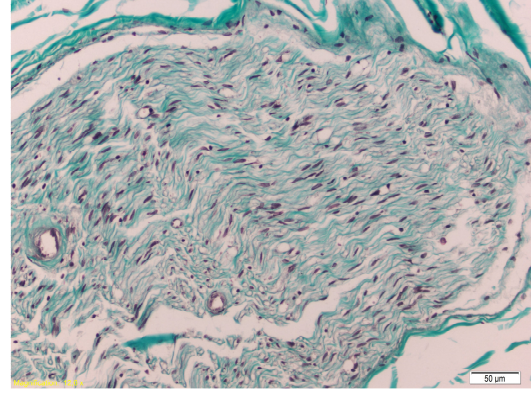
Kontrol Grubu: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH) ile boyanmış siyatik sinire ait transvers kesitlerde en dışta epinöriumla çevrili, epinörium kılıf içerisinde fasiküler şekilde bir araya gelmiş akson demetlerinin etrafında perinörium tabakası görülüyordu. En içte ise aksonlar etrafında ince-gevşek bağ dokusundan oluşan endonörium tabakası izleniyordu.

Giemsa ve Mason ile boyanmış olan kesitlerde miyelinli aksonların miyelin kılıfları değişik çap ve farklı kalınlıklarda koyu mavi renkte boyanmış olarak görüldü (Resim 5).

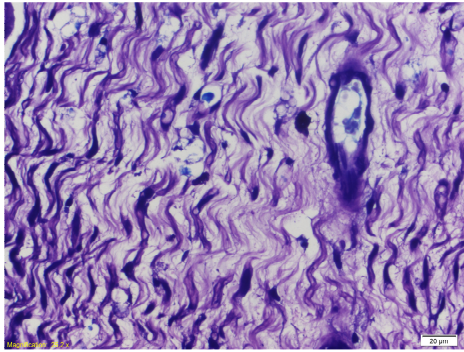
Histopatolojik inceleme aksonlar, Schwann hücreleri ve endonöriuma ait tüm yapıların normal strüktürel görünümde olduğunu gösterdi (Resim 5).



FosfotungstikAsit-Hematoksilen (PTAH) X50



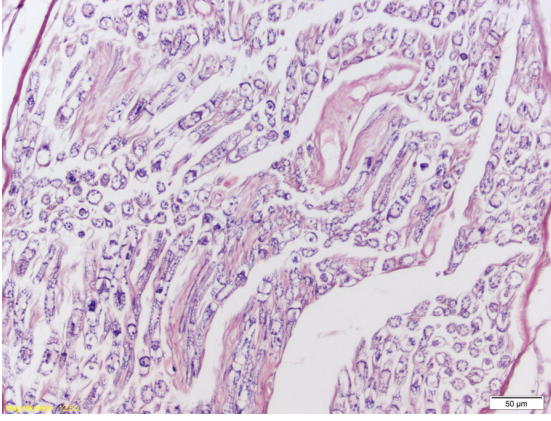
Mason Trichrom X50



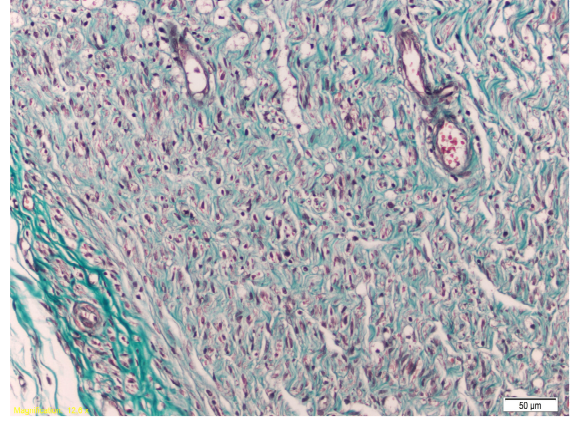
Giemsa X20

Resim 5: FosfotungstikAsit-Hematoksilen (PTAH) X50, Mason Trichrom X50, Giemsa X20

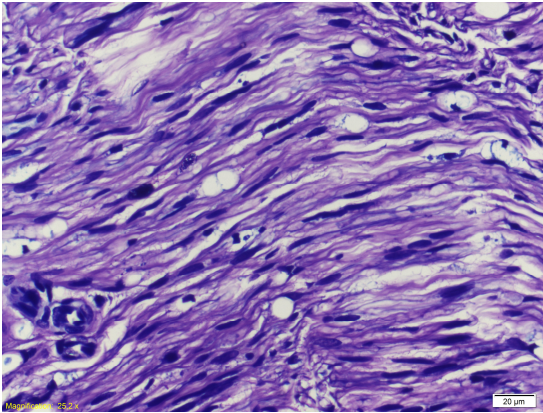
Grup 1 Proksimal Anastomoz: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH) ile boyanmış transvers kesitlerde sinire ait bağ doku kılıfları normal yapısında değerlendirildi. Akson aralarındaki alanlarda meydana gelmiş genişlemeler endonörium tabakasındaki minimal ödem lehine değerlendirildi (Resim 6). Giemsa ve Mason ile boyanmış sinir kesitlerinde; myelin kılıflardaki düzensizlik, kalınlıklarındaki farklılıklar ve ince myelin kılıflı akson sayısında artış olduğu gözlemlendi. Myelinli aksonlar arasında Schwann hücre kılıfı ile sarılı myelinsiz aksonlar mevcuttu. Buna karşın Schwann hücreleri ile endonöriumun normal strüktürel yapıda olduğu gözlemlendi.



A: PTAH X50



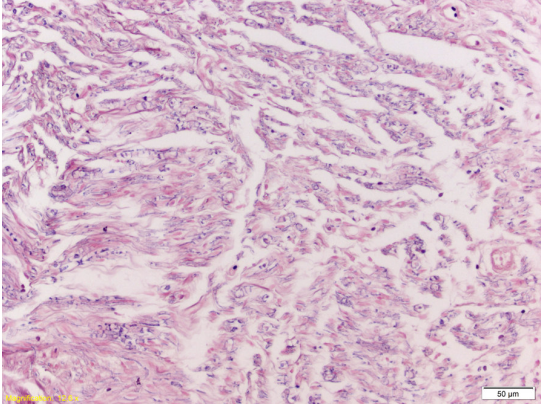
B: Mason Trichrom X50



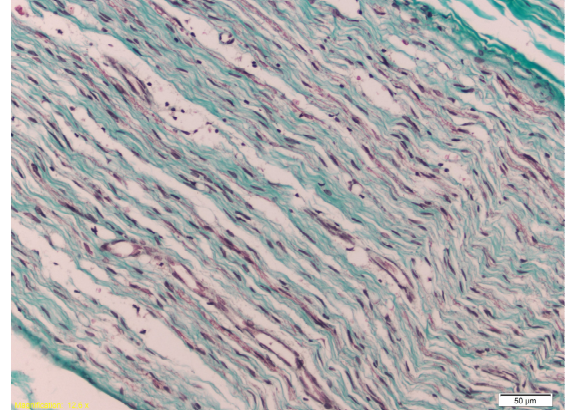
C: Giemsa X20

Resim 6: A: PTAH X50, B: Mason Trichrom X50, C: Giemsa X20

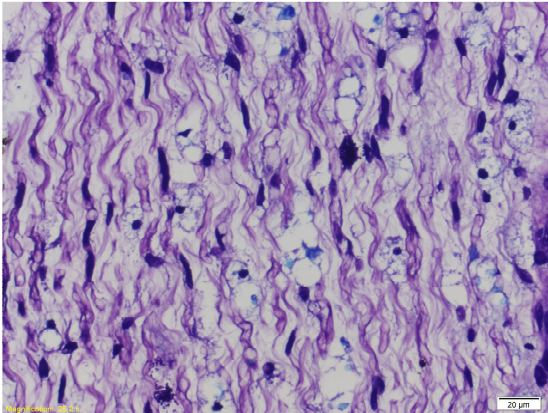
Grup 2 Proksimal Anastomoz: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH) ile boyanmış transvers kesitlerde sinirin periferik bölgesinde yoğun fibrozis ve küçük çaplı akson yapıları gözlemlendi. Sinir kesitinin santral bölgesinde ise fibrozis izlenmeyip, daha kalın çaplı aksonların varlığı saptandı (Resim 7). Giemsa ve Mason ile boyanan kesitlerde ise ince-orta kalınlıktaki myelin kılıflarının çoğunlukta olduğu görüldü. Myelin kılıflarda yer yer düzensizlik ve ondülasyon mevcuttu. Aksonlar arasındaki endonöral dokuda minimal fibrozis ve eşlik eden myelinsiz aksonlar saptandı.



PTAH X50



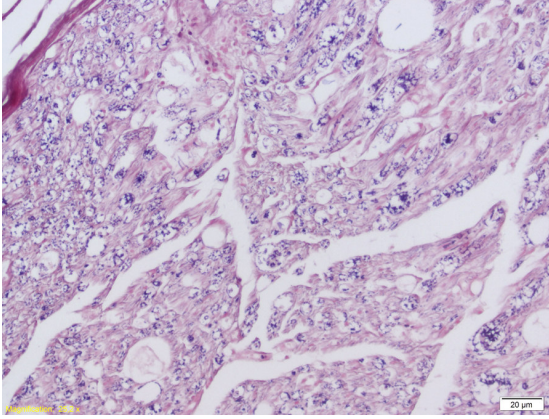
Mason Trichrom X50



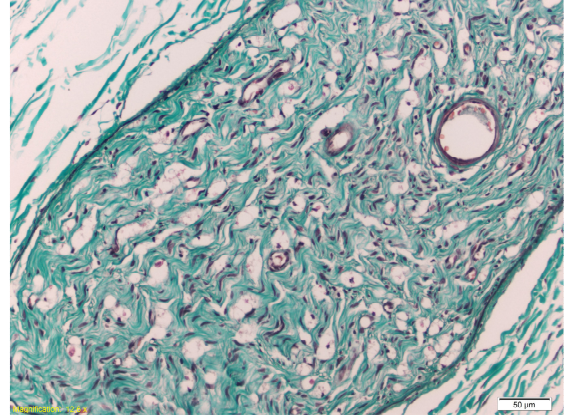
Giemsa X20

Resim 7: PTAH X50, Mason Trichrom X50, Giemsa X20

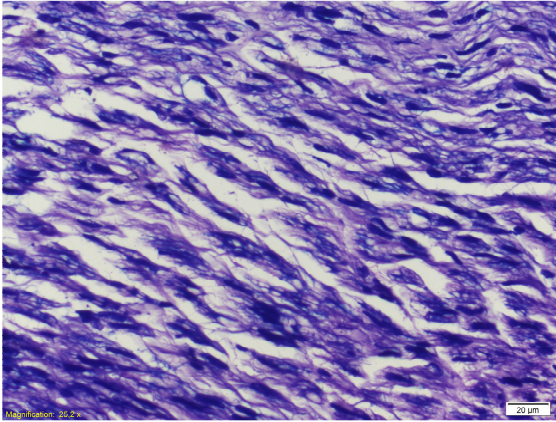
Grup 3 Proksimal Anastomoz: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH) ile boyanmış kesitlerde aralarında minimal düzeyde ödematöz alanların eşlik ettiği değişik çaplarda akson kesitleri saptandı (Resim 8). Giemsa ve Mason ile boyanan kesitlerde düzenli myelin kılıfla çevrilmiş, ağırlıklı olarak orta çaplı myelinli aksonlar görüldü. Myelinli aksonların bazılarında myelin kılıf ile aksolemma arasında vakuoller gözlemlendi. Yer yer myelinsiz akson kesitleri de mevcuttu.



PTAH X20



Mason Trichrom X50

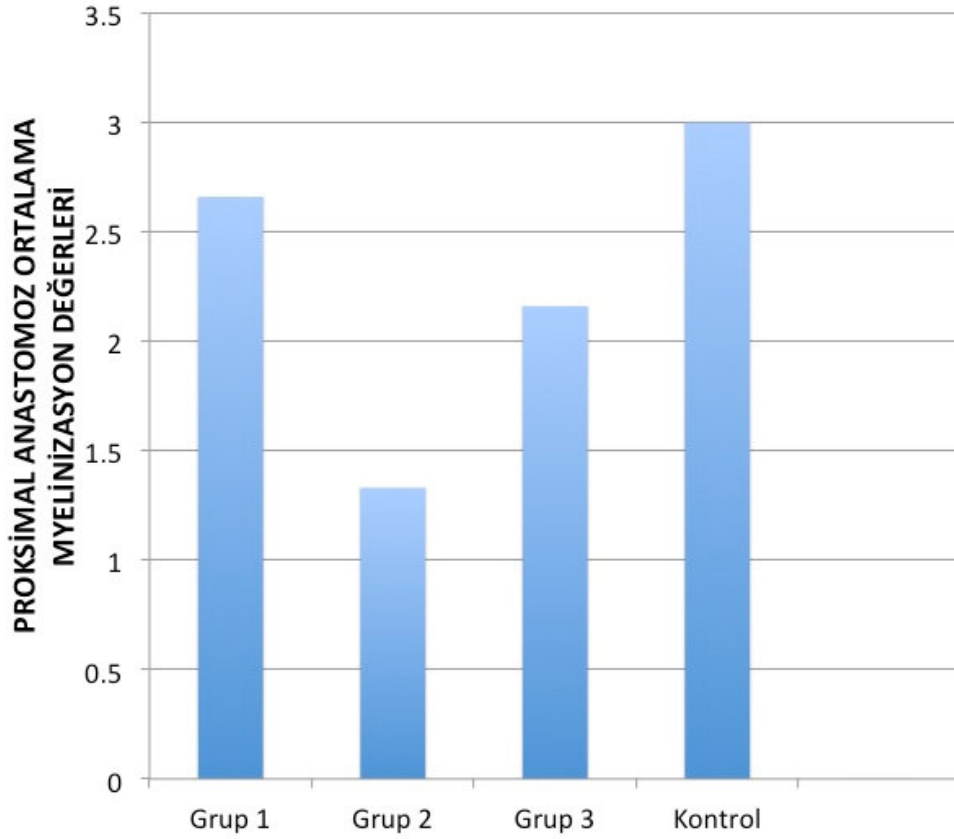


Giemsa X20

Resim 8: PTAH X20, Mason Trichrom X50, Giemsa X20

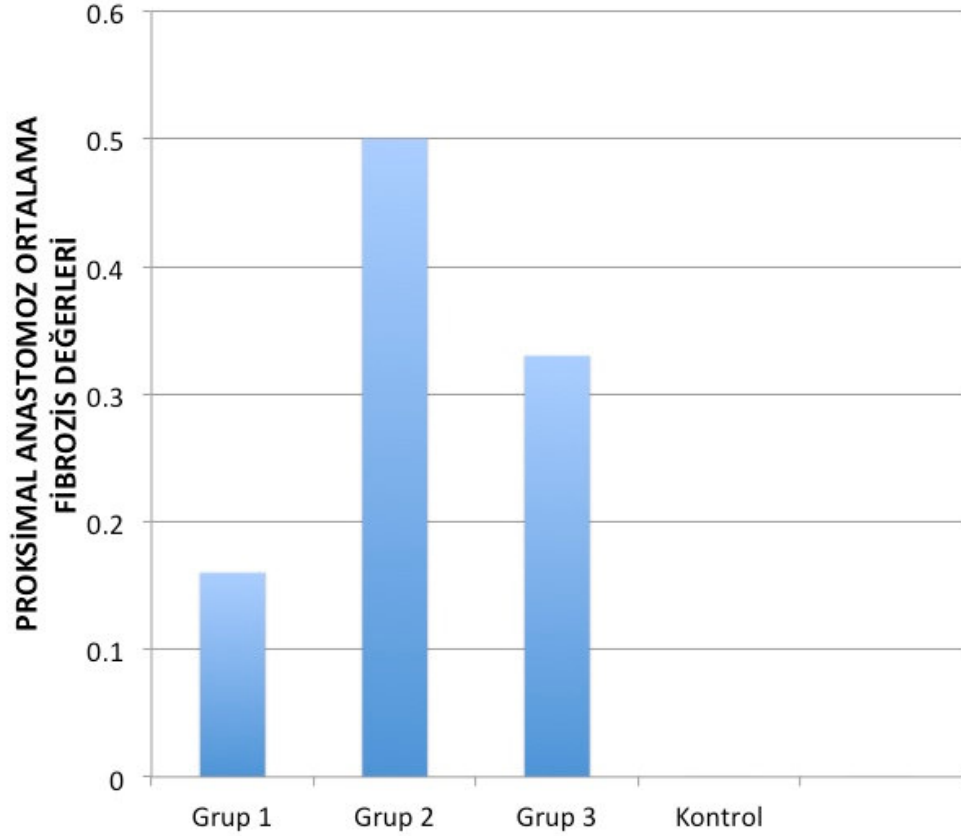
Gruplar arasında proksimal anastomoz myelinizasyon ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. ($p=0.027$) Mann Whitney U testi sonrası ise;

- Grup 1 ile 2'deki deneklerin proksimal anastomoz bölgesindeki myelinizasyon oranları anlamlı şekilde farklı idi ($p=0.007$).
- Grup 1 ile 3'teki deneklerin proksimal anastomoz bölgesindeki myelinizasyon oranları arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0.093$).
- Grup 2 ile 3'teki deneklerin proksimal anastomoz bölgesindeki myelinizasyon oranları arasında anlamlı farklılık vardı ($p=0.018$).



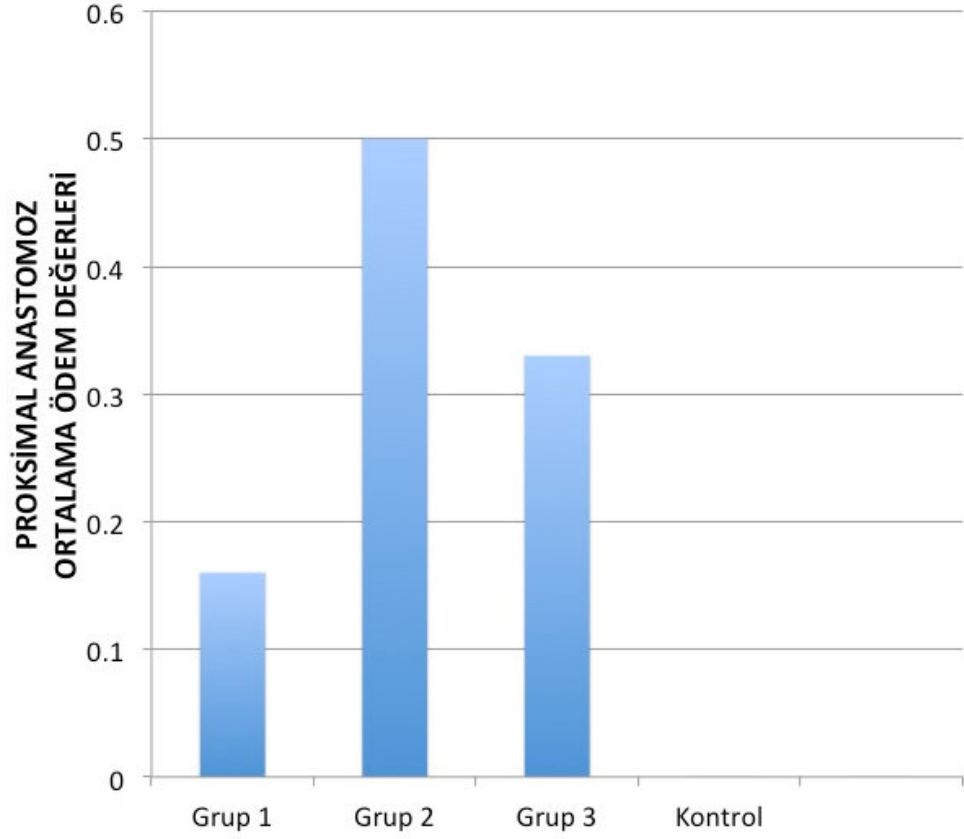
Tablo 14: Proksimal Anastomoz Ortalama Myelinizasyon Değerleri

Gruplar arasında proksimal anastomoz fibrozis ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0.758$). Bununla birlikte fibrozis ortalamaları Grup 2>Grup 3> Grup1 şeklinde oldu.



Tablo 15: Proksimal Anastomoz Ortalama Fibrozis Değerleri

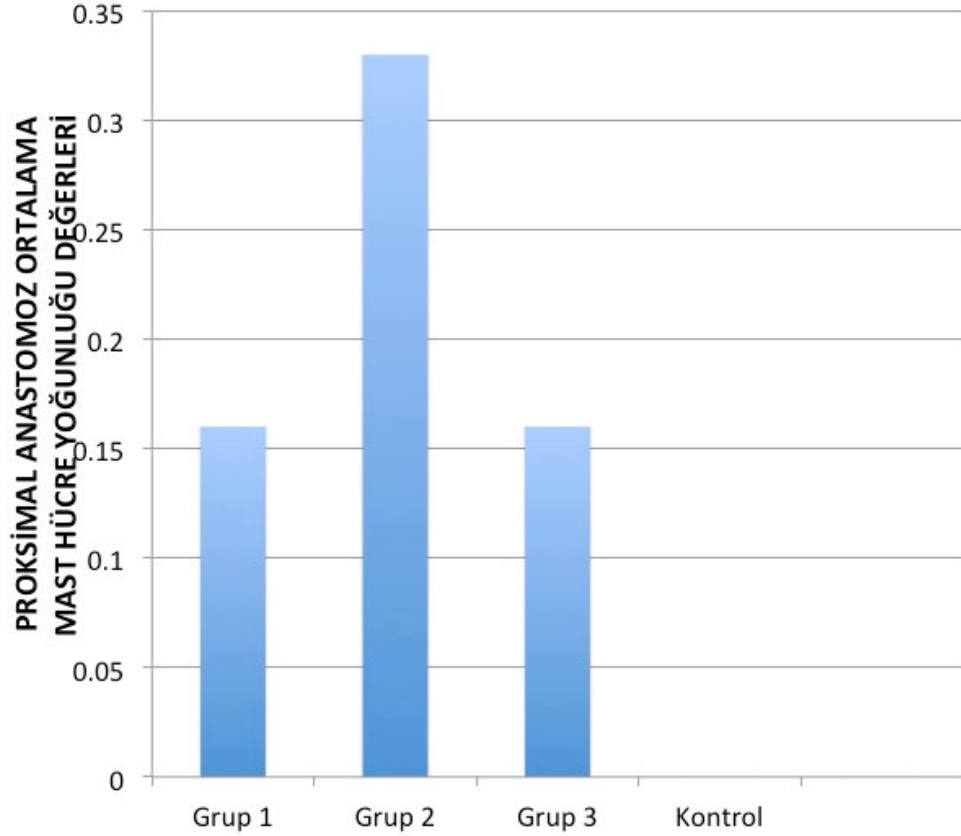
Gruplar arasında proksimal anastomoz ödem ortalamaları Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Fakat istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0.729$). Proksimal anastomoz ödem sıralaması ise; Grup 2>Grup 3> Grup1 şeklinde oldu.



Tablo 16: Proksimal Anastomoz Ortalama Ödem Değerleri

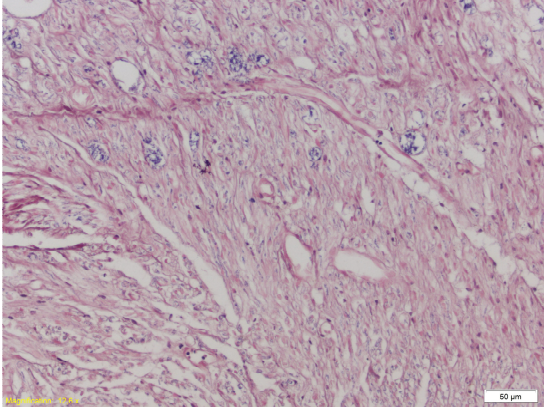
Gruplar arasında proksimal anastomoz bölgesindeki mast hücre yoğunluğu ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0.738$). Mast hücre yoğunluğu sıralaması ise;

Grup 2>Grup 3> Grup1 şeklinde oldu.

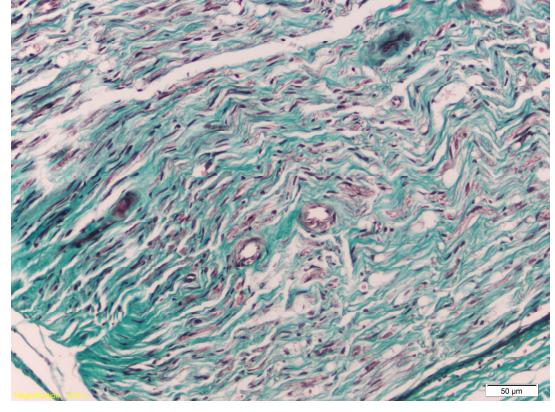


Tablo 17: Proksimal Anastomoz Ortalama Mast Hücre Yoğunluğu Değerleri

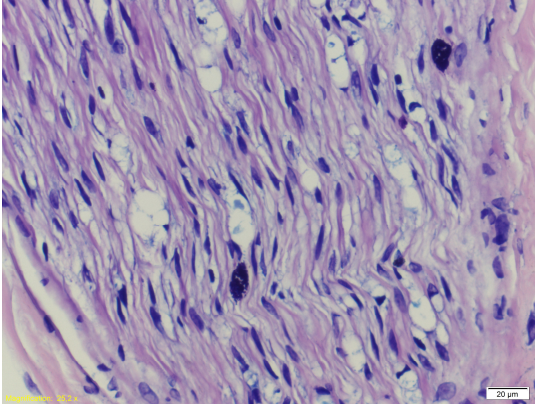
Grup 1 Greft: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH) ile boyanmış kesitlerde sinir bağ doku kılıflarının doğal yapıda olduğu görüldü. Aksonlar arasında mevcut olan genişlemeler perinörium ve endonörium tabakalarında minimal düzeyde ödem lehine değerlendirildi. Giemsa ve Mason ile boyanan kesitlerde myelin kılıflarda düzensizlik, ondülasyon ve kalınlık farklılıkları yanı sıra küçük çaplı-ince myelin kılıflı aksonların sayıca fazla olduğu görüldü. Bazı myelinli akson kesitlerinde periaksanal vakuolizasyon mevcuttu. Aksonlar arasındaki bağ dokuda ise orta derecede fibrozis ve çok sayıda myelinsiz akson mevcuttu.



PTAH X12.6



Mason Trichrom X12.6



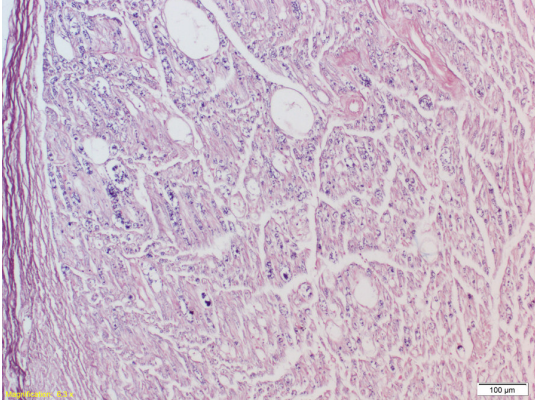
Giemsa X25.2

Resim 9: PTAH X12.6, Mason Trichrom X12.6, Giemsa X25.2

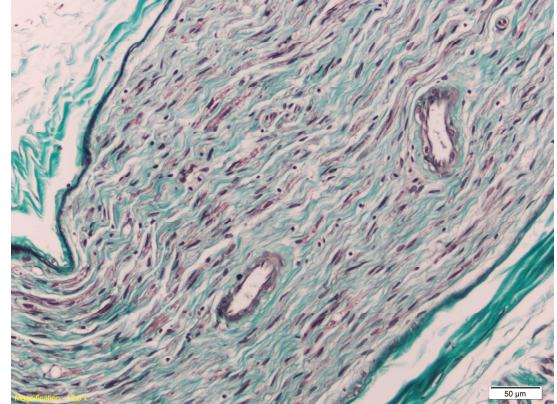
Grup 2 Greft: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH) ile boyanan kesitlerde vasküler media tabakası işe çevrili intraluminal gevşel bağ doku özellikli doku izlendi. Daha büyük büyütmelelerde yapılan incelemelerde bu bağ doku alanlarının değişik çaplarda akson yapılar içerdiği gözlemlendi.

Giemsa ve Mason ile boyanan kesitlerde ise kümelenmiş ince myelin kılıfların olduğu görüldü. Myelin kılıflarda yer yer düzensizlikler ve periaksonal vakuolizasyon tespit edildi. Çok sayıda Schwann hücresi görüldü. Aksonlar

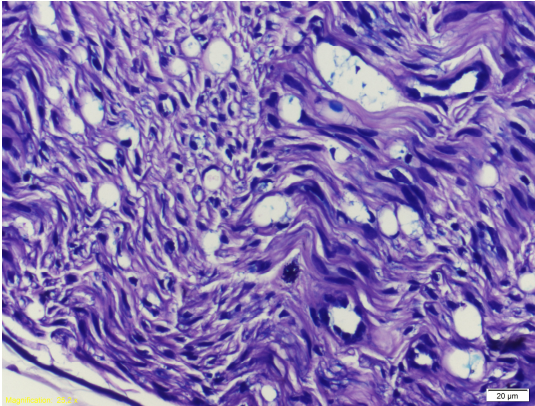
arasındaki endonöriumda fibrotik değişiklikler ve ödematöz alanlar yanısıra myelinsiz aksonlara da rastlandı.



PTAH X12.6



Mason Trichrom X12.6

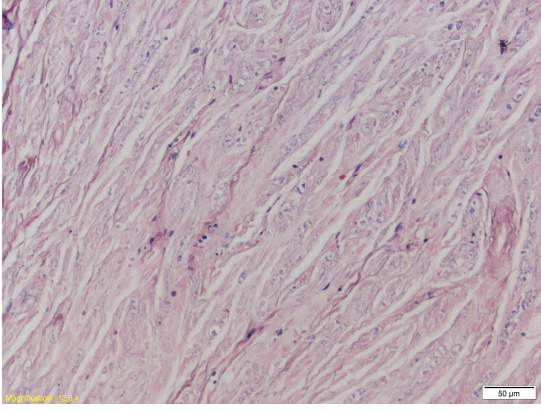


Giemsa X25.2

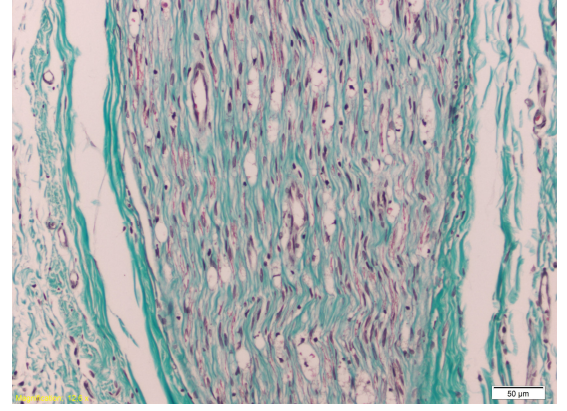
Resim 10: PTAH X12.6, Mason Trichrom X12.6, Giemsa X25.2

Grup 3 Greft: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH), Giemsa ve Mason ile boyanan kesitlerde periferde vasküler media tabakasına ait alanlar ve yer yer fibröz bağ doku varlığı izlendi. Transvers kesitlerde ise fibröz bağ doku içerisinde kümeler halinde küçük çaplı akson demetleri tespit gözlendi. Longitudinal kesitlerde yer yer myelin kılıflı aksonal yapılara rastandı. Bağ doku alanları içerisinde iri nükleuslu hücelerin yoğunluğundaki artış Schwann hücre

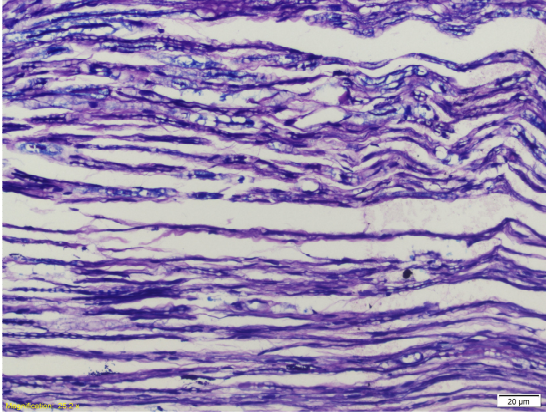
hiperplazisi lehine değerlendirildi. Ağırlıklı olarak ince-düzensiz myelin kılıflı küçük çaplı akson yapıları saptandı. Tüm kesit alanlarında minimal düzeyde ödem mevcuttu.



PTAH X12.6



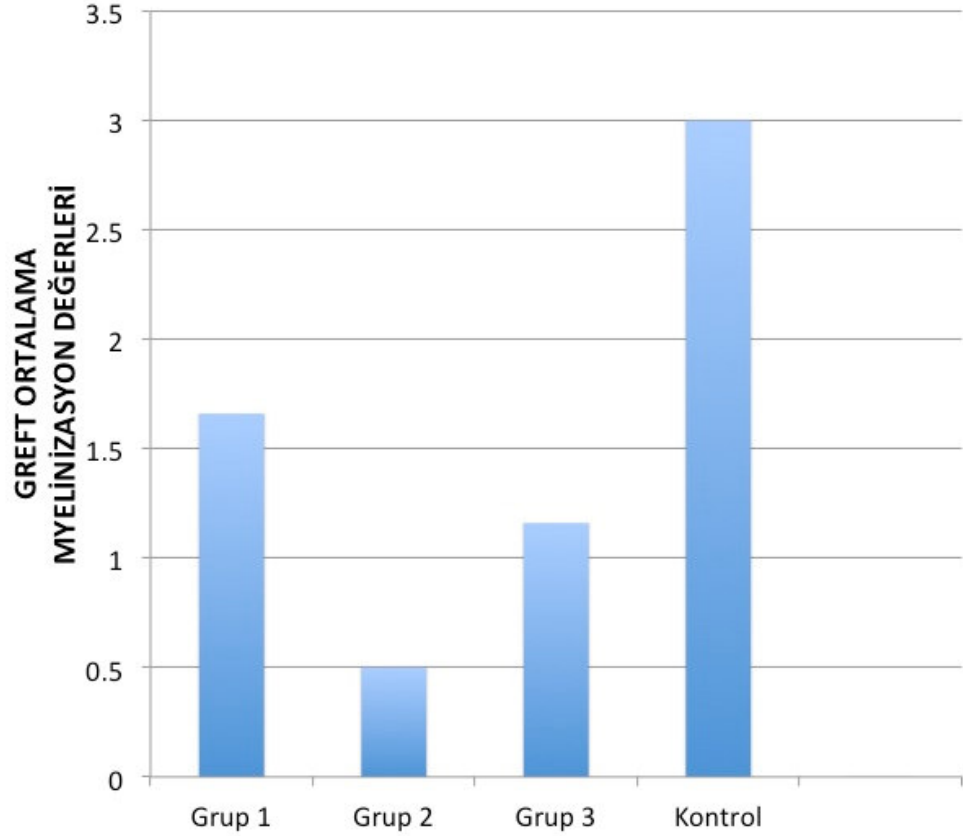
Mason trichrom X12.6



Giemsa X25.2

Resim 11: PTAH X12.6, Mason trichrom X12.6, Giemsa X25.2

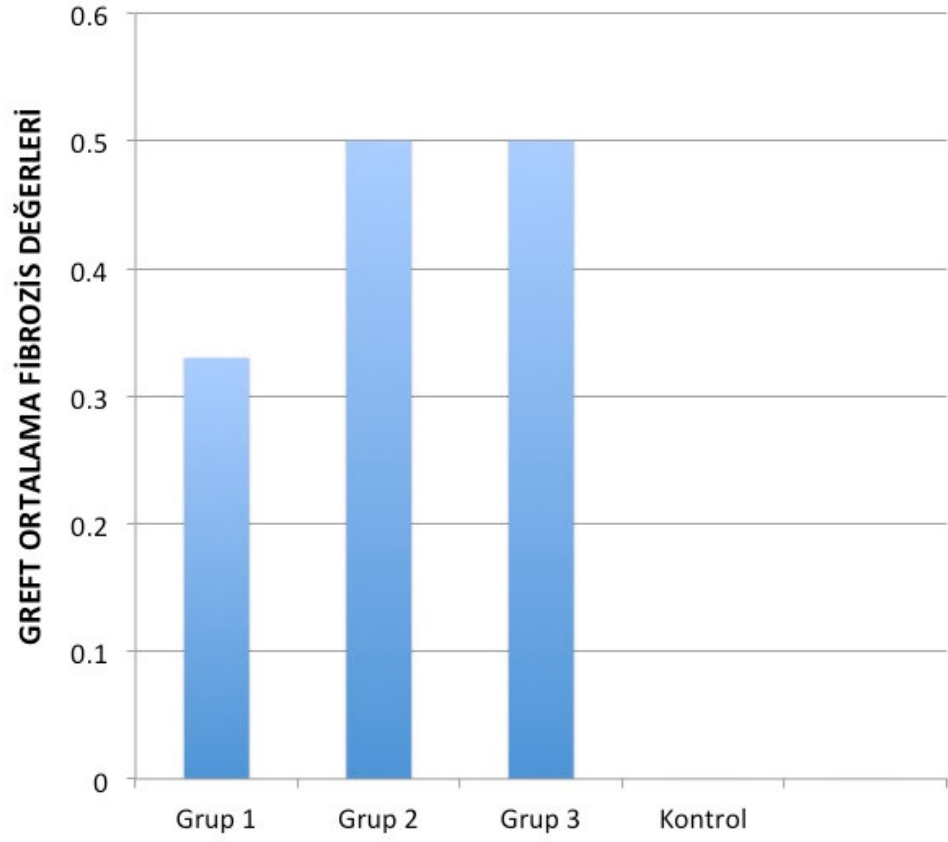
Gruplar arasında greft myelinizasyon ortalamaları Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0.027$) Mann Whitney U test analizi sonrası ise Grup 1-3 arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0.093$).



Tablo 18: Deneklerin Greft Myelinizasyon Oranları

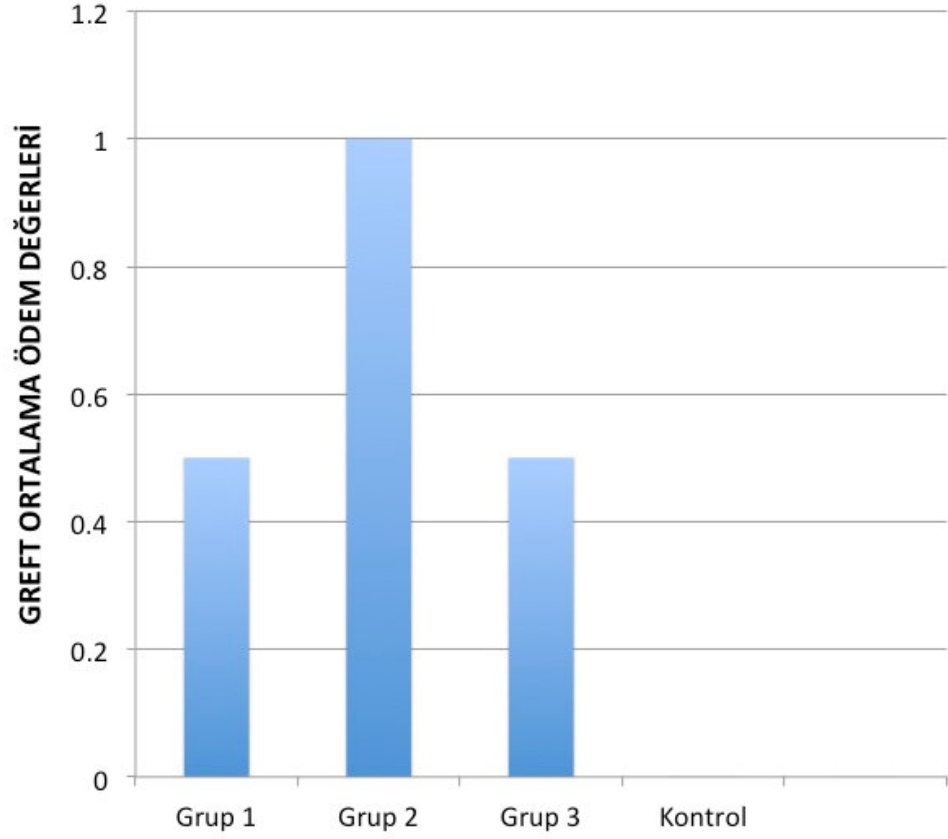
- Grup 1 ile 2 'deki deneklerin greft bölgesindeki myelinizasyon oranları arasında anlamlı farklılık vardı ($p=0.011$)
- Grup 1 ile 3' deki deneklerin greft bölgesindeki myelinizasyon oranları arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0.093$).
- Grup 2 ile 3 'deki deneklerin greft bölgesindeki myelinizasyon oranları arasında anlamlı farklılık vardı ($p=0.043$).

Gruplar arasında greft fibrozis ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.799$). Grup 2 ve Grup 3 fibrozisin daha fazla olduğu gruplardı.



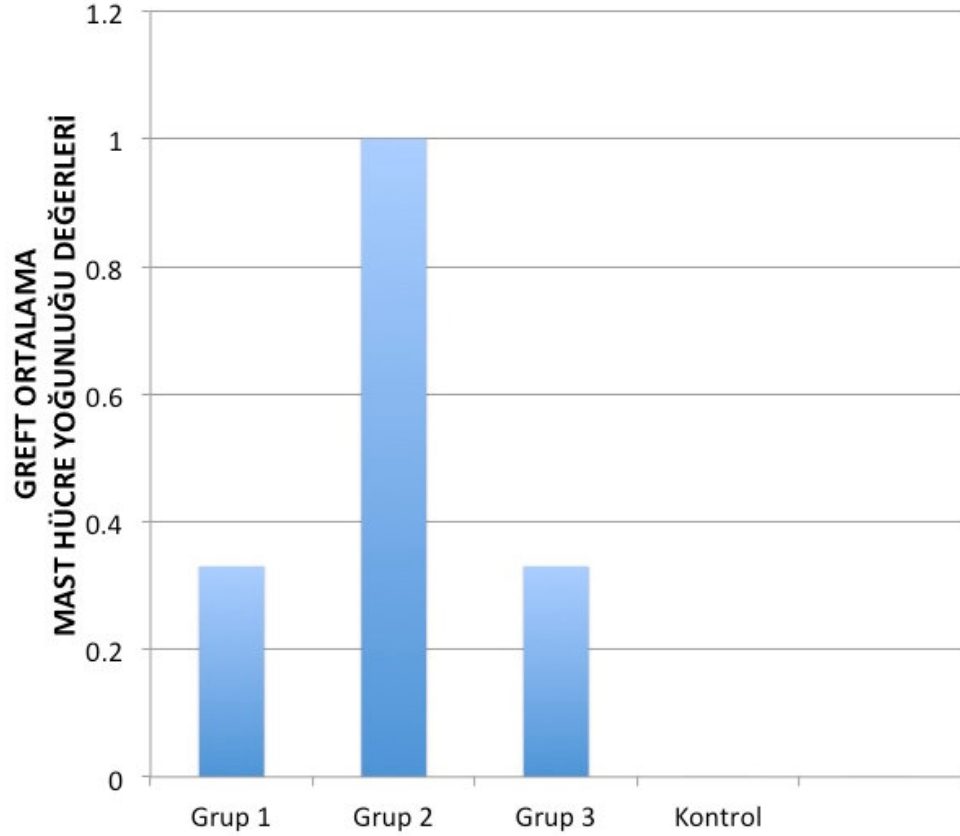
Tablo 19: Deneklerin Greft Fibrozis Oranları

Gruplar arasında greft ödem ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.278$). Grup 2 ve Grup 3 ödemin daha fazla olduğu gruplardı. (Tablo 19)



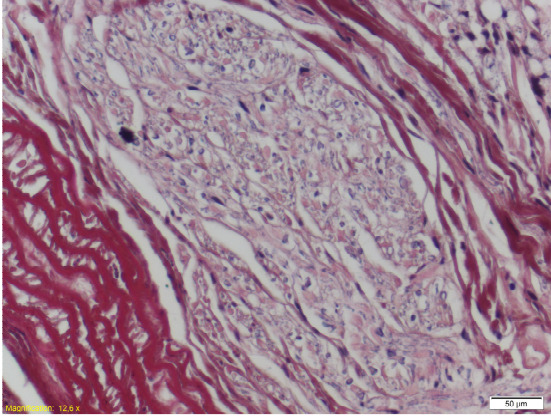
Tablo 20: Deneklerin Greft Ödem Oranları

Gruplar arasında greft mast hücre yoğunluğu Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.108$). Grup 2, mast hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu gruptu (Tablo 20).

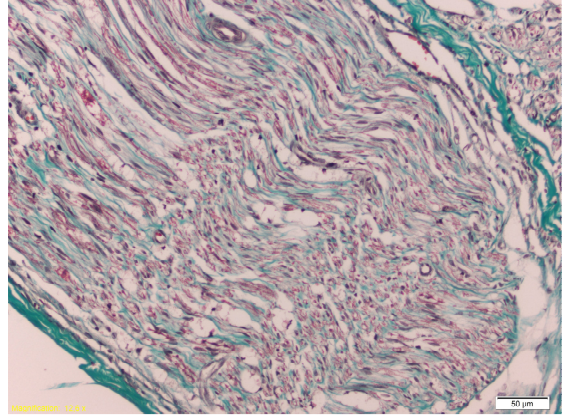


Tablo 21:Deneklerin Greft Mast Hücre Yoğunluğu Oranları

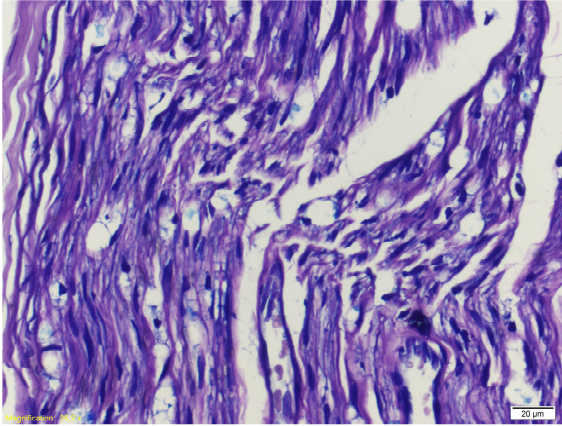
Grup 1 Distal Anastomoz Distali: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH) ile boyanan kesitlerde sinire ait bağ doku kılıflarının doğal yapıda olduğu görüldü. Akson ve periferik myelin tabakasında eozinofilik boyanma yoğunluğunda azalma tespit edildi. Kesitlerde mevcut artmış nükleus yoğunluğu Schwann hücre hiperplazisi lehine değerlendirildi. Giemsa ve Mason ile boyanan kesitlerde myelin kılıflarda ondülasyon-düzensizlik ve kalınlık farklılıkları ile küçük çaplı-ince myelin kılıflı aksonların sayıca fazla olduğu gözlemlendi. Aksonlar arasındaki bağ dokuda minimal fibrozis ve ödem mevcut olup, değişik çaplarda çok sayıda myelinsiz aksonlara da rastlandı.



PTAH X12.6



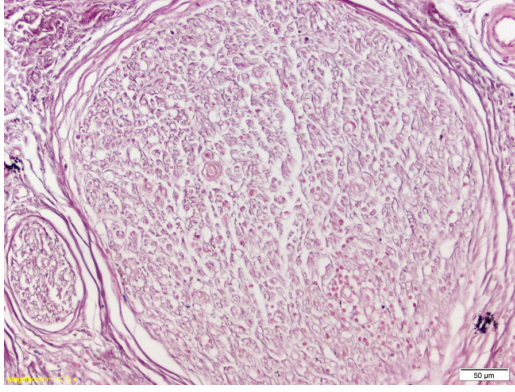
Mason trichrom X12.6



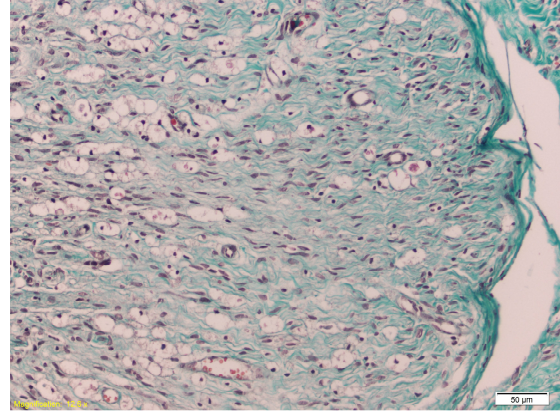
Giemsa X25.2

Resim12: PTAH X12.6, Mason trichrom X12.6, Giemsa X25.2

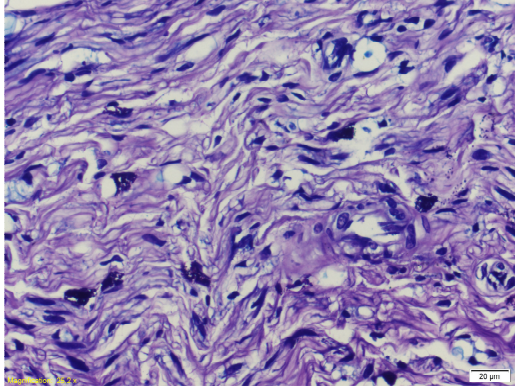
Grup 2 Distal Anastomoz Distali: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH), Giemsa ve Mason ile boyanan kesitlerde ileri derecede düzensiz deforme akson yapıları ve aralarında aşırı ödem artışı ve mast hücreleri görüldü. Aksonlar etrafındaki myelin kılıfların kaybolup, nörokeratin ağ şekline dönüştüğü gözlemlendi. Ayrıca Schwann hücre kılıfı ile çevrili myelinsiz akson kesitlerine rastlandı.



PTAH X12.6



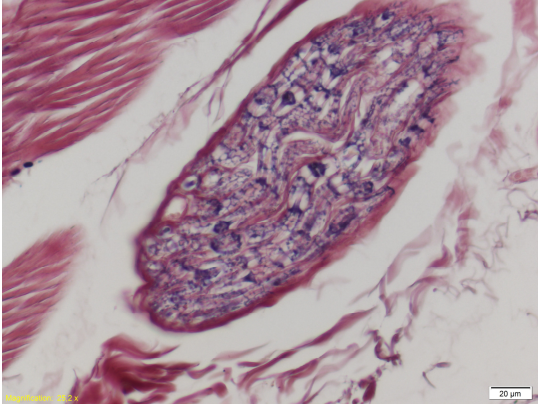
Mason Trichrom X12.6



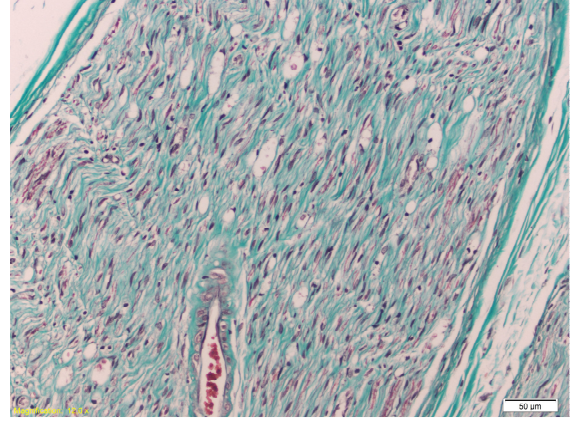
Giemsa X25.2

Resim 13: PTAH X12.6, Mason Trichrom X12.6, Giemsa X25.2

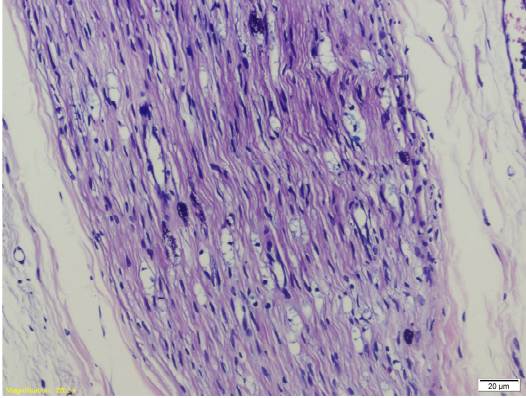
Grup 3 Distal Anastomoz Distali: Fosfotungstik Asit-Hematoksilen (PTAH) ile boyanan kesitlerde küçük çaplı akson yapıları ve aralarında ödematöz alanlar görüldü. Schwann hücrelerinde artış gözlemlendi. Giemsa ve Mason ile boyanan kesitlerde yer yer mast hücreleri ve ince-düzensiz myelin kılıflı küçük akson yapıları saptandı. Endonörium bağ dokuda minimal fibrotik değişikliklere rastlandı.



PTAH X12.6



Mason Trichrom X12.6

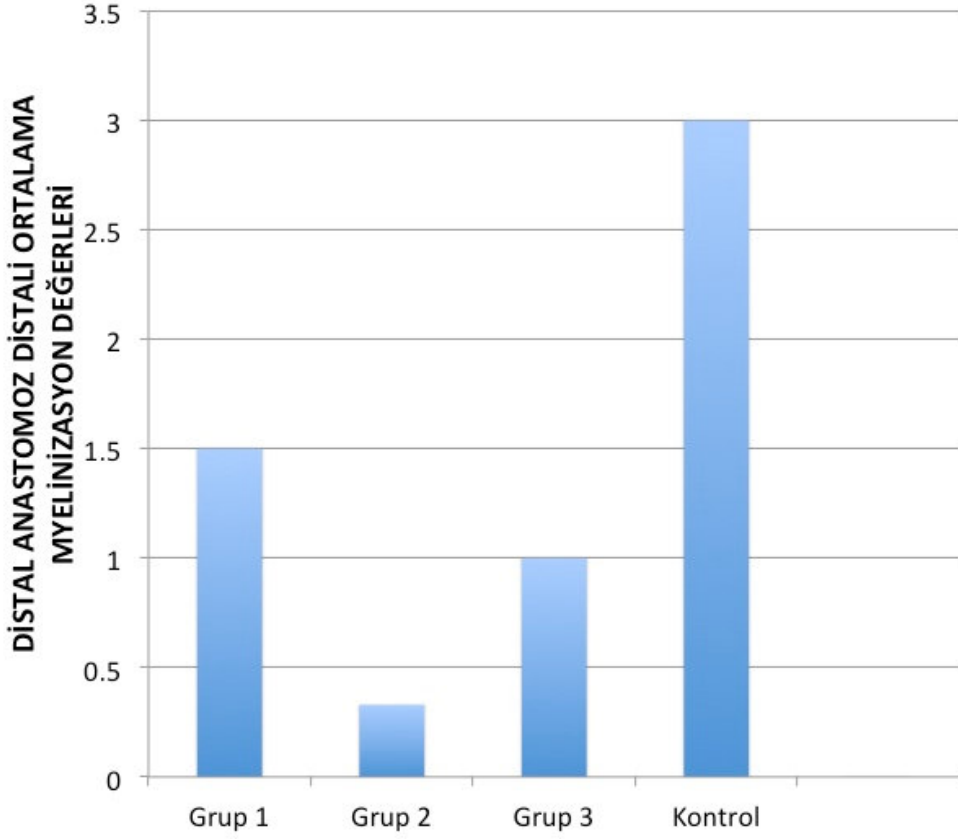


Giemsa X25.2

Resim 14: PTAH X12.6, Mason Trichrom X12.6, Giemsa X25.2

Gruplar arasında distal anastomoz distali myelinizasyon ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.105$). Bununla birlikte deneklerin myelinizasyon sıralaması;

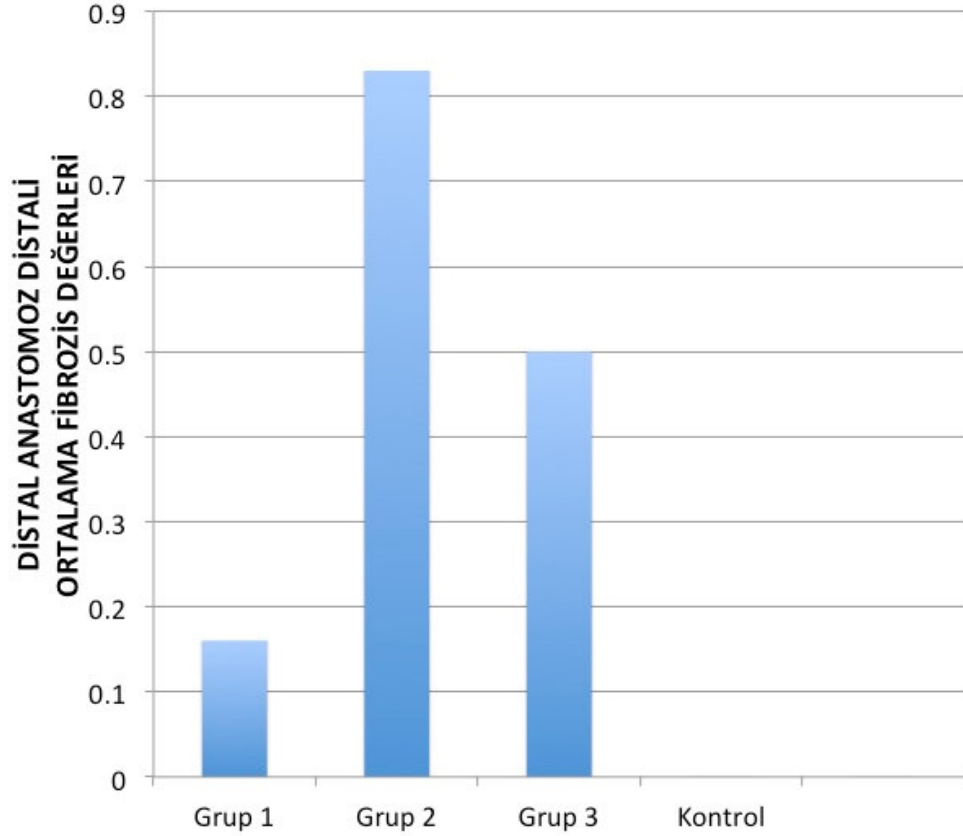
Grup 1>Grup 3> Grup 2 şeklinde oldu.



Tablo 22: Deneklerin Distal Anastomoz Distali Myelinizasyon Oranları.

Gruplar arasında distal anastomoz distali fibrozis ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.041$). Denekler arasındaki distal anastomoz distali fibrozis sıralaması;

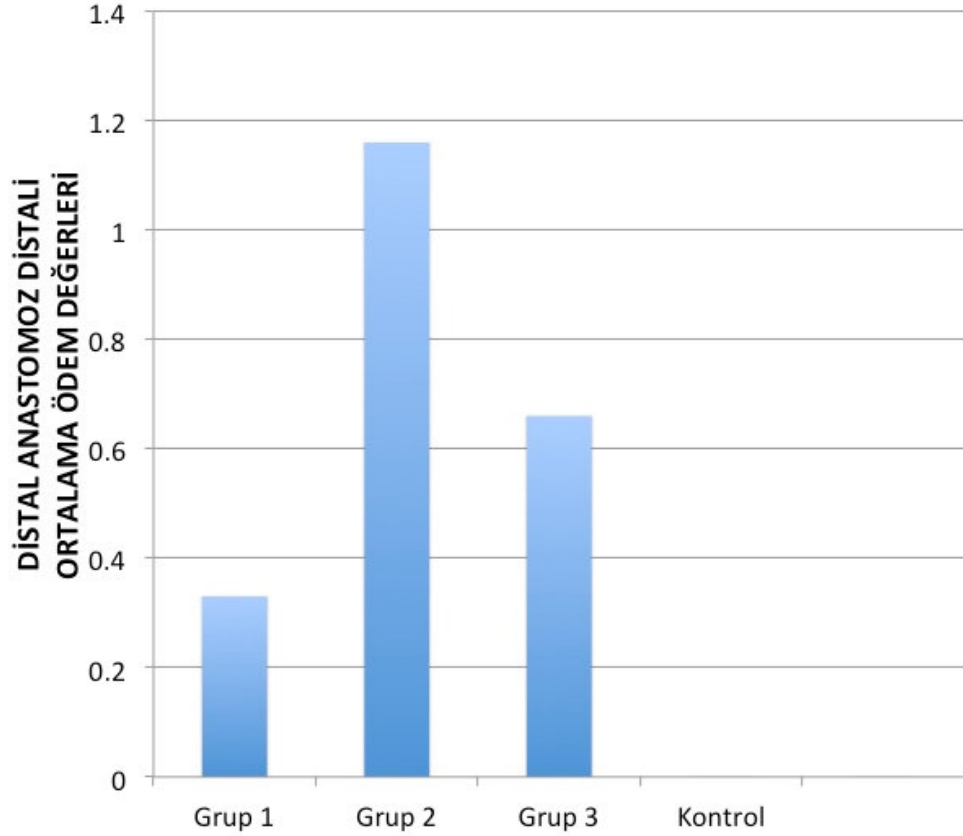
Grup 2>Grup 3>Grup1 şeklinde oldu (Tablo 22).



Tablo 23: Deneklerin Distal Anastomoz Distali Fibrozis Oranları.

Gruplar arasında distal anastomoz distali ödem ortalamaları Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.041$). Mann Whitney U test analizi sonrası ise Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 23)

- Grup 1 ile Grup 2 arasında anlamlı farklılık yoktu. ($p=0.018$)
- Grup 1 ile Grup 3 arasında anlamlı farklılık yoktu. ($p=0.269$)
- Grup 2 ile Grup 3 arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0.092$).

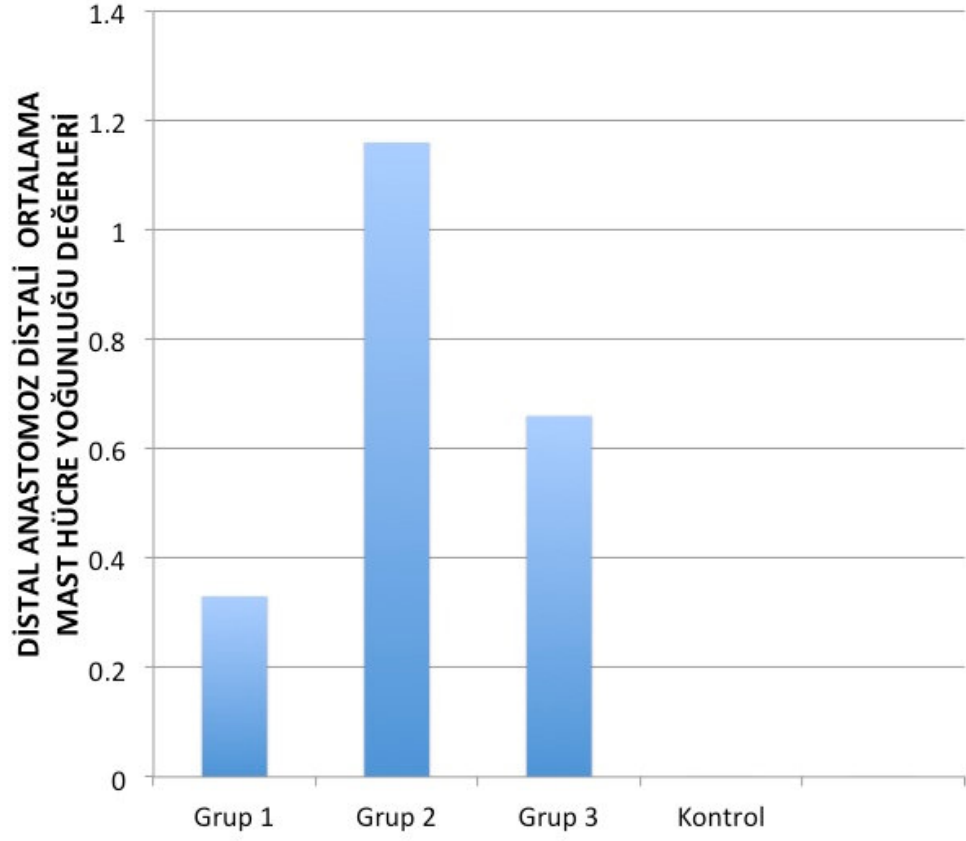


Tablo 24: Deneklerin Distal Anastomoz Distali Ödem Oranları.

Gruplar arasında distal anastomoz distali mast hücre yoğunluğu Kruskal-Wallis test analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.041$). Mann Whitney U test analizi sonrası ise Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Gruplar arasındaki mast hücre yoğunluğu;

Grup 2>Grup 3> Grup 1 şeklinde oldu (Tablo 24).

- Grup 1 ile Grup 2 arasında anlamlı farklılık yoktu. ($p=0.018$)
- Grup 1 ile Grup 3 arasında anlamlı farklılık yoktu. ($p=0.269$)
- Grup 2 ile Grup 3 arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0.092$).



Tablo 25: Deneklerin Distal Anastomoz Distali Mast Hücre Oranları.

5. TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmalarının tedavisi halen günümüzde önemli bir sorun olmaya devam etmekte olup, tedavi protokolü ve sonuçları ile ilgili tam bir uzlaşma sağlanamamıştır. Son yıllarda, sinir iyileşmesi üzerine yapılan çalışmaların yardımıyla periferik sinir yaralanmalarındaki patofizyolojik mekanizmalar ve moleküler düzeydeki değişiklikler aydınlanmaya başlamışsa da, ciddi yaralanmalar sonrasında halen istenilen boyutlarda sinir iyileşmesi elde edilememektedir. Pek çok farklı nedenlerle oluşabilen periferik sinir yaralanmalarının tedavisindeki asıl amaç, sinir bütünlüğünün ve dolayısı ile iletinin tekrar sağlanması, böylelikle sinirin bağlantılı olduğu uç organ fonksiyonlarının en az kayıpla yerine konulabilmesidir. Başarılı bir sinir rejenerasyonu, aksonal tomurcuklanma, büyüme, uç organ reinnervasyonu ve santral sinir sistemi ile rejenere olan liflerin integrasyonu gibi pek çok aşamadan oluşan karmaşık bir süreçtir (175).

Sinir yaralanmasını takiben miyelin dejenerasyonu ilk 6 saat içerisinde başlar ve 6-12. saat içinde sinir-kan bariyeri bozulur. Schwann hücreleri ise yaralanmayı takiben 24 saat içinde aktif hale geçer. Çekirdek ve sitoplazmik büyüme gösteren hücreler hızla bölünerek, dejenerasyon ve tamir yoluna yardım edecek bir çok molekülü eksprese ederler(106). Her ne kadar bu değişiklikler yaralanmayı takiben 1-2 saat içinde başlasa da distal kısımdaki morfolojik değişiklikler 2-3 gün içerisinde görünür hale gelir. Aksonal şişme sonrası myelin fragmente olur. Myelin sistem yıkımı ise sinir kesisinden sonraki 72. saatte görülmeye başlar (176). Sinirin distal segmentinde Wallerian dejenerasyon meydana gelir. Bu dejenerasyonda distalde aksoplazma ve

myelin, Schwann hücreleri ve makrofajlar tarafından fagositoza uğrar. Böylece akson rejenerasyonu için ortam hazırlanır (135). Wallerian dejenerasyon , makrofajların artması ve Schwann hücrelerinin proliferasyonunu aktive etmesi ile başlar. Bu proliferasyon üçüncü gün pik yapar ve yaklaşık 2 hafta sürer. Schwann hücre tüpü debrisleri ise artan makrofajlar tarafından temizlenir (177). Artmış makrofajlar ise rejenerasyon için gerekli olan insülin-like growth factor (ILGF) ve nerve growth factor (NGF) gibi nörotrofik faktörlerin salınmasını stimüle eden interleukin-1 (IL-1) üretir.

Nörotropinler ise hücre yüzeyinde tirozin kinaz reseptörlerinin alt grubu olan spesifik reseptörlere bağlanarak, seçilmiş nöronların apoptozisine neden olur.

Periferik sinir yaralanmalarında, rejenerasyon filizleri sinirin proksimal kısmının en distalindeki Ranvier düğümünden başlar. Daha büyük travmalarda ise bu rejenerasyon filizleri zarar görmüş sinirin daha proksimalinden başlar. Endonörium ve perinöriumda fibroblast aktivitesine bağlı olarak kollajen sentezi meydana gelir. Yeni oluşan endonöral kollajen Schwann hücrenin bazal laminası dışında oluşarak endonöral tüp kalınlığında artışa neden olur. Reinnervasyon süresindeki uzama kollajen yoğunluğunda artışa ve sonuç olarak endonöral tüpün daralmasına yol açar. Yara iyileşme sürecinde gelişen skar formasyonu rejenerasyon ünitesinin distale ilerlemesini kesintiye uğratır. Bu olay ratlarda 48 saat iken insanda birkaç hafta civarındadır. (178) Akson rejenerasyon hızı insanlarda 1-2 mm/gün iken kemirgenlerde 2-3.5 mm/gündür (179). Denervasyonu takiben reinnervasyonun başlaması için 1-3 ay beklenir. Fonksiyonel reinnervasyonun başlaması yaklaşık 1 yılı bulabilir, 3 yıldan sonra ise reinnervasyon beklenmez (179).

Reinnervasyonda istenilen esas olay yaralanma bölgesinden distale doğru aksonların ilerlemesi ve kendi orijinal tüplerine yönelmesidir. Aksonların distalde farklı nörotübüllere yönelmeleri fonksiyonel olmayan sonuçlar ortaya çıkaracaktır. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar, aksonların büyük oranda orijinal tübüllerine ulaştıklarını, bu mekanizmanın ise merkez ve perifer arasındaki anterograd ve retrograd aksonal transport sisteminin rol aldığı lokal biyokimyasal faktörler etkisinde, nörotrofik ve moleküler düzeyde meydana

geldiğini göstermiştir (27). Sinirin yarananmasının distalinden yani hedef organdan gelen, proksimalden aksonal ilerlemeyi sağlamak amacı ile salınan faktörlere nörotrofik faktörler denir. Bunlara örnek olarak 'ciliary neurotrophic factor' (CNTF), 'brain derived neurotrophic factor' (BDNF), 'fibroblast growth factor' (FGF) ve 'nerve growth factor' (NGF) örnek olarak verilebilir (180).

Yapılan deneysel bir çalışmada sinir grefti ile birlikte NGF kullanılmış, sinir rejenerasyon hızı ve oranının artışının yanı sıra düzgün myelinli akson sayısında da artış gösterilmiştir (181). Yine inhibitör peptide TGF-G1 kullanılarak yapılan çalışmada sinir rejenerasyonuna katkı sağladığı gösterilmiştir (182).

Distal kısımda Schwann hücre tübüllerinin kendisi ile ve kendi bazal laminasında bulunan laminin trofik etki göstererek aksonal rejenerasyon için mesaj görevi görürler (183). Aksonun distaldeki kendi tübülüne ilerlemesi motor, duyu ve topografik seçicilik ile sağlanır. Yapılan çalışmalarda tropizm ve aksonal rejenerasyon seçiciliği değerlendirilmiş, rejenere olan aksonların büyüme tomurcuklarının normal seyirleri yanında alternatif yollar da oluşturduğu belirlenmiştir (184, 185).

Sinir onarım hattındaki gerginlik sinir rejenerasyonunu ciddi şekilde bozmaktadır (186). Mackinnon sinir onarım hattında aşırı gerilimin bağ dokusu proliferasyonunu tetikleyerek skar oluşumuna neden olduğunu ve bunun aksonal rejenerasyonu engellediğini belirtmiştir (187).

Sinir uçlarının yeterli koaptasyonun sağlanması, nörotrofik faktörlerin onarım hattında korunması, minimal yabancı cisim reaksiyonu, fibrozis ve kanlanma miktarı gibi faktörler rejenerasyonun başarısını etkileyen önemli faktörlerdir (188). Aksonal eşleşmenin yetersiz olması, nörotrofik faktörlerin ortamda tutulmaması, sütünlerin sebep olduğu fibrozis ve yabancı cisim reaksiyonu sinir rejenerasyonun ve dolayısıyla fonksiyonel iyileşmenin kalitesini düşürecektir. Onarım için gerekli şartların tam olarak sağlanamadığı durumlarda periferik dağılacak aksonlara bağlı olarak nöroma oluşumu gözlenecektir.

Rat siyatik sinirinde 3,6,9 mm lik defektler oluşturulduktan sonra primer onarımın yapıldığı bir çalışmada, defekt boyutuyla onarım hattında gerginliğin ve dolayısıyla oluşan skar formasyonunun doğru orantılı olarak arttığını ve sinir

iyileşmesinin fonksiyonel sonuçlarının da belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (189). Rat siyatik sinir yaralanması modelinde yapılan diğer bir çalışmada 2 mm lik otogreftleme ile sinirin primer onarımı karşılaştırıldığında benzer sinir iletimi bulguları elde edilmiş, 6 mm lik defektlerin sinir grefti kullanılmadan yapılan tamirinin, iletim hızını önemli ölçüde azalttığını belirtilmişlerdir (184). Periferik sinir yaralanmalarında oluşan büyük defektlerin tedavisinde altın standart otolog sinir grefti ile onarımdır (83, 190, 191, 192). Defektin boyutu kullanılan otogreft için sınırlayıcı olabilir. Bunun yanı sıra sinir onarımı sırasında, sinir greftindeki değişmiş fasiküler mimari, aksonlarda saçılmaya yol açması nedeniyle sinir rejenerasyonunu engelleyebilir (190).

Greftin alınması için kullanılan donör alan morbiditesi; duyu kaybı, donör alandaki sinir fonksiyon kaybı, ağrılı nöroma gibi sorunlar sinir grefti ile onarımdaki diğer sınırlamalardır (190, 193, 194).

Bu dezavantajlar göz önünde bulundurularak, periferik sinir kayıplarında, otolog sinir greftlerine alternatif olarak, morbiditesi daha az ve daha iyi fonksiyonel sonuçlar sağlamak amaçlı bir çok çalışmalar yapılmaktadır.

Venöz konduitler sinir defektleri onarımında sıklıkla kullanılan konduit modelidir. Özellikle donör alan sıkıntısının olmaması, ikinci bir insizyona gerek kalmadan elde edilebilmesi, donör alan morbiditesinin az olması gibi avantajları sağlamaktadır. Ancak ven greftlerinin kollabe olarak içerisinden sinir rejenerasyonunu sınırlamaları bu yöntemin hala aşılammış büyük bir problemidir. Ven greft kollapsını engellemek amaçlı metal spiral destekler ve ven greftleri ortasına sinir grefti yerleştirerek çalışmalar yapılmıştır (69, 71, 74). Biz de bu amaçla kollapsın en az olacağı aort allogreftini lümen içine HA ve PRP enjeksiyonu uygulayarak kullandık.

Periferik sinir rejenerasyonunu değerlendirmede, ratlar sıklıkla kullanılan hayvanlardır. Kolay elde edilebilirliği, ucuz olması ve sinir trunkuslarının insanlardakine benzerliği, bu hayvanların sık kullanılmasının nedenleri arasında sayılabilir. Özellikle rat siyatik siniri, uzun seyri, kolay disseksiyona izin vermesi ve manipülasyon için uygun bir alana sahip olması, özellikle periferik sinir çalışmalarında sıklıkla tercih edilmesine neden olmaktadır. İnsanlarda siyatik sinir yaralanmaları nadir olmasına karşın, deneysel modellerde bu sinirin tercih

edilmesinin bir diğ er nedeni de, polifasikü ler mikst tip bir sinir olması; farklı boyut ve tiplerde aksonları iç ermesi nedeniyle kapsamlı bir araştırma olanağı na imkan vermesidir. Bu şekilde, hem duyu hem de motor fonksiyonları aynı anda değ erlendirilebilir. (195, 196, 197, 198). Periferik sinir yaralanmalarında yapılan deneysel ç alışmalarda rejenerasyonunun değ erlendirilmesinde yürü me yolu analizi, elektrofizyolojik, morfolojik ve histolojik yöntemler kullanılmaktadır. Sinir iyileş mesinin fonksiyonel değ erlendirilmesi için kullanılan yürü me yolu analizi değ erli bir parametredir. Medinacelli tarafından 1982 yılında tanımlanan "siyatik fonksiyonel indeksi" fonksiyonel sinir iyileş mesini değ erlendirmede kullanılmış (199). Daha sonradan da Bain, Mackinnon ve Hunter tarafından modifiye edilen yürü me analizi günümüzde en çok kullanılan değ erlendirme yöntemlerinden biri olmuştur(200, 201).

Yaptığımız ç alışmada fonksiyonel iyileş menin değ erlendirilmesi amacıyla 12. hafta sonunda yürü me analizleri yapılmış ve hesaplanan SFİ'ler istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Latans ortalamaları açısından otogreft uygulanan Grup 1'in kontrol grubuna en yakın grup olduğu, latans süresi açısından diğ er gruplardan kısa olduğu belirlendi. PRP kullanılan Grup 3'ün latans süresinin HA uygulanan Grup 2'den daha kısa olduğu gözlemlendi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlemlendi ($p=0.004$). Amplitüd oranlarının karşılaştırılmasında ise Grup 1'in kontrol grubuna en yakın grup olup, diğ er gruplardan belirgin olarak yüksek olduğu gözlemlendi. Grup 1-2, Grup 1-3, Grup 1-kontrol grubu, Grup 2-3, Grup 2- kontrol grubu ve Grup 3 ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p=0.004$)

Ç alışmamızda kullandığımız parametrelerinden histomorfolojik değ erlendirme 12. haftada EMG değ erlendirmesi ve yürü me yolu analizi sonrası yapıldı. Deneyde ç alışılan sol siyatik sinirlerin farklı seviyelerinden (proksimal anastomoz, greft, distal anastomoz distali) örnekler alındı ve bu örneklerde miyelinizasyon, ödem, fibrozis ve mast hücre yoğunluğu ışık mikroskopisi ile değ erlendirilerek bir skala oluşturuldu. Bu şekilde aksonal rejenerasyonun daha iyi değ erlendirilebileceğ i düşünöldü.

Aksonal rejenerasyonun göstergesi olan myelinizasyonun tüm gruplarda distale gidildikçe azaldığı, ödem, fibrozis ve mast hücre yoğunluğunun ise arttığı tespit edildi.

Proksimal anastomoz olarak yapılan değerlendirilmede kontrol grubu ile otogreft kullanılarak onarım yapılan Grup 1 ve allojen aort grefti içine PRP enjeksiyonu yapılarak onarım yapılan Grup 3 arasında miyelinizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Fakat myelinizasyon oranı sırasıyla Grup1, Grup 3 ve Grup 2 şeklinde oldu (Tablo 14).

Fibrozis oranı en fazla Grup 2'de, sonra sırasıyla Grup 3 ve Grup 1'de olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 15).

Ödem oranı en fazla Grup 2'de sonra sırasıyla Grup 3 ve Grup 1 şeklinde oldu, fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı saptanmadı. (Tablo 16) Mast hücre yoğunluğu bakımından ise hemen tüm gruplarda benzer sonuçlar bulundu (Tablo 17).

Greft seviyesinden yapılan kesitlerde ise myelinizasyon oranı otogreft kullanılan Grup 1'de en fazla olup, bunu Grup 3 ve Grup 2 takip etti. Tüm gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Grup 3'deki myelinizasyon oranı Grup 1'e çok yakın olup, Grup 2'deki myelinizasyon ise seyrek ve düzensiz olarak değerlendirildi (Tablo 18).

Fibrozis oranı Grup 2 ve Grup 3'de benzer olarak yüksek tespit edildi. Grup 1 deki fibrozis oranı kontrol grubuna yakın olarak düşük tespit edildi. Fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo 19). Ödem oranları ise Grup 2 de en fazla iken Grup 1 ve Grup 3 de benzer olarak düşüktü (Tablo 20). Buna paralel olarak mast hücre yoğunluğunun Grup 2 de en fazla olduğu görüldü (Tablo 21).

Distal anastomoz seviyesinden yapılan kesitlerde myelinizasyon oranı en fazla Grup 1'de sonra sırasıyla Grup 3 ve Grup 2 şeklindeydi (Tablo 22). Fibrozis oranı Grup 2 de en fazlaydı ve sırasıyla Grup 3 ve Grup 1 de daha düşüktü (Tablo 23). Ödem ve mast hücre yoğunluğu sıralaması da benzer olarak Grup2, Grup 3 ve Grup 1 şeklindeydi (Tablo 24,25).

Grup 2'de kullandığımız Hyalüronik asit (HA), hemen tüm ekstraselüler aralıklarında bulunmaktadır ve ekstrasellüler matriksin hidrodinamik özelliğinin

devamında önemli roller bulunmaktadır (202, 203). Sinir hücresinde yapısal olarak çeşitli görevlerinin olmasının yanı sıra migrasyon, yapışma ve nöronal saçılma gibi birçok hücrel etkileşimde rol alır. Yetişkin dokuların fütal dokulardan en büyük farklarından birisi içerdiği HA olup, fütal yara iyileşmesinin taklit edildiği çalışmalarda ve skarsız yara iyileşmesinin sağlanması amaçlı HA kullanılmıştır (204). Wallerian dejenerasyon sırasında meydana gelen Büngner bantları başta HA olmak üzere ekstrasellüler matriks elemanları tarafından oluşturulmaktadır ve HA reseptörlerinin bloke edilmesinin hücre migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (90). Bu amaçla yapılan çalışmalarda HA bir pompa yardımıyla sinir iyileşme alanına verilmiştir, fakat bu uygulama pratik bir yöntem değildir. Hyalüronik asitin karboksimetil selüloz (CMC) ile film tabaka haline getirilmesi kısmen uygulama kolaylığı kazandırmıştır. (205) CMC, inert ve vücut tarafından yıkıma uğrayabilmesine rağmen HA ve CMC ile oluşturulan film tabakanın etkisinin 4 hafta kadar devam ettiği gösterilmiştir. Mohammed ve ark. insan amniyon membranından elde edilmiş biyobozunur sinir kılavuzu içerisine enjekte ettikleri HA deney modelinde artmış aksonal rejenerasyon gözlemiş, yine Seckel ve ark. , Wang ve ark. da sinir onarım hattına HA enjeksiyonu uygulamış ve periferik sinir rejenerasyon sürecinin hızlandığını belirtmişlerdir. (7, 46, 90) Bu deneysel çalışmalarda aksonal rejenerasyondaki artış, HA'in ekstrasellüler matriksi hidrate edilmiş bir ortamda tutarak rejenera olan aksonların migrasyonunu kolaylaştırması esasına dayandırılmıştır. Özgenel de yaptığı benzer bir çalışmada periferik sinir onarım hattına HA emdirilmiş eriyebilen bir jelatin sarmış ve perinöral skar oluşumunu önleyerek, sinir rejenerasyonunda artış olduğunu gözlemlemiştir (6).

Bizim çalışmamızda ise HA enjeksiyonunu aort allogrefti içerisine uygulayarak hem damar kollapsı engellenmiş hem de daha uzun etkinin sağlandığı pratik bir model oluşturulmuştur.

Rejenerasyon üzerine etkileri araştırılan maddelerin primer sinir onarımlarında ya da sinir defekti modellerinde kullanılması farklı sonuçlar verebilmektedir. Welch ve ark. periferik sinir defekti modelinde kullanılan PDGF ve IGF-I kombinasyonunun rejenerasyon üzerinde olumlu etkileri olduğunu, fakat primer onarım modelinde kullanılan aynı faktörlerin benzer etkiyi göstermediğini belirtmişlerdir (10). Söz konusu yazarlar bu bulgularını, sinir

uçlarının arada defekt olmadan sıkı bir şekilde bir araya gelmesi durumunda mekanik faktörlerin ön plana çıkmasına ve bu etkinin kullanılan faktörlere bağlı olarak gelişecek trofik etkiye göre daha baskın olmasına bağlamışlardır. Welch ve ark. primer sinir onarım modelinin trofik faktörlerin rejenerasyon üzerindeki etkilerini araştırmak için uygun bir model olmadığını ifade etseler de, bu modeli kullanan bir çok çalışmada trofik faktörlerin olumlu etkilerini göstermek mümkün olmuştur (4, 6, 41, 144).

PRP, normal kandaki değerlerden daha yüksek oranda trombosit sayısı içeren otolog plazma parçasıdır. İçerdiği yüksek miktarlardaki trombositte bağlı olarak, pıhtılaşma faktörlerinin tümünü ve pek çok büyüme faktörünü de konsantre şekilde barındırır. Büyüme faktörlerinden başlıca PDGF, TGF- β , VEGF, EGF ve IGF içermektedir. PRP'nin etkisi, içerdiği bu büyüme faktörlerinin sinerjistik etkisi şeklinde meydana gelir (163, 164, 123, 124,168). PRP uygulandığı bölgede içerisindeki trombositlerin trombin ile aktive edilmesi sonucu fibrin pıhtı oluşturur ve biyoaktif özelliğini uzun süre korur. Fibrin pıhtı içerisinde PRP'nin bölgede kalış süresi oldukça uzar. Aspenberg ve ark. (164) ratların aşil tendonu üzerinde yaptıkları bir çalışmada, tek doz uygulama sonrasında 4 hafta süre ile uygulama bölgesinde etkisinin devam ettiğini belirtmişlerdir.

Yapılan çalışmalar, sinir çevresinde oluşan skarın yalnızca iyileşmenin erken dönemlerini etkilediğini ve rejenerasyonun önemli bir kısmının skar dokusu oluşmadan tamamlandığını göstermiştir. Trombositten zengin plazmanın yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştıran çalışmalarda ise, PRP'nin özellikle içerdiği TGF- β ve PDGF nedeniyle hücre dışı matriks birikimine neden olduğu ve bağ doku hücre proliferasyonunu artırdığı belirtilmiştir(8). Bunun aksine Anitua ve ark. titanyum implantlar üzerine uygulanan PRP'nin inflamasyonu azalttığını gözlemlemişlerdir (9). Daha önce yapılmış olan çalışmalar sinir onarımı sonrasında epinöral skar dokusunun oluşması için 6 haftalık bir sürenin yeterli olduğuna, fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için ise 3 aylık bir iyileşme dönemine gereksinim olduğuna dikkat çekmektedir (142). Bu nedenle bizim çalışmamızda da değerlendirme için fonksiyonel iyileşmenin tamamlandığı 12. haftanın sonu beklenmiştir.

Mevcut literatürdeki çalışmalarda allojen damar greftleri, poliglikolik (PGA) asit ve silikon tüpler, kas, kıkırdak gibi yapılar sinir defektlerinde altın standard olarak kullanılan otogreftlere alternatif olarak başarıyla kullanılmıştır (206). Yapılan deneysel çalışmalarda sinir yaralanmalarının tedavisinde daha önce başarılı sonuçlar alınmış olan PRP ve Hyaluronik asitin sinir rejenerasyonu üzerine etkileri bizim çalışmamızda ise allojen aort greftlerine enjekte edilerek fonksiyonel ve histomorfolojik parametrelerle kıyaslanmıştır. Çalışmamızda tüm gruplarda farklı oranlarda sinir rejenerasyonu gözlenmiş olup, PRP'nin sinir otogreftiyle yapılan onarımlardan sonra daha yüksek oranda aksonal rejenerasyon sağladığı görülmüştür. Bu çalışma sonuçlarının sinir yaralanmalarının tedavisinde alternatif yöntem ve araştırmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışma sonucunda tüm denekler histopatolojik ve fonksiyonel olarak değerlendirilip, fonksiyonel değerlendirme için siyatik fonksiyon indeksi, latans ve amplitüd oranları kullanıldı. Tüm gruplarda farklı oranlarda aksonal rejenerasyon gözlemlendi. Fonksiyonel değerlendirmelerde mevcut literatüre benzer olarak otogreftle sinir onarımı yapılan Grup 1, kontrol grubuna en yakın olarak aksonal rejenerasyonun en fazla olduğu grup oldu. Allojen aort grefti içerisine PRP enjekte edilen Grup 3'de ise HA enjekte edilen Grup 2'ye göre daha fazla aksonal rejenerasyon gözlemlendi.

Yapılan histopatolojik incelemede ise sol siyatik sinirin proksimal anastomoz, greft ve distal anastomoz distalinden kesitler alındı ve ışık mikroskobu altında myelinizasyon, fibrozis, ödem ve mast hücre yoğunluğu değerlendirildikten sonra skorlandı.

Proksimal anastomoz seviyesinde yapılan myelinizasyon oranları Grup1> Grup3> Grup 2 şeklinde; greft seviyesinde yapılan incelemede Grup 1> Grup 3> Grup 2 ve distal anastomoz distalinden yapılan kesitlerde ise Grup 1> Grup 3>Grup 2 şeklinde oldu. Fibrozis oranı açısından yapılan değerlendirmede proksimal anastomoz seviyesinde Grup 2>Grup 3>Grup1; greft seviyesinde yapılan incelemede Grup 2=Grup3>Grup 1, distal anastomoz distalinde yapılan değerlendirmede ise Grup 2>Grup 3>Grup1 şeklinde oldu. Ödem miktarı açısından yapılan değerlendirmede; proksimal anastomoz seviyesinde Grup 2>Grup 3>Grup1; greft seviyesinde Grup 2>Grup 3=Grup1 ve distal anastomoz

distalinde yapılan değerlendirmede ise Grup 2>Grup 3>Grup1 şeklinde oldu. Mast h¼cre yoğunluğu bakımından yapılan değerlendirmede; proksimal anastomoz seviyesinde Grup 2>Grup 3=Grup 1, greft seviyesinde Grup 2>Grup 3=Grup 1 ve distal anastomoz distal b¼lgesinde ise Grup 2>Grup 3>Grup 1 şeklinde g¼zlendi.

Bu alışma sonucunda, allojen aort grefti içerisine yapılacak PRP enjeksiyonu ile yapılan sinir onarımının HA enjeksiyonu ile yapılan onarımla kıyaslandığında, sinir rejenerasyonu ¼zerinde daha olumlu etkileri olduğu g¼zlenmiřtir. Bununla birlikte bu ajanların klinik kullanımdaki etkinliklerine ışık tutması için daha geniş serilerde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. ÖZET

Periferik sinir yaralanmaları genellikle mekanik, kimyasal, termal ve patolojik nedenlere bağı olarak meydana gelir ve bu yaralanmaların tedavisi günümüzde halen önemli bir sorun teşkil etmektedir. Sinir yaralanmalarından sonra istenilen fonksiyonel sonuçların elde edilmesi amacıyla birçok klinik ve deneysel çalışma yapılmaktadır. Bu amaçla geliştirilen mikroenstrumanlar, kondüit tüpler, rejenerasyonu arttıran büyüme stimülatörleri gibi mikrocerrahi yöntemlerin yanı sıra moleküler biyolojideki gelişmeler periferik sinir onarımında başarı oranını arttırmıştır.

Bu çalışmada, yüksek oranda büyüme faktörü içeriğine sahip olan trombositten zengin plazmanın (PRP) ve skar oluşumunu azaltarak sinir rejenerasyonuna olumlu yönde etkilerinin olduğu bilinen hyalüronik asitin allojen aort greftine enjekte edilerek, periferik sinir defektlerinde sinir rejenerasyonuna etkilerinin histopatolojik ve fonksiyonel yöntemler ile değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, 1 yaş civarı 20 adet Wistar Albino tipi erkek rat kullanıldı ve bu hayvanlardan 2 adet erkek rat PRP ve aort grefti elde edilebilmesi için donör olarak kullanıldı. Her grupta 6 adet rat olacak şekilde, rastgele seçim yapılarak 3 grup oluşturuldu. Tüm grupların sol siyatik sinirlerinde çalışıldı ve 1'er cm lik sinir defekti oluşturuldu. Sağ siyatik sinirlere ise dokunulmadı ve kontrol grubu olarak kullanıldı. Grup 1: otogreftle onarılan grup, Grup 2: allojen aort grefti içerisine hyaluronik asit enjekte edilen grup ve Grup 3: allojen aort grefti içerisine trombositten zengin

plazma (PRP) enjekte edilen grup olarak dizayn edildi. 12 hafta sonra bulgular fonksiyonel ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

Tüm gruplarda farklı oranlarda aksonal rejenerasyon gözlemlendi. Yapılan fonksiyonel ve histopatolojik değerlendirmelerde mevcut literatüre benzer olarak otogreftle sinir onarımı yapılan Grup 1, kontrol grubuna en yakın olarak sinir rejenerasyonunun en fazla olduğu grup oldu. Allojen aort grefti içerisine PRP enjekte edilen Grup 3'de ise HA enjekte edilen Grup 2'ye göre daha fazla sinir rejenerasyonu meydana geldiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Trombositten zengin plazma, hyalüronik asit, periferik sinir defekti, sinir rejenerasyonu

8. SUMMARY

Peripheral nerve injuries generally occur due to mechanical, chemical, thermal and pathologic causes and the treatment is still a challenging problem. Numerous clinical and experimental studies have been made in order to obtain desired functional recovery. The microsurgical techniques like microinstruments, conduit tubes, growth stimulators that increase regeneration as well as the advances in molecular biology helped the success rates in peripheral nerve repair.

In the present study, we aimed to compare the effects of platelet rich plasma (PRP) that has high levels of growth factors and hyaluronic acid (HA) that is known to have positive effects on nerve regeneration by decreasing scar formation, injected through allogeneous aorta graft in peripheral nerve defects using histopathologic and functional methods.

The study involved 20 Wistar Albino male rats that weighed 200 to 250 grams and aged about 1 year old. Of the rats, two were used as donor for PRP and aorta grafts. Three random groups of 6 rats were composed. In all of the groups, the left sciatic nerves were used and 1 cm of defects were created. The right sciatic nerves were used as control groups. Group 1 was the group repaired with autograft, Group 2 was the group repaired with hyaluronic acid injected through aorta graft and Group 3 was the group repaired with platelet

rich plasma injected through aorta graft. The findings were evaluated in terms of functional and histopathologic parameters at 12 weeks.

In all of the groups axonal regeneration in different proportions was observed. Group 1 was the closest group to the control group showing highest rate of nerve regeneration with respect to the present literature. Group 3 where PRP was injected through aorta graft showed higher rate of nerve regeneration than Group 2 where hyaluronic acid was injected.

Keywords: Platelet rich plasma, hyaluronic acid, peripheral nerve defect,
nerve regeneration

9. KAYNAKLAR

1. Frostick SP., Yin Q., Kemp GJ., Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 18(7), 397-405, (1998).
2. Ilbay K., Etus V., Yildiz K., Ilbay G., Ceylan S., Topical application of mitomycin C prevents epineural scar formation in rats. *Neurosurg Rev*, 28(2), 148- 53, (2005).
3. Gorgulu A., Imer M., Simsek O., Sencer A., Kutlu K., Cobanoglu S., The effect of aprotinin on extraneural scarring in peripheral nerve surgery, an experimental study. *Acta Neurochir.*, 140(12), 1303-7, (1998).
4. Voinesco F., Glauser L., Kraftsik R., Barakat-Walter I., Local administration of thyroid hormones in silicone chamber increases regeneration of rat transected sciatic nerve. *Exp Neurol.*, 150(1), 69-81, (1998).
5. Ozgenel GY., Filiz G., Combined application of human amniotic membrane wrapping and hyaluronic acid injection in epineurectomized rat sciatic nerve. *J Reconstr Microsurg.*, 20(2), 153-7, (2004).
6. Ozgenel GY., Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery*, 23(6), 575-81, (2003).

7. Wang KK., Nemeth IR., Seckel BR., Chakalis-Haley DP., Swann DA., Kuo JW., Bryan DJ., Cetrulo CL. Jr., Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery*, 18(4), 270-5, (1998).
8. Sarıgüney Y. Periferik sinir yaralanmalarının onarımında trombositler zengin plazmanın sinir rejenerasyonu üzerine etkisi, Uzmanlık tezi, Ankara, 2006.
9. Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P., Nurden AT., Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 91(1), 4-15, (2004).
10. Welch JA., Kraus KH., Wells MR., Blunt DG., Weremowitz J., Effect of combined administration of insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor on the regeneration of transected and anastomosed sciatic nerve in rats. *Am J Vet Res.*, 58(9), 1033-7, (1997).
11. Burd DA, Greco RM, Regauer S, Longaker MT, Siebert JW, Garg HG. Hyaluronan and wound healing: a new perspective. *Br J Plast Surg.* 1991 Nov-Dec;44(8):579-84.
12. Bora FW Jr, Bednar JM, Osterman AL, Brown MJ, Sumner AJ. Prosthetic nerve grafts: a resorbable tube as an alternative to autogenous nerve grafting. *J Hand Surg Am.* 1987 Sep;12(5 Pt 1):685-92.
13. Terzis JK, Smith KL. Repair and grafting of the peripheral nerve. McCarthy JG, May JW, Litter WJ, editors. *Plastic surgery*. Philadelphia: WB Saunders; 1990. Volume 1, p: 630-97
14. Shenaq SM, Kim JYS. Repair and grafting of peripheral nerve. In: Mathes SJ, editor. *Plastic surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. Volume 1, p: 719-43
15. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand.* 1987;58(2): 145-69.
16. Maggi SP, Lowe JB 3rd, Mackinnon SE. Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg.* 2003;30(2):109-26
17. Shier D, Butler J, Lewis R. *Hole's Essentials of human anatomy and physiology*. 9th ed. New York: McGraw Hill; 2006. p: 202-42
18. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000;61(3):267-304.

19. Hirakawa H, Okajima S, Nagaoka T, Takamatsu T, Oyamada M. Loss and recovery of the blood-nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins. *Exp Cell Res.* 2003;284(2): 196-210.
20. Lundborg G. Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. *J Bone Joint Surg Am.* 1975;57(7):938-48.
21. Winograd JM, Mackinnon SE. Peripheral nerve injuries: Repair and reconstruction. In: Mathes SJ, editor. *Plastic surgery.* 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. Volume 7, p: 47-514
22. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: A brief review. *Neurosurg Focus.* 2004;15:16(5) E1.
23. Dahlin LB. The biology of nerve injury and repair. *J Am Surg Hand.* 2004;4(3):143-55
24. Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1990; 13(9):785-800.
25. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg [Am].* 2000;25(3):391-414.
26. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(6):1502-8
27. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 1990;13:43-60.
28. Lundborg G. *Nerve Injury and Repair.* New York: Longman Group UK, 1988.
29. Mackinnon SE, Dellon AL. *Surgery of the Peripheral Nerve.* New York: Thieme Med Publ, 1988.
30. Schmidt CE, Leach JB. *Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration.* *Annu Rev Biomed Eng* 2003; 5:293-347.
31. Chiu DT, Janecka I, Krizek TJ, Wolff M, Lovelace RE. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery* 1982; 91:226-233.
32. Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S. Nerve repair by means of

- vein filled with muscle grafts I. Clinical results. *Microsurgery* 2000; 20:32-36.
- 33.** Karacaoglu E, Yuksel F, Peker F, Guler MM. Nerve regeneration through an epineurial sheath: its functional aspect compared with nerve and vein grafts. *Microsurgery* 2001; 21:196-201.
- 34.** Brandt J, Dahlin LB, Lundborg G. Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects. *J Hand Surg [Br.]* 1999; 24:284-290.
- 35.** Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Hansson HA, Johannesson A, Longo FM. et. al. Nerve regeneration across an extended gap: A neurobiological view of nerve repair and the possible involvement of neuronotrophic factors. *J Hand Surg* 1982; 7(6):580-587.
- 36.** Evans GR. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol* 2000; 19:312-318.
- 37.** Ide C, Tohyama K, Tajima K, Endoh K, Sano K, Tamura M. et al. Long acellular nerve transplants for allogeneic grafting and the effects of basic fibroblast growth factor on the growth of regenerating axons in dogs: a preliminary report. *Exp Neurol* 1998; 154:99-112.
- 38.** Hiles RW. Freeze dried irradiated nerve homograft: a preliminary report. *Hand* 1972; 4:79-84.
- 39.** Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res* 1998; 795:44-54.
- 40.** Voytik-Harbin SL, BrightmanAO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem* 1997; 67:478-91.
- 41.** Badylak SF, Record R, Lindberg K, Hodde J, Park K. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998; 9:863-78.
- 42.** Davis GE, Blaker SN, Engvall E, Varon S, Manthorpe M, Gage FH. Human amnion membrane serves as a substratum for growing axons in vitro and in vivo. *Science* 1987; 236:1106-1109.
- 43.** Meek MF, Coert JH, Nicolai JP. Amnion tube for nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107:622-623.
- 44.** Whitworth IH, Brown RA, Dore C, Green CJ, Terenghi G. Orientated

mats of fibronectin as a conduit material for use in peripheral nerve repair. *J Hand Surg (Br.)* 1995; 20:429-36.

45. Kauppila T, Jyvasjarvi E, Huopaniemi T, Hujanen E, Liesi P. A laminin graft replaces neurorrhaphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 1993; 123:181-191.

46. Yoshii S, Oka M, Shima M, Taniguchi A, Akagi M. 30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments. *Brain Res* 2002; 949:202-208.

47. Seckel BR, Jones D, Hekimian KJ, Wang KK, Chakalis DP, Costas PD. Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res* 1995; 40:318-324.

48. Ahmed Z, Underwood S, Brown RA. Low concentrations of fibrinogen increase cell migration speed on fibronectin/fibrinogen composite cables. *Cell Motil Cytoskelet* 2000; 46:6-16.

49. Hashimoto T, Suzuki Y, Kitada M, Kataoka K, Wu S, Suzuki K. Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons. *Exp Brain Res* 2002; 146:356-368.

50. Haipeng G, Yinghui Z, Jianchun L, Yandao G, Nanming Z, Xiufang Z. Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. *J Biomed Mater Res* 2000; 52:285-295.

51. Evans GR, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M. et al. Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2002; 23:841-848.

52. Molander H, Olsson Y, Engkvist O, Bowald S, Eriksson I. Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. *Muscle Nerve* 1982; 5:54-57.

53. Den Dunnen WF, Meek MF, Grijpma DW, Robinson PH, Schakenraad JM. In vivo and in vitro degradation of poly[(50)/(50) ((85)/(15)(L)/(D))LA/epsilon-CL], and the implications for the use in nerve reconstruction. *J Biomed Mater Res* 2000; 51:575-585.

54. Valero-Cabre A, Tsironis K, Skouras E, Perego G, Navarro X, Neiss WF. Superior muscle reinnervation after autologous nerve graft or poly-L-lactide-epsilon-caprolactone (PLC) tube implantation in comparison to silicone tube repair. *J Neurosci Res* 2001; 63:214-223.

- 55.** Soldani G, Varelli G, Minnocci A, Dario P. Manufacturing and microscopical characterisation of polyurethane nerve guidance channel featuring a highly smooth internal surface. *Biomaterials* 1998; 19:1919-1924.
- 56.** Nicoli Aldini N, Fini M, Rocca M, Giavaresi G, Giardino R. Guided regeneration with resorbable conduits in experimental peripheral nerve injuries. *Int Orthop* 2000; 24:121-125.
- 57.** Young RC, Wiberg M, Terenghi G. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves. *Br J Plast Surg* 2002; 55:235-240.
- 58.** Lore AB, Hubbell JA, Bobb DS Jr, Ballinger ML, Loftin KL, Smith JW. et al. Rapid induction of functional and morphological continuity between severed ends of mammalian or earthworm myelinated axons. *J Neurosci* 1999; 19:2442-2454.
- 59.** Gilchrist T, Glasby MA, Healy DM, Kelly G, Lenihan DV, McDowall KL. et al. In vitro nerve repair in vivo. The reconstruction of peripheral nerves by entubulation with biodegradable glass tubes—a preliminary report. *Br J Plast Surg* 1998; 51:231-237.
- 60.** Lenihan DV, Carter AJ, Gilchrist T, Healy DM, Miller IA, Myles LM. et al. Biodegradable controlled release glass in the repair of peripheral nerve injuries. *J Hand Surg [Br]* 1998; 23:588-593.
- 61.** Valentini RF, Vargo Tg, Gardella JA Jr, Aebischer P. Patterned neuronal attachment and outgrowth on surface modified, electrically charged fluoropolymer substrates. *J Biomater Sci Polym Ed* 1993; 5:13-36.
- 62.** Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP, Langer R. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8948- 8953.
- 63.** Dahlin L, Lundborg G. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg [Br]* 2001; 26:393-394. Midgley RD, Woolhouse FM. Silicone rubber sheathing as an adjunct to neural anastomosis. *Surg Clin N Am* 1968; 48:1149-1154.
- 64.** Vasconcelos BC, Gay-Escoda C. Facial nerve repair with expanded polytetrafluoroethylene and collagen conduits: an experimental study in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58:1257-1262.

65. M, Halkias LE, Mallery S, Travers S, Rashid RG. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93:27-34.
66. Sunderland S. *Nerves and Nerve injuries*, (2nd ed) Edinburgh, Churchill Livingstone, 1978:133-141.
67. Rigoni G, Smahel J, Chiu DTW Meyer VE. Vein interposition as a pathway for peripheral nerve regeneration. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 1983; 15(4):227-231.
68. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Eby PL, Seckel BR. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. *Microsurg* 1995; 16(2):65-70.
69. Strauch B, Ferder M, Lovelle-Allen S, Moore K, Kim DJ, Llana J. Determining the maximal length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1996; 12:521-527.
70. Chiu DTW, Strauch B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plast Reconstr Surg* 1990; 86:928-934.
71. Walton RL, Brown RE, Matory WE Jr. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: A retrospective clinical study. *Plast Reconstr Surg* 1989; 84:944-949.
72. Wang KK, Costas PD, Jones DS, Miller RA, Seckel BR. Sleeve insertion and collagen coating improve nerve regeneration through vein conduits. *J Reconstr Microsurg* 1993; 9:39-48,.
73. Smahel J, Jentsch B: Stimulation of peripheral nerve regeneration by an isolated nerve segment. *Ann Plast Surg* 1986; 16:494-501.
74. Fawcett JW, Keynes RJ. Muscle basal lamina: A new graft material for peripheral nerve repair. *J Neurosurg* 1986; 65:354-363,.
75. Smith KG, Robinson PP. The reinnervation of the tongue and salivary glands after lingual nerve repair by stretch, sural nerve graft or frozen muscle graft. *J Dent Res* 1995; 74(12):1850-1 860.
76. Wang H, Lineaweaver WC. *Nerve Conduits for Nerve Reconstruction. Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery* 2003;9(2):59-66.
77. Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR, Murrell GA. Denatured muscle as a

nerve conduit: A functional, morphologic, and electrophysiologic evaluation. *J Reconstr Microsurg* 1994; 10(3):137-144,

78. Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, Schneider W. Tissue engineering of peripheral nerves: A comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107(2):485-494.

79. DeFranzo AJ, Morykwas MJ, LaRosse JR, Jennings DA, Challa V, Argenta LC. Autologous denatured muscle as a nerve graft. *J Reconstr Microsurg* 1994; 10(3):145-149.

80. Feneley MR, Fawcett JW, Keynes RJ: The role of Schwann cells in the regeneration of peripheral nerve axons through muscle basal lamina grafts. *Exp Neurol* 1991; 114:275-285

81. Ulkur E, Yuksel F, Acikel C, Okar I, Celikoz B. Comparison of functional results of nerve graft, vein graft, and vein filled with muscle graft in end-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery* 2003; 23(1):40-8.

82. Brandt J, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G. Functional recovery in a tendon autograft used to bridge a peripheral nerve defect. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2002; 36:2-8.

83. Atabay K, Hong C, Bentz ML. The use of the "sliding epineurial sheath tube" for repair of peripheral nerve defects. *Plast Surg Forum* 1995; 18:121-128.

84. Ayhan S, Yavuzer R, Latifoglu O, Atabay K. Use of the turnover epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve. *J Reconstr Microsurg* 2000; 16(5):371-377.

85. Suzuki M, Itoh S, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K. et. al. Tendon Chitosan Tubes Covalently Coupled With Synthesized Laminin Peptides Facilitate Nerve Regeneration In Vivo. *Journal of Neuroscience Research* 2003; 72:646-659.

86. Mackinnon SE, Dellon AL. A comparison of nerve regeneration across a sural nerve graft and a vascularized pseudosheath. *J Hand Surg* 1988; 13(6):935-942.

87. Lawson GM, Glasby MA. Peripheral nerve reconstruction using rezeethawed muscle grafts: a comparison with group fascicular nerve grafts in a large animal model. *J R Coll Surg Edinb* 1998; 43:295-302.

88. Wang KK, Cetrulo CL, Seckel BR. Tubulation repair of peripheral nerves

in the rat using an inside-out intestine sleeve. *J Reconstr Microsurg* 1999; 15(7):547-554.

89. Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S. Modulation of Peripheral Nerve Regeneration: A Tissue-Engineering Approach. The Role of Amnion Tube Nerve Conduit across a 1-Centimeter Nerve Gap. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105:660-666.

90. Mohammad J, Warnke PH, Pan YC, Shenaq S. Increased axonal regeneration through a biodegradable amnionic tube nerve conduit: Effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor/hyaluronic acid media. *Ann Plast Surg* 2000; 44(1):59-64.

91. Rutishauser U. Adhesion molecules of the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 1993; 3:709-715.

92. Grimpe B, Silver J. The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog Brain Res* 2002; 137:333-349.

93. Bovolenta P, Fernaud-Espinosa I. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol* 2000; 61:113-132.

94. Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res* 2001; 132:611-19.

95. Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng WC, Hu CL. et al. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 2000; 21:1541-1547.

96. Itoh S, Takakuda K, Kawabata S, Aso Y, Kasai K, Itoh H. et al. Evaluation of crosslinking procedures of collagen tubes used in peripheral nerve repair. *Biomaterials* 2002; 23:4475-4481.

97. Ceballos D, Navarro X, Dubey N, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Tranquillo RT. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 1999; 158:290300.

98. Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Strichartz GR, Spector M. Near-terminus axonal structure and function following rat sciatic nerve regeneration through a collagen-GAG matrix in a ten millimeter gap. *J Neurosci Res* 2000; 60:666-677.

99. Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE. Engineering strategies for

peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg* 1999; 26:617-628.

100. Nyilas E, Chiu TH, Sidman RL, Henry EW, Brushart TM, Dikkes P. et al. Peripheral nerve repair with bioresorbable prosthesis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1983; 29:307-313.

101. Gomez N, Cuadras J, Buti M. Histologic assessment of sciatic nerve regeneration following resection and graft or tube repair in the mouse. *Restor Neurol Neurosci* 1996; 10:187-196.

102. Seckel BR, Chiu TH, Nyilas E, Sidman RL. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: Regulation by the target organ. *Plast Reconstr Surg* 1984; 74:173-181.

103. Williams LR, Longo FM, Powell HC, Lundborg G, Varon S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: Parameters for a bioassay. *J Comp Neurol* 1983; 218:160-170.

104. Calder JS, Norris RW: Repair of mixed peripheral nerves using muscle autografts: A preliminary communication. *Br J Plast Surg* 1993; 46:557-564.

105. Hall SM. Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1989;15(6):513-29.

106. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery.* 1998;18(7):397-405.

107. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194(Pt 1):1-14.

108. Zhuk ON, Kalyunov VN. Effect of nerve growth factor on the regeneration of fibers in the rat sciatic nerve. *Neurosci Behav Physiol.*1997;27(5):541-4

109. Lee AC, Yu VM, Lowe JB 3rd, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, Sakiyama-Elbert SE. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2003;184(1):295-303.

110. Jubran M, Widenfalk J. Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors. *Exp Neurol.* 2003;181(2):204-12.

111. Whitworth IH, Brown RA, Dore CJ, Anand P, Green CJ, Terenghi G. Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. *J Hand Surg [Br].* 1996;21(4):514-22.

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

- 113.** Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol.* 1992;119(1):45-54
- 114.** Novikov L, Novikova L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motorneurons in vivo. *Neuroscience.* 1997;79(3):765-74.
- 115.** Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci.* 2000;12(12):4171-80.
- 116.** Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci.* 2002;15(4):613-26.
- 117.** Yin Q, Kemp GJ, Yu LG, Wagstaff SC, Frostick SP. Neurotrophin-4 delivered by fibrin glue promotes peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 2001;24(3):345-51.
- 118.** McCallister WV, Tang P, Smith J, Trumble T. Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in an end-to-side model. *J Hand Surg [Am].* 2001;26(3):478-88.
- 119.** Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M, Austin L. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve.* 1997;20(7):815-22
- 120.** Zang DW, Cheema SS. Leukemia inhibitory factor promotes recovery of locomotor function following spinal cord injury in the mouse. *J Neurotrauma* 2003;20(11):1215-22
- 121.** Zhang F, Blain B, Beck J, Zhang J, Chen Z, Chen ZW. Autogenous venous grafts with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects. *J Reconstr Microsurg* 2002; 18(4):295-300.
- 122.** Strauch B, Rodriguez DM, Diaz J, Yu HL, Kaplan G, Weinstein DE. Autologous Schwann cells drive regeneration through a 6-cm autogenous venous nerve conduit. *J Reconstr Microsurg* 2001; 17(8):589-595.
- 123.** Haynesworth S. Platelet-rich plasma stimulates stem cell chemotaxis, proliferation and potentiates osteogenic differentiation. *The Spine Journal.*

2006;2(5):68-72

124. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(4):489-96.

125. Stenberg PE, Hill RJ. Platelets and megakaryocytes. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors. *Wintrobe's clinical hematology.* 10th ed. Egypt, 1999. Volume 1, p: 615-60

126. Hsu C., Chang J., Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg [Am].*, 29(4), 551-63, (2004).

127. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, Abdullah KM. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc).* 2003;39(10):787-800.

128. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol.* 1989; 109(1):429-40.

129. Chan RK, Liu PH, Pietramaggiori G, Ibrahim SI, Hechtman HB, Orgill DP. Effect of recombinant platelet-derived growth factor (Regranex) on wound closure in genetically diabetic mice. *J Burn Care Res.* 2006;27(2):202-5.

130. Oya T, Zhao YL, Takagawa K, Kawaguchi M, Shirakawa K, Yamauchi T, Sasahara M. Platelet-derived growth factor-b expression induced after rat peripheral nerve injuries. *Glia.* 2002;38(4):303-12.

131. Ohno M, Sasahara M, Narumiya S, Tanaka N, Yamano T, Shimada M, Hazama F. Expression of platelet-derived growth factor B-chain and beta-receptor in hypoxic/ischemic encephalopathy of neonatal rats. *Neuroscience.* 1999;90(2):643-51

132. Allamargot C, Pouplard-Barthelaix A, Fressinaud C. A single intracerebral microinjection of platelet-derived growth factor (PDGF) accelerates the rate of remyelination in vivo. *Brain Res.* 2001;918(1-2):28-39

133. Eccleston PA, Funa K, Heldin CH. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF alpha- and beta-receptors in the peripheral nervous system: an analysis of sciatic nerve and dorsal root ganglia. *Dev Biol.* 1993; 155(2):459-70.

134. Bennett NT., Schultz GS., Growth factors and wound healing,

biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.*, 165(6), 728-37, (1993).

135. Ridley AJ, Davis JB, Stroobant P, Land H. Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol.* 1989;109

(6 Pt2):3419-24

136. Sulaiman OA, Gordon T. Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. *Glia.* 2002;37(3):206-18

137. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades hN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(21):7696-700.

138. Sjalberg J, Kanje M. Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1989; 485 (1):102-8.

139. Kanje M, Skottner A, Sjalberg J, Lundborg G. Insulin-like growth factor I(IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1989;486(2):396-8.

140. Pu SF, Zhuang HX, Marsh DJ, Ishii DN. Insulin-like growth factor-II increases and IGF is required for postnatal rat spinal motorneuron survival following sciatic nerve axotomy. *J Neurosci Res.* 1999;55(1):9-16.

141. Rydel RE, Greene LA. Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells. *J Neurosci.* 1987;7(11):3639-53.

142. Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J, Madison R. Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83(6):1013-9

143. Aebischer P, Salessiotis AN, Winn SR. Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps. *J Neurosci Res.* 1989;23(3):282-9.

144. Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe Ta. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg.* 1999;134(2):200-5

145. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth

factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4-25.

146. Hobson MI, Green CJ, Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat.* 2000;197(4):591-605.

147. Şimşek BM. Farklı formlardaki epidermal büyüme faktörü (EGF)'nün yara iyileşmesi üzerine etkisinin histopatolojik olarak araştırılması. Doktora tezi, Ankara, 1998

148. Wildering WC, Hermann PM, Bulloch AG. Lymnaea epidermal growth factor promotes axonal regeneration in CNS organ culture. *J Neurosci.* 2001;21(23):9345-54.

149. Dubuisson AS, Beuermann RW, Kline DG. Sciatic nerve regeneration across gaps within collagen chambers: The influence of epidermal growth factor. *J Reconstr Microsurg.* 1993;9(5):341-6

150. Wells MR, Kraus K, Batter DK, Blunt DG, Weremowitz J, Lynch SE, Antoniadis HN, Hansson HA. Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: A comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. *Exp Neurol.* 1997;146(2):395-402

151. Meier C, Parmantier E, Brennan A, Mirsky R, Jessen KR. Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an Autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci.* 1999;19(10):3847-59.

152. Özgenel GY. Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery.* 2003;23(6):575-81.

153. Özgenel GY, Filiz G. Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *J Neurosurg.* 2003;98(2):371-7.

154. Woodell-May JE, Ridderman DN, Swift MJ, Higgins J. Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting. *J Craniofac Surg.* 2005; 16(5):749-56, discussion 757-9.

155. whitman DH., Berry RL., Green DM., Platelet gel, an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.*, 55(11), 1294-9, (1997).

156. Marx RE., Carlson ER., Eichstaedt RM., Schimmele SR., Strauss JE.,

- Georgeff KR., Platelet-rich plasma, growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 85(6), 638-46, (1998).
- 157.** Siebrecht MA., De Rooij PP., Arm DM., Olsson ML., Aspenberg P., Platelet concentrate increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite. *Orthopedics*, 25(2), 169-72, (2002).
- 158.** Maiorana C., Sommariva L., Brivio P., Sigurta D., Santoro F., Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma, preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 23(3), 227-35, (2003).
- 159.** Gehring S., Hoerauf H., Laqua H., Kirchner H., Kluter H., Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*, 39(2), 144-8, (1999).
- 160.** Jackson RF., Using platelet rich plasma to promote healing and prevent seroma formation in abdominoplasty procedures. *Am J Cosm Surg.*, 20(4), 185-95, (2003).
- 161.** Man D., Plosker H., Winland-Brown JE., The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.*, 107(1), 229-37, (2001).
- 162.** Brissett AE., Hom DB., The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.*, 11(4), 245-50, (2003).
- 163.** Mazzucco L., Medici D., Serra M., Panizza R., Rivara G., Orecchia S., Libener R., Cattana E., Levis A., Betta PG., Borzini P., The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds, a pilot study. *Transfusion.*, 44(7), 1013-8, (2004).
- 164.** Aspenberg P., Virchenko O., Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.*, 75(1), 93-9, (2004).
- 165.** Anitua E., Andia I., Sanchez M., Azofra J., del Mar Zaldueño M., de la Fuente M., Nurden P., Nurden AT., Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.*, 23(2), 281-6, (2005).
- 166.** Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byrne Pj. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat

model. *Laryngoscope*. 2007;117(1):157-65

167. Lowery GL., Kulkarni S., Pennisi AE., Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone*. 25(2 Suppl), 47S-50S. (1999).

168. DelRossi AJ, Cernaianu AC, Vertrees RA, Wacker CJ, Fuller SJ, Cilley JH, Baldino WA. Platelet-rich plasma reduces postoperative blood loss after cardiopulmonary bypass. *J Thorac and Cardiovasc Surg*, 1990;100: 281-286

169. Longaker mT, Chiu ES, Harrison MR, et al. Studies in fetal wound healing IV. Hyaluronic acid-stimulating activity distinguishes fetal wound fluid from adult wound fluid. *Ann Surg* 1989;210:667-72.

170. Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* 1999;7:79-89.

171. Almond A. Hyaluronan. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1591-6.

172. Ozgenel GY. The effects of a combination of hyaluronic acid and amniotic membrane on the formation of peritendinous adhesions after fleksor tendon surgery in chickens. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:301-7.

173. Ozgenel GY, Şamlı B, OzcanM. Effects of human amniotic fluid on peritendinous adhesion formation and tendon healing after flexor tendon surgery in rabbits. *J Hand Surg Am* 2001;26:332-9.

174. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*. 2007;80:1921-43.

175. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalbruch H, Krarup C. Comparative electrophysiological, functional and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005;25(6):508-19.

176. Hudson AR., Hunter D. Timing of Peripheral Nerve Repair: Important Local Neuropathological Factors. *Clin Neurosurg* 1977;24:391-405.

177. Stoll G., Griffin JW., Li CY., Trapp BD. Wallerian Degeneration in the Peripheral Nervous System: Participation of Both Schwann Cells and Macrophages in Myelin Degradation. *J Neurocytol* 1989; 18:671-83.

178. Seddon H: Three Types of Nerve Injury. *Brain* 1943;66:237-288

179. Thomas MB. Nerve Repair and Grafting. In: Green DP, Hotchkiss RN, Pederson WC, eds. *Green's Operative Hand Surgery*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1999;1381-404.

180. Barbin G., Manthorpe M., Varon S. Purification of the Chick Eye Ciliary

Neuronotrophic Factor. *J. Neurochem.* 1984 43:1468-78

181. Gravvanis AI., Lykoudis EG., Tagaris GA., Patralexis CG., Papalois AE., Panayotou PN., Stamatopoulos NC., Ioannovich JD. Microsurgical Repair of Nerve Lesions with Nerve Grafts: the Effect of Nerve Growth Factor 7S. *Eur J Plast Surg* 2002 25:187-192

182. Gomez R., Serra J.M., Bergera J., Anso M., Gorria O., Qiu S.S., Auba C., Hontanilla B. Nerve Regeneration after Local Administration of the Inhibitor Peptide of the TGF-G1 (P144®). *Eur J Plast Surg* (2010) 33:135-142

183. Lundborg G., Dahlin LB., Danielsen N., Zhao Q. Trophism, Tropism and Specificity in Nerve Regeneration. *J. Reconstr. Microsurgery.* 10(5):345-54, 1994

184. Terzis JK., Faibisoff B., Williams H.B. The Nerve Gap: Suture Under Tension Versus Graft. *Plast. Reconstr. Surg.* 1975;56:166,

185. Tos P., Battiston B., Geuna S., Giacobini-Robecchi MG., Hill M., Lanzetta M., Owen E. Tissue Specificity in Rat Peripheral Nerve Regeneration Through Combined Skeletal muscle and Vein Conduit Grafts. *Microsurgery.* 2000;20:65-71

186. Millesi H. Reappraisal of Nerve Repair. *Surg Clin North Am* 61:321-340, 1981.

187. Mackinnon SE. Nerve Injuries: Primary Repair and Reconstruction. *Mastery of Plastic and Reconstructive Surg.* Cohen M.(ed) Boston 1994 Vol III 1598-624

188. Radek AJ. Blood Supply of Transected Rabbit Peripheral Nerve after End-to-end Suture or Autogenous Grafting: A Microangiographic study. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 20:273-77, 1986.

189. Sunderland I.R.P., Brenner M.J., Singham J., Rickman S.R., Hunter D. A., Mackinnon S.E. Effect of Tension on Nerve Regeneration in Rat Sciatic Nerve Transection Model. *Ann Plast Surg* 2004;53: 382-387

190. Ghaznavi AM., Kokai LE., Lovett ML., Kaplan DL., Marra KG. Silk Fibroin Conduits A Cellular and Functional Assessment of Peripheral Nerve Repair. *Ann Plast Surg* 2011;66: 273-279

191. Fields RD., Le Beau JM., Longo FM., Ellisman MH. Nerve Regeneration Through Artificial Tubular Implants. *Prog Neurobiol* 1989 33:87-134

192. Meek M.F, Coert JH. Clinical use of Nerve Conduits in Peripheral-Nerve

- Repair: Review of the Literature. *J Reconstr Microsurg* 2002; 18:97-109
- 193.** Mackinnon SE: Surgical Management of the Peripheral Nerve Gap. *Clin Plast Surg* 1989;16:587
- 194.** M. Eisenmann-Klein C. Neuhann-Lorenz (Eds.) *Innovations in Plastic and Aesthetic Surgery*. Chapter 10. Nerve Reconstruction by Means of Tubulization:78-81
- 195.** Lufs AL, Amado S, Geuna S, Rodrigues JM, Simões MJ, Santos JD, Fregnan F, Raimondo S, Veloso AP, Ferreira AJ, Armada-da-Silva PA, Varejão AS, Mauncio AC. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non- serrated clamp. *J Neurosci Methods*. 2007;163(1):92-104.
- 196.** Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patncio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: Walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001;108(1):1-9.
- 197.** Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*. 2004;21(11):1652-70.
- 198.** Martins RS, Siqueira MG, da Silva CF, Plese JP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006;64(3B):750-6.
- 199.** Tetik C., Erol B., Çabukoğlu C., Ünsal M. Sıçan Siyatik Sinir Modelinde Fonksiyonel Değerlendirme Yöntemlerinin Yeni bir Sistemle Karşılaştırılması. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2000; 34: 523-527
- 200.** Bain JR., Mackinnon SE., Hunter DA. Functional Evaluation of Complete Sciatic Peroneal and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83: 129-138
- 201.** Bronzino JD. *The Biomedical Engineering Handbook*. Second edition. CRC Press, Florida, 2000; Pp: 141-50
- 202.** Collier J.H., Camp J.P., Hudson T.W., Schmidt C.E., Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid and composite biomaterials for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res*. 50:574-584;2000.

- 203.** Gong H, Ye W, Freddo TF, Hernandez MR. Hyaluronic acid in the normal and glaucomatous optic nerve. *Exp Eye Res.* 1997 Apr;64(4):587-95.
- 204.** Eggli, P. S., Lucocq, J., Ott, P., Graber, W., & Van der Zypen, E. Ultrastructural localization of hyaluronan in myelin sheaths of the rat central and rat and human peripheral nervous systems using hyaluronan-binding protein-gold and link protein-gold. *Neuroscience*, 48(3), 737-744;1992.
- 205.** Hooker, G. D., Taylor, B. M., & Driman, D. K. Prevention of adhesion formation with use of sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane in a rat model of ventral hernia repair with polypropylene mesh—A randomized, controlled study. *Surgery*, 125(2), 211-216;1999
- 206.** Colen KL., Choi M., Chiu DTW. Nerve Grafts and Conduits. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009.124: 386e,394e