

**T.C.**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**

**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PERİFERİK SİNİR TAMİRLERİNDE VEN GREFTLERİ  
KULLANILARAK SÜTÜRLERİN REJENERASYON  
BÖLGESİNDEN UZAKLAŞTIRILDIĞI VE VEN GREFTİNİN  
KEMİK KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERE  
REZERVUAR OLARAK KULLANILDIĞI YENİ BİR YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ VE UÇ UCA EPİNÖRAL SİNİR  
TAMİRLERİYLE KARŞILAŞTIRILMALI ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. ALİ EREN**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. SACİT TURANLI**

**ANKARA**

**NİSAN 2017**



Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tez Sınav Tutanağı

|                                             |                                           |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Adı ve Soyadı                               | ALİ EREN                                  |
| Baba Adı                                    | LOKMAN                                    |
| Doğum Yeri/Tarihi                           | GÜMÜŞHANE/1986                            |
| Diploma Tarihi / Diploma No                 | 2011/12886                                |
| Mezun Olduğu Fakülte                        | CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ                  |
| İhtisas Yaptığı<br>Anabilim Dalı/Bilim Dalı | ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ                  |
| İhtisas Süresi                              | Yıl: 5 Ay:                                |
| Sınav Yapılmasını İsteyen Makam             | Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı |

**UZMANLIK TEZİNİN ADI:** Periferik sinir tamirlerinde ven greftleri kullanılarak sütürlerin rejenerasyon bölgesinden uzaklaştırıldığı ve ven greftinin kemik kaynaklı mezenkimal kök hücrelere rezervuar olarak kullanıldığı yeni bir yöntem geliştirilmesi ve uç uca epinöral sinir tamirleriyle karşılaştırılmalı analizi

**JÜRİ KARARI:**

JÜRİ TEZİ ONAYLAMIŞTIR.

**JÜRİ ÜYELERİ**

**BAŞKAN**  
Prof. Dr. Ulunay KANATLI

**ÜYE**  
Prof. Dr. Sacit TURANLI

**ÜYE**  
Doç. Dr. Murat SONGÜR

**T.C.**  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PERİFERİK SINIR TAMİRLERİNDE VEN GREFTLERİ  
KULLANILARAK SÜTÜRLERİN REJENERASYON  
BÖLGESİNDEN UZAKLAŞTIRILDIĞI VE VEN GREFTİNİN  
KEMİK KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERE  
REZERVUAR OLARAK KULLANILDIĞI YENİ BİR YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ VE UÇ UCA EPİNÖRAL SINIR  
TAMİRLERİYLE KARŞILAŞTIRILMALI ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. ALİ EREN**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. SACİT TURANLI**

Bu tez TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından 3001 proje kapsamında 315S071 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA**

**NİSAN 2017**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>                                                       | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>                                                      | <b>2</b>  |
| 2.1 Tarihçe.....                                                                    | 2         |
| 2.2 Anatomi ve Histoloji .....                                                      | 3         |
| 2.3 Periferik Sinir Hasarı Sınıflandırması .....                                    | 7         |
| 2.4 Periferik Sinir Hasarında Nöron Cevabı: Sinir Dejenerasyonu .....               | 10        |
| 2.5 Sinir Rejenerasyonu .....                                                       | 11        |
| 2.6 Primer Sinir Tamirleri ve Literatür Özeti.....                                  | 12        |
| 2.7 Mezenkimal Kök Hücrelerin Sinir Tamirlerinde Kullanımı ve Etkisi .....          | 15        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>                                                     | <b>17</b> |
| 3.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu Ve Karakterizasyonu .....                  | 18        |
| 3.2 Hayvan Modellerinde Cerrahi İşlem Ve Mezenkimal Kök Hücrelerin Uygulanması..... | 20        |
| 3.2.1 Ven Grefti ile Sütürsüz Tamir Tekniği (V, MV grupları) .....                  | 21        |
| 3.2.2 Ven Grefti İle Sütürlü Tamir Tekniği (SV, MSV Grupları) .....                 | 23        |
| 3.2.3 Epinöral Tamir (Kontrol grubu, K).....                                        | 24        |
| 3.3 Fonksiyonel Testler .....                                                       | 24        |
| 3.4 Gastroknemius Kas İndeksi.....                                                  | 26        |

|           |                                         |           |
|-----------|-----------------------------------------|-----------|
| 3.5       | İmmunohistokimyasal Analizler .....     | 26        |
| 3.5.1     | Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi ..... | 26        |
| 3.5.2     | İmmünohistokimyasal Yöntem.....         | 27        |
| 3.6       | İstatistiksel Analizler.....            | 29        |
| <b>4.</b> | <b>BULGULAR.....</b>                    | <b>29</b> |
| 4.1       | Pinprick Testi .....                    | 30        |
| 4.2       | Toespread Testi .....                   | 32        |
| 4.3       | Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFI) .....   | 33        |
| 4.4       | Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi ..... | 35        |
| 4.5       | İmmünohistokimyasal Sonuçlar .....      | 36        |
| <b>5.</b> | <b>TARTIŞMA.....</b>                    | <b>45</b> |
| <b>6.</b> | <b>SONUÇ .....</b>                      | <b>54</b> |
| <b>7.</b> | <b>ÖZET VE “ABSTRACT” .....</b>         | <b>57</b> |
| 7.1       | Özet .....                              | 57        |
| 7.2       | Abstract .....                          | 58        |
| <b>8.</b> | <b>KAYNAKLAR.....</b>                   | <b>60</b> |

## TABLÖLAR

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Periferik Sinir Hasarı Sınıflandırması.....                                       | 9  |
| <b>Tablo 2.</b> Pinprick testi tepki miktarının gruptaki ortalama±standart sapma değerleri .....  | 31 |
| <b>Tablo 3.</b> Toespread testi tepki miktarının gruptaki ortalama±standart sapma değerleri ..... | 33 |
| <b>Tablo 4.</b> Siyatik fonksiyon indeksinin gruptaki ortalama±standart sapma değerleri .....     | 34 |
| <b>Tablo 5.</b> İmmunohistokimyasal sonuçların gruptaki ortalama±standart sapma değerleri .....   | 39 |
| <b>Tablo 6.</b> Fibrozis alanının gruptaki ortalama±standart sapma değerleri.....                 | 41 |

## ŞEKİLLER

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Sinir hücresi yapısı .....                                                   | 4  |
| Şekil 2. Akson enine kesitinin elektron mikroskopunda görünümü.....                   | 5  |
| Şekil 3. Periferik sinir organizasyonu ve ana bileşenleri.....                        | 6  |
| Şekil 4. Periferik sinir vaskülarizasyonu .....                                       | 7  |
| Şekil 5. Periferik sinir hücresi dejenerasyon ve rejenerasyonu .....                  | 11 |
| Şekil 6. Epinöral tamir .....                                                         | 13 |
| Şekil 7. Epinöral tamirde fasikül uçlarında dizilim bozukluğu oluşma riski .....      | 13 |
| Şekil 8. Epinöral kılıf oluşturulak yapılan sinir tamiri .....                        | 14 |
| Şekil 9. Eksternal juguler ven (EJV) grefti alınması .....                            | 21 |
| Şekil 10. Ven grefti ile sütürsüz tamir tekniği .....                                 | 23 |
| Şekil 11. Pinprick testi tepki seviyesi zaman grafiği .....                           | 30 |
| Şekil 12. Toe spread test tepki seviyesi zaman grafiği .....                          | 32 |
| Şekil 13. Siyatik fonksiyon indeksi zaman grafiği .....                               | 33 |
| Şekil 14. Gastroknemius kas indeksi grafiği .....                                     | 35 |
| Şekil 15. Gruplardaki VEGF (+) immunreaksiyonu gösteren grafik .....                  | 36 |
| Şekil 16. Gruplardaki NF-H (+) immunreaksiyonu gösteren grafik .....                  | 37 |
| Şekil 17. Gruplardaki GAP-43 (+) immunreaksiyonu gösteren grafik .....                | 38 |
| Şekil 18. Gruplardaki MAP-2 (+) immunreaksiyonu gösteren grafik.....                  | 39 |
| Şekil 19. Gruplarda tamir bölgesindeki ortalama fibrozis alanını gösteren grafik..... | 40 |
| Şekil 20. GAP-43 (+) & 12. hafta SFI korelasyon grafiği.....                          | 42 |

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 21.</b> NF-H (+) & 12. hafta SFI korelasyon grafiği.....                                                                                             | 43 |
| <b>Şekil 22.</b> Fibrozis alanı & 12. hafta SFI korelasyon grafiği .....                                                                                      | 44 |
| <b>Şekil 23.</b> VEGF (+) & 12. hafta SFI değişim grafiği .....                                                                                               | 45 |
| <b>Şekil 24.</b> Primer epinöral tamir ve iyileşme sonrası histolojik kesiti .....                                                                            | 49 |
| <b>Şekil 25.</b> SV ve V gruplarında sinir rejenerasyon alanlarının longitudinal kesitlerde H&E, GAP-43, NF-H ile boyanma sonrası histolojik görüntüleri..... | 51 |
| <b>Şekil 26.</b> MSV ve MV gruplarında sinir rejenerasyon alanlarının longitudinal kesitlerde GAP-43 ve NF-H ile boyanma sonrası histolojik görüntüleri.....  | 53 |
| <b>Şekil 27.</b> Sinir rejenerasyon alanlarının longitudinal kesitlerde H&E, GAP-43, NF-H, VEGF ve MAP-2 ile boyanma sonrası histolojik görüntüleri .....     | 56 |



## TEŞEKKÜR

2012 yılında cerrahiye ilk adım attığım Gazi Tıp Fakóltesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalında beş yıl boyunca bana tecrübelerini aktaran, cerrahi bilgi, beceri ve vizyon kazandıran ve bize bir aile gibi davranan tüm değerli hocalarıma,

Yurtiçi ve ABD’de temel ve ileri mikrocerrahi eğitimlerini almamı destekleyerek bu tezin başlangıcından sonuna kadar her aşamada desteklerini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Sacit Turanlı’ya,

İş arkadaşından daha çok bir kardeş gibi çalıştığımız, günlerce ameliyathanede birlikte olup evlerimize gidememize rağmen o yorgunlukta dahi birlikte güldüğümüz, bu yoğun zamanı değerli kılan asistan arkadaşlarıma,

Çocukluğumdan beri her daim yanımda olan, bana çağdaş ve bilimsel bir vizyon aşılamaya çalışan anneme ve babama,

Bu süreçte hep yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen eşime,

Bu çalışmanın yapılmasına destek olan TÜBİTAK’a

**Teşekkür ederim.**

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinir hasarı travma, tümör eksizyonları gibi nedenlere bağı olarak sivil ve askeri hayatta sıklıkla rastlanılan bir durumdur. Amerika ve Avrupa’da yılda yaklaşık 100.000 hasta periferik sinir hasarı nedeniyle ameliyat edilmektedir. Bu sıklık kişi ve toplumlar üzerinde ciddi bir sosyoekonomik yük oluşturmaktadır. Amerika’da sinir hasarı nedeni ile yılda yaklaşık 150 milyar dolar sigorta harcaması yapılmaktadır. **(1-4)**

Sinir dokusunun anatomi ve fizyolojisinin daha iyi anlaşılması, mikrocerrahi yöntemlerin gelişmesiyle birlikte periferik sinir onarımında ciddi gelişmeler kaydedilmesine rağmen hala altın standart olan uc uca tamirlerde mükemmel sonuçlara ulaşamamıştır. Bu açıdan sinir tamirini iyileştirmek amacıyla çok fazla çalışmalar yapılmış ve yapılmaktadır. Sinir tamirlerinin iyileştirilerek daha etkili sonuçlar alınması sadece travmaya bağı sinir hasarlarında değil, tümör eksizyonu gibi doku hasarları ve defektlerinin söz konusu olabileceğı durumlarda, sinir primer tamiri veya greftlenme tekniklerinin iyileştirilebilmesi, sakatlıkların azaltılabilmesi, sonraki multipl cerrahi işlemlerden kaçınılması sağlabilmesi açısından da son derece önemlidir. Ayrıca son yıllarda popüler hale gelen kompozit doku nakilleri (fonksiyonel kas transferleri, ekstremitte replantasyon ve transplantasyonları, yüz transplantasyonu) için de daha iyi fonksiyonel sonuçlar elde edilebilecektir.

Ven greftleri, sinir tamirlerinde kılavuz olarak kullanılmakta olup sinir rejenerasyonlarına metabolik katkı sağlayarak akson rejenerasyonunu destekledikleri, fibrozise karşı bariyer görevi gördükleri ve bu şekilde sinir rejenerasyonunu iyileştirdikleri gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreler de sinir tamirlerinde sinir rejenerasyonunu artırmak amacıyla kullanılmakta ve başarılı sonuçlar alınmaktadır. Kök hücrelerin Schwann hücrelerine dönüşme, schwann hücre sayılarını ve rejenerasyon kapasitelerini artırma potansiyelleri bilinmektedir.

Bu çalışmada, sıçanlarda siyatik sinir hasarı oluşturulup, primer sinir tamirlerinde yeni bir teknik geliştirilerek ven greftleri yardımıyla sütürlerin tamir hattından uzaklaştırılması ve ven greftlerinin aynı zamanda mezenkimal kök hücrelere rezervuar olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu şekilde, ven grefti yardımıyla sütürsüz tamir uygulanan tekniğin, sütürlerin, ve mezenkimal kök hücrelerin primer tamir bölgesindeki etkisi araştırılıp geleneksel yöntem olan epinöral sinir tamirleri ile kıyaslanmıştır.

Çalışmamız Tübitak 3001 proje kapsamında SBAG tarafından desteklenmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Tarihçe**

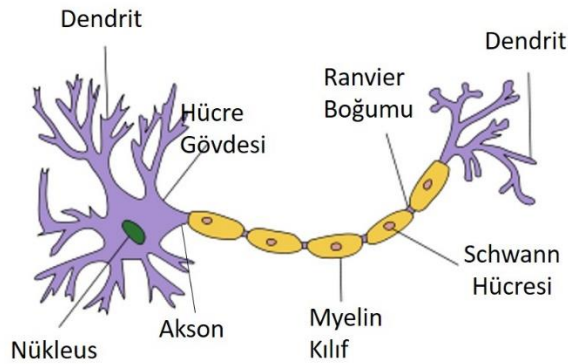
Periferik sinirler tarihte ilk defa Herophilus tarafından M.Ö.300 yıllarında tendonlardan ayırt edilmiştir. Herophilus titiz bir diseksiyonla periferik sinirleri spinal korda kadar izlemiş ve devamlılıklarını ortaya koymuştur. M.S. 100 yıllarında Galen sinir konseptini daha ayrıntılı tanımlarken, ilk sinir tamiri 7. yüzyılda Paulus Aegineta tarafından yapılmıştır. M.S 900 yıllarında Rhazes sinir tamirlerinin ilk açık ve tanımlayıcı referansını vermiştir. (5, 6)

1795 yılında Cruikshank sinir tamirinden sonra distal ekstremitelerde sinir iyileşmesini ve geri dönüşümünü gözlemlemiştir. Mikrocerrahi sinir tamiri ise periferik sinir anatomisi ve fizyolojisi üzerinde geniş deneyimler kazanıldıktan sonra ilk defa 1873 yılında Huenter tarafından tanımlanmıştır. 1900'lerin başında Cajal aksonların nöronlardan rejenere olduklarını ve salınan kemotrofik maddelerin bu sürece rehberlik ettiğini göstermiştir. 1945 yılında Sunderland sinir tamirleri için mikrocerrahi modern teknikleri ortaya koymuş ve modern mikrocerrahinin temellerini atmıştır. (6)

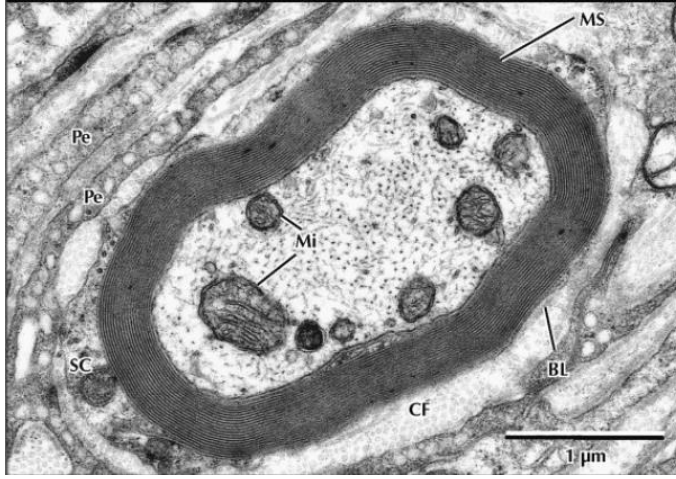
## **2.2 Anatomi ve Histoloji**

Periferik sinir sistemi dört ana bileşenden oluşur. Bunlar: (1) Nöron ve aksonları (2) Schwann hücreleri (3) Bağ doku elemanları (4) Kan damarlarını oluşturan ve damarlarda dolaşan hücrelerdir.

Nöronlar, hücre gövdesi ve devamları olan aksonlardan oluşurlar. (Şekil 1) Aksonlarda, yüksek enerji gereksinimlerinden dolayı bol mitokondri ve sinirsel iletiyi sağlayan, aksonal transportta görevli mikrotübül, mikroflaman,nöroflaman gibi sitoskeletal birimler bulunur. Tüm aksonların etrafını Schwann hücreleri bir kılıf gibi sarar. Bazı aksonlarda, Schwann hücreleri plazma membranı multipl lameller oluşturarak myelin kılıfı oluştururken diğer hücrelerde bunu oluşturmaz. Bu şekilde periferik sinir hücreleri myelinli ve myelinsiz olmak üzere iki yapısal şekilde incelenir. (Şekil 2) Myelin kılıflarda aralıklı kesintiler mevcut olup bunlara Ranvier boğumları adı verilir. Bu bölgelerde her ne kadar myelin kılıf olmasa da Schwann hücrelerinin bazal laminaları devam etmekte olup sinir elektriksel iletişi Ranvier boğumlarında atlayarak iletildiği için bu aksonlarda ileti hızlıdır. Myelinli aksonlarda sinir hızı 100m/sn ve üzerinde iken myelinsiz aksonlarda sinir hızı çok daha yavaştır ve yaklaşık 1 m/sn'dir.



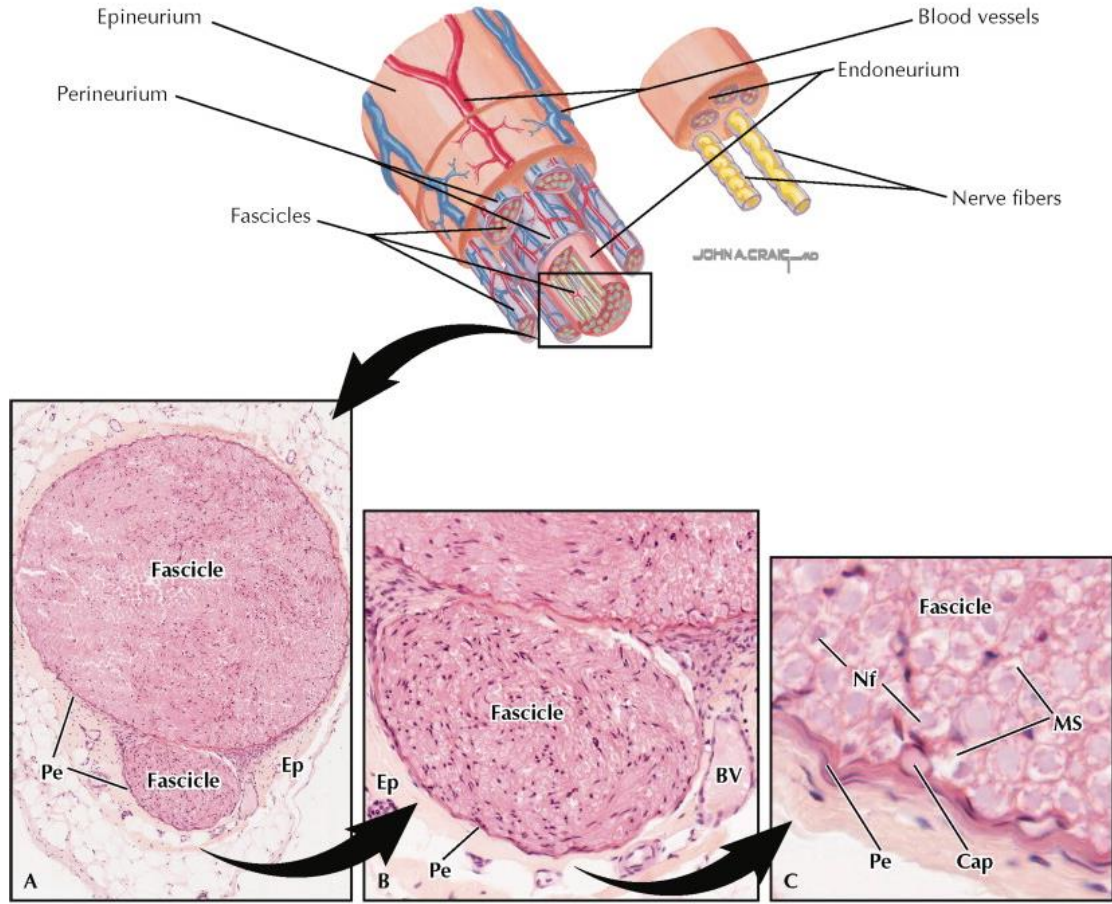
Şekil 1. Sinir hücresi yapısı



**Şekil 2. Akson enine kesitinin elektron mikroskopunda görünümü (Mi, mitokondri; MS, Miyelin kılıf; Sc, Schwann Hücresi; Pe, perinöryum; BL, Bazal Lamina; CL, Kollajen fibriller)**

Aksonların Schwann hücreleriyle sarılmış şekline sinir lifleri adı verilir. Sinir lifleri duysal, motor veya her iki iletiyi de sağlayan karışık tiplerden oluşur. Myelin kılıflı hücreler elektron mikroskopunda rahatlıkla ayırtedilebilirken bunların duysal veya motor nöron olup olmadıklarını elektron mikroskopunda ayırt etmek güncel literatür bilgisiyle mümkün değildir.

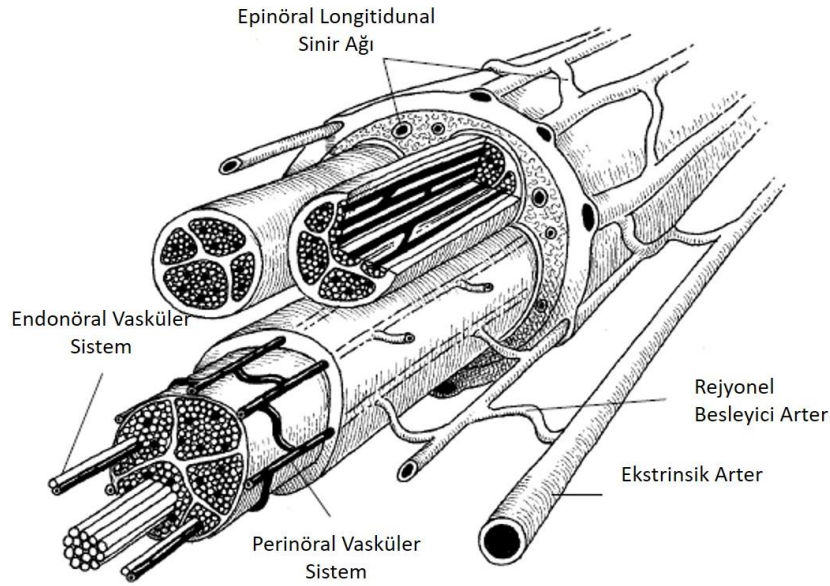
Sinir liflerinin etrafı bağ dokudan oluşan endonöryum ile örtülüdür. Aksonlar endonöryum içerisinde seyrederek buradan beslenirler. Sinir lifleri bir araya gelerek fasikülleri oluşturur. Herbir fasikül perinöryum ile çevrilidir. Perinöryum periferik sinirin biyomekanik dayanıklılığını sağlayan en önemli yapıdır. Epinöryum tüm fasikülleri saran ve perinöryum ile çevrili fasiküller arasında seyreden bağ doku yapısıdır. Ana görevi fasikülleri beslemek ve korumaktır. (Şekil 3)



**Şekil 3. Periferik sinir organizasyonu ve ana bileşenleri (Pe, perinöryum; Ep, epinöryum; BV, Kan damarı; Nf, Sinir lifi; MS, Miyelin kılıf; Cap, Kapiller)** Ana şekil epinöryum, perinöryum ve endonöryum hiyerarşisini göstermektedir. A. Hematoksilen & eozin boyama aksiyel kesitte sinirin farklı büyütme (A: 50X, B: 150X, C: 500X) enine kesitleri (Şekil Netter's Essential Histology, Second Edition, 2013, 2008 by Saunders, Elsevier Inc.'den alınmıştır)

Periferik sinirlerin vaskülarizasyonu sık anastomozlu bir ağla sağlanır. Bu vaskülarizasyonu sağlayan iki major ve bir minör longitudinal sistem vardır. Birinci major kaynak sinir yüzeyindeki epinöryumda seyrederken ikincisi interfaskiküler

epinöral alanda seyrederek. Majör kaynaklar göreceli olarak sabit bir pozisyonadılar. Minör sistem ise endonöryum ve perinöryum içerisinde seyrederek. Longitudinal sistemler arasında ise düzensiz aralıklarla besleyici görev gören segmenter arterler bulunur. Endonöryumlarda seyreden kapillerler kan-beyin bariyeri görevi görmektedir. Bu bölgedeki kapillerlerdeki endotel hücreler arasında sıkı bağlantılar (tight junction) makromoleküllerin geçişini engelleyerek bunu sağlamaktadır. (6-10) (Şekil 4)



Şekil 4. Periferik sinir vaskülarizasyonu (Şekil Lundborg G: Nerve Injury and Repair. New York: Churchill Livingstone, 1988, p 43.' Den alınmıştır.)

### 2.3 Periferik Sinir Hasarı Sınıflandırması



Seddon II. Dünya savaşı sırasında sinir yaralanması olan askerleri inceleyerek sinir hasarlarını nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak üçe ayırmıştır. Nöropraksi lokal myelin hasarını belirtirken genellikle kompresyona sekonder oluşur. Akson devamlılığı bozulmamıştır ve hasar distalinde dejenerasyon oluşmaz. Aksonotmezis, konnektif bağ dokudaki kısmi devamlılıkla birlikte akson devamlılığının bozulmasıdır. Nörotmezis en şiddetli formudur ve sinirin tümünde oluşan hasarı ifade eder. (5, 11)

Sunderland daha sonra Seddon sınıflamasındaki aksonotmetik hasarların farklı prognozları olduğunu farkederek bu sınıflamayı modifiye etti. Seddon sınıflamasındaki aksonotmezi sağlam kalmış konnektif bağ doku miktarına göre üç farklı tipe ayırdı. Nöropraksi Sunderland sınıflamasında tip 1 olmakla birlikte birkaç hafta ya da ay içerisinde kendiliğinden iyileşebilir.

Sunderland tip 2 hasarlarda endonöryum, perinöryum ve epinöryum sağlam iken aksonların bütünlüğünde bozulma olmuştur. Endonöryumlar sağlam olduğu için rejenere olacak aksonlar orjinal doğrultularına yönlenebilir ve birkaç ay içinde tam fonksiyonel geri dönüş beklenir.

Sunderland tip 3'te perinöryum ve endonöryum sağlam iken endonöryum bütünlüğü bozulmuştur. Bu tip hasarlarda hücre gövdelerinde retrograd hasar söz konusudur ve geri dönüş tam değildir. Ayrıca sağlam endonöryum olmadığından akson rejenerasyonunu bozan interfaziküler fibrozis oluşmaktadır. Ayrıca geç iyileşmelerde uç organlarda da değişiklikler olacağı için bu tam bir iyileşmeyi engeller.

Sadece epinöryumun sağlam olduğu hasarlar Sunderland tip 4 yaralanmalardır. Bu tip yaralanmalarda retrograd nöronal hasar ve intrafasiküler fibrozis yoğun olduğu için minimal bir iyileşme ve geri dönüş beklenir. Bu tip yaralanmalar hasarlı segmentin eksizyonu ve sinirin cerrahi tamirini gerektirir. Nörotmezis ise Sunderland tip 5 hasardır ve kendiliğinden iyileşmesi söz konusu olmadığından cerrahi tedavi gerekir. **(10)**

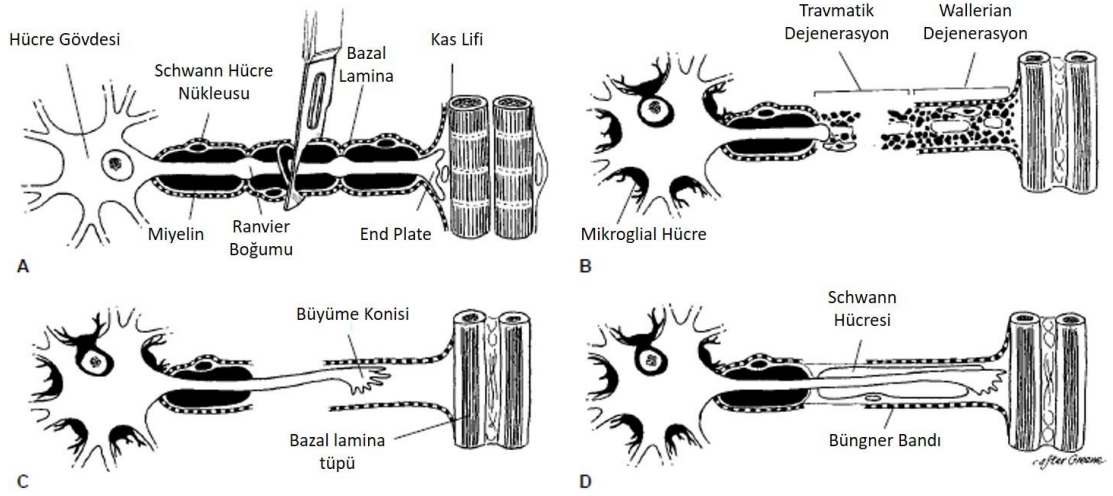
**Tablo 1. Periferik Sinir Hasarı Sınıflandırması**

| <b>Seddon</b> | <b>Sunderland</b> | <b>Patofizyolojik Özellik</b>                                           |
|---------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Nöropraksi    | Tip 1             | Kompresyona sekonder lokal myelin hasarı                                |
| Aksonotmezis  | Tip 2             | Akson bütünlüğü kaybolmuş; endonöryum, perinöryum, epinöryum sağlam     |
|               | Tip 3             | Akson ve endonöryum bütünlüğü kaybolmuş; perinöryum ve epinöryum sağlam |
|               | Tip 4             | Akson, endonöryum ve perinöryum bütünlüğü kaybolmuş; epinöryum sağlam   |
| Nörotmezis    | Tip 5             | Sinir bütünlüğünün tamamıyla kaybolması                                 |

## **2.4 Periferik Sinir Hasarında Nöron Cevabı: Sinir Dejenerasyonu**

Sinir kesisini takiben, aksonların hücre gövdeleri rejenerasyon amaçlı artmış metabolik tüketim nedeniyle şişer. Bazı hücreler, özellikle proksimal aksonal kesilerde, apoptoza gider ve kalıcı olarak rejenere olan nöron sayısı azalır. Periferik sinir sisteminin glial hücreleri olan Schwann hücreleri kemotaktik uyarılarla myelinizan fenotipten fagositik fenotipe dönüşür ve aynı zamanda ortama makrofajlar çağrılır. Bu, distal sinirde olan akson ve myelin disintegrasyonuna neden olan Wallerian dejenerasyonunu başlatır. **(12, 13)** Wallerian dejenerasyonda distal sinirde aksonal hücre iskeleti granüler yapılarının bütünlüğü bozulur. Schwann hücre ve makrofajlar hücre debrislerini temizleyerek geriye sadece bazal membranı bırakırlar. Wallerian dejenerasyonu sürecinde Schwann hücreleri p75, nöronal büyüme faktörü ve kemoatraktan maddeler üretecek şekilde morfolojik değişikliğe uğrarlar. **(6, 14, 15)**

**(Şekil 5A, B)**



**Şekil 5. Periferik sinir hücresi dejenerasyon ve rejenerasyonu A. Akson transeksiyonu B. Hasar alanı distalinde Wallerian dejenerasyonu C. Büyüme konisi bazal lamina tüpüne doğru rejenere olur D. Schwann hücreleri Büngner bandlarını oluşturmak üzere hizalanır (Şekil Seckel BR: Enhancement of peripheral nerve regeneration. Muscle Nerve 1990;13:785-800. Copyright 1989 Lahey Clinic.'ten alınmıştır)**

## 2.5 Sinir Rejenerasyonu

Wallerian dejenerasyonun ardından bazal membranı sağlam olan Schwann hücreleri kendilerini longitudinal olarak hizalayarak Büngner bandları olarak adlandırılan kolonları oluşturur. Bu kolonlar proksimal ve distal bazal membranlar arasında aksonal tomurcuklanmalar için rehber olur ve büyümeyi destekleyici bir mikroçevre oluşturur. Endonöral tüpler kaybolarak Schwann hücrelerine makrofajlarla dolar. (16)

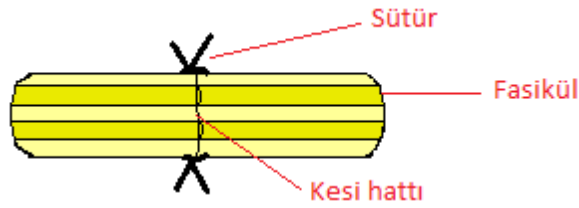
Rejenere olan aksonun ucunda büyüme konisi (growth cone) olarak adlandırılan hareketli cisimcik vardır. Bu cisimcikler içi aktin polipeptidlerden oluşan parmaklı çıkıntılar olan filopodialardan oluşur. Filopodiyalar içindeki aktinler kontraksiyon özellikleriyle aksonların uzamasını sağlarlar. Büyüme konisi bu süreçte proteaz salgılayarak yoluna çıkan matriks yapısını çözerek akson rejenerasyonu için yol açar.

Büyüme konisi nörotrofik faktörler gibi moleküllere cevap olarak varlığını sürdürür, uzar ve sinir matürasyonu sağlanır. Nörotrofik faktörler denerve motor ve duysal reseptörlerde bulunduğu gibi Schwann hücrelerinde de bulunur. Sinir büyüme faktörü (NGF), siliyer nörotrofik faktör, motor sinir büyüme faktörü başlıca nörotrofik faktörlerdendir. Laminin, fibronektin, N-kaderin gibi glikoprotein yapıların da sinir rejenerasyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. **(6, 12, 13) (Şekil 5C, D)**

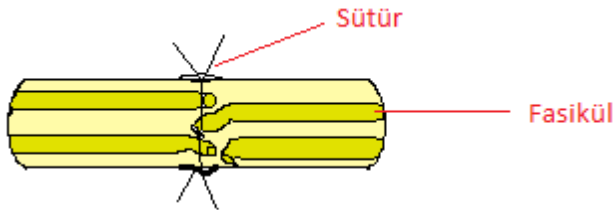
## **2.6 Primer Sinir Tamirleri ve Literatür Özeti**

Sinir tamirlerinde altın standart sinir uçlarının uç uca getirilip epinöral sütürize edilmesidir. **(2, 4)** Sinir uçları üzerindeki nörovazoryumlar hizalanarak aynı fasiküllerin karşı karşıya gelmesi sağlanır ve minimal bir gerginlikle epinöryumlardan 9-0 ya da 10-0 emilemeyen sütürlerle dikilir. **(Şekil 6)** Bu teknikte optimal sinir rejenerasyonu için sinir uçlarının iyi hizalanması, gerginlik olmaması, tamir edilen dokuya en az zarar

verilmesi, skarlaşmayı azaltmak için minimal sayıda suture atılması gerekir. (17-20) Her ne kadar bu şartlar cerrahide titizlikle uygulansa da hala mükemmel sinir tamiri sonuçlarına ulaşılamamıştır. Suture inflamasyonu, intra ve ekstra nöral skar dokusu, akson ve nörotropik faktörlerin etraftaki dokulara kaçması, aksonların iyi hizalanamaması ve çok yavaş rejenerasyon hızı gibi nedenler sinir tamir sonuçlarını sınırlandırmıştır. (13, 21, 22) (Şekil 7)



Şekil 6. Epinöral tamir



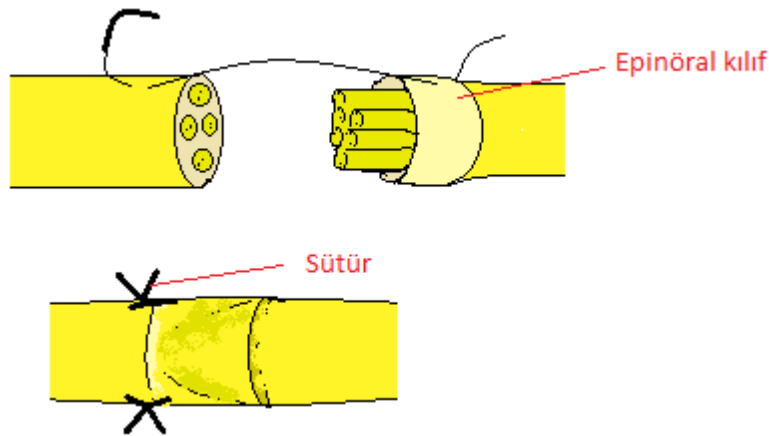
Şekil 7. Epinöral tamirde fasikül uçlarında dizilim bozukluğu oluşma riski

Sinir tamirlerinde daha iyi sonuçların elde edilmesi ve mikrocerrahi tekniklerdeki gelişmeler moleküler biyolojinin klinik uygulamalarda kullanılmasına

bağlı olarak artmaktadır. Schwann hücreleri ve mezenkimal orjinli kök hücreler aksonal büyümeyi desteklemeleri ve nörotropik sitokinler salgılamaları açısından ilgi çekicidir. (13, 23-25)

Siemionow ve arkadaşları distal sinir güdüğündeki epinöryumu 2 mm kıvrıyarak proksimaldeki sinir güdüğünün üzerine örtmüş ve epinöryuma dikmişlerdir. Standart epinöral tamir tekniğine göre daha başarılı sonuçlar almışlardır. Başarılı sonuçları kompresyon ve gerginliğin tamir bölgesinden proksimal epinöryuma taşınması, epinöral kılıfın büyüme ortamı için bir rezervuar görevi görmesine atfetmişlerdir. (26-28) (Şekil

8) Yavuzer ve arkadaşları yine kullandıkları epinöral kılıf yöntemiyle rejenerasyon bölgesinde suture sayısını ve fibrozisi azaltarak daha başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. (29)



Şekil 8. Epinöral kılıf oluşturularak yapılan sinir tamiri

Ven greftleri farklı ebat ve uzunluklarda ulaşılabilir ve rejenerasyon olan aksonlara metabolik destek sağlar. Ayrıca ven duvarı skar oluşumuna karşı bir bariyer olarak görev görür. **(30)** Aynı zamanda ven duvarındaki kollajen ve lamininden zengin dokunun sinir rejenerasyonunu artırdığı düşünülmektedir. **(31)** Elektrofizyolojik ve histolojik olarak yapılan çalışmalarda ven greftlerinin akson rejenerasyonu sağlama kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. **(32, 33)** Levine ve arkadaşları rodent femoral veninde sinir rejenerasyonunu artırma kapasitesine sahip sinir büyüme faktörlerinin eksprese edildiğini göstermişlerdir. **(34)** Foroutan ve arkadaşları sıçanlarda siyatik sinir uç uca tamir sonrası ven kılıfı yerleştirmişler ve standart uç uca tamirlere göre daha iyi sonuçlar almışlardır. **(35)**

Sütür etkilerinin azaltılması amacıyla primer sinir tamirlerinde fibrin yapıştırıcılar kullanılmıştır. Sinir uçları hizalanarak iki sütürle tesbit edildikten sonra fibrin yapıştırıcı kesi hattına uygulanmış ve olumlu sonuçlar bildirilmiştir. **(21, 36, 37)** Lazer yöntemi de sinir etrafına uygulanan sentetik polimerler ısıtılarak sinir güdüklerini tesbit etme şeklinde uygulanmıştır. Her ne kadar başarılı sonuçlar bildirilmiş ise de geç iyileşme, dokuda çatlak ve yarıklar, zayıf mekanik stabilite ve termal hasar gibi dezavantajları söz konusudur. **(21, 38, 39)**

## **2.7 Mezenkimal Kök Hücrelerin Sinir Tamirlerinde Kullanımı ve Etkisi**



Son yıllarda yapılan çalışmalarda kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler sinir rejenerasyonunu artırmak amacıyla kullanılmıştır. **(40, 41)** Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, yağ ve kas gibi farklı dokuların rejenerasyonunu artıran multipotansiyel hücrelerdir. Ayrıca kemik iliği kaynaklı mezankimal kök hücrelerin multipotens kapasitesi sitokin ve nörotropik faktörlerin salınımı ile artırılır. **(13, 42)** Bu faktörler direkt salınma veya hücre-hücre bağlantılarıyla endojen Schwann hücreleri uyarılarak bu hücrelerden salınma şeklinde olur. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden ve endojen Schwann hücrelerden NGF, BDNF, GDNF, NT-3 gibi büyüme faktörlerinin salındığı gösterilmiştir. **(42-44)**

Kemik iliği kaynaklı mezankimal kök hücreler sinir rejenerasyonunu ve aksonal rejenerasyonu artırma kapasitesine sahiptirler. **(42, 45-47)** Cuevas ve arkadaşları farklılaşmamış kemik iliği kaynaklı mezankimal kök hücrelerin periferik sinir hasarlarında yararlı etkileri olduklarını göstermişlerdir. **(48, 49)** Walsh ve Midha tarafından yazılan derlemede kök hücre tabanlı tedavi stratejilerinin klinik uygulamada ümit vadeci olduğunu vurgulamışlardır. **(50)** Kemik iliği kaynaklı mezankimal kök hücrelerin aynı zamanda VEGF, bFGF, HGF ve angiopoietin-1 gibi angiogenik faktörler salgıladığı gösterilmiştir. **(44)** Hipoksinin anjiogenik ve nörojenik faktörleri potansiyelize ederek artmış vaskülarizasyon ve sinir lifi oluşumunu artırdığı bulunmuştur. **(51)** Kök hücreler aynı zamanda IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, TNF-a gibi immunsupresif sitokinler salgılayarak ve ana dokuda lokalize immunsupresif etki gösterir. Bu etkiler İnflamasyon ve fibrozisi engelleyerek sinir rejenerasyonunu ve

iyileşmeyi hızlandırır. (52) Aynı zamanda kök hücreler CD40, CD80 gibi MHC molekülüleri sentezlemedikleri için immunojenik değildirler ve lenfosit cevabı oluşturmazlar. Bu özelliklerinden dolayı allojenik olarak kullanılabilirler ve bu işlemin hızlanmasını sağlarlar. (53)

Periferik sinir rejenerasyonlarında aksonal büyüme ve yenilenme rejenerasyonun önemli bir göstergesidir. (54) Akson büyümesi ve yenilenmesi akson yapıları olan nörotübül, nöroflament gibi sitoskeletal proteinlerdeki  $\beta$ -III tubulinin immunohistokimyasal tanımlanmaları ile değerlendirilmektedir. (55-57) Growth associated protein-43'de yeni oluşan ve henüz nöroflament eksprese etmemiş aksonlara özgü olup akson oluşmasını değerlendirmek amacıyla immunohistokimyasal olarak değerlendirilmektedir. (58)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Önerilen proje Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından incelenmiş olup, Kurulun 04/11/2015 tarih ve 10 sayılı toplantısında gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna karar verilmiştir. (Karar no: 66332047-604.01.02)

### 3.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu Ve Karakterizasyonu

Ksilazin ve ketamin derin anestezisi altında sakrifiye edilen yeni doğmuş iki adet sıçanın femurlarından steril besi yeri (DMEM/Lonza, Belçika) ile yıkama yöntemi kullanılarak kemik iliği alındı.

Fikol (Biocoll / Sigma Aldrich) solüsyonu ile dansite gradient yöntemi kullanılarak elde edilen mononukleer hücreler T25 flasklara içinde %20 Fetal bovine serum (Lonza, Belçika), %2 L-Glutamine (Lonza, Belçika), %1 Penicilin, Streptomycin, Amphotericin (Biological Industries, İsrail) ve %77 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/Lonza, Belçika) içeren besi yeri eklenerek %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre yerleştirilip üç günde bir besiyeri değişimi yapıldı. Hücrelerin gelişimi Leica invert mikroskobu (Leica, Almanya) ile gözlemlendi. 15 gün sonra hücrelerin gelişimi de göz önünde bulundurularak pasaj işlemi yapıldı. İkinci pasaj sonunda hücreler CD11b/c (BD, USA), CD45 (BD, USA), CD90 (BD, USA), CD44 (BD, USA), CD73 (BD, USA), CD 105 (BD, USA), yüzey markerlarına göre flow sitometri cihazında (FACS Aria III, USA) tanımlandı. İkinci pasaj sonrasındaki hücreler farklılaşma yöntemleriyle adiposit, osteosit, kondrosit hücrelerine farklılaştırıldı. Hücrelerin Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen, USA) cihazında hem sayısına hem de canlılığına bakıldı.

*Mezenkimal Kök Hücre Adiposit Farklılaşma Metodu:* Adiposit farklılaşma için Adiposit Diferansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA) kullanıldı. İkinci

pasaja gelen hücreler adiposit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılarak üçüncü hafta sonunda Oil Red (Diagnostic BioSystem, USA) ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Yağ hücreleri Leica invert mikroskobu ile görüntülerek ve yağ hücreleri belirlendi.

*Mezenkimal Kök Hücre Osteosit Farklılaşma Metodu:* Osteosit farklılaşma için Osteosit Differansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA) kullanılacak. İkinci pasaja gelen hücreler osteosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılacaktır. Üçüncü hafta sonunda Von Kossa (Diagnostic BioSystem, USA) ile boyama işlemi gerçekleştirilecek. Osteosit hücreleri Leica invert mikroskobu ile görüntülenecek ve osteosit hücreleri belirlenecek.

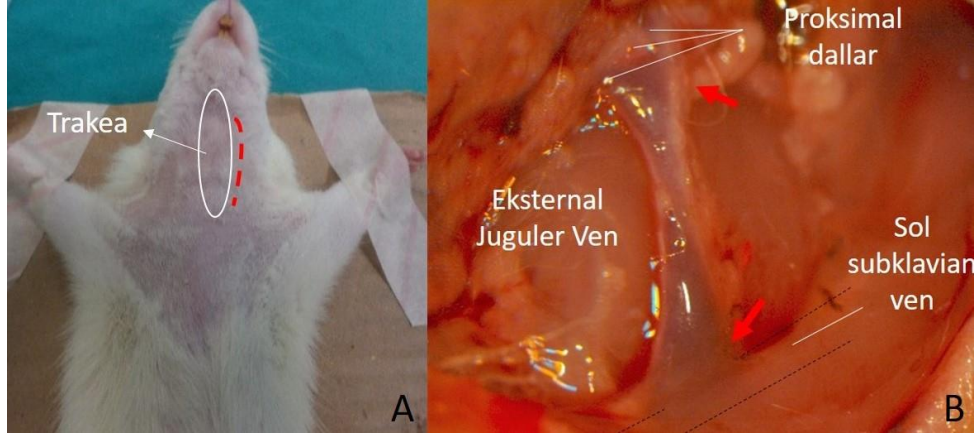
*Mezenkimal Kök Hücre Kondrosit Farklılaşma Metodu:* Kondrosit farklılaşma için Kondrosit Differansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA) kullanıldı. İkinci pasaja gelen hücreler kondrosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılarak üçüncü hafta sonunda Alcian Blue (Diagnostic BioSystem, USA) ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Kondrosit hücreleri Leica invert mikroskobu ile görüntülenerek ve kondrosit hücreleri belirlendi.

Hücreler mikroenjektörlere yerleştirilerek cerrahi işlemlerde uygulanmak üzere hazırlandı.

### **3.2 Hayvan Modellerinde Cerrahi İşlem Ve Mezenkimal Kök Hücrelerin Uygulanması**

Çalışmada 30 tane 250-300 g aralığında erkek Wistar ratları kullanılmıştır. Denekler oda sıcaklığında, 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsüyle kafeslerde saklanmıştır. Cerrahi prosedür intraperitoneal ketamin (45mg/kg)+ intramusküler xylasin (2,5mg/kg) anestezisi altında, tek bir cerrah tarafından, sol alt ekstremitede, operasyon mikroskobu (Zeiss, Germany) ve mikrocerrahi aseptik aletler (S&T, Switzerland) kullanılarak siyatik sinir üzerinde uygulandı.

Otuz adet sıçan her grupta altı adet olacak şekilde rastgele beş gruba ayrıldı. Birinci grupta (K) primer epinöral tamir uygulandı ve bu grup kontrol grubu olarak kabul edildi. İkinci grupta (SV) epinöral tamir üzerine ven grefti uygulandı. Üçüncü grupta (MSV) epinöral tamir üzerine ven grefti uygulanarak ven içine BMSC enjekte edildi. Dördüncü grupta (V) ven grefti ile sütürsüz tamir tekniği uygulandı. Beşinci grupta (MV) ise ven grefti ile sütürsüz tamir tekniği uygulanarak ven içerisine BMSC enjekte edildi.

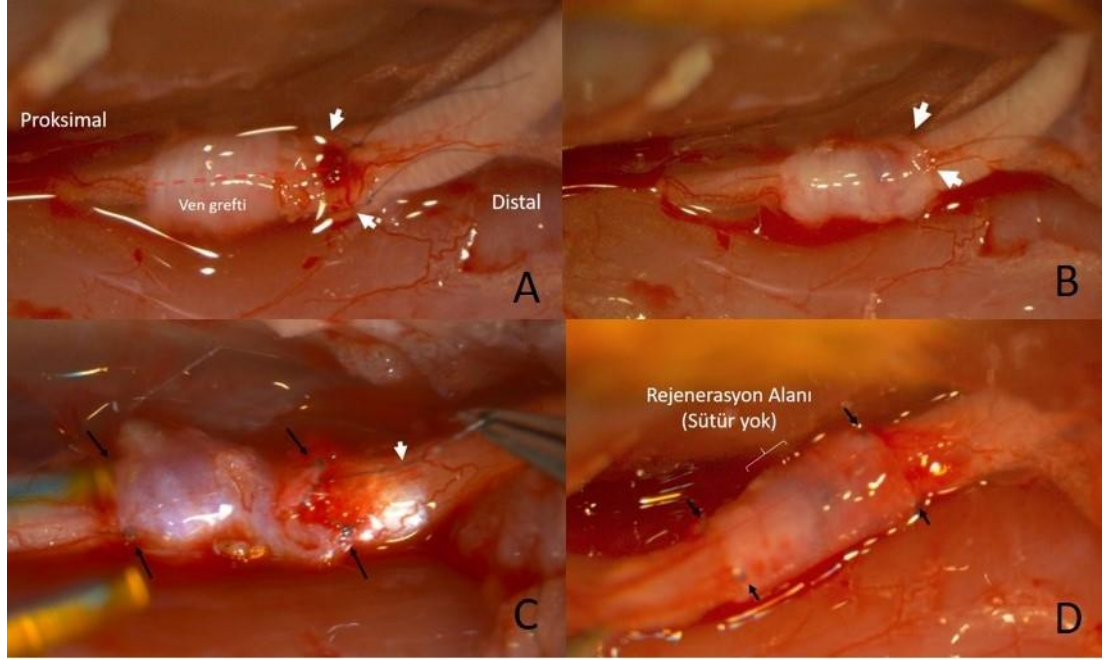


**Şekil 9. Eksternal juguler ven (EJV) grefti alınması. A. Boyun anterolateralinden insizyon yapıp yağ doku kaldırılarak vene ulaşılır. B. EJV proksimalde üç dala ayrılırken en distalde subklavian vene drene olur. Ven proksimalde dallara ayrılma distalde ise subklavian ven bileşkesinden bağlanarak kesilir.(Kırmızı oklar)**

### **3.2.1 Ven Grefti ile Sütürsüz Tamir Tekniği (V, MV grupları)**

Denek supin pozisyonda yatırılıp mikroskop ve mikrocerrahi aletleri kullanılarak servikal anterior-lateral insizyon yapıldı. Sol eksternal juguler ven bulunup proksimal ve distalinden 10-0 naylon sütürlerle (Doğsan A.Ş., Trabzon) ligate edilerek yaklaşık 10 mm uzunluğunda bir segment çıkarıldı. (**Şekil 9**) Denek daha sonra pron pozisyona getirilerek sol posterior uyluktan oblik insizyon yapıldı. Mikroskop ve mikrocerrahi aletler eşliğinde priformis altında siyatik sinir bulunarak distaldeki tibial ve peroneal sinir bifurkasyonlarına kadar eksplere edildi. Siyatik sinir bifurkasyonun 6mm proksimalinde keskin bir bistüri ve sinir tutucu (nerve holder) (S&T, Switzerland) yardımıyla kesildi. Alınan ven grefti forseps ya da dilatatör yardımıyla esnetilerek

siyatik sinir ile uygun çapa getirilip kesilmiş proksimal sinir ucuna geçirildi. Proksimal ve distali venle birleştirme işlemi, sinir uçları ve venin yumuşak doku özelliğinden dolayı uygulaması zordur. Bu nedenle biz aldığımız ven greftini kayganlık sağlamak amacıyla izotonik solüsyon ile yıkanmış ortamda önce proksimal güdüğe geçirip daha sonra vazonöryumları hizalayarak sinir uçlarını hasar olmayan proksimal ve distal bölgede epinöryumdan geçirilen geçici bir 10-0 sütürle gevşekçe bağladık. **(Şekil 10A)** Geçici tesbit ven greftini kesi hattının üzerine kaydırmamızı ve 10-0 sütürlerle fiksasyonunu kolaylaştırdı. **(Şekil 10B, C)** Geçici sütür, bol uygulanma şeklinden dolayı rahatça çıkarıldı. **(Şekil 10C, D)** V grubuna bu yöntem uygulanırken MV grubuna, ek olarak mikroşırınga yardımıyla daha önce hazırlanan  $2 \times 10^6$  sayıda kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre ven içine kesi hattına enjekte edildi.



**Şekil 10. Ven grefti ile sütürsüz tamir tekniği** A. Ven grefti proksimal güdüğe geçirildikten sonra sinir güdükleri geçici bol sütürlerle (Beyaz oklar) tesbit edilir. Geçici sütürler koyulurken epinöral damarların hizalanmasına dikkat edilmelidir. (Kırmızı kesikli çizgi) B. Ven grefti rejenerasyon alanının üzerine kaydırılır. C. Ven grefti rejenerasyon alanının proksimali ve distalinde 180° 10-0 nylon sütürlerle (Siyah oklar) epinöryuma dikilir. Geçici sütür (Beyaz ok) bol özelliğinden dolayı kolayca kesilerek çıkarılabilir. D. Sinir rejenerasyon alanında sütür kalmamakla birlikte damarların iyi hizalandığı ven grefti yardımcı fiksasyon sağlanır.

### 3.2.2 Ven Grefti İle Sütürlü Tamir Tekniği (SV, MSV Grupları)

Siyatik sinir bifurkasyonun 6mm proksimalinde keskin bir bistüri ve sinir tutucu yardımıyla kesildi. Alınan juguler ven grefti önce proksimal güdüğe geçirilip



vazonöryumlar hizalandıktan sonra sinir uçları dört adet birbirine 90° 10-0 naylon sütürle epinöral olarak uc uca dikildi. Ven grefti kesi üzerine kaydırılarak kesi hattına proksimalde ve distalde yaklaşık 5 mm uzaklıkta, birbirine 180° olacak şekilde iki adet 10-0 sütür ile epinöryumlara dikildi. SV grubu bu şekilde bırakılırken MSV grubuna mikroşırınga yardımıyla daha önce hazırlanan  $2 \times 10^6$  sayıda kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre ven içine kesi hattına enjekte edildi.

### **3.2.3 Epinöral Tamir (Kontrol grubu, K)**

Sinir uçları, vazonöryumlar hizalanıp sinir güdükleri uç uca getirilerek dört adet 10-0 nylon sütür ile birbirine 90° olarak epinöral dikildi. (Primer epinöral tamir)

## **3.3 Fonksiyonel Testler**

Sinir rejenerasyonu her beş grup için 4, 8 ve 12. haftalarda pin-prick ve toe spread testleriyle değerlendirildi.

Pinprick testi sensöryel fonksiyonun dönüşünü değerlendirildi. Forceps yardımıyla ayak başparmağı ucundan dize doğru sıkarak uyarı verildi. Ayağını çekme refleksi 0-3 puan arasında değerlendirildi. Ayak bileği üstü 1 puan, metatarsal alan 2

puan, ayak başparmağı seviyesindeki çekme refleksi 3 puan olarak değerlendirildi. Çekme refleksi yoksa 0 puan verildi.

Toe-spread testi motor fonksiyonun dönüşünü değerlendirmek için kullanıldı. Hayvan kuyruğundan tutularak ayak başparmak spontan hareketleri izlendi. Tam ayak başparmağı ekstansiyon ve abdüksiyonu normal olarak değerlendirilerek 3 puan verildi. Ayak başparmağı sadece abdüksiyonu 2 puan, herhangi bir hareket belirtisi 1 puan, hiç hareket olmaması 0 puan olarak kabul edildi. **(40)**

Siyatik sinir fonksiyon indeksi (SFI), 4, 8 ve 12. haftalarda Reynold ve Weiss tarafından tanımlanan yöntemle ölçüldü. Deneklerin ayakları mürekkeple boyanarak beyaz kağıt üzerinde yürütüldü. Sağlam ayakları (N) ve hasarlı ayaklarının (E) izleri belirtilecek şu 3 şekilde ölçüldü: ayak izi uzunluğu (IPL), ayak izi genişliği (ITS, 1. ve 5. parmak arası), orta parmakların genişliği (IIT, 2. ve 4. parmaklar arası). Sonuçlar 0.1 mm'ye kadar netlik gösterecek şekilde elektronik dijital kumpas (Alpha Tools) ölçüldü. SFI'i Bain ve arkadaşlarının tanımladığı göre şu formülle hesaplandı:  $SFI = -38.3 [(EPL - NPL)/NPL] + 109.5 [(ETS - NTS)/NTS] + 13.3 [(EIT - NIT)/NIT] - 8.8$  % 0-11 arasındaki değerler normal sinir fonksiyonunu gösterirken, % -100 tam sinir hasarını, % -11 ve -100 arası inkomplet sinir fonksiyonu geri dönüşünü gösterdiği kabul edildi. **(59, 60)**

### **3.4 Gastroknemius Kas İndeksi**

12. hafta sonunda deneklere anestezi altında intrakardiyak kan alımı ile ötenazi uygulandı. Bilateral gastroknemius kasları çıkarılarak ıslak kas ağırlıkları dijital ölçüm aleti ile ölçüldü. Kas indeksi, opere olan tarafın kas ağırlığı kontralateral tarafa bölünerek ölçüldü. (40)

### **3.5 İmmunohistokimyasal Analizler**

Gruplara ait tüm periferik sinir örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak % 10' luk nötral formaldehit solüsyonunda en az 72 saat tespit edilerek rutin takip işlemlerinin ardından parafin bloklar elde edildi ve hazırlanan parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında / boyuna kesitler alındı.

#### **3.5.1 Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi**

Deney gruplarından alınan kesitler 58°C etüvde 2 saat bekletildikten sonra, 2x15 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80, %70, %50) havada kurutuldu. 10 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen' de 10 dakika boyandı ve 10

dakika akar suda yıkandılar. % 70 alkol + 2 – 3 damla glasiyel asedik asit karışımına batırılıp tekrar 10 dakika akar suda yıkanan lamlar 15 dakika Eozinde bekletilip 10 dakika daha akar suda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %96, %100), 2x15 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

### 3.5.2 İmmünohistokimyasal Yöntem

Polizinli lama alınan kesitler 37 °C’ deki etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak amacıyla etüv ısısı 57 °C’ ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 3 kez 5’er dakika ksilolde bırakıldıktan sonra sırasıyla % 100’ lük, % 96’ lık ve % 80’ lik alkol serilerinden 3’er dakika geçirilerek sudan, 2 kez 5’ er dakika distile sudan geçirilerek alkolden kurtarıldı. Doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında 1 M sitrat tamponuna (pH: 6. 0) (Lot: MK160509, Thermo) etkin bırakıldı. Oda ısısında soğutulduktan sonra Pap pen ile kesit üzerindeki dokuların etrafı çizildi. Camlar % 3’ lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılarak dokularda, endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Daha sonra, camlar PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla Ultra V Block (Lot: 1754084A, LifeTech) uygulandı. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan 1/100 oranında PBS ile dilüe edilmiş VEGF (sc-7269, Lot #K1816), GAP-43 (sc-17790, Lot #L2116), NF-H

(sc-133165, Lot #A1113) ve MAP-2 (sc-20172, Lot #B1016) primer antikorlarına etkin bırakılarak bir gece bekletildiler.

Süre sonunda dokular PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika süresince biyotinli sekonder antikör (Lot: 1754084A, LifeTech) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular enzimin biyotine bağlanması amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Lot: 1754084A, LifeTech) etkin bırakıldılar. Camlar tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kromojen olarak DAB (Lot: 38703, DAB Chromogen/Substrate Kit, ScyTek) uygulandı ve gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. Zemin boyamasında Harris' in Hematoksileni kullanılarak, camlar entellan ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, mikroskop altında değerlendirildi ve sisteme bağlı Leica Q Vin 3 programında resimleri çekildi.

Dokuda VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), GAP-43 (Growth associated protein-43), NF-H (Neuroflamet-H) ve MAP-2 (Microtubule associated protein-2) pozitif hücreler saptandı ve hücreler 1 merkez, 5 perifer bölgede olmak üzere toplam 6 bölge için tüm grup ve tüm deneklerde incelenerek, yoğunlukları belirlendi ve istatistik uygulaması için veriler oluşturuldu. Uygulanan primer antikörler için “ 0=Hiç Yok, 1=Zayıf Tutulum, 2=Azdan Ortaya Değişen Tutulum, 3=Orta Dereceli Tutulum,

4=Ortadan Yoğuna Değişen Tutulum, 5=Yoğun Tutulum” sayısal veriler olarak kabul edildi.

Hematoksilen-Eozin boyama sonucunda elde edilen preparatlardan, her grup ve her denek için skar doku ölçümü Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, mikroskop altında değerlendirilerek ve sisteme bağlı Leica Q Vin 3 programı kullanılarak alan ölçümü ( $\mu\text{m}^2$ ) şeklinde yapıldı. Ölçüm, skar dokusunun birbirinden bağımsız 6 bölgesinde gerçekleştirildi. Alanların ortalaması alınarak gruplar arası istatistik yapıldı.

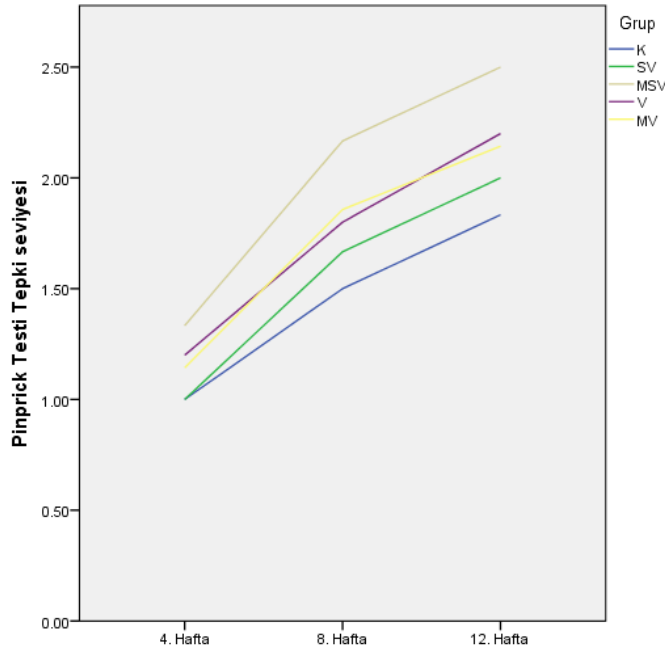
### **3.6 İstatistiksel Analizler**

Veriler SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programına girildi. Nicelikli veriler ortalama  $\pm$ standart sapma, median ile değerlendirildi. Normal dağılım uygunluğa göre Saphiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Çoklu gruplar arası karşılaştırma One-Way Anova ve Kruskal–Wallis testleriyle, ikili kıyaslamalar student t testi ile yapıldı. Postoperatif histolojik ve fonksiyonel sonuçların korelasyonu Pearson korelasyon testi ile değerlendirildi.  $p<0.05$  olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## **4. BULGULAR**

Fonksiyonel test bulguları olan pinprick testi, tospread testi ve SFI ile immunohistokimyasal bulgular aşağıda alt başlıklar halinde incelenmiştir. Tüm bulguların ortalama ve standart sapma değerleri **Tablo 2**, **Tablo 3**, **Tablo 4** ve **Tablo 5**'de gösterilmiştir.

#### 4.1 Pinprick Testi



Şekil 11. Pinprick testi tepki seviyesi zaman grafiği

Bütün gruplarda zamana bağlı olarak pinprick testlerinde anlamlı iyileşme görüldü ( $p=0.001$ ). Şekil 11 gruplardaki 4, 8 ve 12 haftalardaki test sonuçlarını

belirtmektedir. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Hiçbir grupta ortalama pinprick testi maksimum değer olan 3'e ulaşamamıştır. **Tablo 2** 'de pinprick testi ortalama değerleri gösterilmiştir.

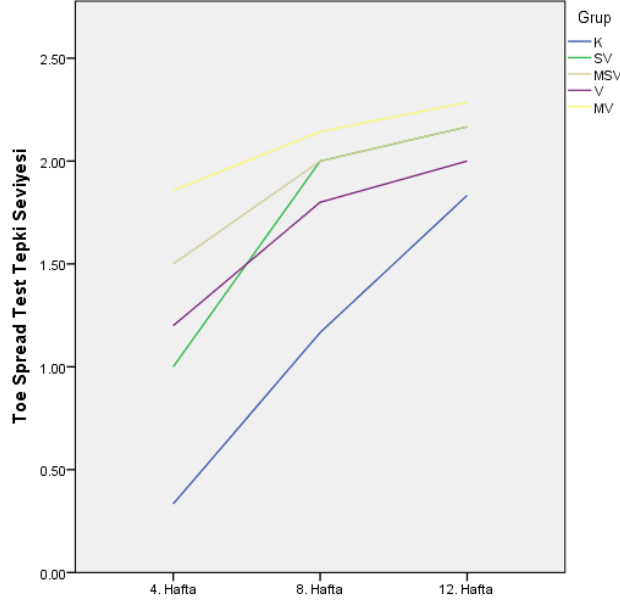
**Tablo 2. Pinprick testi tepki miktarının gruplardaki ortalama±standart sapma değerleri**

| <b>GRUP</b> | <b>4. HAFTA PPT</b> | <b>8. HAFTA PPT</b> | <b>12. HAFTA PPT</b> |
|-------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| <b>K</b>    | 1.00±0.00           | 1.50±0.55           | 1.83±0.41            |
| <b>SV</b>   | 1.00±0.00           | 1.67±0.52           | 2.00±0.63            |
| <b>MSV</b>  | 1.33±0.52           | 2.17±0.41           | 2.50±0.55            |
| <b>V</b>    | 1.20±0.45           | 1.80±0.45           | 2.20±0.45            |
| <b>MV</b>   | 1.14±0.38           | 1.86±0.38           | 2.14±0.38            |

(PPT, Pinprick testi tepki değeri)



## 4.2 Toespread Testi



Şekil 12. Toe spread test tepki seviyesi zaman grafiği

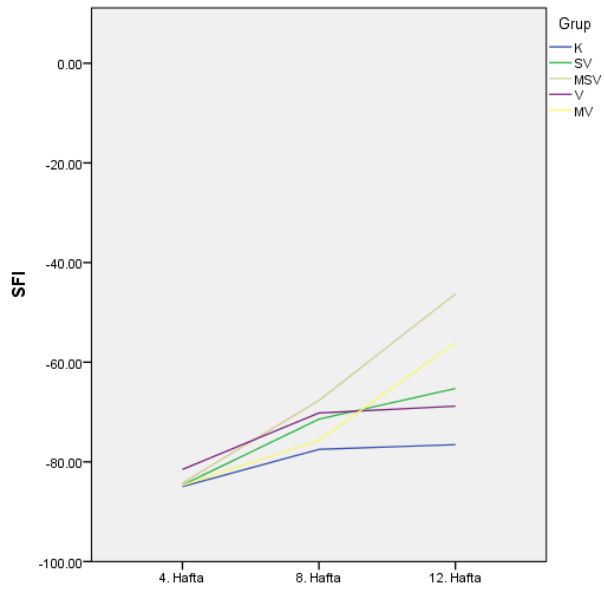
Şekil 12’de bütün grupların toespread test sonuçlarının zamana bağlı değişimi gösterilmiştir. Bütün gruplarda zamana bağlı olarak test tepki seviyesinde artma görülmüştür ( $p=0.001$ ). 4. hafta toespread sonuçlarında, diğer grupların kontrol grubuna üstünlük göstermesine rağmen (SV,  $p=0.03$ ; MSV,  $p=0.0001$ ; V,  $p=0.0001$ ; MV,  $p=0.0001$ ) 8 ve 12 hafta toespread test sonuçları arasında gruplar arası sonuçlarda anlamlı bir fark bulunamamıştır. **Tablo 3**’de toespread testi ortalama değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 3. Toespread testi tepki miktarının gruptaki ortalama±standart sapma değerleri**

| GRUP       | 4. HAFTA TST | 8. HAFTA TST | 12. HAFTA TST |
|------------|--------------|--------------|---------------|
| <b>K</b>   | 0.33±0.52    | 1.17±0.41    | 1.83±0.75     |
| <b>SV</b>  | 1.00±0.63    | 2.00±0.63    | 2.17±0.41     |
| <b>MSV</b> | 1.50±0.55    | 2.00±0.00    | 2.17±0.75     |
| <b>V</b>   | 1.20±0.45    | 1.80±0.84    | 2.00±0.71     |
| <b>MV</b>  | 1.86±0.38    | 2.14±0.69    | 2.29±0.49     |

(TST, Toespread test tepki değeri)

#### 4.3 Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFI)



**Şekil 13. Siyatik fonksiyon indeksi zaman grafiği**

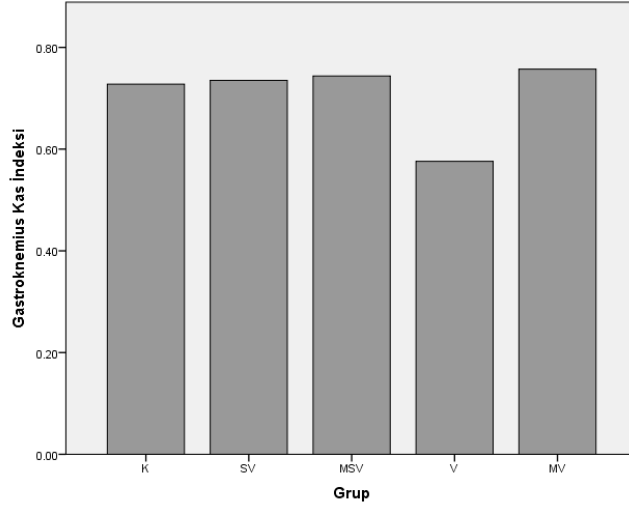
4. ve 8. hafta sonunda hesaplanan SFI’de gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. 8. haftadan sonra MSV ve MV gruplarında, SFI’de artan bir iyileşme izlendi. 12. haftada MV ve MSV gruplarında, kontrol grubu ve diğer gruplara (SV, V) göre anlamlı olarak daha iyi sonuçlar olduğu izlendi. ( $p<0.005$ ) MSV ve MV grupları arasında 12. haftada da SFI sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. **(Şekil 13) Tablo 4’te** siyatik fonksiyon indeksi ortalama değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 4. Siyatik fonksiyon indeksinin gruptaki ortalama±standart sapma değerleri**

| GRUP       | 4. HAFTA SFI   | 8. HAFTA SFI | 12. HAFTA SFI |
|------------|----------------|--------------|---------------|
| <b>K</b>   | -84.96 ± 5.97  | -77.49±6.43  | -76.55±3.70   |
| <b>SV</b>  | -84.67 ± 13.21 | -71.43±8.33  | -65.28±11.79  |
| <b>MSV</b> | -84.25 ± 9.04  | -67.68±12.16 | -46.28±19.45  |
| <b>V</b>   | -81.51 ± 3.63  | -70.18±13.49 | -68.83±9.88   |
| <b>MV</b>  | -84.70 ± 5.19  | -75.68±9.89  | -56.07±8.83   |

(SFI, Siyatik Fonksiyon İndeksi)

#### 4.4 Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi

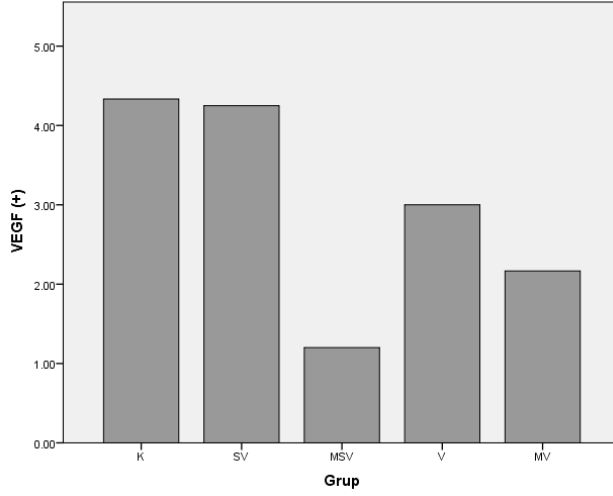


**Şekil 14. Gastroknemius kas indeksi grafiği. Gruplar arası gastroknemius kas indeksinde anlamlı bir farklılık saptanmadı.**

Gruplar arası gastroknemius kas indekslerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı.

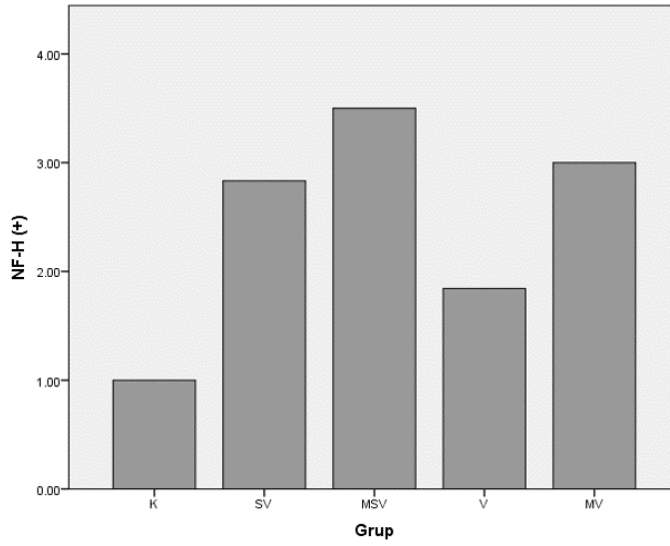
Şekil 14’de grupların gastroknemius kas ağırlık indeksleri grafik halinde belirtilmiştir.

#### 4.5 İmmünohistokimyasal Sonuçlar



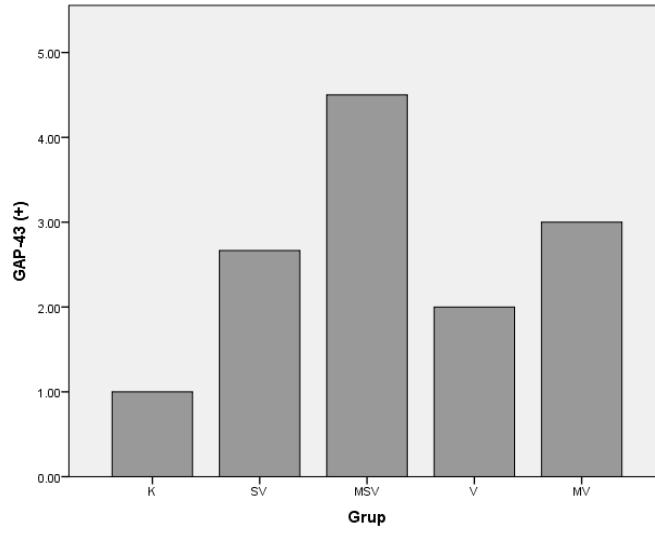
Şekil 15. Gruplardaki VEGF (+) immunreaksiyonu gösteren grafik

Rejenerasyon bölgesinde VEGF (+) immunreaksiyon miktarı SV grubunda anlamlı olarak diğer gruplardan yüksek bulunurken ( $p<0.0001$ ), MSV grubunda anlamlı olarak diğer gruplardan düşük bulunmuştur ( $p<0.0001$ ). Ayrıntılı VEGF immunohistokimyasal boyama sonuçları ve ortalama değerleri Şekil 15’de gösterilmiştir.



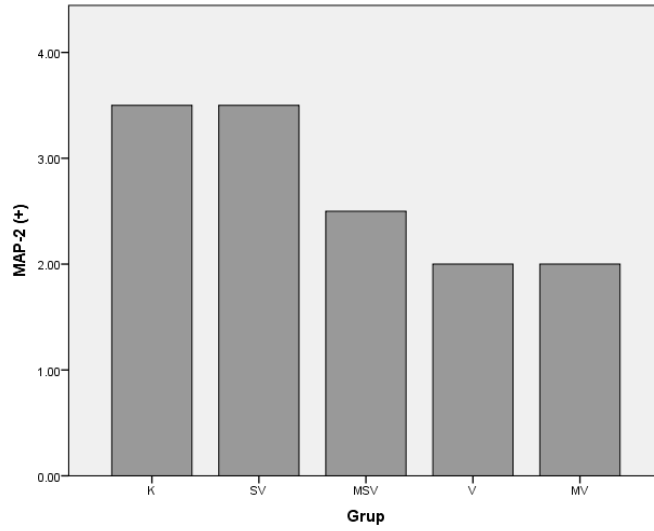
**Şekil 16. Gruplardaki NF-H (+) immunreaksiyonu gösteren grafik**

MSV grubunda, rejenerasyon bölgesinde matür akson belirteci olan NF-H (+) immünreaktivite miktarı diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulundu (K, SV, V,  $p<0.0001$ ; MV,  $p=0.001$ ). V grubu haricinde tüm gruplarda NF-H (+) immünreaksiyon miktarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu izlendi ( $p<0.0001$ ). Ayrıntılı NF-H immünboyama sonuçları **Şekil 16**'da gösterilmiştir.



**Şekil 17. Gruplardaki GAP-43 (+) immunreaksiyonu gösteren grafik**

GAP-43 (+) immunreaktivite gösteren Schwann hücrelerinin diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak en yoğun olduğu grubun MSV olduğu görüldü. ( $p<0.0001$ ) V grubu hariç tüm gruplardaki GAP-43 (+)'liğinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. ( $p<0.0001$ ) SV, V, MV grupları arasında anlamlı bir fark izlenmedi. GAP-43 immünboyama sonuçları **Şekil 17**'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



**Şekil 18. Gruplardaki MAP-2 (+) immunreaksiyonu gösteren grafik**

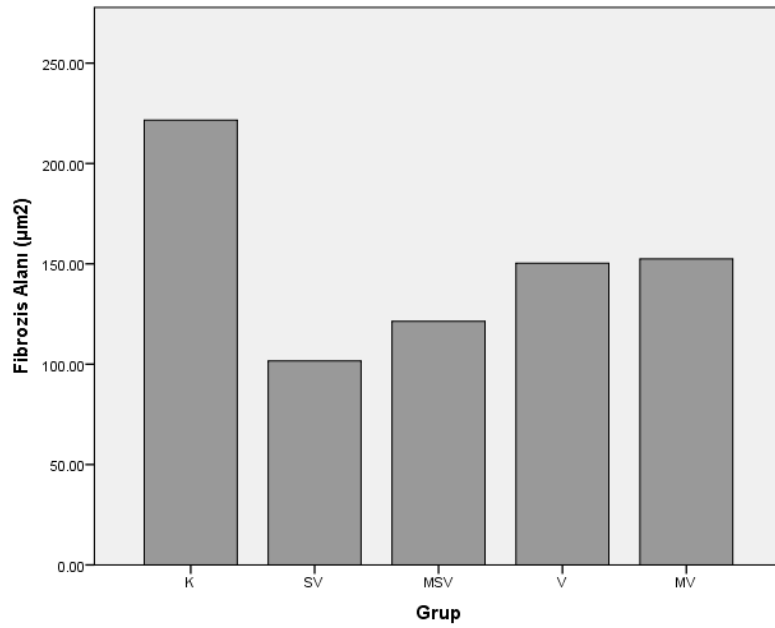
MAP-2 immunreaksiyonu, kontrol grubunda MSV ( $p=0.02$ ), V ( $p=0.01$ ) ve MV ( $p<0.0001$ ) gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. MAP-2 immünboyama verileri **Şekil 18**'de belirtilmiştir. Tüm gruplardaki immunohistokimyasal boyamaların sonuç ortalamaları **Tablo 5**'de standart sapmalarıyla birlikte gösterilmiştir.

**Tablo 5. İmmunohistokimyasal sonuçların gruplardaki ortalama±standart sapma değerleri**

| GRUP | VEGF | NF-H | GAP-43 | MAP-2 |
|------|------|------|--------|-------|
|------|------|------|--------|-------|



|            |           |           |           |           |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>K</b>   | 3.00±0.49 | 1.00±0.18 | 1.00±0.32 | 3.50±0.26 |
| <b>SV</b>  | 4.50±0.27 | 2.50±0.36 | 2.67±0.57 | 3.50±0.45 |
| <b>MSV</b> | 1.50±0.35 | 4.00±0.49 | 4.50±0.24 | 2.50±0.24 |
| <b>V</b>   | 3.00±0.00 | 1.56±0.54 | 2.00±0.24 | 2.00±0.24 |
| <b>MV</b>  | 3.00±0.57 | 3.00±0.40 | 3.00±0.60 | 2.00±0.47 |



**Şekil 19. Gruplarda tamir bölgesindeki ortalama fibrozis alanını gösteren grafik**

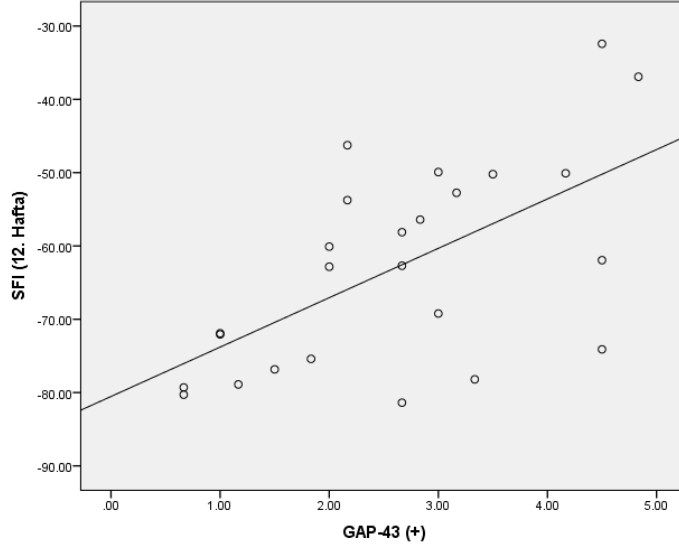
Fibrozis alanının en fazla kontrol grubunda (K) olduğu izlenirken gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ( $p=0.0001$ ). Diğer tüm gruplardaki fibrozis miktarı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ( $p=0.0001$ ). SV ve V

grubu arasındaki kıyaslamada fibrozis alanının SV grubunda anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ( $p=0.01$ ). Yine MSV ve MV grupları kıyaslandığında MSV grubunda fibrozis alanının anlamlı olarak düşük olduğu görüldü. ( $p=0.01$ ) Bundan sütürle tamir yapılan gruplarda daha az fibrozis olduğu sonucuna varıldı. SV ve MSV grupları arasında ve V, MV grupları arasında anlamlı fark izlenmedi. Bu da mezenkimal kök hücre eklenmesinin fibrozis açısından anlamlı bir sonuç oluşturmadığını gösterdi. Gruplardaki fibrozis alan kıyaslaması ortalamaları **Şekil 19** ve **Tablo 6**'te gösterilmiştir.

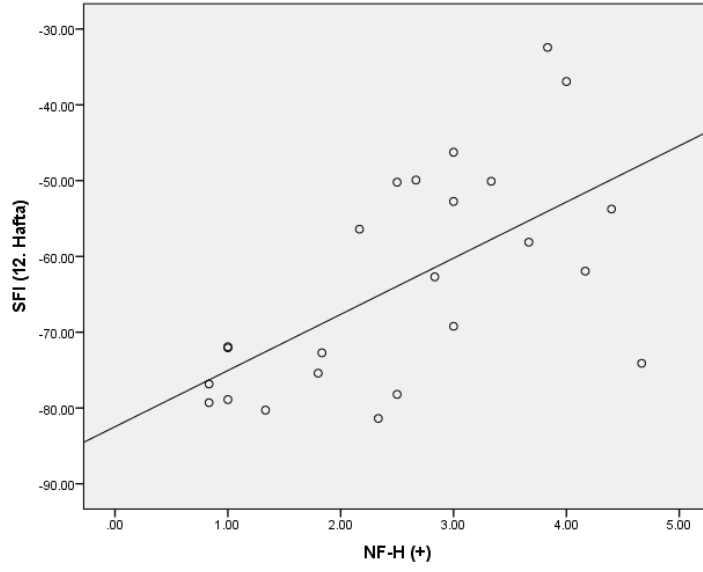
**Tablo 6. Fibrozis alanının gruplardaki ortalama±standart sapma değerleri**

| GRUP                                               | K              | SV            | MSV            | V              | MV             |
|----------------------------------------------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Fibrozis alanı (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b> | 221.59 ± 25.91 | 101.64 ± 7.16 | 121.37 ± 18.82 | 150.31 ± 12.10 | 152.45 ± 11.88 |

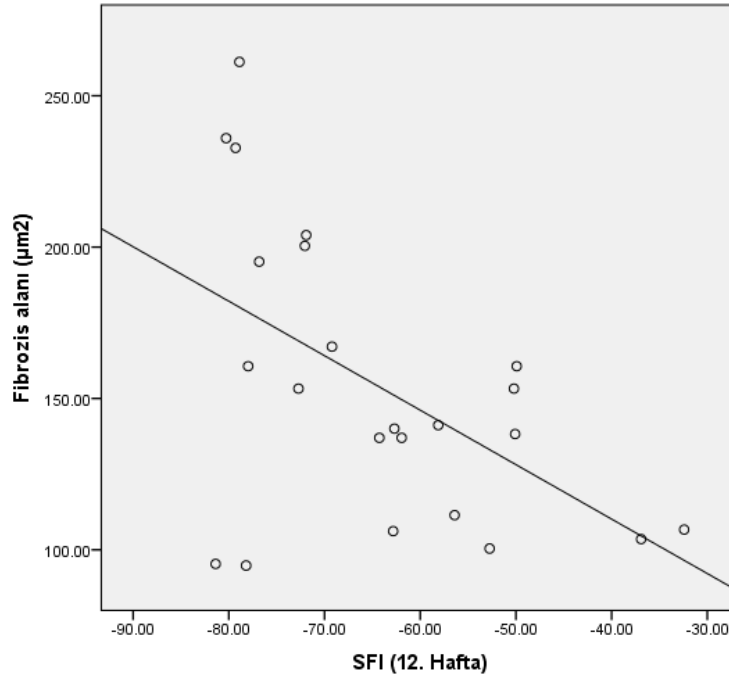
Rejenerasyon bölgesinde, GAP-43 (+) ve NF-H (+) immunreaksiyonun daha yüksek olduğu ve fizrozis alanının daha düşük olduğu sıçanlarda siyatik fonksiyon indeksinin (12. Hafta) daha iyi olduğu izlendi. Yapılan korelasyon analizlerinde deneklerin sakrifiye edilmeden önceki son yürüme analizi olan 12. hafta SFI ile immunohistokimyasal olarak NF-H ( $\rho:0.612$ ;  $p=0.001$ ) ve GAP-43 ( $\rho:0.604$ ;  $p=0.001$ ) pozitifliği ve fibrozis alanı ( $\rho: -0.526$ ,  $p=0.01$ ) arasında anlamlı korelasyon belirlendi. **Şekil 20**, **Şekil 21** ve **Şekil 22**'da bu korelasyonlar grafik halinde görülmektedir.



**Şekil 20. GAP-43 (+) & 12. hafta SFI korelasyon grafiği. GAP-43 pozitif immureaksiyonu ile siyatik fonksiyon indeksi arasında korelasyon saptandı (rho:0.604 ; p=0.001)**

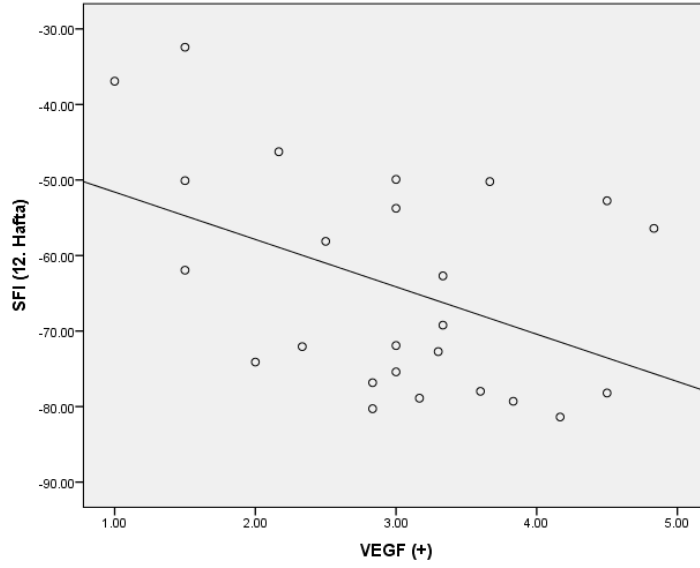


**Şekil 21. NF-H (+) & 12. hafta SFI korelasyon grafiği. NF-H pozitif immureaksiyonu ile siyatik fonksiyon indeksi arasında korelasyon saptandı. (rho:0.612; p=0.001)**



**Şekil 22. Fibrozis alanı & 12. hafta SFI korelasyon grafiği. Fibrozis alanı azaldıkça 12. Hafta SFI’de anlamlı iyileşme izlendi. (rho: -0.526, p=0.01)**

12. hafta SFI indeksinin daha iyi olduğu hastalarda VEGF (+) immunreaksiyon oranının göreceli olarak azalması dikkat çekmesine rağmen yapılan korelasyon testlerinde anlamlı bir korelasyon saptanmadı. **Şekil 23**’de nokta dağılım grafiği olarak bu ilişki gösterilmiştir.



**Şekil 23. VEGF (+) & 12. hafta SFI değişim grafiği. Nokta dağılım grafiğinde VEGF (+) liği arttıkça 12. Hafta SFI’de düşme olduğu görüldü fakat anlamlı bir korelasyon saptanmadı.**

## **5. TARTIŞMA**

Bu çalışmada ven grefti yardımıyla rejenerasyon bölgesinden sütürlerin uzaklaştırıldığı bir tamir yöntemi tanımlanarak sütür kullanılan primer sinir tamir yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Epinöral sütürlerin ven grefti ile sarıldığı yöntemin fonksiyonel ve histolojik sonuçlarının ven grefti ile yapılan sütürsüz tamire ve geleneksel epinöral tamire göre daha iyi olduğu görülmüştür.

Primer sinir tamirlerinde altın standart olarak kullanılan epinöral sütürlerle onarım tekniğinde sütür iğnesinin mekanik travma oluşturması, sütür reaksiyonu nedeniyle anastomoz bölgesinde granülasyon dokusu oluşması, akson uçlarında hizalanma bozukluklarına yol ağabilmesi ve nöroma ile sonuğlanabilmesi gibi sorunlardan dolayı sütürlerin kullanılmadığı yöntemler gündeme gelmiştir.(21, 61, 62) Fibrin yapıştırıcı sinir tamirleri için kullanılmış , sütürsüz bir yaklaşımı sağlamakla birlikte oluşabilecek skar dokusuna karşı bir bariyer oluşturmuştur. (21, 36) F lix ve arkadaşları primer epinöral tamiri sütür ve fibrin yapıştırıcı ile uygulamışlar, SFI sonuçlarında her iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulamamalarına rağmen sinir lif ve myelin kılıf alanının fibrin yapıştırıcı ile yapılan grupta anlamlı olarak daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. (37) Martins ve arkadaşları da aynı şekilde sıçan siyatik sinirleri üzerinde yaptıkları sinir tamirlerinde sadece fibrin yapıştırıcının uygulandığı grubun epinöral sütür ve epinöral sütür ile fibrin yapıştırıcının birlikte kullanıldığı gruba göre daha iyi motor aksiyon potansiyel sonuçları olduğunu belirtmişlerdir. Ne var ki gruplar arasında SFI ve histolojik sonuçlar açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır. (63) Whitlock ve arkadaşları ise fibrin yapıştırıcı ve sütürle epinöral tamir arasında, mikrocerrahinin tecrübeli cerrahlar tarafından uygulanması halinde histomorfometrik sonuçlar açısından bir fark olmadığını göstermişlerdir. (64) Her ne kadar sütürlerin fibrozise neden olduğu belirtilmişse de bu çalışmalarda fibrozis açısından bir değerlendirme yapılmamıştır. Fibrin yapıştırıcının düşük mekanik stabilitesi, bazen stabilizasyon için ek sütür gerektirmesi, viral ve prion enfeksiyonları taşıması gibi dezavantajları da belirtilmiştir.

(21)

Son yıllarda sütür materyallerinin belirtilen negatif etkilerinden kurtulmak amacıyla lazerle doku kaynak (Laser tissue welding, LTW) yöntemi araştırmaları yapılmıştır. (21, 38, 39) Menovsky ve arkadaşları sıçan siyatik sinirinde epinöral tamirlerde sütür düğümlerinin rejenerasyon bölgesine göç ettiklerini ve hizalanma bozukluklarına yol açtıklarını belirtmişlerdir. Uyguladıkları lazer yardımcı tamir yönteminde ise yabancı doku reaksiyonunun daha az olduğunu göstermişlerdir. (65) Barton ve arkadaşları lazerle aktive edilmiş kitozan yapışkan filmlerle sıçan median sinirinde tamir uygulamışlar ve geleneksel epinöral sinir tamiri ile karşılaştırmışlardır. Fonksiyonel olarak LTW’de daha hızlı bir iyileşme görülmesine rağmen, 12 haftalık takip sonunda her iki grup arasında fonksiyonel ve histolojik açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Barton ve arkadaşları sütürle tamir edilen grupta sütür etrafını saran infiltratı histolojik olarak göstermiş ve bu infiltratların rejenere olan liflerde hizalanma hatalarına neden olduklarını belirtmişlerdir. Her ne kadar olumlu sonuçlar belirtilmiş olsa da lazer yönteminin geç iyileşme, dokuda çatlak ve yarıklar, zayıf mekanik stabilite ve termal hasar gibi yan etkileri mevcuttur. Ayrıca teknik zor ve pahalı olmakla birlikte ameliyathanelerde anında hazır bulunabilecek teknik değildir. (39)

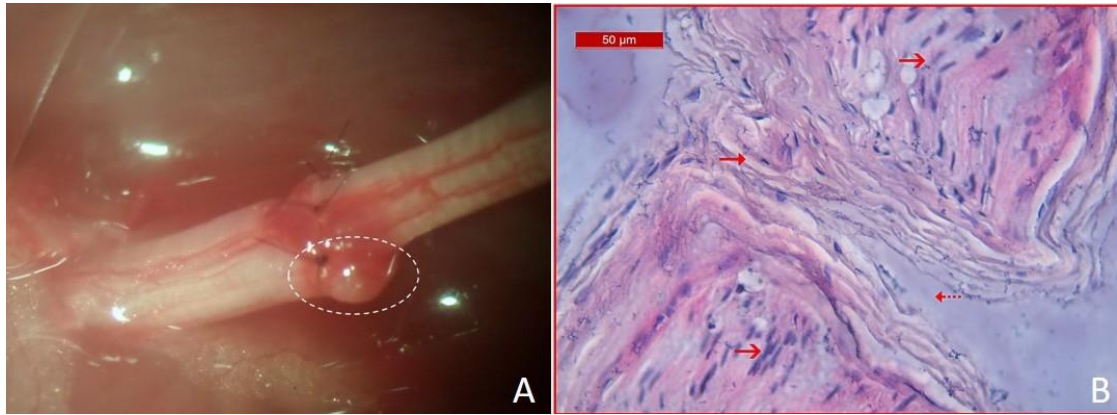
Rejenerasyon bölgesinden sütürleri uzaklaştırmak için bir diğer yöntem olarak epinöral kılıf, ven ya da sentetik ileticiler (conduit) gibi yöntemler kullanılmıştır. (66) Siemionow ve arkadaşları sıçan siyatik sinirlerinde oluşturdukları defektleri epinöral kılıf oluşturarak tamir etmişler. Bu yöntemin sütürleri rejenerasyon bölgesinden



uzaklaştırmasıyla birlikte, rejenerasyon bölgesinde gerginlik ve kompresyonu ortadan kaldıran, aksonların oluşmasını sağlayacak aksoplazmik sıvının rejenerasyon bölgesinden sızmasını engelleyen ve daha iyi bir hizalanma sağlayan bir teknik olduğunu belirtmişlerdir. Geleneksel epinöral tamirle kıyasladıklarında 12. hafta SFI sonuçlarında anlamlı bir farklılık olmamasına karşın ( $-88.39 \pm 10.75$  epinöral tamir grubu,  $-77.35 \pm 17.06$  epinöral kılıf grubu), epinöral tamir yapılan grupta daha hızlı bir iyileşme olduğunu belirtmişlerdir. **(27)** Tetik ve arkadaşları epinöral kılıf yönteminde, kılıfı fibrin yapıştırıcı ile yapıştırdıkları bir grup da uygulamışlar fakat sütür ile yapılan epinöral tamire göre anlamlı bir fark bulamamışlardır. **(28)** Yavuzer ve arkadaşları ise epinöral kılıf yönteminin rejenerasyon bölgesinde fibrozisi azalttığını belirtmişlerdir. **(29)** Ne var ki bu yöntem de hasarlı bölgede sağlam bir epinöryum gerektirir ve özellikle ezilme tarzı (crush) yaralanmalarda epinöryum bu tamir için uygun olmayabilir. **(21)**

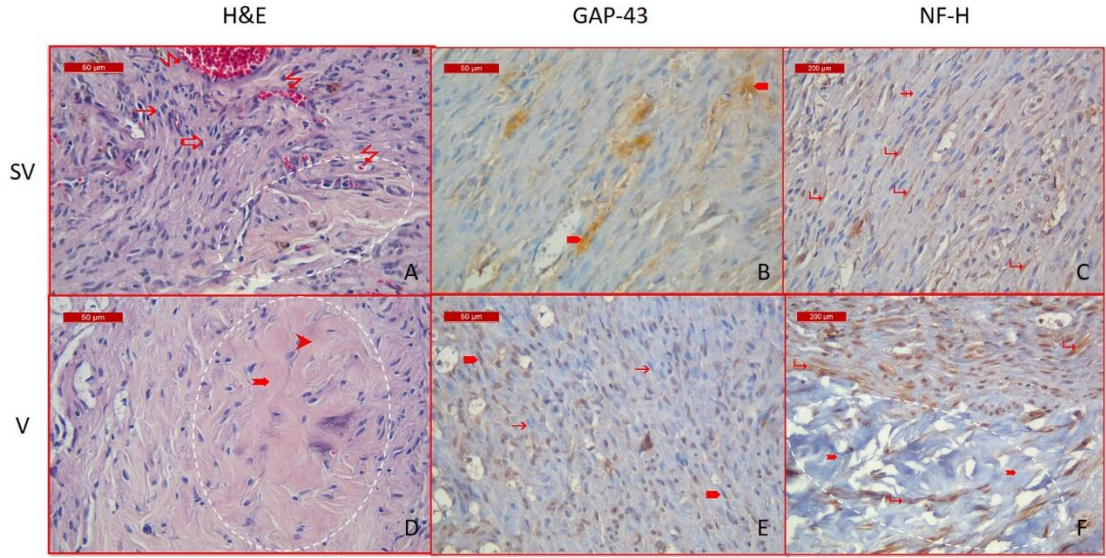
Ven greftleri primer epinöral tamirler üzerine kılıf şeklinde getirilerek kullanılmaktadır. Sinir rejenerasyon bölgesinde ven greftlerinin nörorejenerasyonu uyarıcı etkileri olduğu, skar oluşumuna karşı bariyer oluşturduğu, aksoplazmik sıvının etrafa kaçışını ve nöroma oluşumunu engellediği belirtilmiştir. **(40, 66)** Masear ve arkadaşları ven sarma (wrapping) yöntemini skar oluşumunu azaltmak amacıyla tanımlamışlardır. **(67)** Yoo ve arkadaşları anterior juguler veni epinöral tamir uyguladıkları rekürren laringeal sinire sarmışlar ve ven sarılmayan gruba göre daha iyi fonasyon sonuçları almışlardır. **(68)** Alligand-Perrin ve arkadaşları epi-perinöral tamir uyguladıkları dijital sinir hasarlarına el dorsalinden aldıkları ven grefti ile sarmışlar ve

minimal donör alan skarı ile birlikte nöroma oluşmamış iyi duysal sonuçlar bildirmişlerdir. **(69)** Leuzzi ve arkadaşları sinir hasarı olan 16 hastada otogreft olarak aldıkları ven greftini epinöral tamir öncesi proksimal kılıfa giydirip epinöral tamir yapıldıktan sonra üzerine getirmişlerdir. Ven kılıfı sarılmayan primer tamir uyguladıkları diğer 10 hastaya göre daha iyi motor ve duysal sonuçlara ulaştıklarını ve daha az nöroma oluştuğunu belirtmişlerdir. **(70)** Fonksiyonel sonuçlara dair bazı çalışmalar mevcut olsa da ven kılıfının rejenerasyon bölgesindeki etkilerine dair histolojik incelemeye literatürde rastlamadık.



**Şekil 24. Primer epinöral tamir ve iyileşme sonrası histolojik kesiti. A. Sütürler her ne kadar epinöral damarların hizalanmasını sağlıyor olsa da sütür aralarından aksonların ve aksoplazmik sıvının sızması (Kesikli çember) sıklıkla söz konusudur. B. Primer epinöral tamir sonrası Hematoksilen-Eozin boyamasında fibrozisin birleştirdiği kesi bölgesi (→), birleşmenin tamamlanmadığı kesi bölgesi (→) ve Schwann hücreleri (→) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).**

Bu çalışmada epinöral suturelerin uygulandığı primer tamire ven grefti (SV) kılıfı sarılmakla birlikte, yeni bir teknik tanımlanarak ven ile rejenerasyon bölgesinde sutureless tamir (V) uygulanmıştır. Kontrol grubunda ven kılıfı uygulanan gruplara göre daha fazla hizalanma bozukluğu ve fibrozis olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin suture aralarındaki boşluklardan aksoplazmik sıvının dışarı taşması veya dışardan içeriye doğru bir skarlaşma olması olarak belirtilmektedir. **(27, 66) (Şekil 24)** Ven uygulanan gruplarda fonksiyonel sonuçlar, sinir doku rejenerasyonu (GAP-43) ve matürizasyonu (NF-H) anlamlı olarak daha iyi izlenmiştir. Ne var ki, rejenerasyon bölgesinden suturelerin uzaklaştırılması SFI, sinir rejenerasyon ve matürasyonunda (GAP-43, NF-H boyama) anlamlı bir değişiklik yapmamıştır. Venle birlikte suture uygulanan SV grubunda, sutureless venle tamir olan V grubuna göre daha iyi hizalanma ve daha az fibrozis olduğu görülmüştür ( $p=0.01$ ). **(Şekil 25)** Her ne kadar daha önceki literatür bilgisi bize suturelerin fibroze neden olduğunu bildirirse de çalışmamızdaki histolojik incelemeler aksini göstermektedir. **(21, 65)** Son yıllardaki mikrocerrahi suture materyallerinin ve tekniğin gelişmesinin bunda önemli katkısı olduğunu düşünmekteyiz. Ven kılıflarının etkisi olduğu kadar, suturelerin uygun gerginlikte ve teknikle, dokuya hassas davranılarak koyulması halinde sinir güdükleri arasında boşluğu azaltıp arada fibröz doku oluşmasını engellediği sonucunu çıkarmaktayız. Çalışmamız bu açıdan, tecrübeli cerrahlar tarafından uygulanması halinde suturele yapılan sinir tamirinin iyi sonuçlar verebileceğini gösteren Whitlock ve arkadaşlarının çalışmasını da destekler niteliktedir. **(64)**



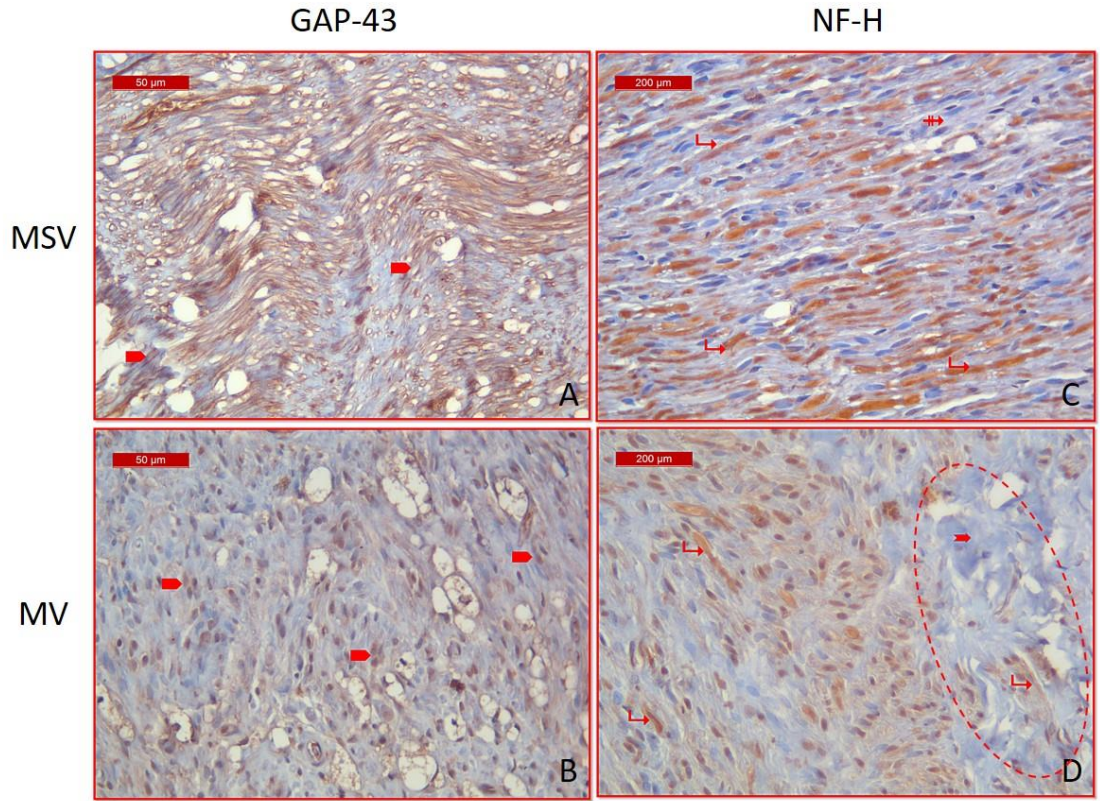
**Şekil 25. SV ve V gruplarında sinir rejenerasyon alanlarının longitudinal kesitlerde H&E, GAP-43, NF-H ile boyanma sonrası histolojik görüntüleri. Sütürlerin rejenerasyon bölgesinden uzaklaştırıldığı V grubunda (Şekil D,F) sütür kullanılan SV grubuna (Şekil A,C) göre daha fazla fibrozis (Kesikli çember) olduğu izlenmektedir. GAP-43 ve NF-H immun boyamalarda SV grubunda (Şekil B,C) V grubuna (Şekil E,F) göre daha iyi akson iyileşmesi, maturasyonu ve akson hizalanması olduğu görülmektedir.**

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) Schwann hücrelerine dönüşebilme kabiliyetleri, nörotropik faktörler salgılayabilmeleri ile sinir rejenerasyonunu iyileştirdiklerine dair literatür verileri vardır. (71) MKH'ler periferik sinir defekti onarımlarında ven veya ileticilerle (conduit) birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. (40, 41) Ne var ki mezenkimal kök hücre ile sinir rejenerasyonu daha çok sinir defektlerinde çalışılmış ve bizim bilgilerimize göre primer sinir tamirlerinde çalışılmış çok çalışma yoktur. Epinöral tamirlerde MKH'lerin yerleştirilebileceği bir rezervuar olmamasının bunun nedeni olduğunu düşünüyoruz. Seyed Foroutan ve

arkadaşları epinöral sütür ile tamir ettikleri sıçan siyatik sinir defektleri üzerine ven kılıfı getirerek içine 0.2 ml fibrin yapıştırıcı içerisindeki  $250 \times 10^3$  sayıda kemik iliği kaynaklı kök hücreyi enjekte etmişlerdir. K  k hücrenin SFI ve aksiyal kesitlerdeki akson sayımı sonuçlarında anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını bildirmişlerdir. (35)

Bu   alışmada MSV ve MV gruplarında venler bir rezervuar olarak kullanılarak içerisine  $2 \times 10^6$  sayıda kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre verilmiştir. Epinöral sütür üzerine ven grefti getirilen gruba (SV) k  k hücre eklenmesi (MSV), SFI’de 8-12 hafta arasında, k  k hücresiz gruplara göre daha fazla artış izlenmesine rağmen istatistiksel analizde anlamlı bir değişiklik saptanmadı ( $p=0.06$ ). NF-H ( $p=0.001$ ) ve GAP-43 ( $p=0.0001$ ) immunreaksiyonlarında k  k hücre eklenen grupta anlamlı artış izlendi. (**şekil 26**) Epinöral sütürün uygulanmadığı ven grefti ile tamir yapılp k  k hücre eklenen MV grubunda, k  k hücre eklenmeyen V grubuna göre 8-12 hafta arasında SFI’de anlamlı artış izlendi ( $p=0.05$ ; SFI, MV: -56, V: -68.8). Aynı zamanda rejenerasyon bölgesindeki NF (0.01) ve GAP (0.01) immun reaksiyonlarındada anlamlı artış izlendi. Bu çalışmada mezenkimal kök hücrelerin primer tamirlerin fonksiyonel sonuçlarına anlamlı katkı sağlamamakla beraber histolojik olarak sinir matürasyonunu ve akson diferansiyasyonunu artırdığı izlendi. Ayrıca k  k hücre eklenen gruplarda fibrozisin miktarında anlamlı bir farklılık olmadığı fakat histolojik kesitlerde akson hizalanmasının ve yoğunluğunun daha iyi olduğu izlendi. Ne var ki bu çalışmada kesitler longitudinal olarak hazırlandığı için akson sayımı yapılmadığından ve hizalanmaya yönelik somut bir değerlendirme metodu olmadığından bu kıyaslamalar

istatistiksel olarak uygulanamadı. Tüm grupların H&E, GAP-43, NF-H, VEGF ve MAP-2 ile immunohistolojik olarak boyanmaları sonrası elde edilen örnek görüntüler **Şekil 27'**de gösterilmiştir.



**Şekil 26.** MSV ve MV gruplarında sinir rejenerasyon alanlarının longitudinal kesitlerde GAP-43 ve NF-H ile boyanma sonrası histolojik görüntüleri. MSV grubunda (A,C) MV grubuna (B,D) kıyasla her iki boyada da daha yoğun immunreaktivite gözlemlendiği ve akson iyileşmesi, maturasyonu ve akson hizalanmasının daha iyi olduğu görülmektedir. MV grubunda NF-H boyamada (D şekli) rejenerasyon bölgesindeki yoğun fibrozis dikkat çekmektedir.



Çalışmamızda sinir iyileşmesi ve olgunlaşması immunohistolojik incelemelerde GAP-43 ve NF immunreaktivitesinin belirlenmesiyle değerlendirildi. GAP-43 ( $\rho:0.604$ ;  $p=0.001$ ) ve NF ( $\rho:0.612$ ;  $p=0.001$ ) immunreaksiyonu ve fonksiyonel sonuçlar arasında pozitif korelasyon olduğu belirlendi. (**Şekil 20, Şekil 21**) Aynı şekilde tamir alanındaki fibrozis miktarı ile fonksiyonel sonuçların ters korele olduğunu saptadık ( $\rho: -0.526$ ,  $p=0.01$ ). (**Şekil 22**) Literatürde bu korelasyonların varlığına dair başka bir çalışmaya rastlamadık. Ayrıca herhangi bir korelasyon bulunamamasına rağmen VEGF'ün daha iyi iyileşme ve matürasyon gösteren sinir dokularda daha düşük immunreaksiyon gösterdiğini saptadık. (**Şekil 23**) Bu, iyileşmeyi yüksek oranda tamamlayan dokularda vaskülarizasyonun da buna bağlı olarak azaldığını bize düşündürdü.

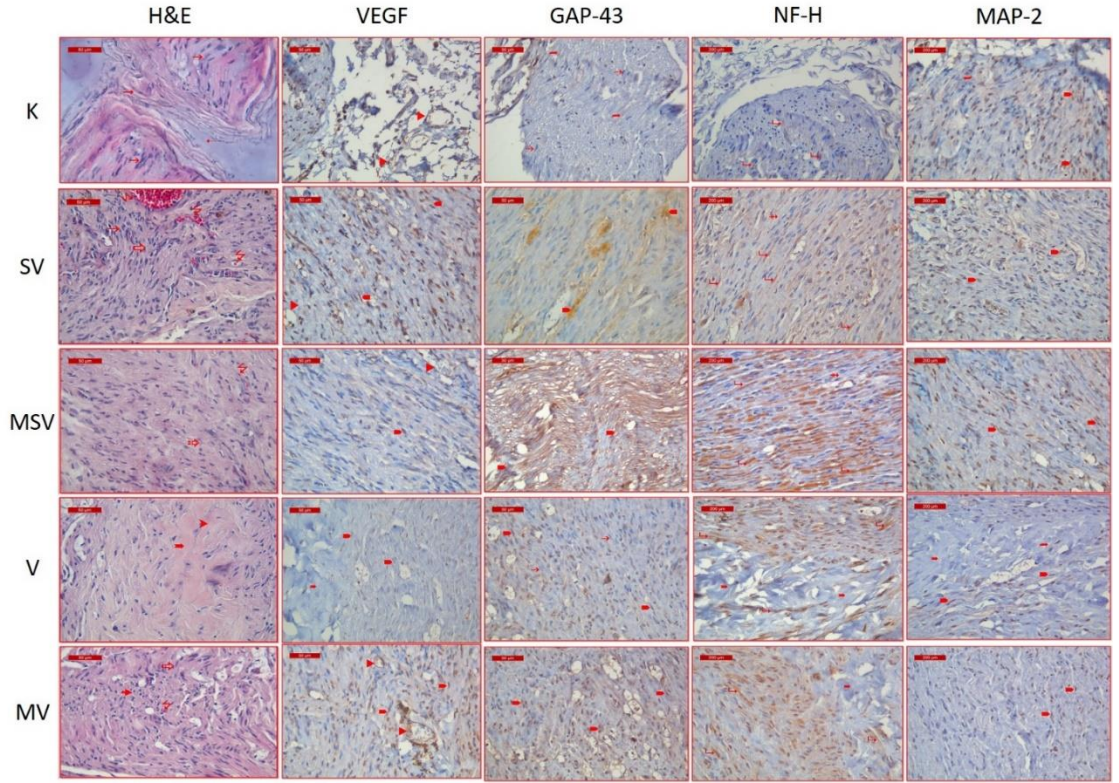
## 6. SONUÇ

Periferik sinir hasarlarında, epinöral tamiri takiben ven kılıfı uygulanan ve mezenkimal kök hücre enjekte edilen tamirlerde en iyi fonksiyonel ve histolojik sonuçlara ulaşılmaktadır. Sütürler önceki literatür bilgisinin aksine uygun şekilde uygulandığında sinir uçlarını birbirine daha iyi yaklaştırıp hizalayarak fibrozisi azaltmakta ve rejenerasyonu iyileştirmektedir. Ven uygulaması aynı zamanda primer sinir tamirlerinde mezenkimal kök hücre uygulaması için bir rezervuar

oluşturabilmektedir. Kök hücre uygulaması fibroziste anlamlı değişiklik yapmamakla birlikte, daha iyi hizalanma, akson oluşması ve matürasyonu sağlamaktadır.

Periferik sinir tamirlerinde altın standart olan epinöral tamirlerin ven kılıfı kullanılarak yapılan alternatif yöntemlerle kıyaslanması ve altın standart yöntemin yeniden gözden geçirilmesini önermekteyiz. Sinir bölgesindeki sütürlerin uygun yerleştirildiğinde, literatürün aksine sinir tamirinde olumlu etki sağladığını saptadığımızdan dolayı cerrahların periferik sinir tamirlerinde sütürden kaçınmak yerine uygun sayıda (3-4), uygun sütür materyali ile (9-0, 10-0) gergin olmayan ve epinöral damarların iyi hizalandığı bir tamir uygulayabilir ve üzerini ven grefti ile sarabilirler. Mezenkimal kök hücreler her ne kadar literatürde sinir defektlerinin (gap) tamirinde çalışılmışsa da primer sinir tamirinde de etkili olabilmektedirler ve bu konuda da destekleyici ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca sinir tamirinde histolojik olarak değerlendirilen aksonal iyileşme, matürasyon ve fibrozis miktarının fonksiyonel sonuçlarla korelasyonuna dair literatürde başka bilgi yoktur ve destekleyici çalışmalar gerekmektedir. Bu korelasyonların varlığı sinir iyileşmesinde in vitro araştırmaların önemini daha fazla ortaya koyacaktır. Fibrozisin azaltılmasının fonksiyonel sinir iyileşmesine olumlu katkı sağlaması açısından, in vitro olarak fibrozisi azaltan ajanların sinir rejenerasyonunda çalışılmasını önermekteyiz.





**Şekil 27. Sinir rejenerasyon alanlarının longitudinal kesitlerde H&E, GAP-43, NF-H, VEGF ve MAP-2 ile boyanma sonrası histolojik görüntüleri**

## 7. ÖZET VE “ABSTRACT”

### 7.1 Özet

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı ven grefti kullanılarak sütürsüz periferik sinir tamir tekniği tanımlayarak bu tekniği epinöral sinir tamirleriyle kıyaslamaktır. Ayrıca ven grefti kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (BMSC) için rezervuar olarak kullanılarak primer sinir tamirlerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

**Metod:** Otuz Wistar Albino sıçan rastgele beş gruba ayrıldı. Siyatik sinir kesildi. İlk grupta (K) epinöral tamir uygulandı. İkinci grupta (SV) epinöral tamir üzerine ven grefti sarıldı. Üçüncü grup (MSV), SV grubu gibi tamir edilerek ven içine BMSC enjekte edildi. Dördüncü grupta (V) ven grefti ile sütürsüz tamir uygulandı. Beşinci grup (MV), dördüncü grup gibi tamir edilerek ven içine BMSC enjekte edildi. Fonksiyonel iyileşme pinprick, toespread testleri ve siyatik fonksiyon indeksi (SFI) ile değerlendirildi. Sinir rejenerasyonu aynı zamanda gastroknemius kas indeksi ve immunohistokimyasal analizle değerlendirildi.

**Bulgular:** Pinprick ve toespread testleri açısından gruplar arasında fark izlenmedi. SFI 4 ve 8. haftalarda fark göstermezken, 12. haftada tüm diğer gruplarda

epinöral tamire göre daha iyi sonuçlar izlendi ve en iyi sonuç MSV grubunda görüldü ( $p<0.05$ ). (SFI, K:  $-76.5\pm3.7$ , SV:  $-65.2\pm11.7$ , MSV:  $-46.2\pm19.4$ , V:  $-68.8\pm9.8$ , MV:  $-56\pm8.8$ ) Gruplar arasında gastroknemius kas indeksinde bir fark yoktu. GAP-43 ve NF-H boyamalarında en iyi immunreaktivite sırasıyla MSV, MV, SV, V gruplarında izlendi ( $p<0.05$ ). MSV grubu diğer gruplara göre daha az fibrozis ve daha iyi hizalanma gösterdi.

**Sonuçlar:** Ven grefti ile sütürsüz teknik, epinöral tamir ile kıyaslandığında daha iyi fonksiyonel sonuçlar göstermesine rağmen, ven grefti ile sarılmadan önce yapılan epinöral sütürle tamirin fonksiyonel ve immunohistokimyasal sonuçları iyileştirip fibrozisi azalttığı izlendi. BMSC uygulamasının da primer sinir tamirlerinde rejenerasyonu artırdığı saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** Sütürsüz sinir tamir, periferik sinir hasarı, ven grefti, mezenkimal kök hücre

## 7.2 Abstract

**Purpose:** The aim of this study was to define a sutureless peripheral nerve repair technique using a vein graft and compare it to epineural repair with or without wrapped vein. The vein grafts were also used as a reservoir for bone marrow-derived stem cells (BMSC) and their effects on primary nerve repair was investigated.

**Methods:** Thirty Wistar Albino rats were randomly divided into five groups. The sciatic nerve was transected. In the first group (K), epineural repair was performed. In the second group (SV), an epineural repair was wrapped with a vein graft. The third group (MSV) were treated like SV group and BMSC was injected into the vein. In the fourth group (V), sutureless repair with vein graft was performed. The fifth group (MV) was treated like V group and BMSC was injected. Functional recovery was evaluated with pinprick, toe spread tests and sciatic nerve index (SFI). Nerve regeneration was also assessed by gastrocnemius index and immunohistochemical analysis.

**Results:** There was no difference in pinprick and toe spread tests between the groups. SFI revealed no difference at 4th and 8th weeks, however, at the 12th week all other groups showed better improvement compared to epineural repair where the MSV revealed the best ( $p<0.05$ ). (K:  $-76.5\pm3.7$ , SV:  $-65.2\pm11.7$ , MSV:  $-46.2\pm19.4$ , V:  $-68.8\pm9.8$ , MV:  $-56\pm8.8$ ) There was no difference in gastrocnemius index between the groups. Better immunoreaction in GAP-43 and NF-H staining was observed in MSV, MV, SV, V groups, respectively ( $p<0.05$ ). MSV group showed less fibrosis and better alignment compared to other groups.

**Conclusions:** Although sutureless repair with a vein graft reveals better functional results compared to epineural repair, epineural suture repair before vein wrapping improves functional and immunohistochemical results and decreases fibrosis. BMSCs also improves regeneration in primary peripheral nerve repair.

**Key words:** Sutureless nerve repair, peripheral nerve injury, vein graft, mesenchymal stem cell

## 8. KAYNAKLAR

1. J IJ-P, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004;25(9):1583-92.
2. Dinis TM, Elia R, Vidal G, Dermigny Q, Denoeud C, Kaplan DL, et al. 3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;41:43-55.
3. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*. 2000;23(6):863-73.
4. Panagopoulos GN, Megaloikonomos PD, Mavrogenis AF. The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration. *Orthopedics*. 2016:1-16.
5. M FG, M M, S H, Khan WS. Peripheral nerve injury: principles for repair and regeneration. *Open Orthop J*. 2014;8:199-203.
6. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg*. 2000;8(4):243-52.
7. Smith BE. *Handbook of Clinical Neurophysiology*. Kimura J, editor 2006.
8. Nahirney WKOaPC. *Netter's Essential Histology*: Elsevier; 2013.

9. Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.* 2013;29(3):317-30.
10. Sunderland S. *Nerve injuries and Their Repair: A Critical Appraisal.* New York: Churchill Livingstone; 1991.
11. Seddon H. *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1972.
12. Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, et al. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. *Prog Neurobiol.* 2010;92(3):245-76.
13. Fairbairn NG, Meppelink AM, Ng-Glazier J, Randolph MA, Winograd JM. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J Stem Cells.* 2015;7(1):11-26.
14. Lin MY, Manzano G, Gupta R. Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin.* 2013;29(3):331-48.
15. Karanth S, Yang G, Yeh J, Richardson PM. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Exp Neurol.* 2006;202(1):161-6.
16. Sulaiman W, Gordon T. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *Ochsner J.* 2013;13(1):100-8.
17. Mackinnon SE. *Nerve Surgery.* 1 ed. New York: Thieme; 2015.

18. Sunderland IR, Brenner MJ, Singham J, Rickman SR, Hunter DA, Mackinnon SE. Effect of tension on nerve regeneration in rat sciatic nerve transection model. *Ann Plast Surg.* 2004;53(4):382-7.
19. Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am.* 2001;12(2):341-52.
20. Dvali L, Mackinnon S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clin Plast Surg.* 2003;30(2):203-21.
21. Barton MJ, Morley JW, Stoodley MA, Lauto A, Mahns DA. Nerve repair: toward a sutureless approach. *Neurosurg Rev.* 2014;37(4):585-95.
22. Pierce NE, Alt JA, Antonelli PJ. Hydrogel sutureless facial nerve repair: pilot clinical investigation. *Laryngoscope.* 2015;125(6):1456-9.
23. Strauch B, Rodriguez DM, Diaz J, Yu HL, Kaplan G, Weinstein DE. Autologous Schwann cells drive regeneration through a 6-cm autogenous venous nerve conduit. *J Reconstr Microsurg.* 2001;17(8):589-95; discussion 96-7.
24. Sorensen J, Fugleholm K, Moldovan M, Schmalbruch H, Krarup C. Axonal elongation through long acellular nerve segments depends on recruitment of phagocytic cells from the near-nerve environment. Electrophysiological and morphological studies in the cat. *Brain Res.* 2001;903(1-2):185-97.
25. Zack-Williams SD, Butler PE, Kalaskar DM. Current progress in use of adipose derived stem cells in peripheral nerve regeneration. *World J Stem Cells.* 2015;7(1):51-64.

26. Lubiatowski P, Unsal FM, Nair D, Ozer K, Siemionow M. The epineural sleeve technique for nerve graft reconstruction enhances nerve recovery. *Microsurgery*. 2008;28(3):160-7.
27. Siemionow M, Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E. Epineural sleeve neurorrhaphy: surgical technique and functional results--a preliminary report. *Ann Plast Surg*. 2002;48(3):281-5.
28. Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. Conventional versus epineural sleeve neurorrhaphy technique: functional and histomorphometric analysis. *Ann Plast Surg*. 2002;49(4):397-403.
29. Yavuzer R, Ayhan S, Latifoglu O, Atabay K. Turnover epineural sheath tube in primary repair of peripheral nerves. *Ann Plast Surg*. 2002;48(4):392-400.
30. Zhang F, Blain B, Beck J, Zhang J, Chen Z, Chen ZW, et al. Autogenous venous graft with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects. *J Reconstr Microsurg*. 2002;18(4):295-300.
31. Eren F, Yuksel F, Ulkur E, Cavdar S, Ercan F, Celikoz B. Nerve regeneration through a healthy nerve trunk: a new and hopeful conduit for bridging nerve defects. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(6):1697-705.
32. Kelleher MO, Al-Abri RK, Eleuterio ML, Myles LM, Lenihan DV, Glasby MA. The use of conventional and invaginated autologous vein grafts for nerve repair by means of entubulation. *Br J Plast Surg*. 2001;54(1):53-7.
33. Sabongi RG, Fernandes M, Dos Santos JB. Peripheral nerve regeneration with conduits: use of vein tubes. *Neural Regen Res*. 2015;10(4):529-33.



34. Levine MH, Yates KE, Kaban LB. Nerve growth factor is expressed in rat femoral vein. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(7):729-33; discussion 34.
35. Seyed Foroutan K, Khodarahmi A, Alavi H, Pedram S, Baghaban Eslaminejad MR, Bordbar S. Bone marrow mesenchymal stem cell and vein conduit on sciatic nerve repair in rats. *Trauma Mon.* 2015;20(1):e23325.
36. Sameem M, Wood TJ, Bain JR. A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(6):2381-90.
37. Felix SP, Pereira Lopes FR, Marques SA, Martinez AM. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. *Microsurgery.* 2013;33(6):468-77.
38. Barton M, Morley JW, Stoodley MA, Ng KS, Piller SC, Duong H, et al. Laser-activated adhesive films for sutureless median nerve anastomosis. *J Biophotonics.* 2013;6(11-12):938-49.
39. Barton MJ, Morley JW, Stoodley MA, Shaikh S, Mahns DA, Lauto A. Long term recovery of median nerve repair using laser-activated chitosan adhesive films. *J Biophotonics.* 2015;8(3):196-207.
40. Nijhuis TH, Brzezicki G, Klimczak A, Siemionow M. Isogenic venous graft supported with bone marrow stromal cells as a natural conduit for bridging a 20 mm nerve gap. *Microsurgery.* 2010;30(8):639-45.
41. Wang X, Luo E, Li Y, Hu J. Schwann-like mesenchymal stem cells within vein graft facilitate facial nerve regeneration and remyelination. *Brain Res.* 2011;1383:71-80.

42. Chen X, Wang XD, Chen G, Lin WW, Yao J, Gu XS. Study of in vivo differentiation of rat bone marrow stromal cells into schwann cell-like cells. *Microsurgery*. 2006;26(2):111-5.
43. Marconi S, Castiglione G, Turano E, Bissolotti G, Angiari S, Farinazzo A, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(11-12):1264-72.
44. Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev*. 2014;23(7):741-54.
45. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Transplantation of cultured bone marrow stromal cells to improve peripheral nerve regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005;34(5):537-42.
46. Cooney DS, Wimmers EG, Ibrahim Z, Grahammer J, Christensen JM, Brat GA, et al. Mesenchymal Stem Cells Enhance Nerve Regeneration in a Rat Sciatic Nerve Repair and Hindlimb Transplant Model. *Sci Rep*. 2016;6:31306.
47. Ladak A, Olson J, Tredget EE, Gordon T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp Neurol*. 2011;228(2):242-52.
48. Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez-Corrochano R, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res*. 2002;24(7):634-8.

49. Cuevas P, Carceller F, Garcia-Gomez I, Yan M, Dujovny M. Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol Res.* 2004;26(2):230-2.
50. Walsh S, Midha R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus.* 2009;26(2):E2.
51. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaour M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One.* 2011;6(3):e17899.
52. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010;5(2):103-10.
53. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;32(5):414-25.
54. Carriel V, Garzon I, Alaminos M, Cornelissen M. Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural Regen Res.* 2014;9(18):1657-60.
55. Carriel V, Garrido-Gomez J, Hernandez-Cortes P, Garzon I, Garcia-Garcia S, Saez-Moreno JA, et al. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng.* 2013;10(2):026022.
56. Huang W, Begum R, Barber T, Ibba V, Tee NC, Hussain M, et al. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. *Biomaterials.* 2012;33(1):59-71.

57. Ma CH, Omura T, Cobos EJ, Latremoliere A, Ghasemlou N, Brenner GJ, et al. Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4332-47.
58. Carriel V, Garzon I, Campos A, Cornelissen M, Alaminos M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(2):553-63.
59. 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(1):129-38.
60. Zeng X, Zhang L, Sun L, Zhang D, Zhao H, Jia J, et al. Recovery from rat sciatic nerve injury in vivo through the use of differentiated MDSCs in vitro. *Exp Ther Med*. 2013;5(1):193-6.
61. Chimutengwende-Gordon M, Khan W. Recent advances and developments in neural repair and regeneration for hand surgery. *Open Orthop J*. 2012;6:103-7.
62. Tse R, Ko JH. Nerve glue for upper extremity reconstruction. *Hand Clin*. 2012;28(4):529-40.
63. Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JP. Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of the 2 techniques in a rat model. Which is the ideal choice? *Surg Neurol*. 2005;64 Suppl 1:S1:10-6; discussion S1:6.

64. Whitlock EL, Kasukurthi R, Yan Y, Tung TH, Hunter DA, Mackinnon SE. Fibrin glue mitigates the learning curve of microneurosurgical repair. *Microsurgery*. 2010;30(3):218-22.
65. Menovsky T, Beek JF. Carbon dioxide laser-assisted nerve repair: effect of solder and suture material on nerve regeneration in rat sciatic nerve. *Microsurgery*. 2003;23(2):109-16.
66. Siemionow M, Uygur S, Ozturk C, Siemionow K. Techniques and materials for enhancement of peripheral nerve regeneration: a literature review. *Microsurgery*. 2013;33(4):318-28.
67. Masear VR, Colgin S. The treatment of epineural scarring with allograft vein wrapping. *Hand Clin*. 1996;12(4):773-9.
68. Yoo YM, Lee IJ, Lim H, Kim JH, Park MC. Vein wrapping technique for nerve reconstruction in patients with thyroid cancer invading the recurrent laryngeal nerve. *Arch Plast Surg*. 2012;39(1):71-5.
69. Alligand-Perrin P, Rabarin F, Jeudy J, Cesari B, Saint-Cast Y, Fouque PA, et al. Vein conduit associated with microsurgical suture for complete collateral digital nerve severance. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2011;97(4 Suppl):S16-20.
70. Leuzzi S, Armenio A, Leone L, De Santis V, Di Turi A, Annoscia P, et al. Repair of peripheral nerve with vein wrapping. *G Chir*. 2014;35(3-4):101-6.
71. Ren Z, Wang Y, Peng J, Zhao Q, Lu S. Role of stem cells in the regeneration and repair of peripheral nerves. *Rev Neurosci*. 2012;23(2):135-43.

