



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**ONKOLOJİK STERİLİZASYON YÖNTEMLERİNDEN
EKSTRAKORPORAL IŞINLAMA VE SIVI NİTROJENLE
HAZIRLANAN OTOGREFTİN SİNİR İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN SIÇAN SİYATİK SİNİR
MODELİNDE KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hüseyin KAYA

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Dünder SABAH

İZMİR, 2016



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**ONKOLOJİK STERİLİZASYON YÖNTEMLERİNDEN
EKSTRAKORPORAL IŞINLAMA VE SIVI NİTROJENLE
HAZIRLANAN OTOGREFTİN SİNİR İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN SIÇAN SİYATİK SİNİR
MODELİNDE KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hüseyin KAYA

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Dünder SABAH

İZMİR, 2016

ÖNSÖZ

Bu çalışmada “Onkolojik Sterilizasyon Yöntemlerinden Ekstrakorporal Işınlama ve Sıvı Nitrojenle Hazırlanan Ototogreftin sinir iyileşmesi üzerine etkisinin sıçan siyatik sinir modelinde karşılaştırılması” araştırılmıştır.

Tez danışmanım olarak çalışmanın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında büyük desteği ve yardımı olan Sayın Prof. Dr. Dünder SABAH’a ve çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Burçin KEÇECİ’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ortopedi ihtisasına başladığım günden itibaren, en iyi şekilde yetişmem için elinden gelen tüm gayreti gösteren, öğrenim görmekten büyük mutluluk ve gurur duyduğum kliniğimizin değerli tüm hocalarına ve uzmanlarına teşekkür ederim.

Asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan arkadaşlarıma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğinin tüm çalışanlarına, çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmadaki yardımlarından dolayı, Fizyoloji Anabilim Dalı’ndan Prof. Dr. Dilek TAŞKIRAN’a ve Doç. Dr. Oytun ERBAŞ’a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’ndan Uzm. Dr. Fatih OLTULU’ya ve Arş. Gör. Gürkan YİĞİTTÜRK’e, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı’ndan Yard. Doç. Dr. Timur KÖSE’ye ve ARGEFAR Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Gerek Tıp Fakültesi gerekse uzmanlık eğitimim süresince destek ve sevgilerini esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Dr. Hüseyin KAYA

İZMİR

2016

ÖZET

Onkolojik Sterilizasyon Yöntemlerinden Ekstrakorporal Işınlama ve Sıvı Nitrojenle Hazırlanan Ototogreftin sinir iyileşmesi üzerine etkisinin sıçan siyatik sinir modelinde karşılaştırılması

Giriş-Amaç: İskelet sistemi malign kemik tümörlerinde ve yumuşak doku sarkomlarında tümörle kontamine kemik, tendon, vasküler yapılar ve sinir dokuları geniş rezeksiyon şeklinde çıkartılmaktadır. Oluşan kemik ve tendon defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan yöntemlerden biri de bu yapıların ekstrakorporal (vücut dışında) tümör hücrelerinden arındırılıp (devitalizasyon, onkolojik sterilizasyon), tekrar alındığı yere tespit edilmesidir (reimplantasyon). Bu çalışmanın amacı; kemik ve tendon defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan bu onkolojik sterilizasyon yöntemleriyle hazırlanmış otogreft yönteminin, sinir defektleri içinde kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymaktır.

Gereç-Yöntem: Bu çalışmada ağırlıkları 250 ile 300 gr. arasında değişen 48 adet dişi Sprague-Dawley rat kullanıldı. Denekler otogreft, radyoterapi, nitrojen grubu olarak üç gruba ayrıldı. Tüm sıçanların sadece sağ arka siyatik siniri operasyonda kullanıldı. Siyatik sinirde 10 mm uzunluğunda oluşturulan sinir defekti yine sinirin kendisinden elde edilen otogreft ile rekonstrükte edildi. Grup 1: Standart sinir otogrefti ile rekonstrüksiyon uygulandı. Grup 2: Ekstrakorporal radyoterapi ile devitalize edilmiş sinir otogrefti ile rekonstrüksiyon. Grup 3: Sıvı nitrojen ile devitalize edilmiş sinir otogrefti ile rekonstrüksiyon yapıldı. Deneklerin yarısı erken dönem 12. hafta, kalan yarısı geç dönem 16. haftada değerlendirmeye alındı. Değerlendirmede; EMG, eğimli tablada motor güç ve histomorfolojik sinir değişikliklerine bakıldı.

Bulgular: Erken dönem ve geç dönem motor güç değerlendirmesinde; otogreft grubunda, radyoterapi ve nitrojen grubuna göre daha iyi motor fonksiyon değerleri olmasına rağmen, her 3 grup arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. EMG; miyelinizasyonunun değerlendirildiği latans sürelerinde erken dönemde otogreft grubu en iyi, nitrojen grubu en kötü değerlere sahipti. Geç dönemde gruplar arasında fark saptanmadı. Aksonal iyileşmenin saptandığı BKAP amplitüd değerlendirmesi yapıldı. Buna göre; erken dönemde nitrojen grubu kötü bulundu. Geç dönemde otogreft grubu anlamlı iyi olup, radyoterapi ve nitrojen grubu benzer saptandı.

Histolojik olarak yapılan miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde otogreft grubu tüm değerlendirmelerde radyoterapi ve nitrojen grubuna göre daha iyi saptandı. Geç dönemde yapılan değerlendirmede; greft bölümünde nitrojen grubu, greft distali bölümünde ise radyoterapi grubu anlamlı yüksek bulundu. Nitrojen grubunda daha belirgin olmak üzere tüm gruplarda fibrozis ve apoptotik hücreler saptandı. Radyoterapi ve nitrojen grubunda; fresh otogreft uygulanan gruba göre düşük revaskülerizasyon saptandı.

Sonuç: Deneysel siyatik sinir greft modelinde; otogreft modelinin, radyoterapi ve sıvı nitrojen ile devitalize edilen sinir otogreftlerine daha üstün yöntem olduğu gösterildi. Ayrıca radyoterapi ve sıvı nitrojenle devitalize edilmiş sinir otogreftlerinin, aksonal rejenerasyonu olumsuz etkilediği görüldü. Onkolojik sterilizasyon yöntemi olan radyoterapi ve sıvı nitrojenle hazırlanan sinir otogreftlerinin iyileşme potansiyeli, işlem görmemiş otogreftte göre düşük olsa da, tümör cerrahisinde ortaya çıkan sinir defektlerinde kullanılabileceğini göstermiştir. Sıçan modelinde yaptığımız bu çalışmanın klinik uygulamasında, yansımalarının hangi düzeyde olacağını öngörmek mümkün değildir.

Anahtar Sözcükler: Ekstrakorporal devitalizasyon, irradiasyon, sıvı nitrojen, sinir otogrefti

ABSTRACT

Comparison of effect on nerve recovery underwent Oncologic Sterilization Methods such as extracorporeal irradiation and liquid nitrogen on the rat sciatic autograft nerve model

Introduction – Objective; Tumor contaminated bone, tendon, vascular structures and neural tissue is removed through wide resection in skeletal malignant bone tumors and soft tissue sarcomas. One of methods used in the reconstruction of occurred bone and tendon defects is; extracorporeal (outside the body) irradiation of structures (devitalization of oncological sterilization) and then using these structures as autografts (reimplantation). These autograft preparation method has been used for reconstruction of tendon and bone defects in malign bone and soft tissue tumor patients. The purpose of this study is to reveal success of oncologically sterilized autograft method in nerve defects after wide resection operations, which is already being used in the reconstruction of bone and tendon defects.

Methods: 48 Sprague-Dawley rats ranging from 250 to 300 grams were used in this study. Subjects were divided into three groups as autograft, irradiation and nitrogen group. All rats were operated only on their right sciatic nerve. 10 mm long nerve defect created in the sciatic nerve was reconstructed with autograft obtained from the nerve itself. Group 1 underwent reconstruction with standard nerve autograft. Group 2 underwent reconstruction with devitalized nerve autograft treated through extracorporeal irradiation. Group 3: underwent reconstruction with devitalized autograft treated through liquid nitrogen. Half of the subjects were evaluated in early stage at 12 weeks and the other half in late stage at 16 weeks. As the final evaluation; EMG, motor strength at the curved table and histomorphologically nerve changes were observed.

Results: In spite of both irradiation and liquid nitrogen groups, better motor function values in early and late stage of the autograft group was obtained, however no significant statistical difference was distinguished among these 3 groups.

EMG; autograft group exhibited the best latency time, while nitrogen group did the worst, where early period myelinisation process was under focus. There was no difference among 3 groups in the late period. CMAP amplitude assessment was made to detect axonal regeneration. Accordingly; in early period nitrogen group determined as the worse. In late period autograft group was significantly better, whereas nitrogen and radiotherapy groups were similar.

Histological study of myelinated nerve fibers; the autograft group showed better results in all the assessments than both nitrogen and irradiation groups. According to assessment made in the late period; nitrogen group in the graft segment and irradiation group in distal segment of the graft showed high myelination rates. There was fibrosis in all 3 groups, but fibrosis and apoptotic cell rate in nitrogen group was higher than other groups. Also revascularization rate in irradiation and liquid nitrogen groups were lower than fresh autograft group.

Conclusion: Autograft model was determined to be more superior to devitalized nerve autografts prepared with irradiation and liquid nitrogen, in experimental sciatic nerve graft modelling. Besides, devitalized nerve autografts prepared with irradiation and liquid nitrogen has an adverse effect axonal regeneration. Healing potential of nerve autografts prepared with oncologic sterilization methods such as irradiation and liquid nitrogen appears to be lower than normal autografts, however this method is shown to be applicable for nerve defects after tumor surgery. It is impossible to predict clinical results of our experiment performed on rat models.

Keywords: extracorporeal devitalization, irradiation, liquid nitrogen, nerve autograft

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
KISALTMALAR.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLolar DİZİNİ.....	VI
1- GİRİŞ.....	1
2- GENEL BİLGİLER.....	
2.1- PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ ANATOMİSİ.....	
2.2- PERİFERİK SİNİR YARALANMASI VE DEFİKTLERİ	
2.3- PERİFERİK SİNİR CERRAHİSİ	
2.4- ONKOLOJİK STERİLİZASYON.....	
3- ÇALIŞMANIN AMACI.....	
4- GEREÇ VE YÖNTEM.....	
5- BULGULAR.....	
6- TARTIŞMA	
7- SONUÇ.....	
8- KAYNAKLAR	

KISALTMALAR

RT: Radyoterapi

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

Gy: Gray

Ark.: Arkadaşları

BKAP: Birleşik Kas Aksiyon Potansiyeli

SC: Schwann Hücresi

CAM: Hücresel Adezyon Molekülü

IL-1: İnterlokin 1

NGF: Nerve Growt Faktör

ILGF: İnsülin Like Growt Faktör

PGA: Poliglikolik Asit

PSS: Periferik Sinir Sistemi

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

EMG: Elektromiyografi

SFİ: Siyatik Fonksiyonel İndeksi

ŞEKİLLER

Şekil 1: Uzantılarına göre nöronların sınıflandırılması.

Şekil 2: Normal periferik sinir anatomisi.

Şekil 3: Periferik sinirlerin fasiküler yapılarına göre sınıflandırılması.

Şekil 4: Sinir dejenerasyon ve rejenerasyonu.

Şekil 5: Epinöral onarım.

Şekil 6: Grup fasiküler onarım.

Şekil 7: İnterfasiküler sinir greftleme.

Şekil 8: Olgu örneği.

Şekil 9: Ege Üniversitesi ARGEFAR Araştırma ve Uygulama Merkezi.

Şekil 10: Mikrocerrahi işlemlerin mikroskopi eşliğinde yapılması.

Şekil 11: Cerrahi görüntü örnekleri.

Şekil 12: Cerrahi görüntü örnekleri.

Şekil 13: Cerrahi görüntü örnekleri.

Şekil 14: Ekstrakorporal ışınlama cihazı.

Şekil 15: Sıvı nitrojen uygulama görüntüsü.

Şekil 16: Cerrahi görüntü örneği.

Şekil 17: Eğimli tablada deneklerin tutunabilme açısının saptanması.

Şekil 18: EMG çekim görüntüsü.

Şekil 19: MP30 biopotansiyel kayıt amplifikatörü ve stimülatörü.

Şekil 20: EMG de M yanıtı ve distal latans süresi.

Şekil 21: Histolojik değerlendirme için alınan sinir doku örnekleri.

Şekil 22: Cerrahi uygulanan tarafta görülen otofaji.

Şekil 23: Deneklerin eğimli tablada tutunma açılarının test edilmesi.

Şekil 24: Deneklerin eğimli tablada tutunma açıları.

Şekil 25: Kontrol ve Cerrahi gruplara ait EMG kayıt örnekleri.

Şekil 26: Histolojik örnek.

Şekil 27: Histolojik örnek.

Şekil 28: Histolojik örnek.

Şekil 29: Sağ A grubu (otogreft) hemotoksilen & eozin boyama. X40 Büyütme.

Şekil 30: Sağ B grubu (radyoterapi) hemotoksilen & eozin boyama. X40 Büyütme.

Şekil 31: Sağ C grubu (nitrojen) hemotoksilen & eozin boyama. X40 Büyütme.

Şekil 32: Miyelinli sinir lifi değerlendirme grafiği 3.ay.

Şekil 33: Miyelinli sinir lifi değerlendirme grafiği 4.ay.

Şekil 34: Vasküler yapı grafiği 3. ay.

Şekil 35: Vasküler yapı grafiği 4. ay.

Şekil 36: cerrahi uygulanan gruplara ait Masson trikrom boyama.

Şekil 37: S100 Boyama .X40 Büyütme.

Şekil 38: TUNEL Boyama .X40 Büyütme.

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Periferik sinir yaralanmasında Seddon ve Sunderland sınıflaması

Tablo 2: Çalışma grupları ve grupların denek sayısını gösteren tablo.

Tablo 3: Eğilimli tablada motor güç tutunma açısının karşılaştırılması.

Tablo 4: EMG parametrelerinin karşılaştırılması.

Tablo 5: s-100 immunoekspresyonun gruplara göre çizelgesi

GİRİŞ

Kas iskelet sistemi tümörleri; tanı, tedavi yaklaşımı ve takibi açısından multidisipliner yaklaşımla bu konuda deneyimli merkezlerce yürütülmesi gereken hastalık grubudur. Malign kas ve iskelet sistemi tümörleri tedavisinde olguların çoğunda cerrahi gerekmektedir. Cerrahi tedavi öncesinde ve/veya sonrasında tanı ve tümörün derecesine bağlı olarak kemoterapi ve/veya radyoterapi uygulanabilmektedir. Hastalar sonraki dönemde klinik ve radyolojik takibe alınır (1).

1970’li yıllardan önce kas iskelet sistemi tümörlerinde uygulanan yaygın tedavi, tutulmuş olan ekstremitenin radikal amputasyonu şeklindeydi. Bu radikal cerrahilere rağmen hastaların sağkalım oranları ancak %10 – 20 arasındaydı (2).

1980’lerden sonra etkili kemoterapotik ilaçların ve tedavi protokollerinin geliştirilmesi sonucu, sağkalım oranlarında artış olmuştur. Aynı zamanda bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi görüntüleme yöntemlerinde teknolojik ilerleme beraberinde rekonstrüktif mikrocerrahideki gelişmeler sonucu malign kas iskelet sistemi tümörlerinin tedavisinde amputasyon oranları %10’ a düşmüştür. Tüm bunların katkılarıyla uygun olgularda %90 oranında ekstremitte koruyucu cerrahi uygulanabilmektedir (3). Onkolojik sonuçlar açısından da geniş cerrahi sınır elde edilen uzuv koruyucu cerrahi ile amputasyon arasında fark olmadığı saptanmıştır (4). Bu nedenle uzuv koruyucu cerrahi yaygın şekilde kabul görmektedir.

Uzuv koruyucu cerrahideki birincil amaç; önce hastanın lokal tümörünü cerrahi olarak geniş cerrahi sınır ile uzaklaştırıp hastayı hayatta tutmak, ikincil amaç; hastalıklı ekstremitayı eğer mümkünse kurtarıp, uzuv kaybını engellemektir. Bu uzuv koruyucu cerrahideki hedef; kurtarılan ekstremitenin fonksiyonel ve işlev gören bir uzuv olarak elde edilmesini sağlamaktır.

Burada birincil amacın tümörün gerektiği kadar ve sağlam sınırlarla geniş olarak eksize edilmesi ve bu kuraldan diğer amaçlar uğruna asla taviz verilmemesi gerekliliği temel felsefedir.

Ekstremitte koruyucu cerrahinin yaygın uygulanması ile birlikte çözülmesi gereken birtakım sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bunlar; büyük kemik defektleri, kas defektleri, ana arter ve ven defektleri, sinir defektleri olarak sıralanabilir. Uzuv koruyucu cerrahi sonrası ortaya çıkan kemik defektleri özellikle eklem ve çevresinde meydana geldiğinde, tümör rezeksiyon protezleriyle rekonstrükte edilebilmektedir. Ayrıca biyolojik rekonstrüksiyon yöntemleri olarak vaskülerize kemik grefti, kemik allogreftleri ve diğer bir yöntem de işlem geçirilmiş otogreftlerdir. Bu yöntemde tümörlü kemiğin rezeksiyonu sonrası rezeke edilen kemik; irradiasyon, sıvı nitrojen, otoklovizasyon vb. onkolojik sterilizasyon yöntemleri kullanılarak tümör hücrelerinden arındırılıp, tekrar defektli bölgeye reimplante edilir. Bu yöntem

onkolojik açıdan güvenli olduğu gibi allojenik reaksiyon riski olmaması, bulaşıcı hastalık geçme riski taşımaması, otogreftin defektli alanı iyi doldurması, cerrahi kolaylığı, gerektiğinde tendon ve bağların kemik üzerinde korunarak rekonstrüksiyon işleminde kolaylık sağlaması, ucuz ve kolay uygulanabilir olması gibi avantajlara sahiptir (5). Malign kemik veya kemik tutulumlu yumuşak doku tümörlerinin geniş rezeksiyonu sonrası oluşan kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için bu yöntem, bir çok merkezde ve kliniğimizde uygun olgularda uygulanmaktadır (78,94).

Kas iskelet sistemi tümör cerrahisinde, tümörün vasküler yapıları invaze ettiği durumlarda arter ve ven yapay greftlerle veya safen ven greftiyle tamir edilebilmektedir. Kemik defektlerinde tümör rezeksiyon protezleri otogreft, allogreft veya işlem görmüş (irradiye, sıvı nitrojen vb.) otogreftler başarıyla kullanılabilir. Ancak tümör ana sinir yapıları invaze ettiğinde, cerrahi sonrası ortaya çıkan sinir defektleri rekonstrüksiyonunda zorluklar bulunmaktadır. Sinir defektlerinde altın standart tedavi sinir otogrefti ile rekonstrüksiyondur (6). Sinir otogrefti, donör saha mobiditesi yaratması sebebiyle ve büyük sinir defektlerine uygun otogreft sinir dokusu alınamaması sebebiyle her hastada kullanılamamaktadır. Diğer tedavi seçenekleri olan sinir allogrefti ve sentetik sinir dokusu ile rekonstrüksiyon yöntemlerinin sonuçlarının tatmin edici olmaması sebebiyle çok tercih edilmemektedir (7). Bu olgularda tedavi olarak tendon transferleri veya ortezler yardımıyla fonksiyon restore edilmeye çalışılmaktadır.

Uzuv koruyucu cerrahide ana sinirlerin eksizyonu gerektiğinde duyusu ve motor fonksiyonu iyi olan bir ekstremitede elde etmedeki en önemli sorunlardan birisi; çözümü zor olan sinir defektlerinin rekonstrüksiyonudur. Biz de çalışmamızda iskelet sistemi tümör cerrahisinde oluşan sinir defektlerine çözüm bulmayı planladık. Bu amaçla; daha önce klinik ve deneysel çalışmalarca etkinliği kanıtlanmış olan kemik ve tendon defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan, onkolojik sterilizasyon yöntemleriyle hazırlanmış otogreft yönteminin, sinir defektleri için kullanılabilirliğini araştırmayı planladık.

GENEL BİLGİLER

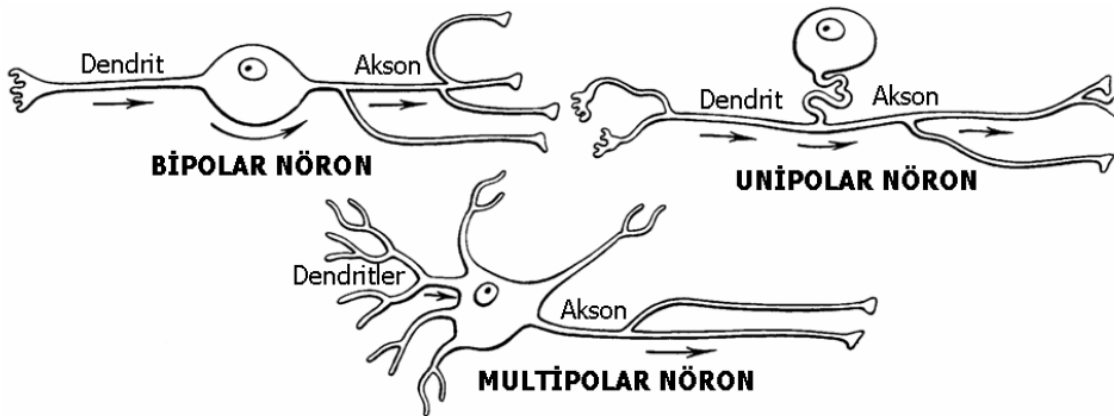
PERİFERİK SINIR SİSTEMİ ANATOMİSİ;

Sinir sistemi merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Beyin ve omurilik merkezi sinir sistemini (MSS) , bu yapılara bağlanan kranial sinirler, spinal sinirler, sinir ağları (pleksus) ve reseptörleri içeren bölümlerine ise periferik sinir sistemi (PSS) denir. Periferik sinir sistemi merkezi sinir sisteminden aldığı motor ve sempatik yanıtları perifere ileten aynı zamanda periferden aldığı duysal uyarıları (ısı,ağrı,temas,vibrasyon) merkeze ileten çift yönlü çalışan bir sistemdir.

Periferik sinir sistemi somatik (motor ve duysal) ve otonom (sempatik ve parasempatik) sinir liflerinden oluşmaktadır. Motor sinirlerin hücre gövdeleri medulla spinalis ön boynuzunda yer alırken, duyu sinirlerinin hücre gövdeleri ise dorsal spinal arka kökler içerisinde yer alır. Otonom sinir sistemi vücutta istemsiz çalışan kalp, düz kas ve bezler gibi yapıların innervasyonu ile ilgilenir. Sempatik ve parasempatik olarak iki bölüme ayrılıp afferent ve efferent sinir lifleri periferik sinirde bulunur (8).

Periferik sinir sisteminin yapıtaşı ektodermal kökenli nöron hücresidir. Nöron, sinir hücre gövdesi ve tüm uzantılarına verilen isimdir. Her bir nöron hücre gövdesi ve yüzeyinde çok sayıda nöritlere (dendritler) sahip olup bunlar bilginin alınması ve hücre gövdesine doğru iletilmesinden sorumludur. Ayrıca nöronları akson denilen uzantıları mevcut olup hücrenin perifer ile iletişimini sağlayan yapıdır. Genellikle her hücrede tek olup aksonlar uzantısı oldukları hücre gövdesinin binlerce katı olabilirler. Dendritler ve aksonlar sinir lifleri olarak bilinir.

Nöronların içerdikleri akson ve dendritler sayı, uzunluk ve şekil olarak farklılık göstererek bunlara bağlı olarak unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere 3 gruba ayrılır.



Şekil 1: Uzantılarına göre nöronların sınıflandırılması (Berry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous system. Gray's anatomy. 38th ed. Williams P.L. Churchill Livingstone, Edingburgh, s:904,1995).

Ünipoar nöronlarda hücre gövdesi tek bir nörite sahip olup kısa bir mesafe sonra iki dala ayrılır. Dallardan biri periferde diğeri ise merkezi sinir sistemine girer. Bu tip nöronlar arka kök ganglionunda yer alır. Bipolar nöronların her iki ucundan birer nörit çıkar. Koku, görme ve duyu ganglionlar bu tip nöronlara sahiptir. Multipolar nöronlar ise çok sayıda dendirit ve uzun bir aksona sahiptir. Beyin ve omuriliğin çoğu nöronları bu tiptedir.

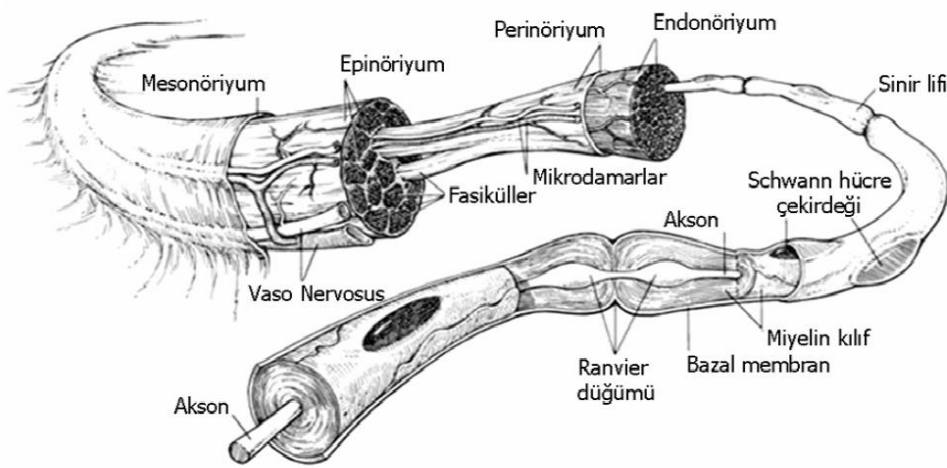
Sinir hücresi gövdesi diğere hücrelerde olduğu gibi içinde nükleusun olduğu sitoplazmadan oluşur. Bu hücre gövdesinde hücre yapıtaşları, nörotransmitterler ve hücrenin yaşaması için gerekli maddeler sentezlenir ve bu bölümde bütün hücresel organeller yer alır. Nöron hücre gövdesinde bulunan granüllü endoplazmik retinakulumu Nissle cisimcikleri denir ve burada protein sentezi gerçekleşir. Tüm bu yaşamsal faaliyetler çekirdeğin bulunduğu hücrenin gövdesinde gerçekleşmektedir. Bundan dolayı aksonun fonksiyon görebilmesi için gövde ile bağlantısının bozulmaması gerekmektedir. Akson ile hücre gövdesi ilişkisi bozulduğunda distal kısımda metabolik olaylar gerçekleşemez ve distal bölüm dejenerasyona gider.

Akson hücre gövdesinin en uzun uzantısı olup hücre zarı aksolemma ismini alarak bu uzantı boyunca devam eder. Aksonun plazmasına aksoplazma denilir. Aksoplazma nissle granülleri veya golgi kompleksi içermemesi sebebiyle hücre gövdesi stoplazmasından farklıdır. Bu nedenle aksonal yaşam hücre gövdesinden maddelerin transportuna bağlıdır.

Aksonal iletim hücre gövdesinden akson terminaline doğru anterograde iletim şeklinde olduğu gibi daha az oranda tam tersi yönde merkeze doğru retrograde iletim şeklinde olabilmektedir. Akson transportu mikofilamentlerin yardımıyla mikrotubuluslarla oluşturulur. Akson terminaline doğru anterograde iletimle aksonun yaşaması ve fonksiyonu için gerekli madde iletimi, retrograde iletimde ise aksonda oluşan metabolik ürünlerin gövdeye taşınması olmaktadır. Ayrıca kuduz virüsü, çiçek virüsü, tetanoz virüsü gibi bazı etkenlerin de aksonal retrograde ileti ile periferden hücre gövdesine taşınarak merkezi sinir sistemi hastalıklarına yol açtığı bilinmektedir (9,10).

Schwann hücreleri nöroektodermal kökenli periferik sinir sisteminin temel destek hücreleri olup akson çevresinde yer alır. Schwann hücreleri periferik aksonlarda myelin oluşturur ve gerektiğinde atık maddelerin fagositozunu yapar. Ayrıca iyon dengesinin sağlanmasına, nörotransmitterlerin dağılımına ve aksolemma boyunca sodyum kanallarının yerleşimine katkıda bulunur. Schwann hücreleri sinir lifini çevreleyen tip 4 kollajen ve lamininden zengin bir bazal membran üretirler. Bu bazal membran, sinir rejenerasyonu sırasında yeni büyümekte olan aksonal tomurcukların distal sinir güdüğüne uzanımları sırasında rehberlik görevi görür.

Periferik sinir lifleri miyelinli yada miyelinsiz olabilirler. Miyelinli sinirlerde miyelin tabakası schwann hücreleri tarafından yapılır. Miyelinli aksonlarda iki schwann hücresi arasında miyelinsiz bölümler vardır. Bu alanlara ranvier boğumları denir. Elektriksel uyarı bir ranvier boğumundan diğerine atlayarak iletilerek çok daha hızlı bir uyarı iletimi sağlanır (11). Bir sinirin miyelin miktarı onun iletim hızını da etkiler. Kalın miyelinli liflerde iletim hızı ince miyelinli liflere göre daha hızlıdır. Akson çapı arttıkça üzerindeki miyelin kılıfı artarak elektriksel iletim hızı da artar. Kalın miyelinli sinirlerde çap 12-20 μm ve iletim hızı 72-120 m/sn gibi yüksek hızdayken, miyelinsiz sinirlerde çap 0.2-1.5 μm ve iletim hızı 0.4-2.0 m/sn dir (11). Miyelinli sinirlerde schwann hücresi tek bir nöronu sararken, miyelinsiz nöronlarda çok sayıda nöronu sarabilmektedir. Sinir kesit alanının %25-85 kadarı bağ dokusu tarafından oluşturulmaktadır. Bu oran sinire ve bulunduğu yere göre farklılık gösterebilmektedir. Periferik sinirler 3 ayrı bağ dokusu tabakası tarafından çevrelenmiştir. Her bir sinir lifi içten dışa doğru endonörium, perinörium ve epinörium tabakası ile sarılıdır.



Şekil 2: Normal periferik sinir anatomisi. (Brandt KE, Mackinnon SE: Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery, 5.th ed, Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM. (eds) Lippincott-Raven, Philadelphia s:80, 1997)

Endonörium fasikül içerisinde yer alan aksanların etrafını saran, fasiküller içerisindeki intersitisyel boşluğu dolduran, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve kapiller sistemden oluşan bağ dokudur.

Perinörium fasikülleri sarar. Kollojen ve elastik lifler içerir. Kan-beyin bariyerinin devamı gibi fonksiyon göstererek difüzyonu kısıtlar, intranöral iyonik çevrenin stabilitesini korur ve enfeksiyonun yayılmasını engeller (12). Perinörium içerisinde bulunan sinir liflerini gerilmelere karşı korur. Perinörium hem mekanik bariyer hem de elektolit dengesinin düzenlenmesini sağlayan diffüzyon bariyeridir.

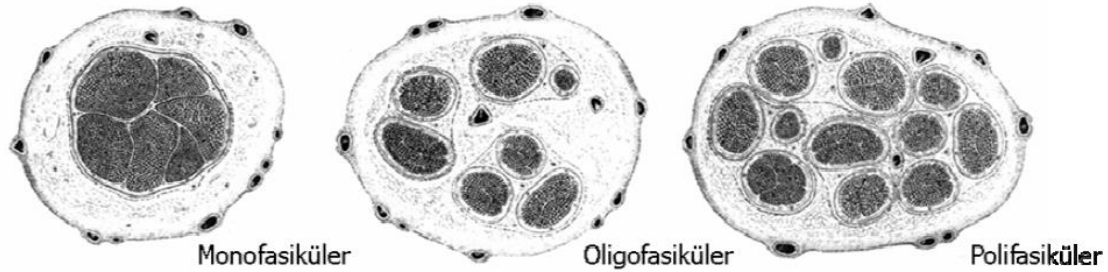
Sinir kılıflarının en dış tabakasını oluşturan bağ doku yapısı epinöriumdur. Epinörium yağ dokusu, tip 1, tip 3 kollajen ve fibroblastlar içermektedir. Sağlam bir yapıya sahip olup ekstremiteler hareketleri sırasında travmaya karşı fasikülleri koruyan, sinir

bütünlüğünün korunmasında en önemli göreve sahip yapıdır. Sinirin beslenmesi bu yapı içerisindeki kan damarlarıyla sağlanmaktadır ayrıca içerisinde lenfatiklerde yer almaktadır.

Periferik sinir vaskülarizasyonu ekstrensek ve intrinsek dolaşım olarak iki şekilde sağlanmaktadır. Ekstresek sistem epinöral alandaki arteriol ve venüllerden oluşur. İntrinsek sistem ise endonöryumdaki kapillerden oluşur. Bu yapılar kendi aralarında kapiller ağı oluşturur.

Periferik sinirler içerisindeki fasiküllerin dağılımına göre 3 gruba ayrılmaktadır.

- 1) Monofasiküler sinir ; tek bir fasikülü içermektedir.
- 2) Oligofasiküler sinir ; birkaç fasikül içermektedir.
- 3) Polifasiküler sinir ;çok sayıda fasikül içermektedir.



Şekil 3: Periferik sinirlerin fasiküler yapılarına göre sınıflandırılması (Lundborg G. The nerve trunk. Nerve injury and repair. Churchill Livingstone, NY, s: 198, 1988)

PERİFERİK SINİR YARALANMALARI VE DEFEKTLERİ;

Periferik sinir yaralanmaları en sık travma nedeniyle gerilim, laserasyon ve kompresyon şeklinde olabilmektedir. Ayrıca kronik basıların yol açtığı tuzak nöropatiler, elektrik hasarı ve yanıkları, enjeksiyon sonrası ve tümörlere bağlı olabilmektedir (13).

Periferik sinir yaralanmalarındaki sınıflandırmanın önemi, elde edilecek olan iyileşme düzeyinin yaralanmanın derecesiyle yakından ilişkili olmasından kaynaklanır. Periferik sinir yaralanmalarındaki sınıflama ilk kez 1941 yılında Cohen tarafından önerilmiş olup 1943 yılında Seddon tarafından bildirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis şeklinde üçlü tanımlama yapılmıştır.

Seddon sınıflaması 1947;

- 1) Nöropraksi ; periferik sinir yaralanmalarının en hafif türü olup geçici fonksiyon kaybı olarak tanımlanmıştır. Motor ve duyu kaybı olmakla birlikte wallerian dejenerasyonu bulgusu yoktur. Sinir devamlılığında kesilme yoktur ve aksonal devamlılık korunmuştur ancak demiyelinizasyon görülebilir (14).
- 2) Aksonotmezis ; sinir çevresindeki mezeneşimal yapılar olan endonörium,perinörium ve epinöriumun sağlam olduğu, sinirin sadece akson devamlılığında ve miyelin kılıfta komplet

kesilme olduğuunda oluşan hasardır.akson ve miyelin de yaralanma bölgesinin distalinde wallerian dejenerasyon olur ve komplet denervasyon meydana gelir. Bu tip yaralanmalarda akson çevresindeki bağ dokunun sağlam olması sebebiyle aksonun proksimalden distale ilerlemesi kolay olur. Prognoz genel olarak iyidir ve tama yakın iyileşme meydana gelir (15).

- 3) Nörotmezis ; Sinir dokusunun anatomik olarak bütünlülüğünün tam olarak kesintiye uğradığı yaralanma şeklidir. Sinirin en ağır yaralanma şekli olup cerrahi tedavi olmaksızın iyileşme şansı yoktur. Aksondaki yıkım ve wallerian dejenerasyon sebebiyle sinir fasiküllerinin iç yapısı bozulur. Yaralanma bölgesinin hem proksimali hem de distalinde dejenerasyon meydana gelmektedir (16).

Tablo 1: Periferik sinir yaralanmasında Seddon ve Sunderland sınıflaması

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

Nörotmezis	Beşinci derece	Akson kaybı Endonöral tüpler ağır hasarlı Perinörium ağır hasarlı Epinörium ağır hasarlı	Spontan iyilik olmaz Cerrahi gereklidir Cerrahiden sonra prognoz belirlenir
------------	----------------	---	---

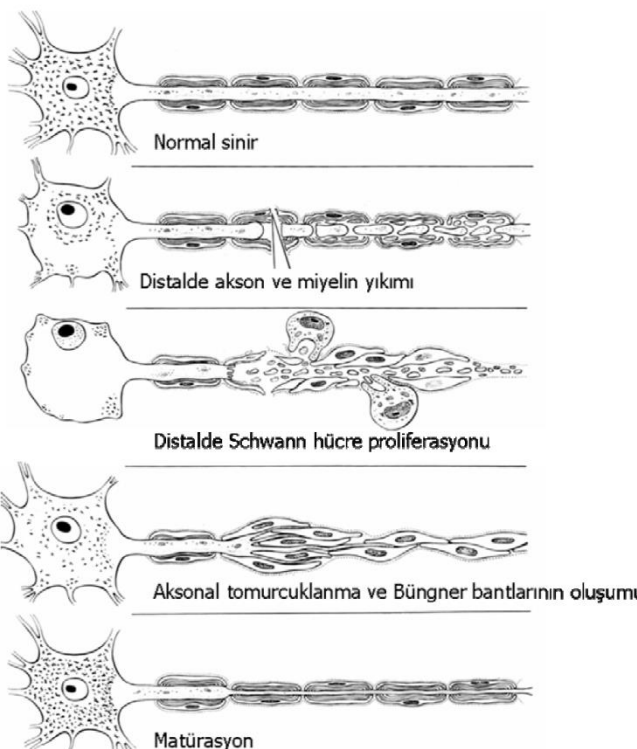
Sunderland sınıflaması(1951);

Sunderland 1951 yılında periferik sinir yaralanmaları için Seddon sınıflamasının bir modifikasyonu şeklinde olan 5 dereceli yeni bir sınıflama tanımlamıştır (17).

1. Birinci derecede olan hasar Seddon sınıflamasında nöropraksi ile eş değerdir.
2. İkinci derecede olan hasar aksonotmezis ile eş değerdir.
3. Üçüncü derecede olan sinir hasarında aksonlarda bozulma ve parsiyel endonörium hasarı olup Seddon sınıflamasında aksonotmezis ile nörotmezis arasında yer alır. Akson distalinde wallerian dejenerasyon izlenir. Endonörium ve schwann hücre kılıfının hasarlı olması sebebiyle iyileşme tam olarak gerçekleşmez. Rejenerasyon sırasında nöroma gelişimi veya aksonların yanlış yönelimi ile karşılaşılabilir. Bu tip hasardaki fonksiyonel iyileşme tam olmayabilir.
4. Dördüncü derece sinir hasarında epinörium hariç sinirin diğer tüm yapıları hasarlanmıştır. Periferik sinirin dışardan görünümü normal olsada akson ve diğer bağ dokuların hasarına bağlı fibrozis nedeniyle rejenerasyon engellenmiştir ve bu nöroma gelişimine neden olur. Spontan iyileşme nadir görülür. Cerrahi olarak hasarlı bölgenin rezeksiyonu sonrası sinir uçları arasında tamir önerilir.
5. Beşinci derece sinir hasarında sinirin tam kat devamlılığın bozulması görülür.

Altıncı derece hasar yakın zamanda tanımlanmış olup miks tip yaralanmadır. Bu daha önce tanımlanan yaralanmaların kombine halidir (18).

SİNİR DEJENERASYONU VE REJENERASYONU;



Periferik sinirlerde aksonal hasar sonucunda hücrenin üç bölgesinde değişiklik meydana gelmektedir. Bunlar yaralanan aksonun distali, proksimali ve hücre gövdesinde olan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerdir.

Şekil 4: Sinir dejenerasyon ve rejenerasyonu. (Lundborg G. The nerve trunk. Nerve injury and repair. Churchill Livingstone, New York, s: 151, 1988).

Bir sinir aksonunun kesilmesi veya hasarlanması halinde aksonun distal ucu ,hücre gövdesinden gelen yapısal proteinler ve nörotrofik maddeleri alamayacağı için dejenere olmaya başlar. Distal uçtaki bu meydana gelen değişimlere wallerian dejenerasyon adı verilir. Aksonal dejenerasyon miyelin yıkımı ve destek glial hücre proliferasyondan oluşur. Akson ne kadar distalde hasarlanırsa wallerian dejenerasyon o kadar erken gelişir. Schwann hücreleri yaralanma sonrası ilk 24 saatte aktive olarak hızla çoğalırlar. Dejenerasyonda kilit rol oynayan schwann hücrelerinin ilk görevi dejenere olan akson ve miyelinlerin temizlenmesi ve bunların makrofajlara geçişine yardım etmektir. Miyelin , schwann hücreleri ve makrofajlar tarafından yok edilir. Aksonal devamlılığın yok olması ile distalde schwann hücreleri proliferere olur ve sütunlar oluştururlar (büngner bandı) (19). 3. günde schwann hücre proliferasyonu pik yapar ve 2.haftada giderek azalır (20). Ayrıca distal segmentte kollajen miktarı giderek artar ve endonöral tüp boyutu küçülür. Bu değişikliklerin büyük kısmı ilk birkaç hafta içinde görülür ancak ortamın tamamen temizlenmesi birkaç ayı bulur.

Periferik sinir yaralanmasında proksimal bölümde, yaralanma bölgesinin hücre gövdesine yakınlığı ve yaralanmanın şiddetine göre hasar meydana gelmektedir. Proksimal hasarlar daha fazla santral nöron kaybına yol açmaktadır. Schwann hücreleri yaralanma bölgesinin proksimali boyunca azalırlar, aksonlar ve miyelin kılıflarının çapları da belirgin oranda azalır. Bu proksimal hücre azalması ve akson çaplarının azalması özellikle fonksiyonel bağlantının koptuğu son organla yeniden bağlantının kurulamadığı durumlarda meydana gelir. Buna bağlı olarak sinir iletim hızı azalır. Rejenerasyon sırasında aksonal çapta artma olur ancak hiçbir zaman hasarlanma öncesi boyutlarına ulaşamaz. Akson çapındaki artış hücre gövdesindeki iyileşmeye, bu iyileşmede fonksiyonel periferik bağlantıya bağlıdır (21).

Aksonun hasarlanmasından sonra hücre gövdesinde de birtakım değişiklikler meydana gelir. Hasarlanma sonucu nöron yeni yapısal proteinler yaparak aksonu onarmaya çalışır. Hücre gövdesinin hacmi artar ve çekirdek periferik doğru yer değiştirir. Hücrenin periferine nissl granüllerinin göçü olur,endoplazmik retinakulum pürüklü bir yapıya dönerek daha sonra parçalanıp yayılır.hücre gövdesinde meydana gelen bu olaylara kromatolizis denir.

Sinir rejenerasyonunun doğru bir şekilde gerçekleşmesi için proksimal ve distal sinir uçları arasındaki kimyasal ve hücresel reaksiyonlar çok önemlidir. Schwann hücreleri rejenerasyonda önemli bir role sahiptir. Hasarlanma sonucu schwann hücre proliferasyonu meydana gelir ve “Büngner bantları” adı verilen longitudinal dizilimler gösterirler.

Tomurcuklar B ngler bantlarını dorultusunda distaldeki hedeflerine doğru uzanırlar. Schwann hücreleri köprü görevi g r rl r. Ayrıca akson çevresindeki miyelin kılıf yapımı ve akson rejenerasyonu için gerekli ekstraselüler protein salınımından sorumludur (19).

Rejenerasyon sırasında kemotaksis ve nörotrofik faktörler önemli rol almaktadır. N rotropizmden sorumlu olan faktörler, schwann hücreleri tarafından sentezlenen hücresel adezyon molekülleri (CAM) olarak adlandırılan moleküllerdir. Bunlardan en önemlileri L1, N-CAM (nöral hücre adezyon molekülü), N-caderin ve Po proteinidir. Aynı zamanda “nterleukin-1” (IL-1)  reterek rejenerasyon için gerekli olan “Nerve Growth Factor”(NGF), “ns lin- Like Growth Factor” (ILGF) gibi nörotrofik faktörlerin salınması için stimulus yaratırlar.

PERİFERİK SİNİR CERRAHİSİ;

Periferik sinir hasarında cerrahi zamanlama önemlidir. Miyelin dokusunun yenilenmesi 8-12 haftada tamamlanır. Bu süre içersinde düzelme olmaması akson hasarını gösterir. Denervasyon sonrasında geri dönüşümsüz kas atrofisi 12-18 ay arasında gelişir ve schwann hücreleri ve endonöral tüplerin canlı kaldıkları süre 18-24 aydır.

Periferik sinir onarımında u -uca primer onarım, eğer defekt mevcut ise otojen sinir greftleri ile onarım, otojen ven grefti kullanımı, vaskülarize sinir greftleri ile onarım, sentetik tüplerin kullanımı, u  yan anastomozlar gibi birçok teknik tanımlanmıştır.

Periferal sinir hasarlarında primer onarım istenen ideal rekonstrüksiyon yöntemidir ve uzun dönem sonunda iyi bir fonksiyonel sonuç sağlar (6,22,23).

Primer onarımın mümkün olmadığı büyük defektlerde mikrocerrahi yöntemlerle sinir otogreftleri ile onarım, standart tedavi yaklaşımıdır (6,19,24,25).

Bununla birlikte otogreftlerin; donör alan morbiditesi nedeniyle bazı dezavantajları mevcuttur (6, 26, 27, 7). Skar oluşumu, multipl cerrahi gereksinimi, fonksiyon kaybı ve nöroma formasyonu, greft elde edilmesinde güçlük, var olan hastalığın yayılımını arttırması riski, sekonder deformite oluşumu, doku yapı ve boyutunda farklılıklar ya da ekstremitenin distal ucunda soğuk intoleransı gelişmesi gibi dezavantajlar nedeniyle pek tercih edilmezler (24, 25, 28). Bu nedenle periferik sinir onarımlarında kan damarı, kas dokusu, t p membran ve diğer doğal biyolojik aktif materyaller kullanılmaya ba lanmı tır (19,27,29).

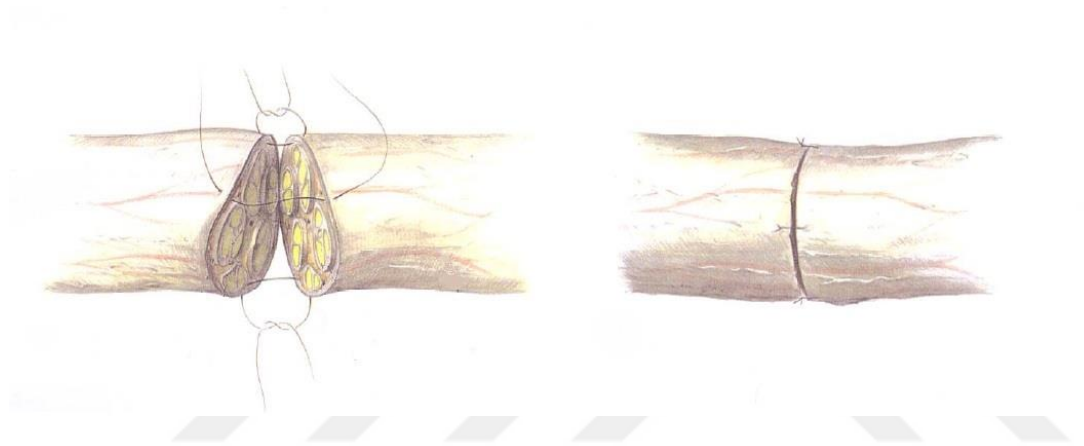
PRİMER ONARIM;

Hasarlı sinir uçlarının primer yakla tırılarak u -uca tamir edilmesidir. Mümkün olan durumlarda en iyi tamir seçeneğidir. Sinir tamirindeki en önemli noktalardan birisi onarım sırasında sinir dokusu üzerinde gerim olu mamasıdır. Gerim oluşması durumunda skar dokusu oluşmakta ve rejenerasyonu olumsuz etkilemektedir (30, 31).

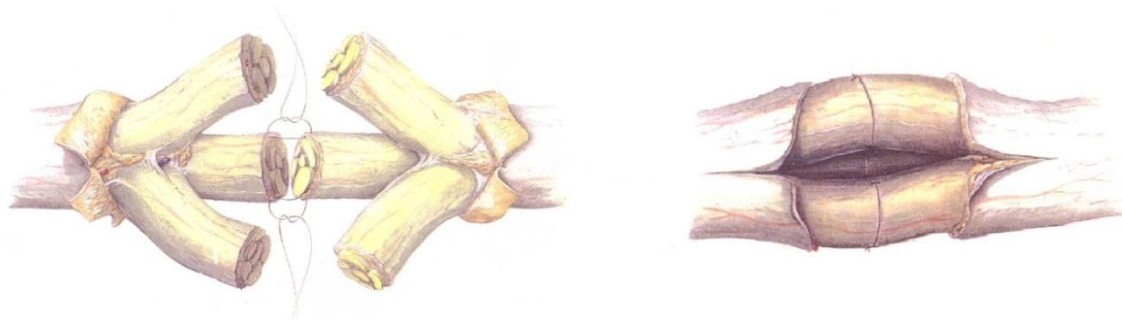
Primer u -uca periferik sinir onarımı teknik olarak iki şekilde yapılabilir. Oligofasik ler veya monofasik ler sinirlerde epinöral teknikle onarım yapılmalıdır. Epinöral teknikte, proksimal ve distal sinir uçları  evre yumuşak dokulardan serbestle tirilir. Epinöral damarlar yada uygun

çaptaki fasiküller gibi anatomik işaretler dikkate alınıp karşılıklı getirilir. Epinörium hafifçe evert edilerek önce 180° aralıkla sütürlenir ardından bu iki sütür arasına sütürler konulur.

Bir diğer teknik olan fasiküler onarım ise polifasiküler sinirlerde tercih edilmelidir. Fasiküler onarımda fasiküllerin tek tek yada gruplar halinde anastomozudur. Bu tekniğin avantajı ise proksimal fasikülün kendi distal fasikülüne doğrudan tamir imkanı sağlar. Tamir sırasında sinir anatomisine dikkat edilerek doğru fasiküler anastomoz sağlanmalıdır. Fasiküller arasındaki epinöral doku çevresel 5-10 mm çıkartılmalı ve fasikül grubu çevresindeki perinörium tabakası karşılıklı sütüre edilmelidir (31). Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar sonucunda; epinöral, perinöral veya grup fasiküler onarım yöntemlerinin birbirlerine bariz üstünlüğü olmadığı gösterilmiştir (22, 32).



Şekil 5: Epinöral onarım (Pechlaner S, Hussl H, Kerschbaumer F, Poisel S. Atlas of Hand Surgery, 1st ed., Stuttgart-New York, s:77, 2000)



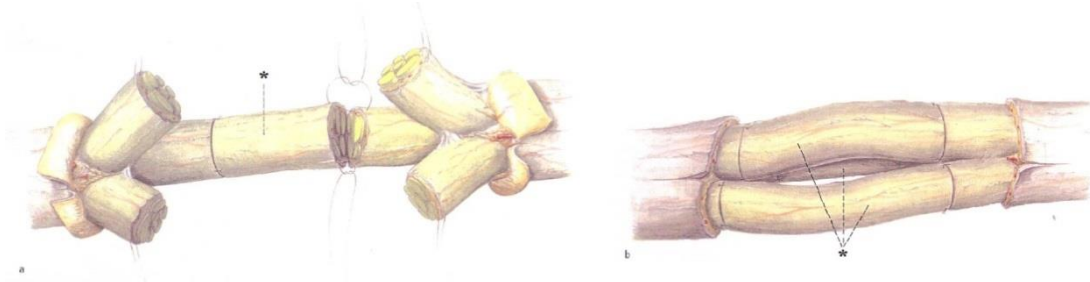
Şekil 6: Grup fasiküler onarım (Pechlaner S, Hussl H, Kerschbaumer F, Poisel S. Atlas of Hand Surgery, 1st ed., Stuttgart-New York, s:78, 2000).

GREFT İLE ONARIM;

Sinir greftlemesi ilk olarak Philipeaux ve Vulpian tarafından köpekte hypoglossal sinirdeki 2 cm'lik defektin lingual sinirden alınan greft ile onarılmasıdır. Klinikte ise 1888'de Mayo-Robinson ilk kez sinir greftlemesini kullanmışlardır (33).

Periferik sinir hasarının geç dönem tamirlerinde ortaya çıkan sinir defektlerinde ve primer onarım halinde gerilme oluşacağı durumlarda, nöroma eksizyonu sonucu oluşan defektlerde, tümör cerrahisi sonrası meydana gelen sinir defektlerinde sinir grefti kullanılması gerekebilmektedir.

Her ne kadar sinir dokusu içermeyen biyouyumlu sentetik maddeler veya doku tüpleri ile sinir allogreftleri, otojen sinir greftleri yerine kullanılmış olsa da bunlar deneysel aşamadır ve klinik başarıları hala sınırlıdır. Sinir otogreftleri bu nedenle halen altın standart yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (34, 35, 36). Günümüzde Millesi ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan interfasiküler greftleme yöntemi (Şekil7); sinir greftleme cerrahisinde sıklıkla kullanılmaktadır (37).



Şekil 7: İnterfasiküler sinir greftleme. (a) Defekt olan bir grup fasikülün sinir grefti ile rekonstrükte edilmesi. Koaptasyon hatlarının gergin olmayan dikişler ile sabitlenmesi. (b) Tüm sinir fasikülleri onarıldıktan sonraki görünüm. (*) Sinir greftleri. (Pechlaner S, Hussl H, Kerschbaumer F, Poisel S. Atlas of Hand Surgery, 1st ed., Stuttgart-New York, s:77, 2000)

Sinir greftleri distal sinir ucu gibi davranır. Bir süre sonra sinir greftinde wallerian dejenerasyon olur ve geriye aksonal rejenerasyon için gerekli bağ doku iskeleti kalır. Graft içerisindeki aksonlar dejenere olur ancak schwann hücrelerinin bazı greftlerde yaşayabildiği gösterilmiştir. Sinir greftinin vaskülarizasyonu postoperatif üçüncü günde başlar. Erken dönemde proksimal ve distal anastomoz bölgesinden beslenirken geç dönemde diffüzyon yoluyla çevre dokulardan da beslenmeye başlar.

Periferik sinir defektlerinde greftle tamir için otogreftler, allogreftler, sentetik greftler, biyolojik greftler kullanılmaktadır.

Otogreft kullanımı;

Periferik sinir defektlerinde ilk tercih edilen yöntem sinir otogrefti kullanımıdır. Geçmişten günümüze kadar venler, arterler, kaslar, tendonlar otogreft olarak kullanılmıştır (38, 38, 40, 41,42). Günümüzde sinir defektlerinde altın standart tedavi yöntemi sinir otogrefti kullanımıdır (6, 43). Deneysel olarak motor sinir kullanımı sonucu rejenerasyonun daha iyi olduğu gösterilmesine rağmen fonksiyonel kayıp yaratmadan motor sinir grefti elde etmek mümkün değildir (44). Bu sebeple duysal sinir grefti kullanımı önerilmektedir. Sınırlı sayıda verici greft sahası vardır. Kutanöz sinir greft donör alanları; sural sinir, safen sinir,

lateral femoral kutanöz sinir, medial antebrakial kutanöz sinir, medial brakial kutanöz sinir, lateral antebrakial kutanöz sinir, dorsal antebrakial kutanöz sinir, süperfisiyel radial sinir, servikal pleksusun kutanöz dalları, interkostal sinirlerdir (45). Tüm bu otojen donör sinirler Wallerian dejenerasyona gider fakat geriye aksonal rejenerasyon için gerekli bağ dokusu iskeletini bırakır, greftlerin damarlanması çevredeki Schwann hücrelerinin anjiyogenezi fibroblast büyüme faktörü ve nörol büyüme faktörü desteği ile meydana gelir.

Otolog sinir grefti kullanılmasının amacı, bazal lamina ile beraber Schwann hücreleri içeren bir tüp geçit sağlamasıdır. Schwann hücrelerini içeren taze sinir greftleri sadece bazal lamina içeren greftlerden aksonal rejenerasyon açısından daha başarılıdır. Bu da Schwann hücrelerinin nörotrofik faktörleri sentezleme yeteneği ile kaynaklanmaktadır (46,47).

Sinir greftlemede önemli olan faktörlerden biri de greft kalınlığıdır. Neovaskülarizasyon oluncaya kadar Schwann hücrelerinin diffüzyonla besleneceği yüzey alanına sahip olması gerekir. Bu nedenle trunkal greftlerde santral nekroz meydana gelebilir. Ayrıca sinir grefti uygulamasında greft gergin suture edilmemeli, greft uzunluğu defektin %15 oranında uzun olmalıdır.

Sinirdeki defekt büyük ise ya da kötü vaskülarize alıcı yatağa greft konması gerekiyorsa vaskülarize sinir greftleri tercih edilir. Vaskülarize ulnar sinir ve vaskülarize sural sinir greftleri bu amaçla kullanılabilecek greftlerdir (48, 49).

Sinir otogrefti ile tamir yönteminin en önemli dezavantajı donör saha morbititesidir. Donör sahada fonksiyon kaybı, his kusuru, ağrılı nöroma, skar izi gelişmesi görülebilmektedir (43, 7). Özellikle majör sinir defektlerinde ise bu defektli alanın boyutunda vücudun başka bölgesinden otogreft amacıyla sinir temini mümkün değildir.

Sinir Tüpleri;

Sinir otogrefti kullanımı donör saha morbiditesine neden olmaktadır. Bu yüzden sinir otogreftlerine alternatif olarak ven greftleri amniyon tüpleri gibi diğer otojen tüpler silikon ve poliglikolik tüpler gibi alloplastik tüpler ve doku mühendisliği ürünü olan matriks, çatı ve sitokin içeren ürünler denenmiştir.

Ven greftleri otojen olmanın avantajına sahip olsalar da donör saha morbiditesini taşımaktadırlar. 3cm ve daha kısa greftlemelerde sonuçlar sinir otogreftlemesiyle benzer olsa da daha uzun defektler ven greftiyle güvenilir şekilde kapatılamaz (50, 51).

Sentetik greftler;

Organik olmayan pekçok materyal sinir grefti olarak araştırılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın kullanılanları silikon, cam lif yapıları greftler, poliglikolik asit (PGA), poly (D,L-lactide-caprolactone) ve trimetilenkarbonat-kaprolakton dır. Grefte karşı immün reaksiyon ve toksisite gibi dezavantajları mevcuttur. Yabancı cisim reaksiyonuna ve artmış inflamatuvar yanıtı yol açarak fibrozis ile sinir rejenerasyonunu engelleyebildikleri gösterilmiştir.

Konduite kullanımı;

Periferik sinir tamiri için kullanılan sinir, ven, arter gibi otojen kullanılan greftlerin tümünde belli oranlarda donör saha morbiditesi ortaya çıkar (52,53,54). Sinir konduiteri otogreftlerin donör saha morbiditesinden kaçınmak için ortaya çıkan alternatif bir yöntemdir (55, 56, 57, 58, 59). Konduitler, rejenere olan aksonların çevre mikroortamından izole edilerek doğru hedef doğrultusunda ilerlemesini sağlarlar (52, 60). Konduiter lümen ile çevre ortam arasında serbest makromolekül diffüzyonunu sınırlayan yapıya sahiptirler (61, 57). Konduiter boyutları, duvar geçirgenlikleri, luminal kompartmanın yüzey özellikleri ve elektriksel geçirgenlikleri gibi özelliklerine bağlı olarak sinir rejenerasyonunu etkilemektedirler (59).

Büyük boyutlu sinir defektlerinin tedavisi ciddi zorluklar oluşturmaktadır (60, 62, 63). Sinir hasarındaki defektin uzun olması konduite kullanımını sınırlayan en önemli faktörlerden birisidir (56, 59, 63).

Allogreft kullanımı;

İlk sinir allogreftlemesi 1885 yılında Albert tarafından bildirilmiştir (65). Ampute ayak ve bacadan aldığı 3 ve 10 cm'lik sinir segmentleriyle iki ayrı olguya sinir transplantasyonu uygulamıştır. Sarkoma rezeksiyonu sonrası olgulara median ve ulnar sinir greftlemesi için uygulanmış. 1. Hastada takipte bilgi alınamamış, 2. Hastada 10 cm'lik greft nekroza gittiği bildirilmiş (65). Mackinnon, 12 yaşında bir erkek hastaya trafik kazasına sekonder tibial sinirde 20 cm'lik defekt nedeni ile kazadan 4 ay sonra 8 kez allogreft uygulamıştır. Dört ay prednizolon ve siklosporin ile immünosupresyon yapılmıştır. Sonuç olarak bazı duysal reinnervasyonun olduğu, motor reinnervasyonun olmadığı belirtilmiştir (66).

Rekonstrüksiyon için sinir grefti ihtiyacı mevcut olan allogreft kullanılan 7 hasta ile yapılan klinik çalışmada; immünsupresyonla 12 – 26 ay, 6 hastada belirgin duysal ve değişen derecelerde motor iyileşme görülmüştür. 1 hastada tedaviye rağmen greft reddi gelişmiştir (67).

İmmünsupresyon allogreftin sinir rejenerasyonu selüler ve matriks köprüsü ihtiyacının kalmadığı noktaya gelene kadar bir doku kanalı oluşturmasını sağlar ve bu noktada greftin fonksiyonel iyileşmesine etki etmeden immünsupresyon tedavisi sonlandırılabilir. İmmünsupresyon sistemik yan etkileri nedeniyle sınırlı süreyle kullanılmalıdır.

Sinir defektlerinde otolog sinir greftlerinin yerine allogreft sinir kullanımı yaygın olmayıp, halen deneysel aşamadadır (7, 66). Çünkü fonksiyonel iyileşme ve rejeksiyonun önlenmesi için immünoşüpresyon gerekmektedir. Siklosporin kullanım ile immünoşüpresyon sağlandığında Schwann hücreleri yaşar ve sinir rejenerasyonu olur. Akson periferiye ulaştıktan sonra immünoşüpresyon kesilirse allogreft Schwann hücreleri ölür ve fonksiyon kaybı meydana gelir. Ratlarda Schwann hücrelerinin artması ile fonksiyon geri döner. Ancak insanlarda Schwann hücrelerinin bölünmesi ve migrasyonu tespit edilememiştir (6). El transplantasyonuna paralel olarak allogreftte ilgi artmıştır. FK506 (tacrolimus), güçlü bir immünoşüpressan olup deneysel olarak aksonal büyümeyi artırır (68, 69).

İmmünoşüpresif tedavinin alıcı üzerindeki toksik etkisi, greftin rejenerasyonunun kötü olmasından dolayı diğer yöntemler olan greftin ön tedavisi ve greftin kaplanması metodları uygulanmıştır.

1-Greft depolanması ve kimyasal tedavisi; Çeşitli allogreft depolamaları ile elde edilen rejenerasyonun, taze allogreftlerden iyi fakat otogreftlerden kötü olduğu belirtilmiştir (70).

2-Greft ön dejenerasyonu; Genelde ön dejenere olan sinirlerde, inflamatuvar yanıtın taze sinirlere göre aynı olduğunu ve rejenerasyonunun da kötü iyileşmesiyle ortaya çıktığı belirtilmiştir (71,72).

3-Derin dondurma; Tek başına sinir allogreftlerinin -196°'de hücre kültüründe dondurulmasıyla greft hücreleri ölür ve böylece grefte lenfosit infiltrasyonu önlenmiş olur (73).

4-Liyofilizasyon (dondurup-kurutma); Greftteki hücrelerin öldürülmesi amaçlanır. İlk önce -10°'den -70°'ye kadar dondurma uygulanır, sonra kurutma olur. Mackinnon ve ark., kontrollü rat modelinde, liyofilizasyonun sinir allogreftlenmesinde antijeniteyi otogreft seviyesine indirdiğini belirtmiştir (74). Bununla birlikte sonuçlar otogreftler kadar iyi değil ancak taze allogreftlerden iyi olduğu belirtilmiş. Liyofilize ve iradiye sinirlerin başarısının sınırlı olduğundan bahsedilmiştir (75).

5-Dondurma ve İrradiyasyon; Mackinnon ve ark., düşük doz iradyasyonun, allogreft antijenitesini otogreft seviyesine indirdiğini, fakat rejenerasyonun daha kötü olduğunu bildirmişler. İyi kontrollü, dondurma ve iradyasyon uygulanan allogreftlerde, taze sinir allogreftlerine göre daha iyi, fakat otogreftlerden bariz olarak daha kötü sonuç alındığı belirtilmiştir (72, 76).

6-Dondurup Isıtma (Freeze-Thawing (FT)); -70°'ye kadar dondurma, sonra 37°'ye kadar ısıtma tekrarlayan kereler yaptıktan sonra, greft tamamen hücresiz kalır. Hücre bazal laminası sağlam kalır. Bazı çalışmalarda ön dejenere ve FT uygulanmış sinir allogreftlerinde az veya hiç histolojik rejeksiyon saptanmamış ve aksonal rejenerasyonun kolaylaştığı gösterilmiştir (73, 77).

Seçilmiş hastalarda greft ihtiyacının otojen olarak karşılanamadığı durumlarda allogreft immünoşüpresyon kullanımının dezavantajları göz önünde bulundurularak kullanılabilmektedir.

ONKOLOJİK STERİLİZASYON;

Malign kemik tümörleri, kemiğe invaze olmuş yumuşak doku sarkomları ve bening agresif kemik tümörleri, cerrahi tedavileri sonrasında ortaya çıkan kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan yöntemlerden biri de; çıkartılan tümörlü kemiğin kullanılması işlemidir. Bu yöntemde tümörle kontamine olan kemiğin vücut dışında (extrakorporal) tümör hücrelerinden arındırılarak (devitalizasyon) tekrar alındığı bölgeye yerleştirilerek tespit edilmesidir (78, 79, 80). Bu biyolojik rekonstrüksiyon yöntemi onkolojik açıdan güvenli bir yöntem olmakla birlikte hastanın kendi dokusu olması sebebiyle allojenik reaksiyon oluşturma ve bulaşıcı hastalık taşıma riski de bulunmamaktadır. Bu yöntemde, kemik alındığı bölgeye reimplante edileceği için defektli alana fiziksel uyumun tam olması, tendon ve bağların origo ve insersiyolarının kemik üzerinde korunarak tendon ve bağ tamiri için kolaylık sağlaması gibi avantajlar da mevcuttur (5, 81, 82, 83). Ayrıca normal dokuların feda edilmemesi, donör ve kemik bankası gerektirmemesi bir diğer avantajıdır.

Bu yöntemde öncelikli olarak temel tümör cerrahisi kuralları ile tümör dokusu geniş eksizyon şeklinde çıkartılır. Çıkartılan tümör dokusu başka bir steril masaya alınır. Tümörlü kemik dokusunun üzerindeki yumuşak dokular ve kemik medullası temizlenir, varsa tendon ve ligamentler tekrar rekonstrüksiyon için kemik üzerinde bırakılabilir. Bu işlem sonrası tümörle kontamine kemik onkolojik sterilizasyon yöntemlerinden biri uygulanarak alındığı bölgeye yerleştirilir ve tespit edilir (78, 84).

Tümörle kontamine kemiklerin, vücut dışında tümör hücrelerinden arındırılması amacıyla literatürde belirtilmiş 6 adet onkolojik sterilizasyon yöntemi mevcuttur.

- 1) İrradiyasyon (78, 87, 88)
- 2) Sıvı nitrojen (84, 93, 94)
- 3) Otoklavizasyon (89, 90)
- 4) Pastörize etme (91, 92)
- 5) Kaynatma (95)
- 6) Alkolde bekletme (96)

İRRADİYASYON;

Kas iskelet sistemi tümörlerinde rezeksiyon sonrası kemiğin ekstrakorporeal olarak vücut dışında radyoterapi ile sterilizasyon sonrası reimplante edilerek kullanımı ilk 1998 yılında Uyttendaele ve ark. tarafından tarif edilmiştir (80).

Bu yöntemde tümörlü dokunun geniş sınırlarla rezeksiyonu sonrası ekstraosseoz ve intramedüller kemik dokusu mümkün olduğunca temizlenir. Tendon ve bağ insersiyoları

rekonstrüksiyon amacıyla kullanılmak üzere kemik doku üzerinde bırakılabilir. Sonrasın kemik steril bir şekilde sarılıp paketlenir. Kemiğe irradiasyon işlemi Linac cihazı yada kan ışınlama cihazı kullanılarak yapılabilir (78, 81). Işınlama işlemi tek fraksiyon bolus olarak onkolojik açıdan güvenli olan 50 Gy -300 Gy irradiasyon dozlarında gerçekleştirilebilir (78,79). Işınlama sonrası kemik anatomik olarak reimplante edilir ve çeşitli yöntemlerle



osteosentez sağlanır.

Şekil 8; sağ femur distalde osteosarkom nedeniyle geniş rezeksiyon uygulanan olgu, tümörle kontamine kemik ekstrakorporal radyoterapi ile onkolojik devitalizasyon işlemi sonrası rekonstrüksiyon amaçlı kullanımına ait görüntüler.

SIVI NİTROJEN;

Sıvı nitrojenin ilk olarak kriyocerrahi kullanımı Cooper tarafından 1962 yılında bildirilmiştir (85). Sonraki dönemde Gage ve ark.'ları tarafından oral kavite tümörlerinde kullanımı ve sıvı nitrojenin kemikler üzerine olan etkileri araştırılarak bildirildi (86).

1964 yılında Marcove ve ark.'ları Memorial Sloan-Kettering kanser merkezinde ilk olarak akciğer kanseri olan bir hastanın humerus metastazında palyatif tedavi amacıyla sıvı nitrojen ile kriyocerrahisi kullanımı bildirildi (97, 98).

Kriyocerrahide sıvı nitrojenin lokal güçlü etkisinden yararlanılarak hücre nekrozu oluşturulmakta. Bu hücre nekrozunda ana mekanizma hücre içi buz kristalleri oluşumu ve hücre membran hasarı şeklindedir. Bir diğer mekanizma ise elektrolit değişimi, hücre protein denatürasyonu ve mikrovasküler hasardır (99, 100).

Sıvı nitrojen -196 C' de bulunmaktadır. Kemik tümörleri tedavisinde etkilidir çünkü kemik nekrozu -21 C 'nin altında oluşmaktadır (86, 101). Sıvı nitrojene bağlı en dramatik etki kemik iliğinde meydana gelmekte, geniş nekroz alanı ve minimal inflamasyon şeklindedir ve ilerleyici fibrozis görülür (86, 102).

Sıvı nitrojenin lokal güçlü etkisinden dolayı dikkatli kullanılmadığında vücut içersinde uygulamada kemik etrafında ciddi sorunlara yolaçmaktaydı. Uygulanan kemik yakınında

kıkırdak hasarı, yumuşak doku hasarı, cilt nekrozu, nöropraksi, enfeksiyon gelişimi ve sekonder kırıklar meydana gelebilmekteydi (97, 103, 104). Bu etkilerinden dolayı geçmişte az kullanılmaktaydı. Sonraki dönemde bu yan etkilere karşı önlemler alınarak cerrahi tekniklerin gelişmesiyle kullanımı yaygınlaştı. Ortopedik cerrahide benign agresif ve düşük dereceli malign tümörlerde küratif tedavi sağladığı görüldü. Ayrıca lokal tümör kontrolü ve metastatik kemik tümörleri için semptomatik tedavi sağladı (105, 106).

Sıvı nitrojen ilk primer osteosarkom tedavisinde 1984 yılında Marcove ve ark.'ları tarafından tekrarlayan dondurma ve çözünme şeklinde küretaj sonrası uygulandı (107).

Malign kas iskelet sistemi tümörlerinin geniş eksizyonla En-blok şeklinde çıkartılarak vücut dışında sıvı nitrojenle kemiğin dondurulup bu kemiğin tekrar kullanılması ilk defa 1999 yılında Tsuchia ve ark. tarafından yapılmıştır ve 2005 yılında da sonuçlarını yayınlamışlardır (94). Bu yayında, tümörlü dokunun geniş rezeksiyon sonrası vücut dışına alınarak kemiğin yumuşak dokulardan ve olabildiğince tümör dokusundan temizliği sonrası kemikte fiksasyon için gerekli hazırlıkları yaptıklarını bildirmişlerdir. Sonrasında bu kemiği 20 dakika boyunca sıvı nitrojende bekleterek dondurma işlemi yapılmış, sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekleterek çözünme ve en son 10 dakika serum fizyolojikte bekleterek çözünme sağlandığı belirtilmiştir. Bu işlem sonrası kemik plak, intramedüller çivi veya kompozit olarak endoprotezlerle kombine edilip rekonstrüksiyon sağlanmıştır. Olgu serilerinde 2 olguda yumuşak dokuda rekürrens görülmüş ve bunlar yetersiz stellit lezyon cerrahisine bağlı olduğu düşünülmüş. Ayrıca %92.8 kaynama elde etmişler, kaynama ortalama 6.7 ayda gerçekleşmiştir. Bu çalışmada sıvı nitrojen ile biyolojik rekonstrüksiyon yönteminin basit ve etkili olduğu belirtilmiştir (94).

ÇALIŞMANIN AMACI

İskelet sistemi malign kemik tümörlerinde ve yumuşak doku sarkomlarında tümörle kontamine kemik, tendon, vasküler yapılar ve sinir dokuları geniş rezeksiyon şeklinde çıkartılmaktadır. Oluşan kemik ve tendon defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan yöntemlerden biri de bu yapıların ekstrakorporal (vücut dışında) tümör hücrelerinden arındırılıp (devitalizasyon, onkolojik sterilizasyon) tekrar alındığı yere tespit edilmesidir (reimplantasyon). Bu uygulama biyolojik rekonstrüksiyon yöntemleri arasında onkolojik açıdan güvenli olduğu gibi; teknik açıdan kolay olması, fiziksel uyumun tam olması, bulaşıcı hastalık riski olmaması, immünolojik yanıt oluşturmaması, normal dokuların feda edilmemesi, donör ve allogreft bankası gerektirmemesi gibi avantajlara sahiptir. Bu uygulama kemik ve tendon defektleri için klinik olarak kullanılmakla birlikte henüz sinir dokusu için kullanılmamaktadır. İskelet sistemi tümör cerrahisinde oluşan sinir defektlerinde rekonstrüksiyon yöntemi olarak sinir otogrefti kullanılmaktadır. Ancak sinir otogrefti donör saha morbiditesisi ve büyük sinir defektlerine uygun otogreft sinir dokusu alınamaması sebebiyle her hastada kullanılamamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; kemik ve tendon defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan bu onkolojik sterilizasyon yöntemleriyle hazırlanmış otogreft yönteminin, sinir defektleri içinde kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymaktır.

Bu çalışmada en sık kullanılan ekstrakorporal devitalizasyon (onkolojik sterilizasyon) yöntemleri olan ekstrakorporal ışınlama ve sıvı nitrojen ile hazırlanmış sıçan siyatik sinir otogreftinin iyileşmesi değerlendirilecektir. Sinir iyileşmesinde iyi sonuç elde edilirse bu yöntem iskelet sistemi tümör cerrahisinde ortaya çıkan sinir defektlerinde kullanılabilecektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya ait deney protokolü Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 25.02.2015 tarihinde 2015-021 karar numarası ile onaylandı.

Çalışmanın tüm aşamaları Ege Üniversitesi ARGEFAR Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapılmıştır.

Bu çalışmada ağırlıkları 250 ile 300 gr. arasında değişen 48 adet dişi Sprague-Dawley rat kullanıldı. Deney hayvanları deney süresince standart pelet yemi ve su ile beslenerek, metabolik kafeslerde standart laboratuvar koşullarında (gece/gündüz=12/12 saat, sıcaklık 21 ± 2 °C, nem oranı %50 düzeyinde, ad libitum su ve yem verilerek) takip edildi. Analjezileri için işlemden 25 dk önce intraperitoneal 28 G insülin iğnesi ile 200 mg/kg parasetamol verildi. Ayrıca parasetamol 500 mg 500 mL hayvanın suyuna eklendi.



Şekil 9: Ege Üniversitesi ARGEFAR Araştırma ve Uygulama Merkezi

Tüm sıçanlara cerrahi işlem ARGEFAR Araştırma ve Uygulama Merkezi Cerrahi Salonunda gerçekleştirildi. Tüm sıçanların cerrahi müdahalesi aynı cerrah tarafından standart mikrocerrahi tekniklere sadık kalınarak operasyon mikroskobu altında gerçekleştirildi. Tüm sıçanların sağ arka ekstremite siyatik sinirleri cerrahi olarak kullanıldı, sol arka ekstremite sinirleri kontrol olarak korundu.



Şekil 10: Mikrocerrahi işlemlerin mikroskopi eşliğinde yapılması.

DENEY

Çalışma grupları;

Cerrahi uygulanan 3 grup; her grupta 16 adet sıçan olmak üzere toplam 48 adet sıçandan oluşmaktaydı. Erken dönem sonuçları değerlendirmek amacıyla her gruptan deneklerin yarısı (24 adet) 12 hafta takip edilerek sakrifiye edildi. Geç dönem sonuçları değerlendirmek amacıyla her gruptan deneklerin kalan yarısı (24 adet) 16 haftalık takip sonrası sakrifiye edildi.

	12. hf. erken dönem değerlendirme	16. hf. geç dönem değerlendirme	
Grup A (otograft)	8 adet	8 adet	16 adet
Grup B (radyoterapi)	8 adet	8 adet	16 adet
Grup C (sıvı nitrojen)	8 adet	8 adet	16 adet
			TOPLAM: 48 adet
Takip Süresi	12 hafta	16 hafta	

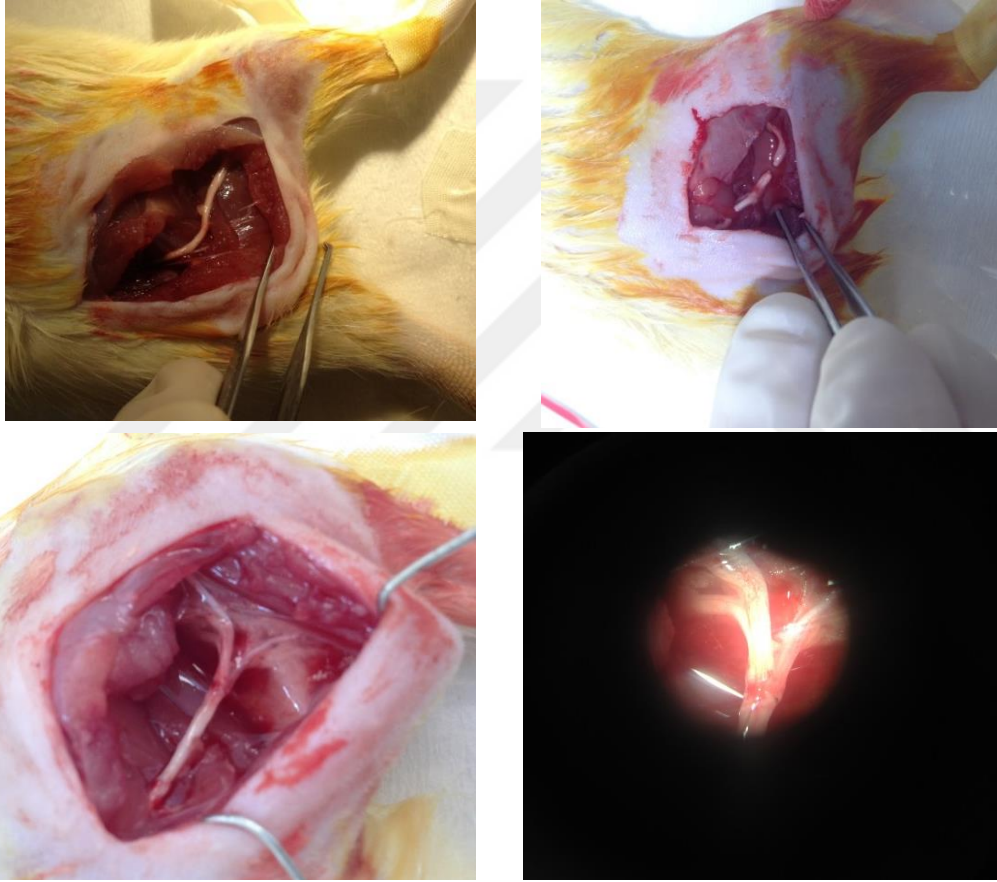
Tablo 2: Çalışma grupları ve grupların denek sayısını gösteren tablo.

Grup A (otogreft); Siyatik sinirden 10 mm uzunluğunda bölüm çıkartılarak sinir grefti orijinal pozisyonunda “fresh otogreft” olarak her iki anastomoz hattına 6 adet epinöral sütür kullanılarak defekt rekonstrüksiyonunda kullanıldı.

Grup B (radyoterapi); 10 mm uzunluğundaki sinir grefti “Ekstrakorporal ışınlama” devitalizasyon işlemi sonrası orijinal pozisyonuna, defektli alana rekonstrükte edildi.

Grup C (sıvı nitrojen); 10 mm uzunluğundaki sinir grefti “sıvı nitrojenle” devitalizasyon işlemi sonrası orijinal pozisyonuna, defektli alana rekonstrükte edildi.

Cerrahi teknik;

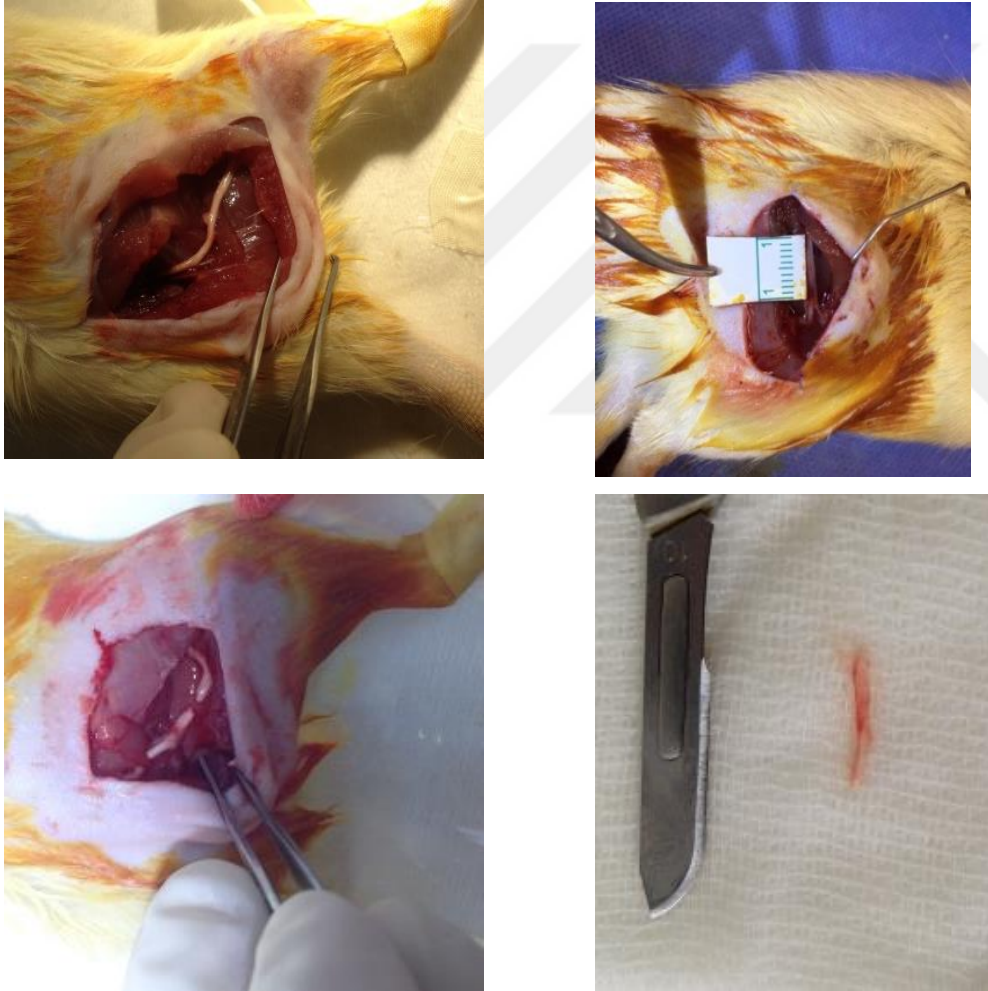


Şekil 11: I) sağ taraf siyatik sinir cerrahi diseksiyonu **II)**10mm lik siyatik sinir grefti oluşturulması **III)**greftin epinöral sutur tekniği ile anastomozu **IV)**anastomoz hattının mikroskop altındaki görüntüsü.

Tüm sıçanlara cerrahi işlem sırasında 50 mg/kg Ketamine-HCl (Alfamine®-im) ve 9 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile anestezi uygulandı. Deneklerin gluteal ve uyluk bölgeleri traş edilerek povidon iodine ile cerrahi alan temizliği yapıldı. Prone pozisyonunda ayakları tespit edildi. Sağ alt ekstremité longitudinal insizyonla girildi. Cilt ekartasyonu sonrası gluteal ve biceps femoris kas grubuna ulaşıldı. Biceps femoris kası üst sınırından,

femurdan diz eklemi seviyesine kadar künt diseksiyonla geçilerek siyatik sinir ortaya konuldu. Siyatik sinir evre yumuşak dokulardan serbestleştirildikten sonra, sinirin popliteal dallanma noktasının proksimalinden ölçüm yapılarak 10 mm lik segmenti mikromakas kullanılarak kesilip çıkartıldı. Rezeke edilen 10 mm lik sinir segmenti her bir grupta işlem sonrası alındığı bölgedeki sinir defektini onarmak için sinir otogrefti olarak kullanıldı. Sinir greftleri yine alındıkları bölgelere ters çevirme yada torsiyon uygulanmaksızın aynı pozisyonunda sütüre edildi. Mikroskop altında yapılan işlemde primer u-uca anastomoz (epinöral) sütür tekniği kullanılarak 10/0 ethilon sütür ile anastomoz bölgelerine 3'er adet sütür yerleştirildi. Yıkama sonrası kas dokusu ve cilt 5/0 R.vicrly ile kapatıldı. Yara yerleri pansumanlar ile takip edildi.

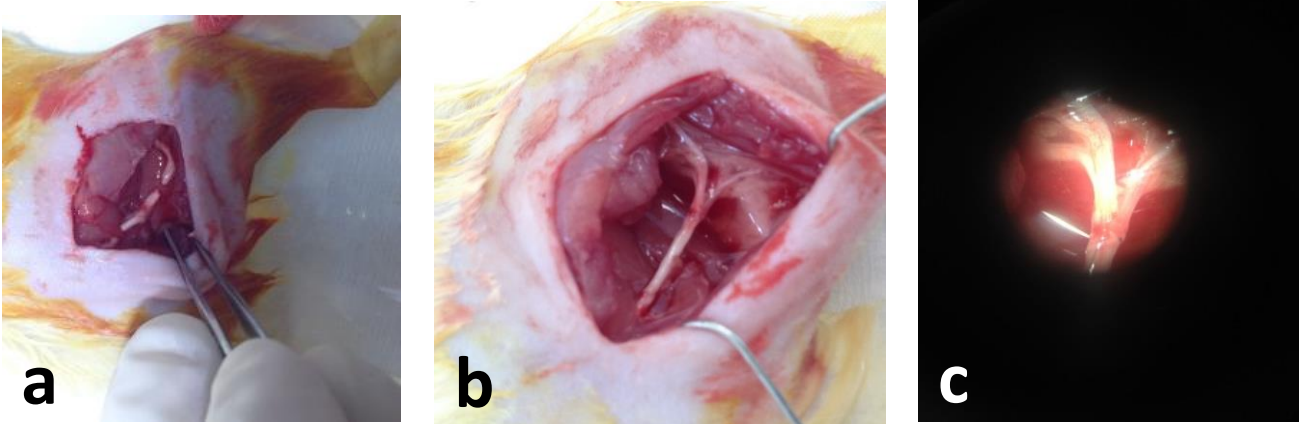
Greftlerin hazırlanması;



şekil 12: Sıçan siyatik sinirinin eksplorasyonu ve 10 mm'lik greft alınması.

Grup A (otogreft);

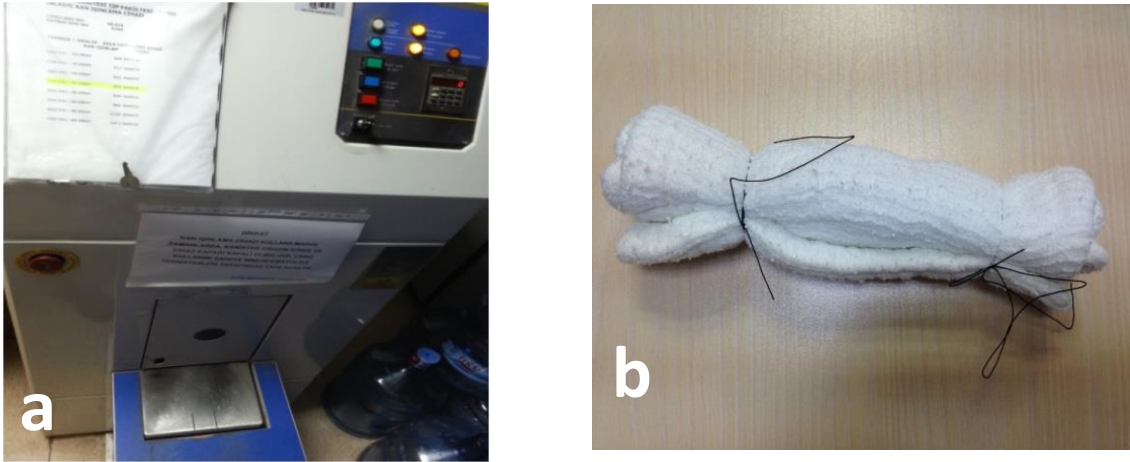
Siyatik sinirden elde edilen 10 mm lik sinir segmenti herhangi bir işleme tabii tutulmaksızın fresh sinir otogrefti şeklinde alındığı defektli alana suture edildi.



Şekil 13: Sinir defekti oluşturulması ve otogreftle onarım yapılması **a)** siyatik sinirden 10 mm'lik bölümün rezeke edilmesi **b)** rezeke edilen kısmın otogreft olarak rekonstrüksiyon için kullanımı **c)** anastomoz hattının mikroskop altındaki görünümü.

Grup B (radyoterapi);

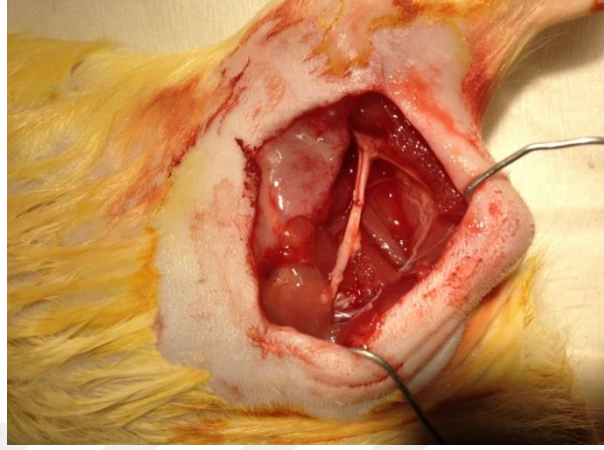
Siyatik sinirden elde edilen 10 mm lik sinir segmenti steril tampon paketine sarılarak hazırlandı. Hazırlanan paket silindirik metal bir kaba konulduktan sonra etrafındaki boş kalan kısımlar doku eşdeğer materyali (pirinç) ile doldurularak, ağzı kapatılan metal kap kan ışınlama cihazına yerleştirildi. Işınlama işlemi tek fraksiyon bolus olarak malign tümör hücrelerini öldürdüğü kanıtlanmış olan 50 Gy ekstrakorporal ışınlama yapıldı. Işınlama sonrası greft alındığı defektli alana suture edildi.



Şekil 14: Siyatik sinirden alınan 10 mm'lik sinir otogreftinin steril paketlenme sonrası kan ışınlama cihazında ekstrakorporal ışınlama ile onkolojik sterilizasyon işlemi yapılması ve sinir defekti rekonstrüksiyonu için kullanımı. **a)** Kan ışınlama cihazı. **b)** Işınlama için steril pakette hazırlanmış greft.

Grup C (sıvı nitrojen);

Siyatik sinirden elde edilen 10 mm.'lik sinir segmenti sıvı nitrojenle devitalizasyon işlemi için sıvı nitrojenle dolu kapalı bir kaba konuldu. Sinir grefti bu kapta 20 dk. bekletildikten sonra 15 dakika oda havasında bekletildi. Ayrıca 15 dakikada serum fizyolojikte bekletilerek çözünme sonrası greft alındığı defektli alana suture edildi.



Şekil

15: Siyatik sinirden alınan 10 mm.'lik sinir otogreftinin sıvı nitrojen ile onkolojik sterilizasyon işlemi sonrası sinir defekti rekonstrüksiyonu için kullanımı.

Yara kapatılması;

Her üç grupta da sinir grefti anastomozları tamamlandıktan sonra ekartörler kaldırılarak künt diseksiyonla açılan kas grubu iki adet emilebilir suturele kapatıldı. Cilt emilebilir suture ile primer kapatıldı. Batikon ile ilk hafta yara pansumanı yapıldı.



Şekil 16: Emilebilir suturelerle yaranın kapatılması.

SİNİR İYİLEŞMESİNİN TAKİBİ;

1) Fonksiyonel değerlendirme;

Siyatik sinir rejenerasyonun fonksiyonel olarak izleminde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi de eğimli tablada motor güç ölçümüdür (109).

Motor güç ölçümü: Motor güç testi için eğimli tabla kullanılmıştır. Eğimli tabla tahtadan yapılmış üzerinde 1 mm.'lik olukların bulunduğu, menteşeli bir sistemdir. Her sıçan tabla yatay konumdayken tablaya yerleştirilerek, tabla yavaşça yukarı kaldırılıp yerle olan açısı arttırıldı. Sıçanın tabla üzerinde kaymadan durabildiği maksimum tutunabilme açısı 3'er kez test edildikten sonra ortalaması alınarak kaydedilmiştir.

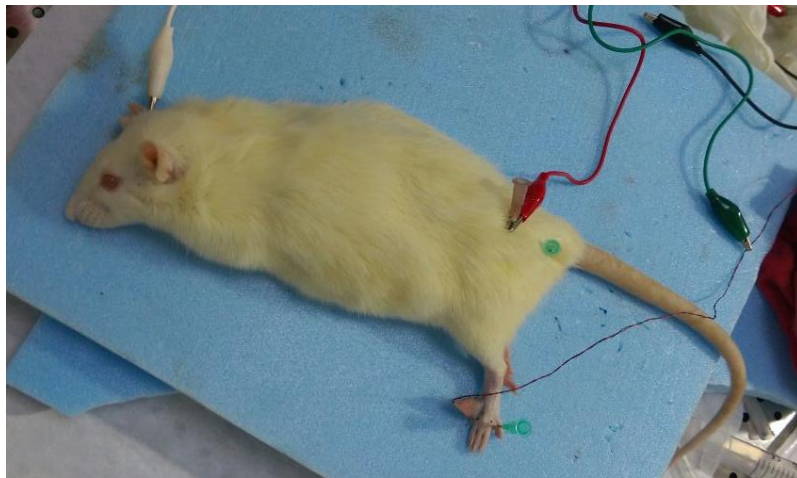


Şekil 17: Eğimli tablada deneklerin tutunabilme açısının saptanması.

2) Elektrofizyolojik değerlendirme;

EMG: EMG kaydı için Biopac MP-30 sistemi kullanılmıştır. EMG 0.5-5000 Hz aralığında, 40 kHz/sn örnekleme hızı ile, her sıçan için siyatik çentikten katod elektrodu (insülin iğnesi) ile 3'er kez 1 Hz sıklığında 0.05 msn süreli ve supramaksimal kas yanıtı oluşacak şekilde sitümulus verilerek, 20 msn süreli kayıtlar alınmıştır. EMG kayıt elektrodu 2-3. İnterosseous kas içine yerleştirilmiş ve monopolar kayıt yapılarak M yanıtı (BKAP) elde edilmiştir (110).

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

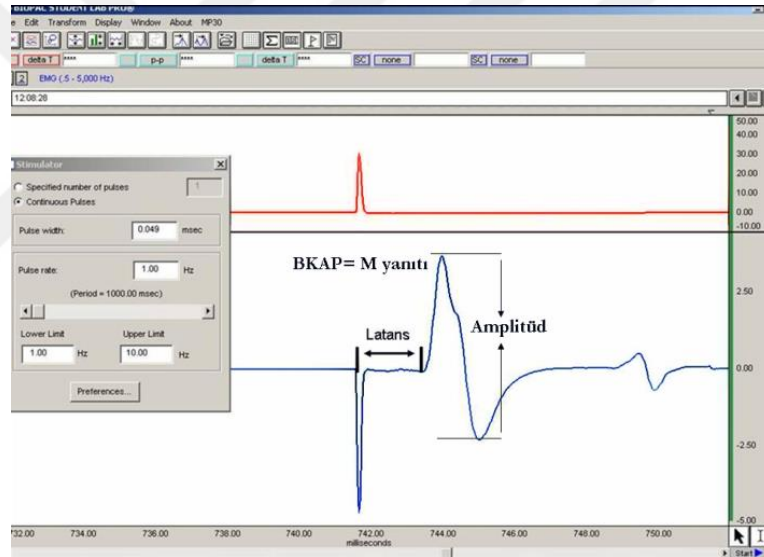


Şekil 18: Siyatik çentikte katod elektrodu, 2-3. interosseöz kas içine yerleştirilmiş monopolar kayıt elektrodu.



Şekil 19: MP30
kayıt
ve stimülatörü.

biopotansiyel
amplifikatörü



Şekil 20: EMG de M yanıtı ve distal latans süresi.

3. Histolojik değerlendirme;

Deneklerin yarısı erken dönem değerlendirme için 12.haftada, kalan diğer yarısı geç dönem değerlendirme için 16. haftada yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Aynı cerrahi yaklaşımla önce sağ taraf siyatik sinir diseksiyonu sonrası her iki anastomoz hattı dahil olacak şekilde sinir dokusu çıkartıldı. Aynı şekilde kontrol grubu olarak değerlendirme amacıyla sol taraf siyatik sinir dokuları çıkartıldı %10 formaldehit solüsyonu içine alındı.

Çalışmamızda rutin olarak genel siyatik sinir yapısını görmek için hematoksilen – eozin boyama, gelişebilecek fibrotik alanları görebilmek için masson – tricrom boyama yapılacak. Ayrıca apoptotik hücreleri saptayabilmek için TUNEL boyama ve miyelinizasyon için periferik sinirlerde miyelini sentezleyen schwann hücrelerinde eksprese olan s-100 boyama yapıldı.



Şekil 21: Sakrifikasyon sonrası deneklerin siyatik sinirlerinin greft proksimali ve distali dahil olacak şekilde histolojik değerlendirme için alınması.

3.1 Tespit Solüsyonları

% 10 'luk Nötral Tamponlu Formalin Tespit Solüsyonu (111)

Formaldehit	100cc
PBS	900cc

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) (178)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	0,813 gr
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$	4,040gr
NaCl	8,78gr
Distile su	1000cc
pH 7,2-7,4 olmalıdır.	

3.2 Işık Mikroskopik Yöntem

3.2.1 Doku Takibi ve Gömme (112)

- Parçalar % 10 formalin çözeltisi içerisinde 24 saat süreyle bekletilerek fikse edildi.
- 24 saat PBS tamponunda bekletilerek yıkandı.
- 2 saat % 80 Etanol,

- 3 saat % 95 Etanol I,
- 3 saat % 95 Etanol II,
- 2 saat % 100 Etanol I,
- 2 saat % 100 Etanol II,
- 2 saat % 100 Etanol III'de bekletilerek dehidretasyon işlemi gerçekleştirildi.
- Ksilol ile şeffaflandırma aşamasına geçildi (Ksilol I 30 dakika, Ksilol II 30 dakika).
- Şeffaflandırma aşamasını sonrası 60°C etüvde erimiş parafin içerisine alınan parçalar 1 gece bekletildi.
- Ertesi gün etüvden çıkarılıp erimiş mavi parafine gömülerek bloklandı.

3.2.2 Kesit Alma (112)

- Işık mikroskopik incelemeler için mikrotomda (Leica RM 2145) 3µ'luk kesitler alınarak 37°C su banyosunda kesitlerin açılması sağlanarak rodajlı ve polilizinli lamalar üzerine doku kesitleri alındı.
- Tüm kesitler 1 gece 37°C'lik etüvde tutularak lam üzerine yapışmaları sağlandı.
- Ksilolle parafinden uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi.
- Uygun histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar için preparatlar hazır hale getirildi.

3.2.3 Histokimyasal Boyamalar

3.2.3.1 Hematoksilen Eosin (H.E.) Boyama (113)

- Ksilol I 10 dakika
- Ksilol II 10 dakika
- Ksilol III 10 dakika
- Kuruduktan sonra alkole geçirildi.
- % 100 Alkol I 2 dakika
- % 100 Alkol II 2 dakika
- % 95 Alkol 2 dakika
- %80 Alkol 2 dakika

- Distile su 5 dakika
- Hematoksilen 2,5 dakika
- Akarsu 5 dakika
- Asit alkol (Doku pembe renk alana kadar batırıp çıkarılır.)
- Akarsu
- Amonyaklı su (Doku mor renk alana kadar batırıp çıkarıldı)
- Akarsu
- Distile su 5 dakika
- Eosin 2,5 dakika
- % 95 Alkol 2 dakika
- % 100 Alkol I 2 dakika
- % 100 Alkol II 2 dakika
- Ksilol I 10 dakika
- Ksilol II 10 dakika
- Ksilol III 10 dakika
- Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı.

Sonuçlar: Nükleus: Mavi, Sitoplazma: Pembe

3.2.3.2 Masson trikrom boyama (114);

Boya ve çözeltilerin hazırlanması

- Regaud'un hematoksileni; 1g hematoksilen, 10 ml %95'lik alkol, 10 ml gliserin 80 ml distile su karıştırılır.
- Pikrik asit; 2 hacim %95'lik alkol yaklaşık %7'lik doymuş pikrik asit, 1 hacim %95'lik alkol karıştırılır.
- Ponceau-asit fuksin; 3 g asit fuksin, 0,7 g ponceau de xyloidine, 100 ml distile su, 1 ml glacial asetik asit karıştırılır.
- Asetik anilin mavisi; %2'lik sulu asetik asit içinde doymuş anilin mavisi solüsyonu hazırlanır.
- Dokular ksilol, alkol ve su ile parafinden uzaklaştırılır.

- Önceden 45 oC'ye kadar ısıtılmış %5'lik (ferric ammonium sulphate) $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \cdot 2.12\text{H}_2\text{O}$ içinde 5 dakika mordantlanır (renk sabitleştirici).
- Çeşme suyunda yıkanır.
- Regaud'un hematoksilen solüsyonu içinde 5 dakika boyanır.
- %95'lik alkolde yıkanır. • Pikrik alkolde diferansiye edilir.
- Çeşme suyunda yıkanır.
- Ponceau-asit fuksin solüsyonunda 5 dakika boyanır.
- Distile suda yıkanır.
- Preparat 5 dakika %1'lik sulu fosfomolibdik asitte diferansiye edilir. 22
- Asetik anilin mavisi solüsyonunu dökülür, 5 dakika beklenir.
- Distile suda yıkanır.
- Preparat 5 dakika %1'lik sulu fosfomolibdik asitte tekrar bırakılır.
- %1'lik sulu asetik asitte 5 dakika bırakılır.
- Absol alkolü takip eden %95'lik alkolde dehidrate edilir, yıkanır.
- Ksilol ile şeffaflştırılır, balsam ile kapatılır.
- Nukleus siyah, stoplazma, intersellüler fibriller ve keratin vermillion kırmızı, kollejen koyu mavi, golgi aygıtı boyanmamış, kas mavi boyanır.

3.2.3.3 İmmunohistokimyasal Boyama (115)

- Kesitler, bir gece 60°C etüvde ve soğuduktan sonra 3x30 dakika ksilolde tutuldu.
- Sırasıyla %95, %80, %70 ve %60'lık etil alkolde 2'şer dk bekletildi.
- Kesitler distile su ile 10 dk yıkandı ve çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizildi.
- PBS (Phosphate Buffered Saline) solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Kullanılacak antikor için önerilen "antijen retrieval" yöntemi uygulandı.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Endojen peroksit blokajı yapıldı. (% 3 H_2O_2) (5 dakika).
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandıktan sonra kesitler üzerine Blok solüsyonu (non-immun serum) damlatılarak 1 saat beklenildi.

- Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırıldı ve uygun şekilde dilüsyonu yapılmış 50 µl primer antikor damlatıldı, kapalı nemli kutuda bir gece 4°C’de bekletildi (Primer antikor dilüsyonu: s100: 1/100) (Bioss, USA).
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatıldı, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dk oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. DAB (3,3-diaminobenzidine) solüsyonu damlatılır, 10 dk kapalı nemli kutuda bekletildi ve tekrar PBS solüsyonu ile 3x5 dk ve distile su ile yıkandı.
- Mayers’in hematoksilen ile Nükleus boyanması kontrol edilerek 5 dk boyama yapıldı.
- Distile su ile yıkandı.
- Sırasıyla % 80, % 95 ve % 100’lük etil alkolde 1’er dk bekletildi.
- Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5’er dk ksilolde şeffaflaştırıldı.
- Kapama mediumuyla lamel ile kesitler kapatıldı.

3.2.3.4 Tunel Boyama (116)

- Kesitler 1 gün önceden deparafinizasyon için Ksilole yerleştirilir.
- % 100 alkol
- % 95 alkol
- % 80 alkol
- % 1 Triton X-100’lü PBS ile yıkama (pH:7,4)
- Dokuların etrafı sınırlayıcı kalem ile çizilir
- Proteinaz K eklenir (3,9 µl proteinaz K + 35 µl distile su)
- Lamaların üzeri cover slip ile kapatılarak 15 dakika beklenir

- PBS ile yıkama 2 kez 5'er dakika
 - H₂O₂ ile yıkama (63 ml PBS + 7ml H₂O₂) 5 dakika
 - PBS ile yıkama 3 kez 1 er dakika
 - Equilibration tamponu 5 dakika
 - Equilibration tamponu lamlardan uzaklaştırılır
 - TdT enzimi eklenir (77 µl Reaksiyon tamponu + 33 µl TdT enzimi)
 - Lamların üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C etüve konulur.
 - Stop/Wash tampon ile yıkama (2 ml stop/wash tamponu + 68 ml distile su) 10 dakika
 - PBS ile yıkama 4 kez 2 şer dakika
 - Anti-Dioksigenin peroksidaz eklenir (Lamların üzeri kapatılır, 30 dakika nemli oda sıcaklığında beklenir).
 - PBS ile yıkama 4 kez 2 şer dakika
 - DAB eklenir (735 µl DAB Dilution buffer + 15 µl DAB substrat)
 - Distile su ile yıkama 3 dakika
 - Mayers Hematoksilen 1 dakika
 - Çeşme suyu 5 dakika
 - Distile su ile yıkama 3 dakika
 - % 80 alkol
 - % 95 alkol
 - % 100 alkol
 - Ksilen I
 - Ksilen II
 - Ksilen III
 - Entalen ile preparatlar kapatılır.
- (Millipore, Apoptag, Germany)

BULGULAR

Bu çalışmada toplam 48 adet denek kullanıldı. Bu denekler 3 gruba ayrıldı. Bulgular ve tartışma bölümünde; 1. gruptan otogreft grubu, 2.gruptan radyoterapi grubu, 3. gruptan ise nitrojen grubu olarak söz edilecektir.

GÖZLEMLER;

Çalışma süresince deneklere her gün rutin beslenme ve barınma kontrolü uygulandı. Ameliyat sonrası bir hafta ya kontrolü yapıldı. Tüm deneklerde sorunsuz yara iyileşmesi sağlandı, enfeksiyon saptanmadı. Nitrojen grubuna ait bir denek 4. haftada exitus oldu. Her üç grupta da cerrahi uygulanan sağ taraf ayak parmaklarında değişik oranlarda otofaji gözlemlendi. Tüm gruplarda ayak tırnaklarında düzleşme ve erken dönemde sağ ayak parmakları üzeri basamadıkları ve sağ ayak topukları üzerinde yürüdükleri görüldü. Yaklaşık 10-12. haftadan sonra parmak hareketleri tam olmasa da normal yürüyüş paternine yakın bir yürüyüş sergiledikleri görüldü. Deneklerin yarısı 3. ayda diğer yarısı ise 4. ayda değerlendirilmeye alındı. Deneklere öncelikle eğimli tahtada yürüme analiziyle motor güç değerlendirmesi yapıldı. Ardından anestezi altında tüm deneklere elektrofizyolojik EMG değerlendirmesi yapıldı. Denekler sakrifiye edildikten sonra eski insizyon skarları kullanılarak yara yerleri diseke edildi. Sağ siyatik sinir yeniden explore edildi. Cerrahi uygulanan siyatik sinirin proksimal ve distal sutureleri görüldü. Sağ siyatik sinir proksimal ve distal anastomoz hattı içerecek ve her iki uçta 5'er mm. daha fazladan sinir dokusunu da kapsayacak şekilde mikro makas ile kesilerek tek parça halinde çıkartıldı. Her 3 grupta da deneklerin tamamında cerrahi uygulanan sinir bütünlüğü tam olarak gözlemlendi. Makroskopik olarak gruplar arasında greftli bölge açısından belirgin farklılık saptanmadı. Çevre yumuşak doku ile yer yer yapışıklıklar görüldü. Ardından tüm deneklerin sol siyatik sinirleri benzer şekilde diseke edilerek, histolojik değerlendirmede kontrol grubu amaçlı mikro makas ile kesilerek örnek alındı.



Şekil 22: Cerrahi uygulanan tarafta görülen otofaji.

FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME;

Çalışmada kullanılan tüm deneklerde, fonksiyonel değerlendirme eğimli tablada yürüme analizi ile yapıldı.

MOTOR GÜÇ;

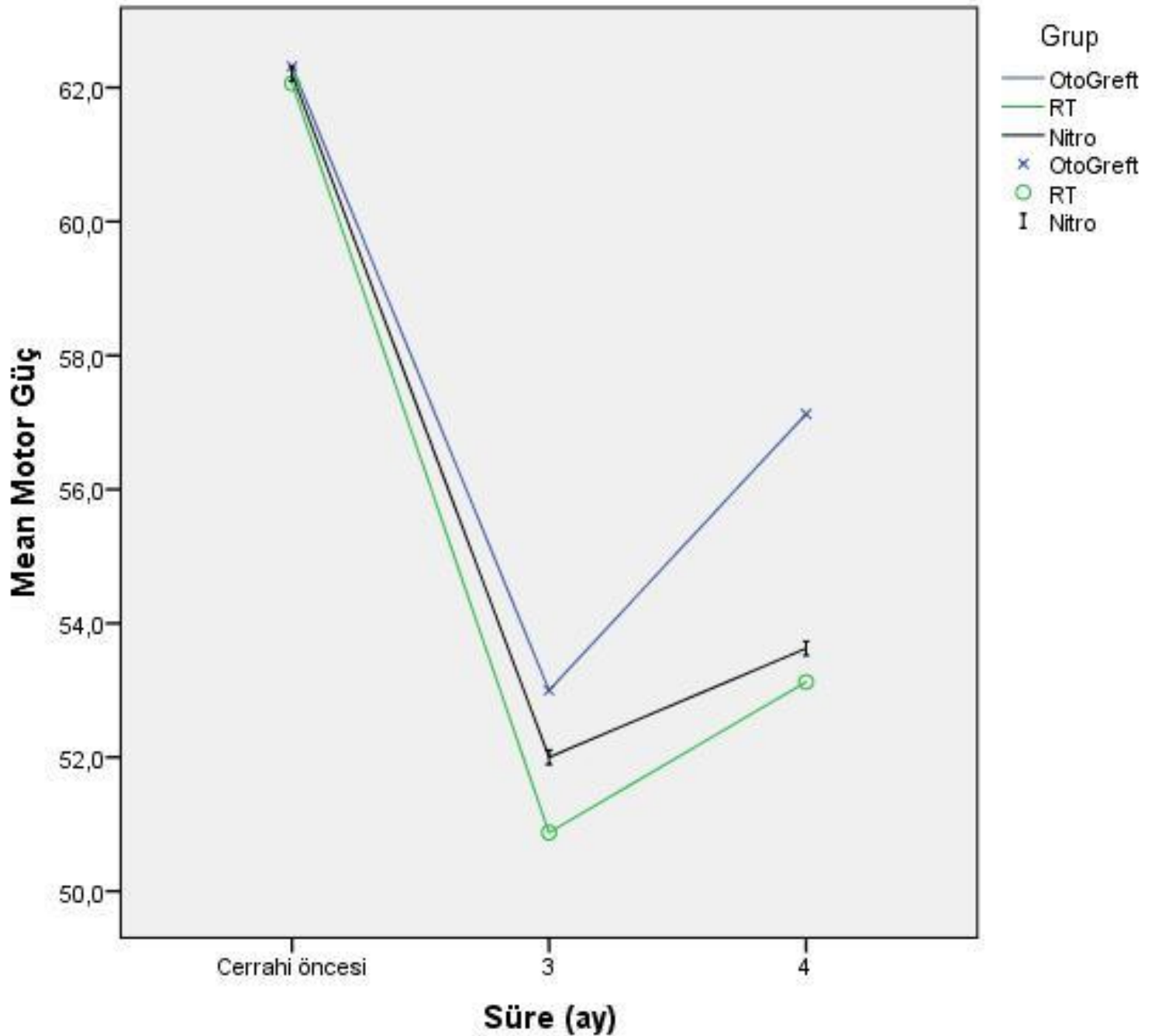


Şekil 23: Deneklerin eğimli tablada tutunma açılarının test edilmesi, motor güç değerlendirmesi.

	Eğimli Tablada Tutulma Açısı (Derece) 3. AY	Eğimli Tablada Tutulma Açısı (Derece) 4. AY
Kontrol (Cerrahi Öncesi)	62,63°	62,25°
A) Ototgreft grubu	53,00°	57,13°
B) Radyoterapi grubu	50,88°	53,13°
C) Nitrojen grubu	52,00°	53,63°

Tablo 3: Eğilimli tablada motor güç tutunma açısının karşılaştırılması.

Motor güç değerlendirmesinde 3. ay ve 4. ay değerlendirmeleri göz önüne alındığında, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. 4. ay değerlendirmesinde her 3 grupta da 3. aya göre motor fonksiyonlarda artış görüldü. 3. ay ve 4. ay değerlendirmelerinde kontrol grubu her 3 gruba motor fonksiyon açısından istatistiksel anlamlı yüksek bulundu ($p<0.001$). Hem 3. ay hem de 4. ay değerlendirmesinde otogreft grubu radyoterapi ve nitrojen grubuna göre motor güç değerleri bakımından yüksek bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p:0.119$ $p:0.393$).



Şekil 24: Deneklerin eğimli tablada tutunma açılarının cerrahi öncesi, 3.ay ve 4.ay ortalama değerleri.

ELEKROFİZYOLOJİK BULGULAR;

EMG;

Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları;

EMG de distal latansı ve BKAP amplitüdü değerlendirildi.

3.ay EMG Latans	A (Otogreft)	B (Radyoterapi)	C (Nitrojen)
Sağ Bacak (cerrahi)	4.27 ± 0.11	5.17±0.26	6.73±0.48
Sol Bacak (kontrol)	2.57±0.09	2.78±0.41	2.40±0.11

3.ay EMG BKAP Amplitud	A (Otogreft)	B (Radyoterapi)	C (Nitrojen)
Sağ Bacak (cerrahi)	2.58 ± 0.22	2.03±0.29	0.75±0.12
Sol Bacak (kontrol)	13.02±0.84	11.74±1.73	15.70±0.88

4.ay EMG Latans	A (Otogreft)	B (Radyoterapi)	C (Nitrojen)
Sağ Bacak (cerrahi)	4.53± 0.17	4.66±0.15	5.01±0.33
Sol Bacak (kontrol)	2.90±0.07	2.84±0.03	2.81±0.10

4.ay EMG BKAP Amplitud	A (Otogreft)	B (Radyoterapi)	C (Nitrojen)
Sağ Bacak (cerrahi)	4.34 ± 0.99	2.21±0.38	2.17±0.61
Sol Bacak (kontrol)	13.16±0.99	15.72±1.10	13.08±0.70

Tablo 4: EMG parametrelerinin karşılaştırılması.

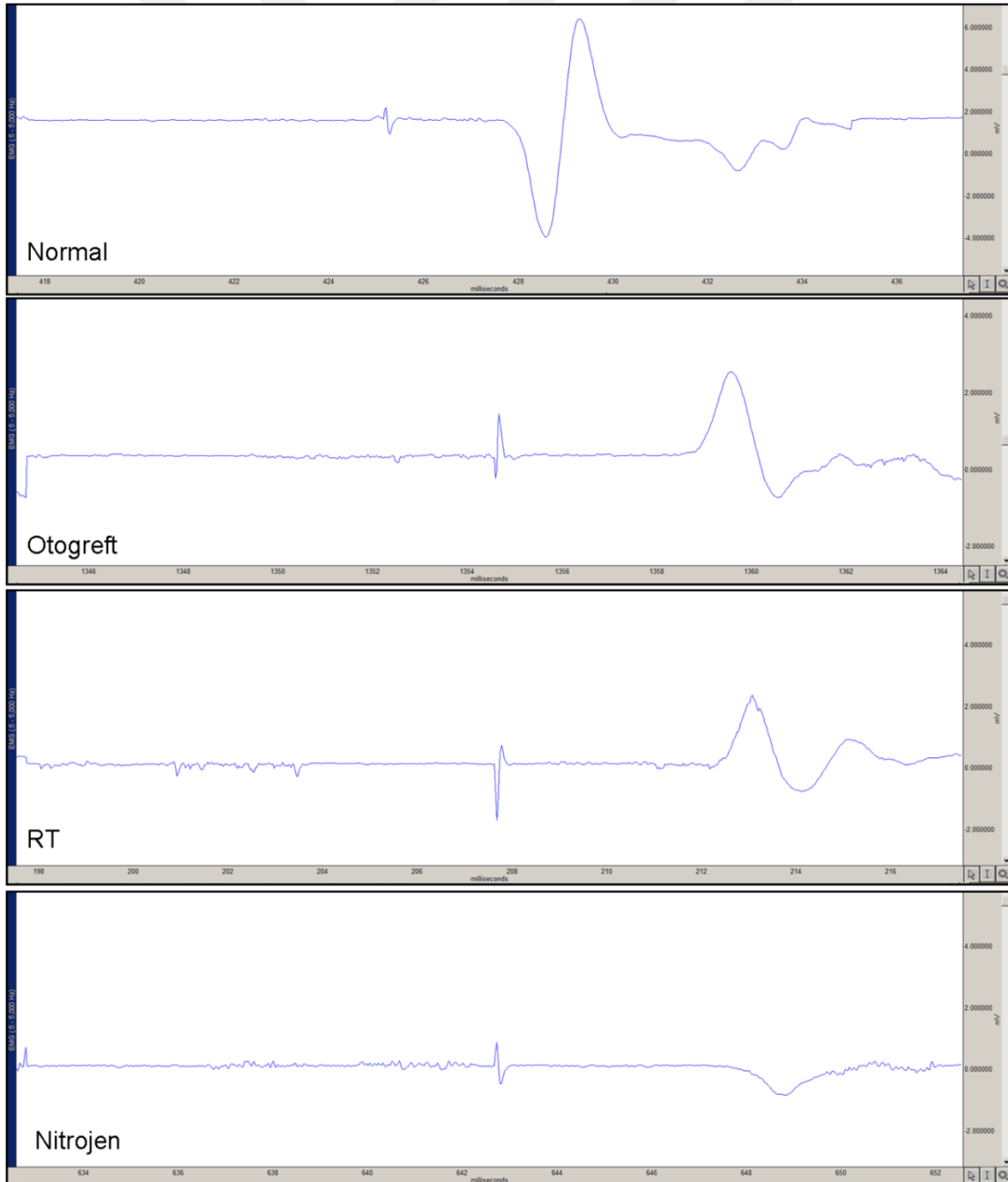
İstatistiksel Analiz;

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

3. ay EMG değeriendirilmesine baktığımızda; radyoterapi ve nitrojen grubunda latansların otogreft grubuna göre uzamış olduğu görüldü ve bu bulgu miyelinizasyonun bozulması olarak değeriendirildi ($p<0.01$). Ayrıca radyoterapi grubu ile nitrojen grubu karşılaştırıldığında, radyoterapi grubunun miyelinizasyonunun daha iyi olduğu görüldü ($p<0.01$).

Radyoterapi ve nitrojen grubunda amplitüde otogreft grubuna göre anlamlı oranda düşüklük görüldü. Ayrıca radyoterapi ile nitrojen grubu karşılaştırıldığında; radyoterapi grubunun amplitüd değerieleri açısından daha iyi olduğu görüldü ($p<0.01$). BKAP amplitüdü aksonal rejenerasyon ile doğru orantılı olduğundan bu bulgu RT grubunda aksonal rejenerasyonun nitrojen grubuna göre daha iyi olduğu yönünde yorumlandı.

4. ay değeriendirilmesine baktığımızda ise miyelinizasyon açısından otogreft grubu ile radyoterapi ve nitrojen grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. Aksonal iyileşme açısından değeriendirdiğimizde ise otogreft grubunun radyoterapi ve nitrojen grubuna göre daha iyi iyileşme gösterdiği saptandı ($p<0.05$). Radyoterapi ve nitrojen grupları arasında aksonal iyileşme arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.5$).



Şekil 25: Kontrol ve Cerrahi gruplara ait EMG kayıt örnekleri.
HİSTOLOJİK BULGULAR;

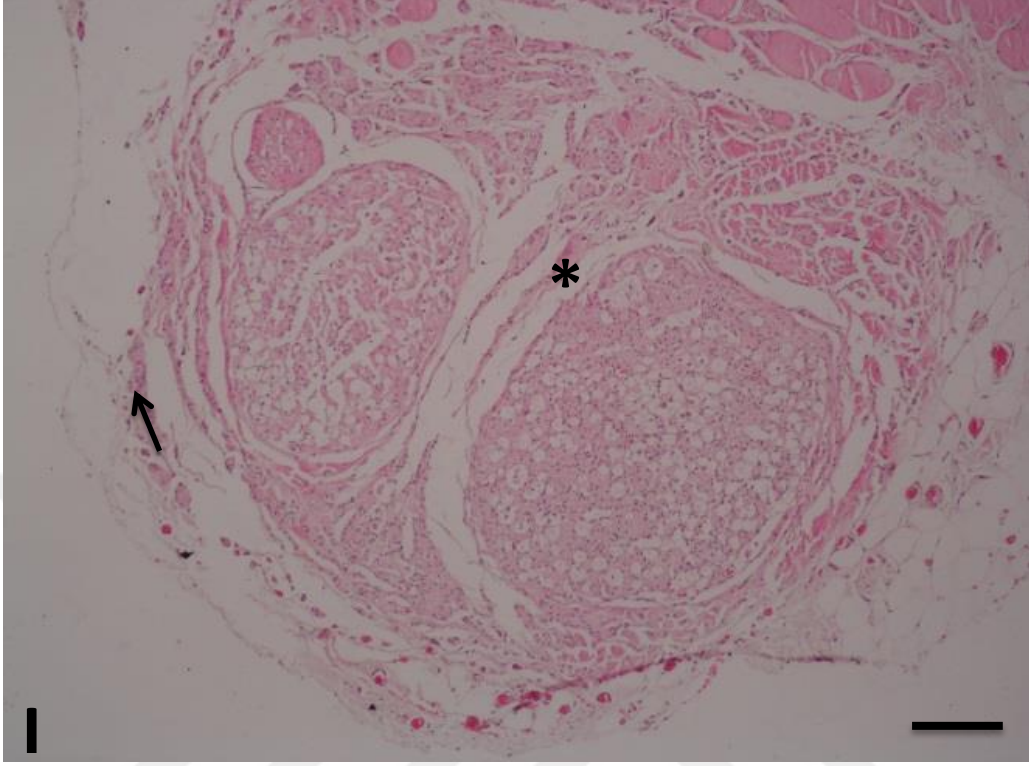
Hematoksilen eozin boyama değerlendirme:

Tüm kontrol gruplarında benzer bulgular saptanmıştır; bu gruba ait sinir dokularından elde edilen kesitlerin hematoksilen-eosin boyanması sonrası ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan kalın fibröz bir bağ dokudan oluşan epinörium ile çevrili olduğu izlenmiştir. Epinöriumda fibröz bağ dokusu dışında, kan damarlarının varlığı da dikkat çekmiştir. Epinöriumun altında sinir fasiküllerinin daha ince bir bağ dokusu olan perinöriumla çevrili olduğu görülmüştür. Perinöriumdan kaynaklanan daha ince bir bağ dokusu olan endonöriumun tek tek sinir liflerini çevrelediği gözlenmiştir. Endonöriumun altında Schwann hücrelerinden oluşan miyelin kılıfının varlığı izlenmiştir. Aksonları saran Schwann hücreleri, oval ya da yuvarlak çekirdekleri ile ayırt edilmiştir. Aksonlar, Schwann hücrelerinin sitoplazmasına gömülmüş halde, soluk renkli olarak izlenmiştir. Miyelinli sinir liflerinde, Schwann hücreleri tarafından yapılan ve aksonun etrafında yerleşmiş olan bir miyelin kılıfı varlığı görülmüştür. Miyelinli sinir liflerinin aralarında, miyelinsiz sinir lifleri, bağ dokusu hücreleri ve kan damarları da ayırt edilmiştir.

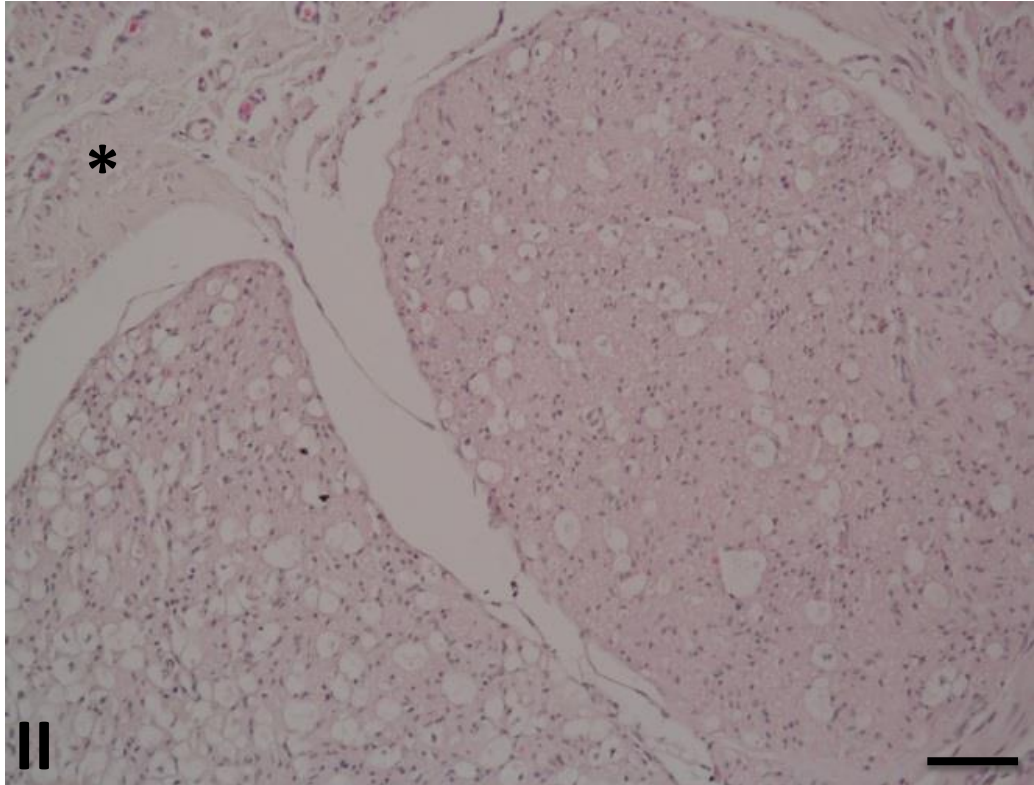
Cerrahi hasar oluşturulmuş tüm guruplarda hem 3 ay hemde 4 aylık kesitlerden elde edilen bulgularda özel anlamda akson ve miyelinli sinir lif sayılarında ve vasküler yapıların sayılarında farklılıklar olmakla beraber, genel anlamda grup ayrımı yapmaksızın elde edilen kesitlerin ışık mikroskopik incelenmesinde, sinirin dıştan fibröz bir bağ dokudan oluşan epinörium ile çevrili olduğu izlenmiştir. Epinöriumda fibröz bağ dokusu dışında, kan damarlarının varlığı da gözlenmiştir. Epinöriumun altında, içerisinde miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin bulunduğu sinir fasikülleri ayırt edilmiştir.

Miyelinli sinir liflerinin rejenerasyonu belirgin olmakla birlikte, sinir liflerinin bazılarında akson ve miyelin kılıfı dejenere olduğu, miyelin kılıf lamellerinin birbirlerinden ayrıldıkları, aksonun büzüştüğü ve bazı liflerde ise tamamen dejenere olduğu dikkati çekmiştir. Miyelinsiz sinir liflerinin genellikle normal yapılarını korudukları izlenmiştir. Bunun dışında, aktif fibroblastların yanında, farklı yönlerde düzenlenmiş, kollajen liflerden zengin fibröz bağ dokusunda artış izlenmiştir.

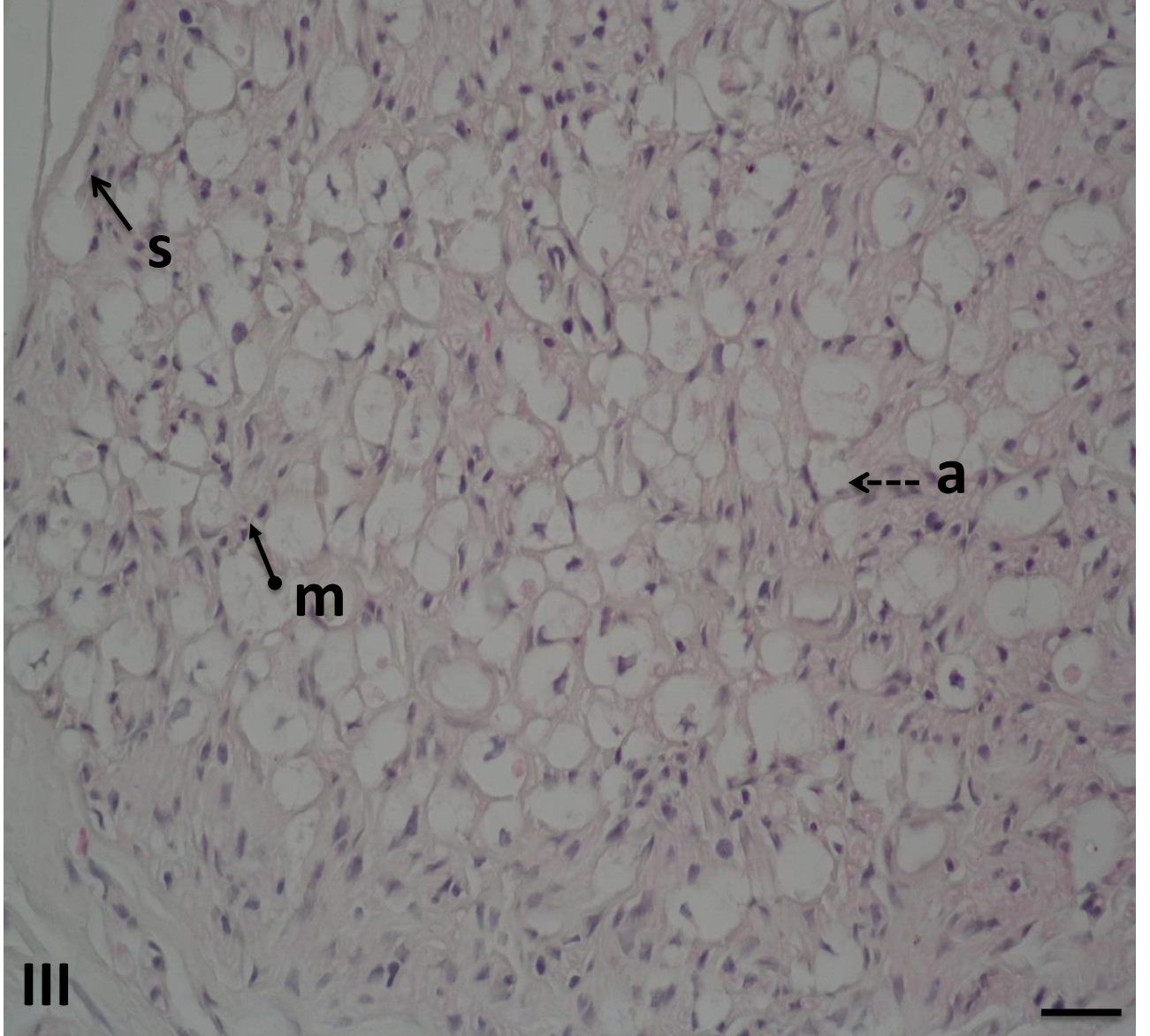
Özellikle büyük miyelinli liflerde endonöral ödem, segmental miyelin dejenerasyonu ile miyelin yoğunluğunda ve miyelinli fibrillerde azalma tespit edilmiştir. Aksonal kayba paralel endonöral fibrozis izlenmiştir. Endonöral ödemin özellikle subperinöral, intersisyel ve perivasküler bölgelere özgü olduğu saptanmıştır. Aksonal demiyelinizasyon Schwann hücrelerinde lipid birikiminin olduğu boşluklar şeklinde izlenmiştir.



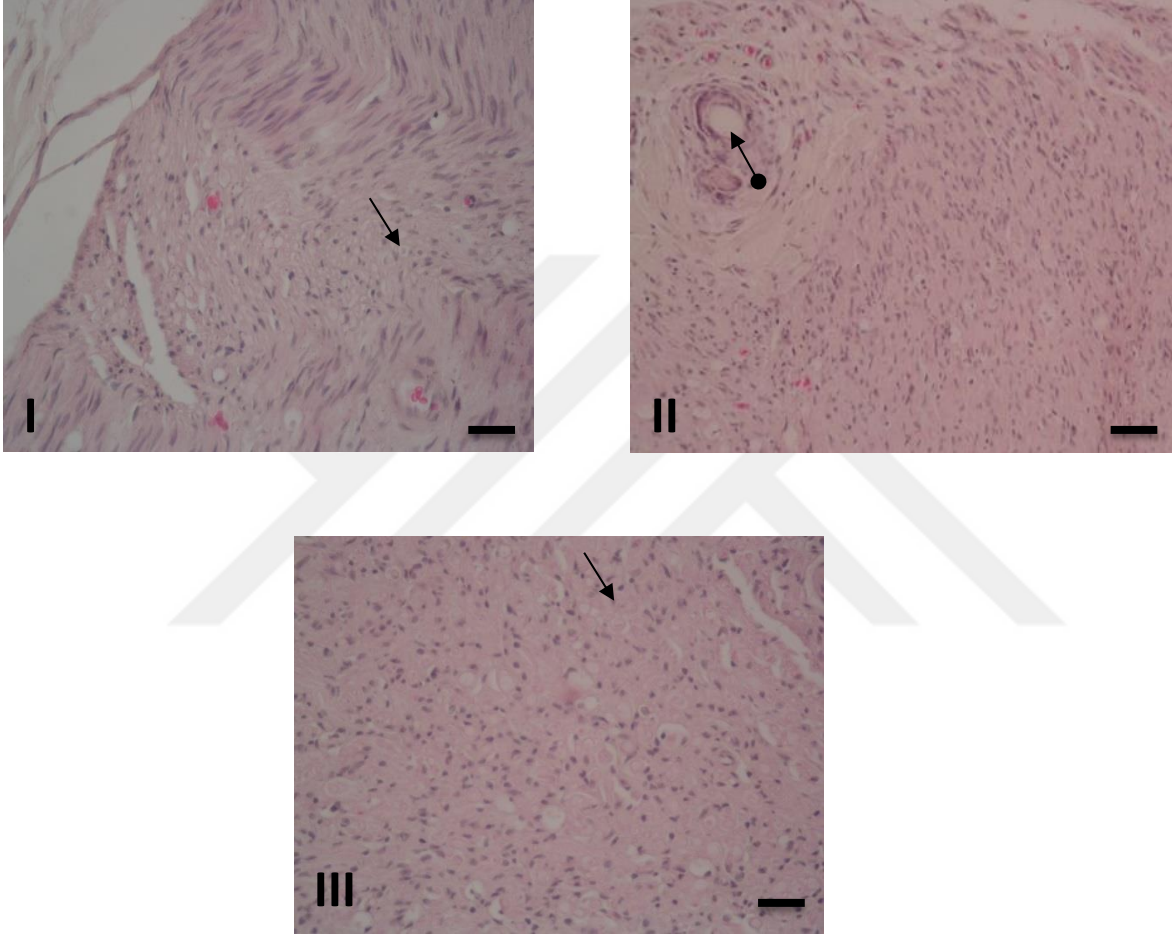
Şekil 26: I- Kontrol grubuna ait siyatik sinir dokusunun görünümü. X10 Büyütme. Hemotoksilen & Eozin Boyama. *Perinöryum Ok (↗): Epinöryum



Şekil 27: II- Kontrol grubuna ait siyatik sinir dokusunun görünümü. X20 Büyütme. Hemotoksilen & Eozin Boyama *Perinöryum



Şekil 28: III- Kontrol grubuna ait siyatik sinir dokusunun görünümü. X40 Büyütme. Hemotoksilen & Eozin Boyama. **s)** schwan hücresi **m)** myelin kılıf **a)** akson

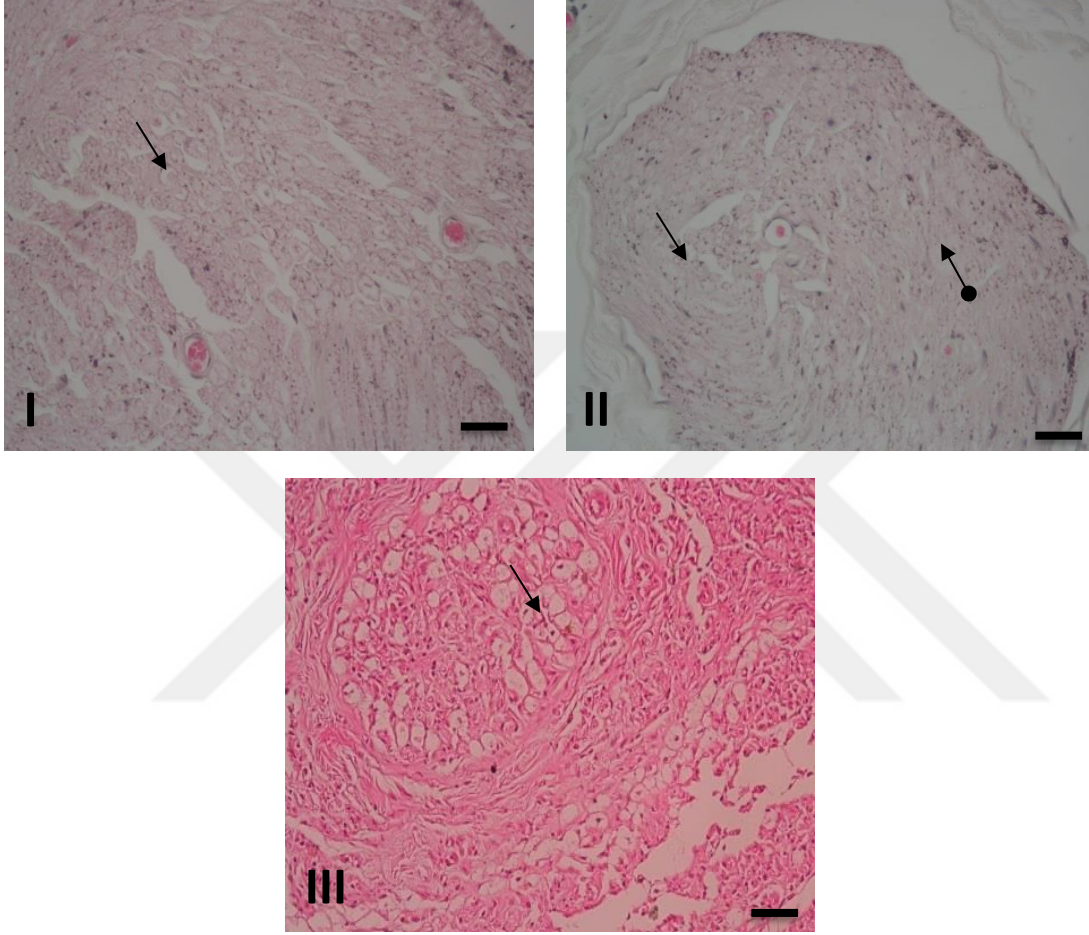


Şekil 29: Sağ A grubu (otogreft) hemotoksilen & eozin boyama. X40 Büyütme.

I – Sağ A grubu X bölümü (proksimal).

II – Sağ A grubu Y bölümü (greft) (●) vasküler yapı.

III – Sağ A grubu Z bölümü (distal).

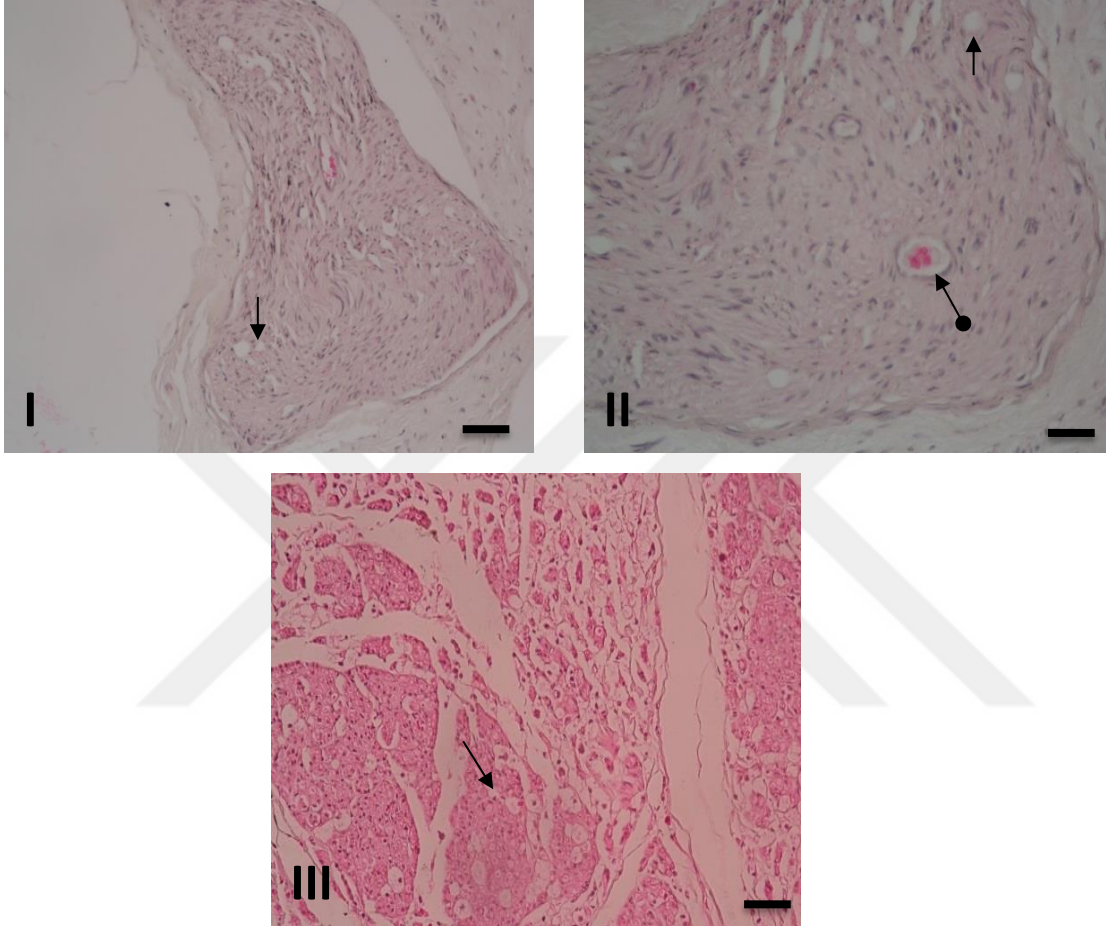


Şekil 30: Sağ B grubu (radyoterapi) hemotoksilen & eozin boyama. X40 Büyütme.

I – Sağ B grubu X bölümü (proksimal)

II – Sağ B grubu Y bölümü (greft)

III – Sağ B grubu Z bölümü (distal)



Şekil 31: Sağ C grubu (nitrojen) hemotoksilen & eozin boyama. X40 Büyütme.

I – Sağ C grubu X bölümü (proksimal)

II – Sağ C grubu Y bölümü (greft)

III – Sağ C grubu Z bölümü (distal)

Kontrol ve cerrahi hasar gruplarındaki miyelinli sinir lifi ve vasküler yapıların değerlendirmesinde; sistematik randomize seçilmiş kesitlerin dijitalize görüntülerinde, her kesit için birbiriyle örtüşmeyen 6 alan birbirinden bağımsız iki araştırmacı tarafından kör olarak taranmış ve her alan için ayrı ayrı yapılan skorlamaların ortalaması alınarak kesitin skorlaması belirlenmiştir. Buna göre;

MİYELİNLİ SİNİR LİFİ:

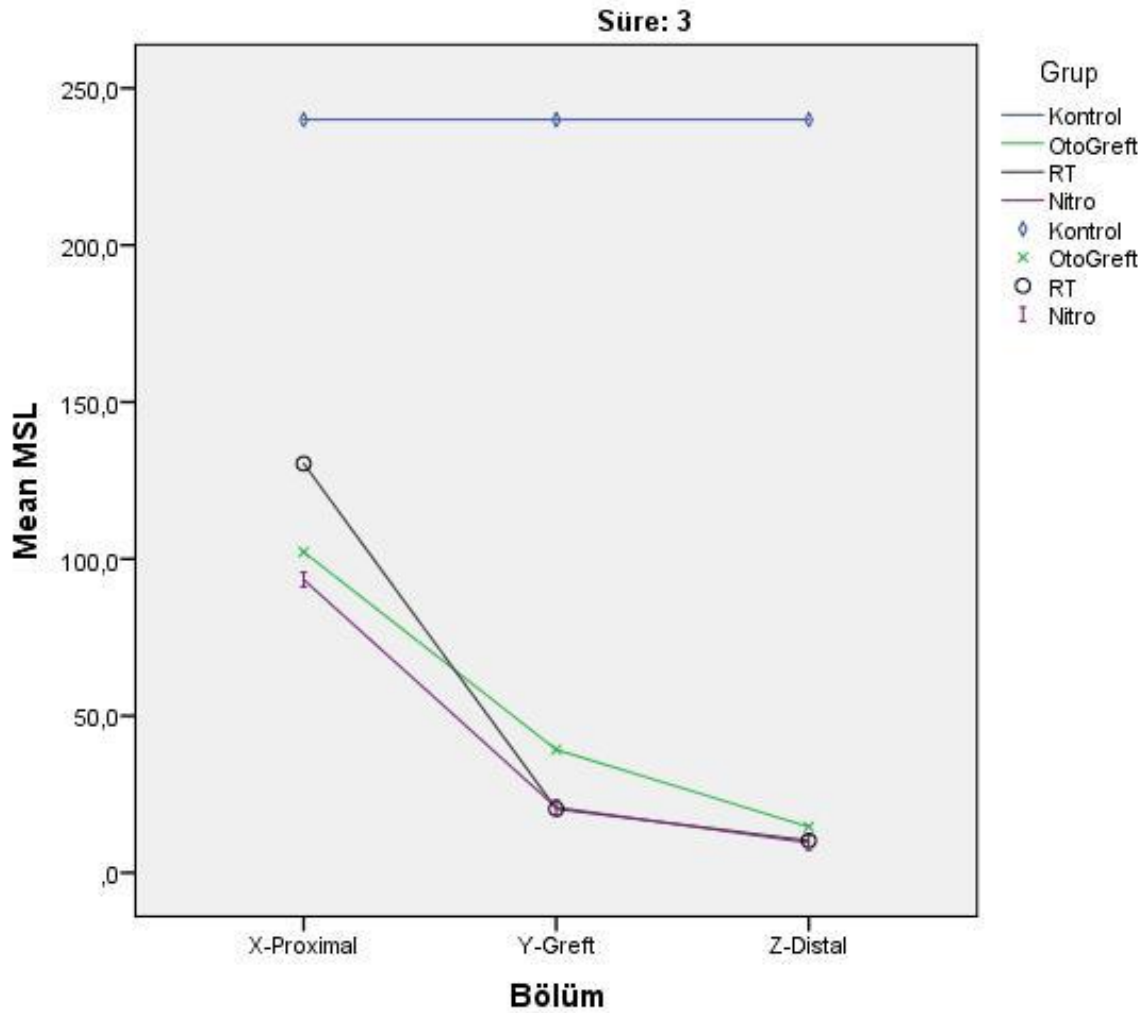
X (greftin proksimal bölümü) :

Sinir grefti uygulanan bölümün proksimalinde (x bölümünde) 3.ayda yapılan miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde otogreft grubu ile nitrojen grubu istatistiksel olarak farklı değildi ($P=0,052$). Radyoterapi grubunda ise otogreft ve nitrojen grubuna göre anlamlı oranda miyelinli sinir lifi yüksek bulundu ($p<0.001$).

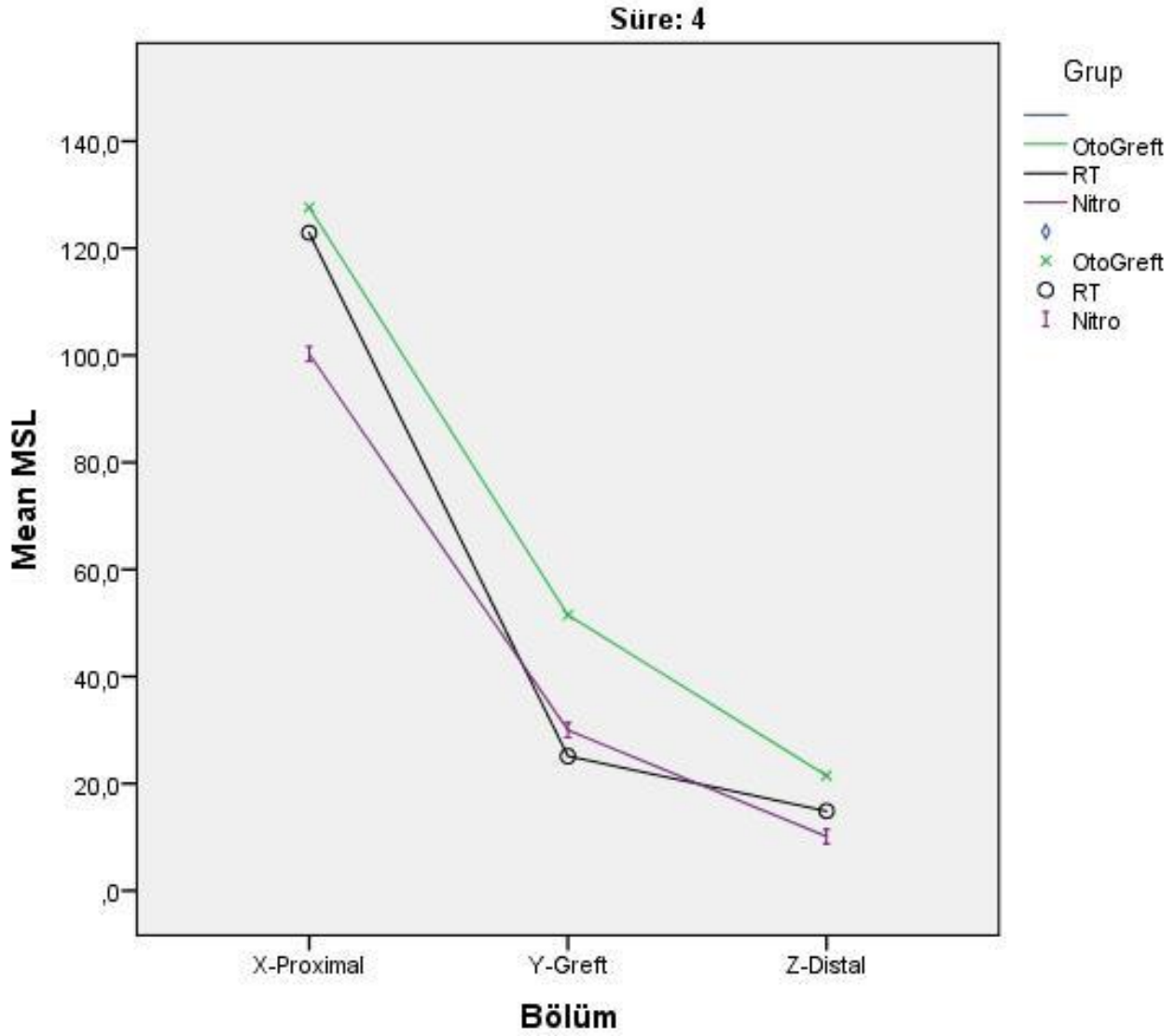
Sinir grefti uygulanan bölümün proksimalinde (x bölümünde) 4.ayda yapılan miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde otogreft grubu ile radyoterapi grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

Nitrojen grubunda ise miyelinli sinir lifi diğer 2 gruba göre anlamlı oranda düşük bulundu ($p<0.001$).

Bu sinirin X bölümünde 3.ayda ve 4.ayda yapılan değerlendirmelerde her 3 grupta da miyelinli sinir lifi sayıları kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı oranda düşük olduğu görüldü.



Şekil 32: Miyelinli sinir lifi değerlendirme grafiği 3.ay.



Şekil 33: Miyelinli sinir lifi değerlendirme grafiği 4.ay.

Y (Graft bölümü):

Sinir grefti bölümünde yapılan 3. aydaki miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde otograft grubunda sinir lifi sayısı radyoterapi ve nitrojen grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulundu. Radyoterapi ve nitrojen grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=1$).

Sinir grefti bölümünde yapılan 4.aydaki miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde otograft grubunda sinir lifi sayısı radyoterapi ve nitrojen grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulundu ($p<0.001$). Ayrıca nitrojen grubunda sinir lifi sayısı bu bölümde radyoterapi grubuna göre anlamlı oranda yüksek saptandı ($p=0,035$).

Bu sinirin Y bölümünde 3. ayda ve 4. ayda yapılan değerlendirmelerde her 3 grupta da miyelinli sinir lifi sayıları kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı oranda düşük olduğu görüldü.

Z (Graftın distal bölümü):

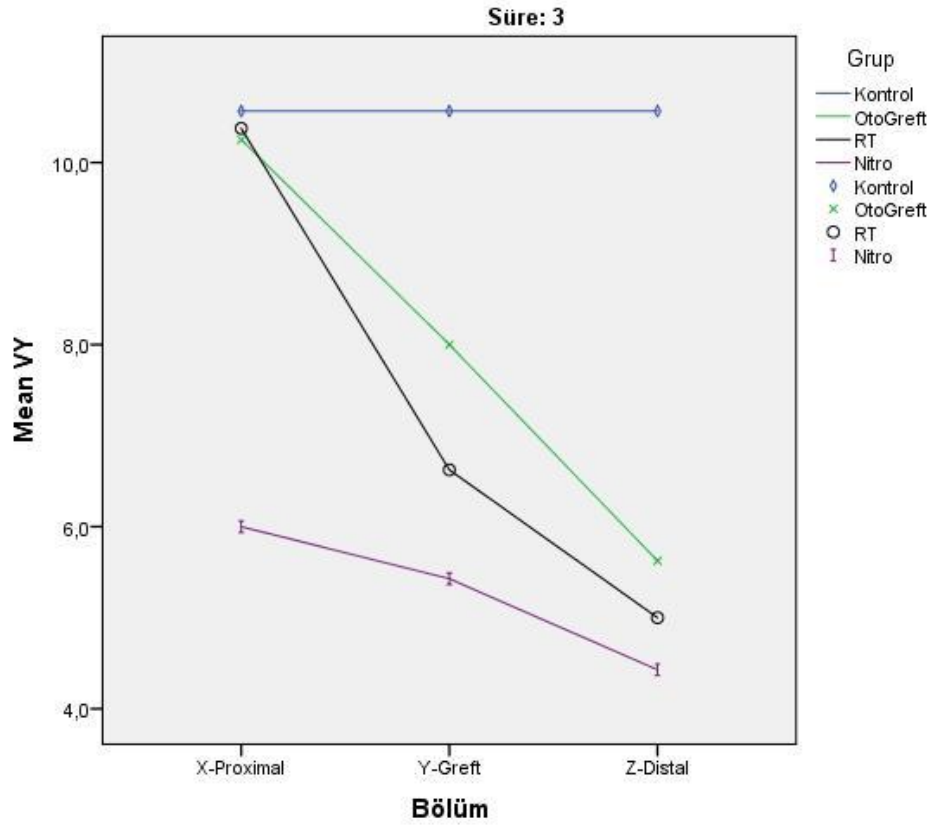
Sinir grefti uygulanan bölümün distalinde (z bölümünde); 3. ayda yapılan miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde otograft grubu, radyoterapi ve nitrojen grubuna göre anlamlı oranda yüksek miyelinli sinir lifi sayısına sahip olduğu görüldü ($P=0,02$ ve $p<0.001$). Yine bu bölümdeki değerlendirmede radyoterapi ve nitrojen grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=1$).

Sinir grefti uygulanan bölümün distalinde (z bölümünde); 4. ayda yapılan miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde otograft grubu, radyoterapi ve nitrojen grubuna göre anlamlı oranda yüksek miyelinli sinir lifi sayısına sahip olduğu görüldü ($p<0.001$). Yine bu bölümdeki değerlendirmelerde radyoterapi grubu nitrojen grubuna göre anlamlı oranda yüksek miyelinli sinir lifi sayısına sahip olduğu görüldü ($p=0,02$).

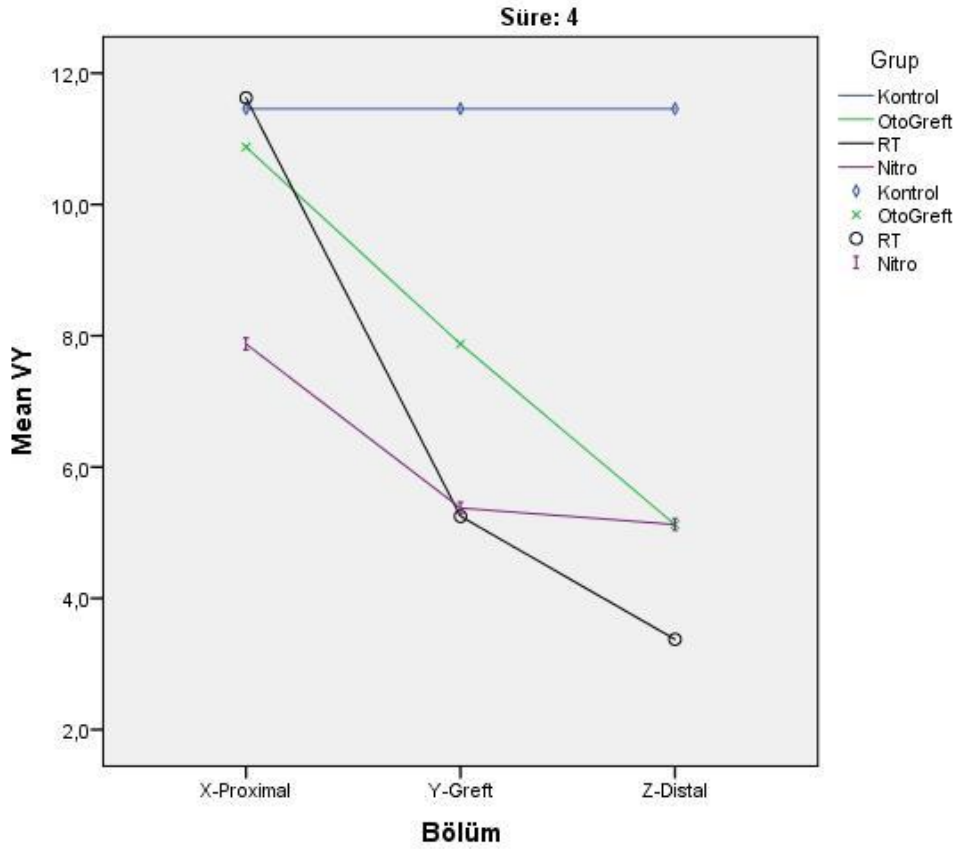
Hem 3. ayda hem de 4. ayda yapılan miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde; her 3 grupta da sinir lifi sayısı proksimal bölümden greft bölümü ve distal bölüme doğru gidildikçe sinir lifi sayısında anlamlı oranda düşüş görüldü.

VASKÜLER YAPILAR;

X (Graft proksimal bölümü): Bu bölümde yapılan vasküler yapı değerlendirmesinde tüm gruplarda 4.ay değerlerinin 3.ay değerlerine göre daha yüksek olduğu görüldü.Vasküler yapı sayısı bakımından otograft grubu ile radyoterapi grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=1$), nitrojen grubunda ise hem otograft hem de radyoterapi grubuna göre anlamlı oranda düşük sayıda vasküler yapı saptandı ($p<0.001$).



Şekil 34: Vasküler yapıların kontrol, otograft, radyoterapi, nitrojen grubu ortalama değerleri grafiği 3.ay.



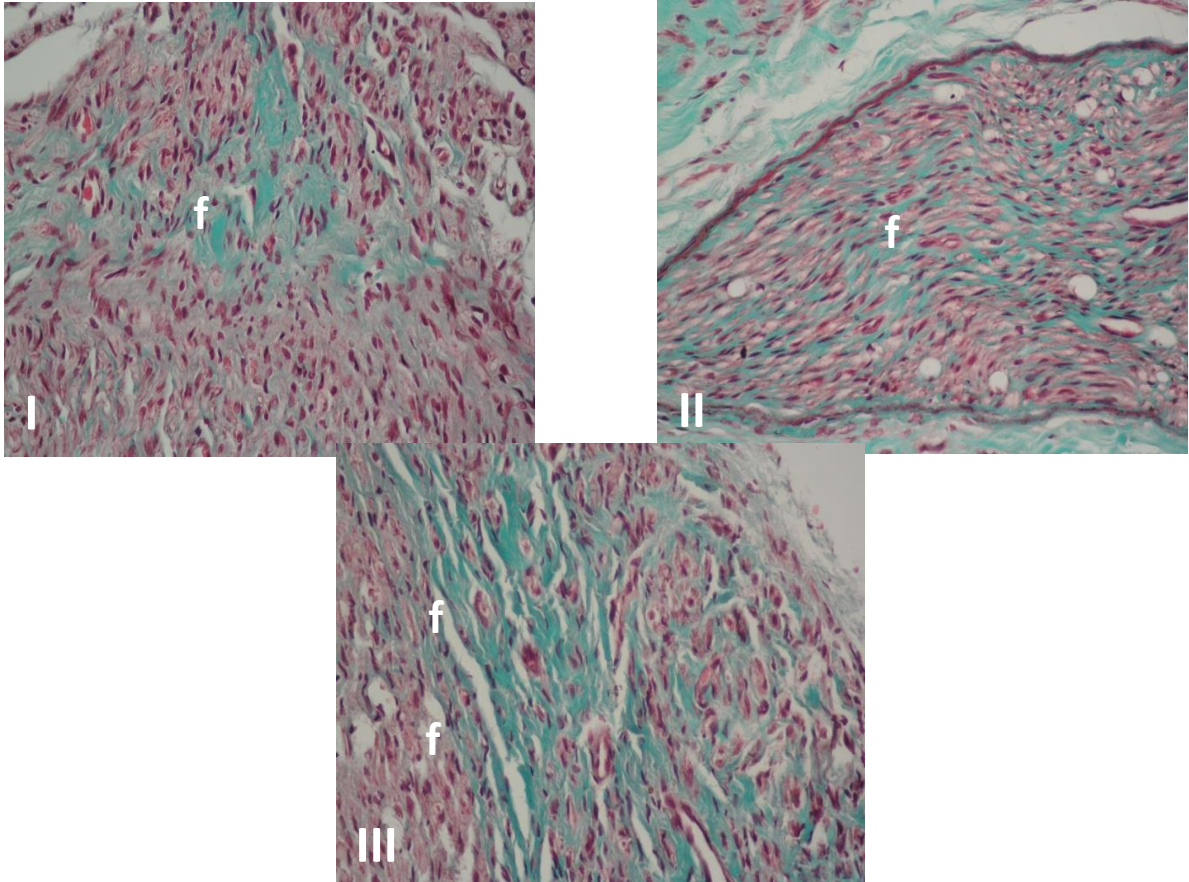
Şekil 35: Vasküler yapıların kontrol ,otogreft, radyoterapi, nitrojen grubu ortalama değerleri grafiği 4.ay

Y (Graft bölümü): Vasküler yapı değerlendirmesine baktığımızda ise 3.ayla 4 ay değerleri arasında fark saptanmadı. Ototogreft grubunda vasküler yapı sayısı hem radyoterapi hem de nitrojen grubuna göre anlamlı oranda yüksek saptandı ($p<0.001$). Radyoterapi ve nitrojen grubu arasında greft bölümünün vasküler yapıları bakımından fark görülmedi ($p=0,761$).

Z (Graft distal bölümü): 3.ayda yapılan vasküler yapı değerlendirmesinde gruplar arasında fark yok iken 4.ayda fark saptandı. Radyoterapi grubunda hem otogreft hem de nitrojen grubuna göre vasküler yapı sayısı düşük bulundu.Bu bölümde otogreft ve nitrojen grupları arasında vasküler yapı değerleri benzer bulundu ($p:0.643$).

Masson trikrom değerlendirme:

Tüm kontrol guruplarında sinirin dıştan kollajen fibrillerin yeşil-mavi boyanması nedeniyle kalın fibröz bir bağ dokudan oluşan epinörium ile çevrili olduğu izlenmiştir. Epinöriumda fibröz bağ dokusu dışında, kan damarlarının varlığı da dikkat çekmiştir. Epinöriumun altında sinir fasiküllerinin daha ince bir bağ dokusu olan perinöriumla çevrili olduğu görülmüştür. Perinöriumdan kaynaklanan daha ince bir bağ dokusu olan endonöriumun tek tek sinir liflerini çevrelediği gözlenmiştir.Cerrahi hasar oluşturulmuş guruplarda kontrol gurupları ile karşılaştırıldığında epinörium ve perinöriumda dikkat çekici bir bulguya rastlanmamıştır. Ancak C gurubu tüm parçalarında(x,y,z) çok belirgin olmak üzere A ve B gurupları özellikle y ve z parçalarında aksonal kayba paralel olarak endonöral fibrozis ve yer yer fibrotik odaklar izlenmiştir.



Şekil 36: cerrahi uygulanan gruplara ait Masson trikrom Boyama. X40 Büyütme. f;fibrozis

I) Ototogreft grubu II) Radyoterapi grubu III) Nitrojen grubu

İmmünohistokimyasal değerlendirme (s 100);

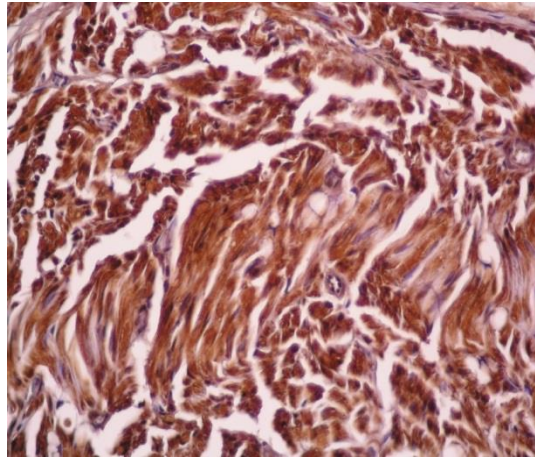
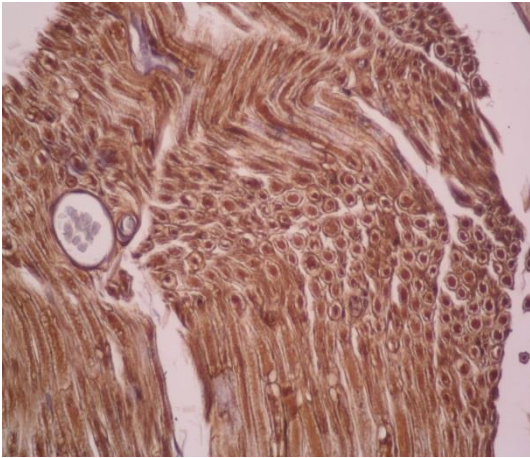
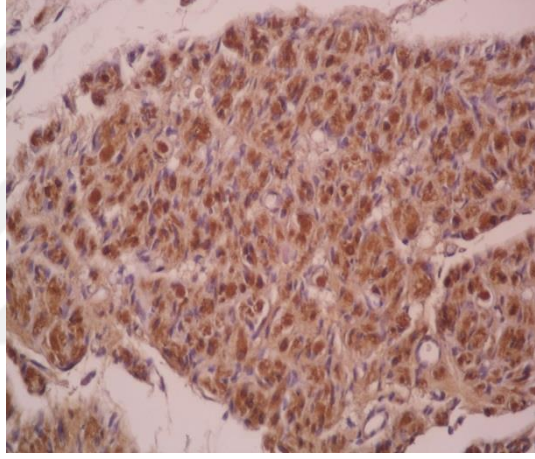
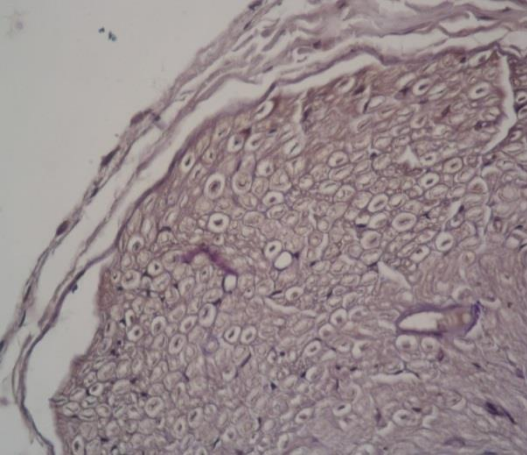
Grupların immünohistokimyasal değerlendirmesinde sistematik randomize seçilmiş kesitlerin dijitalize görüntülerinde, her kesit için birbiriyle örtüşmeyen 6 alan birbirinden bağımsız iki araştırmacı tarafından kör olarak taranmış ve yansıyan sinyal yoğunluğuna (immünreaktivite) bakılmıştır. İmmünreaktivite, 0'dan +3'e kadar bir skala üzerinde değerlendirilerek immünoreaktif skorlama yapılmıştır. Buna göre hiç immünreaktivite olmadığında 0, zayıf immünreaktivite varlığında +1, orta derece immünreaktivite varlığında +2 ve güçlü (artmış) immünreaktivite varlığında +3 olarak değerlendirilmiştir. Her alan için ayrı ayrı yapılan skorlamaların ortalaması alınarak kesitin immünoreaktif skoru belirlenmiştir. Tüm kesitler değerlendirildikten sonra grupların ve alt gruplarının skorları belirlenmiştir. Sonuçlar tablo üzerine yerleştirilerek gruplar ve alt gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır.

s-100		
SOL		
A B C	+++	
SAĞ		
A	X	++
	Y	++
	Z	++
B	X	++
	Y	+
	Z	++
C	X	++
	Y	+
	Z	+

Tablo 5: s-100 immünoekspresyonun gruplara göre çizelgesi

Gruplara ait biyopsilerden elde edilen kesitlerin s-100 ile boyanması sonrası, ışık mikroskopik incelemesinde immünoekspresyon dağılımı Schwann hücreleri için değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak Cerrahi Hasar Grubu bir bütün olarak değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre tüm yapılarda s-100 immünoekspresyonunda azalma saptanmıştır. Cerrahi gruplar arasında S100 immünoekspresyonu düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmamıştır.

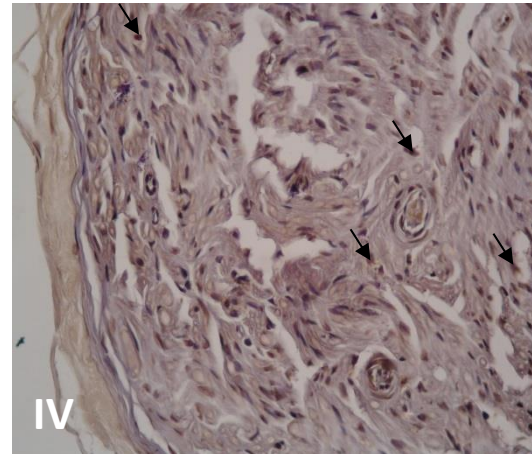
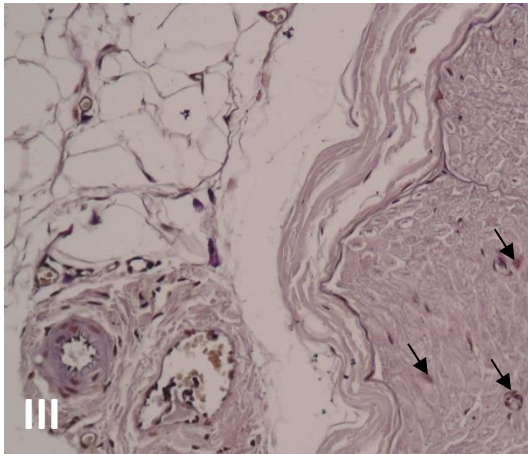
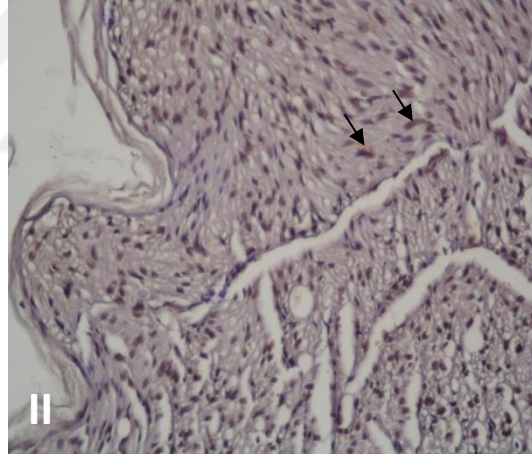
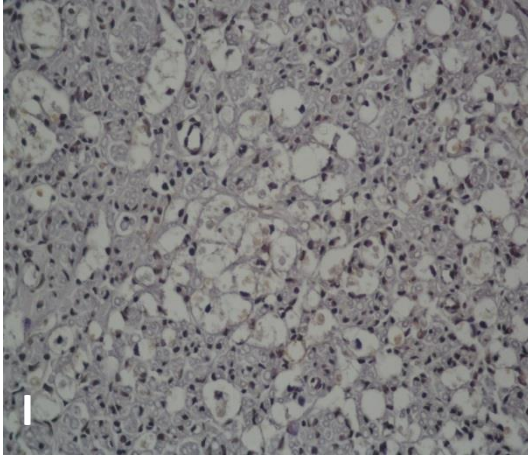


Şekil 37: I) Kontrol II) Ototogreft III) Radyoterapi IV) Nitrojen gruplarına ait greft bölümüne ait S100 Boyama .X40 Büyütme.

TUNEL Boyama;

Gruplara ait dokulardan elde edilen kesitlerin TUNEL boyaması sonrası, ışık mikroskopik incelemesinde siyatik sinir hasarının apoptozis ile ölüm şeklinde kendini gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, hasar oluşturulmuş gruplarda özellikle büyük miyelinli lifleri kapsayan hücre büzüşmesi ve yoğunlaşmış sitoplazma bulguları izlenmiştir.

TUNEL immünoekspresyon dağılımı epinörium, perinörium, endonörium, Schwann hücresi ve stromal damarlarda değerlendirilmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında cerrahi hasar oluşturulmuş tüm gruplarda Tunel pozitif hücre sayısında belirgin artış saptanmıştır. Özellikle C grubu tüm alt gruplarında A ve B gurubuna oranla tünel pozitif hücre sayısının daha fazla olduğu saptanmıştır.



Şekil 38: I)Kontrol II)Otogreft III)Radyoterapi IV)Nitrojen gruplarında greft bölümüne ait TUNEL Boyama .X40 Büyütme.

Sonuç olarak bulguları özetleyecek olursak;

Histolojik değerlendirmede myelinli sinir lifi sayılarına baktığımızda, hem erken hem de geç dönemdeki; sinirin proksimal, greft bölümü ve distalindeki değerlendirmelerde otogreft grubunun radyoterapi ve nitrojen grubuna göre daha iyi olduğu görüldü.

Radyoterapi grubu ile nitrojen grubuna kendi aralarında baktığımızda ise erken dönemdeki değerlendirmelerde aralarında fark saptanmadı. Geç dönem değerlendirmelerde ise greft bölümündeki myelinli lif sayısı olarak nitrojen grubu üstün iken greft distalindeki bölümde radyoterapi grubu daha iyi olarak görüldü. Bu sonuç; nitrojen grubunun greft bölümü ve distalindeki daha belirgin olan fibrozise bağlı, distal bölüme myelinli sinir lifi geçişinin azalması olarak değerlendirildi.

Greft bölümünde yapılan vasküler yapı değerlendirmesinde; işlem görmemiş otogreft grubunda hem radyoterapi hem de nitrojen uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı damar sayısında yükseklik saptandı. Radyoterapi ve nitrojen grubunda ise benzer sonuçlar görülmekle birlikte erken dönem 3.ay değerlendirmesinde nitrojen grubunda RT grubuna göre daha düşük sayıda vasküler yapı görüldü ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Greft distal bölümüne baktığımızda ise; 4. aydaki değerlendirmelerde radyoterapi uygulanan gruptaki damar sayısı hem nitrojen grubu hem de otogreft grubuna göre anlamlı oranda damar sayısı olarak düşük görüldü. Apoptozisin belirlendiği TUNEL boyamada cerrahi uygulanan gruplarda TUNEL pozitif hücre sayısında belirgin artış görülmüştür. Özellikle nitrojen grubunda diğer gruplara oranla daha fazla olduğu saptanmıştır.

EMG değerlendirilmelerinde, erken dönemde; miyelinizasyon açısından baktığımızda otogreft grubu en iyi değerlere, radyoterapi grubu ikinci iyi değerlere, nitrojen grubu ise en kötü değerlere sahip olduğu görüldü. Aksonal iyileşme açısından ise erken dönemde otogreft ile radyoterapi arasında fark saptanmazken, nitrojen grubunun en kötü değerlere sahip olduğu görüldü. Geç dönem değerlendirilmelerde ise miyelinizasyon anlamında gruplar arasındaki farkın kapandığı ve benzer değerlere sahip olduğu görüldü. Yine geç dönemde aksonal iyileşmede otogreft grubu en iyi grup olarak görüldü. Radyoterapi grubu daha iyi değerlere sahip olmakla birlikte nitrojen grubu ile benzer iyileşme göstermekteydi. Erken dönemde miyelinizasyon ve aksonal iyileşmede nitrojenin olumsuz etkilerinin belirgin olduğu görüldü. Geç dönemde radyoterapi ve nitrojenin özellikle aksonal iyileşme üzerine kötü etkisi görülmüş oldu.

3. ay ve 4. ay fonksiyonel iyileşmenin değerlendirmesinde; otogreft grubunda, radyoterapi ve nitrojen grubuna göre daha iyi motor fonksiyon değerleri olmasına rağmen her 3 grup arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı.

TARTIŞMA

Kas ve iskelet sistemi tümörlerinin tedavisinde tümörle birlikte geniş olarak tümörle kontamine kemik, tendon, vasküler yapılar ve sinir dokuları geniş rezeksiyon şeklinde çıkartılması tedavinin esasıdır. Oluşan kemik ve tendon defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılan yöntemlerden biride bu yapıların ekstrakorporal (vücut dışında) tümör hücrelerinden arındırılıp (devitalizasyon, onkolojik sterilizasyon) tekrar alındığı yere tespit edilmesidir (96).

İskelet sistemi tümör cerrahisinde ortaya çıkan küçük sinir defektlerinde donör saha morbiditesine rağmen sinir otogrefti kullanımı altın standart tedavi yöntemidir. Siyatik sinir gibi otogreftle rekonstrüksiyonu zor olan büyük sinir defektlerinde yada sinir otogrefti uygulanamayan sinir defektlerinde ekstremitelerde ciddi fonksiyon ve duyu kaybı oluşabilmektedir (108)

Sinir dokusu kaybı olan periferik sinir yaralanmalarında rekonstrüksiyon için; greft olarak otogreftlerin kullanılması düşünülmüş ve bu amaçla ven, arter, kas, tendon gibi yapılar kullanılsa da bugün tercih edilen yöntem otolog sinir greftleridir. Otolog sinir grefti ile tamir mümkün olan durumlarda altın standart tedavi olarak kabul görmektedir (6, 43). Bu yöntemin ise; donör sinir alanında duyu fonksiyonu kaybı, yara yeri problemleri oluşması, ikinci ek cerrahiye gereksinim duyulması, donör sinir ile alıcı sinir çapında uyumsuzluk, motor ve duysal sinirlerin uygunsuz eşleşmesinin oluşturduğu sinirde fonksiyonel iyileşme problemleri gibi önemli dezavantajları mevcuttur (7). Tüm bu dezavantajlar; araştırmacıları otogreft yerine kullanılabilecek yapay greftlere ve entübülasyon tekniklerinin kullanılmasına yöneltmiştir. Bu doğrultuda sinir grefti amacıyla organik olmayan silikon, PGA gibi materyaller ve kolajen gibi yapı taşları kullanılmıştır (117, 118, 119). Bu tip greft ve biyomateriyallerin bir kısmı deneysel aşamada olsa da bir kısmı klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Weber A ve arkadaşlarının yapmış oldukları çok merkezli randomize prospektif bir çalışmada, 96 hastada dijital sinir rekonstrüksiyonunda poliglikolik asit tüp kullanımının sonuçları yayınlanmıştır. Sonuç olarak 4 mm ve daha küçük sinir defektlerinde kondüit kullanımıyla iyi duysal iyileşme sağlandığı bildirilmiştir.

Entübülasyonun sinir defektlerine onarımı için sinir otogreftlerine alternatif olarak kullanılmasıyla birlikte aynı zamanda doku kaybı olmayan lezyonlarda da sinir sütürasyonuna da alternatif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (117). Entübülasyonda aynı zamanda allogreft kullanımında gerekli olan immünsüpresyona gerek duyulmaz. Entübülasyon amacıyla kullanılan yapay tübüler greftler, otogreft kullanımının getirdiği dezavantajları ortadan kaldırmakla birlikte bazı dezavantajları barındırmaktadır. Özellikle yabancı cisim reaksiyonu nedeniyle oluşan artmış inflamatuvar cevap yara bölgesinde sinir rejenerasyonuna olumsuz etki eder. Ayrıca yapay greftlerin insanlarda kullanılabilmeleri için biyoçözünebilir

olmaları gerekmektedir. Literatürdeki silikon gibi biyoçözünür olmayan materyallerle ilgili çalışmalar, bir süre sonra sinir basısı nedeniyle rejenerasyona engel olduğunu belirtmektedirler (120, 121). Yapay tubüler greftlerin kullanımını kısıtlayan en önemli faktör defektin uzun olduğu sinir hasarlarıdır (54, 56, 63).

Bu konuyla ilgili bazı çalışmalarda 3 cm.'den büyük sinir defektlerinde; aselüler greft ve kondütlerin otolog sinir greftleri kadar iyi olmadığı belirtilmiştir. Daha uzun ve proksimal defektlerde; otolog sinir greftlerinin kondütlere üstün olduğu belirtilmiştir (122). Yine başka bir çalışmada 3cm altındaki küçük duysal sinir defetlerde ven kondütleri ile yapılan rekonstrüksiyon sonuçlarının sural sinir greftleriyle kıyaslanabilir düzeyde olduğu belirtilmiştir (50). Sinir defektlerinde kondüt kullanımı; özellikle distal duyu sinirlerinde kısa defektlerde sinir otogreftleriyle kıyaslanabilir sonuçlara sahip olmakla birlikte, büyük sinir defetlerinde etkinliği sınırlıdır (123).

Bu nedenle tümör cerrahisinde meydana gelen büyük sinir defektlerinde kullanıma sahip değildir.

Primer tamirin mümkün olmadığı sinir yaralanmalarında, sinir defektlerinde; sinir greftleri kullanılır. Rekonstrüksiyon için sinir otogreftlerinin yetersiz olduğu durumlarda, sinir allogreftleri alternatif tedavi yöntemi olarak kullanılabilir. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda; immünsüpresyon tedavisiyle birlikte, allogreft uygulamalarında belli oranlarda iyileşme elde edilmiştir (7).

Mackinnon ve ark., düşük doz irradyasyonun, allogreft antijenitesini otogreft seviyesine indirdiğini, fakat rejenerasyonun daha kötü olduğunu bildirmişler. İyi kontrollü, dondurma ve irradyasyon uygulanan allogreftlerde, taze sinir allogreftlerine göre daha iyi, fakat otogreftlerden bariz olarak daha kötü sonuç alındığı belirtilmiştir (72, 76).

Rekonstrüksiyon için sinir grefti ihtiyacı mevcut olan allogreft kullanılan 7 hasta ile yapılan klinik çalışmada; immünsüpresyonla 12 – 26 ay, 6 hastada belirgin duysal ve değişen derecelerde motor iyileşme görülmüştür. 1 hastada tedaviye rağmen greft reddi geliştiği bildirilmiştir (67).

Allogreft kullanımının immünsüpresyon gerektirmesi, klinik kullanımını kısıtlayan en önemli faktörlerdendir.

Tüm bu periferik sinir defektleri için yapılan allogreft ve yapay greft çalışmaları; sinir otogrefti kullanımında ortaya çıkan morbiditeyi ortadan kaldırmak ve otogreft ile rekonstrükte edilemeyen defektlerde alternatif tedavi yöntemi oluşturmak amaçlıdır.

Tümör cerrahisinde; travmatik ve başka sebeple ortaya çıkan sinir defektlerinden farklı olarak tümörle kontamine olsa da elde defektli alana ait sinir dokusu bulunur. Bu sinir dokusu defektli alanın siniri olması sebebiyle defektli alana anatomik çap ve uzunluk açısından mükemmel uyuma sahiptir. Biz de çalışmamızda iskelet sistemi tümörleri cerrahisinde ortaya

ıkan sinir defektlerinin rekonstrüksiyonunda irradiye otogreftlerinin sonuçlarını araştırmayı amaçladık.

Tümörle kontamine sinir dokusunun kullanılabilmesi için öncelikle klinik kullanımı olan; kemik ve tendon dokuları için uygulanan onkolojik sterilizasyon yöntemlerinin uygulanmasını planladık (78, 94, 124). Onkolojik sterilizasyon amacıyla kullanılan literatürde bildirilmiş 6 adet yöntem mevcuttur. Biz de çalışmamızda bu yöntemlerden en sık kullanılan iki yöntem olan; irradiyasyon ve sıvı nitrojen ile dondurma yöntemlerini kullandık (78, 87, 88) (84, 93).

Singh ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmalarda; 50 Gy irradiyasyonun, kaynatmanın, pastörizasyonunun osteosakromlu tümör hücrelerinin %100 ölümüne, eradike olmalarına yol açtıklarını histopatolojik olarak göstermişlerdir (96). Ancak ve arkadaşları 15 hastalık serilerinde geniş eksizyon sonrası tümörlü kemiğe kan ışınlama cihazı ile, 50 Gy tez doz ekstrokorporal radyoterapi verdikten sonra tümörlü kemiği replante ettiklerini, sadece 1 hastalarında lokal nüksün geliştiğini, ancak bunun da replante edilen kemik segmentinden uzaktaki yumuşak dokuda geliştiğini saptadıklarını bildirmişlerdir (78). Hong ve ark. 16 hastasının (125), Araki ve ark. 20 hastasının (79) ve Krieg ve ark. 16 hastasının (126) tedavisinde 50 Gy dozda ekstrakorparal irradyasyon yöntemiyle tedavi etmişlerdir ve lokal nüks vakası görmemişlerdir. Değişik klinik yayınlarda kullanılan ekstrakorporal radyoterapi dozları, 45 Gy'den 300 Gy'e kadar değişiklik göstermektedir.

Radyoterapinin sinir rejenerasyonu üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu alışmalar genellikle sinir yatağına uygulanan radyoterapinin sinir iyileşmesi üzerine etkisini (127, 128), pre-operatif ve post-operatif uygulanan radyoterapinin periferik sinir rejenerasyonunu üzerine etkisini değerlendirmek için yapılmıştır (130, 161, 162). Ancak tümör cerrahisinde ortaya çıkan kontamine sinir dokusu için onkolojik sterilizasyon yöntemi olarak ekstrakorporal radyoterapi ile ilgili yayına rastlanamamıştır. Radyoterapinin sinir iyileşmesi ve greftleri üzerine bir çok çalışma olmasına rağmen sinir otogreftinin ekstrakorporal tek doz radyoterapi sonrası re-implantasyonu ve bunun rejenerasyonunu gözlemleyen bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Biz de çalışmamızda ekstrakorporal radyoterapi ile kemik otogrefti uygulama yöntemini sinir dokusu için planlayarak, ekstrakorparal radyoterapi dozu olarak kliniğimizde ve bir çok merkezde bu yöntem için kullanılan onkolojik açıdan güvenilir değer olan 50 Gy radyoterapi dozu uyguladık (6, 34, 4, 78, 79).

Bir diğerk yöntem olarak; tümör cerrahisinde benzer şekilde onkolojik açıdan güvenilir olan sıvı nitrojen ile devitalizasyon yöntemini uyguladık. Tsuchia ve ark. tarafından tümörle kontamine kemik greftlerinde devitalizasyon için yaptıkları; 20 dakika boyunca sıvı nitrojende bekletilerek dondurma işlemi, sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekleterek çözünme ve en son 10 dakika serum fizyolojikte bekleterek çözünme işlemini sinir üzerinde uyguladık (94).

Periferik sinir hasarı oluşturarak çalışma yapmak için tarif edilen hayvan modelleri arasında; köpekler, kurbağalar, domuzlar, maymunlar, fareler ve sıçanlar sayılabilir. Rejenerasyonun etkin, hızlı, kolay elde edilebilmesi, maliyetinin az olması ve insan periferik sinirine benzerliği nedeniyle sıçan siyatik siniri deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır. Bunun yanında hem motor hem de sensoriyel sinir fonksiyonlarının değerlendirilebildiği bir model olması nedeniyle tercih edilmektedir (131). Bizde bu nedenle çalışmamızda rat siyatik sinir modelini kullandık.

Birçok çalışmada sinir defekt modeli oluşturulması için, rat siyatik sinirinde 10 mm uzunluğunda defekt oluşturulmuştur (132, 133, 134, 153). Bu çalışmalarda sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için çeşitli süreler kullanılsa da, genel olarak 8 haftadan 16 haftaya kadar olan takip süreleri uygulanmıştır (135). Biz de çalışmamızda sinir iyileşmesinin erken dönem sonuçlarını görmek için; deneklerin yarısını 12 hafta, geç dönem sonuçlarını görmek için deneklerin diğer yarısını 16 hafta takip ettik.

Cerrahi gruplar olarak; 1. grup, sinir defektlerinde altın standart tedavi olan sinir otogrefti, 2.grup olarak onkolojik sterilizasyon yöntemi olarak güvenilir olan ve yaygın kullanılan Radyoterapi ile devitalize edilmiş sinir otogrefti, 3.grup olarak ise aynı özelliklere sahip nitrojen ile devitalize edilmiş sinir otogrefti kullanıldı.

Cerrahi teknik olarak sıçan siyatik sinirinde defekt oluşturulma amaçlı çıkartılan sinir bölümü aynı bölgeye greft olarak kullanılmıştır. Her 3 grupta da greft uçlarında onarım epinöral sütür tekniğiyle yapılmıştır. Sıçan deneylerinde de otogreft yöntemlerinde genellikle epinöral sütür tekniği kullanılmaktadır (136).

Uyguladığımız yöntemde sinir greftinin her iki ucu orijinal yerlerine suture edilmiştir. Bu yöntemle yapılan onarımda fasiküller uygun şekilde karşı karşıya gelmektedir. Sinir greftinin ters çevrilerek kullanıldığı bazı yayınlarda sonuçların daha iyi olduğu belirtilmiştir (137,138). Ancak bazı yayınlarda ise greftin ters çevrilmesi yada rotasyonunun fark yaratmadığı belirtilmiştir (139,140). Çalışmamızdaki amaç cerrahi tekniğin değerlendirilmesi değil, hazırlanan otogreftlerin iyileşme potansiyelini değerlendirmek olduğu için greftlerin her iki ucu orijinal yerine suture edilmiştir.

Literatürde rat siyatik siniri greft modelleri ile yapılan çalışmalarda sinir iyileşmesini değerlendirmek amacıyla; Elektrofizyolojik (EMG) değerlendirme, fonksiyonel değerlendirme ve histomorfolojik değerlendirmeler kullanılmıştır (128, 129, 130, 136).

Elektrofizyolojik çalışmalar periferik sinir yaralanması modellerinde en çok başvuru alan değerlendirme yöntemlerinden birisidir (141). Supramaksimal uyartım ile elde edilen bileşik kas aksiyon potansiyel eğrilerinde pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) amplitüd olarak adlandırılır (142). Amplitüd ile uyarıya yanıt veren motor lifler ve innerve olan motor ünitenin boyutu hakkında bilgi elde edilir. Aksonal rejenerasyon arttıkça ve tekrar miyelizasyon oluştuğunda daha fazla sinir lifinde oluşan değişim ile cevap daha senkron olur ve

sonuç olarak daha yüksek amplitüd kazanılır. Rejenerasyon gösteren aksonlar ile reinnerve olan motor ünite sayısı arttıkça bileşik kas aksiyon potansiyeli amplitüdü artar (143). Latans değeri ise uyarım sonrası kasılma potansiyelinin başlaması arasında geçen zamandır. Bu da miyalizasyon için önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Sıçanlardaki siyatik sinir çalışmalarında elektrofizyolojik kayıtların büyük kaslar ile olan komşuluğu nedeniyle gastroknemius kasından alınan kayıtlarda yanılmalar görülebilmesi sebebiyle, ideal olarak interosseöz kaslardan alınması gerekmektedir (143).

Bizde çalışmamızda tüm deneklerimizde EMG değerlendirmesi yaptık. Bu çalışmada bileşik kas aksiyon potansiyel eğrilerinden pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe), gruplar arasında ve her grupta sağlam taraflar ve deney tarafı arasında karşılaştırıldı.

EMG değerlendirilmelerinde, erken dönemde; miyenilizasyon açısından baktığımızda otogreft grubu en iyi değerlere, radyoterapi grubu ikinci iyi değerlere, nitrojen grubu ise en kötü değerlere sahip olduğu görüldü. Aksonal iyileşme açısından ise erken dönemde otogreft ile radyoterapi arasında fark saptanmazken, nitrojen grubunun en kötü değerlere sahip olduğu görüldü. Geç dönem değerlendirilmelerde ise miyelinizasyon anlamında gruplar arasındaki farkın kapandığı ve benzer değerlere sahip olduğu görüldü. Yine geç dönemde aksonal iyileşmede otogreft grubu en iyi grup olarak görüldü. Radyoterapi grubu daha iyi değerlere sahip olmakla birlikte nitrojen grubu ile benzer iyileşme göstermekteydi. Erken dönemde miyelinizasyon ve aksonal iyileşmede nitrojenin olumsuz etkilerinin belirgin olduğu görüldü. Geç dönemde radyoterapi ve nitrojenin özellikle aksonal iyileşme üzerine kötü etkisi görülmüş oldu.

Siyatik sinir çalışmalarında fonksiyonel değerlendirme amacıyla çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. Siyatik fonksiyonel indeks (SFİ) testi bu yöntemlerden bir tanesidir (144). Bu yöntemin dezavantajı; ölçüm tekniği ve araştırmacının hassasiyetine göre değişiklik gösterip yanılma yada yanlış ölçüm yapılma ihtimalinin yüksek olmasıdır. Hayvanların yürüyüş sırasında ayak izleri alınmadan önce belli bir süre eğitimden geçmeleri gerekir, yine yanlış verileri neden olabilecek bir diğer sorunda; etkilenen ekstremitede gelişen istenmeyen kontraktürlerdir. Bu durumda kaslarda reinnervasyon gelişse bile eklemlerdeki hareket kaybı ve kontraktürler nedeniyle düzgün bir adımlama görülmeyebilir. Ayrıca eklem kontraktürlerinin yanı sıra otokanibalizasyon, sürtünme artefaktları, kuyruk ile izin kontaminasyonu da sağlıklı ayak izlerinin elde edilmesini zorlaştırabilmektedir (145).

Bir diğer fonksiyonel değerlendirme yöntemi ise eğimli tablada motor güç değerlendirmesidir. Bu yöntemde denek eğimli tablaya konulur ve kaç derece eğimde tablada tutunabildiği kaydedilir. Bu yöntemin dezavantajı hayvanın 4 ekstremitelerini ve bazen kuyruğunu destek olarak kullanarak eğimli tablada tutunabilmesidir, ancak yoruma açık olmaması hayvanın en son tutunabildiği eğim açısının kaydedilerek değerlendirme yapılabilmesi ise avantajdır. Çalışmamızda da bu sebeplerden dolayı eğimli tablada motor güç değerlendirme yöntemi kullanılmıştır (109).

Tüm deneklerin motor güç değerlendirmesinde cerrahi öncesi döneme göre tüm cerrahi gruplarda istatistiksel olarak anlamlı motor güç kaybı görüldü. Tüm cerrahi gruplarda 3.aydaki değerlendirmeye göre 4.ayda motor güç değerlendirmesinde artış saptandı. Bu sonuç

3 aylık sürenin motor fonksiyon geri dönüşü açısından yetersiz olduğu ve daha uzun süre takiplerin bu değerlendirme için gerekli olduğu sonucuna varıldı. 3.ay ve 4.ay değerlendirmede otogreft grubunda radyoterapi ve nitrojen grubuna göre daha iyi motor fonksiyon değerleri olmasına rağmen her 3 grup arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. EMG ve histolojik değerlendirme sonuçlarından farklı olarak motor fonksiyon değerlendirmesinde fark saptanmamasının sebebi ise; motor fonksiyonların geri dönmesi için daha uzun süreye ihtiyaç duyması , motor fonksiyon değerlendirmesinde kullanılan yöntemin daha kaba ve diğer ekstremitelerin fonksiyonundan etkilenmesi olarak düşünüldü. Ayrıca bu tip çalışmalar da unutulmaması gereken bir başka unsurda periferik sinir rejenerasyonunun zamanla daha da artabileceğidir. Özellikle motor fonksiyon değerlendirilmesi amaçlı daha uzun takip süreli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Greft içerisindeki iyileşmenin sağlanması için, kanlanmanın yeniden oluşmasıyla ilişkilendirilmiştir. Greftin yeniden vaskülerize olması gerekmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda greftin revaskülarizasyonu için ana mekanizmanın içinde bulunduğu yumuşak doku yatağından gelişen revaskülarizasyon olduğu belirtilmiştir (146, 147)

Bir başka çalışmada rat siyatik sinirinde yapılan incelemede 28.günde greft santralinde hipoperfüzyon olsa da ağırlıklı olarak proksimalden olmakla birlikte her iki uçtan sinir içerisine vaskülarizasyon olduğu gösterilmiştir (148).

Mackinnon ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada periferik kanlanmanın bir öneminin olmadığı bildirilmiştir (149).

Charles O. ve arkadaşlarının rat sinirlerinde yapmış oldukları 1.5 cm'lik tibial sinir greft çalışmasında radyasyonun sinir greft vasküleritesi üzerine etkisini araştırmışlar. Greft cerrahisi sonrası post-operatif 46, 66, 86 ve 106 Gy dozlarında eksternal gama irradiyasyon uyguladıkları gruplar ile irradiyasyon uygulamadıkları kontrol grubunu; vasküler yapı sayısı, vasküler yapıların ortalama çapı ve toplam vasküler yapıların alanı bakımından değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak 86 ve 106 Gy irradiyasyon grubunda greft bölümünde ayrıca radyasyon uygulanan tüm grupların distal bölümünde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı vasküler yapı sayısında azalma saptandığı bildirilmiştir. İrradiyasyonun etkisinin doz bağımlı olduğu belirtilmiştir (150).

Biz de çalışmamızda vasküler yapıları her 3 grupta da sayısal olarak değerlendirdik. Greft bölümünde yapılan vasküler yapı değerlendirmesinde; işlem görmemiş otogreft grubunda hem radyoterapi hem de nitrojen uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı damar sayısında yükseklik saptandı. Radyoterapi ve nitrojen grubunda ise benzer sonuçlar görülmekle birlikte erken dönem 3.ay değerlendirmesinde nitrojen grubunda, RT grubuna göre daha düşük sayıda vasküler yapı görüldü ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Greft distal bölümüne baktığımızda ise; 4. aydaki değerlendirmelerde radyoterapi uygulanan gruptaki damar sayısı hem nitrojen grubu hem de otogreft grubuna göre anlamlı oranda düşük görüldü. Bu sonuç sıvı nitrojen ile devitalizasyonun erken dönemde greft revaskülarizasyonu olumsuz etkilediği şeklinde yorumlandı. Bu sonuç literatürde belirtilen, dondurma işlemi uygulanan otogreft ve allogreftlerde gecikmiş revaskülarizasyon ve azalmış aksonal rejenerasyon görüleceği yönündeki bilgi ile benzerlik göstermektedir (136,151,152).

Sonuç olarak çalışmamızda yaptığımız vasküler yapı değerlendirmesinde; özellikle erken dönemde sıvı nitrojen ile hazırlanan grupta, geç dönemde ise radyoterapi grubunda daha fazla olmak üzere her iki devitalizasyon grubunda, fresh otogreft uygulanan gruba göre düşük revaskülerizasyon saptandı. Bu bulgulara literatürle benzerlik görüldü (136,150,151, 152).

Fansa H. ve ark. nın rat siyatik sinirleri üzerine yaptıkları 6 hafta takip süreli çalışmada; kontrollü dondurma işlemine tabii tutulan ve koruyucu madde uyguladıkları sinir greftleri, sıvı nitrojen ile dondurma işlemi yapılan sinir otogreftlerini fresh otogreftini göre değerlendirmişlerdir. Histolojik olarak dondurulduğunda sinir dokusunun yapısal elemanları olan bazal lamina ve perinöral dokunun etkilenmediğini belirtmişlerdir. Tüm dondurma işlemi uygulanan greftlerde kontrol grubuna göre anlamlı oranda akson sayısında ve miyelinizasyonda azalma saptandığı belirtilmiştir. Kontrollü dondurma işlemi uygulanan gruplarda, koruyucu madde kullanımından dolayı fark olmadığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra kontrollü dondurma işlemi uygulanan greftlerde, sıvı nitrojenle dondurma işlemi uygulanan gruba göre daha iyi sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir. Tüm değerlendirmelerde fresh otogreft kontrol grubu değerlerinin daha iyi olduğu gösterilmiştir. Bozulmuş rejenerasyon genel olarak gecikmiş wallerian dejenerasyon ve yavaşlamış revaskülerizasyona bağlanmıştır. Bunun yanında shewann hücrelerinin hayatta kalma oranlarının azalması nörotrofik faktörleri azaltarak erken rejenerasyonu bozduğu tespit edilmiştir (136).

Birçok greft bankalama çalışmasında pre-dejenerasyon, dondurma, liyofilizasyon ve irradiasyon ile birlikte liyofilizasyon metodları kullanılarak shewann hücreleri ve endotel hücrelerini azaltma ve yok etmeye yoğunlaşmıştır (154, 155). Bunun yanında in vivo çalışmalarda ise genel olarak uzun defektlerde başarılı aksonal rejenerasyon için bu hücrelerin canlılığı üzerine çalışılmaktadır (156, 157). Shewann hücreleri özellikle erken rejenerasyonda, aksonal rejenerasyon için gerekli nörotrofik faktörlerin salınımını sağlamaktadır (158).

Periferik sinir onarımı yapılan çalışma modellerinde histolojik değerlendirmenin ana amacı; özellikle myelinli sinir liflerinde meydana gelen aksonal rejenerasyon, sinir greftindeki revaskülerizasyon ve greftte oluşan fibrozis ve apoptozisin değerlendirilmesidir.

Biz de çalışmamızda myelinli sinir lifi değerlendirmesi, vasküler yapı değerlendirmesi ve greftteki fibrozis ve apoptozisi değerlendirmelerini yaptık.

Sinir grefti bölümünde yapılan 3.aydaki ve 4.aydaki miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde otogreft grubunda sinir lifi sayısı radyoterapi ve nitrojen grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulundu. 3. aydaki yapılan değerlendirmede radyoterapi ve nitrojen grubu arasında anlamlı fark saptanmazken, 4.ayda yapılan değerlendirmede nitrojen grubunda sinir lifi sayısı bu bölümde radyoterapi grubuna göre anlamlı oranda yüksek saptandı.

Sinir grefti uygulanan bölümün distalinde 3.ay ve 4.ayda yapılan miyelinli sinir lifi değerlendirmesinde otogreft grubu, radyoterapi ve nitrojen grubuna göre anlamlı oranda yüksek miyelinli sinir lifi sayısına sahip olduğu görüldü ($P=0,02$ ve $p<0.001$). Yine bu

bölümdeki değerlendirmede 3.ayda radyoterapi ve nitrojen grubu arasında anlamlı fark saptanmazken 4.aydaki değerlendirmede radyoterapi grubu, nitrojen grubuna göre anlamlı yüksek saptandı. Nitrojen grubundaki bu değişim; diğer gruplara göre rejenerasyonda azalma olarak yorumlandı ve nitrojen grubunda daha belirgin olan fibrozise bağlı olduğu düşünüldü.

Yapılan fibrozis değerlendirmesinde özellikle nitrojen grubunun tüm bölümlerinde daha belirgin olmak üzere, otogreft ve radyoterapi gruplarının özellikle greft ve greft distali bölümlerinde aksonal kayba paralel olarak endonöral fibrozis ve yer yer fibrotik odaklar izlendi.

Histolojik değerlendirmelere baktığımızda sinir defeklerinde altın standart tedavi yöntemi olan otogreft grubunun diğer gruplara göre daha iyi olduğunu gördük. Otogreft grubu düzeyinde olmasada radyoterapi ve sıvı nitrojen grubunda da aksonal rejenerasyon olduğunu saptadık. Erken dönemde benzer değerlere sahip olmakla birlikte, geç dönemde greft distalinde yapılan değerlendirmede radyoterapi grubunun nitrojen grubuna göre daha iyi değerlere sahip olduğunu gördük.

Bu sonuçlar radyoterapi ve sıvı nitrojenle devitalize edilmiş sinir otogreftlerinin aksonal rejenerasyonu olumsuz etkilediğini göstermektedir ve bu bulgular literatür ile benzerlik göstermektedir (136, 127, 130).

Literatürde yapılan rat siyatik sinir çalışmasında greft uzunluğu arttıkça aksonal rejenerasyonda azalma saptandığı bildirilmiş. Ayrıca tüm greft boylarında taze otogreftlerin, aselüler allogreftlere üstün olduğu belirtilmiştir (159).Yine yapılan benzer çalışmalarda taze sinir greftlerinin aselüler greftlere göre daha başarılı olduğu belirtilmiştir (46, 160).

Giusti G. ve ark. rat siyatik sinir 10mm lik modelinde yaptıkları çalışmada; taze otogreft, işlem görmüş allogreft ve kollejen kondüit gruplarını karşılaştırmışlar.12. hf ve 16.haftada; tibialis anterior kas gücü ve kas ağırlığı ölçümü, EMG ölçümü, peroneal sinir histolojik değerlendirmesi ve ayak bileği kontraktürü değerlendirmesi yapmışlardır. Sonuç olarak; otogreft grubunun, allogreft ve kollajen kondüite göre üstün olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 16 haftadan daha uzun süre takiplerin sinir grefti modellerinde daha iyi değerlendirme imkanı sağlayabileceğini belirtmişlerdir (135).

Çalışmamızın eksik yanlarına baktığımızda ise; daha uzun süreli bir çalışma planlanıp, özellikle motor iyileşmenin daha iyi değerlendirilebileceği iyileşme süresi sağlanabilirdi. Ayrıca histolojik değerlendirilmelerde elektron mikroskopu kullanılabilir, ek yürüme analizleri bazı çalışmalarda uygulanmış kas ağırlığı ölçümleri, ayak bileği kontraktürlerinin değerlendirilmesi yapılarak, sinir iyileşmesi üzerine daha güçlü yorumlar yapmamız sağlanabilirdi. Bununla birlikte çalışmamızın, benzer sinir greft modeli çalışmaları da göz önünde bulundurulduğunda birçok güçlü yanı mevcuttur. Sinir iyileşmesinin değerlendirilmesinde; histomorfolojik, elektrofizyolojik ve fonksiyonel değerlendirme parametrelerinin üçü birlikte kullanılmıştır. Erken ve geç dönem değerlendirmelerini yapabilmek için, yeterli sayıda denek kullanılabilmektedir.

SONUÇ

1) Deneysel siyatik sinir greft modelinde; otogreft modelinin, RT ve sıvı nitrojen ile devitalize edilen sinir otogreftlerine daha üstün yöntem olduğu gösterildi.

Ayrıca radyoterapi ve sıvı nitrojenle devitalize edilmiş sinir otogreftlerinin aksonal rejenerasyonu olumsuz etkilediği gösterildi. Yapılan fibrozis ve apoptozis değerlendirmesinde tüm cerrahi gruplarda saptanmakla birlikte nitrojen grubunda daha belirgin oranda olduğu görüldü. Erken dönem ve geç dönem fonksiyonel iyileşmenin değerlendirmesinde; otogreft grubunda, radyoterapi ve nitrojen grubuna göre daha iyi motor fonksiyon değerleri olmasına rağmen, her 3 grup arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı.

2) Onkolojik devitalizasyon yöntemi olan RT ve sıvı nitrojen ile hazırlanan sinir otogreftlerinin altın standart yöntem olan fresh otogreft yöntemi kadar iyi olmasa da iyileşme potansiyeli olduğu gösterildi.

Bu iki yöntemin elektrofizyolojik ve fonksiyonel motor güç değerlendirmeleri benzer olmakla birlikte RT grubunun; histolojik değerlendirme olarak nitrojen grubuna göre daha iyi olduğu gösterildi.

3) Deneysel siyatik sinir grefti iyileşmesi modelinde; fonksiyonel değerlendirmedeki motor güç değerlendirmesinin 4. ayda istenilen düzeyde olmadığını ve daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koydu.

4) Onkolojik sterilizasyon yöntemi olan RT ve sıvı nitrojenle hazırlanan sinir otogreftlerinin iyileşme potansiyeli düşük olsa da, tümör cerrahisinde ortaya çıkan sinir defektlerinde kullanılabileceğini göstermiştir.

5) Rat modelinde yaptığımız bu çalışmanın klinik uygulamasında, yansımalarının hangi düzeyde olacağını öngörmek mümkün değildir. Bu konuyla ilgili daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Fuchs B, Ossendorf C, Leerapun T, Sim FH: Intercalary segmental reconstruction after bone tumor resection. *EJSO* 34 (2008) 1271-1276
- 2- Mathew R, Di Caprio MD, Gary E, Friedlaender MD: Malign bone tumors; Limb sparing versus amputations. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2003; 11: 25-37
- 3- Böhm P, Fritz J, Thiede S, Budach W: Reimplantation of extracorporeal irradiated bone segments in musculoskeletal tumor surgery: clinical experience in eight patients and review of the literature. *Langenbecks Arch Surg* (2003) 387:355-365
- 4- B. T. Rougraff, M. A. Simon, J. S. Kneisl, D. B. Greenberg, and H. J. Mankin, "Limb salvage compared with amputation for osteosarcoma of the distal end of the femur. Along-term oncological, functional, and quality-of-life study.," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 76, no. 5, pp. 649-656, May 1994.
- 5- Campanacci M, Bacci G, Bertoni F, Picci P, Minuttillo A, Franceschi C. The treatment of osteosarcoma of the extremities: twenty year's experience at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *Cancer* 1981;48:156-159.
- 6- Lundborg G. A 25-Year Perspective of Peripheral Nerve Surgery: Evolving Neuroscientific Concepts and Clinical Significance. *J. Hand Surg* 2000;25(3):391-414.
- 7- A. M. Moore, W. Z. Ray, K. E. Chenard, T. Tung, and S. E. Mackinnon, "Nerve allotransplantation as it pertains to composite tissue transplantation," *Hand*, vol. 4, no. 3, pp. 239–244, 2009.
- 8- Yıldırım M. *Klinik Nöroanatomî*. 2016; birinci baskı sf. 2.
- 9- Pınar L. *Sinir ve Kas Fizyolojisi Temel Bilgileri* 2015; üçüncü baskı sf. 25.
- 10- Terzis JK., Smith KL., Repair and grafting of the peripheral nerve. McCarthy JG, May JW, Litter WJ, editors. *Plastic surgery*. Philadelphia: WB Saunders; 1990. Volume 1, p: 630–97.
- 11- Shenaq SM., Kim JYS., Repair and grafting of peripheral nerve. In: Mathes SJ, editor. *Plastic surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. Volume 1, p: 719–43.

- 12- Avcı G, Akan M, Yıldırım S, Aköz T. Sinir Onarımı ve Greftleme. T Klin Tıp Bilimleri 2002;22:428-7
- 13- Greenberg MS. Handbook of neurosurgery. 2006; sixth edition p.548-579.
- 14- Brushart TM., Nerve repair and grafting. In. Green DP, Hotchkiss RN, Pederson WC, editors. Green's operative hand surgery. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1999. Volume 2; p: 1381- 403.
- 15- Seckel BR., Enhancement of peripheral nerve regeneration. Muscle Nerve. 1990;13(9):785–800.
- 16- Danielsen N., Pettmann B., Vahlsing HL., Manthorpe M., Varon S., Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. J Neurosci Res. 1988;20(3), 320-30.
- 17- Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. Brain 1951;74: 491-516.
- 18- Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. Ann Plast Surg 1989;22: 257-73.
- 19- Lundborg G., Nerve regeneration and repair. A review. Acta Orthop Scand. 1987;58(2):145–69.
- 20- Bradley, W. G. And Asbury, A. K. (1970) Duration of synthesis phase in neurilemma cells in Mouse sciatic nerve degeneration. Exp. Neurol. 26,275-282.
- 21- Demircan N, Zileli M. Periferik Sinir Cerrahisi 2008; birinci baskı sf.105.-107.
- 22- Merle M, Amend P, Cour C, Foucher G, Michon J. Microsurgical repair of peripheral nerve lesions.1986;2:17-26.
- 23- Olson L, Backman L, Ebendal T, et al. Role of growth factors in degeneration and regeneration in the central nervous system; clinical experiences with NGF and Parkinson's and Alzheimer's diseases. J Neurol1994;242:12-5.
- 24- Chen H, He Z, Tessier- Laigne M. Axon guidance mechanisms: semaphorins as simultaneous repellent and anti-repellents. Nature Neurosci 1998;436-9.

- 25- Erdoan D. Sinir Dokusu. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. İstanbul. Barı/Appleton-Lange 1993;196-231
- 26- Frostick SP, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 1998; 18:397-405.
- 27- Badalamente MA, Hurst LC, Paul SB, Stracher A. Enhancement of neuromuscular recovery after nerve repair in primates. *J Hand Surg* 1987; 12B:211-7.
- 28- Lundborg G. Nerve injury and repair. Edinburg: Churchill Livingstone, 1988:1-22.
- 29- Longo FM, Yang T, Hamilton S, et al. Electromagnetic fields influence NGF activity and levels following sciatic nerve transection. *J Neurosci Res* 1999;55:230-7.
- 30- Campell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology* 2008;119: 1951–1965.
- 31- Abreu LB. Upper extremity nerve lesions (diagnosis, indications, surgical techniques). *Sao Paulo Medical Journal* 1997;115(4): 1495-1507.
- 32- Matsuyama T., Mackay M., Midha R., Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review., *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2000 Apr;40(4):187-99.
- 33- Mackinnon SE., Surgical management of the peripheral nerve gap. *Clin Plast Surg*. 1989;16, 587-603.
- 34- Pabari A, Yang SY, Seifalian AM, Mosahebi A., Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*., 2010 Dec;63(12):1941-8.
- 35- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1944". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013. Web. 13 Jul 2013. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1944/
- 36- Siemionow M., Zielinski M., Meirer R., The single-fascicle method of nerve grafting. *Ann Plast Surg*., 2004 Jan;52(1):72-9.
- 37- Millesi H., Techniques for nerve grafting. *Hand Clin*. 2000;16:73–91.
- 38- Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Inside-out vein graft and insideout artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery* 2003;23: 66-71.

- 39- Strauch B, Ferder M, Lovelle-Allen S, Moore K, Kim DJ, Llena F. Determining the maximal length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1996;12: 521-527.
- 40- Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat* 1997;190: 57-71.
- 41- Brandt J, Dahlin LB, Kanje M, Lundborg G. Spatiotemporal progress of nerve regeneration in a tendon autograft used for bridging a peripheral nerve defect. *Exp Neurol* 1999;160: 386-393.
- 42- P. Konofaos and J. P. ver Halen, "Nerve repair by means of tubulization: past, present, future," *Journal of Reconstructive Microsurgery*, vol. 29, no. 3, pp. 149–164, 2013.
- 43- Battiston B, Tos P, Geuna S. Alternative techniques for peripheral nerve repair: conduits and end-to-side neurorrhaphy. *Acta Neurochir Suppl* 2007; 100: 43-50.
- 44- Moradzadeh A, Borschel GH, Luciano JP, Whitlock EL, Hayashi A, Hunter DA, Mackinnon SE. The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration. *Exp Neurol* 2008;212: 370-376.
- 45- Millesi H. Basic principles of nerve grafting. Georgiade S. G, Riefkohl R, Levin L. S. *Georgiade Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery*. Baltimore: Williams&Wilkins. 1997:6573
- 46- Gulati AK. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg* 1988;69:117-23.).
- 47- M. Siemionow and G. Brzezicki, "Chapter 8 current techniques and concepts in peripheral nerve repair," *International Review of Neurobiology*, vol. 87, no. C, pp. 141–172, 2009.
- 48- Breidenbach WC. Vascularized nerve grafts. A practical approach. *Orthop Clin North Am* 1988,19:81-9.)
- 49- G. I. Taylor and F. J. Ham, "The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 57, no. 4, pp. 413–425, 1976.
- 50- Chiu D, Straugh B: A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defectss of 3cm or less. *Plast Reconstr Surg* 86:928-934, 1990

- 51- Tang JB, Shi D, Zhou H: Vein conduits for repair of nerves with a prolonged gap or in unfavorable conditions. *Microsurgery* 16:133-137, 1995
- 52- Wang X, Hu W, Cao Y et al. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft, *Brain* 2005;128:1897-1910.
- 53- Bini TB, Gao S, Xu X et al. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly (l-lactide-co- glycolide) biodegradable polymer fibers. *J Biomed Mater Res* 2004;68:286-95.
- 54- Sufan W, Suzuki Y, Tanihara M et al. Sciatic nerve regeneration through alginate with tubulation or nontubulation repair in rat. *J Neurotrauma* 2001;18(3):329-8.
- 55- Michael C, Feng Z, Lineaweaver WC. Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg* 2006;57(4):462-471.
- 56- Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *1988;82(5):849-56.*
- 57- Huang YC, Huang YY. Biomaterials and strategies for nerve regeneration. *Artif Organs* 2006;30(7):51-22.
- 58- Hadlock T, Sundback C, Hunter D et al. A polymer foam conduit seeded with schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 2000;6(2):119-27.
- 59- Hudson T, Gregory RDE, Christine ES. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Orthopedic Clin North Am* 2000;31(3):485-98.
- 60- Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T et al. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Research* 2000;868:315-328.
- 61- Taras JS, Nanavati V, Steelma P. Nerve conduits. *J Hand Ther* 2005;18(2):191-98.
- 62- Vaishali B, Doolabh M, Hertl C et al. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev Neurosci* 1996;7:47-84.
- 63- Atchabachian A, Genden EM, Mackinnon SE et al. Regeneration through long nerve grafts in swine model. *Microsurgery* 1998;18:379-82.
- 64- Albert, E. (1885) Einige operationen an nerven. *Wien. Med. Presse* 26, 1285-1288
- 65- Huber, G.C. (1895) A study of the operative treatment for loss of nerve substance in peripheral nerves

- 66- Mackinnon SE, Nakao Y. Repair and reconstruction of peripheral nerve injuries. J Orthop Sci 1997;2:357-65.
- 67- Plast Reconstr Surg. 2001 May;107(6):1419-29. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. Mackinnon SE¹, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP
- 68- Neblett CR, Morris JR, Thomsen S. Laser-assisted microsurgical anastomosis. Neurosurgery 1986; 19:914-34.
- 69- Hebebrand D, Zohman G, Jones NF. Nerve xenograft transplantation: immunosuppression with FK-506 and RS-61443. J Hand Surg 1997;22B:304-7.
- 70- Evans, P.J., Awerbuck, D.C., Mckee, N.H., wade, J.A. and Mackinnon, S.E. (1992) Isometric contractile function following nerve grafting: a study of graft storage. Muscle and Nerve accepted)
- 71- J Bone Joint Surg Am. 1991 Feb;73(2):172-85. Regeneration through nerve allografts in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Tajima K¹, Tohyama K, Ide C, Abe M.
- 72- J Neural Transplant Plast. 1992 Jan-Mar;3(1):39-49. Peripheral nerve transplantation: the effects of predegenerated grafts and immunosuppression. Trumble TE¹.
- 73- Transplant Proc. 1971 Mar;3(1):591-3. Peripheral nerve allografts: modifications of allograft reaction using experimental model in rats. Verhoog BD, van Bekkum DW.
- 74- Neurosurgery. 1984 Nov;15(5):690-3. Peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration across pretreated nerve allografts. Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Kline D, Hunter D.
- 75- Prog Neurobiol. 1994 Jun;43(3):187-233. The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. Evans PJ¹, Midha R, Mackinnon SE.
- 76- Neurosurgery. 1984 Feb;14(2):167-71. Peripheral nerve allograft: an immunological assessment of pretreatment methods. Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Kline D, Hunter D.
- 77- Prog Neurobiol. 1990;34(1):1-38. Nerve regeneration through allogeneic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. Ide C¹, Osawa T, Tohyama K.
- 78- Anacak Y, Sabah D, Demirci S, Kamer S: Intraoperative extracorporeal irradiation and re-implantation of involved bone for the treatment of musculoskeletal tumors. J. Exp. Clin. Cancer Res., 26,4, 2007 pg.571-574
- 79- Araki N, Myoui A, Karatsu S, Hashimoto N, Inoue T, Kudavara I, Ueda T, Yoshikawa H, Masaki N, Uchida A: Intraoperative Extracorporeal Autogenous Irradiated Bone Grafts in Tumor Surgery. Clinical Orthopaedics and Related Research, number:368 pp.196-206 1999

- 80- Uyttendaele D, Schryver AD, Claessens H, Roels H, Berkvens P, Mondelaers W: Limb conservation in primary bone tumours by resection, extracorporeal irradiation and re-implantation. *J Bone Joint Surg (Br)* 1988;70-B:348-53.
- 81- Davidson AW, Hong A, McCarthy SW, Stalley PD: En-Bloc resection, extracorporeal irradiation, and re-implantation in limb salvage for bony malignancies. *Journal of Bone and Joint Surgery(Br)*; jun 2005;87-B,6,pg.851-857
- 82- Hatano H, Ogose A, Hotta T, Endo N, Umezu H, Morita T: Extracorporeal irradiated autogenous osteochondral grafts: A histological Study. *Journal of Bone and Joint Surgery(Br)*; Jul 2005; 87-B, 7; pg.1006-11
- 83- Tanzawa Y, Tsuchiya H, Yamamoto N, Sakayama K, Minato H, Tomita K: Histological examination of frozen autograft treated by liquid nitrogen removed 6 years after implantation. *J Orthop Sci* (2008) 13:259-264
- 84- Nishida J, Shimamura T: Methods of reconstruction for bone defect after tumor excision: A review of alternatives. *Med Sci Monit*, 2008; 14(8): RA107-113
- 85- Cooper IS: Cryogenic surgery of the basal ganglia. *JAMA* 1962; 181:600–4.
- 86- Freezing Bone Without ExcisionAn Experimental Study of Bone-Cell Destruction and Manner of Regrowth in Dogs Andrew A. Gage, MD; George W. Greene Jr., DDS; Mirdza E. Neiders, DDS, MS; Fred G. Emmings, DDS *JAMA*. 1966;196(9):770-774. doi:10.1001/jama.1966.03100220062020.)
- 87- Yamamuro T, Kotoura Y. Intraoperative radiation therapy for osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 1993;62:177-83.
- 88- Tsuboyama T, Toguchida J, Kotoura Y, et al. Intra-operative radiation therapy for osteosarcoma in the extremities. *Int Orthop* 2000;24:202-7.
- 89- Lauritzen C, Alberius P, Santanelli F, et al. Repositioning of craniofacial tumorous bone after autoclaving. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1991;25:161-5.
- 90- Thompson VP, Steggall CT. Chondrosarcoma of the proximal portion of the femur treated by resection and bone replacement: a six-year result. *J Bone Joint Surg [Am]* 1956;33-A:357-67.
- 91- Ehara S, Nishida J, Shiraishi H, Tamakawa Y. Pasteurized intercalary autogenous bone graft: radiographic and scintigraphic features. *Skeletal Radiol* 2000;29: 335-9.
- 92- Manabe J, Kawaguchi N, Matsumoto S. Pasteurized autogenous bone graft for reconstruction after resection of malignant bone and soft tissue tumors: imaging features. *Semin Musculoskelet Radiol* 2001;5:195-201.
- 93- Tsuchiya H, Nishida H, Srisawat P, Shirai T, Hayashi K, Takeuchi A, Yamamoto N, Tomita K: Pedicle frozen autograft reconstruction in malignant bone tumors. *J Orthop Sci* (2010) 15:340-349

- 94- Tsuchiya H, Wan SL, Sakayama K, Yamamoto N, Nishida H, Tomita K: Reconstruction using an autograft containing tumour treated by liquid nitrogen. *Journal of Bone and Joint Surgery(Br)*. Feb 2005; 87B, 2, pg.218-225
- 95- Shin S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shimizu K, Kaku N, Nagatomi H, Masumi S: Biomechanical properties of heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* (2005) 125:1-5
- 96- Singh VA, Nagalingam J, Saad M, Pailoor J: Which is the best method of sterilization of tumour bone for reimplantation? A biomechanical and histopathological study. *BioMedical Engineering OnLine* (2010) Sep.10;9:48
- 97- Marcove RC, Miller TR. The treatment of primary and metastatic localized bone tumors by cryosurgery. *Surg Clin North Am* 1969;49:421-30.
- 98- Marcove RC. A 17-year review of cryosurgery in the treatment of bone tumors. *Clin Orthop* 1982;163:231-4.
- 99- Harris L, Griffiths J. Relative effects of cooling and warming rates on mammalian cells during the freeze-thaw cycle. *Cryobiology*. 1977;14:662-9.
- 100- Miller RH, Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. *Cryobiology*. 1976;13:404-14.
- 101- Schreuder HW, van Egmond J, van Beem HB, Veth RP. Monitoring during cryosurgery of bone tumors. *J Surg Oncol*. 1997;65:40-5.
- 102- Schargus G, Winckler J, Schröder F, Schöfer B. Cryosurgical devitalization of bone and its regeneration. An experimental study with animals. *J Maxillofac Surg*. 1975;3:128-31.
- 103- Marcove RC, Searfoss RC, Whitmore WF, Grabstald H. Cryosurgery in the treatment of bone metastases from renal cell carcinoma. *Clin Orthop*. 1977;127:220-7.
- 104- Marcove RC, Lyden JP, Huvos AG, Bullough PG. Giant cell tumors treated by cryosurgery. *J Bone Joint Surg*. 1973;55:1633-44.
- 105- Malawer MM, Bickels J, Meller I, Buch R, Kollender Y. Cryosurgery in the treatment of giant cell tumor. A long term follow-up study. *Clin Orthop*. 1999;359:176-88.
- 106- Schreuder HW, Veth RPH, Pruszczynski M, Lemmens JAM, Koops HS, Molenaar WM. Aneurysmal bone cysts treated by curettage, cryotherapy and bone grafting. *J Bone Joint Surg*. 1997;79:20-5.
- 107- Marcove RC, Zahr KA, Huvos AG, Ogihara W. Cryosurgery in osteogenic sarcoma: report of three cases. *Comp Ther* 1984;10:52-60.
- 108- *Ann Surg Oncol*. 2010 Feb;17(2):401-6. doi: 10.1245/s10434-009-0745-5. Epub 2009 Oct 20. Complete femoral nerve resection with soft tissue sarcoma: functional outcomes. Jones KB¹, Ferguson PC, Dehesi B, Riad S, Griffin A, Bell RS, Wunder JS.

- 109- J Neurosurg. 1977 Oct;47(4):577-81. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. Rivlin AS, Tator CH.
- 110- Int J Exp Diabetes Res. 2000;1(2):131-43. Slowing of motor nerve conduction velocity in streptozotocin-induced diabetic rats is preceded by impaired vasodilation in arterioles that overlie the sciatic nerve. Coppey LJ¹, Davidson EP, Dunlap JA, Lund DD, Yorek MA.
- 111- Çakalağaoğlu F, Tissue processing, Aegean Pathology Journal 2005;29-34.
- 112- Matsuda Y1, Fujii T, Suzuki T, Yamahatsu K, Kawahara K, Teduka K, Kawamoto Y, Yamamoto T, Ishiwata T, Naito Z. Comparison of fixation methods for preservation of morphology, RNAs, and proteins from paraffin-embedded human cancer cell-implanted mouse models. J Histochem Cytochem. 2011 Jan;59(1):68-75.
- 113- Ekicioğlu G, Özkan N, Şalvaazar E. Hematoksilen-Eozin (hematoxylin-eosin) (H&E), Aegean Pathology Journal 2005;2:58-61.
- 114- DEMİR Ramazan, Selma YILMAZER, Melek ÖZTÜRK, İsmail ÜSTÜNEL, Necdet DEMİR, Emin Türkay KORGUN, Gökhan AKKOYUNLU, Histolojik Boyama Teknikleri, Palme Yayıncılık, Ankara, 2001.
- 115- Marsha Goldstein, Simon Watkins. Immunohistochemistry. Curr Protoc Mol Biol 2008;81:14.6.1-14.6.23.
- 116- Li, Z. Zuo Isoflurane preconditioning improves short-term and long-term neurological outcome after focal brain ischemia in adult rats Neuroscience Thursday, August 06, 2009L.
- 117- Lundborg G, Rosen B, Dahlin L, Holmberg J, Rosen I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. J Hand Surg (br) 2004;29: 100107.
- 118- Weber A, Breidenback WC, Brown RE, Jabaley ME, Mass DP. A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. Plast reconstr Surg 2000;106: 1036-1045.
- 119- Rosen JM, Padilla JA, Nguyen KD. Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in a rat model. Ann Plast Surg 1990;25: 375-387.
- 120- Braga-Silva J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. J Hand Surg 1999;24: 703-706.
- 121- Merle M, Dellon AL, Campbell JN, Chang PS. Complications from silicopolymer intubulation of nerves. Microsurgery 1989;10: 130-133.

122- K. L. Colen, M. Choi, and D. T. W. Chiu, "Nerve grafts and conduits," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 124, no. 6, supplement, pp. e386–e394, 2009.

123- B. J. Pfister, T. Gordon, J. R. Loverde, A. S. Kochar, S. E. Mackinnon, and D. Kacy Cullen, "Biomedical engineering strategies for peripheral nerve repair: surgical applications, state of the art, and future challenges," *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, vol. 39, no. 2, pp. 81–124, 2011.

124- *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2014 Dec;24(8):1539-47. doi: 10.1007/s00590-014-1412-5. Epub 2014 Jan 29. Experimental remodelling of extracorporeal irradiated autogenous and allogenic patellar grafts. Gasimov E¹, Sabah D, Yilmaz O, Kecici B, Oktem G.

125- Hong A, Stevens G, Stalley P, Pendlebury S, Ahern V, Ralston A, Estoesta E, Barrett I: Extracorporeal irradiation for malignant bone tumors. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 50, No.2 pp.441-447, 2001

126- Krieg AH, Davidson AW, Stalley PD: Intercalary femoral reconstruction with extracorporeal irradiated autogenous bone graft in limb-salvage surgery. *Journal of Bone and Joint Surgery*; Mar 2007; 89, 3, pg.366

127- *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1982 Jun;7(3):161-4. The effect of irradiation on nerve grafting. Stearns MP.

128- *Ann Plast Surg*. 1998 Mar;40(3):277-82. The effects of preoperative irradiation on peripheral nerve regeneration. Brandt K¹, Evans GR, Gürlek A, Savel T, Lohman R, Nabawi A, Williams J, Patrick CW, Ang KK, Lembo T, Tinkey P, Cromeens D.

129- Özer H, Deneysel siyatik sinir yaralanmasında poli(3-hidroksibütirat) (PHB) ve Chitosan kaplı tübüler greftler ile birlikte mezenşimal kök hücre kullanımının aksonal rejenerasyona etkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirurji Uzmanlık tezi, Ankara, 2013.

130- *Plast Reconstr Surg*. 2003 May;111(6):2023-4. Peripheral nerve regeneration: the effects of postoperative irradiation. Evans GR¹, Brandt K.

131- Varejão AS., Meek MF., Ferreira AJ., Patrício JA., Cabrita AM., Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001 Jul 15;108(1):1-9.

132- Kalbermatten DF., Erba P., Mahay D, Wiberg M., Pierer G., Terenghi G., Schwann Cell Strip for Peripheral Nerve Repair. *J Hand Surg Eur Vol*. 2008 Oct;33(5):587-94.

- 133- Kilic A., Konopka G., Akelina Y., Regalbuto R., Tang P., Ipsilateral, cabled sural nerve for a sciatic nerve defect: An experimental model in the rat. *J Neurosci Methods*. 2011 Apr 15;197(1):137-42.
- 134- Karagoz H., Ulkur E., Uygur F., Senol MG., Yapar M., Turan P., Celikoz B., Comparison of regeneration results of prefabricated nerve graft, autogenous nerve graft, and vein graft in repair of nerve defects. *Microsurgery*. 2009;29(2):138-43.
- 135- *J Bone Joint Surg Am*. 2012 Mar 7;94(5):410-7. doi: 10.2106/JBJS.K.00253. Return of motor function after segmental nerve loss in a rat model: comparison of autogenous nerve graft, collagen conduit, and processed allograft (AxoGen). Giusti G¹, Willems WF, Kremer T, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY.
- 136- *Muscle Nerve*. 2000 Aug;23(8):1227-33. Cryopreservation of peripheral nerve grafts. Fansa H¹, Lassner F, Kook PH, Keilhoff G, Schneider W.
- 137- Tzou CH., Aszmann OC., Frey M., Bridging peripheral nerve defects using a single-fascicle nerve graft. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Oct;128(4):861-9.
- 138- Ansselin AD., Davey DF., The regeneration of axons through normal and reversed peripheral nerve grafts. *Restor Neurol Neurosci*. 1993 Jan 1;5(3):225-40.
- 139- Sotereanos DG., Seaber AV., Urbaniak JR., Spiegel DA., Sotereanos D. , Anthony DC., Reversing nerve-graft polarity in a rat model: the effect on function. *J Reconstr Microsurg*. 1992 Jul;8(4):303-7.
- 140- Stromberg BV., Vlastou C., Earle AS., Effect of nerve graft polarity on nerve regeneration and function. *J Hand Surg Am*. 1979 Sep;4(5):444-5.
- 141- *BMC Biotechnol*. 2008 Apr 11;8:39. doi: 10.1186/1472-6750-8-39. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. Panseri S¹, Cunha C, Lowery J, Del Carro U, Taraballi F, Amadio S, Vescovi A, Gelain F.
- 142- Chung MS., Baek GH., Oh JH., Lee YH., Bin SW, Gong HS., The effect of muscle length and excursion on muscle contracture after tendon injury: A study in rabbit soleus muscles. *Injury*. 2007;38(10):1139–45.
- 143- Wolthers M., Moldovan M., Binderup T., Schmalbruch H., Krarup C., Comparative electrophysiological, functional and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005;25(6):508–19.

144- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83: 129136

145- Özbayoğlu A. C., Deneysel Sıçan Siyatik Sinirinde Ezilme Tarzı Yaralanma Modelinde Sinir Rejerasyonunda Trombositten Zengin Plazmanın Etkileri. (Uzmanlık Tezi), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,(2008).

146- Prpa B., Huddleston PM., An KN., Wood MB., Revascularization of nerve grafts: a qualitative and quantitative study of the soft-tissue bed contributions to blood flow in canine nerve grafts. *J Hand Surg Am.* 2002 Nov;27(6):1041-7.

147- Zhou J., Tang Z., Xiao Y., An effect of the omental wrapping on revascularization and nerve regeneration of the artificial nerve graft. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2006 Aug;20(8):797-800.

148- Chalfoun C., Scholz T., Cole MD., Steward E., Vanderkam V., Evans GR., Primary nerve grafting: A study of revascularization. *Microsurgery.* 2003;23(1):60-5.

149- Best TJ., Mackinnon SE., Midha R., Hunter DA., Evans PJ., Revascularization of peripheral nerve autografts and allografts. *Plast Reconstr Surg.* 1999 Jul;104(1):152-60.

150- X5) *J Reconstr Microsurg.* 2005 Aug;21(6):397-401.Effects of irradiation on nerve graft vasculature.Oh C¹, George LT, Hunter DA, Evans GR, Brandt KE.

151- *Muscle Nerve.* 1998 Nov;21(11):1507-22. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. Evans PJ¹, Mackinnon SE, Levi AD, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, Midha R.

152- *J Reconstr Microsurg.* 1992 Nov;8(6):437-43; discussion 445-6.Cryopreserved allogeneic vessel and nerve grafts: hind-limb replantation model in the rat.Hirasé Y¹, Kojima T, Uchida M, Takeishi M.

153- Teymur H, Sinir grefti ile periferik sinir rekonstrüksiyonunda trombositten zengin plazmanın (PRP-platelet rich plasma) iyileşmeye etkisi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Uzmanlık tezi, İzmir, 2013.

154- *Muscle Nerve.* 1994 Oct;17(10):1190-200.Isometric contractile function following nerve grafting: a study of graft storage.Evans PJ¹, Awerbuck DC, Mackinnon SE, Wade JA, McKee NH.

155- *Muscle Nerve.* 1995 Oct;18(10):1128-38. Regeneration across preserved peripheral nerve grafts.Evans PJ¹, Mackinnon SE, Best TJ, Wade JA, Awerbuck DC, Makino AP, Hunter DA, Midha R.

156- Neuropathol Appl Neurobiol. 1986 Jan-Feb;12(1):27-46. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. Hall SM.

157- J Reconstr Microsurg. 1997 Apr;13(3):215-25. Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair. Terzis JK¹, Sun DD, Thanos PK.

158- Neurosci Res. 1996 Jun;25(2):101-21. Peripheral nerve regeneration. Ide C¹.

159- Exp Neurol. 2013 Sep;247:165-77. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.04.011. Epub 2013 May 3. Limited regeneration in long acellular nerve allografts is associated with increased Schwann cell senescence. Saheb-Al-Zamani M¹, Yan Y, Farber SJ, Hunter DA, Newton P, Wood MD, Stewart SA, Johnson PJ, Mackinnon SE.

160- J Neurosurg. 1988 Jan;68(1):B117-23. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. Gulati AK¹.

161- Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000 Oct 1;48(3):737-43. An analysis of facial nerve function in irradiated and unirradiated facial nerve grafts. Brown PD¹, Eshleman JS, Foote RL, Strome SE.

162- Acta Neuropathol. 1973 Jan 30;23(2):166-80. A comparison of the effects of irradiation and immunosuppressive agents on regeneration through peripheral nerve allografts: an ultrastructural study. Pollard JD, Fitzpatrick L.

163- [World J Clin Cases](#). 2015 Feb 16; 3(2): 141–147. Published online 2015 Feb 16. doi: [10.12998/wjcc.v3.i2.141](#) PMID: PMC4317607 Clinical outcomes for Conduits and Scaffolds in peripheral nerve repair [David J Gerth](#), [Jun Tashiro](#), and [Seth R Thaller](#)

164- [Ann Plast Surg](#). 2001 Apr;46(4):375-81.

Sciatic nerve reconstruction: limb preservation after sarcoma resection.

[Melendez M¹](#), [Brandt K](#), [Evans GR](#).

165- Injury, Int. J. Care Injured 33 (2002) 627–631 Peripheral nerve reconstruction by autograft Viktor Matejc¹*
ik*

