

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ A.D.**

**SİNİR GREFTİ İLE PERİFERİK SİNİR REKONSTRÜKSİYONUNDA**  
**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN (PRP-Platelet Rich Plasma)**  
**İYİLEŞMEYE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. HAKAN TEYMUR**

**TEZ DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. YİĞİT ÖZER TİFTİKCİOĞLU**

**İZMİR - 2013**

# I

## TEŞEKKÜR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda almış olduğum eğitimim ve yapmış olduğum tez çalışmam süresince benden desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Yiğit Ö. TİFTİKCİOĞLU'na gösterdiği sabrı ve emeği için teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca eğitimim boyunca birlikte çalışma şansını bulduğum, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Yalçın AKIN, Sayın Prof. Dr. Ecmel SONGÜR, Sayın Prof. Dr. Tahir GÜRLER, Sayın Prof. Dr. Mehmet ALPER, Sayın Prof. Dr. Z. Cüneyt ÖZEK ve Sayın Prof. Dr. Ufuk BİLKAY'a hayatım boyunca bana ışık tutacak bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağladıkları için minnettar kalacağım. Omuz omuza çalıştığım tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma işbirlikleri için teşekkür ederim.

PRP hazırlanması aşamasında büyük yardımı olan Ege Üniversitesi Çocuk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Yeşim AYDINOK'a ve kan merkezi teknisyeni Sayın Meltem DEMİR'e, elektromiyografik çalışmalara destek olan Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Oytun ERBAŞ'a yoğun işleri arasında bana zaman ayırdıkları için, istatistiksel çalışmalarda emeği geçen Sayın Dr. Hatice ULUER'e ve Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneylemleri Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmamda sağladığı lojistik destek ve gülen yüzleri için Ege Üniversitesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı başhemşiresi Sayın Rabia ÖRÜN başta olmak üzere tüm hemşire ve klinik personeline teşekkür ederim.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e sadece örneklerin değerlendirilmesi ile kalmayıp, tüm samimiyeti ve ilgisiyle gönülden yardımları için minnettarım.

## II

# İÇİNDEKİLER

<b>I. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>II. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
<b>III. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>45</b>
<b>IV. BULGULAR</b>	<b>65</b>
<b>V. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>79</b>
<b>VI. ÖZET</b>	<b>88</b>
<b>VII. ABSTRAKT</b>	<b>89</b>
<b>VIII. KAYNAKLAR</b>	<b>90</b>

# GİRİŞ

Santral sinir sistemi yapıları olan beyin sapı ve medulla spinalisten köken alan periferik sinirler, uzak dokular ile iletişimin sağlanmasında görev alırlar. Hedef organa göre motor, duyu ya da sempatik etkileri bulunan bu hücrelerin bu kadar uzak mesafeler arasındaki iletişimi sağlaması aksonal uzantıları sayesinde gerçekleştirilir. Periferik sinirler bu aksonal uzantıların organize bir şekilde birlikte bulunmaları halindedir. Özellikle ekstremiteler ve yüzde bu periferik sinirlerin cerrahi hastalıkları Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi'nin konusudur.

Aksonal seviyede bir yaralanmada iyileşme, Wallerian dejenerasyon ve bunu izleyen aksonal rejenerasyonla proksimalden distale doğru gerçekleşir. Bu nedenle hasarlı sinir uçları arasındaki bütünlüğün uygun bir şekilde tekrar sağlanması gerekmektedir. Fonksiyonların geri dönmesi için bu aksonal rejenerasyonun yöneliminin en uygun şekilde gerçekleşmesi hayatidir.

Periferik sinirlerin yaralanması; travma, iskemik olaylar, enfeksiyon, inflamasyon, iyonize radyasyon, traksiyon, eksternal kompresyon, yanık ve elektrik çarpması gibi etkenlerle meydana gelir. Yaralanmanın nedeninden bağımsız olarak bu periferik sinirlerdeki rejenerasyonun tam olmaması veya anormal olarak olması, ilgili son organda fonksiyonel kayıp ve ağrı ile sonuçlanır. Yaralanmanın tedavisinde temel amaç rejenerasyonun gerçekleşeceği uygun ortamı sağlamaktır. Bu nedenle skarlı ve fibrotik dokular uzaklaştırılmalı, taze sinir uçları arasında gerilimsiz bir şekilde bir araya getirilmelidir.

Cerrahi onarımda iki uç arasında defekt bulunmayan ve iki ucun kolaylıkla bir araya getirilebildiği durumlarda primer uç uca anastomoz değişik yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Ancak primer onarımın mümkün olduğu durumlarda bile, onarım bölgesinde gelişen fibrozis ve rejenerasyonun aksonların epinörium dışına çıkmasıyla meydana gelen nöroma oluşumu, rejenerasyonu olumsuz yönde etkileyebilir ve fonksiyonların dönüşü yeterli düzeyde olmayabilir (1).

Gerilimsiz olarak primer uç uca anastomoz şansı bulunmayan, iki uç arasında defektin olduğu yaralanmalarda durum daha da komplike bir hal alır. Bu defektin rekonstrükte edilmesi için birçok cerrahi yöntem ile bunların topikal veya sistemik medikal tedavilerle

kombinasyonlarını içeren yüzlerce çalışma geçmişte yayınlanmıştır. Buna rağmen sinir rejenerasyonunun hala en uygun şekilde nasıl sağlanacağıyla ilgili ortak bir görüş birliği ne yazık ki yoktur.

Defektlerinin rekonstrüksiyonunda birçok alternatif yöntem denense de sinir grefti ile onarım halen altın standarttır ve en başarılı sonuçlar bu şekilde alınır (2,3,4,5). Ancak sinir grefti ile defekt onarımlarında dahi iyileşme oranları yüz güldürücü olmayabilmektedir (6). Bu nedenle mevcut altın standart yöntemi güçlendirecek sinir rejenerasyonunu hızlandırma potansiyeli olan büyüme faktörleri, hormon ve mediyatörler gibi ek yardımcı uygulamalar uzun zamandır denenmektedir ve de denenmeye devam edecektir.

Trombositten Zengin Plazma (PRP) kolay ve nispeten maliyeti düşük ayrıca otojen elde edilebilmesi nedeniyle düşük riskli olan bir uygulamadır. Bu uygulama trombositlerin içerdiği granüllerde bulunan büyüme faktörlerinin etkisinden yararlanmaya çalışır. PRP trombositlerin yoğunlaştırılması ardından kontrollü bir şekilde aktiflenmeleri sonucunda ortama bu faktörleri salmaları esasına dayanan biyolojik bir yöntemdir. Klinik uygulamalarda operasyon öncesinde hastanın kendisinden alınan kandan değişik yöntemlerle ayrıştırılarak yoğunlaştırılan trombositler uygulama sırasında aktiflenerek jel haline getirilir ve bu jel içerisindeki büyüme faktörleri uzun süre lokal olarak salınarak etkilerini gösterirler. PRP içerisinde bulunan başlıca büyüme faktörleri, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), 'transforming' büyüme faktörü (TGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin kaynaklı büyüme faktörü-I (IGF-I), platelet kökenli endotelial hücre büyüme faktörü (PDEGF), interlökin-1 (IL-1) ve trombosit aktive edici faktör-4' dür (PAF-4) (7,8). Bu büyüme faktörleri arasından PDGF, FGF, VEGF ve IGF-I'in sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (12,13,14). Bu faktörlerin rekombinant yolla hazırlanmış formlarının pahalı olması ve laminin, kollajen veya metilselüloz gibi ek taşıyıcı ara maddeler üzerinde uygulanmaya ihtiyaç duymaları en önemli dezavantajlarıdır (16).

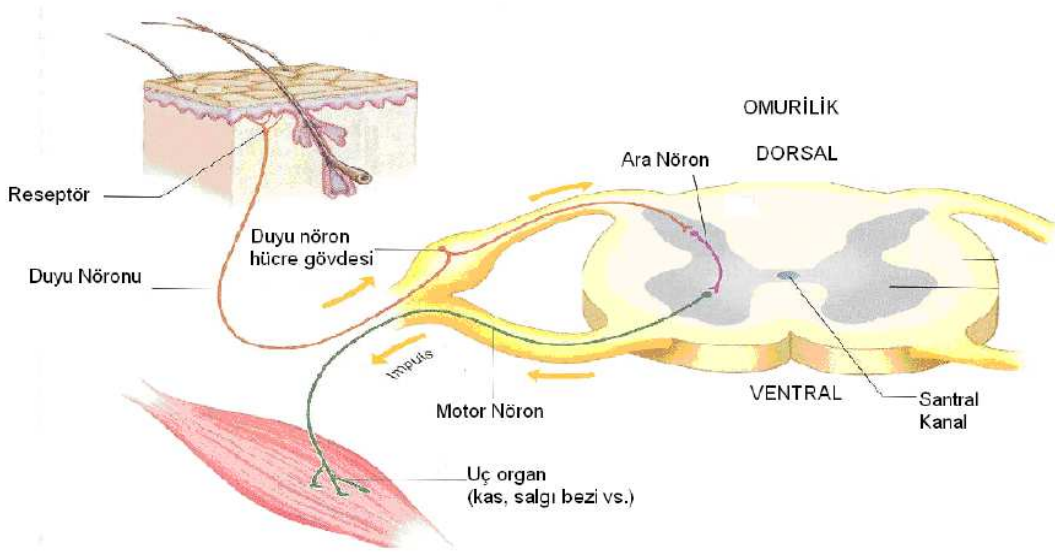
Son yıllarda özellikle kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle maksillofasial cerrahide kullanılmaya başlanan bu yöntemin günümüzde birçok dokunun iyileşmesinde hatta periferik sinir iyileşmesinde de olumlu etkileri olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (8,9,10,11).

Bu çalışmada, sinir grefti ile yapılan bir sinir defekti rekonstrüksiyonu modeli üzerinde, trombositten zengin plazmanın iyileşme üzerindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Ayrıca sinir greftinin bir kısım epinöriyumunun uzaklaştırılmasıyla trombositten zengin plazmanın içeriğindeki büyüme faktörlerinin greft üzerinde ek bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

# GENEL BİLGİLER

## PERİFERİK SİNİR ANATOMİSİ

Periferik sinir sistemi (PSS) , santral sinir sisteminin (SSS) periferde gösterdiği motor ve sempatik yanıtları ileten, aynı zamanda da çevreden gelen uyarıların duyusunu merkezi sinir sistemine taşıyan, çift yönlü iletme sahip önemli bir sistemdir. Motor, duyu ve otonom olmak üzere 3 tip periferik sinir bulunmaktadır (**Şekil 1**). Motor sinirlerin hücre gövdeleri medulla spinalis ön boynuzunda yerleşir, duyu sinirlerinin hücre gövdeleri ise dorsal spinal arka kökler içerisinde yerleşmişlerdir. Otonom sinir sistemine ait nöron gövdeleri ise SSS içerisindeki bazı nükleuslarda veya SSS dışındaki gangliyonlarda toplanmıştır. Ön köklerden çıkan motor sinirler ile arka köklerden çıkan duyu sinirlerin akson uzantıları birleşerek periferik sinirleri oluşturur. Bunun yanında otonom afferent ve efferent sinir lifleri de periferik sinirde bulunur. (17).



**Şekil 1:** Periferik sinir duyu ve motor kökleri şematik çizimi (Shier D, Butler J, Lewis R. Hole's Essentials of human anatomy and physiology. 9th ed. New York: McGraw Hill, 2006: 393' den çevrilerek alınmıştır).

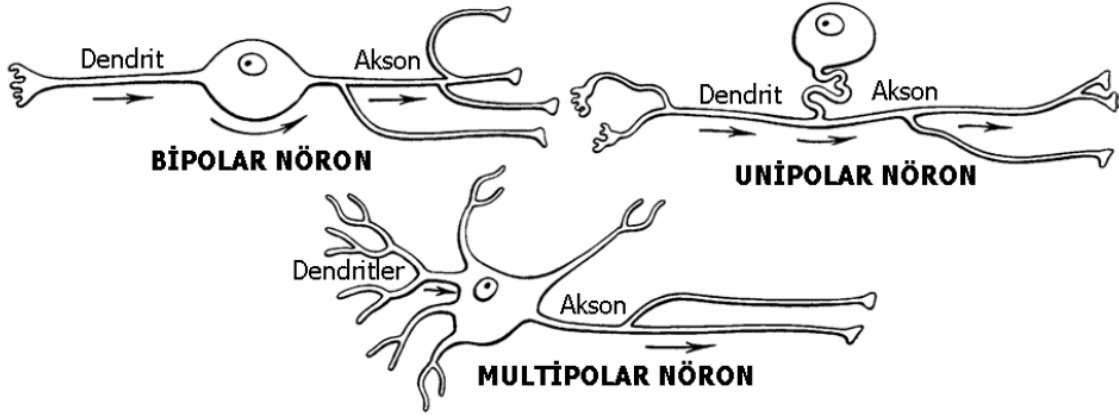
## **Nöron**

Sinir hücresinin SSS'nin temel fonksiyonel hücresidir. Hücrenin ana gövdesi perikaryon olarak isimlendirilir. Hücrenin ana gövdesinin dentrit ve akson denen uzantıları vardır. Dentritler genellikle çok sayıda olup, çevreden gelen uyarıları hücre gövdesine iletmek ve sinir hücreleri arasındaki iletişimi sağlamakla görevli sitoplazmik çıkıntılardır. Akson genellikle her hücrede tek olup hücrenin perifer ile olan iletişimini sağlayan yapıdır. Aksonlar orijin aldıkları hücre gövdesinin binlerce katı olabilirler. Sinir hücresinin metabolik olayları diğer tüm hücreler gibi hücre çekirdeğinin bulunduğu gövde kısmında gerçekleşmektedir. Bu nedenle aksonun fonksiyon görebilmesi için gövde ile ilişkisinin sağlam olması gerekmektedir. Akson ile hücre gövdesi arasındaki ilişki bozulduğu zaman gövdeden bağımsız distal kısımda metabolik olaylar gerçekleşemez ve bu nedenle de bu distal kısım dejenerasyona uğrar. (17).

Sinir hücresinin gövdesi perikaryon olarak isimlendirilir. Perikaryonda tek çekirdek ve birden fazla çekirdekçik bulunur. Bunun dışındaki organeller arasında Nissl cisimciği olarak da adlandırılan granüllü endoplazmik retikulum protein sentezinden sorumlu organeldir. Sinir rejenerasyonu gibi metabolizmanın arttığı durumlarda bu organellerin sayısı da artar. Sitoplazmada bulunan diğer önemli bir yapı gövdenin ve uzantıların şeklinin korunmasını sağlayan, ayrıca metabolitlerin taşınmasında görevi olan hücre iskeletidir. Hücre iskeleti nörofibrillerden oluşur. Bu çatının alt molekülleri nörotübül ve nörofilamanlardır.

Nöronların içerdikleri akson ve dendritler sayısı, uzunluk ve şekilleri açısından farklılıklar gösterebilir. Bu farklılıklara bağlı olarak nöronlar unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (**Şekil 2**).





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

### **Akson**

Akson hücre gövdesinden çıkan bir uzantıdır. Hücre zarı bu uzantı boyunca devam eder. Akson üzerindeki hücre zarı aksolemma olarak isimlendirilir. Akson içerisindeki sitoplazma kısmı ise aksoplazma adını alır. Akson içerisinde hücre iskeleti elemanları bulunur. Bunların, iletim ve yapısal bütünlüğün sağlanmasında önemi vardır. Yine aksoplazma içerisinde düz endoplazmik retikulum, lizozom ve veziküller gibi hücresel elemanlar bulunabilirken, golgi cisimciği ve Nissl cisimciği olarak adlandırılan granüllü endoplazmik retikulum bulunmadığından aksonda protein sentezi gerçekleşemez. Bu nedenle de aksonun canlılığını koruyabilmesi için hücre gövdesine bağlı olması gerekmektedir.

Aksonlar periferik sinir sisteminde mutlaka uydu hücreler olan Schwann hücreleri tarafından sarılı olarak bulunurlar. Bunların aksonun etrafını sarma şekillerine göre aksonlar miyelinli veya miyelinsiz olarak sınıflandırılır.

Aksonlarda hücre gövdesinden uzak kısımlarda diğer sinir hücre gövdeleri, dendrit veya başka aksonlarla bağlantı yapan yan dallar bulunabilir. Bu yan dallar teledendria olarak isimlendirilir. Aksonun en uç terminalinde ise başka bir sinir hücresi, kas ya da salgı bezi ile yaptığı bağlantıya sinaps denir. Sinaps sayesinde uyarı hedef organa iletilir (18).

Akson içerisinde hücre gövdesinden akson terminaline doğru veya tam ters yönde pek çok madde taşınır. Bu taşıma sistemi Ca-Mg ATPaz ile sağlanan ATP ile çalışır. Hücre

gövdesinden akson terminaline doğru olan iletim “Anterograd” iletim olarak isimlendirilir ve bu akım iki farklı hızda olabilir:

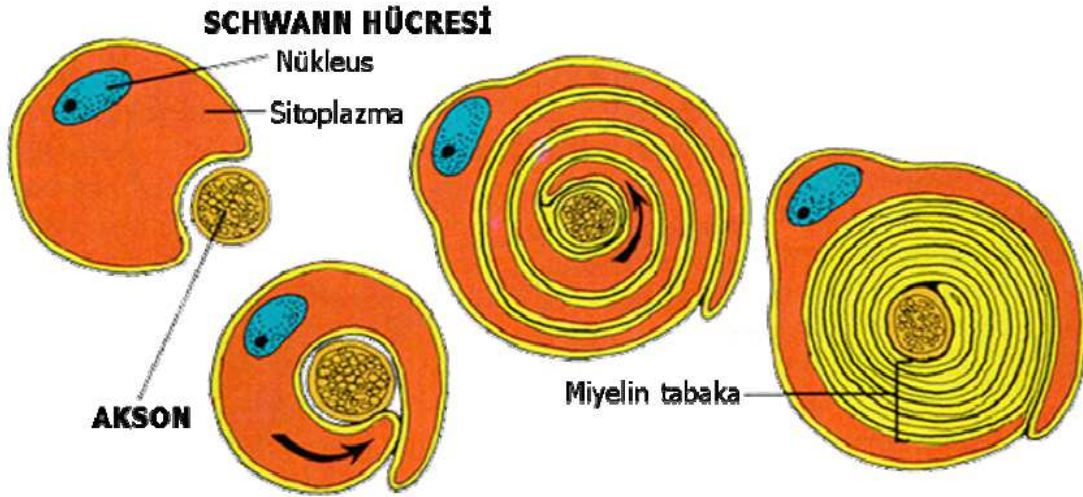
1) Yavaş anterograd taşıma: İletim hızı 1–6 mm/gün olup, aksonların sitoskeletal elemanları bu yolla taşınır.

2) Hızlı anterograd taşıma: Hız yaklaşık 400 mm/gün olup, glikoprotein, lipid gibi hücre zarı molekülleri, çeşitli enzim ve nörotransmitter içeren veziküller taşınır.

Akson terminalinden hücre gövdesine doğru olan taşıma sistemi ise “Retrograd” (somatopedal) taşıma olarak isimlendirilir. Ortalama hız 240 mm/gün kadardır. Retrograd taşıma ile nörotransmitter içeren veziküller ve intra-aksonal proteinlerin geri dönüşümü sağlanır. Ayrıca bu proteinler dışında herpes simpleks ve polio gibi virüsler de geriye doğru taşınabilirler (17,19,20).

### **Schwann Hücreleri ve Miyelin Kılıf**

Schwann hücreleri nöroektodermal kökenli olan periferik sinir sisteminin uydu hücreleridir. Miyelinli veya miyelinsiz her sinir lifinde aksonlar uç uca dizilmiş Schwann hücreleri ile sarılmışlardır. Miyelinli liflerde bu hücreler akson çevresinde konsantrik karakterde fosfolipid bir tabaka olan miyelin kılıfını sentezlerler. Bu konsantrik yapı Schwann hücre zarının çok katlı olarak akson etrafına yığılmasıyla meydana getirilir (**Şekil 3**). Miyelinli liflerde her bir Schwann hücresi tek bir aksonu çevrelerken, miyelinsiz liflerde bir Schwann hücresi birden fazla aksonu çevrelemektedir. Schwann hücrelerinin görevi; iyon dengesinin sağlanmasına, nörotransmitterlerin dağılımına ve aksoslemma boyunca sodyum kanallarının yerleşimine katkıda bulunmaktır. Ayrıca Schwann hücreleri sinir lifini çevreleyen bir bazal membran üretirler. Bu bazal membran tip 4 kollajen ve lamininden zengindir. Sinir rejenerasyonunda, yeni büyümekte olan aksonal tomurcukların distal sinir güdüğüne uzanımları sırasında bu bazal membran rehberlik görevi görür (17).



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

Miyelin diğer hücre zarlarına benzemekle birlikte içeriği farklıdır. Lipid protein oranı 3/1'dir. Miyelin içeriğindeki lipidlerin %20-30 kadarı kolesteroldür. Kolesterol multilameller yapının stabilizasyonunu sağlar. Bunun dışında glikolipid yapısında olan galaktoserebrozid, sülfatid ve gangliozidler de miyelinde bulunan lipidlerdir. Miyelin tabakasında bulunan proteinler glikoprotein yapıdadır. Bu glikoproteinler arasında protein zero (Po), periferik miyelin protein 22 kDa (PMP 22), miyelin ilişkili glikoprotein (MAG), epitelyal kadherin ve periaksin ağırlıklı olarak bulunanlardır (21).

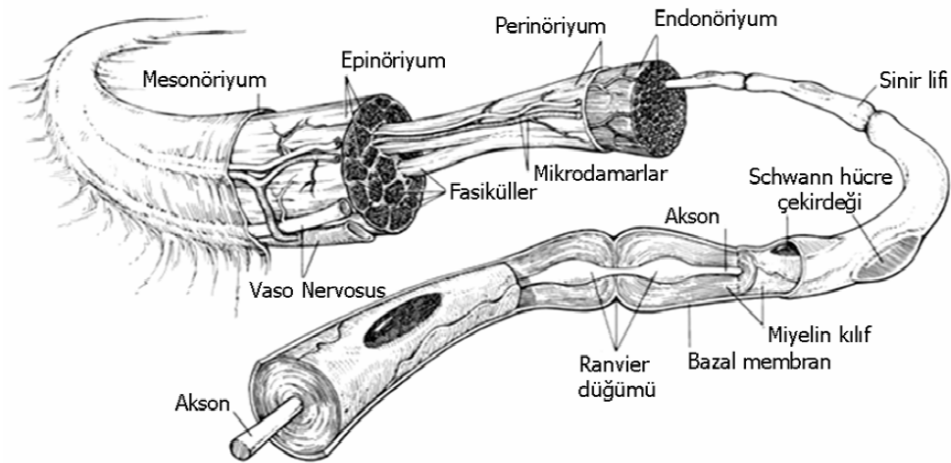
Büyük çaplı somatik sinirlerin tamamına yakını miyelinli iken, 1 mikrometreden ( $\mu\text{m}$ ) küçük çaplı aksonlar genellikle miyelinsizdir. Memelilerde dorsal spinal köklerin ve kutanöz sinirlerin yaklaşık %75 kadarı, kasa giden liflerin %50 kadarı ve postgangliyonik otonomik liflerin tamamına yakını miyelinsizdir. Miyelinli aksonlarda iki Schwann hücresi arasında miyelinsiz kısımlar vardır. Bu kısımlar Ranvier düğümleri olarak adlandırılır (**Şekil 4**). İki Ranvier düğümü arasında tek bir Schwann hücresi ile sarılı olan kısım internod alan olarak isimlendirilir. Elektriksel uyarı bir Ranvier düğümünden diğerine sıçrayıcı (saltatuar) tarzda iletilerek çok daha hızlı bir uyarı iletiminin gerçekleşmesi sağlanır (18).

Sinir lifinin miyelinli olup olmaması yanında, kılıfın kalınlığı da iletim hızını etkiler. Miyelinsiz liflerde çap 0.2–1.5 µm ve iletim hızı 0.4–2.0 m/sn (metre/saniye) iken; kalın miyelinli sinirlerde çap 12–20 µm ve iletim 72–120 m/sn gibi yüksek hızlardadır (18). İletim hızları ve çaplarına göre sinir lifleri 3 gruba ayrılır (17):

- A grubu lifler: Miyelinli somatik afferent ve efferent lifler bu gruptadır. Çapları 2.5–22 µm, ileti hızları 15–100 m/sn arasında değişir.

- B grubu lifler: Miyelinli otonomik pregangliyonik lifler bu gruptadır. Çapları 3 µm, ileti hızları 3–15 m/sn arasında değişir.

- C grubu lifler: Miyelinsiz somatik ve visseral afferent lifler ile postgangliyonik lifler bu gruptadır. Çapları 0.2–1.5 µm, ileti hızları 0.3–1.6 m/sn arasında değişir.



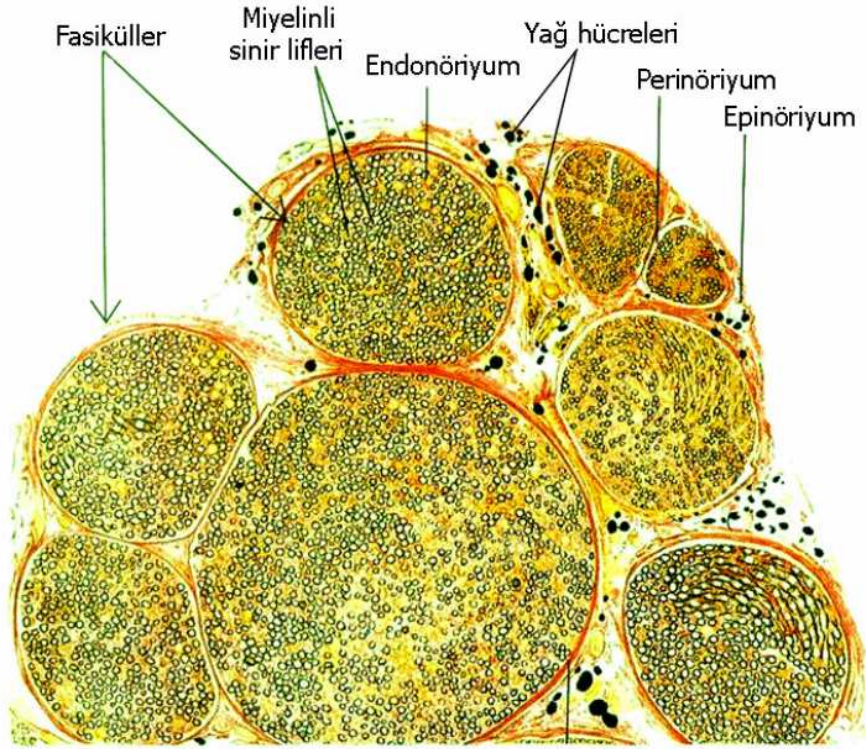
**Şekil 4:** Normal periferik sinir anatomisi. (Brandt KE, Mackinnon SE: Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery, 5.th ed, Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM. (eds) Lippincott-Raven, Philadelphia s:80, 1997)

## Periferik Sinirin Bağ Dokusu

Sinir kesit alanının % 25-85 kadarı bağ dokudan oluşmaktadır. Bu oran sinire ve yer aldığı bölgeye göre değişiklik gösterebilir. Örneğin eklem bölgelerinden geçerken sinirin bağ dokusu daha kalındır. Periferik sinirler birbirinden ayrı 3 bağ doku tabakası ile çevrelenmişlerdir (**Şekil 5**). Her bir sinir lifi, en içte endonörium, daha dışta perinörium ve en dışta da epinörium tabakası bulunur.

Endonörium, mukopolisakkarit temel madde içerisinde yer alan kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve kapiller sistemden oluşan bir bağ dokudur. Ancak elastin içermez. Fasikül, sinir liflerinin bir araya gelerek oluşturduğu yapıdır. Her fasikül perinörium ile sarılmıştır. Perinörium, mekanik olarak sağlam, yassı perinöral hücreler tarafından oluşturulmuş olan çok katlı dens bir lameller tabakadır ve travmalara karşı bir bariyer görevi görür (22). Aynı zamanda perinörium kan-sinir bariyerinden sorumlu olan yapıdır. Distale doğru ilerledikçe perinörium tabakası da incelik ve en distalde lameller yapısı tek kat kalınlığa düşer.

Kan-sinir bariyeri, perinöral tabaka ile endonöriumdaki endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı ile sağlanır. Bu bariyer, endonörium içindeki aksonal çevre ile vücuttaki ekstrasellüler boşluğu ayıran seçici geçirgen bir bariyer olup, aksonlar için uygun fizikokimyasal mikroçevrenin sağlanması ve korunmasında önemlidir. Endonöral damarlar ile en dıştaki epinöral damarları birleştiren anastomotik arteriol ve venüller perinöriumu delerek geçerler (20). Perinörium 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 (23).



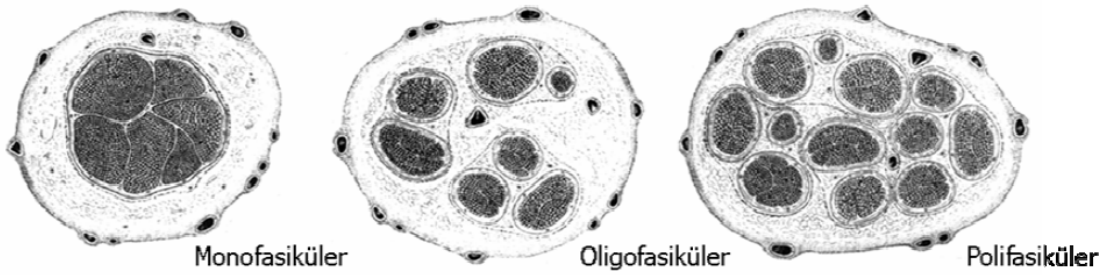
**Şekil 5:** Sinir kılıfları (Berry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous system. Gray's anatomy. 38th ed. Williams P.L. Churchill Livingstone, Edingburgh, s: 947, 1995)

Sinir kılıflarının en dış tabakasını oluşturan bağ doku ise epinöriumdur. Epinörium kollajen tip I ve III, fibroblastlar ve değişen oranlarda yağ dokusu içerir. Epinöriumun görevi, fasikülleri ekstremite hareketleri sırasındaki travmalardan korumaktır. Bu nedenle özellikle eklem bölgelerinde ve yüzeysel yerleşimli sinirlerde daha kalın bir yapıya sahiptir. Epinöriumun kalınlığı sinirin tipi, seviyesi ve bireylere göre farklılıklar gösterebilir. Toplam sinir kesit alanının % 35-75'i arasında değişen bu kalınlık yine distale gittikçe azalır.

Epinörium fonksiyonel olarak iki tabakadan oluşur. Derin tabakaları "internal (interfasiküler) epinörium" olarak adlandırılır. Bu tabaka fasiküllerin etrafını sararak fasikülleri gevşekçe bir arada tutar. "Eksternal (epifasiküler) epinörium" ise daha dışta yer alır. Fasiküllerin üzerinden kolaylıkla ayrılabilen ve paranörium olarak da bilinen bir tabakadır (24). Epinörium içerisinde besleyici kan damaları ile sinire ait lenfatikler de bulunur.

Periferik sinirler içerisindeki fasiküler yapıların dağılımına göre üç ana gruba ayrılır (**Şekil 6**):

1. Monofasiküler sinir: Tek bir fasikül bulunur.
2. Oligofasiküler sinir: Birkaç büyük fasikül içeren sinirdir.
3. Polifasiküler sinir: Periferik sinir içerisinde çok sayıda fasikül mevcuttur. Fasiküller gruplar halinde veya grup oluşturmaksızın bulunabilirler.



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

### **Periferik Sinir Mikrovasküler Anatomisi**

Periferik sinirlerin etrafında bir vasküler ağ olduğunu gösteren ilk çalışma Isenflamm ve Doerffler tarafından 1768 yılında yapılmıştır. Bu dolaşım sistemi ile ilgili detaylar daha sonra, 1878 yılında Ranvier ve 1890 yılında Quenu ile Lejars isimli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Sunderland insanların çeşitli sinirlerinde vasküler yapıların detaylarını incelemiştir. Günümüzde vital mikroskopik yöntemlerin gelişmesi ile deneysel hayvan modellerinde, intranöral mikrovasküler yapının in vivo olarak incelenmesi mümkün olmuştur (26).

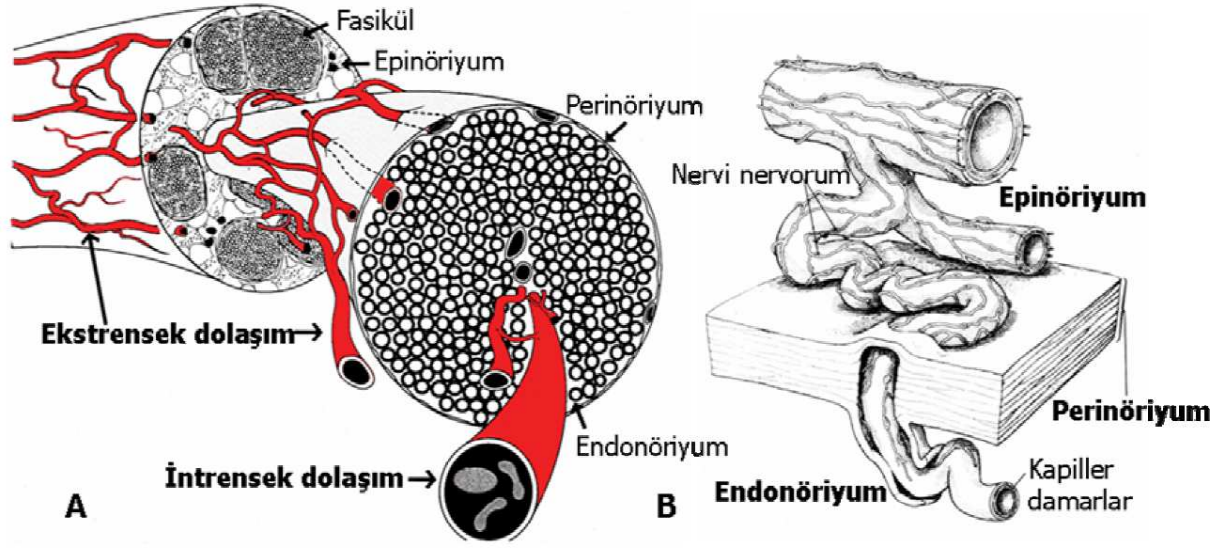
Sinir hücrelerinde, normal fonksiyonların devamlılığının sağlanabilmesi için oksijen desteği ile aerobik metabolizmalarının korunması gerekir. Bu nedenle periferik sinirlerde damarlanma oldukça zengindir. Periferik sinirlerde gerekli olan enerji, epinörium, perinörium ve endonörium tabakalarında bulunan ve birbiri ile yakın bağlantılı olan bir vasküler ağ sayesinde sağlanır (27). Bu zengin vasküler ağ ekstrensek ve intrensek olmak

üzere başlıca iki sistem oluşturur (**Şekil 7A**). Ekstresek ve intrinsek sistemler, birbiriyle bütünleşmiş çalıssa da fonksiyonel olarak birbirinden bağımsız iki ayrı sistemdir.

Ekstresek sistem, sinirin dış yüzeyindeki gevşek bağ doku içerisinde bulunan damarlardan oluşur. Bu bölgedeki damarlara vaso nervosa denir ve bu dallar mezonörium denen gevşek bağ doku kılıfı içerisinde uzanırlar. Mezonörium, kan damarlarını ve epinöriyumu çevreleyen ayrı, gevşek bir kılıf olarak tanımlanmış olmasına rağmen, ayrı yapı olmayıp bir diseksiyon artefaktı olabileceği de ileri sürülmüştür (27). Vaso nervosalar sinirlere yandaş seyreden çevre damarlardan besleyici dallarla oluşturulur. Kaslara giden perforan damarlar ve periosteal damarlar da bu sisteme katkıda bulunurlar. Bu sistem sempatik uyarılar ve lokal ilaçlar gibi çevresel faktörlerden etkilenir. Bu damarlar mezonöriumda uzunlamasına seyirleri boyunca yer yer mezonöriyumu delerek, intrinsek sistemle anastomozlar oluştururlar. İntresek sistem; epinörium, perinörium ve endonörium içerisinde yer alan vasküler pleksustur. Bu sistem metabolik olaylardan, sempatik uyarılardan ve lokal ilaçlardan etkilenmez. Sinirlerin vasküler problemlere karşı korunmasında bu iki sistem arasındaki dengeleyici bazı mekanizmalar görev alır (17,19,26).

Epinöriyumun katları içerisinde seyreden epinöral damarlar, her fasikül veya fasikül demetine besleyici dallar gönderir. Bu damarlar ayrıca değişik seviyelerde perinöral vasküler pleksuslarla da bağlantılar oluştururlar. Periferik sinirin uzunlamasına seyri sırasında perinöral damarlar, birçok alanda perinöriyumun iç tabakasını oblik olarak delerek endonöral aralığa geçer ve burada endonöral vasküler pleksusu oluşturur (**Şekil 7B**). Endonöral vasküler pleksustaki kapillerlerin çapı oldukça geniştir. Ayrıca bu kapillerlerin sıkı endotelyal bağlantıları kan-sinir bariyerinin korunmasında da önem arz eder. Endonöral vasküler yatak, fasiküller boyunca devamlı anastomotik ağlar oluşturarak sabit bir fasiküler kan akımı sağlar. Endonöral dolaşım, perinöriyumun daha dış tabakalarında geçerli olan sempatik inervasyonun aksine, lokal perfüzyon basıncı ile dengede tutulur (20,26). Periferik sinirlerdeki damarların sinüzoidal ve kıvrımlı bir yapıya sahip olmaları sayesinde, vasküler sistem gerilme tipi travmalarda hasardan korunur (20,26,28).





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

Periferik sinirlerde klasik bir lenfatik sistem bulunmasa da, perinöriyum dışında ve endonöriyum içinde lenfatiklere benzer kanalların taşıma görevi yaptığı bilinmektedir. Bunların epinöral alandaki gerçek lenfatiklerle bağlantısının da bulunmadığı düşünülmektedir. Normalde endonöral damar endoteli geçirgen değildir, ancak travma nedeniyle geçirgenliklerinin artması endonöral ödeme neden olur. Klasik bir lenfatik sistem olmadığından, travma sonrasında oluşan ödem erken dönemde fasikül içerisindeki basıncın artmasına neden olur. Bu ödem yine endonöral mikrodolaşım ile temizlenir. Ödem nedeniyle sinirin normal fonksiyonunun devamı için gereken mikroçevre bozulur. İleri evrede ise fibrozis ve skar gelişimi ile problem yaratır (29).

## PERİFERİK SİNİR YARALANMALARI

Periferik sinir yaralanmaları gerilim, laserasyon veya kompresyon gibi çeşitli nedenlerle oluşabilmektedir. Yaralanma tipi ne olursa olsun, önemli olan sinirin iç yapısında oluşan hasarın derecesidir. Yaralanmanın mekanizması ve hastanın yaşı gibi birçok faktöre bağlı olarak oluşan hasar değişebilmektedir. Yaralanmaya neden olan mekanik etkinin keskin, künt, avülzif veya kompresif olması ve sinir hasarına sinir defektinin eşlik edip etmemesi de önemli faktörlerdir. Sinir yaralanmalarının sınıflandırılmasındaki önem, elde edilecek olan iyileşme düzeyinin, yaralanmanın derecesi ile yakından ilişkili olmasından kaynaklanır.

Periferik sinir yaralanmalarına ait ilk sınıflandırma 1941 yılında Cohen tarafından yapılmış ve daha sonra bu sınıflandırma 1947 yılında Seddon tarafından popüler hale getirilmiştir. Seddon tarafından yapılan sınıflandırmada sinir hasarı nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak 3 gruba ayrılmıştır. Sunderland, 1951 yılında bu sınıflamayı daha detaylı olarak genişletmiştir. Sunderland periferik sinir yaralanmalarını, 1 ile 5 arasında değişen 5 ayrı grupta tanımlamıştır. Mackinnon, 1988 yılında birkaç tip sinir hasarını bir arada içeren 6. derece sinir hasarını bu sınıflamaya dahil etmiştir (17,24,30).

### **Seddon Sınıflaması (1947)**

**1. Nöropraksi:** Periferik sinir yaralanmasının en hafif şekildir. Periferik sinirde geçici fonksiyon kaybı olarak tanımlanmıştır. İletim segmental olarak bozulmuştur. Motor fonksiyon tutulumu duyu fonksiyonlarının daha fazla etkilenmiştir. Histolojik olarak anatomik bütünlük ve aksonal devamlılık korunmuştur ancak demiyelinizasyon görülebilir (31). Sinirdeki anatomik bütünlük korunduğundan ve distaldeki kaslar uyarılabildiğinden dejenerasyon izlenmez (19). Geçici kompresyon, traksiyon ve künt travma nöropraksiye neden olabilir. Cerrahi müdahale gerekmez ve sinir ortalama 6-8 hafta içerisinde tamamen normal haline döner. Aksonal hasar olmadığından dejenerasyon ve rejenerasyon izlenmez. Buna bağlı olarak da Tinel bulgusu yoktur (20).

**2. Aksonotmezis:** Bu yaralanmada, periferik sinirde bölgesel olarak sadece akson devamlılığında ve miyelin kılıfta bir kesilme mevcuttur. Schwann hücrelerinin bazal membranı, endonörium, perinörium ve epinörium gibi bağ dokular sağlamdır. Yaralanma sonucunda hücre ölmez ise, lezyon distalinde Wallerian dejenerasyon ve proksimal ucunda aksonal tomurcuklanma görülür (32). Schwann hücreleri endonöral doku ve bazal membranı kılavuz olarak yeni kolonlar oluşturacak şekilde prolifer olurlar. Bağ doku bütünlüğü korunduğundan aksonun proksimalinden distale kolayca ilerler. Prognoz genellikle iyi olup, fonksiyonlar tam olarak geri döner. İyileşme süresi hastanın yaşına, uç organa, lezyonlar arasındaki mesafeye ve rejenerasyon hızına bağlı olarak değişmektedir. Rejenerasyon hızı günde 1-2 mm hızla ilerlerse de, iyileşme süresinde uyarılmayan kaslarda geçen sürenin uzun olmasına bağlı olarak denervasyon atrofi gelişebilmektedir (17,31,32).

Endonöral kılıf bütünlüğü korunduğu için aksonlarda yanlış yönelim izlenmez. Spontan rejenerasyon izlenen durumlarda Tinel bulgusu vardır ve aksonal rejenerasyonun ilerlemesiyle birlikte bu bulgu da distale doğru ilerler (20).

**3. Nörotmezis:** Anatomik olarak sinir devamlılığının tamamen kesintiye uğradığı en ağır yaralanma şeklidir. Lezyonun distalinde denervasyona bağlı olarak fonksiyon kaybı izlenir. Hasarın nedeni tam kat bir kesi olabileceği gibi, iletimi engelleyen ya da siniri infiltre etmiş bir tümör veya skar doku da olabilir (33). Sinir devamlılığı bazı durumlarda korunmuş gibi görünüyorsa da, sinirin iç yapısındaki bozulma nedeniyle sinirde fonksiyon yoktur. Sinir fasikülünün iç yapısı, aksonlardaki yıkım ve Wallerian dejenerasyon nedeniyle bozulur. Distalde daha fazla olmak üzere, hem distalde hem de proksimalde dejenerasyon vardır. Proksimaldeki kesik akson uçlarının Schwann hücrelerince oluşturulan tüplere girmesi mümkün değildir ve cerrahi onarım yapılmazsa genellikle fonksiyonel bir gelişim olmaz. Ayrıca cerrahi onarım yapılmaması durumunda proksimal uçtaki aksonal rejenerasyon nöroma oluşumuna neden olabilir. Endonöral kılıf bütünlüğü de çeşitli derecelerde bozulur ve ek olarak kanama, ödem, inflamatuvar reaksiyonlar sonucu fibrozis kaçınılmaz hale gelir (34).

### **Sunderland Sınıflaması (1951)**

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

**1. derece hasar:** Seddon sınıflamasındaki nöropraksiye karşılık gelen bu hasar derecesinde sinir bütünlüğü korunmuştur. Aksonlar ve sinir bağ dokularında hasar yoktur. Sadece travmaya uğramış segmentte iletim kaybı vardır. İletim kaybı elektrofizyolojik değerlendirmeler ile saptanır. Lezyon distalinde ise iletim normaldir. Yine nöropraksi ile aynı şekilde motor fonksiyonlarda daha fazla olmak üzere duyu ve motor kayıp gözlenir. Turnike kullanımı gibi lokal basınç yaratan klinik uygulamalar sonucu görülen sinir hasarı bu gruba verilebilecek bir örnektir. Tedavide cerrahi gerekmez. Altı sekiz hafta içerisinde şikayetler tamamen geçer.

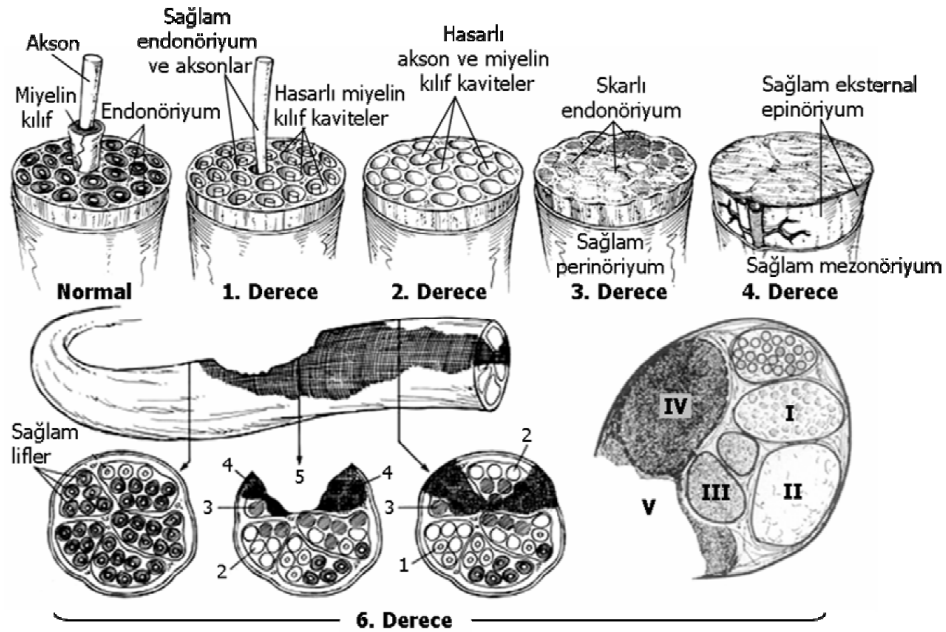
**2. derece hasar:** Seddon'un sınıflamasındaki aksonotmezis eşdeğeridir. Sinir bağ dokuları tamamen sağlam olmakla birlikte, aksonal hasar vardır. Hasar distalinde Wallerian dejenerasyon gelişir. Schwann hücrelerine ait bazal membran sağlam olduğundan prognozu iyidir. Ancak iyileşme 1. derece hasara oranla daha uzun sürede gerçekleşir.

**3. derece hasar:** Hasarlı olan dokular aksonlar, Schwann hücre kılıfı ve endonöriumdur. Epinörium ve perinörium sağlamdır. Akson distalinde Wallerian dejenerasyon izlenir. Endonörium ve Schwann hücre kılıfının hasarlı olması nedeniyle iyileşme tam olarak gerçekleşmez. Rejenerasyon sırasında nöroma gelişimi veya aksonların yanlış yönelimi sık karşılaşılan bir sorundur. Klinikte bu daha geç görülen iyileşme nedeniyle motor fonksiyonda yetmezlik ve duyu dezoriyantasyonudur. Sunderland 3. Derece hasarı aksonotmezis ve nörotmezis karışımı olarak da kabul edilebilir. Daha hafif ve iyileşmeye meyilli olanlarında intrafasiküler alanda minimal bir fibrozis gelişimi ile önemli derecede sinir rejenerasyonu gözlenir. Rejenerasyonun iyi olduğu bu durumda iyileşme aksonotmezis ile benzer kliniktedir. Ancak daha şiddetli bir yaralanmada fibrozis daha baskın olacağından rejenerasyon kötü etkilenebilir. Bu da klinikte nörotmezis benzeri bulgulara neden olacaktır. Rejenerasyon ayda yaklaşık 1 cm ilerleyen tinnel bulgusu ile takip edilebilir. Ancak nöroma gelişimi veya aksonların yanlış yönelimi nedeniyle kötü fonksiyonel sonuçların ortaya çıkması sıktır.

**4. derece hasar:** Tek sağlam yapı epinöriyumdur. Akson ve diğer tüm bağ dokuların devamlılığı bozulmuştur. Periferik sinirin dışarıdan görünümü normal olsa da fibrozis nedeniyle rejenerasyon engellenmiştir ve bu nöroma gelişimine neden olur. Spontan iyileşme oldukça nadir olduğundan cerrahi önerilir. Cerrahi olarak hasarlı kısım rezeke edilerek sağlam sinir uçları arasında yeniden bağlantı sağlanmalıdır. Etiyolojide sıklıkla traksiyon, ezilme, koter yanığı veya yanlışlıkla sinire yapılan enjeksiyon gibi yaralanmalar bulunur.

**5. derece hasar:** Seddon'un sınıflamasındaki nörotmezisi karşılar. Sinirin tam olarak devamlılığının kaybolduğu yaralanmalar sonucunda genellikle görülür. Cerrahi müdahale yapılması gereklidir.

Son olarak Mackinnon bu sınıflandırmaya 6. derece sinir hasarını eklemiştir. Bu yaralanmada tipinde değişik seviyelerde ve farklı derecelerde sinir hasarı mevcuttur. Yaralanmanın homojen olmadığı ezici tipteki yaralanmalarda genellikle ortaya çıkar. Cerrahi olarak intranöral nöroliz yapılarak fasiküller birbirinden ayrılır. Sağlam fasiküller korunarak 4. ve 5. derecede hasarlı olan fasiküller cerrahi olarak onarılır.



**Şekil 8:** Periferik sinir yaralanmalarının sınıflandırılması (Brandt KE ve Mackinnon SE: Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery. Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM. (eds) Lippincott-Raven, Philadelphia, s:82,

1997 ve Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. Ann. Plast. Surg. 22: 257-64, 1989'dan değiştirilerek).

## **PERİFERİK SİNİR CERRAHİSİ**

### **Tarihçe**

Periferik sinir sistemine ait ilk bilgiler Hippocrates (MÖ 460-370) dönemine aittir. Sinir kesilerinin belli bazı duyuşsal veya motor kayba yol açtığı ise ilk olarak Galen (MS 130-200) tarafından bildirilmiştir. Kesilmiş bir sinirde, sinir uçlarının karşılıklı olarak onarımı ilk kez Ferrara (1608) tarafından gerçekleştirilmiştir. Schwann isimli araştırmacı 1839'da kendi adını verdiği Schwann hücreşini tanımlamıştır. Waller, 1850 yılında sinir hasarını anlamaya yönelik yaptığı çalışmalar sonucunda, hasar alanı distalinde aksonların dejenerasyona uğradığını, proksimalinde ise rejenere olmaya başladıklarını saptamıştır. Bu nedenle aksonal dejenerasyon onun adıyla anılmaktadır. Aynı yıllarda Bernard, kürar ile nöromüsküler blokaj konusunda yaptığı çalışmalar ile sinir iletiminin biyokimyasal temelleri hakkında ilk bilgileri ortaya koymuştur (17).

Ondokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru bugünkü bilgilerle bağdaşmayan çeşitli sinir onarım teknikleri tanımlanmış, ancak bunlar kullanıma girmemiştir. Kayıtlara geçen ilk başarılı sinir onarımı ise Paget tarafından 1847 yılında rapor edilmiştir (24). 11 yaşındaki bir çocukta median sinir onarımı sonrasında fonksiyonda tam düzelme olduğu belirtilmiştir.

Sinir defektlerinin sinir grefti ile rekonstrüksiyonunun yapılabileceğı fikri ilk kez Philippeaux ve Vulpian tarafından ortaya atılmış olsa da, ilk kez 1878 yılında Albert tarafından denenmiştir. Başarılı sonuçlar ise ancak 20. yy başlarında Mayo-Robson tarafından yayınlanmıştır (35).

Sinir sisteminin fonksiyonel anatomisi üzerine yaptıkları çalışmaları nedeniyle Golgi ve Cajal, 1906 yılında Nobel ödülünü almışlardır. Sherrington ise 1906 yılında sinir hücrelerinin fonksiyonel bağlantı noktaları olan sinapsları tanımlamıştır. Bir başka Nobel ödülünü ise Erlanger ve Gasser, 1944 yılında aksonların iletim hızları ve kalınlıkları arasındaki farklılıkları tanımlayarak ve bunların fonksiyonlarını açıklayan elektrofizyolojik çalışmalar yaparak almışlardır (36). Bu bilgileri kullanarak 1948 yılında Hodes, Larrabee ve German isimli araştırmacılar klinikte uygulanabilir elektrofizyolojik sinir testlerini geliştirmişlerdir (17).

Birinci ve ikinci Dünya savaşları nedeniyle yaşanan gelişmeler ve ardından 1963 yılında operasyon mikroskopunun kullanıma girmesi de sinir cerrahisi açısından önemli dönüm noktalarıdır.

Günümüz modern sinir cerrahisinin temelini oluşturan Seddon'un çalışmaları sonucunda, sinir hasar dereceleri ile takip ve tedavi seçenekleri arasındaki ilişkiyi belirtmek için 1948 yılında ortaya koyduğu sınıflandırması önemli dönüm noktalarından biridir. Sunderland ise 1945 ile 1968 yılları arasında yaptığı çalışmalar ile Seddon tarafından yapılan sınıflandırmayı daha da detaylandırmış ve çeşitli onarım tekniklerini geliştirmiştir. Ek olarak periferik sinir internal topografik anatomisi üzerine de incelemeler yapmıştır (17).

Periferik sinir cerrahisinin gelişimine, Millesi ve ark. 1972 yılında, sinir grefti ile yapılan gergin olmayan bir onarımın gergin bir primer onarımdan daha iyi sonuç vereceğini gösterdiği çalışmaları ile (37) ; Terzis ise tedavi teknikleri konusunda yaptığı gelişmelerle önemli katkılarda bulunmuşlardır (17).

### **Onarım Teknikleri**

Sinir onarımında amaç rejenerasyon gösterecek olan liflerin başarılı bir şekilde yaralanma distalindeki uygun çevreye yönlendirmek ve bunu yaparken dikiş hattındaki sinir liflerindeki kaybın minimal olmasına çalışmaktır (38). Fonksiyonel ileti ünitesi olan fasiküllerin devamlılığın sağlanması; cerrahi olarak bu yapıların doğru konumlarda birbirlerine karşılıklı getirilmesi ile mümkün olur (39).

Sinir onarımının başarısının artırmak için yaralanmayı takiben mümkün olan en kısa sürede cerrahi onarım yapılmalıdır (40). Zaman geçtikçe fibrozis nedeniyle fasiküllerin ve epinöral damarların belirlenmesi zorlaşacağından bu yapıların karşı karşıya getirilmesindeki yol gösterici etkileri de azalacaktır. Ayrıca yaralanma sonrası erken dönemde gerginlik minimal olup, zaman içerisinde proksimal ve distal sinir segmentlerinde retraksiyon gelişecektir. Retraksiyon nedeniyle onarım hattında iyileşmeyi kötü etkileyecek bir gerginlik olacaktır.

Ayrıca, zamanla gelişen hedef organ atrofileri nedeniyle geri dönüşümsüz kayıplar görülür. Kas dokusundaki geri dönüşümsüz değişiklikler denervasyon süresinin 18-24 aya

kadar uzadığı durumlarda görölür. Bundan sonra sinir onarımı sağlansa bile motor fonksiyonların geri dönmediği bilinmektedir (41). Duyu organlarının ise denervasyona karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir (19).

Sinir onarımında uzun yıllardır değişmeyen bazı temel prensipler vardır. Bunları sıralayacak olursak:

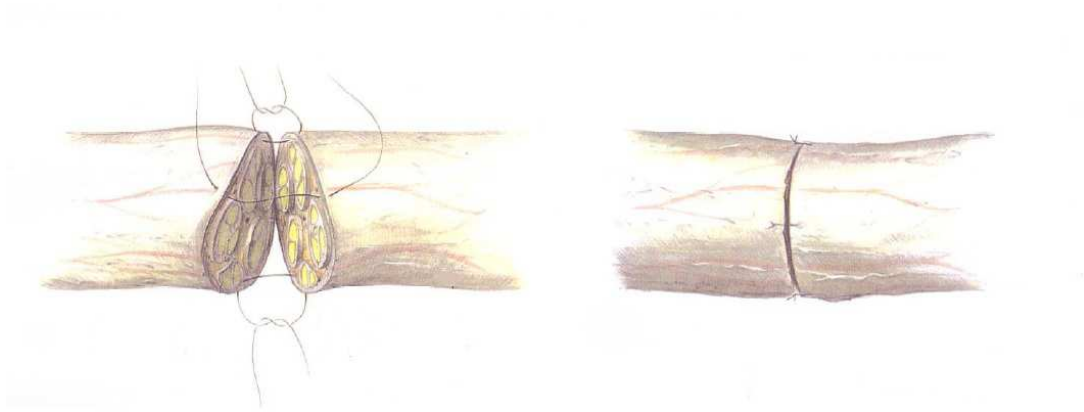
1. Operasyon öncesinde dikkatli bir motor ve duyu muayenesi yapmak gerekir
2. Uygun büyütme, enstrümentasyon ve mikro dikişleri içeren bir mikrocerrahi tekniği kullanılmalıdır
3. Gerilimsiz bir onarım yapılmalıdır
4. Gerilimsiz bir onarım mümkün değilse interpoze edilmiş sinir grefti kullanılmalıdır
5. Şartlar uygunsa primer onarım yapılmalıdır
6. Primer onarımın optimal yapılamayacağı durumlarda onarım 3 hafta kadar ertelenmelidir (örn: yaygın ezilme tarzı yaralanmalarda, sinirde gerilme veya sinir dokusunda kayıp varsa)
7. Hareket aralığı erken dönemde korunarak sinirin dokular arasında kayması sağlanmalıdır
8. Klinik sonuçların en maksimum düzeyde sağlanabilmesi için postoperatif dönemde motor ve duyu rehabilitasyonu ile hareket aralığının sağlanması için mesleki ve fizik tedavi yöntemlerinin uygulanmalıdır (1).

**1. Epinöral Onarım:** Epinöral sütün ile sinir onarımı geleneksel ve sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Dikiş proksimal ve distal uçlardaki epinöriumdan geçer (**Şekil 9**). Epinöral onarımda karşılıklı getirilen sinir uçlarının gerginlik olmadan anatomik olarak tam uygun pozisyonda olmaları prensibine uyulmalıdır. Epinöriumdaki damarların karşılıklı gelmesi rotasyonun uygun şekilde ayarlandığını gösterir. Bu şekilde fasiküller de doğru bir şekilde karşılıklı olarak koapte edilir. İlk sütün konulmadan önce fasiküllerin pozisyonlarının ayarlandığından ve birbirlerini karşıladığından emin olunmalıdır. Kalın sinirlerde 8/0, ince sinirlerde 9/0 veya 10/0 dikişler tercih edilir. Dikiş materyali olarak genellikle emilmeyen dikişler kullanılabilir. Dikiş sayısı sinir uçlarını yaklaştıracak ve gerginlik yaratmayacak mümkün olan en az sayıda olmalıdır (genellikle 4 veya 8 adet) .



Kısa sürede yapılabilmesi ve basit olması nedeniyle epinöral onarım diğer tekniklere nazaran avantajlıdır. Ayrıca sinir içi yapılarına ek zarar verilmeden ve sinir içerisinde reaksiyona neden olabilecek dikiş materyali olmadan gerçekleştirilebilen bir yöntemdir. Dikişlerin çok gergin olarak düğümlenmesi fasiküllerde yanlış eşleşmeye, uçlarının kıvrılmasına üst-üste binmelerine veya epinörium dışına protrüzyonuna neden olabileceğinden önerilmez.

Fasikül sayısının fazla olduğu periferik sinirlerde direk epinöral onarım uygun bir yöntemdir. İki sinir ucunun 8-0 dikişler ile yaklaştırılmadığı kadar gerginlik olan durumlarda direk onarım yapılması önerilmez. Gerginliğin bu derece fazla olmasının başarısızlığa neden olacağı öngörülmektedir. Bu nedenle, kesik sinir uçlarının mobilize edilmesi veya ekstremitenin pozisyonundaki hafif değişiklikler ile giderilemeyecek kadar gerginlik olan durumlarda sinir grefti ile onarım yapılması önerilir (38).

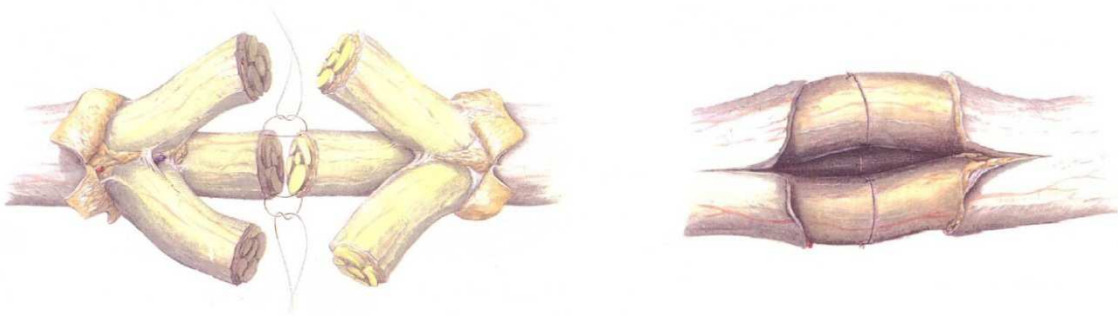


**Şekil 9:** Epinöral onarım (Pechlaner S, Hussl H, Kerschbaumer F, Poisel S. Atlas of Hand Surgery, 1st ed., Stuttgart-New York, s:77, 2000)

- 2. Grup Fasiküler Onarım:** Epinöral onarım tekniğine kıyasla daha pratik ve daha uygun fasiküler eşleşme sağlayan bir yöntemdir. Pratikte, sinirin ana gövdesi içerisinde fasiküllerin iyi organize olduğu ve farklı fonksiyonlara sahip olduğu durumlarda en iyi şekilde uygulanabilir.

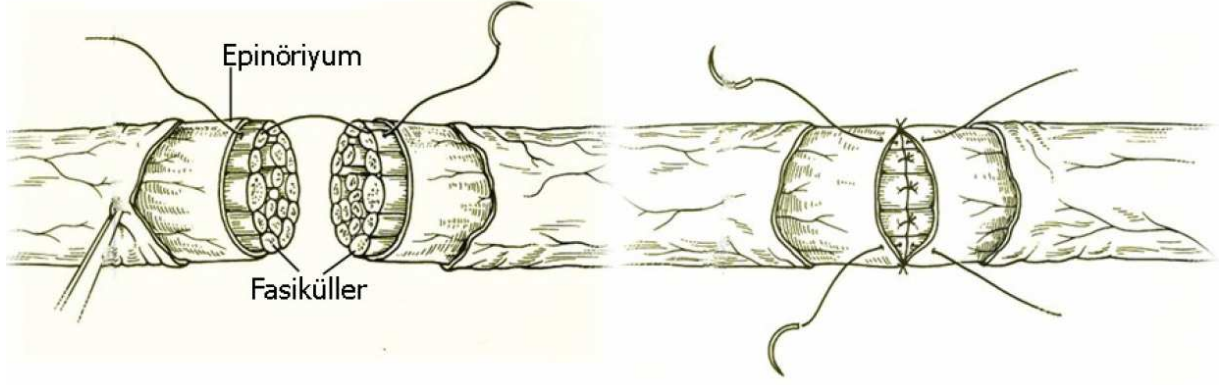
Eşleşen grupların koapte edilmesi interfasiküler epinöral sütürler sayesinde gerçekleştirilir. Dış epinörium geriye doğru diseke edilerek gruplaşmış ardışık fasiküller ortaya çıkartılır. Hasarlı doku olması halinde bunları izole edilmesi güç olduğundan sağlam dokuya kadar debridman yapılmalıdır. Fasikülün kalınlığına göre interfasiküler epinöriumdan geçen 8-0 kalınlıktan 10-0 kalınlığa kadar dikişler kullanılabilir. Genellikle 2-3 adet dikiş her bir grup koaptasyonu için kullanılır. Sütür hattında yine gerginlik olmamalıdır. İnterfasiküler epinörium dış epinörium kadar sağlam bir yapı olmadığından gerginlik olmaması daha da önem taşır. Aksi halde sinir grefti ile onarım düşünülmalıdır (**Şekil 10**).

Grup fasiküler onarımın avantajı anatomik olarak fasiküllerin karşılıklı gelmesinin daha iyi olmasındandır. Fizyolojik çevre (kan-beyin bariyeri) perinöral onarım yöntemine nazaran daha az hasarlanır. Perinöral onarım tekniğine nazaran yine daha az zaman alır ve daha az skar formasyonu görülür (38).



**Şekil 10:** Grup fasiküler onarım (Pechlaner S, Hussl H, Kerschbaumer F, Poisel S. Atlas of Hand Surgery, 1st ed., Stuttgart-New York, s:78, 2000).

**3. Perinöral (Fasiküler) Onarım:** İlk kez 1967 yılında Bora tarafından tanımlanmış olan bir tekniktir (42). Proksimal ve distal sinir uçlarındaki eş fasiküllerin birbirlerine dikilmesiyle optimal eşleşmeyi sağlamak amaçlanır (**Şekil 11**). Fasikülleri ortaya çıkarmak için az bir miktar fasiküller arası epinörium dokusunun proksimal ve distale doğru diseke edilmesi gerekir. Fasiküllerin yeniden bir araya getirilmesi perinöryuma konulan sütürler ile sağlanır. Fasiküler onarımda her fasikülün 2-3 adet 10-0 veya 11-0 dikiş ile tutturulması genellikle yeterli olur (38).



**Şekil 11:** Perinöral onarım (Birch R, Bonney G, Wynn Parry CB. Surgical disorders of the peripheral nerves, 1st ed. Churchill Livingstone, Edingburgh, s:23, 1998).

Fasiküllerin uygun eşlerini saptamak tekniğin en önemli ve zor yönüdür. Sinirin fasiküler dağılımını bilmek bu nedenle önem arz eder. Yaralanmadan sonraki ilk 72 saatte yapılan ameliyatlarda, intraoperatif elektrodyagnostik yöntemler ile motor ve duyu sinirleri birbirinden ayrılabilir. Bu şekilde fasiküler dağılımı tanımlamak mümkün olabilir. Duyusal lifler arasında hatalı fasiküler onarımına bağlı olarak oluşacak fonksiyon kayıpları kortikal yeniden tanımlama ile önlenebilir. Motor aksonların ise duyu aksonlara veya interfasiküler epinöriyuma yönelmesi durumunda fonksiyon kaybı kaçınılmaz olmaktadır (43).

Perinöral dikiş tekniğinin, motor ve duyu sinirlerin kolaylıkla ayrılabilirdiği distal ulnar ve median sinir yaralanmalarında ve parsiyel sinir hasarı olan durumlarda teorik olarak kolayca yapılabildiği iddia edilse de, kesin endikasyonları grup fasiküler onarım kadar net değildir (38). Perinöral onarım yönteminin en önemli dezavantajı, ek diseksiyonlar ve sinir dokusu içerisindeki fazla dikiş materyalinin yarattığı yabancı cisim reaksiyonu sonucu artan intranöral fibrozis riskidir. Fasikül sayısının fazla olduğu durumlarda bu yöntem diğerlerine nazaran daha fazla zaman almaktadır.

Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar sonucunda epinöral ve perinöral veya grup fasiküler onarım yöntemlerinin birbirlerine bariz bir üstünlüğünün olmadığını gösterilmiştir (19,38).

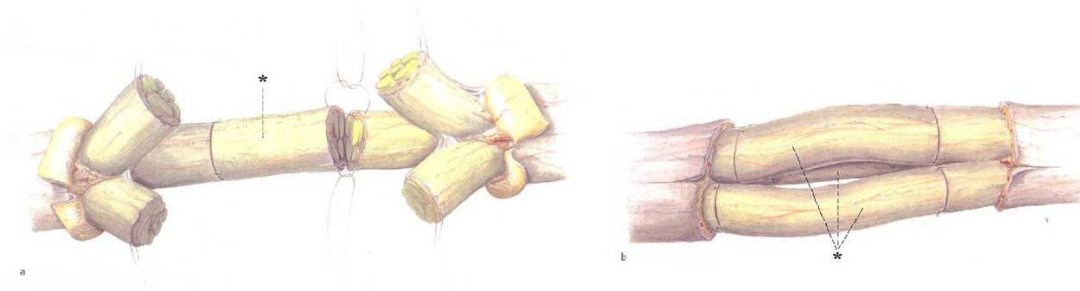
**4. Sinir Grefti İle Onarım:** Sinir yaralanmasının primer olarak onarılmasının mümkün olmadığı durumlarda greft ile rekonstrüksiyon yapılması önerilir. Her ne kadar sinir dokusu içermeyen biyo-uyumlu farklı sentetik maddeler veya doku köprüleri ile sinir allogreftleri otojen sinir greftleri yerine kullanılmış olsa da bunlar deneysel aşamadır ve klinik başarıları sınırlıdır. Sinir otogreftleri bu nedenle halen altın standart yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (3,36,44). Sinir greftleri bazal laminaya sahip bir köprü yapısı sağlamalarının yanında Schwann hücreleri de içeren mükemmel bir çatıya sahiptirler (45).

Günümüzde daha sıklıkla kullanılan sinir greftleme yöntemi Millesi ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan interfasiküler greftleme yöntemidir (46). Bu yöntemin kök sinir grefti yöntemine avantajı, her sinir greftinin çevre doku ile optimal kontak yüzeyi sağlaması ve bu şekilde greftin daha iyi vaskülarize olmasına izin vermesidir. Tek gövde sinir greftinde, kullanılan greft daha kalın olduğundan, greftin santral kısımlarında nekroz ve buna bağlı fibrozis gelişimi nedeniyle daha kötü sonuçlar alınır (36).

İnterfasiküler greftleme yönteminde temel prensip olarak cerrah sağlıklı proksimal ve distal iki uç bulana kadar hasarlı dokuyu uzaklaştırmalıdır. Ekstremitenin hareket aralığında hareket ettirilmesiyle greft alanında bir gerginlik olmadığından emin olunmalıdır. Genellikle defekt uzunluğundan %10 daha uzun greftler kullanılarak retraksiyon veya greftin kontraksiyonuna karşı önlem alınır. Sağlıklı dokuya ulaşıldığında bir miktar epinörium uzunlamasına kesilerek daha sonra sirküler tarzda eksize edilir. Bu şekilde ana fasiküller veya grup oluşturmuş minör fasiküller mikroskop altında diğer dokulardan serbestleştirilir. Ekstremitelerin proksimal kısımlarında fasiküllerin içerisinde hem motor hem de duyu lifleri birlikte seyredebildiklerinden birbirlerinden ayrılmaları daha güçtür. Distalde ise sinir lifleri motor ve duyu fasikülleri olarak daha spesifik gruplar halinde seyrettiklerinden fasiküllerin eşleştirilmesi daha kolay mümkün olur. Genellikle fasikül grupları arasında köprü olarak yerleştirilen sinir greftleri bu fasikül gruplarından daha incedir. Dikiş sinir grefti epinöriyumu ve onarılabilecek olan fasikül grubuna ait perinöriyumu ile

interfasiküler epinöriyumu arasından geçer sinir greftinin kalınlığına göre 2 ya da daha fazla dikiş koaptasyon hattında kullanılır. (Şekil 12) Direk onarımda olduğu gibi sinir grefti sağlıklı, iyi kanlanan bir yatakta olmalıdır. Bu greftin beslenmesi ve fibrozis gelişiminin daha az olması için gereklidir (38).

Direk sinir onarımında olduğu gibi ekstremitte 3 hafta immobilize edilmelidir. Daha uzun immobilizasyon skar oluşumunu artıracığı ve bu süre sonrasında iyileşme hattında gerginliğin çok fazla olmayacağı için önerilmez (38).



**Şekil 12:** İnterfasiküler sinir greftleme. (a) Defekt olan bir grup fasikülün sinir grefti ile rekonstrükte edilmesi. Koaptasyon hatlarının gergin olmayan dikişler ile sabitlenmesi. (b) Tüm sinir fasikülleri onarıldıktan sonraki görünüm. (\*) Sinir greftleri. (Pechlaner S, Hussl H, Kerschbaumer F, Poisel S. Atlas of Hand Surgery, 1st ed., Stuttgart-New York, s:77, 2000)

## SİNİR DEJENERASYON VE REJENERASYONU

Periferik sinirlerdeki aksonal yaralanma sonucunda hücrenin 3 bölgesinde değişiklikler meydana gelir. Bunlar hücre gövdesi, yaralanan aksonun distali ve prokismalindeki yapısal ve işlevsel değişikliklerdir (Şekil 13).

Hücre gövdesindeki değişiklikler “kromatoliz” olarak adlandırılır. Hücre gövdesinin hacmi artar, çekirdek hücre periferine doğru yer değiştirir. Sitoplazmadaki bazofilik materyal kaybolur. Bu protein sentezinin arttığını gösteren değişiklikler RNA sentezinin artmasına bağlıdır. Nükleik asit ve lipid sentezinde gerekli olan glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi sentezi de artar. Protein sentezindeki artış iyileşme ve rejenerasyon için gereklidir. Hücre iskelet elemanları olan nörofilaman ve mikrotübül yapısındaki aktin, tübülün peripherin sentezinde bir artış görülürken; transport için gerekli proteinlerin sentezi azalır. Bu

değişikliklerin şiddeti yaralanmanın yerine ve tipine göre değişiklikler gösterir. Yaralanmanın hücre gövdesine çok yakın olduğu durumlarda hücre ölümü gerçekleşebilir.

Yaralanma bölgesinin proksimalinde bir veya birkaç internodal mesafe uzaklığa kadar ilerleyebilen bir dejenerasyon görülür. Bu retrograd dejenerasyon adını alır. Bu mesafede endöriyumların içi boşalmıştır. Birkaç gün içerisinde bu segmentte distale doğru terminal ve kollateral tomurcuklar belirip uzanmaya başlar. Bu oluşan tomurcuklara rejenerasyon üniteleri denir ve bunlar çok sayıda miyelinsiz akson demetlerinden oluşur. Rejenere olan aksonal tomurcukların uç kısımlarına ise “büyüme konisi” denir.

Büyüme konisi düz endoplazmik retikulum, mikrotübül, mikrofilaman, mitokondri, lizozom ve diğer veziküler yapılardan zengin olup; aktin filamanları ve myozin de içerir. Bu yapıları sayesinde büyüme konisi filapoid çıkıntılar yaparak hareket edebilir. Nörotropizm, rejenere olan aksonların diğer dokulardan ziyade distal sinir segmentine doğru büyüme tercih etmesi durumudur. İlk kez Cajal tarafından 1905 yılında gösterilmiştir. 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 affinitedir (30,47).

Aksonal tomurcuklardan distal segment ile bağlantı yapabilenler matüre olurken bu bağlantıyı yapamayanlar regrese olurlar. Uç organlardan salgılanan trofik maddeler bu yönlendirmenin düzenlenmesinde görev alırlar (19).

Distal sinir segmentindeki aksonlarda ve miyelin kılıfta meydana gelen hücresel değişiklikler Wallerian dejenerasyon olarak adlandırılır. Waller isimli araştırmacı tarafından 1950’de tanımlanan bu dejenerasyon süreci, distal sinir segmentinde hücre gövdesi ile olan bağlantının kaybolmasının ardından izlenir. Buradaki akson ve miyelin kılıf, makrofajlar ve Schwann hücreleri tarafından fagosite edilerek temizlenirken, rejenere olacak aksonun büyümesi için uygun ortam oluşturulur. Hücre iskeletini oluşturan nörofilamentöz yapılar ve mikrotübüller, granüler ve amorf yapılar haline dönüşürler. Çoğalarak farklılaşan plüripotent Schwann hücreleri bazal lamina boyunca dizilerek Büngner bantlarını oluştururlar. Bu bantların ortasındaki iç boş tüp yapısına endonöral tüp denir.

Dejenerasyon sürecini başlatılması aksonlar içerisindeki kalsiyum konsantrasyonunun artması ve proteazların aktifleşmesi ile gerçekleşir. Normalde hücre içi kalsiyum konsantrasyonu farkı aktif kalsiyum pompası sayesinde dengede tutulur ve hücre içindeki düşük kalsiyum seviyesi korunmaktadır. Aksonal hasar oluştuğunda ise artan hücre içi kalsiyum, proteazların aktivasyonuna yol açarak akson içerisinde proteolizi başlatmaktadır.

Miyelinin segmental yapısı bozulur. Miyelin Schwann hücreleri tarafından parçalandıktan sonra ortama gelen makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılır. Bu değişikliklerin büyük kısmı ilk birkaç hafta içinde görülür ancak ortamın tamamen temizlenmesi birkaç ayı alır.

Sinir rejenerasyonunun doğru bir şekilde gerçekleşmesi için proksimal ve distal sinir güdükleri arasındaki kimyasal ve hücrel reaksiyonlar çok önemlidir. Yaralanmanın erken fazında hasar bölgesinde kan hücreleri ve makrofajları içeren eksuda, aralığı doldurarak fibrin pıhtı oluşumunu sağlar. Birkaç gün içinde kapillerler ve epinöral kökenli fibroblastlar bu aralığa göç eder. Fibroblastların proliferasyon olmaları oldukça uzun zaman alır. Kollajen depolanması bu fibroblast ve Schwann hücreleri tarafından gerçekleştirilir.

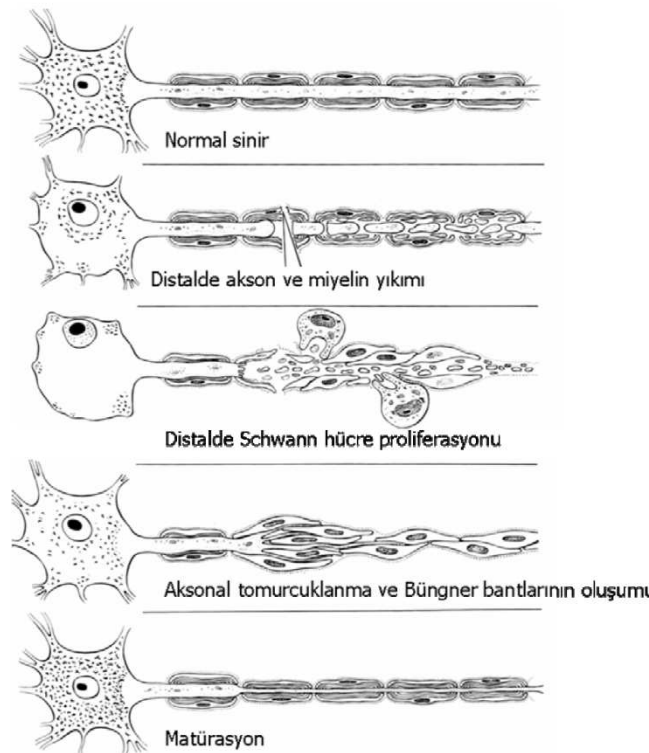
Schwann hücreleri sinir rejenerasyonunda önemli bir yer tutarlar. Aksonotomiyi takiben Schwann hücresi nükleusu daha yuvarlak ve belirgin bir görünüm kazanırken, sitoplazma nispeten daha saydam bir hal almaktadır. Yaralanmadan sonraki ilk 24 saatte Schwann hücreleri proliferasyonmaya başlarlar ve “Büngner bantları” adı verilen longitudinal dizilimler gösterirler. Schwann hücrelerinin proliferasyonu üçüncü günde en yüksek düzeye ulaşır ve daha sonra giderek azalır. Tomurcuklar Büngner bantlarını takip ederek distaldeki hedeflerine doğru uzanırlar (**Şekil 13**). Schwann hücreleri fiziksel bir köprü görevi görmelerinin yanı sıra rejenere olan akson çevresindeki miyelin kılıfı oluşturmak ve aksonal rejenerasyonu destekleyen ekstraselüler proteinleri salgılanmaktan da sorumludurlar. Başlangıçta tomurcuklanan akson sayısı distal segmentteki akson sayısından daha fazladır, ancak zaman içerisinde periferik bağlantıyı yapamayan tomurcuklar dejenere olur ve akson sayıları eşitlenir (19).

Tüm bu aşamalarda kemotaksis ve nörotrofik faktörler önemli rol oynamaktadır. Nörotropizmden sorumlu olan faktörler, proliferasyon yapan Schwann hücreleri tarafından sentezlenen ve hücrel adezyon molekülleri (CAM) olarak adlandırılan bir takım

molekülleridir. Bu moleküllerden bilinen en önemlileri L1, N-CAM (nöral hücre adezyon molekülü), N-caderin ve Po proteinidir. Bu moleküllerden N-caderin Schwann hücreleri üzerinde düzenleyici etki bunun dışındakiler ise rejenere aksonlar ile Schwann hücre kolonları arasındaki temasın sağlanmasından sorumludur. N-caderin ayrıca rejenere olan aksonlarda büyümeyi hızlandırıcı etkiye sahiptir (48).

Adhezyon için önemi başka bir molekül de Schwann hücreleri tarafından üretilen bazal membrandaki tip IV kollajen matriks içerisindeki laminin molekülüdür. Tüm bu hücrel adhezyon moleküllerinin sentezi özellikle dejenerasyon sırasında oluşan demiyelinizasyon evresinde artmaktadır (20).

Büngner bantları tarafından oluşturulan endonöral tüp rejenere olan akson ile penetre olamazsa ilerleyici fibrozis sonucunda oblitere olur (49). Tomurcuklar Büngner batlarının içerisine değil de bağ doku içerisine uzamaya devam ederse bu nörinom oluşumu ile sonuçlanır.



**Şekil 13:** Sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu. (Lundborg G. The nerve trunk. Nerve injury and repair. Churchill Livingstone, New York, s: 151, 1988).



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 (19). Proksimalden distale doğru ilerledikçe rejenerasyon hızı azalmaktadır. Rejenerasyon hızı, hasar alanının sinir hücre gövdesine uzaklığı ile ters orantılıdır (Tablo 1.) (17).

<b>Sinir hasar bölgesi</b>	<b>Günlük rejenerasyon hızı</b>
Üst kol	8.5 mm/gün
Proksimal ön kol	6 mm/gün
El bilek	1–2 mm/gün
El	1–1.5 mm/gün

**Tablo 1:** Üst ekstremitede sinir hasar bölgesine göre rejenerasyon hızları

Distal sinir segmentinin vasküler ağı da yaralanmaya cevap olarak önce vazokonstrükte daha sonra vazodilate olur ama en başarılı aksonal rejenerasyondan sonra bile orijinal kan akımının ancak %60-80'ine ulaşabilir (27).

## **REJENERASYON ÜZERİNE ETKİLİ BÜYÜME FAKTÖRLERİ**

Yakın zamandaki gelişmeler sayesinde; moleküler yolaklar ve bunları fizyolojik etkilerinin anlaşılması ile nörotrofik faktörlerin sinir sisteminin gelişimi, devamlılığının sağlanması ve rejenerasyon üzerindeki etkileri de gösterilebilmiştir. Hasarlanan sinir bölgesinden ve hedef organlardan salgılanan bu endojenik faktörler retrograd olarak aksondan hücre gövdesine taşınarak sinir iyileşmesinde görev alırlar. Endojen olarak tanımlanan bu maddelerin dışarıdan verilmesiyle de sinir iyileşmesinde değişik derecelerde gelişmeler sağlanabildiği yapılan birçok çalışma ile de gösterilebilmiştir (14,50).

Nörotrofik faktörler farklı sinir topluluklarının sağkalımı için gerekli polipeptid yapıdaki bir molekül ailesidir. Nörotrofik faktörler 3 ana grupta incelenebilirler. Bunlardan ilki nörotrofinlerdir. Bunlar NGF (nerve growth factor), beyin kaynaklı büyüme faktörü (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), nörotrofin-3, nörotrofin-4/5 ve son yıllarda bulunan nörotrofin-6'dır. Nörotrofinler 'trk' olarak adlandırılan yüksek affiniteli tirozin kinaz

reseptörlerine ve 'p75' olarak adlandırılan düşük affiniteli NGF reseptörlerine bağlanarak etki 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.

İkinci grupta nöropoetik sitokinler yer alır. Bu grupta silier nörotrofik faktör (ciliary neurotrophic factor, CNTF), lökemi inhibitör faktör (Leukemia inhibitory factor, LIF) ve interlökin-6 (IL-6) bulunmaktadır.

Üçüncü grupta ise TGF (transforming growth factor) ailesi bulunur. Bu gruptaki moleküller arasında TGF-b1, TGF-b2, TGF-b3 ve bunların uzak akrabaları olan GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) sayılabilir. GDNF; bir tirozin kinaz subünitesi olan Ret üzerinden fonksiyon görür.

Nörotrofik faktörler dışında fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF I ve II), tümör nekroz faktörü (TNF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) de sinir rejenerasyonun üzerinde etkileri olan faktörlerdir (14,51).

NGF ilk tanımlanmış olan nörotrofik faktördür. Sinir sistemi üzerinde değişken etkileri bulunur. 26 kD ağırlığındaki bu polipeptid, yaralanma sonrasında Schwann hücreleri, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından ortama salınır. Sinir rejenerasyonu sırasında Schwann hücrelerine etki ederek bunların göç etmelerini ve aksonal çıkıntılara yapışmalarını sağlar. Ayrıca ortamda yeterli düzeyde NGF bulunmadığında makrofajlar tarafından gerçekleştirilen miyelin fagositozu azalarak rejenerasyon olumsuz yönde etkilenir. NGF büyüme faktörü olarak anılmasına rağmen mitojenik özelliği bulunmaz. Sinir hücrelerinin yaşamlarını sürdürmeleri ve sinir liflerinin gelişmesi üzerinde destekleyici etkileri vardır. Etkileri üzerinde farklı görüşler bildirilmiş olmasına rağmen çok sayıda çalışma dışarıdan uygulanan NGF'nin sadece yüksek afiniteli trkA içeren sinirlere etkisi olduğundan motor nöronlar üzerine gösterilebilmiş bir etkisi yoktur (52). Duyusal arka kök ganglionlarının yaşayabilirliği

üzerindeki etkisi kanıtlanmış olan NGF'nin sadece fibronektin ile birlikte kullanıldığı durumlarda motor nöronlar üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (53,54).

Beyin kaynaklı büyüme faktörü (BDGF), NGF ile benzer bir moleküler yapıya sahip bir diğer nörotrofik faktördür. NGF'ye benzer şekilde yaralanma sonrasında Schwann hücrelerinde ve hedef organ olan kas tarafında miktarı artar ve aksonda retrograd olarak sinir gövdesine taşınır. BDGF sinir hücreleri üzerinde büyümeyi düzenleyici etki gösterir. Ağırlıklı olarak trkB olmak üzere, hem trkB hem de trkC reseptörleri üzerinden etki eder. Yapılan çalışmalarda aksonotomi sonrası omurilik ön boynuzda yerleşik motor sinir hücre ölümünü azalttığı, periferik sinir rejenerasyonunu ve remiyelinizasyonunu arttırdığı, ek olarak hücre kültürü çalışmalarında da motor nöronların yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir (55,56).

Nörotropin-3 (NT-3) ve nörotropin-4/5 (NT-4/5) yapısal olarak BDGF'ye benzeyen ve sinir hücreleri üzerinde apoptozu önleyici etkileri olan nörotrofik faktörlerdir. Nörotropin-3 tercihen trkC reseptörlerine, nörotropin-4/5 ise tercihen trkB reseptörlerine bağlanır. Her iki faktörün de motor sinirler üzerinde yaşayabilirliği arttırdıkları gösterilmiştir. Nörotropin-3'ün spinal kord yaralanmalarında rejenerasyonu artırdığı, nörotropin-4/5'in in vitro ortamda iskelet motor nöronların iskelet kası inervasyon kapasitelerini arttırdığı saptanmıştır (57,58).

Silier nörotrofik faktör (CNTF) santral ve periferik sinir sisteminin uydu hücreleri olan astrosit ve Schwann hücrelerinde yüksek düzeylerde bulunur. Yapısal olarak ve reseptör açısından NGF'den farklı bir nörotrofik faktördür. Yaralanma sonrasında ortamda artan CNTF'nin aksonal büyümeyi hızlandırdığı ve motor nöron ölümünü engellediği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. CNTF aynı zamanda nöron kaynaklı bir miyojenik faktör olarak da kabul edilmektedir. Tedavi amacıyla uygulanan CNTF kaslarda denervasyona bağlı gelişen atrofiyi azaltmakta ve kas gücünün yeniden kazanılmasına yardımcı olmaktadır (38). CNTF duysal ve sempatik nöronlarda aksonal büyümeyi, motor nöronların programlı ölümünü engelleyerek sağkalımlarını artırır. Sağlam sinirlerin Schwann hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu farklılaşmış hücrelerin devamlılığının sağlanmasında görev aldığını düşündürür. Aksonal hasar sonrasında, distal güdükte CNTF mRNA seviyeleri hızla düşer ve akson tekrar rejenere olana kadar bir artış görülmez. Sinir rejenerasyonuna CNTF'de de artış eşlik eder. Bu bulgu CNTF seviyelerinin devamlılığı için aksonların glial hücrelerle temas etmesinin gerekli olduğunu gösterir. CNTF'nin ilginç bir trofik etkisi de yaralanma sonrasında sistemik kullanımı ile sıçanlarda kas atrofisinde ciddi bir azalma sağlamasıdır (59,60). Ayrıca CNTF'nin; bazik FGF, BDNF ve NGF ile sinerjistik etkisi

olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. McCallister ve ark.'nın sıçan periferik sinirinde yaptıkları çalışmada aksonotomi sonrası CNTF ve NGF beraber uygulandığında, aksonal rejenerasyonda artış olduğu görülmüştür (61).

Lökemi İnhibitör Faktör (LIF) Yamamori ve ark. tarafından 1989 yılında bulunan, periferik sinirlerin yaşayabilirliğini destekleyen bir diğer büyüme faktörüdür. İn vitro olarak, sempatik nöronlardaki aktivitesinin CNTF ile oldukça benzer olduğu gösterilmiştir. Diğer nörotrofik faktörler gibi ince lifli sinirler tarafından retrograd olarak arka kök ganglionlarındaki taşınır. CNTF ile benzer şekilde sinir hasarı sonrasında bu taşınma artar. Ancak CNTF'den farklı olarak sinir hasarı sonrasında bu faktörün mRNA seviyelerinde artış olur. Kas terminallerinden alınmamasından dolayı hedef hücre olan kas tarafından değil de Schwann hücreleri tarafından sentezlendiği bu nedenle düşünülmektedir. Aksotomize sinirlere LIF uygulandığında, sinir rejenerasyonunun ve miyelinizasyonunun artmasının yanı sıra, kas kitlesinde ve kasılma gücünde de artış olduğu saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada LIF üretimi baskılanmış farelerde kas rejenerasyonunun belirgin şekilde azaldığı ve bu durumun LIF infüzyonu ile düzeldiği gözlenmiştir (59).

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. Saflaştırılmış embriyonik sıçan omurilik motor nöronlarından elde edilebilir ve bunların kolinerjik matürasyonunu destekler. Ayrıca hem motor hem duyu sinirlerinin aksonotomi sonrasında ya da doğal olarak gelişebilecek hücre ölümünü engeller. CDGF, motor sinirler ve duyu sinirleri yanı sıra dorsal kök hücrelerinde de trofik etkiye sahiptir (59). Schwann hücreleri tarafından sentezlenir ve bu hücreler üzerine güçlü trofik etkisi de vardır. Periferik sinir iyileşmesini bu yolla destekler. Özellikle kronik periferik sinir hasarında GDNF düzeylerinde daha belirgin bir artış olduğu saptanmıştır. Deneysel olarak sıçan siyatik sinir hasarında kullanılmış ve sinir rejenerasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (14).

Sinir iyileşmesi üzerine etkili büyüme faktörleri ile ilgili çalışmalar yalnızca bu moleküllerin rekombinant formlarını kullanarak gerçekleştirilmemiştir. İnsan amnion sıvısının anastomoz sonrası sinir onarım hattına lokal olarak uygulanmasının sinir rejenerasyonunu artırdığını saptayan Özgenel ve arkadaşları, bu etkiyi insan amnion sıvısı içerisinde bulunan

NGF, IGF ve FGF gibi büyüme faktörleri ile fibronektin ve laminin gibi ekstraselüler makromoleküllere bağlanmışlardır (15).

Sinir rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri bulunan diğer büyüme faktörlerinden (FGF, PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, VEGF, IGF) detaylı olarak trombositten zengin plazma kısmında bahsedilecektir (bkz. Sayfa 37- 42).

### **TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (Platelet Rich Plasma-PRP)**

Trombositlerin hemostaz üzerindeki fonksiyonları çok uzun zamandır bilindiği halde trombosit süspansiyonlarının seri aferez ürünü olarak kullanılmaları 1970’li yıllara denk gelir. Çeşitli dokular üzerindeki iyileşmeye etkileri ise 1997 yılında Whitman ve arkadaşları tarafından yapılan PRP’nin maksillofasiyal cerrahideki kullanımı ile ilgili klinik çalışma sonrasında hız kazanmıştır (62).

Trombositten zengin plazma literatürde birçok farklı isimle anılmaktadır. Trombositten zengin plazma (platelet rich plasma - PRP) dışında; trombosit jel (platelet gel) ve büyüme faktörlerinden zengin plazma (plasma rich in growth factors) gibi farklı isimlendirmeler ile karşılaşılabilir. Otojen veya allojenik olarak ayrıştırılan ve yoğunlaştırılan dolaşımdaki trombositler aktive olmaları durumunda içerdikleri alfa granüllerde bulunan çok sayıdaki büyüme faktörünü ortama salmaktadırlar. Bu aktivasyon in vitro ortamda da gerçekleştirilebilir. Bu şekilde belli bir alana trombositlerin içerdiği faktörler yoğun bir şekilde uygulanır. Aktif hale getirildiğinde jel haline gelerek ortama yüksek miktarda büyüme faktörü salgılayan trombosit içeriği yüksek bu konsantre ürüne “trombositten zengin plazma” denir.

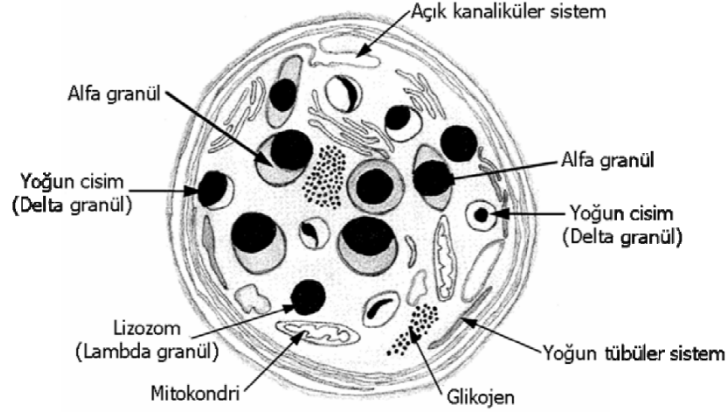
Kronik ülserler, tendonlar, ligamanlar, kas ve kemik dokular üzerinde iyileşmeye olumlu etkileri klinik çalışmalarla gösterilmiş olan PRP, periferik sinirlerin iyileşmesinde de potansiyel klinik bir uygulama olarak son yıllarda deneysel çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (63).

## TROMBOSİTLERİN GENEL YAPISI ve İÇERİKLERİ

Trombositler ortalama çapları 2 µm olan, kemik iliğindeki megakaryositler tarafından üretilen, disk biçiminde ve çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Bu yapılar periferik kan dolaşımına girdikten sonra yaklaşık 10 gün kadar yaşarlar. Hücre zarları trilaminer yapıdadır. En dış yüzeyde glikoprotein, glikolipit ve mukopolisakkaritlerden oluşan ve 'glikokaliks' adı verilen bir tabaka mevcuttur. Bu yapılar trombosit adezyon ve agregasyonunda rol alır. Sitoplazmalarında hücre çekirdeği yoktur ancak diğer hücre elemanları olan mitokondri, mikrotübül, granüller (alfa, delta, lambda) gibi organeller bulunur. Sitoplazmalarında bulunan glikojen partikülleri de trombosit metabolizması için önem taşır.

Trombositlerin hücre zarında 'açık kanaliküler sistem' adı verilen, sitoplazma içerisinde parmak şeklinde uzantılardan oluşan bir kanal sistemi vardır. Bu sayede trombositlerin uyarılmasını sağlayan agonistlerin alınması ve sitoplazmada bulunan aktif moleküllerin dış ortama atılmaları için gerekli yüzey alanı artırılmış olur. Diğer bir sistem trombosit aktivasyonu için gereken kalsiyum iyonlarını depolayan 'yoğun tubüler sistem'dir. Bu kanaliküler sistemin aksine kapalı bir sistem olup, tromboksan gibi prostoglandinlerin sentezinde de rol alır (64,65).

Trombosit hücre iskeletinin %20-%30 kadarını oluşturan ve hücre zarının hemen altında yerleşen aktin ve myozin mikrofilamanları bulunur. Bu mikrofilamanlar trombosit aktivasyonu sırasında gerçekleşen hücre şeklindeki morfolojik değişiklikleri gerçekleştirirler. Gerekli enerji sitoplazmadaki glikojenden elde edilen glukozdan, trikarboksilik asit yolağı kullanılarak sağlanır (64,65) (**Şekil 14**).



**Şekil 14:** Trombositlerin temel yapısı ve içerikleri. (Rendu F, Brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. Platelets 12(5): s:262, 2001)

Trombositlerin sitoplazmalarında çoğu alfa ( $\alpha$ ) granül olmak üzere, delta ( $\delta$ ) ve lambda ( $\lambda$ ) granüller bulunur. Bu granüllerin içerikleri ve işlevleri birbirlerinden farklıdır (**Tablo 2.**).

Normalde insan kanında milimetreküpte 140.000 ila 400.000 arasında bulunan trombositler dalakta çok daha yüksek oranda bulunurlar. Dolaşımında yaklaşık 10 gün kadar kaldıktan sonra retiküloendotelial sistem makrofajları tarafından dolaşımdan temizlenirler (64,65).

Delta granül	Alfa granül	Lambda granül
Nükleotidler <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ATP, ADP</li> <li>▪ GTP, GDP</li> </ul>	Yapışkan glikoproteinler <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fibronektin, Vitronektin, vWF, Trombospondin</li> </ul>	Asit proteazlar <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Katepsin D, E</li> <li>▪ Karboksipeptidazlar</li> <li>▪ Kollajenaz</li> <li>▪ Asit fosfataz</li> <li>▪ Arilsülfataz</li> </ul>
Aminler <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Serotonin</li> <li>▪ Histamin</li> </ul>	Hemostaz faktörleri <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII, Kininojenler, Protein S, Plasminojen</li> </ul>	Glikohidrolazlar <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Heparinaz</li> <li>▪ Diğerleri</li> </ul>
	Hüresel mitojenler <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PDGF, TGF-<math>\beta</math>, ECGF, EGF, FGF-II, VEGF, IGF-II, IL-<math>\beta</math></li> </ul>	
	Proteoglikanlar <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <math>\beta</math>TG, PF4, HRGP, PBP, CTAP-III, NAP-II</li> </ul>	
	Proteaz inhibitörleri Albumin ve immünglobülinler	

**Tablo 2:** Trombosit granüllerinin içerikleri

### **Alfa granüller**

Trombositlerin majör granülleridirler. Her bir trombosit ortalama 50–80 adet  $\alpha$ -granül içerir. Alfa granüller 300–500 nm çapında olup; çoğu hemostaz ve doku iyileşmesinde kritik öneme sahip otuzdan fazla biyoaktif protein ve büyüme faktörü içerirler.

Bu biyoaktif protein ve büyüme faktörlerinin proteinlerin bir kısmı megakaryosit matürasyonu sırasında sentezlenirken bazıları da megakaryosit veya trombosit aşamasında plazmadan endositoz yolu ile alınarak depolanırlar. Bu yolla depolanan albümin ve immunglobülin gibi proteinlerin granül içerisindeki yoğunluğu oldukça düşük seviyelerdedir. Trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinde bulunan biyoaktif proteinler PDGF, TGF, platelet faktör 4 (PF-4), IL-1, trombosit kökenli anjiogenetik faktör (PDAF), VEGF, EGF, trombosit kökenli endotelial büyüme faktörü (PDEGF), epitelyal hücre büyüme faktörü (ECGF) ve IGF olarak sayılabilir (63). Büyüme faktörü olmayan komponentler arasında ise Osteokalsin (Oc), adenozin difosfat (ADP), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve Von Willibrand faktör (VWF) gibi bazı önemli maddeler sayılabilir. Bu komponentlerin trombosit adezyonu, aktivasyonu ve fibroblast proliferasyonunda çeşitli rolleri vardır (66).

### **Delta granüller (yoğun cisimler)**

Elektron mikroskopta ışınları yoğun olarak absorbe etmeleri nedeniyle “yoğun cisimler” olarak adlandırılırlar. Ortalama olarak 250-300 nm çapa sahiptirler. İçerisinde kalsiyum iyonları, pirofosfat, ADP ve ATP gibi protein olmayan molekülleri ve ayrıca plazmadan yaklaşık 100 kat fazla miktarda serotonin olduğu bilinmektedir.

### **Lambda granüller (lizozomlar)**

Çapları 175-250 nm arasında değişen bu granüller sadece lizozomal enzimleri içerirler. Bu enzimlerin bakterisidal etkileri yanı sıra plazminin tamir fazından sonra bölgedeki pıhtıyı eriterek ortadan kaldırması sürecinde de görevleri vardır.

## **TROMBOSİTLERDE BULUNAN BÜYÜME FAKTÖRLERİ**

### **Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF):**

İlk olarak fibroblast ve düz kas hücreleri üzerindeki proliferatif etkisinden dolayı “trombosit kaynaklı mitojen” olarak tanımlanmıştır (67). Primer olarak trombositlerden



salınan bir büyüme faktörü olsa da makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar ve keratinositler tarafından da sentezlenip ortama salınır. Fibroblastlar, düz kas hücreleri ve endotelial hücreler üzerinde kemoatraktan ve mitojenik etki gösterip aynı zamanda bu hücreleri fibronektin ve hiyalüronik asit sentezi için stimüle eder. PDGF bu hücreleri aktive ederek fibroblast proliferasyonu, kollajen birikimi ve anjiogeneze öncülük eder.

PDGF yara iyileşmesine cevapta en erken ortaya çıkan faktör olup birçok deneysel çalışmada granülasyon dokusunu, epitelizasyonu ve neovaskülarizasyonu arttırarak yara iyileşme sürecinin değiştirmeksizin iyileşme hızının arttığı gösterilmiştir. Kronik yaralar, nöropatik ve diyabetik ülserlerinde FDA onayı almış tek büyüme faktörü preparatıdır (68).

PDGF'nin periferik sinir rejenerasyonu üzerindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, yapılan bir çalışmada tam ayrılma veya ezilme tarzı yaralanmalardan sonra mRNA'sında hem proksimal hem de distal segmentte artış olduğu ve bu artışın da Schwann hücre kaynaklı olduğu ayrıca; Schwann hücreleri üzerinde mitojenik etkisinin bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu artışın akson ile Schwann hücresi arasındaki ilişkiye bağlı olduğu da belirtilmiştir (69).

Santral sinir sistemi nöronları da PDGF sentezler ve hasar sonrasında bu nöronlarda PDGF reseptör sayısında artış izlenir. PDGF'nin hem in vivo hem de in vitro olarak nöronal düzenlenmede etkili olduğu gözlenmiştir (70).

#### **“Transforming” büyüme faktör- $\beta$ (TGF- $\beta$ ):**

İlk olarak 1983 yılında plasenta kaynaklı elde edilmiş ve kültür ortamında fibroblast proliferasyonunu artırdığı görülmüştür. Asidik yapıda, 25 kDa ağırlığında bir büyüme faktörüdür. İlk zamanlar normal hücreler üzerinde malign transformasyona neden olduğu düşünülmüş ancak sonradan yara iyileşmesinde olduğu gibi nöral hücreler üzerinde faydalı etkileri olduğu görülmüştür. TGF- $\beta$  vücutta pek çok farklı hücreden sentezlenebilir. Trombosit, aktive alveolar makrofaj, monosit, T-lenfosit ve nötrofil bunlar arasında sayılabilir. Trombositlerin alfa granüllerinde yüksek oranda bulunur ve aktivasyonla diğer faktörlerle birlikte ortama salınır. Yara yerinde kemotaktik ve anjiogenezi hızlandırıcı etkisi vardır. Ayrıca kollajen, fibronektin ve glikozaminoglikanlar gibi birçok ekstraselüler matriks proteininin sentezini regüle eder (71).

Hayvan deneylerinde hem normal hem de problemlili yara ve ülserler üzerinde iyileşme üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (72). İyileşme fazını hızlandırmasının yanında yara gerilim kuvvetini de arttırdığı gösterilmiştir (73).

Sinir hasarında ortama gelen makrofajlar ve Schwann hücrelerinden de salınır. Kendi nörotrofik etkisinin yanında pek çok nörotrofik faktörün, özellikle de motor nöronlar için potent bir nörotrofik faktör olan GDNF'ün, fonksiyonlarını gösterebilmesi için TGF-  $\beta$ 'ya gerek olduğu gösterilmiştir. Bu grup içinden TGF-  $\beta$ 1 ve TGF-  $\beta$ 2'nin, in vitro olarak sıçan Schwann hücreleri üzerinde güçlü mitojenik etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (74). Sulaiman ve ark. da kronik denervasyonda dışardan TGF-  $\beta$  verilmesiyle Schwann hücre proliferasyonunda ölçülebilir bir artış saptamışlardır (75).

### **İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I):**

Aminoasit dizilimi insan proinsülinine benzediğinden dolayı bu adı almıştır. IGF-I %50 oranda IGF-II ile homolog dizilime sahiptir. IGF-I lokal olarak etki gösterebildiği gibi sistemik dolaşıma katılarak uzak organlarda endokrin etkiler de gösterebilir. Lokal olarak etki gösterebilmesi için bağlanabileceği altı farklı reseptörü bulunur. Bunlardan IGFBP-3 baskın olarak bulunanıdır. Bu reseptörle etkileşim sonucunda hücre içi tirozin kinaz yolunu tetiklenir. Büyüme hormonu etkisini IGF-I üzerinden gösterir.

Dolaşımda bulunan IGF-I' in kaynağı büyük ölçüde karaciğer dokusudur. Buna karşın dokularda lokal olarak etki gösteren IGF-I, tüm vücut dokularında üretilebilirler. Hücre kültürleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar IGF-I'in fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, çizgili kas hücreleri, epitelyal hücreler, tiroid hücreleri ve nöronlar gibi birçok hücre üzerinde mitojenik olduğunu göstermektedir. Dolaşımda bulunan IGF-I'in hücresele seviyedeki anabolik etkileri yalnızca protein sentezini artırmakla sınırlı değildir. Periferik hücrelerde glukoz içe alımı ve glikojen sentezini sağlamak, nöronların yaşayabilirliğini artırmak, miyelin sentezini artırmak ve kemik rejenerasyonuna olumlu etkiler sağlamak gibi etkileri de bulunur (67).

Periferik sinirde IGF-1 ve IGF-2 faktörlerinin temel olarak reaktif Schwann hücreleri tarafından sentezlendiği düşünülmektedir. IGF için spesifik reseptörler (tip 1 IGF reseptörleri); Schwann hücreleri, büyüme konileri ve motor nöron aksonları boyunca bulunur (76). IGF-I' in motor, duyu ve sempatik nöronlarda nörotrofik faktör gibi davranarak büyüme

konilerinin motilitesinde, nörit büyümesinde artış sağladıkları ve apoptozu engelledikleri gösterilmiştir (63). Kanje ve arkadaşları sıçan siyatik sinir modeli üzerinde yaptıkları çalışmada; ozmotik pompa ile uygulanan IGF-I'in rejenere olan liflerden hücre içerisine alınarak, retrograd transport ile hücre gövdesine taşındığını ve burada rejenerasyon için gerekli proteinlerin sentezini artırdığını belirtmişlerdir (12). Ayrıca bu artışın IGF-1'i bloke eden spesifik antikolar kullanıldığında gerçekleşmediğini de belirtilmiştir.

### **Fibroblast büyüme faktörü (FGF ):**

İlk kez sığır hipofizinden elde edilmiş olan FGF'in, fibroblastlar üzerindeki mitojenik etkisi gösterilmiştir. Daha sonra anjiogenez, yara iyileşmesi ve embriyolojik gelişim gibi hücresel süreçlerde modülör rolü olduğu saptanmıştır. Asidik (aFGF veya FGF-I) ve bazik (bFGF veya FGF-II) olmak üzere başlıca iki tipi vardır.

Endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, nöral hücreler, kondrositler ve keratinositler tarafından üretilebilirler. Her iki faktörün de mezoderm ve nöroektoderm kökenli hücreler üzerinde kuvvetli mitojenik etkisi vardır. Yara iyileşmesinde hücre migrasyonunu, neovaskülarizasyonu, ekstraselüler matriks proteinleri ve granülasyon dokusu oluşumunu, yara gerilim kuvvetini arttırarak epitelizasyonu hızlandırdıkları görülmüştür (72,77,78).

Her iki faktör de nöral dokularda bolca bulunur. Sinir sisteminin gelişiminde, fonksiyonlarında, nöronal büyüme ve farklılaşmasında etkileri vardır (79). Davis ve ark. tarafından yapılan sıçan Schwann hücre kültürü çalışmasında; bazik FGF'nin daha güçlü olmakla beraber her iki faktörün de Schwann hücre mitozunu arttırdıkları gözlenmiştir. Bu artış, ortama hücre içi cAMP artışına neden olan forsokolin eklenmesi ile daha da belirgin hale gelmektedir (80).

FGF-1 nöron gövdesinde sentezlenir ve akson boyunca anterograd taşınır, bu nedenle aksonotomiden sonra dejenerasyona giden distal güdükte FGF-1 seviyelerinde ilerleyici bir düşme meydana gelir. FGF-1 santral ve periferik nöronlarda yaşayabilirliği ve diferansiyasyonu destekler. İn vivo FGF-1 uygulaması sonrasında hem periferik sinirlerde aksonotomi sonrası aksonal rejenerasyonda hızlanma gözlenmiştir (81).

FGF-2 nöral hücreler için güçlü etkili bir nörotrofik faktördür. Hasarlanma sonrasında akson, Schwann hücreleri, endotelial hücreler, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından sentezlenir. Nöron sağkalımı ve rejenerasyonu üzerinde etkileri vardır. Santral sinir sistemi ve periferik sinir sisteminin farklı bölgelerinden alınan nöronlardan yapılan hücre kültürlerinde nöron yaşayabilirliğini ve aksonal tomurcukların uzanımlarını destekleyerek; astrosit, oligodendrosit ve Schwann hücrelerinin de proliferasyonunu uyarıcı etkilere sahiptir. Ekzojen uygulanan FGF-2, Schwann hücre bazal laminasına bağlanır ve bazal lamina boyunca rejenerasyon olan aksonların büyümelerini hızlandırır (63,82).

### **Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF):**

İlk olarak 1983 yılında tümör anjiogenezi üzerindeki etkileri nedeniyle tanımlanmış olan bir büyüme faktörüdür. Tümör hücreleri tarafından salgılanan bu faktörün vasküler endotelial hücrelerin geçirgenliğini artırarak hücreler arası mesafede ve vücut boşluklarında sıvı birikimine neden olduğu saptanmıştır. Bu nedenle ilk olarak 'vasküler permeabilite faktörü' olarak tanımlanmıştır. Bunu takip eden çok sayıda çalışma ile bu gruba ait izoformların ve spesifik reseptörlerin tanımlanmasını sağlamıştır. Vasküler endotelial büyüme faktörünün şu an için bilinen farklı büyüklüklerde beş adet izoformu mevcuttur. Benzer biyolojik etkilere sahip 121, 145, 165, 189 ve 206 formlarından baskın olarak bulunanları VEGF121 ve VEGF165 formlarıdır.

İlk olarak tümör hücreleri tarafından sentez edildiği bulunmasına rağmen; nötrofiller, trombositler, keratinositler ve astrositler gibi birçok farklı hücre tipi tarafından da doku hipoksisine ve düşük glukoz değerlerine cevap olarak salınır. Yaralanma sonrası hasar bölgesindeki artıştan birincil olarak nötrofil ve fibroblastlar sorumludur. Yaralanma alanında vasküler zedelenmeye bağlı oksijen miktarı azalır, oluşan hipoksi VEGF mRNA'sını güçlü şekilde stimüle eder (77).

VEGF endotelial hücrelerde bulunan tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran proteinleri olan FLT-1, FLK-1 ve nörofilin-1 reseptörleri üzerinden etki ederek anjiogenezi indükler. Bu reseptörler ayrıca nöral dokularda özellikle aksonlardan çıkan büyüme konilerinde ve Schwann hücrelerinde de saptanmıştır. Bazı araştırmacılar bu faktörün FLK-1 üzerinden etki ederek bir nörotrofik faktör gibi davrandığını belirtmişlerdir. Büyüme konileri ve Schwann hücre proliferasyonu üzerindeki olumlu etkileri buna bağlanmıştır (83). Ayrıca motor nöronlarda direk olarak sağkalımı etkileyebileceği de belirtilmiştir (63).

İskemik yaralar üzerinde yapılan bir çalışmada topikal uygulanan VEGF'in yara iyileşmesini artırdığı ve ekstremiteye olan kan akımında artış sağladığı tespit edilmiştir (84).

Lin ve arkadaşları sıçan pelvik ganglionundan elde edilen sinir hücre kültürleri üzerinde VEGF'nin nörotropik etkisini olduğunu ve rejenerasyonu olumlu yönde etkilediğini göstermişlerdir (85). Benzer başka bir çalışmada sıçan üst servikal ganglionu ve dorsal kök ganglionundan elde edilen VEGF'nin; nöronlar ve uydu hücreler üzerinde sağkalımı artırdığı ve Schwann hücreleri üzerinde mitojenik etkisinin de olduğu belirtilmiştir (86).

### **TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA HAZIRLANMASI**

Trombositten zengin plazma; trombosit fonksiyonlarını ve içerdikleri biyoaktif molekülleri daha güçlü bir şekilde kullanabilmek için kandan trombositlerin ayrıştırılması ve yoğunlaştırılması prensibi ile elde edilirler. Bu elde edilen plazma kısmı otolog olarak hazırlanabildiği gibi allojenik kan ürünlerinden de hazırlanabilmektedir. Ancak allojenik olarak elde edilmesi durumunda viral hastalık riski göz önüne alınması gereken önemli bir sorundur. Trombositten zengin plazma hazırlanması için piyasada bulunan hazır kit ve sistemlerden farklı oranlarda trombosit ve büyüme faktörleri içeren ürünler elde edilebilmesine rağmen tümü temel olarak aynı prensiple çalışmaktadır.

Trombositlerin istenen zamandan önce aktif hale gelmeleri ve içerdikleri faktörleri kaybetmemeleri için hastadan alınan kan antikoagülan bir solüsyon içerisine alınır. Seri santrifüj işlemlerinden sonra kırmızı kan hücreleri (RBC), trombositten fakir plazma (platelet poor plasma - PPP) ve trombositten zengin plazma kısımları birbirlerinden ayrıştırılır. Trombositten zengin kısım dışındakiler istenirse yeniden hastaya verilebilir.

Trombositlerin aktivasyonunu sağlamak için trombin ve kalsiyumun solüsyona eklenmesi gereklidir. Aktive olan trombositler uygulandıkları alanda pıhtı formasyonu oluştururken aynı zamanda ortama da içerdikleri çok sayıdaki büyüme faktörlerini salgılar. Kullanılan trombin önceden üretilerek ticari olarak satılan sığır trombin preparatı olabileceği gibi trombositten fakir plazma kısmından otolog olarak da hazırlanabilir (87).

TZP içeriğindeki trombosit sayısının; değişik kaynaklarda  $\geq 1,000,000/\mu\text{L}$  veya bazal trombosit değerinin 3-5 katı kadar olması gerekliliği belirtilmiştir ancak literatürde bazal değer 2 katından az ve 8,5 katı fazlasına kadar olan değerlerle de yapılan çalışmalar mevcuttur (64,65,88).

Pıhtılaşmadan sonra trombositlerin içerdikleri proteinleri ortama salgılamaları 10 dakikada başlar. İlk bir saat içerisinde önceden sentezlenmiş faktörlerin %95 kadarı salgılanır. Daha sonra trombositler faktörleri sentezleyip salgılamaya devam eder. Bu süre makrofajlar tarafından ortamdan kaldırılana kadar sürer. Bazı yapılan çalışmalara göre bu süre 5-10 gün kadar olsa da tendon iyileşmesi için yapılan bir çalışmada PRP'nin 4 hafta süre ile etki gösterebildiği rapor edilmiştir. (64,65,87,88).

## **KULLANIM ALANLARI**

PRP'nin klinik kullanımının faydalı olduğunu savunanlar kemik ve yara iyileşmesinde faydaları olduğunu düşünmektedirler. PRP'nin postoperatif ağrıyı, enfeksiyon ve kan kaybını azalttığını gösteren deliller mevcuttur. Periodontal ve maksillofasiyal cerrahi, estetik ve plastik cerrahi, spinal füzyon cerrahisi, kardiyovasküler cerrahi ve kronik deri ile yumuşak doku ülserlerinin tedavisi ile ilgili çok sayıda yayın literatürde mevcuttur (65).

### **Maksillofasiyal ve Periodontal Cerrahi**

Whitman ve arkadaşları tarafından osteointegre titanyum implantlar ile yapılan maksillofasiyal rekonstrüksiyon ameliyatlarında PRP ile elde ettikleri olumlu etkiler yayınlandıktan sonra kullanımı yaygınlaşmıştır (62). Bunu takiben 1998 yılında Marx ve arkadaşları kemik grefti ile yapılan mandibular rekonstrüksiyon olgularında PRP kullanımının 6 aylık sürede kemik iyileşmesini hızlandırdığı ve dansitede artış sağladığını göstermesi önemli basamaklardan biridir (89). Trombositlerde bulunan PDGF ve TGF- $\beta$  gibi faktörlerin mezenşimal kök hücre ve osteoblastları uyarmasına bağlanmıştır. Yine alveolar yarık vakaları ve maksiller sinüs yükseltilmesi gibi kemik grefti uygulanan başka çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır (90).

### **Estetik Cerrahi**

Abdominoplasti, yüz germe, meme küçültme ve blefaroplasti gibi estetik ameliyatlarda flep altına otolog PRP uygulanmasının postoperatif dönemde hematoma, seroma, ağrı ve dren gelişimini azalttığını gösteren pek çok çalışmaya 20 yılı aşkın bir sürede rastlamak mümkündür. Bunun dışında yağ grefti uygulamalarında da PRP eklenmesiyle daha

az fibrozis görüldüğü ve adipoz kök hücre sayısında artış sağlayarak atonik yaralarda fayda sağlandığı gösterilmiştir (90). Lazer ile yüz gençleştirme sonrasında uygulandığında PRP'nin biyolojik bir örtü gibi davrandığından da yapılan bir çalışmada bahsedilmiştir (91).

### **Rekonstrüktif Cerrahi**

Diyabetik ayak yaraları da dahil olmak üzere kronik ülserler ve iyileşmeyen yaralarda PRP kullanımının; vaskülarizasyonu, epitelizasyonu ve granülasyonu artırdığı yapılan birçok klinik çalışmada gösterilmiştir (64). Ayrıca yanık sonrası greftleme vakalarında olduğu gibi deri greftlerinin alıcı yatağa adaptasyonunu kolaylaştırdığı ve ameliyat sırasındaki kanama ile operasyon süresinde azalma sağladığı bilinmektedir (92).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada iki adet kontrol, iki de PRP içeren 4 grupta cerrahi uygulandı. Her grupta 7 adet sıçan bulunmaktaydı. Ayrıca PRP elde etmek amacı ile 10 adet, toplam 38 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan denek olarak kullanıldı. Cerrahi uygulanan sıçanların ağırlıkları 170-260 gr arasında değişmekteydi.

PRP elde etmek için kanlarının alınması ve diğer cerrahi işlemler uygulanması sırasında tüm sıçanlara 50 mg/kg Ketamine-HCl (Alfamine®-im) ve 9 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile anestezi sağlandı. Trombositten zengin plazmanın hazırlanması için gerekli olan kan; hayvanların intrakardiyak yoldan tüm vücut kanlarının alınması ile elde edildi ve işlem sonrasında yüksek doz fenobarbital ile ötenazi uygulandı.

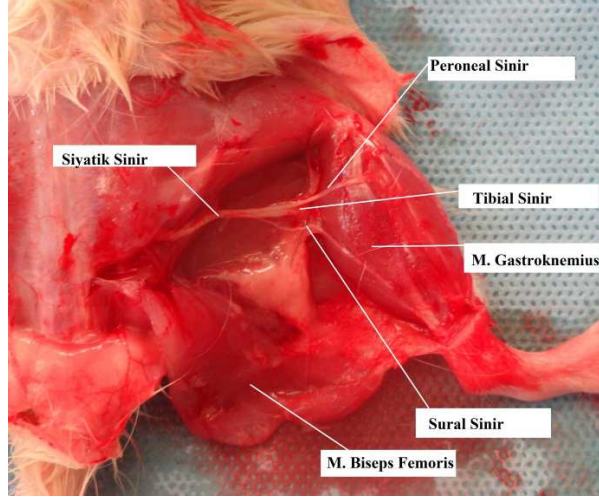
Cerrahi müdahaleler 9 Eylül Üniversitesi Hayvan Laboratuvarı'nda bulunan operasyon mikroskobu (OLYMPUS, OME, Japonya) kullanılarak aynı cerrah tarafından standart mikrocerrahi tekniklerine sadık kalınarak gerçekleştirildi. Sıçanlar anestezi sonrasında tespit tahtalarında sabitlendikten sonra uygun saha temizliği yapılarak operasyona hazırlandı. Cerrahi uygulanan tüm sıçanların sadece sol arka ekstremitte siyatik siniri operasyonda kullanıldı. Sağ arka ekstremitte sinirleri ise kontrol olarak korundu.

Ameliyat sonrasında her sıçan ayrı kafese alınarak uzman veteriner kontrolünde izlendi. Hayvanların yem ve su ihtiyaçları düzenli olarak karşılandı. Kafesleri düzenli olarak temizlendi.

### SIÇAN SIYATİK SİNİR ANATOMİSİ

Sıçan siyatik siniri lumbosakral trunkustan, L4, L5, L6 ve S1 spinal köklerden köken alan; sıçanların en kalın periferik siniridir. Bu köklerden gelen dalların birleşmesiyle pelvis minör içerisinde oluşur. İskium dorsal kenarı ile kuyruk sokumu arasındaki oluktan ilerleyerek siyatik çentikten pelvis dorsaline çıkar. Piriform kasın ventralinden geçtikten hemen sonra uyluk posteriorunda ilerler. Diz ekleminin yaklaşık yarım santim proksimaline kadarki bu ilerleyişi sırasında biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kaslarını inerve eden çok ince bir dal verir. Diz eklemine yakın sural, tibial ve peroneal dallar olmak üzere 3 dala ayrılır. Bu mesafe sıçanlarda ortalama 2 cm civarındadır (**Şekil 15**).





**Şekil 15:** Sıçan Siyatik Siniri Anatomisi (Biceps femoris kası diseke edilip kaldırıldıktan sonra).

Peroneal sinir gastroknemius ve derin parmak fleksör kasları lateralinden geçerek önce peroneus longus daha sonra da derin ve yüzeysel peroneal dallar olarak sonlanır. Yüzeysel dal peroneus longus, peroneus brevis ve parmak ekstansörlerini inerve edip ayak sırtı ve parmakların bir kısım duyusunu sağlar. Derin dal tibialis anterior ve uzun parmak ekstansörlerini inerve ederek ikinci parmak arası bölgeye ulaşır.

Tibial sinir ventrale doğru uzanır. İlk dalı olan sural siniri verdikten sonra gastroknemiusun iki başı arasından geçerek plantaris, soleus, gastroknemiuslar, fleksör hallucis longus, fleksör digitorum longus ve tibialis posterior dallarını inerve eder. Bu dalları verdikten sonra ayak bileğinin hemen superiorunda medial ve plantar dalları vererek sonlanır.

## ÇALIŞMA GRUPLARI

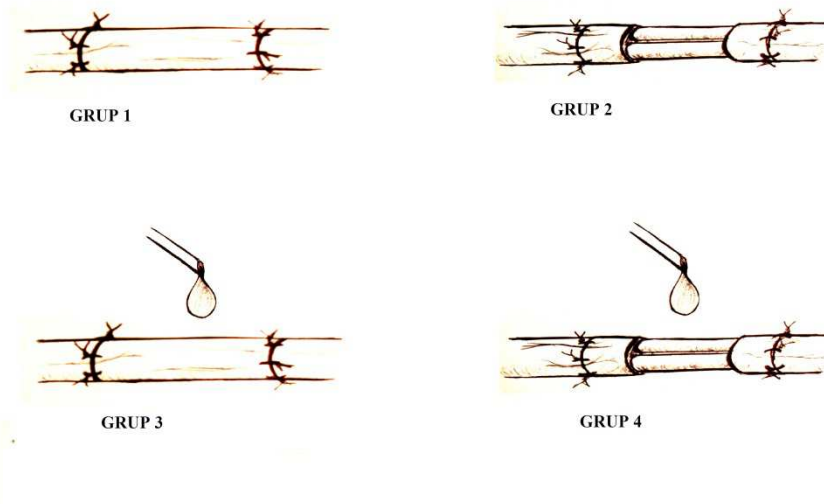
Cerrahi uygulanan 4 grup; her grupta 7 adet sıçan olmak üzere, 28 sıçandan oluşmaktaydı. Gruplar şematik olarak Şekil 16'da gösterilmektedir.

**Grup 1:** 1cm uzunluğundaki sinir grefti orjinal pozisyonunda her iki anastomoz hattında 6 adet epinöral sütür kullanılarak defekt rekonstrüksiyonunda kullanıldı.

**Grup 2:** 1cm uzunluğundaki sinir grefti orjinal pozisyonunda her iki anastomoz hattında 6 adet epinöral sütür kullanılarak defekt rekonstrüksiyonunda kullanıldı. Ek olarak sinir grefti ortasında yaklaşık 6 mm uzunluğundaki bir alanın epinöryum tabakası soyuldu.

**Grup 3:** Grup 1'deki cerrahi müdahaleye ek olarak topikal 0.5 cc PRP operasyon alanına uygulandı.

**Grup 4:** Grup 2'deki cerrahi müdahaleye ek olarak topikal 0.5 cc PRP operasyon alanına uygulandı.



**Şekil 16:** Çalışma gruplarının şematik görünümleri.

## TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN (PRP) HAZIRLANMASI

Deneyde kullanılacak PRP'nin elde edilmesi için 10 adet sıçanın tüm vücut kanı kullanıldı. PRP kullanılacak deney gruplarına ayrı günlerde operasyon yapılacağından sıçanlar rastgele iki gruba ayrılarak aynı işlem farklı günlerde aynen tekrarlandı. Her sıçana Ketamine-HCl (Alfamine®-im) ve Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile anestezi uygulanmasının ardından intrakardiyak kanülasyon yapıldı. Hayvanların tüm vücut kanları alınarak sitrat- fosfat-dekstroz (CPD) solüsyonu ile karıştırıldı. Sonrasında yüksek doz fenobarbital ile ötenazi işlemi uygulandı. Kan ve CPD solüsyonu oranı 5/1 olacak şekilde ayarlandı. Kullanılan CPD solüsyonu kan merkezlerinde rutin olarak kullanılan 26 mg/ml sodyum sitrat dihidrat, 25 mg/ml dekstroz monohidrat, 2,9 mg/ml sitrik asit ve 2,2 mg/ml monobazik sodyum fosfat monohidrat karışımından oluşuyordu.

Elde edilen kan cerrahi uygulanacak sıçanların kendilerinden elde edilmediği ve otolog ürün olmadığı için işleme sokulmadan önce 25 Gy iyonize radyasyona tabi tutularak lenfosit inaktivasyonu sağlandı. Bu şekilde elde edilecek PRP içerisindeki lenfositlerden dolayı “graft versus host” reaksiyonu görülmesine engel olunmaya çalışıldı.

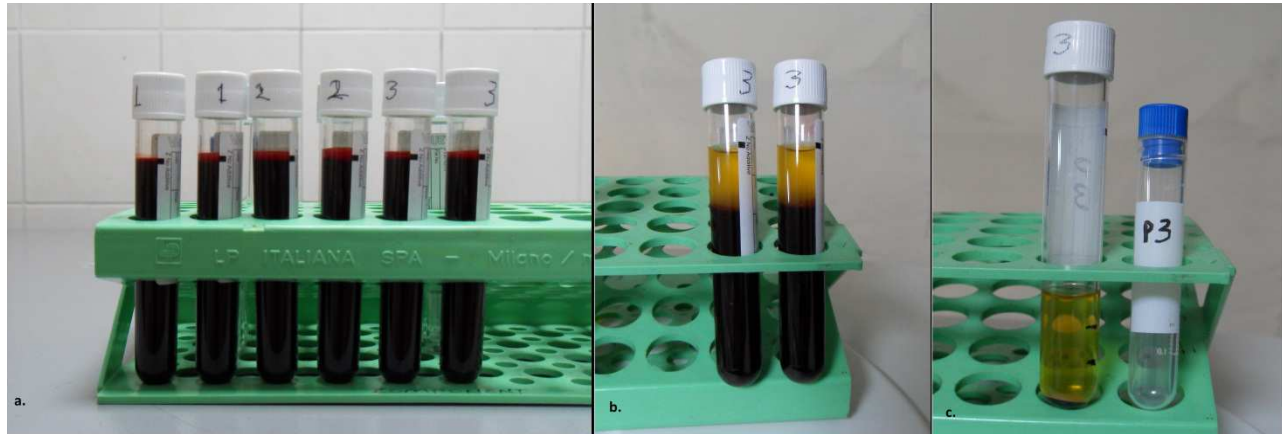
Işılama işleminden sonra alınan kan 9 cc kapasiteli herhangi bir agregasyonu uyaracak veya engelleyecek kimyasal içermeyen beyaz kapaklı cam tüplere alındı (**Şekil: 17-a**). Daha sonra soğutmalı santrifüj cihazında (Johann CR3i, Thermo electron Corporation, USA) ilk santrifüj işlemi 22°C derecede 1300 RPM devirde 15 dakika süreyle uygulandı. İlk santrifüj işlemi sonucunda eritrositlerin geride kalan plazma, trombosit ve lökositlerden ayrıştırılarak tüpün alt kısmına çökmesini sağlandı (**Şekil: 17-b**). En altta kalan eritrositlerin hemen üzerinde trombosit ve beyaz kürelerin oluşturduğu kadifemsi bir ara tabaka (“buffy coat”) izlendi. Trombositlerin büyük çoğunluğu bu ara tabakada olduğundan üstte kalan plazma, trombosit ve lökositleri içeren kısım çok az bir miktar kan ile ayrı bir tüpe alındı.

İkinci santrifüj işlemi yine 22°C derecede, 4400 RPM devirde 10 dakika süreyle uygulandı. Bu işlem sonrasında alınan trombositlerin daha yoğun bir şekilde alt seviyeye çökmesi sağlandı. Santrifüj işlemi sonucunda tüp içerisindeki plazma üç eşit seviyeye bölündü (**Şekil: 17-c**). Üstte kalan 2/3'lük trombosit fakir plazma (platelet poor plasma- PPP) olduğundan uzaklaştırıldı. Geriye kalan PRP, en alttaki az miktardaki kan olduğu yerde bırakılarak ayrı bir tüpe alındı. PPP ve PRP içerisindeki trombosit sayıları hemogram sayım

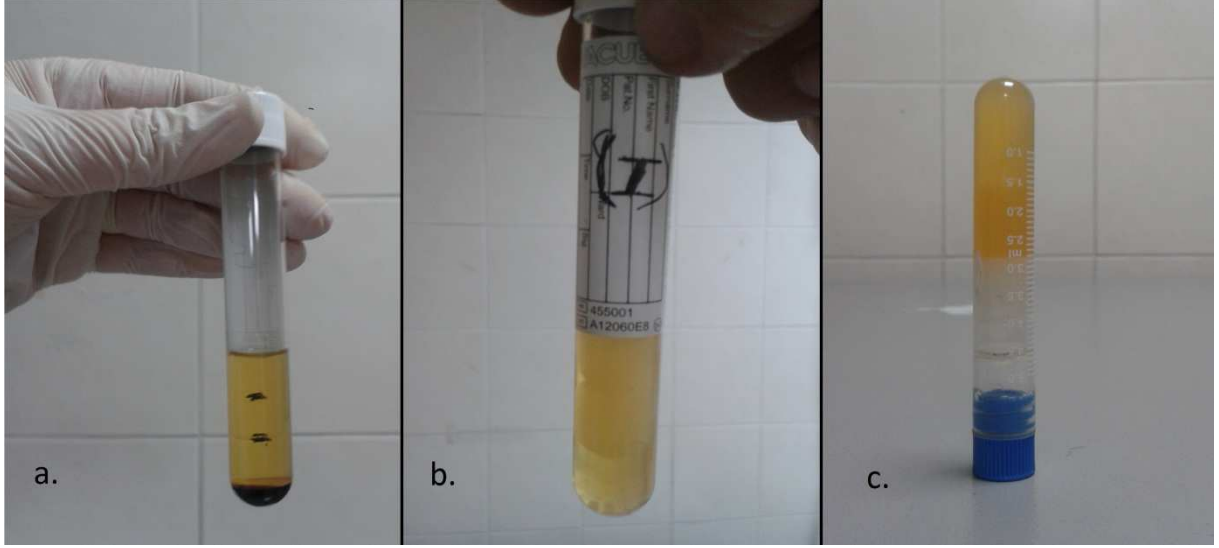
cihazında (ABBOTT, CELL-DYN Emerald, Almanya) sayılarak yöntemin uygun olup olmadığı teyit edildi.

Yapılan literatür çalışmalarına göre PRP içeriği normal kan trombosit değerinin 3-5 katı veya  $\geq 1000 \times 10^3/\mu\text{L}$  olmalıdır. Bizim santrifüj değerlerimizle elde edilen trombosit sayısı her iki durumu da karşılamaktaydı.

Trombosit aktivasyonu için yine literatürde değişik yöntemler tarif edilmiştir (93). Bunların arasında hazır preparat halinde sığık trombin, otolog hazırlanmış trombin (T) ve  $\text{CaCl}_2$  solüsyonları sayılabilir. Bu çalışmada trombosit aktivasyonu için otolog trombin solüsyonu tercih edildi. Otolog olarak sıçan trombinini hazırlamak için 2. santrifüj sonrasında uzaklaştırılan PPP kullanılır (**Şekil: 18-a**). 3.0 ml PPP, 1.0 ml %10'luk kalsiyum glukonat (Calcium Picken %10 ampul, ADEKA®) ile  $37\text{C}^0$ 'de 15 dk inkübe edilir. Bu PPP içerisinde aktive olan trombin nedeniyle az miktarda mevcut olan trombositlerin kümelenmesi izlenir (**Şekil: 18-b**). Hazırlanan otolog trombin (T) solüsyonu istenildiği zaman PRP aktivasyonu sağlanması için PRP:T oranı 10:1 olacak şekilde kullanılır. PRP jel kıvamına geldiği zaman aktif hale geldiğinden emin olunabilir (87,94) (**Şekil: 18-c**).



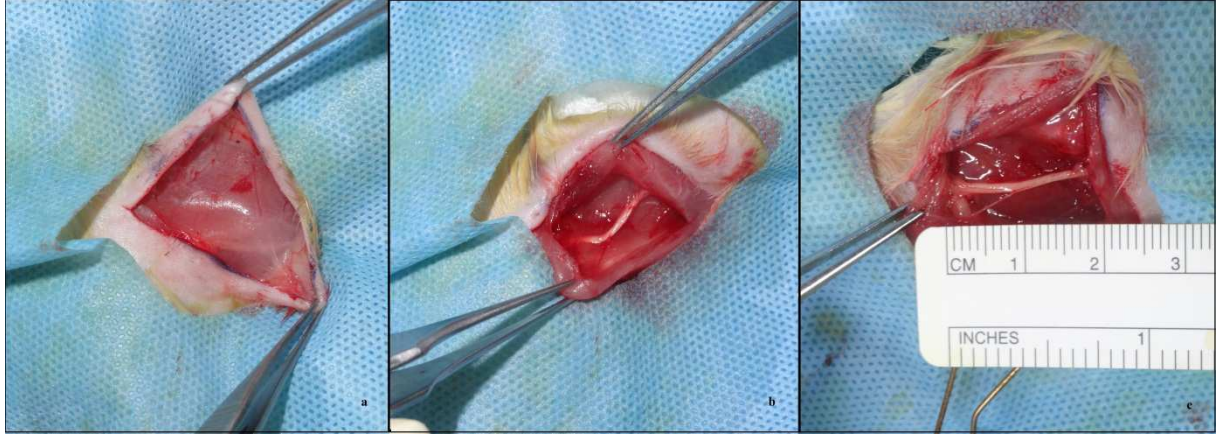
**Şekil 17:** Sıçanlardan elde edilen kanın değişik aşamalarda santrifüj işlemine sokulup PRP hazırlanması (a.) Işınlama sonrasında 9 cc'lik tüplere alınmış tam kan; (b.) İlk santrifüj işlemi sonrasında eritrositlerin serum ve diğer kan hücrelerinden ayrıştırılması; (c.) İkinci santrifüj işlemi sonrasında trombositler ve az miktardaki kan en altta birikir. Serumun üstte kalan 2/3'lük kısmı PPP olarak uzaklaştırılır. Kan dışındaki kısımdan PRP elde edilir ve ayrı bir tüpe alınır.



**Şekil 18:** PRP aktivasyonu için ototrombin elde edilmesi. a.) İkinci santrifüj sonrası üstte kalan serumun 2/3'lük kısmı alınarak ototrombin elde edilmesinde kullanılacak PPP elde edilir; b.) PPP ve kalsiyum glukonat karıştırıldıktan sonra inkübe edilerek trombin elde edilmesi. PPP içerisindeki trombositlerin kümelenmesi izlenir; c.) Aktive edilen PRP jel haline gelerek akışkanlığını kaybeder.

## CERRAHİ TEKNİK

Anestezi için deneklere 50 mg/kg Ketamine-HCl (Alfamine®-im) ve 9 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı uygulandı. Prone pozisyonda ayakları tespit edilip gluteal ve uyluk bölgeleri traş edildi ve povidon iodine ile cerrahi alan temizliği yapıldı. Sol alt ekstremitede kalça eklemi katlantısına paralel oblik gluteal deri insizyonu yapıldıktan sonra deri kenarları ekarte edilerek gluteus süperfisiyalis ve biceps femoris kaslarına ulaşıldı. Deri ekartasyonu sonrası biceps femoris kası üst sınırından, femurdan diz eklemi seviyesine kadar küt diseksiyonla geçilerek, femur ve diz eklemi posterior sınırı boyunca uzanan siyatik sinir ortaya çıkarıldı. Daha sonra sinir ince uçlu bir diseksiyon makası yardımıyla siyatik sinirin siyatik çentikten popliteal alandaki dallanma bölgesine kadar olan kısmı çevre dokulardan serbestleştirildi (Şekil 19). Siyatik siniri tamamen serbestlemek için semitendineus, semimembranöz ve biceps femoris kaslarına verdiği ince motor dalı sakrifiye edildi (Şekil: 20-a). Bu şekilde sinir grefti alınabilecek çevre dokulardan bağımsız bir segment elde edilmiş oldu.



**Şekil 19:** Sıçan siyatik sinirinin eksplorasyonu ve çevre dokulardan diseke edilerek serbestleştirilmesi. (a) Deri insizyonu ardından uyluk kaslarının görünümü. (b) Semitendinöz ve semimembranöz kasların ayrılmasının ardından sinirin ortaya konması. (c) Siyatik sinirin çevre dokulardan serbestleştirilmesi.

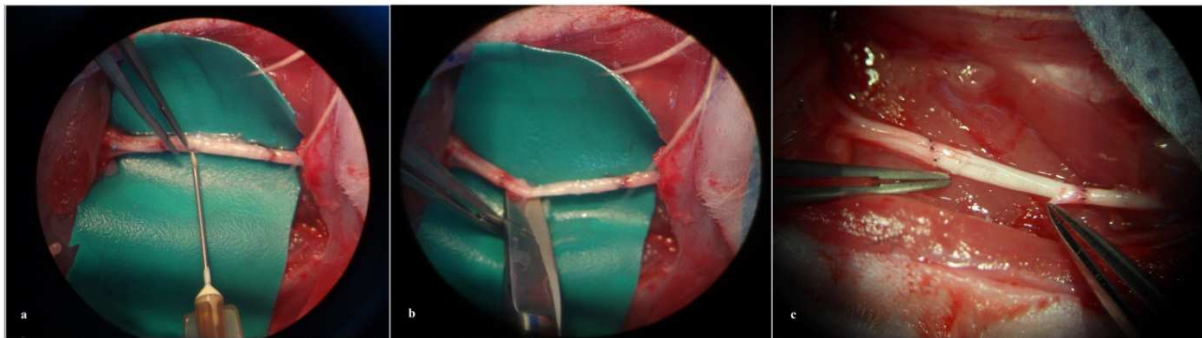
Popliteal dallanma noktasının 1-2 mm proksimalinden itibaren 1 cm'lik sinir segmenti ölçülerek rezeke edildi. Çevre dokulardan serbestlenerek rezeke edilen bu segment, aradaki defekti onarmak için, yine sinir grefti olarak aynı defekte torsiyon veya ters çevirme işlemi uygulanmaksızın aynı pozisyonunda epinöral sütür tekniği ve 10-0 ethilon sütürler ile sinir onarımında kullanıldı (Şekil 20). Daha sonra saha kas yapılar 5-0 R.vicryl ve deri 4-0 ipek

sütürler ile ayrı ayrı tabakalar halinde onarılarak kapatıldı. Cerrahi saha günlük pansumanlarla takip edildi.



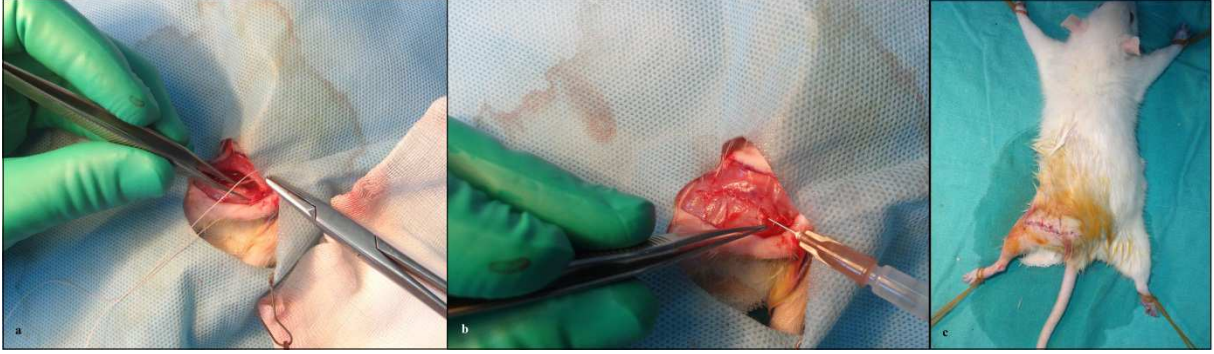
**Şekil 20:** Sinir defekti oluşturulması ve otogreft ile onarım yapılması. (a) Siyatik siniri tamamen serbestlemek için semitendineus, semimenbranöz ve biceps femoris kaslarına verdiği ince motor dal sakrifiye edilmesi. (b) Popliteal dallanma noktasından 1-2 mm proksimalden itibaren 1 cm'lik sinir segmenti ölçülerek rezeke edilmesi. (c) Rezeke edilen kısmın otogreft olarak rekonstrüksiyon için kullanımı.

Grup 2 ve Grup 4'te sinir greftinin orta kısmında yaklaşık 6 mm genişliğindeki bir kısımda, epinörium tabakası çepeçevre soyularak sinir fasiküllerinin sadece kan beyin bariyeri görevi gören perinörium ile kaplı oldukları bir alan oluşturuldu. Bu gruplarda bu uygulama yine sinir grefti proksimal ve distal uçları epinöral onarım yapıldıktan sonra 25 gauge iğne ucu ile epinörium tabakası insize edilip mikro makas ile diseke edilerek çıkartıldı (**Şekil 21**).



**Şekil 21:** Sinir otogreftinin epinörium tabakasının rezeksiyonu. (a) Mikroskop altında 25 gauge iğne ucu ile epinöriumun insizyonu. (b) Mikromakas ile greft orta kısmından bir miktar epinöral tabakanın diseke edilerek eksizye edilmesi. (c) Epinöral tabaka soyulduktan sonraki görünüm.

Grup 3 ve Grup 4’de kullanılan 0.5 cc PRP kas onarımı yapıldıktan sonra insizyon altından loja enjekte edilerek uygulandı (Şekil 21-b). Bu şekilde PRP’nin tamamının sinir grefti çevresinde kaldığından emin olundu.



**Şekil 21:** Sinir onarımı sonrasında yaranın kapatılması (a) Kas tabakanın suture edilerek kapatılması. (b) PRP uygulanan gruplarda kas altındaki sinir onarım alanına ait loja PRP enjekte edilmesi. (c) Deri sutureasyonu sonrasında operasyonun sonlandırılması.



## DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

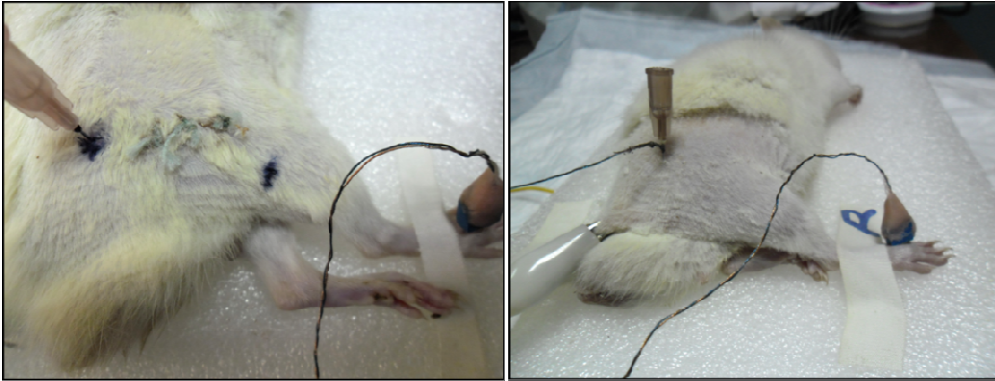
### Elektrofizyolojik Değerlendirme

#### EMG:

Hayvanların yapılacak olan biyopsiler sonrasında sakrifiye edilecek olmalarından dolayı elektrofizyolojik çalışma bu aşamadan önce yapılmıştır. Genel anestezi altında EMG kaydı için Biopac MP-30 sistemi kullanılmıştır. EMG 0.5-5000 Hz aralığında, 40 kHz/sn örnekleme hızı ile, her sıçan için proksimal ve distalden 3'er kez 1 Hz sıklığında 0.05 msn süreli ve supramaksimal kas yanıtı oluşacak şekilde stimulus verilerek, 20 msn süreli kayıtlar alınmıştır.

EMG kaydı sırasında sıçanların rektal prob (CMA/150, Temperature Controller, USA) ile vücut ısıları monitörize edilmiştir. Kayıtlar, vücut sıcaklığını 36-37 °C arasında sabit tutmak için ısıtıcı yüzey aparatı üzerinde alınmıştır.

EMG'de stimulus elektrodunu doğru yerleştirmek için öncelikle sıçanların sağ bacakları traş edilmiştir (Şekil 22).



**Şekil 22:** Siyatik çentikte katod elektrodu, 2-3. interosseöz kas içine yerleştirilmiş monopolar kayıt elektrodu.

EMG için stimulus ve kayıt elektrodları yapılmıştır. Stimulus elektrodu katod olarak belirlenmiş ve kısa insulin iğnesi kullanılmıştır. Anod elektrodu yüzeyel elektrod olarak ekstremitte proksimaline yerleştirilmiştir. (Şekil 22)

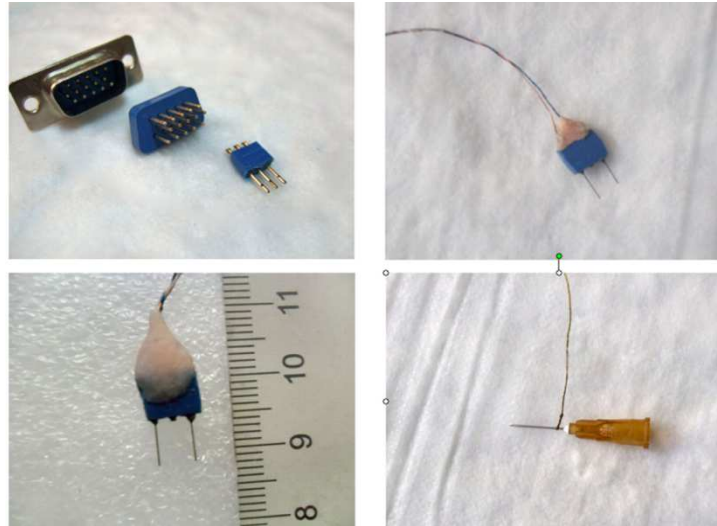
İnsülin iğnesinden yapılan ve subkutan uyarım oluşturan katod elektrodu ile siyatik sinire siyatik çentik bölgesinden (tamir yerinin proksimali) 0.05 ms süreli ve supramaksimal

M yanıtı (BKAP) oluşturacak şiddette uyarı verilmiştir. Uyarı vermek için Biopac MP-30 stimülatörü kullanılmıştır (Şekil 23).



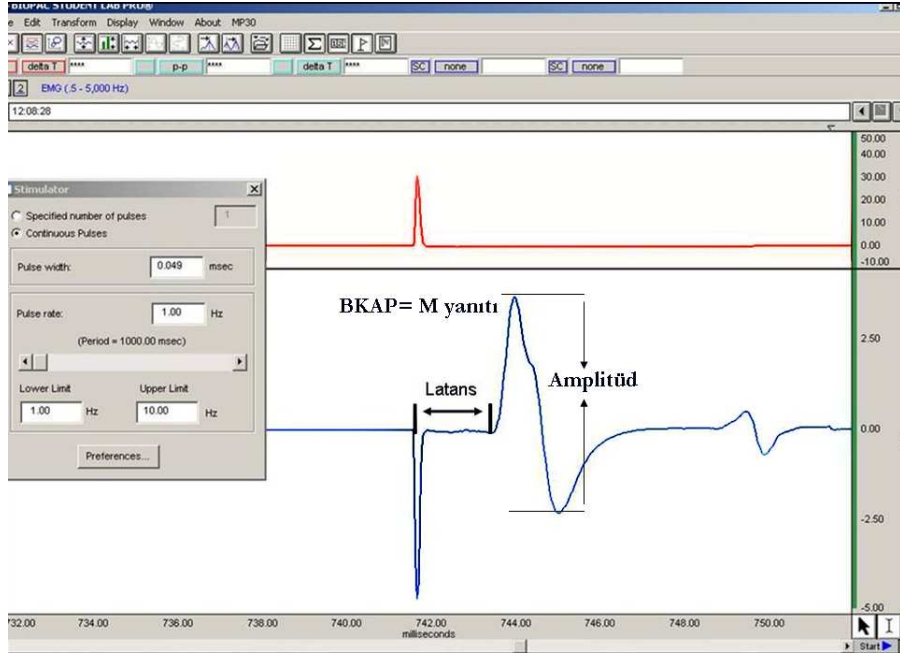
Şekil 23: MP30 biopotansiyel kayıt amplifikatörü ve stimülatörü.

EMG kayıt elektrodu çelik telden yapılmış olup 2-3. interosseöz kas içine yerleştirilmiş ve monopolar kayıt yapılarak M yanıtı (BKAP) elde edilmiştir. (Şekil 22, 24 ve 25)



Şekil 24: VGA kablo ucundan modifiye edilen çelik monopolar kayıt elektrodu, insülin iğnesinden yapılan katod elektrod.

Alınan EMG kayıtları Biopac Student Lab Pro version 3.6.7 software (BIOPAC Systems, Inc.) programında distal latans, BKAP süresi ve amplitüdü yönünden yorumlanmıştır.



Şekil 25: EMG de M yanıtı ve distal latans süresi.

## **KASLARIN MORFOMETRİK DEĞERLENDİRMESİ**

Çalışma süresi olarak öngörülen 10 haftalık sinir iyileşme süresi sonunda Grup 1, 2 ve 4'de 1'er adet, Grup 3'de ise 2 adet denek kaybedildi. Bu nedenle 23 adet denek incelemeye alındı. Çalışma süresini salim olarak geçiren deneklerin genel anestezi altında elektrofizyolojik çalışmaları tamamlandı. Sinir biyopsileri eksplorasyon sonrası alındıktan sonra her iki bacaklarındaki gastroknemius kasları yine anestezinin devam ettiği süre içerisinde eksize edildi ve kasların atrofiye gidip gitmedikleri, renk ve görünüm açısından makroskopik incelemeleri, ıslak ağırlıklarının ölçümleri yapıldı (**Şekil 26**).

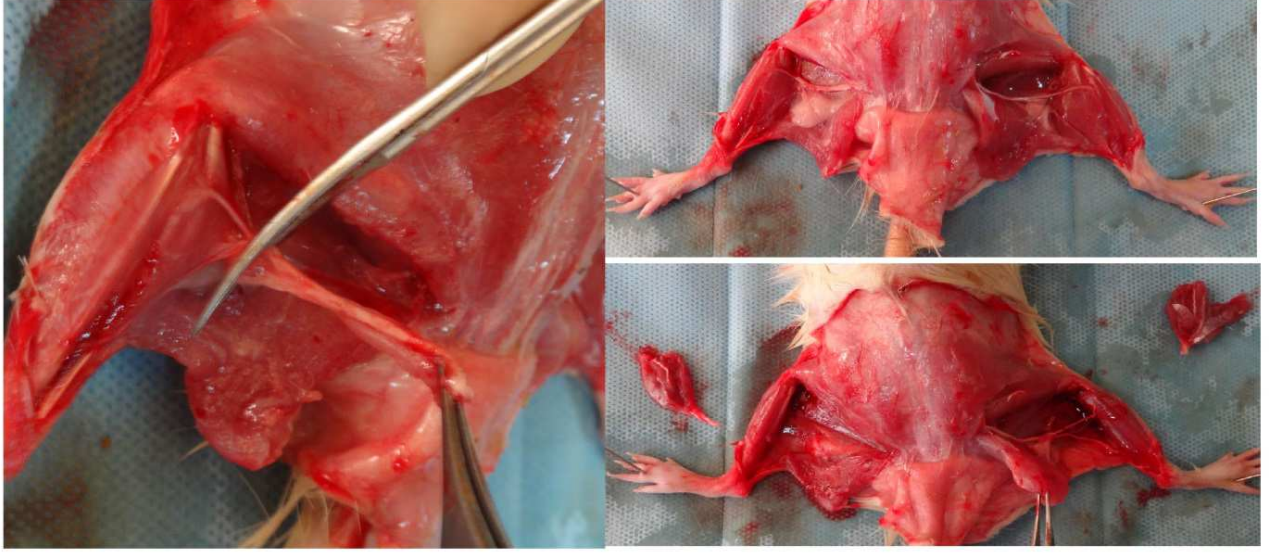
### **Makroskopi**

Gastroknemius kaslarında denervasyona bağlı olarak gelişen değişik derecelerdeki atrofik bulgular makroskopik olarak değerlendirildi.

### **Kas Ağırlık Ölçümü**

Siyatik sinirin tibial dalı tarafından inerve edilen gastroknemius kası her iki arka ekstremitede sinir biyopsisi sonrasında eksize edildi. Kasların ıslak kas ağırlıkları hassas dijital terazi (Sartorius, BP4100S, Almanya) ile ölçüldü. Her hayvanda deney yapılan sol bacak gastroknemius kas ağırlıkları, opere edilmeyen sağ bacadaki gastroknemius kas ağırlığına bölünerek iyileşme oranları hesaplandı. Gruplar arasında iyileşme oranları açısından istatistiksel farklılık arandı.

Kas İyileşme Oranı = (Opere Taraf Kas Ağırlığı / Sağlam Taraf Kas Ağırlığı) X 100 formülü hesaplamada kullanıldı. Elde edilen veriler istatistiksel değerlendirme için kayıt edildi.



**Şekil 26:** Biyopsilerin alınması. Opere edilen taraftan sinir biyopsisi alınması (sol). Biyopsilerin alınması için her iki alanın eksplere edilmesi (sağ üst). Sinir ve kas biyopsilerinin alındıktan sonraki görünüm (sağ alt).

## HİSTOMORFOMETRİK DEĞERLENDİRME

### Mikroskopik Gereç Ve Yöntem

#### Fiksatifler

Cacodylate (0.1M) tamponlu %2'lik glutaraldehit ve %2'lik paraformaldehit solüsyonu.

- 8 cc %25'lik glutaraldehit
- 25 cc %8'lik paraformaldehit
- 17 cc distile su
- 50 cc %2'lik cacodylate tamponu

#### Tamponlar

%2'lik cacodylate tamponu.

- 9,6 gr cacodylate
- 150 cc distile su

#### Işık Mikroskopik Gereç

- Etanol (Merck 1.00886.2500)
- Ksilol (Merck 1.08681.2500)
- Parafin (Surgipath 1F-200, Mavi boncuk)
- Hematoksilen Solüsyonu (Merck 1.05174.2500)
- Mercuric oksit (Merck 1.04465.0100)
- HCl (Merck 1.109060.2500)
- Amonyum solüsyonu (% 25'lik) (Merck 1.05432.2500)
- Eozin
- Toluidin Blue (Sigma T3260-25gr)
- Boraks (Merck Art.6303)

#### Işık Mikroskopik Yöntem

Rutin Işık mikroskopik takip sonrası, 58-60°C'lik etüvde erimiş parafin içerisine alınan parçalar 1 gece bekletildi. Ertesi gün etüvden çıkarılan parçalar mavi boncuk parafin eriyiğine gömülerek bloklandı.

#### Kesit Alma

Işık mikroskopik kesitler için Leica RM 2145 model mikrotomda 5µm'lik kesitler 45°C'lik su banyosuna alındı. Kesitlerin lama iyice yapıştırılması ve parafin uzaklaştırma işlemlerinde mikrodalga fırın (Arçelik MD554) kullanıldı. Tüm gruplardan elde edilen histolojik preparatlarda uygun histokimyasal ve İmmünohistokimyasal boyamalar

gerçekleştirildi. Toluidin ile boyanan kesitler ise epon bloklardan Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotomda 1 µm kalınlıkta alındı.

### **Elektron Mikroskopik Gereç**

- Osmium tetroksit-  $OSO_4$  (Sigma 05500)
- Propilenoksit (Merck 8.07027.1000)
- Epon 812 (Fluka 45345)
- DDSA (Fluka 45346)
- MNA (Fluka 45347)
- DMP 30 (Fluka 45348)
- NaOH (Merck 1.06462.5000)
- BEEM 036 kapsül
- 3,05 mm çaplı G 200 Gilder grid
- Etüv (Heraeus FB420)
- Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotom

### **Elektron Mikroskopik Yöntem**

#### **Fiksasyon**

Ortak mikroskopik yöntemin sonunda yapılan diseksiyondan sonra elektron mikroskopik parçalar postfiksasyon öncesi tampona alınıp bir gece bekletildi. Elektron mikroskopi takip tekniğinde lipidlerin tespiti için gerekli osmium tetroksit ile postfiksasyon işlemi siyatik sinire uygulandı.

Cacodylate tamponunda bulunan elektron mikroskopik parçalar temiz tüpe aktarıldı. Post fiksasyon için tüplere 1:1 oranında + Cacodylate tamponlu osmium tetroksit ( $OSO_4$ ) eklenip (1-1,5 saat) fikse olması sağlandı. Parçalar Cacodylate tamponu ile 3x5 dakika yıkayıp dehidratasyon işlemine geçildi.

#### **Dehidratasyon**

Rutin alkol, propilen oksit ve epondan geçirilen parçalar, DMP-30'suz Epon karışımına alınarak 1 gece (parçalar dibe çökene kadar) buzdolabında 4 °C de bekletildi.

#### **Gömme**

% 1.5-2 oranında DMP-30 içeren epon içerisinde BEEM 036 pyramidal kapsüllere gömüldü. 37 °C, 45 °C ve 60 °C sıcakta tutulan bloklar, parçaların tamamen sertleşmesi dolayısıyla kesite hazırlanması için oda ısısında 10 gün beklemeleri gerekti.

## **Kesit Alma**

Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotom aracılığı ile elektron mikroskobu için yarı ince kesitler alındı. Toluidin boyaması sonrası 1 mikronluk kesitler ışık mikroskobunda incelendi. Kesitlere uygulanan epon kaldırma işlemi sonrası anti S100 immünohistokimyası uygulandı.

## **Işık Mikroskobik Boyama**

### **Histokimyasal Boyama**

### **Histokimyasal Gereç**

- Hematoksilen Solüsyonu (Merck 1.05174.2500)
- Mercuric oksit (Merck 1.04465.0100)
- Eosin
- Toluidin Blue (Sigma T3260-25gr)
- Boraks (Merck Art.6303)
- Işık mikroskobu (Olympus BX-51 light microscope)
- Dijital kamera (Olympus C-5050)

## **Histokimyasal Yöntem**

### **H&E Boyama**

#### **Solüsyonlar:**

Hematoksilen, kristal	5 gr
% 95 alkol	50 cc
Amonyum	100 gr
Mercuric oksit	2.5 gr
Asid Alkol solüsyonu	
% 70 alkol	1000 cc
HCl	10 cc
Amonyaklı Su	
Distile su	1000 cc
Amonyak	1-2 cc



## Eosin Solüsyonu

Eozin Y, % 3 sudaki solüsyonu	100 cc
% 95 alkol	125 cc
Distile su	375 cc

## Boyama Tekniği

Preparatlar aşağıdaki deparafinizasyon ve boyama basamaklarından geçirilip rutin Hematoksilen ve eozin takibi sonrası parçaların boyanması sağlandı. Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı.



**şekil 27:** Laboratuvarda kullanılan teknik, boya ekipmanları ve fotoğraflama işlemi gerçekleştirilen mikroskopik görüntüleme sistemi.

## Toluidin Blue Boyama

### Stok solüsyonu

Toluidin Blue.....0,1 gr

Boraks.....1 gr

Distile su.....50 cc

Bu karışım en az bir gün bekletildi.

## **Çalışma Solüsyonu**

Stok solüsyondan bir şalelik hacim olacak şekilde distile su ilave edilerek 1:1 seyreltildi. Preparatlar 60°C'de sıcak çalışma solüsyonunda 1-2 dakikada boyandı. Akarsuya alınan parçalar kurutularak kapatıldı.

## **İmmünohistokimyasal Boyama**

### **İmmünohistokimyasal Gereç**

- Mouse Anti-S100 (THERMO Scientific, S100 Protein Ab, UK)
- Zymed Histostain Plus (Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG (H+L), HRP-Streptavidin, Blocking Solution Ref/Cat No:859643, San Francisco California, USA)
- Mayer's hematoxylin solüsyonu (Dakocytomation Code no: SL030 Lot: 063190 )
- % 30'luk Peroksidaz solüsyonu (Carlo Erba Code No:412072005)
- DAB (3,3-diaminobenzidine) peroksidaz solüsyonu (Zymed Histostain Plus Ref/Cat No:859643 San Francisco California, USA)
- Super Pap-Pen (Part No: IM3580 immunotech, Beckman Coulter, France)

## **İmmünohistokimyasal Yöntem**

### **Anti-S100 boyama protokolü**

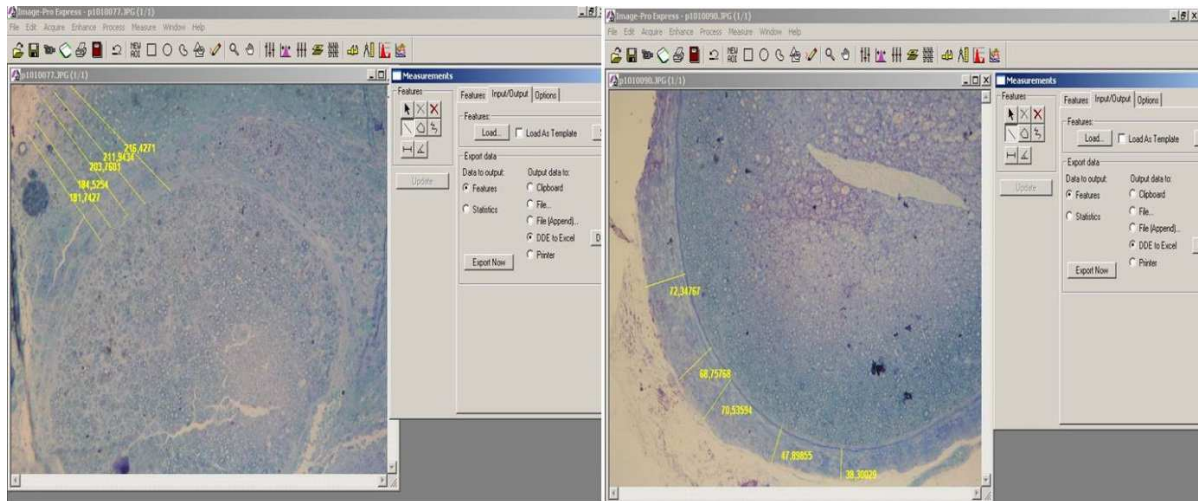
Kesitler aşağıdaki basamaklardan geçirilerek boyama işlemi tamamlandı. Buna göre:

1. Ksilol içinde mikrodalga fırında 90 watt'da 1 dakika işlem görüp deparafinize edilen kesitler distile suya alındı.
2. Preparatlar içinde sitrat tamponu (pH: 6.0) bulunan kap içinde mikrodalga fırında 5 dakika 90 watt-15 dakika 360 watt'ta muamele edildi. Bu özel kaplar 20 dakika sonunda su banyosuna alındı. Oda sıcaklığına ulaşması için 20 dakika bekletildi (Epitoplarnın açığa çıkarılması).
3. Yıkama solüsyonunda 2x2 dakika bekletildi.
4. Serum Bloklama: Kesitlerin immüoglobülinin nonspesifik taşınmasını engellemek için normal horse serum bloklama solüsyonunda 30 dakika bekletildi.
5. Primer antibody: Kesitler 1:100 dilüsyonda mouse anti-S100 (THERMO Scientific, S100 Protein Ab, İngiltere) primer antikoru ile tüm gece inkübe edildi.
6. Yıkama tamponunda 2x2 dakika bekletildi.
7. Endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için kesitler peroksidaz bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletildi.
8. Yıkama tamponunda 3x2 dakika bekletildi.

9. Sekonder antikor olan Biotinle konjuge Horse anti-Mouse IgG ile kesitler 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
  10. Yıkama tamponunda 3x2 dakika bekletildi.
  11. Görünür hale getirme: HRP-Streptavidin ile 30 dakika bekletildi.
  12. Yıkama tamponunda 3x2 dakika bekletildi.
  13. DAB (3,3-diaminobenzidine) peroksidaz substrat solüsyonu ile 5-10 dakika (Mikroskopik kontrollü) bekletildi.
  14. Distile su ile 2x2 yıkama bekletildi.
  15. Mayer's hematoxylin solüsyonu ile boyandı (Hücre sayımı ve oryantasyon için).
  16. Akar suda 5 dakika bekletildi.
  17. Dehidratasyon için % 95 alkolde 2 dakika, % 100 alkolde 2x3 dakika bekletildi.
  18. Ksilolde 2x3 dakika bekletildi.
- Entellan ile lamel kapatılıp, mikroskopik inceleme yapıldı.

## Epinöral Fibrozis Kalınlığı Ölçümü

Epinöral yapının Image-Pro Express 4.5 (Media Cybernetics, inc. USA) programı kullanılarak mikron cinsinden kalınlığı ölçülüp elde edilen datalar istatistiksel olarak değerlendirildi (Şekil 28).



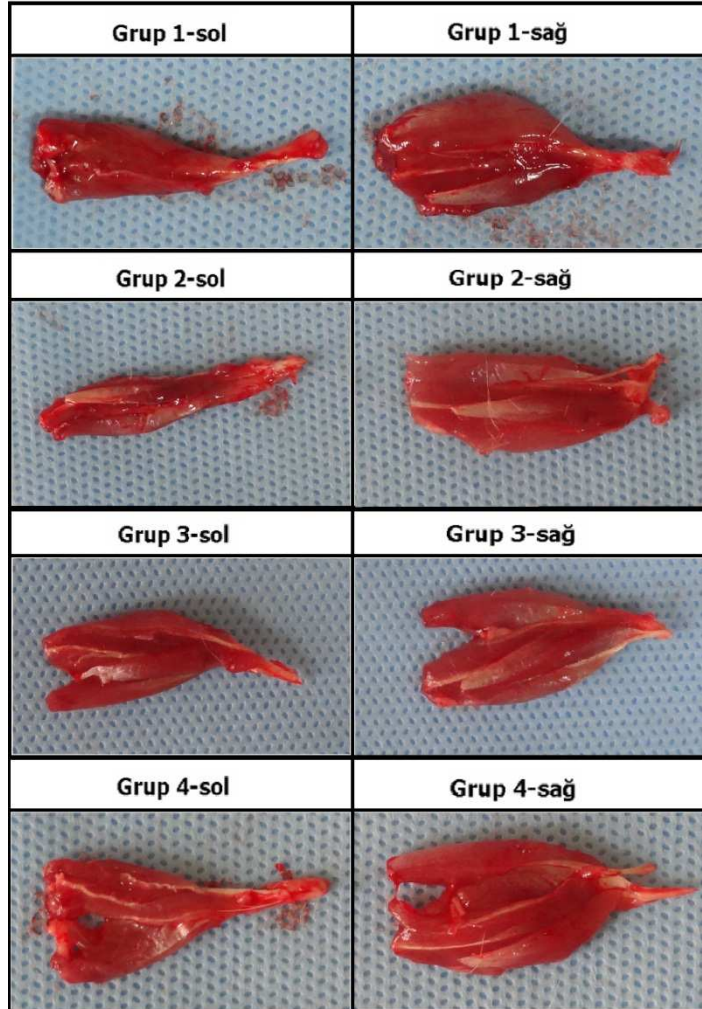
Şekil 28: Grup 2 ve Grup 3'e ait kesitlerde fibrozis hesaplamasının image pro express programı üzerinde ölçülmesi.

# BULGULAR

## KAS MORFOMETRİK BULGULARI

### Makroskopik Değerlendirme

Kontrol olarak bırakılan sağ taraflara ait gastroknemius kaslarının makroskopik görünümü normaldi ve gruplar arasında belirgin fark yoktu. Opere edilen sol taraf gastroknemius kaslarında ise Grup 2’de daha belirgin olmak üzere belirgin atrofik görünüm izlendi (Şekil 29).



Şekil 29: Gruplara göre opere edilen sol taraf ve opere edilmeyen sağ taraf gastroknemius kaslarının makroskopik görüntüleri.

## İstatistiksel Analiz

Gruplara ait sağlam ve opere taraflardaki gastroknemius kas ağırlıkları tüm gruplarda deney uygulanan sağ bacak gastroknemius kaslarının ıslak ağırlıkları tartılarak kayıt edildi. Kasların ağırlıklarının dağılımı Tablo 3'de gösterilmiştir.

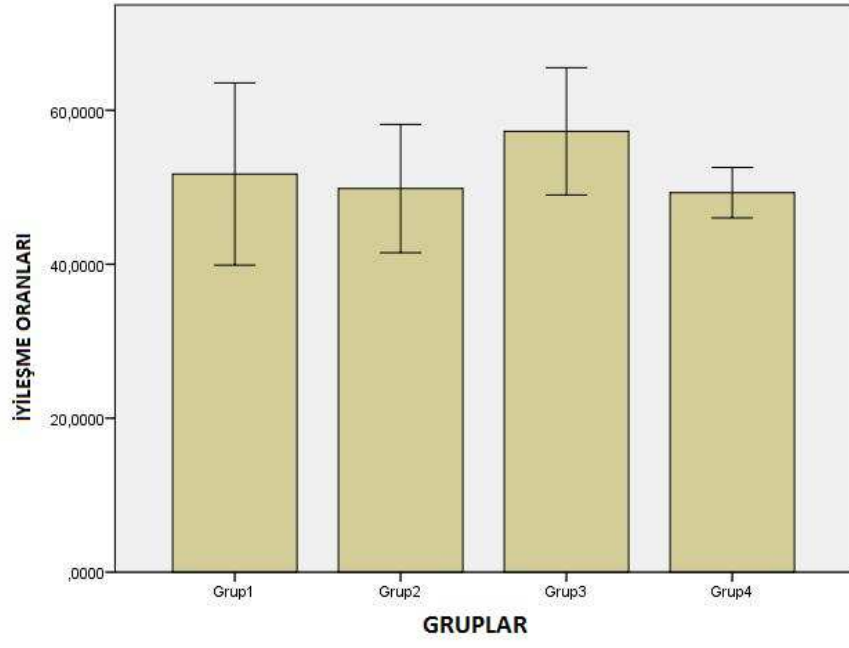
	Grup 1	Grup 2	Grup3	Grup 4
Rat 1	60/118	50/114	50/93	63/127
Rat 2	70/96	53/125	54/114	61/128
Rat 3	45/110	71/113	73/121	57/110
Rat 4	50/101	67/120	67/105	51/95
Rat 5	65/124	45/93	66/108	37/77
Rat 6	45/103	53/116		49/109
Ort.%	% 51.7	% 49.8	% 56.3	% 46.1

**Tablo 3:** Grupların opere (sol)/ sağlam (sağ) taraf kas ağırlıkları oranları.

Kasların ağırlıkları ve iyileşme oranları ile ilgili tüm parametrelerden elde edilen veriler istatistiksel değerlendirme için SPSS for Windows v.15.0 programına (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) aktarıldı. Grupları arasında parametreler açısından genel karşılaştırma nonparametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Bu test ile elde edilen anlamlı sonuçlar parametreler açısından gruplar arasında bir fark olup olmadığını gösterdi.

Bunun sonucunda deneklerin opere edilmeyen sağlam tarafları arasında anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,816$ ). Opere edilen taraflardaki kas ağırlıkları açısından da yine benzer şekilde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ( $p=0,483$ ).

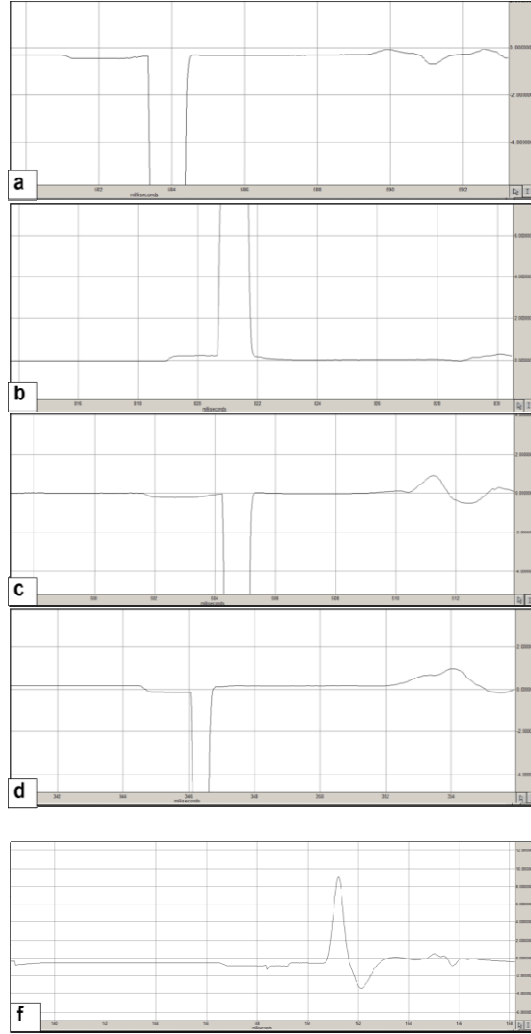
İyileşme oranlarına bakıldığında ortalama iyileşme oranları Grup 3'te % 56.3 ile diğer gruplardan daha yüksek olarak saptansa da, iyileşme oranları açısından gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmadı ( $p=0,318$ ) (**Şekil 30**).



**Şekil 30:** Kas iyileşme oranlarının gruplar arası karşılaştırılması.

## ELEKTROFİZYOLOJİK ÇALIŞMA BULGULARI

Pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) olan amplitüd aksonal rejenerasyon ile doğru orantılı olması beklendiğinden gruplar arasında değerlendirildi. Farklı gruplardan elde edilen EMG kayıtlarına ilişkin örnekler **Şekil 31**'de gösterilmektedir.



**Şekil 31:** Gruplara ait M yanıtlarından örnekler.

- a: 1.Grup sol bacak EMG, b: 2.Grup sol bacak EMG,  
c: 3.Grup sol bacak EMG, d: 4.Grup sol bacak EMG,  
f: normal sağ bacak EMG.

Gruplar	BKAP Amplitüd (mV)
Normal sağ Bacak	10.2 ± 0.4
1.Grup sol bacak	0.3 ± 0.1
2.Grup sol bacak	0.1 ± 0.07 *
3.Grup sol bacak	0.9 ± 0.2 **
4.Grup sol bacak	0.4 ± 0.1 #

**Tablo 4:** Grupların EMG değerlendirmesi sonucunda elde edilen ortalama BKAP (M) amplitüd değerleri.

\*  $p < 0.05$  1. Grup ve 2. Grup

\*  $p < 0.001$  1. Grup ve 3. Grup

#  $p > 0.05$  1. Grup ve 4. Grup

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel açıdan verilerin değerlendirilmesinde SPSS for Windows v.15.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) istatistik paket programı kullanıldı. Grupların değişkenlerinin parametrik özelliklerinin karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA, grupların parametrik olmayan özelliklerinin karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi uygulandı.

BKAP amplitüdü aksonal rejenerasyon ile doğru orantılıdır. Grup 2 ve 4 sadece tamir yapılan gruba göre (Grup 1) daha iyi aksonal rejenere olduğu saptandı.

BKAP amplitüdü değerlerinde sağlam taraf ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmazken ( $p > 0.05$ ), deney tarafında ise Grup 1 ve Grup 2 arasında ( $p < 0.05$ ) ve ayrıca Grup 1 ve Grup 3 arasında ( $p < 0.001$ ) anlamlı fark mevcuttu. 1. ve 4. gruplar arasında ise anlamlı bir fark saptanamadı ( $p > 0.05$ ).

Bu sonuçlar göz önüne alındığında normal greft ile sinir onarımı yapılan Grup1'e kıyasla, bu yönteme PRP eklenen Grup 3'te daha iyi sonuçlar alındı. Greftin bir kısım epinöral dokusunun eksize edildiği Grup 2'de ise normal greft grubu olan Grup 1'e kıyasla daha kötü sonuçlar alındı.



## **HİSTOLOJİK BULGULAR**

Bu gruplara ait histolojik değerlendirmeler otogreftin orta kısmından ve greft distalinden alınan kesitlerle yapılmıştır. Sinirlerin proksimalinde anlamlı bir fark saptanmayacağı öngörülmüştür.

### **Grefte Ait Histolojik Bulgular**

#### **GRUP 1’de Greftin Histolojik Bulguları:**

##### **Hematoksilen & Eosin ve Toluidin Blue Boyama**

En dıştan epinörium ile sarılmış, fasiküler tarzda perinörium ile sarılı siyatik sinir demetleri görüldü. En yüksek büyütme olan X100 büyütmede bu fasiküler yapı içerisindeki akson ve miyelinli halkalar incelendiğinde bu halkalarda dejenerasyon; büyük, orta ve küçük miyelinli halkalarda çeşitli konformasyon bozuklukları ve ayrışma görüldü. Endonöriumda minimal artış saptandı. Yer yer aksonlarda silinmeler görüldü ve perinöral dokuda minimal kalınlaşma izlendi.

##### **Anti S-100 Boyama**

Daha çok perinöral tarafta akson çevresini saran Schwann hücrelerinde immünpozitif boyanmalar görüldü. Santral bölgede ise miyelin halkalarda silinme ve düşük S-100 immünreaktivitesi saptandı.

#### **GRUP 2’de Greftin Histolojik Bulguları:**

##### **Hematoksilen & Eosin ve Toluidin Blue Boyama**

Miyelin halkalarda ayrışma diğer tüm gruplardaki dokulara göre en fazla olan gruptur. Diğer tüm gruplara ait kesitlerde endonöral artışın en fazla olduğu bu gruba ait kesitlerde izlendi. Perinöral hücrelerde yapısal bozukluklar ve yoğun mitotik aktivite görüldü. Aksonlardaki konfigürasyon bozuklukları, dejenerasyon ve silinme en fazla bu grupta görüldü.

## **Anti S-100 Boyama**

Periferal ve santral tüm kesit bölgelerinde kuvvetli bir immünreaksiyon görüldü. Miyelinli halkalara eşlik eden Schwann hücrelerinin sitoplazmik kısımlarında hipertrofik görünümün özellikle orta ve küçük miyelin halkalarda yoğunlaştığı saptandı.

## **GRUP 3'de Greftin Histolojik Bulguları:**

### **Hematoksilen & Eosin ve Toluidin Blue Boyama**

Endonöriyumun normal siyatik sinir histolojisine en yakın olarak görüldüğü gruptu. Aksonların pek çoğunda yapısal korunma olduğu görüldü. Perinöriyumun görece kalın fakat Grup 2'den daha az kalın olduğu saptandı. Damarları döşeyen endotel hücrelerin neovaskülarite açısından pozitif görünümde olduğu saptandı. İlginç bir bulgu olarak hem Grup 3 hem de Grup 4'te siyatik dokusu içinde genelde damarlarla komşu ya da damarlara yakın bölgelerde metakromatik özellik gösteren genellikle yuvarlak veya oval şekilde, hücre sitoplazmalarının tamamına yakını granüller ile kaplanmış mast hücreleri görüldü. Bu hücrelerin Grup 3'te Grup 4'e kıyasla daha çok sayıda olduğu saptandı.

### **Anti S-100 Boyama**

Özellikle periferik bölgede miyelin halkalara rastlanmadı. Yer yer santral bölgede düşük immünreaktivitede miyelin halkalarda reaksiyon saptandı. Grup 1 ile karşılaştırıldığında santral bölgedeki boyamanın anlamlı olduğu görüldü.

## **GRUP 4'de Greftin Histolojik Bulguları:**

### **Hematoksilen & Eosin ve Toluidin Blue Boyama**

Grup 1 ile benzer histolojik görünümde olduğu saptandı. Büyük miyelinli aksonların Grup 2 ile karşılaştırıldığında korunmuş olduğu görüldü. Endonöriyumun artmış olduğu, miyelin halkalarda ayrışma ve konfigürasyon bozuklarının mevcut olduğu görüldü. Yine Grup 3'teki gibi mast hücrelerinin damar ve komşuluk gösterdiği alanlarda yerleştiği saptandı.

### **Anti S-100 Boyama**

Santral ve periferel bölgede benzer S-100 immünreaktivitesi gözlemlendi. Hipertrofik Schwann hücrelerin sayısında genel olarak azalma saptanmadı. Genel olarak normal bir siyatik sinirin S100 boyamasına yakın bir profil sergilemekteydi.

### **Greft Distalinde Histolojik Bulgular**

#### **GRUP 1’de Distal Sinir Bulguları:**

##### **Toluidin Blue Boyama**

Grup 1’in distal alanı incelendiğinde; X100 büyütmede bu fasiküler yapı içerisindeki akson ve miyelinli halkalarda dejenerasyon, büyük, orta ve küçük miyelinli halkalarda çeşitli konformasyon bozuklukları ve ayrışma görüldü. Tüm gruplar içinde büyük miyelinli aksonların en fazla sayıda olduğu saptandı. Endonöriumda minimal artış saptandı. Yer yer aksonlarda silinmeler görüldü ve perinöral dokuda kalınlaşma minimal izlendi.

#### **GRUP 2’de Distal Sinir Bulguları:**

##### **Toluidin Blue Boyama**

Grup 2’nin distal alanı incelendiğinde; miyelin halkalarda ayrışma diğer tüm gruplardaki dokulara göre en fazla olan gruptu. Tüm gruplara ait kesitlerde endonöral artışın en fazla olduğu kesitler bu grupta izlendi. Büyük miyelinli aksonların en az saptandığı kesitti. Aksonlardaki konfigürasyon bozuklukları, dejenerasyon ve silinme en fazla bu grupta görüldü.

#### **GRUP 3’de Distal Sinir Bulguları:**

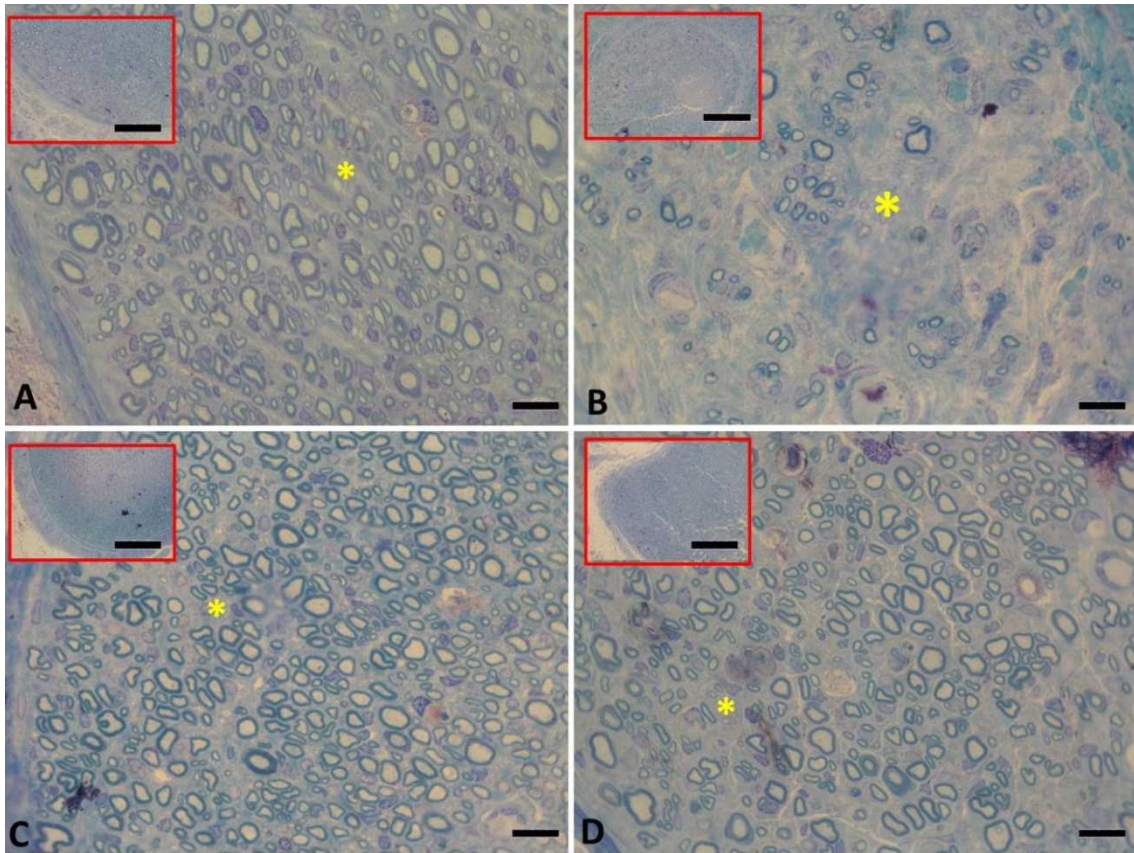
##### **Toluidin Blue Boyama**

Grup 3’ün distal alanı incelendiğinde; aksonların pek çoğunda yapısal korunma olduğu görülse de minimal konfigürasyon bozukluğu, aksonal silinme ve endonöral artış mevcuttu. Perinöriumun da görece kalın olduğu saptandı. Yer yer metakromatik özellik gösteren mast hücreleri distal kısımda da görüldü.

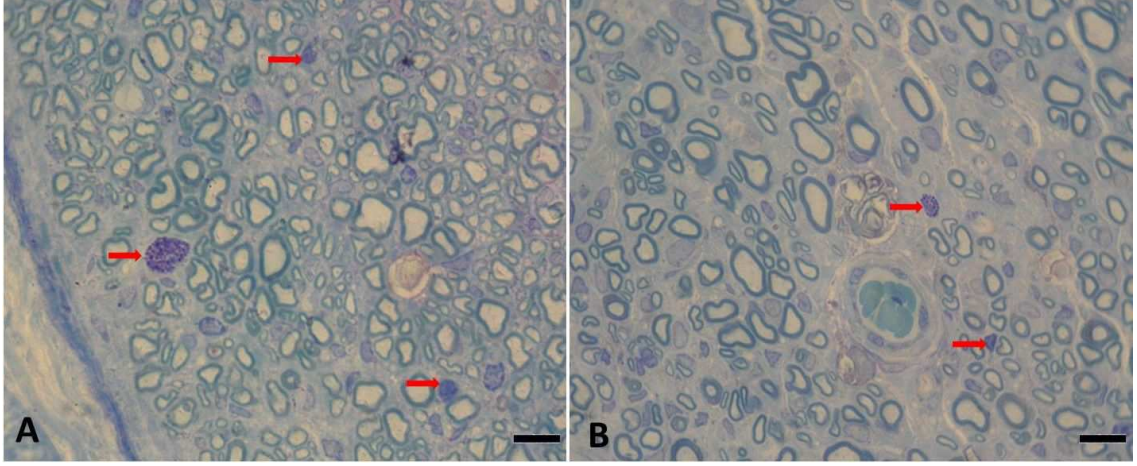
## GRUP 4’de Distal Sinir Bulguları:

### Toluidin Blue Boyama

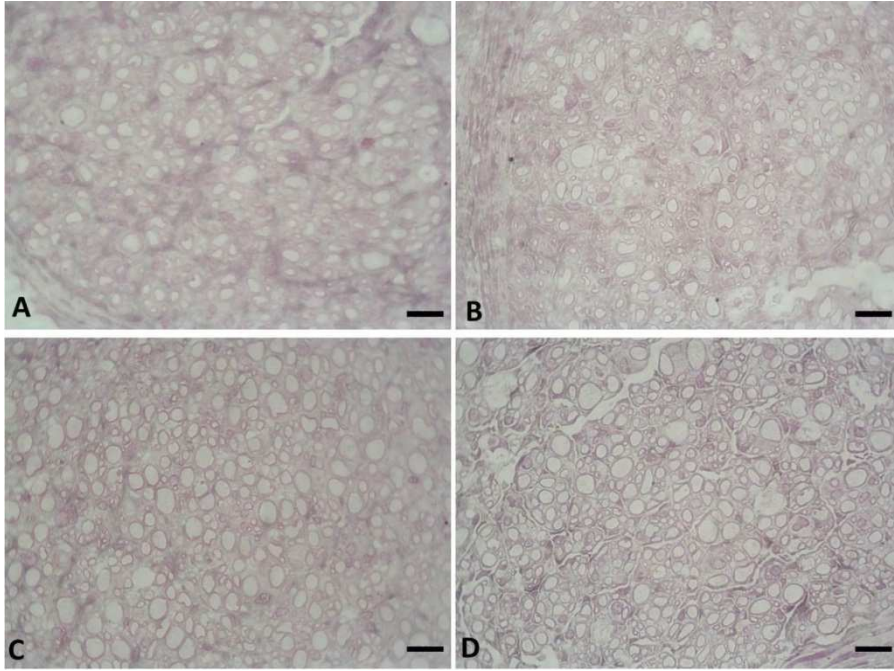
Grup 4’ün distal alanı incelendiğinde; opere alandakinden farklı olarak Grup 1 ile benzerlik göstermediği saptandı. Büyük miyelinli aksonların opere bölgeye kıyasla daha az korunduğu, endonöriyumdaki artışın opere bölgeye oranla daha geniş bir alan işgal ettiği saptandı. Miyelin halkalarda ayrışma ve konfigürasyon bozuklarının mevcut olduğu görüldü. Yine bu alanda mast hücrelerinin damar ve komşuluk gösterdiği alanlara yerleştiği ve bu hücrelerin sayılarının Grup 3’ten az olarak görüldüğü saptandı.



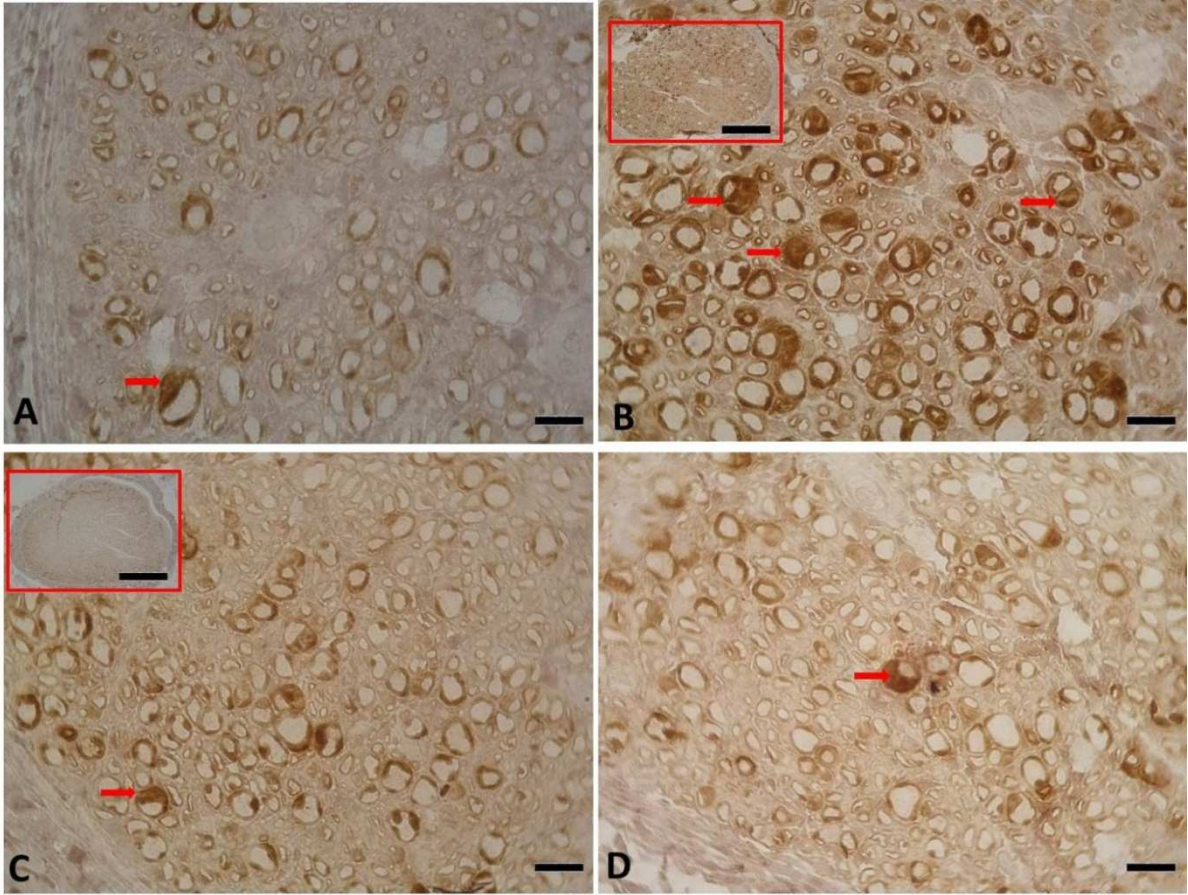
**Şekil 32:** **A.** Grup 1’ e ait siyatik sinir dokusunun görünümü, \* Endonöriyum yapısı. X100 büyütme. Büyütme barı= 50 µm. Küçük resim X20 büyütme. Büyütme barı= 250 µm. Toluidin Blue Boyama. **B.** Grup 2’ ye ait siyatik sinir dokusunun görünümü, \* Endonöriyum yapısı. X100 büyütme. Büyütme barı= 50 µm. Küçük resim X20 büyütme. Büyütme barı= 250 µm. Toluidin Blue Boyama. **C.** Grup 3’ e ait siyatik sinir dokusunun görünümü, \* Endonöriyum yapısı. X100 büyütme. Büyütme barı= 50 µm. Küçük resim X20 büyütme. Büyütme barı= 250 µm. Toluidin Blue Boyama. **D.** Grup 4’ e ait siyatik sinir dokusunun görünümü, \* Endonöriyum yapısı. X100 büyütme. Büyütme barı= 50 µm. Küçük resim X20 büyütme. Büyütme barı= 250 µm Toluidin Blue Boyama.



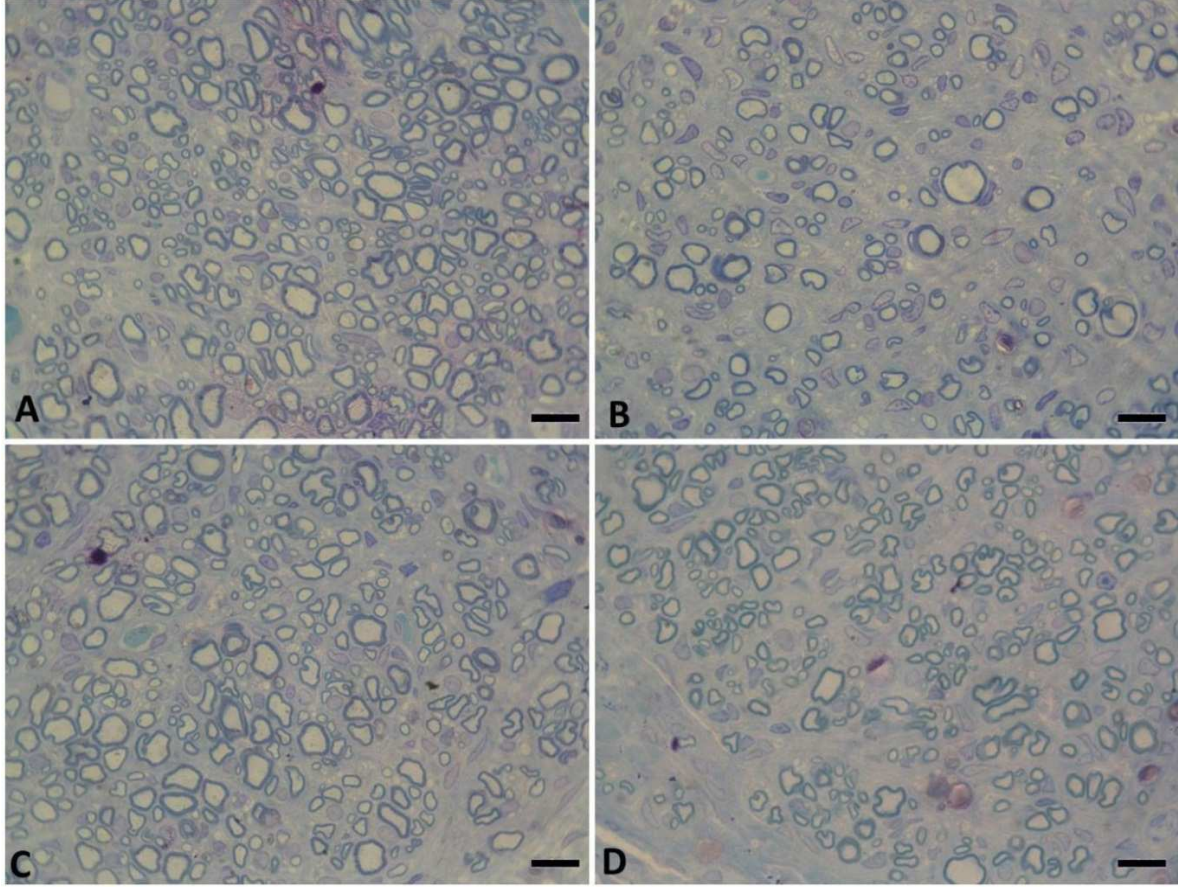
**Şekil 33:** **A.** Grup 3' e ait siyatik sinir dokusunun görünümü. *kırmızı ok*, Mast hücresi. X100 büyütme. Büyütme barı= 50 µm. Toluidin Blue Boyama. **B.** Grup 4' e ait siyatik sinir dokusunun görünümü. *kırmızı ok*, Mast hücresi. X100 büyütme. Büyütme barı= 50 µm. Toluidin Blue Boyama.



**Şekil 34:** **A.** Grup 1' e ait siyatik sinir dokusunun görünümü. X100 Büyütme. Büyütme barı= 50 µm. Hematoksilen & Eozin Boyama. **B.** Grup 2' ye ait siyatik sinir dokusunun görünümü, X100 büyütme. Hematoksilen & Eozin Boyama. **C.** Grup 3' e ait siyatik sinir dokusunun görünümü. X100 büyütme. Hematoksilen & Eozin Boyama. **D.** Grup 4' e ait siyatik sinir dokusunun görünümü, X100 büyütme. Hematoksilen & Eozin Boyama.



**Şekil 35:** A. Grup 1' e ait siyatik sinir dokusunun görünümü. **Kırmızı ok.** hipertrofik sitoplazmalı Schwann hücreleri. Büyütme barı= 50 µm. Anti S100 Boyama. B. Grup 2' ye ait siyatik sinir dokusunun görünümü. **Kırmızı ok.** hipertrofik sitoplazmalı Schwann hücreleri. Büyütme barı= 50 µm. Anti S100 Boyama. C. Grup 3' e ait siyatik sinir dokusunun görünümü. **Kırmızı ok.** hipertrofik sitoplazmalı Schwann hücreleri. X100 büyütme. Büyütme barı= 50 µm. Küçük resim X20 büyütme. Büyütme barı= 250 µm. Anti S100 Boyama D. Grup 4' e ait siyatik sinir dokusunun görünümü. **Kırmızı ok.** hipertrofik sitoplazmalı Schwann hücreleri. X100 büyütme. Büyütme barı= 50 µm. Küçük resim X20 büyütme. Büyütme barı= 250 µm. Anti S100 Boyama.



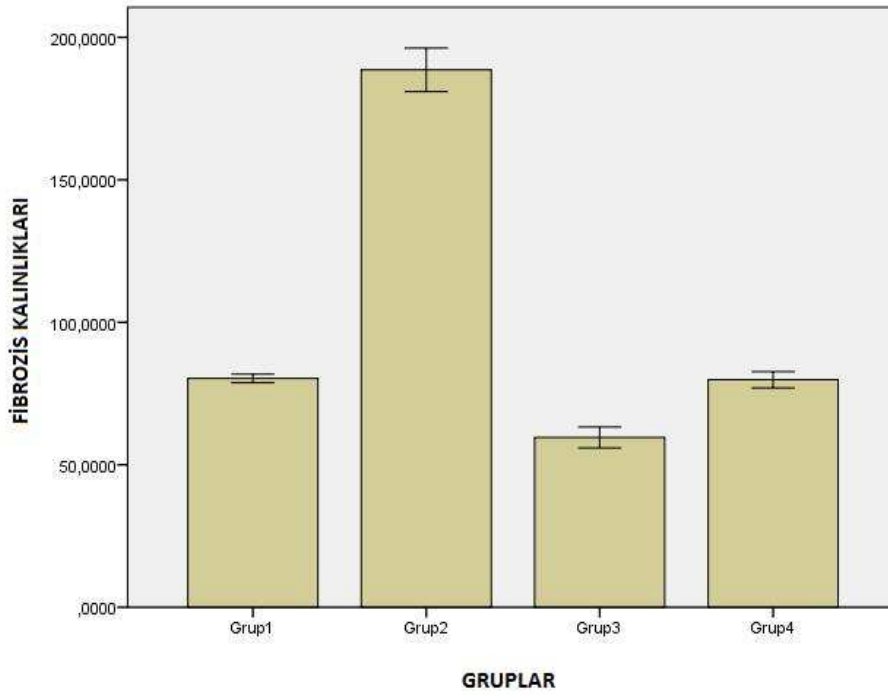
**Şekil 36:** *A.* Grup 1'in distal alanına ait siyatik sinir dokusunun görünümü, Büyütme barı= 50  $\mu$ m. Toluidin Blue Boyama. *B.* Grup 2'nin distal alanına ait siyatik sinir dokusunun görünümü, Büyütme barı= 50  $\mu$ m. Toluidin Blue Boyama. *C.* Grup 3' ün distal alanına ait siyatik sinir dokusunun görünümü, Büyütme barı= 50  $\mu$ m. Toluidin Blue Boyama. *D.* Grup 4' ün distal alanına ait siyatik sinir dokusunun görünümü, Büyütme barı= 50  $\mu$ m. Toluidin Blue Boyama.

## İstatistiksel Analiz

### Perinöral Fibrozis

Her grupta, greft orta kısmından alınan kesitlerde, Image-Pro Express 4.5 (Media Cybernetics, inc. USA) programı kullanılarak epinöral yapı veya sinir grefti dış yüzeyindeki fibrozisin kalınlığı 5 ayrı noktada mikron cinsinden ölçülüp ortalamaları alındı. Elde edilen dataların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS for Windows v.15.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) istatistik paket programı kullanıldı.

Elde edilen bulgular, gruplar arasında non-parametrik Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi yöntemi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandığından ( $p<0.001$ ) gruplar içerisindeki çoklu karşılaştırmalar non-parametrik çoklu karşılaştırma testi olan Mann-Whitney Testi ile çalışıldı (Şekil 37).



**Şekil 37:** Perinöral fibrozis kalınlıklarının gruplara göre karşılaştırılması ( $p<0.001$ ).

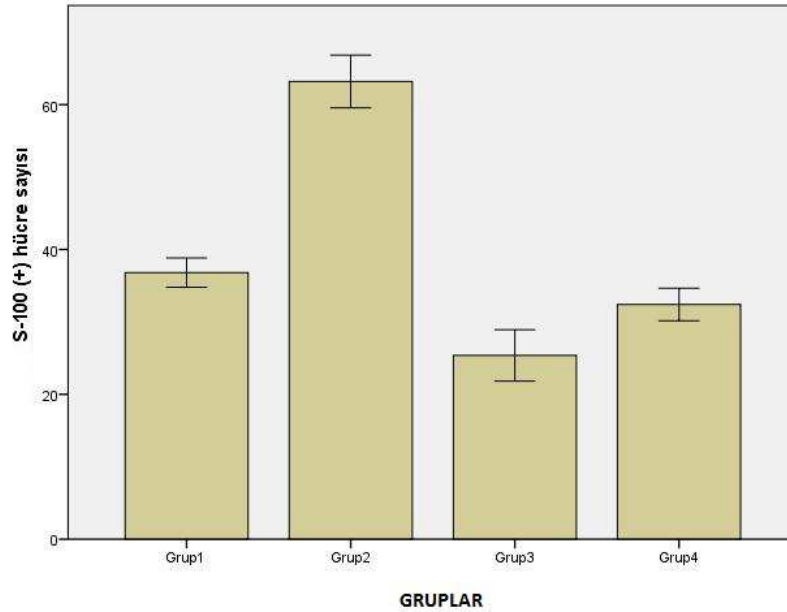
- Grup 1 ile Grup 2 arasında istatistiksel olarak fark saptandı ( $p<0,05$ )
- Grup 1 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak fark saptandı ( $p<0,05$ )
- Grup 2 ile Grup 4 arasında istatistiksel olarak fark saptandı ( $p<0,05$ )
- Grup 3 ile Grup 4 arasında istatistiksel olarak fark saptandı ( $p<0,05$ )



Bu bulgulara dayanarak PRP uygulanan her iki grupta (Grup 3 ve 4), uygulanmayanlara kıyasla daha az fibrozis olduğu gözlemlendi. Epinöral soyma işlemi uygulanan gruplarda ise (Grup 2 ve 4) standart greft gruplarına göre anlamlı derecede fibroziste artış olduğu gözlemlendi. Özellikle PRP uygulanmayan ve bir kısım epinöral soyma işlemi uygulanan Grup 2’de diğer tüm gruplara kıyasla daha fazla perinöral fibrozis geliştiği izlendi.

### S-100 (+) Schwann Hücre Sayısı

Her gruptaki sayımlar; greft orta kısmından alınan kesitlerde, miyelin halka üzerine yerleşmiş Schwann hücrelerinden immünreaksiyon verenler sayılarak yapıldı. Yine elde edilen bulgular gruplar arasında non-parametrik Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi yöntemi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandığından ( $p<0.001$ ), gruplar içerisindeki çoklu karşılaştırmalar non-parametrik çoklu karşılaştırma testi olan Mann-Whitney Testi ile çalışıldı (Şekil 38).



**Şekil 38:** S-100 (+) Schwann hücre sayılarının gruplar arasında karşılaştırılması ( $p<0.001$ ).

- Grup 1 ile Grup 2 arasında istatistiksel olarak fark saptandı ( $p<0.001$ )
- Grup 1 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak fark saptandı ( $p<0.001$ )
- Grup 2 ile Grup 4 arasında istatistiksel olarak fark saptandı ( $p<0,05$ )
- Grup 3 ile Grup 4 arasında istatistiksel olarak fark saptandı ( $p<0.001$ )

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Periferik sinir yaralanmaları ve rejenerasyonu konusundaki ilerlemeler, mikrocerrahi tekniklerindeki gelişmelere rağmen periferik sinir yaralanmaları rekonstrüktif cerrahlar için halen yeterli başarılı sonuçların alınmadığı bir konu olarak önemini korumaktadır. Periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde amaç sinir hücresinin fonksiyonunu gerçekleştireceği son organ (kas, duyu cisimcikleri vb.) ile bağlantısını tekrar oluşturarak kaybedilen yetilerin mümkün olduğunca yerine konulmasıdır. Bu nedenle periferik sinir bütünlüğünün tekrardan oluşturulması ve iletimin geri döndürülmesi gerekmektedir.

Uygun bir periferik sinir rekonstrüksiyonu yapmak için anatomi, patofizyoloji bilgisi ve cerrahi deneyim gerekmektedir. Ancak sinir onarımında gerekli tüm şartlar yerine getirilse dahi öngörülen iyileşme tam olarak gerçekleşemeyebilir. Yaralanmaya bağlı olarak gelişebilecek sinir hücresinin kaybı, reinervasyon sürecinin gecikmesine bağlı olarak gerçekleşen son organ atrofisi ya da aksonların iyileşme sırasındaki yanlış yönelimlerine bağlı olarak başarısızlıklar görülebilir. Ayrıca yaralanma bölgesinde gelişen fibrozis ve nöromalar sinir iyileşmesini kötü yönde etkiler.

Periferik sinir yaralanmalarında sağlam iki sinir uç arasında gerginlikten dolayı primer onarımın mümkün olmadığı durumlarda greft ile sinir rekonstrüksiyonu önerilir. İyileşme alanındaki gerginliğin elde edilebilecek fonksiyonel iyileşme derecesini azalttığı bilinmektedir (38). Sinir defekti rekonstrüksiyonunda biyolojik yapay maddeler, çeşitli sinir dokusu içermeyen dokular (95) ve sinir allogreftleri literatürdeki birçok deneysel çalışmada yaygın olarak kullanılsa da klinik kullanımları sınırlıdır ve sinir defekti onarımında sinir otogrefti halen altın standart yöntemdir (38,96,97).

Sinir rejenerasyonu ve iyileşme hızının daha iyi bir hale getirilmesi için yapılan çalışmalar sadece cerrahi teknik ve kullanılan ek maddelerle sınırlı kalmamıştır. Cerrahiye ek olarak çok sayıda ilaç, hormon ve büyüme faktörleri lokal ve sistemik olarak deneylerde kullanılmıştır. Bunların sonucunda elde edilen verilerden bir kısmı olumlu olsa da büyük bir çoğunluğu rutin klinik kullanıma girmemiştir. Teknik imkanlardaki gelişmelerle sinir rejenerasyonundaki moleküler temellerin giderek daha iyi anlaşılması nedeniyle halen birçok çalışma bu alanda devam etmektedir. Bu çalışmalardaki ortak hedef; akson ve periferik sinir içerisindeki diğer sinir sistemi ve bağ dokusu elamanlarının bulunduğu mikroçevrenin

dışarıdan müdahalelerle daha iyi hale getirilerek sinir rejenerasyonunda gelişmeler sağlanmıştır.

Periferik sinir hasarı oluşturmak ve çalışma yapmak için tarif edilen hayvan modelleri arasında köpekler, kurbağalar, domuzlar, maymunlar, fareler ve sıçanlar sayılabilir. Rejenerasyonun oldukça etkin, hızlı, kolay elde edilebilmesi, maliyetinin az olması ve insan periferik sinirine benzerliği nedeniyle sıçan siyatik siniri deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır. Ayrıca hem motor hem de sensoriyal sinir fonksiyonları değerlendirebildiği için özellikle tercih edilir (98).

Sinir defekti oluşturulması gereken birçok çalışma modelinde kullanılan rat siyatik sinirinde 1 cm uzunluğunda defekt oluşturulmuştur (99,100,101). Bu çalışmalarda sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için 8 veya 12 haftalık süreler beklenmiştir. Bu nedenle bu çalışmada 10 haftalık süre iyileşmenin değerlendirilmesi için yeterli bulunmuştur.

Cerrahi teknik olarak alınan sinir segmenti aynı alanda greft olarak kullanılmıştır. Greft uçlarında onarım epinöral sütür tekniğiyle yapılmıştır ve gruplar arasında fark yoktur. Cerrahi sinir greftleme klinikte daha sıklıkla fasiküler veya grup fasiküler onarımla yapılabilir. Fasiküler veya grup fasiküler onarım yapıldığı durumlarda aksonların yanlış yöneliminin engellenebileceği öngörülür. Sıçan deneylerinde yapılan otogreft yöntemlerinde ise genellikle epinöral sütür tekniği kullanılmaktadır.

Kullandığımız yöntemde sinir greftinin her iki ucu orijinal yerlerine adapte edilmiştir. Bu şekilde yapılan onarımda fasiküller uygun şekilde karşı karşıya gelmektedir. Sinir greftinin ters çevrilerek kullanıldığı bazı yayınlarda sonuçların daha iyi olduğu iddia edilmiştir. Bu özellikle motor sinir iyileşmesinde greftteki dallanmalardan dolayı gerçekleşmesi olası akson yanlış yöneliminin engellenmesine bağlanmıştır (102,103). Bazı yayınlar ise greftin ters çevrilmesi ya da rotasyonunu bir fark yaratmadığı görüşündedir (104,105).

Yapılan bu çalışmada amaç cerrahi yöntemi karşılaştırmak olmadığından ve ters çevirme sonucunda topografinin değişmesi nedeniyle fasiküllerin birbirlerini karşılama oranları öngörülemeyeceğinden bu tip bir uygulamadan uzak durulmuştur.

Greft içerisindeki iyileşmenin sağlanması kanlanmanın yeniden oluşmasını gerektirir. Greftin yeniden vaskülarize olması gerekmektedir. Yapılan bir çalışmada greftin revaskülarizasyonu için primer baskın mekanizmanın içinde bulunduğu yumuşak doku yatağından gelişen revaskülarizasyon olduğu iddia edilmiştir (106,107).

Bu görüşten farklı olarak Sprague-Dawley sıçanları üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise 28. günde greft santralinde hipoperfüzyon devam etse de ağırlıklı olarak proksimalden olmakla birlikte her iki uçtan sinir içerisine vaskülarizasyonun ilerlediği gösterilmiştir (108).

Yine Mackinnon ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada periferik kanlanmanın bir öneminin olmadığı bildirilmiştir (109).

PRP ile yapılan bir tendon grefti çalışmasında greft içine revaskülarizasyonun PRP ile daha iyi olduğu vurgulanmıştır (110).

Greft revaskülarizasyonu üzerindeki bu tartışmalar nedeniyle bu çalışmada PRP kullanılmasının grefte bu açıdan olumlu bir etkisi olup olmadığı da merak konusu olmuştur. Greftler ilk başta difüzyon ile sağkalımlarını devam ettirdiklerinden daha ince greftlerin kullanılması difüzyonun daha kolay gerçekleşmesini sağlar. Nitekim kalın sinir greftlerinde görülebilen santral nekroz da buna bağlanabilir (44).

Difüzyonu engelleyen bariyerlerin ortadan kaldırılmasının veya azaltılmasının da bu nedenle fayda gösterebileceği öngörülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada iki grupta (Grup 2 ve 4) bir kısım epinöriyum soyarak fasiküllerin çevre ile olan etkileşme yüzeyini artırmak ve de PRP ile bunun nasıl etkileneceğini gözlemlemek amaçlanmıştır. Sinir fasikülleri etrafında kan beyin bariyeri görevi gören perinöriyum sağlam bırakıldığından ve yeterli bir destek bağ doku teşkil ettiğinden, greft için yeterli koruma sağlayacağı öngörülmüştür.

Sinir yaralanmalarında iyileşmeyi daha iyi bir hale getirmek için cerrahi tekniklere ek olarak birçok farklı hormon, ilaç veya biyolojik ürünler kullanılmıştır. Tiroid hormonu (111), topikal steroidler (112), fibrin yapıştırıcıları (113,114,115,116), bir immünsüpresif ajan olan FK506 (117) ve insan amnion sıvısı (118,119) bunlardan sadece bazılarıdır.

Bu çalışmalarda amaç yaralanma bölgesindeki aksonun hücresel düzeyde iyileşmesinin mikroçevreye müdahale ile daha iyi bir hale getirilip getirilemeyeceğinin araştırılmasıdır. Bu kullanılan ajanlar rutin kullanıma girmese de bir kısmında olumlu etkiler gözlenmiş ve sinir iyileşmesinin daha iyi anlaşılması için değerli veriler elde edilmiştir. Bu elde edilen verilerin bir kısmı da sinir rejenerasyonu sırasında ortamda arttığı gösterilen ve nörotrofik faktörler olarak isimlendirilen çok sayıdaki peptid yapıdaki moleküllerin varlığıdır (120). Bu artan peptidlerin rekombinant yolla elde edilerek eksojen olarak kullanıldığı bazı çalışmalarda, sinir yaşayabilirliğini ve rejenerasyonunda olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (12,13,74,121). Rekombinant yolla elde edilen büyüme faktörlerinin kullanımının pahalı olması nedeniyle daha kolay ve ucuz formlarının elde edilebileceği biyolojik ürünler de denenmiştir. Bu nörotrofik faktörleri doğal olarak içeren insan amnion sıvısı bunlardan biridir. Amniyotik sıvı veya membran kullanılarak yapılmış bazı çalışmalarda bunun sinir iyileşme hattında skar gelişimini azalttığı ve rejenerasyona olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (15,118,122). Bu etkinin olasılıkla bu hücrelerden salgılanan nörotrofik faktörlere bağlı olduğu düşünülmüştür.

Rekombinant yolla elde edilmiş bu nörotrofik faktörlerin sinir iyileşme alanına lokal olarak tek sefer uygulanması yeterli etki süresi sağlamaz. Uzun süreli etki için bu faktörlerin tekrarlayan uygulamalarına veya uzun süre salınım yapabilecek ek yöntemlere gereksinim duyulur. Fibrin yapıştırıcılar, bazı köpükler, organik/sentetik tüpler ve ozmotik pompa gibi uygulamalar bu nedenle literatürde denenmiştir (123). Ancak tüm bu ek uygulamaların kendilerine ait ek riskleri mevcuttur. Kullanılan bu sentetik pompa ve tüpler enfeksiyon ve yabancı cisim reaksiyonu gibi riskleri de beraberinde getirir. Bunun sonucunda skarlaşma ve vaskülarizasyonun olumsuz etkilenmesine bağlı olarak sinir iyileşmesi de olumsuz şekilde etkilenebilir (124). Bununla birlikte tek doz uygulamalarda dahi bu faktörlerin olumlu etkilerinin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (13,125). Bu kullanılan maddelerin sinir onarımı yapılan bölgede mikroçevrenin değişmesini sağlayarak aksonal rejenerasyonu artırdığı belirtilmiştir.

Yaptığımız çalışmada sinir iyileşmesine olumlu etkileri birçok çalışma ile gösterilmiş PRP kullanılmıştır. PRP daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi aktive olan trombositlerden salınan ve sinir iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinen bazı büyüme faktörlerini içerir. (**Tablo 5**). Aktive olan fibrin pıhtı sayesinde bu büyüme faktörleri ortamda uzun süre etki gösterebilmektedir. Tendon iyileşmesi için yapılan bir çalışmada

PRP'nin 4 hafta süre ile etki gösterebildiği gösterilmiştir (126). Bu nörotrofik faktörler ve etkileri **Tablo 5**'de gösterilmiştir.

Nörotrofik faktörler	Periferik sinir üzerindeki etkileri
<b>PDGF</b>	Schwann hücrelerinde mitojenik etki Aksonal rejenerasyonun hızında artış Miyelinizasyonun artışı
<b>IGF</b>	Aksonal büyüme indüksiyonu, Miyelinizasyonun artması
<b>FGF</b>	Schwann hücre mitoz, diferansiyasyon ve proliferasyonuna destek Aksonal büyüme indüksiyonu
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Schwann hücrelerinde mitojenik etki Aksonal büyüme indüksiyonu
<b>VEGF</b>	Schwann hücre mitoz, diferansiyasyon ve proliferasyonuna destek Aksonal büyüme indüksiyonu
<b>EGF</b>	Tartışmalı
<b>Fibronektin</b>	Schwann hücre adezyonu ve migrasyonuna yardımcı (bazal lamina elemanı) Aksonal büyümenin desteklenmesi

**Tablo 5:** TZP içerisinde bulunan bazı büyüme faktörleri ve sinir rejenerasyonu üzerine etkileri

Sinir iyileşmesi üzerinde rejenerasyona etkili maddelerin kullanımı primer onarım yapılan modellerde ve sinir defekti olan modellerde farklı sonuçlar verebilir. Buna örnek olarak Welch ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada primer onarım yapılan durumlarda bu trofik faktörlerin kullanılmasının defekt olan modellere kıyasla beklenen etkiyi göstermediğini belirtilmiştir (127). Yazarlar bu etkinin sinir uçlarında defekt olmadan sıkı bir şekilde bir araya getirildikleri durumlarda mekanik faktörlerin daha önemli bir hale geldiğini ve bu faktörlere bağlı olan trofik etkiye nazaran daha baskın olduğunu belirtmişlerdir. Buna rağmen hem primer onarım yapılan hem de ezilme tipinde yaralanma modeli oluşturulan birçok sinir iyileşmesi çalışmasında PRP'nin olumlu etkilerinin olduğu literatürde belirtilmiştir (9,10,47). Yine WenJun Yu ve arkadaşlarının yayınladığı bir makalede PRP'nin sinir iyileşmesinde kullanımının olumlu etkilerinden dolayı ileride klinik kullanıma girmesinin beklendiği belirtilmiştir (63). Bu literatür bilgileri ışığında PRP'nin etkisini değerlendirmek için yapılan bu çalışmada sinir grefti ile yapılan sinir onarımı modeli kullanılmıştır. Bu açıdan PRP'nin kullanıldığı çalışmalar arasında bir ilktir. Sinir grefti ile onarım sinir defektlerinde halen klinik uygulamada altın standart olarak kullanılan yöntemdir. Bu açıdan çalışmada elde edilen sonuçlar eşliğinde bunun klinik çalışmalarda da ileride

uygulanması olasıdır. Sinir grefti sinir uçları arasında oluşturulan defekti ortadan kaldırırsa da, PRP'nin etkisini gösterebileceği daha geniş bir sinir segmenti oluşturmaktadır. Bu segmentin dolaşımı ve hücrelerin rejenerasyonu belli bir zaman içerisinde gerçekleşeceği ve bu sürede PRP'nin de etkisinin iyileşme süresinin tamamında olmasa da uzun bir süre devam edeceği öngörülmüştür.

Bu çalışmada siyatik fonksiyonel indeks (SFI) testi kullanılmamıştır. SFI ölçümlerinin en büyük dezavantajı; ölçüm tekniği ve araştırmacının hassasiyetine göre değişkenlik gösterip yanılma ya da yanlış ölçüm yapılma ihtimalinin yüksek olmasıdır. Hayvanların yürüyüş yolunda ayak izleri alınmadan önce belli bir süre eğitimden geçmeleri gerekir. Yine yanlış verilere neden olabilecek bir diğer sorun da etkilenen ekstremitede gelişen istenmeyen kontraktürlerdir. Bu durumda kaslarda reinnervasyon gerçekleşse bile, eklemlerdeki hareket kaybı ve kontraktürler nedeniyle düzgün bir adımlama görülemeyebilir. Ayrıca eklem kontraktürlerinin yanı sıra otokanibalizasyon, sürtünme artefaktları, kuyruk ile izin kontaminasyonu da sağlıklı ayak izlerinin elde edilmesini güçleştirebilmektedir (47).

Histolojik olarak değerlendirilen preparatlar göz önüne alındığında normal periferik sinir morfolojisine en fazla benzeyen grubun Grup 3 olduğu düşünülmektedir. Grup 1'de izlenen aksonal dejenerasyonun bu grupta daha iyi durumda olması PRP'nin etkisine bağlanmıştır. Ayrıca Grup 2'deki görülen en şiddetli dejenerasyon bulguları Grup 4'te bir miktar PRP ile düzelse de yine de epinöriyumun soyulması bu açıdan olumsuz bir etki göstermiştir.

Operasyon alanı distali incelendiğinde yine en şiddetli dejenerasyon bulguları ve büyük çaplı miyelinli aksonlardaki kayıpların izlendiği Grup 2'deki bulguların PRP eklenmiş Grup 4'te daha az olması PRP'nin bu açıdan iyileşmeye olumlu etkisini yansıtmaktadır. Yine Grup 1 ve Grup 3 incelendiğinde her iki grupta da minimal aksonal konformasyon bozuklukları ve silinme görülse de aksonların yapısal olarak Grup 3'te daha fazla korunmuş olması PRP'nin etkisine bağlanmıştır. Bu açıdan nörotrofik faktörlerin koruyucu etkisinin PRP ile sağlanabileceği gösterilmiştir.

Schwann hücre sayısı Grup 3'te en az olsa da normale en yakın değerdedir. En fazla hücreye sahip Grup 2'de özellikle küçük ve orta miyelinli lifler etrafında yoğun olarak gözlenen ve sayılan Schwann hücrelerinde nöroma gelişimi yönünde bir görünüm olduğu düşünülmüştür.

Grup 3 ile Grup 1 karşılaştırıldığında yine anlamlı bir fark gözlenmektedir. Mikroskopik değerlendirme sonucunda da greftin santral kısımdaki miyelin halkalardaki silinmenin daha az olmasıyla birlikte Schwann hücrelerinin daha fazla boyandığı ve bunun anlamlı olduğu düşünülmüştür. Bu bulgular neticesinde sinir grefti çevresine PRP uygulanmasının santral kanlanmayı artırarak Schwann hücrelerinin, santral bölgelerde daha fazla varlıklarını sürdürebilmelerini sağlamıştır. Ancak greftin epinöral tabakasının bir miktar soyulması ile bu etkide bir artış görülmemiş ve PRP ile bu engellenememiştir.

Sinir onarımında epinöral skar dokusu gelişmesinin, aksonal büyümeye engel olması yanında sinirin çevre dokulara yapışmasına ve hareketliliğini kaybetmesine neden olduğu ve bunun da traksiyon yaralanması ve iskemiye zemin hazırladığı düşünülmektedir (128). Bu nedenle oluşacak skar dokusunu azaltmaya yönelik girişimlerin sinir rejenerasyonunu da geliştireceğine inanılmaktadır. Buna karşın, yapılan bir çalışmada kollajenaz enzimi kullanarak epinöral skar oluşumunun azaldığı, skar dokusunun azalmasının uzun vadede sinir rejenerasyonu üzerine bir etkisi olmadığı belirtilmiştir (129). Bu çalışmada skar gelişiminin genellikle sinir rejenerasyonu tamamlandıktan sonra geliştiği bu nedenle rejenerasyonun erken döneminde skar gelişiminin bir problem yaratmaması durumunda sinir rejenerasyonu açısından bir problem olmayacağı belirtilmiştir. Sinir iyileşmesinde PRP'nin kullanıldığı Sarıgüney'in tez çalışmasında ise skar gelişimi için 6 haftalık bir sürenin geçmesi gerektiği ve çalışmalarındaki 12 haftalık süre sonrasındaki incelemelerinde PRP'nin epinöral skar gelişimine bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (10).

Yapılan bu çalışmada ise greft alanındaki perinöral fibrozis açısından gruplar karşılaştırıldıklarında PRP yine olumlu etki göstermiştir. Ancak epinöriyumun soyulmasına bağlı olduğu düşünülen olumsuz gelişme PRP ile tam olarak düzeltilememiştir.

Mast hücreleri ilk olarak 1863 yılında Friedrich Von Recklinghausen tarafından kurbağa mezenterinde saptanmıştır. Mast hücreleri seröz ve mukozal yüzeylerde sıklıkla görülse de evrimsel olarak geri olan birçok omurgalı türünde santral ve periferik sinir sisteminde de rastlanır. Mast hücrelerinin periferik sinir iyileşmesinde, Schwann hücreleri ve makrofajlar gibi önemli bir rolü olabileceği uzun yıllardır tartışılmaktadır ancak bu hücrelerin görevi tam olarak aydınlatılamamıştır. (130,131).



Mast hücrelerinin periferik dolaşımıyla mı buraya geldiği, yoksa sinir içerisinde bulunan mast hücrelerinin proliferasyonuna mı oldukları tartışma konusudur (132). Yine literatürde yapılan bazı çalışmalarda mast hücrelerinin nöroma gelişimi ile ilgili olabileceği rapor edilmiş olsa da bu kesin olarak gösterilememiştir (133). Kotulska ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada önemli olduğu bilinen bir nörotrofik faktör olan NGF'nin trkB reseptörlerinden yoksun sıçanlarda mast hücrelerinin ortamda daha fazla bulunduğu dikkat çekilmiştir. trkB reseptöründen yoksun olan sıçanlarda nöroma gelişiminin daha fazla olduğunun önceki yapılan başka çalışmalarla gösterildiği, bu nedenle de nöroma gelişimi ile mast hücreleri arasında bir ilişki olabileceği tartışılmıştır (134).

Esposito ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise mast hücrelerinin Wallerian dejenerasyonun hem erken dönemde revaskülarizasyon ile ilgili aşamalarda hem de geç dönemde miyelin yıkımı aşamasında görevi olduğundan bahsedilmiştir. Mast hücrelerinin artışının, sinir rejenerasyonu için ortama salınan NGF nedeniyle, sinirin kendisi tarafından ortama çağırılması nedeniyle olabileceğinden bahsedilmiştir. Ayrıca mast hücrelerinin de bazı nörotrofik faktör ve sitokin salgılayıcı kapasiteleri nedeniyle sinir rejenerasyonunda önemli rolleri olabileceği belirtilmiştir.

Yapılan bu çalışmada histomorfolojik değerlendirme sonucunda ilginç bir bulgu olarak PRP kullanılan Grup 3 ve Grup 4'te mast hücrelerine rastlanmıştır. PRP uygulaması mast hücrelerinde artışa neden olmaktadır. Epinöral hasarlanma yapılmayan Grup 3'de bu daha belirgin olarak gözlenmiştir. Yapılan diğer çalışmaların aksine bu bulguların; nöroma gelişiminden çok vaskülarizasyon ve sinir rejenerasyonu ile daha fazla ilişkili olduğu, bunun mikroçevrede daha yoğun olarak bulunan nörotrofik faktörlerle sitokinlere bağlı olduğu görüşündeyiz.

Elektrofizyolojik testler periferik sinir rejenerasyonunu değerlendirmede sıkça kullanılan ve oldukça önemli testlerdir. Sinir liflerinin uyarmaları ile kas liflerinden geçen aksiyon potansiyellerinin bir amplifikatör aracılığı ile büyütülerek incelenmesi esasına dayanır. Elde edilen aksiyon potansiyelleri bileşik kas aksiyon potansiyelleri olup bunların üzerinden çeşitli parametreler ölçülerek değerlendirilir. Ancak elektrofizyolojik ölçümlerin total sinir fonksiyonunu ölçmekten ziyade, lif çapı ve miyelinizasyon derecesi ile ilişkili olarak, en hızlı sinir liflerinin fonksiyonları hakkında bilgi verebilir. Bu açıdan sonuçlar yorumlanırken bu bilgi akılda tutulmalıdır. İnceleme sonucunda elde edilen temel değerler oluşturulan bileşik kas aksiyon potansiyelinin latans, amplitüd ve alan değerleridir.

Supramaksimal uyarım ile elde edilen bileşik kas aksiyon potansiyel eğrilerinde pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) amplitüd olarak adlandırılır (135). Amplitüd ile; uyarıya yanıt veren motor lifler, bunların cevaplarının senkronizasyonu ve inerve olan motor ünitenin boyutu hakkında bilgi sahibi olunabilir. Aksonal rejenerasyon arttıkça ve remiyelinizasyon ilerledikçe, daha fazla lifte oluşan değişim ile cevap daha senkron olur ve daha yüksek amplitüd kazanır. Rejenerasyon gösteren aksonlar ile reinnerve olan motor ünite sayısı arttıkça bileşik kas aksiyon potansiyeli amplitüdü de artar (136). Latans değeri ise uyarım ile kasılma potansiyelinin başlaması arasında geçen zamandır ve miyelinizasyon için önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir (10). Sıçanlardaki siyatik sinir çalışmalarında elektrofizyolojik kayıtların ideal olarak interosseöz kaslardan alınması gerektiği belirtilmektedir. Bunun nedeni; büyük kaslar ile olan komşuluğu nedeniyle gastroknemius kasından alınan kayıtlarda yanılmalar görülebilmektedir (137).

Bu çalışmada birleşik kas aksiyon potansiyel eğrilerinden pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) gruplar arasında ve her grupta, sağlam taraflar ve deney tarafı arasında karşılaştırıldı. Tüm deneklerde bakılan bu parametrelerde sağlam taraf ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). Yine histolojik verilerle korele olacak şekilde Grup 3'te kontrol grubu olan Grup 1'e kıyasla anlamlı derecede fark mevcuttu ( $p<0.001$ ). Bu açıdan PRP olumlu etki göstermiştir. Epinöral soyma işlemi uygulanan Grup 2'de ise Grup 1'e kıyasla amplitüd anlamlı derecede olumsuz etkilenmiştir ( $p<0.05$ ).

Sonuç olarak, sinir rejenerasyonunu etkileyen birçok faktör günümüzde biliniyor olsa da bunların tam olarak nasıl etki ettikleri halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Nörotrofik faktörler bu konulardan biridir. Rekombinant büyüme faktörlerine kıyasla PRP pratik ve hızlı elde edilebilmesi ayrıca maliyet açısından da daha uygun olması nedeniyle avantajlıdır. Yaptığımız çalışmada sinir iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri görülmüş olsa da literatürde bu konu üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Uzun bir sinir segmenti boyunca PRP'nin iyileşmeye etkisi ilk kez çalışılmıştır. Elde edilen olumlu sonuçlar olasılıkla içerisindeki büyüme faktörlerine bağlıdır. Sinir iyileşmesine etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için PRP'nin farklı hayvan ve modellerde de yapılacak çalışmalara gereksinim vardır.

## ÖZET

Periferik sinir yaralanmaları ve rejenerasyonu konusundaki ilerlemeler ayrıca mikrocerrahi tekniklerindeki gelişmelere rağmen periferik sinir yaralanmaları rekonstrüktif cerrahlar için halen yeterli başarılı sonuçların alınmadığı bir konu olarak önemini korumaktadır. Özellikle sinir defekti olan durumlarda birçok alternatif yöntem denense de sinir grefti ile onarım halen altın standarttır ve en başarılı sonuçlar bu şekilde alınır. Ancak sinir grefti ile onarımlarında dahi iyileşme oranları yüz güldürücü olmayabilmektedir. Bu nedenle mevcut altın standart yöntemi güçlendirecek sinir rejenerasyonunu hızlandırma potansiyeli olan büyüme faktörleri, hormon ve mediyatörler gibi ek yardımcı uygulamalar uzun zamandır denenmektedir. Birçok dokunun iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olan trombosit zengin plazmanın (PRP) son yıllarda sinir iyileşmesi üzerinde de olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışma, PRP'nin sinir grefti ile yapılan onarıma etkisi değerlendirilmiştir. Primer onarım yapılan durumların aksine uzun bir sinir segmentinin değerlendirilebilmesi açısından PRP ile yapılan ilk çalışmadır.

PRP 10 adet sıçanın tüm vücut kanları intrakardiyak kanülasyon yoluyla alınarak seri santrifüj işlemlerinden geçirilerek hazırlandı. Operasyon sahasına yine sıçan kanlarından elde edilen ototrombin ile aktive edilerek uygulandı.

Cerrahi uygulama için her grupta 7 adet sıçan bulunan 4 grup Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Tüm sıçanların sadece sol arka siyatik siniri operasyonda kullanıldı. Üst uyuk seviyesinde 1 cm uzunluğunda oluşturulan sinir defekti yine sinirin kendisinden elde edilen otogreft ile rekonstrükte edildi. Grup 1: Standart sinir grefti ile rekonstrüksiyon uygulandı. Grup 2: Standart sinir greftinin bir miktar epinöriyumu soyuldu. Grup 3: Grup 1'deki ile aynı şekilde rekonstrüksiyona ek olarak greft çevresine PRP uygulandı. Grup 4: Grup 2'deki uygulamaya ek olarak sinir grefti çevresine PRP uygulandı.

Denekler 10 hafta sonra elektromiyografik, ıslak kas ağırlıkları ve histomorfolojik sinir değişiklikleri açısından değerlendirildi. İstatistiksel sonuçlar Mann Whitney-U yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Kas ağırlıkları açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Hem elektromiyografik ( $p < 0.001$ ), hem de histomorfolojik değerlendirme sonrasında ( $p < 0.001$ ), PRP uygulanan Grup 3'te kontrol grubuna kıyasla olumlu etkilerin olduğu saptandı. Epinöriyumun soyulmasının ise PRP'nin etkisini arttırmadığı, aksine sinir iyileşmesini olumsuz olarak etkilediği bulundu.

Sonuç olarak, Sinir grefti ile yapılan sinir rekonstrüksiyonunda, PRP'nin nörotrofik faktörlerin bir kısmını içerdiğinden bu olumlu etkiyi sağladığı ve klinikte de uygulanabilir bir yöntem olduğu düşünüldü.

## ABSTRACT

Despite the advances on understanding peripheral nerve injuries and regeneration, also in surgical techniques, peripheral nerve injuries still maintaining its importance for reconstructive surgeons as a matter that the successful results still cannot be sufficient.

Especially in cases where the nerve defects repaired with several alternative methods, repairment with nerve grafts are still gold standard and the most successful results can be obtained by this way. However the recovery rates may not be satisfactory, even if nerve grafts used for reconstruction. Thus; growth factors, hormones and mediators as well as additional utilities that has the potential to nerve regeneration, have been tested for a long time in order to speed up and to strengthen the current gold standard method. With positive effects that have been reported on many tissues healing, in recent years it also had been reported that platelet-rich plasma (PRP) have positive effects on nerve regeneration. Our study is designed to evaluate the effect of PRP for reconstruction with a nerve graft. This is a novel study in terms of evaluating the regeneration with PRP of a long nerve segment unlike primary repair.

PRP is produced from the entire body blood of 10 rats which had been obtained by intracardiac cannulation by a series of centrifugations. Autologous thrombin, which is also obtained from the blood of rats, is used for activation of PRP that had been applied to operation area.

At surgery procedures 4 group of Sprague-Dawley rats, which had 7 rats in each group, had been used. In all of surgery group rats, only the left rear limb sciatic nerves had been used. A 1 cm long nerve defect was created at the level of the upper thigh again reconstructed with nerve autograft obtained from nerve itself. Group 1: Standard nerve graft reconstruction was performed. Group 2: Standard nerve graft with a central part of epineurium resected used for reconstruction. Group 3: PRP is applied in addition around the graft reconstruction area which was performed as Group 1. Group 4: PRP is applied in addition around the graft reconstruction area which was performed as Group 2.

After 10 weeks wet muscle weights, electromyographic findings and histomorphological changes in the nerve had been evaluated. Results were statistically analyzed using the Mann-Whitney-U statistical method.

There was no significant difference in weight of muscles. Both electromyographic ( $p < 0.001$ ), as well as histomorphological findings ( $p < 0.001$ ) of the Group 3, which PRP applied, was significant compared to the control group. Partially resection of epineurium does not increase the effect of the PRP, also has a negative effect on the healing of the nerve.

As a result, PRP which contains a portion of neurotrophic factors provided positive effects on nerve reconstruction with nerve graft and suggested that it is a method which can also be applied in the clinical cases.

## KAYNAKLAR

- 1) L. Dvali, S. Mackinnon., Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clin Plastic Surg.* 2003 Apr;30(2):203-21.
- 2) Siemionow M., Demir Y., Mukherjee AL., Repair of peripheral nerve defects with epineural sheath grafts. *Ann Plast Surg.*, 2010 Dec;65(6):546-54.
- 3) Pabari A, Yang SY, Seifalian AM, Mosahebi A., Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.*, 2010 Dec;63(12):1941-8.
- 4) Ducic I, Fu R., Iorio ML., Innovative treatment of peripheral nerve injuries: combined reconstructive concepts. *Ann Plast Surg.*, 2012 Feb;68(2):180.
- 5) Millesi H., Bridging defects: autologous nerve grafts. *Acta Neurochir Suppl.*, 2007;100:37-8.
- 6) Evans GR., Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol.*, 2000 Oct-Nov;19(3):312-8.
- 7) Sondell M., Lundborg G., Kanje M., Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci.* 1999;19(14), 5731-40.
- 8) Yu W., Wang J., Yin J., Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. *Int J Neuroscience.*, 2011 Apr;121(4):176-80.
- 9) Ding XG., Li SW., Zheng XM., Hu LQ., Hu WL., Luo Y., The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model. *Asian J Androl.*, 2009 Mar;11(2):215-21.
- 10) Yakup S., Trombositten Zengin Plazmanın Sinir Rejenerasyonuna Etkisi. (Uzmanlık Tezi), Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, (2006).
- 11) Sommeling CE., Heyneman A., Hoeksema H., Verbelen J., Stillaert FB., Monstrey S., The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.*, 2013 Mar;66(3):301-11.
- 12) Kanje M., Skottner A., Sjöberg J., Lundborg G., Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1989;486(2), 396-8.
- 13) Laird JM., Mason GS., Thomas KA., Hargreaves RJ., Hill RG., Acidic fibroblast growth factor stimulates motor and sensory axon regeneration after sciatic nerve crush in the rat. *Neuroscience.* 1995;65(1), 209-16.

- 14) Frostick SP., Yin Q., Kemp GJ., Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998;18(7):397–405.
- 15) Ozgenel GY., Filiz G., Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *J Neurosurg*. 2003;98(2), 371-7.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Lundborg G., Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand*. 1987;58(2):145–69.
- 20) Maggi SP., Lowe JB 3rd., Mackinnon SE., Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg*. 2003;30(2):109–26.
- 21) Garbay B., Heape AM., Sargueil F., Cassagne C., Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*. 2000;61(3):267–304.
- 22) Lundborg G., The nerve trunk, *Nerve injury and repair*. Churchill Livingstone, New York, (1988). Pp: 32-63.
- 23) 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.
- 24) Thomas PK., Berthold CH., Ochoa J., Microscopic anatomy of the peripheral nervous system, *Peripheral Neuropathy*., 3rd edition. ed: Dyck P., WB Saunders, Philadelphia (1993). Pp: 28-80.
- 25) 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.
- 26) 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.

- 27) Brandt KE., Mackinnon SE., Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 5th edition, eds: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM., Lippincott-Raven, Philadelphia (1997). P: 79-90.
- 28) Myers RR., Morphology of the peripheral nervous system and its relationship to neuropathic pain. *Anesthesia, Biologic Foundations*, eds: Yaksh TL., Lynch III C., Zapol WM., Maze M., Biebuyck JF., Saidman LJ., Lippincott Raven, Philadelphia, (1998). Pp: 483- 514.
- 29) Rempel D., Dahlin L., Lundborg G., Pathophysiology of nerve compression syndromes: Response of peripheral nerves to loading. *J Bone Joint Surg Am.* 1999 Nov;81(11):1600-10.
- 30) Dvali L., Mackinnon S., Peripheral nerve repair and transfers. In McCarthy JG, Galiano RD, Boutros SG, editors. *Current therapy in plastic surgery*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p: 568-73.
- 31) Brushart TM., Nerve repair and grafting. In. Green DP, Hotchkiss RN, Pederson WC, editors. *Green's operative hand surgery*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1999. Volume 2; p: 1381- 403.
- 32) Seckel BR., Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1990;13(9):785–800.
- 33) Danielsen N., Pettmann B., Vahlsing HL., Manthorpe M., Varon S., Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J Neurosci Res.* 1988;20(3), 320-30.
- 34) Sunderland S., The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve.* 1990;13(9):771–84.
- 35) Mackinnon SE., Surgical management of the peripheral nerve gap. *Clin Plast Surg.* 1989;16, 587-603.
- 36) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1944". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2013. Web. 13 Jul 2013.  
<[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1944/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1944/)
- 37) Colen KL., Choi M., Chiu DT., Nerve grafts and conduits. *Plast Reconstr Surg.*, 2009 Dec;124(6 Suppl):e386-94.
- 38) Matsuyama T., Mackay M., Midha R., Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review., *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2000 Apr;40(4):187-99.
- 39) Millesi H., Microsurgical repair of peripheral nerves, *Plastic Surgery*, 4th edition. eds: Smith JW., Aston SJ., Little Brown, Boston (1991). Pp: 1053-74.

- 40) Rolfe B., Nerve Repair, *Green's Operative Hand Surgery*, 6<sup>th</sup> edition. ed: Wolfe SW., Churchill Livingstone, New York, (2011).
- 41) Wilgis EFS., Nerve repair and grafting, *Operative Hand Surgery*, ed: Green DP., Churchill Livingstone, New York, (1982). Pp: 915-38.
- 42) Bora FW., Peripheral nerve repair in cats. The fascicular stitch. *J Bone joint Surg.* 1967;49A, 659.
- 43) Lundborg G., Dahlin LB., Structure and function of peripheral nerve, *Operative Nerve Repair and Reconstruction*. ed: Gelberman RH. JB Lippincott, Philadelphia (1991). Pp: 3-15.
- 44) Siemionow M., Zielinski M., Meirer R., The single-fascicle method of nerve grafting. *Ann Plast Surg.*, 2004 Jan;52(1):72-9.
- 45) Wilgis EFS., Nerve repair and grafting. In: Green DP, ed. *Operative Hand Surgery*. Vol 2, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1988:1373–1404.
- 46) Millesi H., Techniques for nerve grafting. *Hand Clin.* 2000;16:73–91.
- 47) Özbayoğlu A. C., Deneysel Sıçan Siyatik Sinirinde Ezilme Tarzı Yaralanma Modelinde Sinir Rejerasyonunda Trombositten Zengin Plazmanın Etkileri. (Uzmanlık Tezi), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,(2008).
- 48) Bixby JL., Zhang R., Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 1990;110(4), 1253-60.
- 49) Burnett MG., Zager EL., Pathophysiology of peripheral nerve injury: A brief review. *Neurosurg Focus.* 2004;15:16(5) E1.
- 50) Henderson CE., Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:64–70.
- 51) Dahlin LB., The biology of nerve injury and repair. *J Am Soc Surg Hand.* 2004;4(3), 143-55.
- 52) Henderson CE., Camus W., Mettling C. et al., Neurotrophins promote motor neurone survival and are present in embryonic limb bud. *Nature.* 1993;363:266–270.
- 53) He CL., Chen ZW., Chen ZR., Enhancement of motor regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery.* 1998;13, 151-4.
- 54) 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.



- 55) 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.
- 56) Novikov L., Novikova L., Kellerth JO., Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience.* 1997;79(3):765–74.
- 57) Schnell L., Schneider R., Kolbeck R., Barde YA., Schwab ME., Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature.* 1994;367, 170-3.
- 58) Yin Q., Kemp GJ., Frostick SP., Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg[Br].* 1998;23(4):433–7.
- 59) Terenghi G., Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194( Pt 1):1–14.
- 60) Frostick SP., Yin Q., Kemp GJ., Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery.* 1998;18(7):397–405.
- 61) 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.
- 62) 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.* 1997;55:1294-9.
- 63) Yu W., Wang J., Yin J., Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. *Int J Neurosci.* 2011 Apr;121(4):176-80.
- 64) Eppley BL., Pietrzak WS., Blanton M., Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Nov;118(6):147e-159e.
- 65) Pietrzak WS., Eppley BL., Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg.* 2005 Nov;16(6):1043-54.
- 66) 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.

- 67) Hsu C., Chang J., Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg [Am]*. 2004;29(4), 551-63.
- 68) Chan RK, Liu PH, Pietramaggiore 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.
- 69) 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.
- 70) Sasahara M., Fries JW., Raines EW., Gown AM., Westrum LE., Frosch MP., Bonthron DT., Ross R., Collins T., PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. *Cell*. 1991;64(1):217-27.
- 71) Bennett NT., Schultz GS., Growth factors and wound healing, biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg*. 1993;165(6), 728-37.
- 72) Rudkin GH., Miller TA., Growth factors in surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1996;97(2):469-76.
- 73) 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.
- 74) 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 Pt 2):3419-24.
- 75) 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.
- 76) Lutz BS., Wei FC., Ma SF., Chuang DC., Effects of insulin-like growth factor-1 in motor nerve regeneration after nerve transection and repair vs. nerve crushing injury in the rat. *Acta Neurochir (Wien)*. 1999;141(10):1101-6.
- 77) 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.
- 78) Steed DL., Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg*. 1998;25(3), 397-405.

- 79) 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.
- 80) Davis JB., Stroobant P., Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol.* 1990; 110(4):1353–60.
- 81) Midha R., Munro CA., Dalton PD., Tator CH., Shoichet MS., Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg.* 2003;99(3):555–65.
- 82) Fujimoto E., Mizoguchi A., Hanada K., Yajima M., Ide C., Basic fibroblast growth factor promotes extension of regenerating axons of peripheral nerve. In vivo experiments using a Schwann cell basal lamina tube model. *J Neurocytol.* 1997;26(8):511–28.
- 83) Yu C. Q., Zhang M., Matis K. I., Kim C., Rosenblatt M.I., Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008;49(9), 3870–3878.
- 84) 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.
- 85) Lin G., Chen KC., Hsieh PS., Yeh CH., Lue TF., Lin CS., Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor and neurotrophins on cultured major pelvic ganglia. *BJU Int.* 2003;92(6), 631-5.
- 86) Sondell M., Lundborg G., Kanje M., Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci.* 1999;19(14), 5731-40.
- 87) Franco D., Franco T., Schettino AM., Filho JM., Vendramin FS., Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use. *Aesthetic Plast Surg.* 2012 Oct;36(5):1254-9.
- 88) Haynesworth S., Kadiyala S., Bruder S., Platelet-rich plasma stimulates stem cell chemotaxis, proliferation and potentiates osteogenic differentiation. *The Spine Journal.* 2002 Sep-Oct;2(5):68-72.
- 89) 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.* 1998 Jun;85(6):638-46.

- 90)Sommeling CE., Heyneman A., Hoeksema H., Verbelen J., Stillaert FB., Monstrey S.,  
The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2013 Mar;66(3):301-11.
- 91)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.* 2001 Jan;107(1):229-37.
- 92)Saltz R., Dimick A., Harris C., Grotting G., Psillakis J., Vasconez LO., Application of autologous fibrin glue in burn wounds. *J Burn Care Rehabil,* 1989 Nov-Dec;10(6):504-7.
- 93)Textor JA., Tablin F., Activation of Equine Platelet-Rich Plasma: Comparison of Methods and Characterization of Equine Autologous Thrombin. *Vet Surg.* 2012 Oct;41(7):784-94.
- 94)Li W., Feng R., Preparation of platelet-rich plasma gel and its effect on skin flap survival of rat. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2012 Jan;26(1):64-9.
- 95)Doolabh VB., Hertl MC., Mackinnon SE., The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci.* 1996 Jan-Mar;7(1):47-84.
- 96)Pabari A., Yang SY., Seifalian AM., Mosahebi A., Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010 Dec;63(12):1941-8.
- 97)Siemionow M., Brzezicki G., Chapter 8: Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87:141-72.
- 98)Varejão AS., Meek MF., Ferreira AJ., Patrício JA., Cabrita AM., Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods.* 2001 Jul 15;108(1):1-9.
- 99)Kalbermatten DF., Erba P., Mahay D, Wiberg M., Pierer G., Terenghi G., Schwann Cell Strip for Peripheral Nerve Repair. *J Hand Surg Eur Vol.* 2008 Oct;33(5):587-94.
- 100)Kilic A., Konopka G., Akelina Y., Regalbuto R., Tang P., Ipsilateral, cabled sural nerve for a sciatic nerve defect: An experimental model in the rat. *J Neurosci Methods.* 2011 Apr 15;197(1):137-42.
- 101)Karagoz H., Ulkur E., Uygur F., Senol MG., Yapar M., Turan P., Celikoz B., Comparison of regeneration results of prefabricated nerve graft, autogenous nerve graft, and vein graft in repair of nerve defects. *Microsurgery.* 2009;29(2):138-43.
- 102)Tzou CH., Aszmann OC., Frey M., Bridging peripheral nerve defects using a single-fascicle nerve graft. *Plast Reconstr Surg.* 2011 Oct;128(4):861-9.

- 103) Ansselin AD., Davey DF., The regeneration of axons through normal and reversed peripheral nerve grafts. *Restor Neurol Neurosci.* 1993 Jan 1;5(3):225-40.
- 104) Sotereanos DG., Seaber AV., Urbaniak JR., Spiegel DA., Sotereanos D. , Anthony DC., Reversing nerve-graft polarity in a rat model: the effect on function. *J Reconstr Microsurg.* 1992 Jul;8(4):303-7.
- 105) Stromberg BV., Vlastou C., Earle AS., Effect of nerve graft polarity on nerve regeneration and function. *J Hand Surg Am.* 1979 Sep;4(5):444-5.
- 106) Prpa B., Huddleston PM., An KN., Wood MB., Revascularization of nerve grafts: a qualitative and quantitative study of the soft-tissue bed contributions to blood flow in canine nerve grafts. *J Hand Surg Am.* 2002 Nov;27(6):1041-7.
- 107) Zhou J., Tang Z., Xiao Y., An effect of the omental wrapping on revascularization and nerve regeneration of the artificial nerve graft. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2006 Aug;20(8):797-800.
- 108) Chalfoun C., Scholz T., Cole MD., Steward E., Vanderkam V., Evans GR., Primary nerve grafting: A study of revascularization. *Microsurgery.* 2003;23(1):60-5.
- 109) Best TJ., Mackinnon SE., Midha R., Hunter DA., Evans PJ., Revascularization of peripheral nerve autografts and allografts. *Plast Reconstr Surg.* 1999 Jul;104(1):152-60.
- 110) Xie X., Zhao S., Wu H., Xie G., Huangfu X., He Y., Zhao J., Platelet-rich plasma enhances autograft revascularization and reinnervation in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. *J Surg Res.* 2013 Jan 31. [Epub ahead of print]
- 111) 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.* 1998;150(1):69–81.
- 112) Galloway EB 3rd., Jensen RL., Dailey AT., Thompson BG., Shelton C., Role of topical steroids in reducing dysfunction after nerve injury. *Laryngoscope.* 2000;110(11):1907–10.
- 113) Cruz NI., Debs N., Fiol RE., Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs. *Plast Reconstr Surg.* 1986;78(3):369–73.
- 114) Narakas A., The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *Orthop Clin North Am.* 1988;19(1):187–99.
- 115) Palazzi S., Vila-Torres J., Lorenzo JC., Fibrin glue is a sealant and not a nerve barrier. *J Reconstr Microsurg.* 1995;11(2):135–9.

- 116) Smahel J., Meyer VE., Bachem U., Glueing of peripheral nerves with fibrin: Experimental studies. *J Reconstr Microsurg.* 1987;3(3):211–20.
- 117) Lee M., Doolabh VB., Mackinnon SE., Jost S., FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve.* 2000;23(4):633–40.
- 118) Özgenel GY., Filiz G., Combined application of human amniotic membrane wrapping and hyaluronic acid injection in epineurectomized rat sciatic nerve. *J.Reconstr Microsurg.* 2004;20(2):153–7.
- 119) Heldin CH., Westermark B., Mechanism of action and in vivo role of platelet derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1283–316.
- 120) Longo FM., Hayman EG., Davis GE., Ruoslahti E., Engvall E., Manthorpe M., Varon S., Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating in vivo within nerve regeneration chambers. *Brain Res.* 1984 Aug 20;309(1):105-17.
- 121) Gordon T., Sulaiman O., Boyd JG., Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 2003 Dec;8(4):236-50.
- 122) Pan HC., Cheng FC., Chen CJ., Lai SZ., Lee CW., Yang DY., Chang MH., Ho SP., Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci.* 2007 Nov;14(11):1089-98.
- 123) Wong C., Inman E., Spaethe R., Helgerson S., Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb Haemost.,* 2003 Mar;89(3):573-82.
- 124) Odaka M., Uchiyama Y., Oka Y., Tamaki T., Evaluation of morphological and functional regeneration of rat nerve-muscle units after temporary and permanent tubulization. *Muscle Nerve,* 2003 Aug;28(2):194-203.
- 125) Near SL., Whalen LR., Miller JA., Ishii DN., Insulin-like growth factor II stimulates motor nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1992 Dec 15;89(24):11716-20.
- 126) Aspenberg P., Virchenko O., Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand.* 2004 Feb;75(1):93-9.
- 127) 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.* 1997 Sep;58(9):1033-7.

- 128) 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.* 1998;140(12):1303-7.
- 129) Rydevik M., Bergstrom F., Mitts C., Danielsen N., Locally-applied collagenase and regeneration of transected and repaired rat sciatic nerves. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2002;36(4):193-6.
- 130) Giorgadze T., Rukhadze R., Giorgadze S., Gujabidze N., Tevzadze N., Quantitative changes of schwann and mast cells in the process of peripheral nerve regeneration. *Georgian Med News.* 2010 Nov;(188):84-8.
- 131) MacDonald SM., Mezei M., Mezei C., Effect of Wallerian degeneration on histamine concentration of the peripheral nerve. *J Neurochem.* 1981 Jan;36(1):9-16.
- 132) Esposito B., De Santis A., Monteforte R., Baccari GC., Mast cells in Wallerian degeneration: morphologic and ultrastructural changes. *J Comp Neurol.* 2002 Apr 8;445(3):199-210.
- 133) Nennesmo I., Reinholt F., Mast cells in nerve end neuromas of mice. *Neurosci Lett.* 1986 Sep 12;69(3):296-301.
- 134) Kotulska K., Larysz-Brysz M., Marcol W., Józwiak J., Grajkowska W., Lewin-Kowalik J., The influence of trkB deficiency on long-term outcome of peripheral nerve injury in mice. *Folia Neuropathol.* 2007;45(2):82-92.
- 135) Chung MS., Baek GH., Oh JH., Lee YH., Bin SW, Gong HS., The effect of muscle length and excursion on muscle contracture after tendon injury: A study in rabbit soleus muscles. *Injury.* 2007;38(10):1139–45.
- 136) 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.
- 137) 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.

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının 87/2012 protokol numarası ile 27.02.2013 tarihli toplantısında verdiği izin ile gerçekleştirilmiştir.