

**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Nedim SAVACI**

**PERİFERİK SİNİR KESİSİNDE FARKLI ONARIM
ZAMANLARINDA MELATONİNİN SİNİR İYİLEŞMESİNE
OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Mustafa SÜTÇÜ

UZMANLIK TEZİ

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Mustafa KESKİN**

KONYA – 2010

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Periferik Sinir Embriyolojisi.....	4
2.2. Periferik Sinir Anatomisi.....	5
2.2.1. Hücre Gövdesi (Soma, Perikaryon).....	6
2.2.2. Dendrit.....	7
2.2.3. Akson.....	7
2.3. Aksonal İletim.....	8
2.4. Schwann Hücresi ve Miyelin Kılıf.....	10
2.5. Perinörium.....	12
2.6. Endonörium.....	13
2.7. Epinörium.....	14
2.8. Sinirin Vasküler Yapısı.....	15
2.8.1. Ekstresek Vasküler Sistem.....	16
2.8.2. İntresek Vasküler Sistem.....	16
2.9. Sinirin Lenfatikleri.....	18
2.10. Sinirin İnervasyonu.....	18
2.11. Periferik Sinir Yaralanmaları.....	18
2.11.1. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması.....	20
2.11.1.1. Seddon Sınıflaması.....	21
2.11.1.2. Sunderland Sınıflaması.....	22
2.12. Sinir Dejenerasyonu.....	24
2.12.1. Proksimal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler.....	25
2.12.2. Distal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler.....	27
2.13. Sinir Rejenerasyonu.....	28
2.13.1. Proksimal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler.....	30
2.13.2. Distal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler.....	32
2.14. Sinir Rejenerasyonunu Etkileyen Faktörler.....	34
2.15. Periferik Sinir Onarımı.....	36
2.15.1. Tarihçe.....	36
2.15.2. Koaptasyon Teknikleri.....	39
2.15.2.1. Uç-uca onarım.....	40
2.15.2.2. Uç Yan Onarım.....	42
2.15.2.3. Sinir grefti ile onarım.....	42
2.15.2.4. Alternatif Koaptasyon Teknikleri.....	43
2.15.3. Sinir Onarım Zamanı.....	44
2.16. Rat Siyatik Siniri.....	45
2.17. Melatonin.....	45
2.17.1. Melatoninin etki mekanizması.....	47
2.17.2. Periferik Sinir Kesisine Melatoninin Etkisi.....	51
2.18. Kavrama testi.....	54
2.19. Stereoloji.....	55

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	58
3.1. Gruplar.....	58
3.2. Cerrahi Teknik.....	59
3.3. Değerlendirme yöntemleri.....	61
3.3.1. Kavrama Testi.....	61
3.3.2. Histolojik (Histomorfometrik) Değerlendirme.....	63
3.3.3. İstatistiksel Analiz.....	65
4. BULGULAR.....	66
4.1. Genel değerlendirme bulguları.....	66
4.2. Kavrama Testi Bulguları.....	67
4.3. Histolojik Bulgular.....	68
4.3.1. Makroskobik Bulgular.....	68
4.3.2. Mikroskopik Bulgular.....	68
5. TARTIŞMA.....	72
6. SONUÇ.....	83
7. ÖZET.....	84
8. ABSTRACT.....	85
9. KAYNAKLAR.....	86

KISALTMALAR

ACTH: Adrenokortikotropik hormon

DNA: Deoksiribonükleik asit

ATP: Adenozin trifosfat

P0: Protein sıfır

PMP: Periferal miyelin proteini

MBP: Miyelin temel protein

Ngr1: Nöroregulin

RNA: Ribonükleik asit

GAPs: Growth-associated proteins

NAT: N-asetiltransferaz

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

6- HMS: 6-Hidroksimelatoninsülfat

HİOMT: Hidroksi indol O-metil transferaz

NO: Nitrik oksit

SOD: Superoksit dismutaz

NOS: Nitrik oksit sentetaz

OH: Hidroksil

TGF: Transforming büyüme faktörü

bFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

PEG: Füzyonunda polietilen glikol

NADPH-d: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat bağımlı diaphorase

nNOS: Nöronal nitrik oksit sentetaz

SRÖ: Sistemik Rastgele Örneklem

STR: Systematic uniform random sampling

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Grupların kavrama skorları.

Tablo 2: Gruplardan elde edilen ortalama miyelinli akson sayıları.

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** Periferik sinir sistemi. a) Dorsal kök ganglionu, b) Ranvier düğümü, c) Schwann hücresi, d) Nöromusküler bileşke.
- Şekil 2:** Sinir Hücresi (Soma, Perikaryon).
- Şekil 3:** Schwann Hücresi ve Miyelin Kılıf. a) Miyelinli akson, b) Miyelin kılıf gelişimi.
- Şekil 4:** Periferik sinir anatomisi.
- Şekil 5:** Sinirin vasküler yapısı.
- Şekil 6:** Periferik sinir yaralanmalarının sınıflaması (Seddon ve Sunderland).
- Şekil 7:** Akson Dejenerasyonu (Wallerien Dejenerasyon).
- Şekil 8:** Aksonal Rejenerasyon Süreci.
- Şekil 9:** Epinöral sinir onarımı.
- Şekil 10:** Çalışmada kullanılan cerrahi ekipman.
- Şekil 11:** A) Ratın operasyona hazırlanması, B) Siyatik sinir diseksiyonu
- Şekil 12:** Siyatik sinirin trifikasyondan 1 cm proksimalinden tek hamlede kesilmesi.
- Şekil 13:** 10/0 Prolen ile sinirin epinöral teknikle onarılması (10x ve 16x büyütmede).
- Şekil 14:** Kas ve cilt sütürasyonu.
- Şekil 15:** Kavrama testi skorlaması; A) Kavrama yok (0), B) Hafif Kavrama (1), C) Güçlü Kavrama (2).
- Şekil 16:** Kavrama gücü ölçüm düzeneği.
- Şekil 17:** Kavrama gücü ölçümü. A) Güçlü kavrama, B) Kavrama gücünde azalma.
- Şekil 18:** Histolojik değerlendirme için kullanılan stereolojik sistem.
- Şekil 19:** Miyelinli akson sayımı esnasındaki ekran görüntüsü.
- Şekil 20:** Siyatik sinirin kesik olduğu sağ ayakta otokanibalizasyon.
- Şekil 21:** O.saatte (Grup 1 ve 5) yapılan gerilimsiz sinir onarımı.
- Şekil 22:** Sinir kesisi sonrası 1. haftada meydana gelen nöroma formasyonu ve fibrozis.
- Şekil 23:** Gruplardan elde edilen kavrama gücü değerleri.
- Şekil 24:** Rejenere siyatik sinir segmentinin genel görüntüsü (Toluidin mavisi)
- Şekil 25:** Rejenere aksonlardan oluşan fasiküller (Toluidin mavisi).
- Şekil 26:** Rejenere Siyatik sinir segmentinde miyelinli aksonlar (Toluidin mavisi).
- Şekil 27:** Gruplardan elde edilen miyelinli akson sayılarının karşılaştırılması.

1. GİRİŞ

Periferik sinir sistemi, insanın içinde yaşadığı dış dünya ile santral sinir sistemi arasındaki iletişimi sağlayan organizmanın en uzak noktasındaki yapılara kadar tüm bölgelerini birbirine bağlayan sinir sistemi bölümüdür. Periferik sinirler, medulla spinalis ön boynuzundaki motor nöronların, dorsal ganglionlardaki duyu köklerin ve sempatik ganglionlardaki sempatik nöronların bağ dokusuyla çevrili aksonal uzantılarından meydana gelen ve ulaştıkları hedef organa göre motor, duyu ya da otonomik fonksiyonları olan yapılardır (1,2). Dış ortamdan alınan inputlar periferik duyu sinirleri aracılığıyla beyine iletilir. Bu veriler değerlendirildikten sonra oluşturulacak yanıt için uyarı kaslara ve ilgili organa periferik motor sinirler aracılığıyla götürülür. Bu iletişimde meydana gelecek en ufak kesinti yaşam kalitesini ve konforunu kötü yönde etkileyecek problemlere neden olur (3).

Periferik sinir yaralanmaları, sinirde gerilme, ezilme ya da kesilmeye bağlı olarak meydana gelebilir. Yaralanmayı takiben sinirin proksimal ve distal kısımlarında önemli histopatolojik değişiklikler ortaya çıkar (4,5). Yaralanmanın nedeni ne olursa olsun sinir hasarından sonraki dejeneratif değişiklikler aynıdır. Hücre düzeyinde aksonal hasarı takiben sinirin proksimal ve distal uçlarında, Schwann hücrelerinde ve inflamatuvar hücrelerin sayısında oluşan değişiklikler nörotrofik ve nörotropik mediatörler aracılığı ile meydana gelir (6). Distal uca kalan aksonda ana hücre ile ilişkisi kesildikten sonra "Wallerian" dejenerasyon görülür (7,8). Travma sonucu oluşan sinir yaralanmalarına yaklaşımda pek çok sınıflama mevcuttur, Seddon ve Sunderland'in önerdiği periferik sinir hasar sınıflamaları tedaviyi yönlendirmek ve prognozu öngörebilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (1,5,9,10). Özellikle travmalar sonucu gelişen periferik sinir hasarı, kişide fiziksel olduğu kadar psikososyal ve ekonomik problemlere de yol açan bir durumdur. Periferik sinir yaralanmalarından sonra iyileşme için geçen süre oldukça uzundur ve ciddi fonksiyon kayıplarına neden olmaktadır. Bu nedenle uygulanan cerrahi teknikler ve sinir iyileşmesi ile ilgili araştırmalar günümüzde halen devam etmektedir. Periferik sinir cerrahisinde proksimal ve distal kesi uçları arasındaki anatomik onarımın sağlanması amacıyla değişik fiziksel ve kimyasal yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır (11,12,13,14). Mikrocerrahi uygulamalarının yaygınlaşması, yeni teknolojilerin gelişimi, cerrahi mikroskop kullanımının yaygınlaşması, epinöral ya da perinöral dikişler ile gerilimsiz ve anatomik olarak sinir uçları karşılıklı olarak sütüre edilebilmektedir. Histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerin gelişmesi de periferik sinir

yaralanmalarında, sinir onarımının başarısını büyük oranda arttırmıştır (15). Buna rağmen, günümüzde halen sinir hasarı sonrası sinir iyileşmesinin, duyuşsal ve fonksiyonel olarak yaralanma öncesi dönem ile aynı seviyeye ulaşmasını sağlayabilecek bir tedavi şekli ortaya konamamıştır (1,16,17,18). Yaralanmanın nedeninden bağımsız olarak, sinir dokusunda iyileşmenin tam olmaması veya sinirin uygun olmayan rejenerasyonu, sıklıkla fonksiyonel kayıplara ve kronik ağrıya neden olur. Periferik sinir yaralanmalarında tedavinin asıl amacı, sinir bütünlüğünü tekrar sağlayarak impuls iletiminin geri dönüşünü sağlamak. Dolayısıyla kaybolan motor ve duyu fonksiyonlarının restorasyonunu sağlamaktır (2,19,20). Sinir hasarı meydana gelen hastaların tedavisinde en iyi fonksiyonel geri kazanım, kesik uçların uygun mikrocerrahi teknikler ile doğru fasiküler diziliminin sağlandığı, gerilimsiz koaptasyonlar ile elde edilebilmektedir (8,21). Bununla birlikte sinir rejenerasyonunun başarısını birçok faktör etkilemektedir ve fonksiyonel geri kazanım hiçbir zaman tam olamamaktadır. Daha başarılı klinik sonuçların, mikrovasküler cerrahide olduğu gibi, daha hassas mikrocerrahi yöntemlerin kullanılmasıyla elde edilemeyeceği ön görülmektedir. Sinir onarımında daha ileri tekniklerin gelişimi, sinir rejenerasyon mekanizmasının ve biyokimyasının detaylarını ortaya koyacak çalışmalar ile sağlanabilecektir (22). Sinir onarım zamanı, yaralanmanın tipine, yaranın durumuna ve sinirin vasküler durumuna bağlıdır (23,24). Keskin bir aletle meydana gelen sinir kesilerinde, ezilme tarzında yaralanma bileşeni az olanlarda, temiz yaralarda ve nöral kan dolaşımının iyi olduğu durumlarda primer sinir onarımı fonksiyonel geri kazanım için en iyi seçenektir. Mackinnon ve ark. çalışmalarında sinir kesisinde en iyi sonucun erken onarım sonucu elde edildiğini bildirmişlerdir (22,25). Ancak, erken onarım için uygun olmayan durumlarda geç onarım gerekebilmektedir.

Son yıllarda periferik sinir yaralanmalarında non-steroid antiinflamatuvarlar, tiroid hormonları, steroidler, büyüme hormonu, sinir büyüme faktörleri, eritropoetin, ACTH (adrenokortikotropik hormon) ve insülin benzeri peptidler gibi çeşitli farmakolojik ajanların sinir rejenerasyonunu hızlandırdığını gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (26-32). Bu amaçla melatoninle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Melatonin pineal bezden salgılanan bir nöroendokrin hormondur. Salgılanımındaki sirkadien ritminden dolayı melatonin suprakiazmatik nükleusa etki ederek 24 saatlik siklusların düzenlenmesinde rol alır (33-36). Melatonin oldukça etkin bir serbest radikal temizleyicisidir, yüksek lipofilik ve hidrofilik özelliğe sahiptir, vücutta depolanmadan kan ve vücut sıvılarına hızla geçerek hücre ve hücre çekirdeğine ulaşır. Bu özelliği ile hücrenin mitokondrisine nüfuz edebilen bir antioksidandır. Bu sebeple de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha

etkilidir (37-42). Melatonin fizyolojik etkilerini hem reseptör üzerinden, hem de reseptörden bağımsız olarak gösterebilir (43). Serbest radikal temizleyici etkisi reseptörden bağımsızdır. DNA (deoksiribonükleik asit) üzerine koruyucu etkisi vardır. Melatonin oksijen radikallerini ve peroksinitritleri ortadan kaldırarak septik şokta ve inflamatuvar olaylarda etkilidir (38,44,45). Travmayı takiben lipid peroksidasyonunda artış meydana gelir. Yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonunda belirgin artışın 1, 24 ve 48. saatte olduğu gösterilmiştir (46). Melatonin kullanılanlarda peroksidasyon hızının hasar öncesi seviyesine döndüğü, melatoninin 48. saatten sonra maksimum etki gösterdiği ve kronik nöroprotektif etkisi olduğu tespit edilmiştir (37). Melatonin 1-50mg/kg dozlarında nöroprotektif etkilidir (43,47-49).

Periferik sinir cerrahisinde onarım zamanlamasının önemi herkesçe kabul görmektedir. Bu sebeple yapılan çok sayıdaki araştırma sonucu erken ve geç onarım zamanları tanımlanmış ve bu onarım zamanlarında elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Onarım zamanına ek olarak periferik sinir yaralanmalarından sonra sinir rejenerasyonunu hızlandırmak ve fonksiyonel geri kazanımı artırmak için çok sayıda tedavi seçeneği sunulmuştur. Büyüme faktörleri, nörotrofik faktörler ve pek çok farmakolojik ajan sinir hücrelerinin yaşayabilirliklerini artırmakla birlikte, sinir iyileşmesini de stimüle ederler. Deneysel olarak, yaralanma sonrasında sinir hücre ölümünü azaltmak ve sinir iyileşmesini hızlandırmak amacıyla çok sayıda çalışma yapılmasına karşın, hali hazırda klinik kullanıma giren bir ajan mevcut değildir. Bu bilgiler ışığında deneysel olarak oluşturulan siyatik sinir kesisinde farklı onarım zamanlarında melatoninin sinir iyileşmesine olan etkisini araştırmak ve bu etkileri stereolojik olarak değerlendirerek kantitatif veriler elde etmek amacıyla bu çalışma planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

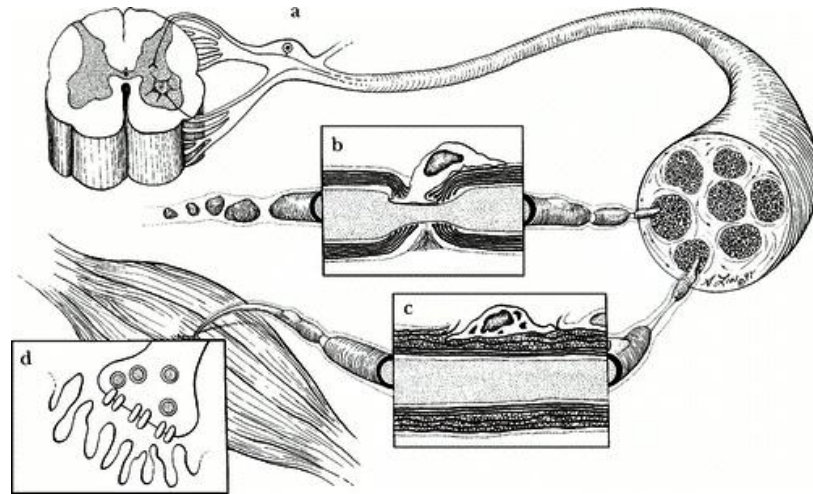
2.1. Periferik Sinir Embriyolojisi

Canlı hücrenin bir özelliği de, her hücreye özgü olmak üzere uyarılma ve bunu iletme ya da bu uyarıya yanıt verebilmedir. Uyarılma ve uyarıyı iletmede en özelleşmiş ve gelişmiş hücreler sinir hücreleridir. Vücudun diğer tüm hücre ve dokularının fonksiyonlarını düzenleyecek, birbirleri arasındaki ilişkiyi sağlayacak düzeyde gelişmiş olan bu hücreler diğer yapı elemanları ile birlikte sinir dokusunu oluşturmaktadırlar. Sinir sistemi embriyolojik olarak ektodermden, çevre doku ise mezodermden gelişir. Meydana gelen ilk oluşuma nöral plak adı verilir. Nöral plak başlangıçta çok sıralı nöroepitel hücrelerinden ibarettir. Farklı görünüşteki bu hücreler, ektodermin kübik biçimli diğer hücrelerinden daha yukarı doğru yükselmiştir. Daha sonra bu yapının yan kısımları kabarıp. Gelişmeye devam eden nöral kabartılar önce yükselir. Onsekiz günlük embriyoda nöral plak kalınlaşır nöral kristayı oluşturur ve mezoderm içersine göç ederler daha sonra orta çizgiye doğru kıvrılarak sulkus nöralisi oluştururlar. Periferik sinir sisteminin tüm hücreleri krista nöralisten köken alır. Bu arada gittikçe yükselen sulkus nöralisin kenarları 22. günde orta çizgi hizasında hem baş, hem de kuyruk yönüne doğru birleşir. Oluk kanal haline dönüşerek kanalis nöralis oluşur. Lümen çevresinde çok sıralı olarak dizilmiş tek tip nöroepitel hücreleri bulunur. Sonradan farklılaşan nöroepitel hücrelerinin bir bölümü nöronun primitif hücresi olan nöroblastları, bir bölümü de glioblastları oluşturur. Başlangıçta hiçbir uzantısı olmayan bu hücreye apolar nöroblast denir, zamanla iki adet uzantı gelişerek hızla büyür ve primitif akson halini alır, diğer kenardaki uzantı ise dallanır ve primitif dendriti meydana getirir. Bu son haliyle hücreye multipolar nöroblast denir ve gelişerek erişkin sinir hücresi olan nöronu oluşturur. Nöroblast halinden itibaren hücre bölünme yeteneğini kaybetmiştir. Spinal sinirler ekstremite tomurcukları oluşur oluşmaz ekstremitelere penetre olmaya başlar. Periferik sinirlerin miyelinizasyonu Schwann hücreleri tarafından oluşturulur. Schwann hücreleri nöral tomurcuktan orijin alır, periferik doğru yönelir, aksonların çevrelerine dolanır ve nörolemma kılıfını oluştururlar. Schwann hücreleri tarafından gerçekleştirilen miyelinizasyon fetal hayatın 4. ayından itibaren başlar (1,50). Bu gelişme sırasında, sinir hücrelerinin gelişebilecekleri en üst düzeylere kadar gelişmeleri söz konusudur. Bu durum, sinir hücrelerinin erişkinde yenilenebilme ve çoğalabilme yeteneklerini ortadan kaldırır. Ancak ileri derecede diferansiye olmaları sinir hücrelerinin, organizmadaki tüm hücreleri kontrol eden üst düzeyde hücreler olmasını sağlar. Bu nedenle sinir dokusundan kurulmuş olan sinir sistemi, canlıyı oluşturan

sistemlerin gerektiği gibi ve birbirleri ile uyum içinde çalışmalarını düzenleyen sistemdir (50-53).

2.2. Periferik Sinir Anatomisi

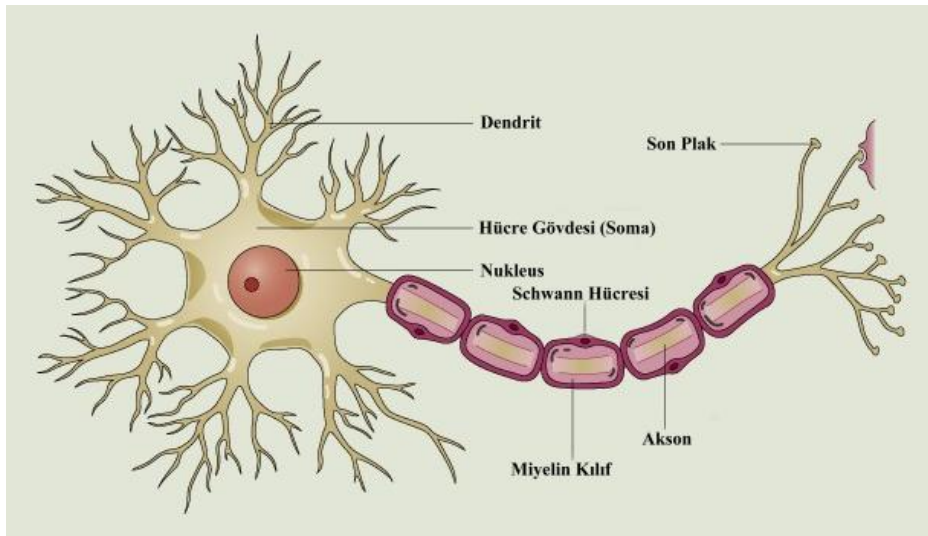
İnsanda sinir sistemi en az 10 milyar sinir hücresi içerir (54,55). Sinir dokusu, entegre bir iletişim ağı halinde vücuda dağılmıştır. Yapısal olarak sinir dokusu iki hücre tipi içerir: çevreden gelen uyarıları sinir impulslarına çevirmek ve iletmek üzere farklılaşan sinir hücreleri (nöronlar) ile bu hücelere mekanik ve metabolik olarak destek olan bağ dokusu hücrelerinin (nöroglia hücreleri) oluşturduğu sinir dokusuna özel bir destek dokusundan (glial doku) meydana gelmiştir. Sinir dokusu sinir sistemini oluştururken, bu sistemin farklı fonksiyonel bölümlerine göre bazı morfolojik farklılıklar gösterir. Sinir sistemi anatomik olarak, beyin ve spinal korttan oluşan santral sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılır (54,56,57) (Şekil 1). Periferik sinir sistemi merkezi organlar ile organizmanın en uzak noktasındaki yapılara kadar tüm bölgelerini birbirine bağlayan sinir sistemi bölümüdür. Periferik sinirler ve bunların yolları üzerinde bulunan ganglionlar ile reseptörlerden oluşmuştur. Verileri taşıyacak şekilde dizayn edilmiş olup sempatik ve otonomik yollarla çevresel değişiklikleri yönlendirir. Periferik sinirler; nöronlar, destek bağ dokusu, hücresel yapılar ve hedef-organlardan oluşan kompleks bir yapıdır. Nöronlar birbirleri ile dendrit denilen sitoplazmik uzantılar ile temas kurarken, her nöron perifere genelde tek bir akson gönderir (8).



Şekil 1: Periferik sinir sistemi. a) Dorsal kök ganglionu, b) Ranvier düğümü, c) Schwann hücresi, d) Nöromusküler bileşke. (Ho et al., 1998. Copyright 1998 by Annual Reviews, Inc. Permission pending.)

Akson demetleri duyu ganglionlarının distalinde bir araya gelirler ve spinal kökleri (dorsal ve ventral) oluştururlar. İki kökün birleştiği yer spinal sinirin en proksimal ucudur, burada duyu ve motor lifleri farklı oranda bir arada bulunurlar. Afferent liflerin (duyu sinirleri) hücre gövdeleri dorsal spinal arka kökler içerisinde yerleşmiştir ve periferik duyu reseptörlerinde sonlanırlar. Liflerin yoğunluğu duyu alıcıların sayısı ile doğru orantılıdır. Efferent liflerin (motor sinirler) hücre gövdeleri dorsal spinal arka kökler içerisinde yerleşmiştir ve kas liflerinin motor son plaklarında sonlanırlar. Hem afferent hem de efferent sinir lifleri bağ dokusunun birleştirdiği ve fasikül adı verilen demetler halinde seyrederek (8). Merkezi sinir sistemi bu şekilde periferdeki dokularla ilişkidir; afferent liflerle alınan duyu mesajları arka kök ganglionlarına gelir ve motor iletiler omurilik ön boynuz hücrelerinden perifere iletilir (1).

Periferik sinir dokusu, sinir lifleri ve çevre destek dokudan oluşur. Sinir sistemini fonksiyonel ünitesi sinir hücresidir (nöron). Diğer tüm yapılar nöronlara bağımlıdır. Nöronlar uyarıları almak, iletmek, bazı hücrel aktiviteyi başlatmak, nörotransmitterleri ve diğer bilgi moleküllerini salgılamaktan sorumludurlar. Her bir sinir hücresi; hücre gövdesi (perikaryon, soma), dendrit ve akson olmak üzere 3 kısımdan oluşur (Şekil 2).



Şekil 2: Sinir Hücresi (Soma, Perikaryon). (© 2000 John Wiley Sons, Inc.)

2.2.1. Hücre Gövdesi (Soma, Perikaryon)

Perikaryon denenen hücre cismi, hücrenin trofik merkezini temsil eder. Nükleus, nükleolus ve çevre sitoplazmasından oluşur. Her bir sinir hücresi içerisinde tek bir çekirdek ve birden fazla çekirdekçik bulunur. Hücre fonksiyonları için gerekli olan membran sentetik enzimler ve diğer biosentetik sistemlere sahiptir. Sitoplazmada Nissl cisimcikleri denenen golgi-ribozom organel kompleksleri ve granüllü endoplazmik retikulum

da mevcuttur. Bu yapılar, sinir rejenerasyonu gibi metabolik hızın arttığı durumlarda sayıca artış gösterirler (8). Nissl cisimciği özellikle protein sentezinden sorumludur. En belirgin sitoplazmik organeller golgi cisimcikleri ve mitokondrilerdir. Görevi materyalleri veziküllerine toplamak ve hücrenin diğer bölümlerine taşımaktır. Somada ayrıca mitokondri, nöroflament ve mikrotübüller bulunmaktadır (8,53).

2.2.2. Dendrit

Hücre gövdesinde yerleşik, çevreden uyarı almak için özelleşmiş reseptör fonksiyonu gören çok sayıdaki sitoplazmik uzantılar dendrit olarak adlandırılır. Bu yapılar hücre gövdesinin uzantısıdır. Bazı nöronlarda dendritler bir metreye kadar uzayabilirler ve birçok nöronda bütün sinirin %90'ını oluşturabilir. Proksimal dendritler Nissl cisimciği ve Golgi aparatının parçalarını içerirler. Bununla birlikte dendritlerdeki ana sitoplazmik organeller mikrotübül ve nöroflamanlardır (58). Dendritler, çevreden, duyu epitelinden veya diğer nöronlardan gelen uyarıları hücre gövdesine iletirler ve nöronlar arasındaki iletişimi sağlarlar. Dendritler çok nadir miyelin taşır.

2.2.3. Akson

Sinir hücrelerinin perifer ile iletişimini sağlayan hücrenin silindirik uzantısı ise aksondur. Tüm aksonlar hücre gövdesinin akson tepeciği denilen kısa piramit şekilli kısmından çıkar ve kas, sinir veya glandlara impuls iletilmesini sağlarlar. Akson ile akson tepeciğinin birleştiği bölgeye başlangıç segmenti denir. Başlangıç segmenti kısa, dar ve miyelinsiz bir kısımdır. Burası nörona gelen değişik eksitatör ve inhibitör uyarıların değerlendirildiği ve bir aksiyon potansiyelinin ya da sinir impulsunun üretilip üretilmeyeceğinin belirlendiği yerdir. Akson tepeciğinden sonra akson miyelinleşir, çapını artırır ve sonlanacağı hedef-organa kadar aynı çapta devam eder. Sıklıkla her bir sinir hücresinin pek çok dendriti olmasına karşın, tek bir aksonu vardır. Aksonlar, orijinal hücre gövde çapının binlerce katı kadar uzunlukta perifere uzanım gösterebilirler. Bir akson; aksoplazma, aksolemma ve miyelin kılıftan meydana gelir. Aksoplazmayı çeviren hücre zarına “aksolemma” denir (59,60). Aksonların çapı ve boyu sinirden sinire farklılık gösterir. Aksonun distal uçları dallanır ve her biri başka hücrelerle sinapslar aracılığıyla ilişki kurarlar. Aksonlar düz endoplazmik retikulum ve belirgin sitoskeletona (nöroflaman ve mikrotübül) sahiptirler. Hücre sitoplazmasının akson içerisindeki eş değeri aksoplazmadır. Aksoplazmada, bazı proteinler, hücre iskeletini oluşturan mikrotübüller ve nörofilamanlar bulunur. Bunlar yapısal bütünlüğün devamının sağlanmasında ve aksonal iletimde önemlidir. Aksonlar, miyelinli ya da miyelinsiz olabilirler. Miyelin kılıf periferik sinir sisteminde Schwann hücreleri tarafından yapılır (1). Sinir hücresinde metabolik

olaylar, hücre gövdesinde gerçekleşir; bu nedenle sinirin fonksiyonun görebilmesi için, periferik aksonal uzantılar ile sinir gövdesinin devamlılık göstermesi gerekir. Aksoplazmada mitokondri, düz endoplazmik retikulum, lizozom ve veziküller gibi organellerin bulunmasına karşın, protein sentezi yapabilen golgi cisimcikleri ya da granüllü endoplazmik retikulumlar yoktur. Bu nedenle canlılıklarını koruyabilmek için hücre gövdesi ile devamlılıklarının korunması gerekir (8). Sinirin akson terminalinde, başka bir sinir hücresi, kas ya da salgı bezi ile yaptığı bağlantıya sinaps adı verilir. Sinaps ile sinir üzerinde ilerleyen uyarı hedef organa iletilmiş olur (1). Aksonun gövde ile ilişkisi herhangi bir nedenle kesintiye uğrarsa, aksonda sinir fonksiyonunun devamlılığı için gereken metabolik olaylar gerçekleşemediği için, distal kısımları dejenerasyona uğrar (8,16).

2.3. Aksonal İletim

Aksonal iletim sistemi, Ca-Mg ATPaz ile sağlanan ATP'ye yani enerjiye bağımlıdır. Aksonal taşıma çift yönlüdür. Anterograd (somatofugal) taşıma ile sinir hücre gövdesinde sentezlenen pek çok madde farklı hızlarda aksonun uzun aksı boyunca taşınır. İki farklı hızda anterograd taşıma vardır: 1) Yavaş taşıma: 1–6 mm/gün hız ile aksonların sitoskeletal elemanları taşınır. Aktin, tübülün gibi mikrotübül proteinleri, nörofilaman ve mikrofilamanlar bu yolla taşınırlar. 2) Hızlı taşıma: Yaklaşık 400 mm/gün hız ile glikoprotein, lipid gibi hücre zarı elemanları, çeşitli enzimler ve nörotransmitter içeren veziküller taşınır. Retrograd (somatopedal) taşıma, akson distal ucundan hücre gövdesine doğru olan taşıma sistemidir. Ortalama taşınma hızı 240 mm/gün kadardır. Retrograd taşıma ile nörotransmitter veziküllerinin ve akson içindeki proteinlerin geri dönüşümü sağlanır. Ayrıca akson terminalindeki ya da kesilmiş akson ucundaki sinir büyüme faktörü gibi nörotrofik faktörler ve herpes simpleks, polio gibi virüsler de geriye doğru taşınabilirler (8,16,17). Klinikte her iki yönde olan aksoplazmik iletim, sinir kompresyonunu takiben proksimal ve distal uçlarda meydana gelen şişmeden ve ayrıca gecikmiş sinir rekonstrüksiyonunda sinirin distal ve proksimal uçlarında oluşan çap farkından sorumludur. Sinir iki şekilde uyarıyı iletir; ya yavaşça moleküllerin aksoplazmik iletimini kullanarak fiziksel hareketlerle ya da hızlıca hücre membranı boyunca yaratılan elektriksel akımla. İstirahat döneminde, sinir lifi polarize durumda ve içi dışına göre negatif olup potansiyel farkı $-70 \sim -80$ milivolt düzeyindedir (54). Bu lifin içindeki potansiyelin, lifin dışındaki interstisyel sıvıya göre ~ 70 milivolt daha negatif olduğu anlamını taşır. Sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+) iyonlarının plazma zarından diffüzyonu ile oluşan ve ATP enerjisi kullanan sodyum potasyum pompası aracılığı ile sürdürülen bu

duruma istirahat membran potansiyeli adı verilmektedir (54). Bunun sağlanmasında sodyumu hücre dışına, potasyumu hücre içine pompalayan sodyum-potasyum pompasının önemli rolü vardır (61). Sinir sinyalleri, membran potansiyelindeki hızlı değişimlerden ibaret olan bu aksiyon potansiyelleri ile iletilir. Yeterli şiddetteki bir uyarı ile aksonun ilk segmentinden başlayan ve aksosoma boyunca ilerleyen negatif elektrik dalgasına aksiyon potansiyeli adı verilmekte olup, sinir impulsları sinir lifi boyunca aksiyon potansiyelinin hareketi sonucu ilerlemektedir. Aksiyon potansiyeli birbirini izleyen dönemler şeklinde olmaktadır.

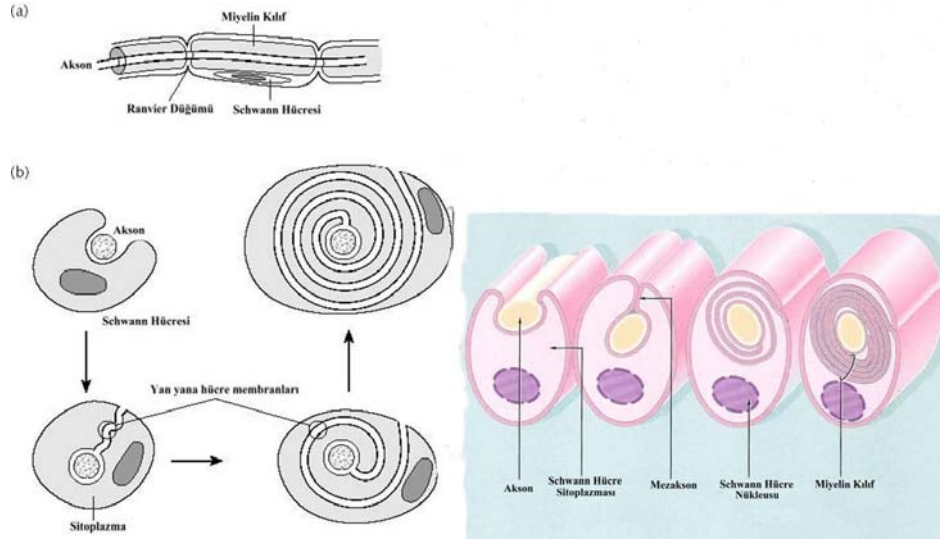
Her aksiyon potansiyeli, normal istirahat potansiyelinin negatif değerden ani olarak pozitif bir değere doğru yükselmesiyle başlar ve hemen hemen aynı hızla tekrar negatif potansiyele dönüşür. Bu değişiklikler saniyenin on binde biri kadar sürede olmaktadır. Sinir sinyalinin iletilmesinde, aksiyon potansiyeli sinir lifi boyunca sinir ucuna kadar yayılır. Bir uyarı sonrası, Na⁺ iyonları akson içine geçmekte ve aksosoma dışındaki pozitif iyonlar nötralize olmaktadır. Bu durumda membranın dış kısmı içe göre negatif olup potansiyel farkı +40'tır. Bir sinir lifinin ileti hızı, aksonun çapı ile ilişkilidir ve kalın lifler küçük çaplı olanlara kıyasla daha hızlı bir ileti sağlamaktadır (54). Sükun dönemi; bu normal istirahat potansiyeli durumudur. Depolarizasyon döneminde; membran aniden sodyuma karşı geçirgen hale gelir, çok büyük miktarda sodyum iyonu hücre (akson) içine girer, normal -90 MV'luk polarize durum tersine dönerek potansiyeli pozitif olur (61). Repolarizasyon döneminde ise membranın sodyum geçirgenliği çok artıktan sonra, saniyenin onbinde birleri kadar bir süre içinde sodyum kanalları açıldıkları hızda kapanırlar potasyum kanalları ise daha geçirgen hale gelir ve potasyum iyonlarının dışarı çıkması sonucu membran potansiyeli eski haline gelir (62). Buna membranın repolarizasyonu adı verilir. Bu olaylarda iki voltaj kapılı kanal rol oynamaktadır. Bunlar sodyum ve potasyum voltaj kapılı kanallardır.

Periferik Sinirde İleti: Miyelinli liflerde, Schwann hücrelerinin aksonun etrafını defalarca sarması sonucu çok sayıda miyelin katları oluşur. Miyelin çok iyi bir yalıtkan olduğundan, membrandan iyon akımını yaklaşık olarak 5000 kat azaltır. Bununla birlikte iyon akımı sadece Ranvier boğumlarında olabilmektedir. Sonuç olarak, aksiyon potansiyeli boğumdan boğuma iletilir. Bu sıçrayıcı ileti sonucunda miyelinli liflerde ileti 5-50 kata kadar artmaktadır. Sinir liflerinde ileti, çok küçük miyelinsiz liflerde 0.25 m/sn ile kalın miyelinli liflerde 100 m/sn arasında değişmektedir (61). Miyelin kılıfının kalınlığı da ileti hızı üzerine etkili olan diğer bir faktör olup, bir sinir lifindeki ileti hızı ile lif çapı arasında

doğrusal bir ilişki mevcuttur; en kalın liflere ait 120 m/sn ile en ince liflerdeki 2 m/sn'nin altındaki değerler arasında değişmektedir (54,63).

2.4. Schwann Hücreleri ve Miyelin Kılıf

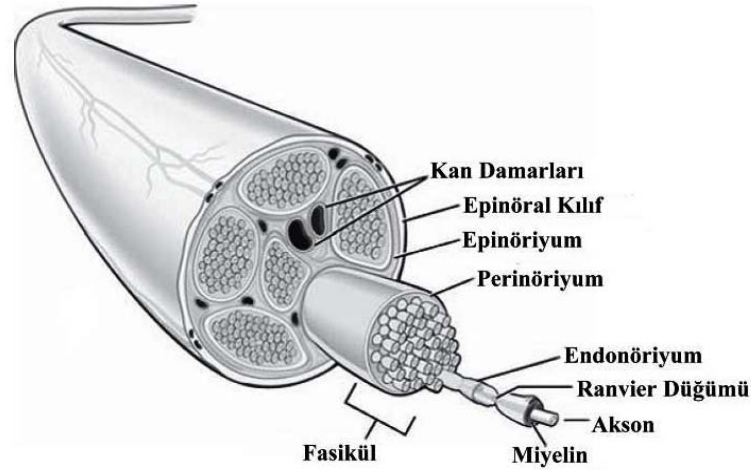
Schwann hücreleri periferik sinir sisteminin destekleyici hücreleridir (15,59,60,64). Schwann hücresi üçgen görünümlü, oval nükleus içeren hücrelerdir. Temel fonksiyonu hem miyelinli hem de miyelinsiz sinir liflerini desteklemektir. Akson etrafında yer alırlar, iyon dengesinin sağlanmasında, nörotransmitterlerin dağılımında ve aksosoma boyunca sodyum kanallarının yerleşiminde görevi olan hücrelerdir. Nöroektodermal kökenli bu hücreler nöral krestten gelişirler, periferik sinir sisteminin uydu hücreleridir ve akson çevresinde konsantrik karakterde fosfolipid bir tabaka olan miyelin kılıfı üretirler. Miyelin kılıf, aksonu endonöriumun ekstrasellüler kompartmanından ayırmakta ve sinir impulslarının hızlı bir şekilde iletilmesini sağlamaktadır. Miyelinli ya da miyelinsiz her sinir lifinde aksonlar ucuca dizilmiş ve Schwann hücreleri ile sarılmıştır (Şekil 3). Miyelinli liflerde her bir Schwann hücresi tek bir aksonu çevrelerken miyelinsiz liflerde bir Schwann hücresi birden fazla aksonu çevrelemektedir. Bu hücreler ayrıca, periferik sinir sistemindeki kalıntıları temizler ve yaralanma veya kesilme sonrası aksonların yeniden büyümesine rehberlik ederler (5,15,64-67). Schwann hücreleri tip 4 kollajen ve lamininden oluşan bir bazal membran üretirler ve bu yapı da sinir lifini çevreler. Bu bazal membranın sinir rejenerasyonundaki rolü çok önemlidir, özellikle sinir rejenerasyonu sırasında, yeni büyümekte olan aksonal tomurcukların distal sinir güdüğüne uzanımları sırasında rehberlik görevi görür (8). Miyelin, yapısal olarak diğer hücre zarlarına benzemesine karşın içeriği farklıdır. Miyelin kılıfın yapısında, protein sıfır (P0), periferik miyelin proteini (PMP) ve miyelin temel protein (MBP) olarak adlandırılan membran proteinleri bulunur (59,60,68,69). P0, miyelin kılıf lamellerinin sıkıca bir araya gelmesinden sorumlu esas yapısal miyelin proteindir. Biyokimyasal olarak %75 lipid ve %25 proteinden meydana gelir. Miyelin tabaka içerisinde bulunan lipidlerin %20 ila %30'unu oluşturan kolesterol, multilamellar yapının stabilizasyonunu sağlar. Miyelin içeriğindeki diğer lipidler, glikolipid yapısında olan galaktoserebrozid, sülfatid ve gangliosiddir. Miyelin kılıfının %25'ini oluşturan proteinler ise glikoprotein yapısındadır. Bu transmembran glikoprotein, karşılıklı iki membran tabakası arasında güçlü bir adhezyon sağlar ve periferik sinir miyelininin en önemli yapısal komponentidir (70).



Şekil 3: Schwann Hücresi ve Miyelin Kılıf. a) Miyelinli akson, b) Miyelin kılıf gelişimi (Ransom, B. R. and Kettenham, H. (ed.) (1995). Neuroglia. Oxford University Pres)

Miyelinizasyonda, miyelin kılıfın kalınlığı Schwann hücreleri tarafından değil, akson çapı tarafından belirlenir. Dolayısıyla, miyelin oluşumu, akson ve Schwann hücreleri arasındaki fonksiyonel ilişki sonucunda gerçekleşmektedir. Miyelin kılıf kalınlığının düzenlenmesi, nöroregulin (Ngr1) adı verilen bir büyüme faktörüne bağlıdır. Miyelin kılıf akson boyunca birbiri ardına dizilen birçok Schwann hücreleri tarafından yapıldığı için segmental görünümündedir. Miyelinli aksonların da miyelinsiz kısımları vardır. Komşu Schwann hücrelerinin karşılaştığı bölgeler, miyelin kılıftan yoksundur. Bu alanlara Ranvier düğümü (nodu) adı verilir. Bu bölgeler sinir ileti hızı açısından önem taşır. Ranvier düğümleri, uyarının sıçrayıcı (saltuar) tarzda iletimi ile çok hızlı taşınmasını sağlar (1,8). İki Ranvier nodu arasındaki miyelin kılıfla kaplı bölgeye de internodal segment denir. Büyük çaplı sinirlerin hemen hepsi miyelinli iken, çapı 1 mikrometreden (μm) küçük aksonlar genellikle miyelinsizdir. Memelilerde dorsal spinal köklerin ve kutanöz sinirlerin yaklaşık %75'i, kasa giden liflerin %50'si ve postganglionik otonomik liflerin tamamına yakını miyelinsizdir. Periferik sinir sisteminde Schwann hücreleri miyelinsiz sinir liflerini de çevreler. Schwann hücreleri aksonun uzun eksenine boyunca paralel olarak uzanır ve aksonlar hücre sitoplazmasına gömülü halde bulunur. Periferik sinir sisteminde miyelinsiz sinir lifleri Schwann hücreleri içine gömülmüşlerdir, her bir Schwann hücresi, bir ya da daha fazla aksonu aynı anda sarmaktadır. Bu tür aksonlar ve eşlik eden Schwann hücreleri, Remark içiği olarak adlandırılır (59,60,71). Bir sinirin miyelinli olması aksiyon potansiyelinin iletim hızını arttırmaktadır. Miyelin kılıfın kalınlığı da iletim hızını etkiler.

Miyelinsiz liflerde çap 0.2–1.5 µm ve iletim hızı 0.4–2.0 m/sn (metre/saniye) iken; kalın miyelinli sinirlerde çap 12–20 µm ve iletim 72–120 m/sn gibi yüksek hızlardadır (1). Periferik sinir sisteminde sinir lifleri gruplar oluşturarak sinirleri meydana getirirler. Sinir lifleri, afferent veya efferent aksonlar içeren miyelinli ya da miyelinsiz sinir lifi demetlerinden oluşan ve çevresi bağ dokusu kılıflarla sarılı oluşumlardır (11,54,63,72-74). Periferik sinirlerde bağ dokusu oranı %25-85 arasındadır ve lokalizasyonuna göre değişmektedir. Periferik sinirler anatomik olarak ayrılmış birbirinden bağımsız ve farklı fonksiyonel özelliklere sahip üç farklı destek doku kılıfı içerir (Şekil 4). Bu oluşumlar dıştan içe; epinörium, perinörium ve endonöriumdur ve bu yapıların bir çok mekanik ve fizyolojik görevi vardır (8).



Şekil 4: Periferik sinir anatomisi (Siemionow M, Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. Int Rev Neurobiol. 2009;87:141-72.)

2.5. Perinörium

Her bir sinir fasikülünün etrafını ayrı ayrı saran ve mekanik olarak kuvvetli bağ dokusudur. Yassı perinöral hücreler tarafından oluşturulan, ince tabakalar halinde 10-15 kat olarak düzenlenmiş çok katlı bir tabaka olup, travmalara karşı asıl koruyuculuğu üstlenir. Kalınlığı 400-800 Å, çapı 5 mikrondur. Bu kılıf farklı yönlere dağılan 6-15 kadar lamellerden oluşur. Bu konfigürasyon yapıya sağlamlık kazandırır. Bu tabaka endonöriumdan daha organize ve iç tabakasında skuamli ve lamelli hücreler, dış tabakasında ise yoğun kollajen içerir. Perinörium kan beyin bariyerinin bir uzantısıdır, koruyucu fonksiyonun yanı sıra, kan-sinir bariyerini oluşturur. Kan-sinir bariyeri sinir lifinin iç dengesinin korunmasında çok önemlidir ve perinöral hücreler ile endonöriumdaki endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı noktalarından meydana gelir. Buradaki perinöral hücreler fibroblastlardan farklılaşmışlardır. Bu bariyer, endonörium

içindeki aksonal çevre ile vücuttaki ekstrasellüler boşluğu ayıran bir difüzyon bariyeri olup, aksonlar için uygun fizikokimyasal mikroçevreyi sağlar. Travmaya ve iskemiye karşı oldukça dirençlidir. Bu perinöral kılıf sinirin distaline doğru inceler ve en distalde hücre tabakası tek kat kalır. Perinörium, epinöral damarlar ile endonöral damarları birleştiren anastomotik arteriol ve venüllerce delinir (117). Epinöral damarların perinöriyuma hafif olarak oblik girmelerinden dolayı, doku basıncında artma bunların kompresyonuna ve bu durum demiyelinizasyona neden olur. Perinörium ayrıca dış ortamla endonörium arasında difüzyon ve basınç bariyeri oluşturur. Normalde perinörium devamlı bir basınç altındadır, fasikülleri hafif bir basınç altında tutar. Çünkü çevresindeki interstisyel doku basıncı hafif olarak daha yüksektir. Sinir travması ile bu basınç artar. Bunun sonucunda; perinöriyumda bir defekt olduğunda ya da sinir kesildiğinde bu basınç artışı ile fasiküller yumuşak ve jölemsi bir doku halinde perinöriyumun ağzından taşarak herniye olur. Kan-sinir bariyerinin bir şekilde zarar görmesi sinir fonksiyonunu etkiler, periferik sinir sistemi zararlı maddelere karşı savunmasız kalır ve endonöral ödem gelişir. Perinörium longitudinal olarak da gerilim altındadır. Sinirler yapısal olarak hasar görmeden %10 oranında uzatılabilmektedirler. Periferik sinirlerin longitudinal olarak gerilmesine hemen hemen perinörium tek başına karşı koymaktadır (8). Gerilme ile perinörium kopmadan önce sinir liflerinin kopması olasılığı yok denecek kadar azdır.

2.6. Endonörium

Periferik sinir lifleri ve Schwann hücre kompleksi bir araya gelerek fasikül denen yoğun bir demet oluşturur. Fasikülde sinir lifleri, kollajen ve retikulin lifleri ile beraber mukopolisakkaritten oluşan temel maddenin (ground substance) içinde bulunur. Bu yapının temel hücresi fibroblastlardır ve kollajen üretiminden sorumludur. Hücreler, kollajen, retikulin ve temel maddenin oluşturduğu yapıya endonörium denir. Aksonlar ve çevrelerindeki miyelin kılıf endonörium içinde bulunurlar. Fibroblast, kollajen matriks, mast hücreleri, kapiller ağ ve geniş ekstrasellüler aralıktan oluşur. Elastin içermezler ve fibroblastlar nadiren gözükür (59,60). Büyük, miyelinli aksonların etrafını iki tabaka halinde kollojen sarmaktadır. Dıştaki tabaka longitudinal olarak, içteki tabaka gelişmiş güzel uzanım gösterir ve karbonhidrattan zengin retikulin ile bağlantılıdır. Küçük miyelinli aksonlar, sadece longitudinal kollojen tabakasına sahiptir. Endonöral ortam, lenfatik kanallardan yoksundur ve kan sinir bariyeri sonucu farklı bir yapıya sahiptir (75) Ayrıca endonöral sıvı basıncı proksimalden distale farklılık gösterir. Endonöral boşluk, sinir lifi

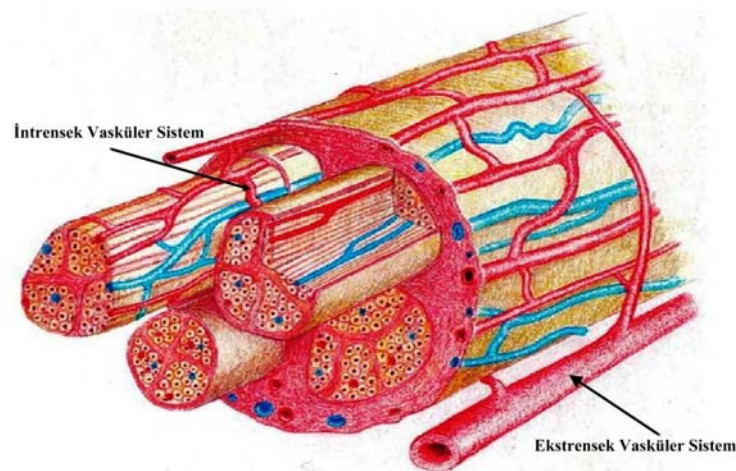
için optimum çevreyi sağlar (76). Endonörium sinir lifinin optimal fonksiyonu için uygun bir ortam sağlanmasında en önemli etkidir (8,17,54,57,60,63,77-79).

2.7. Epinörium

Miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin bir araya gelerek oluşturduğu yapı fasiküldür. Merkezi sinir sistemi ve periferik organlar arasındaki motor ve duyu iletimini sağlayan periferik sinir lifleri, epinörium adı verilen fibröz bağ dokusundan oluşan bir kılıf ile kuşatılmıştır. Epinöriumun esas görevi, fasikülleri ekstremitelerin hareketi esnasında travmalara karşı korumaktır. Bu nedenle özellikle eklem bölgelerinde oldukça kalındır (16,17,54,57,80). Bağ dokusu elemanları, periferik sinirin kompresyon ve gerilme gibi çevresel etkenlere karşı direncinden sorumlu olan elastikiyet özelliği ve dalgalı bir görünümünden sorumlu yapılardır (63,72). Epinörium gevşek, yumuşak bağ dokusudur, tip 1 ve tip 3 kollajen liflerden, elastik liflerden, fibroblastlardan ve değişen oranlarda yağ dokudan meydana gelir. Kollojen fibrillerinin çoğu longitudinal olarak uzanım gösterir ve geri kalan küçük bir bölümü ise oblik bir seyir göstermektedir. Kollajen lifleri çoğunlukta olup epineurium'un kalınlığının yarısından fazlasını oluşturan (63,72,81-85). Fasikülleri ve fasikül gruplarını saran epinörium fonksiyonel olarak eksternal ve internal olmak üzere iki tabakadan oluşur. Eksternal epinörium periferik sinirlerin en dış kısmında tüm siniri saran bağ dokudur. Kollojenden zengindir ve büyük oranda potansiyel boşluklar içerir bu da sinirin gerilmesine ve hareketine izin verir. Siniri mekanik etkilerden korur, fasiküllerin üzerinden kolaylıkla sıyrılabilen bağ doku yapısıdır. Derin tabaka internal (interfasiküler) epinörium olup, fasikülleri tek tek sarar, fasikül ve fasikül gruplarını ayırır ve bunları gevşek şekilde bir arada tutar. Bağ dokusunun fasiküller arasına yayılması ile oluşmaktadır. Bunun neticesinde dışarıdan gelen kompresyon kuvvetlerine karşı fasiküller için bir yastıkçık vazifesi görür. Her iki tabaka da longitudinal kuvvetleri alttaki perinöryuma iletilmeden önce absorbe ederler. Bir sinir kesitinde epinöriumun kalınlığı sinirin lokalizasyonuna göre, sinirden sinire, kişiden kişiye ve sinirin bulunduğu bölgeye göre değişmektedir. Epinörial doku, bir sinir gövdesinin kesit alanının % 30-%75'ini oluşturur. Yüzeysel seyreden sinirlerde ya da mekanik etkilere açık olan eklem yerleri gibi bölgelerdeki sinirlerde bağ doku daha kalındır, bunun nedeni de tekrarlayan travmalara karşı koruyuculuğu arttırmaktır (8,17,86,87). Sinir liflerinin sayısı ve çapı arttıkça bu oran yine artmaktadır. Kural olarak, fasiküller küçük ve sayıca fazla ise epineurium miktarı da o oranda artış göstermektedir (52,57,63).

2.8. Sinirin Vasküler Yapısı

Periferik sinirin yapısında, besleyici damarlar (arteriae nervosum, venae nervosum), lenfatikler ve sinirler de mevcuttur (88). Periferik sinirlerin vasküler yapısı ile ilgili ilk çalışma, 1768 yılında Isenflamm ve Doerffler tarafından yapılmıştır ve renkli balmumunun yardımıyla, sinirlerin etrafında bir vasküler ağ olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra bu damarlanma hakkındaki detaylı bilgiler, 1878 yılında Ranvier ve 1890 yılında Quenu ile Lejars isimli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. İnsanların çeşitli sinirlerindeki vasküler yapıların detayları, Sunderland tarafından incelenmiştir. Vital mikroskopik yöntemlerin günümüzde gelişmesi ile deneysel hayvan modellerinde, in vivo olarak intranöral mikrovasküler yapının ve fonksiyonlarının incelenmesi mümkün olmuştur (89). Sinir hücrelerinde, normal fonksiyonları devam ettirebilmek için devamlı ve yeterli miktarda oksijen desteği ile aerobik metabolizmalarının korunmasına ihtiyaç vardır. Periferik sinirlerde oldukça zengin bir damarlanma mevcuttur. Periferik sinirlerin kan akımı vaza nervorum denilen bölgesel damarlardan kaynaklanan dallanmalar vasıtasıyla olmaktadır. Sinir iskemiye son derece hassas olduğu için farklı sinir segmentleri ve tabakaları arasında çok gelişmiş dinamik bir vasküler pleksus bulunmaktadır (Şekil 5). Periferik sinirlerde uyarı iletimi ve aksonal taşıma için gerekli olan enerji, epinöriyum, perinöriyum ve endonöriyum tabakalarında bulunan ve birbiri ile yakın bağlantılı olan bir vasküler ağ sayesinde sağlanır (2). Bu, birbiriyle entegre fakat fonksiyonel açıdan bağımsız ve birbirini kompanse edebilen ekstrensek ve intrinsek sistemlerce sağlanmaktadır (90). Periferik sinirlerde bu iki ayrı vasküler sistemin birbiriyle yaygın anastomozları vardır.



Şekil 5: Sinirin vasküler yapısı (Zochodne DW. Neurobiology of Peripheral Nerve Regeneration. Cambridge University Pres. 2008.)

2.8.1. Ekstresek Vasküler Sistem

Sinirin dış yüzeyindeki gevşek bağ doku içerisinde sinire izlediği güzergah boyunca değişik seviyelerden katılan, segmental bölgesel besleyici damarlardır. Bu damarlar sinirin en dışındaki adventisya tabakasında longitudinal olarak seyreden arteriyoller ve venüllerdir. Bu bölgeye vaza nervorum denir ve bu dallar mezonörium denen gevşek bağ doku kılıfı içerisinde uzanırlar. Vaza nervorumlar sinirlere yandaş seyreden damarlardan gelen besleyici dallardan oluşur ve segmental dizilirler. Ekstrinsik sistem damarları farklı boyutlarda olup majör vasküler trunkuslardan, kollaterallerden ve ayrıca kasa giden perforan damarlar ve periosteal damarlardan meydana gelir. Ekstresek damarlar mezonörium denilen gevşek bağ dokusu içinde ve epinöriumda seyrederek. Besleyici damar epinöriyuma ulaştığında, epinörium içinde dallanarak, inen ve çıkan dallar ile intranöral pleksusu besler. Ekstresek sistemin venleri sıklıkla arterlere eşlik eder. Epinöriumdaki intranöral damarlar, eşlik eden sinir liflerince sempatik innervasyonun kontrolü altındadır. Ekstresek dolaşımdaki kan akımı adrenerjik uyarı (sempatik uyarı), epinefrin ve lokal anesteziyelerden etkilenir (91,92) ve az miktarda da arteriyel CO₂ den etkilenir. Mezonöriumda uzunlamasına seyreden damarlar mezonöriyumu yer yer delerek, intrinsek sistemle anastomozlar yapar.

2.8.2. İntrensek Vasküler Sistem

Fasiküler, endonörium ve perinöriumda bulunan oblik konfigürasyonlu mikrodamarlardır ve ekstresek besleyici damarların dallanması ile başlar. Ekstresek damarlar fasikül içerisine girerek kapiller mesafede intrinsek pleksusu meydana getirirler. İntrensek sistem, epinörium, perinörium ve endonörium içerisinde yer alan vasküler pleksuslardan meydana gelir, endonöral kapiller ve mikrodamarları içerir. Her iki sistem arasında transvers olarak anastomotik mikro damarlar bulunmaktadır. Dallar epinörium içinde uzunlamasına seyrederek. İntrensek sistem hücresel metabolizmaya yardımcı “exchange sistem” olarak görev yapar. Bu damarlarda kan akımının belli bir yönü olmayıp, her iki yönde de gerçekleşmektedir. İntrensek sistem işlevini ekstresek sistemden bağımsız gerçekleştirebilir. Bu sistem metabolik olaylardan, sempatik uyarılardan, lokal ilaçlardan ve çevresel değişimlerden etkilenmez. İntrensek dolaşımın prekapiller sfinkterleri olmadığından endonöral dokunun metabolik ihtiyaçlarından fazla kan akımı sağlanmış olur. Venöz sistem arteriyel sisteme eşlik eder. Bu iki sistem arasındaki dengeleyici bazı mekanizmalar, siniri vasküler problemlere karşı korur (2,16,89). İntrensek sistemden gelen dönüş akımı ise epinöriumda bulunan venüllere drene olur. Vasküler

yapıdaki bir bozulmada sinir fonksiyonel ve yapısal değişikliğe uğrar. Bu iki damar sistemi arasında bir baskınlık yoktur. Epinöral ve perinöral damarların birbirleri arasında çok sıkı anastomotik bağlantılar vardır. Bu anastomatik damar ağı ile periferik sinir, iskemiye karşı direnç sağlamış olur (93). Epinöral ve endonöral damarlar yapısal olarak bazı özellikler gösterirler. Epinöral damarlarda bulunan endotel hücreleri arasında protein makromoleküllerinin geçişine izin veren açıklıklar bulunur. Epinöriumdan difüzyon ile geçebilen proteinler, geçirgen olmayan perinöriumdan geçemezler. Morfolojik olarak endonöral pleksus damarları, ağırlıklı olarak postkapiller venül ile devam eden küçük, kapiller benzeri yapılardır. Epinöriumda fibroblastlar bulunmaktadır, yaralanmaya şiddetle yanıt verirler ve çoğalırlar. Bu yüzden kronik enflamasyonlu sinirlerde eksternal epinörium 2-3 mm kalınlaşabilir ve sonuçta fibrozis gelişir travma sonrası sinirin elastikiyetinin azalmasına yol açar, bunun sonucunda da limitli harekete ve sinirin gerilmesine neden olur (8). Endonöral endotelyal hücreler komşu hücrelerle sıkıca bir arada bulunarak, endonöral boşlukta proteinlerin ekstravazasyonunu engellerler. Bu hücrelerle birlikte perinörium kan-sinir bariyerini oluşturur. Bu yüzden cerrahi disseksiyon sırasında perinöriumun hasar görmemesine dikkat edilmelidir (90). Endonöral vasküler yatak, fasiküller boyunca devamlı anastomotik ağlar oluşturur ve bu sayede sabit bir fasiküler kan akımı sağlanır. Bu bölgedeki dolaşım, perinöriumun daha dış tabakalarında geçerli olan sempatik innervasyonun aksine, lokal perfüzyon basıncı ile dengede tutulmaktadır (2,16,17). Periferik sinirlerdeki damarlar, sinüzoidal ve kıvrımlı bir yapıya sahiptirler. Bu sinüzoidal ve kıvrımlı yapısal özellikleri sayesinde, vasküler sistem gerilme tipi travmalarda hasardan korunur (2,8,17). Son derece iyi vaskülarize olan periferik sinir gövdesi travmaya vasküler permeabilitede artma ve intranöral ödemin de görüldüğü inflamasyonla yanıt verir. Ufak travmada epinöral damarlar hızla tepki göstererek epinöral ödem meydana gelir. Fakat perinöriumun bariyer görevi görmesinden dolayı ödem endonöral boşluğa ulaşamaz. Daha şiddetli travmalarda endonöral damarların da permeabiliteleri artarak dolaşımdaki proteinler endonöral boşluğa geçerler. Perinöral difüzyon bariyeri bozulmadan endonöral ödem meydana gelirse, bir nevi minyatür kapalı kompartman sendromu meydana gelir (90). Kesi hattında meydana gelen gerginlik aksonal geçişi dolayısı ile rejenerasyonu etkilemektedir. Sinir lifinde perinöriumun cerrahi olarak disseke edilmesi sinir iletimini bozarken, epinöriumun disseke edilmesinin böyle olumsuz bir etkisi yoktur (76).

2.9. Sinirin Lenfatikleri

Periferik sinirlerde klasik bir lenfatik sistem yoktur. Epinöriumda arterlerle birlikte seyreden lenfatik kapillerler bulunur. Epinöriumdaki damarlar kan-sinir bariyeri içermez. Epinöriumda lenfatik yapılar da yine bu tabaka içinde uzanır (8). Endonöriumda ve fasiküller içinde lenfatik kapillerler yoktur. Perinörium ve endonöriumda bulunmayan lenfatik kanallar epinörium boyunca iki taraflı olarak bölgesel lenf düğümlerine drene olan kapiller lenfatik ağ bulunmaktadır. Periferden merkeze olan lenfatik akıma nazaran, merkezden periferik olan akım daha kuvvetlidir (90). Fakat sinir lifleri arasında sıvı dolu endonöral boşluklar vardır. Bu endonöral boşluklarla lenfatikler arasında, perinörium etkin bir bariyer oluşturur. Endonöral boşlukta klasik bir lenfatik sistem olmadığı için, travma sonrasında oluşan ödem erken dönemde fasikül içerisindeki basıncı arttırarak, sinirin normal fonksiyonunun devamı için gereken mikroçevreyi bozar. Bu sebeple travma sonrası kan-sinir bariyerinin bozulmasıyla oluşan endonöral ödem dışarıya çıkamaz; fibroblast invazyonu ve endonöral skar gelişir (8). Normalde endonöral damarlar geçirgen değildir, ancak travma sonucu geçirgenliklerinin artması ile oluşan endonöral ödem, yine endonöral mikrodolaşım ile temizlenir (87,89). Ancak bu kapalı kompartman yapılıması; sinirin aktif enfeksiyon bölgesinden bile zarar görmeden geçmesini sağlar. Perinörium zedelendiğinde, enfeksiyonun sinir fasikülleri boyunca ilerlediği görülmektedir (94).

2.10. Sinirin İnervasyonu

Periferik sinirlerin nervi nervorum denilen özel sinirleri, perivasküler pleksus yoluyla vazomotor innervasyon sağlayan sempatik sinir lifleri ile sinirin ağrı duyusunu sağlayan serbest sinir uçları vardır. Bunlar epinörium, perinörium ve endonöriumun her birinde bulunup duyu ve sempatik lifler içerir (8).

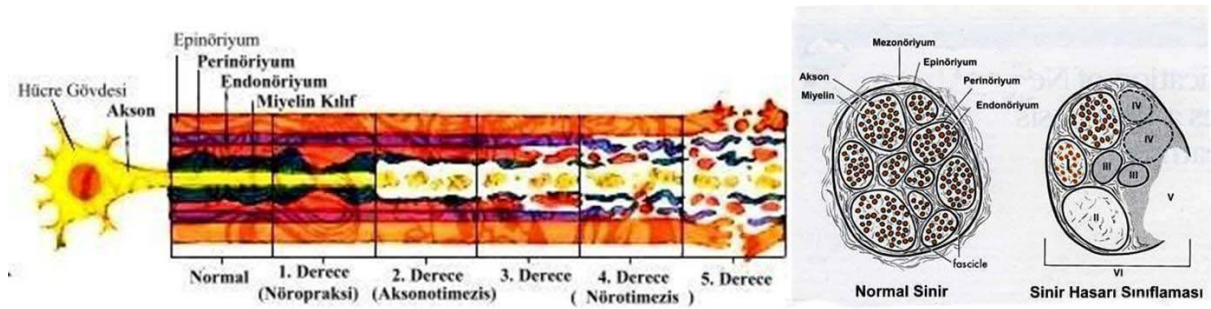
2.11. Periferik Sinir Yaralanmaları

Periferik sinir mikroanatomisinin çok komplike olmasından dolayı sinire uygulanacak kompresyon, intranöral doku komponentlerine bir çok yoldan etki eder. Aksonlar bağ doku tabakaları ile çok iyi korunurlar ve kompresyonun erken evrelerinde direkt bir hasara uğramazlar. Orta dereceli bir kompresyonda yüzeysel tabakada, yani epinöriumda mikrovasküler staz, ödem ve uzun vadede intranöral fibrozis gibi doku reaksiyonları meydana gelir. Bu dönemde inflamasyonun etkisi sinir liflerine sekonder etkidir (95). Periferik sinirlerde yaralanma mekanizmalarının bilinmesi, teşhis ve tedavinin prognozu açısından önemlidir. Periferik sinir hasarları, uzun süre sıkışmanın oluşturduğu

hasardan, termal, iskemik, kimyasal hasara ve travma sonucu meydana gelen akut yaralanmalara kadar değişken bir spektrumu içerir. Kesici alet yaralanmaları ve ateşli silah yaralanmaları sonucu sinir hasarı oluşabilir. Germe-traksiyon tarzı yaralanma, genellikle fraktür-dislokasyon sonrası meydana gelir. Sinir yaralanmalarının en yaygın görülen tipi gerilme tipi yaralanmalardır (5). Periferik sinirler, kollajen içeren endonöriyumları sayesinde belli bir elastikiyete sahiptirler; ancak traksiyon kuvveti sinirin esneme kapasitesini aşarsa bu tip hasar meydana gelebilir ve devamlılık tamamen kaybolabilir. Bununla birlikte, çoğu yaralanmada devamlılığın genellikle korunduğu bildirilmiştir. Gerilme tipi yaralanmalar genellikle, periferik sinir izolasyonunda veya ekstremitte kırıklarında, sinirle kemiğin yakın olduğu noktalarda görülür. İkinci sıklıkta laserasyonlar gelir ve bu tip yaralanma sıklıkla bıçak benzeri penetran aletlerle oluşabilir. Bu tip yaralanmalarda tam bir kesi olabilmesine rağmen, bazı sinir elemanlarının devamlılığı korunabilir (4,5). Kompresyon tipi yaralanmalar ise yine sık görülür ve tuzak nöropatileri, alçı sıkıştırması, kompartman sendromu gibi nedenlerle meydana gelebilir. Sinir devamlılığı korunmuş olmasına rağmen, hem duyu hem de motor kayıp oluşabilir. Patofizyolojisi tam açıklanamamıştır, ancak muhtemel mekanizma mekanik kompresyon ve bunun sonucunda oluşan iskemidir (5). Herhangi bir ilacın periferik sinir içine veya yakınına enjeksiyonu geçici duyu kaybından paraliziye kadar değişen oranlarda sinir hasarı yapabilir. Büyük çaplı miyelinli liflerin, küçük çaplılara oranla daha fazla iskemik etkiye uğradığı gösterilmiştir. Kısa süreli iskemide, histolojik değişiklikler genellikle geri dönüşümlüdür. Şiddetli iskemik hasara uğramış sinirde, genellikle fonksiyonun kaybolabileceği ve tam bir iyileşmenin oluşmayabileceği kabul edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ezilme tipi yaralanmalarda mekanik deformasyonun etkilerinin daha ön planda olduğu görüşü kuvvetlenmiştir (4,5,96). Kompresyonun etkisi sonucunda oluşan yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ile aksonal transport sekteye uğrar. Ayrıca Schwann hücresi gibi nöral olmayan hücreler de proliferasyon olarak kompresyona cevap verirler. Kompresyonun sekonder etkisi ise yüksek basıncın kendisinin yaptığı direkt etkidir. Bu da direkt miyelin hasarına ve aksonal düzenin bozulmasına neden olur (95). Elektrik ve termal yaralanmaların tedavileri zordur ve prognozları kötüdür. Sinir hasarına ek olarak yumuşak doku hasarı da söz konusudur. Periferik sinir yaralanmaları; yaralanma şekli ne olursa olsun, oluşan sinir hasarının onarımı ve fonksiyonların tam geri kazanımı günümüzde bile cerrahi bir problem olmaya devam etmektedir. Travmanın şeklinin yanı sıra, sinir içyapısında oluşan hasar derecesi de elde edilecek iyileşme miktarı ile yakından ilişkilidir (16,19).

2.11.1. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması

Periferik sinir lezyonların sınıflandırılmaları, sinir liflerinde ve trunkuslarda olan yapısal veya fonksiyonel değişikliklere göre yapılabilir. Mekanik iletim bloğunda kompresyon gibi lokal intranöral mikrosirkülasyonun bloğu varsa metabolik (fizyolojik) iletim bloğundan bahsedilir. Çünkü sinir iletimi lokal enerji desteğine (kanlanmasına) bağlıdır. Bu durumda yapısal olarak sinir sağlam olsa bile impuls iletiminde problem oluşur. Üst ekstremiteye uygulanan turnikenin sistolik basınçtan çok yüksek şişirilmesi, peroneal sinirin ayak ayak üzerine atılıp uzun süre kalındığında ayakta hissedilen iğnelenme bu duruma gösterilebilecek örneklerdir. Beslenmemeye bağlı bir iletim bozukluğu olan metabolik iletim bozukluğu, kompresyonun kaldırılması halinde hemen geri döner. Uzun süren iskemilerde geri dönüş, iskemik kalma zamanına bağlıdır. Altı-sekiz saat iskemi sinir liflerinin geri dönüşsüz hasarı için kritik bir zamandır (97). Periferik sinir onarımının başarısı, süreye ve sinir yaralanmasının derecesine bağlıdır (5,68). Sinir hasarlarını sınıflandırmanın önemi; sinir hasarının prognozunu belirlemek ve ona yönelik tedavi planının seçilmesine temel oluşturmaktır (6). Periferik sinir yaralanmaları ile ilgili ilk sınıflama, 1941 yılında Cohen tarafından önerilen ve 1943 yılında Seddon tarafından bildirilen nöropraksi, aksonotimezis ve nörotimezis tarzındaki üçlü ve kullanımı kolay sınıflamadır (9). Sunderland, 1951 yılında bu sınıflamayı detaylandırarak, 1 ile 5 arasında değişen 5 grup sinir yaralanma tipi tanımlamıştır. 1988 yılında Mackinnon birkaç tip sinir hasarını bir arada içeren 6. derece sinir hasarını bu sınıflamaya dahil etmiştir (8,17,98). Seddon ile Sunderland tarafından geliştirilen sınıflandırma günümüzde yaygın olarak kabul edilmekte ve kullanılmaktadır (4,5,68,99). (Şekil 6).



Şekil 6: Periferik sinir yaralanmalarının sınıflaması (Seddon ve Sunderland). (©Elsevier. Inc. – Netterimages.com)

2.11.1.1. Seddon Sınıflaması

Seddon 1943 yılında sinir yaralanmalarını şiddetine göre 3 üç temel sınıfa ayırmıştır. Kendi orijinal terimleri olan, nöropraksi, aksonotomezis ve nörotomezisi tanımlamıştır. Bu sınıflama geniş oranda kabul görmüştür ve yaygın olarak kullanılmaktadır (9).

Nöropraksi: Seddon'un orijinal sınıflamasına göre nöropraksi; komplet motor paralizi varken, duysal ve sempatik fonksiyonların devam etmesini tanımlar. Bu yaralanmaların en hafif tipidir. Geçici segmental (lokal) iletim bloğu ile karakterize olup, anatomik bütünlük ve aksonal devamlılık korunmuştur (76,86). Lokal miyelin onarımı gerçekleşince spontan iyileşir ve iyileşme tam olur, nöropraksi tedavisinde cerrahiye gerek yoktur. Ancak iyileşme zamanı 5 gün ila 3 ay arasında değişir (ortalama 6–8 hafta). Sinir, makroskopik olarak normaldir, histolojik olarak en sık demiyelinizasyon görülür (17). Nöropraksi'de, miyelin yapısında bazı değişiklikler meydana gelmesine rağmen, oluşan geçici fonksiyon kayıplarının yaralanma bölgesindeki lokalize bir iyon-aracılı iletim bloğundan dolayı oluştuğu düşünülmektedir (99). Kalın liflerin deformasyon özelliğinden dolayı, ince lifler kompresyona kalın liflere göre daha az hassas olurlar. Bu nöropraktik lezyonların sadece motor veya sadece duysal kayıplar şeklinde değil mikst tablolar şeklinde ortaya çıkmasına neden olur (100). Hasarın distalindeki sinir normal kalır ve yaralanma distalindeki kasların uyarılabilirliği korunduğu için Wallerian dejenerasyon görülmez (16). Geçici kompresyon, traksiyon ve künt travma ile oluşabilir. Örnek olarak turnike paralizisi ve cumartesi gecesi paralizisi (Saturday night palsy) gösterilebilir. Aksonal bir hasar olmadığı için, sinir tomurcuklanmasını (rejenerasyonu) gösteren Tinel bulgusu yoktur (17).

Aksonotomezis: Bu tip lezyon ezilme tarzı yaralanmalar, ciddi kompresyon veya gerilim tipi yaralanmalar neticesinde oluşur. Hasar bölgesinde miyelin kılıf ve aksonal devamlılık bozulur, Schwann hücreleri bazal membranı, endonörium, perinörium ve epinörium sağlamdır. Böyle bir yaralanma sonrası, lezyon seviyesinin distalinde Wallerian dejenerasyon, proksimalinde ise aksonal tomurcuklanma görülür. Böylece lezyonun distalinde tam bir motor, duyu ve otonomik fonksiyon kaybı oluşur. Wallerian dejenerasyon vardır ama endonöral tüp sağlamdır. Endonöral doku ve bazal membran, Schwann hücreleri için kılavuz tüp görevi görerek prolifer olmalarını sağlar (101). Sağlam endonöral tüpler boyunca miyelin kılıf oluşumu ve aksonal büyümeyle birlikte spontan rejenerasyon görülür. Destek bağ dokular sağlam olduğu için prognoz iyidir ve fonksiyonel geri dönüş tamdır. Fonksiyonların geri dönmesi ve iyileşme süresi; son organ

ve lezyon arasındaki mesafeye, hasarın şiddetine, hastanın yaşına ve rejenerasyon miktarına bağlıdır. Rejenerasyon günde 1–2 mm hızla olur, ancak iyileşme süresince uyarılmayan kaslarda denervasyon atrofi gelişebilir (8,86,101). Endonöral kılıf bütünlüğü korunduğu için aksonlarda yanlış yöne büyüme olmaz doğru periferik hedeflere doğru büyürler. Spontan rejenerasyon beklenen bu tip yaralanmada Tinel bulgusu vardır ve aksonal rejenerasyon ilerledikçe, bu bulgu da distale doğru ilerler (17). Cerrahi ancak intranöral skarlaşma durumunda söz konusudur.

Nörotomezis: En ciddi yaralanmalardır. Anatomik olarak sinirde ciddi hasarlanma vardır. Distalde daha fazla olmak üzere, hem distalde hem de proksimalde dejenerasyon vardır. Sinir elemanlarının bazılarının ya da tamamının devamlılığı bozulmuştur. Sinirin tam kesilmiştir veya endonörium, perinörium ve epinörium hasarlanmıştır. Klinik ve EMG görünümü aksonotmezisle aynı olabilir. Lezyon distalinde denervasyona bağlı tüm motor, duyu, otonomik fonksiyonlarda kayıp meydana gelir (9). Bu tip hasarın yaygın nedenleri; laserasyon, direkt mermi yaralanmaları, ciddi ezilme, traksiyon, kimyasal madde enjeksiyonu ve şiddetli iskemik yaralanmalar olabileceği gibi iletimi engelleyen ya da siniri infiltre eden bir tümör veya skar dokusu da olabilir (98). Bu tip yaralanmada aksonda yeniden büyümeyi yönlendirecek yapılar kaybolur ve skar oluşur. Sinir devamlılığı bazı durumlarda görülebilir de, sinirin iç yapısındaki bozulma nedeniyle sinirde fonksiyon yoktur. Sinir fasikülünün iç yapısı, aksonlardaki yıkım ve Wallerian dejenerasyon nedeniyle bozulmuştur. Endonöral kılıf bütünlüğü de çeşitli derecelerde bozular. Bunlara ek olarak kanama, ödem, şiddetli iltihabi reaksiyona neden olur ve fibrozis kaçınılmaz hale gelir (86). Bu tür yaralanmada nöroma oluşma ihtimali yüksektir. Cerrahi girişim yapılmadan spontan rejenerasyon mümkün değildir (8,16,99). Prognoz; hastanın yaşına, paralizinin süresine, lezyonun seviyesine, hasarlanmış sinire, cerrahinin yapıldığı zamana ve tekniğe bağlıdır. Nörotomezis tarzında yaralanan bir periferik sinirde, tam fonksiyonel iyileşme beklenmez (4).

2.11.1.2. Sunderland Sınıflaması

Sunderland, 1951 yılında sinirde meydana gelen hasarı temel alan anatomik içerikli ve beş dereceden meydana gelen sınıflamasını ortaya koymuştur (10,102).

1. Derece Hasar: Seddon sınıflamasındaki nöropraksi tipi hasara eşdeğerdir. Akson ve sinir kılıf yapıları sağlamdır; ancak travma alanındaki sinir segmentinde iletim kaybı ve lokal demiyelinizasyon vardır. Wallerian dejenerasyon meydana gelmez, spontan iyileşir (17,86).

2. Derece Hasar: Seddon sınıflamasında aksonotimize ise eşdeğer olarak kabul edilmiştir. Sinir kılıf yapıları sağlamdır; ancak akson bütünlüğü kesintiye uğramıştır. Distal segmentte Wallerian dejenerasyon gelişir. Schwann hücre bazal membranı ve endonöral kılıf sağlam olduğu için prognoz iyidir ve spontan iyileşir (17,86,98).

Sunderland'a göre 3, 4, 5. derece hasarlar nörotimize ise eşit olup 3.derecede endonörium, 4.derecede endonörium ve perinörium, 5.derecede endonörium, perinörium ve epinörium hasarı mevcuttur.

3. Derece Hasar: Seddon sınıflamasındaki aksonotimezis ve nörotimezisin bir karışımı olarak kabul edilir. Bu tip yaralanmalarda epinörium ve perinörium sağlamdır, ancak Schwann hücre kılıfı, endonörium ve akson devamlılığı bozulmuştur. İç yapının bu düzensizliği ve devamsızlığı ciddi kompresyon veya hasar sonucu oluşabilir. Endonöriumdaki hasarın derecesine bağlı olarak iyileşme oluşabilir. Akson distalinde Wallerian dejenerasyon meydana gelir. Endonörium ve Schwann hücre kılıfı hasar gördüğü için iyileşme tam olmaz (17,86). İlimli bir 3. derece hasar intrafasiküler alanda minimal fibrozis ve iyi derecede rejenerasyonla iyileşebilir ki, bu tarz lezyonlar aksonotimizeye karşılık gelir. Buna karşın şiddetli bir 3. derece hasarda, rejenerasyonu engelleyecek şekilde fibrozis oluşabileceği için, böyle bir yaralanma nörotimezis olarak kabul edilir (98). Rejenerasyon, ayda yaklaşık 1 cm ilerler ve bu klinikte distale doğru ilerleyen Tinel bulgusu ile takip edilebilir. Rejenerasyon sırasında nöroma oluşumu ya da motor ve duyu liflerin yanlış eşleşmeleri kötü fonksiyonel sonuçlara neden olabilir (8,86). Bu durumda nöromanın ve skarın tamamının cerrahi rezeksiyonu gereklidir.

4. Derece Hasar: Sinirin epinörium dışındaki tüm tabakalarının devamlılığı bozulmuştur. Fiziksel olarak sinir bütünlüğü devam etmekle birlikte, oluşacak skar dokusunun yaratacağı blok sinir rejenerasyonunu engeller ve hasar bölgesinde nöroma oluşumuna neden olur. Spontan iyileşme görülebilmesine karşın oldukça nadir olduğu için cerrahi onarım önerilir. Bu tip hasarlanmada, hasarlı kısmın eksize edilerek sinir uçlarının cerrahi olarak ucuca sütüre edilmeleri gerekir (8,86). Tinel bulgusu hasar bölgesinde mevcuttur, ancak rejenerasyon skar dokusu ile engellendiğinden distale ilerleyemez. Lezyon distalinde Wallerian dejenerasyon vardır. Bu tip hasar sıklıkla gerilim, traksiyon, ezilme, koter yaralanması veya sinire yapılan yanlış enjeksiyon sonucu meydana gelir (17).

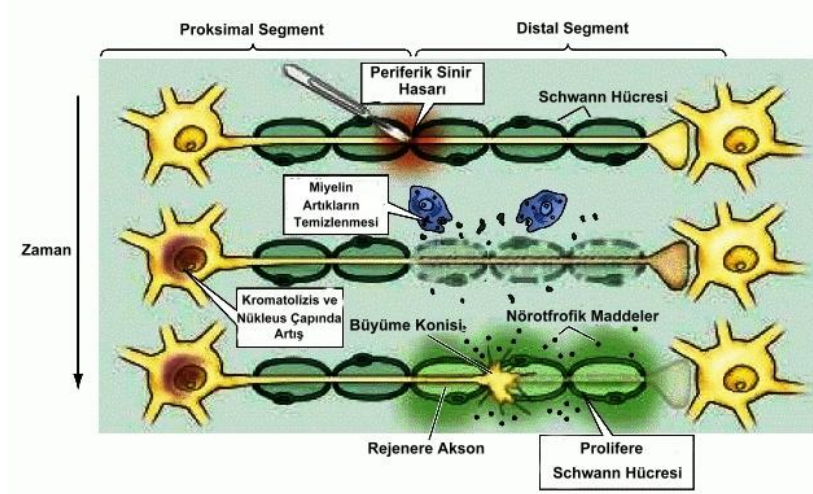
5. Derece Hasar: Sinir tamamen kesintiye uğramaktadır, epinörium da dahil olmak üzere sinir devamlılığı tam olarak kaybolmuştur ve cerrahi onarım şarttır (4,5,99,103). Cerrahi onarım veya greftleme olmaksızın iyileşme mümkün değildir. Sıklıkla penetran travmalar ile meydana gelir (8,17). Bu tip yaralanmada hemen her zaman

tamir bölgesinde, aksonal hedefte uygunsuzluk (misdirection) olduğu için aksonal rejenerasyonun prognozu iyi olmaz.

6. Derece Hasar: Mackinnon bu sınıflamaya 6. derece sinir hasarı şeklinde bir ekleme yaparak sınıflandırmayı modifiye etmiştir. Mikst tip sinir hasarı denen bu grupta, aynı sinir boyunca değişik seviyelerde ve farklı derecelerde sinir hasarları bir aradadır (104). Bu, kimi liflerde akson kaybının kimi liflerde ise ileti bloğunun olduğu mikst yaralanmadır. Bu tür lezyonlar çok yaygındır ve pür akson kayıplı lezyonlardan ayırım için dikkatli elektrodyagnostik inceleme gerektirir. Özellikle ezici tip yaralanmalarla meydana gelir. Bazı fasiküller normaldir, bazılarında spontan iyileşme beklenir, ancak 4. ve 5. derecede hasarlanmış fasiküllerde rejenerasyon mümkün değildir. Tedavisinde intranöral nöroliz ile sağlam fasiküllere zarar vermeden, 4. ve 5. derece hasarlı fasiküllerin cerrahi onarımları gerekir (17,98).

2.12. Sinir Dejenerasyonu

Periferik sinir sisteminde santral sinir sisteminden farklı olarak hem dejenerasyon hem de rejenerasyon görülür (54,105,106). Periferik sinir liflerinin dejenerasyonunu ve rejenerasyonunu başlatan ve devam ettiren moleküler mekanizma hala tam olarak anlaşılamamıştır. Biyolojik açıdan, sinir yaralanması ve onarımından sonra fizyolojik sonuçları etkileyen faktörler; yaralanmanın başlangıçtaki şiddeti, meydana gelen dejeneratif değişiklikler, hasar sonrası sağlam kalan sinir hücrelerinin sayısı, aksonal büyümenin hızı ve kalitesi, rejenerasyon olan aksonların uygun şekilde düzenlenmeleri, uç-organların mevcut durumudur. Klinik olarak iyileşme sıklıkla tam olmaz ve en sık zayıf ya da anormal duyu, motor fonksiyonlarda kayıp, soğuk intoleransı, ağrı gibi hastanın sosyal hayatını ve iş hayatını etkileyen olumsuz belirtilerle seyreder (18). Yalnızca iletim bloğunun olduğu birinci derece yaralanmalarda, patolojik değişiklikler ya hiç yoktur ya da çok hafiftir. Daha ciddi sinir hasarlarında yaralanma bölgesinin yanı sıra, yaralanma bölgesinin proksimalinde, distalinde ve sinir hücresinin gövdesinde bir takım yapısal ve işlevsel değişiklikler meydana gelir (54,73,77,82,107-109). Hasar distalindeki tüm miyelinli veya miyelinsiz liflerde seviyesi ne olursa olsun, tüm distal aksondan hedef organa kadar, akson ve çevre miyelinde fragmentasyon yani Wallerian dejenerasyon meydana gelir (5,65,66,68,110-114) (Şekil 7).



Şekil 7: Akson Dejenerasyonu (Wallerien Dejenerasyon) (Purves D., Augustine GJet al. Neuroscience Sinauer Associates, Inc.; 2001.)

Periferik sinirde meydana gelen herhangi bir hasarda, yaralanmanın şiddetine göre, aksonal devamlılığın bozulduğu yerin proksimalinde; korunmuş son internoda kadar daha sınırlı bir dejenerasyon meydana gelir. Kural olarak, aksondaki hasar hücre gövdesine ne kadar yakın ise, hücre gövdesinde o denli önemli değişiklikler meydana gelir (54). Nöronda yani hücre gövdesinde santral kromatolizis ve nükleus çapında artma gözlemlenir. Bu nöronun rejenerasyon için gerekli yapısal proteinleri üretmesi için yaptığı metabolik hazırlığı temsil eder.

2.12.1. Proksimal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler

Lezyon düzeyinden itibaren proksimal bölümdeki ilk Ranvier düğümüne kadar olan sinir segmentinde önce dejenerasyonla ilişkili bazı değişiklikler meydana gelir. Aksonda, hasar sonrası hücre gövdesinde gelişen değişikliklere retrograd dejenerasyon adı verilir (54,63,77). Yaralanmaya bağlı olarak, nöron perikaryonunda ve sinir lifi proksimalinde meydana gelen değişiklikler, yaralanmanın şiddetine ve yaralanan bölgenin perikaryona yakınlığına bağlıdır. Şiddetli travmalarda olduğu gibi, sinir hücresi perikaryonu tam olarak dejenere olduğunda, proksimal segmentin tamamı Wallerian dejenerasyon bulgularını göstermektedir (4,5,15,96,99). Yaralanan bölgenin yakınındaki proksimal segment boyunca, Schwann hücrelerinde yapısal değişiklikler ile akson ve miyelin kılıf çapında azalma meydana gelir. Yaralanmayı takiben proksimal segmentte, akson çaplarının azalmasıyla beraber sinir iletim hızı da düşer. Aksonal yaralanma sonrasında, altı saat içerisinde sinir hücre gövdesi şişer ve hacmi artar, hücre çekirdeği periferik doğru göç eder, nissl cisimcikleri ve granüllü endoplazmik retikulumlar yıkılır. Sitoplazmanın yapısı değişir ve bu değişikliklerin tümüne birden 'kromatoliz' denir (59,68,96,110).

Yaralanmadan sonra, RNA ve protein sentezi artar. Aksonal kesi sonrası, hedef hücrelerce salgılanan nörotrofik faktörler açığa çıkar ve retrograd aksonal transportla hücre gövdesine taşınır. Bu reaksiyonel değişiklikler hasar sonrası 2 ila 3. haftalarda en yüksek değerine ulaşır. Bu değişikliklerin amacı kaybolan aksoplazmik hacmi yerine koyabilmektir (5,16). Wallerian dejenerasyonda primer histolojik değişiklik, akson ve miyelin kılıfta oluşan yapısal bozukluklardır. Dejenerasyon sonucu gözlenen başlıca yapısal değişiklikler, nöronda nörotübül ve nörofilamanların düzensiz hale gelmesi, akson ve miyelin kılıfın birbirlerinden ayrılmaları, aksonda varikoz şişkinliklerin oluşmasıdır. Miyelin kılıf dejenerasyonu özellikle 36-48 saat içinde belirgin hale gelir. Yaralanmadan sonra 48-96 saatte genellikle akson devamlılığı kaybolur ve impuls iletimi bozulur. Wallerian dejenerasyonda Schwann hücrelerinin anahtar rol oynadıkları kabul edilmektedir (15,64,65). Bu hücreler yaralanmadan sonra 24 saat içinde aktif hale geçer, çekirdek ve sitoplazmik büyüme gösteren hücreler, hızla bölünerek, dejenerasyon ve tamir sürecine yardım edecek bir çok molekülü eksprese eder. Schwann hücreleri dejenerasyon sonrası, akson ve miyelin artıklarını ortadan kaldırır. Periferik kandan göç eden makrofajlar ile Schwann hücreleri, fagositoz yaparak, yaralanma bölgesini 1 haftadan bir kaç aya ulaşan bir sürede temizler (5,15,115). Bu süreçte, endonöriyumda bulunan mast hücrelerinin de önemli rollere sahip oldukları bilinmektedir. Sinir yaralanmasını takiben, mast hücrelerinden salgılanan vazo aktif aminler fagositleri stimüle ederler. Bu hücreler yaralanmadan sonra ilk 2 hafta içinde çoğalırlar, makrofaj göçünü kolaylaştıran ve kapiller permeabiliteyi arttıran histamin ve serotonin salgırlar (65). Bunun sonucunda aksoplazma erir ve aksolemma parçalara ayrılır. Başlangıç evresinde, travmaya cevap olarak endonöral tüp şişer, ilk iki haftadan sonra çapı oldukça azalır. Alttaki granüler yapı kaybolur ve bu esnada miyelin kılıf intakt kalacaktır. Fakat makrofajlarca, Schwann hücrelerinin miyelin debrisleri fagosit edilir. Daha sonra Schwann hücreleri prolifer olmaya başlarlar, bu olaylar yaralanmadan yaklaşık olarak 12 saat sonra başlar, 3 günde maksimuma ulaşır ve yaklaşık 2 hafta sürer (116). 5-8 haftada dejenere olan sinir artıkları genellikle ortadan kaldırılmıştır. Daha ciddi sinir hasarında travma-aracılı lokal bir reaksiyon meydana gelir. İntrafasiküler yaralanmalarda sinir lifi distal kısımları elastik endonöriyumlarından dolayı retraksiyona uğrar. Lokal vasküler travma, güçlü inflamatuvar cevapla sonuçlanan hemoraji ve ödeme neden olur. Fibroblastlar prolifer olur ve oluşan fibröz bağ dokusu, yaralanan segmentte şişkinliğe neden olur. İntrafasiküler skar dokusu sinir gövdesinde de gelişir ve genellikle perinöral skar dokusu ile birleşir (5). Eğer erken bir dönemde sinirin kesik uçları cerrahi olarak karşı karşıya getirilir ise, proksimaldeki aksonal uzantılar

distalde yer alan sinir segmentine doğru büyümeye devam eder. Aksi halde, aksonal uzantılar çevre doku içine doğru yanlış bir yönelim göstererek sonlanır.

2.12.2. Distal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler

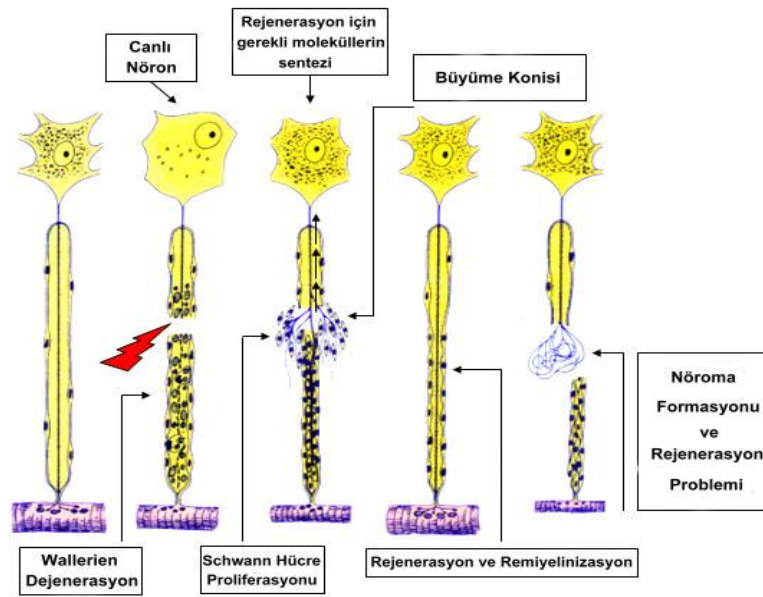
Aksonların çeşitli sebeplerle devamlılığı bozulduğunda, yaralı bölgenin distalinde kalan sinir parçası Wallerian dejenerasyona gider. İlk kez 1850 yılında Waller isimli araştırmacı kurbağa hipoglossal sinirinde, sinirin kesilmesi sonrasında distal segmentte oluşan değişiklikleri gözlemlemiş ve bu dejeneratif sürece “Wallerian Dejenerasyon” ismini vermiştir. Wallerian dejenerasyon ile akson ve miyelin kökenli maddelerin temizlenmesi sağlanırken, rejenere olan aksonun büyümesi için uygun ortam oluşturulur. Ortada oluşan içi boş tüp yapısına endonöral tüp adı verilir (19,76,117). Sinir kesildikten sonra, Schwann hücrelerinin mitotik aktiviteleri artar. Schwann hücre proliferasyonu, yaralanma sonrası 3. günde pik yapar ve ilk hafta boyunca tedrici olarak azalır (16,76). Aksoplazmanın mikrotübül ve nörofilamentleri proteolitik süreçten dolayı bozulur. Aksoplazmik hücresel iskelet, proteolitik enzimler ile yıkılır. Bu işlem kalsiyum bağımlıdır ve aksoplazmada nörofilaman yıkımı, kalsiyum ile aktive olan proteolitik enzimlerle meydana gelir. Her ne kadar bu değişiklikler kesilme sonrası 1-2 saat içinde başlasa da, distal güdükte morfolojik değişiklikler 2-3 gün içinde görünür hale gelir. Aksonal şişmeyi takiben miyelin yapısı fragmente olur. Zaman içinde miyelin, Schwann hücrelerince ve makrofajlarca fagosite edilerek ortamdaki uzaklaştırılır. Aksonotomi sonrası bu fiziksel değişikliklerin büyük bir kısmı ilk birkaç hafta içerisinde tamamlanır, ancak tüm debrisin temizlenmesi ve bütün miyelin fragmanlarının uzaklaştırılması birkaç ayı bulabilir (16,19). Yaralanmadan sonra 3-4 ay içerisinde, endonöral tüp küçülmeye başlar. Endonöral tüpler, hasarlanma sonrası ilk 3 ay içinde orijinal çaplarının %10-20'si kadar bir oranda küçülürler (5). Schwann hücresi bazal laminasının dış yüzeyindeki kollajene ilaveten, endonöral kılıfta da kalınlaşma gözlenir. Endonöral tüp genellikle rejenere bir akson ile birleşir, akson ile bağlantı kurulmadığında, artan fibrozis ile birlikte ilerleyici fibrozis sonucunda tüp tamamen oblitere olur ve ortadan kalkar. Wallerian dejenerasyonunun geç dönemlerinde Schwann hücre yığınları ile karakterize kollabe endonöral tüpler mikroskopta da ayırt edilebilir. Prolifere ve diferansiye olan pluripotent Schwann hücreleri, bazal lamina boyunca dizilerek Schwann hücre sütunlarından oluşan aksonun rehber yolları olan Büngner bantlarını oluştururlar (5,66,96). Bu bantlar, sinir yaralanmasından sonra, akson büyümesi için Schwann hücrelerinin nöronları destekleyici etkilerinin önemli bir göstergesidir. Schwann hücreleri, rejenere olan aksonlar için kılavuz olmalarının yanı

sıra, nöron sağ kalımına ve aksonal büyümeye destek olur. Yaralanma sonrası, endonöral kollajen üretimi artar; bu da distal tübüllerde zamana bağımlı daralmaya yol açar (118). Sunderland sınıflamasına göre 4. ve 5.derece yaralanmalarda endonöral tüpler yapısal olarak tamamen bozulur. Schwann hücreleri ve aksonlar tanınmaz hale gelir. Bu tip yaralanmalarda epinöriumda önemli yapısal değişiklikler meydana gelir. 24 saat içerisinde dejenere olmuş sinir uçlarında reaktif epinöral fibroblastlar ortaya çıkar. Bütün bunlar, Schwann hücreleri, perinöral ve endonöral fibroblastların proliferasyonu ile beraber olur. Etkin hücresel çoğalma bir hafta içinde en yüksek düzeye ulaşarak uzun süre devam eder. Hafif yaralanmalarda olduğu gibi, kapiller permeabilite artar, bu artış mast hücre proliferasyonu, ödem ve takip eden makrofaj infiltrasyonu sonucu oluşur. Hücresel cevapların büyüklüğü, sinir ve onu saran dokulardaki travmanın şiddetiyle paraleldir. 4. ve 5. derece yaralanmalarda sinirin distalinde, şişkinleşmiş ve dejenerasyona uğramış Schwann hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar ve kollajen lif demetleri göze çarpar. Rejenere aksonlar, proksimal segmentin şişkin kısmına ulaşır ve burada çok ciddi engellerle karşılaşır. Çoğu akson skar dokusunda halka dizilimi oluşturur veya proksimal segment boyunca geri döner. Bazı rejenere aksonlar distal kısma ulaşır. Sinir rejenerasyonu, yaralanmanın şiddeti, skar oluşumunun büyüklüğü ve aksonun yaralı bölgeye ulaşmasından önce geçen süre gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebilir (4,5,99,103).

2.13. Sinir Rejenerasyonu

Bir periferik sinir kesildiğinde, kesildiği yerde rejenerasyon için büyük çaba sarf etmektedir. Nöronların çoğu yaşamaya devam eder ve periferik sinir gövdesinin fizyolojisi rejenerasyona destek olur. Periferik sinirde iyileşme süreci, rejenere olmuş aksonların periferdeki hedef organlarla fonksiyonel bağlantı oluşturması ile sonlanır. Sinirin iyileşme düzeyi, bu olaylar dizisinde fonksiyonun geri kazanımı ve uygun bağlantıların sağlanması için ekstra selüler ve selüler nöronal elementlerin ortak etkilerine bağlıdır. Bu elementler; ekstra selüler matriks, nörotrofik ve nörotropik faktörlerdir. Yine bu elementler; etkilenmiş aksonların canlılıklarını devam ettirebilmelerini, aksonal uzamayı ve miktarını, etkinliğini ya da hedef organ innervasyonunun spesifikliğini sağlar. Nöron dışı çevre de iyileşme sürecine katkıda bulunur. Nöronun efektif rejeneratif cevabı; retrograd aksonal reaksiyon sonucunda oluşmaktadır. Yaralanmayı takiben, birçok nöronda kromatolitik değişiklikler meydana gelir. Bu olay nöron gövdesinde meydana gelmektedir ve aksonal rejenerasyonun güçlenmesi için önceden olması gereken zorunlu bir süreçtir (Şekil 8). Hücrede hacim

artışı, nükleusun perifere yerleşimi ile sitoplazmadaki bazofili kaybı olur. Sinir yaralanmasını takiben, aksonal büyüme için bazı proteinlerin sentezi gereklidir. Rejenerasyon başlayınca nöronal RNA içeriği artar. Takiben glikolik asid, respiratör enzimler ve nöronal lipoproteinler gibi aksonal membran sentezi için gerekli proteinlerin sentezi artar (119). Mikrotübül ve mikro filament proteinlerinin her ikisi de aksonal büyüme ve fonksiyon artışı için gereklidir. Nörofilament sentezi aksonal uzama için gerekli değildir; fakat akson hedef hücre ile birleştiğinde nöron, aksonun çapını artırmak için nörofilamentlere ihtiyaç duyar. Benzer olarak nörotransmitter ve enzim sentezi sinaptik iletim için gereklidir fakat aksonal uzama için gerekli değildir (120).



Şekil 8: Aksonal Rejenerasyon Süreci (<http://www.neuroanatomie.at>)

Aksonotomiyi takiben tüm nöronlar canlı kalamamaktadır, motor ve duyuşal nöronların bir kısmı ölmektedir. Yenidoğan ve gençlerde, nöronların nörotrofik faktörlerle olan hedefe bağımlılıklarının daha fazla olması nedeniyle, sinir kesilmesinden sonra nöron ölümü daha fazladır. Proksimal sinir hücre yaralanmaları ile yaşlı ve yenidoğanlardaki sinir yaralanmalarında hücre ölümünün daha sık olduğu bilinmektedir. Fakat erken dönemde kesinin onarılmasının, bu hücre ölümünü engelleyebileceği deneysel olarak gösterilmiştir (119). Siyatik sinir kesisinden sonra, L5 dorsal kök gangliyonlarında aksotomili nöronların %30-50'si ölmektedir. Motor nöron ölümü ise akson kesisini takiben %30 olarak bildirilmiştir. Bu durum; sinir kesisini takiben, fonksiyonel iyileşmeye major etki yapabilmektedir. Motor sinirlerin kesilmesi sonucunda, kas liflerinde atrofi ve hedef kaybı sonucunda, nöronal atrofi meydana gelir. Yapılan prenatal çalışmalar sonucu, nöronların

gelişmeleri için nörotrofik maddelere bağımlı olduğu, bunlarında hedeflere bağılı olduğu ve retrograd olarak transport edildiği gösterilmiştir (121).

2.13.1. Proksimal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler

Aksonal yaralanma seviyesinin proksimalinde; bir ya da iki internodal segment boyunca akson dejenere olur ve endonöral tüp içi boş silindir şeklinde kalır. 24 saatlik bir latent period sonrası, proksimal kesik uçta terminal ve kollateral aksonal tomurcuklanmalar meydana gelir. Türlerine ve yaralanmanın mekanizmasına bağılı olarak zamanı değişmekle birlikte, her proksimal güdükten distale doğru uzanan, birkaç terminal ve kollateral tomurcuk oluşur. Anterograd ilerleyen bu büyümede, kollateral tomurcuklar kesi proksimalindeki aksonun sağlam olduğu Ranvier düğümlerinden köken alır. Terminal tomurcuklar zedelene aksonun proksimal ucundan çıkar ve tüp boyunca bazal lamina içinde distale doğru uzanır. Bu olayda hedef spesifikliğı yoktur. Yani bir motor akson duyuşal alanlara girerek, uygun olmayan duyuşal uyarılara neden olabilir. Rejenerasyon sadece aksonal ilerleme ile sınırlı değildir. Schwann hücreleri de aksonal ilerlemeye eşlik eder. Hatta Schwann hücrelerinin yokluğunda aksonal rejenerasyon gerçekleşmez (106). Periferik sinirlerde yer alan endonöral tüplerin yenilene aksonlara yol göstermesi ve Schwann hücrelerinin de yardımı ile aksonal rejenerasyon meydana gelir (54,63,73,78,108,109,122-124). Schwann hücresi ile akson ve ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimler periferik sinir rejenerasyonu için son derece önem taşımaktadır (81,124,125). Hasarlanmış sinirde akson ucundan tomurcuklanma ilk 6 saat içinde başlamasına karşın, bu ilk tomurcuklar genelde rezorbe olur. İnternal sitoskeletal yapıları olan kalıcı tomurcuklar, genelde ilk 24 saatin sonunda belirmeye başlarlar. Terminal tomurcuklar, kalan aksonların uç kısmından çıkarlar. Bir miyelinize aksondan çıkan ve endonöral tüp içinde ilerleyen her bir tomurcuğa, “rejenerasyon ünitesi” denir. Onarımı takip eden haftalar içerisinde, rejenerasyon ünitesi içindeki ortalama akson sayısında azalma meydana gelir. Rejenerasyon ilerledikçe, içlerinden bir tanesi matur hale gelir ve miyelinize olur bu sırada diğer aksonlar kaybolur (8). Eğer erken bir dönemde sinirin kesik uçları cerrahi olarak karşı karşıya getirilir ise, proksimaldeki aksonal uzantılar distalde yer alan sinir segmentine doğru büyümeye devam eder. Aksi halde, aksonal uzantılar çevre doku içine doğru yanlış bir yönelim göstererek sonlanır. Her bir tomurcuğun ucundaki kısma ise ‘büyüme konisi’ adı verilir (8,16,76). Büyüme konisi, düz endoplazmik retikulum, mikrotübül, mikrofilaman, mitokondri, lizozom ve diğer veziküler yapılardan zengindir. Aktin filamanları ve myozin içerir. Bu yapılar, büyüme konisinin filapoid

çıkıntılar yaparak hareketli olmasını sağlar. Distal sinir segmentindeki Schwann hücre kolonları (Büngner bantları) ve Schwann hücrelerinin bazal laminaları, büyüme konisinin ilerlemesi için uygun bir ortam sağlar. Büyüme konisinin, Schwann hücre bazal laminasında bulunan fibronektin ve laminine affinitesi vardır ve aksonal tomurcukların büyüme yönünü belirleyen faktörlerden biri de bu affinitedir (8,17). Periferik sinirin rejenerasyon kapasitesini, ilk kez Cajal isimli araştırmacı 1928 yılında kedilerin omuriliklerinde yaptığı çalışmalarda ortaya koymuştur. Aksotomiye takiben proksimal uçta pek çok tomurcuğun oluştuğunu ve bunların distale uzanarak rejenerasyonu sağladığını saptamıştır. Cajal ayrıca rejenere olan aksonların, diğer dokulardan ziyade distal sinir segmentine doğru tercih edilir bir büyüme patterni (nörotropizm) gösterdiklerini de ortaya koymuştur (18,76). Aksonal tomurcukların sayısı zamanla azalır, bazıları distal segment ile bağlantı yaparken; diğerleri regrese olur. Bağlantıyı yapabilenler mature olurlar. Uç organlardan salgılanan trofik maddeler bu yönlenebilirliği düzenler (16). Rejenere olan akson tomurcuklarının oluşturdukları büyüme konisinin ana komponenti olan aktin, tubulin ve akson büyümesi için gereken yapısal proteinlerin (growth-associated proteins; GAPs) sentezi artarken, transport fonksiyonunda rolü olan nörofilaman proteinlerinin sentezi azalır (19,76). Sinir hasarı sonrasında ortaya çıkan kromatoliz, temel olarak rejenerasyonu göstermekle birlikte, aynı zamanda sinir hücresinin travmadan ne şiddetle etkilendiğinin de bir göstergesidir. Geniş aksoplazmik kayıplarında, oluşan kromatoliz ile hücre onarım mekanizmaları başlasa bile, hücre ölümü meydana gelebilir (18). Sinir hücresinde oluşan bu değişikliklerin derecesi, hasarın şiddeti ve yaralanmanın ne kadar proksimalde olduğu ile yakından ilişkilidir. Hücre gövdesine çok yakın yaralanmalar hücre ölümüne neden olabilir (5,8,76). Hücre ölümü duyu nöronları için daha tipiktir. Duyu hücrelerinin gövdelerinde gerçekleşen hücre ölümünün, hasar sonrası ilk 24 saat içinde gerçekleştiğine dair bilgiler mevcuttur. Bu bilgiler ışığında tedavinin ilk 24 saat içerisinde başlaması gerekmektedir. Motor nöronlarda duyu nöronları ile kıyaslandığında hücre ölümü daha az gerçekleşmektedir (19). Aksonotomisi takiben, dorsal kök gangliyonunda apoptozla hücre ölüm insidansının, %20-50'ye kadar arttığı bildirilmiştir (5). Yaralanma nedeniyle nöronal hücre ölümünün mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak yaralı alanın mikroçevresinin hücre ölümünde önemli olduğuna inanılmaktadır (66,96). Yaralanmadan sonra, periferik sinir mikroçevresinde, Schwann hücrelerinin destekleyici rolleri yanında, salınan pek çok tropik molekülün, hücre yaşamını etkilediğini bildiren çalışmalar yayınlanmıştır (15,66,67,115,126-132). Rejenerasyon sürecinde, akson çapları artmakla beraber, yaralanmadan önceki normal boyutlarına ulaşamazlar. Rejenerasyon sonucu

endonöral tüp içinde gelişen aksonal sürgün orijinal akson çapının ancak % 80'ine ulaşabilir ve iletim hızı da orijinal aksondaki seviyeye ulaşamaz (54). Rejenerasyon sırasında, hücre perikaryonu ve akson arasındaki fonksiyonel ilişki son derece önemlidir. Fonksiyonel periferik bağlantılar yeniden kurulmadan, hücre perikaryonunda tam bir iyileşme meydana gelmez. Akson çapındaki artış, hücre perikaryonundaki iyileşme ile doğru orantılıdır. Rejenere aksonlar, proksimal segmentin şişkin kısmına ulaşır ve burada çok ciddi engellerle karşılaşabilir. Çoğu akson skar dokusunda halka dizilimi oluşturur veya proksimal segment boyunca geri döner. Bazı rejenere aksonlar distal kısma ulaşır. Sinir rejenerasyonu, orijinal yaralanmanın şiddeti, skar oluşumunun büyüklüğü ve aksonun yaralı bölgeye ulaşmasından önce geçen süre gibi, pek çok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterir (4,5,99,103). Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, aksonun büyüme hızının günde 2-4 mm olduğu saptanmıştır (54). Bir sinirin proksimal ve distal uçları arasındaki mesafe birkaç milimetreden fazla ise ya da uçlar arasındaki aralık fibröz bir doku ile doldurulmuş ise iyileşme olasılığı oldukça zayıftır (54,73,82). Proksimal uçtan gelişen aksonal sürgünlerin çevre bağ dokusu içine doğru kaçması sonucu nöroma adı verilen ve kitle halini almış liflerin oluşturduğu bir yapı karşımıza çıkar (54,78,82,107,109,133,134). Sinirin proksimal ve distal uçlarının uç-uca getirildiği sutureasyon işlemi sonrası aksonal rejenerasyon meydana gelir. Önce, endonörium'daki Schwann hücreleri mitotik bölünmeye uğrar ve kesinin proksimal ve distal segmentlerindeki endonöral tüplerin içindeki boşluğu doldurur (54,125,135). Proksimalde yer alan kesik akson ucundan sürgün şeklinde çok sayıda aksonal uzantı çıkar. Schwann hücreleri arasındaki yarıklar boyunca endonöral tüp içinde ilerleyerek proksimal ve distal sinir uçları arasındaki mesafeyi kateder (54,109,122,136). Daha sonra, komşu Schwann hücreleri lezyon düzeyinden başlayarak distale doğru her bir aksonun çevresinde miyelin bir kılıf oluşturur (54).

2.13.2. Distal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler

Distalde injurinin seviyesi ne olursa olsun, tüm distal aksondan hedef-organa kadar, akson ve çevre miyelinde fragmentasyon yani Wallerian dejenerasyon meydana gelir. Sonuçta tüm distal akson resorbe olurken endonöral tüpler Schwann hücreleri ve makrofajlarla dolar. Wallerian dejenerasyon sırasında plöripotent Schwann hücresi bir yandan endonöral bağ dokusu kılıfının içindeki bazal laminada proliferer olurken, diğer yandan kalan miyelin ve akson debrisini ortadan kaldırır. Prolifere olan Schwann hücreleri longitudinal sırada sıkıca biraraya gelerek bir sütun oluşturacak şekilde dizilir; buna Büngner Bantları denir. Schwann hücrelerini çevreleyen bazal lamina Büngner bantlarını

da çevrelemeye devam eder. Bu oluşan ortam rejenerasyon için en uygun ortamı sağlar ve bu bantların içine girebilen rejenere aksonlar en sağlıklı rejenerasyonu gerçekleştirir. Distal sinir lifindeki bağ dokusunun bütünlüğü intakt bir aksone bağlı olduğundan, sinir rejenerasyonu gerçekleşmediği takdirde distal endonöral tüpte geri dönüşümsüz daralma ve fonksiyon kaybı meydana gelir. Bu yüzden rejenere olacak aksonun nihai çapı azalmış olur. Bazal lamina tip IV kollajen, heparinsülfat, proteoglikan, laminin, nidojen ve entaktinden oluşur. Özellikle bazal tabakadaki lamininin büyüme merkezinin hızını ve yönünü etkilediği bilinmektedir (8,16). Yaralanmayı takiben yaklaşık 24 saatlik bir latent dönem yaşandıktan sonra kesik sinirin proksimal ucu kabarak büyüme merkezini (Growth Cone) oluşturur. Sadece uçtaki büyüme merkezinden değil ayrıca Ranvier boğumundan da tomurcuklanma (sprouting) ile anterograd büyüme başlar. Tomurcuklar proksimal sinir güdüğünden distale doğru ilerlerler. Akson tomurcukları distal güdüğe ulaştınca tomurcuklar Büngner bantlarının içinde ilerlemeye devam ederler. Bu hareketlenme sinir iyileşmesinin başarısını etkileyen en önemli olaydır. Bazı tomurcuklar bağ doku içersine doğru uzanabilirler ki, bu durum nöroma oluşumu ile sonuçlanır. Tomurcuklar Büngner bantlarını takip ederek, perifere doğru uzanıp hedef organlarını bulurlar. Başlangıçta proksimal segmentteki tomurcuklanan akson sayısı, distal segmentteki mevcut akson sayısından daha fazladır, ancak zaman içerisinde periferik bağlantıyı yapamayan tomurcuklar dejenere olur ve akson sayıları eşitlenir (5,16). Tomurcuklar fasiküller arasında geçiş yapabilirler. Fakat bir akson distaldeki kendi fasikülüne ulaşsa bile, bu aksonun kendi hedef organına ulaşabileceği anlamına gelmez. Akson herhangi bir hedef organa ulaştınca maturasyon işlemi başlar. Maturasyon proksimalden distale doğru gerçekleşir. Çap artışını miyelinizasyon izler. Fakat rejenere olmuş bir matür aksonun nihai çapı bile normalden azdır ve miyelin kılıfı daha incedir. Rejenere olan aksonlar; Schwann hücrelerine ulaştıkları zaman, miyelinizasyonu başlatan sinyal oluşur. Miyelogenезisin nöronal regülasyonu, aksonun plazma membranı ve Schwann hücresi arasındaki etkileşimden kaynaklanır. Akson hedef organa ulaştığı zaman, çapı ve maturitesi artar (8). Tüm sinir kesilerinde rejenerasyon yavaştır ve tam değildir. Rejenere olan akson günde ortalama 0.25mm hızla skar dokusunda ilerler. Akson tomurcukları distal endonöral tüpe ulaştınca büyüme değişik etmenlere bağımlı olarak günde 1-2 mm hızla devam eder. Bu yüzden özellikle proksimal sinir kesilerinde rejenerasyon tamamlanıncaya kadar ciddi kas atrofileri meydana gelir. Bu yüzden rejenerasyonun hızını ve kalitesini artıracak yöntemler, sinir onarımında elde edilecek fonksiyonel sonucu olumlu etkileyecektir (8). Akson rejenerasyon hızı, yaralanmanın

düzeyi ve şiddetiyle ilgilidir. Proksimalden distale doğru ilerledikçe rejenerasyon hızı azalmaktadır. Rejenerasyon hızı, hasar alanının sinir hücre gövdesine uzaklığı ile ters orantılıdır (8). Hayvan deneylerinde distal segmentin rejenerasyon hızının nörotomezis tipi yaralanma sonrası 2.0–3.5 mm/gün, aksonomezis tipi yaralanma sonrası 3.0–4.5 mm/gün olduğu saptanmıştır. Yetişkin insanlarda ise ortalama aksonal rejenerasyon hızı günde 1–2 mm'dir (8,16). Distal sinir segmentinin vasküler ağı da yaralanmaya cevap olarak, önce vazokonstrikt olur, daha sonra vazodilate olur, ama en başarılı aksonal rejenerasyondan sonra bile orijinal kan akımının ancak %60-80'ine ulaşabilir (137).

2.14. Sinir Rejenerasyonunu Etkileyen Faktörler

Proksimal ve distal uçları arasında yara iyileşmesinin doğal sonucu olarak gelişen skar formasyonu, aksonun distale doğru büyümesini fiziksel olarak engeller ve büyüme merkezinin dallanmasına, başka yöne sapmasına, geri dönmesine ya da sonlanmasına neden olur. Sinir kesisi ve onarım sonrasında, normal şartlar altında tomurcuklanan aksonların sadece altıda birinin ya da sekizde birinin distal uca ulaştığı düşünülmektedir (106). Bir sinir hücresi ve sinirin proksimal güdüğü, sinir ölümü gerçekleşmedikçe rejenerasyon kapasitesini kaybetmez. Bu yüzden sinir onarımındaki gecikme sadece distal sinir ucu ve hedef organ açısından olumsuz bir etkidir (106). Nedeni tam bilinmemekle beraber genç hastalarda sinir onarımı sonrası fonksiyonel iyileşme, yaşlı hastalara göre çok daha iyidir. Gençlerde distal aksonda ve hedef organda dejenerasyon daha az, akson rejenerasyonu ise daha fazladır. Yaş ilerledikçe miyelinli lifler azalır, akson dejenerasyon insidansı artar ve iletim hızları düşer (138). Saf duyu ya da saf motor sinirin onarımının fonksiyonel iyileşmesinin miks sinirlere göre daha iyi olduğu kabul edilse de hiçbir sinir fonksiyonel olarak uniform değildir. Sinir onarımı sonrası fonksiyonel iyileşme için en önemli belirleyici etken sinir kesisinin meydana geldiği seviyedir. Birçok nedendenle proksimal kesilerin prognozu distal kesilere göre çok daha kötüdür. Akson, esasında sinirin doğal bir uzantısı olduğundan proksimal bir kesi sinir hücresinin çok daha büyük bir yüzdesine hasar verir. Sinirin rejenerasyonu için metabolik ve zaman ihtiyacı çok daha fazladır. Akson kesisi ne kadar proksimalde ise aksonun rejenere olması ve maturasyonu için gereken süre de o kadar fazladır. Bu süre uzadıkça distal aksonda ve hedef organda atrofi meydana gelir. Dejenerasyon miktarı, geri dönüşümü olmayan değişikliklerin potansiyeli artar. Proksimal sinir gövdesinde motor ve duyu aksonları, fasiküler ağ içinde rastgele dizilirken, distale doğru gidildikçe aksonal homojenite artar (8). Sinir rejenerasyonunu belirleyen diğer önemli faktör sinir hasarına neden olan etkidir. Sinir ne

kadar az travmatize olursa fonksiyonel iyileşmesi o kadar iyi olur. Giyotin tipi kesilerde sinir daha az ve lokalize hasar görür. Ateşli silah yaralanması gibi şiddetli sinir hasarında, sinirin uzunlamasına etkilenmesi nedeni ile hasarlı kısmın dikkatli rezeksiyonu önemlidir. Sinir rejenerasyonunu etkileyen en önemli faktörler uygulanan cerrahi teknik ve onarım zamanıdır (139-141). Mümkün olan en erken zamanda sinir onarımını gerçekleştirmek hem iyi bir aksonal rejenerasyona hem de daha iyi bir fonksiyonel geri dönüşe olanak sağlamaktadır. Uygun zamanlama ile mikroskop altında, uygun sütür materyali ve uygun sütür tekniği kullanıldığında en az doku reaksiyonu ile iyileşme sağlanacaktır.

Deneysel olarak elektrik alanı ve trofik faktörlerle sinir rejenerasyon hızını artırma çalışmaları yapılmaktadır. İlerleyen akson ile fibroblast proliferasyonu, kollajen depolanması gibi yara iyileşme mekanizmaları arasında bir tür rekabet olduğu için aksonun ilk sütür hattından (anastomoz) geçme süresi çok önemlidir. Olasılıkla ilk sütür hattını ne kadar çok akson başarıyla geçerse, başta spesifiklik olmak üzere genel iyileşme sonuçları daha iyi olacaktır (142).

Nörotrofik faktörler çeşitli dokulardan salgılanan ve sinir hücresinin yaşaması ve büyümesi için gerekli olan bir polipeptid ailesidir (20,143,144). Embriyonik yaşam boyunca nöronların gelişim ve olgunlaşmalarına katkıda buldukları ve sinir yaralanmalarından sonra da rejenerasyonu ilerlettikleri bildirilmiştir. Nörotrofik maddeler ayrıca sinir hücresinin maturasyonuna ve metabolik işlevini sürdürmesine katkı sağlar. Normalde sinirin hedef dokusu nörotrofik maddeleri sentezler. Bu maddeler hasarlanmış sinirde ve hedef organlarda travma sonrası ortaya çıkarak akson terminallerince alınarak sinir hücre gövdesine retrograd taşınır. Akson ile Schwann hücreleri arasındaki ilişkinin bozulması, bu faktörlerin sentez ve salınımında artışa neden olur. Sinir devamlılığı bozulduğunda Schwann hücresi ve diğer bazı “non-nöral hücreler” hasarlı bölgede nörotrofik faktörleri üretmeye başlar. Bu yüzden rejenerasyon işlevi lokal Schwann hücrelerince sağlanan nörotrofik faktörlere bağımlıdır (90). Yaralanma sonrasında aksonların canlılıklarını sürdürmelerinde ve aksonal büyümede etkili olan endojen kaynaklı çok sayıda faktör tanımlanmıştır. Son yıllarda sinir iyileşmesinde nörotrofik faktörlerin önemi üzerinde sıklıkla durulmaya başlamıştır. Pek çok deneysel çalışmada, bu faktörlerin sinir hasarında kullanımıyla, sinir hücre yaşayabilirliğinde ve aksonal büyümede artış saptanmıştır (18,20).

Nörotrofik faktörler ise rejenerasyon olan aksonun yönünü ve böylece spesifikliği etkileyen maddelerdir. Distal segmentden salgılanan nörotrofik faktörler, difüze olabilen

maddeler ile konsantrasyon gradiyenti oluşturarak ilerleyen tomurcuğu yönlendirebilir (144). Üç tip spesifiklik vardır;

- 1) Doku spesifikliği; diğer dokulara karşı distal sinir dokusunun reinnervasyonunu tercih etmesidir.
- 2) Motor/duyu spesifikliği (hedef organ spesifikliği); karışık bir sinirde rejenere olan kesik motor aksonun, duyu dalına karşın tercihen distal motor dalı reinnerve etmesidir.
- 3) Topografik spesifiklik (fasiküler spesifiklik); analog distal yönün ve bölgenin reinnervasyonun tercih edilmesidir.

2.15. Periferik Sinir Onarımı

2.15.1. Tarihçe

Periferik sinir sistemi ile ilgili ilk tanımlamalar ve ilk yazılı belgeler MÖ 4. yüzyılda Hipokrat'a ve MÖ 3.yüzyılda Herophilus'a aittir. ilk defa Herophilus sinirleri medulla spinalise kadar takip edip, motor-duyu ayrımı yapmış olmasına rağmen periferik sinirlerin tendonlardan ayırt edilemediği bildirilmektedir. Ancak periferik sinir kesilerini ilk kez ele alan Galen (İ.S. 130-200) bazı sinirlerin kesisinde duyumun kaybolduğunu, bazılarında ise kasların gücünde azalma olduğunu bildirmiştir ve ilk kez sinir ile tendonu birbirinden farklı iki yapı olarak tanımlamıştır (8,75). Fakat zamanın geleneksel Hipokrat öğretisi sinir iyileşmesinden şüpheyle bahsetmektedir. Ayrıca Galen (M.S. 130-201), periferik sinirlerin iyileşme kapasitelerinin olmadığına inanmaktaydı. Bu yıllardaki sinirin iyileşemeyeceği düşüncesi yüzyıllar boyu hakimiyetini korumuştur. 9. yüzyılda İbn-i Sina ve Ebu Bekir er-Razi (Rhazes) ile periferik sinir onarımı başlar. Bu bilginler kesik sinir uçlarını sütür yardımıyla cerrahi yöntemler kullanarak tamir ederek periferik sinir cerrahisini başlatmışlardır (7,8). Periferik sinirler hakkında yeterli anatomik ve rejenerasyon kapasiteleri gibi fizyolojik bilgilere sahip olmadıkları için orta çağ cerrahları sinir onarımında hayal kırıklıkları ve tereddütler yaşayıp, sinir onarımından uzak durmuşlardır. Batıda sütür ile kesik sinirlerin tamirini ilk olarak Guy de Chauliac (1300-1370) yapmıştır. Periferik sinir sütürasyonuna ait ilk kayıtlar 13. yüzyılda William Saliceto'ya aittir. Gabriela Ferrara (1543-1627) periferik sinir cerrahisinde bir öncüdür ve kesilen bir sinirin güdüklerini sütüre etme tekniğini günümüze yakın bir şekilde ilk tarif eden cerrahdır. Sinir sistemi ile ilgili detaylı bilgiler ise 16., 17. ve 18. yüzyıllardan sonra elde edilmeye başlanmıştır. Frances Glison (1597-1677) sinirin uyarılabilir yapısını, Antoni van Leewenhoek (1632-1723) mikroskobik yapısını, Fontana (1730-1805) akson ve miyelin kılıfını tarif etmişlerdir. Fonksiyonel yapıya yönelik en erken çalışmalardan biri Galvani'ye (1737–1798) aittir. Galvani kurbağalarda yaptığı çalışmalar ile sinir liflerinin

elektrik stimülasyonuna yanıt verdiğini saptamıştır. Anatomik organizasyonlarının ve sinir hücreleri ile ilgili detayların tanımlanması, 18. yüzyılın başlarında Bell, Magendie, Remark ve Von Purkinje gibi çeşitli araştırmacılar ile sağlanmıştır. 19. yüzyılda motor sinirlerin ventral köklerdeki anatomik organizasyonu Sir Charles Bell (1774-1842) tarafından tarif edilirken, dorsal köklerdeki duyu fonksiyonunun yerleşimi François Magendie (1783-1855) tarafından belirlenmiştir. 1839’da Theodore Schwann (1810-1855) tarafından kendi adıyla anılan hücrenin yapısı ve işlevi yayınlanmıştır (8). Yine aynı yıllarda Johannes von Purkinje (1787-1869) tarafında nöronlar ve aksonlar arasındaki bağlantılar tarif edilirken, Robert Remak (1815-1855) tarafından miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri arasındaki farklar açıklanmıştır. Sinirin primer onarımı ile ilgili en erken kayıtlardan biri Paget’ye aittir. Paget 1847 yılında 11 yaşında bir hastanın median sinir kesisini primer onarmış ve fonksiyonel geri dönüşün tam olduğunu göstermiştir (1). August Waller, 1850 yılında kurbağa glossopharyngeal sinirinde yaptığı çalışmalar sonucunda, aksonların hasar alanı distalinde dejenere olduklarını, proksimalinde ise rejenere olmaya başladıklarını saptamıştır. Bu dejenerasyona da “Wallerian dejenerasyon” adını vermiştir (7,8). Aynı yıllarda Bernard, kürar ile nöromusküler blokaj konusunda yaptığı çalışmalar ile sinir iletiminin biyokimyasal temelleri hakkında ilk bilgileri ortaya koymuştur (8). Artan bilgi birikimi ile sinir anatomisi, fizyolojisi ve fonksiyonun daha iyi anlaşılması; sinir iyileşme sürecinin çözülmeye başlanması sonucu ,sinir onarımı için yeni stratejiler geliştirilmeye başlandı. 1873’de Hueter kesilmiş sinirde geleneksel epinöral onarımı tarif etti. Sinir iletim hızları ilk Herman von Helmholtz (1821-1894) ve Guillaume Duchenne (1806-1875) tarafından ölçülerek elektrofizyolojik prensipleri kliniğe uyarlanmıştır. Böylece klinik açıdan sinir fonksiyonuna ve disfonksiyonuna faydalı bilgiler kazandırmışlardır. Golgi ile Cajal 1906’da sinir sisteminin birbirine fonksiyonel bağlantılarla geçmiş sinir hücrelerinden oluşan bir şebekeden ibaret olduğunu göstermişlerdir. Sherrington ise, 1906 yılında “sinaps” adı verilen sinir hücrelerinin fonksiyonel bağlantı noktalarını tanımlamıştır. 1917’de Langley ve Hashimoto ise daha hassas bir teknik olan perinöral onarım tekniğini geliştirmişlerdir (7,8). Tinel birinci dünya savaşı sırasında yaptığı çalışmalarda (1915), tingling (karıncalanma) bulgusunu tanımladı ve değişen tingling’in aksonların rejenerasyonunu gösterdiğini buldu, bu bulguya kendi adı verildi (Tinel bulgusu (76). Erlanger ve Gasser, 1944 yılında her bir sinir hücresinin ve bağlantılarının farklılaşmış fonksiyonları olduğunu tanımlayarak ve bunların fonksiyonlarını açıklayan elektrofizyolojik çalışmalar yaparak almışlardır. Bu bilgileri kullanarak 1948 yılında

Hodes, Larrabee ve German isimli araştırmacılar klinikte uygulanabilir elektrofizyolojik sinir testlerini geliştirmişlerdir (8).

Periferik sinir onarımın ilk denemeleri topografik dizilime ve gerilime dikkat etmeden, sadece sinir uçlarını kabaca bir araya getirerek, sinir gövdesinin devamlılığını sağlama amacıyla gerçekleştirilmekteydi. Periferik sinir cerrahisinde, bugün modern sinir cerrahisinin temelini oluşturan ilk bilimsel çalışmalar Seddon tarafından 1948 yılında yapılmıştır, savaş yaralanmaları üzerinde takip ve tedavi seçenekleri üzerine yaptığı çalışmalarla “Seddon sınıflaması”nı geliştirmiştir. Onarım sonrası sinir rejenerasyonun hızı, greftle onarım teknikleri ve iskeminin periferik sinir üzerine etkisi konularında öncülük eden önemli çalışmalar yapmıştır (145). Sir Sydney Sunderland’in 1945’de ulnar, median ve radial sinirlerin; 1948’de siyatik sinirin intranöral topografilerini yayınlaması ile periferik sinir onarımı anatomik temellere dayanarak gerçekleştirilmeye başlanmıştır (8), fasiküler sinir onarımı gibi sinir onarımının teknik yönleri geliştirilmiştir (146). 1964’de Kurze ve Smith cerrahi mikroskop ile interfasiküler sinir onarımına başlatmışlardır (147,148). Yapılan çalışmalar ve elde edilen deneyimler, sütür hattındaki gerginliğin intranöronal fibrozise ve aksonal ayrışmaya neden olduğunu gösterdi. Hasarlı sinir uçlarının rezeksiyonu, sütür hattındaki gerginliğin en aza indirilmesi, tamir hattında boşluk olmaması, eklem fleksiyonda tutularak sinir yolunun kısaltılması, immobilizasyon ve gerektiğinde kemik kısaltılması yapılmasının ne kadar önemli olduğunu anlaşılmasını sağladı (147,148). Millesi 1972 yılında sinir greft gerginliğinin önemini ortaya koymuştur. 1972’de Millesi gerilim altında gerçekleştirilen sinir onarımında, konnektif dokuda fazla büyüme olduğunu, fibrozisin arttığını gösteren deneysel çalışmasını yayınladı ve gerilimli onarım yerine sinir grefti ile daha iyi sonuçlar elde edileceğini bildirdi. Daha sonraki deneysel ve klinik çalışmalar da gerilimli tek bir onarımlı hatta göre, gerilimsiz iki onarım hattından aksonun daha iyi rejenere olduğunu ortaya koydu (149,150). 1970’lerde Julia Terzis gerilimsiz onarımın faydalarını gösterdi ve tedavi tekniklerini geliştirip çeşitlendirerek önemli katkılarda bulundu (8). Bu gelişmelerle birlikte mikrocerrahi, atravmatik yöntemlerin kullanılması, daha hassas teknik ile daha iyi fasiküler düzenlemeyi ve daha iyi fonksiyonel sonuçların elde edilmesi sağlandı (7,8). Moberg ve Delon 1988’de periferik sinir lezyonlarında, duyu üzerine yaptığı çalışmalarla önemli katkıda bulunmuşlardır (151). Sinir yaralanmalarına yaklaşım son yıllarda çok dramatik değişiklikler göstermiştir. Güncel araştırmalarla, sinir onarımı ve rejenerasyonundaki olayları daha çok moleküler yönden incelemeye ağırlık vermiştir. Sinir rejenerasyonunun

moleküler düzeyde anlaşılması sayesinde, farmakolojik ve genetik manipulasyonlar ile periferik sinir iyileşmesinde daha iyi sonuçlar elde etmek mümkün olacaktır.

Mackinnon, periferik sinir cerrahisi için 8 temel prensip bildirmiştir (22,25).

1. Gerek motor ve gerekse duyu sisteminin çok iyi preoperatif ve postoperatif kantitatif klinik değerlendirmesi yapılmalıdır.
2. Mikrocerrahi aletler, mikrosütür ve cerrahi mikroskop yardımı ile mikrocerrahi teknikleri kullanılmalıdır.
3. Sinir onarımı gerilimsiz olmalıdır.
4. Gerilimsiz onarım gerçekleştirilemezse sinir grefti kullanılmalıdır.
5. “Uç-Uca onarım” gerçekleştirmek için ekstremitenin postural pozisyon ayarlaması yapılmamalıdır. Gerek uç-uca onarım, gerekse sinir grefti uygulaması nötral pozisyonda gerçekleştirilmelidir.
6. Klinik ve cerrahi imkanlar el verdiği sürece primer sinir onarımı tercih edilmelidir.
7. Periferik sinirin intranöral topografisi uygunsa, grup fasiküler onarım tercih edilmelidir. Eğer fasikül hem duyu , hem motor fonksiyonuna sahipse ve grup fasikülleri iyi tanımlanamıyorsa, epinöral onarım tercih edilmelidir.
8. Cerrahi başarının artması için postoperatif motor ve duyu eğitim rehabilitasyonu gerçekleştirilmelidir.

Periferik sinir onarımında ven, arter, çizgili kas, tendon, silikon tüp gibi materyallerin kullanımı; uç yan ve uç uca gibi onarım tekniklerinin bulunması; doku sentezleme ve embriyonik hücre kültürleri gibi yöntemlerle periferik sinir dokusunun elde edilebilmesi şeklindeki yaklaşımlar son yıllardaki gelişmeleri oluşturmaktadır. Bununla birlikte periferik sinir yaralanmalarında non-steroidal antiinflamatuvar ajanlar, steroidler, sinir büyüme faktörleri, tiroid hormonları, büyüme hormonu, ACTH ve insülin benzeri peptidler gibi çok sayıda madde daha iyi sonuçlar almak amacıyla kullanılmaktadır. Bu şekilde sinir defektinin olduğu komplike yaralanmalardaki tedavi alternatifleri ve tedavinin başarısı arttırılmaya çalışılmaktadır.

2.15.2 Koaptasyon Teknikleri

Periferik sinirlerin cerrahi anatomilerinin bilinmesi ve kesiye yanıtlarının anlaşılması, sinir onarımının ve rekonstrüksiyonunun planlanabilmesi için şarttır. Gerek cerrahi gerekse biyolojik pekçok faktör sinir onarımı sonrası fonksiyonel geri dönüşün kalitesini belirler. Antibiyotiklerin kullanılmaya başlanılmasından sonra periferik sinir

cerrahisinde başarıyı etkileyen ikinci büyük yenilik, hassas mikrocerrahi tekniklerin kullanılmaya başlanmasıdır (7). Sinir onarımındaki temel prensipler Millesi tarafından şu şekilde ifade edilmiştir (147);

- 1- Güdüğün hazırlanması ve mikroskop altında yaralanma bölgesi tamamen debride edilir. Gerekirse interfasiküler diseksiyon da yapılır.
- 2- Sinir uçları, uygun gerginlikte olacak şekilde bir araya getirilir.
- 3- Fasiküller optimum temasta olacak şekilde, sinir uçlarının koaptasyonu yapılır.
- 4- Uygun kalınlıkta sütürler kullanılarak, koaptasyonun devam ettirilmesi sağlanır.

Periferik sinir onarım teknikleri şunlardır (152);

- a) Uç-uca onarım (-Epinöral Onarım, -Grup Fasiküler Onarım, -Fasiküler Onarım)
- b) Uç-yan onarım
- c) Sinir greftleri ile onarım

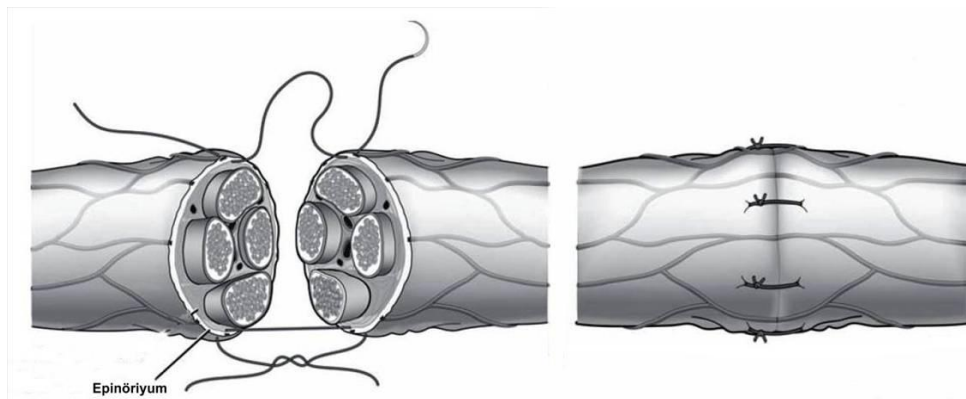
2.15.2.1. Uç-uca onarım

Uç uca sinir onarımları sinir uçlarının lup ya da cerrahi mikroskop kullanılarak bir araya getirilerek suture edilmesidir ve epinöral, grup fasiküler ya da fasiküler onarım şeklinde uygulanabilmektedir. Suture hattı bölgesinde gelişen fibrozis ve skar oluşumunun olabildiğince azaltılması fonksiyonel bir iyileşmenin elde edilebilmesi bakımından anastomoz için kullanılan suture materyali ve uygulanan cerrahi teknik son derece önemlidir. Suture işlemi için kullanılacak iğne olabildiğince ince ve atravmatik olmalı, suture edilecek sinirin kalınlığına göre 8/0 ya da 10/0 suture materyalleri kullanılmalı, suture sayısı çok fazla olmamalı ve epinöral onarımda sutureler epineurium'a sınırlı kalmalıdır (63,73). Sinir uçlarının çok gevşek ya da çok sıkı bir şekilde birbirine yaklaştırılması sinir rejenerasyonunu olumsuz yönde etkileyecektir (11,14,63,73,82,153). Suture edilecek sinirin proksimal ve distal ucundaki fasiküler yapı dikkatle incelenmeli ve karşılıklı olarak doğru bir şekilde suture edilmelidir. Standart epinöral anastomoz tekniği, interfasiküler onarım tekniğine kıyasla daha kolay ve kısa süreli bir işlemdir.

Klinik uygulamada suture tekniği seçimi, hassas fasiküler dizilim ile travmadan sakınmanın nispi kazançlarının değerlendirilmesi ile belirlenir. Dijital duyu siniri gibi genelde benzer fonksiyonel özelliklere sahip olan, minimal epinöral doku içeren, birbirine yakın dizilmiş sinir lifli sinirlerin taze, düz kesilerinde en iyi sonuç, eksternal anatomik işaretleri (damarlar) dikkate alarak fasiküler dizilimin gerçekleştirildiği ve atravmatik epinöral teknik ile onarım yapıldığı zaman elde edilebilmektedir. Proksimal sinir

lezyonlarında (kök ya da pleksus) olduğu gibi fasiküler dizilimin belirsiz olduğu durumlarda da epinöral teknik tercih edilir. Her bir motor ve duyu lifinin tanımlanabildiği daha distal sinir lezyonlarında ise grup fasiküler onarım, fonksiyonel homojenite gösteren fasikül dizilimi sağlar (7).

Epinöral Onarım: Lupla veya mikroskop kullanılarak yapılmalıdır. Epinöral onarım, standart hale gelmiş bir tekniktir. Öncelikle onarılacak sinir uçları, yaralanma bulguları uygun şekilde tazelenmelidir. Normal rotasyonel uzanım ile birlikte, gerginlik olmayacak şekilde onarım yapılmalıdır. Rotasyonel düzgün dizilim, epinöral damarlarla sağlanabilir. Sinir onarımı emilmeyen sütürlerle yapılmalı ve ince sinirler için 10/0, daha kalın sinirler için 8/0 sütürler kullanılmalıdır. Epinöral onarımının en önemli basamağı sinir uçlarının hazırlanmasıdır. Sinir uçları; sinir aksına dik olarak aynı hizada kesilmelidir. Sinir uçlarını keserken keskin bir bistüri kullanılmalı ve bu işlem tek seferde yapılmalıdır. Böylece, uzunlamasına seyreden epinöral damarların ve fasiküllerin dizilimi için mümkün olan en iyi pozisyon elde edilmiş olur. Epinöral onarımı yapılırken sinir uçları etraf dokudan sinire doğru atravmatik bir şekilde diseke edilir. Sinirin iki ucu, daha sonra en az gerginlik olacak şekilde karşı karşıya getirilir. Bu işlemler yapılırken, gerektiğinde epinöral kenarlar mikro forsepsle tutulabilir. Onarımı yapan cerrah, ilk etapta 180 derece ara ile 2 adet 8-0 naylon sütürü epinöriumun tüm katlarına, alttaki fasikülleri yaralamayacak şekilde yerleştirmelidir. Sütürler sinirin düz uçlarını birbirine hafifçe temas edecek şekilde dikkatlice bağlamalıdır (Şekil 9). Eğer bu iki adet 8-0 sütürlerle onarım hattı uç uca bir arada tutulamıyorsa, onarım yerinin gergin olduğu anlamına gelir ve greft ile onarım sözkonusudur. Periferik sinir onarımından sonra ekstremitelere, 3-4 hafta süresince sinirin gergin olmadığı pozisyonda atele alınmalıdır. Eğer sinir uçlarını bir araya getirmek için, eklem fleksiyonu gerekli olmuş ise; atel sonlandırıldıktan sonra haftada 10 -15 derece olacak şekilde, ilgili eklem yavaş yavaş ekstansiyona getirilmelidir (76).



Şekil 9: Epinöral sinir onarımı (Siemionow M, Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. Int Rev Neurobiol. 2009;87:141-72.)

Grup Fasiküler Onarım: Daha etkili bir tedavi protokolüdür. Fasiküler gruplar belirlenir ve diseke edilir. İnterfasiküler epinöral sütür tekniği ile fasiküller grup haline getirilir. Bu teknikte hata oranı daha düşüktür, çünkü aynı fasikül içinde kalan aksonlar karşıya geçebilir ve uygun alanları innerve ederler. Grup fasiküler onarımda; interfasiküler anatomik bütünlük ve düzen, fasiküler onarıma göre daha iyidir. Ancak teknik olarak daha zordur ve epinöral onarıma göre daha iyi bir büyütme gereklidir (8).

Fasiküler Onarım: Bu onarım tekniği, az sayıda ve geniş fasikülü olan sinirlerde faydalıdır. Fasiküller, tek tek perinöriyuma konan sütürlerle bir araya getirilir. Sinir uçları izole edildikten sonra, yüzeysel epinöral tabaka bir insizyonla, sinir ucunun birkaç milimetre gerisinden çevresel olarak eksize edilir. Daha sonra her bir fasikül etraf bağ dokusundan serbestleştirilir. Kötü görümlü, fibrotik sinir uçları, normal sinir dokusuna ulaşıncaya kadar eksize edilir. Fasikül sadece birkaç milimetre diseke edilmelidir ve aşırı diseksiyondan kaçınılmalıdır. Çünkü aşırı diseksiyon, intranöral skar oluşumuna neden olur (8).

Her ne kadar perinöral onarım ile daha hassas fasiküler dizilim sağlansa da, perinöriyum manipülasyonunun neden olduğu ek travma, sinir rejenerasyonunu olumsuz etkilemekte ve daha iyi fasiküler dizilimin sağladığı avantaj kaybedilmektedir. Literatürdeki hiçbir klinik çalışma daha hassas fasiküler dizilim sağlayan perinöral tekniğin, daha az travmatik olan epinöral tekniğe üstünlüğünü gösterememiştir (3).

2.15.2.2. Uç Yan Onarım

Periferik sinirlerde uç yan onarım, 1800'lü yılların sonlarında sinir onarım tekniği olarak kullanılmıştır. Uç yan onarım; sağlam donör sinirde hasar yaratmaksızın, distal hedef organların reinnervasyonuna olanak sağlayan bir tekniktir. Sağlam donör sinirden, hasarlanmış sinirin distal ucuna aksonların rejenerasyonu ve end organdaki reinnervasyonların lateral filizlenme yoluyla olduğu, deneysel olarak gösterilmiştir (154,155).

2.15.2.3. Sinir Grefti ile Onarım

Uç uca sinir tamirinin yapılamadığı durumlarda; proksimal ve distal güdükler arasında defekt olduğunda kullanılan bir tekniktir (156). Sinir grefti, rejenere olan aksonlar için bir konduit vazifesi görür. Ayrıca Schwann hücresi, büyüme faktörü ve bazal lamina komponentleri için kaynak oluşturur. Bu maddeler nörotropik ve nörotrofik etkiler ile

nöronal büyümeye yardımcı olmalarına rağmen, konvansiyonel insan sinir otogreftlemenin nihai fonksiyonel sonuçları çoğu zaman istenilen düzeyde değildir (157).

Periferik sinir kesisinin onarımı sonrası sinir fonksiyonunun geri kazanılması hala önemli bir sorundur. Mikroskobun ve hassas cerrahi sütürlerin kullanılmaya başlanması ile fasiküler ve grup fasiküler onarımlar mümkün olmuşsa da bunların hiçbiri kesik bir akson ucunu distal karşıtına ideal yaklaştırmayı sağlayamamaktadır. Günümüzde distal periferik sinir sisteminin rejenerasyon kapasitesi olduğunu, ayrıca yeterli boyut ve sayıda akson ürettiğini bilmekteyiz. Buna rağmen istenilen klinik başarının gerçekleşmemesinin nedeni büyük olasılıkla akson rejenerasyonunun yanlış yönlendirilmesidir. Bu kontrol edilebilir bir durumdur. En hassas sütürler kullanıldığında bile tubüler yapı içinde gap kalmaktadır. Bu durum, aksonun rejenerasyon sırasında tomurcuklanmaya başlayacağı yere skar dokusunun girmesi ile sonuçlanacak ve fonksiyonel geri dönüşü azaltacaktır (12).

2.15.2.4. Alternatif Koaptasyon Teknikleri

Her ne kadar mikrosütür koaptasyon en sık kullanılan sinir onarım tekniği olsa da çok iyi bilinmektedir ki epinöriyum ve perinöriyumdan geçen sütürler fibroblastik proliferasyona sebep olarak akson dokusunun yanlış yönlendirilmesine, basıya ve skara neden olmaktadır (7). Lazer ile koaptasyon, onarım yerinde sütür gibi yabancı cismin olmadığı bir teknik olduğu için denenmekte olan bir alternatif bir yöntemdir (12). Epinöral tabakanın mikrocerrahi teknik ve Pulsed Laser Işını ile rezeksiyonu sonrası gerçekleştirilen fasiküler onarımında, yüksek fibroblastik aktiviteye sahip bu mezodermik dokunun eliminasyonu sayesinde onarım yerinde skar oluşumunun daha az olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar lazer ile onarım daha az skar ve dolayısıyla daha az basıya neden olsa da %41 - %82 oranında görülen ayrışma, lazer ile nörorafinin gerilim gücünün çok az olduğunu göstermektedir. Yüksek lazer enerjisi ile bu gerilim gücünü artırmak mümkünse de termal etki ile altta yatan aksonlara hasar verme ihtimali de artmaktadır. Teknolojik ilerleme sayesinde lazer nörorafi gelecekte sinir onarımında etkili bir yöntem olabilir (12).

Fibrin yapıştırıcısı koaptasyon bölgesinde yabancı cisim bırakmamaktadır. Deneysel çalışmalarda, sütürle onarımla eşdeğer fonksiyonel etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (3). Buna rağmen tüm otörlerin nörorofide tercihi 9/0 ve 10/0 monofilaman prolendir.

2.15.3. Sinir Onarım Zamanı

Periferik sinir hasarı sık karşılaşılan klinik problemlerden biridir. Böylesi durumlarda en iyi çözüm nörorafidir. Sinir kesilerinde onarım sonrası iyileşmenin kalitesini ve aksonal rejenerasyonu birçok faktörün etkilediği bilinmektedir. Bunlar; yaralanmanın şekli, şiddeti, hastanın genel durumu, onarım şekli, onarım zamanı ve cerrahın deneyimidir (158). Periferik sinir kesilerinde optimal onarım zamanının ne olacağına dair pek çok çalışma yapılmıştır ve bu konudaki tartışmalar hala devam etmektedir. Sinir onarım zamanlaması; sinirin yaralanma şekline, yaranın durumuna ve sinirin vasküler durumuna bağlıdır (23,24). Keskin bir cisimle meydana gelen, ezilme komponentinin olmadığı ya da minimal olduğu temiz yaralarda ve iyi vasküler desteğin mevcut olduğu olgularda fonksiyonun geri kazanılabilmesi için en iyi seçenek primer sinir onarımıdır. Tarihsel olarak, primer sinir onarımı, Wallerian dejenerasyonun tamamlanması için zaman kazanmak amacıyla yaralanmadan sonraki ilk 3 hafta içerisinde yapılırdı. Mackinnon ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda daha iyi sonuçların alınabilmesi için kesilen sinirin acilen onarılması gerektiğini göstermişlerdir (22). Son zamanlarda primer onarım sinir kesisini takip eden ilk 72 saat ile 7 gün arasında yapılmaktadır (25). Barrs'ın domuz fasiyal sinirinde yaptığı çalışmada 0. günde ve 5. günde yapılan sinir onarımlarında elde edilen rejenere akson sayılarını geç dönemde yapılan onarımlardan anlamlı derecede farklı bulmuştur (159). Sinir kesisinden sonra fonksiyonel geri dönüşü optimize etmek için erken reinnervasyon gereklidir (160,161). II. Dünya savaşı esnasındaki periferik sinir yaralanmalarıyla ilgili tecrübelerde; sinir onarımındaki her 6 günlük gecikmenin onarım sonrası elde edilecek performansta %1'lik bir düşüşe neden olduğu ve 3. aydan sonra bu düşüşün çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir (162). Ancak erken onarım için uygun olmayan olgularda gecikmiş onarım yapmak gerekir. Sinir kesisini takiben ilk üç haftada sinir uzunluğunun %8'i kadar retrakte olabilir, dolayısıyla sekonder onarım teknik olarak daha zordur ve sinir grefti gerekebilir (163). Direkt sinir onarımı, iki sinir ucu arasındaki defektin minimum olduğu ve minimal gerilimle yaklaştırılabildiği durumlarda tercih edilir (164). En iyi sonuçlar saf duyu ya da saf motor lif taşıyan sinirlerde elde edilmektedir (163,165). Sinir onarımı sonrası optimal sinir rejenerasyonunun olabilmesi için sinir uçları gerilimsiz olarak doğru yönlendirilmeli ve atravmatik bir şekilde minimal doku hasarına neden olarak en az sayıda sütür ile onarılmalıdır (17,22,25,86,166-170).

2.16. Rat Siyatik Siniri

Rat siyatik siniri memeli hayvanlar arasında, elektron mikroskopi düzeyinde bile insan sinir dokusundan ayırt edilemeyen hücresel detaylara sahip, ucuz ve temini kolay sinir dokusu kaynağıdır (171). Bu nedenle rat siyatik siniri ve dalları deneysel sinir cerrahisinde ve sinir rejenerasyonu çalışmalarında en çok kullanılan sinirlerdir. Lumbosakral trunkustan çıkan siyatik sinir varyasyon göstermekle beraber sıklıkla 4., 5. ve 6. lomber spinal sinirlerin füzyonu ile oluşur ve en kalın periferik sinirdir. 2005 ± 89 motor nöronu, 10500 tane dorsal kök ganglion nöronu vardır. Sinirin uylukta, büyük trokanterin distalinde toplam 23700-27000 arasında aksonu bulunmaktadır (172,173). Bunların sadece 7800 tanesi miyelinlidir. Miyelinli aksonlardan 4500 tanesinin tibial sinire, 1900 tanesinin peroneal sinire, 1050 tanesinin sural sinire ve 350 tanesinin kutanöz sinire ait olduğu bulunmuştur. Miyelin kılıfının çapı 1.5 - 12.5 mikron arasında değişmektedir. Miyelinsiz akson sayısı ise toplam 19400 dür (174). Pelvis minör içinde siyatik sinir adını alarak iskiyum dorsal kenarı ile kuyruk sokumu arasındaki derin olukta ilerler. Siyatik çentikten çıktıktan sonra piriform kasın ventralinde seyrederek ve uyluk arkasına ilerler. Bu safhada sinir unifasikülerdir. Sırt derisinin yarıya yakın kısmını ve arka bacak kaslarının çoğunu innerve eder. İlk önce biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kaslarını innerve eden ince bir motor dal verir. Daha sonra diz ekleminin yaklaşık yarım santimetre proksimalinde tibial, peroneal (fibular) ve bunlardan hemen önce sural olarak 3 dala ayrılır. Peroneal sinir tibialis anterior ve ekstensör digitorum longus kaslarını innerve ederken, tibial sinir plantar fleksörleri, ayak parmak fleksörlerini ve tibialis posterior kasını innerve eder (175).

2.17. Melatonin

Pineal bezin (epifiz bezi) varlığı eski zamanlardan beri bilinmektedir. Epifiz bezi beyin küçük bir uzantısıdır ve posterior komissür ve dorsal habenular komissür arasında, üçüncü ventrikülün posterior duvarına yapışıktır. Boyutu ve pozisyonu aynı türler içinde dahi farklılık gösterir ve biyolojik olarak aktif bir çok bileşik salgılar. Epifiz bezi pinealositler ve nöroglialardan oluşur. Pinealositler norepinefrin, histamin, serotonin, melatonin, dopamin gibi biyolojik aminleri ve lüteinleştirici hormon “releasing” hormon, tiroit “releasing” hormon, somatostatin, arginin, vasopressin gibi peptidleri sentezler (176). Epifiz bezi böbreklerden sonra damarsal yapıdan (kan akımı 4ml/dk/gr) en zengin organdır. Epifiz bezinin vücut ağırlığına oranı, diğer türler ile karşılaştırıldığında insanda küçük bir orana sahiptir. Arteriyel beslenme, posterior koroidal arterler yoluyla olur, venöz dolaşım ise internal serebral venler yoluyla sağlanır. Çoğunlukla süperior servikal gangliondan

sempatik innervasyonu vardır ve sinir lifleri internal karotid sinir ile beze ulaşır (41). Epifiz bezi memelilerde sekretuar, balıklarda ve amfibienlerde fotoreseptif, sürüngenlerde ve kuşlarda ise hem fotoreseptif hem de sekretuar fonksiyonları üstlenmiş bir organdır (177). En önemli salgısal ürünü bir nörohormon olan melatonin (N asetil-5-metoksitriptamin)' dir. Melatonin ilk defa Lerner ve arkadaşları tarafından 1958 yılında izole edilmiş ve insanlarda belirli hastalıklarda ortaya çıkan düzensiz deri pigmentasyonunun tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Ancak daha sonraki çalışmalarda melatoninin derideki melanoforlarla ilişkisinin memeli olmayan vertebralılara özgü olduğu anlaşılmıştır (178,179). Melatonin 232 molekül ağırlıklı, ilkelinden gelişmişine kadar bütün aerobik canlılarda bulunan ve evrim boyunca korunmuş bir moleküldür (180). Melatonin adını, kurbağa derisinde pigment hücrelerindeki melanin granüllerinin agregasyonuna neden olmasından ötürü almıştır (181,182). Pineal bezde melatonin sentezi ve salınımı karanlık ile uyarılır, ışık ile baskılanır. Karanlığın başlaması ile fotoreseptörler hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdeği uyarır (41,183-185). Suprakiazmatik çekirdek memelilerde biyolojik sirkadiyen saattir. Karanlığın başlamasıyla birlikte sinir uçlarından noradrenalin salgılanır; bu da pinealositlerdeki beta adrenerjik reseptörleri uyarır. Adenilat siklaz aktivitesinin artmasıyla oluşan cAMP, N-asetiltransferaz (NAT) sentezini uyarır. NAT'ın enzimatik aktivitesinin gece boyunca artışı serotonin düzeylerini düşürür, buna bağlı olarak N-asetilserotonin ve melatonin düzeylerini artırır. Yetişkinlerde gece ölçülen ortalama plazma melatonin seviyesi 50-70pg/ml'dir (186,187) ve başlıca metaboliti olan 6- HMS (6-Hidroksimelatonin sülfat)'nin maksimum plazma konsantrasyonu 80- 100pg/ml arasındadır. Plazma melatonin konsantrasyonu gece saat 02:00 ile 04:00 arasında pik değerlerine ulaşır. Erişkinde sekresyon genelde saat 21:00-22:00 arası başlar, saat 07:00-09:00 arası sona erer. 6-HMS'nin ortaya çıkış ve pik düzeye ulaşma zamanı bu sürelerden 1-2 saat, sabah düşüşü ise 3-4 saat geç olur. İnsanda 6-HMS'nin %70-80'i gece idrarında (24:00-08:00) atılır (180). Normal insan melatonin ritminin en karakteristik özelliği normal bireylerde günlük ve haftalık olarak tekrarlanabilir olmasıdır. Aynı birey için değişmezken bireyler arasında ritmin amplitüdü açısından çok büyük bir değişkenlik vardır (36,180-182). En yüksek melatonin düzeyi yaşamın üç ile beşinci yılları arasında saptanır (41,180). Yaşlanma ile melatonin sentez ve salınımında azalma meydana gelir (188). Ayrıca uzun süreli uçuşlara bağlı uyku ve biyolojik ritim bozukluklarını (jet lag) 3 mg oral dozla önlemede etkili olduğu bulunmuştur (189). Pineal bezde sentezin başlangıç basamağını, sistemik dolaşımdan triptofanın pinealosite aktif geçişi oluşturur. Triptofan, önce triptofan hidrosilaz ile orto pozisyonundan

hidroksillenerek 5-hidroksitriptofana dönüşür. Bunu aromatik aminoasit dekarboksilazların (dopa dekarboksilaz) kataliz ettiği dekarboksilasyon reaksiyonu izler. Oluşan ürün önemli bir biyolojik amin olan 5-hidroksitriptamin (serotonin)'dir. Pineal bez serotonin konsantrasyonu açısından vücutta en zengin organdır (190). Serotonin, N-asetiltransferaz (NAT) ve hidroksi indol O-metil transferaz (HIOMT)'ın birbirini takip eden aktiviteleri ile son ürün olan melatonine dönüşür (41).

Melatonin sentezini uyaran diğer bir mekanizma, fosfoinozitol sistemiyle bağlantılı α -1 adreno reseptörler olup burada Ca^{+2} -fosfolipid bağımlı protein kinaz C yoluyla cAMP uyarılması gerçekleşir. Işık-karanlık sisteminin yanında magnetik alanlara maruz kalmakta melatoninin sirküler ritmini ve salgılanımını azaltır (36,191). Plazma melatonin düzeyi gün içinde 30-200pg/ml arasında değişir ve plazmada %70'i albumine bağlı olarak bulunur (192,193). Pinealosit'lerde üretilen melatonin; çok hızlı bir şekilde bu hücrelerin komşuluğunda yer alan kapillerler'e bırakılmak suretiyle sistemik kan dolaşımına karışır (194). Pineal gland'dan sistemik kan dolaşımına verilen melatonin karaciğer ve böbreklerde metabolize olur (186,195). Melatoninin kandaki yarı ömrü 10-40 dakika civarında (insanda ortalama 28,4 dakika) olup ekzojen melatoninin metabolik yarı ömrü 20-60 dk'dır (196). Melatoninin %90'ı karaciğerde hidroksillenir ve kandan tüm vücut sıvılarına taşınır. Atılımı ise 6-hidroksimelatonin ve kinüraminlerin glikuronid ve sülfat bileşikleri şeklinde %20 feçesle, %70 idrarla olur. Serbest melatonin halinde %1'i ve 5-metoksi indol asetik asit olarak %0.5'i geçmemek üzere idrarda bulunabilir (197-199).

2.17.1. Melatoninin Etki Mekanizması

Melatonin yüksek lipofilik ve hidrofilik özelliğe sahiptir, vücutta depolanmadan kan ve vücut sıvılarına hızla karışır (41). Melatonin lipid çözünürlüğünden dolayı hücre membranını kolaylıkla geçer ve tüm hücre organellerine nüfuz edebilir. Hücrenin mitokondrisine nüfuz edebilen bir antioksidandır. Bu sayede mitokondrileri de oksidasyon zedelenmesinden koruyabilmektedir. Fizyolojik etkilerini hem spesifik reseptörler aracılığıyla, hem de reseptörden bağımsız olarak gösterebildiği bildirilmiştir. Beyinde ve suprakiazmatik nükleusta melatonine ait membran reseptörleri belirlenmiştir (200). Son yıllarda yapılan çalışmalarda melatonin reseptörü klonlanmış ve G proteine bağlı reseptör ailesine ait olduğu gösterilmiştir (201). Periferik immün hücrelerde melatonine ait membran reseptörlerinin varlığı saptanmıştır. Bunlar ikinci haberci olarak cAMP'i kullanırlar. İn vitro fizyolojik dozlarda melatonin, cAMP üretimini zamana ve doza bağlı bir şekilde inhibe eder (202). Melatoninin nükleusta bağlandığı bölgeler hem merkezi sinir

sisteminde hem de periferik dokuda bulunmaktadır ve klonlanmıştır. Melatonin reseptörleri; Mel-1a, Mel-1b ve Mel-1c olmak üzere üç tiptir. Mel-1a reseptör geni insan kromozomunda 4q35.1 lokalizasyonunda kodlanmıştır. Sirkadien ve reproduktif etkilerinin bu reseptör aracılığı ile gerçekleştiği düşünülür. Mel-1b reseptör geni insan kromozomunda 11q21-22 bölgesinde kodlanmıştır. Beyin ve retinada eksprese olur ve her iki bölgede de dopaminerjik fonksiyonlar ile ilişkili olduğu düşünülür. Mel-1c geni ise insanda saptanmamıştır. İn vivo ve in vitro olarak 6- ve 2- bölgelerinden halojenlenmiş melatoninler iyi agonistlerdir. Melatoninin bu güne kadar saptanabilmiş spesifik bir antagonisti yoktur (203). Melatoninin reseptörden bağımsız etkileri de vardır. Bu etkilerinde aracı olarak kalmodulin kullanılır ve Ca^{+2} ile ilişkili olan hücre içi olaylar değişikliğe uğrar (200).

Melatoninin çok çeşitli etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir. Melatoninin ritmik özelliğe sahip birçok biyolojik fonksiyon (vücut ısısı, solunum, dolasım sistemi, üreme vb) üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir. Genel olarak birçok canlı türü için melatoninin çeşitli fizyolojik olaylara adaptasyonda zamana uyumu düzenlediği düşünülmektedir. Melatoninin insandaki etkileri iki kategoride incelenebilir. Bunlardan ilki vücutta büyük oranda pineal bezden salgılanan melatoninin sirkadiyen ritmi düzenleyici etkisidir. İkincisi ise bu hormonun vücuttaki anabolik fizyolojik etkileridir. İnsanda melatonin düzeylerinin yüksekliği, vücut ısısında azalma, artmış ısı kaybı, azalmış kalp debisi, uyanıklık halinde bozulma ve artmış immün duyarlılık ile birlikte (41). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda melatonine ait olduğu gösterilen ya da düşünülen fonksiyonlar şu şekilde sıralanabilir:

- Melatoninin insan dışındaki memelilerde mevsimsel üreme fizyolojisi üzerinde etkin olduğu görülmüştür (204).
- Salgılanmasındaki sirküler ritimden dolayı bu pineal hormon suprakiazmatik nükleus üzerine etki ederek 24 saatlik siklusların düzenlenmesinde rol oynar. Melatoninin uyutucu etkisi ve uzun uçak yolculuklarının yarattığı fizyolojik düzensizliğin tedavisinde kullanılması biyolojik saat olarak da tanımlanan suprakiazmatik nükleusla etkileşiminin bir sonucudur (178).
- Potansiyel antikanser bir madde olduğuna inanılmaktadır (35).
- Melatoninin antioksidan aktivitesi oldukça önemlidir.
- Melatonin 1-50mg/kg dozda nöroprotektif etki göstermektedir. 50-100mg/kg ölüme kadar yol açabilen komaya sebep olabilir (48).

- Ayrıca rejenerasyonu stimüle edici, uyku ritmi ve endokrinolojik aktivite düzenleyici, osteoblastik aktiviteyi hızlandırıcı, antiepileptik, hipotermik ve immüneyi güçlendirici, etkisi olduğu bildirilmiştir (184,187,190,195,205,206).

Melatonin fizyolojik olarak en güçlü serbest radikal temizleyicisidir. Melatonin serbest radikallere karşı direkt etkisinin yanı sıra, glutatyon peroksidazı aktive ederek glutatyon üzerinden de antioksidan etki göstermektedir (207). Melatoninin antioksidan kapasitesi birçok çalışma ile gösterilmiştir (44), bu çalışmalarda in vitro melatoninin etkisinin glutatyonun beş ve mannitolün onbeş katı olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada melatoninin en etkili antioksidanlardan E vitamininden iki kat daha etkili olduğu bildirilmiştir (186,208). Son yıllarda önemli bir antioksidan olduğu ispatlanan melatoninin antioksidan savunma sisteminde rol alan superoksit dismutaz (SOD) ve nitrik oksit sentetaz (NOS) gibi enzim aktivitelerini değiştirdiği rapor edilmiştir (209,210). Son dönemde hayvanlarda yapılan çalışmalar inflamasyon patofizyolojisinin kontrolünde melatonin kullanımının faydaları olduğunu göstermiştir. Melatonin diğer antioksidanlarla etkileşime girerek onların etkinliğini artırır. Vit C, troloks ya da glutatyon ile in vitro ortamda inkübe edildiğinde her üçüyle sinerjik etki gösterdiği ve in vitro radikal oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (211).

Melatonin hidroksil (OH)'i nötralize ederken kendi elektronlarından birini vererek radikale dönüşür. Toksik etkisi çok düşük olan bu radikale indolil katyon radikali adı verilir. İndolil oluştuktan sonra ikinci basamakta O₂ radikali zehirsiz hale getirilir ve N-asetil 5-metoksikinüramin oluşur. Melatonin ile diğer indollerin (seratonin, N-asetil seratonin, 5-metoksimelatonin) antioksidan özellikleri karşılaştırıldığında, melatoninin antioksidan özelliğinin, bu moleküllerin antioksidan özelliklerinden belirgin olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Melatonin molekülü kolay oksitlenmez, otooksidasyona uğramaz, redoks döngüsüne ve hidroksi radikali üreten reaksiyonlara katılmaz. Diğer tüm düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan farklı olarak bir kez okside olduktan sonra indirgenmez. Bu özelliği ile molekül otooksidatif radikal oluşumu ve toksik redoks döngüsüne karşı korunur. N-asetil 5-metoksikinüramin idrarla atılan son üründür. Melatonin hem yağda hem de suda çözünür özelliğe sahip olması nedeniyle, vücudun her hücresine, sitozole ve hücre içindeki diğer yapılara kolaylıkla girer. Bu sebeple de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha etkilidir (42). Melatonin antioksidan olarak nükleer DNA, membran lipidleri ve hücre içi proteinleri oksidatif hasarlara karşı korur. Ayrıca melatonin süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ve nitrik oksit sentaz enzim aktivitelerinde değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (210).

İnflamasyon ve oksidatif stres koşullarında, nitrik oksit ve süperoksitin birleşmesiyle oluşan peroksinitrit toksik bir oksidandır. Melatonin peroksinitrite bağlı oksidan olaylarda inhibitör etkiye de sahiptir. Vücutta normalde aerobik metabolizma sırasında süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri oluşur. Bu serbest oksijen radikallerinin doymamış yağ asitlerinde lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre hasar meydana getirmeleri antioksidan sistemler ile engellenir. Melatoninin lipid peroksidasyonunu azalttığı 1993'deki bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada Pierrefiche ve arkadaşları alloksana bağlı olarak kan glukozundaki yükselmeyi melatoninin sınırlandırdığını göstermişlerdir (212). Bir diğer çalışmada ise özellikle akciğerlerde biriken böcek ilacı Paraquatla oluşan lipid peroksidasyonunun melatoninle birlikte verildiğinde ortadan kalktığı bulunmuştur (182,210). Melatoninin glutatyon peroksidaz üzerine etkisi vardır. Bu enzim antioksidan savunma sisteminin bir elemanı olarak özellikle nöral dokuda önemli rol oynar. Sıçana eksojen melatonin uygulanmasına bağlı olarak beyin glutatyon peroksidaz aktivitesi 30 dakika sonra iki katına çıkar. Enzim aktivitesi ile doku melatonin konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (213). Melatoninin etkilediği başka bir enzim ise 5-lipooksijenazdır. Bu enzim alerjik olaylarda ve inflamasyon reaksiyonlarında anahtar rol oynayan lökötrienlerin sentezinde görev alır. Melatoninin 5-lipooksijenaz aktivitesini inhibe etmesinin enflamasyonu ve sonuçta serbest radikal hasarını azaltacağı düşünülebilir (214).

Melatoninin birçok hücre fraksiyonunu oksidatif hasardan koruma özelliği onu önemli bir antioksidan haline getirir. Diğer serbest radikal tutucuların çözünürlükleri nedeniyle aktiviteleri sınırlıdır. Örneğin E vitamini membranda bulunan doymamış yağ asitlerini oksidasyondan koruyan önemli bir maddedir ancak sitozolde bulunmadığı için bu ortamda koruması çok kısıtlıdır. Antioksidan olarak etkili olan ve geniş bir intraselüler dağılım gösteren tek madde melatonin değildir, ancak yüksek toksisitesi olan serbest radikallerin direkt tutucusu olarak diğer endojen antioksidanlardan daha etkilidir. Direkt serbest radikal tutma özelliğinin yanısıra melatonin nükleer reseptör üzerinden serbest radikalleri tutan enzimlere etkilidir (215). Bu etkilerin biraraya gelmesiyle melatonin indol içeren organizmalarda antioksidan savunma sisteminin komponenti olarak kabul edilmektedir (142).

2.17.2. Periferik Sinir Kesisine Melatoninin Etkisi

Melatoninin periferik sinir kesisi sonrasında rejenerasyona etkisi üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmaların birisinde periferik sinir kesisinde nöroma formasyonu ve kollajen sentezi üzerine melatoninin supresör etki yaptığı gösterilmiştir (216). Başka bir çalışmada ise rat siyatik sinirinde sütürle onarım sonrası melatoninin sinir onarımı ve nöronal rejenerasyona etkisi araştırılmıştır (217). Bu çalışmada eksojen olarak verilen melatonin sinir onarım bölgesinde nöroma oluşumu ve kollajen birikimini anlamlı derecede azaltmış ve sinir rejenerasyonunu artırmıştır. Klinik olarak melatonin nöroma oluşumu ve sinir rejenerasyonu üzerine olan bu etkisi nedeniyle cazip bir tedavi seçeneği olabilir. Melatonin eksikliği olgularında periferik sinir onarımında diğer tedavi yöntemlerine ek olarak melatoninin verilmesi iyi bir seçenek olabilir (217). Transforming büyüme faktörü (TGF)- β ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'nin Schwann hücre etkinliğinde ve fibroblastlardaki kollajen üretiminde önemli bir rol oynar (218-221). Turgut ve ark. pinealektomi ve eksojen melatonin uygulaması sonrasında siyatik sinir anastomoz bölgesinde TGF- β 1 ve bFGF'nin immunohistokimyasal profilini incelemiştir (47). Bu çalışmada pinealektomi geçiren hayvanların sinirlerinin epinöriumlarında güçlü TGF- β 1 ve bFGF ekspresyonu gözlenmiş ancak kontrol ve melatonin gruplarında ya hiç görülmemiş ya da zayıf bir etki görülmüştür. Bu nedenle, TGF- β 1 ve bFGF anastomoz bölgesinde kollajen birikimi ve nöroma oluşumunun kontrolünde etkilidir ve melatoninin sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu etkisi vardır (47). Bir diğer çalışmada ezilmiş sıçan siyatik aksonlarında plazmalemmal füzyonunda polietilen glikol (PEG) ile indüklenen in vitro ve/veya in vivo onarıma melatoninin etkileri incelenmiş ve bu çalışmada lezyon bölgesinde bileşik aksiyon potansiyeli iletimi melatonin grubunda anlamlı derecede daha yüksek ve daha büyük amplitüdü idi. Diğer tedavi grupları ile karşılaştırıldığında melatonin siyatik aksonlarının in vivo PEG füzyon yeteneğini artırmıştır. Bu nedenle, PEG ile kombine melatonin insanda ezilme tarzı yaralanmayı takiben aksonların onarımında etkili olabilir (222). Biyolojik sistemlerde melatoninin antioksidan özellikle iyi bilinmektedir (223) Travmanın indüklediği periferik sinir hasarından korunmada yararlı etkileri mevcuttur. Örneğin, sinir sisteminde oksidasyon esnasında Melatonin peroksitifik hasarı engeller (39,224). Melatonin santral sinir sisteminde reaktif oksijen radikallerinin zararlı etkilerini, serbest radikal temizleyici etkisiyle veya nitrik oksit sentaz aktivitesini azaltarak radikal üretimini azaltabilir (38,48,225-227). Melatonin ayrıca posttravmatik polimorfonükleer hücre infiltrasyonunu inhibe eder (228), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazı stimüle eder (229). Ek olarak nöral lipid

peroksidasyonunu azaltarak siyatik siniri iskemi reperfüzyon hasarından korur (229). Shokouhi ve ark. künt siyatik sinir hasarı sonrası, lipid peroksidasyonu ve sinir lifi hasarında melatoninin düşük doz (10 mg / kg) ve yüksek dozlardaki (50 mg / kg).nöroprotektif etkisini araştırmışlardır (43). Bu çalışmanın sonuçlarına göre düşük doz melatonin siyatik sinirdeki aksonal değişiklikleri ve travmanın indüklediği miyelin hasarını azaltmıştır. Bununla birlikte yüksek doz melatonin ultrastrüktürel değişiklikleri neredeyse tamamen nötralize etmiştir. Bu nedenle, 50 mg / kg dozdaki melatonin künt travma sonrası oluşan sinir hasarında potetnt nöroprotektif etki göstermiştir ve periferik sinir liflerini lipid peroksidasyonundan koruyabilmektedir (43). Periferik sinir fonksiyonuna melatoninin etkileri ovariektomize yaşlı ratlarda incelenmiştir (230). Bu çalışmada ovariektomize yaşlı ratlara günlük 5 ve 20 mg / kg dozda 2 ve 6 hafta boyunca melatoninin verilmiş. Aksiyon potansiyelinin yayılımı, sinir iletim hızı ve distal latans ekstrasellüler elektrofizyolojik teknik ile tespit edilmiş. Melatonin gruplarının ortalama distal latansı kontrol gruplarından daha kısa bulunmuş ve sinir iletim hızı her iki melatonin grubunda da anlamlı derecede daha fazla bulunmuş. Bu sonuçlar göstermektedir ki ovariektomize yaşlı ratlarda melatonin siyatik sinirde meydana gelen dejenerasyonda elektrofizyolojik olarak bir iyileşme sağlayabilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, postmenapozal periferik sinir dejenerasyonunun tedavisinde melatonin potansiyel bir klinik uygulama olarak önerilebilir (230). Yenidoğan rat motornöronları siyatik sinir kesisinde savunmasızdır (231). Memelilerin periferik ve santral sinir sisteminde farklı nöronlarda periferik sinir hasarını takiben nitrik oksit sentaz (NOS) eksprese olur, normalde nöronlar NOS aktivitesinden yoksundur muhtemelen sinir hasarını takiben aktive ortaya çıkmaktadır (232). Bazı araştırmacılar yenidoğan ratlarda siyatik sinir kesisi sonrasında motor nöron ölümünün NOS'un bir izoformu aracılığıyla olabileceğini önesürmüşlerdir (233-236), bir nikotinamid adenin dinükleotid fosfat bağımlı diaphorase (NADPH-d) sitoplazmada mevcuttur (234,237). Yaralanmanın indüklediği NOS ekspresyonunda hasarlı hücrelerin ölümü bu olay için sinyal gibi görünmektedir ve bu enzim nitrik oksiti nörotoksik düzeylerde üreten bir katil protein olarak işlev görüyor olabilir (234). Son zamanlarda, spinal motornöronlarda aksonal hasar sonrasında antioksidan ajan ve nöronal NOS (nNOS) inhibitörü olarak melatoninin muhtemel etkilerinin olabileceği araştırılmıştır (48). Bu çalışmada rat yavrularında siyatik sinir postnatal 2. ve 7. günde kesilmiş, melatonin 1-50 mg/kg dozlarda nöronal ölümü azaltmış yani melatonin düşük dozlarda da nöroprotektif etki göstermiştir. Melatonin yüksek dozlarda (50 ve 100 mg / kg) toksik etki göstermiştir. Ayrıca, kontrol ve tedavi gruplarında nNOS ekspresyonu açısından fark görülmemiş, siyatik havuzunda hayatta kalan motor

nöronlarda enzim ekspre edilmemiştir (48). Yeni doğan ratlarda günlük melatonin uygulamasının süperoksit dismutaz (SOD) 1 ve 2 ekspresyonu üzerine etkisi olup olmadığıyla ilgili çalışmalar yapılmış (238) ve indüklenen bir serbest radikal temizleyici etkisi olduğu görülmüştür (227,239). Melatonin postnatal 3. ve 7. günlerde aksotomiye takiben motor nöron kaybını yaklaşık % 75 korur. Bununla birlikte ne siyatik kesisinde ne de melatonin grubunda enzimlerin herhangi bir değişiklik tespit edilmemiş (238). Melatonin sadece santral sinir sisteminde apoptotik hücre ölümünü azaltmakla kalmayıp aynı yenidoğan ratlarda periferal aksotomiye indüklenen nöronal ölümü de azaltır (239). Bu nedenle, siyatik aksotomi sonrasında ve melatoninin uygulandıktan sonra apoptotik olaylar araştırılmış ve neonatal ratlarda medulla spinaliste hücre ölümü organizatörü Bax ve antiapoptotik protein olan Bcl-2 üzerine odaklanılmış (240). Bu çalışmanın sonucunda, postnatal 2. günde siyatik kesisinde lumbar genişlemede Bax mRNA'sı artmış, immatür motor nöronlarda Bax immünoreaktivitesinde aksotomi ile herhangi bir değişiklik meydana gelmemiş ve son olarak melatoninin motornöron ve dorsal boynuz hücrelerini Bax ve Bcl-2'den bağımsız bir mekanizma aracılığı ile koruduğu görülmüş. Bu nedenle, yenidoğan ratın dorsal boynuzundaki fizyolojik ve aksotomi ile indüklenen hücre ölümü Bax ekspresyonu ile birlikte. Bununla birlikte bu ekspresyon motor nöron ölümüyle ilişkili değildir. Melatonin sinir hasarından 1 gün sonra sadece aksotomize motornöronları korumakla kalmayıp dorsal boynuz hücrelerinin kaybını da azaltmıştır. Her iki durumda da, nörohormonun etki mekanizması Bax veya Bcl-2'nin ekspresyonundaki değişikliklerle ilgili değildir (240). Önceki çalışmalarda, yenidoğan ratlarda siyatik sinir kesisi sonrası spinal motor nöronlarda nNOS tespit edildi. nNOS yetişkin hayvanların hasarlı motor nöronlarında hücre ölümüyle ilgili olarak gözlemlendi (232,241,242). Her ne kadar nöron kaybı yapılan çalışmalarla doğrulansa da, aksotomiye takibeden 1. ve 5. günlerde hasarlı hücrelerde nNOS immunohistokimyasal olarak araştırılmamıştı Roge'rio ve arkadaşlarını yaptıkları çalışmaya kadar (238,243,244). Yapılan bir çalışmada, enzim aktivitesi ölçümü için sinir hasarından 1 hafta sonra NOS izoformları kullanılmış, yenidoğan ratlarda siyatik kesisinde ölümlerin büyük çoğunluğunun aksotomize motor nöronlarda olduğu tespit edilmiştir (238). Ratlarda postnatal 2. günde siyatik aksotomi lomber motor nöron kaybına neden olmuş ve bu durum NO üretimi ile ilişkili olabilir. Bu nedenle, ratlarda postnatal 2. günde siyatik sinir kesisinde ve antioksidan melatonin ile tedavisinde NOS ekspresyonu ve NO sentezi incelenmiş. Bu çalışmanın sonuçlarına göre melatonin NOS ekspresyonunu değiştirmez ve NOS aktivitesindeki değişiklik kalsiyuma bağlı değildir (244). Aksonlarında periferik hasar oluşmuş kranial motor nöronlarda melatoninin etkileri

incelenmiştir (232). Periferik sinir hasarını takiben nöropatogenezde oksidatif stres ve masif NO üretimi meydana gelir. Bu nedenle, Chang ve arkadaşları periferik aksotomi sonrası hasarlı hipoglossal sinirde melatoninin nöroprotektif etkisinin olup olmadığını araştırmak için bir çalışma yapmışlar, çünkü melatoninin NO ile alakalı farklı deneysel nöropatolojilerde oksidatif hasarı azalttığı bilinmektedir. Bu çalışmada hipoglossal motor nöronlarda hasarın indüklediği NADPH-d/NOS ekspresyonunu melatoninin farklı dozları etkili bir şekilde azaltabilmektedir. Sonuç olarak, periferik sinir hasarından sonra meydana gelen oksidatif stres melatoninin etkili bir şekilde azaltabileceği söylenebilir. Bu bulgu, yalnızca NO'nun fonksiyonel rollerinin daha iyi anlaşılmasına ışık tutmakla kalmayıp travmatik sinir yaralanmasını takiben oksidatif hasardan korunmada melatoninin potansiyel terapötik kullanımı ihtimalini ortaya atmaktadır (232). Diğer bir çalışmada periferik sinir hasarını takiben SOD aktivitesinin korunmasında melatoninin yararlı etkileri olabileceği araştırılmış (245). Bu çalışmada, erişkin ratlarda hypoglossal sinir kesiminde intraperitoneal melatonin enjekte edilmiş. Sonuçlar, SOD aktivitesinin korunmasında melatoninin etkili terapötik ajan olarak önemli bir kapasitesi olduğunu göstermiştir, böylece periferik sinir yaralanmasında önceki çalışmalarla benzer şekilde oksidatif hasarı azaltmaktadır (232). Bununla birlikte periferik sinir yaralanmasından sonra melatoninin nöroprotektif rolü antioksidan seviyelerinin korunmasının ötesinde rejenerasyon işlemini desteklemiştir. Eksojen melatonin antioksidan savunma sisteminin fonksiyonunu belirgin olarak düzeltmiştir. Periferik sinir yaralanmasındaki oksidatif hasarın tedavisinde umut verici bir tedavi olarak klinik çalışmalarda melatonin kullanımı önerilebilir (245).

2.18. Kavrama Testi

Kavrama testi ilk kez 1995'te Bertelli and Mira tarafından rat median sinir modelinde fleksör fonksiyonu değerlendirmek için basit bir metod olarak önerilmiştir (246). Bu metoda ratlar hafifçe kuyruk tarafından kaldırılarak elektronik bir ölçüm cihazına bağlı ızgarayı kavramasına için izin verilir. Rat kavrama gücünü kaybedinceye kadar kuyruk tarafından havaya kaldırılır. Bu esnada göstergede okunan değer kavrama gücü olarak kaydedilir (246). Kavrama testi fonksiyonel sinir rejenerasyonunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Denervasyon sonrası kaybolan parmak fleksiyonunun başarılı bir sinir rejenerasyonu sonrasında fleksiyon yapabilme kabiliyeti tekrar ortaya çıkar. Kavrama testi bu geri kazanımı değerlendirmede kullanılan objektif bir testtir (246,247). 2003 yılında Papalia ve arkadaşları orijinal kavrama ızgarasını üç barlı bir hale getirerek modifiye etmişlerdir (248).

2.19. Stereoloji

Üç boyutlu istatistiğin bir dalı olan stereoloji; verilen yapıların yüzey alanını ve hacmini tahmin etmede kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Histolojik kesitlerin mikroskop altında izlenebilen ya da bu kesitlerden değişik şekillerde elde edilen görüntülerinden o yapılar hakkında güvenilir üç boyutlu veriler elde etmek için kullanılan bir dizi yöntemi içerir. Bu yöntemlerle iki boyutlu görüntülerden yola çıkılarak hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi bir çok geometrik özellikleri hakkında önemli sayısal değere ulaşılabilmektedir. 1984 yılında Sterio tarafından stereolojik yöntemlerden disektör yöntemi bulunmuş ve önceki yöntemlere ek olarak daha tarafsız ve etkin sayım yöntemleri tanımlanmıştır. Böylece mikroskopik çalışmalarda yeni bir dönem başlamıştır (249,250). Stereolojik metotların sağladığı şey, kısa zamanda, güvenilir ve doğru ölçümler yapmayı mümkün kılmaktır (249,251-255).

Bir yapının veya organın hacim, yüzey alanı gibi değerlerinin hesaplanması, yapı içerisinde bulunan farklı bileşenlerin birbirlerine göre hacim, uzunluk, alan vb. yoğunluklarının bulunması, bir yapıdaki toplam tanecik (hücre vb.) sayısının ortaya çıkarılması gibi çalışmalar, morfometrinin önemli konularını oluşturur (256). Biyolojik yapılara ilişkin bu tip sayısal verilerin elde edilmesinde kullanılacak birçok yöntemin var olması, bu yöntemler arasından en uygun ve güvenilir olanının seçilmesi sorununu da beraberinde getirmektedir. Önemli olan, herhangi bir niceliği hesaplar veya ölçerken, yapıdan mümkün olduğunca tarafsız (yani gerçek değerden sistematik bir sapma göstermeyen) sonuçların elde edilmesini sağlayabilecek bir yöntemin tercih edilmesidir (257-261). Stereolojik yöntemlerin birçoğu, uygulamada, ilgilenilen yapının sistematik-tekdüze-rastgele olarak elde edilmiş örnekleri üzerinde ölçümler yaparak, o yapıdaki söz konusu sayısal niceliğin belli ve istatistiksel olarak kabul edilebilir bir hata payı dahilinde hesaplanmasına dayanır. Çoğu zaman, çalışılan yapılarda ilgilenilen nicelik (örneğin bir organdaki hücre sayısı) büyük olduğundan, belli oranda bir örnekleme yapmak kaçınılmazdır (253,257,262). Bu örnekleme sonucunda elde edilecek verilerin güvenilirliği ise, pratikte geçilen uygulama aşamalarında gösterilecek özenle doğrudan ilişkilidir. Birçok durumda, makroskopik bir yapının paralel dilim veya kesitlere ayrılması, bu kesitlerin mikroskopta incelenmesi, bu inceleme sırasında belli büyüklükte adımlamalarla ilgilenilen doku bileşenlerinin taranması ve mikroskop görüntü alanlarında, büyüklüğü belli olan örnekleme alanlarının belirlenmesi, bu alanların ardışık görüntü alanları boyunca karşılaştırılması, kesit kalınlığının ölçülmesi vb. gibi, dikkat gerektiren basamaklar karşımıza çıkar. Bu basamakları dikkatli ve kurallara uygun bir biçimde

gerçekleştirdiğimiz takdirde, güvenilir sonuçlara ulaşmamamız için herhangi bir neden kalmaz (257,262-265). Makroskobik örnekleri mikroskop altında inceleyebilmek için çoğunlukla bu parçalardan küçük örnekler almak gerekir. Örnekler, inceleme amacına uygun büyüklüklerde alındıklarında, tüm yapının ancak çok küçük bir miktarını temsil edebilirler. Stereolojik yöntemlerin bir çoğunda, eğer alınan örnekler sistematik rastgele örnekleme kurallarına göre elde edilmişse, ana yapının bu şekilde seçilmiş çok küçük parçalarından, istenilen niceliğin güvenilir bir hesaplamasını elde etmek mümkün olabilmektedir (253,257,266). Hacim hesaplaması için kullanılan Cavalieri yöntemi ve fiziksel parçalama gibi bazı hesaplama yöntemleri için, makroskobik bir organı çoğu kez paralel dilimlere ayırmamız gerekmektedir (250,267,268). Cavalieri metodu, canlı organizmalarda ilgilenilen herhangi bir yapı ya da organın hacminin hesaplanması amacıyla son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış bir yöntemdir. Bu yöntem ile önce hacmi hesaplanacak yapı dilimlere ayrılır, her bir dilimin kesit yüzey alanı bulunup, kesit kalınlığı ile çarpılarak ilgili dilimin hacmi hesaplanır ve nihayet dilimlerin hacimleri toplanarak ilgilenilen yapının toplam hacmi hesaplanır (268).

Stereolojik metotların temelini “Sistematik Rastgele Örnekleme” (SRÖ) stratejisi oluşturmaktadır. Bu örnekleme biçiminin temel özelliği, çalışılacak olan yapıdan örnekler alınmanın gerekli olduğu durumlarda, yapının her noktasının eşit örneklenme şansına sahip olmasının sağlanmasıdır. Biyolojik yapılar, genellikle, içerdikleri ve araştırmacı için inceleme konusu olan bileşenlerine göre (hücre, çekirdek, vezikül vb.) çok büyük olduklarından, yapıdan elde edilen tüm kesitlerin çalışmaya dahil edilerek değerlendirilmesi, pratik olarak imkansızdır. Örneğin, insan neokorteksindeki toplam nöron sayısını tesbit etmeye yönelik bir çalışma için, çalışılacak beyinlerden alınacak onbinlerce histolojik kesit tek tek incelenemez. Bu durumda elde edilebilecek muhtemel örnekler (kesitler) arasından belli oranlarda bir seçim yapılması gerekecektir. Bu seçim yapılırken, seçilen örneklerin, söz konusu yapıyı en iyi biçimde temsil edebilmesi için, yapının her bir noktasının eşit örneklenme şansına sahip olması, istatistiksel bir zorunluluktur. Bu şartı sağlamak üzere, rastgele seçimler yapmak da, tam olarak sorunu çözememektedir. Sistematik Rastgele Örnekleme’nin önemi burada ortaya çıkmaktadır. Sistematik Rastgele Örnekleme, önceden belirlenmiş sabit bir örnekleme aralığı boyunca, ilk aralık içinden rasgele bir noktadan başlanmak suretiyle, ilgilenilen yapının tamamının örneklenmesini içerir. Önceden belirlenen örnekleme aralığı (örneğin, her onuncu kesiti veya parçayı seçmeye karar verildiğinde ilk on kesitlik seri), örneklemin sistematik kısmını, ilk aralık içinde rasgele bir noktadan başlanması (örneğin, ilk on kesit içinden

herhangi birinin başlangıç olarak seçilerek, bu kesitten sonra gelen her onuncu kesitin örnek olarak seçilmesi) ise, örneklemenin rasgelelik özelliğini sağlar. İstatistiksel bakış açısıyla, bu tip bir örnekleme, ne kadar çok örnek üzerinde uygulanırsa, yapının her noktasına eşit örnekleme şansı tanıdığı için, homojen ve verimli bir örnekleme elde etme şansı da o kadar artar (257).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (SÜDAM) Hayvan Etik Kurulu'nun 17.07.2009 tarihli 2009/43 sayılı izni ile planlandı. Çalışmada "Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi İlkeleri"ne uyuldu. Bu çalışma, T.C. Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 2009/09202079 proje numarası ile desteklendi. Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilen bu çalışmada ağırlıkları 250-275 gram arasında değişen, 80 adet erişkin dişi Wistar Albino rat kullanıldı. Deney hayvanları SÜDAM'dan temin edildi, hayvanların preoperatif ve postoperatif bakımları da aynı merkez tarafından yapıldı. Deney hayvanlarının tamamı standart fiziki şartların sağlandığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık, 22 ± 1 ° C sıcaklıkta, % 50 ± 5 nem oranında ve saatte 15 defa hava değişiminin yapıldığı odalarda, rahatça ulaşabildikleri su ve standart rat diyetinin bulunduğu uygun büyüklükteki kafeslerde 5 rat bir arada olacak şekilde barındırıldı.

3.1. Gruplar

Ratlar rastgele seçilerek her biri 10 rattan oluşan 8 gruba ayrıldı.

1. Grup (10 rat): Siyatik sinir tek taraflı diseke edilerek trifikasyon seviyesinin 1cm proksimalinden bistüri yardımı ile tek hamlede kesildi ve 0. saatte 10/0 prolen ile mikroskop kullanılarak 10x ve 16x büyütmede 10/0 prolen ile epinöral olarak onarıldı. Postoperatif 1mg/kg Melatonin günde tek doz intraperitoneal olarak 12 hafta boyunca verildi.

2. Grup (10 rat): Siyatik sinir tek taraflı diseke edilerek trifikasyon seviyesinin 1cm proksimalinden bistüri yardımı ile tek hamlede kesildi ve 12. saatte 10/0 prolen ile mikroskop kullanılarak 10x ve 16x büyütme altında 10/0 prolen ile epinöral olarak onarıldı. Postoperatif 1mg/kg Melatonin günde tek doz intraperitoneal olarak 12 hafta boyunca verildi.

3. Grup (10 rat): Siyatik sinir tek taraflı diseke edilerek trifikasyon seviyesinin 1cm proksimalinden bistüri yardımı ile tek hamlede kesildi ve 24. saatte 10/0 prolen ile mikroskop kullanılarak 10x ve 16x büyütme altında 10/0 prolen ile epinöral olarak onarıldı. Postoperatif 1mg/kg Melatonin günde tek doz intraperitoneal olarak 12 hafta boyunca verildi.

4. Grup (10 rat): Siyatik sinir tek taraflı diseke edilerek trifikasyon seviyesinin 1cm proksimalinden bistüri yardımı ile tek hamlede kesildi ve 1. haftada 10/0 prolen ile mikroskop kullanılarak 10x ve 16x büyütme altında 10/0 prolen ile epinöral olarak onarıldı. Postoperatif 1mg/kg Melatonin günde tek doz intraperitoneal olarak 12 hafta boyunca verildi.

5. Grup (10 rat): Siyatik sinir tek taraflı olarak sadece diseke edilerek trifikasyon seviyesinin 1cm proksimalinden bistüri yardımı ile tek hamlede kesildi ve 0. saatte 10/0 prolen ile mikroskop kullanılarak 10x ve 16x büyütme altında 10/0 prolen ile epinöral olarak onarıldı. Ek medikasyon yapılmadı.

6. Grup (10 rat): Siyatik sinir tek taraflı olarak sadece diseke edilerek trifikasyon seviyesinin 1cm proksimalinden bistüri yardımı ile tek hamlede kesildi ve 12. saatte 10/0 prolen ile mikroskop kullanılarak 10x ve 16x büyütme altında 10/0 prolen ile epinöral olarak onarıldı. Ek medikasyon yapılmadı.

7. Grup (10 rat): Siyatik sinir tek taraflı olarak sadece diseke edilerek trifikasyon seviyesinin 1cm proksimalinden bistüri yardımı ile tek hamlede kesildi ve 24. saatte 10/0 prolen ile mikroskop kullanılarak 10x ve 16x büyütme altında 10/0 prolen ile epinöral olarak onarıldı. Ek medikasyon yapılmadı.

8. Grup (10 rat): Siyatik sinir tek taraflı olarak sadece diseke edilerek trifikasyon seviyesinin 1cm proksimalinden bistüri yardımı ile tek hamlede kesildi ve 1. haftada 10/0 prolen ile mikroskop kullanılarak 10x ve 16x büyütme altında 10/0 prolen ile epinöral olarak onarıldı. Ek medikasyon yapılmadı.

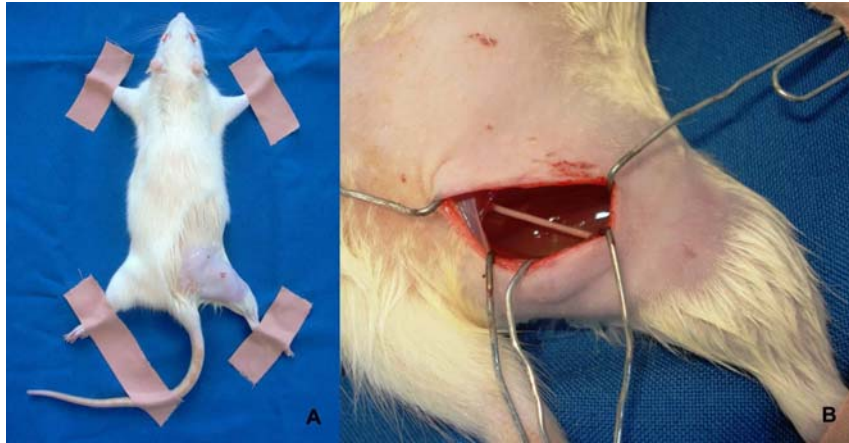
3.2. Cerrahi Teknik

Cerrahi işlemler 80 mg/kg Ketamin-HCl (Ketalar®, Pfizer) ve 10 mg/kg Xylazin-HCl (Rompun®, Bayer) karışımının intramusküler verilmesiyle oluşturulan anestezi altında, aynı cerrah tarafından, standart mikrocerrahi teknikler ve operasyon mikroskobu (Zeiss, Almanya) kullanılarak 10x ve 16x büyütmede gerçekleştirildi (Şekil 10). Operasyondan önce cerrahi uygulanacak saha tıraş edildi. Povidon iyod (Batticone®, Adeka) ile operasyon sahası temizlendi ve steril örtülerle kapatıldı. Cerrahi işlemlerde steril aletler kullanıldı. Rat prone pozisyonunda iken ameliyat sahasına tespit edildikten

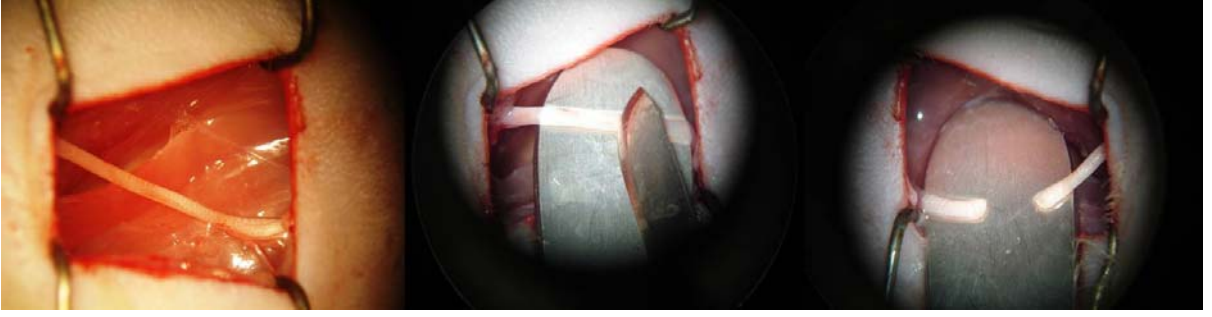
sonra sağ alt ekstremitede, oblik gluteal insizyon ile cilt ve cilt altı geğildi. Gluteus maximus ve biceps femoris kasları keskin ve künt disseksiyon ile birbirinden ayrılarak siyatik sinir ortaya çıkarıldı (Şekil 11). Siyatik sinir, mikrocerrahi aletler yardımıyla siyatik çentikten trifurkasyon bölgesine kadar evre dokulardan serbestlendi ve bu seviyenin 1 cm proksimalinden bistüri yardımı ile tek hamlede kesildi (Şekil 12). Farklı zamanlarda mikroskop altında epinöral olarak 10/0 prolene ile mikrocerrahi teknikler kullanılarak onarıldı (Şekil 13). Deneklere gruplarına uygun cerrahi işlem uygulandıktan sonra, kas 4/0 vicryl ile cilt 4/0 prolene ile sütüre edildi ve ratlar tekrar kafeslerine alındı (Şekil 14).



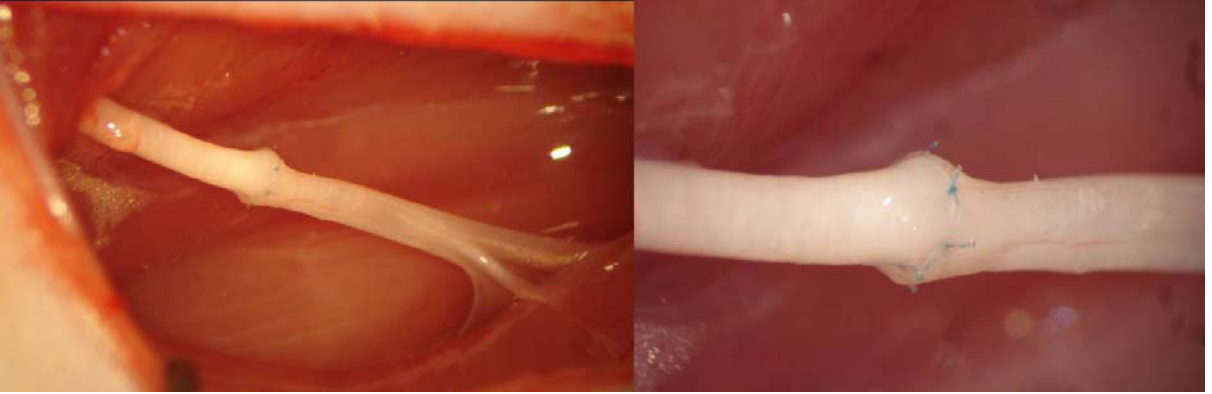
Şekil 10: Çalışmada kullanılan cerrahi ekipman.



Şekil 11: A) Ratın operasyona hazırlanması, B) Siyatik sinir diseksiyonu



Şekil 12: Siyatik sinirin trifikasyondan 1 cm proksimalinden tek hamlede kesilmesi.



Şekil 13: 10/0 Prolen ile sinirin epinöral teknikle onarılması (10x ve 16x büyütmede).



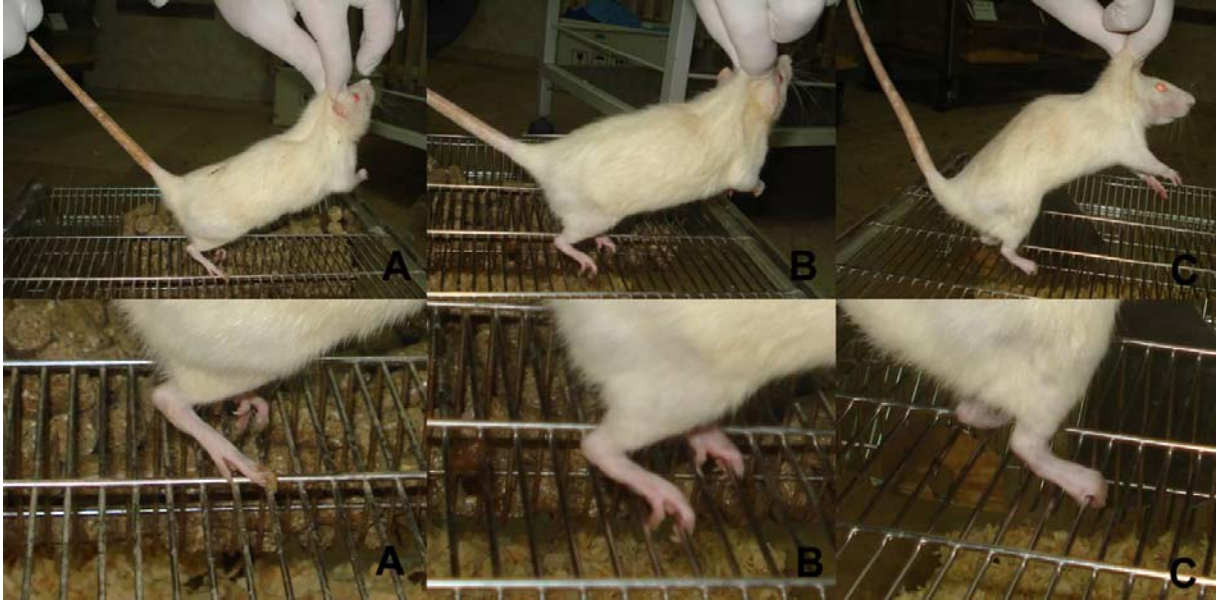
Şekil 14: Kas ve cilt sütürasyonu.

3.3. Değerlendirme Yöntemleri

3.3.1. Kavrama Testi

Sinir onarımından 12 hafta sonra ratlara kavrama testi yapıldı. Kavrama testi iki şekilde gerçekleştirildi. İlk olarak ratların bari kavrayıp kavrayamadıkları değerlendirildi ve bu kavrama esnasındaki parmaklardaki fleksiyon miktarı 3 kademedede skorlandı (Şekil 15). Bunlar; 0: kavrama yok, 1: hafif kavrama mevcut, 2: güçlü kavrama olarak kaydedildi.

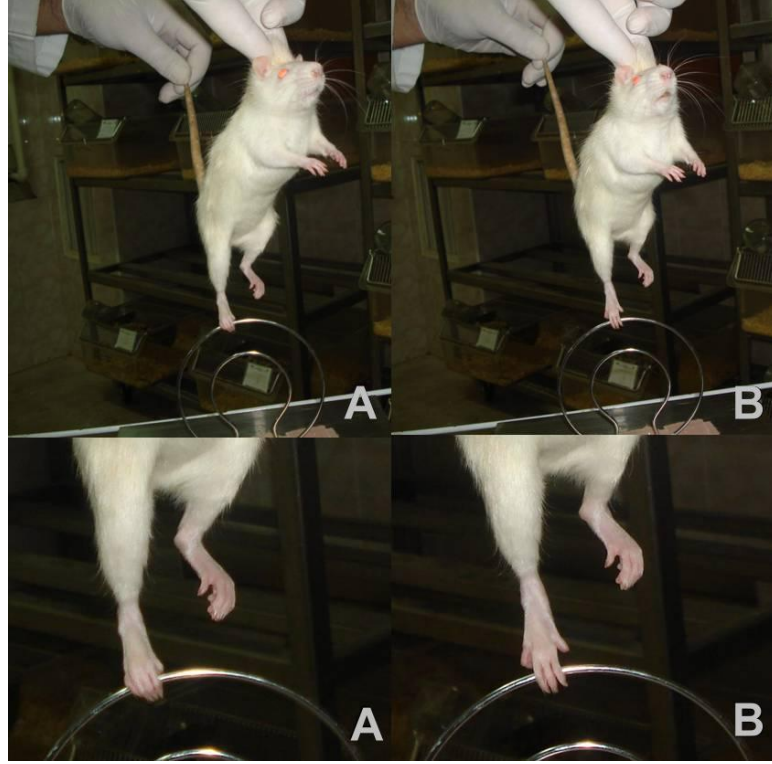
İkinci olarak ratlar başı yukarıda olacak şekilde tutularak elektronik bir ölçüm cihazına bağlı olan ızgarayı kavramasına için izin verildi (Şekil 16). Rat kavrama gücünü kaybedinceye kadar havaya kaldırıldı. Bu esnada göstergede okunan değer kavrama gücü olarak kaydedildi. Bu işlem ardışık olarak 10 dakika arayla 3 kez tekrarlandı ve göstergede okunan maksimum değerlerin ortalaması kavrama gücü olarak tespit edildi (Şekil 17).



Şekil 15: Kavrama testi skorlaması; A) Kavrama yok (0), B) Hafif Kavrama (1), C) Güçlü Kavrama (2).



Şekil 16: Kavrama gücü ölçüm düzeneği.



Şekil 17: Kavrama gücü ölçümü. A) Güçlü kavrama, B) Kavrama gücünde azalma

3.3.2. Histolojik (Histomorfometrik) Değerlendirme

12 haftalık takip süresi sonunda bütün gruplardaki ratların kavrama testleri yapıldıktan sonra anestezi altında histolojik incelemeler için ratların siyatik sinirleri alınarak servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Siyatik sinirin gluteal çentikten çıktığı yer ile bifurkasyon bölgesi arasındaki kısmı total olarak çıkarıldı. Sinir segmenti bir plastik zemin üzerinde iki ucu iğne ile tespit edilip, gergin kalması sağlandı. Sinir bu şekli ile 0.12 M tamponunda (pH 7.4) hazırlanmış %2.5 glutaraldehit solüsyonu içine konuldu. Bu solüsyonda 6 saat tespit edildikten sonra anastomozun distalinden 1 milimetrelilik örnekler alındı. Doku örnekleri 0.12 M fosfat tamponunda beşer dakika olmak üzere üç defa yıkandı ve %1 osmium tetroksit solüsyonunda 2 saat tespit edildi. Dehidratasyon işlemi artan konsantrasyonlardaki etil alkol solüsyonlarında gerçekleştirildi. Doku örnekleri daha sonra 2 x 8 dakika propilen oksit'te bekletildi. Araldite CY212, dodecenylsuccinic acid (DDSA), DMP 30 ve dibutyl phthalate karışımından oluşan araldite karışımı ve propilen oksitin eşit oranındaki karışımında 2 x 30 dakika daha bekletilen örnekler daha sonra sadece araldite karışımı içinde 2 x 2 saat 37°C'de infiltrasyona bırakıldı. Doku örnekleri en son araldite karışımı konulmuş gömme kalıplarında 60°C'de 18 saat polimerizasyonun tamamlanması için bekletildi. Doku kalıplarından ultramikrotom (Leice RM 2155) kullanılarak alınan 1µm kalınlığındaki kesitler toludin mavisi ile boyandı.

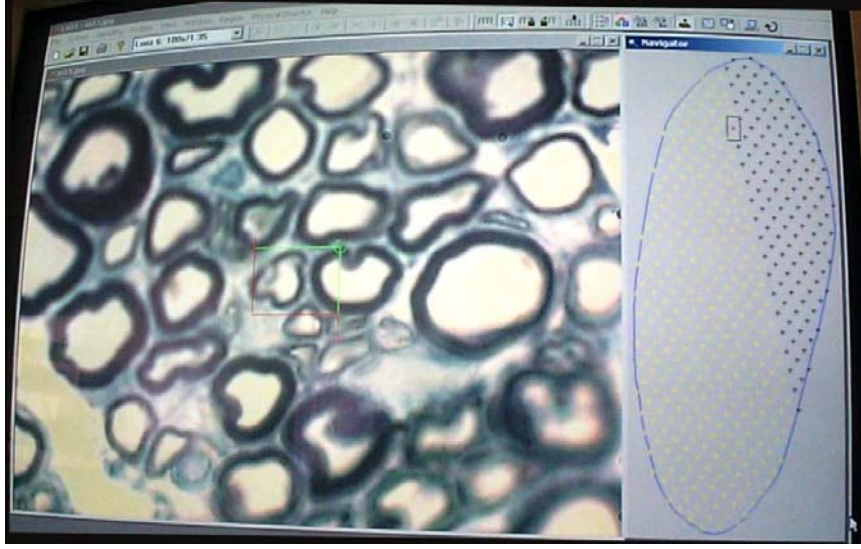
Siyatik sinirlerden elde edilen kesitlerin analizi; bir CCD dijital kamera, bir görüntü yakalama kartı (Flash Point 3D) ve tabla kontrol ünitesi (Prior) içeren bir masaüstü bilgisayar, bir bilgisayar kontrollü mikroskop tabla motoru (Prior), bir mikrokator (Heidenhein) ve bir araştırma ışık mikroskobundan oluşan Stereolojik Görüntü Analiz Sistemi ile gerçekleştirildi. Bu sistemde yapılan stereolojik ölçümler, belirtilen birimleri kontrol eden ve yeni stereolojik ölçüm araçlarını içeren bir yazılım (CAST-Computer Assisted Stereological Toolbox-Olympus-Danimarka) aracılığıyla gerçekleştirildi (Şekil 18).

Siyatik sinir kesitleri, 10 x (N.A.=1.4; son büyütme=509x) büyütmede görüntülendi ve aksonları içeren tüm sinir kesiti perimetrik olarak sınırlandırıldı. Ardından 100 x (N.A.=1.35; son büyütme=5090x) büyütmede, ekrana $59,79 \mu\text{m}^2$ alana sahip bir tarafsız sayım çerçevesi yerleştirildi. Çerçeve konumlandırıldıktan sonra alan örnekleme (meander sampling) 40 x 40 μm 'lik adımların sistematik-random-tekdüze örnekleme (STR; systematic uniform random sampling) şemasına göre doku kesiti üzerine yerleştirilmesi ile gerçekleştirildi ve her adımda tarafsız sayım çerçevesinin kurallarına uygun olan miyelinli akson kesitleri sayıldı (Şekil 19). Her adımda elde edilen sayım değerleri, kullanılan yazılım içindeki veri dosyasına kaydedilerek, daha ileri hesaplamalar bu kayıtlı dosyalar üzerinden gerçekleştirildi.

Kesitlerde bulunan toplam akson sayısına ulaşmak için, sayılan akson izdüşümü sayısı, yazılım tarafından hesaplanan STR örnekleme fraksiyonu (100/3,737) ile çarpıldı. Bu işlem sonucunda sinirde bulunan toplam akson sayısının tarafsız bir hesaplaması elde edilmiş oldu.



Şekil 18: Histolojik değerlendirme için kullanılan stereolojik sistem.



Şekil 19: Miyelinli akson sayımı esnasındaki ekran görüntüsü.

3.3.3. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki akson sayıları ve kavrama testlerinin farklılıklarının değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Verilerin bireysel analizleri ANOVA ve Student T testleri kullanılarak yapıldı. Elde edilen sonuçlar $p < 0.05$ olduğu durumda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

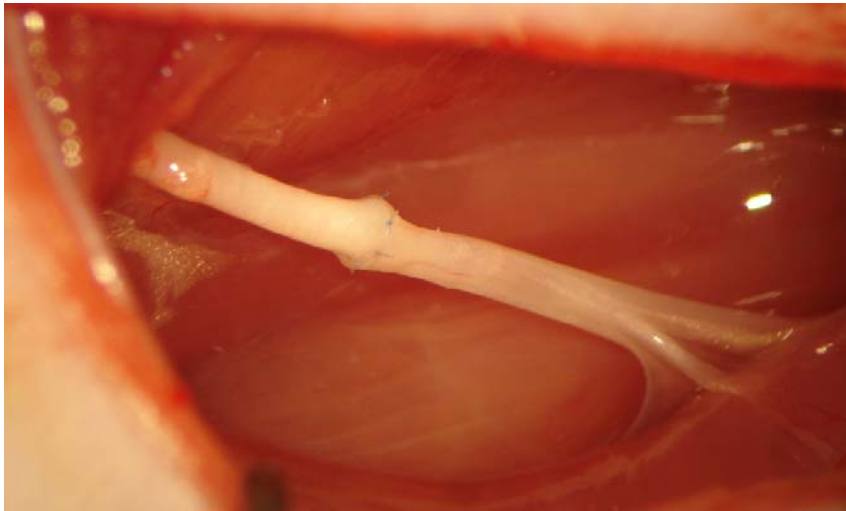
4. BULGULAR

4.1. Genel Değerlendirme Bulguları

12 haftalık takip sırasında, opere edilen ratlardan 4. ve 7. gruptan birer rat 1. haftada, 1. ve 8. gruptan birer rat 10. günde bilinmeyen nedenlerden dolayı kaybedildi. 4., 5. ve 8. gruptan birer ratta sağ ayaklarında kısmi otokanibalizasyon gözlemlendi (Şekil 20). Bütün bu hayvanlar çalışma dışı bırakılarak yerlerine yeni ratlar çalışmaya dahil edildi. Ayrıca 0. saatteki onarımlar (Grup 1 ve Grup 5) gerilimsiz ve optimum şartlarda gerçekleştirildi (Şekil 21). Melatonin verilmeyen 1. hafta onarım grubunda (Grup 8) nöroma formasyonu ve etraf dokuda ciddi fibrozis gözlemlendi. Sinir onarımı daha gerilimli yapılabildi (Şekil 22). Cerrahi işlem sonrasında tüm ratların sağ alt ekstremitelerinde paralizasyonu gözlemlendi ve bazı ratların ayak bilekleri ve dizlerinde kontraktür gelişimi gözlemlendi.



Şekil 20: Siyatik sinirin kesik olduğu sağ ayakta otokanibalizasyon.



Şekil 21: 0. saatte (Grup 1 ve 5) yapılan gerilimsiz sinir onarımı.



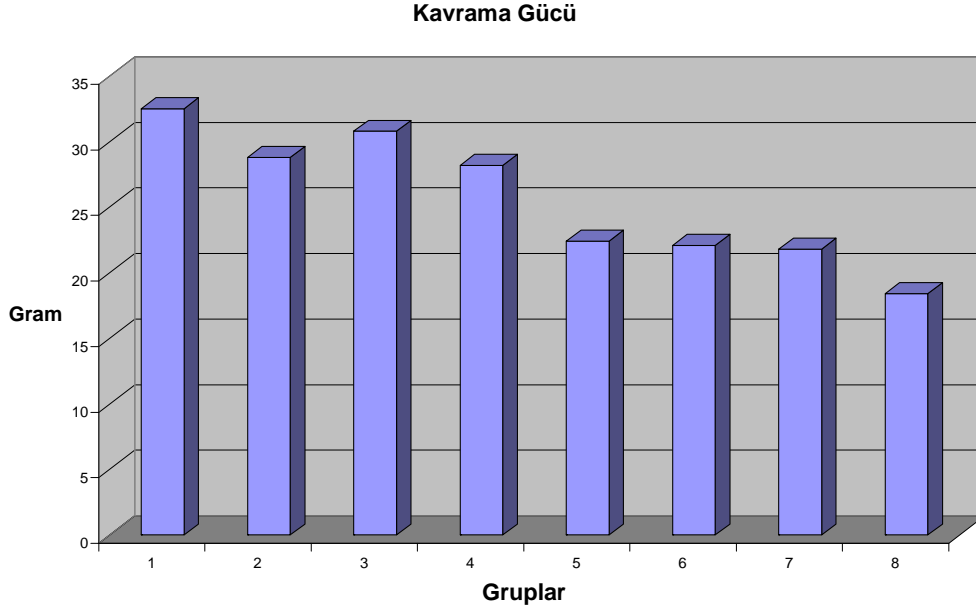
Şekil 22: Sinir kesisi sonrası 1. haftada meydana gelen nöroma formasyonu ve fibrozis.

4.2. Kavrama Testi Bulguları

Postoperatif 12. hafta sonunda, hazırlanan bir düzenek yardımı ile bütün gruplardaki ratların her birine kavrama testi yapıldı. Kavrama gücü skoru Tablo 1’de, kavrama gücü değerleri ise Şekil 23’de özetlenmiştir. Gruplardan elde edilen kavrama güçleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Ancak akson sayısı ile kavrama gücü arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korelasyon olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Tablo 1: Grupların kavrama skorları.

Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7	Grup 8
1	0	1	2	2	1	2	0
2	2	2	1	1	1	1	0
2	1	2	2	1	2	2	1
0	0	1	1	2	2	2	1
1	1	0	0	1	1	1	2
2	2	1	1	2	1	0	1
2	1	2	2	1	2	0	2
1	1	1	0	0	0	1	0
2	2	0	1	1	0	1	1
1	2	2	2	1	1	1	1



Şekil 23: Graplardan elde edilen kavrama gücü değeri.

12. hafta sonunda anestezi altında histomorfometrik analizler için, siyatik sinirler alındı ve ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildiler.

4.3. Histolojik Bulgular

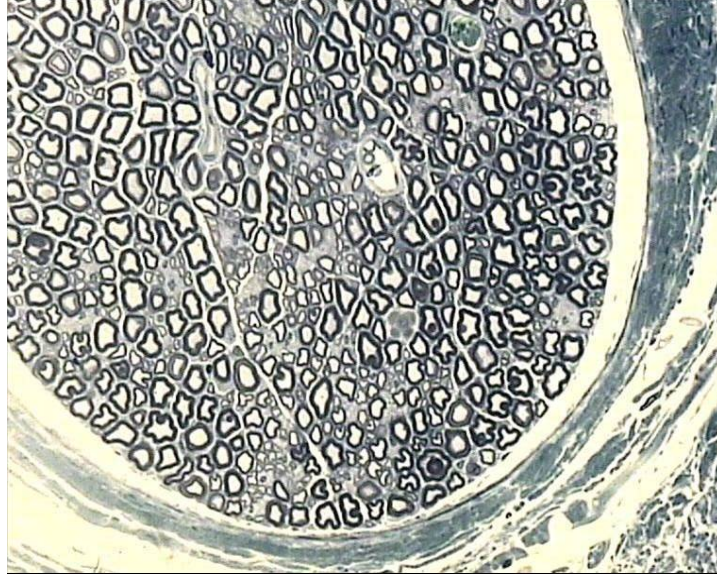
4.3.1. Makroskopik Bulgular

Kavrama testini takiben yapılan makroskopik değerlendirmede ciltteki sütür hatlarında, yara iyileşmesinde ve suture edilen kaslarda herhangi bir problem gözlenmedi. Siyatik sinirlerin eksplorasyonunda tüm sinir anastomozlarının intakt olduğu görüldü. Grup 5, 6, 7 ve 8'de sütür hatlarına uyan bölgelerde farklı miktarlarda nöroma oluşumu ve yapışıklıklar gözlemlendi. Grup 1, 2, 3, ve 4'te herhangi bir nöroma formasyonu gözlenmedi. Daha sonra, bütün ratların cerrahi işlem uygulanan sağ siyatik sinirleri anastomoz alanının proksimal ve distalden in vivo olarak fikse edildikten sonra histolojik inceleme için kesilerek çıkarıldı. Doku parçaları %10'luk nötral tamponlu formaldehit içine konarak inceleme için laboratuara ulaştırıldı.

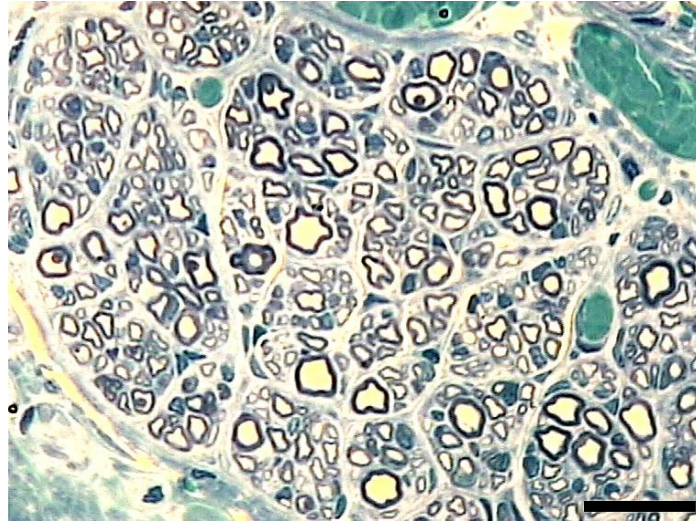
4.3.2. Mikroskopik Bulgular

Sinir kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin, epinörium ile çevrili olduğu gözlemlendi. Epinöriumda fibröz bağ dokusu dışında, kan damarlarının varlığı da gözlemlendi. Epinöriumun altında, değişik çaplarda miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin bulunduğu sinir fasiküllerinin varlığı gözlemlendi. Miyelinli sinir liflerinin çoğu alanlarda

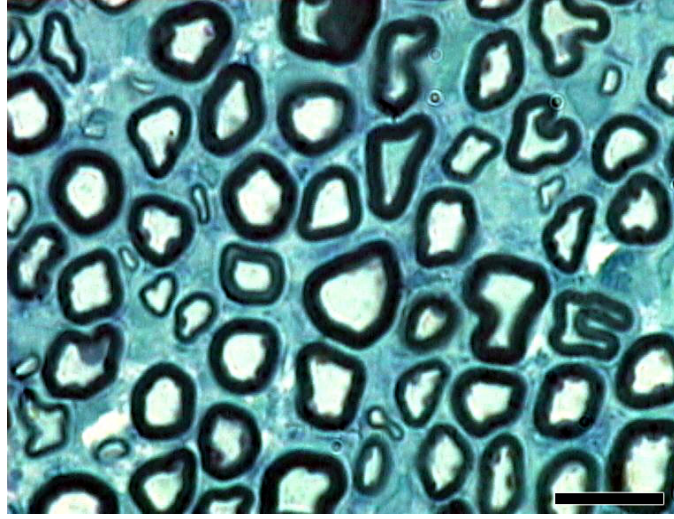
rejenere oldukları ve akson ve miyelin kılıf yapıları ile birlikte normal görünümde oldukları kaydedildi. Bununla beraber bazı miyelinli sinir liflerinde, akson etrafında yer alan miyelin kılıfın normal yapısının bozulduğu, miyelin kılıf ve aksonun dejenere oldukları gözlemlendi (Şekil 24, 25, 26).



Şekil 24: Rejenere siyatik sinir segmentinin genel görüntüsü (Toluidin mavisi)



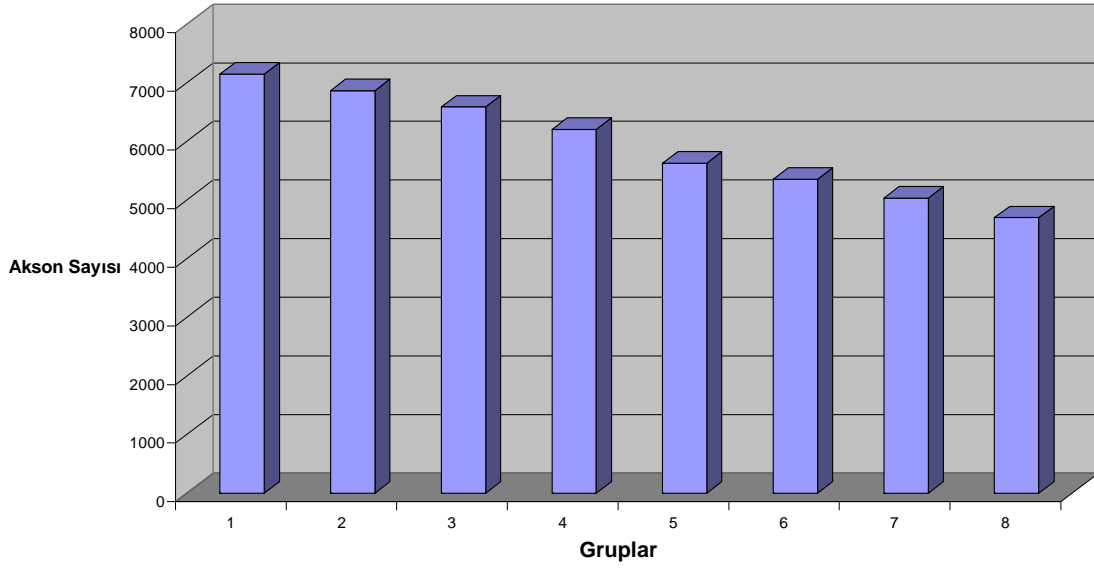
Şekil 25: Rejenere aksonlardan oluşan fasiküller (Toluidin mavisi).



Şekil 26: Rejenere Siyatik sinir segmentinde miyelinli aksonlar (Toluidin mavisi).

Gruplardan elde edilen miyelinli akson sayıları Şekil 25’de ve Tablo 2’de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre onarım zamanı ve melatoninin sinir iyileşmesi üzerine olan etkisinin değerlendirildiği Grup 1, 2, 3 ve 4’ te elde edilen miyelinli akson sayıları arasındaki fark bazı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Onarım zamanının sinir iyileşmesi üzerine olan etkisinin değerlendirildiği Grup 5, 6, 7 ve 8’de gruplar arasındaki miyelinli akson sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Benzer onarım zamanlarındaki gruplar arasında (Grup 1,2,3,4 ve Grup 5,6,7,8) miyelinli akson sayılarına melatoninin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Melatoninin etkisinin araştırıldığı gruplardan Grup 1 ve Grup 2’nin miyelinli akson sayılarına melatoninin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Grup 1 ve Grup 3’ün miyelinli akson sayılarına melatoninin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Grup 1 ve Grup 4’ün miyelinli akson sayılarına melatoninin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Grup 2 ve Grup 3’ün miyelinli akson sayılarına melatoninin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Grup 2 ve Grup 4’ün miyelinli akson sayılarına melatoninin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Grup 3 ve Grup 4’ün miyelinli akson sayılarına melatoninin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Gruplardan elde edilen kavrama testi sonuçları ile miyelinli akson sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edildi ($p<0,05$).

Grupların Rejenere Akson Sayıları



Şekil 27: Gruplardan elde edilen miyelinli akson sayılarının karşılaştırılması.

Tablo 2: Gruplardan elde edilen ortalama miyelinli akson sayıları.

GRUPLAR	Miyelinli Akson Sayısı
Grup 1	7148,5 ± 463,04
Grup 2	6865,1 ± 351,54
Grup 3	6589,9± 336,86
Grup 4	6206,9 ± 240,10
Grup 5	5631,3 ± 222,28
Grup 6	5354,5 ± 176,79
Grup 7	5034,4 ± 160,33
Grup 8	4699,2 ± 276,99

5. TARTIŞMA

Hipokrat periferik sinir sistemi yaralanmaları için “sinir kesildiği zaman kendi kendini iyileştiremez” demiştir. Ancak periferik sinir sisteminde santral sinir sisteminden farklı olarak hem dejenerasyon hem de rejenerasyon görülür (54,105,106). İnsanlarda, travmatize olmuş periferik sinir aksonlarının oldukça yüksek bir rejenerasyon yeteneği mevcuttur (221).

Klinik olarak travmatik periferik sinir lezyonları hekimleri zorda bırakan ve cerrahi tedavi sonrası başarı şansının çoğunlukla sınırlı bir düzeyde kaldığı patolojilerdir. Major düzeyde bir morbiditeye neden olur, ciddi ekonomik ve sosyal problemlere neden olabilir (269). Sinir kesisi ve onarımını takiben meydana gelen dejenerasyon ve rejenerasyon olayları uzun yıllardan beri bilinmektedir ve bu konuda çok fazla çalışma yapılmıştır. Son yıllarda, sinir iyileşmesi üzerine yapılan çalışmaların yardımıyla periferik sinir yaralanmalarındaki patofizyolojik mekanizmalar ve moleküler düzeydeki değişimler aydınlanmaya başlamıştır. Bu konuda çok fazla şey bilinmesine rağmen, sinir kesilerinin klinik tedavilerinin temel prensipleri çok fazla değişim göstermemiştir. Günümüzde bile, keskin bir cisimle düzgün kesilmiş bir sinirin cerrahi teknik olarak mükemmel onarılmış olması, iyi bir fonksiyonel sonucun garanti edemez ve çoğu zaman sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel geri dönüş yetersizdir (18,270). Çok farklı nedenlerle oluşabilen periferik sinir yaralanmalarında tedavideki asıl amaç, rejenere olan liflerin proksimal uçtan distal uca ilerleyerek denerve end organın reinnervasyonunun sağlanması ve sinir bütünlüğünün, dolayısı ile iletinin tekrar sağlanması, sinirin bağlantılı olduğu end organ fonksiyonlarının en az kayıpla yerine konulabilmesidir. Başarılı bir sinir rejenerasyonu, aksonal tomurcuklanma, büyüme, uç organ reinnervasyonu ve santral sinir sistemi ile rejenere olan liflerin integrasyonu gibi pek çok aşamanın tamamlanması gereken karmaşık bir süreçtir (271-273).

Periferik sinir hasarı sık karşılaşılan klinik problemlerden biridir. Böylesi durumlarda en iyi çözüm nörorafidir. Sinir kesilerinde onarım sonrası iyileşmenin kalitesini ve aksonal rejenerasyonu birçok faktörün etkilediği bilinmektedir. Bunlar; yaralanmanın şekli, şiddeti, hastanın genel durumu, onarım şekli, onarım zamanı ve cerrahın deneyimidir (158). Periferik sinir kesilerinde optimal onarım zamanının ne olacağına dair pek çok çalışma yapılmıştır ve bu konudaki tartışmalar hala devam etmektedir. Sinir onarım zamanlaması; sinirin yaralanma şekline, yaranın durumuna ve sinirin vasküler durumuna bağlıdır (23,24). Keskin bir cisimle meydana gelen, ezilme komponentinin olmadığı ya da minimal olduğu temiz yaralarda ve iyi vasküler desteğin

mevcut olduğu olgularda fonksiyonun geri kazanılabilmesi için en iyi seçenek primer sinir onarımıdır. Tarihsel olarak, primer sinir onarımı, Wallerian dejenerasyonun tamamlanması için zaman kazanmak amacıyla yaralanmadan sonraki ilk 3 hafta içerisinde yapıldı. Ancak Mackinnon ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda daha iyi sonuçların alınabilmesi için kesilen sinirin acilen onarılması gerektiğini göstermişlerdir (22). Son zamanlarda primer onarım sinir kesisini takip eden ilk 72 saat ile 7 gün arasında yapılmaktadır, sekonder onarım ise 1. haftadan sonra yapılmaktadır (25,76,274). Ancak erken onarım için uygun olmayan olgularda gecikmiş onarım yapmak gerekir. Sinir kesisini takiben ilk üç haftada sinir uzunluğunun %8'i kadar retrakte olabilir, dolayısıyla sekonder onarım teknik olarak daha zordur ve sinir grefti gerekebilir (163). Direkt sinir onarımı, iki sinir ucu arasındaki defektin minimum olduğu ve minimal gerilimle yaklaştırılabildiği durumlarda tercih edilir (164). En iyi sonuçlar saf duyu ya da saf motor lif taşıyan sinirlerde elde edilmektedir (163,165). Sinir onarımı sonrası optimal sinir rejenerasyonunun olabilmesi için sinir uçları gerilimsiz olarak doğru şekilde yönlendirilmeli ve atravmatik bir şekilde minimal doku hasarıyla en az sayıda sütür ile onarılmalıdır (17,22,25,86,166-170).

Periferik sinirin kesildiği anda onarılması iatrojenik yaralanmalar haricinde mümkün değildir. Dolayısıyla ideal onarım zamanını tespit etmek, onarım sonrası daha iyi fonksiyonel geri dönüş için önemlidir. Bu konuda, kesi sonrası sinirde meydana gelen değişiklikler bize yol gösterebilir. Sinir kesildikten sonra meydana gelen değişiklikler yapılan çok sayıda çalışma ile ortaya konmuştur. Seviyesi ne olursa olsun hasar distalindeki tüm miyelinli veya miyelinsiz liflerde, distal aksondan hedef-organa kadar Wallerian dejenerasyon meydana gelir (5,65,66,68,103,110-114,140). Aksonal yaralanmayı takiben ilk 6 saat içerisinde miyelin dejenerasyonu başlar, 6-12. saatte kan-sinir bariyeri bozulur. Her ne kadar bu değişiklikler kesilme sonrası 1-2 saat içinde başlasa da, distal güdükte morfolojik değişiklikler 2-3 gün içinde görünür hale gelir. Aksonal şişmeyi takiben miyelin fragmente olur. Miyelin sistemlerin kollapsı, sinir kesisini takip eden 72. saatte görülür (140). Wallerian dejenerasyon genellikle memelilerde 4. günde tamamlanır. Zaman içinde miyelin, Schwann hücrelerince ve makrofajlarca fagosite edilir. Aksonotomi sonrası bu değişikliklerin büyük bir kısmı ilk birkaç hafta içerisinde tamamlanır (15,16,19,65). Bu dejeneratif süreç aslında rejenerasyon için hazırlık aşamasıdır ve olması zorunludur. Sinirdeki dejenerasyon ve rejenerasyon süreci dinamiktir ve süreçler iç içe geçmiştir. Zaman ilerledikçe dejenerasyon ve rejenerasyon arasında bir denge kurularak sinir iyileşmesi ivme kazanır. Schwann hücreleri yaralanmadan sonra 24 saat içinde aktif hale geçer, çekirdek ve sitoplazmik büyüme gösteren hücreler, hızla

bölünerek, dejenerasyon ve tamir yoluna yardım edecek bir çok molekülü eksprese ederler (5,15,115). Daha sonra Schwann hücreleri proliferere olmaya başlarlar, bu yaralanmadan yaklaşık olarak 12 saat sonra başlar, 3 günde maksimuma ulaşır ve ilk hafta boyunca yavaşça azalır (16,76,116). Proksimal kesik uçta terminal ve kollateral aksonal tomurcuklanmalar meydana gelir. Hasarlanmış sinirde akson ucundan tomurcuklanma ilk 6 saat içinde başlamasına karşın, bu ilk tomurcuklar genelde rezorbe olurlar. İnternal sitoskeletal yapıları olan kalıcı tomurcuklar, genelde ilk 24 saatin sonunda belirmeye başlarlar (8). Bütünlüğü bozulmuş sinirde meydana gelen bu değişiklikler çalışmamızdaki; Grup 5 (0. saat onarım grubu), Grup 6 (12. saat onarım grubu) ve Grup 7 (24. saat onarım grubu)'de elde edilen miyelinli akson sayılarının Grup 8 (1. hafta onarım grubu)'den istatistiksel olarak anlamlı seviyede ($p<0.05$) farklı olmasını açıklayabilmektedir. Dolayısıyla bu veriler kalıcı aksonal tomurcuklanma safhasında sinir onarımı gerçekleştirdiğimizde daha iyi ve hızlı bir aksonal rejenerasyon elde edeceğimizin bir göstergesidir. Ayrıca çalışmamızda miyelinli akson sayıları en erken onarım zamanında (Grup 5 – 0.saat) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0.05$) fazla tespit edilmiştir. Onarım zamanı geciktikçe akson sayılarındaki tedrici azalma da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Gruplar arasındaki kavrama testi değerleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p> 0.05$). Literatürde de geç dönemde yapılan sinir onarımlarında akson sayısında azalma meydana geldiği bildirilmiştir (275). Yapılan çok sayıdaki çalışmada rejenere akson sayısı ile fonksiyonel geri dönüş arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (276,277). 24 saat içerisinde dejenere olmuş sinir uçlarında reaktif epinöral fibroblastlar ortaya çıkar. Etkin hücresel çoğalma bir hafta içinde en yüksek düzeye ulaşır (4,5,99,103). Barrs'ın domuz fasiyal sinirinde yaptığı çalışmada 0. günde ve 5. günde yapılan sinir onarımlarında elde edilen rejenere akson sayılarını geç dönemde yapılan onarımlardan anlamlı derecede farklı bulmuştur (159). Aksonal tomurcukların sayısı zamanla azalır, bazıları distal segment ile bağlantı yaparken; diğerleri regrese olur (16). Proksimal sinir ucunda meydana gelen bu rejeneratif değişikliklerin sinirin distal ucuna ilerleyebilmesi için sinirin kesik olan proksimal ve distal uçlarının birbiri ile tekrar temas halinde olması gereklidir. Eğer bu dönemde sinirin kesik uçları cerrahi olarak karşı karşıya getirilir ise, proksimaldeki aksonal uzantılar distalde yer alan sinir segmentine doğru büyümeye devam eder. Bu ilerleme sinir iyileşmesinin başarısını etkileyen en önemli olaydır (8,16,76). Periferik sinir kesisi sonrasında proksimal sinir ucundan başlayan rejenerasyonun distale ilerlemesinde bir blok olduğunda ya da proksimal sinir güdüğü ile distal güdük uç uca getirilerek onarım

gerçekleştirilmediğinde akson rejenerasyonunda aksama olur. Aksonal uzantılar çevre doku içine doğru yanlış bir yönelim göstererek sonlanır. Proksimal uçtan gelişen aksonal sürgünler çevre bağ dokusu içine doğru kaçarak nöroma formasyonu meydana gelir (54,78,82,107,109,133,134). Geç dönemde yapılan sinir onarımlarında sinir uçlarında meydana gelen kalın kollajen bariyerler nedeniyle proksimal uçtan distal uca efektif akson penetrasyonu zorlaşmaktadır (279). Yapılan çalışmalarda ise 5. günden sonra gerçekleştirilen sinir greftlemesinde fibröz doku proliferasyonunun ciddi cerrahi probleme neden olduğu gösterilmiştir (280,281). Çalışmamızda 1. haftada yapılan sinir onarımında (Grup 8) sinir güdüklerinin uçlarında nöroma meydana geldiği gözlemlendi. Bu yapıların rezeksiyonu sonrasında retrakte sinir güdüklerinin boyları daha da kısalarak gerilimli bir koaptasyon yapılmasına neden olmuştur. Ayrıca sinirin etrafında meydana gelen yoğun skarın seri rezeksiyonu ile sinir ucuna ancak ulaşılabilmektedir.

Hücre ölümü duyu nöronları için daha tipiktir. Duyu hücre gövdelerinde gerçekleşen hücre ölümünün, hasar sonrası ilk 24 saat içerisinde gerçekleştiğine dair çeşitli bilgiler mevcuttur ve bu bilgiler ışığında tedavinin ilk 24 saat içerisinde başlaması gerekmektedir. Motor nöronlarda duyu nöronları ile kıyaslandığında hücre ölümü daha az gerçekleşmektedir (19,282). Ancak sinir kesisinden sonra fonksiyonel geri dönüşü optimize etmek için erken reinnervasyon gereklidir (160,161). II. Dünya savaşı esnasındaki periferik sinir yaralanmalarıyla ilgili tecrübelerde; sinir onarımındaki her 6 günlük gecikmenin onarım sonrası elde edilecek performansta %1'lik bir düşüşe neden olduğu ve 3. aydan sonra bu düşüşün çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir (162). Tavşanlarda yapılan çalışmalarda erken dönem sinir onarımı sonrası geç döneme göre daha iyi fonksiyonel geri kazanım elde edilmiş ve bu durum histolojik inceleme ile de konfirme edilmiştir (139,162). Ayrıca maymunlarda yapılan bir çalışmada ise erken sinir onarımı sonrası elin intrinsik kaslarında daha fazla miktarda motor innervasyon olduğu gözlemlenmiştir (283). Pek çok cerrah erken dönemde sinir onarımını önermektedir, erken dönemde yapılan sinir onarımlarında kas kuvveti daha iyi bulunmuştur (139,284). Sinir onarımı sonrası fonksiyonel dönüşün kötü olmasını sebepleri arasında geç dönem sinir onarımı yer almaktadır (285). Geç dönem sinir onarımları ancak ezilme tarzı yaralanmalarda, kontamine yaralarda ve genel durumu kötü hastalarda iyi bir seçenek olabilir.

Distal sinir segmentinin vasküler ağı da yaralanmaya cevap olarak, önce vazokonstrükte olur, daha sonra vazodilate olur, ama en başarılı aksonal rejenerasyondan sonra bile orijinal kan akımının ancak %60-80'ine ulaşabilir (137). Geç dönemde yapılacak

greftsiz bir koaptasyonda onarım sahasındaki gerilim, kan akımını azaltarak daha fazla skar ve adhezyon oluşumu ile rejenerasyonu engellemektedir. Clark ve ark. sinirde meydana gelen %8'lik bir gerdirmenin kan akımını %50 oranında azalttığını %15'lik bir gerdirmenin %80 oranında kan akımını azalttığını bildirmiştir. Ayrıca sinirde meydana gelecek %16-%17'lik bir uzama kan akımının azalmasının yanı sıra mekanik olarak da onarım zorluğuna neden olacağı ifade edilmiştir (119,286). Yapılan bir çalışmada ise sinir kesisi sonrası geç dönemde hücre metabolizması ve sinir kan akımının arttığı bildirilse de bu artış rejenerasyon akson sayısını etkilememiştir (159). Gerilimsiz direkt sinir koaptasyonu sinir kesisini takiben ilk birkaç gün içerisinde mümkündür (287,288). Erken dönemde yapılan uç uca sinir onarımında proksimal ve distal sinir uçlarından çok az miktarda yapılacak rezeksiyon ile iyi bir koaptasyon sağlanabilirken geç dönemde yapılan sinir onarımlarında sinir uçlarında meydana gelen nöroma formasyonu ve etraf dokuda meydana gelen fibrozis nedeniyle sinir uçlarından daha fazla rezeksiyon gerekmektedir (289). Öyle ki sinir grefti ihtiyacı doğuracak düzeyde sinir defekti meydana gelebilmektedir. Bizim çalışmamızda da 1. haftada onarılan grupta (Grup 8) kesik sinirin uçları eksplore edilirken etraf dokunun oldukça fibroze olduğu, proksimal sinir güdüğünde nöroma formasyonu meydana geldiği bununla birlikte sinirin proksimal ve distal güdüklerinde retraksiyon olduğu gözlemlendi. Sinir uçlarının diseksiyonu diğer gruplara nazaran daha zordu ve proksimal sinir güdüğünden daha fazla rezeksiyon yapılmak zorunda kalındı. Dolayısıyla bu grupta sinir onarımları diğer gruplara göre daha gerilimli olarak gerçekleştirildi. Millesi brakial plexus yaralanmaları ile ilgili yaptığı çalışmada sinir kesisinden sonraki ilk 72 saatte uç uca sinir onarımı için uygun koşulların mevcut olduğunu, sinir uçlarında meydana gelen retraksiyonun minimal olduğunu, gerilimsiz koaptasyonun mümkün olduğunu ve sinir grefti ihtiyacının olmadığını bildirmiştir (290). Geç dönemde yapılan sinir onarımlarında sinir grefti ihtiyacı kaçınılmaz olabilir böyle bir durumda otojen sinir grefti alınması ikinci bir cerrahi işlem gerektirmekle kalmayıp operasyon zamanını uzatarak sinir donör alanında ek morbiditeye de neden olmaktadır.

Sinir kesilerinde onarım sonrası iyileşmenin kalitesini ve aksomal rejenerasyonun hızını birçok faktörün etkilediği bilinmektedir. Uç organlardan salgılanan trofik maddeler bu yönlendirmeyi düzenlerler (16). Akson kesisi sonrası, hedef hücrelerce salgılanan nörotrofik faktörler retrograd aksomal transportla hücre gövdesine taşınır. Bu reaksiyonel değişiklikler hasar sonrası ilk haftalarda en yüksek değerine ulaşır. Bu değişikliklerin amacı kaybolan aksoplazmik hacmi yerine koyabilmektir (5,16). Nörotrofik aktivite, sinir kesisinden sonraki ilk 3-6 saat arasında pik yapmakta ve sonraki 1-7 gün içinde normale

dönmektedir (291). Sinir rejenerasyonu ve maturasyonu üzerindeki olumlu etkileri bilinen nörotrofik faktörler, kesilmiş sinirde distal sinir ucundan da salgılanmaktadır. Distal uçtan salgılanan bu nörotrofik maddeler difüzyonla ancak belli bir mesafeye kadar proksimale yayılabilirler (292,293). Dolayısıyla proksimal segmentle irtibatı kesilen distal segmentten salınan nörotrofik faktörlerin rejenerasyona katkı yapabilmesi için proksimal güdük ile tekrar temasının sağlanması gerekmektedir. Bu temas erken dönemde koaptasyon ile sağlanırsa daha hızlı ve kaliteli rejenerasyon elde edilebilecektir. Bütün bu veriler klinik olarak periferik sinir kesisinde sinir onarımının acil bir cerrahi girişim olduğu ve mümkün olan en erken zamanda yapılması gerektiğini göstermektedir.

Melatonin (N asetil-5-metoksitriptamin) pineal bezden salgılanan, 232 molekül ağırlıklı, en ilkel canlıdan en gelişmişine kadar bütün aerobik canlılarda bulunan ve evrim boyunca korunmuş bir moleküldür (180). Melatonin yüksek lipofilik ve hidrofilik özelliğe sahiptir, vücutta depolanmadan kan ve vücut sıvılarına hızla karışır (41). Melatonin lipid çözünürlüğünden dolayı hücre membranını kolaylıkla geçer, tüm hücre organellerine nüfuz edebilir ve hücrenin mitokondrisine nüfuz edebilen bir antioksidandır. Bu sayede mitokondrileri de oksidasyon zedelenmesinden koruyabilmektedir. Fizyolojik etkilerini hem spesifik reseptörler aracılığıyla, hem de reseptörden bağımsız olarak gösterebildiği bildirilmiştir (200). Serbest radikaller hücrede lipid, protein, DNA ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklere etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri serbest radikaller için oldukça çekici makromoleküllerdir. Biyomoleküllerin tümü serbest radikallerin etki alanında olsalar da lipitler en duyarlı yapılardır. Serbest radikaller başlıca moleküler oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır (294). Lipid peroksidasyonu membranların iyonlara geçirgenliğini artırarak membran reseptör ve enzimleri gibi transmembran proteinlerde hasar oluşturur (295). Lipid membranın destrüksiyonu hücrede iyon ve enzim imbalansına neden olur, bu durumda Ca^{+2} akımına, hücre ödemine ve nekroza yol açar (296). Travmayı takiben lipid peroksidasyonunda artış meydana gelir. Yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonunda belirgin artışın 1, 24 ve 48. saatte olduğu gösterilmiştir (46).

Melatonin fizyolojik olarak en güçlü serbest radikal temizleyicisidir. Melatonin serbest radikallere direkt etkisinin yanında, glutatyon peroksidazı aktive ederek glutatyon üzerinden de antioksidan etki göstermektedir (207). Melatoninin antioksidan kapasitesi birçok çalışma ile gösterilmiştir (44). Bu çalışmalarda in vitro melatoninin etkisinin glutatyonun beş ve mannitolün onbeş katı olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada

melatoninin en etkili antioksidanlardan E vitamininden iki kat daha etkili olduğu bildirilmiştir (39,208). Melatoninin periferik sinir kesisi sonrasında rejenerasyona etkisi üzere çok sayıda çalışma yapılmıştır. Biyolojik sistemlerde melatoninin antioksidan özellikleri iyi bilinmektedir (223). Travmanın indüklediği periferik sinir hasarından korunmada yararlı etkileri mevcuttur. Örneğin, sinir sisteminde oksidasyon esnasında Melatonin perioksidatif hasarı engeller (39,224). Melatonin santral sinir sisteminde reaktif oksijen radikallerinin zararlı etkilerini, serbest radikal temizleyici etkisiyle veya nitrik oksit sentaz aktivitesini azaltarak radikal üretimini azaltabilir (38,48,225-227). Melatonin kullanılanlarda peroksidasyon hızının hasar öncesi seviyesine döndüğü, melatoninin 48. saatten sonra maksimum etki gösterdiği ve kronik nöroprotektif etkisi olduğu tespit edilmiştir (37). Melatonin ayrıca posttravmatik polimorfonükleer hücre infiltrasyonunu da inhibe eder (228), süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazı stimüle eder. Ek olarak nöral lipid peroksidasyonunu azaltarak siyatik siniri iskemi reperfüzyon hasarından korur (229). Shokouhi ve ark. künt siyatik sinir hasarı sonrası, lipid peroksidasyonu ve sinir lifi hasarında melatoninin düşük doz (10 mg / kg) ve yüksek dozlardaki (50 mg / kg) nöroprotektif etkisini araştırmışlardır (43). Bu çalışmanın sonuçlarına göre düşük doz melatonin siyatik sinirdeki aksonal değişiklikleri ve travmanın indüklediği miyelin hasarını azaltmıştır. Bununla birlikte yüksek doz melatonin ultrastrüktürel değişiklikleri nerdeyse tamamen nötralize etmiştir. Bu nedenle, 50 mg / kg dozdaki melatonin künt travma sonrası oluşan sinir hasarında potent nöroprotektif etki göstermiştir ve periferik sinir liflerini lipid peroksidasyonundan koruyabilmektedir (43). Yenidoğan rat motornöronları siyatik sinir kesisinde savunmasızdır (231). Yapılan bir çalışmada, yenidoğan ratlarda siyatik kesisinde ölümlerin büyük çoğunluğunun aksotomize motor nöronlarda olduğu tespit edilmiştir (238). Memelilerin periferik ve santral sinir sisteminde farklı nöronlarda periferik sinir hasarını takiben nitrik oksit sentaz (NOS) eksprese olur, normalde nöronlar NOS aktivitesinden yoksundur muhtemelen sinir hasarını takiben ortaya çıkmaktadır (232). Bazı araştırmacılar yenidoğan ratlarda siyatik sinir kesisi sonrasında motor nöron ölümünün NOS'un bir izoformu aracılığıyla olabileceğini öne sürmüşlerdir (233-236). Bir nikotinamid adenin dinükleotid fosfat bağımlı diaphorase (NADPH-d) sitoplazmada mevcuttur (234,237). Yaralanmanın indüklediği NOS ekspresyonunda hasarlı hücrelerin ölümü bu olay için sinyal gibi görünmektedir ve bu enzim nitrik oksiti nörotoksik düzeylerde üreten bir katil protein olarak işlev görüyor olabilir (234). Son zamanlarda, spinal motornöronlarda aksonal hasar sonrasında antioksidan ajan ve nöronal NOS (nNOS) inhibitörü olarak melatoninin muhtemel

etkilerinin olabileceği araştırılmıştır (243). Bu çalışmada rat yavrularında siyatik sinir postnatal 2. ve 7. günde kesilmiş, melatonin 1-50 mg/kg dozlarda nöronal ölümü azaltmış yani melatonin düşük dozlarda da nöroprotektif etki göstermiştir. Melatonin yüksek dozlarda (50 ve 100 mg / kg) toksik etki göstermiştir. Ayrıca, kontrol ve tedavi gruplarında nNOS ekspresyonu açısından fark görülmemiş, siyatik havuzunda hayatta kalan motor nöronlarda enzim eksprese edilmemiş (243). Melatonin postnatal 3. ve 7. günlerde aksotomiye takiben motor nöron kaybını yaklaşık % 75 azaltır. Bununla birlikte ne siyatik kesisinde ne de melatonin grubunda enzimlerde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir (238). Melatonin sadece santral sinir sisteminde apoptotik hücre ölümünü azaltmakla kalmayıp aynı yenidoğan ratlarda periferal aksotomiyle indüklenen nöronal ölümü de azaltır (239). Bu nedenle, siyatik aksotomi sonrasında ve melatoninin uygulandıktan sonra apoptotik olaylar araştırılmıştır (240). Neonatal ratlarda medulla spinaliste içinde hücre ölümü organizatörü Bax ve antiapoptotik protein olan Bcl-2 üzerine odaklanılmış. Bu çalışmanın sonucunda, postnatal 2. günde siyatik kesisinde lumbar genişlemede Bax mRNA'sı artmış, immatür motor nöronda Bax immünoreaktivitesinde aksotomi ile herhangi bir değişiklik meydana gelmemiş ve son olarak melatoninin motornöron ve dorsal boynuz hücrelerini Bax ve Bcl-2'den bağımsız bir mekanizma aracılığı ile koruduğu görülmüş. Bu nedenle, yenidoğan ratın dorsal boynuzundaki fizyolojik ve aksotomi ile indüklenen hücre ölümü Bax ekspresyonu ile birlikte dir. Bununla birlikte bu ekspresyon motornöron ölümüyle ilişkili değildir. Melatonin sinir hasarından 1 gün sonra sadece aksotomize motornöronları korumakla kalmayıp dorsal boynuz hücrelerinin kaybını da azaltmıştır. Her iki durumda da, nörohormonun etki mekanizması Bax veya Bcl-2'nin ekspresyonundaki değişikliklerle ilgili değildir (240). Melatoninin koruyucu etkisinin en belirgin olduğu miyelinin yanı sıra nükleer, aksonal ve mitokondrial korumada da iyi olduğunu, ek olarak melatoninin nöron koruyucu etkisi zedelenmeden bir saat sonraya göre 48 saatte daha belirgin olduğu bildirilmiştir (297).

Çalışmamızda melatonin gruplarında (Grup 1, 2, 3 ve 4) elde edilen rejenere akson sayılarının melatonin uygulanmayan gruplarla (Grup 5, 6, 7 ve 8) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). 0. saat ile 12. saatte yapılan onarımlar sonrasında elde edilen rejenere akson sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken 12 hafta boyunca intraperitopneal (i.p.) olarak 1mg/kg Melatonin uygulanan gruplarda rejenere akson sayıları arasındaki farkın ortadan kalktığı tespit edildi. Benzer şekilde 12. saat ve 24. saatlerde yapılan onarımlarda da rejenere akson sayıları arasında tespit edilen fark melatonin uygulaması sonrasında ortadan kalktığı gözlemlendi.

Ayrıca 24. saat ile 1. hafta onarımları arasında belirgin olarak mevcut olan anlamlı farkın yine 1mg/kg Melatonin ile ortadan kalktığı tespit edildi. Gruplar arasındaki kavrama testi değerleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). Elde ettiğimiz bu veriler göstermektedir ki periferik sinir kesisi sonrası uygulanan melatonin kesilen sinirde meydana gelen hücre ölümünü azaltarak ya da güçlü antioksidan özelliği ile akson rejenerasyonuna pozitif yönde katkıda bulunmuştur.

Aksonlarında periferik hasar oluşmuş kranial motor nöronlarda melatoninin etkileri incelenmiştir. Periferik sinir hasarını takiben nöropatogeneizde oksidatif stres ve masif NO üretimi meydana gelir. Bu nedenle, Chang ve arkadaşları periferik aksotomi sonrası hasarlı hipoglossal sinirde melatoninin nöroprotektif etkisinin olup olmadığını araştırmak için bir çalışma yapmışlar, çünkü melatoninin NO ile alakalı farklı deneysel nöropatolojilerde oksidatif hasarı azalttığı bilinmektedir (232). Bu çalışmada hipoglossal motor nöronlarda hasarın indüklediği NADPH-d/NOS ekspresyonunu melatoninin farklı dozları etkili bir şekilde azaltabilmektedir. Sonuç olarak, periferik sinir hasarından sonra meydana gelen oksidatif stresi melatoninin etkili bir şekilde azaltabileceği söylenebilir. Bu bulgu, yalnızca NO'nun fonksiyonel rollerinin daha iyi anlaşılmasına ışık tutmakla kalmayıp travmatik sinir yaralanmasını takiben oksidatif hasardan korunmada melatoninin potansiyel terapötik kullanımı ihtimalini ortaya atmaktadır (232). Diğer bir çalışmada periferik sinir hasarını takiben SOD aktivitesinin korunmasında melatoninin yararlı etkileri olabileceği araştırılmış (245). Bu çalışmada, erişkin ratlarda hypoglossal sinir kesisinde intraperitoneal melatonin enjekte edilmiş. Sonuçlar, SOD aktivitesinin korunmasında melatoninin etkili terapötik ajan olarak önemli bir kapasitesi olduğunu göstermiştir, böylece periferik sinir yaralanmasında önceki çalışmalarla benzer şekilde oksidatif hasarı azaltmaktadır (232). Bununla birlikte periferik sinir yaralanmasından sonra melatoninin nöroprotektif rolü antioksidan seviyelerinin korunmasının ötesinde rejenerasyon işlemini desteklemiştir. Eksojen melatonin antioksidan savunma sisteminin fonksiyonunu belirgin olarak düzeltmiştir. Periferik sinir yaralanmasındaki oksidatif hasarın tedavisinde umut verici bir tedavi olarak klinik çalışmalarda melatonin kullanımı önerilebilir (245).

İnsanlarda, hasarlı periferik sinir aksonları oldukça yüksek bir rejenerasyon yeteneğine sahiptir (221). Ancak, değişik cerrahi teknikler kullanılarak anastomoz işlemi gerçekleştirilen nörotomi olgularında optimal rejenerasyonun sağlanmasında bazı güçlükler söz konusudur. Sütüre edilmiş travmatik periferik sinir hasarının iyileşmesi ise, Schwann hücresi rejenerasyonu ile skar oluşumu arasındaki dengeye bağlıdır (136). Pleasure ve ark. deneysel siyatik sinir kesisi sonrası, özellikle sinirin distal kesik ucunda

daha belirgin olmak üzere önemli ölçüde bir kollajen birikimi ve nöroma formasyonunun söz konusu olduğunu ifade etmişlerdir (108). Doğaldır ki, skar dokusu gelişmesi aksonal rejenerasyon için mekanik bir bariyer oluşturarak sinirsel iletide bloğa yol açmaktadır (11,78,82). Skar oluşumu engellenebildiği takdirde, aksonal uzantıların gelişmesi ve dolayısıyla da rejenerasyon süreci hızlanacaktır (108). Bu amaca yönelik olarak in vivo deneysel çalışmalarda bazı ajanlar kullanılmıştır (13,298,299). Periferik sinir dokusunda mevcut kollajen yapımının önemli bir bölümü perineurium'da yer alan fibroblastlar tarafından gerçekleştirilmektedir (85,300). Travmatik olaya bir yanıt reaksiyonu şeklinde hasara uğrayan dokuda kollajen yapımı ve birikimi olmaktadır (301). Aksonal uzantıların gelişmesi ile karakterize rejenerasyon olayında, kollajenin de içinde yer aldığı çeşitli ekstrasellüler matriks komponentlerinin sinir liflerine destek sağlamak ve miyelinizasyonu başlatmak gibi bazı önemli işlevleri olduğu kabul edilmektedir (81,218,300). Ancak, kollajen liflerinin rejenerasyon gösteren aksonal uzantılar için de mekanik bir bariyer oluşturduğu ve uygulanacak cerrahi girişimin başarı şansını azalttığı da oldukça iyi bilinen bir husustur (74,82,133,300). Yapılan bir çalışmada periferik sinir kesisinde nöroma formasyonu ve kollajen sentezi üzerine melatoninin supresör etki yaptığı gösterilmiştir (216). Başka bir çalışmada ise rat siyatik sinirinde sütürle onarım sonrası melatoninin sinir onarımı ve nöronal rejenerasyona etkisi araştırılmıştır (217). Bu çalışmada eksojen olarak verilen melatonin, sinir onarım bölgesinde nöroma oluşumu ve kollajen birikimini anlamlı derecede azaltmış ve sinir rejenerasyonunu artırmıştır. Klinik olarak melatoninin nöroma oluşumu ve sinir rejenerasyonu üzerine olan bu etkisi nedeniyle cazip bir tedavi seçeneği olabilir. Melatonin eksikliği olgularında periferik sinir onarımında diğer tedavi yöntemlerine ek olarak melatoninin verilmesi iyi bir seçenek olabilir (217). Transforming büyüme faktörü (TGF)- β ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'nin Schwann hücre etkinliği ve fibroblastlardaki kollajen üretiminde önemli bir rol oynar (218-221). Turgut ve ark pinealektomi ve eksojen melatonin uygulaması sonrasında siyatik sinir anastomoz bölgesinde TGF- β 1 ve bFGF'nin immunohistokimyasal profilini incelemiştir (47). Bu çalışmada pinealektomi geçirmiş hayvanların sinirlerinin epinöriumlarında güçlü TGF- β 1 ve bFGF ekspresyonu gözlenmiş ancak kontrol ve melatonin gruplarında ya hiç görülmemiş ya da zayıf bir etki görülmüş. Bu nedenle, TGF- β 1 ve bFGF anastomoz bölgesinde kollajen birikimi ve nöroma oluşumunun kontrolünde etkilidir ve melatoninin sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu etkisi vardır (47).

Periferik sinir kesilerinde erken onarım sinir iyileşmesinde iyi sonuçlar alınmasında etkilidir ancak yeterli değildir. Çalışmamızda erken onarıma ek olarak melatonin kullanımı

deneysel olarak akson rejenerasyonunu artırmıştır. Ayrıca erken dönemde sinir onarımının mümkün olmadığı durumlarda melatonin uygulaması bekleme sürecinde akson yaşayabilirliğini artırarak ve güçlü antioksidan etkisiyle kesilen sinirdeki hasarı azaltarak akson rejenerasyonuna pozitif yönde katkıda bulunabilmektedir.

6. SONUÇ

Periferik sinir kesisinde onarım zamanlaması ve melatonin uygulamasında;

- En erken zamanda yapılan onarım neticesinde en fazla sayıda rejenere aksona ulaşılmıştır.
- Erken dönemde yapılan onarım ile kesilen sinirler canlılığını kaybetmeden ve daha fazla dejenerasyona uğramadan onarılabilmiştir.
- Erken dönemde onarım ile elde edilen rejenere akson sayısının fazlalığı daha iyi bir fonksiyonel geri dönüşün işareti olabilir
- Her ne kadar gruplar arasındaki kavrama güçleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da rejenere akson sayısı ile kavrama gücü arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde pozitif korelasyon tespit edilmiştir.
- İntraperitoneal Melatonin uygulaması, onarım zamanları arasında meydana gelen rejenere akson sayıları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farkı ortadan kaldırmıştır.
- Melatonin uygulanması literatürde kanıtlandığı şekliyle kesilen sinirlerin canlı kalmalarına destek olup, güçlü antioksidan etkisiyle ve nöroma oluşumunu inhibe ederek sinir iyileşmesine olumlu yönde katkıda bulunmuştur.
- Elde edilen deneysel veriler ışığında, periferik sinir hasarında Melatonin uygulaması klinik kullanıma girme yolunda dikkate alınması gereken bir molekül olarak karşımıza çıkmaktadır.

7. ÖZET

Travma sonucu meydana gelen periferik sinir hasarı, fiziksel olduğu kadar psikososyal ve ekonomik problemlere de yol açan ciddi bir durumdur. İyileşme süreci oldukça uzundur ve ciddi fonksiyon kayıplarına neden olmaktadır. Günümüzde bile mükemmel duyuşsal ve fonksiyonel olarak geri dönüşü sağlayabilecek bir tedavi şekli ortaya konamamıştır.

Periferik sinir cerrahisinde onarım zamanlamasının önemi herkesçe kabul görmektedir. Bununla birlikte pek çok farmakolojik ajan deneysel olarak, hücre ölümünü azaltmak ve sinir iyileşmesini hızlandırmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak hali hazırda klinik kullanıma giren bir ajan mevcut değildir. Bu bilgiler ışığında deneysel olarak oluşturulan siyatik sinir kesisinde farklı onarım zamanlarında melatoninin sinir iyileşmesine olan etkisini araştırmak ve bu etkileri stereolojik olarak değerlendirerek kantitatif veriler elde etmek amacıyla bu çalışma planlandı.

Çalışmada toplam 80 adet Wistar cinsi dişi rat kullanıldı. Onarım zamanları 0. saat, 12. saat, 24. saat ve 1. hafta olarak belirlendi. İlk dört gruba (Grup 1, 2, 3, ve 4) sinir kesisi sonrası 12 hafta boyunca intraperitoneal olarak Melatonin verildi ve belirlenen zamanlarda onarım yapıldı. İkinci dört gruba (Grup 5, 6, 7 ve 8) siyatik sinir kesisini takiben belirlenen zamanlarda onarım yapıldı. 12. hafta sonunda miyelinli akson sayıları değerlendirildi. Erken onarım yapılan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark tespit edildi ($p<0.05$). Melatonin verilen gruplardan elde edilen akson sayılarının verilmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Ayrıca Melatoninin onarım zamanlarına göre akson sayıları arasındaki farkı ortadan kaldırdığı gözlemlendi.

Sonuç olarak periferik sinir kesilerinde erken onarım sinir iyileşmesinde iyi sonuçlar alınmasında etkilidir ancak yeterli değildir. Çalışmamızda erken onarıma ek olarak melatonin kullanımı deneysel olarak akson rejenerasyonunu artırmıştır. Ayrıca erken dönemde sinir onarımının mümkün olmadığı durumlarda melatonin uygulaması bekleme sürecinde akson yaşayabilirliğini artırarak ve güçlü antioksidan etkisiyle kesilen sinirdeki hasarı azaltarak akson rejenerasyonuna pozitif yönde katkıda bulunabilmektedir.

Anahtar kelimeler: Periferik sinir kesisi, onarım zamanı, melatonin, stereoloji

8. ABSTRACT

Periferic nerve injury is a serious causes economic and psychosocial problems, which happens as a result of trauma. Healing period is fairly long and causes serious functional losses. Recently no treatment method presents to provide recovery as perfect sensational and functional.

It's all agreed that the importance of repair timing in periferic nerve surgery. However most pharmacological agent was used to accelerate nerve healing and reduce cell death as experimental. But currently there is no agent which enters clinic usage. In the light of these data, this study is planned to acquire quantitative data which evaluate these effects as stereologic and to search the influence of nerve healing of melatonin in different repair times at sciatic nerve cut formed as experimental.

In this study total 80 Wistar female rats are used. Repair times are determined as 0. hour, 12. hour, 24. hour and 1. week. After nerve cut during 12 weeks as intraperitoneal melatonin was given to the first four groups (Group 1, 2, 3 and 4) and repair was made at determined times. Repair was made to the second four gruops (Group 5, 6, 7 and 8) at determined times following sciatic nerve cut. The end of 12.week the axon numbers with miyelin was evaluated. Significantly difference was stated as statistical in the groups that made early repair. ($p < 0.05$). It's stated that the axon numbers acquired from the groups given melatonin are significantly different from the ones not given melatonin as statistical. ($p < 0.05$). Besides melatonin removes the difference of axon numbers according to their repair times.

As a result early repair in periferic nerve cut is effective in nerve healing to take good results but it's not sufficient. In our study in addition to early repair the usage of melatonin increases axon regeneration as experimental. Moreover melatonin application increases axon viability at waiting time in case of there is no possible early period nerve repair. It contributed to axon regeneration to increase the damage of nerve cut by the influence of strong antioxidant.

Key Words: Periferic nerve injury, repair time, melatonin, stereology.

9. KAYNAKLAR

1. Shenaq SM, Kim JYS. Repair and grafting of peripheral nevre. In: Mathes SJ, editor. Plastic surgery. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. Vol.1: 719-43.
2. Winograd JM, Mackinnon SE. Peripheral nevre injuries: Repair and reconstruction. In: Mathes SJ, editor. Plastic surgery. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. Vol. 7: 47-514.
3. Seckel BR. Current Status of Peripheral Nerve Surgery. Perspectives in Plastic Surgery. 1990; 4: 91-104.
4. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. Muscle and Nerve, 2000; 23: 863-73.
5. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. Neurosurg Focus, 2004; 16 : 1-7.
6. Liuzzi FJ, Tedeschi B. Peripheral nerve regeneration. Neurosurg Clin N Am. 1991 :31-42.
7. Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. Historical And Basic Science Review: Past, Present and Future of Nerve Repair. J Reconstr Microsurg. 1997; 130: 215-225.
8. Terzis JK, Smith KL. Repair and Grafting of the Peripheral Nerve: Plastic Surgery. McCarthy JG (ed), WB Saunders, Philadelphia.1990; 630- 697.
9. Seddon HJ. Three types of nerve injury. Brain 1943; 66: 237-88.
10. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. Brain. 1951; 74:491-516.
11. Menovsky T., Beek J.F., Laser, Fibrin Glue, or Suture Repair of Peripheral Nerves: a Comparative Functional, Histological, and Morphometric Study in the Rat Sciatic Nerve, Journal of Neurosurgery 2001; 95: 694-99.
12. Almquist E.E., Nerve Repair by Laser, The Orthopedic Clinics of North America, 1988; 19: 201-208.
13. Cockett S., Kiernan J., Accelaration of Peripheral Nervous Regeneration in the Rat by Exogenous Triiodothyronine, Experimental Neurology 1973; 39: 389-94.
14. Fischer D.W., Beggs J.L., Kenshalo D.L., Shetter A.G., Comparative Study of Microepineurial Anastomoses with the Use of CO2 Laser and Suture Techniques in Rat Sciatic Nerves: Part 1, Neurosurgery, 1985; 17: 300-08.
15. Frostick SP, Yin Q and Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nevre regeneration. Microsurgery 1998; 18: 397-405.
16. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. Acta Orthop Scand.1987;58:145-69.
17. Maggi SP, Lowe JB 3rd, Mackinnon SE. Pathophysiology of nerve injury. Clin Plast Surg. 2003;30(2):109-26
18. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. J Hand Surg [Am]. 2000;25:391-414.
19. Dahlin LB. The biology of nevre injury and repair. J Am Surg Hand. 2004;4(3):143-5
20. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. J Anat. 1999;194:1-14.
21. Sunderland S.: The anatomic foundation of peripheral nevre repair techniques. Orthopaedic linics of North America 1981;12:245.
22. Mackinnon SE. New Directions in Peripheral Nerve Surgery. Ann Plast Surg. 1989; 22: 257-73.

23. Siemionow, M., and Sari, A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the Cleveland Clinic microsurgery laboratory. *Neurol. Res* 2004; 26, 218–25.
24. Spinner, R. J., and Kline, D. G. Surgery for peripheral nerve and brachial plexus injuries or other nerve lesions. *Muscle Nerve* 2000;23, 680–95.
25. Dvali, L., and Mackinnon, S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clin Plast Surg* 2003;30, 203–21.
26. Kanje M, Skottner A, Lundborg G. Effects of growth hormone treatment on the regeneration of rat sciatic nerve. *Brain Res* 1998; 475: 254-8.
27. Rabinovsky ED. The multifunctional role of IGF-1 in peripheral nerve regeneration. *Neurol Res* 2004; 26 (2): 204-10.
28. Van der Zee CE, Brakkee JH, Gispen WH. Putative neurotrophic factors and functional recovery from peripheral nerve damage in the rat. *Br J Pharmacol* 1991; 103: 1041-6.
29. Campana, W. M., and Myers, R. R. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: Changes after nerve injury. *FASEB J* 2001; 15, 1804–6.
30. Digicaylioglu, M., Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA. Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 9855–60.
31. Koszykowska, M., Wojtkiewicz J., Majewski M., Jana B. Effect of steroid hormones on the peripheral nervous system. *J. Anim. Feed Sci* 2008; 17: 3–18.
32. Lindsay, R. M. . Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J. Neurosci* 1988; 8, 2394–405.
33. Diaz Lopez B, Diaz Rodriguez E, Urquijo C, Fernandez Alvarez C. Melatonin influences on the neuroendocrine-reproductive axis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1057: 337-64.
34. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med* 1996; 21 (3): 307-15.
35. Vijayalaxmi B, Thomas CRJ, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From Basic Research to Cancer Treatment Clinics *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20: 2575-601.
36. Persengiev S, Kanchev L, Vezenkova G. Circadian patterns of melatonin, corticosterone, and progesterone in male rats subjected to chronic stress: effect of constant illumination. *J Pineal Res* 1991; 11 (2): 57-62.
37. Genovese T, Mazzon E, Muia C, Bramanti P. Attenuation in the evolution of experimental spinal cord trauma by treatment with melatonin. *Pineal Res* 2005; 38: 198-208.
38. Reiter RJ. Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104 (1): 10-6.
39. Pieri C, Marra M. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55: 271-6.
40. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25 (3-4): 177-95.
41. Altun A, Vardar A, Altun BU. Melatonin and the cardiovascular system. *Anadolu Kardiyol Derg* 2001; 1:283-8.
42. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 2000; 9:160-71.

43. Shokouhi G, Tubbs RS, Shoja MM, Hadidchi S, Ghorbanihaghjo A, Roshangar L, Farahani RM, Mesgari M, Oakes WJ. Neuroprotective effects of high-dose vs low-dose melatonin after blunt sciatic nerve injury. *Childs Nerv Syst* 2008; 24: 111-117
44. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 1993; 70: 65-71.
45. Reiter RJ, Poeggeler B. Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring receptor. *Neuroendocrinol Lett* 1993; 15: 103-16.
46. Hall ED, Braughler M. Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and Na-K⁺ ATPase activity. *J Neurosurg* 1982; 57: 247-53.
47. Turgut M, Oktem G, Uysal A, Yurtseven ME. Immunohistochemical profile of transforming growth factor-beta 1 and basic fibroblast growth factor in sciatic nerve anastomosis following pinealectomy and exogenous melatonin administration in rats. *J Clin Neuroscience* 2006; 13: 753-8.
48. Rogerio F, de Souza L, Teixeira SA, Oliveria AL, de Nucci G, Langone F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. *Brain Research* 2002; 926, 33-41.
49. Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, Takagi K. Potent protective effects of melatonin on experimental spinal cord injury. *Spine* 2000; 25 (7): 769-75.
50. Sadler TW, ed. *Langman's Medical Embryology*, 10 Ed. Lippincott Williams and Wilkins 2006: 433-480.
51. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology* Philadelphia: WB Saunders Company. 1997, 2001; 1: 183-95.
52. Matloub HS and Yousif J. Peripheral nerve anatomy and innervation pattern. *Hand Clin* 1992; 8: 201-14.
53. Cormack DH, ed. *Essential, Histology*, Second Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 209-35.
54. Snell R.S., *Clinical Neuroanatomy for Medical Students*, Little Brown and Company, Boston. 1980: 87-114.
55. Jung-Tetas I, Baulieu EE. 1998. Steroid hormone receptors and steroid action in glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 65 (1-6): 243-51
56. Ganong WF; Çeviren: Doğan A. *Tıbbi Fizyoloji*. Barış kitabevi. İstanbul, 1995.
57. Stevens A., Lowe J.S., *Human Histology*, Mosby, London, 1997: 92-4.
58. Berne RM, Levy MN. *Principles of Physiology*, 1999; 3: 72-5.
59. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A text and atlas*. Baltimore, Philadelphia, 5th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
60. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology: Text and atlas*. 10th ed, New York, LANGE Mc Graw-Hill, 2003.
61. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, 2000;1: 622-7.
62. Pocock G, Christopher R. *Human Physiology The Basis of Medicine*, 1999;1:71-6.
63. Sunderland S., *Nerve Injuries and their Repair. A Critical Appraisal.*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1991: 17-26, 47-52, 79-89, 91-113, 201-212, 213-219, 395-411, 439-465.
64. Mirajullah M, Xinya S. Schwann cells: Leader of nervenkitt. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2002; 14: 30-3.

65. Hirata Kazuho and Kawabuchi Masaru. Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during wallerian degeneration. *Microscopy Research and Technique*, 2002; 57:541-7.
66. Anselin AD, Fink T, Davey DF. An alternative to nerve grafts in peripheral nerve repair: Nerve guides seeded with adult Schwann cells. *Acta Chirurgica Austriaca* , 1998; 147: 19-24.
67. Makwana M, Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS Journal* 2005; 272: 2628-38.
68. Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathology* 1999; 9: 313-25.
69. Melcangi RC, Cavarretta IT, Ballabio M, Leonelli E, Scheone A, Azcoitia I, Magnaghi V. Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Research*, 2005; 48: 328-38.
70. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000;61:267-304.
71. Ganong WF. Review of Medical Physiology, 2001;1: 49.
72. Fujii K., Tsuji M., Murota K., Isolation of Peripheral Nerve Collagen, *Neurochemical Research* 1986; 11: 1439-46.
73. Holmes W., Young J., Nerve Regeneration after Immediate and Delayed Suture, *Journal of Anatomy* 1942; 77: 63-96.
74. Salonen V., Lehto M., Vaheri A., Aro H., Peltonen J., Endoneurial Fibrosis Following Nerve Transection, *Acta Neuropathology (Berl)*, 1985; 67: 315-21.
75. Polder TW. Pathophysiology of peripheral nerve injury and repair. Palmer JD (ed): *The Manual of Neurosurgery*, Edinburg: Churchill Livingstone 1996: 777-789.
76. Brushart TM. Nerve repair and grafting, Green's Operative Hand Surgery. Green DP (ed) Churchill Livingstone. New York vol.II 1999; 1381-403.
77. Cravioto H., Wallerian Degeneration: Ultrastructural and Histochemical Studies, *Bulletin of the Los Angeles Neurological Societies* 1969; 34: 233-53.
78. Low C.K., Chew S.H., Song I.C., Ng T.H., Low Y.P., End-to-side Anastomosis of Transected Nerves to Prevent Neuroma Formation, *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1999; 369: 327-32.
79. Salonen V., Roytta M., Peltonen J., The Effects of Nerve Transection on the Endoneurial Collagen Fibril Sheaths, *Acta Neuropathology (Berl)* 1987; 74: 13-21.
80. Tassler P.L., Dellon A.L., Canoun C., Identification of Elastic Fibres in the Peripheral Nerve, *Journal of Hand Surg [Br]* 1994; 19: 48-54.
81. Eather T.F., Pollock M., Collagen Synthesis in Axotomized Peripheral Nerve Evidence against Schwann Cell Involvement, *Experimental Neurology* 1987; 96: 214-8.
82. Lane M., Bora W. Jr., Pleasure D., Neuroma Scar Formation in Rats Following Peripheral Nerve Transection, *Journal of Bone and Joint Surgery* 1978; 60: 197-203.
83. Lowry A., Wicox D., Masson E.A., Williams P.E., Immunohistochemical Methods for Semiquantitative Analysis of Collagen Content in Human Peripheral Nerve, *Journal of Anatomy* 1997; 191: 367-74.
84. Luque E.H., Angulo E., Montes G.S., A Histochemical and Electron Microscopic Study on the Collagen of Nerves in the Domestic Fowl, *Journal of Anatomy* 1983; 137: 171-6.

85. Nath R.K., Mackinnon S.E., Jensen J.N., Parks W.C., Spatial Pattern of Type I Collagen Expression in Injured Peripheral Nerve, *Journal of Neurosurgery* 1997; 86: 866-70.
86. Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve* 1990;13:771-84.
87. Rempel D, Dahlin L, Lundborg G. Pathophysiology of nerve compression syndromes: Response of peripheral nerves to loading. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81:1600-10.
88. Gelberman RH, Dahlin L. *Operative Nerve Repair And Reconstruction* 1991; 1: 11-2.
89. Lundborg G. Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. *J Bone Joint Surg Am* 1975; 57: 938-48.
90. Lundborg G. Intra-neural Microcirculation. Gary K. Frykman Editor. *The Orthopedic Clinics of North America* 1988; 19: 1-12.
91. Myers RR, Heckman HM: Effect of local anesthetics on nerve blood flow: Studies using lidocaine with and without epinephrine. *Anesthesiology* 1989; 71:757-62.
92. Selander D, Mansson LG, Karlsson L, Svanik J: Aderenerjik vasoconstriction in peripheral nerves of the rabbit. *J Anesthesiology* 1985; 62:6-10.
93. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Hansson HA, Johannesson A, Longo FM, Varon S. Nerve regeneration across an extended gap: a neurobiological view of nerve repair and the possible involvement of neuronotrophic factors. *J Hand Surg (Am)* 1982; 7: 580-7.
94. Bell MA, Weddell AGM, A descriptive study of the blood vessels of the sciatic nerve, *Brain* 1984; 107: 871-89
95. Dahlin LB. Conditionig effect induced by chronic nerve compression. An experimental study of the sciatic and tibial nerve of rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1992; 26: 37-41.
96. Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Supplement* 2000; 9:33-38.
97. Çoban YK, Çıralık H, Kurutaş EB. Ischemic preconditioning reduces the severity of ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve in rats. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* 2006; 29: 1-2.
98. Dvali L, Mackinnon S. Peripheral nerve repair and transfers. In McCarthy JG, Galiano RD, Boutros SG, editors. *Current therapy in plastic surgery*. Philadelphia: Saunders Elsevier 2006; 568-73.
99. Fernandez E, Pallini R, Lauretti L, Scogna A. Neurosurgery of the peripheral nervous system: injuries, degeneration and regeneration of the peripheral nerves. *Surg Neurol* 1997; 48: 446-7.
100. Shyu BC, Danielsen N, Andersson SA, Dahlin LB. Effects of sympathetic stimulation on C-fibre response after peripheral nerve compression: an experimental study in the rabbit common peroneal nerve. *Acta Physiol Scand* 1990; 140: 237-43.
101. Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1990;13:785-800.
102. Achauer BM, Eriksson E. *Plastic Surgery*, St. Louis, Mosby 2000; 1: 79-83.
103. Quan D, Bird S. Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nerve injuries. *Orthopaedic Journal* 1999; 12: 45-51.
104. Mackinnon S, Dellon A: *Surgery of the Peripheral Nerve*. New York, Thieme, 1998.

105. Santo Neto H, Teodori RM, Somazz , Marquez . Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local Anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg* 1998; 51(7): 555-60.
106. Thanos PK, Okajima S, Terzis JK. Ultrastructure and Cellular Biology of Nerve Regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1998; 14: 423-36.
107. Battista A., Cravioto H., Neuroma Formation and Prevention by Fascicle Ligation in the Rat, *Neurosurgery* 1981; 8: 191-204.
108. Pleasure D., Bora F.W. Jr., Lane J., Prockop D., Regeneration after Nerve Transection: Effect of Inhibition of Collagen Synthesis, *Experimental Neurology* 1974; 45: 72-78.
109. Sunderland S., The Capacity of Regenerating Axons to Bridge Long Gaps in Nerves, *Journal of Comparative Neurology* 1953; 99: 481-93.
110. Stoll G, Jander S and Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripheral Nervous System* 2002; 7: 13-27.
111. Patsalos PN, Bell ME, Wiggins RC. Pattern of myelin breakdown during sciatic nerve wallerian degeneration: reversal of the order of assembly. *J Cell Biology* 1980; 187: 1-5.
112. Behnam-Rasouli M, Nikraves MR, Mahdavi-Shahri N, and Tehranipour M. Post-Operative Time Effects after Sciatic Nerve Crush on the Number of Alpha Motoneurons, Using a Stereological Counting Method (Disector). *Iran Biomed J* 2000; 4: 45-9.
113. Cunha MTR, Silva AL, Fenelon SB. Comparison of nerve graft integration after segmentar resection versus epineural burying in crushed rat sciatic nerves. *Acta Cir Bras* 1997; 12: 221-5.
114. Hall SM. Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989;15:513-29.
115. Pagnotta A, Tos P, Fornaro M, Gigante A, Geuna S, Battiston B. Neurotrophins and their receptors in early axonal regeneration along muscle-vein-combined grafts. *Microsurgery* 2002; 22: 300-3.
116. Luis CJ, Contopoulos AN., *Basic Histology* 1997;1: 161-3.
117. Fawcett JW. Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 1990;13:43-60.
118. Simon P. Schwann cells, neurotrophic factors and peripheral nerve regeneration, *Microsurgery* 1998; 18: 397-405.
119. Watchmaker GP, Mackinnon SE. Advances in Peripheral Nerve Repair. *Clinics Plast Surg* 1997; 24 : 63-73.
120. Elizabeth OJ. Regeneration and repair of peripheral nerves, *Injury int j care injured* 2005; 36: 24-9.
121. Douglas WZ. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves, *Muscle and nerve* 2000; 9: 33-8.
122. Fujimoto E., Mizoguchi A., Hanada K., Yajima M., Ide C., Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Extension of Regenerating Axons of Peripheral Nerve. In vivo Experiments Using a Schwann Cell Basal Lamina Tube Model, *Journal of Neurocytology* 1997; 26: 511-28.
123. Ide C., Tohyama K., Tajima K., Endoh K., Sano K., Tamura M., Mizoguchi A., Kitada M., Morihara T., Shirasu M., Long Acellular Nerve Transplants for Allogenic Grafting and the Effects of Basic Fibroblast Growth Factor on the Growth of Regenerating Axons in Dogs: a Preliminary Report, *Experimental Neurology* 1998; 154: 99-112.

124. Liu H.M., The Role of Extracellular Matrix in Peripheral Nerve Regeneration: a Wound Chamber Study, *Acta Neuropathology (Berl)* 1992; 83: 469-74.
125. Sulaiman O.A., Gordon T., Transforming Growth Factor-beta and Forskolin Attenuate the Adverse Effects of Long-term Schwann Cell Denervation on Peripheral Nerve Regeneration in vivo. *Glia* 2002; 37: 206-18.
126. Midha R, Munro CA., Dalton PD, Tator CH and Shoiched MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg* 2003; 99:555-65.
127. Gravvanis AI, Tsoutsos DA, Tagaris GA, Papalois AE, Patralexis CG, Iconomou TG, Panayotou PN, and Ioannovich JD. Beneficial effect of nerve growth factor-7S on peripheral nerve regeneration through inside-out vein grafts: an experimental study. *Microsurgery* 2004; 24:408-15.
128. Sheng CY, Liang HC, Chuan TC, Hsin CT, Chiang CW, Li HC, Hsu YC. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 2000; 21: 1541-47.
129. Evans GRD. Challenges to nerve regeneration. *Seminars in Surgical Oncology* 2000; 19: 312-8.
130. Gordon T, Sulaiman O, Boyd GJ. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripheral Nervous System* 2003; 8: 236-50.
131. Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B and Bilboa G. Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system. *J Neuroscience Methods* 1998; 85: 119-27.
132. Lee AC, Yu VM, Lowe YB, Brenner MJ, Hunter DA, Mackinnon SE, Elbert-Sakiyama SE. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Experimental Neurology* 2003; 184: 295-303.
133. Cravioto H., Battista A., Clinical and Ultrastructural Study of Painful Neuroma, *Neurosurgery* 1981; 8: 181-190.
134. Spencer P.S., The Traumatic Neuroma and Proximal Stump, *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases* 1974; 35: 85-102.
135. Scherer S.S., Kamholz J., Jakowlew S.B., Axons Modulate the Expression of Transforming Growth Factor-betas in Schwann Cells. *Glia* 1993; 8: 265-76.
136. Davison S.P., McCaffrey T.V., Porter M.N., Mandres E., Improved Nerve Regeneration with Neutralization of Transforming Growth Factor-beta 1, *Laryngoscope* 1999; 109: 631-5.
137. Brandt KE, Mackinnon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM, editors. *Grabb and Smith' plastic surgery*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997: 79-90.
138. Choi SJ, Harii K, Lee MJ et al. Electrophysiological, Morphological, and Morphometric Effects of Aging on Nerve Regeneration in Rats. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg* 1995; 29: 133-40.
139. Bolesta MJ, Garrett WE Jr, Ribbeck BM, Glisson RR, Seaber AV, Goldner JL. Immediate and delayed neurotomy in a rabbit model: a functional, histologic, and biochemical comparison. *J Hand Surg Am* 1988;13:352-7.
140. Hudson AR, Hunter D. Timing of peripheral nerve repair: important local neuropathological factors. *Clin Neurosurg* 1977;24:391-405.
141. Lauretti L, Pallini R, Romani R, Di Rocco F, Ciampini A, Gangitano C, Del Fa A, Fernandez E. Lower trunk of brachial plexus injury in the neonate rat: effects of timing repair. *Neurol Res* 2009; 31:518-27.

142. Mackinnon SE, Dellon AL, Hudson AR, Hunter DA. Nerve Regeneration Through a Pseudosynovial Sheath in a Primate Model. *Plast Reconstr Surg* 1985;75 :833-41.
143. Funakoshi H, Risling M, Carlstedt T, Lendahl U, Timmusk T, Metsis M, Yamamoto Y and Ibanez CF. Targeted expression of a multifunctional chimeric neurotrophin in the lesioned sciatic nerve accelerates regeneration of sensory and motor axons. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 5269-74.
144. Seckel BR, Ryan SE, Gagne RG et al. Target-Specific Nerve Regeneration Through a Nerve Guide in the Rat. *Plast Reconstr Surg* 1986; 78: 793-8.
145. Seddon, H. Peripheral nerve injuries. Medical research council special report series 1954: 282.
146. Sunderland S. Changes in denervated structures. In: *Nerve injuries and their repair. A critical appraisal*, Churchill Livingstone Inc 1991; 233-235.
147. Millesi H. Peripheral nerve repair: terminology, questions, and facts. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 1985; 2: 1.
148. Matsuyama T. Peripheral nerve repair and grafting techniques:a review. *Neurol Med Chir* 2000; 40: 187-99.
149. Mackinnon SE. Nerve Injuries: Primary Repair and Reconstruction. *Mastery of Plastic and Reconstructive Surgery*.Cohen M.(ed) Boston 1994; Vol. III. 1598-1624.
150. Millesi H. Interfascicular nerve grafting. *Orthopedic Clinics of North America* 1981; 12: 2.
151. Millesi H, Meissl G, Berger A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J. Bone Joint Surg* 1972; 54 (4): 727-50.
152. Takeshi M. Peripheral nerve repair and grafting techniques:a review *Neurol Med Chir* 2000; 40: 187-99.
153. Huang T.C., Blanks R.H., Berns M.W., Crumley R.L., Laser vs. Suture Nerve Anastomosis, *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1992; 107: 14-20.
154. Fereidoon M. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. *Microsurgery* 2003; 23: 359-62.
155. Feng Z. End-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery* 2002; 22: 122-7.
156. Midha R. Peripheral nerve repair and grafting techniques :A review Sunnybrook health science centre,University of Toronto 2001;1-7.
157. Best TJ, Mackinnon SE, Midha R, Hunter DA, Evans PJ. Revascularization of Peripheral Nerve Autografts and Allografts. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 152-160.
158. Ikeda K. Timing and technique of peripheral nerve repair. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1980;20:759-67.
159. Barrs DM. Facial nerve trauma: optimal timing for repair. *Laryngoscope*. 1991;101:835-48.
160. Kobayashi J, MacKinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, Kuzon WM Jr. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve* 1997;20:858-66.
161. Lee M, Doolabh VB, Mackinnon SE, Jost S. FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve* 2000;23:633-40.
162. Karaismailoglu TN, Tasci N, Baris S, Tomak Y, Piskin A. Histological and electrophysiological assessment of the results of primary and secondary neurorrhaphy in a rabbit model. *J Orthop Sci* 2003;8:88-91.
163. Trumble, T. E. Peripheral nerve injury: Pathophysiology and repair. In "Trauma" (D. V. Feliciano, E. E. Moore, and K. L. Mattox, Eds.), McGraw-Hill, New York, NY 1999: 2048-2053.

164. Diao, E., and Vannuyen, T. Techniques for primary nerve repair. *Hand Clin* 2000; 16: 53–66.
165. Townsend, P. L. Microsurgical techniques in reconstructive surgery. In “Operative Surgery and Management” (G. Keen and J. R. Farndon, Eds.), 3rd ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1994: 434–5.
166. Dahlin, L. B., and Lundborg, G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg. Clin. N. Am* 2001; 12, 341–52.
167. Harris, M. E., and Tindall, S. C. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg. Clin. N. Am* 1991; 2: 93–104.
168. Siemionow, M., Tetik, C., Ozer, K., Ayhan, S., Siemionow, K., and Browne, E. Epineural sleeve neurorrhaphy: Surgical technique and functional results—A preliminary report. *Ann. Plast. Surg* 2002;48: 281–5.
169. Tetik, C., Ozer, K., Ayhan, S., Siemionow, K., Browne, E., and Siemionow, M. Conventional versus epineural sleeve neurorrhaphy technique: Functional and histomorphometric analysis. *Ann. Plast. Surg* 2002; 49: 397–403.
170. Waller, A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil. Trans. R. Soc. London.* 1850: 140, 423–9.
171. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic Assessment of Nerve regeneration in the Rat. *Plast Reconstr Surg* 1985; 75: 384-8.
172. Swett JE, Torigoe Y, Elie VR et al. Sensory Neurons of the Rat Sciatic Nerve. *Exp Neurol.* 1991; 114: 82-103.
173. Swett JE, Wikholm RP, Blanks HI et al. Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol.* 1986; 93: 227-52.
174. Schmalbruch H. Fiber Composition of the Rat Sciatic Nerve. *Anat Rec.* 1986; 215: 71-81.
175. Bayramiçli M. Deneysel mikrocerrahi. Temel araştırma, doku ve organ nakil modelleri. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ. 2005: 342–3.
176. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336:186-95.
177. Arendt J. The Pineal Gland: Basic Physiology and Clinical Implications. In: Degroot LJ, eds. *Endocrinology.* 3rd. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995: 433-42.
178. Underwood H. The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia* 1990; 46: 120-8.
179. Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H., Mori N., Isolation of Melatonin, Pineal Factor that Lightens Melanocytes, *Journal of the American Chemical Society* 1958; 80: 2587.
180. Arendt J. Melatonin *Clin Endocr* 1998; 29: 205-29.
181. Tuncer M, Balkancı D. Melatonin ve fizyolojik olaylardaki rolü. *Fizyoloji Bülteni* 1993; 5: 40-58.
182. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G. (1995) Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sc.* 1995; 56: 83-89.
183. Morita Y., Absence of Electrical Activity of the Pigeon’s Pineal Organ in Response to Light, *Experientia* 1966; 22: 402.
184. Sirotkin A.V., Schaeffer H.J., Direct Regulation of Mammalian Reproductive Organs by Serotonin and Melatonin, *Journal of Endocrinology* 1997; 154: 1-5.

185. Wirz Justice A., Graw P., Krauchi K., Sarrafzadeh A., English J., Arendt J., Sand L., 'Natural' Light Treatment of Seasonal Affective Disorder, *Journal of Affective Disorders* 1996; 37: 109-20.
186. Pieri C., Marra M., Moroni F., Recchioni R., Marcheselli F., Melatonin: Peroxyl Radical Scavenger more Effective than Vitamin E, *Life Sciences* 1994; 55: 271-6.
187. Reiter R.J., Functional Pleiotropy of the Neurohormone Melatonin: Antioxidant Protection and Neuroendocrine Regulation, *Frontiers in Neuroendocrinology* 1995; 16: 383-415.
188. Iguchi M, Kato K, Ibayashi M. Age dependent reduction in serum melatonin concentration in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol and Metab* 1982; 55: 27-9.
189. Takahashi T, Sasaki M, Itoh H, Yamadera W, Ozone M, Obuchi K, Hayashida K, Matsunaga N, Sano H. Melatonin alleviates jet lag symptoms caused by an 11-hour eastward flight. *Psychiatry Clin Neurosci* 2002; 56:301-2.
190. Reiter RJ. Pineal Melatonin: Cell biology of its synthesis and of its interactions. *Endocrine Rev* 1991; 12: 152-70.
191. Wilson BW, Stevens RG, Anderson LE (1989) Neuroendocrine mediated effects of electromagnetic-field exposure: possible role of the pineal gland. *Life Sci* 1989; 45: 1319-32.
192. Claustrat B, Brun J, Garry P, Roussel B. A once repeated study of nocturnal plasma melatonin patterns and sleep recordings in six normal young men. *J Pineal Res* 1986; 3: 301-10.
193. Ronco AL, Halberg F. The pineal gland and cancer. *Anticancer Res* 1996; 16 (4A): 2033-9.
194. Fawcett D.W., Jenesh R.P., *Pineal Gland in Concise Histology*. ed: Bloom M., Fawcett D.W., Chapman & Hall International Thomson Publ., New York, 1977: 164-5.
195. Reiter R.J., The Pineal Gland and Melatonin Relation to Aging: a Summary of the Theories and of the Data, *Experimental Gerontology* 1995; 30: 199-212.
196. Lane AE, Moss HB. Pharmacokinetics of melatonin in man: First pass hepatic metabolism. *J Clin Endocrinol and Metab.* 1985; 61: 1214-6.
197. Ozdemir D, Uysal N, Tugyan K, Gonenc S, Acikgoz O, Aksu I, Ozkan H. The effect of melatonin on endotoxemia-induced intestinal apoptosis and oxidative stress in infant rats. *Intensive Care Med* 2002; 33: 511-6.
198. Smith JA, Helliwell PS, Isdale A, Astbury C, Padwick DJ, Bird HA. Human nocturnal blood melatonin and liver acetylation status *J Pineal Res* 1991; 10: 14-17.
199. Waldhauser F, Ehrhart B, Forster E. Clin aspect of the melatonin action: Impact of the development, aging and puberty, Involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia* 1993; 49: 671-81.
200. Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benitez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994;17: 55-62.
201. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 1994; 55 (24): 455-60.
202. Morgan PJ, Williams LM. Central melatonin receptors; implications for a mode of action. *Experientia* 1989; 45: 955-65.

203. Sugden D, Chong NWS. Pharmacological identity of 2-(125-I) iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res* 1991; 539: 151-4.
204. Cagnacci A, Volpe A. Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. *J Endocrinol Invest* 1996; 19: 382-411.
205. Acuna-Castroviejo D., Escames G., Macias M., Munoz Hoyos A., Molina Carballo A., Arauzo M., Montes R., Cell Protective Role of Melatonin in the Brain, *Journal of Pineal Research* 1995; 19: 57-63.
206. Cardinali DP, Vacas MI. Cellular and molecular mechanisms controlling melatonin release by mammalian pineal glands. *Cell Mol Neurobiol.* 1987;7:323-37.
207. Omura T, Sano M, Omura K, Hasegawa T, Nagano A (2004) A mild acute compression induces neurapraxia in rat sciatic nerve. *Int J Neurosci* 2004; 114: 1561-72.
208. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29:363-72.
209. Delagrangre P, Guardiala- Lemaitre B. Melatonin, its receptors, and relationship with biological rhythm disorders *Clin Neuropharmacol* 1997; 20 (6): 482-510.
210. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B. A review of the evidence supporting melatonin role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18 : 1-11.
211. Poeggeler B, Reiter RJ, Hardeland R, Swerynek E, Melchiorri D, Barlow-Walden LR. Melatonin, a mediator of electron transfer and repair reactions, acts synergistically with the chain breaking antioxidants ascorbate, trolox and glutathione. *Neuroendocrinol Lett* 1993; 17: 347-57.
212. Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I, Laborit H. Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 80 (2): 211-23.
213. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26 (5): 497-502.
214. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-48.
215. Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schrader M, Carlberg C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 7037-40.
216. Turgut, M., Uyanikgil, Y., Baka, M., Tunc, A. T., Yavaşoğlu, A., Yurtseven, M. E., and Kaplan, S. Pinealectomy exaggerates and melatonin treatment suppresses neuroma formation of transected sciatic nerve in rats: Gross morphological, histological and stereological analysis. *J Pineal Res* 2005; 38, 284–291.
217. Turgut, M., Uysal, A., Pehlivan, M., Oktem, G., and Yurtseven, M. E. Assessment of effects of pinealectomy and exogenous melatonin administration on rat sciatic nerve suture repair: An electrophysiological, electron microscopic, and immunohistochemical study. *Acta Neurochir. (Wien.)* 2005; 147, 67–77.
218. Bunge, R. P., and Bunge, M. B. Evidence that contact with connective tissue matrix is required for normal interaction between Schwann cell and nerve fibers. *J. Cell Biol* 1978; 78, 943–50.

219. Einheber, S., Hannocks, M. J., Metz, C. N., Rifkin, D. B., and Salzer, J. L. Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *J. Cell Biol* 1995; 129, 443–58.
220. Rufer, M., Flanders, K., and Unsicker, K. Presence and regulation of transforming growth factor beta mRNA and protein in the normal and lesioned rat sciatic nerve. *J. Neurosci. Res* 1994; 39, 412–23.
221. Tatagiba, M., Rosahl, S., Gharabaghi, A., Bloemer, U., Brandis, A., Skerra, A., Sami, M., and Schwab, M. E. Regeneration of auditory nerve following complete sectioning and intrathecal application of the IN-1 antibody. *Acta Neurochir. (Wien.)* 2002; 144, 181–7.
222. Stavisky, R. C., Britt, J. M., Zuzek, A., Truong, E., and Bittner, G. D. Melatonin enhances the in vitro and in vivo repair of severed rat sciatic axons. *Neurosci. Lett* 2005; 376, 98–101.
223. Hardeland, R., Reiter, R. J., Poeggeler, B., and Tan, D. X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev* 1993; 17, 347–57.
224. Hsu, C. H., Chi, B. C., and Casida, J. E. Melatonin reduces phosphine-induced lipid and DNA oxidation in vitro and in vivo in rat brain. *J. Pineal Res* 2002; 32, 53–8.
225. Baydas, G., Reiter, R. J., Nedzvetskii, V. S., Yasar, A., Tuzcu, M., Ozveren, F., and Canatan, H. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol. Lett* 2003; 137, 169–74.
226. Nam, E., Lee, S. M., Koh, S. E., Joo, W. S., Maeng, S., Im, H. I., and Kim, Y. S. Melatonin protects against neuronal damage induced by 3-nitropropionic acid in rat striatum. *Brain Res* 2005; 1046, 90–6.
227. Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., and Gitto, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biomed. Sci.* 2000; 7, 444–58.
228. El-Abhar, H. S., Shaalan, M., Barakat, M., and El-Denshary, E. S. Effect of melatonin and nifedipine on some antioxidant enzymes and different energy fuels in the blood and brain of global ischemic rats. *J. Pineal Res* 2002; 33, 87–94.
229. Sayan, H., Ozacmak, V. H., Ozen, O. A., Coskun, O., Arslan, S. O., Sezen, S. C., and Aktas, R. G. Beneficial effects of melatonin on reperfusion injury in rat sciatic nerve. *J. Pineal Res* 2004; 37, 143–8.
230. Ek, R. O., Zencirci, S. G., Dost, T., Birincioglu, M., and Bilgin, M. D. Effects of melatonin supplementary on the sciatic nerve conduction velocity in the ovariectomized-aged rat. *Neuro Endocrinol. Lett* 2007; 28, 666–70.
231. Greensmith, L., and Vrobova, G. Motoneurone survival: A functional approach. *Trends Neurosci* 1996; 19, 450–5.
232. Chang, H. M., Ling, E. A., Lue, J. H., Wen, C. Y., and Shieh, J. Y. Melatonin attenuates neuronal NADPH-d/NOS expression in the hypoglossal nucleus of adult rats following peripheral nerve injury. *Brain Res* 2000; 873, 243–51.
233. Ando, A., Domodo, T., Tsumori, T., and Yasui, Y. Changes of NADPH-diaphorase activity in the lumbosacral intermediolateral neurons of the rat after pelvic axotomy. *Brain Res. Bull* 1996; 40, 37–42.
234. Clowry, G. J. Axotomy induces NADPH diaphorase activity in neonatal but not adult motoneurons. *Neuroreport* 1993; 5, 361–4.

235. Este´vez A. G., Spear N., Manuel S. M., Radi R., Henderson C. E., Barbeito L., Beckman J. S. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J. Neurosci* 1998; 18, 923–31.
236. Yu, W. H. A. Regulation of nitric oxide synthase expression in motoneurons following nerve injury. *Dev. Neurosci* 1997; 19, 247–54.
237. Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M., and Vincent, S. R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 86, 2811–2814.
238. Roge´rio, F., Teixeira, S. A., de Rezende, A. C., de Sa´, R. C., de Souza, L., Queiroz, L., De Nucci, G., Muscara´, M. N., and Langone, F. Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment. *Brain Res. Dev. Brain Res* 2005; 154, 217–25.
239. Reiter, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* 1998; 56, 359–384.
240. Roge´rio, F., Jorda˜o, H., Jr., Vieira, A. S., Maria, C. C., Santos de Rezende, A. C., Pereira, G. A., and Langone, F. Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment. *Brain Res.* 2006; 1112, 80–90.
241. Wu, W., Liuzzi, F. J., Schinco, F. P., Depto, A. S., Li, Y., Mong, J. A., Dawson, T. M., and Snyder, S. H.). Neuronal nitric oxide synthase is induced in spinal neurons by traumatic injury. *Neuroscience* 1994; 6, 719–26.
242. Yu, W. H. Spatial and temporal correlation of nitric oxide synthase expression with superoxide dismutase reduction in motor neurons following axotomy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 962, 111–121.
243. Roge´rio, F., de Souza, L., Queiroz, L., Teixeira, S. A., Oliveira, A. L., de Nucci, G., and Langone, F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. *Brain Res.* 926, 33–41. (2002)
244. Roge´rio, F., Teixeira, S. A., Ju´nior, H. J., Maria, C. C., Vieira, A. S., de Rezende, A. C., Pereira, G. A., Muscara´, M. N., and Langone, F. mRNA and protein expression and activities of nitric oxide synthases in the lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin administration. *Neurosci. Lett.* 2006; 407, 182–7.
245. Chang, H. M., Huang, Y. L., Lan, C. T., Wu, U. I., Hu, M. E., and Youn, S. C. Melatonin preserves superoxide dismutase activity in hypoglossal motoneurons of adult rats following peripheral nerve injury. *J. Pineal Res.* 2008; 44, 172–80.
246. Bertelli, J. A., and Mira, J. C. The grasping test: A simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1995; 58, 151–5.
247. Sinis N, Schaller HE, Schulte-Eversum C, Schlosshauer B, Doser M, Dietz K, et al. Nerve regeneration across a 2cm gap in the rat median nerve using a resorbable nerve conduit filled with Schwann cells. *J Neurosurg* 2005;103:1067–76
248. Papalia, I., Tos, P., Stagno d’Alcontres, F., Battiston, B., and Geuna, S. (2003). On the use of the grasping test in the rat median nerve model: A reappraisal of its efficacy for quantitative assessment of motor function recovery. *J. Neurosci. Methods* 127, 43–74
249. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy* 1984; 134: 127-36.

250. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard IR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 379-94.
251. Coggeshall RE. Assaying structural changes after nerve damage, an essay on quantitative morphology. *Pain (Supplement)* 1999; 6: 21-5.
252. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 857-81.
253. West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 275-78.
254. Mayhew TM. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *J Neurocytol* 1992; 21: 313-28.
255. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 1969; 26: 235-302.
256. Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. *J Microsc* 1986;143:3-45.
257. Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147:229-63.
258. Schmitz C. Variation of fractinator estimates and its prediction. *Anat Embryol* 1998;198:371-97.
259. Schmitz C, Hof PR. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. *J Chem Neuroanat* 2000; 20:93-114.
260. Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology reconsidered. *J Microsc* 1999;193:199-211.
261. West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 1999;22:51-61.
262. Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy*. Guilford: Bios Scientific Publishers; 1998 :187-95.
263. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: A brief survey. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1990;258: 148-56.
264. Mayhew TM, Gundersen HJG. If you assume, you can make an ass out of you and me: A decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat* 1996;188:1-15.
265. Russ JC, Dehoff RT. *Practical Stereology*. New York: Plenum Press; 1999: 192-8.
266. Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1100-23.
267. Royet JP. Stereology: A method for analysing images. *Progress Neurobiol* 1991;37:433-74.
268. Canan S, Şahin B, Odacı E ve ark. Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: Cavalieri prensibi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(S):7-14.
269. Dagum A B. Peripheral nerve regeneration, repair and grafting. *J Hand Ther* 1998; 11:111-7.
270. Terzis JK, Smith KL. *The peripheral nerve: Structure, function and reconstruction*. Raven Press, New York 1990.
271. Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98:1264-71, discussion 1272-4.

272. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalbruch H, Krarup C. Comparative electrophysiological, functional and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005;25:508–19.
273. Schaller E, Lassner F, Becker M, Walter GF, Berger A. Regeneration of autologous and allogenic nerve grafts in a rat genetic model: preliminary report. *J Reconstr Microsurg*. 1991; 7: 9-12.
274. Omer GE Jr. Nerve response to injury and repair. In: Hunter JM, Schneider LH, Mackin EJ, et al. editors. *Rehabilitation of the hand*. St. Louis: Mosby; 1990. p. 515–22.
275. Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *Neurosci*. 1995;15:3876-85.
276. Frykman GK, McMillan PJ, Yegge S. A review of experimental methods measuring peripheral nerve regeneration in animals. *Orthop Clin North Am*. 1988;19:209-19.
277. Shibata M, Tsai TM, Firrell J, Breidenbach WC. Experimental comparison of vascularized and nonvascularized nerve grafting. *J Hand Surg Am*. 1988;13:358-65.
278. Haerle M, Schaller HE. Peripheral nerve surgery. *Akt Traumatol*. 2000; 21: 391-402.
279. Ducker TB, Kauffman FC. Metabolic factors in surgery of peripheral nerves. *Clin Neurosurg*. 1977;24:406-24.
280. Sunderland S. *Nerves and nerve injuries*. Churchill Livingstone, New York 1984: 499-585.
281. Eather TF, Pollock M, Myers DB. Proximal and distal changes in collagen content of peripheral nerve that follow transection and crush lesions. *Exp Neurol*. 1986 ;92:299-310.
282. Ma J, Novikov LN, Kellerth JO, Wiberg M. Early nerve repair after injury to the postganglionic plexus: an experimental study of sensory and motor neuronal survival in adult rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2003;37:1-9.
283. Grabb WC. Median and ulnar nerve suture. An experimental study comparing primary and secondary repair in monkeys. *J Bone Joint Surg Am*. 1968 ;50:964-72.
284. Bignotti B, Origo C, Schenone A, Ratto S, Mancardi GL, Ferrari ML. Experimental studies on peripheral nerve repair following early or delayed suture. *Ital J Orthop Traumatol*. 1986 ;12:259-66.
285. Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *J Neurosci*. 1995 ;15:3886-95.
286. Clark WL, Trumble TE, Swiontkowski MF, et al. Nerve tension and blood flow in a rat model immediate and delayed repairs. *J Hand Surg [Am]* 1992;17:677–87.
287. Mailander P, Berger A, Schaller E, Ruhe K. Results of primary nerve repair in the upper extremity. *Microsurgery*. 1989; 10: 147-50.
288. Sinis N, Kraus A, Papagiannoulis N, Werdin F, Schittenhelm J, Meyermann R, Haerle M, Geuna S, Schaller HE. Concepts and developments in peripheral nerve surgery. *Clin Neuropathol*. 2009;28:247-62.
289. Kline DG. Importance of timing for repair of peripheral nerve injuries. *Surg Neurol*. 1976;5:244-5.
290. Millesi H. The current state of peripheral nerve surgery in the upper limb. *Ann Chir Main*. 1984; 3: 18-34.

291. Amara B, Medinacelli L, Lane GB, Merle M. Functional Assessment of Misdirected axonal Growth After Nerve Repair in the Rat. *J Reconstr Microsurg*. 2000; 16: 563-7.
292. Francel PC, Francel TJ, Mackinnon SE, Hertl C. Enhancing Nerve Regeneration across a Silicone tube Conduit by using interposed short-segment nerve grafts. *J Neurosurg* 1997; 87: 887-92.
293. Smahel J, Jentsch B. Stimulation of Peripheral Nerve Regeneration by an Isolated Nerve Segment. *Ann Plast Surg*. 1986; 16: 494-501.
294. Criolo MR, Fiskin K, Martino AD, Corasaniti MT. Age-related changes in Cu, Zn, superoxide dismutase, Se-dependent and independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mech Ageing Dev* 1991;61: 287-97.
295. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344 (8924): 721-724.
296. Cheeseman KH and Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*; 1993;49: 481-93.
297. Kaptanoglu E, Tuncel M, Palaoglu S, Konan A, Demirpence E, Kilinc K. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 2000; 93 (1 Suppl): 77-84.
298. Pichichero M., Beer B., Clody D., Effects of Dibutyryl Cyclic AMP on Restoration of Function of Damaged Sciatic Nerve in Rats, *Science*, 1973; 182: 724-5.
299. Roisen F., Murphy R., Pichichero M., Braden W., Cyclic Adenosine Monophosphate Stimulation of Axonal Elongation, *Science* 1972; 175: 73-4.
300. Siironen J., Sandberg M., Vuorinen V., Roytta M., Expression of Type I and III Collagens and Fibronectin after Transection of Rat Sciatic Nerve. Reinnervation Compared with Denervation, *Laboratory Investigation* 1992; 67: 80-7.
301. Nath R.K., Kwon B., Mackinnon S.E., Jensen J.N., Reznik S., Boutros S., Antibody to Transforming Growth Factor beta Reduces Collagen Production in Injured Peripheral Nerve, *Plastic and Reconstructive Surgery* 1998; 102: 1100-6.