



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SİYATİK SİNİR YARALANMASINDA POLİ(3-HİDROKSİBÜTİRAT)
VE CHİTOSAN KAPLI TÜBÜLER GREFTLER İLE BİRLİKTE MEZENŞİMAL
KÖK HÜCRE KULLANIMININ AKSONAL REJENERASYONA ETKİSİ**

Dr. Hıdır ÖZER

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

**ANKARA
2013**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SİYATİK SİNİR YARALANMASINDA POLİ(3-HİDROKSİBÜTİRAT)
VE CHİTOSAN KAPLI TÜBÜLER GREFTLER İLE BİRLİKTE MEZENŞİMAL
KÖK HÜCRE KULLANIMININ AKSONAL REJENERASYONA ETKİSİ**

Dr. Hıdır ÖZER

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Gökhan BOZKURT

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2013

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım olarak çalışmanın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında büyük desteği ve yardımı olan Sayın Doç. Dr. Gökhan Bozkurt'a teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda görevli değerli öğretim üyelerim Sayın Prof.Dr. Servet İnci, Sayın Prof.Dr. Osman Ekin Özcan, Sayın Prof.Dr. Selçuk Palaoğlu, Sayın Prof.Dr. Nejat Akalan, Sayın Prof.Dr. Hakan Oruçkaptan, Sayın Prof.Dr. Mustafa Berker, Sayın Doç.Dr. Atilla Akbay, Sayın Doç.Dr. Kamil Öge, Sayın Doç.Dr. Melike Mut Aşkun, Sayın Doç.Dr. Burçak Bilginer, Sayın Uzm.Dr. İlkey Işıkkay'a uzmanlık eğitimim süresince mesleki tecrübe, deneyim ve bilgilerini benimle paylaştıkları için teşekkür ederim. Beraber çalışma fırsatı bulduğum ve tez aşamasında yardımlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışmadaki histopatolojik incelemeleri yapan Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof.Dr. Petek Korkusuz'a, elektrofizyolojik çalışmalar için Nöroloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç.Dr. Çağrı Temuçin'e, yapay tübüler greft materyalini hazırlayan Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof.Dr. Emir Baki Denkbaş ve Sayın Biyolog Murat Demirbilek'e, kök hücrelerin temini ve hazırlanması için Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden Sayın Prof.Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya ve Sayın Biyolog Sevil Arslan'a, nanopartiküllerin hazırlanması ve temini için Sayın Prof.Dr. Can Akçalı'ya, biyoistatistik değerlendirmelerindeki katkıları için Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Sayın Arş.Gör. Duygu Aydın'a teşekkür ederim.

Gerek Tıp Fakültesi gerekse uzmanlık eğitimim süresince en büyük destekçilerim olan fedakar anne ve babama, uzmanlık eğitimim süresince gösterdikleri sabır ve anlayış için sevgili eşim Melek Özer, çocuklarım Azra ve Asya Özer'e teşekkür ederim. Bu süreçte kaybettiğim ağabeyim Dr. Yunus Özer'i sevgi ve saygıyla anıyorum.

ÖZET

Özer H, Deneysel siyatik sinir yaralanmasında poli(3-hidroksibütirat) (PHB) ve Chitosan kaplı tübüler greftler ile birlikte mezenşimal kök hücre kullanımının aksonal rejenerasyona etkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirurji Uzmanlık tezi, Ankara, 2013. Periferik sinir yaralanmasında altın standart tedavi hasar gören periferik sinir uçlarının uç-uca onarımı veya hasarlı uçlar arasındaki mesafeyle, gerginliğin fazla olduğu durumlarda sinir grefti ile uçların birleştirilmesidir. Greft ile onarımın dezavantajları, verici alanda motor-duysal kayıp gelişmesi, verici greft miktarının sayı ve çap olarak yetersizliği ve yanlış eşleşmedir. Bu dezavantajların giderilmesi amacı ile son yıllarda entübülasyon stratejileri ve kök hücre uygulamalarından yararlanılmaktadır.

Bu çalışmada entübülasyon amaçlı bakteriyel polyester ve chitosan kaplı tübüler greft ile birlikte insan kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin kullanımının aksonal rejenerasyon üzerine olan etkilerinin araştırılması planlandı. Bakteriyel polyesterler ve chitosanın biyouyumlu, biyoçözünür, nontoksik ve kolay şekil verilebilen yapıda olması, biyolojik sistemlerde kullanılabilmelerini sağlamaktadır. Çalışmamızda bakteriyel polyester ailesinin bir üyesi olan polihidroksibütirat (PHB) ile tübüler yapının iç yüzeyi, chitosan isimli biyomateryalle bu tübüler yapının dış yüzeyi kaplandı. Chitosan kaplama ile tüpün kollapsının engellenmesi amaçlanırken, polihidroksibütirat (PHB) kaplı iç yüzeyde aksonların rejenerasyonunu kolaylaştırabilmek için nanoteknolojiden faydalanıldı.

Bu çalışmada ağırlıkları 225 ile 275 gr. arasında değişen toplam 30 adet erkek Wistar-Hannover albino rat kullanıldı. Denekler otogreft, yapay tübüler greft, yapay tübüler greft-kök hücre grubu olarak üç gruba ayrıldı. Deneklerde 10 mm uzunluğunda defekte neden olan deneysel siyatik sinir hasarı oluşturuldu. Hasar birinci grupta otogreft, ikinci grupta tüp halinde, üç boyutlu yönlendirilmiş nanofiber yüzeyli PHB ve chitosan yapısındaki yapay tübüler greft ile içi boş olarak ve üçüncü grupta PHB ve chitosan yapısındaki yapay tübüler greftin içerisine insan mezenşimal kaynaklı kök hücre konularak onarıldı. Dördüncü ve sekizinci hafta sonunda deneklerdeki fonksiyonel düzelme siyatik sinir fonksiyon indeksi ile değerlendirildi. Bütün gruplarda zaman ilerledikçe istatistiksel olarak anlamlı düzelme olduğu saptandı. Sekizinci hafta sonunda yapılan histopatolojik incelemede üç grupta da rejenere olan aksonlar saptandı. Otogreft grubunda diğer iki gruba göre, yapay tübüler greft-kök hücre grubunda ise yapay tübüler greft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla

aksonal rejenerasyon olduğu tespit edildi. Deney sonucunda PHB ve chitosan modifikasyonu ile hazırlanan túbüler greftlerin hem kendi başlarına hemde insan mezenşim kaynaklı kök hücre ile birlikte kullanımının sinir rejenerasyona katkı sağladığı gösterildi. PHB ve chitosan yapısındaki túbüler greft ile birlikte mezenşimal kök hücrelerin kullanımının, tek başına kullanımına göre daha iyi aksonal rejenerasyon sağladığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: PHB, chitosan, mezenşimal kök hücre, periferik sinir, aksonal rejenerasyon

ABSTRACT

Özer H, The effects poli (3-hidroksibütirat) (PHB) and chitosan modified tubular graft and mezenchymal stem cell on axonal regeneration in experimental sciatic nerve injury, Hacettepe University Medical Faculty, Neurosurgery Specialty Thesis, Ankara, 2013

The gold standard in the treatment of peripheral neuronal injury is end to end anastomosis of the nerve endings, but in case of tension or segmental neuronal tissue loss, neuronal garfts must be used. Disadvantages of neuronal grafting are motor or sensory neurological loss in the donor site, insufficient length and diameter of the neuronal graft and aberrant pairing of the nerve fibers. For the reasons mentioned, entubulation strategies and stem cell applications are being developed.

In this research, we investigated the effects of tubular grafts covered with bacterial polyesters and chitosan and human mesenchymal stem cells on the axonal regeneration. Biocomformability, bioresorbable, nontoxic and formability characteristics of bacterial polyesters and chitosan makes them suitable for nerve grafting. In this study, the inner surface of the tubular structure is covered with polyhydroxy butyrate (PHB), which is a member of bacterial polyesters, and the outer surface is covered with chitosan. Chitosan cover is used to prevent the collapse of tubular structure and the inner cover PHB used to facilitate the neuronal growth.

Thirty Wistar-Hannover albino rats weighting 225-275 gr. were divided into three groups, autograft, synthetic tubular graft and synthetic tubular graft plus stem cells. A ten millimeter nerve segment was sectioned out from the sciatic nerves of the rats and autografts form is used in the first group, the gap was grafted by tube shaped three dimensional directed nanofiber surfaced PHB and chitosan formed tubular graft without any content in the second group and tube shaped three dimensional directed nanofiber surfaced PHB and chitosan formed tubular graft with human mesenchymal stem cells in the third group.

Functional improvement was assessed by sciatic nerve function index after four and eight weeks. Statistically significant improvements were observed in all groups by the time. Regenerated axons were seen in histopathological evaluation in all groups after eight weeks. There were significant differences in axonal regeneration in auto graft group compared with

other two groups and in synthetic tubular graft-stem cell group compared with only synthetic tubular graft group. PHB and chitosan modified tubular grafts provided neuronal regeneration alone or combined with hMSC. PHB and chitosan grafts with mesenchymal stem cells provided better axonal regeneration than they used alone.

Key words: PHB, chitosan, mesenchymal stem cell, peripheral nerve, axonal regeneration

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET	II
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
RESİMLER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
GRAFİKLER DİZİNİ.....	XIV
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 PERİFERİK SİNİR ANATOMİSİ	5
2.2 PERİFERİK SİNİR YARALANMASI	10
2.2.1 Klinik Değerlendirme	10
2.2.2 Dejenerasyon	15
2.2.3 Rejenerasyon	18
2.2.4 Rejenerasyonda EMG'nin Yeri	21
2.3 PERİFERİK SİNİR YARALANMALARINDA CERRAHİ TEDAVİ	22
2.3.1 Tarihçe	22
2.3.2 Cerrahi Zamanlama.....	23
2.3.3 Cerrahi Teknik	24
2.3.3.1 Primer Onarım	25
2.3.3.2 Greft ile Onarım.....	26
2.3.3.3 Nörotizasyon.....	28
2.4 PERİFERİK SİNİR ONARIMINDA GREFTLER	28
2.4.1 Otogreft Kullanımı.....	28

2.4.2 Sentetik Greftler	29
2.4.3 Biyolojik Greftler (Doğal Materyaller).....	29
2.4.4 Dolgu Maddeleri.....	30
2.5 DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	30
2.5.1 Doku İskelesi.....	31
2.5.2 Nanoteknoloji ve Nanotıp	31
2.5.3 Chitosan.....	32
2.6 POLİHİDROKSİALKANOATLAR	34
2.7 PHB [Poli(3-hidroksibütirat)]	36
2.8 ERİŞKİN MEZENŞİMAL KAYNAKLI KÖK HÜCRELER.....	37
2.8.1 Mezenşimal Kaynaklı Kök Hücrelerin İşaretlenmesi ve Transplantasyonu	40
3.MATERYAL VE METOD	42
3.1 GREFTLERİN HAZIRLANMASI	42
3.2 MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE HAZIRLANMASI	44
3.2.1 Mezenşimal kök hücrelerin izolasyonu ve çoğaltılması	44
3.2.2 Mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyonu	44
3.2.3 İşaretleyicinin (VP6) mezenşimal kök hücreler üzerine etkisi.....	45
3.3 DENEY	45
3.3.1 Anestezi.....	46
3.3.2 Cerrahi Eksplorasyon ve Sinir Hasarı Oluşturulması	46
3.3.3 Otolog Sinir Grefti ile Onarım	47
3.3.4 PHB - Chitosan Tübüler Greft ile Onarım	48
3.3.5 PHB - Chitosan Tübüler Greft ve hMSC ile Onarım	48
3.3.6 Yara Kapatılması	49
3.4 SİNİR İYİLEŞMESİNİN TAKİBİ	50
3.4.1 Fonksiyonel Değerlendirme	50
3.4.2 Elektrofizyolojik Değerlendirme.....	51

3.4.3 Histolojik Değerlendirme	51
3.5 İSTATİSTİK ANALİZ.....	54
4.BULGULAR	55
4.1 GÖZLEMLER.....	55
4.2 İŞARETLEYİCİNİN MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ.....	59
4.3 FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME.....	60
4.4 ELEKTROFİZYOLOLJİK DEĞERLENDİRME.....	65
4.5 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	70
5. TARTIŞMA	76
6.SONUÇ	81
7. KAYNAKÇA	83

KISALTMALAR

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BMSC	Bone marrow stromal cell
CMAP	Compound muscle action potential
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
dhh	Desert Hedgehog
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
dsDNA	Çift iplikli deoksiribonukleik asit
EMG	Elektromyografi
FGF	Fibroblast growth factor
GGF	Glial growth factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
hMSC	Human mesenchymal stem cell
IL-1	İnterlökin 1
IL-2	İnterlökin 2
IL-6	İnterlökin 6
IL-10	İnterlökin 10
IL-12	İnterlökin 12
IL-15	İnterlökin 15
IL-18	İnterlökin18
ITF	Intermediary toe spread factor

MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MSC	Mesenchymal stem cell
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NGF	Nerve growth factor
NT-3	Neurotropin 3
PBS	Phosphate buffer solution
PGA	Poliglikolik asit
PHA	Polihidroksialkanoat
PHB	Polihidroksibutirat
PHBHHX	Poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksihekzanoat)
PHBHV	Poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat)
PLF	Print length factor
SC	Schwann cell
SCBL	Schwann Cell Basal Lamina
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Scanning electron microscope
SFI	Sciatic functional index
TNF- α	Tumor necrosing factor- α
TSF	Toe spread factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa:
2.1 Periferik sinir yaralanmasında Seddon ve Sunderland sınıflaması	12
2.2 PHA üreten bazı organizmalar	35
3.1 Grefte doku yanıtı kapsamında grefti saran kapsül ve onu çevreleyen çevre dokunun mikroskopik özellikleri skorlanmaktadır	53
4.1 MTT Assay ile elde edilen absorban değerleri (nanometre olarak).....	59
4.2 SFI sonuçları için ortanca değerler	60
4.3 SFI değerleri için dördüncü ve sekizinci haftalar sonunda elde edilen sonuçlar, sonuçların gruplar arasında analizi ve her bir grubun kendi içinde zamana göre analizi.....	64
4.4 Yüzde CMAP sonuçları	66
4.5 Doku reaksiyonu skorları analizi.....	70
4.6 Gruplar arasında akson sayısı/defekt alanı oranlarının analizi.....	72
4.7 Gruplar arasında damar sayısı/defekt alanı oranlarının analizi.....	73

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa:
2.1 Kemik iliğinde oil red ile boyanmış MSC'lerin yağ hücrelerine farklılaşması	40
2.2 Kemik iliğinde alizarin red ile boyanmış MSC'lerin kemik hücrelerine farklılaşması	40
2.3 İşaretleyici (VP-6 nanoparçacığı)	41
3.1 A) Elektrospin sistemi B) Drum kollektör C) Yönlendirilmiş PHB nanofiber membran D ve E) Tüp şeklindeki PHB nanofiber membran F) Nanofiber membranın SEM görüntüsü G) Chitosan ile kaplanmış PHB nanofiber membran	43
3.2 PHB ve chitosan modifikasyonu ile tüp şeklinde hazırlanmış greft materyali	43
3.3 Cerrahi aşamada kullanılan mikrocerrahi aletler	46
3.4 Sinir eksplorasyonu	47
3.5 Oluşturulan hasar sonrası görünüm	47
3.6 Mikroskop altında yapılan otolog sinir grefti ile onarım	48
3.7 PHB ve chitosan yapısındaki tübüler greft ile onarım	49
3.8 Cerrahi insizyonun stapler ile kapatılması	49
3.9 Yürüme koridorunda deneklerin ayak izlerinin alınması	51
3.10 Deneklerin genel anestezi sonrası sakrifiye edilmesi	52
4.1 Yapay tübüler greft grubundaki bir denekte gelişen otofaji	56
4.2 Cerrahi sonrası 1.haftada deneklerin yürüme karakteri	56
4.3 Yapay tübüler greft kullanılan bir denekte cerrahi alanın sekizinci hafta sonundaki eksplorasyon görüntüsü	58
4.4 Yapay tübüler greft kullanılan bir denekte sekizinci hafta sonunda yapılan incelemede materyalin tübüler yapısını koruduğu fakat üzerinin ince fibrotik bir tabaka ile kaplanmış olduğu görülmektedir.	58
4.5 EMG kaydı	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa:
2.1 Periferik sinir anatomisi	7
2.2 Periferik sinir yaralanmasında Seddon ve Sunderland sınıflaması	14
2.3 Dejenerasyon sürecinde rol oynayan hücreler ve inflamatuvar sitokinler	18
2.4 Epinöral onarım (nörorafi)	26
2.5 Fasiküler onarım	26
2.6 Greft kullanılarak fasiküler onarım (otogreft kullanılmış)	27
2.7 Chitosan'ın biyokimyasal yapısı	33
2.8 Sellüloz, Chitosan ve Kitin'in biyokimyasal yapılarının karşılaştırılması	33
2.9 PHA'nın genel yapısı	36
2.10 PHB polimeri	36
2.11 MSC'lerin doku hasarında olası yarar mekanizmaları	38
4.1 EMG kayıtları	67
4.2 Histopatolojik görüntüler	75

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik	Sayfa:
4.1 SFI değerlerinde grupların dördüncü hafta sonuçlarının analizi	61
4.2 SFI değerlerinde grupların sekizinci hafta sonuçlarının analizi	62
4.3 SFI değerlerinde grupların dördüncü ve sekizinci hafta sonuçlarının karşılaştırılması	63
4.4 Doku reaksiyonunun yapay tübüler greft ve yapay tübüler greft-kök hücre grupları arasındaki analizi	71
4.5 Gruplar arasında akson sayısı/defekt alanı oranlarının analizi	72
4.6 Gruplar arasında damar sayısı/defekt alanı oranlarının analizi	74

1.GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmalarında aksonların devamlılığını bozan herhangi bir hasar ya da patolojik süreç; yol açtığı fonksiyonel kayıp yanında hasta, aile, toplum ve devlet üzerinde bedensel, psikolojik ve ekonomik boyutta olumsuz sonuçlar doğurmaktadır.

Ülkemizde periferik sinir yaralanmalarının cerrahi tedavisi ve sonuçları hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Amerika Birleşik Devletler’inde yılda yaklaşık 50.000 periferik sinir cerrahisi gerçekleştirildiği bilinmektedir (1). Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar periferik sinir sistemi yaralanmalarının cerrahi tedavilerinin sonuçlarının santral sinir sistemi yaralanmalarının cerrahi tedavilerinin sonuçlarından daha üstün olduğunu göstermektedir. Bunun başlıca nedeni santral sinir sisteminin rejenerasyon yeteneğinin kısıtlı olmasıdır. Özellikle son yıllarda moleküler ve hücre biyoloji, biyomühendislik ve kök hücre alanındaki önemli gelişmelere paralel olarak periferik sinir rejenerasyonu hakkındaki bilgilerimiz artmaktadır. Periferik sinir cerrahisinde amaç rejenerasyon sürecindeki bir takım eksikliklerin giderilmesi ve fonksiyonel sonuçların tekrar kazanılmasıdır.

Periferik sinirler mekanik, termal ve kimyasal nedenlerle hasarlanmaktadır. Günümüzde travmaya maruz kalan hastaların % 2,8’inde periferik sinir hasarı olduğu ve bu hastaların çoğunluğunda uzun süreli fonksiyonel kayıplar ortaya çıktığı bilinmektedir (2). Ekstremitelerin açık yaralanmalarının % 5’inde ciddi periferik sinir hasarı olduğu, yaralanmanın sıklıkla üst ekstremitede ulnar veya median siniri alt ekstremitede ise peroneal siniri etkilediği bilinmektedir (3). Periferik sinir yaralanması omurilik yaralanmasına göre daha yaygın bir yaralanma şeklidir (4). Periferik sinir yaralanmalarında cerrahi tedavinin amacı kesi proksimalinde kalan aksonların rejenerasyon sırasında orijinal distal uçlarına ulaşmalarını sağlamak ve son organları innerve edebilmelerine imkan tanımadır (5). Günümüzde periferik sinir yaralanmalarında kabul edilen tedavi şekli: kesici tipteki yaralanmalarda erken dönemde uç-uca sinir onarımı, hasarlı sinir uçları arasında büyük boşluklar veya gerilim olduğunda ise greft ile onarımdır (6). Periferik sinir onarımında sinir dokusunda gerginlik oluşması istenilmeyen bir durumdur. Bu konuda yapılan çalışmalarda defekti kapatmak için sinir uçlarına ortalama % 10’dan fazla gerilim uygulanması kan akımında % 50’ye varan azalmaya neden olacağını göstermektedir (7). Periferik sinir onarımında başarısızlık hedef kas dokusunda motor ve duysal fonksiyon kayıplarına ve ağrılı nöropatilere yol açmaktadır. Periferik sinir yaralanmasında altın standart tedavi kesilmiş

periferik sinir uçlarının primer olarak uç-uca onarılması, bu yapılamıyorsa otolog duysal sinir grefti kullanılarak sinir uçlarının birleştirilmesidir (8). Hasarlı sinir uçlarının primer onarımında sinir trasesi üzerinde gerginlik oluşması otogreft kullanımında ise donör sinir alanında fonksiyon kaybı, nöroma oluşumu, skar dokusunun gelişmesi ve donör sinir çapının genellikle tamir edilecek sinir çapı ile uyumsuzluğu dezavantajlar oluşturmaktadır (9,10). Yine otogreft kullanılarak yapılan cerrahi tedavi sonrası hedef organ reinervasyon oranları beklenildiği kadar yüksek değildir. Travmatik hasar sonrası periferik sinirde ortaya çıkan doku kaybı büyük miktarda olduğunda alınan sinir grefti yeterli olmamaktadır.

Günümüzde bahsedilen bu sorunlardan kaçınmak için farklı klinik ve deneysel stratejiler geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan entübülasyon stratejilerinde biyolojik ve sentetik olarak elde edilebilen bir takım tüplerden yararlanılmaktadır. Entübülasyon stratejilerinde iskelet kası lifleri, arter, ven, amniyon tüpleri, fasya kılıfları gibi biyolojik yapılarla birlikte silikon, plastik, poliglikolik asit, polietilen, polivinil yapısındaki sentetik tüplerden faydalanılmıştır. Entübülasyon için kullanılan bu materyaller içleri boş olarak veya sinir rejenerasyonuna katkı sağlayan sinir büyüme faktörü ve rejeneratif sitokinlerle dolu olarak kullanılabilir. Bu maddeler kullanılan tüplerden beklenen etkinliği artırmanın yanısıra daha uzun mesafeler için greftleme yapılmasına olanak sağlamaktadır. Bu tekniğin amacı periferik sinir yaralanmasında hasar gören sinir uçları arasındaki iletişimin tekrar sağlanması ve yeterli sayıda aksonun üzerinde gelişip büyüebileceği hasarlı alanı dolduran ve lezyonun her iki ucunu birbirine yaklaştıran bir köprünün sağlanmasıdır. Aynı zamanda tüpler rejenerasyon için bir kanal oluşturmakta aksonların tüp yüzeyine adhezyonlarını engellemekte ve rejenerasyon için aksonları hedefe doğru uygun şekilde yönlendirmektedirler. İç yüzeyleri yönlendirmiş nanofibriler membrandan oluşan tübüler greftler aksonların doğru bir şekilde hedeflerine ulaşmalarını sağlamaktadır. Nöroma oluşumunu da engelledikleri bildirilmektedir. Mikroçevrede bulunan rejenerasyona etkili lokal büyüme faktörlerinin bu tübüler yapıların içine girebildiği gösterilmiştir (169).

Otolog sinirlere alternatif olarak ilk defa arter ve ven greftleri önerilmiştir (11). Deneysel çalışmalarda önemli sonuçlar alınmış olmasına rağmen bu teknikte büyük arter ve venlere ihtiyaç duyulması, biyolojik greftlerin kollaps olması bu tekniğin önündeki engellerdir. Entübülasyon amacı ile biyolojik yapılardan en sık kullanılan ven greftleri teorik olarak otojen olmanın avantajına sahip olsalarda kaçınılmaz olarak donör alan morbiditesine neden olmaktadır, 3 cm ve daha kısa greftlemelerde sonuçlar iyi olsada uzun defektlerde güvenilir değildirler (12).

Deneyisel hayvan modelleri ile yapılan son dönem araştırmalarda biyolojik tüplere alternatif olarak kullanılan sentetik tüplerin canlı dokuda ileri derecede inflamatuvar reaksiyona sebep olduğunu ve fibrozis ile sinir rejenerasyonunu engellediğini göstermiştir (166). Grefte karşı immün cevap gelişmesi ve toksisitesi de diğer dezavantajlarıdır. Bu tip olumsuz reaksiyonel olayları ortadan kaldırmak için doku mühendisliği stratejilerinden faydalanılmaktadır. Günümüzde doku mühendisliği teknikleri kullanılarak petrol bazlı bileşiklere alternatif oluşturacak biyoçözünür, organizma için biyouyumlu, nontoksik, rejenerasyona yardımcı, rejenerasyon süresince bozulmadan bütünlüğünü koruyabilen, rejenerasyon sonrası ortamdaki uzaklaştırılabilen ve canlı dokuda daha az inflamatuvar reaksiyona sebep olacak materyaller geliştirilmiştir.

Periferik sinir rejenerasyonunda son dönemde bu amaçla bakteriyel polyesterlerden yararlanılmaktadır. Bakteriyel polyesterler doğadaki değişik bakterilerin sitoplazmalarında üretilen, canlı dokuya uyumluluğu ispatlanmış, biyoçözünür, termoplastik, piezoelektrik, elastometrik, suda çözünebilen ve nontoksik olan biyomateryallerdir (13). Bakteriyel polyesterler içerisinde yer alan polihidroksialkanoatlar (PHA) grubunda 300'den fazla mikroorganizma tarafından üretilen 80'den fazla monomer polyester mevcuttur (14). Polihidroksibütirat (PHB) bu grubun ilk bulunan üyesidir. Kolay tüp şekli verilebilen bir yapıda olduğu için entübülasyon stratejilerinde kullanılmaktadır. Ancak bu biyomateryalin düşük mekanik güç ve yüksek kırılabilirlik gibi dezavantajları vardır (15). Bu çalışmada PHB materyali ile daha önce yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sorunları giderebilmek için tüp şeklindeki yapının dış yüzeyinin başka bir biyomateryal ile güçlendirilmesi planlandı. Bu amaçla kitinin deasetilasyonu ile elde edilen ikinci bir biyopolimer olan chitosan'dan yararlanıldı (16,17). Chitosan biyouyumlu, biyoçözünür, nontoksik, antifungal ve antimikrobiyal özelliklere sahip bir biyomateryaldir. Kolaylıkla istenilen şekil ve geometriye (membran, süngerimsi yapı, fiber, mikro ve nanoküre, tüp gibi) sahip yapılara dönüştürülebilmektedir (18,19). Aynı zamanda chitosanın yara iyileştirme, serumdaki kolesterol düzeyini azaltma ve bağışıklık sistemini aktive etmek gibi son derece önemli fonksiyonları vardır (20,21). Kemirgenlerin ve köpeklerin siyatik sinir yaralanma modellerinde chitosan onarım için yapay köprü olarak kullanılmıştır (22,23). Chitosan'dan elde edilen tüp şeklindeki biyomateryaller üzerinde yapılan Schwann hücre transplantasyonu araştırmalarında chitosanın aksonal rejenerasyona katkısı olduğu gösterilmiştir (24). Chitosan biyopolimerinin periferik sinir yaralanmasında kılavuz tüp olarak kullanımını sonrasında

ortaya çıkan düşük mekanik direnç, kollaps gibi sorunlar bir takım bileşenlerin eklenmesiyle giderildi ve sinir kılavuzu olarak kullanımı yaygınlaştı (25).

Çalışmamızda entübülasyon amaçlı kullanılan tübüler materyalin dış yüzeyi mekanik direncin artırılabilmesi amacı ile chitosan kaplanırken iç yüzeyi de aksonal rejenerasyonu kolaylaştırılabilmek için yönlendirilmiş nanofibriler membrandan oluşturuldu.

Son yıllarda periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde entübülasyon stratejileri ile birlikte kök hücrelerin kullanıldığı çalışmalarda önemli sonuçlar elde edilmiştir. Kök hücrelerin bakteriyel polyesterler ile biyoyumluluk gösterdiği ve kök hücrelerin bakteriyel polyesterler üzerinde agregatlar ve sferoidal kümeler oluşturdukları saptanmıştır (26). Yine nöral kaynaklı kök hücrelerin bu bakteriyel polyesterlerin nanofibriler yüzeyine tutunarak büyüme ve farklılaşma gösterebildikleri literatürdeki çalışmalarda mevcuttur. Bu amaçla embriyonik, fetal ve erişkin mezenşimal kaynaklı kök hücrelerden yararlanılmaktadır. Mezenşimal kök hücreler kendini yenileyebilen ve kemik, kıkırdak, yağ, kas gibi multiple mezodermal dokulara farklılaşabilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. MSC'lerin potansiyel avantajları otolog donörden temin edilebilmesi ve allojenik MSC'nin nonimmunojenik olmasıdır. MSC'lerin ayrıca in vitro ortamda nöronal morfoloji kazanmaları ve nöronal ve nöroglial marker eksprese etmeleri sinir sistemi hasarında kullanımına olan ilgiyi arttırmaktadır. Mezenşimal kök hücrelerin transplantasyonu ile bu hücrelerin kendini yenileme ve multipotansiyel özelliklerinden yararlanabileceği düşünülmektedir. Kök hücrelerin aynı zamanda hasarlı hücreler ile yer değişimi, nöroproteksiyon veya endojen hücreler ile birlikte rejenerasyon oluşturabilmek için uygun bir mikroçevre oluşumu sağladığı bilinmektedir. Günümüzde insanlar üzerinde mezenşimal kök hücrelerin Parkinson hastalığında, beyin hasarında, serebral infarkta ve spinal kord hasarında transplantasyonu ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur (27,28,29). Farklılaşmanın yanısıra kök hücrelerin hasarlı nöronlara rejenerasyon sürecinde trofik destek sağlaması da başka bir olası mekanizmadır (30). Kök hücre tedavisinin bazı durumlarda kayıp nöronların yerini almaktan çok nöronal koruma ve anti-inflamatuvar özellikleri ile tedaviye katkıda bulunduğunu gösterir bilgiler elde edilmiştir (31,32).

Bu çalışmada oluşturulan deneysel siyatik sinir hasarı sonrasında PHB ve chitosan modifikasyonu ile hazırlanan bir biyomateryal olan tübüler greftlerin, tek başına veya nanopartikül ile işaretlenmiş insan mezenşim kaynaklı kök hücreler ile birlikte kullanılmasının sinir rejenerasyonuna olan etkisi araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 PERİFERİK SİNİR ANATOMİSİ

Sinir sistemi fonksiyonel ve morfolojik olarak bir bütün olmasına karşın topografik ilkeler ve etkilediği organ gruplarına göre bölümlere ayrılır. Yerleşim özelliği dikkate alınarak sinir sistemi: Merkezi ve Periferik sinir sistemi olarak iki bölüme ayrılır. Beyin ve omurilik merkezi sinir sistemini (MSS) oluştururken bu iki yapıya bağlanan ve çevrede bulunan sinirleri (nervi craniales, nervi spinales), sinir ağlarını (plexus) ve reseptörleri kapsayan sinir sistemi bölümüne de periferik sinir sistemi (PSS) denir. Bir periferik sinir tek tip liften (duysal veya motor) oluşabildiği gibi karışık liflerden de oluşabilir. Periferden aldığı uyarıları (ağrı, ısı, ışık, ses) merkezi sinir sistemine taşıyan sinirlere duysal sinirler (n.sensorius), merkezi sinir sisteminden aldığı emirleri periferdeki efektör yapılara (kas, bez) taşıyan çalıştırıcı sinirlere motor sinirler (n.motorius, somatomotor veya visseromotor), ortak olarak motor ve duysal liflerden oluşmuş sinirlere ise karma sinir (n. mixtus) denir (33).

Periferik sinirler somatik (motor ve duysal) ve otonomik (sempatik ve parasempatik) lifler içerebilirler. Motor nöronlar omurilik ön boynuzundadır. Somatik efferent sistemin ikinci nöronlarını oluşturur. Bu hücrelerin aksonları periferik sinirler içerisinde seyrederek son organları olan çizgili kas hücrelerinde sonlanır. Duysal nöronlar dorsal kök ganglionlarında hücre gövdeleri bulunan bipolar nöronlar olup distalde reseptör yolu ile aldıkları uyarıları proksimalde omurilik içerisinde yer alan ilgili Rexed laminalarına taşır. Sempatik sistem efferentleri merkezi sinir sisteminde ilgili alanlardan çıkarlar ve bunlar paravertebral veya prevertebral ganglionlarda sinaps yaptıktan sonra son organlar üzerinde sonlanırlar. Parasempatik sistem efferentleri merkezi sinir sisteminde ilgili alanlardan çıkarlar ve son organlarından hemen önce yerleşmiş olan ganglionlarda sinaps yaparak son organlar üzerinde sonlanırlar (34).

Embriyolojik olarak periferik sinirler “ektoderm” tabakasından gelişir. Gestasyonun üçüncü ve dördüncü haftalarında nöral krest hücreleri “nöroektoderm”i oluştururlar ve bu yapı mezoderm içine göç eder. Burada dorsal kök ganglionlarına, Schwann hücrelerine ve diğer nöroblastik hücrelere dönüşürler. Spinal kord geliştikçe bazal plaktaki motor nöron aksonları mezodermal tabakadan gelişen kas dokusu içine dağılırlar. Dorsal kök gangliyonlarından da

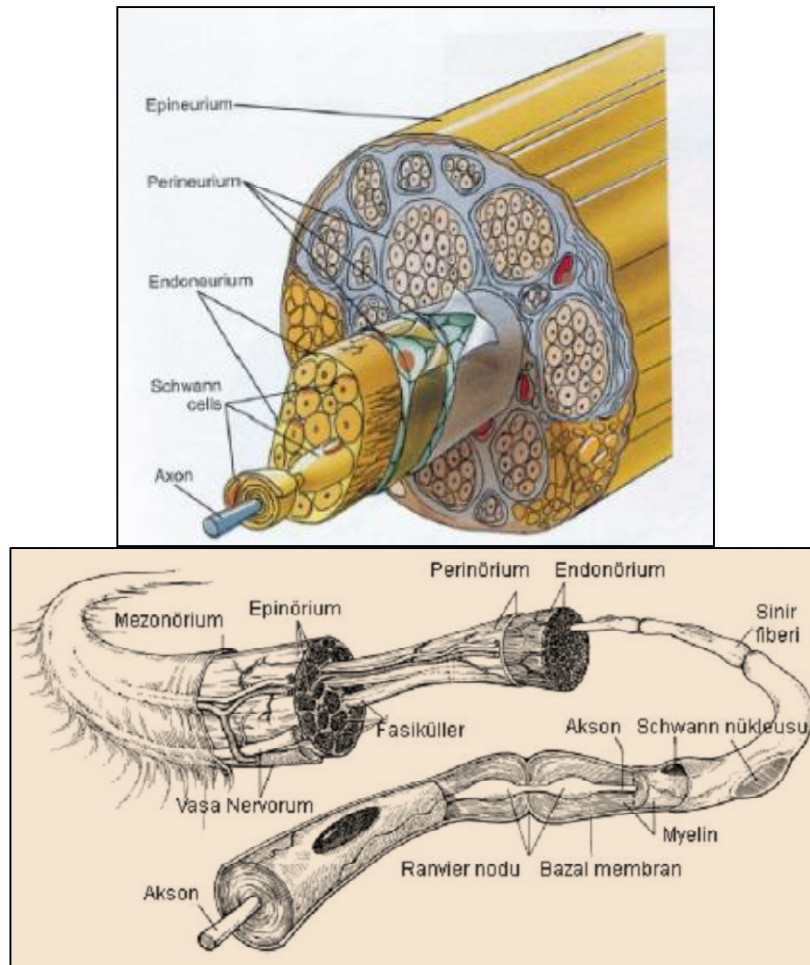
perifere doğru dağılım başlar. Fetal yaşamın yaklaşık dördüncü ayında Schwann hücreleri bu dağılan axonların myelinizasyonuna başlar. Bazı motor nöronlarda ise bu myelinizasyon süreci doğum sonrası birinci yıla kadar uzayabilir.

Periferik sinir sistemin yapıtaşını nöron denilen ektodermal kökenli hücreler oluşturmaktadır. Nöronlar akson ve dendrit denilen sitoplazmik uzantıları ile diğer nöronlar ve görev yaptığı son organlar arasında fonksiyonel iletişim kurmaktadır. Dendritler sinaptik terminaller oluşturacak şekilde nöron yüzeyini kaplamıştır. Nöronlarda genellikle bir adet bulunan akson aksolomma denilen trilaminar bir membran ile sarıdır. Nöronun çekirdeği, endoplazmik retikulumu ve mitokondrisi dışındaki organelleri aksoplazmada yer alır. Ayrıca aksoplazmada nörotübüller ve mikrofilamanlardan oluşan bir transport sistemi vardır. Transport hem akson distaline (anterograd) hem de nörona doğru (retrograd) yönde gerçekleşmektedir. Anterograd taşınma aksonun yaşaması ve fonksiyon görmesi için gerekli maddeleri gövdeden perifere taşıırken, retrograd taşıma aksonda oluşan metabolik ürünleri ve fonksiyonları biten prelizozomal maddeleri gövdeye taşımaktadır. Yavaş ve hızlı transport mekanizmaları mevcuttur (35). Nöronlardaki iletinin temelini oluşturan elektriksel aktivite Na-K ATP'az pompaları yardımı ile oluşan bir süreçtir. Bu pompa kapıları aksolommanın içi ve dışı arasında elektriksel bir gradient farkı yaratırlar ve sonuçta oluşan aksiyon potansiyeli akson boyunca ilerler. Bu impuls nöronun aksonla birleştiği konik bölgede başlamaktadır. Bu bölge miyelinsiz bir bölgedir ve daha fazla Na-K ATP'az pompası içerir (36,37).

Periferik sinir içerisinde aksonlar Schwann hücreleri (SC) ile çevrilidir ve bu hücreler periferik sinir sisteminin temel destek hücreleridir. Schwann hücreleri ekstrasellüler matriks proteinlerini salgılayarak çevre düzenini sağlarlar. Bu salgılar ince bazal lamina tabakasını oluştururlar. SC ve bazal lamina birlikte Büngner bandı olarak adlandırılır ve rejenere olan aksonlar için nörotropik destek ve fiziksel rehber oluşturur. Hatta donör sinir grefti hasarlanmış sinir ucu SCBL tabakasında yer alan ve majör bir glikoprotein olan laminin'e yapışır. Çalışmalar göstermiştir ki akson ve reinnervasyon olmaksızın SC yeni laminin üretebilmektedir. Laminin'in sinir rejenerasyonunu ve adhezyonunu hızlandırdığı gösterilmiştir (38). Lamininin yanısıra SC akson etrafında ekstrasellüler matriks ve diğer hücreler arasında iletişim sağlamak için Tip IV ve Tip V kollajen, entaktin, heparin sülfat, proteoglikan ve fibronektin salgılamaktadır. Bu maddelerden sadece laminin basal laminanın iç tabakasında yer alır ve rejenere olan akson ile doğrudan ilişkilidir. Ancak SC myelin kılıf üretebilmesi için içeriden akson ile dışarıdan ise ekstrasellüler matriksle ilişkide bulunması gerekmektedir (laminin-reseptör-laminin-kollajen bağı). Lamininin diğer hücre tiplerinde

migrasyon, adhezyon, proteolizis gibi pek çok görevi olduğunda gösterilmiştir. Periferik sinirde laminine bağlanan reseptör tiplerine rastlanmıştır (38).

Periferik sinir lifleri myelinli veya myelinsiz yapıda olabilirler. Myelinli sinirlerde myelin tabakası Schwann hücreleri tarafından yapılır. Myelinli aksonlarda myelinli bölümler arasında Ranvier boğumları vardır. Bu boğum bölgelerinde adhezyon molekülleri ve sodyum iyon kanalları bulunur. Ranvier boğumları elektriksel iletinin atlayarak aktarılmasından sorumludur ve böylece elektriksel iletinin akson boyunca hızlandırılmasını sağlar. Bir sinirin myelinizasyon miktarı onun ileti hızına da etki eder. Kalın myelinli liflerde ileti hızı ince liflere oranla daha fazladır. Schwann hücreleri tarafından üretilen myelin elektriksel iletimin akson boyunca yayılma hızını artırır. Akson çapı arttıkça üzerindeki myelin kılıfta büyür ve elektriksel iletim hızı artar. Myelinsiz aksonda ileti hızı 2 – 2,5 m/sn iken myelinli sinirlerde 3 – 150 m/sn dir (40). Myelinsiz nöronlarda Schwann hücresi çok sayıda nöronu sararken, myelinli sinirlerde tek bir nöron sarılmaktadır. Schwann hücreleri sayısal olarak artmamakla birlikte yaş ile hücre volümü genişlemektedir.



Şekil 2.1 Periferik sinir anatomisi (Myckatyn T.M. ve ark. 2007)

Akson ve Schwann hücrelerinden oluşan periferik sinir lifleri birleşerek fasikül denilen küçük demetleri oluşturmaktadır. Bu sinir lifleri fibroblast, mast hücreleri, kapiller kan damarları ve kollajenöz ara maddelerden oluşan ve endonöryum denilen bir kılıf ile sarılıdır. Endonöryum fasikül içerisinde yer alan aksonların etrafını sardığı gibi fasikül içerisindeki interstisyel boşluğun tamamını doldurur. SC basal laminası çevresindeki iki kat kollajen lif tabakası ile endonöryal kılıfı oluşturur. Kollajen lifler longitudinal yerleşimlidir ve 4:1 oranında Tip I (büyük interstisyel mikrofibril) ve Tip III (endonöryal retikülin) ve az miktarda da Tip IV ve Tip V kollajen bulunur. Büyük myelinli bir lif etrafında içten dışa Schwann hücresi basal laminası, sirküler ve oblik duran kollajen lifler (Plenk-Laidlaw kılıfı) ve en dışta longitudinal kollajen lifler (Key-Retzius kılıfı) bulunmaktadır. Endonöryumda bulunan kapillerler sıkı bağlantılar (tight junction) yapar ve kan-sinir bariyeri oluşumuna katılır, endonöryal sıvı proksimodistal basınç farkları boyunca hareket edebilir. Travmaya bağlı olarak gelişen intraperinöryal (endonöryal) ödem intrensek dolaşımda bozukluklara yol açabilir (41,42). Endonöryum çevreden izole iyonik bir ortam sağlamada önemlidir. Periferik siniri oluşturan fasiküller perinöryum denilen bağ dokusu ile sarılıdır. Perinöryum çoğunlukla Tip III kollajen lifler ve daha az miktarda Tip I kollajen içermektedir. Fibroblast kaynaklı yassılaştırmış poligonal hücrelerden oluşan lameller yapısı vardır. Lameller farklı özellikler gösterirler. Fasikül büyüklüğü ile lamellerin sayısı doğru orantılıdır. Perinöryum periferik dallanmayı takip eder ve son dala gelindiğinde tek perinöral hücre ile lif çevrilir (Henle kılıfı). Yüzey lamelleri geçirgen özellikler taşıırken derin lameller kan-sinir bariyeri içeren vasküler yapılara ve özelliklere sahiptir. Perinöryum kapillerleri basal membranlarında sıkı bağlantılar ihtiva ederler. Aynı kan-beyin bariyerinde olduğu gibi kan-sinir bariyeri de osmotik ajanlarla geçici olarak açılabilir. Perinöryum normalde hafif derecede interstisyel basınç nedeniyle çevresel bir gerginlik altındadır. Travmalar nedeniyle perinöryum iç basıncı önemli derecelerde artabilir. Yüksek basınç perinöryumu belli alanlarda parçalayabilir ve sinir lifleri bu alanlardan dışarı herniye olarak demiyelinize olabilirler. Perinöryum içerisinde bulunan sinir hücrelerini gerilmelere karşı korur. Gerilme esnasında yükün önemli kısmını karşılar. Gerilme ile perinöryum kopmadan önce sinir liflerinin kopma olasılığı yok sayılabilecek kadar azdır. Perinöryum hem mekanik bariyer hem de elektrolit dengesini sağlayan bir diffüzyon bariyeridir. Kan-beyin bariyeri periferik sinirin spinal korddan ayrıldığı yerden başlayan kan-nöron bariyeri ile devam etmektedir. Bu oluşumu distalde perinöryum ve endotel tabakası yapar. Görevi nöral beslenmeyi sürdürecektir mikroçevreyi oluşturmaktır (43).

Periferik sinirin enine kesitinde en dışta sinirin bütününi örten epinöryum tabakası yer alır, yoğun Tip 1 kollajen içeriği ile sağlam bir yapıdır ve sinir bütünlüğünün korunmasında en önemli görevi üstlenir. Sinire giren damarlar epinöryum üzerinde arteriyoller oluştururlar ve bu arteriyoller sayesinde sinirin beslenmesi sağlanır. Epinöral arteriyollerin endonöral kapiller yapılarla doğrudan anastomozları vardır. Epinöryumdaki damarlar kan-sinir bariyeri içermez. Fasiküllere hareketlerinde ve dış travmalara karşı destek görevi olan koruyucu bağ dokusudur. İ ve dış olarak iki katmanı vardır. İç katman daha çok perinöral aralıklara septalarla tutunarak stabilizasyonu sağlarken dış katman yoğun bağ dokusu ile koruyucu kılıfı oluşturmaktadır (44). Tüm bu yapıların oluşumunda Schwann hücreleri tarafından salınan Desert Hedgehog (dhh) molekülleri kilit fonksiyon göstermektedir. evre bağ dokuları tarafından dhh moleküllerinin algılanmasını takiben sinir liflerinin sarılması ile oluşmaktadır. Bir sinirin kesit alanının %25–85 kadar kısmı bağ dokudan oluşmaktadır (45). Mezonöryum artık birçok araştırmacı tarafından da kabul gören en dış katmanı oluşturmaktadır. Periferik sinir doku içerisinde mezonöryum denilen gevşek areolar yağ dokusu yastıkçığı içerisinde seyreder. Bu tabaka siniri künt darbelerden koruyan ve siniri diğer dokulardan ayıran en dıştaki dokudur ve epinöryum ile ilişkisi olduğu düşünölmektedir. Mezonöryum perinöral vasköler pleksusu taşıtmaktadır ve sinir fasikölünün hareketle sürtünmeden zarar görmesini engellemektedir. Periferik sinirlerin beslenme paterni Bridenbach ve Terzis tarafında araştırılmıştır. Bu çalışmada periferik sinirler dominant pedikölün tek olması, olmaması veya çok sayıda olmasına göre sınıflandırılmıştır (46). Bu vasköler pediköller mezonöryum içinde seyreder ve valv benzeri yapılar taşırlar. Kan akımı bu damarlardan vazo nervorumlara akmaktadır (47).

Sinirdeki fasiköl sayısı sinir boyunca ve bireysel olarak farklılıklar göstermektedir ve birbirleriyle bağlantılar kurarak intranöral pleksuslar oluşturmaktadırlar (48). Duyu sinirleri özelleşmiş duyu reseptörlerinde, motor sinirler ise motor son plaklarda sonlanmaktadırlar. Sherington bir sinir lifi ve innerve ettiği kas lifi grubunu motor ünite olarak tanımlamıştır. Burada sözü edilen alfa motor siniri olup her bir sinir lifi için 10–1000 arası ektrafüzal kas lifi düşmektedir. Aralığın bu kadar geniş olması kas grubunun görev ve uyarılara yanıt verme hızına bağlıdır (49). Miyelinli alfa motor nöronları kasa girdiği lokalizasyonda motor ünitenin fonksiyon özelliğine göre çok sayıda dala ayrılır. İntramüsköler dallanmadan sonra sinir lifleri miyelinsizdir. Bununla birlikte Schwann hücreleri akson uçlarını evre bağ dokudan ayırmaya devam etmektedir. Akson terminalinde, aksolemma ile sarkolemma arasında sinaptik boşluk denilen bölgeler bulunmaktadır. Bu terminal uçlar çok sayıda asetilkolin veziköllerini ve

mitokondriler içermektedir. Bu motor son plaklar aksonda oluşan depolarizasyonun kasa iletildiği fonksiyonel ünitelerdir (50).

Periferik sinir vaskülarizasyonu ekstrensek dolaşım ve intrinsek dolaşım olarak ikiye ayrılır. Ekstresek dolaşım epinöryal alandaki arteriol ve venüllerden oluşur. Bu damarlar sinirin dış kısmında mezonöryumda yer alırlar ve sinire besin taşırlar ayrıca intrinsek dolaşım ile bağlantıları vardır. Sempatik uyarıdan ve parsiyel CO₂ basıncından etkilenirler. İntrensek dolaşım ise endonöryal büyük kapillerlerden oluşur. Epinöryum, perinöryum ve endonöryumda longitudinal ve oblik anastomozlar yaparlar. Prekapiller sfinkter olmadığından dolaşımın yönü değişebilir. Best ve arkadaşları sıçanda yaptıkları 2 cm'lik siyatik sinir greftleme çalışmasında greftleme sonrası endonöryal perfüzyonun 72 saat devam ettiğini, buna karşın epinöryal perfüzyonun ise 48 saat devam ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışma bize epinöryal perfüzyonun daima endonöryal perfüzyonu takip ettiğini göstermiştir (51,52).

2.2 PERİFERİK SİNİR YARALANMASI

2.2.1 Klinik Değerlendirme

Periferik sinirler termal, kimyasal, mekanik nedenlerle hasar görebilir. Periferik sinir yaralanmasının en sık nedeni travmadır. Trafik kazaları, ateşli silah yaralanmaları, kesici-delici alet yaralanmaları etyolojik faktörler arasındadır. Travmaya maruz kalan hastaların % 2,8'inde periferik sinir hasarı oluşmakta ve bunların birçoğu uzun süreli fonksiyon kayıpları ile sonuçlanmaktadır (2). Ekstremitelerin açık yaralanmalarının % 5'inde ciddi tedavi gerektiren periferik sinir hasarı olduğu, yaralanmanın sıklıkla üst ekstremitede ulnar veya median sinirde olduğu bildirilmiştir. Alt ekstremitede ise en sık peroneal sinir hasarı oluşur (3).

Kronik basıların yol açtığı tuzak nöropatiler (karpal tünel sendromu, ulnar sinir tuzak nöropatisi v.b.) ikinci sırayı almaktadır. Tedavi amaçlı yapılan enjeksiyonlar sonrası da periferik sinirler hasarlanmaktadır. Bunların dışında elektrik hasarı ve yanıklar, metabolik nedenler (diyabet, üremik nöropati, amiloidoz), toksik nedenler (ilaçlar, alkol, kurşun zehirlenmesi), enfeksiyöz hastalıklar (AİDS), tümörler, radyasyon, herediter hastalıklar etyolojik nedenler arasında sayılabilir. Perioperatif basılar nedeniyle olan periferik sinir yaralanmaları da hem alt hemde üst ekstremitelerde görülebilmektedir (53).

Periferik sinir içerisindeki tüm sinir lifleri aynı derecede yaralanmaya uğrayabileceği gibi yaralanmanın şiddetine ya da tipine göre aynı sinir içerisindeki farklı lifler farklı derecede yaralanmaya da uğrayabilir.

Periferik sinir tamiri sonucu iyileşmenin zamanı ve başarısı yaralanmanın derecesine bağlıdır. Klinik olarak kullanılabilir hasar derecelendirme sistemi sinir yaralanması sonrası sinirde gelişen mikroskopik değişiklikler ve hastanın kliniği ile ilişkilidir. Periferik sinir yaralanmalarında ilk kez 1941 yılında Cohen tarafından önerilen ve 1943 yılında Seddon tarafından bildirilen nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis tarzındaki üçlü ve basit sınıflama yaygın şekilde kabul görmüştür (Tablo 2.1) (54).

Seddon sınıflamasına göre en hafif zararlanma türü “nöropraksi” olup motor ve duysal kayıp olabilmekle birlikte Wallerian dejenerasyonu bulgusu yoktur. Tuzak nöropatilerinde görülen hasar tipidir. Çok zor tespit edilebilen segmental demyelizasyon gibi myelin yapılarıdaki değişikliklere rağmen bu tip hasarlanmada semptomların geçici olma nedeni yaralanma yerinde lokal olarak iletimin kesintiye uğramasından kaynaklanır. Yaralanmanın proksimalinde ve distalinde sinir normal ilettime sahiptir. İletim bloğu söz konusudur. Sinir devamlılığında kesilme yoktur. Saatler, günler, haftalar veya aylar içinde düzelir. Konservatif tedavi yeterlidir. “Aksonotmezis” sinir çevresindeki mezenşimal yapılar olan perinöryum ve epinöryum korunarak sinirin akson ve çevresindeki myelin kılıfta komplet kesilme olduğunda oluşan hasardır. Trafik kazalarında veya ateşli silah yaralanmalarında daha yaygın görülen bir yaralanmadır. Akson ve myelinde yaralanma noktasının distalinde oluşan Wallerian dejenerasyon komplet denervasyona neden olur. Akson ve myelin kılıfı hasarlıdır fakat çevreleyen doku kısmen veya tamamen sağlamdır. Waller dejenerasyonu oluşur fakat düzelme çevre dokulardaki hasara ve kasa uzaklığına göre değişir. Bu tip yaralanmanın trafik kazaları, ateşli silah yaralanmaları, akut ezilme ve kronik kompresyon gibi çok sayıda nedeni vardır. Bu tip yaralanmada iyileşme oranı yüksektir çünkü sinir çevresindeki hasarlanmamış mezenşimal dokular bir kafes görevi görerek hedef organın reinervasyonu için aksonların filizlenmesine kılavuzluk eder. Aksonotmezis için Sunderland sınıflamasına göre daha ayrıntılı prognoz belirlenmesi yapılabilir. “Nörotmezis” ise sinirin ya tamamıyla kopması ya da aksonal rejenerasyonu olanaksız kılacak şekilde nedbe dokusu oluşumunu tanımlar. Cerrahi tamir olmadıkça düzelme olanaksızdır (55,56). Çünkü aksonların yeniden uzaması için kılavuzluk edecek mezenşimal doku kaybı olmuş ve skar dokusu oluşmuştur. Bu basit sınıflama günümüzde özellikle akut yaralanmaların sınıflandırılması, tedavisi ve takibi için halen geçerliliğini korumaktadır (57).

Tablo 2.1 Periferik sinir yaralanmasında Seddon ve Sunderland sınıflaması

Seddon Sınıflaması	Sunderland	Patoloji	Prognoz
Nörapraksi	Birinci derece	Miyelin zararı	Haftalar, aylar içinde mükemmel düzelme, iyi prognoz, cerrahi tedavi gerekmez
Aksonotmezis		Akson kaybı Değişik derecede bağ doku hasarı	Destek dokuların korunmasına ve kasa olan mesafeye bağlı olarak iyiden kötüye değişebilen prognoz, cerrahi tedavi genellikle gerekmez
	İkinci derece	Akson kaybı Endonöral tüpler sağlam Perinöryum sağlam Epinöryum sağlam	Kasa olan mesafeye bağlı olarak iyi prognoz
	Üçüncü derece	Akson kaybı Endonöral tüpler hasarlı Perinöryum sağlam Epinöryum sağlam	Kötü prognoz Aksonlar hatalı yöne gidebilir Cerrahi gerekebilir
	Dördüncü derece	Akson kaybı Endonöral tüpler hasarlı Perinöryum hasarlı Epinöryum sağlam	Kötü prognoz Aksonlar hatalı yöne gidebilir Cerrahi sıklıkla gerekir
Nörotmezis	Beşinci derece	Akson kaybı Endonöral tüpler ağır hasarlı Perinöryum ağır hasarlı Epinöryum ağır hasarlı	Spontan iyilik olmaz Cerrahi gereklidir Cerrahiden sonra prognoz belirlenir

Hasarın şiddetine göre Sunderland'ın bildirmiş olduğu 5 kategoriden oluşan hasarın sınıflandırılması sistemi, Seddon'ın sınıflandırma sistemi içinde değerlendirilebilir (58). Sunderland sınıflaması Seddon sınıflamasının bir modifikasyonudur. (Tablo 2.1 ve Şekil 2.2) Sunderland aksonometrik hasarları alt derecelere ayırmıştır ve günümüzde en çok kullanılan 2.sınıflandırma sistemidir (59).

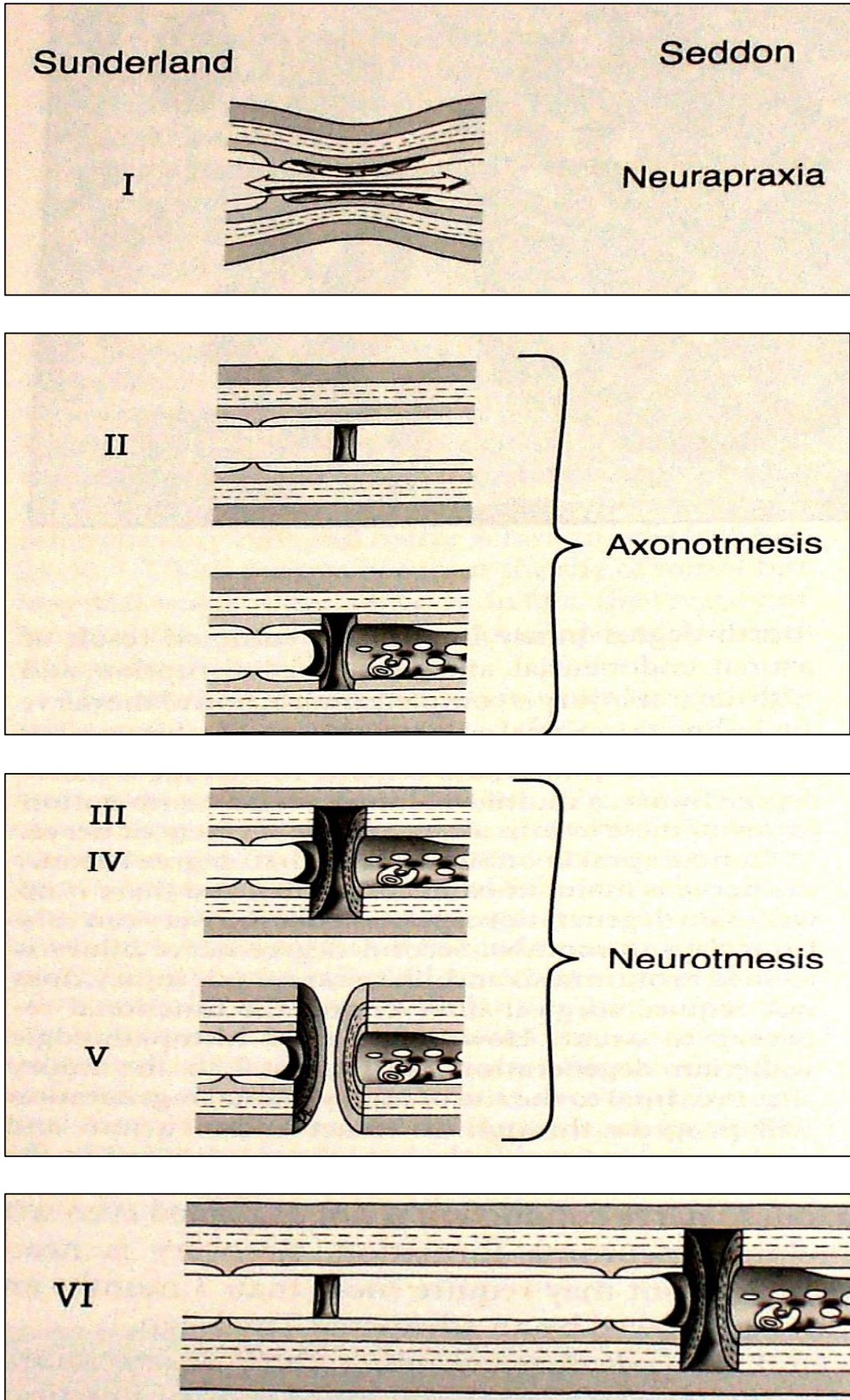
Sunderland Sınıflaması

1. Birinci derecede olan hasar Seddon'ın sınıflandırmasında nöropraksi ile eş değerdir.
2. İkinci dercede olan hasar ise aksonotmezis karşılığıdır.
3. Üçüncü derece sinir hasarında aksonlarda bozulma ve parsiyel endonöryum hasarı vardır ve Seddon'ın sınıflandırmasında aksonotmezis ile nörotmezis arasında yer alır. Bu tip hasar kronik kompresyon, akut ezilme yada gerilme sonucunda oluşur. Bu hasar da endonöryumda ve Schwann hücrelerinin bazal laminalarında hasar vardır. Perinöryum intaktır ancak gelişmekte olan filizlenmeler endonöryum ve Schwann hücrelerinin hasarlanması yüzünden oluşan skar dokusu boyunca ilerlemek zorundadır. Bu durumda rejenerasyonun tam olmamasına ve rejenere olan sinir liflerinin yanlış distal reseptörlerle eşleşmesine sebep olabilir. Sağlam kalmış perinöryum yeniden büyüyen sinir liflerini sınırlar. Bu tip hasarda ki fonksiyonel iyileşme tam olmayabilir. Yeniden büyüyen sinir liflerinin büyüme hızı ikinci derecede (1-2 mm/ gün) olduğu gibidir. Ancak skar dokusu boyunca ilerlemek zorunda olduğundan büyüme hızı buna bağlı olarak daha yavaş olmaktadır.

Sunderland Seddon'ın nörotmezisini dördüncü ve beşinci derece olarak değerlendirmiştir.

4. Dördüncü derece sinir hasarında epinöryum hariç sinirin tüm bölümleri hasarlanmıştır. Bu tip hasarın en sık sebepleri esneme ve akut ezilmedir. Sinir içindeki skarlaşma ileri derecededir ve sinir liflerinin yeniden büyümesini kısıtlar. 3 ay sonunda birinci, ikinci ve üçüncü derece hasarlarda iyileşme ile ilgili bazı kanıtlar belirir. Eğer üç ay sonunda herhangi bir iyileşme söz konusu değilse o zaman bu yaralanma dördüncü derece kabul edilir. Bu durumda cerrahi müdahale gerekmektedir.
5. Beşinci derece hasarda ise sinirin tamamı kopmuştur. Bu iki grubun cerrahi tedavi olmaksızın iyileşmesi mümkün değildir (60).

Altıncı derece hasar yakın zamanda eklenmiştir (61). Bu tip yaralanma mikst tip yaralanmadır ve bazı fasiküller veya liflerde birinci veya ikinci derecede, bazılarında da üçüncü, dördüncü, veya beşinci derecede hasar olabilir.



Şekil 2.2 Periferik sinir yaralanmasında Seddon ve Sunderland sınıflaması

2.2.2 Dejenerasyon

Travmatik bir sinir hasarından sonra morfolojik ve metabolik değişiklikleri de kapsayan birçok fizyopatolojik olay meydana gelir. Bu değişiklikler sinir hücresinde hasarın distali ve proksimalindeki aksonlarda görülür. Aynı zamanda kas, duyu reseptörleri ve serebral kortekste de değişiklikler meydana gelmektedir.

Periferik sinir yaralanması sonrasında aksonda hem proksimal hemde distal yönde dejenerasyon gelişir, bu değişiklikler hücre proliferasyonundan ziyade tek bir sinir kompleksinin yapısını ve iletim işlevini korumak amaçlıdır. Gelişen dejeneratif süreç ve fizyopatolojik değişikler sinirin yaralanma bölgesinin proksimalinde ve distalinde ayrı ayrı incelenebilir (62). Ayrıca merkezi sinir sisteminde de değişiklikler görülür ve bazı nöronlar ölür (63). Hasarlı bölgenin proksimal tarafında sinir hücre gövdesindeki ve sinir fibrillerindeki değişiklikler yaralı segmentin hücre gövdesine yakınlığına ve yaralanmanın şiddetine bağlıdır. Proksimal hasarlar daha fazla santral nöron kaybına yol açmaktadır. Ayrıca kutanöz duyu afferentleri gibi bazı nöron grublarının diğerlerine göre periferik sinir hasarına daha duyarlı oldukları gösterilmiştir (64,65). Schwann hücreleri yaralanma bölgesinin yanında proksimal segment boyunca azalır, aksonlar ve myelin kılıfların çapı görülebilecek düzeyde küçülür. Bu proksimal hücre azalması ya çok az olabilir yada azalma geriye hücre gövdesine doğru yayılabilir. Özellikle fonksiyonel bağlantının koptuğu son organla yeniden bağlantı oluşmazsa yaralanmanın belirgin bulgularından biri olan proksimal segment aksonlarının çaplarında küçülme oluşur. Buna bağlı olarak sinir iletim hızı azalır. Rejenerasyon döneminde aksonal çapta artış olur ancak hiçbir zaman hasarlanmadan önceki boyutlarına erişmez. İyileşme döneminde aksonlarla hücre gövdelerinin iyileşmesi kesinlikle birbirine bağımlıdır. Fonksiyonel periferik bağlantı olmadan hiçbir zaman hücre gövdesi tamamen iyileşmezken aksonların çapının büyüklüğü hücre gövdesinin iyileşmesine bağlıdır (66). Yaralanma sonrasında proksimal uçta en azından ilk ranvier düğümüne kadar retrograd bir dejenerasyon gelişir. Aksonal yaralanmayı takip eden ilk 6 saat içinde sinir hücresinde değişikler meydana gelmeye başlar. Nükleusun periferik yerleşmesi ve stoplazma yapısında değişmeler fark edilir. Hücrenin kendisi, çekirdek ve çekirdekçik büyür. Hücrenin periferine Nissl granüllerinin göçü olur, endoplazmik retikulum pürtüklü bir yapıya döner ve daha sonra parçalanıp yayılır. Bu olaylar zincirine kromatolizis denir. Hasar görmüş aksonun tamiri için gerekli olan aksonal yapısal komponentlerin üretilmesi için salgılanacak olan nörotransmitterler hücrenin metabolik fonksiyonunca sağlanır. Bu süreç artmış RNA, protein

komponentleri, lipidler, glikoz 6-fosfat dehidrojenaz ve hidrolitik enzimlerce sağlanır (67,68). Hücre membran proteinleri ve Growth-Associated Proteins (GAP) büyüme faktörleri sentezinde artış olur. Eş zamanlı olarak perinöral glial hücrelerin etkili proliferatif cevabı olur ki çoğu zaman kromatolizisin bir işareti olarak bilinir. Glial hücre gelişimi muhtemel iyileşme evresinde siniri korumak için etkilenmiş sinir ve kesilmiş sinaptik bağlantıya doğru gelişir.

Perinöryum dejenerasyonda önemli rol oynar. Aksonlar içerisinde ödem ve şişmeyi strüktürel olarak önler ve ilerideki anastomotik zonda longitudinal oryantasyonu sağlar (69,70). Kesiden kısa bir süre ve Wallerian dejenerasyondan hemen önce kesi alanında “kimyasal yanma” denilen hızlı travmatik dejenerasyon oluşur. Bu hasar sodyum ve kalsiyumun içeri girmesine ve protein ile potasyumun masif kaybına ikincil gelişir ve rejenerasyon akson tomurcuğunun ve büyüme konisinin hemen önünde yerleşerek distale ulaşmalarını engeller (71,72). Aksonotmezisi takiben gelişen dorsal kök ganglion nöronlarında hücre ölüm insidansı % 20 ile % 50 arasındadır (73). Yaralanma duysal ve kranial sinirleri içeriyorsa ve aksonotmezis proksimalde oluşuyorsa sıklıkla hücre ölümü olur. Nöronal hücre ölümlerini içeren yaralanmanın bu süreci tam olarak anlayamamıştır ancak yaralanma bölgesinin mikroçevresinin içindeki şartların bu süreçte önemli olduğuna inanılmaktadır. Yapılan çalışmalar merkezi sinir sistemindeki nöronların periferik çevrede bir rejenerasyon kapasitesine sahip olduğunu ancak periferik sinirin santral çevrede rejenerasyon kapasitesini kaybettiğini göstermiştir. Moleküler çalışmalar yapan yazarlar yaralanmadan sonra hücrelerin yaşamını sürdürmelerinde Schwann hücrelerinin önemli rol oynadığını göstermişlerdir (74,75).

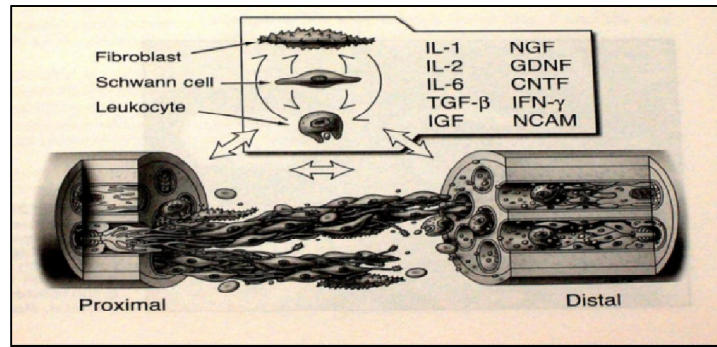
Yaralanma sonrası distal uçta meydana gelen değişikliklere Wallerian dejenerasyon adı verilir ve yaralanma distalinde kalan aksonun tamamını etkiler. Aksonal dejenerasyon myelin yıkımı ve destek glial hücre proliferasyonundan oluşan bir süreçtir. Önce akson ve ardından çevresindeki myelin kılıf dejenerasyon olur. Akson ne kadar distalde kesintiye uğrarsa Wallerian dejenerasyonu o kadar erken gelişir. Dejenerasyon sonrasında proksimal uç için tropizm oluşturan bir alan oluşmaktadır. Schwann hücreleri Wallerian dejenerasyonda kilit rol oynar. Yaralanmadan sonraki 24 saat içerisinde aktive olurlar. Nükleus ve sitoplazmalarında genişleme mitoz hızlarında artış olur. Bu hücreler dejenerasyon ve onarım sürecinde yardımcı eden birçok molekülün gen düzenlenmesini kontrol eden hücreleri oluşturmak için hızla bölünür. Schwann hücrelerinin ilk baştaki rolü dejenerasyon olan akson ve myelinlerin temizlenmesi ve bunların makrofajlara geçişlerine yardımcı etmektir. Makrofajlar primer olarak hemopoetik akstan hasarın olduğu bölgeye toplanırlar ve geçirgenliği artmış olan kapiller duvarından hasarlı bölgeye geçerler. Daha sonra Schwann hücreleri ve makrofajlar bir hafta

ile birkaç ay boyunca fagositoz ve hasarlı bölgeyi temizlemek için birlikte çalışırlar. Endonöral yapısal hücreler travmadan sonraki iki hafta içerisinde süregelen bu değişikliklerde merkezi rol oynamak için önemli ölçüde çoğalırlar. Bunlar kapiller geçirgenliği artıran ve makrofajların göçünü sağlayan histamin ve serotonin salgılayıcılar. Wallerian dejenerasyonda ilk olarak oluşan histopatolojik değişiklik, yaralanmadan sonraki saatler içinde oluşan aksonlarda ve myelinlerdeki fiziksel parçalanmadır. Yapısal olarak tüm nörotübülüs ve nöroflamanlarda düzensizlik oluşur ve aksonların kenarları genişlemiş kabarcıklar gibi düzensiz bir hal alır. Yaralanmadan 48 ile 96 saat sonra aksonal devamlılık kaybolur ve impulsa iletiminin devamı olanaksız hale gelir. Myelinlerin parçalanması yavaş bir şekilde çoğunlukla aksonlardan 36 ile 48 saat sonra oluşur. Makrofajlardan salınan moleküler ürünler Schwann hücrelerini önce fagositoz sonrasında da rejenerasyonda rol alacak şekilde aktive eder. Bundan sonra inflamatuvar araçların rol aldığı karmaşık bir moleküler haberleşme mekanizması dejenerasyonun tamamlanmasını ve sonunda gelişecek rejenerasyonu düzenler (76,77).

Ekstraselüler matrikste bulunan nöron kaynaklı mitojenler ile SC farklılaşır ve sayıca artar. Schwann hücreleri sıra halinde dizilirler ve etraflarını basal lamina sarar, bu yapıya endonöral tüp veya Büngner bantları adı verilir. Bu kolonlar tomurcuklanan akson için yolak oluştururlar. Wallerian dejenerasyon sırasında iki ana protein salgılanır: NGF ve Laminin. Schwann hücreleri üzerinde NGF basal laminalarında ise laminin için reseptör bulunmaktadır. Kesiden sonra mRNA düzeyinde belirgin artma olur. Makrofaj tarafından salınan IL-1, NGF sentezini uyarır. NGF reseptör kontrolü Schwann hücrelerinde aksonal kontakt ile sağlanmakta kontakt olmazsa sayıda artış, kontak kurulursa sayıda azalma görülmektedir (78). NGF reseptörleri duyu sinirlerinde önemli rol oynarken motor sinirler varlık yada yokluğuna duyarsızdır. Bu iletişim büyüme konisini harekete geçirir ve hücre gövdesine yönelmesini sağlar. Böylece rejenerasyon için ilk adım atılmış olur. Kesiden sonraki ilk birkaç günde akson-gliyal hücre etkileşimine aracılık ettiği düşünülen bazı moleküller yeniden düzenlenmekte yada distal uç içinde yeniden tanımlanmaktadır (79). Kesiden üç gün sonra çoğu Schwann hücresinde L1 nöral hücre adhezyon molekülleri ve N-CAM yeniden görülmektedir. L1'in sinir büyümesinin desteklenmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İn vitro çalışmalarda NGF'nin tersine büyüyen bir aksonu kendi yönüne çevirebildiği gösterilmiştir. Ayrıca distal uçta bulunan Schwann hücrelerinin NGF salgıladığı ve bu maddenin de nörotropik etkisi olduğu gösterilmiştir.

IL-1 (interlökin-1) ve TNF-alfa (tumor necrosing factor-alfa) inflamatuvar sürecin başlamasında ve devam etmesinde, myelin debrisin ortadan kaldırılmasında merkezi bir rol oynamaktadır (80,81,82,83). IL-6 ve IL-10 mRNA miktarlarında artışlar saptanmış, bir çalışmada SC tarafından da IL-6 salgılandığı tespit edilmiştir (84,85,86,87). IL-6 ile nörotrofinler arasında bir yolak olduğu in vitro çalışmalar tarafından desteklenmektedir (88,89). IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, İnterferon-gama, GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) gibi başka pek çok sitokin ve kemotraktanların bu süreçte rol aldığı düşünülmektedir. Bu moleküllerin bir kısmı pro-inflamatuvar rol oynarken bir kısmı anti-inflamatuvar rol oynamakta, bir kısmı da nörotropik faktörlerin salınmasında inflamatuvar süreçle olan bağlantıyı sağlamaktadır. Bu kaskadın sonucu öncelikle Wallerian dejenerasyonun tamamlanmasıdır. SC'lerin aktive olması ve rejenerasyondaki kilit rollerini üstlenebilmeleri için dejenerasyonun tamamlanması gereklidir. Bu süreçler hem eş zamanlı hem de ardışık olarak gerçekleşmektedir ve dejenerasyon, rejenerasyonun ön şartı olarak gözükmektedir.

Sonuç olarak, proksimal sinir ucunun rejenerasyon sırasında distal uçtan salınan soluble target-derived nöronotrofik faktörler tarafından uyarıldığı, desteklendiği ve yönlendirildiği anlaşılmaktadır.



Şekil 2.3 Dejenerasyon sürecinde rol oynayan hücreler ve inflamatuvar sitokinler

2.2.3 Rejenerasyon

Sinir kılıfının devamlılığının korunmuş olması halinde dejenerasyonu takiben sinir hasarlandığı yerin distaline doğru günde yaklaşık 1 mm hızla rejenerer olur. Aksonun kesintiye uğrayan kısmından distale doğru rejenerer olan kısım aksonun ilk haline göre daha ince myelinlidir ve internodal aralıklar daha kısadır.

Schwann cell rejenerasyonda merkezi rol oynamaktadır. Proksimal büyüme konisi için distal uçta meydana gelen tropizmin gerçekleşmesi, gerek inflamatuvar sürece olan katkıları

gerekse de başta NGF (nerve growth factor) olmak üzere nörotropik faktörlerin salınımı ve düzenlenmesindeki görevleri son derece önemlidir. SC yokluğu durumunda akson büyümesi ya başarısız olur ya da çok azalır. Fibroblastlar ve basal lamina kendi başlarına yeterli değildir. Makrofajlar normal bir sinir lifinde % 5 oranında bulunur. Schwann hücreleri ve makrofajlar myelin degradasyonu için ortak çalışırlar. Schwann hücreleri makrofajlara myelinin bazı komponentlerini sunarken makrofajlarda Schwann hücrelerine ya bir mitojen olarak ya da remyelinizasyonda yeniden kullanım için myelin kökenli ürünler sunar. Ayrıca makrofajlar hem ApoLipoprotein E debrisini temizler hemde kapiller endotel hücre davranışlarını etkileyen TNF-alfa salınım ve sentezini tetikleyerek anjiojenezi artırır. Makrofajlar Schwann hücrelerine sundukları mitojenler ile onların proliferasyonunu indükler.

Dejenere olmuş aksonlar yerlerine boş endonöral tüp bırakırlar. Myelinli aksonlar takip eden birkaç gün içinde terminal tomurcuk ve kollateraller oluşturarak endonöral tüp boyunca ilerler. Büyüme konileri bir yanda basal lamina ile diğer yanda ise Schwann hücresi ile temastadır. Bu tomurcuklanmanın adına “rejenerasyon ünitesi” adı verilir ve tek bir SC ve basal laminası birden çok rejenerasyon ünitesini çevreleyebilir. İkinci basamak ise kompartmanlaşmadır. Proksimal uç küçük fasiküllere ayrılır ve beraberinde SC, perinöral hücreler ve endonöral fibroblastlar arasında metaplazi gelişerek mikroçevreyi ve kan-sinir bariyerini tekrar sağlamak amaçlanır. Sinir kesisi sonrasında kesinin en az 3.5 cm proksimalinde endonöral fibroblastlar ve SC çevresel olarak uzarlar ve rejenerasyon ünitelerini çevreleyerek kompartman halini alırlar. Bu mekanizma sinir tomurcuğunun aralarına girerek rejenerasyon yolu boyunca devam eder. Yapılan bir çalışmada sinir greftlemede kullanılan otogreftlerde kompartmanlaşma tespit edilirken allogreftlerde saptanamamıştır. Bunun sebebinin yıkılan kan-sinir bariyeri nedeniyle oluşan antijen-antikor reaksiyonu ve rejenerasyonda ertelenme olarak gösterilmiştir (56,72,79). Bu dönemde distal uçta kesiden 3 gün sonra Büngner bantlarının oluşması için hızlı bir SC proliferasyonu ve mitozu görülür. İkinci mitoz safhası ise myelin yapımından hemen önce proksimal ve distal uçlar birbirlerine kavuşunca gerçekleşir. Bu karşılaşmanın hızı insanda yaklaşık 1mm/gün, sıçanda ise 3mm/gündür (90,91). Büyüme konilerinin kaderi Büngner bantlarına ulaşip ulaşmamaları ile ilgilidir, eğer düzgün temas olmaz ise büyüme konisi bağ dokusu içerisinde büyümeye başlar ve burada kaybolur. Tek bir endonöral tüpe ise birden çok büyüme konisi ve buna bağlı akson uçları girebilir. Endonöral tüpe ulaşamayan aksonlarda ise apoptoz ve degradasyon görülür. Distal ve proksimal uçlar SCBL tüpleri içinde birbirlerine

dokunduklarında sayıca artarlar ve dolayısıyla büyüme konisinin çapı artar ve etrafı saran eski SCBL tüpü kendini parçalayarak yeni SC proliferasyonu ile SCBL oluşturulur (70,79,90,91).

Aynı aksondan çıkan terminal tomurcuklar “rejeneratif birim” olarak adlandırılır. Bu gelişim için yalnızca bir nöral çıkıntı yüzeyi üzerinde multiple “filopodia” ya da “microspike” larla tipik bir büyüme konisine sahip olur (42,79). Bu filopodialar anten görevi gören çıkıntılardır, bir hücre yada partikülle temas edince yapışır ya da geri çekilirler ve nörit büyümesine rehberlik ederler. Kısa bir süre sonra büyüme konisinde lif formasyonu başlar. Büyüme konisinde iki tür hareket görülür bunlar hızlı, alev benzeri ekstansiyonlar ve daha yavaş lineer mikrospikeların retraksiyonlarıdır (39). Büyüme konisi ile onların mikroçevresi arasındaki ilişki nörit uzaması ve formasyonu için ön koşuldur. NGF, laminin, fibronektin, gibi kemotrofik moleküllere de yanıt verir (42,56).

Schwann hücre sütunlarına giren lifler efektör organa ulaşınca kadar büyümeye devam ederler. Her Schwann hücre sütunu çeşitli liflerden uzantılar alır. Mikst sinir yaralanmalarında duyu liflerinin rejenerasyonu motor son plaklara bağlı sütunlara doğru gelişirse kas fonksiyonu geri dönmez (92). Motor lifler duyu son plaklarına bağlı sütunlara doğru gelişirse budama ile uzaklaştırılır (93). Tek bir motor aksonun kollateralleri ayrı bir kasi reinnerve edebilir ve tek bir duyu aksonunun kollateralleri ayrı cilt alanının duyusunu alabilir. Kesilen aksonlar travmayı takiben ilk altı saat içinde rejener olmaya başlar. Başlangıçtaki filizler genellikle rezorbe olur, kalıcı filizler birinci günden sonra oluşur. Bu filizlerin distale ilerlemesi kesi alanında geriler, buna skar gecikmesi denir. Bu gecikme sıçanlarda 48 saat kadar kısa olabilir fakat insanlarda birkaç haftayı bulabilir.

Bazı aksonlar onarım alanını karşıya geçip distal uca ulaşamazlar, kendi üzerlerine kıvrılarak Schwann hücreleri ve bağ dokusu ile beraber nöroma oluştururlar. Nöromalar sinir gövdesi içinde kaldıklarında “neuroma in continuity” adını alırlar ve yaptıkları bası ile fonksiyonel rejenerasyon sağlayacak aksonları da engellerler. Bu sinir onarımlarındaki başarısızlıkların en önemli sebeplerindendir. Kas hücreleri nöral inputun kaybına bağlı olarak bir hafta içinde atrofiye gitmeye başlarlar (94). Buna ek olarak akson motor hedefine 12 ay içerisinde ulaşmazsa fonksiyonel kas reinnervasyonu azalır (95). Zayıf fonksiyonel geri dönüşün nedeni kasmın atrofiye gitmesinden ziyade intramusküler sinir yolağındaki azalmadır.

Motor sinirden farklı olarak yıllar sonra bile duyu sinirleri fonksiyonel duyuyu (iki nokta diskriminasyonu) yeniden kazananabilirler. Literatür verileri göstermektedir ki serbest sinir sonlanması Paccini korpüskülleri, Meisner korpüskülleri, Ruffini ve Merkel

sonlanmaları gibi her tip duysal hasar tekrar reinerve olabilmektedir (94,96). Ancak araştırmacılar tamirdeki gecikmenin 6 aydan daha fazla gecikmesi durumunda fonksiyonel duyunun azalacağını belirtmektedirler (97).

Periferik sinir hasarının merkezi sinir sisteminde duyu ve motor korteks üzerinde de önemli sonuçları vardır. Aksonal yaralanma, sinir tamiri ve reinervasyona cevap olarak somatosensoryel korteks reorganizasyona gider. Periferel rejenerasyon kortikal devrelerde reaktivasyona neden olmakta bu da kortikal nöronların duysal inputu değerlendirme kapasitelerini korumalarını sağlamaktadır. Sanes primer motor korteksteki fonksiyonel reorganizasyonun sinir kesilmesine cevap olarak oluştuğunu göstermiştir (98).

2.2.4 Rejenerasyonda EMG' nin Yeri

EMG reinnervasyon ve denervasyon varlığının araştırılmasında önemlidir. EMG bir kasta normal innervasyonun olup olmadığını gösterir. Klinik semptom ve fizik bulgularla sinir yaralanmasının derecesini ayırt etmenin güç olduğu akut yaralanmalarda denervasyon boyutunun bilinmesi ve travmanın patern ve dağılımının anlaşılması açısından travma sonrası 2-3. haftalarda EMG çalışmalarının yapılması önemlidir. Denerve kas reinnerve olurken EMG iyileşmenin spesifik fazlarını işaret eden karakteristik değişiklikler gösterir. Sinir rejenerasyonu, kas reinervasyonu ve normal kas aksiyon potansiyellerine dönüş için ihtiyaç duyulan zaman yaralanmanın şiddetine, kas ve yaralanma bölgesi arasındaki mesafeye bağlıdır (99,100). Kas denervasyonundan sonra EMG elektriksel olarak 5-7 gün sessiz kalır. Bu yüzden duysal ve motor sinir ileti çalışmalarında nöropraksik yaralanmaları aksonotmetik ve nörotmetik yaralanmalardan ayırt etmek için yaralanma sonrası en az 1 hafta gereklidir.

Denerve olan kasta sık olarak fibrilasyon potansiyelleri görülür ve yaralanma sonrası 3 hafta içinde ortaya çıkmaktadır. Bu zamandan sonra EMG bulguları sinir yaralanmasının derecesine ve rejenerasyonuna bağlıdır. Düşük amplitüd, kısa süre ve polifazik motor ünit potansiyellerinin görülmesi tamir ve reinervasyonun belirtileridir. Kasta palpe edilebilir bir kontraksiyondan daha önce motor ünit potansiyeller görülebilir. Rejenerasyon devam ederken fibrilasyon potansiyelleri azalır, küçük amplitüdü polifazik motor ünit sıklığı artar. Bu potansiyeller rejenerasyonun ilk önemli belirtileridir ve motor üniteye yakın yerlerden daha kolay elde edilirler. Birkaç hafta sonra süre ve amplitüdüleri artmaya başlar (99).

Elektrofizyolojik çalışmalarda CMAP değeri reinnervasyon sonrası kastan elde edilen aksiyon potansiyelini gösterir. Durasyon ise aksiyon potansiyeli kaydedilmeye başlandığı andan bitiş değerine kadar geçen süreyi gösterir. Latans kasa uyarı verilmesinden aksiyon potansiyel değeri alınana kadar geçen süredir. Durasyon rejenere sinir dokusundaki myelinli liflerin myelinsiz liflere oranını göstermektedir. Latans süresi ise rejenere sinir dokusunun iletiyi kasa taşıma hızını belirtir. Bu değerin uzaması sinirde herhangi bir yerdeki bası veya blokaj yada myelin yokluğunu gösterir (51,71,101). EMG istemli motor fonksiyon bulunmadan haftalar ve aylar öncesinden rejenerasyon delillerini gösterebilirken travma sonrası erken dönemde geriye kalan sağlam motor ünitelerin bulunmasını da sağlamaktadır. Ancak EMG kasın istemli kasılmasına rağmen şiddetli denervasyon ile ilgili değişiklikleri göstermeye devam edebileceği için asla dikkatli bir nörolojik muayenenin yerine geçmemelidir. EMG sadece sinir liflerinin hedef kasları yeniden inerve etmeye başladığı andaki aşamada rejenerasyonu keşfedebilmektedir. Sinir yaralanmasında hedef kasa olan uzaklık EMG'nin zamanlamasını değiştirmektedir.

Nöropraksik yaralanmada belirleyici olan sinir segmenti boyunca sinir iletilisinin gecikmesi veya tam olarak engellenmesidir. Nöropraksik yaralanma sonrası elde edilen EMG sonuçları genellikle normal kalmaktadır. Distal sinir segmentinde sinir ileti cevabının yokluğu aksonotmetik yada nörotmetik derecede yaralanma sonucu akson kaybını göstermektedir. Bu tür yaralanmalardan 2-3 hafta sonra EMG sonuçları anormaldir. Rejenerasyonda fibrilasyon ve denervasyon potansiyelleri azalmakta ve motor potansiyeller ile yer değiştirmektedir. Bu durum rejenere liflerin adaleye eriştiğini ve akson-motor son plak bağlantılarının yeniden düzenlendiğini gösterse de rejenerasyonun kalite ve boyutu hakkında herhangi bir bilgi vermemektedir.

2.3 PERİFERİK SİNİR YARALANMALARINDA CERRAHİ TEDAVİ

2.3.1 Tarihçe

Periferik sinir sisteminin varlığı yazılı olarak MÖ 460-370 yıllarında ilk Hipokrat tarafından tarif edilmiştir (102). Galen MS 130-200 yıllarında periferik sinirin kesilmesiyle duyu ve güç kaybı olduğunu göstermiş, tendon ile sinirin farklı iki yapı olduğunu tanımlamıştır (103). VII. Yüzyılda Razes sinir lezyonlarının tamir edilemeyeceğini ifade etmiştir (104). İbn-i Sina (980-1030) sinirlerin tamir amaçlı dikilebileceğini bildirmiştir.

1776'da Cruikshank ve 1795'de Haighton hayvan çalışmalarında rejenera olan sinirlerde parsiyel fonksiyonel iyileşme elde edilebileceğini göstermişlerdir.

İnsanda ilk sinir tamirini yapan hekimlerden biri Baudens olup 1836 yılında median ve ulnar siniri suture etmiştir. 1873'de Hueter halen sinir tamirinde standart teknik olarak kabul edilen epinöral suture tekniği ile uç uca anastomoz tekniğini başarıyla uygulamış ve tarif etmiştir (105). 1917'de fasiküler suture tekniği Langley ve Hashimoto tarafından tarif edilmiştir (106). 1954 yılında Seddon otograft kullanarak tedavi ettiği geniş bir seri yayınlamıştır. 1.ve 2. Dünya savaşları periferik sinir cerrahisinin gelişmesinde en güçlü etken olmuşlardır. Savaş döneminde pekçok periferik sinir yaralanmasına cerrahi tedavi uygulanmış ve iyi sonuçlar alınmıştır. Seddon, Sunderland, Lundborg, Millesiz, Terzis, Mackinnon ve Dellon gibi hekimler sinir yaralanması ve tamiri konusunda yoğun olarak çalışmışlardır.

2.3.2 Cerrahi Zamanlama

Periferik sinir hasarında cerrahi tedavinin zamanlaması açısından bazı önemli noktalar vardır. Myelinin yenilenmesi 8-12 haftalık sürede tamamlanır. Bu süreçte düzelme olmaması akson hasarını gösterir. Aksonal rejenerasyon uygun koşullar altında 1mm/gün hızında ilerler. Denervasyon sonrasında geri dönüşümsüz kas atrofisi 12-18 ay arasında gelişir ve SC ile endonöral tüplerin canlı kaldıkları süre 18-24 aydır.

Cerrahinin planlanmasına etki eden en önemli faktör hastanın başvurma zamanıdır. Genel olarak künt travmalardan 2-4 hafta sonra tedavi yapılabilir. Bu dönem sinir rejenerasyonu için en uygun şartların olduğu zamandır. Eğer hastaya bu sürede cerrahi tedavi yapılmıyorsa hasta sinir rejenerasyonu ve hedef organın reinervasyonu açısından klinik ve elektrofizyolojik testlerle sıkı takibe alınır. 3 ay içerisinde iyileşme belirtisi olmazsa ameliyat edilmelidir. Cam, bıçak, jilet gibi kesici ajanlarla oluşan temiz sinir kesilerinde hasta ilk 24 saat içinde başvurmuşsa ve uygun şartlar mevcutsa primer tamir yapılabilir. Bu dönemde endonöral tüpler normal ölçülerdedir ve anastomoz gerilme olmaksızın başarılıdır. Skar dokusu henüz yoktur. Yaralanmadan sonaki ilk 72 saat içerisinde yapılan sinir onarımı akut tedavidir. Genellikle savaş zamanındaki tecrübeler geç veya sekonder tamirin uzun yıllar boyunca daha popüler olmasına yol açmıştır. Bu tür ciddi yaralanmalar genellikle yumuşak doku veya diğer organ yaralanmaları ile birlikte dir. Bu yaralanmalarda cerrahinin geç yapılmasının nedenleri: yaranın temiz olmaması, enfeksiyonun varlığı, cilt defektinin

mevcudiyeti, vasküler yaralanma ile birliktelik ve kemik kırıklarının olmasıdır (107). Bu sürede sinirde oluşan hasarın sınırlarında ortaya çıkar ki bu tedavide avantaj sağlar. Ateşli silah yaralanmaları dışındaki lezyonlarda tamirin zamanlaması sinir kesisinin ciddiyetine, eşlik eden kontüzyona, sinir uçlarının fragmantasyonuna, sinirin uzunlamasına hasarına, lokal doku hasarının derecesi ve kontaminasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu faktörlerin biri veya daha fazlasının mevcudiyetinde geç tamir önerilmektedir. Geç tamirin dezavantajları endonöral tüp ve fasiküllerin progresif olarak küçülmesi, ikinci bir ameliyat gerektirmesi, retrakte sinir uçlarının fibrozisle kısılmasıdır. 6 aydan sonraki yapılan cerrahi sonuçlar yeterince iyi olmamakta, yaralanmadan 1 yıl sonra ise cerrahi tedavi önerilmemektedir (108).

Prognoz hastanın yaşına, yaralayıcı ajanın cinsine, yaralanan bölgede ek organ yaralanması olup olmamasına, enfeksiyonun varlığına, cerrahi müdahaleye kadar geçen süreye, yaralanan sinire, yaralanma seviyesine ve son organa olan uzaklığına, ameliyat sırasında sinirin anatomik bütünlüğünün devam edip etmediğine, anatomik olarak defekt varsa defektin uzunluğuna, intraoperatif yapılan testlere ve cerrahi teknik gibi birçok faktöre bağlıdır (107,108).

Periferik sinir cerrahisinin temel ilkelerinden birisi, tam olmayan lezyonlarda cerrahi yapılmadığı zaman daha iyi sonuç alındığıdır (109).

2.3.3 Cerrahi Teknik

Periferik sinir onarımında uç-uca onarım, eğer defekt mevcut ise otojen sinir greftleri ile onarım, vaskülarize sinir greftleri ile onarım, otojen ven grefti kullanımı, sentetik tüplerin kullanımı, uç yan anastomozlar gibi pek çok teknik tanımlanmıştır. Yaralanmış periferik sinirin onarım tekniğinin planlanmasında sinirin fonksiyonel önemi, duysal ve motor liflerinin oranı, fasiküllerin sayısı ve çapı ile epinöral dokunun miktarı, yaralanmanın tipi ve sinirin yaralanma derecesi önemli rol oynar.

Seddon sınıflamasına göre nörotmezis tipi yaralanmalar ve Sunderland sınıflamasına göre 4. ve 5. derece yaralanmalar hemen her zaman ayrıca Sunderland sınıflamasına göre 3. derece yaralanmalar bazen cerrahi tedavi gerektirmektedir.

Cerrahi sırasında sinir bütünlüğünün korunmuş olduğu durumlarda eksternal veya internal nöroliz dekompresyon amaçlı bir seçenek olarak düşünülmelidir. Lezyon bölgesinde sinir ortaya konduktan sonra özellikle gerilme veya basıya bağlı yaralanmalarda bütünlük

bozulmamışsa çevre dokulara olan yapışıklıklar ortadan kaldırılarak eksternal nöroliz yapılır. Eksternal nöroliz skar dokusunun neden olduğu yapışıklık ve bası nedeniyle ortaya çıkan duysal ve motor defisitler yanında skar dokusunun rejenere aksonların büyümesini geciktirebileceği ve sinirin iyileşme hızını azaltabileceği düşüncesi ile uygulanmaktadır. Burada sinir dokusu çevre dokudan tamamıyla ayrılmaktadır.

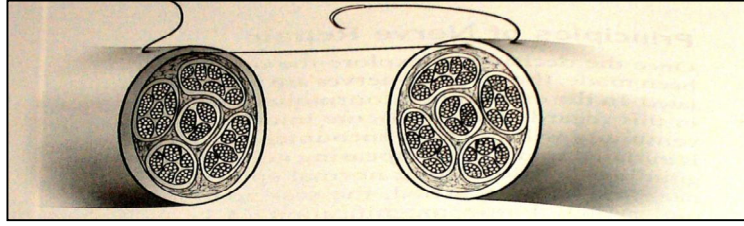
Sinirin hasarlanma yerinde epinöryumu deforme ise, devamlılığı kaybolmuşsa ve fibrotik bir tabaka ile sarılmışsa internal nöroliz yapılmalıdır. Fonksiyonel sinir fasiküllerini fonksiyonel olmayan fasiküllerden ayırt etmek ve fonksiyonel olmayan liflerin yeniden fonksiyonel hale getirilmesi için internal nöroliz uygulanmaktadır. Parsiyel sinir yaralanmalarında bir kısım sağlam fasiküllerin yanında yer alan skar ile çevrili fonksiyonel olmayan ve nonkozaljik ağrıya yol açan lifler için de uygulanmaktadır.

2.3.3.1 Primer Onarım

Burada bütünlüğü bozulmuş sinir uçlarının ortaya konulması ve primer yaklaştırılarak onarılmaları söz konusudur. Primer uç-uca onarım mümkün olan durumlarda en iyi tedavi şekli olarak kabul edilmektedir (109,110). Primer onarım için yaranın taze, temiz ve düzgün sınırlı olması önemlidir. Bu da genelde yaralanmadan hemen sonra ilk saatler içerisinde yapılan akut cerrahilerde ve genelde kesici aletlerle olan yaralanmalarda rastlanan bir durumdur (110). Primer onarımda dikkat edilmesi gereken nokta sinir üzerinde gerilim oluşmamasıdır. Bu durum skar dokusu oluşturmakta ve rejenerasyonu olumsuz etkilemektedir (109). Çalışmalar defekti kapatmak için sinir uçlarına ortalama % 8-10'dan fazla gerilim uygulandığında kan akımında % 50'ye varan azalma olacağını göstermiştir (7). Sinir tamirinde başarısız olunması hedef kas dokusunda fonksiyon kaybına, duysal patolojilere ve ağrılı nöropatlere neden olmaktadır.

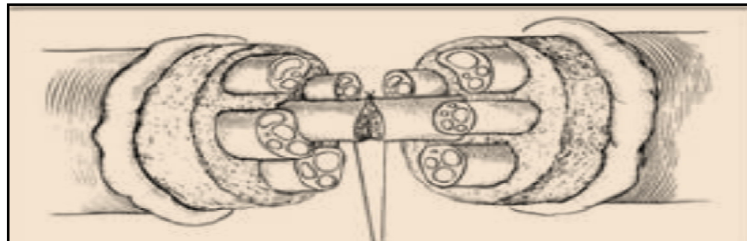
Primer uç-uca periferik sinir onarımı epinöral onarım (nörorafî) ya da fasiküler onarım tekniği ile yapılabilir. Epinöral onarım tekniğinde kesik sinirin proksimal ve distal güdükleri çevre dokulardan serbestleştirilir. Epinöral damarlar ya da uygun çaptaki fasikül grupları gibi devamlılığı olan anatomik yapılar karşılıklı getirilir ve güdükler epinöryumundan 8/0 veya 10/0 monoflaman atravmatik emilmeyen sütürler ile önce 180 derece aralıkla sütürlenir. Böylece sinir uçlarının torsiyonu engellenir. Daha sonra önde ve arkada bu iki sütürün arasına sütürler konulur. Anastomozda gerilim yoksa iki uç tam karşılıklı gelecek şekilde ve fasiküller

birbirinin üzerine binmeyecek şekilde mümkün olduğunca az sütür konmalıdır (70). Bu tip onarım oligofasiküler veya monofasiküler sinirlerde uygulanmalıdır.



Şekil 2.4 Epinöral onarım (172)

Polifasiküler sinirlerde ise fasiküler onarım yapılmalıdır. Fasiküler anastomoz fasiküllerin tek tek veya gruplar halinde anastomozudur ve proksimal fasikülün kendi distal ucuna anastomozunu sağlamak açısından epinöral anastomoza göre daha avantajlıdır. Fasiküler anastomozun bir diğer avantajı sinirin tamamının değil sadece hasarlı fasikülün tamirine olanak sağlamasıdır. Ancak bu teknikte sinir anatomisi iyi incelenmeli ve uygun fasiküller bulunarak bunların birleştirilmesi sağlanmalıdır. Fasiküler onarım tekniğinde proksimal ve distal güdükteki fasikül grupları internal nörolizis yapılarak diseksiyonla ortaya çıkarılır. Fonksiyonel devamlılığı olanlar diseke edilip bırakılırken fonksiyonel ve anatomik devamlılığı olmayanlarda normal fasiküler yapı ortaya çıkana kadar lezyon diseksiyonu yapılır. Fasiküllerin uçlarından proksimal ve distalde epinöral doku çevresel olarak 5-10 mm çıkartılmalıdır. Anastomoza mümkün olduğunca en uzak ve zor alanda olan fasikülden başlanıp fasiküller perinöryumdan 10/0 monoflaman emilmeyen sütürlerle dikilir. Fasiküler onarımda fasikül grubu etrafındaki perinöryum tabakaları karşılıklı sütüre edilir (110).



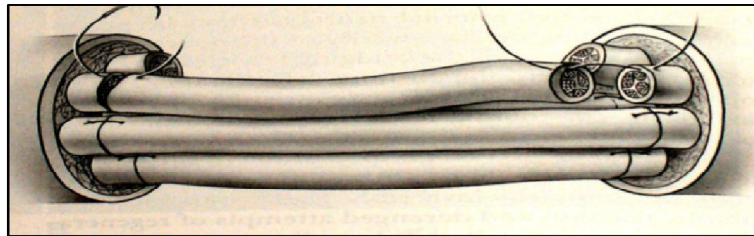
Şekil 2.5 Fasiküler onarım (172)

2.3.3.2 Greft İle Onarım

Anatomik devamlılığını yitirmiş veya anatomik devamlılığı olsa da fonksiyonel devamlılığı olmayan sinirlerde oluşan nöroma veya hasarlı sinir bölümü eksize edilip

proksimal ve distalde ki kesik sinir uçlarının cerrahi sırasında karşı karşıya getirilemediği veya primer onarım halinde gerilme oluşacağı durumlarda greft kullanılması gereklidir.

Genellikle sinir uçları arasındaki açıklık 5 cm'den daha fazla olduğu durumlarda greft kullanılmalıdır. Sinir greftleri distal sinir ucu gibi davranır. Bir süre sonra sinir greftinde Wallerian dejenerasyon olur, geriye aksonal rejenerasyon için gerekli bağ dokusu iskeleti kalır. Bunun için Schwann hücreleri canlılığını sürdürmeli ve yeterli revaskülarizasyon olmalıdır. Greft içerisindeki aksonlar dejenere olur ancak Schwann hücrelerinin bazı greftlerde yaşayabildiği gösterilmiştir. Schwann hücreleri dejenere olsa bile geride kalan bazal lamina canlılığını sürdürür ve vaskülarizasyon yeterli seviyeye geldiğinde tekrar Schwann hücresi oluşabilir. Schwann hücreleri aksonal rejenerasyon için gerekli sitokinleri salgırlar. Sinir greftinin damarlanması postoperatif 3. günde başlar. İlk zamanlarda greft materyali proksimal ve distal sinir ucundan beslenir. Bir süre sonra ise çevre dokulardan difüzyon yoluyla da beslenmeye başlar. Greftin uzunluğu ve çapı başarıyı etkiler çünkü boyu uzun ve çapı 5 mm'den daha geniş olan greftlerin orta kısımlarında ki revaskülarizasyon yetersiz olduğundan santral nekroz gelişebilir. Greftin yaşaması için optimal çapı 5 mm'den küçük olmalıdır. İdeal greft çapı 2-3 mm'dir. Bu teknikte greftlenecek sinir uçları iyi ortaya konulmalı, eğer oluşmuşsa sinir uçlarındaki nedbe dokuları eksize edilmelidir. Proksimal ve distale doğru minimal sağlam sinir dokusu eksizyonu yapmak koşulu ile nedbe dokuları temizlenir. Fasiküler anastomoz yapılacaksa ayrıca epinöryum bir miktar eksize edilmeli ve fasiküller ortaya konulmalıdır. Burada da epinöral veya fasiküler onarım söz konusudur. Sinir greftleri hesaplanan uzunluktan %10-20 daha uzun kesilmelidir. En uzak noktadaki ve derindeki fasikülden başlamak üzere 10/0 monoflaman emilemeyen naylon sütürlerle greft proksimal ve distal fasikül grubuna sütürlenir. Genellikle 1 yada 2 sütür yeterli olur. Başarılı bir greftleme için anastomoz gergin olmamalı, greft uçları mümkün olduğunca karşılıklı gelmelidir.



Şekil 2.6 Greft kullanılarak fasiküler onarım (otogreft kullanılmış) (172)

Bu amaçla otogreftler, allogreftler, sentetik greftler, biyolojik greftler kullanılmaktadır. Sinir otogrefti vücudun bir parçasında mevcut olan sinirin başka bir yere taşınması ile yapılmaktadır. Greftin doğal dokusu aksonal rejenerasyon için endonöral tüp oluşturmaktadır. Ancak bu teknik greft alınan yerde denervasyona neden olur. Sinir allogreftleri ise başka bir donörden sinir dokusu teminidir. Allogreftlerin doku reaksiyonuna yol açması ve immünoşüpresif ilaç kullanımı zorunluluğu en önemli dezavantajlarıdır (173).

2.3.3.3 Nörotizasyon

Primer onarım veya greft ile tamirin mümkün olmadığı yaralanmalarda sağlam bir sinir kesilir ve sinirin proksimal ucuyla hasarlı sinirin distal ucu arasında anastomoz yapılır. Kesik sinirin proksimalinden gelmesi gereken akımın başka bir sinirden sağlanması işlemidir. Bu tür cerrahide amaç belirli kas gruplarına fonksiyon kazandırabilmektir. Fonksiyonlarda ilerleme olması için hedef organla donör sinirin uyumlu hale gelmesi gerekir. Nörotizasyondaki distal elemanlar için kullanılan donör sinirler arasında interkostal sinirler, hipoglossal sinir, frenik sinir, uzun torasik, torakodorsal ve medial pektoral sinirler bulunmaktadır (174).

2.4 PERİFERİK SİNİR ONARIMINDA GREFTLER

2.4.1 Otogreft Kullanımı

Periferik sinir yaralanmalarında primer onarımın mümkün olmadığı durumlarda otogreft kullanımı ilk tercih edilen yöntemdir. Günümüze kadar venler (111,112), arterler (111), kaslar (113), tendonlar (114) otogreft olarak kullanılmıştır. Bugün artık bu amaçla otolog sinir greftleri kullanılmaktadır ve greft kullanmayı gerektiren sinir onarımlarında otolog sinir greftleri altın standart olarak değerlendirilmektedir (8). Deneysel olarak motor sinir kullanıldığında rejenerasyonun daha iyi olduğu gösterilmesine rağmen fonksiyon kaybı olmadan motor sinir donörü elde etmek çoğu zaman mümkün olmamıştır (115). Bu nedenle duysal sinirler önerilmektedir. Otojen sinir grefti kaynakları arasında sural sinir, medial ve lateral antebrakial kutanöz sinirler, C4 duysal dalları, büyük auriküler sinir, terminal posterior interosseöz sinir ve lateral kutanöz femoral sinir yer alır. Otogreft kullanımında donör sinir alanında fonksiyon kaybı, nöroma oluşumu, skar dokusu gelişmesi ve donör sinir çapının genellikle tamir edilecek sinir çapı ile uyumsuzluğu dezavantajlar oluşturmaktadır (9,10). Travmatik hasar sonrası periferik sinirde ortaya çıkan doku kaybı büyük miktarda ise alınan

sinir grefti yeterli olmamaktadır. Yine otogreft kullanılarak yapılan cerrahi tedavi sonrası hedef organ reinnervasyon oranları beklenildiği kadar yüksek olamamış ve tam bir fonksiyonel iyileşme sağlanamamıştır.

Vaskülarize sinir greftleri ayırt edilebilir vasküler pedikülü olan sinir greftleridir. Sıklıkla sural veya ulnar sinir kaynaklı bu greftler ağır cilt defektinin olduğu, az kanlanan yerlerde ve büyük defekt varlığında önerilmiştir. Vaskülarize sinir grefti kullanılan anastomozlarda prognozun daha iyi olduğu ve sinir büyüme hızının maksimum olduğu bildirilmiştir (175).

2.4.2 Sentetik Greftler

Pek çok organik olmayan materyal sinir grefti olarak araştırılmıştır. Bunların arasında en popüler olanları silikon, cam lif yapılı greftler, poliglukolik asit (PGA), poly(D,L-lactide-ε-caprolactone), poly(2-hydroxyethylmethacrylate-co-methylmethacrylate) (pHEMA) ve trimetilenkarbonat-kaprolakton en çok bilinenleridir. Pek çoğu ticari olarak üretilmektedir. Bir kısmı hiç absorbe olmayan, bir kısmı da tam absorbe olamayan bu materyallerin görevlerini tamamladıktan sonra bası oluşturmamaları için çıkarılmaları gerekebilir. Değişen derecelerde yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaları ve artmış inflamatuvar yanıtı yol açarak fibrozis ile sinir rejenerasyonunu engelleyebildikleri gösterilmiştir. Greftte karşı immün cevap gelişmesi ve toksisitesi de dezavantajdır.

Silikon bir prospektif klinik çalışmada mikroşirurjik sinir onarımı ile karşılaştırılmıştır (116). 5 yıllık takip sonrasında tüp ile yapılan tedavide soğuk intoleransının daha kötü olması dışında aralarında anlamlı fark bulunmamıştır. Başka bir randomize prospektif çalışmada ise PGA tüpleri dijital sinirlerde kullanılmış, iki nokta ayırımı testi ile yapılan takiplerde 4 mm'den küçük defektlerde daha belirgin olmak üzere standart sinir onarımına göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (117). Yine de bu materyaller ile insan üzerinde yapılmış klinik çalışma sayısı oldukça azdır.

2.4.3 Biyolojik Greftler (Doğal Materyaller)

Bu sınıfta canlı organizmalarda bulunan maddeler yer alır. Bu grubun en önemli üyeleri arasında kollajen (fibröz yapısal protein), jelatin (kollajenden elde edilir), chitosan

(polisakkarit), aljinat (polisakkarit), polihidroksibutirat (bakteryel polyester) ve bunun kopolimerleri bulunmaktadır.

2.4.4 Dolgu Maddeleri

Periferik sinir onarımında yapay greftlerin kullanılması ile birlikte bu tüplerin içlerinin doldurulması kavramı da ortaya çıkmıştır. Bu mekanik anlamda uzun greftlerde gerekli olmaktadır. Periferik sinir rejenerasyonunda doğal süreçlerin anlaşılmaya başlaması ile birlikte sinir rejenerasyonuna katkı sağlamak amacı ile pek çok farklı madde tüp greftlerin içerisine konulmuş ve sinir rejenerasyonuna katkıları araştırılmıştır. Hücre olarak Schwann hücreleri yoğun araştırma konusu olmakla birlikte elde edilmelerindeki zorluk pratik kullanımlarını sınırlamaktadır.

Kök hücre, in vitro yönlendirilmiş kök hücre ve fibroblastlar üzerinde yoğun araştırma yapılmaktadır. Yine doğal yapısal maddeler olarak kollajen, fibrin, laminin, agaroz, sentetik maddeler olarak poliamidler, catgüt ve poliglakton bu amaçla kullanılmakta ve araştırılmaktadır. Sinir rejenerasyonunun doğal sürecinde kesin mekanizmaları ortaya konulmamış olsa da önemli rolleri olduğu bugün artık bilinen nörotropik maddeler olan NGF (nerve growth factor), FGF (fibroblast growth factor), GGF (glial growth factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin 3) greft tüplerinde dolgu malzemesi olarak araştırılmaktadır (118).

2.5 DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği organ ve doku fonksiyonlarının iyileştirilmesi, korunması ve onarımını sağlayacak biyolojik yapıların geliştirilmesi üzerine mühendislik ve yaşam bilimleri prensiplerinin uygulanacağı interdisipliner bir alan olarak tanımlanır (119). Doku mühendisliğindeki esas yaklaşım doğal ekstraselüler matriksi taklit etmektir. Ekstraselüler matriks biyokimyasal uyarılar ile ve topografik yapısı ile hücrelerin hareketleri üzerinde belirgin bir şekilde etkilidir.

2.5.1 Doku İskelesi

Doku iskelesinin morfolojisi, bileşenleri, topografisi ve biyokimyasal yapısı doku onarımını sağlayabilir ve bu tip doku iskeleleri aynı zamanda aksonal uzama için modifiye edilebilir. Doku iskelesi oluşması istenen yeni doku için bir yaşam alanı olarak fonksiyon görür. Doku iskelesi oluşturmak için kullanılacak materyalde biyouyumluluk, hücre büyümesini destekleyebilme, hücreleri organize etme ve yönetme, yeni doku oluşumuna izin verme ve toksik olmayan ürünlere parçalanarak canlı dokudan temizlenebilme gerekli özelliklerdir. Ayrıca hücre göçü, metabolit temini ve atıkların uzaklaştırılabilmesi için porozite, üzerinde oluşabilecek mekanik kuvvetlere dayanıklılık, inflamatuvar yanıt oluşturmama ve üç boyutlu doku gelişimini destekleme gibi pek çok özelliği barındırmaları beklenir (120).

Doku iskelesi araştırma ve uygulamalarında yüzey modifikasyonu önemli bir yer tutar. Bu özellik hücre yerleşmesi, hücre büyümesinin desteklenmesi, hücre organizasyonu ve yönlendirilmesi için doğrudan etkilere sahiptir. Polimerik ya da degradable tüm sinir tüpü modellerinin temel sorunu biyolojik geçirgenliğin sağlanamamasıdır. Bu biyolojik geçirgenlik salınan nörotrofik faktörlerin diffüzyonuna izin verebilmeli, buna karşılık fibröz dokunun infiltrasyonunu engelleyebilecek kadar da seçici olmalıdır.

2.5.2 Nanoteknoloji ve Nanotıp

Nanoteknoloji, nanometre boyutlarında malzemelerin anlaşılması ve kontrolünü amaçlar (International Nanotechnology Initiative). Bu malzemeler farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptirler. Biyolojik doğal dokuların yapısal özelliklerini taklit etmek ancak nanomateryaller ile mümkün olabilmektedir. Nanomateryaller farklı ve eşsiz özellikleri ile çeşitli dokuların iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır (121).

Nanofiber, nanometre boyutları ile ölçülen 100 nanometre civarında çapa sahip liflerdir. Canlı dokuların bir çok ekstraselüler ve intraselüler yapısal elemanları için nanofiberler bir temel oluştururlar. Örneğin dsDNA 1,5 nm, hücre yapı iskeletleri 30 nm boyutlarındadır. Ekstraselüler yapılar için de nano boyutlardaki elemanlar temel yapıtaşlarıdır. Nanofiber üretmek için bugün en sık kullanılan ve aynı zamanda en basit yöntem elektrospin yöntemidir.

Elektrospın mikrondan nanometreye kadar sürekli fiber üretilebilen basit bir yöntemdir. Elektrospın tekniği ile elde edilen doku iskeleleri kardiyovasküler, kas-iskelet sistemi ve kök hücre çalışmaları gibi çok çeşitli doku mühendisliği alanlarında kendine kullanım alanları bulmuştur. Elektrospın doku iskeleleri yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahiptir bu da biyoaktif ajanların etkili bir şekilde salımlarına olanak verir ve aynı zamanda hücreler ile biyoaktif ajanların en yüksek oranda temas etmelerini sağlar. İn vivo elektrospın sinir doku iskeleleri ile aksonal uzama ve kısmi fonksiyon iyileşmesi gösterilmiştir. Bu bulgular elektrospın fiberlerin nöral doku tamirinde kullanılabileceğini göstermektedir .

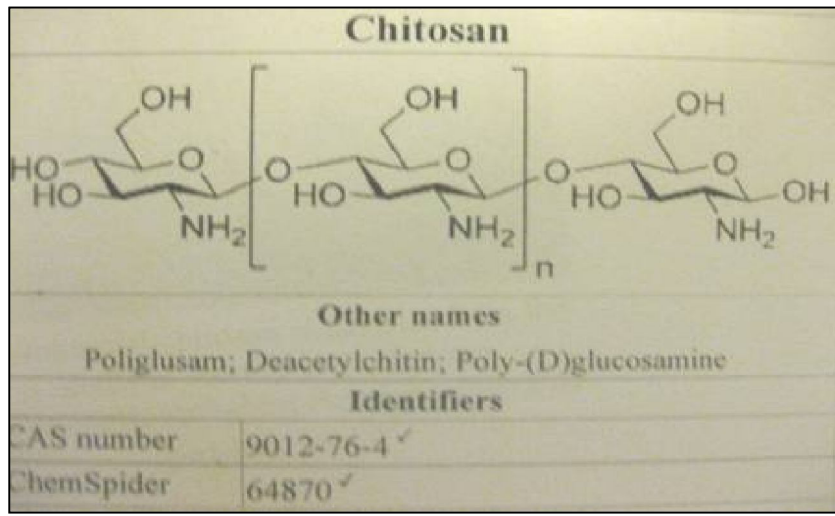
Kapasitör, bilgi teknolojileri için transistör ve diyotlar, bataryalar ya da yakıt hücreleri gibi enerji iletimi, çevrimi ve depolama sistemleri ve havalandırma yapıları için yapısal kompozitler gibi pek çok alanda da nanoteknoloji bazlı nanofiber malzemeler kullanım alanına sahiptir.

2.5.3 Chitosan

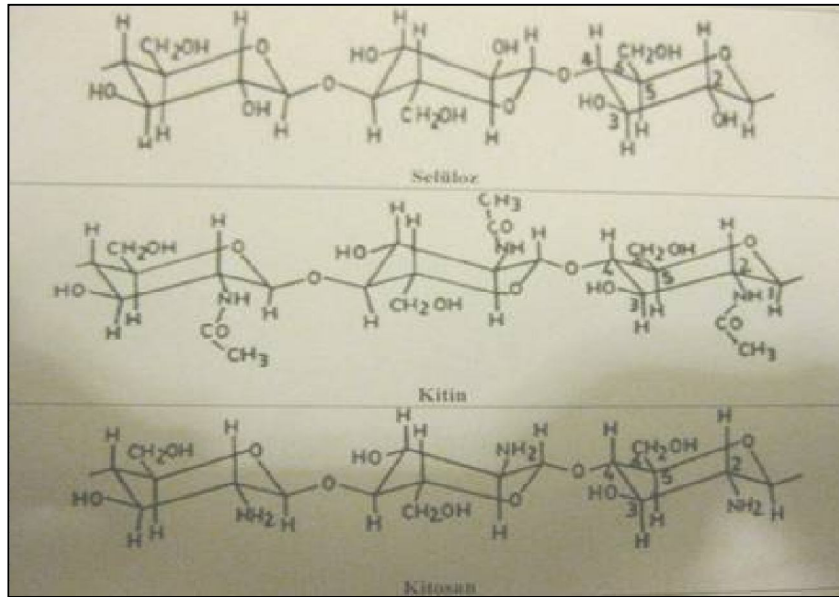
Chitosan, yeryüzünde selülozdan sonra en bol bulunan ikinci biyopolimer olan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir biyopolimerdir (16,17). Kitin doğada deniz kabukluları ile kabuklu böceklerin kabuk yapısında bol miktarda bulunmaktadır. Kitinin kimyasal yapısı selülozla çok benzemektedir aralarındaki en önemli farklılık selüloz moleküllerinin 2 numaralı karbon atomunda yer alan hidroksil gruplarının yerinde asetil grupları NHCOCH_3 yer almasıdır. Kitin biyopolimerinden chitosan elde debilmek için yüksek sıcaklıklarda ve alkali koşullar altında deasetilasyon işlemi gerçekleştirilir ve bu işlem hiçbir zaman sonlanmaz. Bu nedenle chitosan yapılarının en tipik özelliklerinden biri deasetilasyon derecesi adı verilen kitin yapısında asetil gruplarının uzaklaştırılabilme oranını temsil eden değerdir. Öte yandan chitosan biyopolimeri bazı fungal yapılardan da izole edilebilmektedir (122). Chitosan biyopolimeri biyolojik uyumluluk özelliğinin yanı sıra biyolojik bozunabilme, nontoksik olma, antifungal ve antimikrobiyal olma gibi özelliklerinden dolayı başta biyomedikal uygulamalar olmak üzere daha birçok değişik uygulamada kullanılmaktadır. Chitosan'ın kullanılabilirliğindeki bu zenginliğin bir diğer nedeni de chitosanın kolaylıkla istenilen şekil ve geometriye (membran, süngerimsi yapı, fiber, mikro ve nanoküre, tüp gibi) sahip yapılara dönüştürülebilmesidir (18,19). Chitosan biyopolimerinde yer alan yüksek yük yoğunluğundan dolayı polikatyonik özelliği söz konusudur ve ayrıca hidroksil ve amino grupları gibi reaktif gruplara sahiptir. Literatürde yer alan araştırmalara göre chitosanın yara

iyileştirme, serumdaki kolesterol düzeyini azaltma ve bağışıklık sistemini aktive etmek gibi son derece önemli fonksiyonları mevcuttur (20,21).

Kimyasal ve biyolojik aktiviteye sahip olan chitosan biyopolimerinin istenilen şekil ve geometride işlenebilmesi için kullanılan en yaygın yöntem chitosan polimeri üzerinde yer alan fonksiyonel gruplar aracılığı ile bifonksiyonel çapraz bağlama ajanları (örneğin; formaldehit, glutaraldehit, etilenglikol diglisidileter gibi) ya da NaOH tripolifosfat gibi alkalın yapılar kullanılarak çapraz bağlama tekniği olmuştur (123). Bir diğer çapraz bağlama yöntemi ise chitosanın polikasyonik yapısı dikkate alındığında beraberinde polianyonik bir yapı (örneğin; aljinat biyopolimeri) kullanılarak gerçekleştirilen çapraz bağlama işlemidir (124).



Şekil 2.7 Chitosan'ın biyokimyasal yapısı



Şekil 2.8 Sellüloz, Chitosan ve Kitin'in biyokimyasal yapılarının karşılaştırması

Chitosan biyopolimerinin periferik sinir yaralanmalarında kılavuz tüp olarak kullanımını sınırlayan neden düşük mekanik dirence sahip olmasıydı. Ancak bir takım bileşenlerin eklenmesiyle mekanik dirençleri arttırıldı ve sinir kılavuzu olarak kullanımları yaygınlaştı (25). Biyoyumlu ve biyoçözünbilir özelliğe sahip olması dışında toksik olmayan chitosan kemirgenlerin ve köpeklerin siyatik sinir yaralanmasında onarım için yapay köprü olarak kullanıldı (22,23). Ek olarak chitosandan elde edilen tüp şeklindeki yapılar üzerinde Schwann hücre transplantasyonunun periferik sinir yaralanmasında faydalı olduğu gösterildi (24).

2.6 POLİHİDROKSİALKANOATLAR

Polihidroksialkanoatlar (PHA) çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından azot, fosfor gibi temel besinlerin sınırlı konsantrasyonlarında ve karbon kaynağının fazlalığında enerji depo materyali olarak sentezlenen hidroksialkanoat polimerleridir (125,126). Bu polimerler, doğrusal, kısa zincirli C-hidroksi yağ asiti monomerleri içeren, zarla çevrili hücre içi depo materyali olup tekrarlanan hidrofobik birimlerden meydana gelmiş uzun polimerlerdir. Bu hücre içi depo materyalinin insandaki yağ ve bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı bilinmektedir.

PHA 300'den fazla farklı mikroorganizma tarafından üretilmektedir ve 80'den fazla sayıda monomer çeşidi vardır. Biyoyumlu ve biyoçözünür olmaları, nontoksik olmaları ortak özellikleridir (13). PHA'ların immunolojik açıdan insan dokusunda yavaşça degrade olması vücut içinde implant olarak kullanılabilceği anlamına da gelmektedir. PHA üretimi sırasında şeker ve yağlar gibi tekrarlanabilen kaynaklar spesifik mikroorganizmalar tarafından fermente edilerek PHA polimerleri oluşturulmaktadır. Farklı monomer kombinasyonlarının çokluğundan dolayı PHA özellikleri değişiklik göstermektedir. Ancak PHA ailesinin bütün üyeleri aşağıdaki karakteristik özellikleri gösterir;

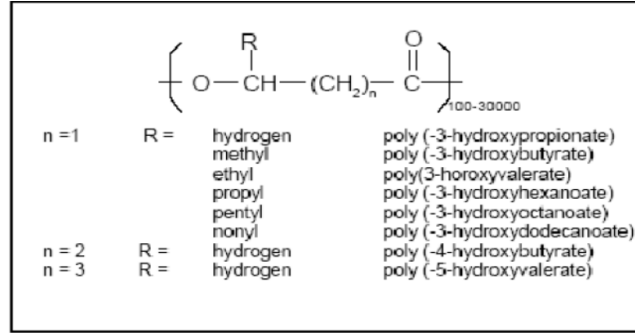
- Düz ve dallanmış, doymuş ve doymamış yapıları, alifatik ve aromatik yan grupları vardır
- Biyolojik olarak yıkılabilir
- Su buharını geçirmez
- Yüksek UV-direnci

- Nontoksik
- Biyouyumlu
- Piezoelektrik
- Optik açıdan aktif *
- PHA'lar termoplastik veya elastomerik materyallerdir
- PHA bakterilerde karbon ve enerji deposu olarak kullanılır
- Yetersiz N, P, Mg ve fazla karbon bulunan şartlarda üretimi olur. Nutrientler dengelendiğinde depolimeraz ile degrade olurlar.
- (*Şimdiye kadar sadece PHB ve kopolimerleri için tespit edilmiştir.)

Tablo 2.2 PHA üreten bazı organizmalar

Actinomyces	Ferrobacillus	Pseudomonas
Alcaligenes	Halofax	Protomonas
Aeromonas	Hyphomicrobium	Ralstonia
Azosprillum	Methylobacterium	Rhizobium
Bacillus	Methylocystis	Rhodococcus
Beijernickia	Methylosinus	Rhodopseudomonas
Chlorogloea	Micrococcus	Rhodospirillum
Chromatium	Mycoplasma	Streptomyces
Clostridium	Nitrobacter	Thiobacillus
Derxia	Nocardia	Vibrio

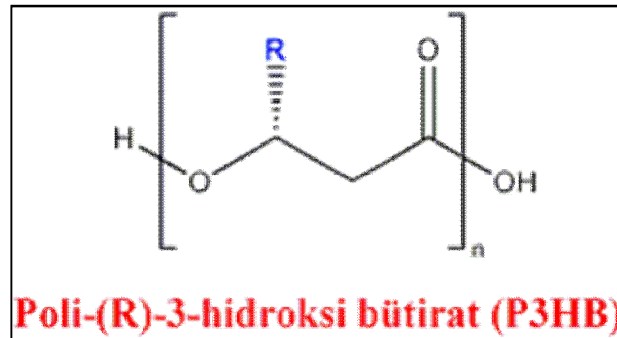
PHA'lar aerobik ortamda karbon ve oksijene kadar, anaerobik ortamda ise metana kadar yıkılabilmektedir (127). Bu özellikleri biyolojik sistemlerde kullanılabilmesi için avantaj oluşturmaktadır. Yapılarındaki yan zincirlere göre monomerler ayırt edilir. Örneğin polihidroksibutirat yan zincir olarak metil, polihidroksiheksanoat yan zincir olarak propil taşımaktadır. Monomerlerin birleştirilmesi ile oluşturulan kopolimerlere, kullanılan monomerlerin özelliklerine göre farklı kimyasal ve fiziksel özellikler verilebilmektedir (128).



Şekil 2.9 PHA'nın genel yapısı

2.7 PHB (POLİ 3-HİDROKSİBÜTİRAT)

Polihidroksibütirat (PHB) monomerler arasında ilk tanımlanan ve en çok bilinenleridir. PHA ailesinin en basit üyesidir. İlk kez Lemoigne tarafından 1920'li yıllarda topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu rastlanılan 3-hidroksi bütirik asit, poli-3-hidroksibütirat homopolyesteri (PHB) olarak tanımlanmıştır.



Şekil 2.10 PHB polimeri

Alcaligenes eutrophus bakterisi kuru ağırlığının %90'ından fazla PHB biriktirebildiği için PHB üretimi amacıyla kullanılmaktadır. Hücre içinde oluşumu *Alcaligenes eutrophus* 'un salgıladığı enzim ile asetil koenzim A'nın dimerleşerek asetil koenzim A' ya dönüşümü ile başlar. Daha sonra karbonil grubu indirgenerek 3-hidroksi bütirik asite dönüşür. 3-hidroksi karboksilik asidin kondenzasyon polimerizasyonu bakterinin ürettiği PHA 'synthase' veya 'polymerase' adı verilen bir enzimle hücre içinde başlatılarak PHB sentezi gerçekleşir (129).

PHB tamamen yıkılabilir polyester yapıda, optik aktiviteye sahip piezoelektrik, çok iyi bariyer oluşturabilen bir materyaldir (130). PHB biyouyumludur, iyi oksijen geçirebilir, suda çözünmez, hidrolitik yıkılmaya dirençlidir, tamamen yıkılması 24-30 ay almaktadır (155).

Tohill ve arkadaşları PHB ve MSC kullandığı çalışmaların'da kök hücrelerin Schwann hücrelerine dönüşüp sinir rejenerasyonuna katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (131). Young ve arkadaşları periferik sinir hasarı oluşturulan tavşanlarda PHB'den elde edilen köprü greft materyali ve glial growth factor birlikte kullanımının common peroneal sinirde aksonal ve schwann hücre rejenerasyonunu belirgin olarak arttırdığı göstermişlerdir (170).

Polihidroksibütirat (PHB) tüp şekli verilebilen yapıda olması, biyouyumlu olması, hidrolitik yıkılmaya dirençli olması, nontoksik olması, bir süre sonra vücuttan yıkılarak uzaklaştırılabilmesi nedeni ile greft olarak kullanılmaktadır. Fakat düşük mekanik güç ve yüksek kırılma gibi dezavantajları vardır (15). Polihidroksibütirat kullanılarak hazırlanan greftlerin iç yüzeyi yönlendirilmiş nanofibriler membrandan oluşmuştur. Yönlendirilmiş nanofibriler membranların aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdıkları bilinmektedir.

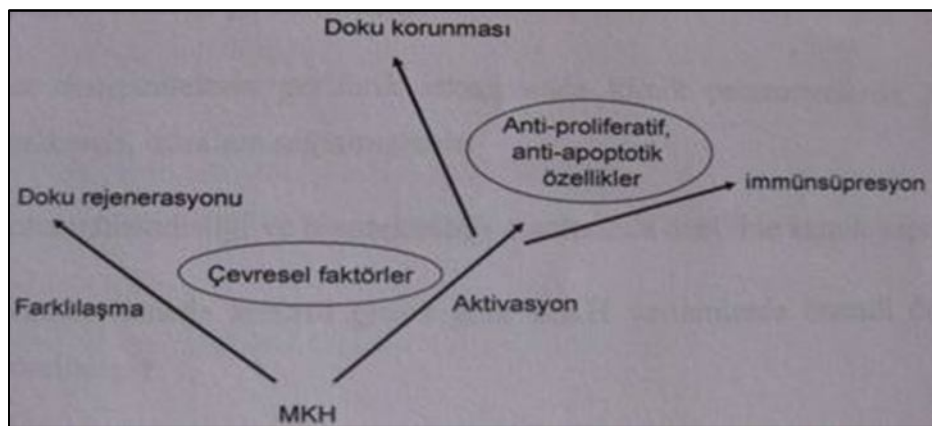
Literatürde mezenşimal kök hücreler (bone marrow stromal cell, BMSC veya mesenchymal stem cell, MSC) ile bakteriyel polyesterlerin ilişkisini inceleyen çalışmalar mevcuttur. MSC'lerin bu yapılarla biyouyumluluk gösterdiği ve üzerlerinde agregatlar ve sferoidal kümeler oluşturdukları saptanmıştır (26). Yine nöral kök hücrelerin bu bakteriyel polyesterlerin nanofibriler yüzeyine tutunup, büyüme ve farklılaşma gösterebildikleri tespit edilmiştir.

2.8 ERİŞKİN MEZENŞİMAL KAYNAKLI KÖK HÜCRELER

Kök hücreler multipotent olup birden fazla hücre tipini oluşturabilmesi ve kendisini yenileyerek sınırsız sayıda çoğalabilmesi ile diğer öncü hücrelerden ayrılır. Embriyonik, Fötal, Erişkin kök hücreler gibi farklı çeşitleri vardır. Erişkin kök hücreler mezenşimal, nöral, epitelyal, yağ dokusu kaynaklı olabilir (132). Sinir sistemi kendisini yenileme kapasitesi oldukça sınırlı olan hücrelerden oluştuğu için pek çok hastalıkta fonksiyonel tam bir iyileşme sağlanamamaktadır. Bu yüzden sinir sistemi üzerinde en yoğun kök hücre araştırması yapılan alanlardan birisi olmuştur. Sinir sistemi düşünüldüğünde kök hücre uygulamalarının tedaviye olan katkısı iki farklı mekanizma ile olabilir; kök hücrelerin farklılaşarak kaybedilen dokunun yerini alması veya kaybedilen dokunun geride kalan hücreler ile yenilenebilmesi için destek

sağlanmasıdır (133). Kök hücrelerin hasarlı nöronlara rejenerasyon sürecinde trofik destek sağlaması dikkate değer bir konudur (30). Kök hücre tedavisinin bazı durumlarda kayıp nöronların yerini almaktan çok nöronal koruma ve anti-inflamatuvar özellikleri ile tedaviye katkıda bulunduğunu gösterir bilgiler elde edilmiştir (31,32).

Kemik iliği stromal hücreleri veya mezenşimal kök hücreler (MSC) plastisiteleri nedeni ile doku ve organ rejenerasyonu için en ilgi çekici hedeflerden birisidir (134). Günümüzde insanlar üzerinde mezenşimal kök hücrelerin Parkinson hastalığı, travmatik spinal kord hasarı, beyin hasarı ve serebral infarkt'ta transplantasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (27,28,29). MSC 'lerin in vitro ortamda nöron ve astrosit benzeri morfolojik farklılaşma göstermeleri, nöronal ve nöroglial marker ekspresyon etmeleri in-vivo ortamda gelişen embriyonun sinir dokusuna nakil yapıldığında belirgin derecede nöronal farklılaşma göstermeleri bu alana duyulan ilginin artmasına neden olmuştur (135,136). Yetişkin organizmada bu farklılaşma gösterilememiş ve MSC ile ilgili farklılaşmanın yeniden ele alınması gerekli olmuştur (137,138). Bu sonuçlar farklılaşma olduğunu kesinlikle reddetmese de bu hücrelerin fonksiyonel düzelmeyi desteklemesi için daha farklı mekanizmaların olduğunu düşündürmektedir. MSC 'ler birçok nörotropik faktör ve sitokin üretir, başka fenotiplere dönüşebilir, inflamasyonu baskılar, doku tamirinde görevli büyüme faktörlerinin üretimini tetikler (139,140,141). Tüm bu özellikler birlikte değerlendirildiğinde (akson rejenerasyonunun desteklenmesi, nöronal koruma, immün yanıtların düzelmesi, myelin oluşumunun desteklenmesi, angiogeneze katkı sağlanması, nöronal iyileşme için uygun mikroçevre oluşturulması, olası lokal farklılaşma) MSC 'ler için fonksiyonel iyileşmeye katkı sağlayabilmeleri amacı ile birden fazla mekanizmaya sahip oldukları düşünülmektedir.



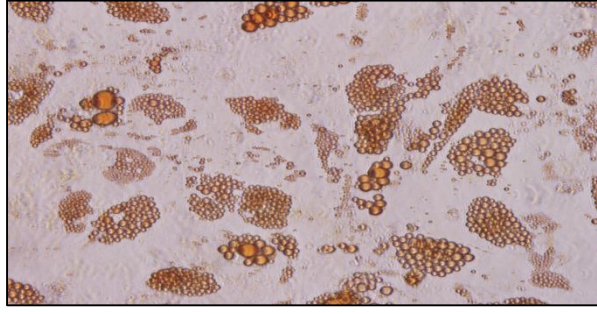
Şekil 2.11 MSC'lerin doku hasarında olası yarar mekanizmaları

Mezenşimal kök hücrelerin (MSC) sahip oldukları çeşitli biyolojik özellikler nedeni ile nöronal, embriyolojik ve hematopoetik kök hücrelere göre çeşitli avantajları vardır ve bu nedenle uygulamalarda öncelikli olarak düşünülebilirler (142,143).

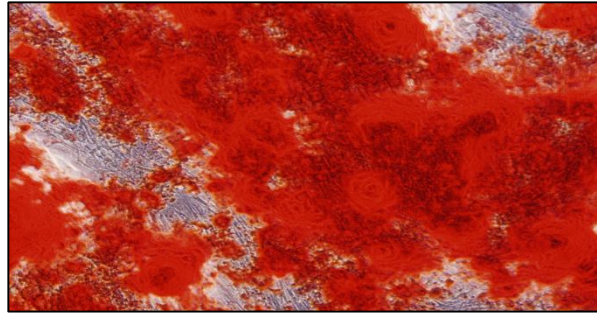
Bu avantajlar:

- 1- Kolayca izole edilebilmeleri ve kültür ortamında çok sayıda çoğaltılabilmeleri
- 2- İn vitro pasajlama sırasında genetik anormalliklere yatkınlıklarının daha az olması nedeni ile diğer kök hücrelere göre daha düşük oranda kanser riski taşımaları
- 3- Rejeksiyonu önlemek için immünsüpresif tedaviye gerek olmadan otolog olarak verilebilmeleri
- 4- Hipoimmünojenik olmaları nedeni ile allojenik MSC uygulamalarına olanak sağlamaları
- 5- İntravenöz yolla verildiklerinde hasarlanmış dokuya yerleşebilmeleri
- 6- Etik olarak en uygun kök hücre çeşidi olmalarıdır.

Kemik iliği MSC'leri en bol bulunduran en güvenilir ve buna bağlı olarak da klinik uygulamalar için en sıklıkla kullanılan MSC kaynağıdır. Kemik iliğinde bulunan MSC'ler kemik iliği stromasına hematopoetik kök hücrelerin yaşamaları ve farklılaşabilmeleri için çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler salgılamaktadırlar (144). Kemik iliği dışında MSC'lerin yağ dokusu, periosteum, synovial membran, synovial sıvı, iskelet kası, dermis, umbilikal kord kanı, plasenta, karaciğer, dalak, timus gibi çok çeşitli organ ve dokularda buldukları bilinmektedir (145,146,147,148). Tanımı gereği MSC'lerin kemik, kıkırdak ve yağ dokusuna dönüştüğü bilinmektedir. Bunun dışında MSC'lerin hem mezenşimal, hem de mezenşimal olmayan çok farklı hücre tiplerine dönüşebildikleri gösterilmiştir: miyosit, kardiyomiyosit, hepatosit, insülin üreten hücreler, endotelyal hücreler, epitelyum hücreleri, epitelyum benzeri hücrelere, nörona farklılaştıkları gösterilmiştir (145,149,150).



Resim 2.1 Kemik iliğinde oil red ile boyanmış MSC'lerin yağ hücrelerine farklılaşması



Resim 2.2 Kemik iliğinde Alizarin red ile boyanmış MSC'lerin kemik hücrelerine farklılaşması

Diğer kök hücrelerde olduğu gibi MSC'lerin de hasralanmış bölgelere göç ettikleri ve bu bölgelere yerleştikleri bilinmektedir. MSC'lerin kan - beyin bariyerini geçebilecek migrasyon yeteneğine sahip olmaları bir diğer önemli özellikleridir (144). Bu özellik invaziv cerrahiye gereksinim duymadan periferal yoldan verildiğinde santral hedeflere ulaşabileceği konusunda umut vermiştir. Böylece yerel glial skar oluşumu, yaygın glial aktivasyon ve inflamatuvar faktör salınımından kaçınılmış olacaktır (151).

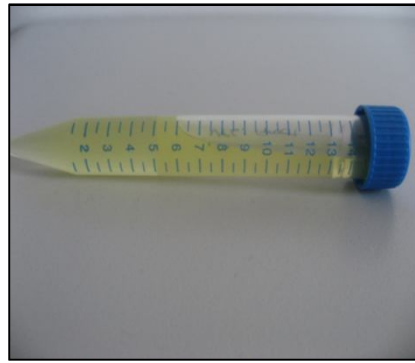
2.8.1 Mezenşimal Kaynaklı Kök Hücrelerin İşaretlenmesi ve Transplantasyonu

Transplantasyon çalışmalarında transplante edilen hücrelerin kesin olarak tanınması dışında alıcı dokuya uyum sağladıklarının ve orada yaşadıklarının gösterilmesi gereklidir. Bu amaçla transplante edilen kök hücrelerin in vivo tanınabilmesi için onları işaretleyen değişik yöntemler kullanılmaktadır. Hücreler transplantasyon öncesi in vitro olarak hücre kompartmanına özgü marker ya da reporter genlerle işaretlendikten sonra in vivo tanınır ya da reporter gen eksprese eden transjenik hayvandan kaynaklanan hücreler transplantasyon sonrası alıcı doku içerisinde kolaylıkla bulunabilir.

Transplante edilecek kök hücreler:

- 1- Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi suretiyle (Bisbenzimidazole Hoechst floresan boyası ile)
- 2- Sitoplazmik işaretlenme suretiyle (Fast- blue, RDA, carboxyfluorescein, thiol ile)
- 3- Membran işaretlenme suretiyle (DiI, DiO, i PKH26 ile), (152).
- 4- Reporter gen işaretlenme suretiyle (lacZ ve EGFP ile) alıcı doku içerisinde tanınabilir hale gelebilirler.

Polymer bağlı suda çözünebilir nanoparçacıklar, hücre görüntülenmesi ve takibi için kullanılan yeni bir probe türüdür. Nanoparçacıklar güçlü bir parlaklık, artmış photostability, geniş bir floresans aralığı sağlarken hücreler için kuantum dot'lara ve öteki boyalara göre daha az zararlı olması bu nanoparçacıkları var olan diğer metaryellerin önüne çıkarmaktadır. Elimizdeki polymer bağlı VP-6 Nanoparçacığı (işaretleyici) floresan yaymakta ve böylece işaretlenen mezenşimal kök hücrelerin enjekte edildiği canlıda takibini sağlamaktadır. Bu kopolymer Suzuki Coupling polimerizasyon tekniği kullanılarak sentezlenmiş ve çökertme yöntemiyle nanoparçacığa dönüştürülmüştür. Bu nanoparça Bilkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü tarafından hazırlanmıştır.



Resim 2.3 İşaretleyici (VP-6 nanoparçacığı)

Transplantasyon çalışmalarının büyük çoğunluğunda verilecek olan kök hücreler sinir dokusu içerisine intraparakimal ya da direk enjeksiyon yolu ile verilmektedir. Vasküler sistem aracılığıyla intravenöz yoldan verilen kök hücrelerin metoda bağlı olarak hasarlı dokuya migre olduğu da gösterilmiştir. Transplante edilecek kök hücrelerin hacmi transplant yerinin hacmine bağlıdır. Hücre yoğunluğu ve transplante edilen toplam hücre sayısı greftleme için yeterli olacak kök hücre sayısı ve en iyi yaşam süresinin temin edilmesi gerekmektedir.

3.MATERYAL VE METOD

Çalışmaya ait deney protokolü Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 18.02.2013 tarihinde 2013/02-02 karar numarası ile onaylandı.

Çalışmada kullanılan denekler Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Laboratuvarından, çalışmada kullanılan insan kaynaklı mezenşimal kök hücreler Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edildi. Çalışmanın tüm deneysel aşamaları Hacettepe Üniversitesi Nöroşirurji Anabilim Dalı Mikronöroşirurji Laboratuvarında yapıldı. Histopatolojik incelemeler ise Hacettepe Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda tamamlandı.

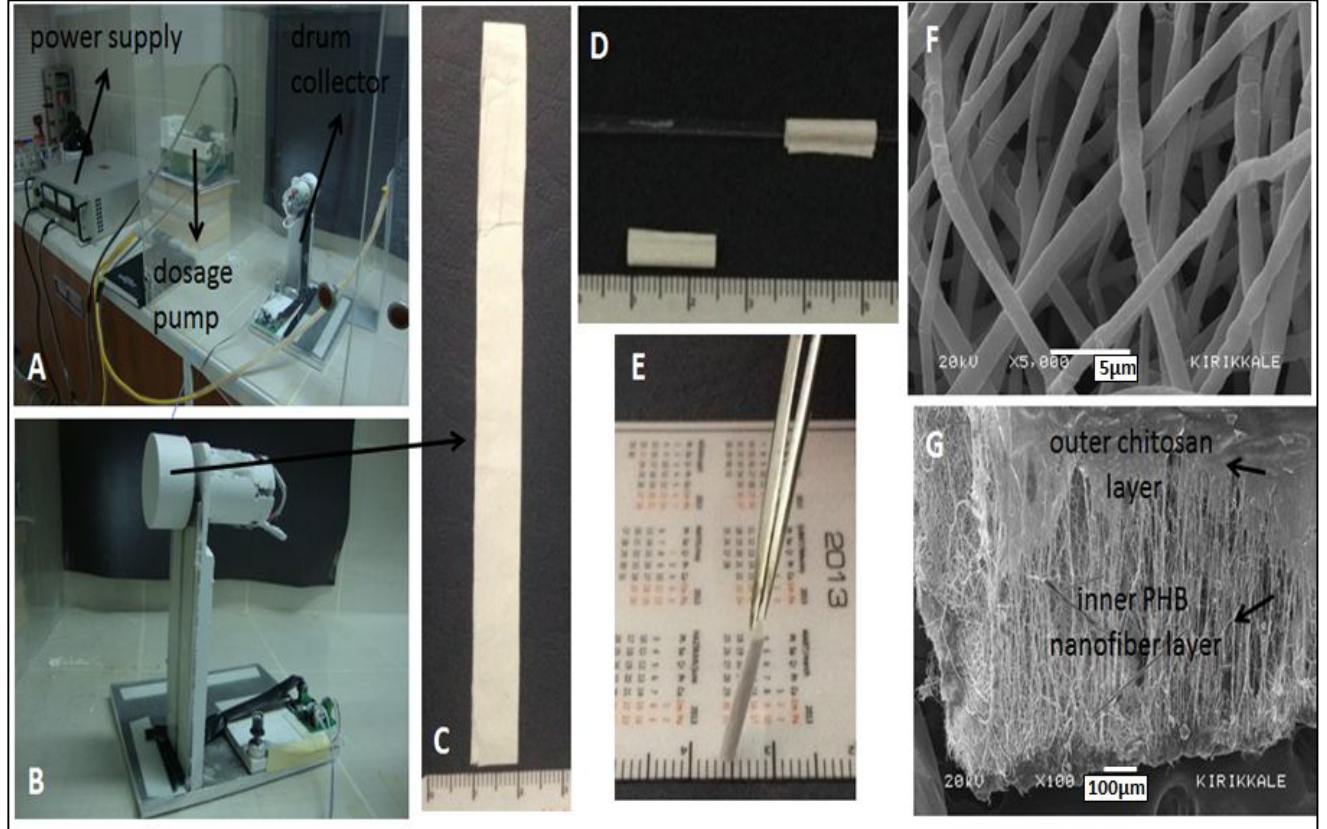
3.1 GREFTLERİN HAZIRLANMASI

Bu çalışmada kullanılan tübüler greftlerin iç yüzeyi yönlendirilmiş nanofibriler PHB membrandan, dış yüzeyi ise chitosan filminden oluşmaktadır. Yönlendirilmiş nanofibriler membranların aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdıkları bilinmektedir. Chitosan kaplama ile tübüler greftlerin mekanik dayanıklılığının artırılması amaçlandı.

Poly-3-hidroksibutirat (PHB, Sigma ABD) %5 konsantrasyondaki 60°C'de kloroformda çözüldü. Çalışmada yönlendirilmiş nanofibriler doku iskelesi ile birlikte Spellman marka CZE1000R model (0-30kV) yüksek voltaj kaynağı, Goldman marka dozaj pompası ve drum kollektörün (3100 rpm) yer aldığı elektrospin düzeneği kullanılmıştır (Resim 3.1A). Elektrospin tekniğinde polimer konsantrasyonu, uygulanan voltaj, toplayıcı-enjektör ucu mesafesi en önemli parametrelerdendir. 11kV voltaj altında, 20 cm toplayıcı-iğne ucu arası mesafede, 0.5ml/sa akış hızında, 3100 rpm döner toplayıcı ile yönlenmiş PHB nanofiber membranlar elde edildi. Döner toplayıcının dış yüzeyinde toplanan fibrillerden yönlendirilmiş nanofibriler doku iskeleleri elde edildi (Resim 3.1B,C). Taramalı elektron mikroskop ile elde edilen doku iskelesinin ortalama fibriler çapının 500-700 nm olduğu saptandı. Nanofibrillerin % 95'ten fazla kısmının yönlendirilebildiği görüldü (Resim 3.1F). Yönlendirilmiş nanofiber PHB membranlar 15 mm uzunluğunda 10 mm eninde parçalara ayrıldı. Bu parçalar kullanılarak 1,0 mm çapında, yönlenme hattına paralel tüpler elde edildi. Tüpler yapılırken yönlenme hattına paralel kenarları krokodil dişli pens yardımı ile ısıtılarak kapatıldı (Resim 3.1C,D,E).

Bu çalışmada dış yüzeyde kullanılan chitosan için % 5 gliserol (w/w kitosan) katkılı, % 1 asetik asit içerisinde % 2 chitosan (w/v, low molecular weight, Aldrich, ABD) çözeltisi

sonikatör yardımı ile hazırlandı. Daha önce hazırlanan tüplerin yüzeyi chitosan-gliserol çözeltisi kullanılarak solusyon dipping method ile kaplandı. Kaplanan yüzeyler kısa süreli olarak 1M NaOH ile çapraz bağlandı. Hazırlanan tüpler hücre uygulamaları için kullanılacağından dolayı pH 7,4 gelene kadar PBS ile yıkanmaya bırakıldı.



RESİM 3.1 A) Elektrosin sistemi B) Drum kollektör, C) Yönlendirilmiş PHB nanofiber membran, D) ve E) Tüp şeklindeki PHB nanofiber membran, F) Nanofiber membranın SEM görüntüsü, G) Chitosan ile kaplanmış PHB nanofiber membran (SEM fotoğrafları Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Laboratuvarı'nda çekilmiştir.)



Resim 3.2 PHB ve chitosan modifikasyonu ile tüp şeklinde hazırlanmış greft materyali

3.2 MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİN (hMSC) HAZIRLANMASI

3.2.1 Mezenşimal Kök Hücre İzolasyonu ve Çoğaltılması

Bu çalışma için 05.06.2003 tarihinde Hacettepe Üniversitesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulunca FON 03/16-3 karar nosu ile kabul edilen ‘‘Mezenkimal Kök Hücre Plastisitesi’’ adlı çalışma için 2007 yılı öncesi onamları alınarak toplanan donör kemik iliklerinden izole edilip saklanmış 5 farklı hMSC’ler kullanıldı. Mezenşimal kök hücreler, sayıca arttırılmaları amacıyla Dulbeco’s Modified Eagle Medium (DMEM), L-Glutamin ve fetal dana serumu içeren zengin besi yerinde 37°C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültürde çoğaltılan hücelere Tripsin-EDTA enzimi uygulandı. Hücreler kültür kabının yüzeyinden kaldırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonundaki hücreler Tripkan mavisi boyası kullanılarak Thoma lamında sayıldı. Hücre sayısına göre bir kısım hücre daha sonra kullanılmak üzere % 10 DMSO içeren dondurma medyumunu ile -196°C’lik sıvı azot tankında donduruldu, kalan hücreler ise tekrar kültüre edildi.

3.2.2 İzole Edilen Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Tüm karakterizasyon çalışmaları pasaj 3 hMSC’ler ile yapıldı. İlk olarak invert mikroskop kullanılarak hücrelerin morfolojik karakterizasyonu yapıldı. Ardından FACS Aria marka akım sitometrisi cihazı kullanılarak hMSC’ler bulundurmaları (CD105, CD44, CD73 gibi) ve bulundurmamaları (CD45, CD34, HLA-DR gibi) gereken yüzey belirteçleri için işaretlenerek hücrelerin immunfenotipik özellikleri saptandı. Ayrıca bu hücrelerin şartlandırılmış ortamlarda yağ ve kemik hücrelerine farklılaşmaları sağlanarak karakterizasyonları tamamlandı.

Kemik Hücrelerine Farklılaşma: Tripsinize edilmiş olan pasaj 2 hMSC’ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek üzerine DMEM-LG içerisine % 10 serum, 100 nM deksametazon, 10mM beta gliserofosfat ve 0,2mM askorbik asit ilave edilerek hazırlanmış olan osteoblast farklanma medyumunu eklendi. 21 gün süresince 3–4 gün aralıklarla medyumunu değiştirilerek izlendi. Süre bitiminde farklanması beklenen hücreler Alizarin Kırmızısı S boyası ile boyandı ve farklılaşma potansiyeli gösterildi.

Yağ Hücrelerine Farklılaşma: Tripsinize edilmiş olan pasaj 2 hMSC’ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek çoğaltıldı ve üzerine DMEM-LG içerisine % 10 serum, 1µM deksametazon, 60µM indometazin, 500µM izobutimetilksantin (IBMX) ve 5µg/ml insülin eklenerek hazırlanmış olan adipojenik farklanma medyumunu eklendi. 21 gün süresince 3–4 gün

aralıklarla medyumunu değiştirilerek takip edildi. Süre bitiminde farklanması beklenen hücreler oil red o ile boyanarak farklılaşma potansiyeli gösterildi.

3.2.3 İşaretleyicinin (VP-6) Mezenşimal Kök Hücreler Üzerine Etkisi

Çalışmada bu amaçla MTT ASSAY (hücre canlılık testi) uygulandı.

MTT Assay Protokolü:

10.000 hücre/200 µl besiyeri/1kuyu olacak şekilde pasaj 3'teki insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Üzerlerine 2mg/mL işaretleyici içeren besiyeri kondu. 13. günün sonunda MTT protokolü uygulandı.

1. 96 well plate içerisinde bulunan 200 µl gelişim besiyeri toplanarak atıldı.
2. Hücreler PBS ile yıkandı.
3. Kuyucuklara 100 µl DMEM-LG eklendi.
4. Tüm kuyucuklara 20 µl MTT solusyonundan eklendi.
5. Alüminyum folyoya sarılan 96 well plate 4 saat inkübatör içinde inkübasyona bırakıldı.
6. Süre bitiminde 100 µl sodyum dodesil sülfat (SDS) ilave edilerek, karanlıkta inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.
7. Süre bitiminde, plate (kültür kabı) optik yoğunluk 490 nm spektrofotometrede okutuldu.

3.3 DENEY

Bu çalışmada ağırlıkları 225 ile 275 gr. arasında değişen 30 adet erkek Wistar-Hannover albino rat kullanıldı. Deney süresince hayvanlar standart laboratuvar koşullarında (polikarbon kafeslerde, % 50-60 nem aralığında, 20-25 °C) tutuldu ve standart yem (ad labitum su ve pellet yem) ile beslendi.

Ameliyat sonrası 8 hafta yaşatılan denekler histopatolojik çalışma için örneklerin alınması amacı ile sakrifiye edildi. Sonuçlar fonksiyonel, elektrofizyolojik ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Çalışmada denekler 3 gruba ayrıldı.

- Grup 1 (kontrol grubu, otogreft grubu): 10 denekte sadece otolog sinir grefti kullanıldı.
- Grup 2 (deney grubu, yapay tübüler greft grubu): 10 denekte PHB ve chitosan kaplı tübüler greft kullanıldı.
- Grup 3 (deney grubu, yapay tübüler greft-kök hücre grubu): 10 denekte içerisi hMSC ile doldurulmuş PHB ve chitosan kaplı tübüler greft kullanıldı.

3.3.1 Anestezi

Altı saatlik açlık sonrasında deneklere 1 mgr/kg ketamine (Ketalar, Pfizer) ve 1 mgr/kg xylasin (Alfazyne, Alfasan) intraperitoneal olarak verildi. Denekler spontan solunuma bırakılarak cerrahi işlemler yapıldı.

3.3.2 Cerrahi Eksplorasyon ve Sinir Hasarı Oluşturulması

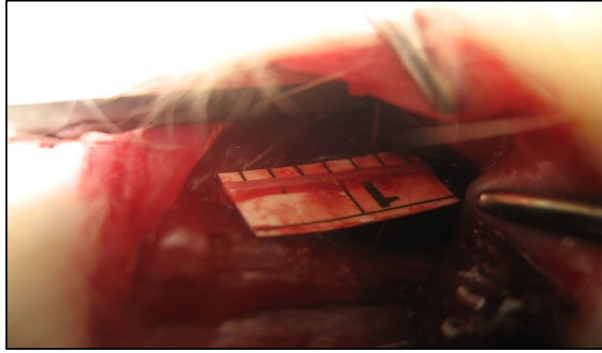
Cerrahi uygulamalar Zeiss Opmi Laboratuvar Mikroskop ve mikrocerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirildi. Anestezi sonrası denekler prone pozisyonda tespit edildi ve sağ gluteal ve femoral bölgeleri tıraş edildi. Cerrahi saha lokal antiseptiklerle (Batticon) yıkandıktan sonra steril olarak örtüldü.



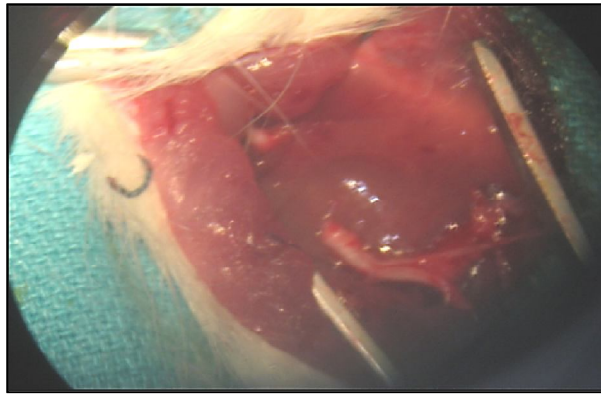
Resim 3.3 Cerrahi aşamada kullanılan mikrocerrahi aletler

Femur kemiğine paralel 3 cm'lik insizyon ile cilt-cilt altı geçildi. Kaslar otomatik ekart r ile ekarte edildi. Uyluk fleks r ve ekstensör grup kasları arasından diseksiyon derinleştirilerek siyatik sinire ulaşıldı. Sinir çevresindeki bağ dokusunun diseksiyonu tamamlandıktan sonra siyatik sinirin anatomisi tanımlandı. Her denekte siyatik sinirin

distalindeki bifurkasyona uygun uzunlukta işaretleme yapıldıktan sonra 1 cm'lik siyatik sinir mikromakas kullanılarak kesilip çıkarıldı.



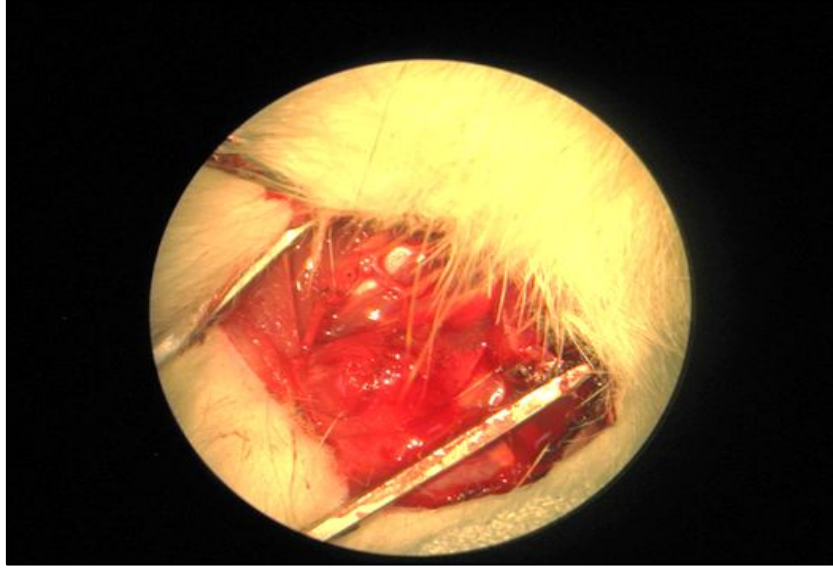
Resim 3.4 Sinir eksplorasyonu



Resim 3.5 Oluşturulan hasar sonrası görünüm

3.3.3 Otolog Sinir Grefti ile Onarım

Çalışmanın kontrol grubunda elde edilen sinir dokusu otogreft materyali olarak kullanıldı. Çıkarılan sinirin 1 cm'lik kısmı proksimal ucu distale, distal ucu proksimale gelecek şekilde ters çevrildi. Daha sonra uçlar mikroskop eşliğinde primer olarak uç-uca anastomoz (epinöral) ile birleştirildi.



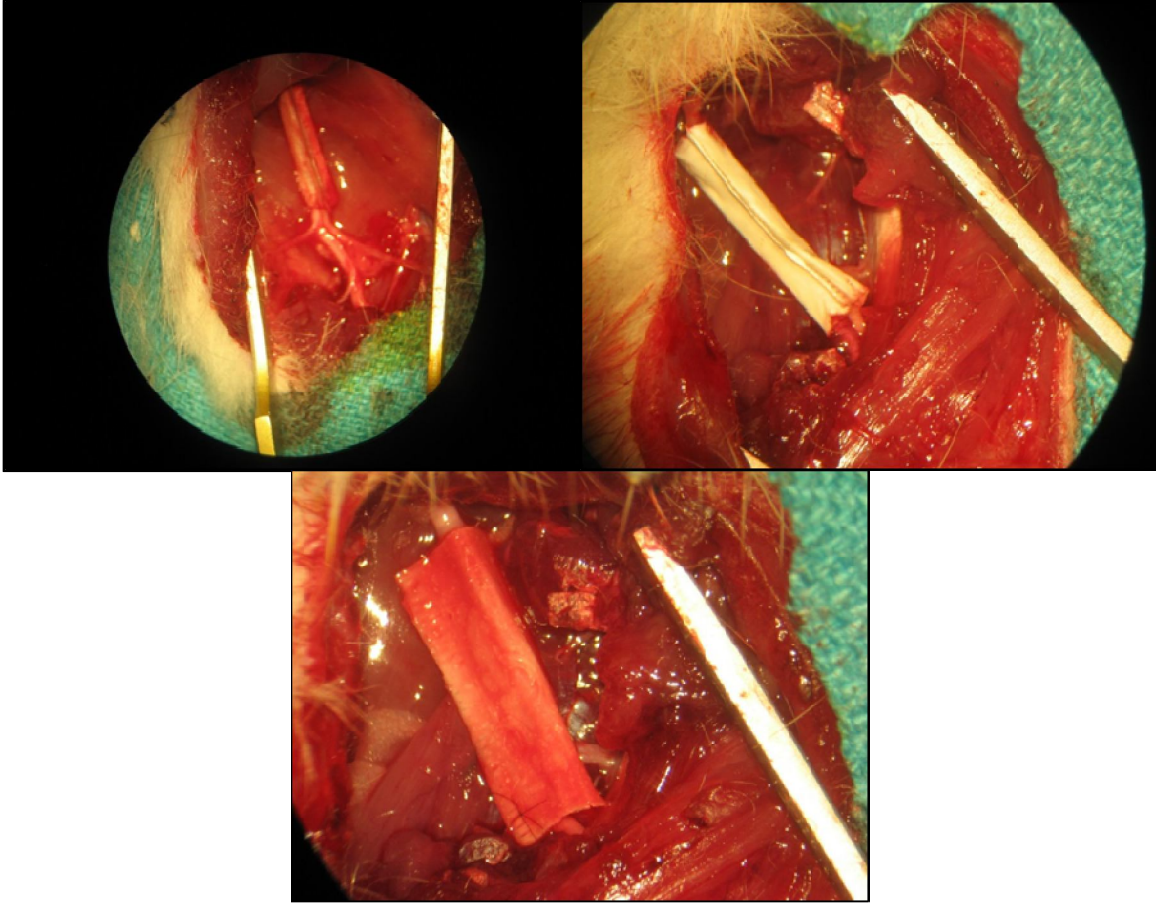
Resim 3.6 Mikroskop altında yapılan otolog sinir grefti ile onarım

3.3.4 PHB - Chitosan Tübüler Greft ile Onarım

Bu grupta bulunan deneklere; daha önceden hazırlanmış PHB ve chitosan tübüler greftler kullanıldı. Proksimal ve distal uçlar arasında entübülasyon tekniği uygulandı. Öncelikle distal sinir ucu tüp içerisine konuldu ve distal uç kapatıldı, sonra proksimal uç tüp içerisine konuldu ve proksimal uç kapatıldı. Proksimal ve distal uçlarda epinöryum ve tübüler greft 10.0 poliamid suture ile birbirine tespit edildi.

3.3.5 PHB - Chitosan Tübüler Greft ve hMSC ile Onarım

Bu grupta bulunan deneklere; daha önceden hazırlanmış PHB ve chitosan tübüler greftler kullanıldı. Proksimal ve distal uçlar arasında entübülasyon tekniği uygulandı. Öncelikle distal uç tüp içerisine konuldu ve distal uç kapatıldı, sonra proksimal uç tüp içerisine konuldu. Proksimal uç kapatılmadan önce greft içerisine 100 mikrolitre hMSC solüsyonu (her deneye ortalama 1000.000 hücre konulacak derişimde) eklendi. Daha sonra proksimal uç kapatıldı. Proksimal ve distal uçlarda epinöryum ve tübüler greft 10.0 poliamid suture ile birbirine tespit edildi.



Resim 3.7 PHB ve chitosan yapısındaki tübüler greft ile onarım

3.3.6 Yara Kapatılması

Her  c grupta da anastomozların tamamlanmasının ardından ekart r kaldırıldı. Kaslar sebest olarak bırakıldı ve yara stapler ile kapatıldı.



Resim 3.8 Cerrahi insizyonun stapler ile kapatılması

3.4 SİNİR İYİLEŞMESİNİN TAKİBİ

3.4.1 Fonksiyonel Değerlendirme

Siyatik sinir rejenerasyonunun fonksiyonel olarak izleminde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin günümüzde kullanılanları arasında siyatik sinir fonksiyon indeksi, başparmak yayılma testi, ekstensör postural zorlama, nosiseptif fonksiyon testi, gastrokinemius ve soleus ağırlık ve/veya hacim ölçümü ve kinematik ölçümler sayılabilir (153,154).

Bu çalışmada deneklerin sinir rejenerasyonunun klinik takibinde Siyatik Sinir Fonksiyon İndeksi (SFI) kullanıldı. Yürüme analizi 100 cm uzunluğunda 10 cm genişliğinde hazırlanmış cam koridorda yapıldı. Denekler bu koridorda yürümeye alıştırdı. Ardından kağıt ve damga düzeneği kullanılarak yürüme analizleri yapıldı (79). Bu yöntemde 8,2cm×42cm boyutlarında beyaz kağıt yürüme koridoruna yerleştirildi. Deneklerin her iki arka ayağı çini mürekkebi konulmuş mürekkep tablasına bastırılarak yeteri kadar boyandıktan sonra, yürüme koridorunda serbestçe yürümelerinin ardından beyaz kağıda çıkan ayak izleri alındı. Bu izler kullanılarak Bain ve ark. tarafından 1989'da modifiye edilen formül ile SFI değerleri hesaplandı (153). Bu yöntemde yüzde olarak sonuç elde edilmekte ve 0 civarındaki sonuçlar normal siyatik sinir fonksiyonunu gösterirken 100 civarındaki sonuçlar tam kesiyi ifade etmektedir.

Bain ve ark. tarafından önerilen SFI hesaplama formülü:

$$SFI = -38,3 \times PLF + 109,5 \times TSF + 13,3 \times ITF - 8,8$$

Burada;

$$PLF \text{ (print length factor)} = (\text{Deneysel PL} - \text{Normal PL}) / \text{Normal PL}$$

$$TSF \text{ (toe spread factor)} = (\text{Deneysel TS} - \text{Normal TS}) / \text{Normal TS}$$

$$ITF \text{ (intermediary toe spread factor)} = (\text{Deneysel IT} - \text{Normal IT}) / \text{Normal IT}$$

Çalışmada tüm denekler için 4.hafta ve 8.hafta sonunda SFI hesaplandı. Belirtilen zamanlarda gruplar arasındaki fark ve her grup için iki farklı zaman aralığı arasındaki farklar değerlendirildi.



Resim 3.9 Yürüme koridorunda deneklerin ayak izlerinin alınması

3.4.2 Elektrofizyolojik Değerlendirme

Çalışmada yer alan her üç gruptan ikişer deneğe 8. hafta sonunda elektrofizyolojik testler uygulandı. Testler Hacettepe Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı EMG laboratuvarında Medtronic Keypoint, USA marka EMG (Elektromiyografi) cihazı ile yapıldı. Deneklere kas gevşetici verilmeden 1mg/kg ketamine verildi. Kayıt için paslanmaz çelik iğne elektrotlar kullanıldı. Kas göbeği-tendon ilkesine uygun olarak aktif elektrod gastrokinemus kası içerisine, referans elektrod ise aynı kasın tendonun üzerine yerleştirildi. Toprak elektrod, stimülatör ile aktif elektrot arasına yerleştirildi. Siyatik sinir “siyatik notch” düzeyinde, katod aktif elektroda yakın olacak şekilde yüzeysel stimülatör ile uyarıldı ve siyatik sinir CMAP’ı elde edildi. Uyarım 0,2 ms süreli kare dalga uyarımlar ile siyatik siniri supramaksimal olarak uyuracak ancak çevreye yayılmayacak en düşük uyarım şiddetinde (1,5-8mA) gerçekleştirildi. Her iki siyatik sinir (sağ ve sol bacak) için en az üç tekrarlayan genlikte ve morfolojide CMAP elde edildikten sonra CMAP negatif tepe genliği ölçüldü. Ayrıca sağ siyatik sinir CMAP genliği, sağlam sol tarafın genliğinin yüzdesi olarak hesaplandı.

3.4.3 Histolojik Değerlendirme

Tüm denekler 8. hafta sonunda sakrifiye edildi. Daha önce tarif edilen standart anestezi sonrasında deneklerin toraksı açıldı. Genel anestezi altındaki deneklere sol ventrikülden, deneklerin alt ekstremitelerinde istenilen sertleşme oluşuncaya kadar sabit hızda % 4 paraformaldehit (0.1mol/L fosfat tampon içinde, pH 7.4) verilerek perfüzyon ile

fiksasyon yapıldı. Uygun cerrahi yöntemle, çevre yumuşak dokular dikkatle temizlendikten sonra, proksimal ve distaldeki anastomozlar dahil olmak üzere sinir dokuları çıkarıldı. % 2.5'lik gluteraldehit solüsyonu içinde 24 saat süreyle 4°C'de immersiyon yoluyla fikse edildi. Daha sonra tampon solüsyonunda yıkandı ve fosfat tamponlu %1'lik ozmiyum tetroksit içinde 4°C'de iki saat süreyle postfikse edildi. Sabit ajitasyonlu doku takip cihazıyla (Leica Wetzlar, Almanya) dereceli etil alkollerden geçirilerek epona (EMS, Almanya) gömüldü. Yarı ince kesitler (her örnek için en az 10 kesit), metilen mavisi-azur II ile literatürde bildirilen periferik sinir rejenerasyon kriterleri açısından (161,162,163,164), bilgisayar ve dijital kamera (Leica DC500, Westlar Almanya) bağlantılı ışık mikroskobu aracılığıyla yakalanarak Leica Application Suite ve Qwin marka görüntü analiz programları ile literatürden modifiye edilen yöntemle kantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre sinirin enine kesit alanı dijital ortamda hesaplandı. Bu alandaki toplam akson ve kan damarı kesiti sayıları ayrı ayrı hesaplanarak elde edilen sayısal veri defekt alanına oranlandı. Biyomateryal uygulanan gruplarda yapay tübüler grefte karşı doku yanıtı literatürdeki yumuşak doku implantlarına ait yöntemle göre semikantitatif olarak skorlandı (159,160). Skorumlama yöntemi tabloda gösterilmektedir (Tablo 3.1). İstatistiksel analizde akson sayısı/defekt alanı, kan damarı sayısı/defekt alanı ve doku yanıtı skorları kullanıldı.



Resim 3.10 Deneklerin genel anestezi sonrası sakrifiye edilmesi

Tablo 3.1 Grefte doku yanıtı kapsamında grefti saran kapsül ve onu çevreleyen çevre dokunun mikroskobik özellikleri skorlanmaktadır.

		Skor			
		4	3	2	1
Kapsül Yerleşimi		Her iki tarafta kapsül	Yalnız alt (iç) yüzde	Yalnız üst (dış) yüzde	Kapsül yok
Kapsül Oluşumu		Yoğun	Gevşek fibro-adipoz veya adipoz	Gevşek fibro-elastik	Kapsül yok
Kapsülün hücresel özellikler	Fibroblast kalınlığı	30 tabakadan fazla	10-30 tabaka	0-10 tabaka	0 tabaka
	Fibroblast içeren yüzey			Hayır	Evet
	Akut/kronik inflamatuvar süreç			Kronik	Akut
	İnflamasyon yoğunluğu	Ağır	Orta	Hafif	Yok
İnflamatuvar hücre yerleşimi	İnflamatuvar hücre	Sonda ve ortada	Ortada	Sonda	yok
	Makrofaj içeren yüzey			Hayır	Evet
	Dev hücre içeren yüzey			Hayır	Evet
	PMNL içeren yüzey			Hayır	Evet
	Plazma hücresi içeren yüzey			Hayır	Evet
	Kan damarı varlığı			Hayır	Evet
Kapsülü çevreleyen doku	Akut/kronik inflamatuvar süreç			Kronik	Akut
	İnflamasyon yoğunluğu	Ağır	Orta	Hafif	Yok
	Makrofaj			Hayır	Evet
	Dev hücre			Hayır	Evet
	PMNL			Hayır	Evet
	Plazma hücresi			Hayır	Evet
	Kan damarı varlığı			Hayır	Evet

3.5 İSTATİSTİK ANALİZ

Çalışmada elde edilen sonuçlar SPSS 15.0 yazılımı kullanılarak Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda analiz edildi. Tüm veriler ortanca, minimum ve maksimum değerleriyle temsil edildi. Verilerin normal dağılıp dağılmadığına bakıldı ve tüm veriler parametrik olmayan testlerle analiz edildi. (Çoklu karşılaştırma için Kruskal Wallis testi kullanıldı ve gruplar arasındaki farklılıkların hangi gruptan kaynaklandığına posthoc Dunn testi ile bakıldı.) Farkın $p < 0.05$ 'ten küçük olması anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Bu çalışmada toplam 30 denek kullanıldı ve bu denekler onarlı üç gruba ayrılarak incelendi. Birinci grupta otolog sinir grefti ile epinöral onarım yapıldı. İkinci grupta PHB ve chitosan modifikasyonu ile hazırlanmış, yönlendirilmiş nanofibriler yüzeyli tüp haline getirilmiş doku iskelesinden oluşan yapay tübüler greft materyali kullanılarak, proksimal ve distal sinir uçları arasında entübülasyon tekniği ile onarım yapıldı. Üçüncü grupta yine aynı yapay tübüler greft materyali ile entübülasyon tekniği uygulandı, ancak greft içerisine insan kaynaklı mezenşimal kök hücre eklenerek onarım yapıldı. Bulgular ve tartışma bölümlerinde birinci gruptan 'otogreft grubu', ikinci gruptan 'yapay tübüler greft grubu', üçüncü gruptan ise 'yapay tübüler greft-kök hücre grubu' olarak söz edilecektir.

4.1 GÖZLEMLER

Çalışma süresince deneklere her gün rutin beslenme ve barınma kontrolü uygulandı. Ameliyat sonrası bir hafta süre ile günlük yara yeri kontrolü yapıldı. Tüm gruplardaki deneklerin tamamında sorunsuz yara yeri iyileşmesi olduğu görüldü. Hiçbir denekte yara yerinde enfeksiyon veya kötü yara yeri iyileşmesi gösterir akut dönemde aşırı kızarıklık, ısı artışı, şişlik gelişimi, kronik dönemde hipertrofik skar veya keloid oluşumu görülmedi. Deney süresince denek kaybı yaşanmadı, tüm denekler deney süresini sağlıklı olarak tamamladı. Dördüncü hafta sonunda yapılan ayak muayenesinde yapay greft grubunda bir denekte sağ ayak üçüncü parmakta tam otofaji gözlemlendi. Diğer gruplarda böyle bir durumla karşılaşılmadı. Sekizinci hafta sonunda yapılan ayak muayenesinde ek başka denekte otofaji olmadığı görüldü. Her üç gruptaki deneklerin cerrahi uygulanarak denerve edilen sağ bacak, gastrokinemius ve soleus kaslarında belirgin atrofi ve ayak tırnaklarında düzleşme gözlemlendi.



Resim 4.1 Yapay tübüler greft grubundaki bir denekte gelişen otofaji

Cerrahi sonrası ilk haftada yapılan yürüme değerlendirmesinde deneklerin tümünün sağ ayak parmakları üzerine basamadıkları, bunun yerine sağ ayak topukları üzerine basarak yürüdükleri, sağ ayaklarını invertte durumda tuttukları ve ağırlı uyaran ile sağ ayak parmaklarını hareket ettirmedikleri görüldü. Bu durum sağ siyatik sinirde tam kesi oluşturma amacına uygun cerrahi uygulandığı yönünde yorumlandı.

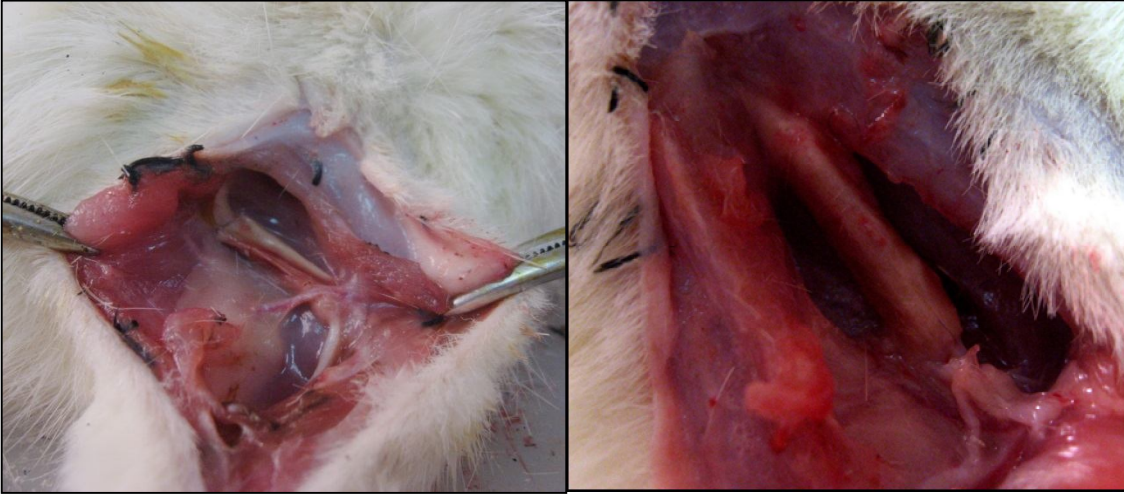


Resim 4.2 Cerrahi sonrası 1.haftada deneklerin yürüme karakteri

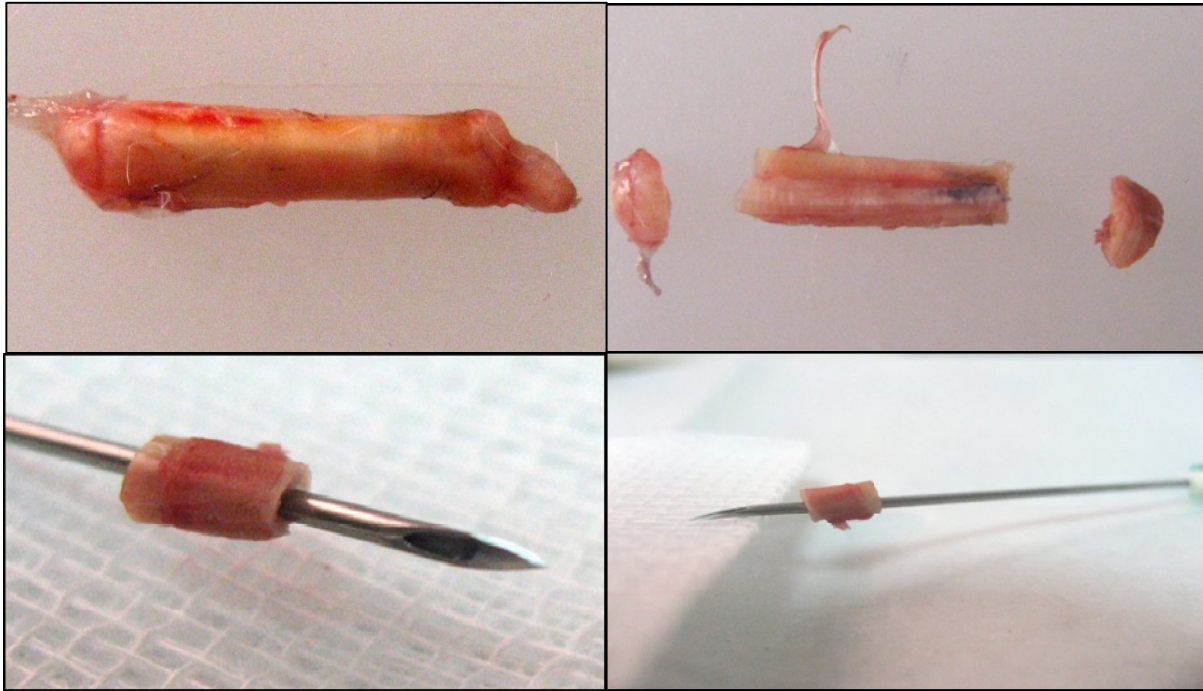
İlerleyen haftalarda inversiyon pozisyonunun kaybolduğu görüldü. Dördüncü haftada yapılan yürüme testinde ayak parmakları üstüne bastıkları saptandı. Bu sırada deneklerin tamamından spontan yürüme halinde iken ayak izi alınabildi. Sekizinci haftada yapılan yürüme testinde normal yürüyüş paternine yakın bir yürüyüş sergiledikleri görüldü. Periferik ağrı verildiğinde ayağı çekme refleksinin mevcut olduğu görüldü ve deneklerin tamamından spontan yürüme halinde iken ayak izi alınabildi.

Çalışmada kullanılan tüm denekler sekizinci hafta sonunda kardiyak perfüzyon yolu ile sakrifiye edildi. Eski insizyon skarı kullanılarak yara yerleri diseke edildi ve sağ siyatik sinirleri yeniden eksplore edildi. Eksplozasyon sırasında hiçbir denekte insizyon bölgesinde enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Derin yarada hiçbir denekte enfeksiyon veya abse bulgusu yoktu. Tüm gruplarda siyatik sinir öncelikle iliopsoas adelesini çaprazladığı alanda tespit edildi. Burada proksimal sütürler görüldükten sonra sinir distale doğru takip edilerek distal sütürlere ulaşıldı ve tüm greft alanı ekspozite edildi. Bu sırada gerek otogreft grubunda gerekse yapay tübüler greft ve yapay tübüler greft-kök hücre gruplarında sinir anastomozu yapılan bölge ile çevre dokular arasında aşırı yapışıklık yoktu. Anastomoz bölgesi proksimal ve distal sütürleri içerecek ve her iki uçtan birer milimetrelilik daha fazladan sinir dokusunu da kapsayacak şekilde keskin diseksiyon kullanılarak çevre dokulardan temizlendi ve mikromakas ile kesilerek tek parça halinde çıkarıldı. Her üç grupta da deneklerin tamamında tüm sütür hatları sağlamdı. Hiçbir denekteki otolog greftler veya yapay tübüler greftlerde kopma olmadığı ve greftin proksimal veya distal uçlardan ayrılmadığı görüldü. Proksimal ve distal uçların anastomozunda kullanılan poliamid sütürler büyük oranda korunmuştu.

Yapay tübüler greft ve yapay tübüler greft-kök hücre gruplarında entübülasyon amaçlı olarak kullanılan PHB ve chitosan kompleksinin üzeri ince, fibröz bir bağ dokusu tabakası ile kaplanmıştı. Her iki grupta da kullanılan tüp materyal deney öncesinde verilen şeklini korumuştu. Otogreft grubunda denekler incelendiğinde kullanılan otogreftlerin makroskopik olarak boyutlarını koruduğu, epinöryumun daha mat bir renge sahip olduğu gözlemlendi.



Resim 4.3 Yapay tübüler greft kullanılan bir denekte cerrahi alanın sekizinci hafta sonundaki eksplorasyon görüntüsü



Resim 4.4 Yapay tübüler greft kullanılan bir denekte sekizinci hafta sonunda yapılan incelemede materyalin tübüler yapısını koruduğu fakat üzerinin ince fibrotik bir tabaka ile kaplanmış olduğu görülmektedir.

4.2 İŞARETLEYİCİNİN MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ

Çalışmada kök hücreleri işaretlemeye kullanılan VP-6 nanoparçacığının deneyde kullanılan hMSC'lerin canlılığına olan etkileri; in vitro ortamda MTT Assay (hücre canlılık testi) kullanılarak değerlendirildi. Deney sonuçları aşağıda tablo halinde gösterilmiştir. İşaretleyici + hMSC + Medyum kullanılan kuyucuklarda yapılan ölçümlerde alınan absorbans değerlerinin hMSC + Medyum içeren grubun absorbans değerleri ile karşılaştırılması sonucu hMSC'lerin canlılığını korudukları gözlemlendi.

Tablo 4.1 MTT Assay ile elde edilen absorbans değerleri (nanometre olarak)

2.gün	5.gün	7.gün	9.gün	11.gün	13.gün
İŞARETLEYİCİ + hMSC + Medyum					
1.714	1.709	1.612	1.634	1.614	1.540
hMSC + Medyum (POZİTİF KONTROL)					
1.711	1.733	1.980	1.857	1.850	1.800
MEDYUM (NEGATİF KONTROL)					
0.145	0.139	0.141	0.159	0.141	0.153

4.3 FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME

Çalışmada kullanılan tüm deneklerde fonksiyonel değerlendirme yürüme analizi ile yapıldı. Bu amaçla siyatik sinir fonksiyon indeksi kullanıldı (153). Bu yöntemle elde olunan değerler yüzde olarak hesaplandı. Sıfıra yakın değerler normale yakın siyatik sinir fonksiyonunu, yüze yakın değerler ise tama yakın siyatik sinir fonksiyon kaybını yansıtmaktadır. SFI için ortalama değerleri hesaplandı ve aşağıdaki tabloda gösterildi.

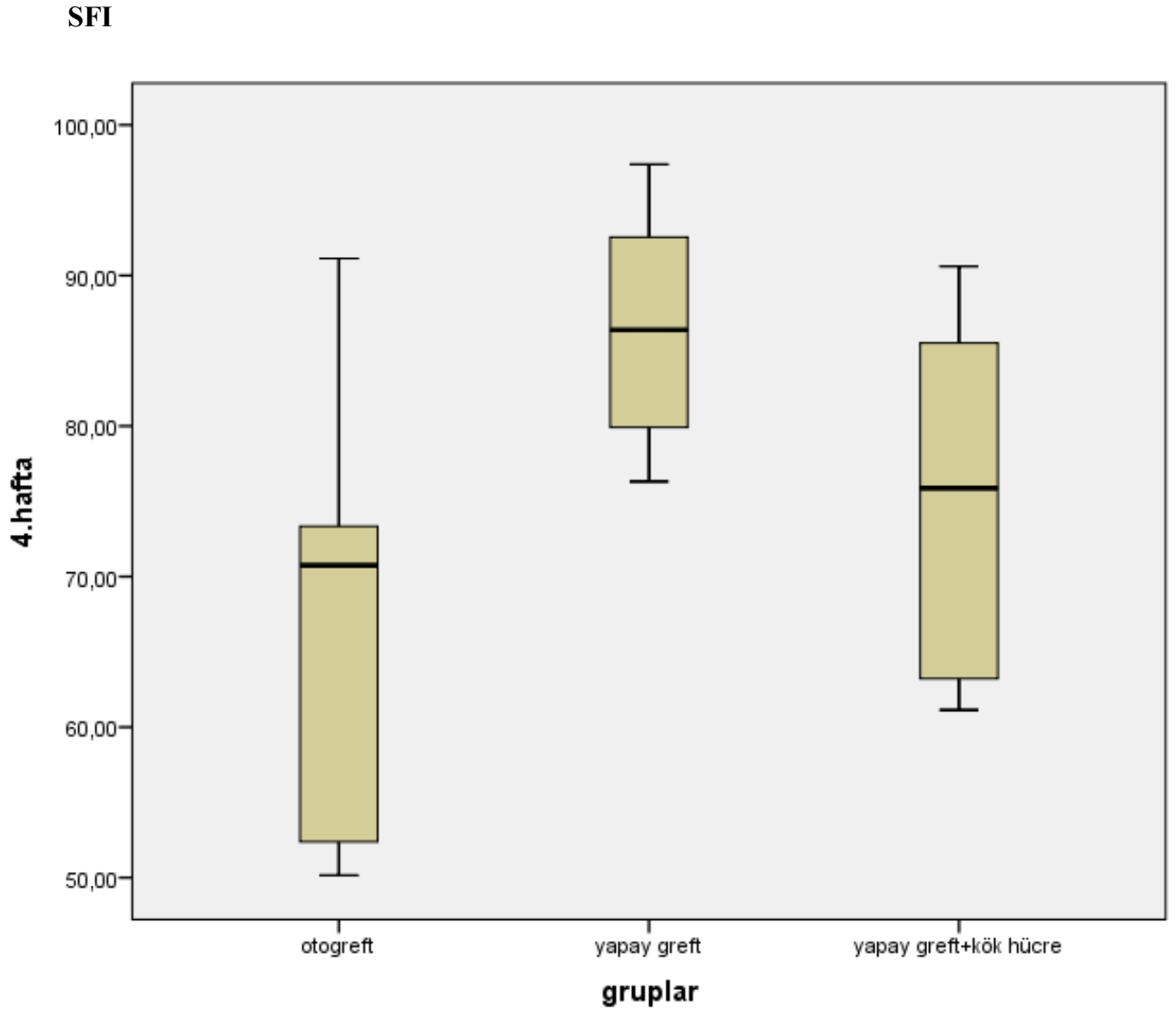
Tablo 4.2 SFI sonuçları için ortalama değerler

		4. Hafta	8. Hafta
Otogreft	Ortanca	70,75	56,26
Yapay tübüler greft	Ortanca	86,39	77,40
Yapay tübüler greft-kök hücre	Ortanca	75,87	59,84

Her üç grupta da tüm deneklere dördüncü ve sekizinci haftaların sonunda yürüme analizi yapıldı. Elde edilen siyatik sinir fonksiyon indeksi sonuçları non parametrik Kruskal Wallis testi ile analiz edildi.

Buna göre dördüncü hafta sonunda yapılan testlerde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.011$). Bu fark Dunn testi ile tekrar değerlendirildi. Otogreft grubu sonuçlarının yapay tübüler greft grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi olduğu görüldü ($p=0,01$). Otogreft ve yapay tübüler greft-kök hücre grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p=1,0$). Yine yapay tübüler greft-kök hücre ve yapay tübüler greft grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,134$).

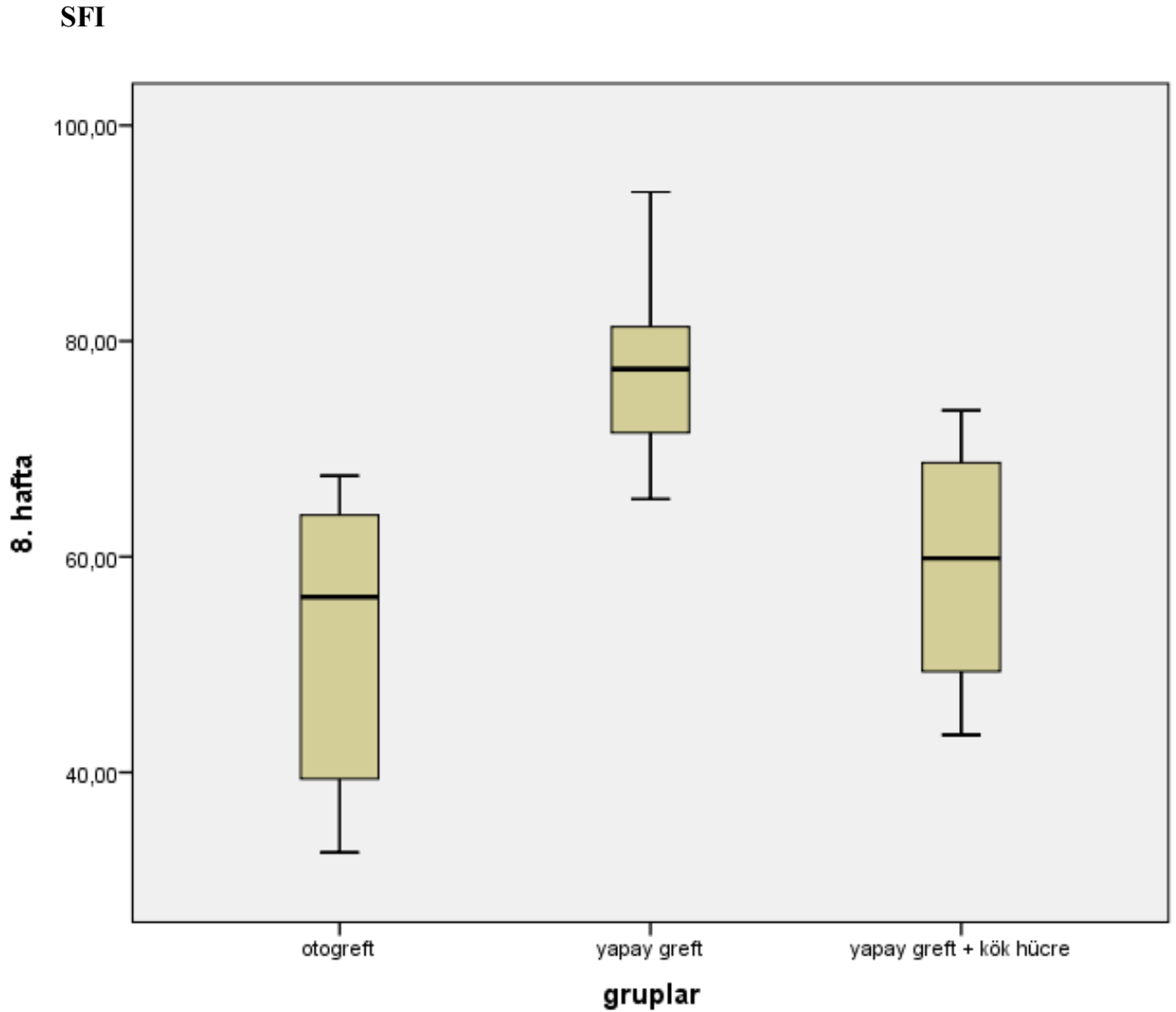
Grafik 4.1 SFI değerlerinde grupların dördüncü hafta sonuçlarının analizi



Sekizinci hafta sonunda yapılan testlerde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu tespit edildi. ($p=0,0001$). Otogreft grubu sonuçları yine yapay tübüler greft grubun'dan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı. ($p= 0,0001$). Yine otogreft grubu ve yapay tübüler greft-kök hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark yoktu ($p=0,64$).

Dördüncü hafta sonuçlarından farklı olarak sekizinci hafta sonunda yapay tübüler greft-kök hücre grubu sonuçlarının yapay tübüler greft grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu görüldü ($p=0,013$).

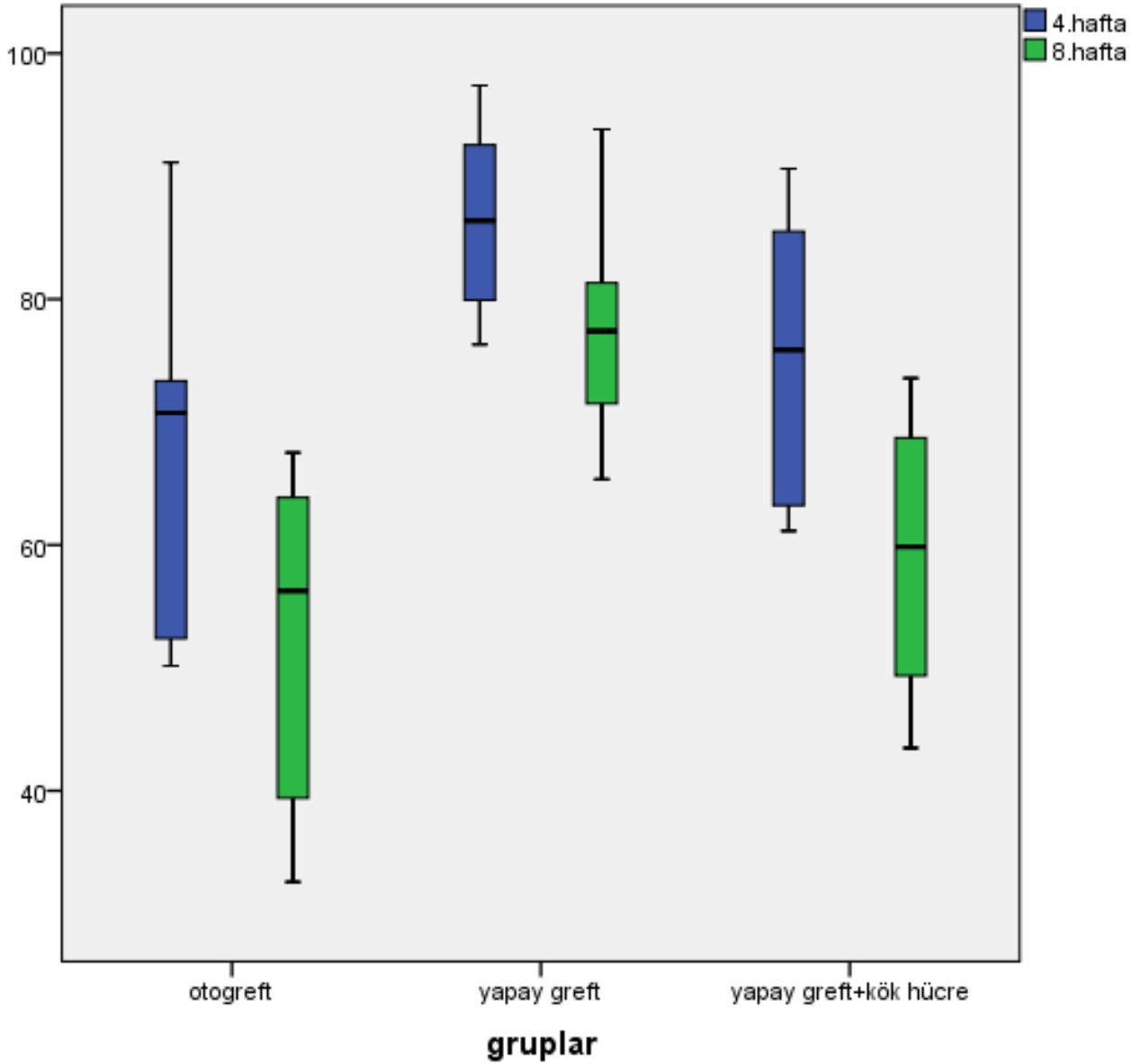
Grafik 4.2 SFI değerlerinde grupların sekizinci hafta sonuçlarının analizi



Sonrasında her grubun kendi içerisinde dördüncü ve sekizinci hafta sonunda elde edilen sonuçları birbirine göre Wilcoxon testi ile analiz edildi. Buna göre otogreft grubunda sekizinci hafta sonundaki sonuçların, dördüncü hafta sonundaki sonuçlara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p=0,005$). Yapay tübüler greft grubunda sekizinci hafta sonundaki sonuçlar, dördüncü hafta sonundaki sonuçlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi ($p=0,005$). Yapay tübüler greft- kök hücre grubunda sekizinci hafta sonundaki sonuçlar, dördüncü hafta sonundaki sonuçlara göre yine istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi ($p=0,005$).

Grafik 4.3 SFI değerlerinde grupların dördüncü ve sekizinci hafta sonuçlarının karşılaştırılması

SFI



Sonuç olarak, bütün grupların sekizinci hafta sonuçlarının dördüncü hafta sonuçlarına göre kendi içerisinde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu bulundu ($p=0,005$).

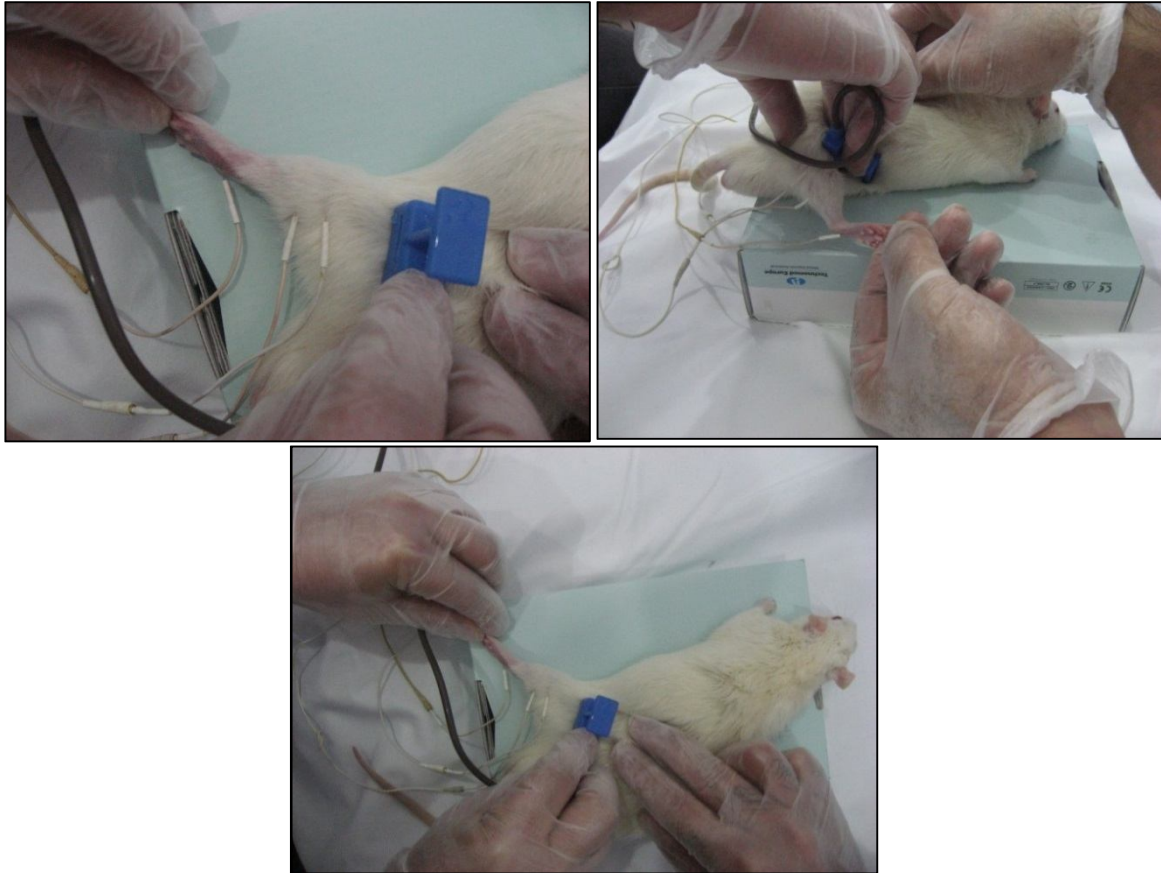
Tablo 4.3 SFI değerleri için dördüncü ve sekizinci haftalar sonunda elde edilen sonuçlar, sonuçların gruplar arasında analizi ve her bir grubun kendi içinde zamana göre analizi

	4. Hafta	8. Hafta	Wilcoxon Testi
Otogreft			
Ortanca	70,75	56,26	P=0,005
Minumum	50,16	32,59	
Maksimum	91,13	67,52	
Yapay tübüler greft			
Ortanca	86,39	77,40	P=0,005
Minumum	76,31	65,36	
Maksimum	97,38	93,81	
Yapay tübüler greft- kök hücre			
Ortanca	75,87	59,84	P=0,005
Minumum	61,13	43,47	
Maksimum	90,61	73,56	
Kruskal Wallis	P=0,011	P=0,0001	

4.4 ELEKTROFİZYOLOJİK DEĞERLENDİRME

Çalışmada kullanılan deneklere (her gruptan iki tane olmak üzere toplam 6 adet denek) elektrofizyolojik değerlendirme amacı ile sekizinci hafta sonunda sakrifikasyon öncesi EMG uygulandı. Test sırasında tüm denekler için önce sol (normal) bacakta ve sonrasında sağ (cerrahi uygulanmış) bacakta gastrokinemius ve soleus kaslarından iğne elektrodlar kullanılarak CMAP değerleri kaydedildi. CMAP genliği bir sinirin uyarılması ile o sinirin innerve ettiği kas liflerinden elde edilen toplam kas yanıtını yansıtmakta olup, sinir akson sayısı ile orantılıdır. Çalışmamızda opere edilen taraftaki (sağ) siyatik sinir CMAP genliğinin, sağlam taraftaki (sol) siyatik sinir CMAP genliğine oranının hesaplanması ile elde edilen yüzde CMAP değerleri ile istatistiksel analiz yapıldı. Yüzde CMAP değeri rejenerasyon indeksi olarak ifade edilebilir ve opere edilen siyatik sinirdeki rejenerasyonun göstergesi olarak, gastrokinemius kasını innerve eden siyatik sinir aksonlarının sayısını yansıtmaktadır.

$$\text{Yüzde CMAP} = 100 \times \text{CMAP (sağ)} / \text{CMAP (sol)}$$



Resim 4.5 EMG kaydı

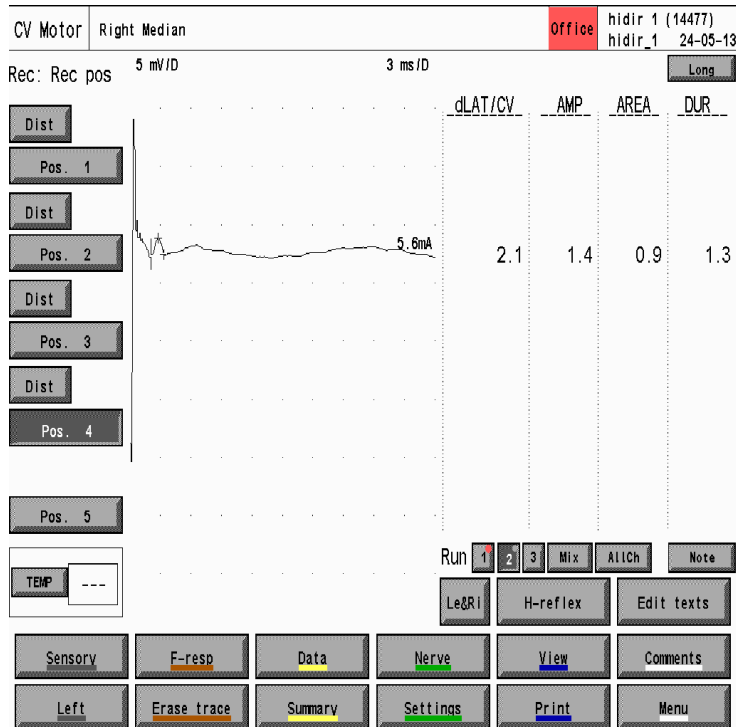
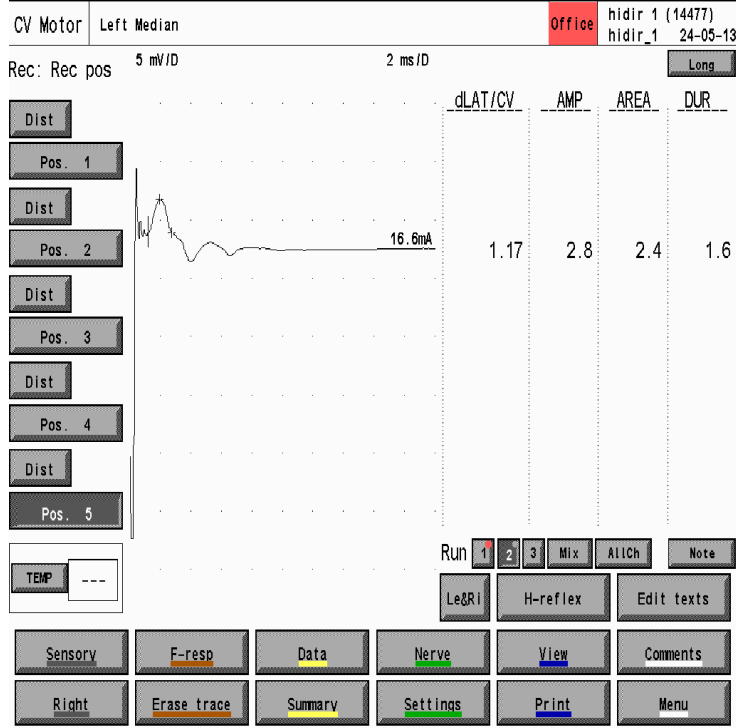
Elde edilen değerler yardımıyla yüzde CMAP değerleri bulundu ve gruplar arasında bu değer bakımından istatistiksel olarak farklılık olup olmadığına non-parametrik test olan Kruskal Wallis testi yardımıyla bakıldı. Testler $p= 0,05$ üzerinden istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı şeklinde değerlendirildi. Buna göre gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.565$).

Tablo 4.4 Yüzde CMAP sonuçları

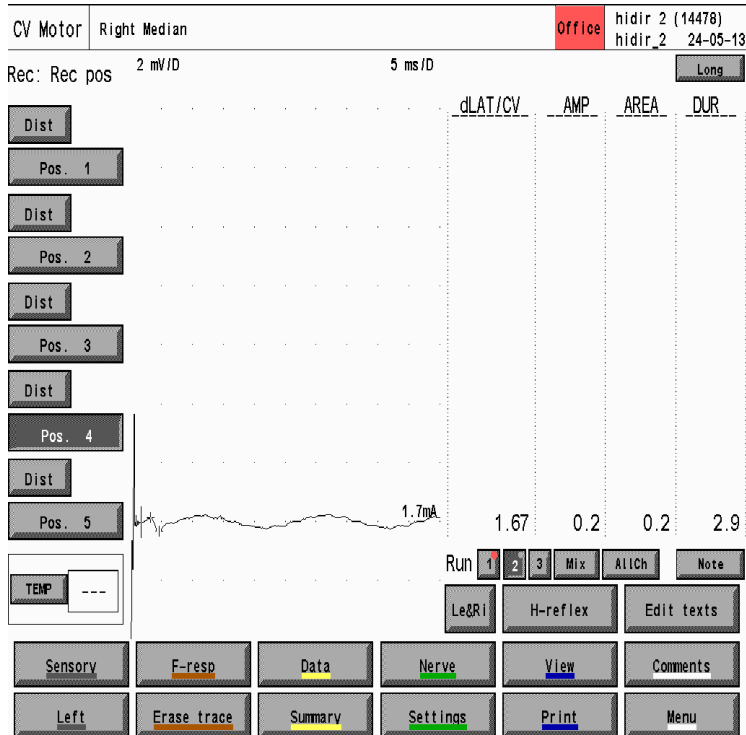
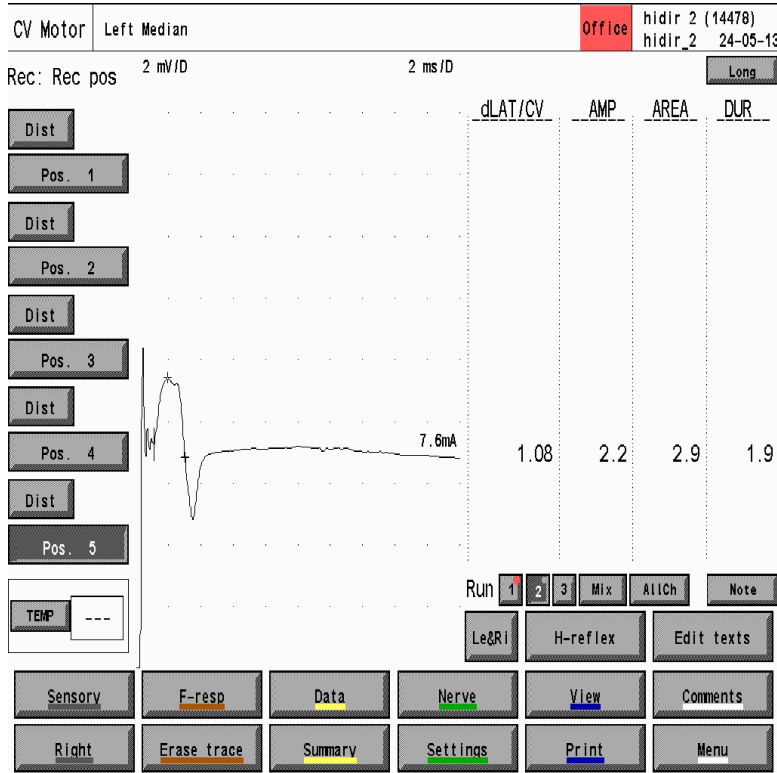
	LmV	RmV	YÜZDE CMAP
Otogreft 1	2,2	0,2	9,09
Otogreft 2	7,8	0,8	10,26
Yapay tübüler greft 1	2,8	0,7	25
Yapay tübüler greft 2	1,5	0,1	6,67
Yapay tübüler greft + kk hcre 1	0,4	0,05	12,50
Yapay tübüler greft + kk hcre 2	3,5	0,4	11,43

Şekil 4.1 EMG kayıtları.

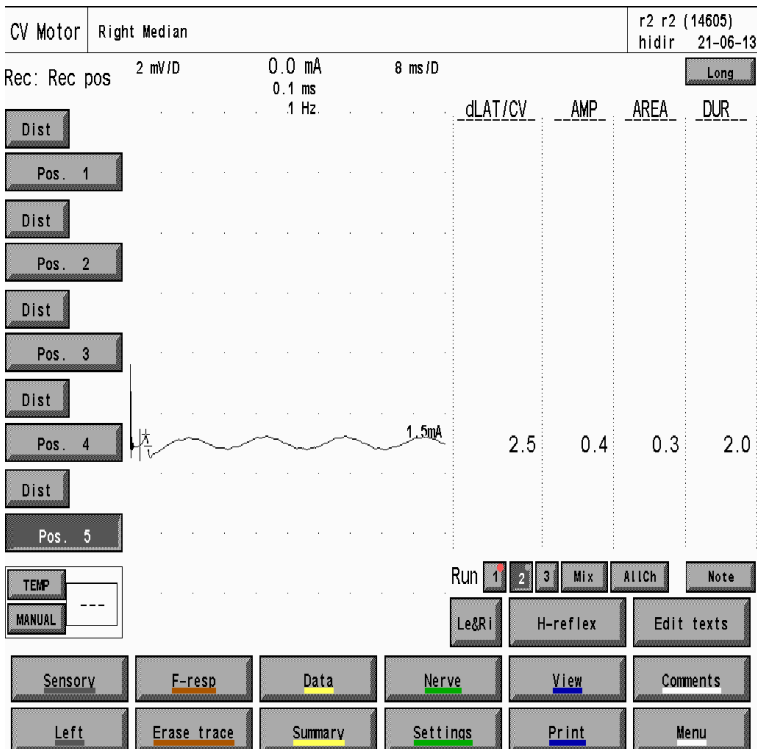
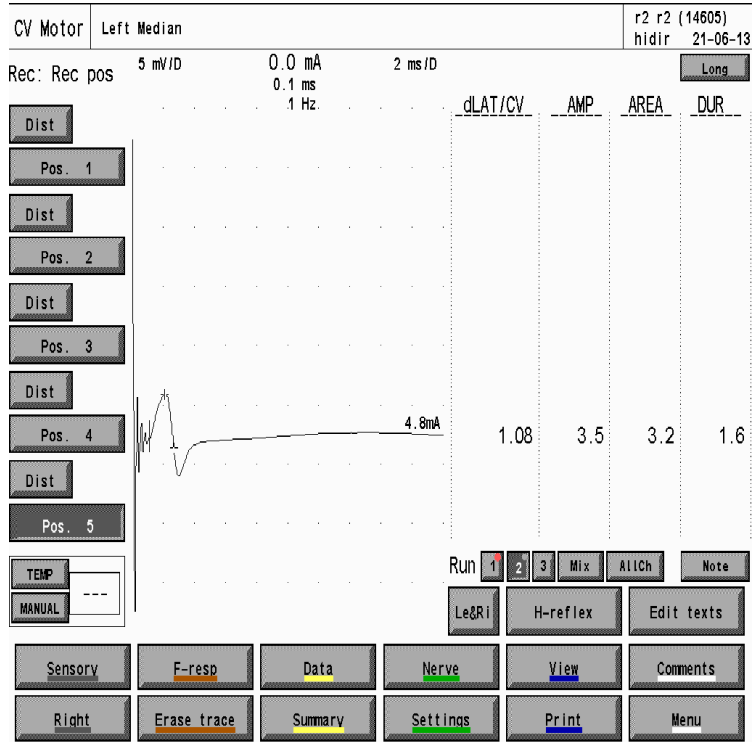
A) Yapay tübüler greft grubundaki bir deneğin sol ve sağ bacaklarından alınmış olan örnek kayıtlar. Cerrahi uygulanmış sağ bacakta aksiyon potansiyeli oluştuğu görüldü (5,6 mA). Bu sonuç aksonal rejenerasyonun devam ettiği yönünde değerlendirildi. Sağlam olan sol bacaktan alınan aksiyon potansiyeli değerinin (16,6mA) daha yüksek olduğu görülmektedir.



B) Otogreft grubundaki bir deneğin sol ve sağ bacaklarından alınmış olan örnek kayıtlar. Cerrahi uygulanmış sağ bacakta aksiyon potansiyeli olduğu görüldü (1,7mA). Bu sonuç aksonal rejenerasyonun devam ettiği yönünde değerlendirildi. Sağlam olan sol bacaktan alınan aksiyon potansiyeli değerinin (7,6mA) daha yüksek olduğu görülmektedir.



C) Yapay tübüler greft-kök hücre grubundaki bir deneğin sol ve sağ bacaklarından alınmış olan örnek kayıtlar. Cerrahi uygulanmış sağ bacakta aksiyon potansiyeli olduğu görüldü (1,5mA). Bu sonuç aksonal rejenerasyonun devam ettiği yönünde değerlendirildi. Sağlam olan sol baktan alınan aksiyon potansiyeli değerinin (4,8mA) daha yüksek olduğu görülmektedir.



4.5 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

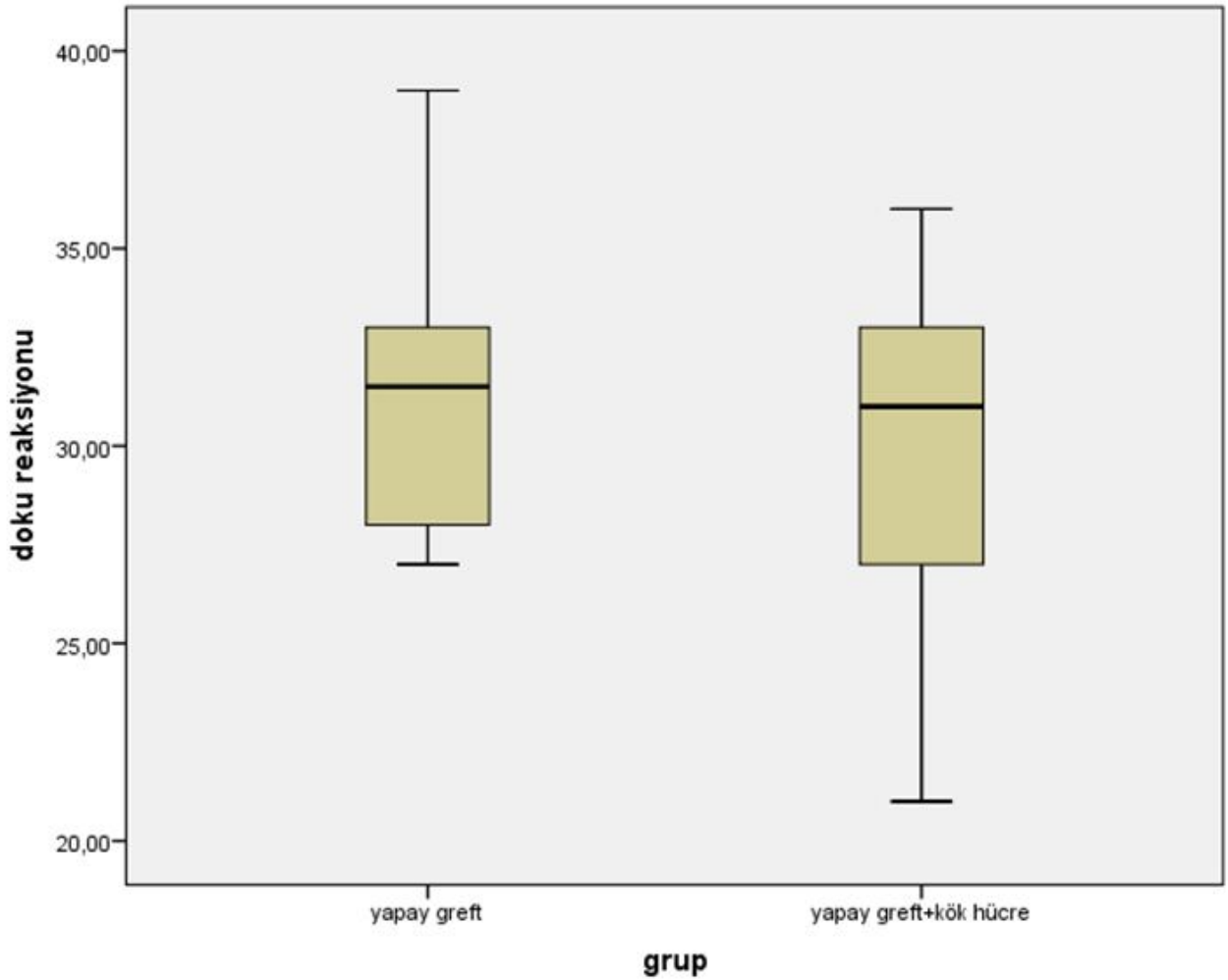
Işık mikroskobu düzeyinde yapay greft olarak kullanılan PHB ve chitosan yapısındaki tüplerin in vivo koşullarda hemen hiç degrade olmadığı ve varlığını koruduğu saptandı. PHB ve chitosan yapısındaki yapay tübüler greft orta derecede doku reaksiyonuna neden oldu (Şekil 4.2). PHB ve chitosan yapısındaki tüpe karşı oluşan doku reaksiyonu: mezenşimal kök hücre uygulanan (yapay tübüler greft-kök hücre) ve uygulanmayan (yapay tübüler greft) grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermedi ($p=0,676$).

Tüp şeklindeki greftin hem iç hem de dış yüzünde lenfosit, parçalı ve makrofaj ağırlıklı, yer yer dev hücreler ve katmanlar oluşturan fibroblastların katıldığı orta kalınlıkta (1 ila 10 katlı) bir enkapsülasyon olduğu gözlemlendi. Tüpün iç ve dış yüzündeki kapsül kalınlığı birbirine yaklaşık olarak eşitti. İçteki gevşek ve damardan zengin bağ dokusu sinir rejenerasyonunun gerçekleştiği alanla devamlıydı.

Tablo 4.5 Doku reaksiyonu skorları analizi

		Doku Reaksiyonu
Yapay tübüler greft	Ortanca	31,5
	Minumum	27
	Maksimum	39
Yapay tübüler greft + kök hücre	Ortanca	31
	Minumum	21
	Maksimum	36
Mann-Whitney U		P=0,676

Grafik 4.4 Doku reaksiyonunun yapay tübüler greft ve yapay tübüler greft-kök hücre grupları arasındaki analizi



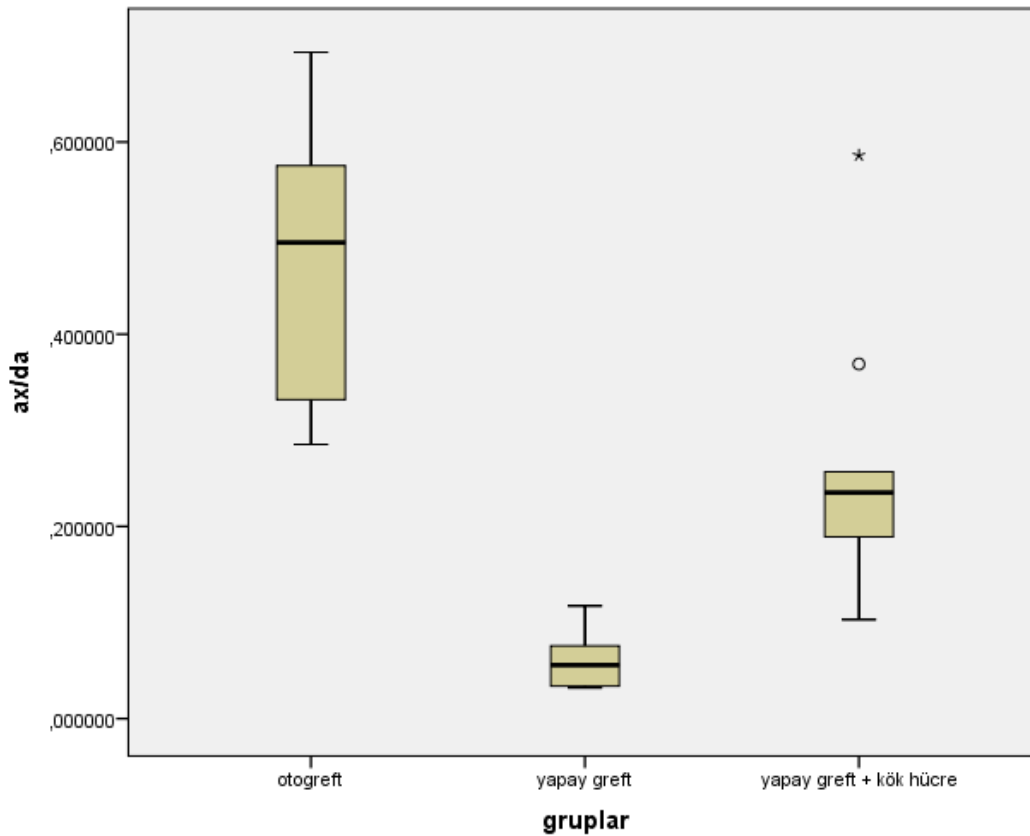
Akson sayısı/defekt alanı oranı sonuçları non parametrik Kruskal Wallis testi ile çoklu analiz edildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0,0001$). Ototogreft uygulanan grupta akson fasiküllerinin sık ve düzenli gruplar yaptığı sağlıklı sinir rejenerasyonu sürecine ait görüntüler izlendi (Şekil 4.2). Bu grupta siniri içten dışa saran bağ dokusu yapısındaki kılıflar ve damarlar düzenli görünümdeydi. Gruplar arasında ikili analizler uygulandığında otogreft grubundaki akson sayısı yapay tübüler greft grubuna göre anlamlı bir biçimde daha fazlaydı. ($p=0,0001$).

Fakat otogreft ve yapay tübüler greft-kök hücre grupları arasında akson sayısı/defekt alanı oranı sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede fark yoktu ($p=0,143$).

Tablo 4.6 Gruplar arasında akson sayısı/defekt alanı oranlarının analizi

		Akson sayısı/defekt alanı
Yapay tübüler greft	Ortanca	0,055
	Minumum	0,032
	Maksimum	0,117
Yapay tübüler greft-kök hücre	Ortanca	0,235
	Minumum	0,103
	Maksimum	0,586
Otogreft	Ortanca	0,495
	Minumum	0,285
	Maksimum	0,693
Kruskal Wallis		P=0,0001

Grafik 4.5 Gruplar arasında akson sayısı/defekt alanı (ax/da) oranlarının analizi



Yeni rejenere olan akson grupları yapay tübüler greft-kök hücre ve yapay tübüler greft uygulanan gruplar arasında karşılaştırıldığında; yapay tübüler greft-kök hücre grubunda yapay tübüler greft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde akson sayısının daha fazla olduğu görüldü ($p=0,018$).

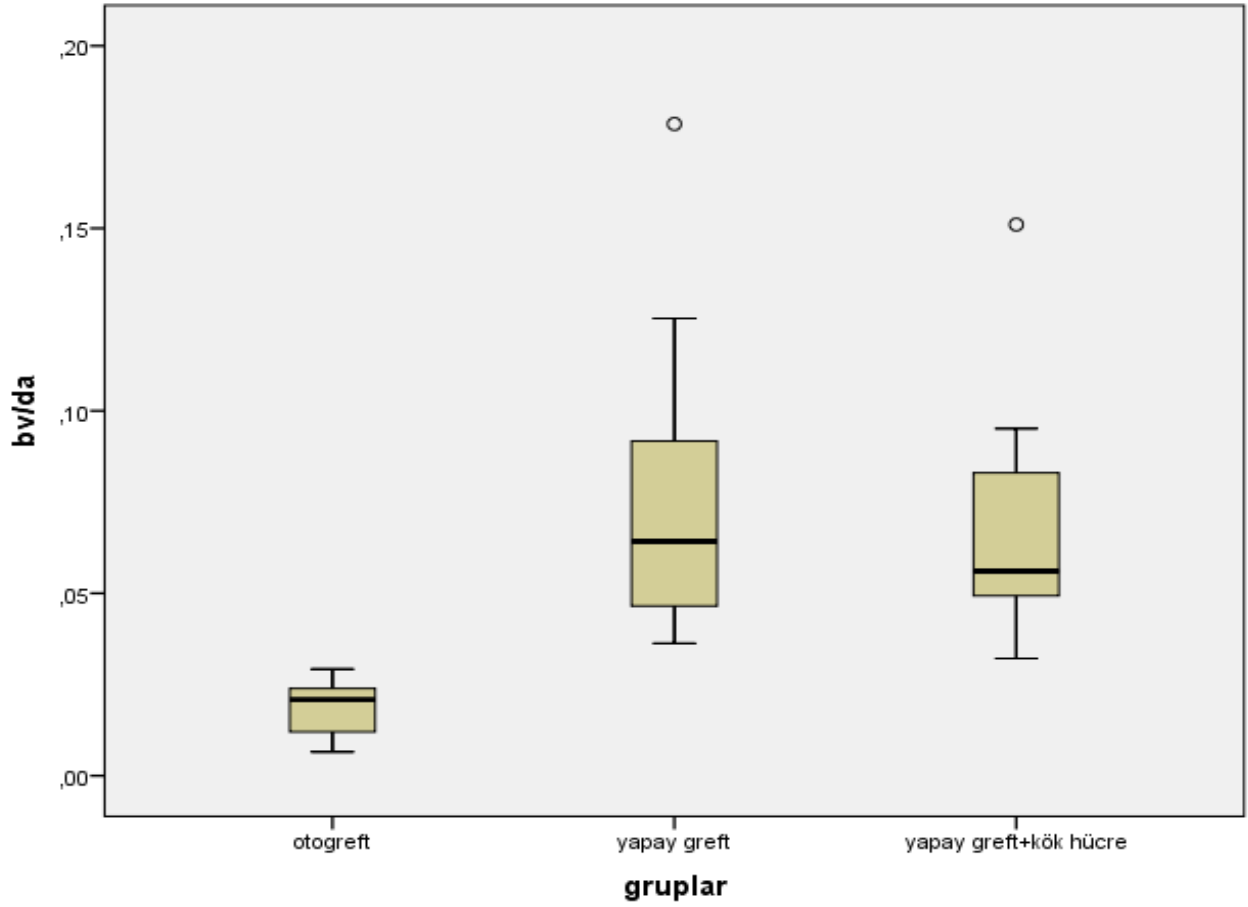
Mezenşimal kök hücre içeren ve kök hücre içermeyen PHB-chitosan modifikasyonu ile tüp şeklinde hazırlanarak yapay tübüler greft kullanılan gruplarda tüpün lümeninde damardan zengin bağ dokusu içinde rejenere olan düzensiz bebek akson grupları izlendi (Şekil 4.2 B ve C). Perinöral vasküler bağ dokusu tüpe karşı oluşmuş enkapsülasyon alanı ile kesişiyordu. Mezenşimal kök hücrelerle birlikte yapay tübüler greft uygulanan grupta, tek başına yapay tübüler greft uygulanan gruba göre daha düzenli bir onarım alanı izlendi.

Hem yapay tübüler greft hem de yapay tübüler greft-kök hücre gruplarında defekt alanında çok sayıda küçük damarın varlığı dikkati çekti. Damar sayısı/ defekt alanı oranı non parametrik Kruskal Wallis testi ile çoklu olarak analiz edildi. Aksonal rejenerasyon alanındaki damarı sayısı mezenşimal kök hücreli ve kök hücresiz grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark göstermedi ($p= 1$). (Şekil 4.2)

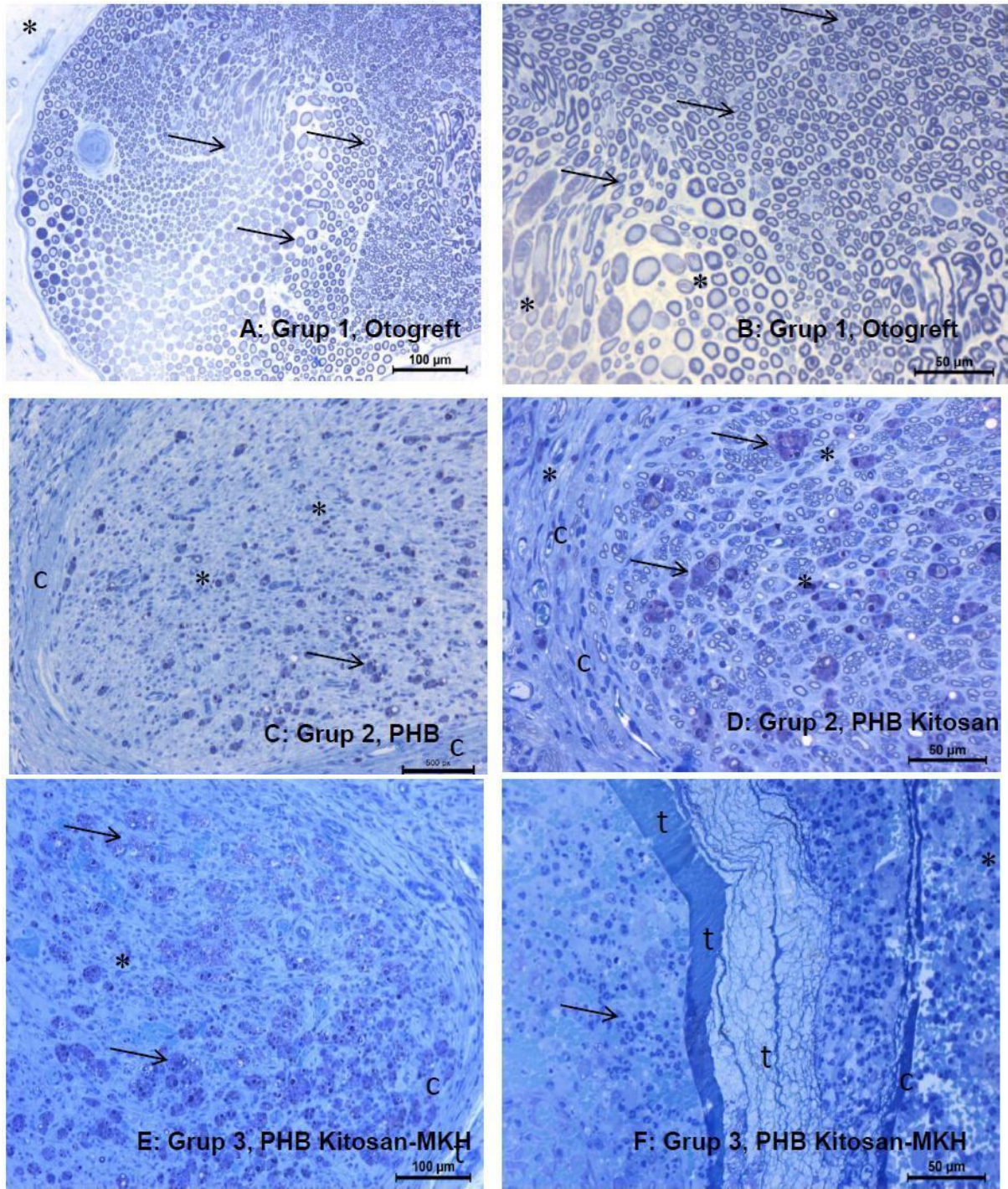
Tablo 4.7 Gruplar arasında damar sayısı/defekt alanı oranlarının analizi

		Damar sayısı/defekt alanı
Otogreft	Ortanca	0,020
	Minumum	0,010
	Maksimum	0,030
Yapay tübüler greft	Ortanca	0,064
	Minumum	0,040
	Maksimum	0,180
Yapay tübüler greft + kök hücre	Ortanca	0,056
	Minumum	0,030
	Maksimum	0,150
Kruskal Wallis		P=0,0001

Grafik 4.6 Gruplar arasında damar sayısı/defekt alanı (bv/da) oranlarının analizi



Sonuç olarak incelenen tüm gruplarda rejenere olan aksonlar saptanmıştır. Her üç grupta da uygulanan tedaviler periferik sinir rejenerasyonuna izin vermiştir. PHB ve chitosan modifikasyonu ile hazırlanan tübüler greftin mezenşimal kök hücre ile birlikte uygulanmasının tek başına uygulanmasına göre sinir rejenerasyonu sürecini bir miktar hızlandırdığı saptandı (Şekil 4.2E ve F).



Şekil 4.2 Histopatolojik görüntüler. Otogreft grubunda (A,B) rejenere olan aksonların (ok) düzenli fasikülleri gözlenmektedir. Yapay tübüler greft ve yapay tübüler greft-kök hücre gruplarında (C,F) yer yer degrade olmasına rağmen genel olarak bütünlüğünü koruyan PHB-Chitosan tübüler greft (t) ve onu iç ve dış yüzünde saran lenfomonositer, fagositer hücreler ve fibroblastlardan oluşan enkapsülasyon (c) görülmektedir. Tübüler yapıdaki greft lümenini merkezde damardan (yıldız) zengin, rejenere olmakta olan miyelinli ve miyelinsiz akson kesitlerini içeren fibrovasküler granülasyon dokusunun doldurduğu görülmektedir. E ve F de aksonlar, C ve D ye göre çok sayıda ve daha düzenlidir.

5. TARTIŞMA

Bir periferik sinirin herhangi bir nedenle bütünlüğünün bozulması durumunda organizma bunu tamir etmek için gerekli doğal mekanizmalara sahiptir. Yine de rejenerasyon denilen bu sürecin başarılabilmesi için bazı şartlar gerekmektedir. Periferik sinir sisteminde nöropraksinin ötesine geçen tüm yaralanmalarda sinirin distalinde Wallerian dejenerasyon gelişmekte ve ne kadar uzun bir sinir olduğundan bağımsız olarak proksimal kısım ile birlikte distal kısmın rejenerasyon olması gerekmektedir. Burada sinir rejenerasyonunun en önemli aşaması olan proksimal ve distal kısımlar arasında fiziksel olarak uygun bir bağlantının oluşması bu tip sinir bütünlüğünün bozulduğu durumlarda çok önemlidir. Cerrahi tedavi bu bağlantının sağlanmasında en önemli seçenektir. Burada amaç proksimalde kalan aksonların rejenerasyon sırasında orjinal distal uçlarına ulaşmalarının sağlanması ve böylece son organları innerve edebilmesidir (5). Yukarıda bahsedilen sinir dokusunun bütünlüğünün bozulduğu olgularda yapılan uç-uca anastomozlar bu amaca ulaşmanın en uygun yolu olarak görülmektedir (109,110). Ancak sinir dokusunda kayıp olması durumunda veya herhangi bir nedenle sinir uçları birbirine yaklaştırılmadığında periferik sinir onarımlarında oluşabilen gerginlik ve vasküler yetersizlik nedeniyle yapay greft kullanmak zorunluluğu ortaya çıkmaktadır.

Periferik sinir yaralanmaları için cerrahi tedavi uygulamaları 1800'lü yılların ikinci yarısında başlamış ve en önemli bilgi birikimi dünya savaşlarında elde edilmiştir. Sinir dokusu kaybı olan periferik sinir yaralanmalarında greft olarak başlangıçta otogreftlerin kullanılması düşünülmüştür. Bu amaçla ven, arter, adale, tendon gibi yapılar kullanılsa da bugün tercih edilen yöntem otolog sinir greftleridir. Bu yolla tedavi bugün altın standart olarak kabul görmektedir (8). Yine de bu yöntemin bazı dezavantajlarının olduğu bilinmektedir. Donör sinir alanında duyu fonksiyon kaybı, donör sinir ile alıcı sinir çapında uyumsuzluk, yanlış eşleşme denilen, motor ve duysal sinirlerin uygunsuz eşleşmesinin oluşturduğu sıkıntılar, ikinci ek cerrahiye gereksinim duyulması, yara yeri problemleri oluşması ve buna bağlı morbidite önemli dezavantajlardır. Hatta bazı durumlarda yeteri kadar donör sinir grefti elde edilememesi ve sadece bu nedenle yeterli tedavinin sağlanamaması bir diğer dezavantajdır. Tüm bu dezavantajlar araştırmacıları otogreft yerine kullanılacak yapay greftlere ve entübülasyon tekniklerinin kullanılmasına yöneltmiştir. Bu amaçla bugüne kadar organik olmayan silikon, PGA gibi materyaller veya canlı organizmada yer alan kollajen gibi yapı taşları kullanılmıştır (116,117,167). Bu tip greft ya da biyomateryallerin bir kısmı deneysel çalışmalarda, bir kısmı ise klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. 2000 yılında

96 hastada dijital sinir rekonstrüksiyonunda poliglikolik asit tüplerin kullanıldığı çok merkezli, randomize, prospektif bir çalışma yayınlanmıştır (117). Literatürde bu tip greft ve biyomateryallerin insan üzerinde etkinliğini otolog duysal sinir greftleri ile karşılaştıran prospektif, randomize ve çift kör güvenilir çalışma sayısı çok azdır. Ayrıca entübülasyon çalışmalarına ek olarak periferik sinir rejenerasyonuna katkısı olabilecek kök hücrelerle ilgili sonuçlar hakkındaki veriler yetersizdir (156,157).

Günümüzde sinir dikişlerine alternatif olarak taze sinir yaralanmalarında, sinir greftlerine alternatif olarak rekonsrükatif sinir cerrahisinde, ağırlı nöromaların tedavisinde entübülasyon amaçlı tüpler kullanılmaktadır. Entübülasyonun sinir defektlerinin onarımı için sinir otogreftlerine alternatif olarak kullanılmasıyla birlikte aynı zamanda doku kaybı olmayan lezyonlarda da sinir sütürasyonuna alternatif olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir (116). Entübülasyonda rejenerasyona katkısı olan nörotrofik faktörlerin, inflamatuvar mediatörlerin, sitokinlerin ve kök hücrelerin direkt olarak lümen içerisine verilebilmesi bir diğer avantajdır (169) . Aynı zamanda entübülasyonda allogreft kullanımında gerekli olan immünsüpresyona gerek duyulmaz. Entübülasyon amacıyla kullanılan yapay tübüler greftler, otogreft kullanımının getirdiği dezavantajları ortadan kaldırırken bazı dezavantajlara da kendisi neden olmaktadır. Özellikle yabancı cisim reaksiyonu nedeni ile oluşan artmış inflamatuvar cevap yara bölgesinde sinir rejenerasyonuna olumsuz etki eder. Bu yapay greftlerin ilk dezavantajdır. Yapay greftlerin insanlarda kullanılabilmesi için biyoçözünbilir olmaları gerekmektedir. Literatürdeki biyoçözünür olmayan materyallerle ilgili çalışmalar (silikon v.b), bunların bir süre sonra sinir basısı nedeniyle rejenerasyona engel olduğunu ortaya koymuştur (165,166).

Bu amaçla geliştirilen bakteriyel polyesterler mikroorganizmalarda enerji deposu olarak üretilmeleri nedeniyle biyoçözünbilir yapıdaki maddelerdir (168). Yapılan çalışmalarda bakteriyel polyesterlerin aerobik ortamda karbondioksit ve suya kadar parçalandıkları gösterilmiştir (127). Bu özellik bakteriyel polyesterlerin diğer doku mühendisliği alanlarında olduğu kadar periferik sinir yaralanmalarında cerrahi bir tedavi seçeneği olan entübülasyon stratejilerinde greft olarak kullanımına izin vermektedir.

PHB bakteriyel polyester ailesinin bu mekanik ve biyolojik özelliklerine sahip bir biyomateryaldir. Daha önce yapılan çalışmalar PHB'in canlı dokularla uyumuna ve diğer bakteriyel polyesterler ile karşılaştırılabilir şekilde hücre büyümesine ve aksonal rejenerasyona katkısına vurgu yapmaktadır (130,131,170). Araştırılan hücre tipleri arasında kök hücrelerde

bulunmaktadır (131). Polihidroksibütirat (PHB) tp Şekli verilebilen yapıda olması, biyouyumlu olması, hidrolitik yıkılmaya dirençli olması, nontoksik olması, bir süre sonra vücuttan yıkılarak uzaklaştırılabilmesi nedeni ile tübüler greft olarak kullanılmaktadır. Fakat PHB'nin düşük mekanik güç ve yüksek kırılgnlık gibi dezavantajları vardır (15). PHB'nin düşük mekanik güce ve yüksek kırılgnlık riskine sahip olması nedeniyle literatürdeki deneysel çalışmalarda tp Őeklini koruyamamış olması ve mekanik olarak yetersiz kalması, bizi kullanılan bakteriyel polyesterde değişiklik yapmaya yönlendirdi. Bakteriyel polyester materyalinin başka bir biyopolimer olan ve canlı dokular için toksik olmayan chitosan ile modifiye edilerek daha güçlü bir tübüler yapı oluşturulması amaçlandı. Bu çalışmada hazırlanan tübüler greftlerin i yüzeyi yönlendirilmiş nanofibriler PHB membran, dış yüzeyi ise chitosan filmden oluşturuldu. PHB'nin i yüzeyindeki yönlendirilmiş nanofibriler membranların aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdıkları bilinmektedir. Chitosan kaplama ile hazırlanan greftin mekanik dayanıklılığını artırmak amaçlandı.

Daha önce kliniğimizde yine bir bakteriyel polyester olan poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat)'dan (PHBHHX) retilen tübüler greftlerle yapılan deneysel çalışmada sinir rejenerasyonu açısından çok iyi sonuçlar elde edilmesine rağmen kullanılan biyomateryalin mekanik olarak yetersiz olduğu tespit edildi (171). Bu çalışmada yapay tübüler greft ve yapay tübüler greft-kök hücre gruplarında kullanılan, dış yüzeyi chitosan kaplı ve i yüzeyi PHB'dan oluşan tübüler greftlerin tümünün sekiz hafta sonunda yara iyileşmesindeki kompresif gçlerle ezilmediği ve çökmeye dayanıklı olduğu tespit edildi. Yapay tübüler greftlerin tamamının içerisinde hem makroskopik olarak hem de mikroskopik olarak rejenere aksonlar görüldü. Hiçbir denekte greftin içi boş olarak bulunmadı. Tübüler greftler içinde rejenere olan aksonların bulunması modifikasyon ile hazırlanarak güçlendirilen tübüler greftin sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca İngilizce literatürde PHB'nin chitosan ile modifiye edildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmadı.

Periferik sinir onarımı sonrası deneklerin fonksiyonel iyileşmelerini değerlendirmenin en önemli metodlarından birisi siyatik sinir fonksiyon indeksidir (SFI) (153). Bizim çalışmamızda dördüncü hafta sonunda yapılan SFI' lar değerlendirildiğinde otogreft grubu sonuçlarının yapay tübüler greft ve yapay tübüler greft-kök hücre gruplarından anlamlı derecede daha iyi olduğu görüldü. Aynı Şekilde yapay tübüler greft-kök hücre grubu sonuçlarının yapay tübüler greft grubundan anlamlı derecede daha iyi olduğu tespit edildi. 4. Hafta sonunda ortanca değerleri incelendiğinde otogreft grubunda %70, yapay tübüler greft-

kök hücre grubunda %75 ve yapay tübüler greft grubunda ise %86 olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar üç grupta 4. hafta sonunda henüz anlamlı bir sinir iletimi ve kas reinnervasyonu olmadığı yönünde yorumlandı. Sekizinci hafta sonunda grup ortancaları değerlendirildiğinde sonuçların otogreft grubunda %56, yapay tübüler greft-kök hücre grubunda %59 ve yapay tübüler greft grubunda ise % 77 olduğu tespit edildi. Sekizinci hafta sonunda otogreft, yapay tübüler greft-kök hücre ve yapay tübüler greft gruplarındaki sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ve aksonal rejenerasyonun olumlu yönde devam ettiği şeklinde yorumlandı. Zaman içerisinde sonuçlarda düzelmeye devam etmesi asıl beklenti olduğu için SFI ölçümleri açısından bakıldığında otogreft ve yapay tübüler greft-kök hücre gruplarının daha iyi iyileşme sağladığı görüldü.

Ancak sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşmenin sekiz haftada tamamlanmış olmadığı düşünüldüğünde bu sonuçlar ilerleyen haftalarda yapay tübüler greft-kök hücre gruplarının lehine farkın açılabilceği beklentisini doğurmaktadır. Daha uzun süreli bir çalışma ile bu araştırılabilirse de bu çalışmanın sonuçları ile bunu söylemek mümkün değildir. Sonuçta sekiz hafta sonunda yapay tübüler greft grubunda otogreft ve yapay tübüler greft-kök hücre grupları ile karşılaştırılabilir bir fonksiyonel düzelmeye sağladığı görülmektedir. SFI sonuçlarının görece olarak ölçüm hatalarına imkan verdiği ve güvenilirliğinin çok yüksek olmadığı unutulmamalıdır.

Elektrofizyolojik çalışmalar periferik sinir yaralanması modellerinde en çok başvurulan değerlendirme yöntemlerinden birisidir. Bu çalışmada her gruptan ikişer adet olmak üzere toplam altı denekte sinir rejenerasyonunu EMG ile değerlendirdik. CMAP değerleri normal periferik sinir fonksiyonunun en önemli göstergelerinden birisidir. Deneklerin yüzde CMAP değerleri ile yapılan karşılaştırmalarda hem otogreft hem de yapay tübüler greft-kök hücre grubu ve yapay tübüler greft grubunun benzer yüzde CMAP değerlerine sahip olduğu görüldü. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. Yapılan elektrofizyolojik değerlendirmede bütün gruplarda siyatik sinir hasarı oluşturulan bacakta aksiyon potansiyellerinin sağlam bacakta aksiyon potansiyellerinden daha düşük değerde olduğu tespit edildi. Bu sonuç hasar oluşturulan siyatik sinirde aksonal rejenerasyonun devam ettiği şeklinde yorumlandı. Fakat gerek denek sayısının yetersiz olması gerekse sekiz haftalık süreçte henüz aksonal rejenerasyonun tamamlanmamış olması nedeni ile bizim çalışmamızdaki EMG sonuçları ile kesin bir değerlendirme yapmak doğru bir yaklaşım değildir.

Periferik sinir onarımı modellerinde histolojik incelemenin ana hedefi: rejenere olan aksonların gösterilmesi ve rejenerasyon beklenen alanın ne kadarlık kısmının aksonal rejenerasyona ayrıldığına tespit edilmesidir. Ancak onarım alanındaki mutlak akson sayılarının tespit edilmesine rağmen bu sayıların tek başına değerlendirilmesinin her zaman doğru sonuç vermeyebileceği bilinmelidir. Bu çalışmada bu sorunu engellemek için akson sayısı/onarım alanı oranını kullandık. İncelenen tüm deneklerde rejenere olan aksonlar tespit edildi. PHB ve chitosan modifikasyonu ile hazırlanan yapay tübüler greftin tek başına kullanımının aksonal rejenerasyonun gelişmesine katkı sağladığı tespit edildi. Yapay tübüler greftlerin biyomekanik özellikleri ve dirençleri ile ilgili olarak sözü edilen kollapsın bu çalışmada kullanılan PHB ve chitosan modifikasyonu ile elde edilen tübüler greft ile aşılabileceği gösterildi. PHB yapı iskelelerine uygulanan yüzey modifikasyonlarının in vitro düzeyde üzerlerindeki kök hücrelerin gelişmelerine ve hücrelerin yönlenmelerine dolayısıyla rejenerasyona olumlu etki ettiği gösterildi. Bu çalışmada bu amaçla sinir rejenerasyonu yönüne paralel yönlendirilmiş nanofiberlerden oluşan bir yüzey modifikasyonu ile rejenerasyona olumlu katkısı olabilecek sonuçlar elde edildi. Ancak tübüler greft içerisinde rejenere aksonlar olmakla birlikte bunların daha çok tübüler greftin merkezinde yerleştiği ve tübüler grefte komşu yüzeyde ince bir bağ dokusu reaksiyonu olduğu gözlemlendi.

Bu çalışmadaki sonuçlar aksonal rejenerasyon açısından otogreft grubunun diğer gruplara göre daha iyi aksonal rejenerasyon sağladığını göstermektedir. Tek başına kullanıldığında yapay tübüler greft aksonal rejenerasyon sağlamıştır fakat bu yeterli bir sonuç değildir. Yapay tübüler greft-kök hücre grubunda ise aksonal rejenerasyon yapay tübüler greft grubuna göre daha iyidir. Bu sonuç hMSC'lerin vucuttaki pek çok doku ile birlikte periferik sinir dokusunda da rejenerasyona katkı sağladığını göstermektedir ve literatür verileri ile uyumluluk göstermektedir (27,28,29).

hMSC'lerin sinir sistemi hastalıklarında tedaviye olumlu katkılarını gösteren çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Bu çalışma santral sinir sisteminde olduğu gibi periferik sinir sistemi rejenerasyonu ile ilgili bilgilerimize katkı sağlamaktadır. Bu tip çalışmalarda unutulmaması gereken başka bir unsurda periferik sinir rejenerasyonunun zamanla daha da artabileceğidir. Bu nedenle daha uzun takip süreli yeni çalışmalar gereklidir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada ratlarda gerçekleştirilen deneysel siyatik sinir yaralanmasında:

- 1) Deneysel siyatik sinir yaralanma modelinde otogreft kullanımının halen diğer yöntemlere üstün olduğu gösterildi.
- 2) Deneysel siyatik sinir yaralanma modellerinde kullanılan entübülasyon stratejileri ve kök hücre uygulamalarının daha da geliştirilmesinin gerektiğini ortaya koydu.
- 3) Bu çalışmada kullanılan yapay tübüler greftlerin tek başına veya mezenşimal kök hücrelerle birlikte kullanımının rejenerasyon çalışmalarına katkıda bulunduğu tespit edildi.
- 4) Bu çalışmada kullanılan PHB ve chitosan modifikasyonu ile hazırlanan yapay tübüler greftlerin biyomekanik dirençlerinin oldukça sağlam olduğunu ve kollapsın oluşmadığını gösterdi. Dolayısıyla rejenere olan aksonların arttığını ortaya koydu. Ancak gelecek vaad eden bu materyalin daha da geliştirilmesinin uygun olacağı düşünüldü.
- 5) Yapay tübüler greftlerin tek başına kullanımında elde edilen rejenerasyon miktarının kök hücreler ile birlikte kullanımına göre daha az olduğunu gösterdi. Bu nedenle mezenşimal kök hücrelerin erken veya geç dönemde çeşitli etkilerle periferik sinir rejenerasyonuna katkıda bulunduğunu ortaya koydu.
- 6) Bu biyomateryale karşı oluşan fibrotik reaksiyonun oluşturduğu skar dokusunun tek başına PHB materyali kullanılan çalışmalara göre daha az miktarda olduğu tespit edildi.
- 7) Deneysel siyatik sinir yaralanma modelinde elde edilen SFI değerlerinin istenilen düzeyde olmadığı ve fonksiyonel iyileşmenin izlenebilmesi için daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu ortaya koydu.

Gerek greftlerin yapısal özelliklerinin geliştirilmesi, gerekse sinir rejenerasyonuna destek sağlamak üzere kullanılan dolgu maddeleri üzerindeki araştırmalar sinir onarım yöntemi olarak kullanılabilir sayısız seçenekler ve kombinasyonlar sunmaktadır. Dahası bugün anladığımız anlamda iyi bir greftin özelliklerine sahip malzemelerin ve fizyolojik mekanizmalarda rolü olduğu anlaşılan moleküllerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Kök hücre çalışmaları ise periferik sinir onarımına yepyeni bir bakış açısı sunmaktadır. Yapılacak olan periferik sinir hasarı çalışmalarında kök hücrelerin nanoparçacıklar ile işaretlenmesiyle

deney sonunda yapılacak immünohistokimyasal incelemeler sayesinde kök hücrelerin rejenerasyon sürecine nasıl bir katkı sağladığı da aydınlatılabilecektir.

Şüphesiz ki periferik sinir onarımının ideal tedavisine ulaşmak için alınması gereken önemli bir mesafe vardır. Bugüne kadar elde edilen bilgilerle hasarlanma sonrasında gerçekleşen dejenerasyon ve rejenerasyon süreçleri tam olarak anlaşılmış değildir ve bu süreçlerin anlaşılması bu konudaki ilerlemelere temel oluşturacaktır.

7.KAYNAKÇA

- 1) Belkas J, Midha R, Shoichet M. Peripheral nerve regeneration through a synthetic hydrogel nerve tube. *Restorative Neurology and Neuroscience* 2005; 23: 19-29.
- 2) Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 1998;45: 116-122.
- 3) Danayemez M, Solmaz I, Izci Y. Prognostic factors for the surgical management of peripheral nerve lesions. *Tohoku J Exp Med* 2005;205: 269-275.
- 4) Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered construct. *Anat Rec* 2001;263: 396-404.
- 5) Horn KL, Crumley RL. The physiology of nerve injury and repair. *Otolaryn. North Am* 1984;17: 321-333.
- 6) Brandt KE, Mackinnon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and grafts. In Aston S.J. Beasley R.W. Thorne C.H. (eds.). *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 5th Edition. New York: Lippincott-Raven 1997; 79-90.
- 7) Trumble TE, McCallister WV. Repair of peripheral nerve defects in the upper extremity Hand. *Clin.* 2000;16: 37.
- 8) Battiston B, Tos P, Geuna S. Alternative techniques for peripheral nerve repair: conduits and end-to-side neuroorrhaphy. *Acta Neurochir Suppl* 2007; 100: 43-50.
- 9) Yu X, Bellamkonda R. Tissue-engineered scaffolds are effective alternatives to autografts for bridging peripheral nerve gaps. *Tissue Eng.* 2003; 9: 421-430.
- 10) 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: 320-330.
- 11) Foramitti C. *Plastic Surgery*, Mc. Carty, J.G. May, J.W. Littler, J.W. Edition Vol 1. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, Saunders Company 1990: 630-697.

- 12) Chiu D, Straugh B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3cm or less. *Plast Reconstr Surg* 1990; 86: 928-934.
- 13) Adreesen B, Steinbuechel A. Biosynthesis and biodegradation of 3-hydroxypropionate-containing polyesters. *Applied and Environmental Microbiology* August 2010; p. 4919-4925.
- 14) Steinbuechel A, Lutke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem Eng J* 2003; 16: 81-96.
- 15) Shen F, Zhang E, Wei Z. Surface bio-modification of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) and its aging effect. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces* 2009; 73: 302-307.
- 16) Hirano S. *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th edn.1994; p. 231.Elvers.
- 17) Yao K, Peng T, Yin Y, Xu M. *JMR rev. Macromol. Chem. Phys.* 1995; C35: 155.
- 18) Muzzarelli RA, Mattioli M, Pugnali A, Biagini G. Biochemistry, histology and clinical uses of Chitins and Chitosans in wound healing. *EXS*.1999; 87: 251-64
- 19) Kenawy ER, Abdel-Hay FI, Abou El-Magd A, Mahmoud Y: Biologically active polymers. VIII modification and antimicrobial activity of chitosan derivatives. *J. Bioact. Compat. Pol* 2005;20: 95–111.
- 20) Malette WG, Qigley HJ, Gaines RD, Johnson ND, Rainer WG. Chitosan: a new hemostatic. *Ann. Thor. Surg.* 1983;36: 55- 58.
- 21) Nagyvary JJ, Falk JD, Hill ML, Schmidt ML, Wilkins AK, Bradbury EL. The hypolipidemic activity of chitosan and other polysaccharides in rats *Nutri. Rep. Int.* 1979; 20: 677- 684.
- 22) Itoh S, Suzuki M, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J. Development of a nerve scaffold using a tendon chitosan tube. *Artif. Organs.* 2003;27(12): 1079- 1088.

- 23) Rosales -Cortes M, Peregrina- Sandoval J, Banuelos- Pineda J, Castellanos- Martinez EE, Gomez- Pineodo UA, Albarran- Rodriguez e. Regeneration of the axotomised sciatic nevre in dogs using the tubulisation technique with chitosan biomaterial preloaded with progesterone. *Rev. Neurol.* 2003;36(12) ,1137- 1141.
- 24) Yuan Y, Zhang P, Yang Y, Wang X, Gu X. The interraction of schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials* 2004;25(18): 4273- 4278.
- 25) Freier T, Montenegro R, Shan Koh H, Shoichet MS. Chitin- based tubes for tissue engineering in the nerveous system. *Biomaterials* 2005;26(22): 4624-32.
- 26) Yu BY, Chen PY, Sun YM, Lee YT, Young TH. Effects of the surface characteristics of polyhydroxyalkanoates on the metabolic activities and morphology of human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomaterials Science* 2010; 21: 17-36.
- 27) Venkataramana NK, Kumar SK, Balaraju S, Rdahakrishnan RC, Bansal A, Dixit A, Rao DK, Das M, Jan M, Gupta PK, Totey SM. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res* 2010;155(2): 62-70.
- 28) Venkataramana NK, Bansal A, Balaraju S, Jan M, Chandra R, Dixit A, Rauthan A, Murgod U, Totey SM. Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. *Cytotherapy* 2009;11(7): 897-911.
- 29) Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplantation* 2007;40: 609-619.
- 30) Schwarz SC, Schwarz J. Translation of stem cell therapy for neurological diseases. *Transl Res* 2010;156(3):155-60.
- 31) Einstein O, Fainstein N, Vaknin I, Mizrachi-Kol R, Reihartz E, Grigoriadis N, Lavon I, Baniyash M, Lassman H, Ben-Hur T. Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. *Ann Neurol* 2007;61: 209-218.

- 32) Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D, Muraca G, Mareschi K, Rustichelli D, Ferrero I, Mazzini L, Madon E, Fagioli F. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2008;31: 395-405.
- 33) Yıldırım M. Temel Nöroanatomi. 2000; birinci baskı sf. 1-2,4-6.
- 34) Taner D. Fonksiyonel noroanatomi. 1998; birinci baskı sf.9-13,35-47.
- 35) Cevalli L, Mackinon S, Nerve repair, grafting and nerve transfers, *Clin Plast Surg*, 2003;30: 203-21.
- 36) Terzis JK, Smith KL. Repair and grafting of the peripheral nerve. In McCarty (Ed) *Plastic Surgery*, WB Saunders, Philadelphia. 1990;Ch 19: 630 – 697.
- 37) Thomas PK, Ochoa J, Berthold CH. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In Dyck PK(eds) *Peripheral Neuropathy*, WB Saunders, Philadelphia 1993;Ch (2)2: 28–92.
- 38) Bain JR, Mackinon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83: 129-36.
- 39) Çataltepe O, Ratlarda deneysel femoral sinir kesisinde bir entubulasyon modeli olarak femoral arter ve ven kullanımı. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İleri Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, Ankara, 1991
- 40) Watchmaker G, Mackinnon SE. Nerve injury and repair. In Peimer CA, ed: *Surgery of hand and upper extremity*. New York, Mc Graw-Hill, 1996:1251–1276. 98
- 41) Junguriera L.C, Carneiro j, Kelley R.O, *Basic Histology, Nerve Tissue*, s 163-194, 7 ed. Appleton, Lange 1992
- 42) IJkema-Paassen j. Jansen K, Gramsbergen A. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation *Biomaterials* 2004;25: 1583-1592.
- 43) Stanthaveerappa TR, Bourne GH. Perineural epithelium: a new concept of its role in the integrity of the peripheral nervous system. *Science* 1966;154: 1464.

- 44) Avcı G, Akan M, Yıldırım S. Sinir onarımı ve greftleme. *T Klin J Med Sci.* 2002;22: 428- 437.
- 45) Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo, *Dev. Biol.* 1995: 172; 126–138.
- 46) Bridenbach WC, Terzis JK. The blood supply of vascularized nerve grafts. *J Reconstr Microsurg* 1986;2: 689–707.
- 47) Del Pinal F, Taylor GI. The venous drainage of nerves, anatomical study and clinical applications. *J Hand Surg Br* 1990;43: 511-20.
- 48) Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 1990;13: 785–800.
- 49) Donaghy R. History of microsurgery, in Wilkins RH, Rengachary SS (eds) *Neurosurgery*. New York, McGraw-Hill Book Co. 1985, 20–26.
- 50) Wong BJ, Crumley RL. Nerve wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995;28(5): 881–895.
- 51) Frykman GK, McMillan PJ, Yegge S. A review of experimental methods measuring peripheral nerve regeneration in animals. *Orthop Clin North (AM)*; 1988;19: 209-19.
- 52) Sunderland S, *The Anatomy and Physiology of nerve injury*. *Muscle, Nerve* 1990;13: 771-784.
- 53) Greenberg MS. *Handbook of neurosurgery*. 2006; sixth edition p.548-579.
- 54) Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain* 1943;66: 237-288.
- 55) Snell RS, *Organization of the nervous system*. *Clinical Neuroanatomy* Boston, Little Brown, 1992, s 1-2
- 56) Ducker T.B, Klempe LG, Hayes GJ, *The Metabolic Background of peripheral Nerve Surgery*. *J of Neurosurg*, 1969;270: 30-31.
- 57) Grant GA, Kliot M. *Youmans neurological surgery*. 2003, fifth edition p.3795-3797.
- 58) Sunderland S. *Nerves and nerve injuries*, ed 2. London: Churchill Livingstone, 1978; 133-134.

- 59) Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 1951;74: 491-516.
- 60) Demircan N, Zileli M. *Periferik Sinir Cerrahisi* 2008; birinci baskı sf.102-103.
- 61) Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg* 1989;22: 257-73.
- 62) Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* 2004;16(5):1-7.
- 63) Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997;14: 67-116.
- 64) Ygge J. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. *Brain Res* 1989;478: 193-195.
- 65) Hu P, McLachlan EM. Selective reactions of cutaneous and muscle afferent neurons to peripheral nerve transection in rats. *J Neurosci* 2003;23: 10559- 10567.
- 66) Demircan N, Zileli M. *Periferik Sinir Cerrahisi* 2008; birinci baskı sf.105.-107.
- 67) Ducker TB, Kempe LG, Hayes GJ. The metabolic background for peripheral nerve surgery. *J Neurosurg* 1969;30: 270-80
- 68) Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev neurobiol* 1971;14: 49-124
- 69) Fawcett JW, Keynes RJ, *Peripheral nerve Regeneration*. *Ann Rev. Neurosci.* 1990;13: 43-60.
- 70) Vekris M, Soucacos P, *Uptade on peripheral nerve microsurgery*. *Microsurgery* 2006; 26: 216-217.
- 71) Elmstedt N, *Development of biosynthetic conduit for spinal cord and peripheral nerve injury repair, in vitro study master's thesis in biomedical engineering at the School of Electrical Engineering, Royal Institue of Tecnology, Stockholm, Sweeden* 2006
- 72) McQuarrie I, Idzikowski C. *Injuries to peripheral nerves*, Mosby, St Louis 1988; 802-803.

- 73) Lundborg G. A 25- year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am* 2000;25: 391-414.
- 74) David S, Aguayo AJ: Axonal elongation into peripheral nervous system 'bridges' after central nervous system injury in adult rats. *Science* 1981;214: 931-933.
- 75) Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 1980;284: 264-265.
- 76) Karanth S, Yang G, Yeh J, Richardson PM. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Exp Neurol* 2006;202: 161-166.
- 77) Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* 2002;7: 13-27.
- 78) Vajero A, Meek M.F, Ferreira A.J, Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 2001; 108: 1-9.
- 79) Özmen S, Ayhan S, Latifoğlu O. Stamp and paper method: A superior technique for the walking track analysis. *Plast Reconstr Surg*, 2002;15: 109(5): 1760-1.
- 80) Pineau I, Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured Mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol* 2007;500: 267-285.
- 81) Stubgen JP. Tumor necrosis factor-alpha antagonists and neuropathy. *Muscle Nerve* 2008;37: 281-292.
- 82) Siebert H, Bruck W. The role of cytokines and adhesion molecules in axon degeneration after peripheral nerve axotomy: a study in different knockout mice. *Brain Res* 2003;960:152-156.
- 83) Leskovaara A, Moriarty LJ, Turek JJ, Schoenlein IA, Borgens RB. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. *J Exp Biol* 2000;203: 1783-1795.

- 84) Lara-Ramirez R, Segura-Anaya E, Martinez-Gomez A, Dent MA. Expression of interleukin-6 receptor alpha in normal and injured rat sciatic nerve. *Neuroscience* 2008;152:601-608.
- 85) Cheepudomwit T, Guzelsu E, Zhou C, Griffin JW, Hoke A. Comparison of cytokine expression profile during Wallerian degeneration of myelinated and unmyelinated peripheral axons. *Neurosci Lett* 2008;430:230-235.
- 86) Uceyler N, Tscharke A, Sommer C. Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. *Brain Behav Immun* 2007;21: 553-560.
- 87) Rutkowski JL, Tuite GF, Lincoln PM, Boyer PJ, Tennekoon GI, Kunkel SL. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol* 1999;101: 47-60.
- 88) Marz P, Heese K, Dimitriades-Schmutz B, Rose-John S, Otten U. Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Glia* 1999;26: 191-200.
- 89) Golz G, Uhlmann L, Ludecke D, Markgraf N, Nitsch R, Hendrix S. The cytokine/neurotrophin axis in peripheral axon outgrowth. *Eur J Neurosci* 2006;24: 2721–2730.
- 90) Fu YS, Gordon T, The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration, *Molecular Neurobiology*, 1997;14: 67-116.
- 91) Geuna S, Romando B, nerve regeneration along bioengineered scaffolds *Microsurgery* June, 2000;10: 429-438.
- 92) Junqueira LC. Carneiro J. Kelley RO. *Sinir Dokusu.: Temel Histoloji* (Con. ed. Aytekin Y.). 7th Edition. 1992;196-230.
- 93) Brushart TM. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J.Neurosci*, 1993;13: 2730–2738.
- 94) Diao E, Vannuyen T. Techniquens for primary repair. *Hand Clin* 2000;16: 53-66

- 95) Bowden R, Gutmann E. Denervation and reinnervation of human voluntary muscle. *Brain* 1944;67: 273-313.
- 96) Jabaley ME, Burns JE, et al. Comparison of histologic and functional recovery after peripheral nerve repair. *J Hand Surg (AM)* 1976;1: 119-30.
- 97) Mackinnon SE, Dellon AL. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Adv Plast Reconstr Surg* 1990;85: 419-24.
- 98) Sanes JN, Suner S, Donoghue JP. Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. I. Long term patterns of reorganization following motor or mixed peripheral nerve lesions. *Exp Brain Res* 1990;79: 479-91.
- 99) Brallier F, Electromyography, its use and misuse in peripheral nerve injuries, *Orthop Clin North Am*, 1981;12: 229.
- 100) Rainbolt J, Contribution of Clinical Neurophysiology in the studies of lesion and regeneration of peripheral nerves, *Int J Microsurg*, 1981;3: 161-162.
- 101) Shin J.Oh. Normal values for common nerve conduction tests. In: Retfort DC, editor. *Clinical electromyography: nerve conduction studies*. 2nd. Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1993; p. 84-104.
- 102) Adams F. *The genuine Works of Hippocrates*. New York, William Wood & Co, 1849
- 103) Polder TW. Pathophysiology of peripheral nerve injury and repair. Palmer JD. *The manual of Neurosurgery*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1996; 777-783.
- 104) Gurlt E. *Geschichte der Chirurgie*. Berlin, Verlag August Hirschwald, 1898
- 105) Millesi H. Reappraisal of nerve repair. *Surg Clin of North Am* 1981;61: 321-340.
- 106) Philipeaux JM, Vulpian A. Note sur des essais de greffe d'un troncon de nerf lingual entre les deux bouts du nerf hypoglosse. *Arch Phys and Norm Pathol* 1870;3: 618.
- 107) Seçer Hİ, Danayemez MK, Gönül E, İzci Y. Surgical Repair of ulnar nerve lesions caused by gunshot and shrapnel: results in 407 lesions. *J Neurosurg* 2007;107: 776-783.

- 108) Seçer Hİ, Danayemez MK, Tehli Ö, Gönül E, İzci Y. The clinical, electrophysiologic, and surgical characteristics of peripheral nerve injuries caused by gunshot wounds in adults: a 40-year experience. *Surgical Neurology* 2008;69: 143-152.
- 109) Campell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology* 2008;119: 1951–1965.
- 110) Abreu LB. Upper extremity nerve lesions (diagnosis, indications, surgical techniques). *Sao Paulo Medical Journal* 1997;115(4): 1495-1507.
- 111) Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery* 2003;23: 66-71.
- 112) Strauch B, Ferder M, Lovelle-Allen S, Moore K, Kim DJ, Llena F. Determining the maximal length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1996;12: 521-527.
- 113) Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat* 1997;190: 57-71.
- 114) Brandt J, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G. Spatiotemporal progress of nerve regeneration in a tendon autograft used for bridging a peripheral nerve defect. *Exp Neurol* 1999;160: 386-393.
- 115) Moradzadeh A, Borschel GH, Luciano JP, Whitlock EL, Hayashi A, Hunter DA, Mackinnon SE. The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration. *Exp Neurol* 2008;212: 370-376.
- 116) Lundborg G, Rosen B, Dahlin L, Holmberg J, Rosen I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J Hand Surg (br)* 2004;29: 100-107.
- 117) Weber A, Breidenback WC, Brown RE, Jabaley ME, Mass DP. A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plast reconstr Surg* 2000;106: 1036-1045.
- 118) Chen MB, Zhang F, Lineaweaver WC. Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg* 2006;57: 462-471.
- 119) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260: 920-926.

- 120) Edwards SL, Mitchell W, Matthews JB, Ingham E, Russell SJ. Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament. *AUTEX Electronic Research Journal* 2004: pp.86-94.
- 121) Zhang L, Thomas WJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* 2009;4: 66-80.
- 122) Khalof SA. Production and characterization of fungal chitosan under solid-state fermentation conditions. *International Journal of Agriculture and biology.* 2004;6(6): 1033- 1036.
- 123) Denkbaş EB, Odabaşı MA. Chitosan microspheres and sponges: Preparation and characterization *Journal of Applied Polymer Science.* 2000;Vol 76: 1637- 1643.
- 124) Öztürk E, Ergün MA, Öztürk Z, Nurözler AB, Keçeci K, Özdemir N, Denkbaş EB. Chitosan-coated alginate membranes for cultivation of limbal epithelial cells to use in the restoration of damaged corneal surfaces. *Int. Jour. Artif. Organs.* 2006;29(2): 228-238.
- 125) Anderson, Dawes E. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* 1990;54: 450-472.
- 126) Poirier Y, Nawrath C, Somerville C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. *Biotechnol* 1995;13: 142-150.
- 127) Khanna S, Srivastava AK. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* 2005;40: 607-619.
- 128) Hrabak O. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol Rev* 1992;103: 251-256.
- 129) Curley JM, Hazer B, Lenz R.W and Fuller RC. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) containing aromatic substituents by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 1996; 29: 1762-1766.
- 130) Miguel O, Fernandez-Berridi M. I ruin, J. Survey on transport properties of liquids, vapors, and gases in biodegradable poly(3-hydroxybutyrate). *J. Appl. Polym. Sci.* 1997;63: 1849-1859.

- 131) Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Tereghi G, Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett* 2004, 362: 200-203.
- 132) Miller HR. The promise of stem cells for neural repair. *Brain Research* 2006;1091: 258-264.
- 133) Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2006;7: 395-406.
- 134) Prokop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276: 71-76.
- 135) Munoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci* 2004; 24: 4585-4595.
- 136) Sigurjonsson OE, Perreault MC, Egeland T, Glover JC. Adult human hematopoietic stem cells produce neurons efficiently in the regenerating chicken embryo spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102: 5227-5232.
- 137) Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, Robertson CS, Liu H, Shine HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 2002;297: 1299.
- 138) Neuhuber B, Himes BT, Shumsky JS, Gallo G, Fischer I. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Res* 2005;1035(1): 73-85.
- 139) Dormady SP, Bashayan O, Dougherty R, Zhang XM, Basch RS. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10: 125-140.
- 140) Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33: 145-152.
- 141) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279: 1528-1530.

- 142) Kraussis D, Kassis I. The potential use of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: an overview of precilical experience. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2008;110: 889- 896.
- 143) Abdallah BM, Kassem M. The use of mesenchymal stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. *J. Cell Physiol.* 2009;218: 9- 12.
- 144) Zietlow R Lane EL, Dunnet SB, et al. Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res.* 2008;331: 301- 322.
- 145) Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochemst.*2009;106: 984- 991.
- 146) Müller I, Lymperi S, Dazzi F. Mesenchymal stem cell therapy for degenerative inflammatory disorders. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008;13: 639- 644.
- 147) Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, et al. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine *Int. J. Biochem Cell Bio.* 2008;40: 815- 820.
- 148) Patel SA, Sherman L, Munoz J, et al. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol. Their Exp.* 2008;56: 1-8.
- 149) Giordano A, Galderisi, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. 2007;211(1): 27-35.
- 150) Spitkovsky D, Hesheler J. Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2008;17(2): 79- 90.
- 151) Zietlow R, Lane EL, Dunnet SB, et al. Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res.* 2008; 331: 301- 322.
- 152) Honig MG, Hume RI. Carbocyanine dyes. Novel markers for labelling neurons. *Trends. Neurosci.* 1989;12(9): 336-8.
- 153) Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83: 129- 136.

- 154) Varejao AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Nerurol Res* 2004;26(2): 186-194.
- 155) Felix S, Gerburg K, Hisham Fansa, Biocompatibility of different nerve tubes. *Materials* 2009;2(4): 1480-1507.
- 156) Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Experimental Neurology* 2007;204: 443-453.
- 157) Nie X, Zhang XJ, Tian WD, Jiang M, Dong R, Chen JW, Jin Y. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36: 32-38.
- 158) Dodla MC, Bellamkonda RV. Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminin and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* 2008;29: 33-46.
- 159) An YH and Friedman RJ eds. *Animal Models in Orthopedic Research*, An YH and Friedman RJ eds. CRC Press Raton 1999: pp 402-403.
- 160) Bölgen N, Vargel İ, Korkusuz P, Menceloğlu YZ, Pişkin E. In vivo performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions. *J Biomed Mat Res Part B: Applied Biomaterials* 2007;81B: 530-543.
- 161) Chun-Jung Chen, Yen-Chuan Ou, Su-Lan Liao, Wen-Ying Chen, Shih-Yun Chen, Ching-Wen Wu, Chun-Chiang Wang, Wen-Yi Wang, Yong-San Huang, Shan-Hui Hsu. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair *Experimental Neurology* 2007;204: 443–453.
- 162) Yu-Zhu Bian, Yang Wang, G. Aibaidoula, Guo-Qiang Chen, Qiong Wu. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2009;30: 217–225.
- 163) X. Nie, Y.J. Zhang, W.D. Tian, M. Jiang, R. Dond, J.W Chen, Y. Jin: Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2007;36: 32–38.

- 164) Mahesh Chandra Dodla, Ravi V. Bellamkonda. Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminin and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps. *Biomaterials* 2008;29: 33–46.
- 165) Braga-Silva J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg* 1999;24: 703-706.
- 166) Merle M, Dellon AL, Campbell JN, Chang PS. Complications from silicopolymer intubulation of nerves. *Microsurgery* 1989;10: 130-133.
- 167) Rosen JM, Padilla JA, Nguyen KD. Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in a rat model. *Ann Plast Surg* 1990;25: 375-387.
- 168) Seung HL, Kyoung HK, Eun Y.K, Tong UC. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) based on proteome analysis. *Biotechnol Lett* 10. 1007/s10529-013-1246
- 169) Mohanna PN, Young RC, Wiberb M, Terenghi G. A composite poly-hydroxybutyrate-glial growth factor conduit for long nerve gap repairs. *J. Anat.* 2003;203: pp 553-565.
- 170) Young R.C, Wiberb M, Terenghi G. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): A resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves. *Br. J. Plast. Surg.* 2002;55: 235-240.
- 171) Sakar M, Bozkurt G. Deneysel siyatik sinir hasarında PHBHHX ve mezenşimal kök hücre kullanımının aksonal rejenerasyona etkisi. HÜTF Nöroşirurji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2010.
- 172) Tsuge K, Ikuta Y, Sakuae M: A new technigue for nerve suture: The anchorin funicular suture. *Plast Reconstr Surg* 1975;56: 496-500.
- 173) Doolabh VG, Tung TH, Wayne FM, et al: Effect of non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody plus donor antigen pretreatment in peripheral nerve allotransplantation. *Microsurgery* 2002;22: 322-334.
- 174) Merrell GA, Barrie KA, Katz DL, Wolfe SW. Results of nerve transfer technigues for restoration of shoulder and elbow function in the context of a metaanalysis of the English literature. *J Hand Surg (Am)* 2001; 26(2): 303-314.

- 175) Taylor GL: Free vascularized nerve transfer in the upper extremity. *Hand Clin* 1999; 15: 673-695.