

70654
T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF
CERRAHİ ANABİLİM DALI

**DENERVE KASLARIN NÖROTİZASYONUNDA
CERRAHİ TEKNİKLERİN VE NERVE GROWTH
FACTOR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(RATLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA)**

Dr. ADNAN MENDERES

Uzmanlık Tezi

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Danışman

Yrd.Doç Dr. MUSTAFA YILMAZ

İZMİR- 1998

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi eğitimim yanında sundukları ortam sayesinde hekim ve insan olarak bana kazandırdıkları değerlerle yetişmemde büyük katkıları olan hocalarıma sonsuz şükran ve minnetlerimi sunarım.

Dr.Adnan Menderes

İÇİNDEKİLER

1-Giriş	3
• Periferik sinir onarımının tarihsel gelişimi	4
• Periferik sinir morfolojisi	5
• Sinir yaralanmalarının ve rejenerasyonun patofizyolojisi	9
• Periferik sinir rekonstrüksiyonu	14
• Nörotizasyon	17
• Nerve Growth Factor	22
• Amaç	25
2-Materyel Metod	26
• Nerve Growth Factor hazırlanması	27
• Deneysel Gruplar	28
• Elektromyografi	32
• Kas Gücü Ölçümleri	34
• Kas Ağırlık Çalışması	36
• Histopatolojik Morfometrik İnceleme	37
3-Sonuçlar	38
• Elektromyografi	38
• Kas Ağırlık Çalışması	41
• Kas Gücü Ölçümü	43
• Histopatolojik morfometrik inceleme	46
4-Tartışma	49
5-Özet	63
6-Referanslar	66

GİRİŞ

Periferik sinir onarımlarında rekonstruktif mikrocerrahi yöntemlerinin gelişmesine paralel olarak daha başarılı sonuçlar alınmaya başlamıştır. Pek çok sinir defekti sinir greftleri, nöromusküler transplantlar ya da nörotizasyon tekniklerine gerek kalmadan onarılmakta ve gerekli rehabilitasyon sağlanmaktadır. Ancak travma, cerrahi girişimler enfeksiyon ve tümörler sonucu oluşan ciddi defektler kimi zaman vücudun spontan onarım sınırlarını aşmaktadır. Cerrahi olarak rekonstrüksiyon teknikleri ise mükemmel sonuçlara henüz ulaşamamış olup ideal nöromusküler rekonstrüksiyon için temel tıp kavramlarının ve cerrahi yöntemlerin daha fazla araştırılmasına gerek vardır. Sinir yaralanmasından sonra sinirin distal ve proksimal uçlarında, hedef iskelet kasında oluşan değişiklikler, onarım ve sonrasında sonucu etkileyen hem cerrahi tekniklerin hem de trofik faktörlerin tam olarak belirlenmesi gereklidir.

Sinir onarımları için geliştirilen cerrahi yöntemler bazı klinik durumlarda yeterli olmamaktadır ve hedef organlara sinirlerin doğrudan yönlendirilmesi olan nörotizasyon teknikleri tek seçenek olmaktadır. Bu amaçla tarif edilmiş olan teknikler etkinliklerinin tam olarak belirlenmesi ve geliştirilmeleri ile daha yaygın kullanıma girebilirler. Denerve dokuların nörotizasyonuna etki eden faktörler de günümüze kadar tam olarak tespit edilmiş değildir. Periferik sinir iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen Nerve Growth Factor gibi trofik faktörlerin nörotizasyon ile birlikte kullanıldığında sağlayabileceği etkilerin ne olduğu da bu güne kadar araştırılmamıştır. Bu amaçla farklı nörotizasyon teknikleri ve Nerve Growth Factor'ün denerve kasların reinnervasyonu üzerine etkilerinin belirlenebilmesi için periferik sinir iyileşmesi ve reinnervasyon üzerine günümüzde geçerli olan görüşler göz önüne alınarak bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Periferik Sinir Onarımının Tarihsel Gelişimi

Periferik sinir sisteminden ilk söz eden Hipokrat olmuştur (MÖ460-370). Periferik sinir kesilerinin sonuçlarını ilk araştıran Galen (MS 130-200) bazı sinirlerin kesilmesi ile duyu bazılarının kesilmesi ile de motor kayıp olduğunu ortaya koymuştur. Ancak ilk sinir sütürü 13. Yüzyılda William of Saliceto (1210-1277) tarafından Bologna'da konmuştur. 16 ve 19. Yüzyıllar arasında sinir liflerinin yapıları ve uyarılabilirlikleri Glisson (1597-1677), mikroskopik yapıları van Leewenhoek (1632-1723), axon ve myelin tabakası Fontana (1730-1805), fonksiyonları Galvani (1737-1798), anatomik organizasyonları Bell (1774-1842), axon ve nöron bağlantılarını ise von Purkinje (1787-1869) gibi araştırmacıların çalışmaları ile belirlenmiştir. 1828'de sinir cerrahisi ile ilgili deneysel çalışmalar Fluorens ile başlamıştır. 1839'da Schwann kendi adıyla anılan hücrelerin yapısını tanımlamıştır. İlk rapor edilen sinir onarımı Paget tarafından 1847'de yapılan median sinir onarımı olgusudur.

Sinir yaralanmalarının anlaşılabilmesi için önemli bir aşama da 1850'de Waller'in yaralanma distalinde oluşan dejeneratif değişiklikleri, rejenere olan aksonların sinir lifi içinde ilerlemelerini göstermesi ile olmuştur Helmholtz ve Duchenne sinirlerin elektrofizyolojik prensiplerle incelenmesini ve fonksiyonun klinik parametrelerle belirlenmesi için çalışmalarda bulunmuşlardır. 1906'da Golgi ve Cajal sinir sisteminin yapısını tanımlayarak Nobel ödülünü kazanmışlardır. Hoffman ve Tinel 1915'de çok yakın aralarla rejenere olan sinir üzerinde hastalar tarafından hissedilen karıncalanmayı tanımlamışlardır. 1944'de Erlanger ve Gasser sinir liflerinin fonksiyonlarını ve elektrofizyolojik özelliklerini ortaya koydukları çalışmaları ile Nobel ödülünü kazanmışlardır. Bu kavramları kullanarak Hodes, Larrabee ve German 1948'de elektrofizyolojinin klinik testlerde kullanımını geliştirmişlerdir.

Günümüzde gerçekleştirilmekte olan periferik sinir cerrahisinin temelleri Seddon tarafından belirlenmiştir. 2. Dünya Savaşı sırasındaki sayısız periferik sinir yaralanmaları üzerindeki çalışmaları (Seddon 1948), sinir greftlemesi tekniği (Seddon 1963), iskeminin

sinir üzerindeki etkileri (Seddon ve Holmes 1945) ve onarım sonrasında iyileşme hızı gibi periferik sinir cerrahisinin pek çok alanındaki çalışmaları ile öncü olmuştur.

Sunderland (1945, 1952, 1953, 1968), Millesi (1972, 1976, 1981, 1984), Terzis'in (1976, 1979, 1980) sinir yaralanması ve onarım teknikleri üzerinde yaptıkları araştırmalar ve temel bilim dallarının sinir hücresi, Schwann hücrelerinin rolü, sinirin yaralanmaya cevabı, akson büyümesi, aksonal transport , çevresel etkenler gibi konularda sağladığı bilgiler ile periferik sinir cerrahisinde önemli aşamalar kaydedilmiştir. (1)

Periferik sinir morfolojisi

Periferik sinir sistemi; nöronlar, destek bağ dokusu ve hücresel elemanları ve hedef son organlardan oluşan karmaşık bir yapıdır. Santral sinir sistemi dorsal spinal kökler ve anterior spinal horn'dan köken alan motor lifler aracılığı ile çevre ile bağlantı kurar. Nöronlar birbirleriyle dendrit adı verilen sitoplazmik uzantılar ile bağlantılar kurarlar ve akson adı verilen tek bir uzantı ile perifere ulaşırlar. Akson demetleri, dorsal ve ventral spinal kökleri oluştururlar. Duyusal ve motor liflerden oluşan spinal sinirler bu iki kökün birleşmesi ile oluşurlar. Afferent lifler periferik duyu reseptörlerde sonlanırken, efferent lifler kaslarda yer alan motor son plaklarda sonlanırlar. Bunlara ek olarak kan damarları ve deri eklerinin motor innervasyonunun sağlayan otonomik lifler de sinir yapısı içinde yer alır.(1-7)

Sinir sisteminin fonksiyonel birimi nörondur. Diğer hücrelerle ortak yapıları içermesine rağmen özelleşmiş bir yapısı vardır. Her sinir hücresi sinir impulslarını almak, iletmek için geniş yüzey alanı yaratan uzantılara sahiptir. Akson dışında tüm sinir hücresi yüzeyi sinaptik terminallerle kaplıdır. Dendrit adı verilen bu sitoplazmik uzantılar reseptif fonksiyonlar için özelleşmiştir. Çoğu nöron sadece tek bir aksone sahiptir ancak alfa motor nöronlar birden fazla akson kollaterali verebilirler.(1,2)

Akson genel olarak silindirik bir uzantı şeklindedir. Aksolemma adı verilen yüksek derecede mobil fosfolipid molekül matriks içinde yüzen trilaminar protein molekül mozaik bir

yapı ile sınırlanmıştır. Sinir hücresinin akson uzantısı ile aksonun birleştiği noktaya başlangıç segmenti denir ve myelinsizdir. Bu alanın sinir impulslarının başlangıç noktası olduğu tahmin edilmektedir. Ranvier nodu gibi diğer myelinsiz alanlar da aynı yapıya sahiptirler ve sinir aksiyon potansiyellerinin iletiminden sorumludurlar. Aksolemma intra- ve ekstraselüler iyon konsantrasyonlarını değiştirerek bir dinlenme potansiyelini sabit tutar. Bu sodium-potastum ATPase pompasına dayanan enerjiye bağlı bir süreçtir. Elektrokimyasal gradiyan nöronların uyarılabilir yapısını belirler. Spesifik bir uyarı sonucunda iyon akışı olur ve aksiyon potansiyeli oluşarak ilerler bu sayede bir kasın kasılması ya da somesthetik bir impuls tetiklenebilir (1,2,4).

Akson silindiri içinde aksoplazma yer alır. Amorf bir matriks içinde yer alan mikrofilamanlar, nörotübüller, mikrotübüller aksoplazma içindeki temel yapılardır. Hücresel organellerden mitokondri ve yumuşak endoplazmik retikulum dışında hiçbirisi akson içinde bulunmaz. Bu yüzden akson özellikle protein makromolekülleri için nöron gövdesine bağımlıdır. Aksoplazma içinde yer alan ek küçük yapı mikrofilamanlardır. Sarmal aktin zincirlerinden oluşan mikrofilamanların kontraktıl yapıları nedeni ile intraaksonal transportta rol aldıkları düşünülmektedir. Daha belirgin ve büyük olan nörofilamanlar ise 68000-200000 moleküler ağırlığa sahip üç proteinden oluşurlar ve yaralanan bir akson içinde kalsiyum ile aktive olan proteazlar tarafından hızla parçalanırlar. Mikrotübüller, 23-25µm çapında silindirler şeklinde uzanırlar ve akson kitlesi ile orantılı olarak artarlar. Terminal akson dallarında proksimal aksone göre on kat daha fazla sayıda yer alırlar. Mikrotübül sayısı ve yapısı sinir hücresi türüne göre de değişiklik gösterir.(1,2) .

Akson içinde hücreden distale doğru (somatofugal, antegrad) ve aksondan yukarı doğru(retrograd) bir transport vardır. Protein makromolekülleri antegrad olarak aksone taşınırken özellikle Schwann hücreleri ve end-organlar tarafından salınan Nerve Growth Factor gibi trofik maddeler retrograd olarak taşınırlar. Akson kesildiği zaman distal uç, artık

impulsları iletemez hale gelir. Sinaptik iletim ve sinir ucu fonksiyonları ancak sinir bütünlüğü korunursa sağlanabilir. Axoplasmik transport sabit bir hızda olmaz, radyokimyasal ve histokimyasal tekniklerle yapılan çalışmalar günde, 0.25 ile 1 mm arasında değişen hızlar tespit etmiştir. Yavaş aksoplasmik iletim nörotübül-nörofilaman ağının proksimodistal yönde kitlesel hareketi ile olur. Rejenere olan sinir dokusunun hızı da bu antegrad iletim hızı ile belirlenir. Hızlı aksoplasmik taşıma ile hücre gövdesinde sentezlenen asetilkolinesterazlar gibi enzimler veya aksolemma komponentlerinin distale taşınması sırasında gerçekleşir (1,2,4).

Antegrad taşımaya ek olarak intraaksonal proteinlerin ve nörotransmitterlerin geri dönüşümünün gerçekleşebilmesi için gerekli olan retrograd transport mevcuttur. Ancak belki daha önemli olan sinir uçlarından aktif endositoz yolu ile alınan ve trofik etkisi olabilecek maddelerin hücre gövdesine taşınmasıdır. Motor yada duyu sinirleri tarafından innerve edilen dokuların saldığı Nerve Growth Factor gibi maddeler sinir uçlarından yüksek afiniteli reseptörler aracılığı ile alınıp sinir hücre gövdesine taşındıklarında metabolizma üzerine etkili olurlar (1-8).

Periferik sinir sisteminin nöronal uydu hücreleri olan Schwann hücreleri akson çevresine bir proteofosfolipid tabaka olan myelin kılıf hazırlarlar. Yüksek rezistans ve düşük kapasitanslı bir tabaka olan myelin tabakası 1-2 mm aralıklarla kesintiye uğrar , bu myelinsiz alanlara Ranvier nodu adı verilir. Antegrad olarak ilerleyen elektriksel akım bir noddan diğerine arada kalan sinir membranında bir potansiyel yaratmadan atlar ve bu sayede 70m/saniyeye ulaşan iletim hızlarına ulaşılabilir.

Sinir kesit alanının %25-85 kadar kısmını bağ dokusu oluşturmaktadır. Bu oran sinire ve yer aldığı bölgeye göre değişmektedir. Periferik sinirler üç ayrı destek bağ dokusu tabaka ile sınırlanırlar. Akson ve Schwann hücrelerinden oluşan periferik sinir lifi kompleksi düzeyinde; pek çok sinir lifi bir araya gelerek fasikül adı verilen sıkıca bağlı bir demet oluştururlar. Fasikül içinde sinir lifleri, mukopolisakkarid zemin içinde uzunlamasına oriente

kollajen lifleri ve retikülin lifler içerir. Bu yapının temel hücresel yapısı ise fibroblasttır. Hücreler, kollajen, retikülin ve zemin maddesi kompleksi endonörium olarak adlandırılır. Perinörium ise, sinir fasiküllerinin etrafını saran bağ dokusu yoğunlaşmasının adıdır. Perinörium içinde epinöriumdan uzanan damarları barındırır ve fasiküllerin beslenmesini sağlar. Periferik sinir dokusunun gerilim gücünü belirleyen perinörium temel iskelet yapısıdır. Epinörium ise sinir fasiküllerini, perifasiküler ve interfasiküler bağ dokusunu saran dış kılıfı oluşturur. Siniri besleyen kapiller ağ ve lenfatikler epinöriumda yer alır.

Sinir hücreleri normal fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için aerobik metabolizmalarına yetecek kadar devamlı oksijene ihtiyaç duyarlar. İskemiye bu kadar duyarlı olmaları nedeniyle sinirler tüm katları içeren dinamik bir vasküler ağ ile beslenirler. Çevre arter ve venlerden gelen dallar epinöriumda dallanarak intranöral pleksusu besler. Siniri saran bağ dokusu katlarının her birinde diğerleriyle bağlantılı olan vasküler bir ağ vardır. Perinöral ve endonöral damarlar fasiküler pleksusu oluşturur ve sinir fasikülünün tek başına fonksiyon gösterebilecek bir ünite olarak yaşamasını sağlarlar. Deneysel çalışmalar proksimal bağlantılar dışında tüm vasküler bağlantılarından ayrılan sinirlerin sadece epinöral, perinöral vasküler ağa dayalı olarak uzun segmentler halinde yaşayabileceğini ortaya koymuştur.

Duyu sinirleri özelleşmiş reseptörlerde, motor sinirler ise motor son plaklarda sonlanırlar. Motor ünite terimi ilk olarak Sherrington tarafından 1929 yılında bir sinir lifi ve aktive ettiği bir grup kas lifi olarak tanımlanmıştır. Her bir motor akson motor üniteyi oluşturan 10-1000 kas lifini innerve edebilir.(1,6) Bu tanım alfa motor nöron ve innerve ettiği extrafusul kas liflerini içerir. Efferent aksonların terminal yapısını oluşturan motor son plaklarının temel özellikleri şu şekildedir: Myelinli alfa motor sinir lifi kasa girdikten sonra motor ünitenin özelliğine göre çok sayıda dala ayrılır. Kas lifine yaklaştığında kas lifine myelinsiz aksonları yayar. Her terminal akson kas lifi içinde yer alan yaklaşık 50µm genişliğindeki bir alana yerleşir. Terminal uç çok sayıda mitokondri ve asetil kolin içeren

veziküller içerir ve nörofilamentler bu bölgede gözlenmezler. Motor son plağı bölgesinde, kas lifinde granuler sarkoplazm ve çok sayıda nükleus ve mitokondrinin bu bölgede yoğunlaşması nedeniyle oluşan hafif bir elevasyon gözlenir. Genişlemiş ve yaygın hale gelmiş olan akson katlanıp kıvrılmış sarkolemma'nın oluşturduğu bir oluğa yerleşir. Bu oluk herbiri aksonun bir parçasını içeren dallara ayrılabilir. Aksonlar tamamen myelinsiz haldedir ve tüm motor son plak onu çevre bağ dokularından izole eden Schwann hücre membranı ile kaplıdır. Akson membranı (aksolemma), kas membranından (sarkolemma) sinaptik yarık adı verilen 200-500A genişliğinde bir glikoprotein yapıda bir boşluk ile ayrılır. Akson depolarizasyonu ile ortama iletim ajanı olan asetilkolin, eksositoz yolu ile salınır ve postsinaptik kas membranı Na⁺ iyonlarına permeabl hale gelip kasılır. Depolarizasyon dalgası tüm kas membranına dağılır ve transvers tübüller aracılığı ile kas lifi içindeki kontraktıl myofibrillere taşınır, bunun sonucunda kas kasılması gerçekleşir. Ortama salınan asetilkolin miktarı, sinir ucuna ulaşan impuls sayısına bağlıdır. İmpuls sayısı, uyaran akson sayısı, motor ünitenin özellikleri ve kas lifinin yapısı ortaya çıkan kasılmanın özelliklerini belirler.(1,2,5-7)

Sinir yaralanmalarının ve rejenerasyonun patofizyolojisi

Sinir yaralanması ya da kesileri sonucunda sinir hücresinde, aksonda, distal sinirde ve hedef iskelet kasında çeşitli değişiklikler olmaktadır. Seddon ve Sunderland'ın çalışmalarıyla sinir yaralanmaları sınıflandırılmıştır (1-6). Seddon'un sınıflandırmasına göre en basit yaralanma olan nöroprakside akson ve destek yapıların yapısal bütünlüğü korunmuştur. Hücre ve perifer arasındaki aksonal akım devam etmektedir. İletim bloğu saatler ya da aylar sürebilir ancak iyileşme tamdır. İkinci derece yaralanma olan axontmeside ise akson eşlik eden endonörium ile beraber ya da yalnız olarak zarar görmüştür. Distalde Wallerian dejenerasyon ve myelin tabakasında lysis oluşur. Destek bağ dokusu ve uydu hücreler bütünlüğünü koruyorsa, endonörial kanal açıksa ve uygun şekilde yer alıyorsa, ayrıca reinnervasyon hedef

iskelet kasında geri dönüşümsüz değişiklikler oluşmadan gerçekleşirse fonksiyonel iyileşme olur. En ciddi yaralanma derecesi olan nörotmeside ise sinir fasikülleri ya da tüm sinir hasar görmüştür. Kesilen sinirlerin uygun şekilde onarımlarından sonra bile hedef organa doğru sinir rejenerasyonunun tam olmaması ve yanlış yönlenebilmesi nedeni ile tam fonksiyonel iyileşme sağlanamaz.

Sinirin fasiküler yapısını göz önüne alan ve .5 dereceden oluşan Sunderland sınıflandırmasına göre birinci derece yaralanma, nöropraksi ile aynı özellikleri taşır. İkinci derece yaralanma aksontmesis ile aynıdır. Üçüncü derece yaralanmada sinir lifleri endonörium ile birlikte zarar görmüştür ancak perinörium korunmuştur. Rejenerasyon olmasına rağmen yeni gelişen aksonların intrafasiküler olarak karışması nedeniyle hedef organların reinnervasyonu tam olmamaktadır. Dördüncü derecede endonörial yapıya ek olarak perinöriumda zarar görmüştür. Epinörium sağlam olması sebebiyle sinirin bütünlüğü korunmuş olabilir ancak skar ve interfasiküler karışma reinnervasyonu geniş ölçüde bozar. Beşinci derecede sinir gövdesi tamamen ayrılmıştır ve spontan iyileşme söz konusu olamaz.(3-6)

Sinir yaralanmasına ilk homeostatik yanıt histiositik hücre aktivasyonu ile makrofajların hasarlanan bölgeye gelmesi ile olur. Bunu distal kısımdaki yapıların fagositoz ile tahrip olması izler. Distal sinir segmentinde oluşan Wallerian dejenerasyon sonucunda myelin yapısı bozulur, sonuçta Schwann hücreleri, endonöral hücreler ve bağ dokusu geride kalır ve proksimal segmentden rejenere olan akson tomurcukları eğer hala bütünlüğünü koruyorsa distal segmentde yer alan endonöral tübüllere çekilirler. Destek yapılar çeşitli derecelerde hasar görür, eğer tam bir dejenerasyon mevcut ise rejenerasyon potansiyeli kalmaz. Sinir kesisi ne kadar düzgün onarılsa da rejenere olan sinir lifleri hiçbir zaman orijinal liflerin yerini tam olarak alamaz. Bir miktar akson kaybı ve yanlış yönlendirme mutlaka olur.

Akson bütünlüğü bozulmasından sonra proksimal akson ucundan aksoplazma dışarıya akar. Turgorun azalması sonucunda akson membranları yapışır ve retrakte olur. Kalsiyum iyonlarının aksoplazma içine girmesi ile bir takım proteazlar ve serbest radikaller aracılığı ile doku yıkımı başlar. Aksonal transport devam ettiği sürece hücre gövdesinden aksona doğru aktin, tubulin ve nörofilamanlar gibi iskelet yapıların taşınması gerçekleşir ve rejenerasyon hızını da bu süreç belirler (1,3,4).

Sinir hücre gövdesinde ise nükleus şişer, kaba endoplazmik retikulum distale doğru yer değiştirir. Serbest ribozomların sayısı artar. Kromatolizis olarak adlandırılan bu süreçte RNA ve protein sentezi artmıştır.

Lezyon sahasında yer alan makrofajlar hücre sel artıkları temizler ve distal sinirin dejenerasyonunda rol alırlar. Fagositik rollerine ek olarak makrofajlar; Schwann hücrelerinin çoğalmasına yarayan maddeler, mitogenler, Nerve Growth Factor, İnsulin Like Growth Factor (IGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) gibi büyüme faktörleri, akson uzamasında yer aldığı düşünülen apolipoprotein-E gibi pek çok trofik faktör salgırlar (3,5,9).

Schwann hücreleri, sinir rejenerasyonunda önemli bir yer tutarlar. Hem aksonların hedeflerine ulaşmaları için gereken fiziksel konduitleti oluştururlar hem de aksonal gelişmeyi destekleyen ekstraselüler proteinleri sağlarlar. Hasar gören bir sinirde Schwann hücreleri aktive olur, çoğalarak distal segmentte makrofaj aktivitesine yardımcı olurlar. Myelin fagosite edilse de Schwann hücreleri sağlam kalır. Schwann hücrelerinin oluşturduğu tübüller içine doğru akson rejenerasyonu kompleks bir süreçtir. Rejenere olan bir akson distale doğru birden fazla tomurcuk gönderebilir. Bunu hedef organa olan spesifiteye göre oluşan selektif atrofi izler. Spesifite hedef organa ya da topografik olarak veya motor ve duyusal olarak ayrılabilir (3,5,9).

Kesilen ve rejenere olan proksimal aksonun ucunda oluşan genişlemiş aksonal tomurcuklanmaya adına, büyüme konisi adı verilir. Büyüme konisi içinde aksonal büyüme ve

rejenerasyon için gerekli destek dokulara ulaşacak nöritlerden ve bol miktarda aksonal organel ve mikrofilamanlardan oluşur. Optimal olarak büyüme konisi, Schwann hücre tübüllerine yönelmektedir. Bu süreç pekçok mekanizma tarafından kontrol altındadır; bazal lamina yapıları ile kontakt yönlendirme, nörotropizm-kemotaksis bunlardan bazılarıdır. Genel olarak sinirlerin doğru distal hedeflere yönelmek için doğru topografik yönelme potansiyelleri yüksektir. Akson distal segmente ulaştıktan sonra perifere doğru büyümeye devam eder ve hedef organa varmasından sonra maturasyon safhası başlar. Proksimalden distale doğru akson çapı artar, myelinizasyon bunu takip eder. Rejenere olmuş bir akson normalden daha küçüktür ve daha ince bir myelin tabakası vardır.

Sinir kesisi ya da ciddi ezilme yaralanmalarından sonra proksimal ve distal sinir uçlarının primer reanastomozu ile hedef iskelet kasının optimal reinnervasyonu sağlanabilir. Eğer sütün hatında gerginliğe yolaçmadan primer onarım yapılamıyorsa interpozisyonel sinir greftleri ile onarım en iyi fonksiyonel sonucu verir. İnterpozisyonel sinir greftleri reinnervasyona üç şekilde yardımcı olur. Öncelikle greftte yeralan endonöral tüpler rejenere olan aksonların defekti geçebileceği bir çatı sağlar. İkinci olarak Schwann hücreleri canlı oldukları sürece aksonal rejenerasyonu uyaran trofik faktörler salar. Üçüncü olarak greftteki Schwann hücreleri rejenere olan sinir liflerinin remyelinizasyonuna yardımcı olur. (4,6,9)

Sinir rejenerasyonu distal sinir segmenti ya da interpozisyonel sinir grefti iskemik ya da fibrotik hale geldiğinde ciddi olarak engellenir. Endonöral kanallar bozular, Schwann hücreleri trofik faktörleri ve myelini üretmez hale gelir. Bu durumda hedef iskelet kasına ya da end organa ulaşan sinir lifi sayısı belirgin ölçüde azalır ve fonksiyonel iyileşme suboptimal olur.(2,4,5,6,8)

Motor denervasyondan sonra iskelet kasında bazı değişiklikler olmaktadır. Makroskopik olarak kas çapında ve kas lifi hacminde belirgin kayıp olur. Hücresel düzeyde kontraktıl proteinlerde kayıp ve isoformlarında değişiklik görülür. Kas liflerinin fonksiyonel

özellikleri hücre içindeki myosinin kütlesi ve türüne ayrıca innervasyonu sağlayan motor sinirin karakteristikleri ile belirlenir. Myosin miktarında net azalma ve myosin subtiplerinde değişiklikler, azalmış güç üretimi, yorgunluk direnci, kasılma sayıları gibi kontraktıl özelliklerde değişikliklerle sonuçlanır (1,3,6).

Denervasyon sonrasında nöromusküler bileşkede de bir takım değişiklikler oluşur. Erken dönemde kas liflerinde daha yoğun olarak son plak bölgesinde yer alan nöromusküler reseptörler denerve kas lifi yüzeyinde yaygın olarak gözlenir. Devam eden denervasyon sonucunda, bu potansiyel nöromusküler reformasyon bölgeleri reinnervasyon sağlayacak olan sinir liflerini kabul etme yeteneklerini kaybederler. Bunun sonucunda da ilerleyen kas lifi atrofisi, kontraktıl protein kaybı ve kontraktıl fonksiyonda kalıcı bozulma takip eder.

Motor ünite düzeyinde denervasyon orijinal motor ünite yapısında rekonfigurasyona neden olur. Bir iskelet kası motor ünitesi tek bir motor akson ve innerve ettiği kas liflerinden oluşur. El ve gözde olduğu gibi ince hassas hareketler akson başına 10 kas lifi gibi küçük motor üniteler ile kontrol edilir. Ancak deltoid kasında olduğu gibi kaba hareketler çok büyük motor üniteler ile (1000 kas lifi /akson) sağlanır. Yüz ve larinks kasları gibi az sayıda kas lifinin bir aksonla innerve olduğu kaslarda motor ünitenin rekonfigurasyonu genellikle ince motor kontrolün kaybına ve sinkineziye neden olur çünkü tek bir akson daha fazla kas lifini ya da yanlış kas liflerini innerve edebilir. Motor aksonların denerve bir kasa ulaşması ile reinnervasyon öncelikle eski motor son plakların reinnervasyonu ile olur. İlk gelen aksonların yakınlarındaki kas liflerini reinnerve etmesi ve yeni nöromusküler bileşkelerin kurulması ile yeni bir motor ünite dağılımı gerçekleşir. Reinnerve eden sinirin özelliğine göre kas lifleri reinnervasyondan sonraki iki hafta içinde değişim gösterirler. Normal kastaki motor ünitelerin mozaik dağılımının yerine reinnerve kaslarda ortak innerve olan kas lifi kümeleri ve daha küçük motor üniteler gösterir. Az sayıda akson denerve kasa ulaşırsa fonksiyonu sağlayabilmek için aksonlar çevredeki daha fazla sayıda son plagi innerve edebilmek

amacıyla yan dallar verir. Bunun sonucunda dev motor üniteler oluşabilir. Motor fonksiyon nöromusküler bileşkenin kurulmasından hemen sonra başlamayabilir. Fonksiyonel iyileşme ancak intrafusal kas liflerinin gama efferent kontrolü sağlanması ile gerçekleşir. Ancak gamma reinnervasyon hiçbir zaman tam sağlanamaz. Feedback kontrol olmadığı için kesin ince hareketler yeterli kontraksiyon olmasına rağmen yapılamaz (1,3,6,10).

Periferik sinir rekonstrüksiyonu

Bir yaralanmadan sonra denerve kaslarda fonksiyonel iyileşmeyi etkileyen en önemli faktörlerden birisi de cerrahi rekonstrüksiyon metodudur. Sinirlerin atravmatik şekilde manipule edilmesi, sinir uçlarının iyi koaptasyonu ve gerginliğin önlenmesi temel kurallardır (1,3-7).

Hueter ilk olarak 1873 yılında epinöral sütün ile sinir koaptasyonu sağlamıştır ve bu uzun yıllar boyunca standart onarım metodu olmuştur. 1917 yılında ilk olarak Langley ve Hashimoto tarafından ortaya atılmasına rağmen perinöral veya fasiküler sinir onarımı yaygın kullanım bulamamıştır. Antibiyotik kullanımından önceki dönemlerde ve sinir greftleri ile ilk zamanlardaki başarısızlıklar nedeniyle periferik sinir onarımlarında uzun süre başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Sinirin fasiküler yapısını göz önüne almadan yapılan onarımların yeterli sonuç vermeyeceği özellikle sinirlerin intranöral topografik özelliklerinin belirlenmesi ile anlaşılmıştır.

1964 yılında mikroskopun epinöral sinir onarımında kullanılması ile teknikler giderek gelişmiştir. Yüksek büyütme altında, mikrocerrahi teknikleri ile sinirin hassas yapısına zarar verilmeden manipulasyonu gerçekleştirilebilir. Bu şartlar altında fasiküler seviyede optimal koaptasyon sağlanabilir ancak akson-akson koaptasyonu mümkün olamaz.

Kolay ve hızlı uygulanması, yüksek büyütme gerektirmemesi, intranöral yapının bozulmaması ve intranöral sütünlerin neden olabileceği yabancı cisim reaksiyonunun

olmaması gibi nedenlerle epinöral sinir onarımı halen en yaygın kullanılan yöntemdir. En önemli dezavantajı olan koaptasyon sahasında fasiküllerin uygun şekilde karşı karşıya getirilmesindeki güçlük nedeniyle koaptasyon sahasında oluşan dezorganizasyon sonuçları olumsuz etkilese de standart onarım metodu olmaya devam etmektedir (1,4).

Perinöral veya fasiküler onarım ise distal ve proksimal uçlardaki fasiküllerin optimal koaptasyon için cerrahi olarak manipulasyonunu gerektirir. En büyük güçlük hangi fasikülün distal uçtaki hangi fasikül ile koaptasyonun gerektiğinin tespit edilmesidir. Fasiküler topografinin bilinmesi, özellikle distale gittikçe fasiküler homojenitenin artması ve intraoperatif elektrodiagnostik ve histokimyasal metodların kullanımı ile bu uygun fasiküller belirlenebilmektedir. Fasiküler sinir onarımı ile rejenere olan aksonlar büyük ölçüde doğru yönlendirilebilir ve bu da fonksiyonel sonuçları olumlu etkilemektedir. Önemli dezavantajları daha fazla intranöral disseksiyon ve sütürlerin neden olduğu fibrozis ile uzun süren, teknik olarak daha güç bir onarım yöntemi olmasıdır (1,4).

Koaptasyon sahasında gerginlik skar gelişimine, bağ dokusunun sinir uçları arasına girmesine, fasiküller arasında boşluklar oluşmasına neden olur. Yapılan tüm çalışmalarda 2-2.5 cm'den geniş defektlerin sinir greftleri ile onarılması gerektiği sonucunu vermiştir (4,6,11). İnterpozisyonel sinir greftleri reinnervasyona üç şekilde yardımcı olur. Öncelikle greftte yer alan endonöral tüpler rejenere olan aksonların defekti geçebileceği bir çatı sağlar İkinci olarak Schwann hücreleri canlı oldukları sürece aksonal rejenerasyonu uyaran trofik faktörler salar. Üçüncü olarak; greftteki Schwann hücreleri rejenere olan sinir liflerinin remyelinizasyonuna yardımcı olur. Eğer çok fazla sinir greftlemesi gerekiyorsa ve alıcı yatak vaskularizasyonu yeterli değilse vaskularize sinir greftleri kullanılmalıdır (1,2,4). Böylece vaskularizasyon için gereken sürede iskeminin neden olacağı intranöral fibrozis engellenebilir ve daha hızlı reinnervasyon sağlanabilir.

Bazı araştırmacılar ideal sinir koaptasyonunda sütür kullanılamaması gerektiğini savunmaktadır. Bu amaçla fibrin yapıştırıcılar, laser gibi pek çok farklı yöntem denenmiştir ancak hepsi de çeşitli avantajlar sağlamalarına rağmen standart onarım metodlarının yerini alamamışlardır. Koaptasyon sahasında skar gelişimini azaltarak aksonal rejenerasyonu arttırmak amacıyla tubularizasyon yöntemleri denenmiştir. Sinir uçları sütür kullanılmadan çeşitli materyellerden yapılan tüpler içinde yerleştirilmiştir böylece intrinsik rejenerasyon mekanizmalarının optimal Şartlarda çalışacağı düşünülmüştür. Sinir greftleri yerine bioabsorbabl konduitler ya da otolog doku kullanımı rejenere olan aksonların yönlendirilebileceği bir çatı sağlaması nedeniyle deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılıp çeşitli ölçülerde başarılı sonuçlar alınmıştır. Arter, ven, dura, fasya, kas, mezotelyum, omentum gibi dokuların yanında pekçok bioabsorbabl veya rezorbe olmayan sentetik materyeller bu amaçla kullanılmış ancak bu yöntemlerin hiçbiri yaygınlaşamamıştır (1,5,8,12). Tüm bunlara ek olarak son zamanlarda denenmeye başlanan uç-yan sinir anastomozları da belirli ölçüde başarılı sonuçlar vermiştir.

Yapılan tüm araştırmalar teknik olarak periferik sinir defektlerinin rekonstrüksiyonu için pek çok alternatif sunmaktadır. Fakat karşılaşılan klinik durumların çeşitliliği nedeniyle primer yada sekonder sinir onarımı her zaman sağlanamayabilir. Denerve kalan kasların neden olduğu ağır fonksiyonel ve estetik sorunlar reinnervasyonun sinirlerin doğrudan denerve dokuya yönlendirilmesini gerektiren nörotizasyon tekniklerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Nörotizasyon

Sinirlerin hücresel ve doku boyutlarında iyileşme mekanizmalarının anlaşılması ve buna bağlı olarak periferik sinir onarımında mikrocerrahi yöntemlerin kullanılması, epinöral, perinöral sütün tekniklerinin geliştirilmesi, tübularizasyon tekniklerinin ortaya atılması, sinir greftleri, vaskularize sinir greftleri yada sinir transferleri her zaman gerekli rekonstrüksiyonun sağlanması için yeterli olamamaktadır. Bazı klinik durumlarda proksimal ve distal sinir segmentleri mevcut onarım yöntemleri ile onarılmaya uygun olmayabilir. Distalde sinir ve kas kayıpları olabilir ya da proksimal sinir segmentindeki defekt nedeniyle orijinal sinir kullanılamayabilir. Santral veya periferik sinir lezyonları sonucunda denerve olan motor veya duysal bir bölgenin reinnervasyonu için nörotizasyon kavramı öne sürülmüştür. Kısaca fonksiyonel bir sinirin denerve bir motor ya da duysal bölgenin doğrudan reinnervasyonu için kullanılmasına nörotizasyon adı verilmektedir. Bu amaçla daha az klinik değeri bulunan fonksiyonel bir sinir hasarlanan sinir yerine kullanılabilir. Kullanılacak sinirin yerine kullanılacağı sinire benzer yapıda ve sayıda lifler içermesi ve ayrıldığı vücut bölgesi için gerekli olmaması gereklidir (6,13,14).

Teorik olarak beş olasılık mevcuttur: Kutanokutanöz, Nörokutanöz, Muskulomusküler, Nöromusküler, Nöronöral nörotizasyon. Her durumda da donör sinirin alıcıda aksonal rejenerasyon sağlanması gerekmektedir.

Kutanokutanöz nörotizasyon: Sağlıklı deri komşuluğunda yeralan denerve derinin reinnervasyonunu sağlar. Deri greftleri, deri flepleri veya duysu bozulmuş deri bölgeleri progresif olarak çevredeki normal innerve deriden gelişen kollateral tomurcuklanma ile reinnerve olmaktadır. Ancak reinnervasyonun kalitesi ve yayılımı sınırlı olmaktadır. Spesifik reseptor organ reinnervasyonları düzensizdir.

Nörokutanöz nörotizasyon Duyu lifleri taşıyan sinir fasiküllerinin ya da sinir greftlerinin derinin alt tabakalarına implantasyonu ile duyu özelliğini yeniden kazanabileceği

görüştür. Brunelli tarafından 1983'de öne sürülen bu yöntem ile deriye implante edilen sinirlerin nöroma oluşturmak yerine deriyi reinnerve ettikleri tespit edilmiştir (13). Esasında bu durum tüm yüzeysel yaralanmalar ve deri insizyonlarından sonra gerçekleşmektedir. Ancak derinin bu yöntem ile nörotizasyonundan sonra genellikle çok uzun süren pareteziler hissedilmektedir.

Muskulomuskuler nörotizasyon: 1914 yılında Heineke, tavşanlarda sağlıklı kaslardan komşu denerve kaslara kollateral aksonal gelişim olduğunu göstermiştir. Erlacher 1914'de bu sonuçları doğrulamıştır ancak fonksiyonel sonuçlar çok yetersiz bulunmuştur. 1945'de Van Hareveld bu tip nörotizasyonun mekanizmalarını parsiyel olarak paralize edilmiş kasların reinnervasyonunu çalışarak göstermiştir (13).

İnnerve bir kasın komşuluğunda yer alan denerve bir kasın reinnervasyonu için aksonal gelişim kaynağı olarak rol alması muskulomuskuler nörotizasyonun temelini oluşturur (15-17). Klinik olarak bu tip nörotizasyon fasiyal sinir paralizisi gibi spesifik durumlarda uygulanmıştır. Thompson 1971'de denerve extensor brevis veya palmaris longus kasının yüze transferini öne sürmüştür. Reinnervasyon sınırlı olmuş ve axonal gelişmeyi sağlayan kas ile senkronize hareket sağlanmıştır. Efferent motor lifler alıcı kas üzerinde yayılıp yeni son plakların gelişimlerini ve reinnerve kasın istemli hareketini sağlamıştır. Fakat afferent liflerin yeni reseptör oluşturma kapasiteleri oldukça sınırlı kalmıştır. İnsanda Erb paralizisi vakalarındaki pektoralis major kasında olduğu gibi bazı kasların spontan parsiyel reanimasyonu muskulomusküler nörotizasyon ile açıklanabilir.

Nöronöral nörotizasyon: Proksimal sinir gövdesindeki ya da santraldeki defektler sonucunda motor ya da duyuusal denervasyona yol açan bir sinirin yeniden fonksiyonel hale getirilmesi için fonksiyonel bir sinirin distal uca transfer edilmesi kavramıdır. 1873'de Letievant, onarılamayacak distal parçası olan bir sinire sağlıklı bir sinirin lateral implantasyonunu öne sürmüştür. Baş boyun bölgesinde fasiyal reanimasyon için hypoglossal,

spinal aksesuar, trigeminal sinir ile fasial sinir nörotizasyonu uygulamaktadır. Brakiyal pleksus yaralanmalarında ilk olarak 1903'de Harris ve Low distal C5 spinal sinirini sağlam C6, C7 sinirlerine implante etmişlerdir. Daha sonraları çeşitli araştırmacılar spinal aksesuar, interkostal sinirleri kullanarak brakial pleksus yaralanmalarını onarmaya çalışmışlardır. Radial sinir superficial dalı ve ulnar sinir, median sinir nörotizasyonu için kullanılmıştır. Özellikle ağır multipl travmalar sonucunda oluşan brakial pleksus yaralanmaları bu tür hastaların yaşam oranlarının artması ile daha sıklıkla nörotizasyon girişimlerinin uygulanmasına neden olmaktadır.(5,13,14,18)

Nöromusküler nörotizasyon: Denerve bir kasın direkt sinir implantasyonu ile reinnervasyonu kavramıdır. Gersuny 1906'da normal olarak innerve bir kasa ek bir sinir implante ederek hiperinnervasyon sağlamıştır. Teknik, ilk olarak 1914 yılında Heineke tarafından tarif edilmiştir. Hayvan deneyleri ve iki klinik vakadan sonra Erlacher 1915 de uygun vakalarda kullanılabileceğine karar vermiştir. Daha sonraları Steindler (1916), Elsberg (1917), Weiss (1930), Aitken (1950) çalışmaları ile uygun teknik kullanıldığında paralize kaslarda fonksiyonel motor son plakların oluştuğunu göstermişlerdir. Denerve kas liflerinin aksonal gelişmeye direkt etkileri, motor sinirlerin myogenik kapasiteleri Peterson ve Crane'in 1972 de yaptıkları deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Sorbie ve Porter (1969) yeni motor son plaklarının gelişimini ve orijinal gücün en az yarısının geri kazanıldığını köpekler üzerinde göstermişlerdir.(13)

Brunelli, bu konuda yayınladığı pek çok araştırması ile nöromusküler nörotizasyonun sadece deneysel değeri olan bir kavram olmadığını ve klinik olarak kullanılabileceğini göstermiştir(19-21). Brunelli sadece efferent motor reinnervasyonun değil aynı zamanda afferent reinnervasyonun da direkt muskuler nörotizasyon ile geliştiğini elektron mikroskopisi ile belirlemiştir. Frey 1982'de, Cheng 1994'de yaptığı çalışmalarda direkt sinir implantasyonu ile primer sinir onarımı arasında yakın sonuçlar elde etmiş ve distal sinir ucunun bulunmadığı

durumlarda direkt sinir implantasyonu ile reinnervasyonun güvenli bir alternatif olduğunu öne sürülmüştür (22,23). Zhang 1997'de denerve kas kitlesinin korunmasında motor nörotizasyon ile motor sinir onarımlarının farkı olmadığını saptamıştır(24). Ancak aynı çalışmada transplante edilen kas fleplerinde nörotizasyon ile yeterli kas kitlesi korunumunu sağlayamamış ve transplantasyonun kasın reinnervasyona olan cevabını değiştirebileceğini öne sürmüştür.

Deneysel olarak denerve kasların reinnervasyonun anlaşılabilmesi için yapılan çok sayıda araştırma ile yeni motor son plaklarının gelişimi, denervasyonun ve reinnervasyonun patogenezi gibi konular aydınlatılmaya çalışılmıştır (25-35). Az sayıdaki klinik vakada gözlenen başarılı sonuçlara rağmen daha yaygın olarak kullanımı 1981 yılında Brunelli ve arkadaşlarının. başarılı klinik seri sonuçlarını sunmaları ile başlamıştır (19-21,36). Özellikle üst ekstremitede çeşitli travmatik nedenlerle ciddi yaralanmalar ve multifokal sinir lezyonları oluşabilmektedir. Brakial pleksus kök avülsiyonları, gövde rüptürlerine ek olarak motor sinirin kasa giriş noktasından avülsiyonu ve onarım için yeterli distal uç bulunmayan periferik sinir lezyonları da görülmektedir. Üst ekstremitenin önemli sinirleri olan median, radial ve muskulokutanöz sinir bu şekilde yaralanabilir aynı anda brakial pleksus seviyesinde de hasar olabilir. Bu olgularda muskuler ramus avülse olur ve ana trunkus aynı seviyede rüptüre olur ve çevre dokulardan diskonnekte olup 20 cm kadar retrakte olabilir. Modern rekonstrüktif cerrahi metodlarla ciddi şekilde yaralanan ekstremitelerin yaşamı devam ettirilebilir ancak fonksiyonel kılmakta önemli problemler ortaya çıkmaktadır. Ayrıca geç dönemde yapılan sinir eksplorasyonlarında distal sinir ucunun Wallerian dejenerasyon sonucunda tamamen kaybolması da mümkündür. Tüm bu durumlarda motor ramus kaslara direkt olarak ya da sinir greftleri aracılığıyla implante edilebilir.

Paralize larinksin reanimasyonu primer sinir onarımı sonrasında abduktör ve addüktör kaslara giden liflerin nöromusküler yanlış birleşmesi nedeniyle sağlanamamaktadır. Doyle,

kesilen recurrent laringeal sinirin posterior cricoarytenoid kasa direkt implantasyonu ile daha selektif kontrol sağlanabileceğini önermiştir. Tucker, bu kavramı sinir-kas pedikül tekniği ile geliştirmiştir (37-42). Crumley'de benzer amaçlarla split phrenik sinir implantasyonunu denemiştir (43). Sinir-kas pedikül tekniğinde, periferik motor sinir kendi iskelet kasından bir parça ile beraber reinnerve edilmek istenilen kasa implante edilir. Böylelikle direkt sinir implantasyonunda olduğu gibi sadece kesik axon uçları değil aynı zamanda sinirin kasa girdiği noktadaki motor son plaklar da sinir ile birlikte taşınmış olur ve muskulomuskuler nörotizasyon yoluyla daha çabuk reinnervasyon sağlanabileceği öne sürülmüştür. Meilke direkt sinir implantasyonu ve nöromusküler pedikül tekniklerini tavşan strap kas reinnervasyonu modelinde karşılaştırmış ve fark bulamamıştır (44). Hall, yüz kaslarının reinnervasyonu için bu iki yöntemi karşılaştırmış ve nöromusküler pedikül tekniği ile daha fazla kontraktıl güç sağlandığını saptamıştır (45). Broinatowski, köpek yüz kaslarında nöromusküler pedikül tekniği ile reinnervasyon sağlamıştır ayrıca tavşanlarda baş boyun bölgesinde direkt sinir implantasyonu ve nöromusküler pedikül tekniğini karşılaştırmıştır (46-49). Klinik olarak nörotizasyon teknikleri larinks kaslarının reinnervasyonu için kullanılmaktadır. Tucker geniş serisinde ansa hypoglossi sinirini kullanarak bilateral vokal kord paralizisinde %74, unilateral vokal kord paralizisinde %88 başarı sağlamıştır. May ve Beery unilateral vokal kord paralizisinde ses kalitesinde %95 ilerleme sağlamışlardır (50). Direkt sinir implantasyonu ve sinir-kas pedikül implantasyonu yöntemlerini araştıran çalışmaların bir kısmında sinir-kas pedikül implantasyonunun daha üstün olduğu yönünde sonuçlar olsa da iki yöntem arasında fark olmadığı yönünde de bulgular elde edilmiştir (51-54).

Nerve Growth Factor

Periferik sinirlerin rejenerasyon kabiliyetleri fazla olmasına rağmen sinir yaralanması ve onarımından sonra normal fonksiyon tam olarak kazanılamamaktadır. Anatomik ve patolojik değişikliklerin tam olarak anlaşılması, mikrocerrahi teknikleri sonuçları olumlu etkilemiştir. ancak özellikle son zamanlarda araştırmacıların ilgisi cerrahi onarım teknolojisi kadar rejenere olan aksonda oluşan hücresel ve moleküler düzeydeki olayların anlaşılmasına kaymıştır. Her ne kadar çok uzun süredir sinir hücresi etrafında oluşan biyolojik faktörlerin sinir gelişim, büyüme, yaşama, ve rejenerasyonuna etkileri üzerinde durulsa da 1951 yılında Levi-Montalcini ve Hamburger tarafından Nerve Growth Factor'ün bulunması sinir rejenerasyonu çalışmalarında gerçek ilerlemelere neden olmuştur (3,7,8). Ayrıca hücre kültür yöntemlerinin geliştirilmesi sinir rejenerasyonunda etkili olabilecek pek çok ajanın in vitro olarak saptanıp denenmesine olanak sağlamıştır. Böylece embryonik sinir gelişiminden sinir hücresinin travmaya yanıtına kadar pek çok sorun araştırılmıştır (56-58). Elektromanyetik alandan çeşitli kimyasal maddelere kadar bir çok değişik etkenin sinir rejenerasyonuna etkileri araştırılmıştır (56-58). Sinir hücresi üzerinde etki gösteren Nerve Growth Factor dışında pekçok peptid tanımlanıp NGF ile bir sınıflanıp nörotropinler grubunu oluşturmuşlardır.

Bu faktörlerin çoğu ve reseptörleri, Schwann hücrelerinde, lomber spinal kord nöronlarında, dorsal kök ganglionlarında ve hedef kaslarda artış gösterir. Schwann hücrelerinde ya da hedef kaslarda üretilen bazı faktörlerin retrograd olarak dorsal kök ganglionlarına ve spinal kord motor nöronlarına taşınıp duyuşal ve motor rejenerasyona destek oldukları öne sürülmüştür. Bazı faktörler de lokal olarak etki gösterip Schwann hücresi proliferasyonu etkilemekte ve rejenere olan aksonun myelinizasyonunu sağlamaktadır. Bu faktörlerin yaralanmaya cevapları çok karışık olmasına rağmen bir yada daha fazlasının lokal veya yaygın olarak hedeflenmesi ile sinir rejenerasyonuna olumlu etki sağlanabilir (3,7,8,58-62).

Nörotropin ailesi Nerve Growth Factor (NGF), Ciliary Neurotrophic Factor, Brain-Derived Growth Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), ve Neurotrophin -4/5 (NT-4/5)'den oluşur (8). Yapısal olarak benzerlikleri olmasına rağmen fonksiyonel olarak farklılıkları olduğuna dair kanıtlar vardır. NGF bazı periferik nöronların sinir sistemi gelişimi sırasında büyüme ve hedef organa (kas gibi) bağlanmasını sağlar. Ayrıca periferik sinir sisteminde de benzer etkisi vardır. Büyüme faktörü adı genellikle kültür ortamında mitojenik etki yaratan faktörler için kullanılmaktadır. NGF ilk tanımlanan büyüme faktörü olmasına rağmen mitojenik etkisi yoktur. Duyarlı sinir hücrelerinde yaşamı ve sinir liflerinin büyümesini destekler. Yaralanma sonrasında Schwann hücreleri ve muhtemelen fibroblastlar, makrofajlar tarafından sentezlenip salınır ve sinir uçları tarafından içeri alınıp sinir terminaline retrograd olarak taşınır. Duyu ve sempatetik nöronların NGF esas hedefi olduğu düşünülmektedir ancak motor nöronlarında hedeflendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. İnternalizasyon ve transport iki reseptör tarafından düzenlenir. Düşük affiniteli NGF reseptörü (p75) Schwann hücrelerinde sinir yaralanmasından sonra artar ve rejenerasyon sonrasında bazal düzeyine döner. İkinci reseptör trk ailesine aittir ve trkA NGF için esas reseptördür. NGF'e hücreyel yanıt trk ailesi ile olmaktadır. NGF potansiyel olarak periferik sinir yaralanmalarında ve nöropatilerde tedavi amaçlı olarak kullanılabilir. Hem sinir kesileri hem de diabetik nöropati akson çapında ve nörofilaman sentezinde azalmaya neden olur. NGF nörofilaman ekspresyonunu artırır ve nörofilamanlar da akson çapının esas belirleyicileridir (8).

NGF kullanılarak yapılan periferik sinir iyileşmesi çalışmaları duyu ve motor sinir rejenerasyonuna olumlu ve hızlandırıcı etkilerini göstermiştir (62-79). NGF sinir rejenerasyonunun erken dönemlerinde daha matür nöral organizasyon, daha fazla proliferatif vaskularizasyon ve artmış sayıda myelinli aksonlarla olumlu etkilerini göstermiştir (75)

Ciliary Neurotrophic Factor

İlk olarak in-vitro olarak civciv silier nöronlarının hayatiyetini arttırması ile tanımlanmıştır. Daha sonraları ise periferik sempatetik nöronlar, kültür ortamında duyu nöronları ve embryonik motor nöronları ve hipokampal nöronları etkilediği saptanmıştır. İn-vivo olarak retinal fotoreseptör hücrelerin dejenerasyonunu engellemesi, yeni doğmuş farelerde fasiyal motor nöron kaybını engellediği, genetik motor sinir defisitlerini tersine döndürdüğü belirlenmiştir. CNTF'nin normal Schwann hücrelerinde depolandığı ve sinir hasarından sonra salındığı öne sürülmüştür. CNTF'nin sinir kaynaklı myojenik faktör olduğu düşünülmektedir. Periferik sinirlerde bol miktarda bulunmakta ve iskelet kaslarında CNTF reseptörleri bulunmaktadır. Eksojen olarak verildiğinde kaslarda atrofiyi azaltmakta ve denervasyon sonrasında kas gücünün yeniden kazanılmasını sağlamaktadır.(8,79-81)

Brain Derived Nerve Growth Factor

NGF ile %50 dizilim benzerliği gösterir. Hücre kültürlerinde duyu nöronları ve parasempatetik ganglion hücrelerini desteklemiştir. İn-vivo olarak BDNF embryo, yenidoğan ve erişkin motor nöronlarının yaşamını desteklemiştir. NGF'ye benzer şekilde yaralanma sonrasında Schwann hücrelerinde ve hedef kaslarda artış göstermiştir. Yaralanmış sinirin proksimal ucunda trkB reseptörü artışı olur ve bu reseptörün BDNF'nin hücre içine alınıp transferinde rol aldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlarla BDNF'nin motor ve duyu nöronları için önemli bir trofik faktör olduğu ve eksojen BDNF ile periferik sinir yaralanmasına bağlı dejeneratif değişikliklerin engellenebileceği öne sürülmüştür (8,80-82).

Neurotrophin 3.

NGF ve BDNF gibi in vitro olarak nöral krest ve duyu nöronlarının değişimini ve yaşamını destekler. Dorsal kök ganglionlarında yer alan proprioseptif nöronların Neurotrophin-3 esas hedefi olduğu bulunmuştur. BDNF ile benzer olarak yenidoğan motor nöronlarını axotomy sonrasında kurtarır ve siyatik sinirde retrograd olarak dorsal kök

hücrelerine ve motor nöronlara taşınır. Sinir yaralanmasından sonra NT-3 seviyesinde düşme olur ve rejenerasyon tamamlandıktan sonra normal seviyesine ulaşır. Esas rolü normal axon-Schwann hücresi etkileşimlerini düzenlemektir.(8,85)

Neurotrophin 4/5

BDNF ile aynı reseptöre bağlanır. Siyatik sinir yaralanmasından sonra 6-24 saat sonra siyatik sinir ve gastroknemius kasında artış gösterir. BDNF ise 72 saat sonra artış gösterir. Bu bilgiler NT-4/5 ve BDNF'nin aynı reseptöre farklı zamanlarda bağlanarak periferik sinir rejenerasyonunu birlikte desteklediklerini göstermektedir.

Amac

Periferik sinir iyileşmesi, sinir rekonstrüksiyon metodları, nörotizasyon ve sinir büyüme faktörleri hakkında günümüzde geçerli olan bilgiler göz önüne alındığında özellikle çok karmaşık klinik durumlarda tek alternatif yöntem olarak karşımıza çıkan nörotizasyon kavramının daha ayrıntılı olarak incelenmesinin faydalı olacağına düşünülerek bu araştırma planlandı. Bu amaçla günümüzde kullanılmakta olan başlıca nöromuskuler nörotizasyon teknikleri olan direkt sinir implantasyonu ve sinir kas pedikülü implantasyonu yöntemlerine ek olarak denerve kasların birden fazla noktadan reinnervasyonu sağlayabilecek bir yöntem olarak sinirlerin fasiküler yapısı da göz önüne alınarak geliştirdiğimiz ve daha önce hiçbir deneysel ve klinik çalışmada denenmemiş olan fasiküler sinir implantasyonu yöntemini karşılaştıracak deneysel bir model geliştirdik. Periferik sinir iyileşmesi ve iskelet kası üzerine olumlu etkilerinin olduğu bilinen Nerve Growth Factor'ün denerve kasların reinnervasyonunda etkin olabileceğinden yola çıkarak deneysel çalışmamızda bu faktörü de kullandık. Nörotizasyon için kullandığımız farklı tekniklerle belirlenen gruplara ek olarak Nerve Growth Factor uyguladığımız gruplar oluşturularak denerve kasların reinnervasyonu üzerine etkilerini araştırdık.

MATERYEL METOD

Çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Dokuz Eylül Üniversitesi Nöroloji ve Patoloji Anabilim Dallarından deneysel girişimlerin değerlendirilmesinde yardım alınmıştır.

Deney hayvanı olarak İzmir Ege Üniversitesi Veterinerlik Araştırma Enstitüsünden temin edilen 300-350 gr ağırlığında erişkin Wistar ratları kullanılmıştır.

Hayvanlara ilk olarak eter ile sedasyonu takiben intraperitoneal sodyum pentobarbital 80mg/kg uygulanarak anestezi sağlandı.

Çalışma alanı hedef kas; sıçan soleus kası ve nörotizasyon için de derin peroneal sinir olarak belirlendi.

Anestezi sağlandıktan sonra hayvanlar uygun şekilde traş edilip prone pozisyonda alt extremité ekstansiyonda olacak şekilde operasyon masasına yerleştirildi. Cerrahi işlem yapılacak alan ve çevresi povidon- iyodine solusyonu ile temizlendi. Tüm cerrahi işlemler steril koşullar altında, operasyon mikroskopu (Zeiss OPMI 99) ile X16 büyütmede mikrocerrahi aletleri ve teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Aşil tendonu üzerinden başlayıp uyluk ortasına kadar uzanan posterior zig-zag insizyon yapıldı . Gluteal kas split edildi ve tüm bacak kasları ve common peroneal sinir siyatik sinirden orijin aldığı noktaya kadar expose edildi. Soleus ve gastroknemius kasları arasındaki plana ulaşıldı. Soleus kasının motor siniri tespit edilip en sık nörotizasyona ihtiyaç duyulan klinik durumu simule etmek amacıyla kastan avülse edilerek ayrıldı. Bu sinir ile reinnervasyonu engellemek amacıyla 5mm segment eksize edildi proksimal uç bipolar koterizasyon ile yakılıp proksimal ve süperfisyal olarak çevrildi. Tibial sinir soleus kası altında bulunup bu sinir ile reinnervasyonu engellemek amacıyla proksimalde kesilip ucu bağlandı.

Derin peroneal sinir extansor digitorum kasına girdiği noktadan common peroneal sinirden ayrıldığı noktaya kadar disseke edildi. Bu aşamaya kadar yapılan işlemler bütün gruplar için standart olarak gerçekleştirildi. Grupların özelliklerine göre derin peroneal sinir kastan farklı şekilde ayrılıp soleus kası bu sinir kullanılarak farklı yöntemlerle nörotize edildi. Kas 5/0 vicryl (Ethicon), deri 5/0 prolene (Ethicon) suture kullanılarak kapatıldı.

Farklı nörotizasyon teknikleri ve Nerve Growth Factor kullanımına bağlı olarak 6 grup oluşturuldu. Sol bacak soleus kası ise kontrol grubu olarak kullanılmak üzere herhangi bir cerrahi işlem yapılmadan bırakıldı.

NGF Hazırlanması:



Şekil 1: Çalışmada kullanılan Nerve Growth Factor (NGF-7S)

Bu çalışmada Nerve Growth Factor(NGF-7S) (Sigma Pr.No. N-0513) kullanıldı(Şekil 1). Bu madde, fare submaksiller gland dokusundan izole edildikten sonra nörotropik etkiye sahip olduğu belirlenmiş olan β -alt ünitesi saflaştırılmıştır. Doku kültür ortamlarında bioaktivitesi test edilen NGF-7S 2-200ng/ml konsantrasyonlar arasında etkili bulunmuştur. Liyofilize toz halinde bulunan preparatın tamponlu salin ya da doku kültür medimu ile sulandırılması önerilmiştir.

Çalışmamızda steril şartlarda hazırlanan 2.5mM sodyum fosfat ph:7.0 tamponu solvent olarak kullanıldı 89 mg Di-Sodium hidrojen phosphate dodecahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) MW=358.14 gr 100 ml steril bidistile suda çözülerek 2.5mM solusyon hazırlandı. 39 mg Natriumdihydrogenphosphat-2hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) MW=156gr 100ml steril bidistile suda çözülerek 2.5mMlık solusyon hazırlandı. Her iki çözeltiden uygun miktarda karıştırılarak pH 7.0 olan sodyum fosfat tamponu elde edildi.

100µgr liyofilize NGF-7S 50 ml sodyum fosfat tamponu içinde çözülerek 2µgr/ml NGF-7S solusyonu hazırlanıp deneysel çalışmalar sonuçlanana kadar 0°C'de saklandı.

Deneysel Gruplar

Grup 1: Direkt sinir implantasyonu

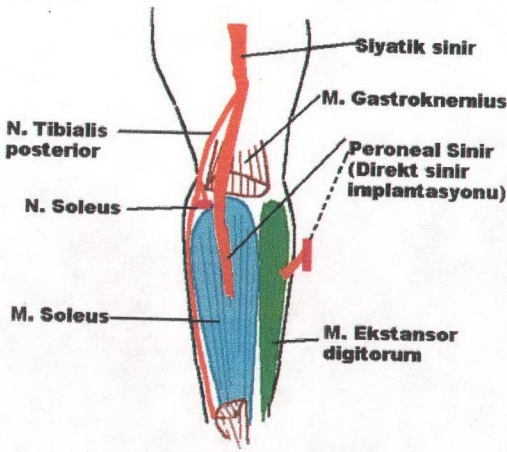
Derin peroneal sinir gerginlik olmayacak uzunluk sağlanacak kadar distalden kesilip gastroknemius kası üzerinden çevrilip soleus kasına ulaştırıldı. Soleus kası ½ orta kısımda perimysium açılıp sinir 2 veya 3 adet 10/0 ethilon (Ethicon) sütürler ile kasa implante edildi.(Şekil 2)

Grup2: Fasikuler Sinir İmplantasyonu

Derin peroneal sinir kesildikten sonra mikroskop altında epinörüm distalde açılarak intranöral disseksiyonla sinir fasiküllerine ayrıldı. Ana sinirin genelde 3 fasikülden oluştuğu görüldü. Sinir fasikülleri 5 mm kadar disseke edildiler. Sinir, kas üzerine çevrildikten sonra daha yaygın bir nörotizasyon sağlamak amacıyla sinir fasikülleri kas yüzeyine yayılıp birer adet 10/0 ethilon (Ethicon) sütür ile kasa tespit edildi. (Şekil 3)

Grup 3: Sinir-kas Pedikül İmplantasyonu

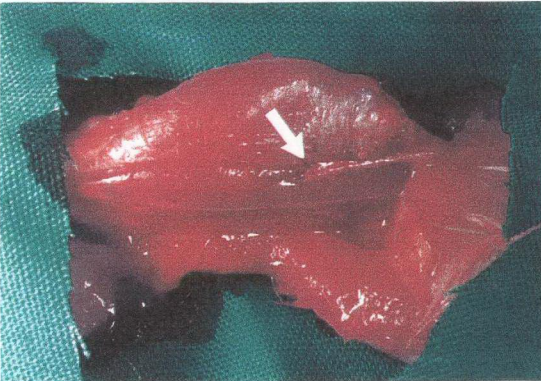
Derin peroneal sinirin Extansor digitorum kasına girdiği bölgeden 3x3 mm boyutlarında kas dokusu sinir ucundan ayrılmadan sinir ucunda taşındı. Soleus kası yüzeyinde aynı büyüklükte alanda perimysium açıldı ve nöromuskuler pedikül ucundaki kas bu bölgeye 4 adet 10/0 ethilon (Ethicon) sütür ile tespit edildi.(Şekil 4)



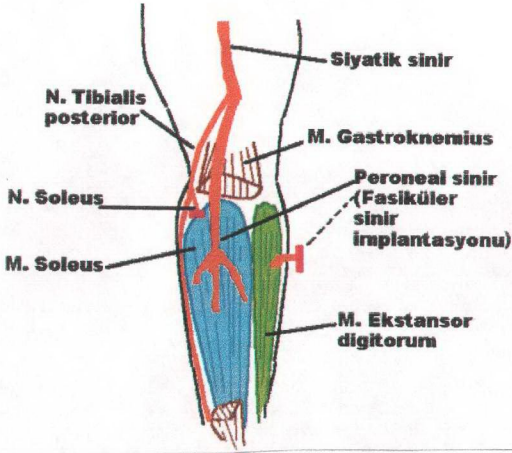
Şekil 2: Direkt sinir implantasyonu yapılan Grup 1 ve Grup 4’de gerçekleştirilen cerrahi işlemler. (A): Çizimde şematik olarak gerçekleştirilen işlem görülmektedir.



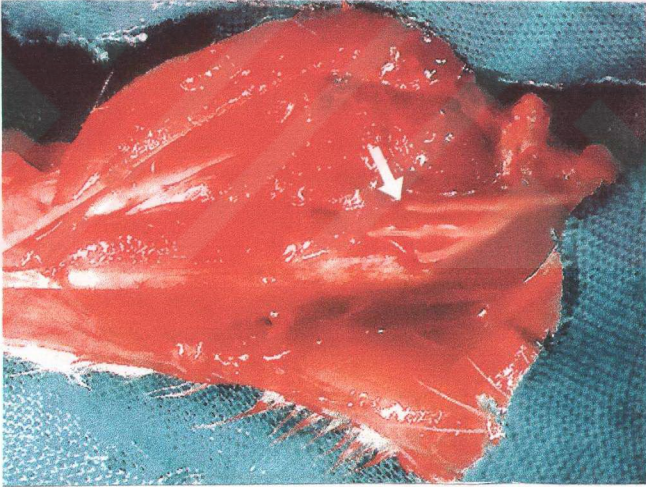
Şekil 2(B): Derin peroneal sinir soleus kasına implantasyon için hazırlanmış halde



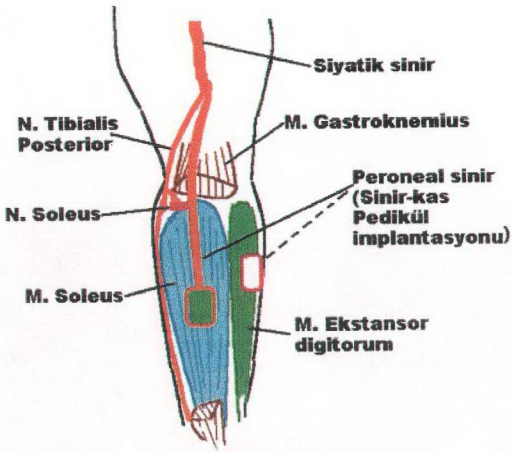
Şekil 2(C): Soleus kasının direkt sinir implantasyonu ile nörotizasyonu sonrası görünüm. (Ok implantasyon yapılan alanı göstermektedir)



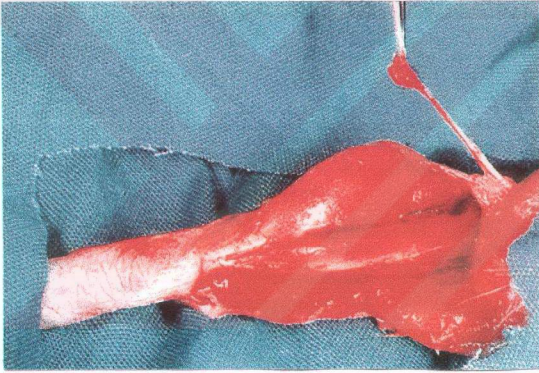
Şekil 3 (A): Fasiküler sinir implantasyonu yapılan Grup 2 ve Grup 5’de gerçekleştirilen cerrahi işlemler çizimde şematik olarak görülmektedir



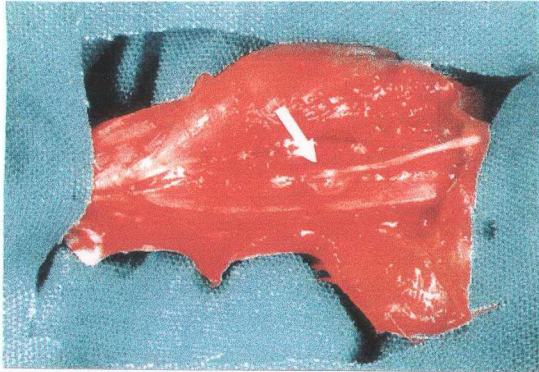
Şekil 3 (B): Ok 3 fasiküle ayrıldıktan sonra soleus kası yüzeyine yayılarak implante edilen Derin peroneal siniri göstermektedir.



Şekil 4: Sinir-kas pedikül implantasyonu yapılan Grup 3 ve Grup 6'da gerçekleştirilen cerrahi işlemler. (A): Çizimde şematik olarak gerçekleştirilen işlem görülmektedir.



Şekil 4(B): Derin peroneal sinir ucunda ekstansor digitorum kasına girdiği noktadan 3 x 3 mm boyutlarında kas parçası ile birlikte hazırlanmıştır.



Şekil 4(C): Sinir-kas pedikül implantasyonu sonrası görünüm. (Ok sinir kas pedikülünün soleus kasına implante edildiği noktayı göstermektedir)

Grup 4: Direkt sinir implantasyonu+ NGF uygulaması.

Grup 1 de olduğu şekilde derin peroneal sinir soleus kasına implante edildikten sonra. implantasyon bölgesine tüm soleus kasında endurasyon sağlayacak kadar 2µgr/ml NGF solusyonu 30 G hypodermic iğne ile enjekte edildi. Hayvanlar normal yaşam ortamlarına döndükten sonra haftalık olarak bu enjeksiyonlara ether ile sedasyon altında 4 hafta süreyle devam edildi.

Grup 5: Fasiküler sinir implantasyonu + NGF uygulaması.

Grup 2 ile aynı şekilde sinir fasiküllerinin kas yüzeyine yaygın şekilde implantasyonu yapıldı. İmplantasyon bölgesine tüm soleus kasında endurasyon yapacak miktarda 2µgr/ml NGF solüsyonu enjekte edildi. Enjeksiyonlara 4 hafta süreyle devam edildi.

Grup 6: Sinir-kas pedikül implantasyonu+ NGF uygulaması.

Grup 3 ile aynı şekilde derin peroneal sinir nöromusküler pedikül implantasyonu yapıldıktan sonra 2µgr/ml NGF solusyonu soleus kası içine enjekte edildi. 4 hafta süreyle haftada 1 kez olmak üzere enjeksiyonlara devam edildi.

Yukarıda belirtilen cerrahi işlemler ve NGF uygulanan ratlar normal yaşam şartlarında standart besinlere beslenerek 12 hafta süreyle gözlemleniler. Değerlendirme amacıyla 8,10,12. haftalarda elektromyografik inceleme, 12. haftada kas güçleri, kas ağırlıkları ve histopatolojik morfometrik incelemeler yapıldı.

Elektromyografik Değerlendirme

Elektromyografik değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Elektromyografi Laboratuvarında gerçekleştirildi. Tüm hayvanlar 8,10,12 haftalarda elektromyografik incelemeye alındılar. 8 ve 10. haftalarda yapılan incelemelerde kapalı olarak iğne elektrodlar kullanılarak 12. hafta da ise cerrahi olarak kas ve sinir ekspoze

edilip iğne elektrodlar kullanılarak açık yöntemle elektromyografiler elde edildi (Şekil 5) Öncelikle intramuskuler Ketamine ile sedasyon sağlanıp hayvanların incelemeye alınan ekstremitesi dışında kalan ekstremite ve gövdeleri sabitlendi. Spontan istemli kas potansiyellerinin gözlenebilmesi için deneylerde kullanılan hayvanların derin anestezi altında olmamalarına dikkat edildi. Her hayvan için 8, 10,12. haftalarda elde edilen veriler saklanarak nörotizasyonun zaman içindeki gelişiminin saptanmasına çalışıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar belirlendi.



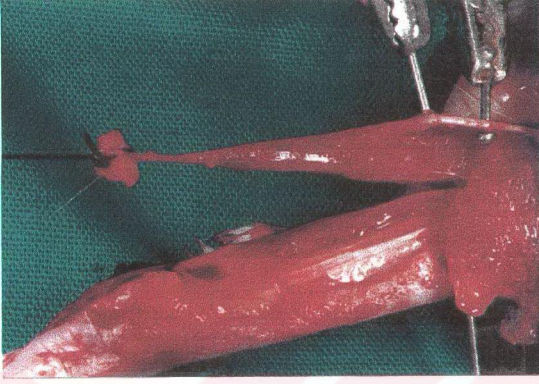
Şekil 5: 12 haftada deneysel işlemlerin yapıldığı sağ taraf soleus kası ve nörotizasyonda kullanılan sinir, tamamen ekspoze edilip iğne elektrod aracılığı ile elektromyografi alınırken görünümü.

Kas Gücü Ölçümleri:

İntramusküler Ketamine anestezisi altında sıçanlar prone pozisyonda plastik bir platforma tüm ekstremiteleri ve vücutlarından fikse edildiler. İncelemeye alınacak bacak kalça, diz ve bilekten rijit şekilde fikse edildi. Ratların bacak posteriorunda yapılan longitudinal insizyon ile Aşil tendonu ve Peroneal sinirleri bacak kasları ile birlikte ekspozite edildi. Gastroknemius ve soleus kasları nörotizasyon bölgesi ve sinire zarar verilmeden ayrıldı. Gastroknemius kası Aşil tendonuna insersiyon noktasından ayrılarak tamamen etkisiz hale getirildi. Soleus kası vasküler beslenmesi ve nörotize eden sinir yapıları korularak tamamen serbestleştirildi. Soleus tendonu Aşil tendonu ile birlikte insersiyonuna yakın bir seviyeden kesildi. Tendon ucu 3/0 ipek ile izometrik gerilim transduserine (USSC sutures) bağlandı. (Şekil 6, Şekil 7). Bu işlemler sırasında hayvanın vücut ısısı korundu ve kasların kuruması önleildi.



Şekil 6: Kas gücü ölçümlerinde kullanılan düzenek görülmektedir.



Şekil 7: Kas gücü ölçümleri sırasında Soleus kasının görünümü. Aşıl tendonu aracılığı ile optimal kontraktıl uzunlukta sabitlenen soleus kası nörotizasyon bölgesine zarar verilmeden elektrodlar aracılığı ile uyarılmıştır.

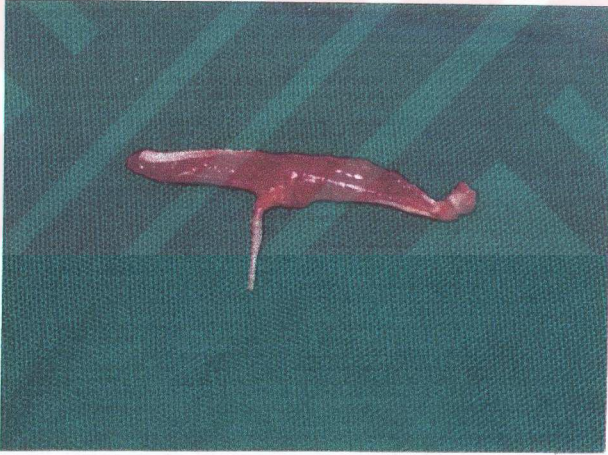
Peroneal sinirin stimülasyonu için periferik sinir stimulatörü kullanıldı (İnnervator NS252- Fischer&Paykel). Kasların en yüksek izometrik gücü ürettikleri optimal kontraktıl uzunlukları kasa uygulanan eşik üzeri uyarı ile belirlendi (70mA 0.2msec). Optimal kontraktıl uzunluklar belirlendikten sonra 10 dakika kasların istirahati için beklendi. Her kas için tek seyirme kasılması (Twitch contraction) sonucu üretilen güçleri saptandı. (20 mA .0.2msec). Daha sonra tetanik kontraktıl güç tekrarlayan elektrik stimülasyon ile belirlendi (20mA, 0.2msec 10.Hz),(Şekil 7) Elektrik stimülasyonlar arasında 4 dakika ara verildi.

Kontrol olarak her hayvanın herhangi bir girişim yapılmamış olan sol taraf soleus kasları da aynı şekilde incelemeye alındı

Kas Ağırlık Çalışması

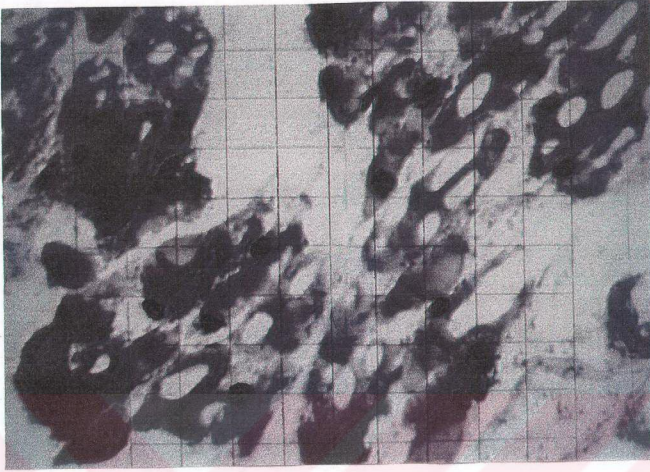
Makroskopik değerlendirmede kas ağırlıkları ele alındı. Tüm elektrofizyolojik incelemelerin tamamlanmasından sonra deneysel çalışmanın yapıldığı sağ taraf soleus kası orijininin Aşil tendonuna kadar tamamen eksize edildi ve gram olarak ağırlıkları Sartorius PT6 (Sartorius AG Göttingen) hassas terazi ile ölçüldü (Şekil 8). Kontrol grubu olarak her hayvanın sağlam sol taraf soleus kası da eksize edilip tartıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Farklı cerrahi nörotizasyon teknikleri uygulanan gruplar birbirleri ile ve NGF uygulanan gruplar, uygulanmayanlar ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İstatistik yöntem olarak t-testi kullanıldı.



Şekil 8: Tüm elektrofizyolojik ölçümler tamamlandıktan sonra tartı işlemi için eksize edilmiş soleus kası görülmektedir

Histopatolojik Morfometrik İnceleme.



Şekil 9: Histopatolojik morfometrik ölçümler sırasındaki görünüm. Birim alana düşen motor son plaklar ekran üzerine yerleştirilen grid aracılığı ile hesaplanmıştır.

Kas ağırlıkları hesaplandıktan sonra her gruptaki kasların yarısı yeni motor son plakların gösterilebilmesi için Karnosky-Roots Acetylcholinesterase boyası uygulanabilmesi için -18°C derecede donduruldu (86). Cryostat ile seri longitudinal 8- μm frozen section kesitler alındı. Asetilkolinesteraz boyası uygulandıktan sonra doku kesitleri ışık mikroskopunda incelenerek motor son plaklarının varlığı ve dağılımları incelendi. Reinnerve motor son plakları yerleri ve sayıları saptandı. Motor son plaklar ancak sonplağa giren akson tespit edilirse reinnerve olarak kabul edildi. Motor son plakların orijinal motor son plak bölgesinde mi yoksa ektopik mi oldukları da belirlendi. Morfometrik ölçüm için, 10X objektif altında elde edilen ışık mikroskopisi (Nikon) görüntüleri, CCD Kamera (Sony) ile monitöre aktarıldı. Monitor üzerine yerleştirilen bir grid yardımıyla morfometrik ölçüm yapıldı (Şekil 11). Bu ölçümde Weibel tarafından bildirilen formülden yararlanıldı (87). $\text{NMEP}=\text{N}.121/\text{Ik}$.

Burada NMEP birim kas dokusu alanına (mm²) düşen Motor son plak sayısını, N ölçüm alanındaki (grid içindeki) motor son plak sayısını, İk ise kas dokusu üzerine süperpoze olan grid noktalarını göstermektedir.

SONUCLAR

Elektromyografi

Tüm hayvanlara 8, 10 ve 12. haftalarda elektromyografi uygulandı. 8. haftada yapılan incelemelerde direkt sinir implantasyonu yapılan grup 1'de yaygın olarak denervasyon potansiyelleri, denervasyona bağlı fibrillasyonlar ve çok az sayıda geniş süreli, küçük boyutlu erken reinnervasyon motor ünite potansiyelleri (MÜP) tespit edildi. Fasiküler sinir implantasyonu yapılan grupta ise çok sayıda küçük boyutlu polifazik erken reinnervasyon MÜP'leri saptandı, denervasyon potansiyellerine daha az rastlandı. Sinir-kas pedikül implantasyonu grubunda ise az miktarda denervasyon potansiyellerine ek olarak reinnervasyonu gösteren küçük boyutlu polifazik motor ünite potansiyelleri de mevcuttu. Aynı yöntemlere ek olarak NGF uygulana gruplar içinde de en iyi elektromyografik bulgular fasiküler sinir implantasyonu grubunda bulundu. Direkt sinir implantasyonu ve NGF grubunda henüz denervasyon potansiyellerinin dominant olduğu ve fibrillasyonların devam ettiği gözlemlendi. Grup 6 da ise denervasyon potansiyelleri henüz devam etmekle birlikte Grup 3'e oranla daha fazla reinnervasyon bulguları saptandı.

10. haftada tekrar kapalı yöntemle iğne elektrodlar aracılığı ile yapılan değerlendirmelerde fasiküler sinir implantasyonu yapılan grupların, özellikle Grup 5'in denervasyon potansiyellerinin tamamen ortadan kalkmış olması nedeniyle diğerlerinden daha iyi elektromyografik sonuçlara sahip olduğu görüldü ancak motor ünite potansiyelleri

amplitüdleri normal yapısına ulaşmamıştı (Şekil 10). Sinir-kas pedikül implantasyonu yapılan Grup 3 ve özellikle NGF de uygulanan Grup 6 da denervasyon potansiyelleri büyük ölçüde azalmış olarak bulundu. Reinnervasyon bulgusu olan motor ünite potansiyellerinin amplitüderinde belirgin artış ve sürelerinde azalma saptandı

DOKUZ EYLÜL UNIVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
NOROLOJİ ANABİLİM DALI

20. 07 . 1998

SURNAME : fare10

First Name: fare

Dept: 88

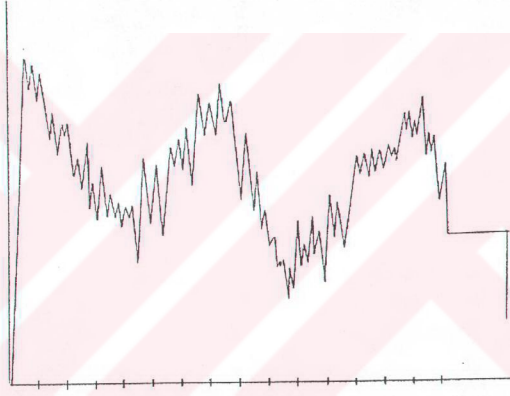
Remarks: 888

Date of Birth: 88

TOENHES

W. K. K. K.
Yazma İşleri
211 00000
00 000000
00 00000
00 00000
00 00000

A: 1 20.07.1998 12:47 A



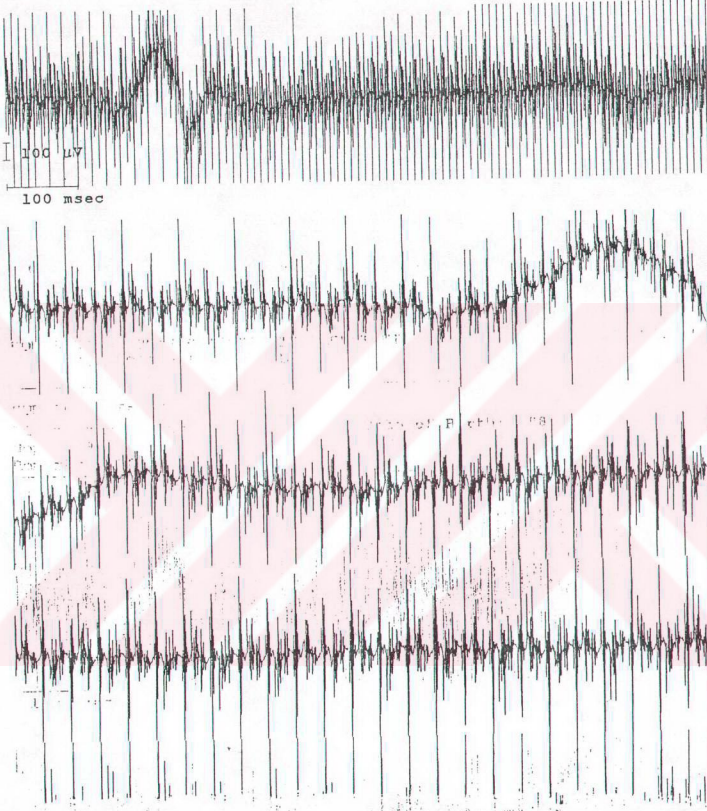
Şekil 10: 8. Haftada fasiküler sinir implantasyonu ve NGF uygulanan Grup 5'e ait bir soleus kasına ait Elektromyografi. Reinnervasyon bulgusu olan polifazik, küçük boyutlu motor ünite potansiyelleri görülmektedir

SURNAME: fare2
First Name: fare
Dept: 88
Remarks: 88

Date of Birth: 88

TOENNIES
M. K. K.
M. K. K.
M. K. K.
M. K. K.

A: 1 23.07.1998 13:24 A



Şekil 11: 12. haftada sinir-kas pedikül implantasyonu yapılan Grup 3'teki bir soleus kasına ait elektromyografik görünüm. Kasın tamamen reinnerve olduğu görülmektedir.

12. haftada diğer değerlendirmeler yapılmadan önce cerrahi olarak normal taraf kaslar ve deneysel işlemlerin uygulandığı taraf kaslar ekspoze edildi ve iğne elektrodlar aracılığı ile elektromyografiler elde edildi. Grup 1’de artık fibrillasyonlara ve positive keskin dalgalara rastlanmamakla birlikte motor ünite potansiyelleri amplitüpleri normalden daha küçük, ve süreleri de yer yer normalden uzun bulundu. Grup 2 reinnervasyon tamamlanmış olarak bulundu. Grup 3 denervasyon bulguları tamamen kaybolmuştu ancak yer yer küçük boyutlu polifazik motor ünite potansiyelleri mevcuttu. Grup 4 denervasyon bulguları gözlenmemesine rağmen motor ünite potansiyelleri kısmen normalden daha büyük ve uzun süreli bulundu. Grup 5 ve Grup 6’ da ise tamamen normal bir kasa ait elektromyografik görüntü elde edildi (Şekil 11).

Kas Ağırlıkları

Her grup için ortalama kas ağırlıklarının karşılaştırılmaları Tablo 1 de özetlenmiştir. Tüm gruplarda deneysel işlemlerin uygulandığı sağ taraf soleus kas ağırlıklarının kontrol için sağlam bırakılan sol taraf soleus kasına göre çeşitli oranlarla azalmış olduğu bulundu. Normal taraf ile yapılan karşılaştırmalarda tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı ağırlık kaybı olduğu belirlendi ($p<0.001$).

NGF uygulanmayan gruplarda ağırlık azalmasının daha belirgin olduğu görüldü. Direkt sinir implantasyonu yapılan Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 ‘e oranla anlamlı olarak daha az ortalama kas ağırlığına sahip olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). Fasiküler sinir implantasyonu yapılan Grup 2 ve kas-sinir pedikül implantasyonu yapılan Grup 3 arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.922$). NGF uygulanan gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında Grup 4 (direkt sinir implantasyonu+NGF) kas ağırlıklarının Grup 5 ve Grup 6’ya oranla daha az olduğu görüldü ($p<0.001$). Grup 5 ve grup 6 arasında normal kas dokusu ağırlıklarına oranla

kayıp yüzdeleri arasında sadece%2'lik fark olmasına rağmen yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda anlamlı fark olduğu belirlendi (p=0.035). Böylece grup 6 (kas sinir pedikül implantasyonu+ NGF) normal kas ağırlığının %92 oranında korunmuş olması sebebiyle en iyi grup olarak değerlendirildi.

Aynı cerrahi işlem uygulanmasına rağmen NGF uygulanan ve uygulanmayan gruplar da birbirleriyle karşılaştırıldı. Grup 1 ve Grup 4, Grup 2 ve Grup 5, Grup 3 ve Grup 6 birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve NGF uygulanan grupların aynı işlemler yapılmış olmasına rağmen ilk 3 gruba oranla anlamlı olarak daha iyi kas ağırlık korunumuna sahip olduğu belirlendi (her üç karşılaştırma için p<0.001)

Tablo 1: Soleus kas ağırlıklarının karşılaştırılması (mgr)

Sıçan	Grup 1		Grup 2		Grup 3		Grup 4		Grup 5		Grup 6	
	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney
1	298.6	226.5	288.7	237.2	309.7	261.8	294.6	253.4	305.2	267.2	291.8	273.3
2	287.5	230.1	294.9	243.9	279.8	239.0	286.5	249.8	300.2	276.1	308.1	278.4
3	279.9	215.6	300.6	243.8	280.5	239.0	289.9	252.1	288.3	263.1	287.7	272.2
4	300.2	221.6	306.8	251.9	296.0	248.9	293.2	248.3	294.8	267.1	283.4	270.3
5	303.7	227.8	302.3	254.0	267.9	231.6	301.7	248.1	286.3	260.3	300.4	274.2
6	290.4	212.6	278.3	236.4	299.1	250.1	289.4	243.1	290.2	265.1	290.8	268.5
Ortalama	293.4	222.4	295.3	243.1	288.9	242.1	292.6	249.1	294.2	266.4	295.4	272.4
SD	9.005	7.045	10.41	7.277	15.37	10.72	15.32	3.623	7.36	5.385	9.015	3.425
Fark	71		52.2		46.8		43.5		27.8		23.4	
%normal		%75		%82		%83		%85		%90		%92

(Kontrol: Sol taraf normal kası, Deney: deneysel grup sağ taraf, SD: Standart sapma)

Kas Gücü

Kas güçlerinin değerlendirilmesi için her kas için maksimal tetanik ve seyirme kasılması güçleri gram olarak tespit edildi. Kas gücü kas kitlesi tarafından belirlendiği için her hayvanda kontrol ve deneysel taraf kasların ürettikleri gücün kas kitlesine oranları bulundu. Böylece denervasyon nedeniyle kas içinde artan bağ dokusu ve azalan kontraktıl yapıların neden olabileceği değişiklikler de göz önüne alınmış oldu.

Seyirme kasılması güçleri karşılaştırıldığında direkt sinir implantasyonu yapılmış olan Grup 1'de normal tarafın ancak %56'sı kadar güç üretilebildiği bulundu. Fasiküler sinir implantasyonu yapılan Grup 2 normal tarafın %63'ü kadar güç üretimi ile Grup 1'den anlamlı olarak daha fazla güç üretimine sahip bulundu ($p=0.008$). Sinir-kas pedikül implantasyonu yapılan grup 3 NGF uygulanmayan gruplar arasında normal kasların %65'i kadar güç üretimi ile en iyi sonuçlara sahip olarak bulundu. Grup 2 ve Grup 3 arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p=0.783$). NGF uygulanan gruplar da kendi aralarında değerlendirildi ve Direkt sinir implantasyonu yapılan Grup 4, diğer gruplara oranla daha az güç üretimine sahip olduğu bulundu ($p<0.001$). Fasiküler sinir implantasyonu yapılan grup 5 ve sinir-kas pedikül implantasyonu yapılan grup 6 arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.104$). Tüm gruplar arasında en iyi sonuçlar normal kas gücünün %82 sine ulaşan grup 6 olarak belirlendi.

Cerrahi teknik olarak aynı işlem yapılan ancak NGF kullanımında fark olan gruplar birbirleriyle karşılaştırıldı. Grup 1 (direkt sinir implantasyonu) ve Grup 4 (direkt sinir implantasyonu+NGF) karşılaştırıldığında Grup 4 istatistiksel olarak daha iyi bulundu ($p<0.001$). Grup 2 (Fasiküler sinir implantasyonu) ve Grup 5 (Fasiküler sinir implantasyonu+ NGF) arasında da anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Grup 6 (Nöromuskuler pedikül+ NGF) Grup 3 'den (nöromuskuler pedikül) daha iyi bulundu ($p<0.001$). Maksimal seyirme (Twitch) gücü ölçümleri sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo2: Maksimal Seyirme kasılım gücü (gr/gr ıslak ağırlık)

Sıçan	Grup 1		Grup 2		Grup 3		Grup 4		Grup 5		Grup 6	
	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney
1	101	60	103	67	112	71	98	72	112	87	99	84
2	100	62	106	72	100	66	99	70	106	80	114	91
3	96	57	110	68	96	63	101	77	100	83	99	80
4	109	53	100	69	103	67	110	74	98	77	96	80
5	116	61	98	59	97	61	105	74	95	79	108	88
6	105	59	95	63	99	66	102	73	99	81	107	91
Ortalama	104.5	58.6	102	64.5	101.2	65.6	102.5	73.3	101.6	81.1	103.8	85.6
SD	7.176	3.266	5.477	4.633	5.845	3.445	4.416	2.388	6.218	3.488	6.911	5.086
Fark	45.9		37.5		35.6		29.2		20.5		18.2	
%normal		%56		63%		%65		71%		%80		%82

(Kontrol. Sol taraf normal kası, Deney: deneysel grup sağ taraf, SD: Standart sapma)

Aynı zamanda kasların maksimal tetanik kasılma güçleri ile ürettikleri en fazla güç ölçüldü. Maksimal tetanik güç ölçüm sonuçları Tablo 3 de özetlenmiştir. NGF kullanılmayan gruplar arasında en iyi sonuç normal kasın ortalama %64'ü oranında tetanik güç ile Grup 3'de bulundu. Fasiküler sinir implantasyonu yapılan Grup 2 ve Grup 3 (sinir-kas pedikül implantasyonu) arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.064$). Direkt sinir implantasyonu grubu diğerlerinden anlamlı olarak daha düşük sonuç verdi ($p<0.001$)

NGF uygulanan gruplar değerlendirildiğinde Grup 6 (sinir-kas pedikül implantasyonu +NGF) normal kasların %85'i oranında maksimal tetanik güç ile en iyi sonuçlara sahip bulundu, diğer gruplardan daha fazla tetanik güce ulaştığı ortaya kondu ($p<0.001$). Grup 4'ün

(direkt sinir implantasyonu+NGF) Grup 5 'ten (Fasiküler sinir implantasyonu+NGF) daha düşük tetanik güç ölçümleri verdiği bulundu ($p<0.001$). Grup 5 (Fasiküler sinir implantasyonu+NGF) normalin %82 'si ve Grup 6 (sinir-kas pedikül implantasyonu+NGF) normalin %85'i oranında maksimal tetanik güç ölçümleri verdi. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$)

Aynı cerrahi işlem yapılmasına rağmen NGF uygulaması farkı olan gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında NGF kullanılan Grup 4, Grup 5, Grup 6 nın ilk üç gruba oranla daha iyi sonuç verdiği belirlendi. (Her üç karşılaştırma için $p<0.001$)

Tablo 3: Maksimal tetanik kasılım gücü (gr/gr ıslak ağırlık)

Sıçan	Grup 1		Grup 2		Grup 3		Grup 4		Grup 5		Grup 6	
	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney	kontrol	deney
1	610	324	610	376	626	390	604	418	614	488	596	506
2	600	309	628	380	590	370	600	426	614	480	612	514
3	589	319	610	374	600	378	590	400	586	478	590	504
4	590	300	590	366	602	388	610	424	598	486	612	520
5	626	342	606	350	592	376	610	430	590	476	603	508
6	603	310	600	376	604	392	594	420	608	482	610	513
Ortalama	603	317.3	608	370.4	602.3	384	601.3	412	601.7	481.7	603.8	511
SD	13.79	14.69	12.62	10.98	12.86	8.89	8.26	10.53	12.16	4.63	9.21	5.94
Fark	285.7		237.6		218.3		189.3		120		92.8	
%normal		%53		%61		%64		%68.5		%82		%85

(Kontrol: Sol taraf normal kasi, Deney: deneysel grup sağ taraf, SD: Standart sapma)

Bütün gruplarda normal kasa oranla gram kas dokusunun ürettiği seyirme (Twitch) ve tetanik kas gücü ölçümlerinin sonuçları Tablo 4’de özetlenmiştir

Tablo 4. Deney gruplarının Normal kas gücüne oranla ürettikleri güç yüzdeleri

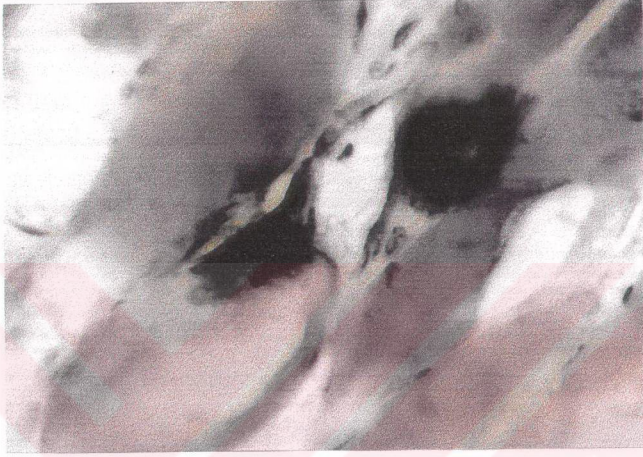
Grup	Seyirme(Twitch)	Tetanik
Grup1(Direkt sinir implantasyonu)	%56	%53
Grup2 (Fasiküler sinir implantasyonu)	%63	%61
Grup 3 (sinir-kas- pedikül implantasyonu)	%65	%64
Grup 4 (Direkt sinir implantasyonu +NGF)	%71	%68,5
Grup 5 (fasiküler sinir implantasyonu + NGF)	%80	%82
Grup 6 (sinir-kas pedikül implantasyonu + NGF)	%82	%85

Histopatolojik Morfometrik İnceleme

Asetilkolinesteraz boyası ile boyanan preparatların tümünde yeni motor son plaklarının oluşumu gözlemlendi (Şekil 12). Tüm nörotizasyonlar orijinal motor son plak bölgesinden farklı bir alana yapıldığından özellikle bu bölgede yoğun yeni motor son plak gelişimi tespit edildi. Yeni motor son plaklarının özellikle nörotizasyon bölgesi ve orijinal motor son plak bölgesi arasında geliştiği ve nörotizasyon bölgesi distalinde minimal yeni motor son plak gelişimi olduğu saptandı. Ayrıca orijinal motor son plak bölgesinde de innerve motor son plaklar olması eski motor son plakların reinnerve olması olarak yorumlandı.

Özellikle NGF kullanılan gruplarda motor son plak dağılımının nörotizasyon sahasında yoğun olmakla birlikte daha homojen olduğu gözlemlendi. Ayrıca fasiküler sinir implantasyonu yapılan grupta motor son plakların daha yaygın olarak kasa dağılımı olduğu

tespit edildi. Kas-sinir pedikülü tekniği ile nörotizasyon yapılan gruplarda sinirle beraber taşınan kas dokusunda da motor son plakların korunduğu ve soleus kasında da implantasyon bölgesinde yoğunlaşan motor son plak gelişimi saptandı.



Şekil 12: İnnerve motor son plaklar. Motor son plağa giren akson görölmektedir.
(Karnosky-Roots asetilkolinesteraz boyası)

Morfometrik inceleme ile yeni motor son plak bölgesinde birim alana düşen motor son plak sayıları saptandı. Rat soleus kasında normal motor son plaklar oldukça sınırlı bir bölgeye lokalize olduğu için yeni motor son plak bölgesindeki motor son plak yoğunluğu normal kaslardaki yoğunluk ile karşılaştırıldı. Normal değeri tüm gruplardaki kontrol grubunu oluşturan karşı taraf soleus kası motor son plak bölgesindeki birim alana düşen motor son plak sayısı ortalaması bulunarak saptandı. Histolojik morfolometrik ölçümlere ait sonuçlar Tablo 5’de özetlenmiştir. Direkt sinir implantasyonu ve fasiküler sinir implantasyonu yapılan grupların normal motor son plak yoğunluklarına yakın sonuçlar verdiği görüldü, istatistiksel

olarak fark bulunmadı. Sinir kas pedikül implantasyonu ile normalden daha yoğun motor son plak gelişimi olduğu bulundu.

NGF uygulaması ile NGF uygulanmayan gruplara oranla daha fazla motor son plak geliştiği saptandı. Direkt sinir implantasyonu ve fasiküler sinir implantasyonu gruplarında normalden daha yoğun olmakla birlikte özellikle fasiküler sinir implantasyonu ile normale yakın bir motor son plak dağılımının elde edildiği belirlendi. Sinir kas pedikül implantasyonu yapılan grupta hem sinir ucunda taşınan hem de denerve kasta yeni gelişen motor son plakların NGF etkisi ile yüksek sayılara ulaştığı tespit edildi.

Tablo 5. Motor son plak yoğunluklarının karşılaştırılması (motor son plak sayısı/mm²)

Grup	Motor son plak yoğunluğu
Normal	10.08
Grup1 (Direkt sinir implantasyonu)	9.28
Grup2 (Fasiküler sinir implantasyonu)	8.90
Grup 3 (Sinir-kas pedikül implantasyonu)	14.44
Grup 4 (Direkt sinir implantasyonu +NGF)	11.73
Grup 5 (Fasiküler sinir implantasyonu + NGF)	11.39
Grup 6 (Sinir-kas pedikül implantasyonu + NGF)	16.23

TARTIŞMA

Travma, cerrahi, tümörler, kompresyon , enflamatuar durumlar ya da enfeksiyonlar sonucunda hasar gören periferik sinir yapılarının onarımında anatomik, histolojik, patolojik olayların anlaşılması ve rekonstrüktif cerrahi yöntemlerinin gelişmesi ile periferik sinir lezyonlarının ve bunlara bağlı defektlerin onarımında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Mikrocerrahi yöntemleri ile primer sinir onarımı ve sinir greftleri ya da diğer konduitler ile sinir defektlerinin onarımında başarılı sonuçlar alınmaktadır. Ancak özellikle bazı travmatik durumlarda sinir innerve ettiği kastan avülsiyon şeklinde kopabilir, sinir çeşitli seviyelerden multifokal zarar görmüş olabilir, sinir brakial pleksus yaralanmalarında olduğu gibi daha yukarı seviyelerden hasar görmüş olabilir, geç sinir eksplorasyonlarında distal uç wallerian dejenerasyon sonucunda tamamen kaybedilmiş olabilir ya da santral sinir sistemi lezyonları denervasyona yol açabilir. Tüm bu durumlarda denerve kalan kaslar nedeniyle fonksiyonel ve estetik olarak oldukça kısıtlayıcı durumlar ortaya çıkabilir.

Santral ya da periferik sinir lezyonları sonucu denerve kalan motor ya da duyuşal olarak önemli bir bölgenin reinnervasyonu için nörotizasyon yani sağlıklı bir sinirin transferi gerekebilir. Proksimal motor uyarı kaybı olduğunda hedef iskelet kasının reinnervasyonu için başka bir periferik sinir kullanılabilir. Bu amaçla daha az değeri olan fonksiyonel bir periferik sinir kullanılır. Kullanılacak sinirin yeterli sayıda ve benzer özelliklerde sinir liflerine sahip olması ve ayrılacağı vücut bölgesinde eksiklik yaratmaması gerekir. Sağlıklı donör sinir kesildikten sonra proksimal ucu hasar gören sinirin postlezyonel distal ucuna, eğer uygun distal uç yoksa direkt olarak denerve kasa ya da duyu kaybı olan deriye bağlanır. Donör sinir ve alıcı arasında bağlantı direkt sinir koaptasyonu veya implantasyon ile kurulur, gerekirse sinir greftleri de kullanılabilir (13).

Özellikle ekstremitelerde sinirin avulsiyon ile hedef iskelet kasından koptuğu durumlarda nöromusküler nörotizasyon tek tedavi alternatifi olabilir. Üst ekstremitte travmaları sonucu brakial pleksus kök avülsiyonları, kord kopmalarına ek olarak periferik motor sinirlerin kasa giriş noktalarından kopmaları ile onarım için uygun distal uç bulunmayabilir. Motor sinir ucunun hedef kasta avülsiyonuna ek olarak ana sinir kökü boyunca çevre dokulardan ayrılıp retrakte olur. Bu gibi durumlarda motor sinir ucu kasa direkt olarak ya da sinir greftleri aracılığı ile implante edilebilir (10,13,17,19-21).

Baş boyun bölgesinde fasiyal ve laringeal reinnervasyon için de nörotizasyon kullanılmıştır. Fasiyal sinir paralizilerinde hipoglossal, spinal aksesuar, trigeminal sinir transferlerine ek olarak karşı taraf sağlam fasiyal sinir uçlarına bağlanan sinir greftleri ile motor input paralize taraf fasiyal sinire taşınmıştır. Ancak sinir transferleri yani nöronöral nörotizasyon ile sinkinezi ve kitlesel hareketlerin oluşması sonuçları olumsuz etkilemiştir. Paralize larinksin reinnervasyonu için rekürrent laringeal sinirin direkt koaptasyonu ya da sinir transferleri önerilmiştir ancak onarılan sinirde abdükör ve addükör liflerin uygunsuz birleşmesi ile öngörülen vokal kord hareketleri elde edilememiştir. Ancak çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilen direkt sinir implantasyonu ve sinir-kas pedikülü implantasyonu yöntemleri ile larinksin nörotize edip fonksiyonel sonuçlar elde etmişlerdir (37-39,41-43,50,52,54).

Gerek üst ekstremitte gerek baş boyun bölgesinde motor sinir lezyonlarında nöromusküler nörotizasyon kavramı rekonstrüktif tekniklerin yukarıda belirtilen zor durumlarda başarısız kalması nedeniyle uygun şartlarda önemli bir alternatif olmaktadır. Heineke, Erlacher, Elsberg ve Steindlerin öncü çalışmaları ile denerve iskelet kaslarının sinir implantasyonu ile reinnervasyonunun mümkün olduğu ortaya çıkmıştır. Daha sonraları diğer çalışmalarda da yabancı bir sinirin denerve bir kasa implantasyonu ile reinnervasyonun sağlanabileceği, yeni nöromusküler bileşkelerin kurulabileceği gösterilmiştir. İlk deneysel ve

linik olgularda sinir kas gövdesine direkt olarak implante edilmekteydi. Ancak daha sonraları innerve bir kasın denerve komşu kasın reinnervasyonunda rol aldığı muskulomuskuler nörotizasyon kavramından da faydalanmak amacıyla sinir-kas pedikülü implantasyonu yöntemi geliştirilmiştir. Tucker, Crumley gibi araştırmacılar larinksin reinnervasyonunda bu yöntemi denemişler ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Bazı deneysel çalışmalarda sinir-kas pedikülü tekniğinin direkt sinir implantasyonundan daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır(38,45,46,51-53). Bunun nedeni olarak çıplak., kesik akson uçları yerine motor son plakların sinirin ucunda yer alması ve böylece daha hızlı ve etkin bir nörotizasyon olduğu gösterilmiştir. Fakat bu iki yöntem arasında fark olmadığını göstermiş araştırmalar da mevcuttur.(44)

Bu iki yönteme ek olarak bu çalışmada implante edilecek sinirin fasiküllerine ayrılarak kas yüzeyinde daha geniş bir alana yayılmasını ve bu şekilde daha hızlı ve etkin nörotizasyon sağlanıp sağlanamayacağı da incelenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında bu yöntemin daha önce deneysel ve klinik modellerde kullanılmadığı görüldü. Tek bir alandan kasa yayılan aksonların yeni dallar vermeleri ve yeni nöromuskuler bileşkelerin gelişmesinde buna bağlı olarak oluşabilecek gecikmenin bu şekilde azaltılabilmesi bu şekilde mümkün olabilir. Ayrıca tek bir noktadan kası reinnerve eden sinir liflerinin motor ünitelerin gelişmesi için yeterli olsalar da topografik olarak motor ünite organizasyonlarının düzensiz olması ve bunun yeniden düzenlenmesi için gerekli zamanın fonksiyonel sonuçları olumsuz etkilemektedir. Bu yüzden eğer kasın daha yaygın olarak bir kaç noktadan birden reinnerve edilmesi ile daha erken ve etkin bir nörotizasyon gerçekleştirilebileceği ve denervasyon hasarlarının engellenebilir. Fasiküler sinir implantasyonun alternatif bir yöntem olarak daha organize ve hızlı bir nörotizasyon sağlayabileceği düşünüldü. Bu amaçla derin peroneal sinir intranöral disseksiyonla fasiküllerine ayrıldı. Hayvanların büyük çoğunluğunda Derin peroneal sinirin 3 fasiküle ayrıldığı görüldü. Fasiküller yaklaşık 5 mm kadar disseke edilerek

kas yüzeyine farklı noktalara mümkün olduğu kadar birbirlerinden uzak noktalara suture edildiler.

Çalışmamız sonucunda gerek kas ağırlıkları gerekse kas gücü yönünden en iyi sonuçları nöromusküler pedikül gruplarında saptanmıştır. Fasiküler sinir implantasyonu grupları elektromyografik olarak erken dönemde reinnervasyon potansiyellerinin gelişmesi , kas ağırlıkları ve kas gücü ölçümlerinde direkt sinir implantasyon gruplarına üstünlük sağlamıştır. NGF uygulanan gruplarda fasiküler sinir implantasyonu ve kas sinir pedikül implantasyonu arasında bir fark saptanmadı. Bu bulgular ile daha önceki araştırmalarla kısmen benzer sonuçlar elde edilmiş oldu Direkt sinir implantasyonu ile yeterli reinnervasyonun sağlandığı yönünde çalışmalar olsa da, literatürde sinir-kas pedikül implantasyonunun daha üstün olduğu öne sürülmüştür (44-46, 51-54). Çalışmamızda yer alan fasiküler sinir implantasyonu ise sinir-kas pedikülüne yakın sonuçlar vermiştir ve aralarında istatistiksel bir fark bulunmaması , travmatik durumlarda avulse olan sinirin bu şekilde kas yüzeyine yayılarak implantasyonu ile elektif olarak normal bir sinirin kas sinir pedikülü yöntemi ile implantasyonundan elde edilebilecek başarıya ulaşılabileceğini göstermiştir.

Primer sinir onarımı için ideal şartlar olsa bile hiçbir zaman yaralanma öncesindeki durum %100 olarak sağlanamamaktadır. Gerek koaptasyon sahasından distale ulaşan motor liflerin sayısındaki azalma, gerek fasiküler düzeyde organizasyonun tam olarak sağlanamaması ve reinnervasyona kadar geçen sürede hedef kaslarda engellenemeyen olumsuz değişiklikler fonksiyonel olarak tam iyileşmeyi engeller. Bu güne kadar primer sinir onarımları üzerine yapılmış olan sayısız klinik ve deneysel çalışmada iyileşmeyi arttırmak ve fonksiyonel sonucu iyileştirmek için çok sayıda yöntem denenmiş olsa da ulaşılan değerler bizim çalışmamızda nörotizasyon ile ulaştığımız sonuçlardan farklı değildir. Reinnerve kasları değerlendiren elektrofizyolojik ve kas gücü gibi fonksiyonel parametreler göz önüne alındığında primer sinir onarımları ile de en fazla %80 düzeyinde iyileşmeden öteye

gidilememiştir. Zaman zaman klinik olarak primer sinir onarımları için şartlar zorlanmakta, çok sayıda ve uzun sinir greftleri kullanılmakta, sinirler gerginliği azaltmak için mobilize edilmekte bunların sonucu olarak da zaten sınırlı olan iyileşme potansiyeli daha kısıtlanmaktadır (5,10) . Bu nedenle çalışmamızda yer alan nörotizasyon metodlarının primer sinir onarımları, sinir greftlerinin kullanımı gibi yöntemlerle karşılaştırıldığı ileri araştırmalar planlamaktayız. Böylece nörotizasyonun klinik değeri tam olarak belirlenebilir ve daha etkin fonksiyonel onarım sağlamak için daha yaygın olarak kullanım alanı bulabilir.

Periferik sinir yaralanması ve onarımından sonra oluşan anatomik ve patolojik değişikliklerin tam olarak anlaşılması, mikrocerrahi teknikleri sonuçları olumlu etkilemiştir ancak özellikle son zamanlarda araştırmacıların ilgisi cerrahi onarım teknolojisi kadar rejenerere olan aksonda oluşan hücresel ve moleküler düzeydeki olayların anlaşılmasına kaymıştır. Her ne kadar çok uzun süredir sinir hücresi etrafında oluşan biyolojik faktörlerin sinir gelişim, büyüme, yaşama ve rejenerasyonuna etkileri üzerinde durulsa da 1951 yılında Levi-Montalcini ve Hamburger tarafından Nerve Growth Factor'ün bulunması sinir rejenerasyonu çalışmalarında gerçek ilerlemelere neden olmuştur(6). Ayrıca hücre kültür yöntemlerinin geliştirilmesi sinir rejenerasyonunda etkili olabilecek pek çok ajanın in vitro olarak saptanıp denenmesine olanak sağlamıştır böylece embryonik sinir gelişiminden sinir hücresinin travmaya yanıtına kadar pek çok sorun araştırılmıştır. Sinir hücresi üzerinde etki gösteren Nerve Growth Factor dışında pekçok peptid tanımlanıp NGF ile bir sınıflanıp neurotrofinler grubunu oluşturmuşlardır. Bu faktörlerin çoğu ve reseptörleri Schwann hücrelerinde, lumbar spinal kord nöronlarında, dorsal kök ganglionlarında ve hedef kaslarda artış gösterir. Schwann hücrelerinde ya da hedef kaslarda üretilen bazı faktörlerin retrograd olarak dorsal kök ganglionlarına ve spinal kord motor nöronlarına taşınıp duyuşal ve motor rejenerasyona destek oldukları öne sürülmüştür. Bazı faktörler de lokal olarak etki gösterip Schwann hücresi proliferasyonu etkilemekte ve rejenerere olan aksonun myelinizasyonunu

sağlamaktadır. Bu faktörlerin yaralanmaya cevapları çok karışık olmasına rağmen bir yada daha fazlasının lokal veya yaygın olarak hedeflenmesi ile sinir rejenerasyonuna olumlu etki sağlanabilir.

NGF bazı periferik nöronların sinir sistemi gelişimi sırasında büyüme ve hedef organa (kas gibi) bağlanmasını sağlar. Yaralanma sonrasında Schwann hücreleri ve muhtemelen fibroblastlar tarafından sentezlenip salınır ve sinir uçları tarafından içeri alınıp sinir terminaline retrograd olarak taşınır. Duyu ve sempatetik nöronların NGF esas hedefi olduğu düşünülmektedir ancak motor nöronlarında hedeflendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.(66,69,71,72,74,75)

NGF kullanılarak yapılan periferik sinir iyileşmesi çalışmaları duyu, motor ve otonomik sinir rejenerasyonuna olumlu ve hızlandırıcı etkilerini göstermiştir (65,66,69,72,73,76-78). NGF'e ek olarak birçok araştırmacı pek çok farklı büyüme faktörleri ve diğer ajanların sinir iyileşmesine etkilerini araştırmışlardır IGF(İnsulin like growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), Neurotrophin 3, Ciliary Neurotrophic Factor, Leukemia İnhibitory Factor Gibi pekçok madde gerek santral sinir sisteminde gerek periferik sinir iyileşmesi modellerinde kullanılmış ve çeşitli etkileri ortaya konmuştur (80-85,88,91). Ancak NGF tüm bu çalışmalar içinde en fazla yer alan faktör olmuştur. NGF çeşitli sinir hücresi gruplarınınin rejenerasyonları üzerine etkilidir. NGF yokluğunda hücrelerde birtakım chromatolitik reaksiyonlar ve bunun sonucunda sinir hücresi ölümü gelişir (90). Perez-Polo NGF'nin oksidan-antioksidan dengesi üzerine etkilerinin akson tomurcuklanması, büyümesi ve sinaps oluşumu üzerine hem büyüme ve gelişmenin tüm evrelerinde hem de bir yaralanma sonrasında ve hatta yaşlanma sürecinde rol aldığını öne sürmüştür. Exojen NGF'nin periferik sinir sisteminde, sempatetik ve dorsal kök hücrelerinde yaşamı ve yaralanma sonrasında büyüme kabiliyetini desteklediği saptanmıştır.(90). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda Santral sinir sistemi lezyonları çevresinde NGF sentezlendiği saptanmıştır.(90). Yani santral

sinir sistemi de rejenerasyon için NGF'ye ihtiyaç duyar. İn-vivo Spinal kord yaralanması deneysel modelinde NGF axonal büyüme ve sinir hücresi yaşamını arttırıcı etkileri bulunmuştur. Santral sinir sisteminde NGF Spinal kord duyu liflerinin rejenerasyonun, spinal kord rejenerasyon potansiyelinin artmasına ve spinal korda yerleştirilen greftlerin rejenerasyonuna olumlu etkileri bulunmuştur (92.). Retinal ganglion hücrelerinin axotomi sonrası hayatiyetlerinin sürdürmeli üzerine olumlu etkileri olduğu da bulunmuştur.

NGF'nin periferik sinir iyileşmesi üzerine farklı deneysel modellerle çok sayıda araştırma yapılmıştır ve zaman zaman çelişkili sonuçlar ortaya konmuştur. Eppley Mandibular sinir rejenerasyonu modelinde NGF ile başarılı sonuçlar elde etmiştir (69) .Rich siyatik sinirin silikon odacık içinde iki sinir ucu arasında boşluk oluşturduğu modelinde eksojen NGF etkilerini araştırmış ve NGF ile hem myelinli akson sayısında ve myelin kalınlığında hem de sinirin internal organizasyonunda daha iyi sonuçlar elde etmiştir.(65) Fasiyal sinir kesisi modelinde NGF ile daha fazla sayıda rejenere olan axon sayılarına ulaşmışlardır aynı araştırma da doğal şartlarda NGF etkisinin sinir kesisinden 4 gün sonra ortaya çıktığı ancak eksojen olarak ortama eklenen NGF ile 4-6 saat sonra sinir hücresinde daha güçlü etki sağlandığı öne sürülmüştür.(66) Spector da NGF fasiyal sinir rejenerasyonunun erken dönemlerinde (5 hafta) daha matür nöral organizasyon, daha fazla proliferatif vaskularizasyon ve artmış sayıda myelinli aksonlarla olumlu etkilerini göstermiştir (72) Hollowell ise sıçan siyatik siniri ile yaptığı çalışma da NGF ile faydalı bir etki elde etmemiştir(67).

NGF dışında diğer nörotropik faktörler de benzer çalışmalarda kullanılmıştır ve özellikle Cilary Neurotrophic Factor ile NGF'den daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir(81) . Ancak Cilary Neurotrophic Faktör ün motor sinir hücresi kültürlerinde hayatiyeti arttırmasına rağmen rat iskelet kasında ve diğer hedef dokularda bulunmaması nedeniyle bir nörotropik faktör olarak etkileri tartışmalı bulunmuştur.

Bu çalışmada ise NGF periferik sinir rejenerasyonun esas hedefi olan iskelet kasının nörotizasyonu üzerine etki yapabilecek etkenlerden biri olarak değerlendirilmiştir. Normalde Schwann hücreleri, iskelet kas hücreleri ve fibroblastlar gibi pekçok kaynaktan sentezlendiği bilinen NGF'nin lokal olarak nörotize edilen kas ve sinire uygulanması ile elde edilecek etki araştırılmıştır. NGF ortama salındıktan sonra sinir boyunca retrograd olarak dorsal kök ganglionlarına ve spinal kord motor nöronlarına taşınıp duyuşal ve motor rejenerasyona destek olur. Ancak nörotrofik faktörlerin nörotizasyona etkileri daha önce araştırılmamış olduğundan bu çalışmada sinir iyileşmesi için temel nörotrofik faktör olan NGF'nin denerve kasların nörotizasyonu için denenmesi planlandı. Ayrıca NGF'nin myojenik süreçte aktif bir rol aldığı da son zamanlarda yapılan araştırmalar ile ortaya çıkmıştır (93). Hücre kültürlerinde ve in vivo modellerde kas hücresi gelişimi ve rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile motor sinir lifleri üzerine spesifik etkisi olan bazı faktörler de bulunmuştur. Brain Derived Neurotrophic factor , Ciliary Nerve Growth Factor, Neurotrophin3, Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) gibi bazı faktörler yapılan çalışmalarda NGF ye oranla motor sinir hücresine daha etkili bulunmuştur. Ancak bu faktörlerin nörotizasyon modelinde değerlendirilmesi öncelikle NGF'nin etkilerinin tespit edilmesinden sonraki bir aşama olarak ilerki çalışmalarımızın hedefi olarak belirlenmiştir

Daha önce periferik sinir kesileri, spinal kord yaralanmaları, santral sinir sistemi üzerine NGF etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda NGF'nin lokal olarak uygulanabilmesi için çeşitli tubularizasyon yöntemleri, kapalı sinir iyileşme ortamları ve infüzyon pompaları kullanılmıştır (69,78,79,94). Ancak bu çalışmada olduğu gibi çok özel yapısı bulunan kas sinir bileşkesi bu yöntemlerin uygulanması için uygun değildir. Sinir uçlarının kas ile direkt temas halinde olması çevre ortamda bulunan NGF ile etkileşmesini mümkün kılmamaktadır. Bu sorunun sinir uçlarının direkt temas halinde bulunduğu kas içine NGF uygulanması ile

aşılacağı düşünöldü. Daha önce yapılan çalışmalarda Basic Fibroblast Growth Factor gibi büyüme faktörlerinin lokal olarak intramusköler uygulanmış olması bu şekilde uygulama ile NGF etkilerini ortaya çıkarılabileceği düşünöldü (95). Sinir implantasyonu yapıldıktan sonra kas içine 4 hafta boyunca düzenli aralıklarla NGF enjeksiyonları yapıldı. NGF konsantrasyonu daha önce periferik sinir iyileşmesi modellerinde kullanılan dozlara uygun olarak ayarlandı. NGF'nin periferik sinir iyileşmesi üzerine etkilerinin özellikle yaralanmadan sonraki erken dönemde 3-5 haftalar arasında olduğu bulunmuştur, bu nedenle nörotizasyon sonrasında 4 hafta süreyle NGF kullanılmıştır. Ayrıca santral sinir sisteminde uzun süreli yüksek doz NGF kullanılması sonucu beklenilenin tersine faydalı bir etki oluşmadığı bulunmuştur (79)

Periferik sinir lezyonlarının değeriendirilmesi için en değeri araçlar elektrofizyolojik değerişikliklerin izlenmesini sağlayan yöntemlerdir. Elektromyografi kaslarda oluşun aksiyon potansiyellerinin kaydedilmesi ile zaman içinde kas ve sinirlerde oluşun değerişikliklerin takibinde çok değerilidir. Özellikle ratlarda deneysel modellerin küçük boyutlu olması nedeniyle iğne ve açık elektromyografi yöntemleriyle daha doğru sonuçlar alınabileceği önerilmiştir(96,97) Bu yüzden. Nörotizasyon sonrasında iyileşmenin değeriendirilebilmesi için bu çalışmada da elektromyografi kullanılmıştır. Erken dönemde yapılan incelemelerde iğne elektromyografisi ve son değeriendirmede de açık yöntemle iğne elektrod elektromyografisi uygulanmıştır. Periferik sinir lezyonun gelişiminden sonraki 1-4 haftalardan sonra denervasyon nedeniyle gelişen fibrilasyon potansiyelleri tespit edilir. Reinnervasyon ise fibrilasyon potansiyellerinin azalması ve motor ünite potansiyellerinin tespit edilmesi ile olur. Reinnervasyon ilerledikçe motor ünite potansiyelleri amplitüdü artar ve süreleri kısılır. Erken reinnervasyon sırasında motor ünite potansiyelleri motor ünitelerin normalden daha büyük olması nedeniyle daha yüksek amplitüdü olabilir ve zamanla hem amplitüdü hem de süre normal düzeyine ulaşır. Yapmış olduğumuz çalışmada

elektromyografik değerlendirmeler sonucunda NGF uygulana gruplar aynı cerrahi işlemin yapıldığı gruplarla karşılaştırıldığında özellikle erken dönemde denervasyon potansiyellerinin daha azalmış olması, rejenerasyon potansiyellerinin gelişimi ile daha hızlı bir iyileşmenin gerçekleşmekte olduğunu göstermiştir. Özellikle 12. Haftada yapılan değerlendirmelerde ise elektromyografik olarak NGF uygulanmış gruplarda normal kas elektromyografik bulguları ile uyumlu görüntüler elde edilmiştir. Bu bulgular ile NGF uygulamasının direkt nöromuskuler nörotizasyon üzerine de olumlu etiler yaptığını göstermektedir.

Farklı cerrahi teknikler elektromyografik olarak karşılaştırdığımızda direkt sinir implantasyonu grubunda denervasyon potansiyellerinin diğer gruplardan daha geç dönemde kaybolduğu ve reinnervasyon potansiyellerinin gelişip normal motor ünite potansiyellerinin gelişmesinin yavaş olduğu bulundu. Fasiküler sinir implantasyonu yapılan grupta denervasyon potansiyelleri diğer gruplardan daha önce kayboldu . Bu sinirin kas yüzeyinde daha geniş alana yayılmış olmasına bağlı olarak denerve alanlara daha çabuk ulaşması nedeniyle olabilir. Sinir-kas pedikül implantasyonu yapılan grupta da denervasyon potansiyellerinin nispeten daha geç dönemde kaybolduğu görüldü. Ancak geç dönemde oluşan potansiyellerin daha olgun ve düzenli olması daha iyi bir reinnervasyonun gerçekleşmiş olduğunu göstermekteydi.

Kasların fonksiyonel iyileşmesinin değerlendirilmesi için kontraktıl güç ölçümleri yaptık. Maksimal seyirme kasılması gücü ve maksimal tetanik güç kas kontraktilitesinin değerlendirilmesi için kullanılan parametrelerdir (97) Bir kasın eşik potansiyel değerinden biraz büyük bir elektriksel uyarının etkisi ile kasın kasılma biçiminde verdiği cevaba seyirme denir. Eğer kas kasılma sırasında ikinci bir uyarın etkisi altında kalırsa gerilmede artma gözlenebilir ve genlik bir tek kasılmanın iki katından büyük olabilir bu etkiye kasılmanın üst üste binmesi denir. Periyodik uyarınların uygulanması ile kasın gerilimi en üst düzeye ulaşır ve kas gevşeyemez böylece maksimal tetanik güç elde edilir. Motor denervasyondan sonra

iskelet kasında bazı yapısal değişiklikler olmaktadır. Makroskopik olarak kas çapında ve kas lifi hacminde belirgin kayıp olur. Hücresel düzeyde kontraktil proteinlerde kayıp ve isoformlarında değişiklik görülür. Zamanla kas kitlesinin büyük kısmını yağ ve bağ dokusu kaplar. Bu nedenle bu çalışmada öncelikle kas güçleri tespit edildikten sonra kaslar eksize edilip ıslak kas ağırlıkları da belirlenip birim kas dokusunun ürettiği gücün bulunması için kas gücünün kas ağırlığına oranları hesaplanmıştır ve bundan sonra gruplar birbirleriyle ve normal kas ile karşılaştırılmıştır. 12 hafta sonunda tüm gruplarda kas gücünde normal taraflara oranla azalmalar olduğu saptanmıştır.(Tablo 4) Farklı cerrahi işlemlerle nörotizasyon gerçekleştirilen gruplarda kas güçleri karşılaştırıldığında en yüksek değerlere sinir-kas pedikül implantasyon tekniğinin kullanıldığı grupta olduğu ortaya konmuştur Özellikle sinir-kas pedikül implantasyonuna ek olarak NGF de verilen kasların normal kas gücüne %85 oranında yaklaşmış olması bu iki yöntemin birlikte kullanılması ile nörotizasyonda oldukça başarılı sonuçlar alınabileceğini göstermektedir. Daha önce denenmemiş bir başka yöntem olan fasiküler sinir implantasyonu da kas sinir implantasyonundan daha düşük sonuçlar vermiş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Direkt sinir implantasyonu ise daha önceki çalışmalarda ulaşılan sonuçlardan farklı bir sonuç vermemiştir.

Bu çalışmada ayrıca morfometrik olarak motor son plaklarının dağılımları incelenmiştir. Normal sıçan soleus kasında motor son plaklar sinirin kasa girdiği noktada ve çevresinde lokalize olarak yer almaktadır. Uyguladığımız cerrahi modelde sinir implantasyonları normal motor son plak bölgesinden daha distalde farklı bir noktaya yapılmıştır böylece yeni gelişen motor son plakların gelişimi gösterilmeye çalışılmıştır. Sonuçta tüm gruplarda yeni gelişen motor son plakların yeni implantasyon sahası ve daha proksimalde yer alan orijinal motor son plak bölgesi arasında yayıldığı gözlemlendi. Gruplar arasındaki farkları belirlemek amacıyla bu bölgelerdeki birim kas dokusuna (mm²) düşen motor son plak yoğunluklarının hesaplanması planlandı. Yapılan değerlendirmeler sonucunda

sinir-kas pedikülü ile sinir implantasyon yapılan gruplarda normal kas dokusuna ve diğer gruplara göre daha yoğun, lokalize bir motor son plak dağılımı olduğu saptandı. Fasiküler sinir implantasyonu yapılan gruplarda sonuçlar normale daha yakın bulundu. Direkt sinir implantasyonu gruplarında da değerler istatistiksel olarak normalden farklı değildi. Dikkat çekici bir diğer bulgu da NGF kullanılan grupların değerlerinin aynı cerrahi işlem yapılan gruplara oranla belirgin sayıda daha fazla motor son plak tespit edilmiş olmasıdır. Motor son plakların kantitatif olarak değerlendirildiği bir çalışmada implantasyon yapılan kas bölgesine göre yeni ektopik motor son plaklar gelişimi ve orijinal motor son plakların yeniden reinnervasyonunun farklılık göstermesine rağmen total motor son plak sayısının bundan etkilenmediği bulunmuştur(31). Bizim çalışmamızda da benzer olarak yeni implantasyon bölgesinde yeni motor son plakların oluştuğu ve eski motor son plak bölgesindeki motor son plakların reinnervasyonunun gerçekleştiği gözlemlendi

Çalışmamızın sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde sinir onarımı için uygun şartların olmadığı durumlarda nöromusküler nörotizasyon yöntemleri ile denerve kasların reinnervasyonunun etkin bir şekilde sağlanabileceği görülmektedir. Her ne kadar bu güne kadar kullanılmakta olan direkt sinir implantasyonu ile reinnervasyon sağlansa da sinir-kas pedikül implantasyonu ve fasiküler sinir implantasyonunun belirgin ölçüde daha etkin nörotizasyon yöntemleri oldukları kanıtlanmıştır. Daha önce denenmemiş bir yöntem olan fasiküler sinir implantasyonu ise sinir-kas pedikül implantasyonu ile benzer sonuçlar vererek direkt sinir implantasyonu yönteminin geliştirilmiş bir türü olarak pek çok klinik durumda kullanılabilir bir nörotizasyon yöntemi olarak öne sürülmüştür. Elektif şartlarda fonksiyonel bir sinir kullanılarak nörotizasyon planlandığında sinir-kas pedikülü kullanılması için uygun sinir ve kas yapıları bulunabilir. Ancak travmatik olarak avulse olmuş bir sinir direkt olarak denerve hedef iskelet kasına implante edilmek zorundadır. Bu durumda proksimal sinir

ucunun fasiküllerine ayrılarak kas yüzeyine yayılarak implantasyonu ile daha etkin bir nörotizasyon sağlanabileceği yapmış olduğumuz deneysel çalışma ile kanıtlanmıştır. Deneysel ve klinik olarak fasiküler sinir implantasyonuna yönelik araştırmaların literatürde yer almaması nedeniyle özellikle klinik şartlarda yapılacak çalışmalar ile bizim bu çalışmada ulaştığımız sonuçların desteklenmesi nörotizasyon konusunda daha iyi sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır. Özellikle primer sinir onarımları ile karşılaştırmaların yapılacağı ve sinir greftleri ile birlikte bu yöntemin denenmesi yönündeki ileriki çalışmalarımız ile nörotizasyonun daha yaygın ve etkin kullanımı sağlanabilecektir.

Nörotizasyon sadece çeşitli nedenlerle oluşan sinir defektlerinde değil aynı zamanda serbest fonksiyonel kas transferlerinde de kullanılabilir. Donor kaslarda fonksiyonel defekt yaratmadan motor sinire dokunulmadan sadece segmental olarak kas transfer edilip alıcı sahadaki bir motor sinir ile nörotize edilerek fonksiyonel hale getirilebilir. Bu yöntem de henüz deneysel ve klinik olarak kullanılmamıştır ve bu yönde yapacağımız ileriki çalışmalar ile rekonstrüktif cerrahi için faydalı bir alternatif sağlanabileceği inancındayız. Örneğin fasial sinir paralizlerinde uzun süreli ve çok aşamalı bir yöntem olan karşı yüz sinir greftlemesi ve sonrasında serbest kas transferleri, nakledilen kasın ilk aşamada nörotizasyonu ile hızlı bir fasial reanimasyon elde edilmesi sayesinde daha etkin bir yöntem haline getirilebilir. Günümüzde gelişmekte olan doku mühendisliği teknolojisi ile pek yakında insan kas dokusu da üretilecektir. Bu şekilde üretilen kasların fonksiyonel hale gelebilmesi ancak nörotizasyon yolu ile gerçekleşebilir.

Yapmış olduğumuz deneysel model ve ölçüm metodları ile nörotizasyon ile sağlanan motor reinnervasyon değerlendirilmiştir. Fakat kontrollü kas fonksiyonu için gerekli olan refleks mekanizmaları sağlayan kas liflerindeki gama efektör sinir lifi fonksiyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Kontrollü ve ince kas fonksiyonları ancak normal feedback mekanizmalarına sahip kaslarla gerçekleştirilebilir.

Nörotizasyon tekniklerinin ya da nörotrofik maddelerin bu mekanizmaların gelişimi üzerine etkileri de henüz belirlenmemiştir.

Temel nörotrofik faktör olan NGF periferik sinir iyileşmesi üzerinde bilinen etkilerine ek olarak nörotizasyon için de ilk olarak denenmiş ve tüm cerrahi yöntemlerle birlikte reinnervasyon için tüm parametrelerde belirgin iyileşme göstermiştir. Klinik şartlarda gelişen gen terapisi yöntemleri ile sinir rejenerasyonunun desteklenmesi sinir onarımlarında yeni bir döneme girilmesine neden olacaktır. Çeşitli dokulara spesifik büyüme faktörlerinin insanlarda da kullanıma girmesi ile yara iyileşmesinin farklı aşamalarının hızlandırılması ve hastalık süreçlerinin değiştirilmesi mümkün olacaktır. Bazı büyüme faktörlerinin kas hastalıkları için lokal ve sistemik uygulanması için araştırmalar devam etmektedir. İnsan rekombinant Nerve Growth Factor'ü üretilmiştir ve bunun insanlarda da periferik sinir onarımları ve nörotizasyonda kullanılması günümüzde elde edilen sonuçları çok daha ileriye taşıyabilir.

Denervasyon sonrası oluşan ağır fonksiyonel ve estetik sorunlar gelişen cerrahi yöntemler ve nörotrofik faktörlerin yerinde kullanımı ile yakın gelecekte aşılabacaktır. Sinir onarımları, nörotizasyon ve farklı nörotropik faktörler ile deneysel ve klinik araştırmalarımız bu çalışmadan elde ettiğimiz olumlu sonuçların yardımı ile devam edecektir.

ÖZET

Travma, cerrahi, tümörler, kompresyon , enflamatuar durumlar ya da enfeksiyonlar sonucunda hasar gören periferik sinir yapılarının onarımında anatomik, histolojik, patolojik olayların anlaşılması ve rekonstrüktif cerrahi yöntemlerinin gelişmesi ile periferik sinir lezyonlarının ve bunlara bağlı defektlerin onarımında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak özellikle bazı travmatik durumlarda sinir innerve ettiği kastan avülsiyon şeklinde kopabilir, sinir çeşitli seviyelerden multifokal zarar görmüş olabilir, sinir brakial pleksus yaralanmalarında olduğu gibi daha yukarı seviyelerden hasar görmüş olabilir, geç sinir eksplorasyonlarında distal uç wallerian dejenerasyon sonucunda tamamen kaybedilmiş olabilir ya da santral sinir sistemi lezyonları denervasyona yol açabilir ve bu gibi durumlarda primer sinir onarımı mümkün olamaz. Bu gibi durumlardaki tedavi alternatifi olan nörotizasyon santral veya periferik sinir lezyonları sonucunda denerve olan motor veya duysal bir bölgenin reinnervasyonu daha az klinik değeri bulunan fonksiyonel bir sinirin hasarlanan sinir yerine kullanılmasıdır. Denerve kasların nörotizasyonu için kullanılmakta olan başlıca nörotizasyon metodları direkt sinir implantasyonu ve sinir-kas pedikül implantasyonudur. Sinirlerin fasiküler yapılarını göz önüne alarak ana sinirin fasiküllerine ayrılarak kas yüzeyine yayılması ile daha etkin bir nörotizasyon sağlanabileceğini düşünülerek daha önce denenmemiş bir yöntem olan fasiküler sinir implantasyonu metodunu bu yöntemlere ek olarak geliştirdik.

Nerve Growth Factor sinir iyileşmesini arttıran temel faktörlerden biridir. Sinir hücrelerinin hayatiyetini artırır, aksonal büyümeyi hızlandırır, iyileşen sinirlerde aksonal yapıyı ve organizasyonu destekler ayrıca iskelet kası üzerine myojenik etkileri vardır. Periferik sinir iyileşmesi üzerine etkileri daha önce yapılan çeşitli deneysel çalışmalarla araştırılmış olsa da nörotizasyona olan etkilerinin literatürde yer almadığı görüldü. Bu

özellikleri göz önüne alınarak NGF'nin nörotizasyon etkileri oluşturduğumuz deneysel modelde farklı nörotizasyon teknikleri ile birlikte araştırıldı.

Rat soleus kası ve derin peroneal sinir kullanılan deneysel modelde direkt sinir implantasyonu, fasiküler sinir implantasyonu ve sinir-kas pedikül implantasyonu yöntemlerinin kullanıldığı ve aynı cerrahi yöntemlere ek olarak NGF uygulanan 6 grup oluşturuldu. Nörotizasyonun değerlendirilmesi için elektromyografi, tetanik ve seyirme kas gücü ölçümleri, kas ağırlıklar ve histopatolojik morfometrik ölçümler yapıldı.

Tüm gruplarda normal kas ile karşılaştırıldığında çeşitli ölçülerde reinnervasyonun sağlanmış olduğu tespit edildi. Elektromyografik olarak fasiküler sinir implantasyonu grubunun daha erken dönemde daha yaygın reinnerve olduğu saptandı. Sinir-kas pedikülü implantasyonunun da etkin bir şekilde reinnervasyon sağladığı tespit edildi. Direkt sinir implantasyonu ile geç dönemde etkin bir reinnervasyon sağlansa da denervasyon bulgularının uzun sürmesi fonksiyonel sonuçları etkilemekteydi Aynı cerrahi işlemlerin uygulanıp ek olarak NGF enjeksiyonları yapılan grupların elektromyografik bulguları aynı dönemlerdeki diğer gruplara göre daha iyi bulundu.

Kas gücü değerlendirmesinde sinir kas pedikülü grubu seyirme ve tetanik kasılma gücü ölçümlerinde normal kasın %65 ve %64'ü ile en iyi sonuçları verdi. Fasiküler sinir implantasyonu istatistiksel olarak sinir kas pedikülü ile farklı sonuç vermedi. Direkt sinir implantasyonu her iki gruptan daha az güç üretmekteydi . NGF verilen gruplar aynı cerrahi işlem yapılan diğer gruplara oranla anlamlı şekilde daha fazla güç ürettiği saptandı. En yüksek değer % 82 seyirme gücü ve %85 tetanik güç üretimi ile sinir-kas pedikül implantasyon grubunda bulundu.

Kas ağırlıklarının ölçümleri ile ortalama olarak direkt sinir implantasyonu ile %75, fasiküler sinir implantasyonu ile %82 ve sinir kas pedikül implantasyonu ile %83 kas ağırlıklarının korunmuş olduğu saptandı. Aynı cerrahi işlemlere ek olarak NGF uyguladığımız

gruplar ise anlamlı olarak daha iyi kas kitlesi korunduğu bulunmuştur. Fasiküler sinir implantasyonu ve sinir-kas pedikülü implantasyonu arasında anlamlı bir fark bulunmazken bu iki grupta direkt sinir implantasyonundan daha üstün bulundu.

Histopatolojik olarak asetilkolinesteraz boyası ile yeni motor son plak gelişimi tespit edildi. Morphometrik inceleme sonucunda direkt sinir implantasyonu ve fasiküler sinir implantasyonu ile normal motor son plak bölgesindeki motor son plak yoğunluğuna yakın sonuçlar elde edilirken sinir kas pedikülü ile daha yoğun bir motor son plak gelişimi olduğu saptandı. NGF uygulanan grupların hepsinde daha yoğun motor son plak gelişimi olduğu bulundu.

Sonuçlar göz önüne alındığında çeşitli cerrahi yöntemlerle nörotizasyon ile denerve kasların reinnervasyonunun sağlanabildiği görüldü. Daha önce denenmemiş bir yöntem olan fasiküler sinir implantasyonu ise direkt sinir implantasyonundan daha başarılı sonuçlar veren sinir-kas pedikül implantasyonu metoduna yakın sonuçlar vermesi nedeniyle önemli bir alternatif olarak belirlendi. NGF'nin uygulandığı grupların aynı cerrahi işlemlerin yapıldığı gruplara göre daha iyi sonuçlar vermiş olması nörotizasyon için de etkin bir madde olduğunu kanıtlamıştır .

REFERANSLAR

1. Terzis JK, Smith KL Repair and grafting of the peripheral nerve. In McCarthy JG(Ed) Plastic Surgery, WB Saunders, Philadelphia, 1990.Ch 19:630-97
2. Thomas PK, Ochoa J, Berthold CH, Carlsted T, Corneliuson O. Microscopic anatomy of the peripheral nerveous system. In Dyck PJ, Thomas PK (Eds) Peripheral Neuropathy, WB Saunders, Philadelphia 1993; Ch (2)2: 28-92
3. Griffin JG, Hoffman. Degeneration and regeneration in the peripheral nerveous system In Dyck PJ, Thomas PK (Eds) Peripheral Neuropathy, WB Saunders, Philadelphia 1993; Ch(4)22: 361-76
4. Dellon AL Wound healing in nerve Clin Plast Surg 1990 17:3,545-70
5. Wong BJ, Crumley RL Nerve wound healing. An overview.Otolaryngol Clin North Am 1995 Oct;28(5):881-895
6. Carroll WR Nerve grafting and neuromuscular transfers .Otolaryngol Clin North Am 1994 27: 125-38
7. Seckel BR Enhancement of peripheral nerve regeneration. Muscle Nerve 1990 Sep;13(9):785-800
8. Shenaq SM, Rabinovsky ED Gene therapy for plastic and reconstructive surgery Clin Plast Surg 1996 Jan;23(1):157-171
9. Bunge RP The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration.J Neurol 1994 Dec;242(1 Suppl 1):S19-S21
10. Wyrick JD, Stern PJ Secondary nerve reconstruction Hand Clin 1992 Aug;8(3):587-98
11. Stewens WG, HallJD,Young VL,Weeks PM. When should nerve grafts be grafted? An experimental study in rats. Plast Reconstr Surg 1985 75(5): 707-11

12. Lolley RD, Bose WJ, Bastian F, Bassam B, Meyer FN, Anderson LD. Vein ,silastic, polyglycolic acid fine mesh: a comparative study in peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg* 1995;35:266-71
13. Narakas AO Neurotization or nerve transfer in traumatic brachial plexus lesions In Tubiana R (Ed), *The Hand*, WB Saunders Philadelphia, 1988 Vol 3;Ch62:656-83
14. Allieu Y, Cenac P Consideration of surgical intervention for total paralysis secondary to multiple avulsion injuries lesions In Tubiana R (Ed), *The Hand*, WB Saunders Philadelphia, 1993 Vol 4;Ch 42:638-45
15. Miller TA, Korn HN, Wheeler ES, Eldrige Can one muscle reinnervate another? A preliminary study of muscular neurotization in the rabbit *Plast Reconstr Surg* 1978 Jan;61(1):50-7 L
16. Must R Experimental investigation of muscular neurotization in the rat. *Muscle Nerve* 1987 Jul-Aug;10(6):530-6
17. Klueber KM Role of muscle neurotization in the reinnervation of murine muscle grafts *Anat Rec* 1987 Dec; 219(4):370-3, 429-33
18. Rubin LR, McCoy W Neural neurotization *Ann Plast Surg* 1978 Nov;1(6):562-7
19. Brunelli G, Brunelli LM Direct neurotization of severely damaged denervated muscles *Int Surg* 1980 Nov-Dec;65(6):529-31
20. Brunelli G, Monini I, Brunelli F. La neurositacion musculaire directe. *Ann Chir Main* 1990;9: 290-5
21. Brunelli GA, Brunelli GR Direct muscle neurotization. *J Reconstr Microsurg* 1993 Mar;9(2):81-90; discussion 89-90
22. Frey M, Gruber H, Holle J, Freilinger G An experimental comparison of the different kinds of muscle reinnervation: nerve suture, nerve implantation, and muscular neurotization *Plast Reconstr Surg* 1982 Apr;69(4):656-69

23. Cheng N, Li X, Huang A Experimental comparison of muscle contractility after three methods of reinnervation *Ann Plast Surg* 1994 Aug;33(2):166-90; discussion 169-70
24. Zhang F, Lineaweaver WC, Ustuner T, Kao SD, Tonken HP, Campagna-Pinto D, Buncke HJ Comparison of muscle mass preservation in denervated muscle and transplanted muscle flaps after motor and sensory reinnervation and neurotization *Plast Reconstr Surg* 1997 Mar;99(3):803-14
25. Kuffler DP, Thompson W, Jansen JK The fate of foreign endplates in cross-innervated rat soleus muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1980 Jun 24;208(1171):189-222
26. Ip MC, Vrbova G Reinnervation of the soleus muscle by its own or by an alien nerve *Neuroscience* 1983 Dec;10(4):1463-9
27. Brunetti O, Carretta M, Magni F, Pazzaglia U Role of the interval between axotomy and nerve suture on the success of muscle reinnervation: an experimental study in the rabbit *Exp Neurol* 1985 Nov;90(2):308-21
28. Brunetti O, Carobi C, Pazzaglia U Influence of atrophy on the efficiency of muscle reinnervation *Exp Neurol* 1987 May;96(2):248-52
29. McNamara MJ, Garrett WE Jr, Seaber AV, Goldner JL Neuroorrhaphy, nerve grafting, and neurotization: a functional comparison of nerve reconstruction techniques *J Hand Surg [Am]* 1987 May;12(3):354-60
30. Hennig R Late reinnervation of the rat soleus muscle is differentially suppressed by chronic stimulation and by ectopic innervation *Acta Physiol Scand* 1987 May;130(1):153-60
31. Kuiken TA, Childress DS, Rymer WZ The hyper-reinnervation of rat skeletal muscle *Brain Res* 1995 Apr 3;676(1):113-23
32. Choi SJ, Harii K, Asato H, Ueda K Aging effects in skeletal muscle recovery after reinnervation *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996 Jun;30(2):89-98

33. Payne SH Jr, Brushart TM Neurotization of the rat soleus muscle: a quantitative analysis of reinnervation. *J Hand Surg [Am]* 1997 Jul;22(4):640-3
34. Gray WP, Keohane C, Kirwan WO Motor nerve transplantation. *J Neurosurg* 1997 Oct;87(4):615-24
35. Billington L Reinnervation and regeneration of denervated rat soleus muscles *Muscle Nerve* 1997 Jun;20(6):744-6
36. Mackinnon SE, McLean JA, Hunter GA Direct muscle neurotization recovers gastrocnemius muscle function *J Reconstr Microsurg* 1993 Mar;9(2):77-80
37. Tucker HM Reinnervation of the unilaterally paralyzed larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1977 Nov-Dec;86(6 Pt 1):789-94
38. Tucker HM Human laryngeal reinnervation: long-term experience with the nerve-muscle pedicle technique *Laryngoscope* 1978 Apr;88(4):598-604.
39. Tucker HM Reinnervation of the paralyzed larynx: a review. *Head Neck Surg* 1979 Jan-Feb;1(3):235-42
40. Tucker HM Restoration of selective facial nerve function by the nerve-muscle pedicle technique. *Clin Plast Surg* 1979 Jul;6(3):293-300
41. Tucker HM, Rusnov M Laryngeal reinnervation for unilateral vocal cord paralysis: long-term results. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1981 Sep-Oct;90(5 Pt 1):457-9
42. Tucker HM Nerve-muscle pedicle reinnervation of the larynx: avoiding pitfalls and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1982 Jul-Aug;91(4 Pt 1):440-4
43. Crumley RL Experiments in laryngeal reinnervation *Laryngoscope* 1982;92(suppl):1-29
44. Meikle D, Trachy RE, Cummings CW Reinnervation of skeletal muscle: a comparison of nerve implantation with neuromuscular pedicle transfer in an animal model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987 Mar-Apr;96(2 Pt 1):152-7

45. Hall SJ, Trachy RE, Cummings CW. Facial muscle reinnervation: A comparison of neuromuscular pedicle with direct nerve implant. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988;97:229-33
46. Broniatowski M, Ilyes LA, Sorensen K, Rosenthal DI, Nose Y, Maniglia AJ Direct nerve implantation vs. nerve-muscle pedicle: a comparative study of reinnervation in the rabbit. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1989 Feb;100(2):126-33
47. Broniatowski M, Lavertu P, Tucker HM The deep temporal nerve-orbicularis oculi muscle pedicle as a possible means for reanimation of the upper face. *Ear Nose Throat J* 1990 Mar;69(3):140-4
48. Broniatowski M, Grundfest-Broniatowski S, Davies CR, Jacobs GB, Tucker HM, Nose Y Dynamic rehabilitation of the paralyzed face: III: Balanced coupling of oral and ocular musculature from the intact side in the canine *Otolaryngol Head Neck Surg* 1991 Nov;105(5):727-33
49. Broniatowski M, Ilyes LA, Jacobs GB, Rosenthal DI, Maniglia AJ, Tucker HM, Nose Y Dynamic rehabilitation of the paralyzed face: I. Electronic control of reinnervated muscles from intact facial musculature in the rabbit. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1987 Nov;97(5):441-5
50. May M, Beery Q Muscle-nerve pedicle laryngeal reinnervation. *Laryngoscope* 1986 Nov;96(11):1196-200
51. Goding GS Jr, Cummings CW, Bright DA Extension of neuromuscular pedicles and direct nerve implants in the rabbit. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989 Feb;115(2):217-23
52. Goding GS Jr Nerve-muscle pedicle reinnervation of the paralyzed vocal cord. *Otolaryngol Clin North Am* 1991 Oct;24(5):1239-52

53. Anonsen CK, Patterson HC, Trachy RE, Gordon AM, Cummings CW Reinnervation of skeletal muscle with a neuromuscular pedicle. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985 Feb;93(1):48-57
54. Fata JJ, Malmgren LT, Gacek RR, Dum R, Woo P Histochemical study of posterior cricoarytenoid muscle reinnervation by a nerve-muscle pedicle in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987 Sep-Oct;96(5):479-87
55. Hockman CH, Gossman MD, Liddell NE, Renehan WE Restoration of orbicularis oculi function by contralateral orbicularis oculi innervated muscle flap vs neuromuscular pedicle technique. *Exp Neurol* 1992 Sep;117(3):307-12
56. Zienowicz RJ, Thomas BA, Kurtz WH, Orgel MG A multivariate approach to the treatment of peripheral nerve transection injury: the role of electromagnetic field therapy. *Plast Reconstr Surg* 1991 Jan;87(1):122-129
57. Tong JX, Rich KM Diphenylpiperazines enhance regeneration after facial nerve injury. *J Neurocytol* 1997 May;26(5):339-347
58. Khouri RK, Chiu DT, Feinberg J, Tark KC, Harper A, Spielholz Effects of neurite-promoting factors on rat sciatic nerve regeneration. *Microsurgery* 1989;10(3):206-209
59. Walter MA Facial nerve regeneration, growth factors, and return of the mimetic, symmetrical smile. *Facial Plast Surg* 1993 Jan;9(1):68-73
60. Lundborg G, Dahlin L, Danielsen N, Zhao Q Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1994 Sep;10(5):345-354
61. Olson L, Ayer-LeLievre C, Ebendal T, Eriksson-Nilsson M, Ernfors P, Henschen A, Hoffer B, Giacobini M, Mouton P, Palmer M, et al Grafts, growth factors and grafts that make growth factors. *Prog Brain Res* 1990;82:55-66
62. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Hansson HA, Johannesson A, Longo FM, Varon Nerve regeneration across an extended gap: a neurobiological view of nerve repair and the

- possible involvement of neuronotrophic factors J Hand Surg [Am] 1982 Nov;7(6):580-587
63. Oudega M, Hagg T Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 1996 Aug;140(2):218-229
 64. Rich KM, Disch SP, Eichler ME The influence of regeneration and nerve growth factor on the neuronal cell body reaction to injury. *J Neurocytol* 1989 Oct;18(5):569-576
 65. Rich KM, Alexander TD, Pryor JC, Hollowell JP Nerve growth factor enhances regeneration through silicone chambers. *Exp Neurol* 1989 Aug;105(2):162-170
 66. Chen YS, Wang-Bennett LT, Coker NJ Facial nerve regeneration in the silicone chamber: the influence of nerve growth factor. *Exp Neurol* 1989 Jan;103(1):52-60
 67. Hollowell JP, Villadiego A, Rich KM Sciatic nerve regeneration across gaps within silicone chambers: long-term effects of NGF and consideration of axonal branching. *Exp Neurol* 1990 Oct;110(1):45-51
 68. Ehrlich D, Keyser K, Manthorpe M, Varon S, Karten HJ Differential effects of axotomy on substance P-containing and nicotinic acetylcholine receptor-containing retinal ganglion cells: time course of degeneration and effects of nerve growth factor. *Neuroscience* 1990;36(3):699-723
 69. Eppley BL, Snyders RV, Winkelmann TM, Roufa DG Efficacy of nerve growth factor in regeneration of the mandibular nerve: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1991 Jan;49(1):61-68
 70. Burgers JK, Nelson RJ, Quinlan DM, Walsh PC Nerve growth factor, nerve grafts and amniotic membrane grafts restore erectile function in rats. *J Urol* 1991 Aug;146(2):463-468
 71. He C, Chen Z, Chen Z Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery* 1992;13(3):151-154

72. Spector JG, Lee P, Derby A, Friedrich GE, Neises G, Roufa DG Rabbit facial nerve regeneration in NGF-containing silastic tubes. *Laryngoscope* 1993 May;103(5):548-558
73. Mulholland MW, Romanchuk G, Lally K, Simeone DM Nerve growth factor promotes neurite outgrowth in guinea pig myenteric plexus ganglia. *Am J Physiol* 1994 Oct;267(4 Pt 1):G716-G722
74. Date I, Furukawa S, Ohmoto T Increased nerve growth factor level in the distal stump of transected sciatic nerve in relation to aging and its application for neural grafting. *Exp Neurol* 1994 Nov;130(1):168-171
75. Vejsada R, Sagot Y, Kato AC Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. *Eur J Neurosci* 1995 Jan 1;7(1):108-115
76. Spector JG, Lee P, Derby A, Roufa DG Comparison of rabbit facial nerve regeneration in nerve growth factor-containing silicone tubes to that in autologous neural grafts *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995 Nov;104(11):875-885
77. Doubleday B, Robinson PP The effect of NGF depletion on the neurotropic influence exerted by the distal stump following nerve transection *J Anat* 1995 Jun;186(Pt 3):593-605
78. Danielsen N, Varon S Characterization of neurotrophic activity in the silicone-chamber model for nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1995 May;11(3):231-235
79. Gold BG Axonal regeneration of sensory nerves is delayed by continuous intrathecal infusion of nerve growth factor. *Neuroscience* 1997 Feb;76(4):1153-1158
80. Sahenk Z, Seharaseyon J, Mendell JR CNTF potentiates peripheral nerve regeneration. *Brain Res* 1994 Aug 29;655(1-2):246-250

81. Newman JP, Verity AN, Hawatmeh S, Fee WE Jr, Terris DJ Ciliary neurotrophic factors enhances peripheral nerve regeneration. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996 Apr;122(4):399-403
82. Lewin SL, Utley DS, Cheng ET, Verity AN, Terris DJ Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. Laryngoscope 1997 Jul;107(7):992-999
83. Utley DS, Lewin SL, Cheng ET, Verity AN, Sierra D, Terris DJ Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996 Apr;122(4):407-413
84. Shirley DM, Williams SA, Santos PM Brain-derived neurotrophic factor and peripheral nerve regeneration: a functional evaluation. Laryngoscope 1996 May;106(5 Pt 1):629-632
85. Oakley RA, Lefcort FB, Clary DO, Reichardt LF, Prevet D, Oppenheim RW, Frank E Neurotrophin-3 promotes the differentiation of muscle spindle afferents in the absence of peripheral targets J Neurosci 1997 Jun 1;17(11):4262-4274
86. Bancroft JD, Stewens A (Eds) Theory and practice of histological techniques Churchill livingstone, Edinburgh,London,Melbourne,New York 1990;3rd Ed.:108-9
87. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and the other organs. Lab Invest 1963;12:131-55
88. Welch JA, Kraus KH, Wells MR, Blunt DG, Weremowitz J. Effect of combined administration of insulin like growth factor and platelet derived growth factor on the regeneration of transected and anastomosed sciatic nerve in rats Am J Vet Res 1997; 58:1033-37

89. Shiotani A, O'Malley BW Jr, Coleman ME, Alila HW, Flint PW Reinnervation of motor endplates and increased muscle fiber size after human insulin-like growth factor I gene transfer into the paralyzed larynx *Hum Gene Ther* 1998 Sep 20;9(14):2039-47
90. Hiraizumi Y, Fujimaki E, Transfeldt EE, Kawahara N, Fiegel VD, Knighton D, Sung JH The effect of the platelet derived wound healing formula and the nerve growth factor on the experimentally injured spinal cord *Spinal Cord* 1996 Jul;34(7):394-402
91. Finkelstein DI, Bartlett PF, Horne MK, Cheema SS Leukemia inhibitory factor is a myotrophic and neurotrophic agent that enhances the reinnervation of muscle in the rat. *J Neurosci Res* 1996 Oct 1;46(1):122-8
92. Oudega M, Hagg T Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord *Exp Neurol* 1996; 140:218-229
93. Seidl K, Erck C, Buchberger A Evidence for the participation of nerve growth factor and its low-affinity receptor (p75NTR) in the regulation of the myogenic program. *J Cell Physiol* 1998 Jul;176(1):10-21
94. Santos FX, Bilbao G, Rodrigo J, Fernandez J, Martinez D, Mayoral E, Rodriguez Experimental model for local administration of nerve growth factor in microsurgical nerve reconnections *Microsurgery* 1995;16(2):71-76
95. Lefaucheur JP, Sebille A What is the future for intramuscular administration of basic fibroblast growth factor in muscular diseases? *Muscle Nerve* 1994 Mar;17(3):276-84
96. Zeng I, Worsieg A, Albrecht G, Grisold W, Hopf R, Redl H, Schlag G A noninvasive functional evaluation following peripheral nerve repair with electromyography in a rat model *Plast Reconstr Surg* 1994;94:146-51
97. Kanaya F, Tirrell JC, Briedanbach WC Sciatic functional index, Nerve conduction tests, muscle contraction, axon morphometry as indicators of regeneration *Plast Reconstr Surg* 1996; 98:1264-71