

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**SİYATİK SİNİRİN FARKLI HASAR MODELLERİNDE
YENİ DAMARLANMANIN İNCELENMESİ**

Bahadır Murat DEMİREL

Doktora Tezi

Antalya, 2011

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**SİYATİK SİNİRİN FARKLI HASAR MODELLERİNDE
YENİ DAMARLANMANIN İNCELENMESİ**

**Bahadır Murat DEMİREL
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nurettin OĞUZ**

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından desteklenmiştir (Proje no:2009.03.0122.007)

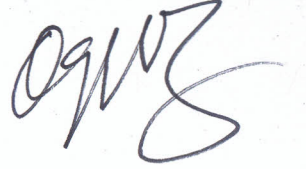
“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2011

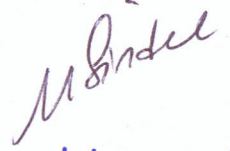
Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Anatomi Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 26 / 12 / 2011

Tez danışmanı : Prof. Dr. Nurettin OĞUZ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Muzaffer SİNDEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇİMEN
Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Levent SARIKCIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



ONAY: Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2011 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurul ve Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (orijinaleri ekte sunulmuştur).

1. Özsoy U, Hizay A, Demirel BM, Özsoy Ö, Bilmen Sarıkcioğlu S, Turhan M, Sarıkcioğlu L. The hypoglossal-facial nerve repair as a method to improve recovery of motor function after facial nerve injury. Ann Anat. 2011 Jul;193(4):304-13. Epub 2011 Mar 10. Review.
2. Sarıkcioğlu L, Demirel BM, Ütük A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. Folia Morphol (Warsz). 2009; 68(1):1-7. Review.
3. Sarıkcioğlu L, Demirel BM, Demir N, Yıldırım FB, Demirtop A, Oğuz N. Morphological and ultrastructural analysis of the watershed zones after stripping of the vasa nervorum. Int J Neurosci. 2008 Aug;118(8):1145-55.

ÖZET

Her yıl birçok insan periferik sinir hasarına maruz kalmaktadır ve bu hasarlar ekonomik ve sosyal kayıplara neden olmaktadır. Bu kayıpları en aza indirmek için yaralanma en kısa sürede tedavi edilmelidir. Etkin tedavi yöntemleri geliştirmek ise periferik sinir hasarını, dejenerasyon ve rejenerasyon sürecini daha iyi anlamakla mümkün olur. Bu süreci daha iyi anlayıp değerlendirmek için araştırmacılar çeşitli hasar modelleri, farklı periferik sinirler ve farklı denekler ve teknikler günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Siyatik sinir periferik sinir hasarı modelleri oluşturmak için tercih edilen sinirlerden birisidir. Ezi ve kesi modelleri de sinir hasarını simüle etmek için tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir. Rejenerasyon sürecine etki eden birçok faktör de sinirbilimciler tarafından araştırılmaktadır. Bu faktörlerden bir tanesi de nörotrofik faktörlerdir. Birçok nörotrofik faktörden birisi olan vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) yapılan çalışmalar ışığında anjiyogenez dışında sinir sistemi üzerine olan etkileri de tespit edilmiştir.

Çalışmamızda sıçan siyatik sinirinde, farklı hasar modelleri uygulayarak, VEGF ekspresyonunu tespit etmeyi amaçladık. Bu amaca yönelik olarak 110 adet dişi sıçan kullanılmıştır. Gerekli izinler ve etik kurul onayı alındıktan sonra, denekler kontrol ve sham dahil olmak üzere ezi, tam kesi ve yarı kesi gruplarına ayrılmıştır. Her bir deney gurubu da kendi içerisinde 48. saat, 14 günlük ve 30 günlük alt gruplarına ayrılarak, gurup başına 10 adet deneğin düştüğü toplam 11 gurup oluşturuldu. Cerrahi operasyon öncesinde ve operasyon sırasında yürüme patern analizi, geri çekme refleksi ve morfolojik değerlendirme yapıldı. Daha sonra deneklere guruplarına göre cerrahi işlem uygulandı. Deney süresi dolan denekler sakrifiye edilerek siyatik, elektron mikroskopik, immünohistokimyasal ve western blot analizi için siyatik sinir örnekleri alındı. Toplanan veriler yardımıyla, yürüme patern analizi, geri çekme refleksi değerlendirildi. Cerrahi operasyon öncesinde, cerrahi operasyon sırasında ve sonrasında stereomikroskop yardımı ile çekilen görüntüler morfolojik olarak değerlendirildi. Deneklerden alınan örneklerden ise elektron mikroskopik analiz ve moleküler biyolojik tekniklerden olan immünohistomiksal ve western blot analizi gerçekleştirildi. Deney gurupları arasında morfolojik olarak ve VEGF'in ekspresyonu yönünden kontrol ve sham gruplarına göre farklılıklar bulundu ve sonuçlar literatür bilgisi ile tartışıldı.

Yürüme patern analizi sonuçlarına göre en iyi iyileşme -13,26 değer ile yarı kesi 30 günlük alt grubunda görüldü. Morfolojik olarak tüm deney gruplarının 48 saatlik alt gruplarında hasarlanma bölgesinde damarlanmada artış gözlemlendi. Elektron mikroskopik incelemede tüm deney gruplarının 48 saatlik alt gruplarında denejerasyonun başlangıcı görülürken, 30 günlük alt gruplarda rejenerasyon liflerle birlikte myelinsiz

liflerde tespit edildi. İmmünohistokimya sonuçlarına göre en fazla VEGF ekspresyonu yarı kesi 48 saatlik alt grupta görülürken, en az yarı kesi 30 günlük alt grupta görüldü. Western blot analizine göreyse en fazla VEGF ekspresyonu ezi 30 günlük alt grupta görülürken en az ekspresyon yarı kesi 14 günlük alt grupta görülmüştür.

Elde ettiğimiz sonuçların siyatik sinirin farklı hasar modellerinde, morfolojinin anlaşılması ve VEGF ekspresyonun tayini yönünden konu ile ilgili çalışan araştırmacılara periferik sinir yaralanmalarında dejenerasyon ve rejenerasyon sürecini daha iyi anlamak üzere kaynak olacağı ve ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Siyatik sinir, VEGF, ezi, tam kesi, yarı kesi, sıçan

ABSTRACT

Every year many people are affected by peripheral nerve injuries that results in undesirable social and economical lost. In order to overcome those lost to minimum, injuries must be treated as soon as possible. Due to develop effective treatment methods, it is important to understand the whole process of degeneration and regeneration during peripheral nerve injuries. Today scientists research on different injury models on various peripheral nerves using much kind of experimental animals applied by many techniques in order to examine and reveal out the process. Sciatic nerve is commonly used to apply peripheral nerve injury models, so as crush and cut methods are widely used models to stimulate peripheral nerve injury. Neuroscientists also investigate many factors affecting the regeneration process. One of these factors is neurotrophic factors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is also a neurotrophic factor having a role not only in angiogenesis but also have effects on nervous system.

In our study we aimed to investigate VEGF expression on rat sciatic nerve using different injury models. 110 female rats were used. After taken all the approvals from local ethical committee, rats were divided into control, sham, crush, cut and semi-cut main groups. Experimental groups also divided into subgroups as 48th hour, 15th day and 1st month, 10 animals per each, 11 groups totally. Before and during surgical operation walking track analysis, pinch test and morphological evaluation was performed. Animals were operated under stereomicroscope according to their experimental model. As determined in the schedule rats were sacrificed and sciatic nerve samples were collected for electron microscopy, immunohistochemistry and western blot analysis. Walking track analysis and pinch tests were scored in order to evaluate motor and sensorial recovery respectively. Images collected by stereomicroscope before, during and after the surgical process were examined morphologically. Electron microscopic analysis and immunohistochemistry and western blot analysis as molecular biologic techniques were investigated by collected sciatic nerve samples after routine appropriate procedures. We observed morphological and expressional differences of VEGF among the experimental groups, discussed by in the light of literature.

Walking track analysis revealed that the most recovery was observed semi-cut 30 days subgroup by -13,26 value. Morphologically neovascularisation at the injury site was seen in all experimental 48th hour subgroups. In electron microscopic evaluation we observed the beginning of degeneration in all experimental 48th hour subgroups. Also in all experimental 30th day subgroups both regenerated nerve fibres and

unmyelinated axons were seen. Immunohistochemically the most VEGF expression was seen in semi-cut 48th hour subgroup. On the contrary the least expression was observed in semi-cut 30th days subgroup. Western blot analysis revealed out that the most and the least VEGF expression was seen in crush 30th days and semi-cut 14th day subgroups respectively.

We think that our results will help neuroscientists in the perspective of morphological and expressional way of VEGF in order to understand the degeneration and regeneration process during the peripheral nerve injury on different injury models of rat sciatic nerve and will shed light for further studies about the subject.

Keywords: Sciatic nerve, VEGF, crush injury, cut injury, semicut injury, rat

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Periferik sinir anatomisi	3
2. 1. 1. Epineurium	5
2. 1. 2. Endoneurium	5
2. 2. Vasa nervorum	5
2. 3. Siyatik sinir anatomisi	6
2. 4. Periferik sinir yaralanması	7
2. 4. 1. Periferik sinir hasarının sınıflandırılması	8
2. 4. 2. Sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu	8
2. 5. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)	10
2. 5. 1. VEGF reseptörleri	11
2. 5. 2. VEGF'in görevleri	11
2. 5. 3. VEGF ve sinir rejenerasyonu ilişkisi	12
2. 5. 4. VEGF ve epinöral damarlar	13
MATERYAL VE METOD	
3. 1. Denekler	15
3. 2. Deney grupları	15
3. 3. Cerrahi işlemler	15
3. 4. Değerlendirme testleri	17
3. 4. 1. Motor fonksiyon testi (Yürüme patern analizi)	17
3. 4. 2. Duyusal fonksiyon testi (Pinch test)	17
3. 5. Morfolojik değerlendirme	18
3. 6. Işık ve Elektron mikroskopik inceleme	18
3. 7. İmmünohistokimyasal değerlendirme	18
3. 8. Western Blot analizi	19
3. 9. Veri analizi	20

BULGULAR		21
4. 1.	Yürüme patern analizi	21
4. 2.	Pinch test bulguları	22
4. 3.	Morfolojik değerlendirme	23
4. 4.	Işık ve Elektron Mikroskopik Değerlendirme	37
4. 5.	İmmünohiskimyasal Değerlendirme	51
4. 6.	Western Blot Değerlendirmesi	66
TARTIŞMA		68
SONUÇLAR		72
KAYNAKLAR		74
ÖZGEÇMİŞ		78
EKLER		79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

		Sayfa
VPF	: Vasküler geçirgenlik faktörü	1
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü	1
SC	: Schwann hücreleri	5
NGF	: Sinir büyüme faktörü	9
IL-1	: İnterlökin 1	9
NCAM	: Nöral hücre adezyon molekülü	9
VEGF-A	: VEGF tipi	10
VEGF-B	: VEGF tipi	10
VEGF-C	: VEGF tipi	10
VEGF-D	: VEGF tipi	10
VEGF-E	: VEGF tipi	10
svVEGF-E	: VEGF-F	10
VEGF-F	: VEGF tipi	10
VEGFR-1	: VEGF Reseptörü	10
VEGFR-2	: VEGF Reseptörü	10
VEGFR-3	: VEGF Reseptörü	10
sVEGFR-1	: VEGF Reseptörü	10
sVEGFR-2	: VEGF Reseptörü	10
PIGF	: Plazental büyüme faktörü	10
SFI	: Siyatik fonksiyon indeksi	17
PL	: Topuk ile üçüncü parmağın uç kısmı arasındaki mesafe	17
TS	: Birinci ve beşinci ayak parmakları arasındaki mesafe	17
ITS	: İkinci ve dördüncü parmaklar arasındaki mesafe	17
TEMGA	: Tıp Fakültesi Elektron Mikroskopik Görüntü Analiz Ünitesi	18
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu	18
PBS	: Fosfat tamponlu tuz	18
UV	: Ultraviyole	19
IgG	: İmmüoglobulin g	19
DAB	: Diaminobenzidin	19
PVDF	: Polivinilidin florit	19
TBS	: Tris tamponlu tuz	19
TBS-T	: Tween 20 içeren tris tamponlu tuz	19
HRP	: Horseradish peroksidaz	19
CL	: Chemiluminisance	19
TK	: Tam kesi	21
YK	: Yarı kesi	21
IHC	: İmmünohistokimya	57
WB	: Western blot	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Periferik sinirlerin vücuttaki dağılımı	3
2.2.	Miyelinli bir nöronun yapısı	4
2.3.	Bir periferik sinirin enine kesiti	4
2.4.	Endoneuriumda bulunan yapılar	5
2.5.	Vasa nervorum	6
2.6.	Sıçan siyatik sinirinin önden görüntüsü	7
2.7.	Wallerian dejenerasyonu	9
2.8.	VEGF tipleri ve reseptörleri	11
2.9.	VEGF ve sinir sistemi üzerine olma etkileri	12
3.1.	Ezi grubuna ait bir deneğin siyatik sinirinin cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası (B) ve sakrifasyon günü (C) görüntüsü.	16
3.2.	Tam kesi grubuna ait bir deneğin siyatik sinirinin cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası (B) ve sakrifasyon günü (C) görüntüsü.	16
3.3.	Yarı kesi grubuna ait bir deneğin siyatik sinirinin cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası (B) ve sakrifasyon günü (C) görüntüsü.	16
3.4.	Sıçan ayak izleri kullanılarak elde edilecek olan ölçümler.	17
4.1.	Deney gruplarının cerrahi operasyon öncesi ve sonrası elde edilen SFI değerleri.	21
4.2.	Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası tam geri çekme refleksi (Derece 3) gösteren denek sayıları.	22
4.3.	Ezi grubu 48. saat alt grubun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	24
4.4.	Ezi grubu 14 günlük alt grubun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	25
4.5.	Ezi grubu 30 günlük alt grubun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	26
4.6.	Tam kesi 48. saat alt grubun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.Plazma GPx enzimi aktivite değerleri.	27
4.7.	Tam kesi 14 günlük alt grubun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.Plazma GPx enzimi aktivite değerleri.	28
4.8.	Tam kesi 30 günlük alt grubun cerrahi operasyon öncesi	29

	(A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	
4.9.	Yarı kesi 48. saat alt grubun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	30
4.10.	Yarı kesi 14 günlük alt grubun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	31
4.11.	Yarı kesi 30 günlük alt grubun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	32
4.12.	Sham grubunun grubunun cerrahi operasyon öncesi (A) ve sakrifasyon günü (B) ve kontrol (C) grubunun morfolojik görünümü.	33
4.13.	Ezi deney grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	34
4.14.	Tam kesi deney grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	34
4.15.	Yarı kesi deney grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.	35
4.16.	Tüm grupların morfolojik görünümü.	36
4.17.	Ezi 48 saatlik grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	38
4.18.	Ezi 14 günlük grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	39
4.19.	Ezi 30 günlük grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri. Siyah ok; remyelinize sinir lifleri, beyaz ok; myelin rezidüleri.	40
4.20.	Tam kesi 48 saatlik grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	41
4.21.	Tam kesi 14 günlük grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	42
4.22.	Tam kesi 30 günlük grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	43
4.23.	Yarı kesi 48 saatlik grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	44
4.24.	Yarı kesi 14 günlük grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	45
4.25.	Yarı kesi 30 günlük grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	46
4.26.	Kontrol grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	47
4.27.	Sham grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	47

4.28.	Ezi grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	48
4.29.	Tam kesi grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	48
4.30.	Yarı kesi grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	49
4.31.	Tüm grupların ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.	50
4.32.	Ezi 48 saatlik grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	52
4.33.	Ezi 14 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	53
4.34.	Ezi 30 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	54
4.35.	Tam kesi 48 saatlik grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	55
4.36.	Tam kesi 14 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	56
4.37.	Tam kesi 30 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	57
4.38.	Yarı kesi 48 saatlik grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	58
4.39.	Yarı kesi 14 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	59
4.40.	Yarı kesi 30 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	60
4.41.	Sham grubunun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	61
4.42.	Kontrol grubunun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	62
4.43.	Ezi 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	63
4.44.	Tam kesi 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	63
4.45.	Yarı kesi 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	63
4.46.	Tüm grupların VEGF ekspresyonu ve dağılımı.	64
4.47.	Tüm grupların immünohistokimyasal (IHC) olarak VEGF ekspresyonunun grafiği.	65
4.48.	Deney gruplarının immünohistokimyasal olarak VEGF ekspresyonunun karşılaştırılması grafiği.	65
4.49.	Western blot (WB) uygulaması sonrası elde edilen VEGF ve beta actin ekspresyonun bantlarını gösteren film.	66
4.50.	Western blot (WB) uygulaması sonrası elde edilen VEGF ekspresyon grafiği..	66
4.51.	Deney gruplarının Western blot analizine göre VEGF ekspresyonunun karşılaştırılmalı grafiği.	67

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1.	Sinir hasarının sınıflandırılması	8
3.1.	Deney grupları	15

GİRİŞ VE AMAÇ

Her yıl birçok insan periferik sinir hasarı nedeniyle tedavi görmektedir. Bu hasarlar, travma, bası, nörotoksik maddeler, metabolik yada immün hastalıklar, tümör yada vitamin yetersizliği sonucu ortaya çıkabilir [1]. Hasarlanan sinir en kısa sürede tedavi edilmelidir. Şayet hasarlı periferik sinir tedavi edilmezse, kısmen ya da tamamen paralize olabilir [2]. Klinik olarak en çok kullanılan iki tedavi yöntemi direkt olarak sinir uçlarının koaptasyonu ve hasarlı sinilerin uçları arasına greft koyma yöntemidir. Her iki yöntemde de farklı oranda motor ve duysal iyileşme görülmekle birlikte tam iyileşme şansının az olduğu bildirilmiştir. Bu durum hastanın yaşam kalitesi, ekonomik ve iş gücü bakımından kayıplara neden olmaktadır.

Periferik sinir iyileşmesini tam olarak anlamak için hasarın tam olarak anlaşılması yani hasar sonrası dönemde sinir ve çevre dokularda oluşan değişikliklerin morfolojik ve moleküler düzeyde bilinmesi gereklidir. Bu amaca yönelik olarak sinir hasarını simüle etmek üzere çeşitli deney hayvanlarında farklı sinir hasarı modelleri oluşturulmuştur. Bu deney modellerinin birbirlerinden farklılığı hasarının oluşturulma yeri, biçimi ve zamanıdır. Periferik sinir hasarı oluşturmak için ezi [3-8], kesi [9], termal hasar [10], nörotoksik maddeler [11, 12] ve iskemi [13] gibi modeller kullanılmaktadır. Bu modeller içerisinde en çok kullanılanları; siyatik sinirin yarı, tam kesisi ve sinir ezisidir [1].

Periferik siniri hasarını simüle etmek için siyatik, median, fasiyal ve optik sinir sık kullanılan modellerdir. Bunlardan en çok tercih edilen periferik sinir, siyatik sinirdir. Bu tercihte sinirin kolay ulaşılabilir olması, cerrahi işlemlerin sinire kolaylıkla uygulanabilmesi, deney hayvanlarındaki en büyük sinir olması ve hasarın morfolojik olarak da görülebilmesinin rolü büyüktür.

1983 yılında “vasküler geçirgenlik faktörü” (VPF) [14] olarak bulunan vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) anjiyogenezde önemli rol aldığı bildirilmiştir [15]. Son on yılda VEGF’in anjiyogenik aktivitesi ile ilgili 10.000’den fazla yayın yapılmıştır ve VEGF’in anjiyogenik aktivitesi dışında da farklı görevleri olduğu bildirilmiştir [16]. VEGF endotel hücrelere en özgü büyüme faktörü olarak düşünülmüştür, fakat nöronlar üzerinde de direkt etkisi bulunmaktadır [16].

Anjiyogenezis, sinir rejenerasyonunda etkin rol oynamaktadır. Endonöral damarlar hasarlı sinire makrofajların, oksijen ve besinin gelişini sağlarken, nöritlerin uzaması ve non-nöral hücrelerin proliferasyonu için gereklidir [16]. Sinir rejenerasyonunda VEGF’ün rolü Sondell ve ark. [17]

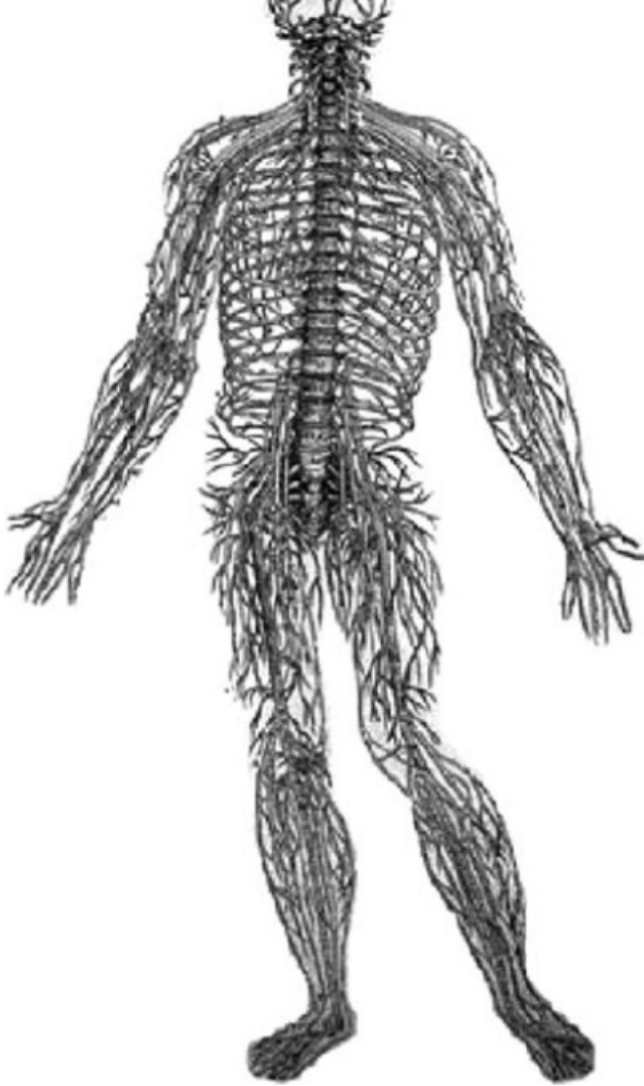
tarafından bulunmuştur. Hobson ve ark. [18] ise artan damarlanmanın sinir rejenerasyonunu olumlu yönde etkiliğini saptamışlardır.

Bu çalışma, sıçan siyatik sinirinde farklı periferik sinir hasarı modellerinde VEGF ekspresyonunun/dağılımının nasıl etkilendiği hipotezinin test edilmesi amacıyla planlanmıştır.

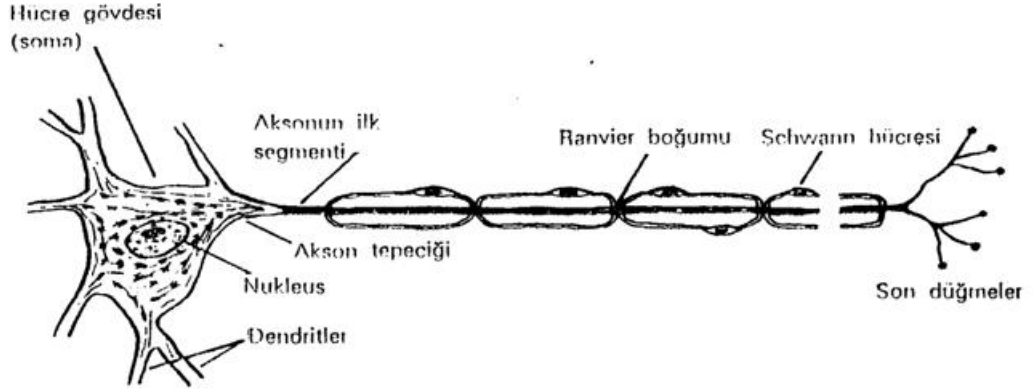
GENEL BİLGİLER

2.1.Periferik Sinir Anatomisi

Periferik sinirler tüm vücutta bulunup, doku ve organlara motor ve/ya da sensitif innervasyon sağlamak üzere özelleşmiş karmaşık bir ağ sistemini oluşturur (Şekil 2.1). Nöronlar sinir sisteminin yapıtaşları olup, bir sinir hücresi ile bundan çıkan akson ve dendritlerden oluşmuştur. Bir sinir hücresinin ışık mikroskobu ile incelenmesinde ortada oval ya da yuvarlak bir çekirdek gözlenir. Nöroplazma olarak adlandırılan stoplazması içinde iplikçik, membran ve granüller yapıda nörofibril, Nissl maddesi, Golgi kompleksi ve mitokondri gibi çeşitli organeler bulunur (Şekil 2.2.).

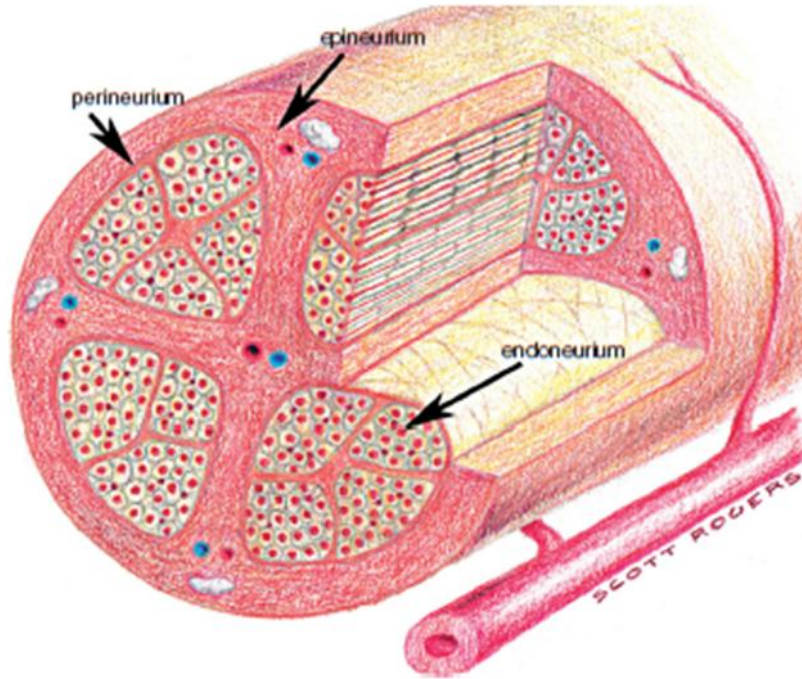


Şekil 2.1. Periferik sinirlerin vücuttaki dağılımı. Vesalius'tan alıntı (1514-1564) [19].



Şekil 2.2. Miyelinli bir nöronun yapısı [20].

Bir periferik sinir lifi endoneurium adı verilen bağ dokusu ile sarılıdır. Sinir lifleri bir araya gelerek sinir fasiküllerini oluşturur ve bunlarda perineurium ile sarılıdır. Sinir fasikülleri de bir araya gelerek bir periferik siniri oluşturur ve bu da epineurium ile sarılıdır (Şekil 2.3.). Epineuriumda sinir dokusunu besleyen longitudinal ve delici tarzda uzanan damarlar bulunur. Bu damarlar eksternal damar ağı olarak isimlendirilir. Sinir dokusunun içerisindeki damarlar ise internal damar ağıdır. Sinir dokusunu dışarıdan ve içeriden besleyen bu damarlar bir ağ oluşturarak “vasa nervorum” adını alır.



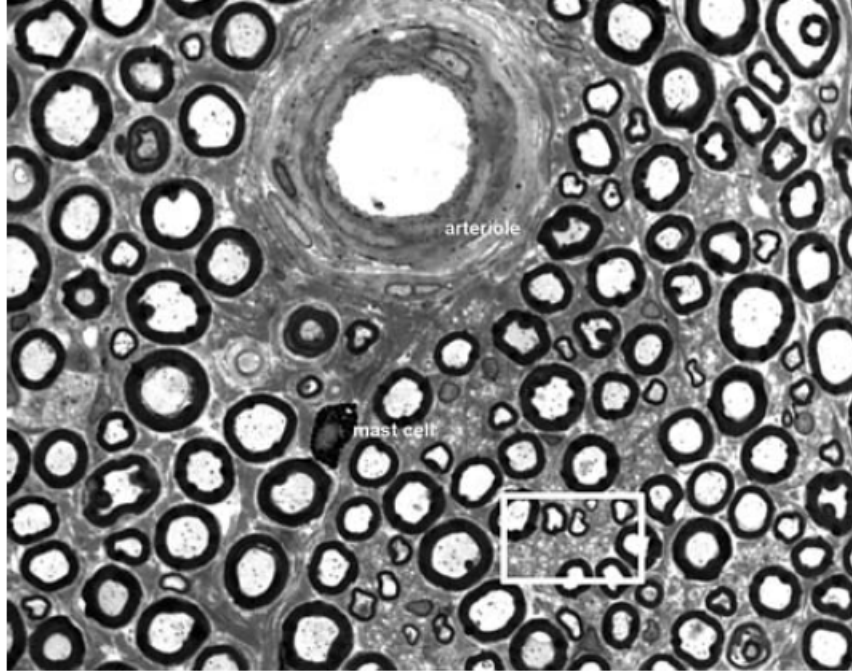
Şekil 2.3. Bir periferik sinirin enine kesiti. [21]

2.1.1. Epineurium

Periferik sinirleri dıştan saran epineuriumdaki kan akışı endoriumdakine oranla iki-üç kat daha fazladır. Epineural damarların ayrıca kendilerine özgü fizyolojik özellikleri vardır. Vasa nervorum vasoaktif özellikte gösterir. Hem sempatetik adrenerjik terminaller hem de peptiderjik sonlanmalar kan akışı üzerinde rol oynar [21].

2.1.2 Endoneurium

Endoneurium periferik sinirin en önemli kısımlarından birisi olarak değerlendirir. Aksonları ve destek hücreleri olan Schwann hücrelerini (SC) içerir. Ayrıca mast hücreleri, makrofajlar, fibroblast ve kan damarlarını içerir (Şekil 2.4) [21]. Endonöral kan damarları geniş kapiller olup, bazı arteriyoller fasiküle kadar uzanmaktadır. Birçok endonöral damar innerve edilmez ve sıkı bağlarla bağlanmışlardır. Endonöral vasa nervorumda da kan sinir bariyeri görülür. [21].

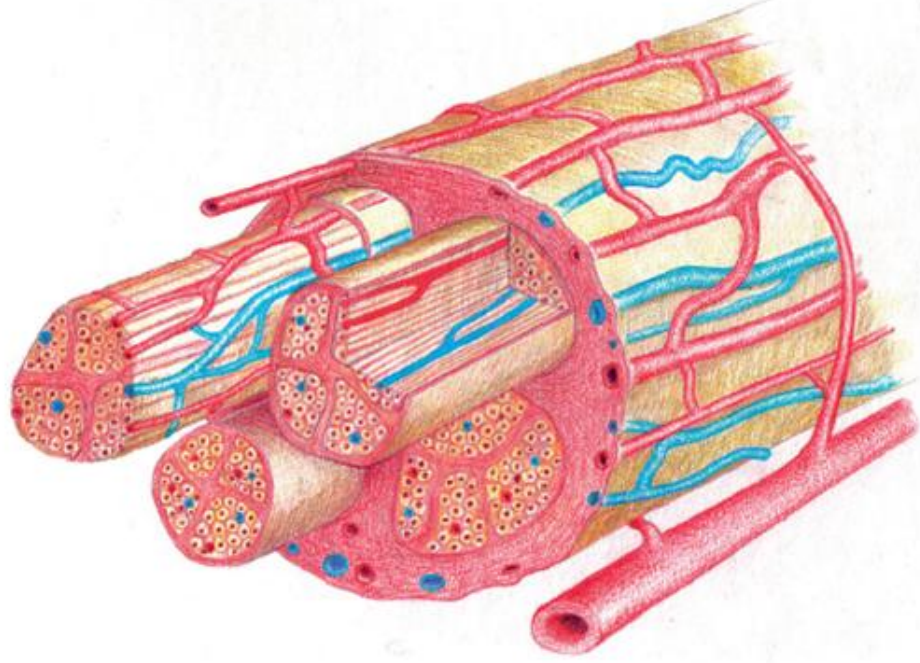


Şekil 2.4. Endoriumda bulunan yapılar. Myelinli ve myelinsiz (beyaz kutu) sinir lifleri görülmektedir [21].

2.2. Vasa nervorum

Sinirler, genellikle nörovasküler yapılar halinde seyrederek ve sinirlerle birlikte seyreden bu arteriyel yapılar *vasa nervorumu* oluşturarak sinirlerin beslenmesini sağlarlar (Şekil 2.5). Vasa nervorum epineuriumda yoğun ve düzensiz bir ağ oluşturur ve bu ağdan ayrılan damarlar sinirin ve derindeki yapıların beslenmesini sağlar. Longitudinal damarlarda epineural plexusdan çıkar ve sinirin içinde ilerler. Vasa nervorumdan ayrılan arterioller ile longitudinal olarak uzanan damarlar bazen sinirin bazı kısımlarını besleyemez ya da yetersiz gelir. Bu durumda sinir arteriyel

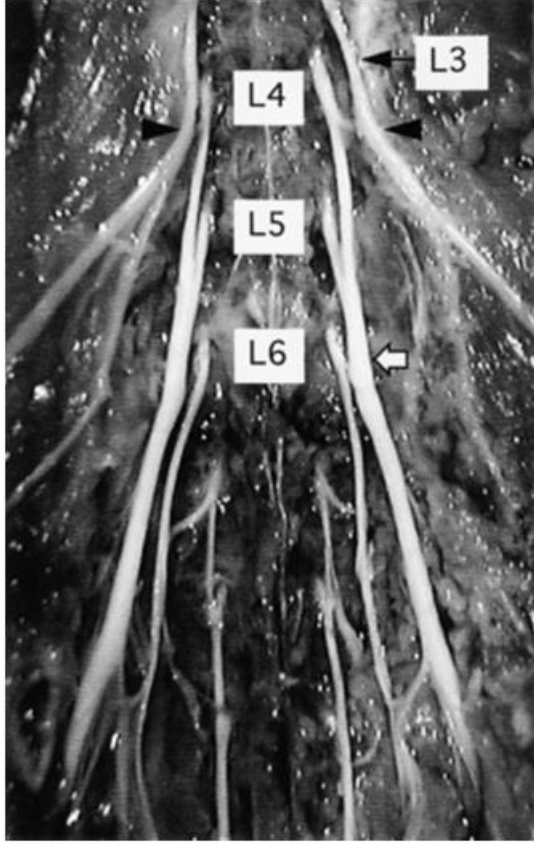
beslenmede yetersizlik olduğu zaman iskemiye hassas hale gelir. Sinirlerin beslenmesinde, kanlanmanın zayıf olduğu alanlar “watershed zone” olarak isimlendirilir [21].



Şekil 2.5. Vasa nervorum [21].

2.3.Siyatik Sinir Anatomisi

Siyatik sinir plexus sacralisten ayrılır (Şekil 2.6). L4 ve L5 lumbal sinirlerden, sıklıkla T13 ve L3'den dallar katılmaktadır. Sakral plexus 5, 6 ve kısmen 4. lumbal sinirler tarafından oluşturulur. Bu sinirlerin dalları truncus lumbosacralisi oluşturur [22]. Sakral plexus pelviste orijinlerine göre anterior ve posterior olmak üzere 2 dala ayrılır. Posterior dalı siyatik sinirdir (n. ischiadicus). Siyatik sinir n. tibialis, n. peroneus communis adı verilen terminal dallara sahiptir [23].



Şekil 2.6.Sıçan siyatik sinirinin önden görüntüsü. L4 ve L5 spinal sinirlerin ön dalları birleşip siyatik siniri oluşturmaktadır. L6 spinal sinir siyatik sinire solda ince bir dal vermektedir. (beyaz ok). (Siyah ok) L4 ve L3 spinal sinirlerin ince birleşimi görülmektedir [22].

2.4. Periferik Sinir Yaralanması

Mekanik travmadan (bası, gerilme, şiddet), termal, iskemik ve kimyasal etkenler gibi çok değişik etkenlerden dolayı periferik sinirler yaralanabilirler. Bu yaralanmaların en sık görüleni travmatik yaralanmalardır. Periferik sinir yaralanmaları hayati tehlike oluşturmamalarına rağmen kişinin günlük yaşantısını ileri derecede kısıtlayabilmesi, sosyo-ekonomik ve psikolojik durumunu etkilemesi açısından önemlidir. Periferik sinir yaralanması sonrası istenilen amaç sinir iyileşmesinin en kısa sürede sağlanmasıdır. Bu iyileşmenin hızlı ve istenilen şekilde olması hasar tipi, derecesi ve uygulanan tedaviye bağlıdır. Periferik sinir hasarı, uygulanan kompresyonun süresine ve kuvvetine göre değişkenlik gösterir. Fazla miktarda bir bağ dokusu ile sarılı çok sayıda fasikül içeren sinirler, az miktarda bağ dokusu ile sarılı tek fasikül içeren sinirlere göre daha az kompresyondan etkilenir. Sinir içindeki fasiküllerin yerleşimine göre de değişiklik gösterir. Büyük lifler küçük liflere göre kompresyon ve iskemiye daha fazla duyarlıdır. Ayrıca yüzeysel yerleşimli fasiküller derin yerleşimli olanlara oranla daha fazla kompresyona duyarlıdır. Ayrıca, kalın perineurium içine gömülü küçük

lifler, ince perineurium içine gömülü kalın liflere oranla daha az kompresyona duyarlıdırlar [24, 25].

2.4.1.Periferik Sinir Hasarının Sınıflandırılması

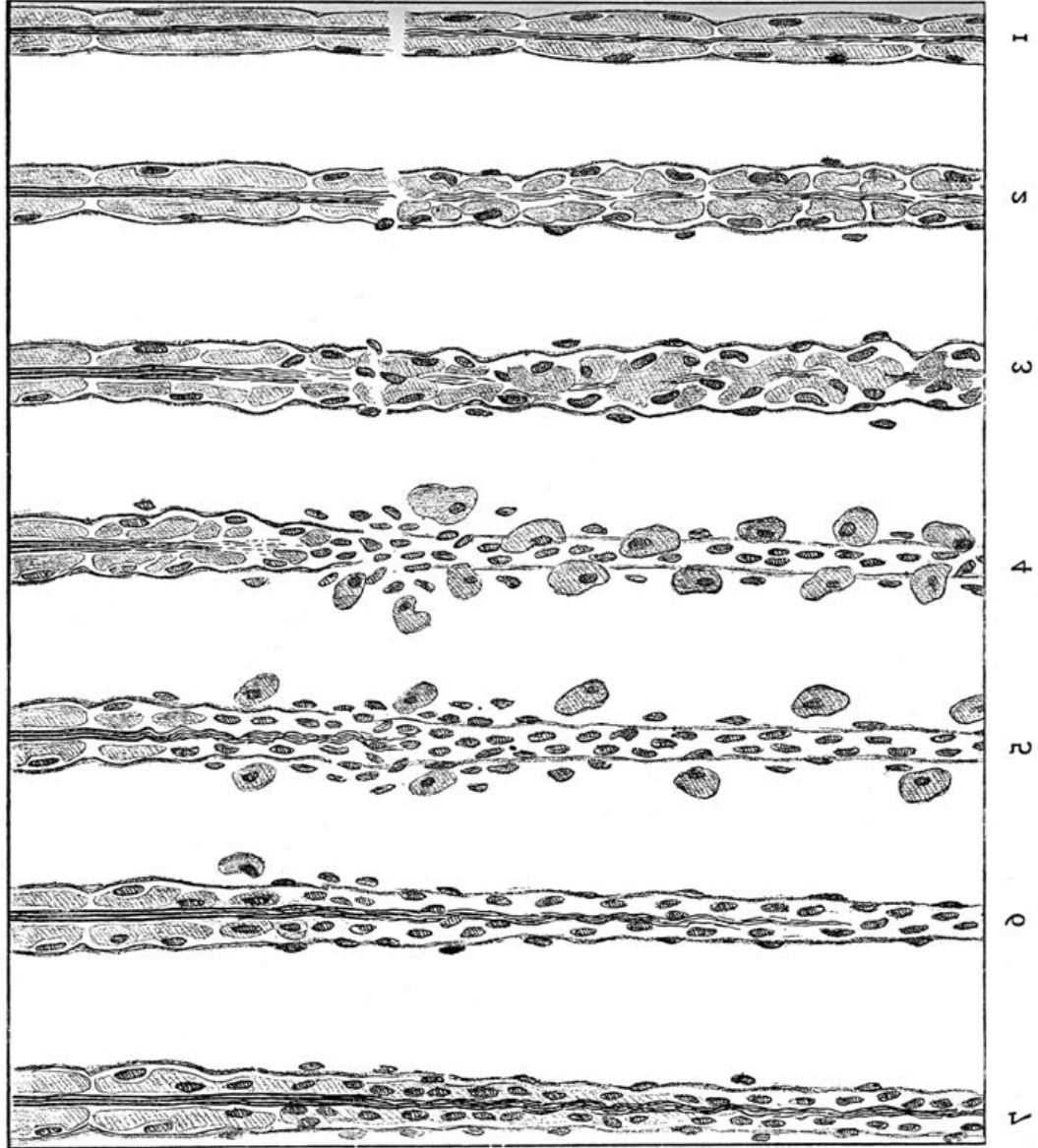
1941 yılında Cohen periferik sinir hasarını klinik olarak üç grupta sınıflandırmış ve Seddon 1947 yılında bu sınıflandırmayı 650 hastada yaptığı çalışmalarla popüler hale gelmiştir. Sunderland, 1951 yılında Seddon'un popülerize ettiği sınıflandırmayı geliştirerek beş sınıfta incelemiştir ve bugün kullanılan sınıflandırma oluşturulmuştur. Sunderland beş derece tanımlamış olmasına rağmen Seddon sınıflandırması da günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. 1988 yılında Mackinnon ve Dellon, Sunderland'ın sınıflandırmasına altıncısını da eklemiştir [26]. Yaralanmanın derecesinin bilinmesi tedavinin planlanması açısından önemlidir. Birinci, ikinci ve üçüncü derece yaralanmalarda geri dönüş olur, cerrahiye gerek yoktur, dördüncü ve beşinci derece yaralanmalarda ise cerrahisiz geri dönüş olmaz. Altıncı derece yaralanmalarda ise geri dönüş değişik derecelerde olabilir [27].

Tablo 2.1. Sinir hasarının sınıflandırılması.

SEDDON	SUNDERLAND
Nöropraksi	1. derece yaralanma Segmental demiyelinizasyon, lokalize iletim bloğu
Aksonotmezis	2. derece yaralanma Aksonal yaralanma, distalde
	3. derece yaralanma Waller dejenerasyonu
	4. derece yaralanma Waller dejenerasyonu ve endoneuriumda fibrozis ile birlikte
Nörotmezis	5. derece yaralanma İntakt olan tek yapı eksternal epineuriumdur.

2.4.2.Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu

Bir sinir hücrelerine ait aksonun kesilmesinde; proksimal ve distal akson segmentleri ile hücre gövdesinde bir takım dejeneratif değişiklikler görülür [28]. Bir akson kesildiğinde ve bütünlüğünü kaybettiğinde distal parça Waller dejenerasyonuna uğrar (Şekil 2.7) [26]. Waller dejenerasyonunun başlangıcı kesi sonrası 48-96 saattir [24-26].



Şekil 2.7. Wallerian dejenerasyonu. [21].

Waller dejenerasyonunda, myelinin primer fagositozunun çoğu dolaşımdan gelen makrofajlar tarafından oluşturulur. Makrofajlar, yaralanma sonrası 2-3 günde endoneuriumda sayıca belirgin olarak artarlar [28]. Schwann hücresi, NGF (Nerve Growth Factor, sinir büyüme faktörü) oluşturmaya ve güçlü bir uyarın olan IL-1 (İnterlökin-1) salgılamaya devam eder. Makrofajlar ve Schwann hücreleri miyelin yıkımına devam ederler. [24, 25]. Schwann hücreleri, rejenere olan aksonlarla temas etmesi için yüzeylerinde NGF ve reseptörünü sentezler. Aynı zamanda L1 ve NCAM (Nöral Hücre Adezyon Molekülü)'da sentezlenmeye devam eder. Bu adhezyon molekülleri, akson uzaması için uygun yüzey sağlar. Diğer hücresel değişiklikler ise endonöral kapillerlerde geçirgenlikte artış, endonöral ödem oluşumu, kan-sinir bariyerinin bozulması ve endonöral fibroblastların proliferasyonunu içerir [28]. Aksotomi sonrasında nöron şişer, nissel maddesi dağılır ve nükleus periferal bir görünüm kazanır [29]. Kesilen aksonlar, yaralanma sonrası

birkaç saat içinde rejeneratif filizler oluştururlar. Filizler, sağlam bulunan en distaldeki Ranvier boğumundan köken alırlar. Rejenerasyon üniteleri her aksondan birkaç kollateral filiz şeklindedir. Sonuçta birkaç ay içinde sinir kesiti ve tamiri sonrasında distal parçadaki myelinli akson sayısı 1,5-5 kat artar. Tek bir rejenere olan üniteden çıkan çok sayıdaki filizler distal parçada farklı ve genelde uygun olmayan Schwann hücre tüpleri yani Büngner bantları içerisinde ilerlerler. Bir kez bu yol içerisinde ilerlemeye başladıklarında geriye dönüş yoktur. Tek bir motor nöron farklı kas gruplarına innervasyon sağlayabildiği gibi tek bir duyu nöronu da çeşitli alanlardan duyu alabilir [29]. Rejenere olan aksonun en distali, büyüme ucudur ve koniktir. Büyüme konisinin çevreyi algılama, bilgiyi işleyerek aksonu en uygun ortama yönlendirme yeteneği vardır. Filopodiumlar, parmaklı çıkıntılardır ve aktif olarak genişlerler. Lamellipodlar, membranın daha büyük genişlemeleridir. Bu çıkıntılar, büyüme konisinin tabanında mikrotübüllerce desteklenen aktin flamanlar üzerinde uzanırlar [30].

Büyüme konisi, dört grup faktöre cevap verir. Bunlar:

- 1- Nörotrofik faktörler
- 2- Nörit geliştirici faktörler
- 3- Matriks oluşturan faktörler
- 4- Metabolik ve diğer faktörler

Nörotrofik faktörler, denerve motor lif ve duyu reseptörlerinde bulunan makro moleküler proteinlerdir. Aynı zamanda rejenerasyon güzergâhındaki Schwann hücrelerinde de bulunurlar. Bu faktörler nörit gelişimi ve maturasyonunda yardımcı görevler üstlenir [31]. Nörotrofik faktörlerden farklı olarak nörit geliştirici faktörler, nörit gelişimini arttırıcı substrat bağlı glikoproteinlerdir. Dördüncü grup, çok çeşitli faktörler içerir. Asidik ve bazik fibroblastik faktörler, insülin ve insülin benzeri gelişim faktörü, glia kökenli proteaz inhibitörü, elektrik stimülasyonu ve tiroid hormonu adrenokortikotropik hormon, östrojen, testesteron gibi hormonlar bu grupta değerlendirilirler [32].

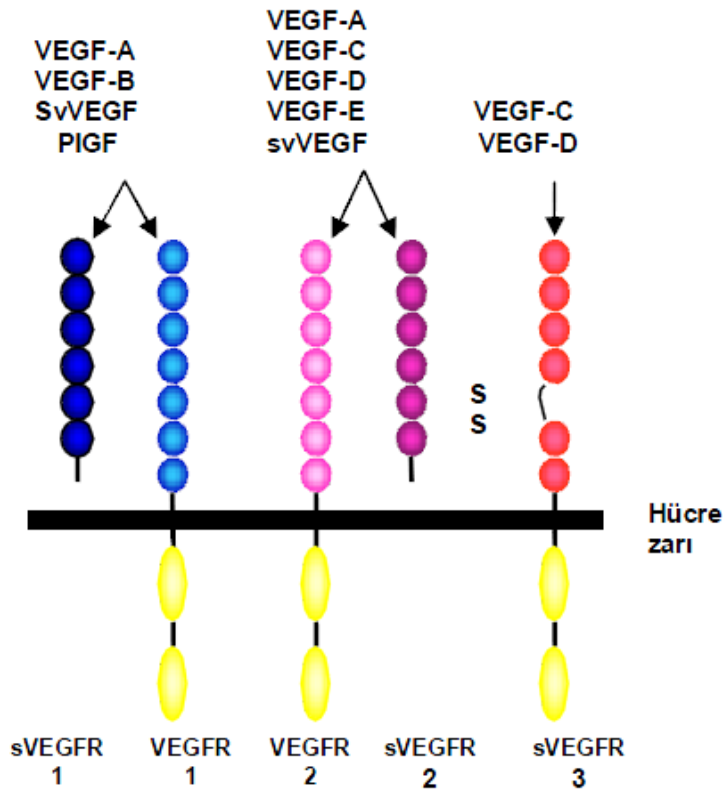
2.5. Vaküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

1983 yılında “vasküler geçirgenlik faktörü” (VPF) [14] olarak bulunan vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) anjiyogenezde önemli rol aldığı bildirilmiştir [15]. VEGF’in, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, svVEGF (VEGF-F) ve PlGF (plasental büyüme faktörü) olmak üzere yedi alt tipi; VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-1, sVEGFR-2 olmak üzere beş reseptörü bulunmaktadır. 1989 yılında ise klonlanmıştır [33]. Başta VEGF-A olmak üzere ailenin tüm üyeleri; vücutta olagelen birçok fizyolojik (vaskülojeniz, anjiogenez veya kemotaksi gibi) ve patolojik olayda (kanser, neovasküler hastalıklar veya kronik inflamatuvar hastalıklar gibi) rol almalarından dolayı son yıllarda oldukça popüler olmuştur [34].

Bu yüzden son yıllarda VEGF 'in anjiyogenik aktivitesi ile ilgili 10.000'den fazla yayın yapılmıştır ve VEGF'in anjiyogenik aktivitesi dışında da farklı görevleri olduğu bildirilmiştir [16]. VEGF endotel hücrelere en özgü büyüme faktörü olarak düşünülmüştür, fakat nöronlar üzerinde de direkt etkisi bulunmaktadır [16]. Dorsal kök ganglion hücre kültüründe VEGF aksonal büyümeyi stimüle ederek, duyu nöronlarının ve satellit hücrelerin devamlılığını sağlamıştır [17].

2.5.1 VEGF Reseptörleri

Bu büyüme faktörü ailesinin endotel hücresinde etki gösterebilmesi için öncelikle ona bağlanabilmesi gerekir. Bir başka deyişle, endotel hücreleri VEGF'den faydalanabilmek için onun bağlanabileceği özgül reseptörleri sentezlemesi gerekir. Bu reseptörler 5 tanedir: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-1 ve sVEGFR-2 [33] (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. VEGF tipleri ve reseptörleri [16].

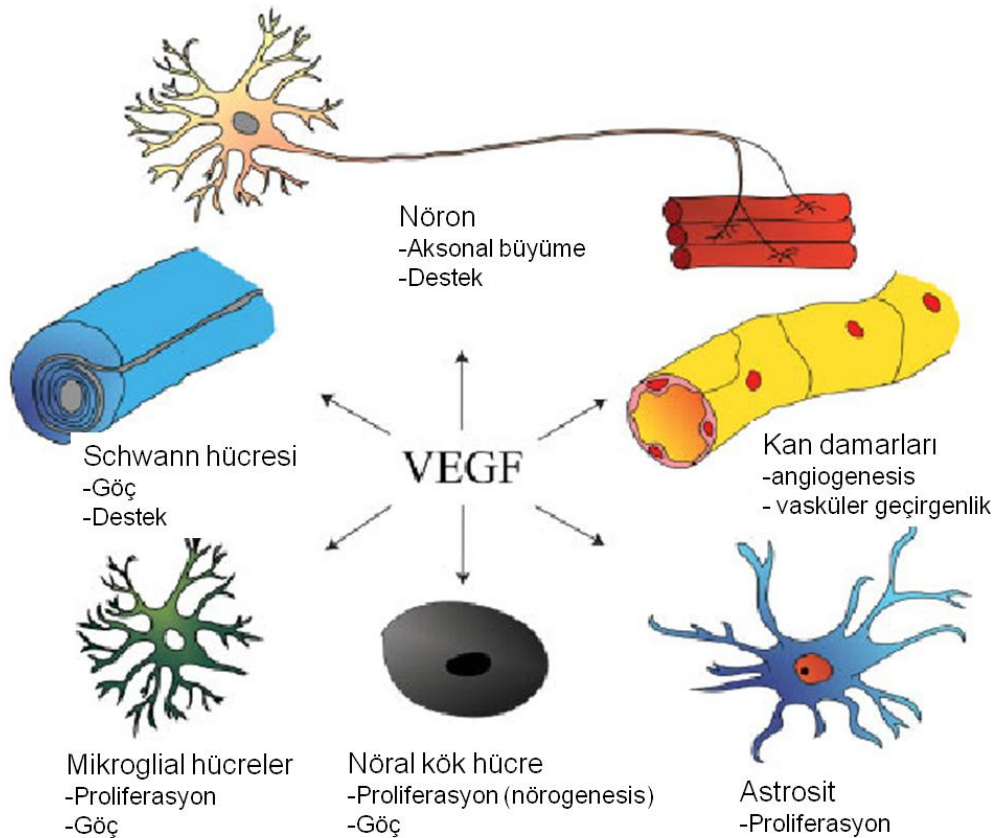
2.5.2 VEGF'nin görevleri

VEGF vasküler sistem boyunca dizilmiş endotel hücreleri için bilinen en özgü mitojendir. Vaskülojenez ve anjiogenezde önemli bir mediatördür. Anjiyogenik etkilerine ek olarak, endoteliyal hücrelerin migrasyon aktivitesini uyarmaktadır. Bu faktörün geri çekilmesi halinde vaskülarizasyonun gerilediği gözlenmiştir [35]. VEGF sayesinde endotel hücreleri proliferasyonunda ve bu büyüme faktörüne doğru göç edip dizilerek yeni damarlar için öncü olan tüp formasyonu oluşmasını

sağlamaktadır. Dermal yaralanmaları da içeren birçok yaralanmada; normal doku tamirinin ayrılmaz bir parçası olan anjiogenez, yaralanmadan hemen sonra yüzeysel epidermal keratinositler tarafından salgılanan VEGF tarafından indüklenir. Bu sayede bir yanda kan akımının artması gerçekleşirken, diğer yandan yaralanma bölgesinde yeni kan damarları oluşumu tetiklenir ve iyileşme hızlanır. Eksojen olarak verilen VEGF'ün iskemik tavşan ekstremiteğinde ve domuz koroner arterlerinde azalmış kan akımına cevap olarak yeni damar oluşumunu ve perfüzyonu artırdığı gösterilmiştir [36].

2.5.3. VEGF ve sinir rejenerasyonu ilişkisi

VEGF, *in vitro* ve *in vivo* ortamda nörogenezi stimüle ettiği bildirilmiştir (Şekil 2.9) [37]. Örneğin, VEGF, serebral kortikal kültürlerde nöronal öncülerin proliferasyonunu stimüle etmektedir ve VEGF'in devamlı intraserebroventriküler yolla verilmesi sıçan beyinde, gyrus dentatus'unda subventriküler ve subgranüler alanlarda etkilerinin var olduğu bildirilmiştir [16]. Ayrıca VEGF, egzersiz ile uyarılmış hippocampus nörogenezi için gereklidir [38].



Şekil 2.9. VEGF ve sinir sistemi üzerine olan etkileri [16].

VEGF glial hücreleri de etkilemektedir. VEGF'in mezensefalik kültürlerde [39] ve *in vivo* olarak intracerebral VEGF salınımından sonra [40] astrositler üzerinde mitojenik etkisi vardır. Krum ve ark. hasarlı bölgede anjiyogenezi ve gliosizi indüklendiği bir yara iyileşme modelinde

intraserebral yolla VEGF nötralize edici antikor kullanıştır. Bu antikorun anjiyogenezi ve astroglial proliferasyonu azaltıp, endotelial ve astroglial dejenerasyonu artırarak daha büyük scar oluşumuna sebep olduğunu görmüşlerdir [41]. Ayrıca dorsal kök gangliyonu ve üst servikal ganglion kültürlerinde VEGF hücrelerin daha uzun süre yaşamasını ve Schwann hücrelerinin proliferasyonunu stimüle etmiştir [17]. Sıçandan elde edilen Schwann hücre kültürlerinde hücre göçünü stimüle edip hücrelerin hayatta kalmasını arttırmıştır [42].

VEGF, *in vitro* koşullarda motor nöronlar üzerine direkt etkileri olduğu bildirilmektedir. VEGF seviyesinin azalması, motor nöronları hücre ölümüne yatkın hale getirirken, VEGF'in verilmesi bu nöronların iskemik hasardan koruduğu tespit edilmiştir [16].

VEGF serebral iskemisi sonrası 1-3 saat içerisinde salındığı ve 24-48 saat içerisinde en yüksek seviyesine ulaştığı bildirilmiştir [43, 44]. VEGF damar geçirgenliğini arttırarak, endotel hücrelerin disfonksiyonunu engeleyerek ve anjiyogenezi stimüle ederek iskemik hasarlarda koruyucu rol oynamaktadır [16].

VEGF reseptörlerinden VEGFR-1, VEGFR-2 ve NP-1 sadece endotel hücrelerde değil, nöron ve glial hücrelerde de salgılanmaktadır [45-47].

Anjiyogenez, sinir rejenerasyonunda etkin rol oynamaktadır. Endonöral damarlar hasarlı sinire makrofajların, oksijen ve besinin gelişini sağlarken, nöritlerin uzaması ve non-nöral hücrelerin proliferasyonu için gereklidir [16]. Sinir rejenerasyonunda VEGF'ün rolü Sondell ve ark. [17] tarafından bulunmuştur. Hobson ve ark. [18] ise artan damarlanmanın sinir rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediğini saptamışlardır. VEGF'in artışı, aksonal rejenerasyonu ve Schwann hücrelerinin göçündeki artış ile ilişkili olup hedef dokunun reinnervasyonu da olumlu yönde etkilenmektedir [16]. Fakat sıçanlar üzerinde yapılan omurilik tam kesisi sonrası kortikospinal yolun aksonları retrograd olarak dejenere olmakta, rejenerasyonun görülmediği saptanmıştır. Bunun sebebinin ya iskemisi sonucu arteriyel beslenmenin yetersizliğinden ya da büyüme faktörlerinin eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir [48]. Birçok araştırmacı ileride yapılacak olan çalışmalarla bu belirsizliğin aydınlatılacağını vurgulamıştır.

2.5.4 VEGF ve epinöral damarlar

Höke ve ark. [49] yaptıkları çalışmada hasarlanan sinirin, ödem ve proliferasyonda dolayı genişlediğini, 2. haftada damar sayısının ve epineuriumda toplam damar alanının arttığını gözlemlemişlerdir. 6. ayda ise damar sayısı 2. haftaya göre azalmış fakat bu sayı bazal değerlere ulaşmamıştır [49]. Höke ve ark. sinir rejenerasyonunun hasarlı bölgedeki lokal faktörlerinde önemli bir rol oynadığını belirtmektedir [49]. Yine aynı çalışmada VEGF'in RT-PCR ile mRNA seviyesinde ilk kez incelenmesi sonucu diğer sonuçlarla benzer bulgular görülmüştür. Yani 2. haftada

VEGF ekspresyonu artarken, 1. aydan itibaren taban seviyeye düşerek, 6. ayda da bu seviyede kaldığı bulunmuştur. Benzer şekilde Podhajsky ve Myers da ezi ve kesi sonrası aynı günlerde damar sayısının arttığını rapor etmişlerdir [50, 51].

MATERYAL VE METOT

3.1.Denekler

Çalışmamızda, ağırlığı 200-250 gr arasında olan 110 adet, erişkin dişi *Rattus norvegicus* wistar kullanılmıştır. Tüm denekler 12 saat gece, 12 saat gündüz siklusunda ve her kafeste 4 denek olacak şekilde yeterli yem ve su ile beslenmişlerdir. Deney öncesinde bütün ratların normal yürüme kontrol edilmiştir, normal olmayanlar deney grubundan çıkarılmıştır. Tüm prosedürler Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Kuruluna sunulmuş ve etik kurul onayı (Hay. Den. Etik – 103 / 02 / 04-17) ve gerekli izinler alınmıştır.

3.2.Deney Grupları

Çalışmamızda kullanılan denekler aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde rastgele sınıflanmıştır.

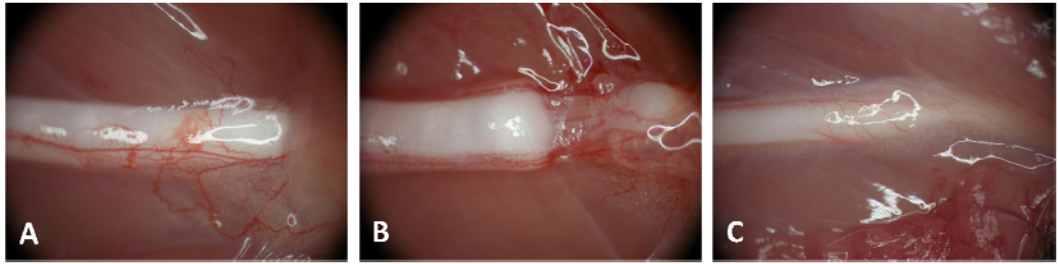
Tablo 3.1. Deney grupları

Gruplar			Grup No.	Denek sayısı	
Kontrol			1	10 denek	
Sham			2	10 denek	
Deney	Kesi	Tam	48. Saat	3	10 denek
			14. Gün	4	10 denek
			30. Gün	5	10 denek
	Yarı kesi		48. Saat	6	10 denek
			14. Gün	7	10 denek
			30. Gün	8	10 denek
	Ezi		48. Saat	9	10 denek
			14. Gün	10	10 denek
			30. Gün	11	10 denek
Toplam				110 denek	

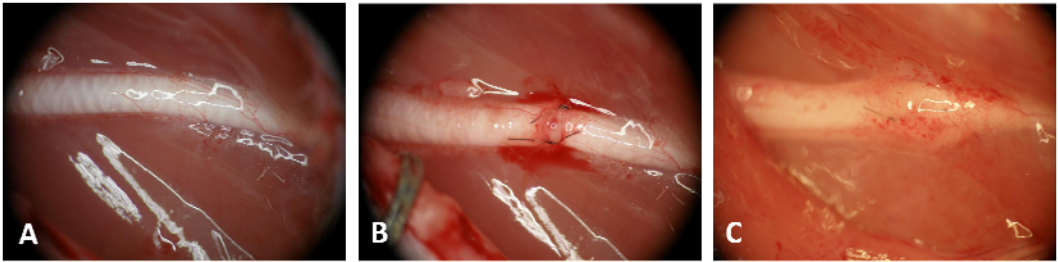
3.3.Cerrahi İşlemler

Deney ve sham grubundaki tüm deneklere cerrahi işlem öncesinde 15 mg/kg Xylazin HCl (Rompun®) ve 100 mg/kg Ketamin'in (Ketalar®) intraperitoneal olarak verilerek operasyon için yeterli anestezisi sağlanmıştır. Daha sonra sol arka uyluk yeterli oranda traşlanarak, flaster yardımıyla sol arka ekstremitte ve kuyruk sabitlenerek uyluğun arka-yan kısmında longitudinal bir kesi uygulanmıştır. Makas veya penset yardımıyla gluteal kaslar ve biceps femoris kası arasından girilerek sol siyatik sinire ulaşılmıştır. Ezi uygulanacak olan gruplarda siyatik sinir bir hemostatik klemp (Aesculap, BH104H) yardımıyla 30 sn. süreyle De Koning metodu [52] ile ezi hasarı oluşturulmuştur (Şekil 3.1.). Standardizasyon amacıyla tüm ezi işlemleri aynı klemp ile yapılmış ve klempin ucundan 0.5 cm uzaklıkta olacak şekilde siyatik sinir yerleştirilerek ezi uygulanmıştır. Tam kesi grubunda uyluk ortasındaki bir seviyede cerrahi mikroskop altında siyatik sinirin total kesisi, yarı kesi grubunda ise

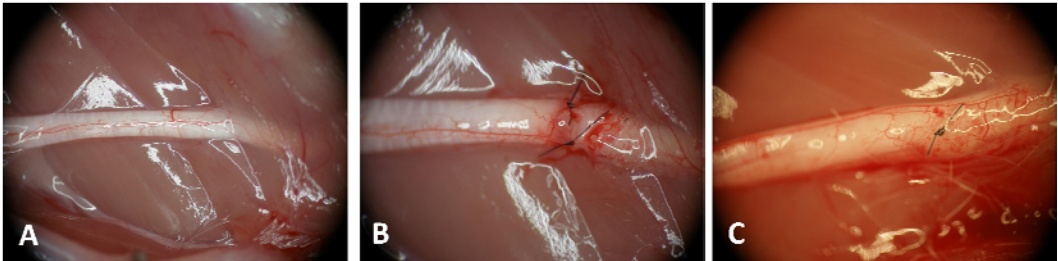
sinirin yarısına kadar olan bölüm kesilip 10.0 ile epineuriumdan tek dikişle kesi bölgesi koapte edilmiştir (Şekil 3.2. ve Şekil 3.3). Kontrol grubuna hiçbir cerrahi işlem uygulanmamıştır. Sham grubunda ise siyatik sinire ulaşılmış fakat sinire herhangi bir cerrahi müdahale yapılmamıştır. Siyatik sinir kesisi yapılmış olan denekler, sinir kesisinin uygulanmasından hemen sonra sinir uçları 10.0 dikiş materyali ile koapte edilmiştir. Cerrahi işlem sonrasında cilt derisi 2.0 dikiş materyali ile kapatılmış ve antiseptik solüsyon ile kesi bölgesi silinmiştir. Cerrahi operasyon sonrası ağrının dindirilmesi amacıyla Tramadol HCl (Contramal®) uygulanmıştır. Denekler her kafeste 4 adet olacak şekilde postoperatif bakım odasında sınırsız yem ve su verilerek iyileşmeye bırakılmıştır. Operasyon öncesinde ve sonrasında siyatik sinir ve hasar alanı stereomikroskop yardımıyla fotoğraflandırılmıştır. Aynı işlem deneklerin sakrifiye edildiği günde tekrar edilmiştir. Cerrahi işlemin uygulandığı gün 0. gün olarak değerlendirilmiştir. Deney gruplarında sinir hasarı sonrasındaki 48. saatte, 14. günde ve 1. ayda denekler üretan ile sakrifiyonu sağlanarak, hasarlı bölgenin distalinden ultrastrüktürel, elektron mikroskopik ve western blot analizleri için örnekler alınmıştır.



Şekil 3.1.Ezi grubuna ait bir deneğin siyatik sinirinin cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası (B) ve sakrifiyon günü (C) görüntüsü.



Şekil 3.2.Tam kesi grubuna ait bir deneğin siyatik sinirinin cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası (B) ve sakrifiyon günü (C) görüntüsü.

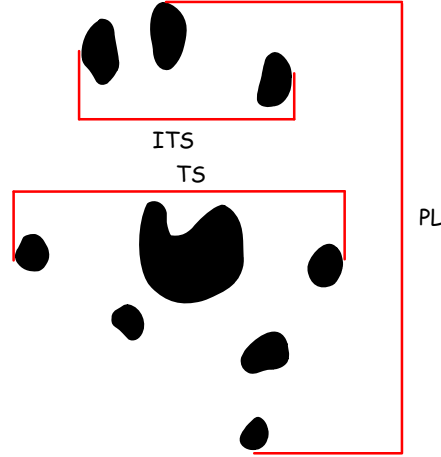


Şekil 3.3.Yarı kesi grubuna ait bir deneğin siyatik sinirinin cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası (B) ve sakrifiyon günü (C) görüntüsü.

3.4. Değerlendirme Testleri

3.4.1. Motor Fonksiyon Testi (Yürüme Patern Analizi)

Çalışmamızda motor fonksiyon, yürüme patern analizi ile değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucu siyatik fonksiyon indeksi (SFI) hesaplanmıştır. SFI değerinin hesaplanmasında üç farklı parametre kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır (PL: topuk ile üçüncü parmağın uç kısmı arasındaki mesafe, TS: birinci ve beşinci ayak parmakları arasındaki mesafe, ITS: ikinci ve dördüncü parmaklar arasındaki mesafe) (Şekil 3.4). Siyatik fonksiyon indeksinin hesaplanması için deneklerin arka ayakları mürekkepli stampa üzerine bastırıldıktan sonra 80 cm uzunluğunda, 7 cm genişliğinde, 10 derecelik eğime sahip bir yürüme bandı üzerinde yürütülmüşlerdir. Zemine bir fotokopi kâğıdı yerleştirilerek ayak izlerinin kâğıda çıkması sağlanmıştır. Ayak izlerinden elde edilen ölçüm değerleri Bain ve arkadaşlarının [53] tarif ettikleri matematik formülasyonuna konularak siyatik fonksiyon indeksi hesaplanmıştır. Yürüme patern analizi için 0., 1., 7., 14., 21., 28. günlerde alınan ayak izleri kullanılarak siyatik fonksiyon indeksi hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Sıçan ayak izleri kullanılarak elde edilecek olan ölçümler

3.4.2. Duyusal Fonksiyon Testi (Pinch Test)

Duyusal fonksiyonun iyileşmesi, Pinch test ile analiz edilmiştir. Bu test için denek fazla bir strese maruz bırakılmadan tutularak ayak taban derisi bir penset yardımı ile kısırılmıştır. Bu kısırılmaya (çimdiğe) karşı oluşturulan cevaba geri çekme refleksi (foot withdrawal) adı verilmektedir. Ayak taban derisinde, deneklerin geri çekme refleksini gösterdiği alanlar tespit edilerek; bu teste verilen cevap not edilmiştir. Fonksiyonel iyileşmeyi değerlendirmek için, geri çekme refleksine cevap vermeyen denekler için Derece 0, hafif derecede cevap veren denekler için Derece 1, orta derecede geri çekme refleksi gösteren denekler için Derece 2 ve tam bir yanıt gösteren denekler için de Derece 3 olmak üzere derecelendirme

yapılmıştır. Geri çekme refleksi ile cevap veren rat sayıları her grup için 0. , 1. , 7. , 14. , 21. , 28. günlerde kaydedilmiştir.

3.5. Morfolojik Değerlendirme

Deneklerin siyatik sinirlerine ait görüntüler, cerrahi operasyon öncesinde, cerrahi operasyon sonrasında ve sakrifasyon günü siyatik sinir doku alımında önce stereomikroskop yardımıyla fotoğraflanarak, siyatik sinirin, scar dokusunun ve damarlamanın morfolojik olarak değerlendirmesi yapılmıştır.

3.6. Işık ve Elektron Mikroskopik İnceleme

Sakrifasyon günü deneklerden alınan siyatik sinir örnekleri, 0.1 M Sorenson fosfat tamponunda (pH 7.2) hazırlanmış %4'lük glüteraldehit solusyonunda +4°C'de iki saat süreyle pre-fikse edilmişlerdir. Pre-fiksasyonun ilk saatinden sonra dokular uygun boyutlara (1x1 mm) getirmek amacıyla trimlenmiştir. Pre-fiksasyon süresi sonunda dokular, %6,5'lük sakkarozda her biri 10 dakika olmak üzere 3 defa yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra dokular post fiksasyon için %1'lik ozmiyum tetroksitte 2 saat +4°C'de bekletilmiştir. Post fiksasyon sonrası dokular, %6,5'lük sakkarozla 3x10 dakika yıkanmıştır. Dokular, sırasıyla %30'lük, %50'lik ve %70'lik alkollerde 3'er kez ve 10 dakika süreyle tutulduktan sonra, 1 saat boyunca uranil asetat içerisinde bekletilmiştir. Dokular, sırasıyla %80, 90, 96 ve 100'lük alkolde 3'er kez ve 10 dakika süreyle bekletildikten sonra, 2 kez 10'ar dakika propilen oksitle muamele edilmiştir. Dokular, 1 gece 1:1 oranında hazırlanmış propilen oksit-araldit karışımında rotatorda döndürülmüştür. Gece boyu karışımında beklemiş olan dokular taze hazırlanmış araldite gömülüp ve 48 saat süreyle polimerleşme için 60°C'lik etüvde bekletilmiştir. Elektron mikroskop takibi gerçekleştirilmiş olan doku bloklarından, önce 1-2 µm kalınlığında kalın kesitler alınmıştır. Alınan kalın kesitler %1'lik toluidin mavisi ile boyanarak ince kesit alanları belirlenmiştir. Belirlenen alanlardan da, ince kesitler alınmıştır. İnce kesitler elektron mikroskopik analiz için kontrastlanarak Tıp Fakültesi Elektron Mikroskopik Görüntü Analiz Ünitesinde (TEMGA) bulunan TEM (Transmisyon Elektron Mikroskop, Zeiss LEO906E) mikroskobunda incelenmiştir.

3.7. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Parafine gömülmüş olan dokulardan mikrotom ile, 5 µm kalınlığındaki kesitler poli-L-lizinle kaplı lamlara alınmıştır. Her gruptan poli-L-lizinli lamlara alınmış olan kesitlere VEGF için immünohistokimyasal boyama gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal boyama için, preparatlar 60°C'lik etüvde 45 dakika bekletilerek parafinin erimesi ve kesitlerin lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı. Süre sonunda preparatlar ksilolde 2 kez 10'ar dakika, azalan alkol serilerinin (%100, %90, %80, %70) her birinde 1 kez 5 dakika tutulmuştur. Distile suda da 5 dakika bekletilen preparatlar, antijenlerin açılması için 2 kez 5'er dakika 0.01 M sitrik asitte ile mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Kaynatma işleminden sonra preparatlar 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Süre

sonunda preparattaki kesitlerin etrafı hidrofobik bir kalemle (pap-pen) ile çizildi. Preparatlar endojen peroksidaz enziminin baskılanması için %3'lük H₂O₂'de 25 dakika oda ısısında bekletildi. Süre sonunda preparatlar 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Sekonder antikorun spesifik olmayan bağlanmalarını engellemek için preparatlar ultra UV block solüsyonunda 10 dakika, oda ısısında bekletildi. Bu sürenin sonunda preparattaki kesitler üzerine yaklaşık 30 µl primer antikor (poliklonal tavşan anti-rat VEGF IgG) (Santa Cruz Biotechnology, sc-507) 1:100 dilüsyon oranında damlatılıp gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda preparatlar 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Preparatların üzerine biyotinli anti-rabbit sekonder (Vectasatin ABC kit, Vector, PK-4001 antikor damlatılıp, 30 dakika oda ısısında bekletildi. Süre sonunda preparatlar 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Preparattaki kesitler üzerine peroksidaz işaretli avidin damlatılarak 30 dakika, oda ısısında inkübe edildi. Bu işlemin ardından 3 kez 5'er dakika PBS'te yıkama gerçekleştirildi. Deney ve kontrol gruplarına ait olan preparatlar, DAB ile geliştirilerek VEGF boyanmaları ışık mikroskobu ile semi kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

3.8. Western Blot Analizi

Kontrol ve deney grubu hayvanlara ait siyatik sinir doku örnekleri, 0,2 gr dokuya 600 µl lysis buffer ve 10 µl proteaz inhibitör kokteyli olacak şekilde inkübe edilerek sonikatör yardımı ile homojenize edilmiştir. Tüm örneklerden, 15000 g'de, +4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları -20°C'de saklanmak üzere, protein lizatları hazırlandı. Elektroferezden önce, 100°C'deki suda numuneler 5 dakika kaynatıldı. Jel elektroforezi için %12'lik poliakrilamid jel hazırlandı. Her kuyucuğa 12 mikrolitre örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde konulacak ve Mini protean sistem III tankının içine yerleştirildi. Mini protean sistem III tankına elektroferez solüsyonu eklenerek, tank güç kaynağına bağlandı. Proteinlerin güç kaynağı aracılığı ile 80 volt, 50 miliamperde yaklaşık 2 saat elektroferez gerçekleştirildi.

Proteinler jelde yürürken, PVDF membran üstte ve altta 3'er adet filtre kağıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. PVDF membran üzerine proteinleri içeren jel konularak hazırlanan sandviç Mini protean III sistemindeki tank blot içerisine alınacaktır. Mini protean III tankına transfer solüsyonu eklenecek ve +4°C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra elde edilen membran, tris tamponlu tuz solüsyonu (TBS) ile hazırlanan % 5'lik yağsız kuru süt tozu ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde blokladı. Membran, üreticinin tavsiyesine göre hazırlanmış ve bloklama solüsyonu içinde dilüe edilmiş olan primer antikor (anti-VEGF) kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildikten sonra +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca, 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran, primer antikor için uygun olan ve bloklama solüsyonu ile dilüye edilmiş horseradish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe

edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca, 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenecek yıkama yapıldı. Membran SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi ile 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında karanlık oda içerisinde membranlardaki sinyaller hiperfilme aktarıldı. Film developer ve ardından fiksatiften geçirildikten sonra distile su ile yıkayıp kurutuldu. Böylece, deney ve kontrol gruplarındaki VEGF ekspresyonu protein düzeyinde semi kantitatif olarak değerlendirilip, karşılaştırıldı.

3.9. Veri Analizi

Yürüme patern analizi, tam geri çekme refleksi, morfolojik görüntüler, ışık ve elektron mikroskopi görüntüleri grafik ve resimler halinde incelendi. Moleküler biyolojik tekniklerden olan immünohistakimya ve Western blot uygulamaları gruplardaki VEGF ekspresyon sonuçları iki ayrı araştırmacı tarafından incelenip, gruplardaki VEGF ekspresyon düzeyleri belirlendi. Yürüme patern analizi ile edilen veriler SPSS programına aktarılarak, istatistiksel olarak ortalamaları, normal dağılıma uyup uymadıkları tespit edildikten sonra elde edilen veriler analiz edildi. Yürüme patern analiz sonuçları ANOVA testi ile analiz edilirken, pinch test verileri ise Ki-kare testi ile test edildi. Tüm testler için anlamlılık seviyesi $p:0.05$ olarak belirlendi.

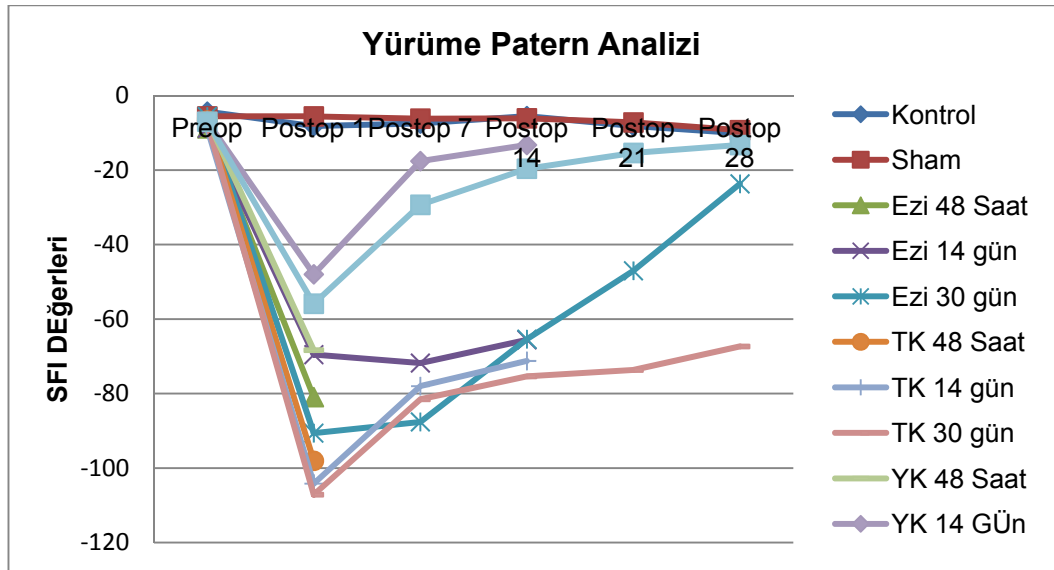
BULGULAR

4.1.Yürüme Patern Analizi

Kontrol ve sham gruplarının SFI değerleri karşılaştırıldığında, veri eldesinin yapıldığı günlerde iki grup arasındaki elede edilen değerler birbirine çok yakındır.

Tüm grupların 48 saatlik alt gruplarında rejenerasyonun olmadığı sitayik fonksiyon indeksinden (SFI) de anlaşılmaktadır. Bu grupların sakrifasyon öncesi SFI değerleri sırasıyla, ezi grubunda -80.95 ± 11.90 , tam kesi grubunda -98.04 ± 8.41 ve yarı kesi grubunda ise -68.34 ± 9.65 'tür (Şekil 4.1). 14 günlük alt gruplarda en iyi iyileşme -13.25 ± 7.84 SFI ile yarı kesi grubunda görüldü. Ezi ve tam kesi gruplarının ise SFI indek değerlerinin birbirlerine yakın olup, bunların sırasıyla -65.56 ± 6.53 ve -71.23 ± 9.37 olduğu bulundu (Şekil 4.1). 30 günlük alt gruplarda ise en iyi iyileşme -13.26 ± 4.78 SFI değeri ile yarı kesi grubunda, sonra ise -23.70 ± 8.43 SFI değeri ile ezi grubunda tespit edildi. Tam kesi grubunun 30 günlük alt grubunun SFI değeri ise -67.34 ± 5.48 olup diğer grupların gerisinde olduğu görüldü (Şekil 4.1). Bu gruba ait SFI değerleri her postoperatif süre bazında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak diğer gruplara göre daha düşük seviyede ($p < 0.05$) SFI değerine sahip olduğu tespit edildi.

-50 değeri rejenerasyon için ön veri niteliğinde olup bu değeri yarı kesi 14 günlük, yarı kesi 30 günlük ve ezi 30 günlük alt gruplar sırasıyla -13.25 ± 7.84 , -13.26 ± 4.78 ve -23.70 ± 8.43 değerleri geçtiği görüldü. 48 saatlik alt gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, 14 günlük alt gruplarda yarı kesi grubunda ve 30 günlük alt gruplarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).



Şekil 4.1. Deney gruplarının cerrahi operasyon öncesi ve sonrası elde edilen SFI değerleri.

4.2. Pinch Test Bulguları

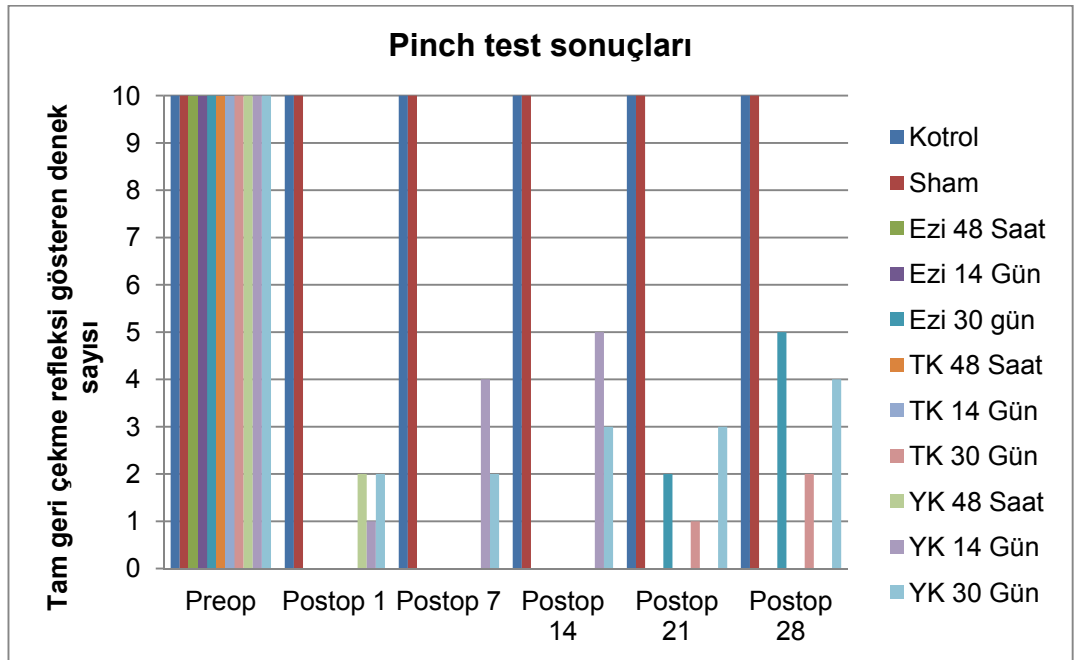
Kontrol ve sham grubunda pinch test cevabı preoperatif ve postoperatif haftalarda tam geri çekme refleksi (Derece 3) olarak tespit edildi.

Cerrahi operasyonun ertesi günü tam geri çekme refleksi sadece yarı kesi gruplarında görülmüştür. Yarı kesi grubunun 14 günlük ve 30 günlük alt gruplarında zamanın ilerlemesine paralel olarak rejenerasyonun artmasıyla birlikte bu gruplarda görülen tam geri çekme refleksini gösteren denek sayılarında artış görülmüştür (Şekil 4.2).

Ezi grubunda tam geri çekme refleksi sadece 30 günlük alt grupta, sakrifasyon öncesi son iki hafta önce görülmüştür ve sakrifasyon günü ezi grubunun 30 günlük alt grubunda 5 denekte gözlenmiştir (Şekil 4.2).

Tam kesi grubunda ezi grubuna benzer şekilde sadece 30 günlük alt grupta tam geri çekme refleksi görülmüştür ve sakrifasyon öncesi son iki hafta içerisinde görülmüştür. Fakat bu grupta tam geri çekme refleksi gösteren denekler ezi grubunun 30 günlük grubunda bulunan ve tam geri çekme refleksi gösteren denek sayısından daha azdır. Sakrifasyon günü ezi 30 günlük alt grupta 5 denekte tam geri çekme refleksi gözlenirken, bu sayı tam kesi 30 günlük alt grupta 2'dir (Şekil 4.2).

Pinch test verileri değerlendirildiğinde en fazla geri çekme refleksi (derece 3) gösteren denek sayılarının yarı kesi grubunda olduğu istatistiksel olarak ta doğrulandı ($p < 0.05$). Diğer gruplar da ise postoperatif süreler bazında değerlendirildiğinde benzer sonuçlar tespit edildi ($p < 0.05$)



Şekil 4.2. Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası tam geri çekme refleksi (Derece 3) gösteren denek sayıları.

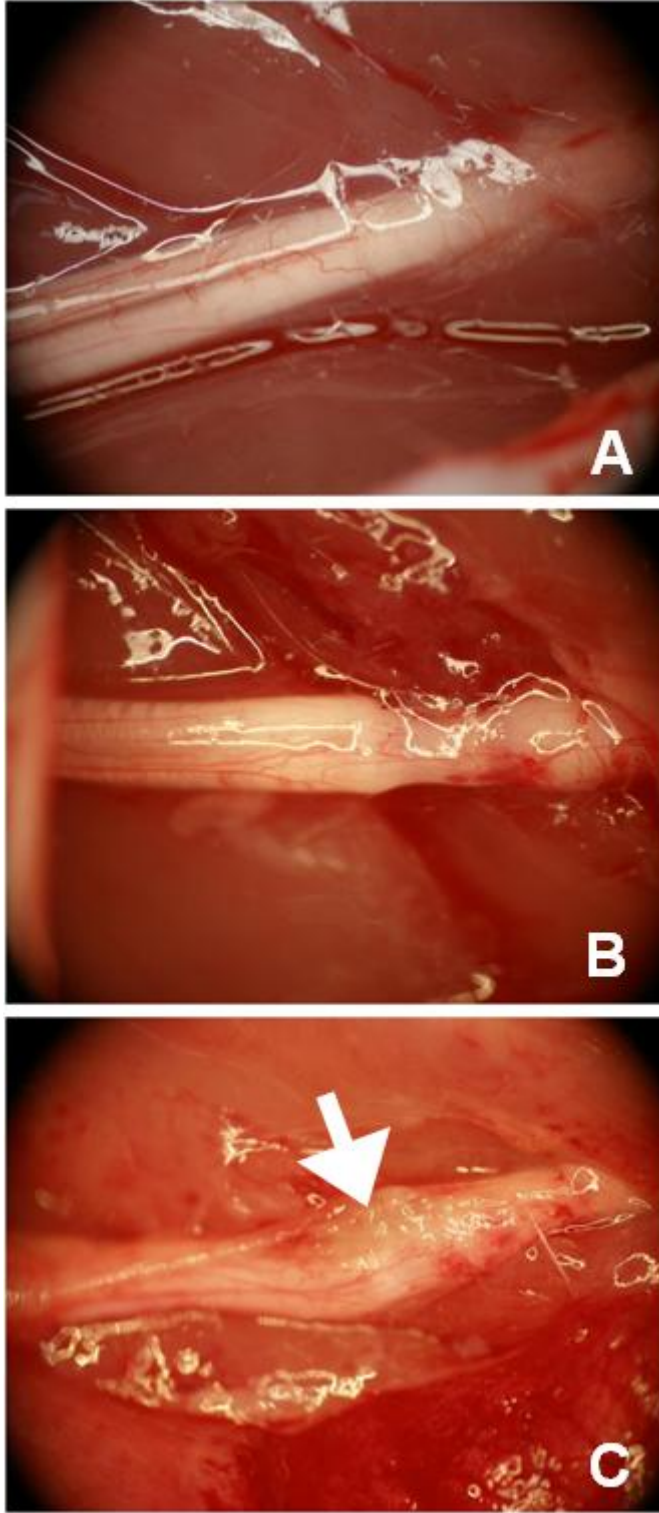
4.3. Morfolojik Değerlendirme

Siyatik sinirin dış morfolojisinde özellikle damarlanmasında ezi ve kesi öncesi morfolojik farklılıklar gözlemlendi. Kontrol ve sham (şekil 4.12) gruplarına göre Ezi grubunda sinirin bütünlüğü bozulmazken, tam kesi grubunda tamamen, yarı kesi grubunda kısmen sinirin bütünlüğü bozulmuştur (şekil 4.16).

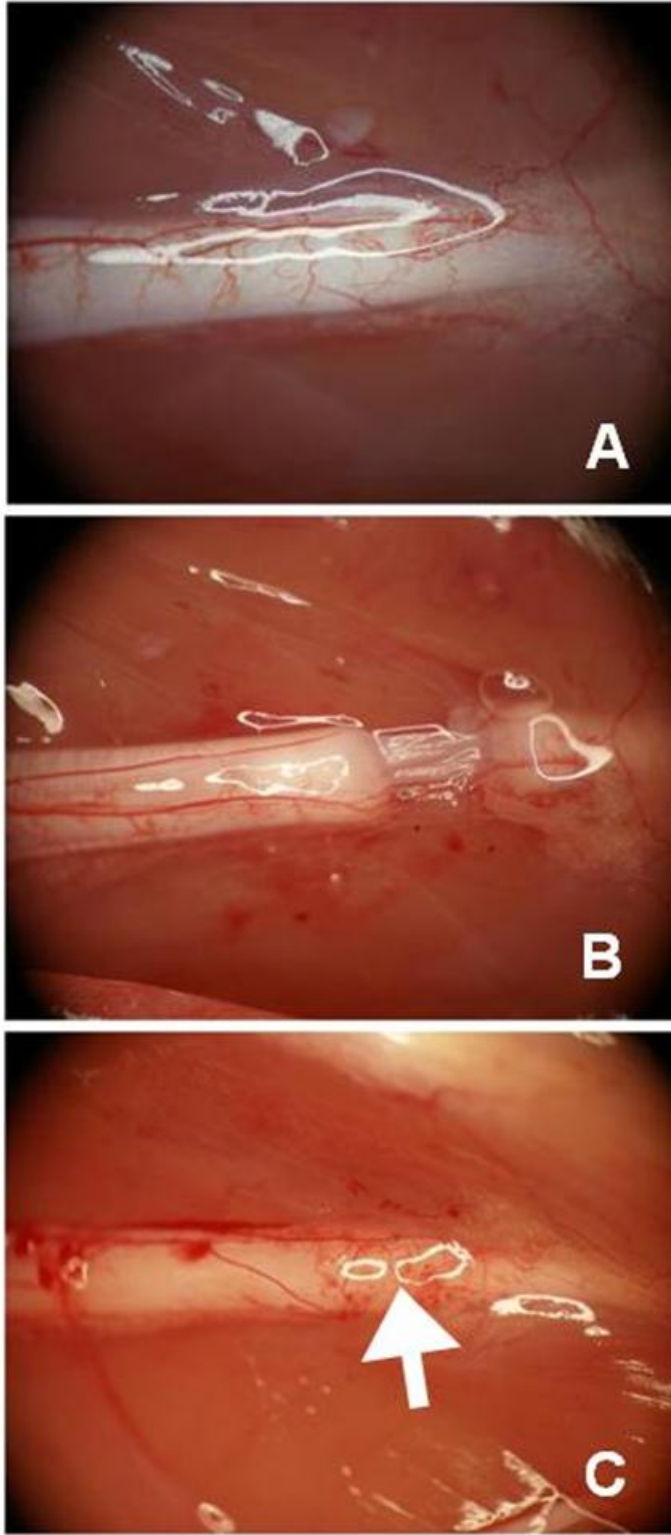
Ezi grubunda tüm alt gruplarında (şekil 4.13) zellikle de hasarlı bölgede damarlanmada artış görülmüştür. 48. saatlik ezi grubunda hasarlı bölgede küçük damarların artışıyla birlikte hasarlı bölgede skar dokusu gözlemlendi (şekil 4.3.). 14 günlük alt grupta ise özellikle hasar bölgesinde epineriumda küçük arteriyollerin artışı dikkat çekmektedir (şekil 4.4). 30 günlük alt grupta ise skar dokusunun kaybolduğu, hasar bölgesinde ve hasar bölgesinin haricinde damarlanmada ve küçük arteriyelerde artış görüldü. Ayrıca longitudinal olarak uzanan damarların da hasar öncesi gibi siniri beslediği görülmüştür (şekil 4.5).

Tam kesi grubunun 48. saatlik alt grubunda da kesi bölgesinde skar dokusu ve damarlanmada artış görüldü (şekil 4.6 ve şekil 4.14). Bu artış ezi grubunun 48 saatlik alt grubundaki artış kadar değildir. 14 günlük alt grubunda da damarlanmada artış görüldü ve hasar bölgesindeki skar dokusu tamamen kaybolmadığı izlendi (şekil 4.7 ve şekil 4.14). Diğer alt grublarda olduğu gibi damarlanmada artış görülmüştür. Bu artış ezi grubundaki kadar belirgin değildir. Hasar bölgesindeki skar dokusu ise bu grupta gözlemlenmedi (şekil 4.8 ve şekil 4.14).

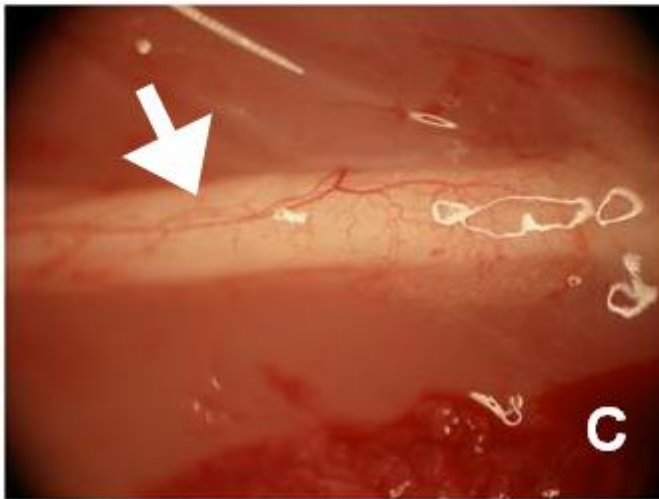
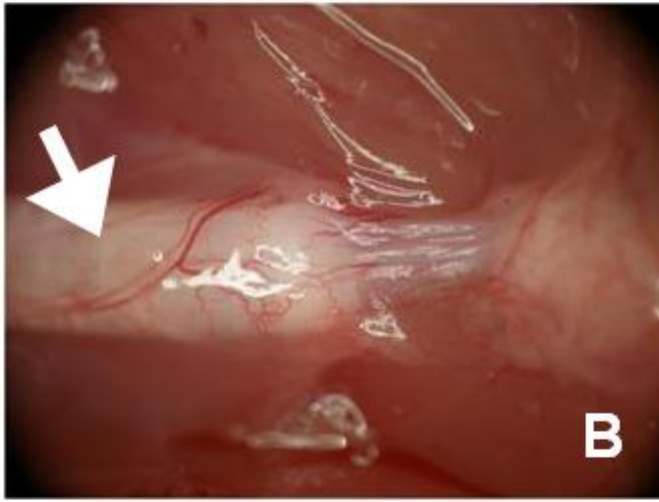
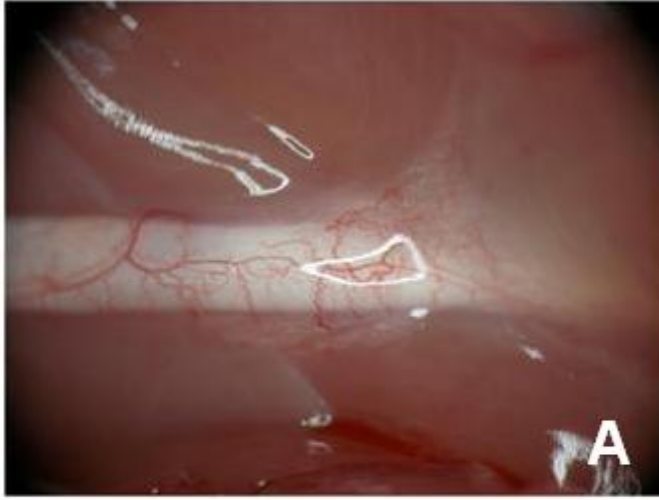
Yarı kesi 48. saat alt grubunda damarlanmada artış görülmezken, skar doku sinirin kesi yapılan yarımında görüldü (şekil 4.9 ve şekil 4.15). Diğer yarı morfolojik bütünlüğünü koruduğu tespit edildi. 14 günlük alt grubta az da olsa yeniden damarlanma görülmekte ve skar dokusu sinirin kesi yapılan yarımında hala görüldüğü tespit edildi (şekil 4.10 ve şekil 4.15). 30 günlük grupta az miktarda yeniden damarlanma görüldü ve skar dokusu bu grupta tespit edildi (şekil 4.11 ve şekil 4.15).



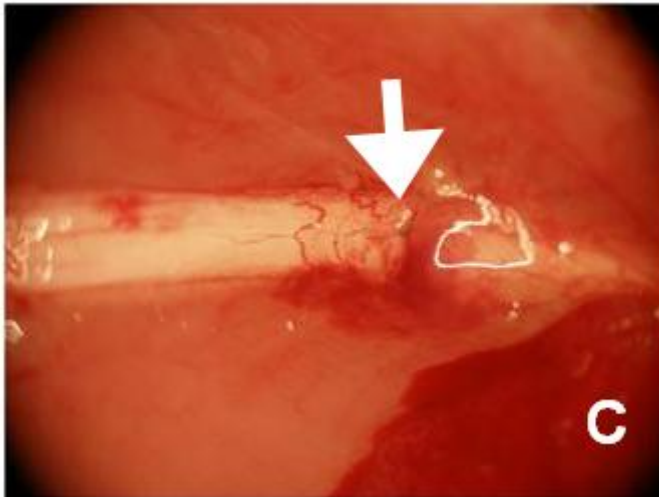
Şekil 4.3.Ezi grubu 48. saat alt grubun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü. Beyaz ok; 48. saatlik gruplarda belirgin olan skar dokusu



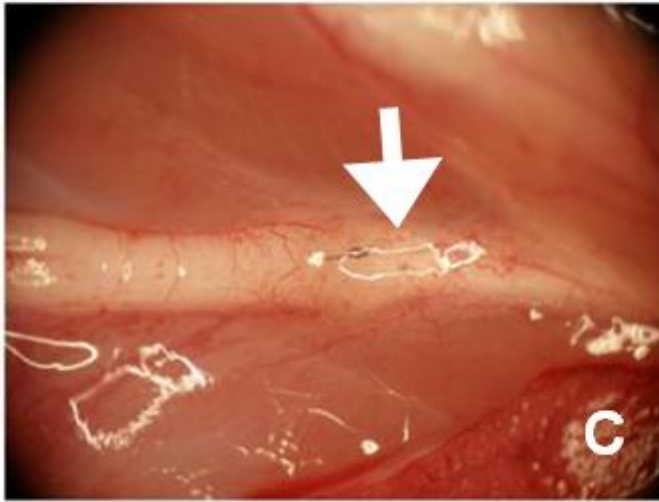
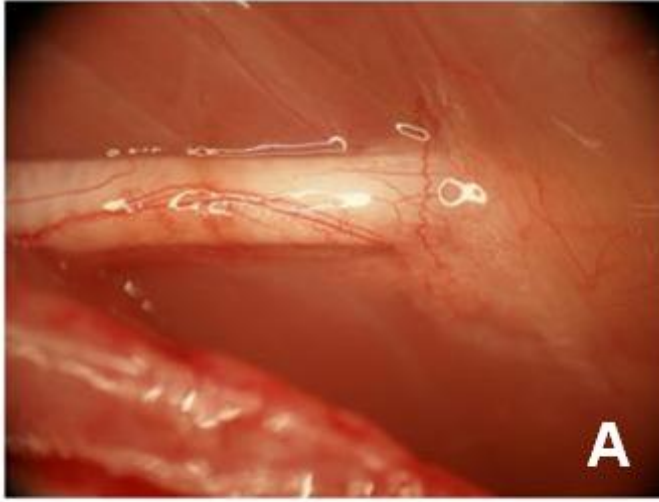
Şekil 4.4.Ezi grubu 14. gün alt grubunun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü. Beyaz ok; arteriyol artışının fazla olduğu ezi bölgesi



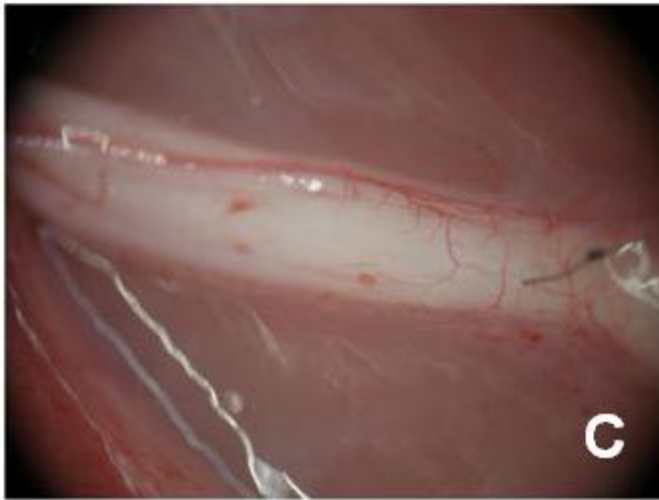
Şekil 4.5.Ezi grubu 30 günlük alt grubunun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü. Beyaz oklar; ezi bölgesinin haricinde arteriyol artışının fazla olduğu bölgeyi göstermektedir.



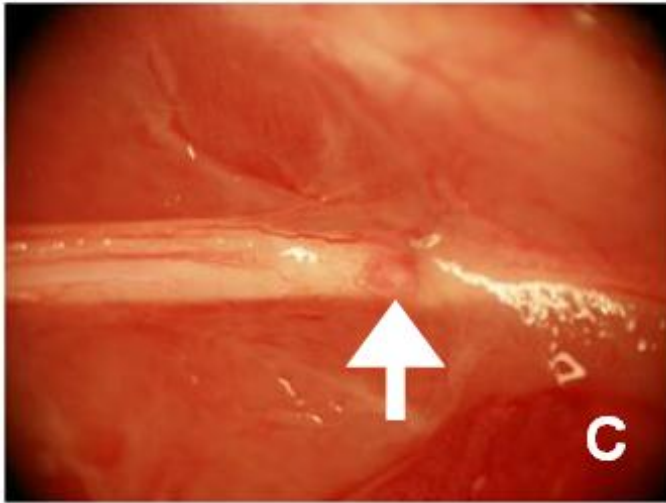
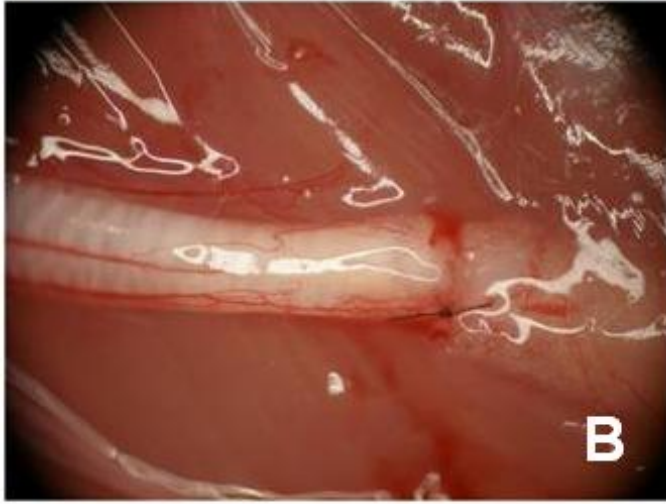
Şekil 4.6.Tam kesi 48. saat alt grubunun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü. Beyaz ok; hasar bölgesindeki yeniden damarlanma.



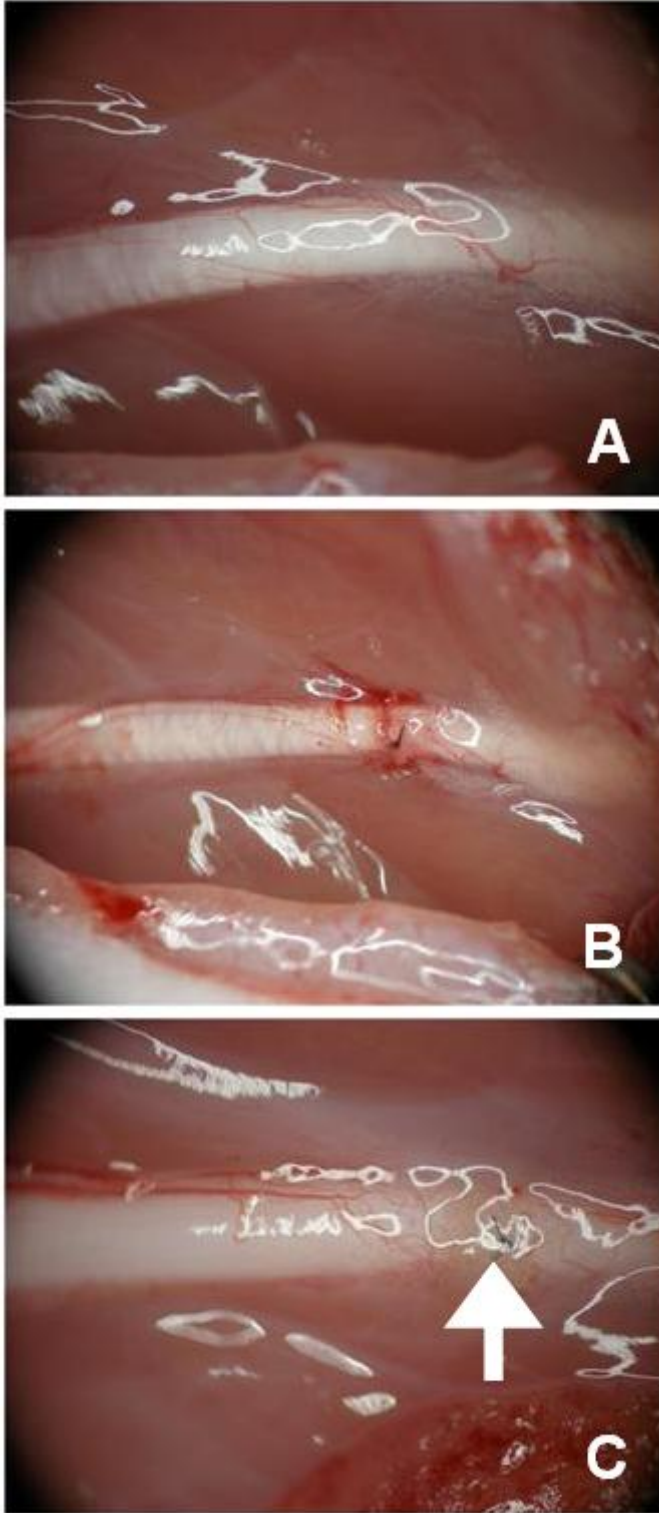
Şekil 4.7.Tam kesi 14 günlük alt grubunun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü. Beyaz ok; skar dokusu.



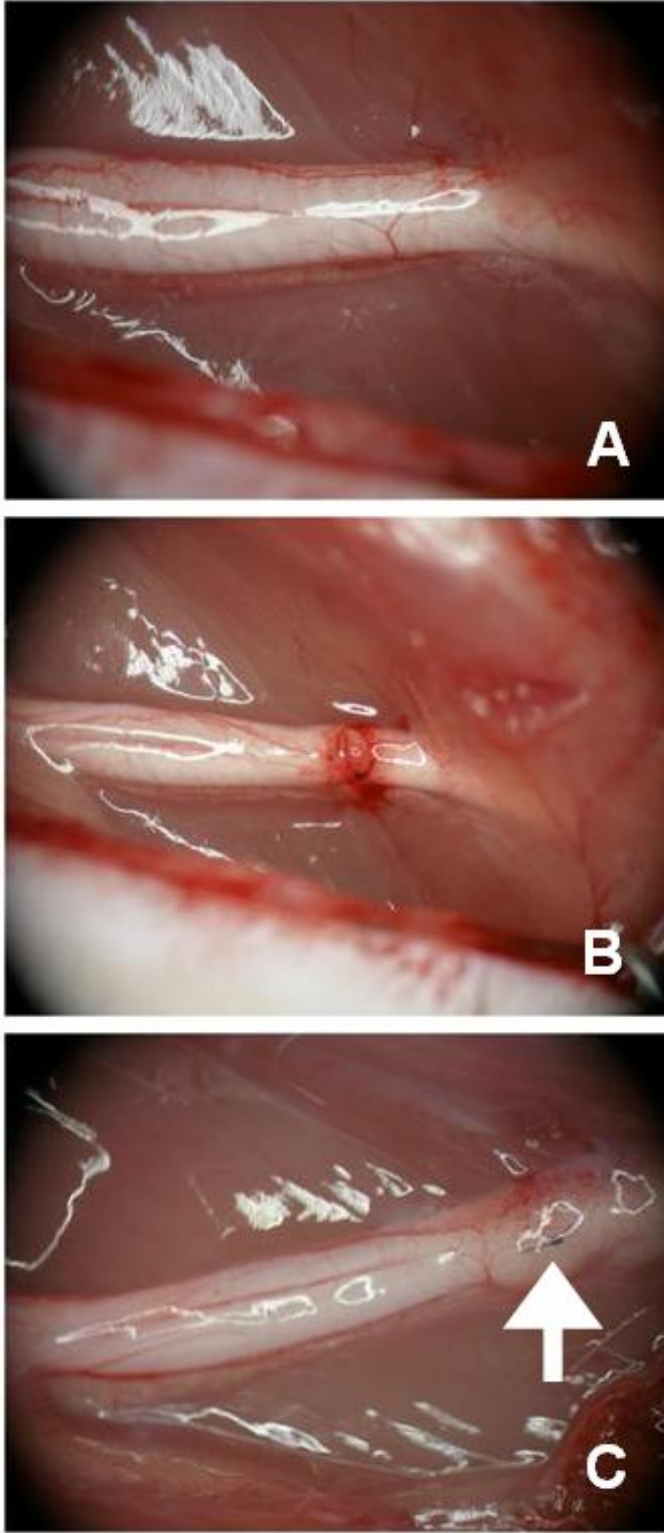
Şekil 4.8.Tam kesi 30 günlük alt grubunun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.



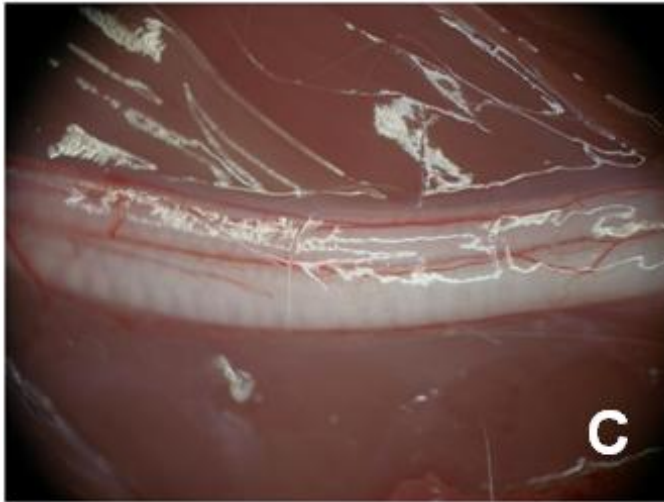
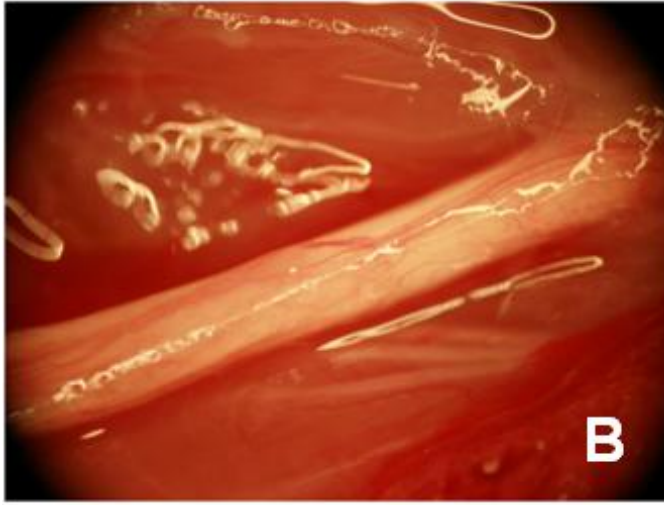
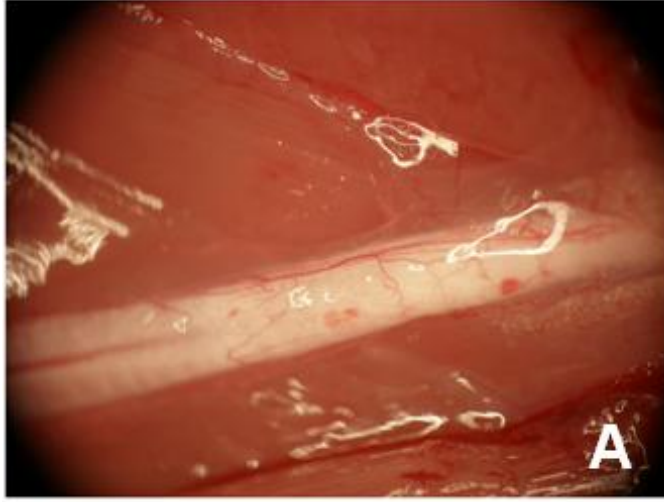
Şekil 4.9.Yarı kesi 48. saat alt grubunun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü. Beyaz ok; sinirin yarısında görülen skar dokusu.



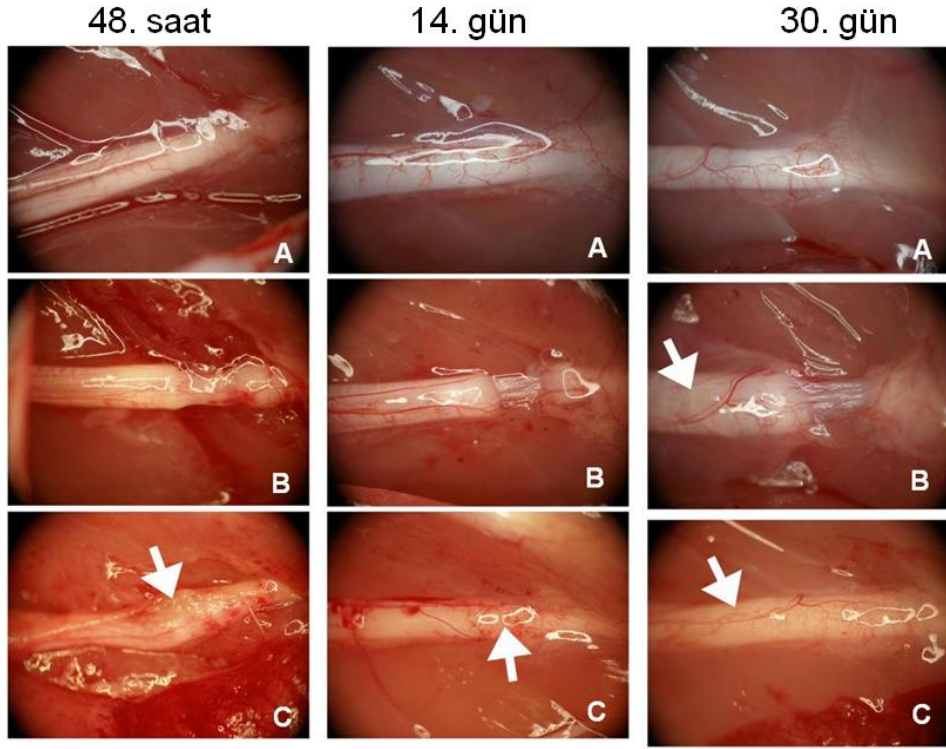
Şekil 4.10.Yarı kesi 14 günlük alt grubunun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü. Beyaz ok; sinirin yarısında görülen skar dokusu.



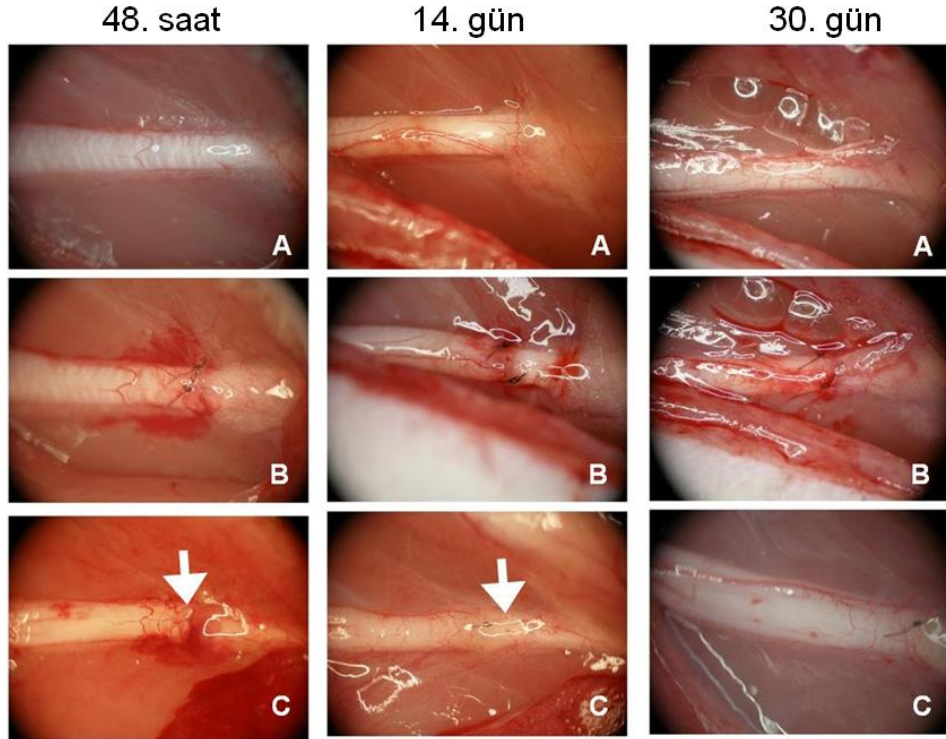
Şekil 4.11.Yarı kesi 30 günlük alt grubunun cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifişyon günü (C) morfolojik görünümü. Beyaz ok; sinirin yarısında görülen skar dokusu.



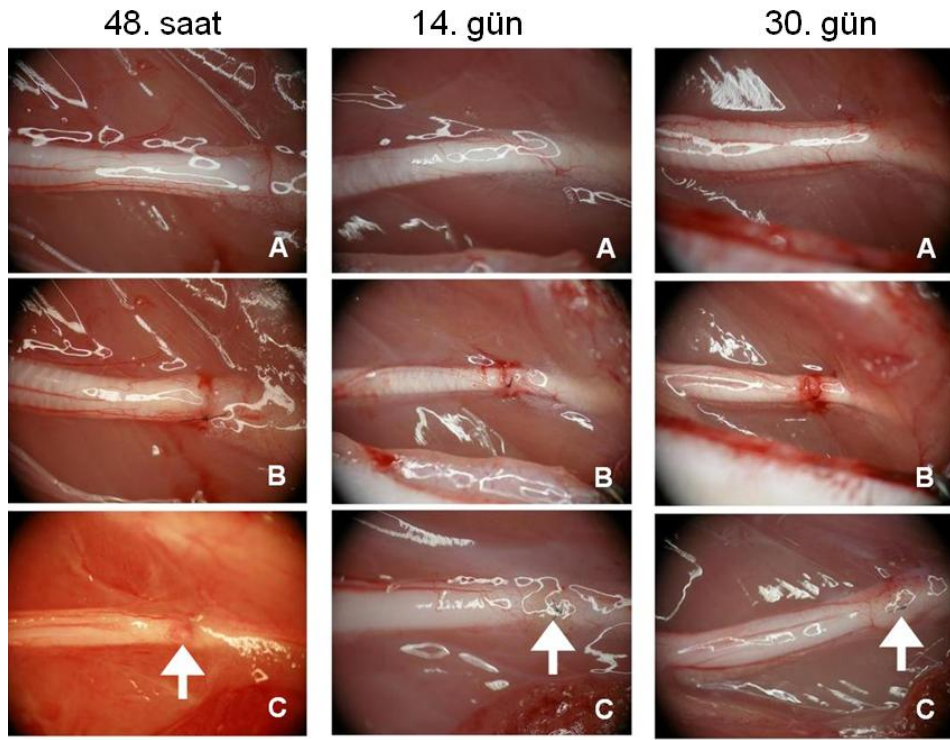
Şekil 4.12. Sham grubunun grubunun cerrahi operasyon öncesi (A) ve sakrifasyon günü (B) ve kontrol (C) grubunun morfolojik görünümü.








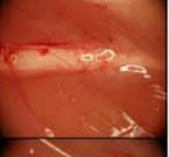











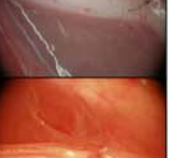











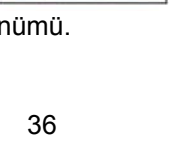
Şekil 4.13.Ezi deney grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt grublarının cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.



Şekil 4.14.Tam kesi deney grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt grublarının cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.



Şekil 4.15.Yarı kesi deney grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt grublarının cerrahi operasyon öncesi (A), cerrahi operasyon sonrası(B) ve sakrifasyon günü (C) morfolojik görünümü.

		Preop	Postop	Sakrifasyon günü
Ezi	48. saat			
	14. gün			
	30. gün			
Tam kesi	48. Saat			
	14. gün			
	30. gün			
Yarı kesi	48. saat			
	14. gün			
	30. gün			
Sham				
Kontrol				

Şekil 4.16. Tüm grupların morfolojik görünümü.

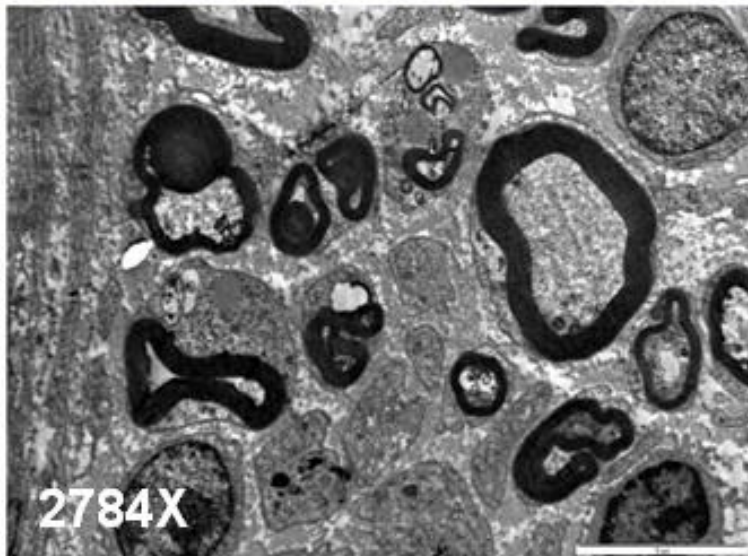
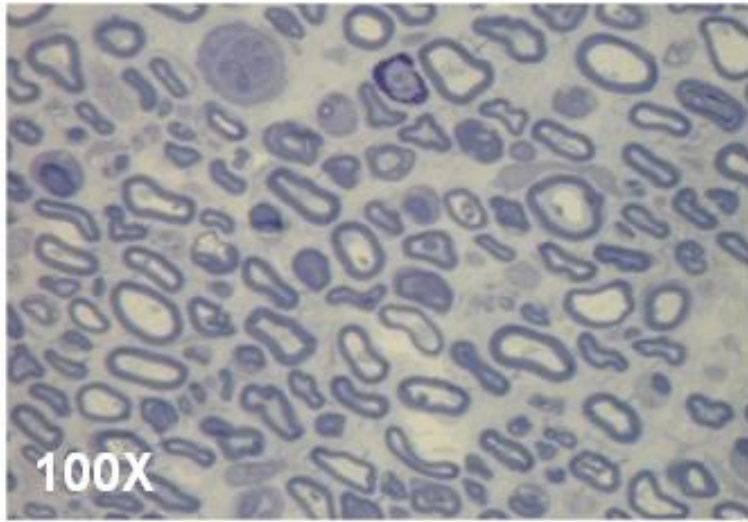
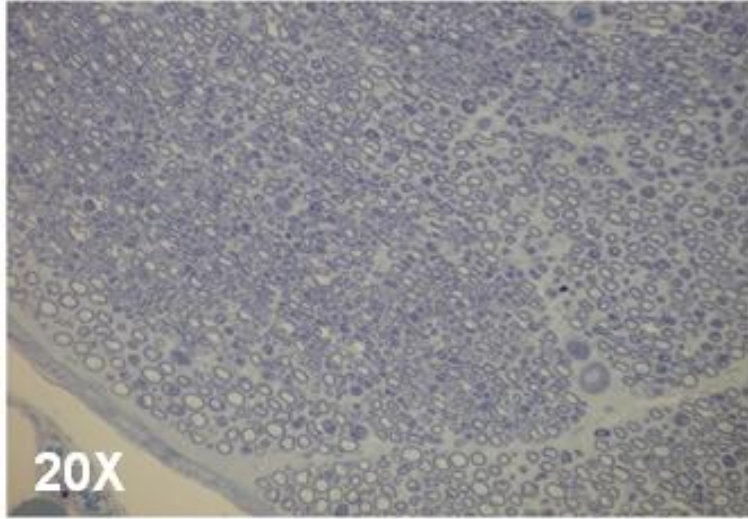
4.4. Işık ve Elektron Mikroskopik Değerlendirme

Kontrol ve sham gruplarının ışık mikroskopik değerlendirmesinde, myelinli ve myelinsiz sinir lifleri içeren normal bir siyatik sinir yapısı görülmüştür ve myelin deformasyonu, hasarlanmış bir sinir lifi yapısı tespit edilmemiştir (Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.31).

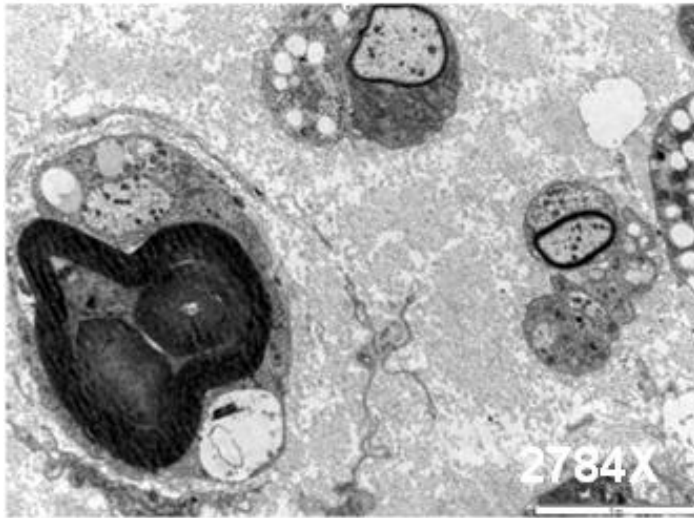
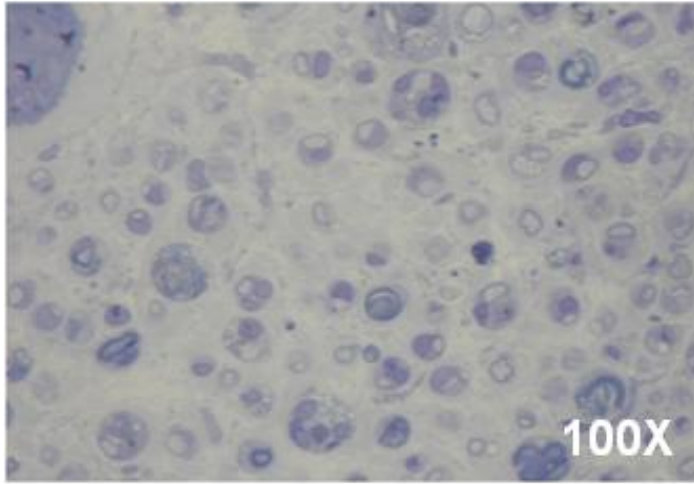
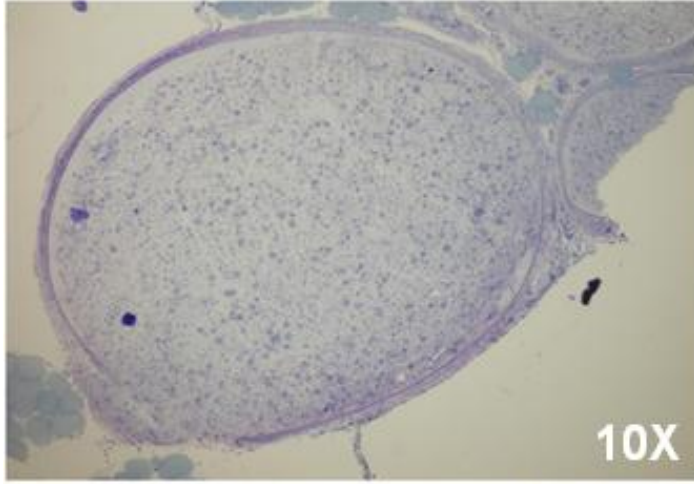
Ezi 48 saatlik alt grubunda hem ışık hem de elektron mikroskopik görüntülerinde dejenerasyonun başladığı görüldü. Makrofaj infiltrasyonu ile birlikte, sinir liflerinin de ayrıldığı görüldü (Şekil 4.17 ve Şekil 4.28). Ezi 14 günlük alt grubunda vakuoler dejenerasyon, makrofaj infiltrasyonu ve bağ dokusunda artış görülmektedir (Şekil 4.18 ve Şekil 4.28). Ezi 30 günlük alt grubu daha iyi morfolojik durumda olup, remyelinize olmuş sinir lifleri görüldür. 14 günlük alt grupta gözlenen bağ dokusu ve ödem azalmıştır. Myelin kılıf farklı formlarda görülmekle birlikte, hasarlı myelinli lifler de halen mevcuttur (Şekil 4.19 ve Şekil 4.28).

Tam kesi 48 saatlik alt grubunda görülen dejenerasyon sahaları, ezi 48 saatlik alt gruba oranla daha fazladır. Makrofaj infiltrasyonu ile birlikte Schwann hücreleri de tespit edilmiştir. Myelin lif yer yer ayrılıp dejenere olmaya başladığı ve ayrıca akson dışında olduğu gibi akson içerisinde de dejenerasyon alanları görülmektedir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.29). Tam kesi 14 günlük alt grupta dejenere myelin lifleri ve myelin rezidüleri görüldü. Bağ dokusunda artış ve vakuoler dejenerasyonda izlenmektedir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.29). Tam kesi 30 günlük alt grupta halen myelin rezidüleri izlenmekte. Myelinli ve myelinsiz sinir lifleri gözlemlenmektedir. Bağ dokusu tam kesi 14 günlük gruba oranla azalsa da, genel yapı ezi 30 günlük grup kadar iyi değildir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.29).

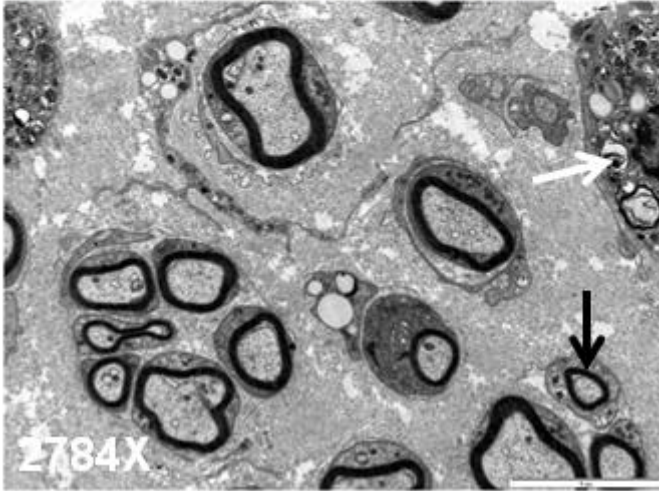
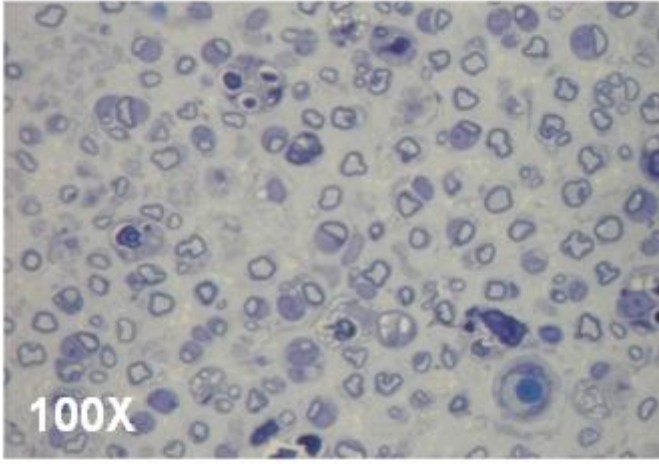
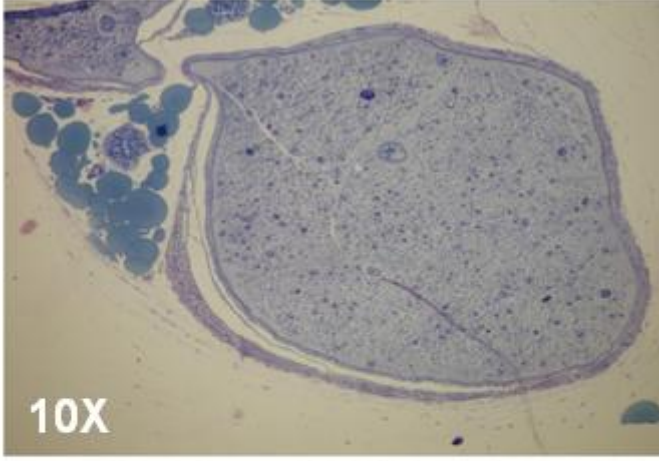
Yarı kesi 48 saatlik alt grubunda yer yer myelin katlanmalarında ayrılmalar gözlemlenir. Myelin kılıf düzensiz ve ince bir görünümündedir. Ayrıca vakuoler dejenerasyonda görülmüştür (Şekil 4.23 ve Şekil 4.30). Yarı kesinin 14 günlük alt grubunda ise fasiküler tarzda dejenerasyon görüldü. Kimi alanlar sağlam iken, hasarın yapıldığı yerlere yakın alanlarda bağ dokusu artışı, dejenerasyon artışı, fagositik aktivitede artış tespit edildi (Şekil 4.24 ve Şekil 4.30). Yarı kesi 30 günlük alt grupta fasiküler dejenerasyon izlenmekle birlikte, halen myelin rezidüleri, değişik formlarda ve kalınlıkta myelin kılıfı ve myelinsiz sinir lifleri görülmüştür (Şekil 4.25 ve Şekil 4.30).



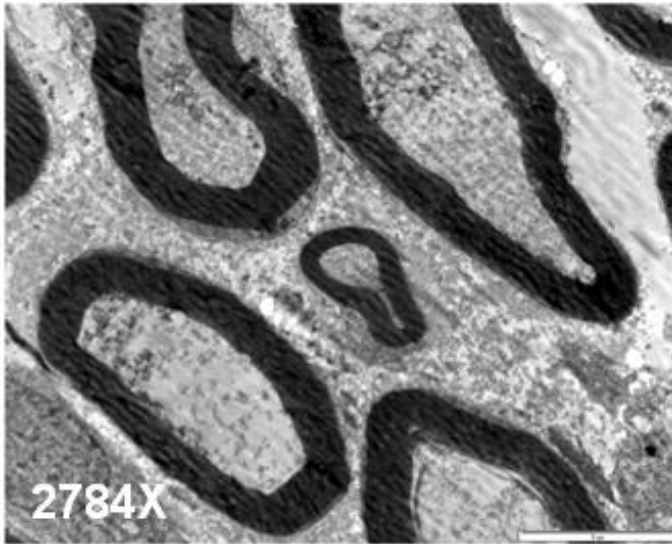
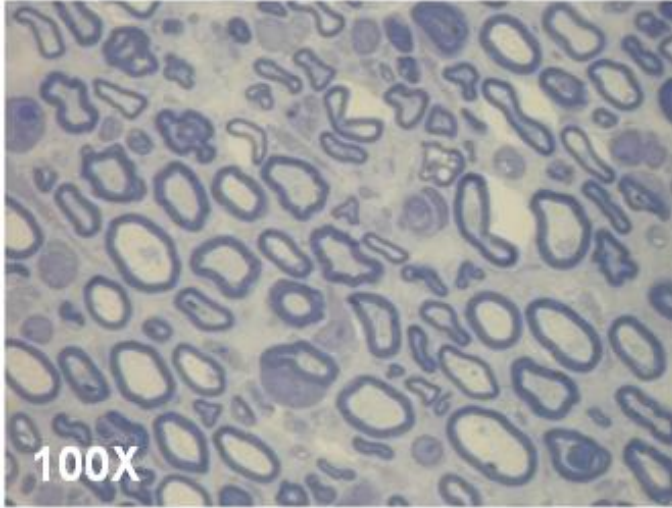
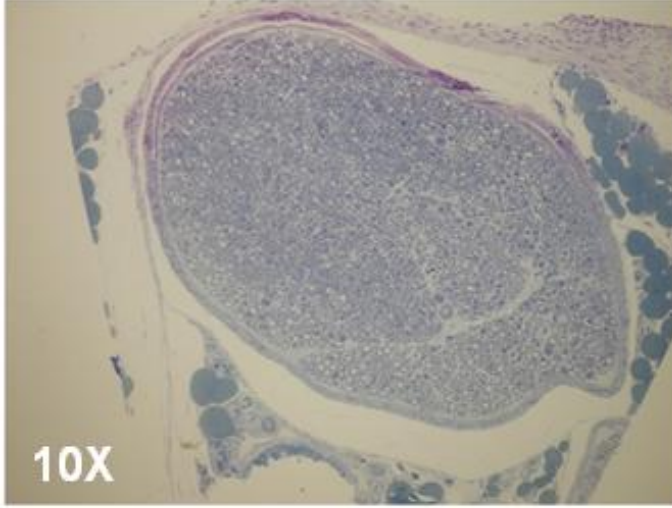
Şekil 4.17. Ezi 48 saatlik grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.



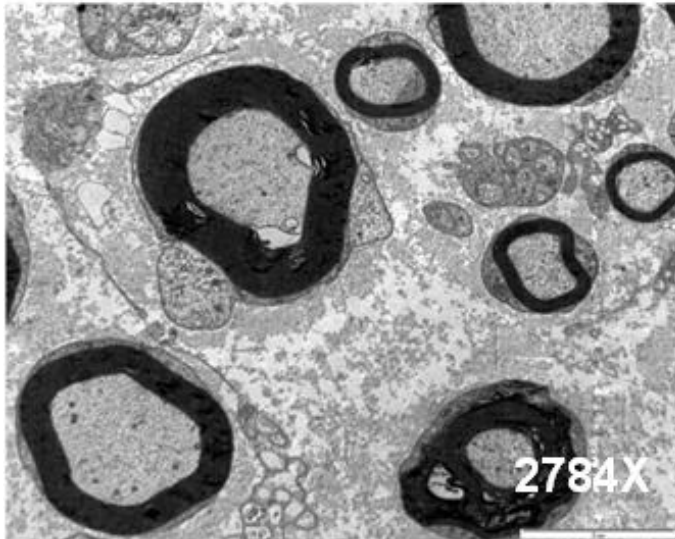
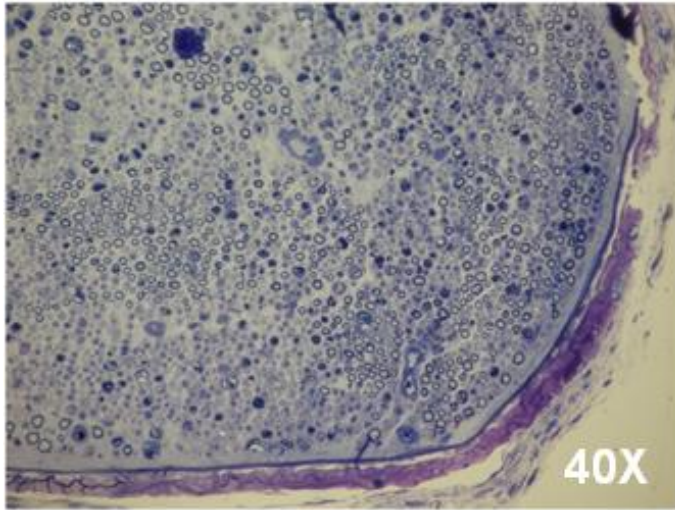
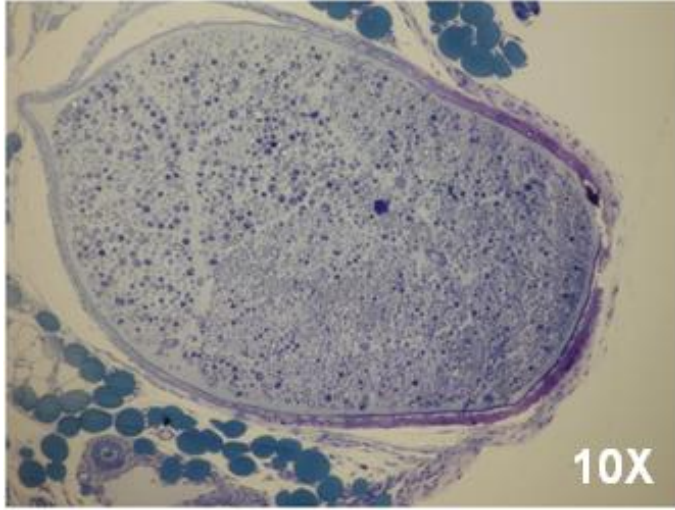
Şekil 4.18. Ezi 14 günlük grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.



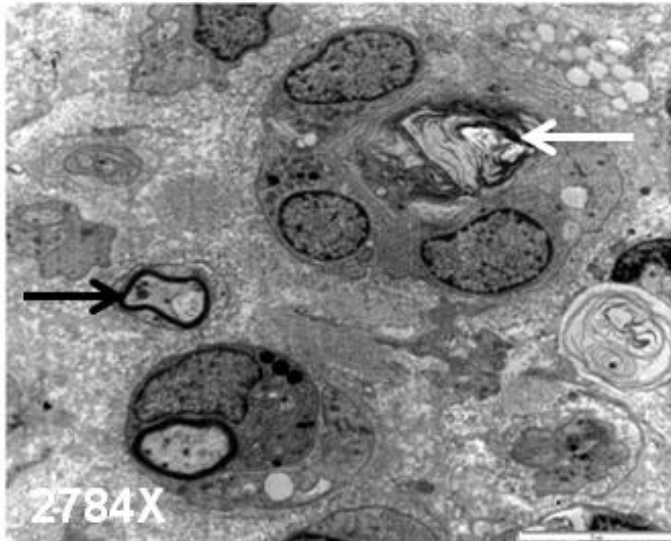
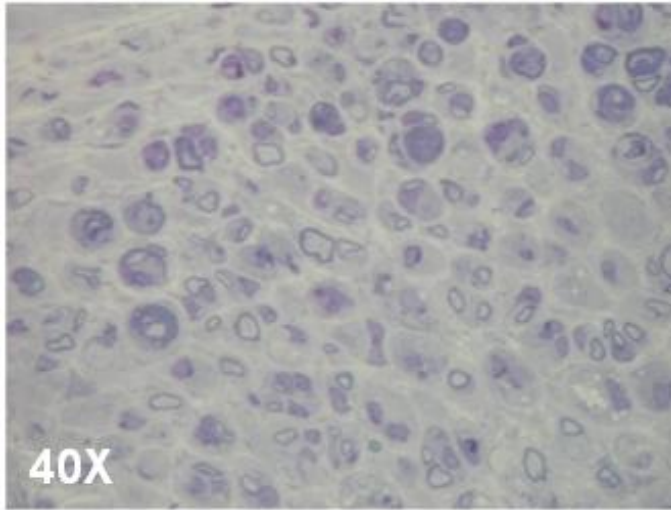
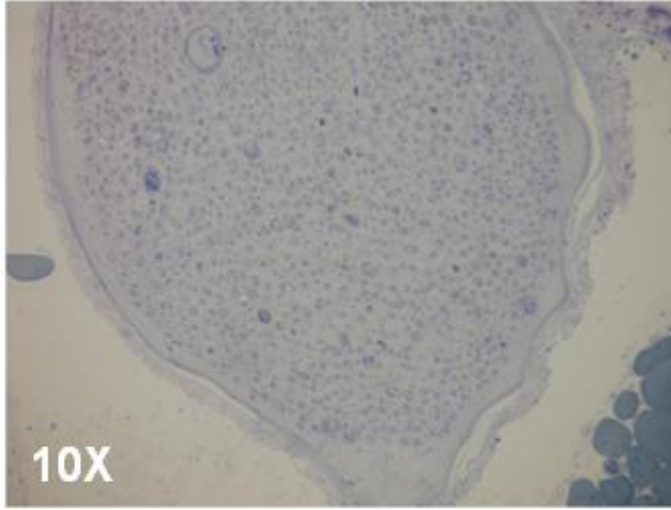
Şekil 4.19. Ezi 30 günlük grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri. Siyah ok; remyelinize sinir lifleri, beyaz ok; myelin rezidüleri.



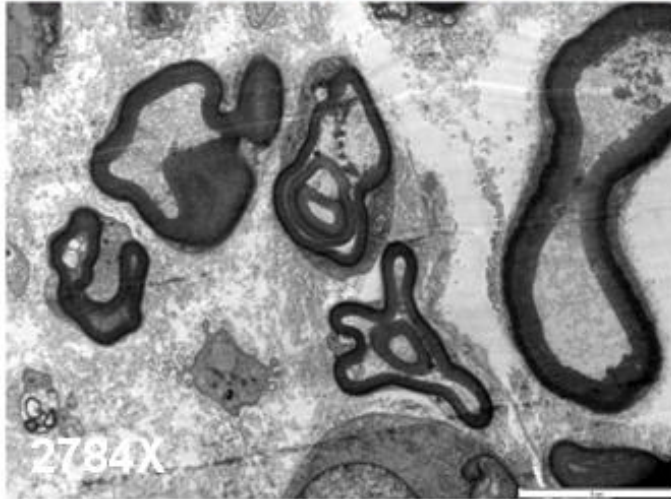
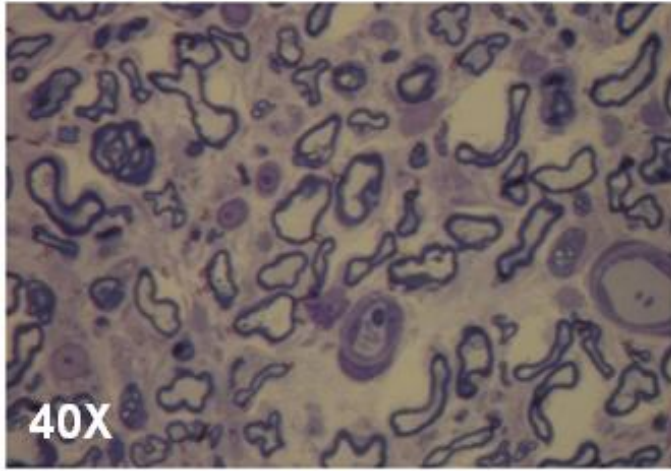
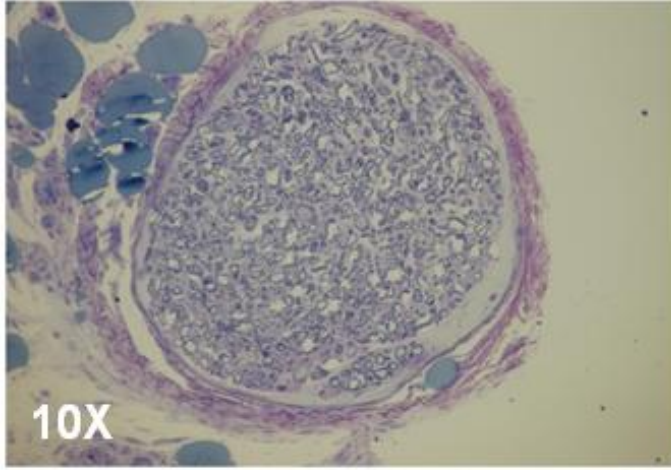
Şekil 4.20. Tam kesi 48 saatlik grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.



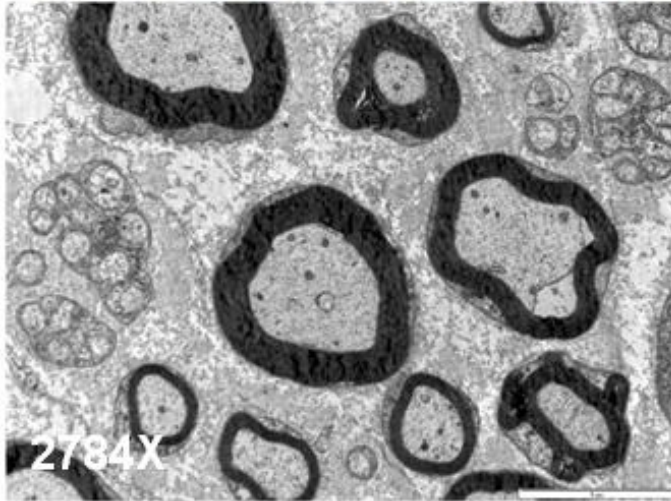
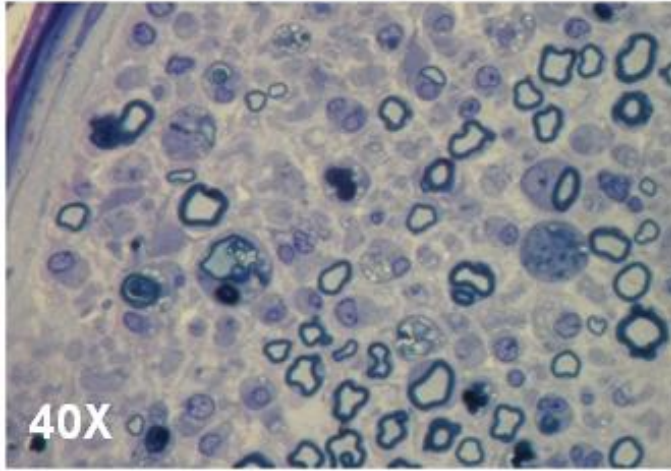
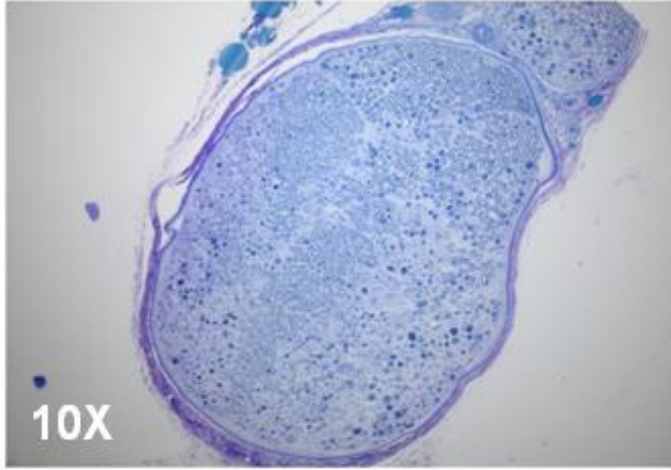
Şekil 4.21. Tam kesi 14 günlük grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.



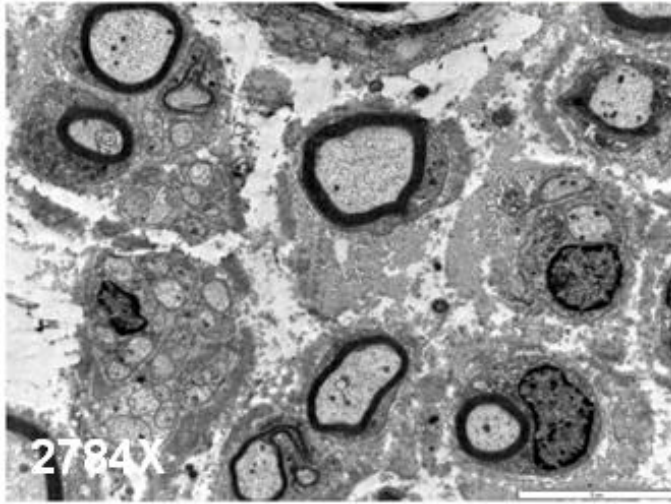
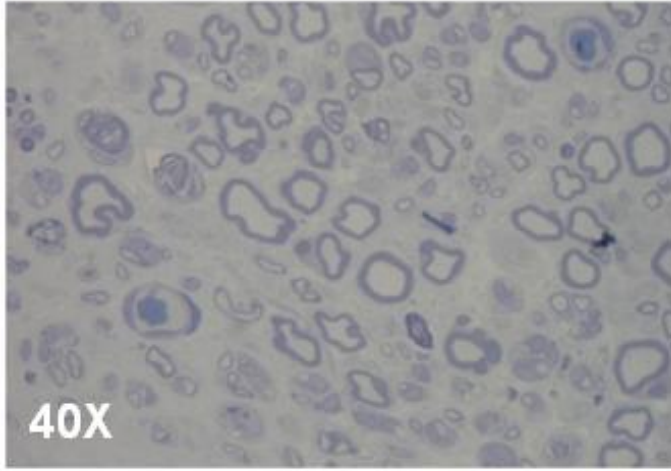
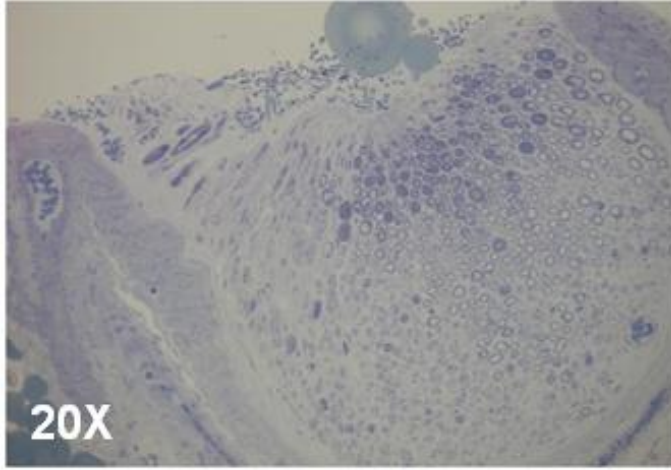
Şekil 4.22.Tam kesi 30 günlük grubun ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri. Siyah ok; remyelinize sinir lifleri, beyaz ok; myelin rezidüleri.



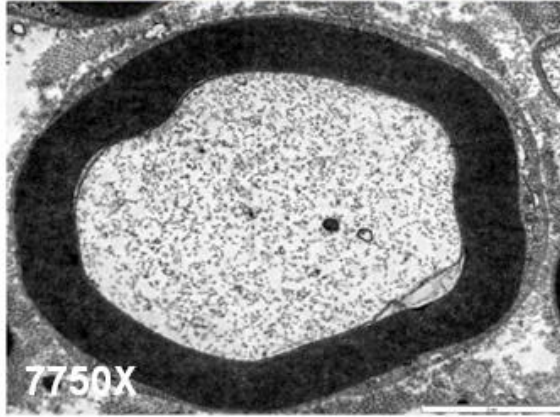
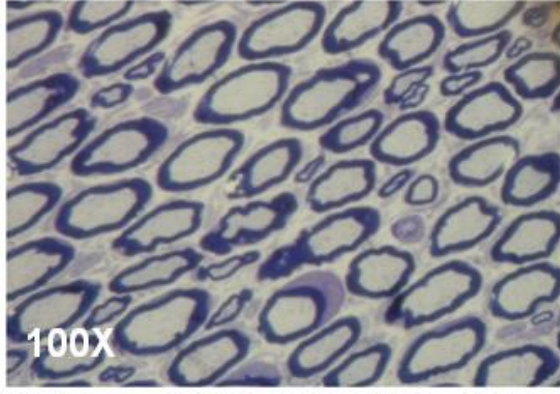
Şekil 4.23. Yarı kesi 48 saatlik grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.



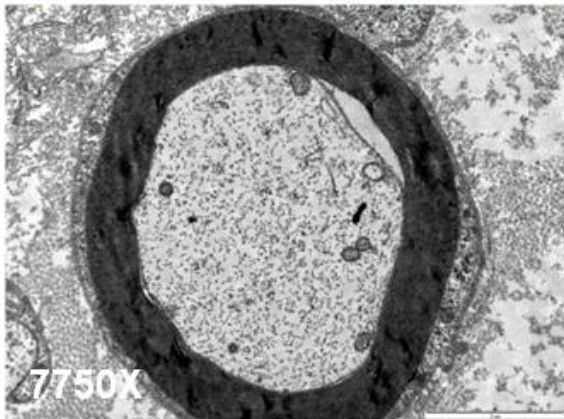
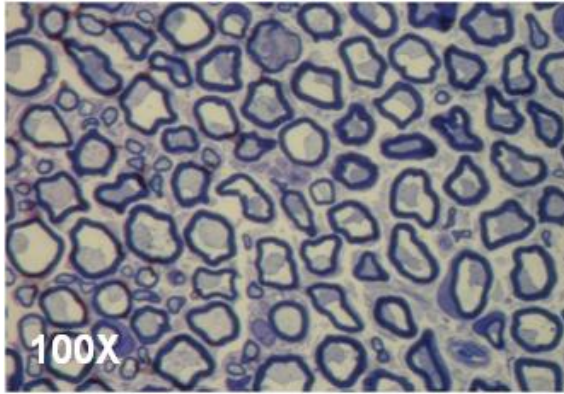
Şekil 4.24. Yarı kesi 14 günlük grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.



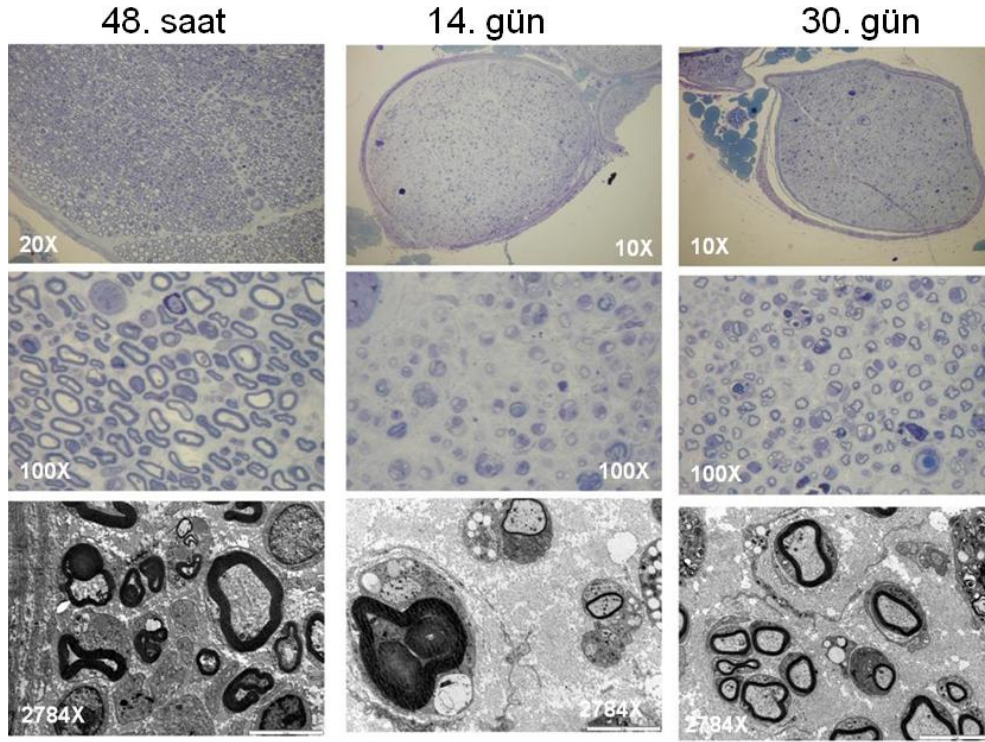
Şekil 4.25. Yarı kesi 30 günlük grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.



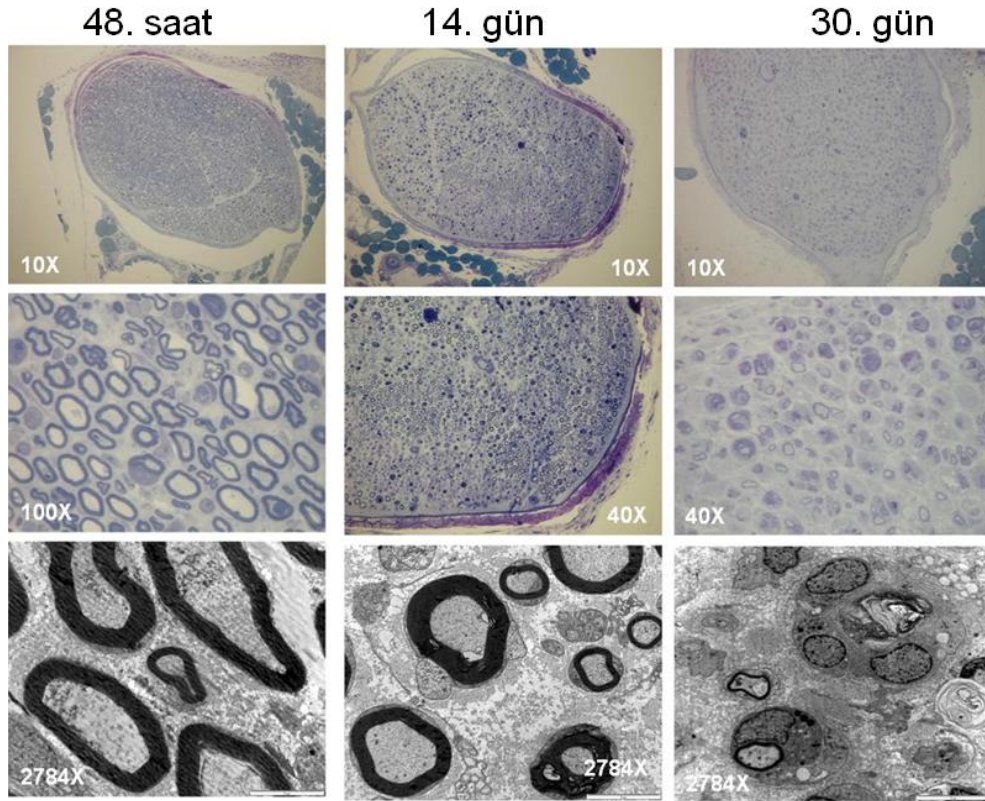
Şekil 4.26. Kontrol grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.



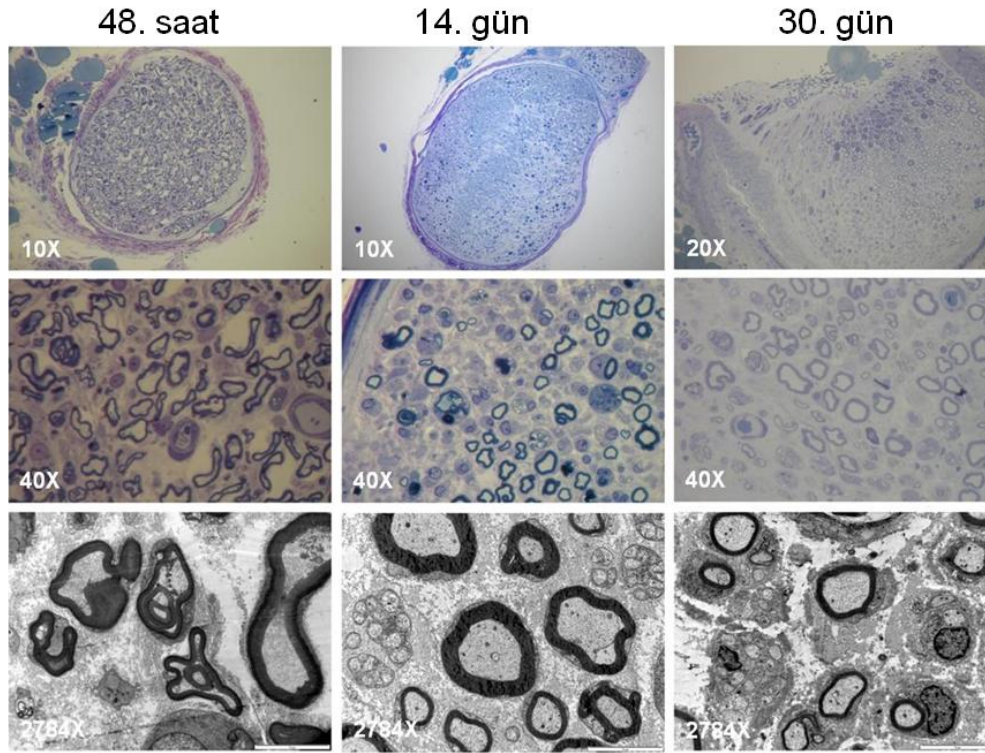
Şekil 4.27. Sham grubun ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.




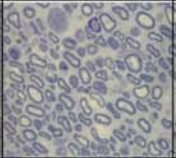
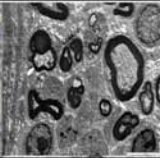
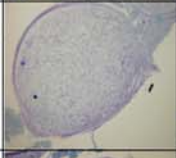
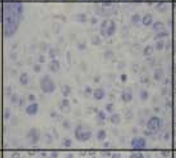

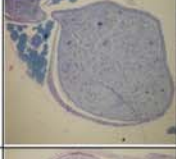
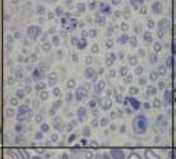

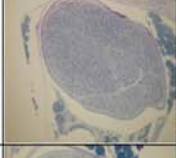
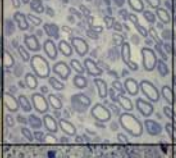

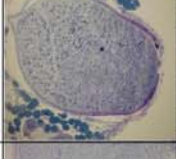
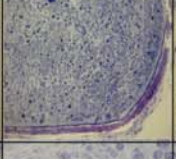


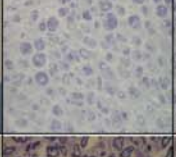
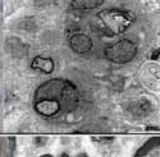
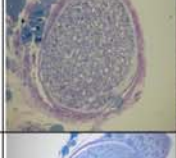

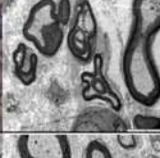
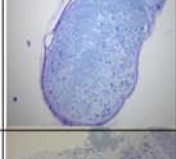
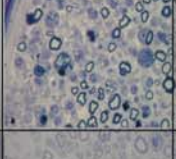


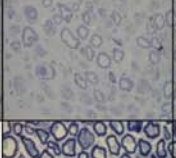
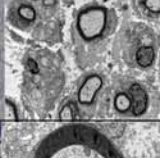

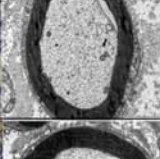


Şekil 4.28.Ezi grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.



Şekil 4.29.Tam kesi grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.



Şekil 4.30.Yarı kesi grubunun 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının ışık ve elektron mikroskopik görüntüleri.

		10X / 20X	40X / 100X	2784X / 7750X
Ezi	48. saat			
	14. gün			
	30. gün			
Tam kesi	48. saat			
	14. gün			
	30. gün			
Yarı kesi	48. saat			
	14. gün			
	30. gün			
Sham				
Kontrol				

Şekil 4.31. Tüm grupların ışık ve elektron mikroskobik görüntüleri.

4.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

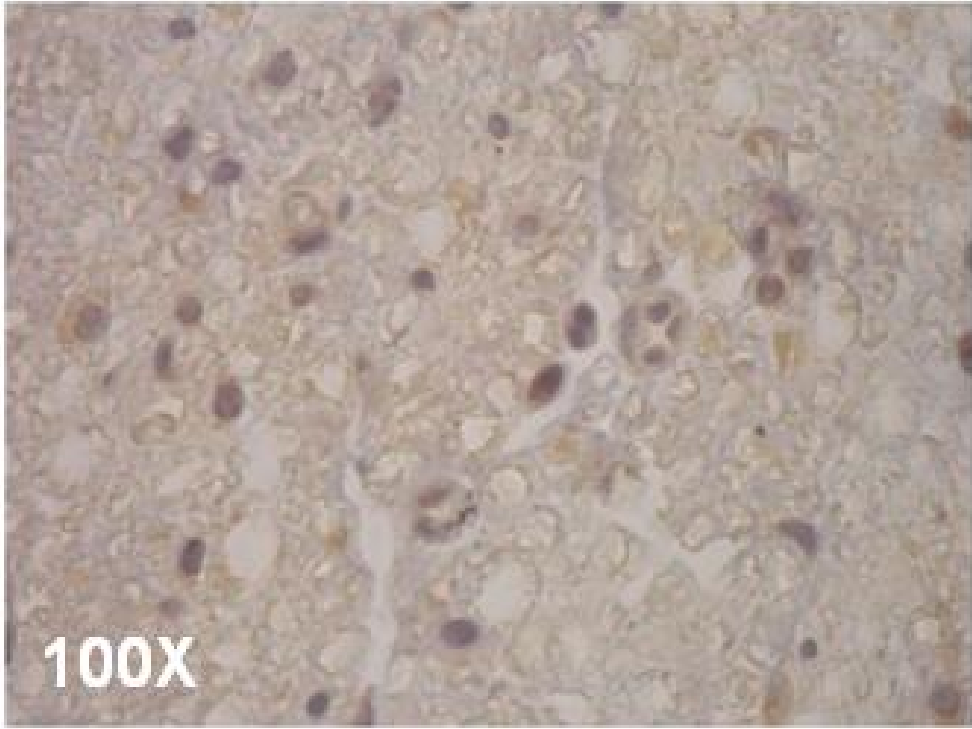
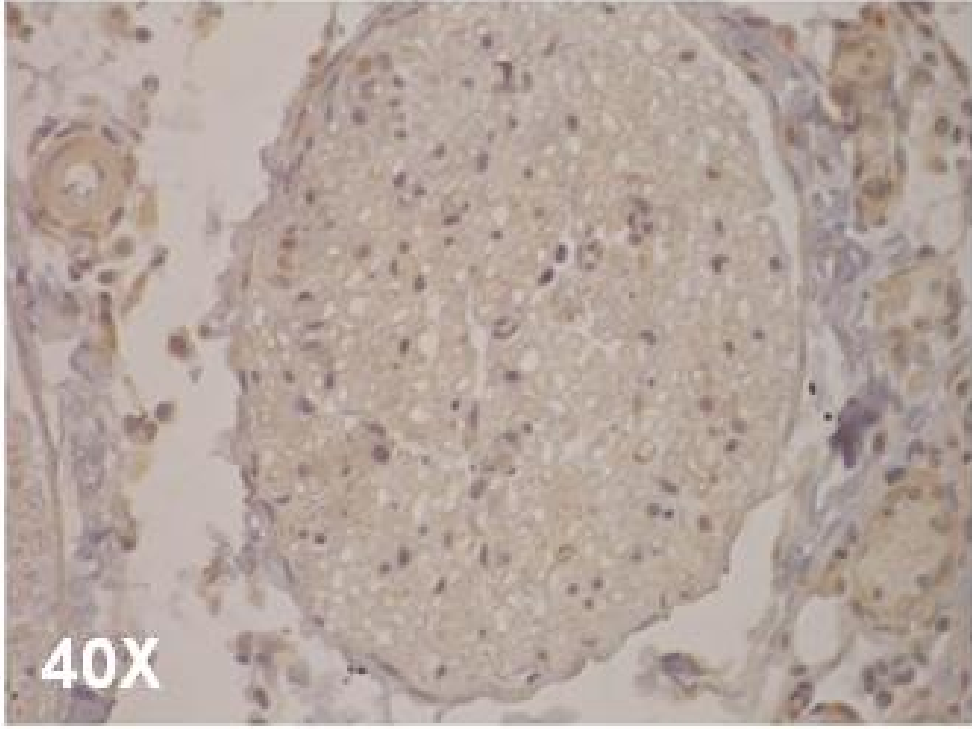
Gruplara ait VEGF'in immünohistokimyasal değerlendirmesi iki gözlemci tarafından gerçekleştirildi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda en yüksek VEGF ekspresyonunun tam kesi 48 saatlik grupta olduğu gözlemlendi. En az VEGF ekspresyonu ise tam kesi 30 günlük grupta olduğu görüldü (Şekil 4.32 – Şekil 4.47).

Ezi grubunu incelendiğinde en fazla VEGF ekspresyonu 48 saatlik alt grupta belirlendi. En az VEGF ekspresyonu ise 30 günlük alt grupta görüldü. 14 günlük alt grup ise diğer alt gruplara göre orta şiddette ekspresyon gösterdi (Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.43 ve Şekil 4.47).

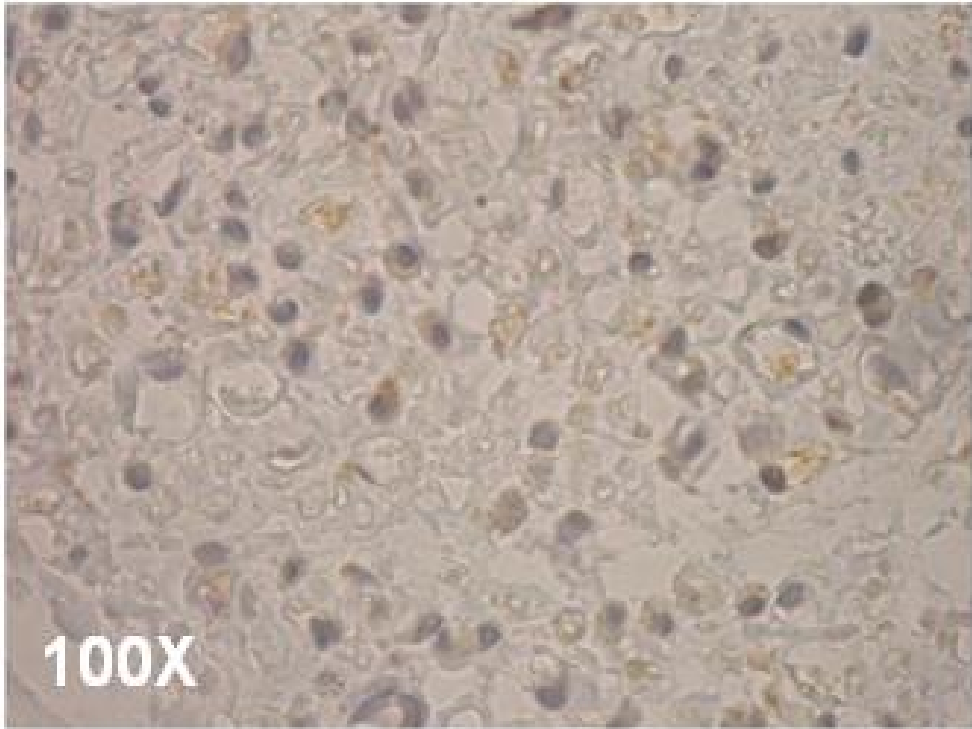
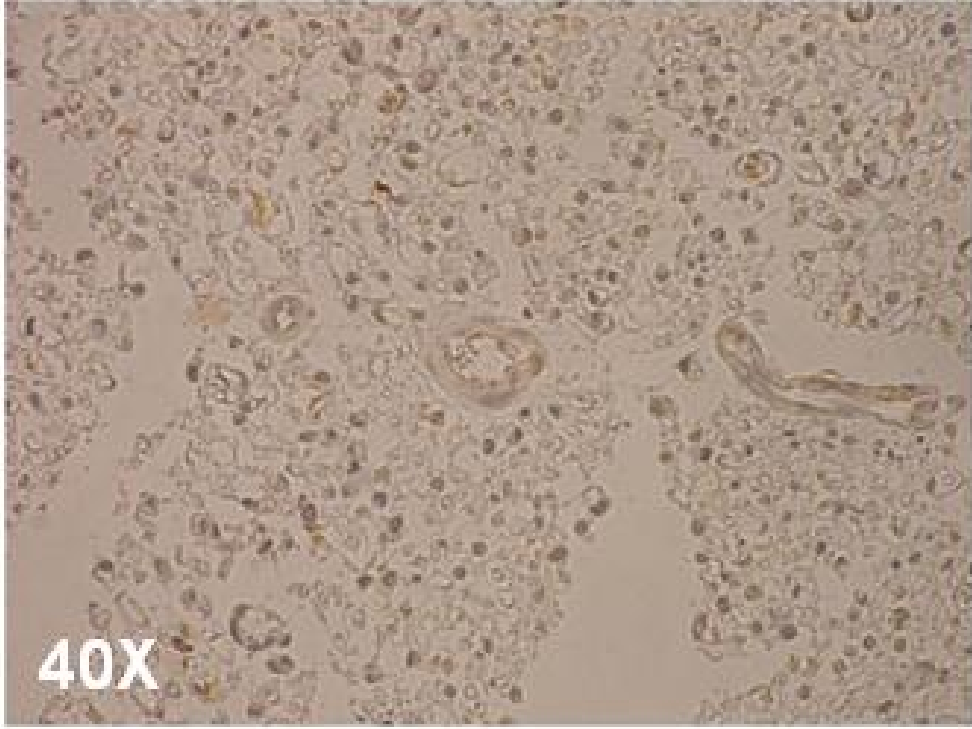
48 saatlik, 14 günlük ve 30 günlük yarı kesi grupları incelendiğinde, en fazla VEGF üretiminin 48 saatlik alt grupta, 14 günlük ve 30 günlük alt grupların ise aynı seviyede ve 48 saatlik alt gruba göre daha az ekspresyon olduğu gözlemlendi (Şekil 4.38 – Şekil 4.47).

VEGF ekspresyonu tam kesi alt gruplarında arasında en yoğun şiddette 48 saatlik alt grupta gözlenirken, en düşük ekspresyon ise 30 günlük alt grupta görülmüştür (Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.45 ve Şekil 4.47).

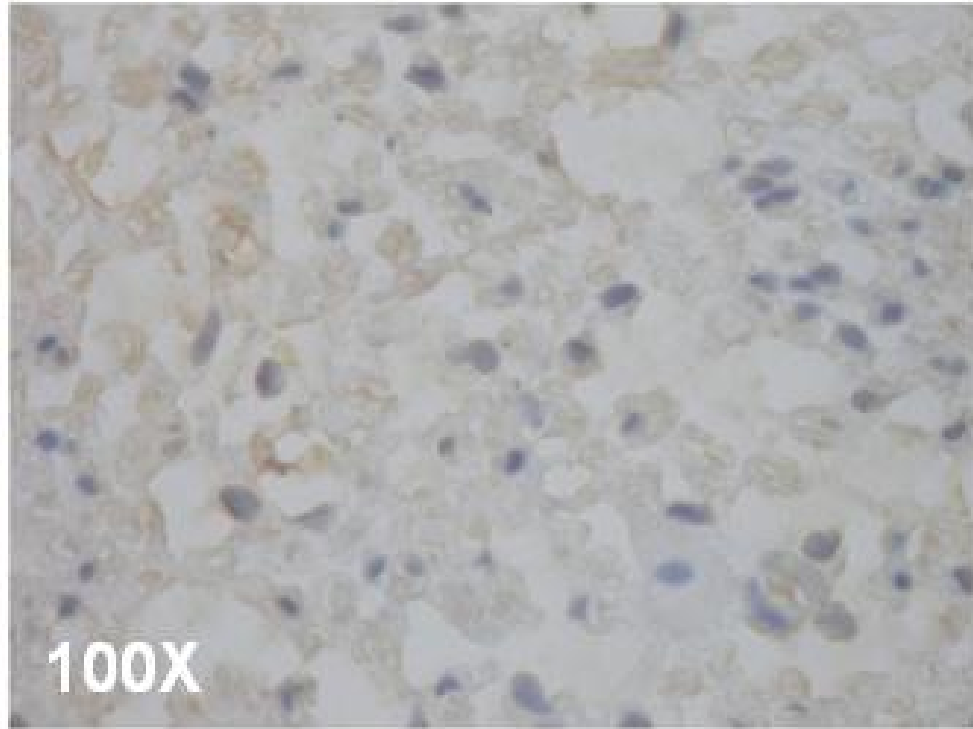
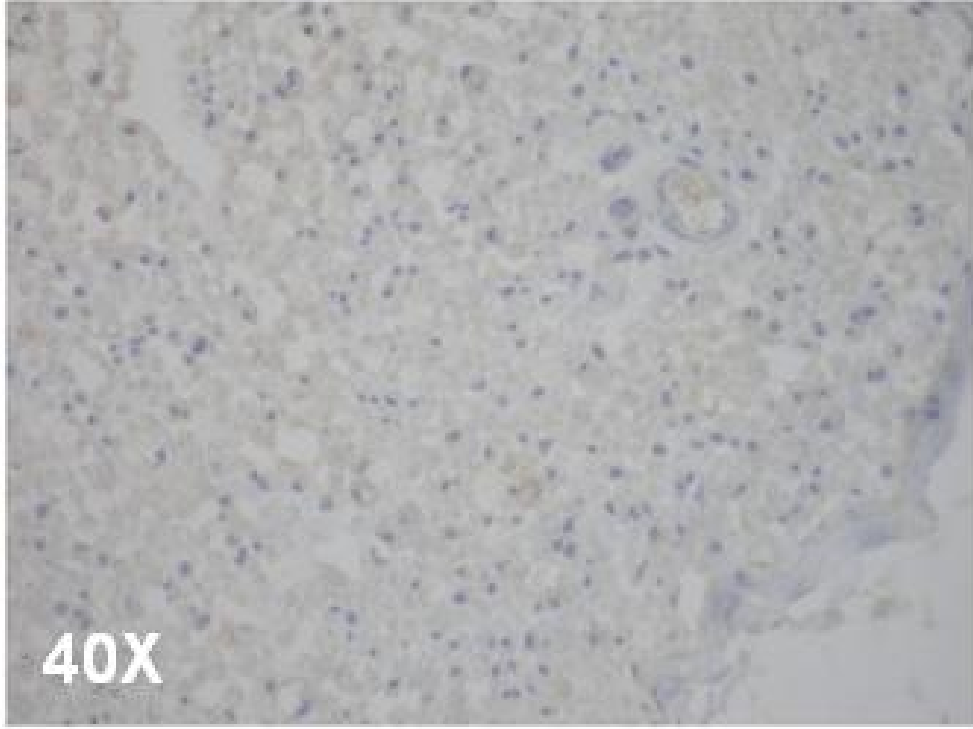
48 saatlik alt gruplar incelendiğinde ise en az VEGF ekspresyonu yarı kesi grubunda iken, en fazla ekspresyon tam kesi grubunda belirlendi. Yarı kesi ve tam kesi gruplarının 14 günlük alt gruplarında VEGF ekspresyonu aynı seviyede olup, ezi 14 günlük alt gruba göre daha düşük düzeyde tespit edildi. 30 günlük alt gruplarda ise en fazla VEGF ekspresyonu ezi grubunda görülürken, en az ekspresyon ise tam kesi 30 günlük alt grubunda görülmüştür.



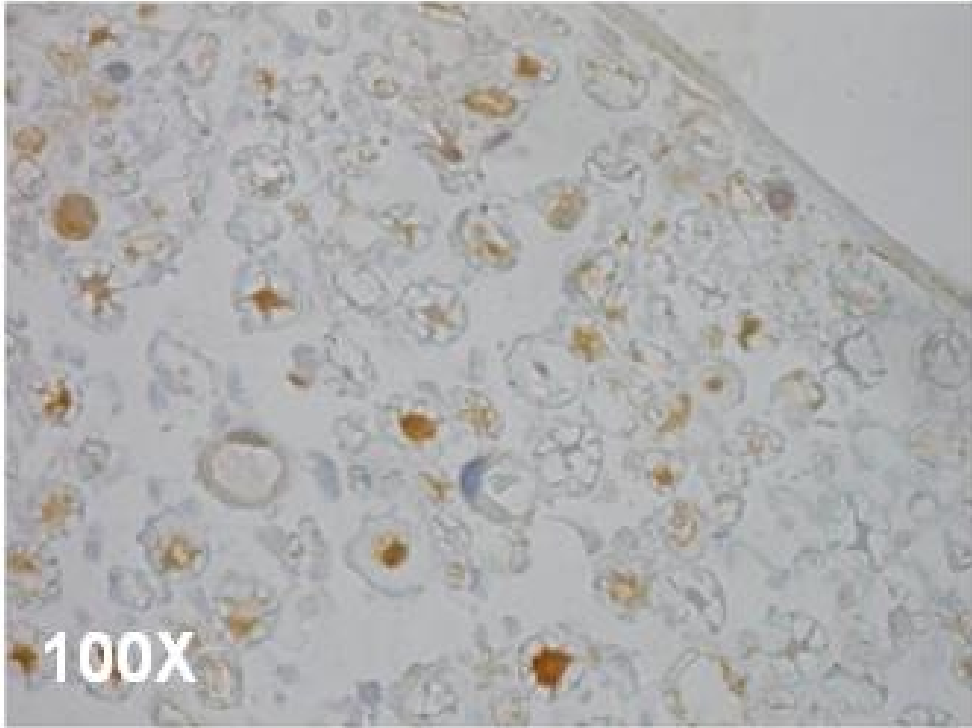
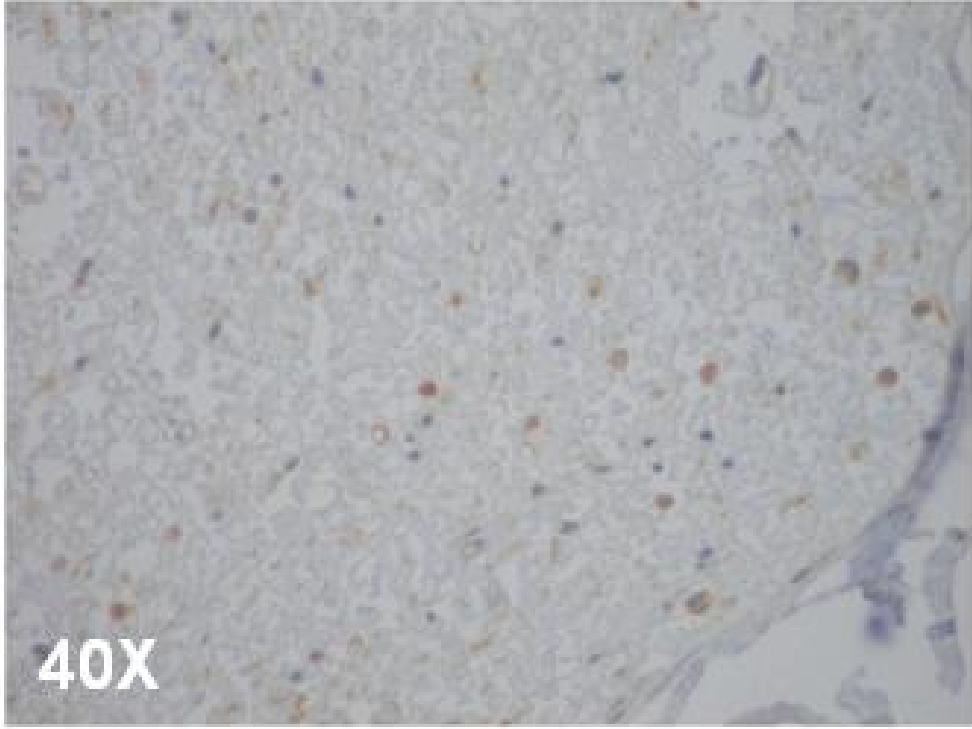
Şekil 4.32. Ezi 48 saatlik grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



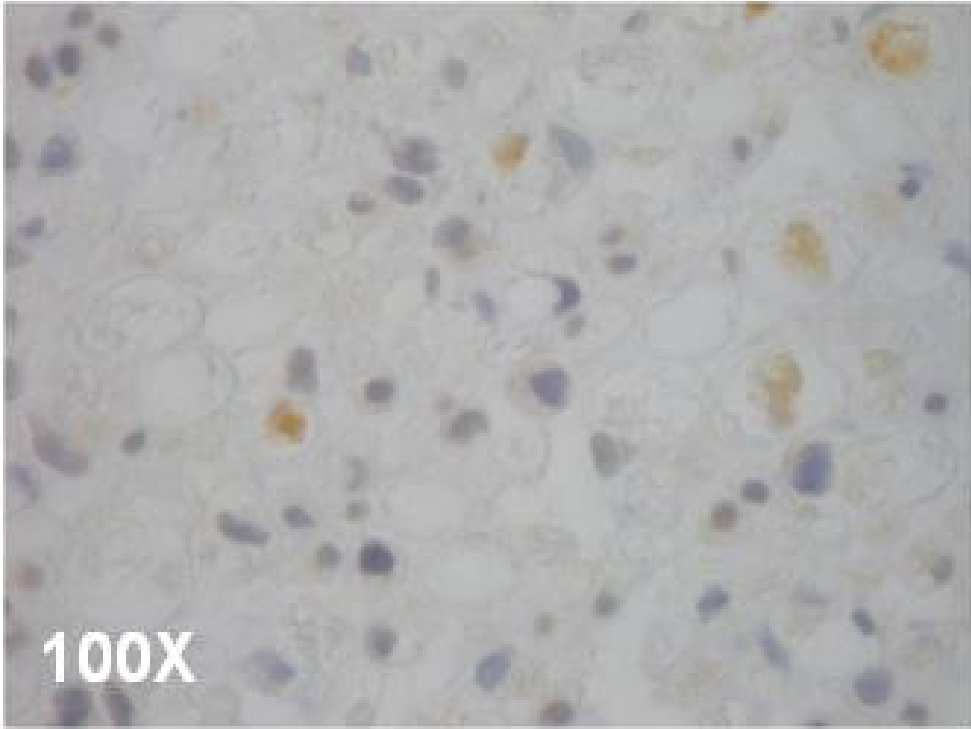
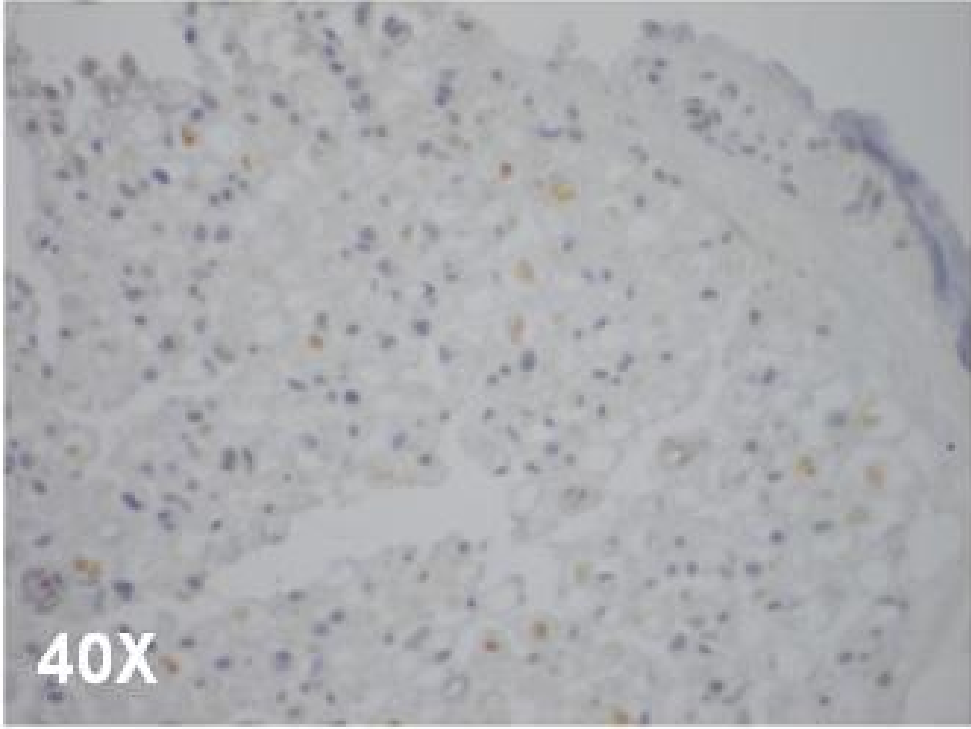
Şekil 4.33. Ezi 14 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



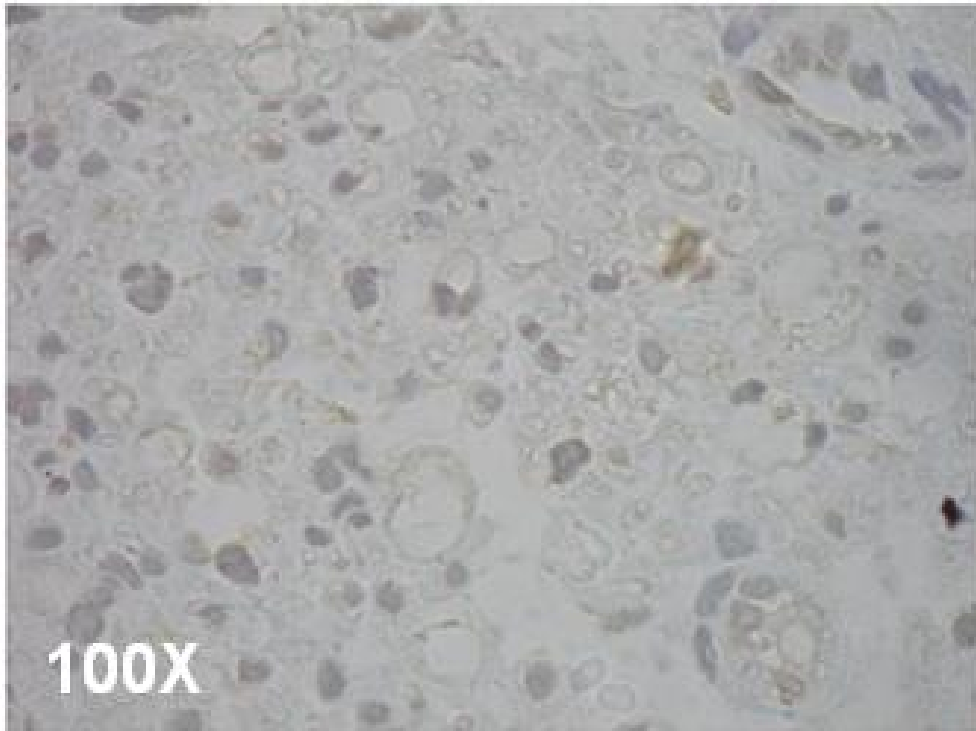
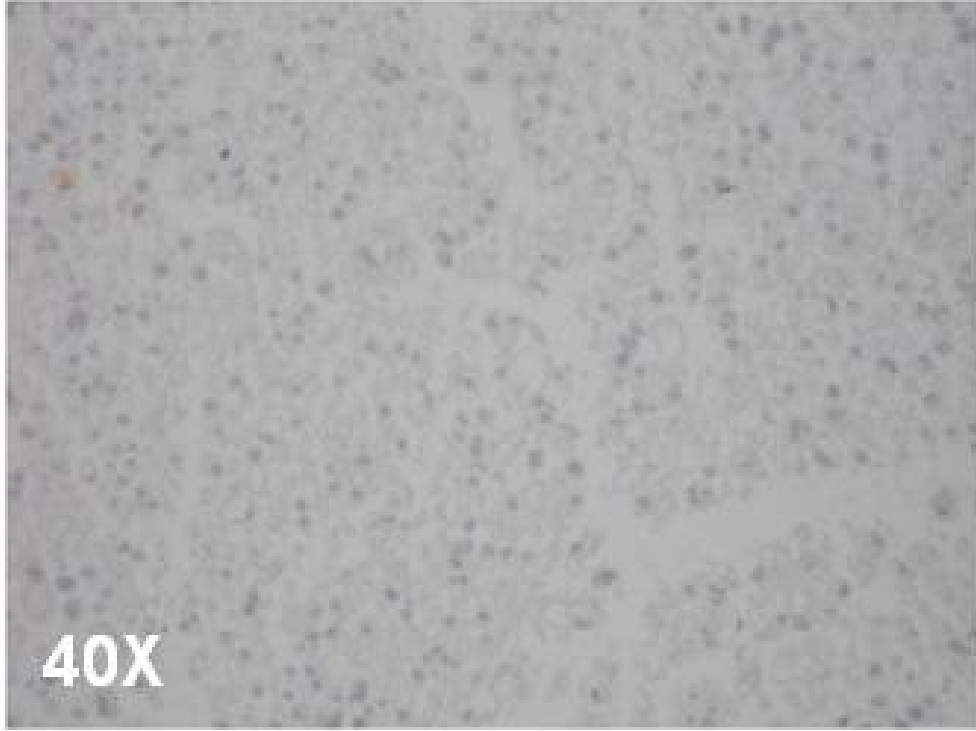
Şekil 4.34. Ezi 30 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



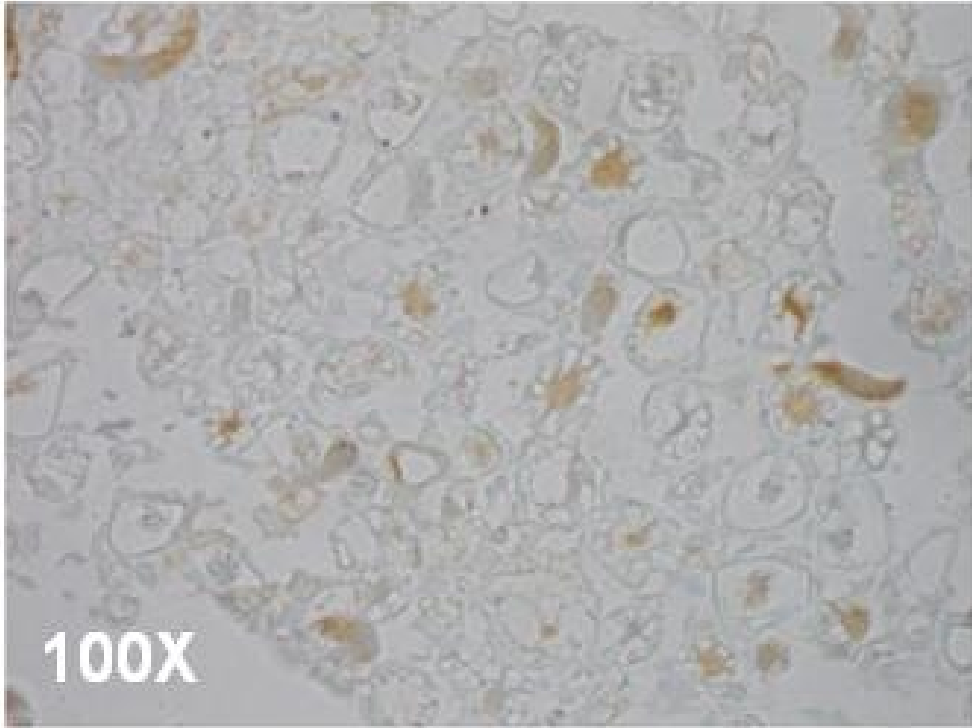
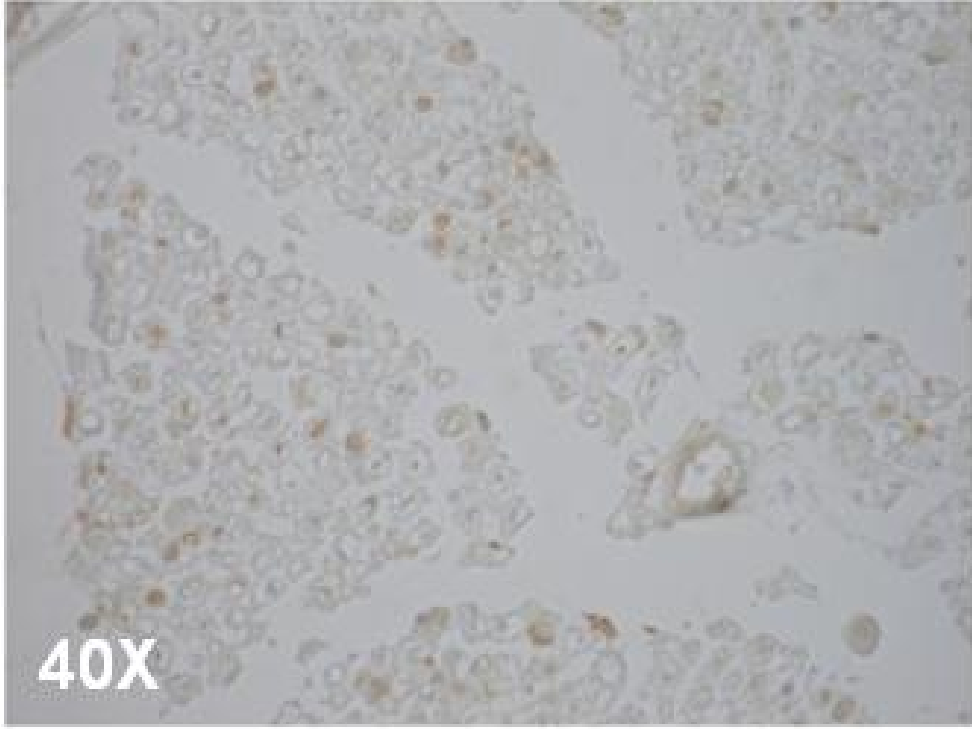
Şekil 4.35. Tam kesi 48 saatlik grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



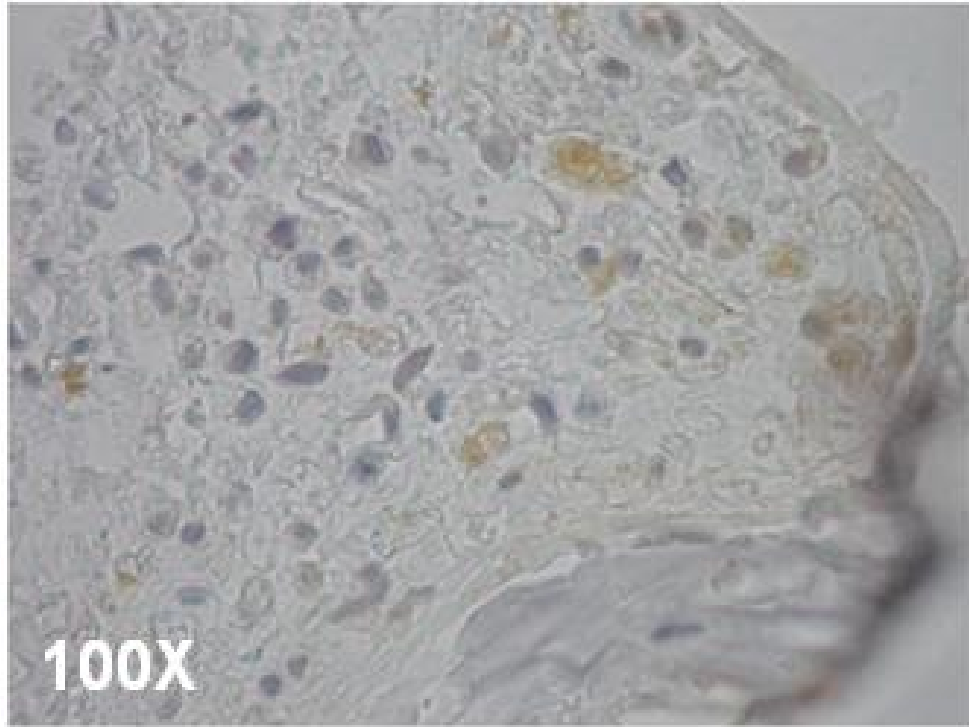
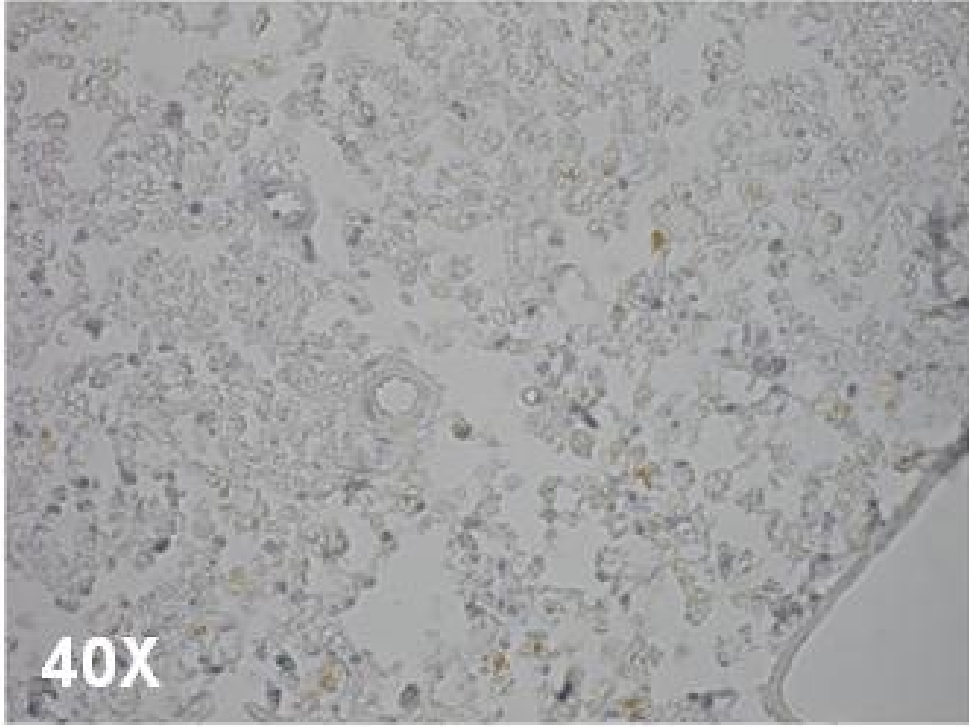
Şekil 4.36. Tam kesi 14 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



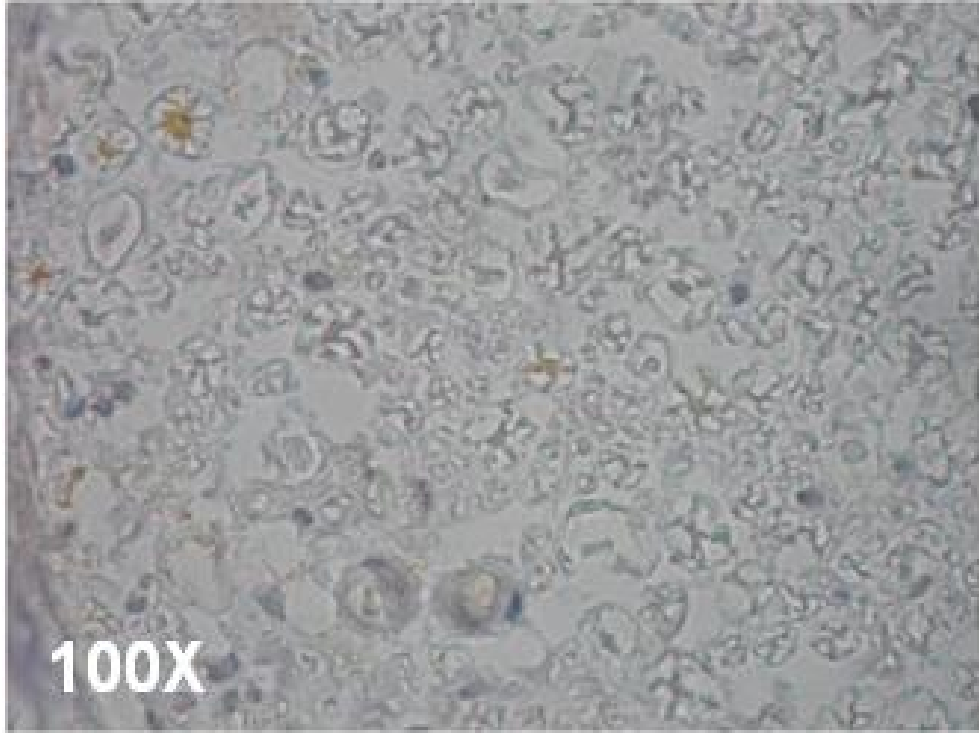
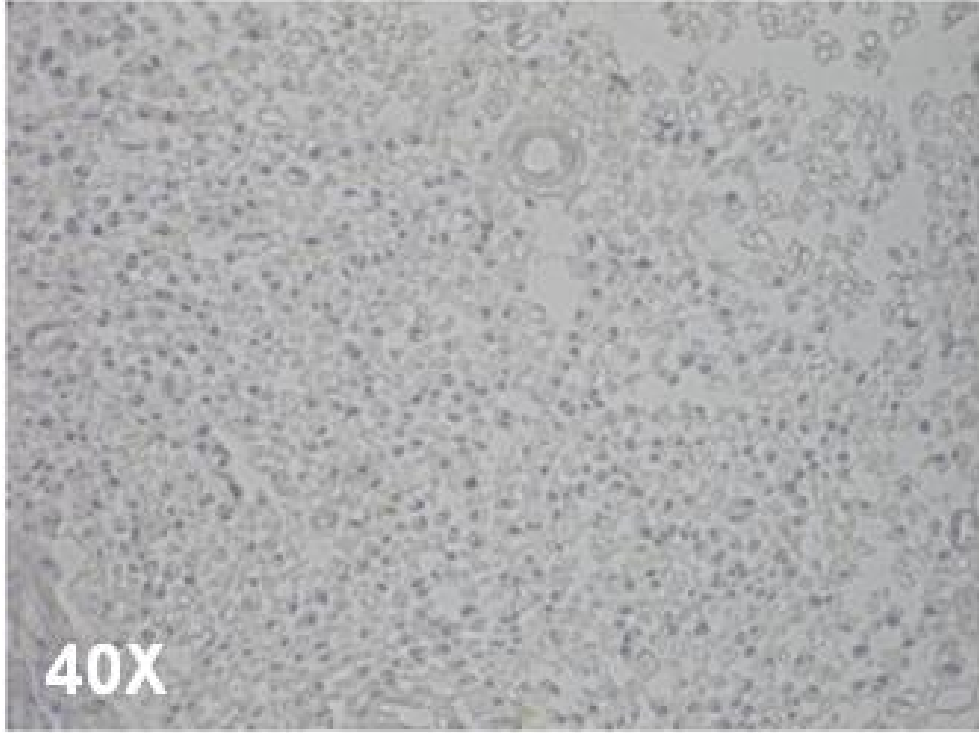
Şekil 4.37. Tam kesi 30 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



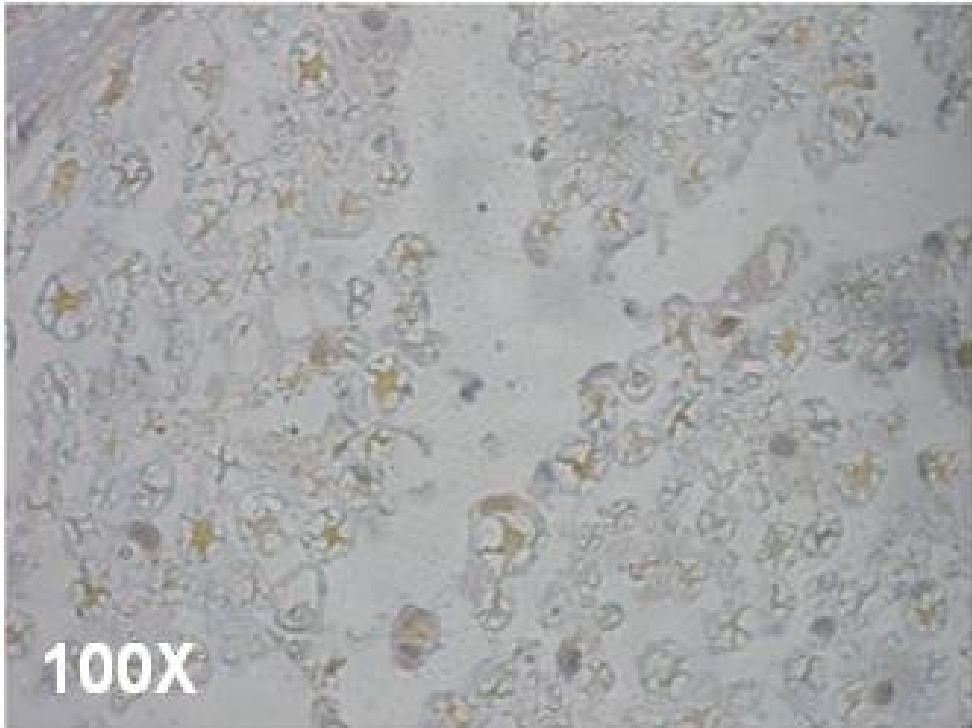
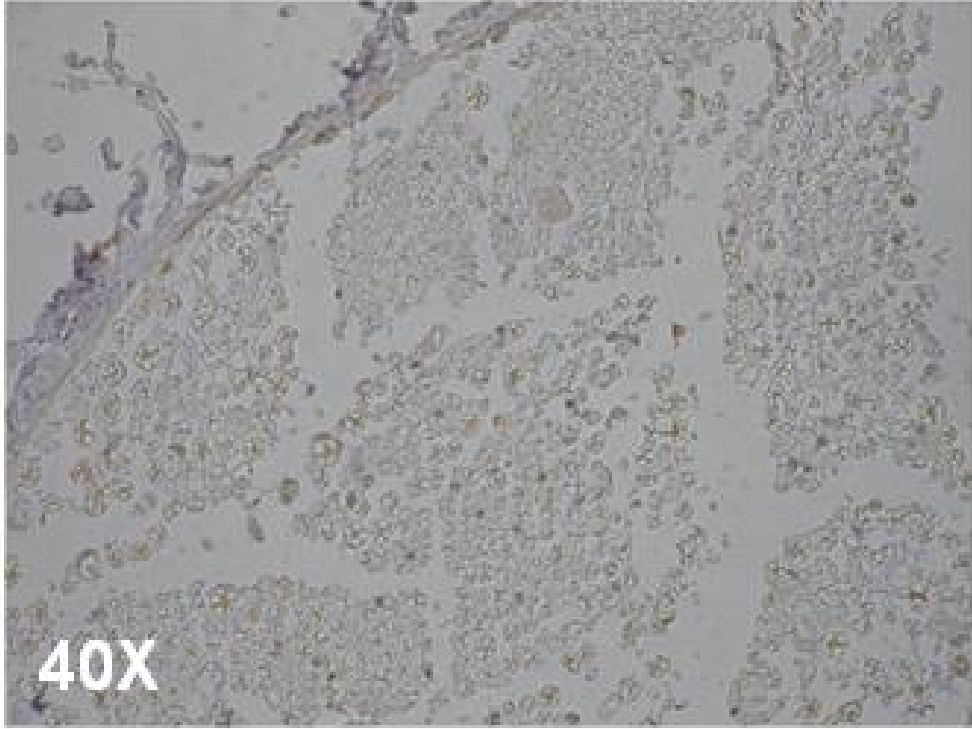
Şekil 4.38. Yarı kesi 48 saatlik grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



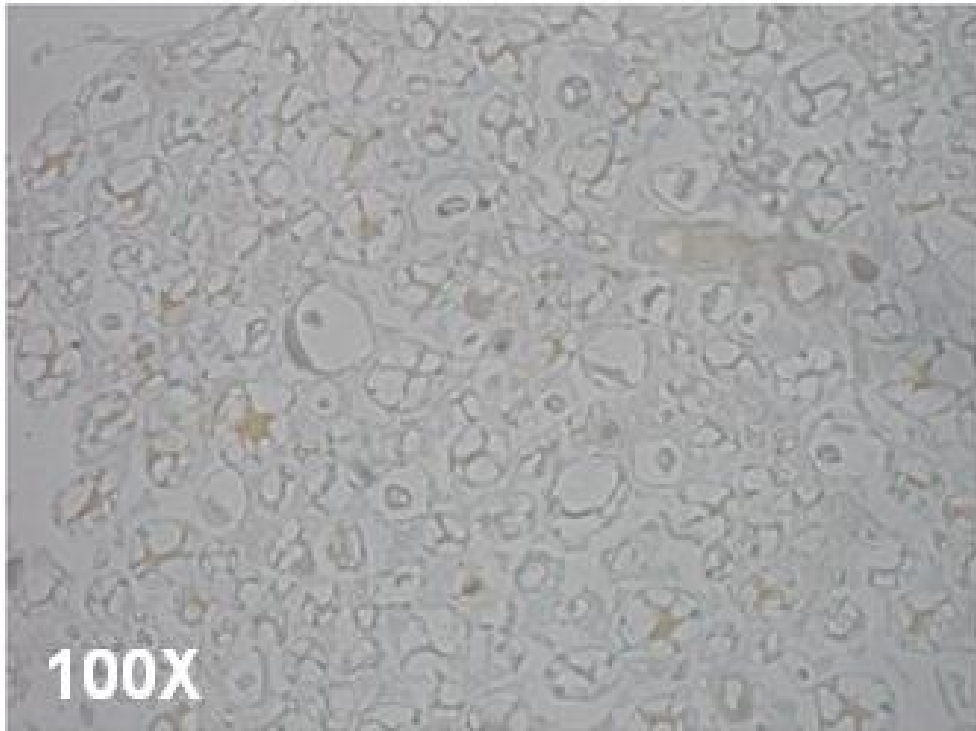
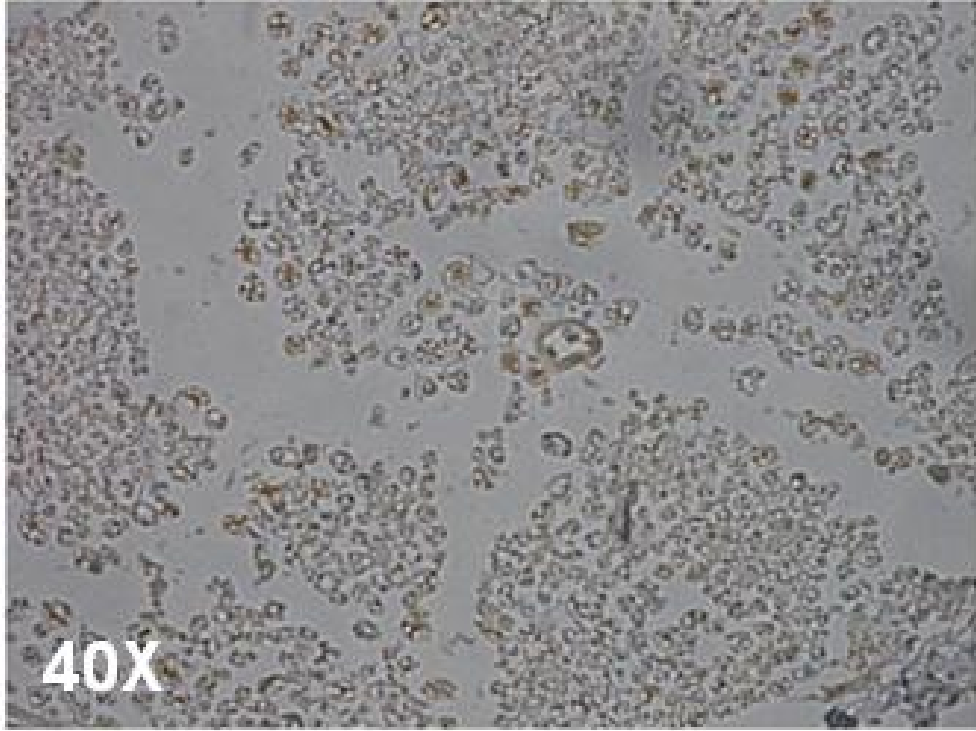
Şekil 4.39. Yarı kesi 14 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



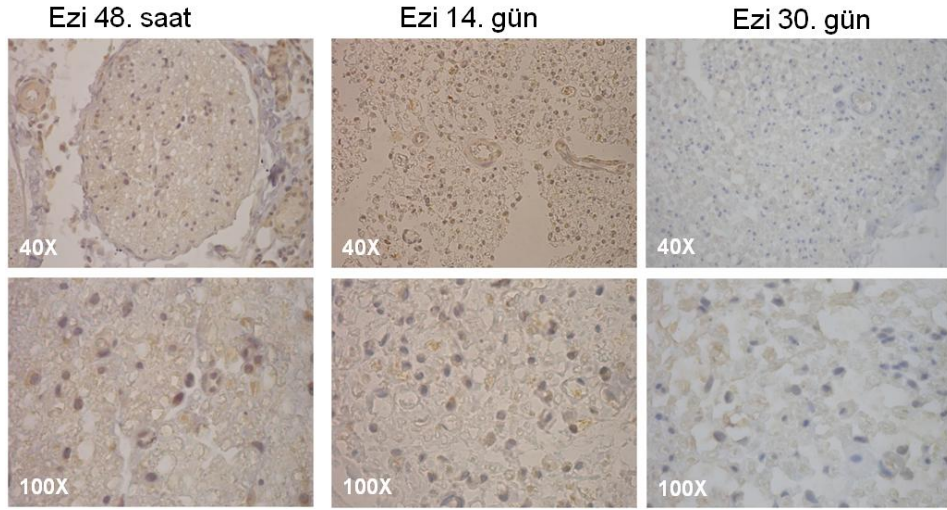
Şekil 4.40. Yarı kesi 30 günlük grubun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



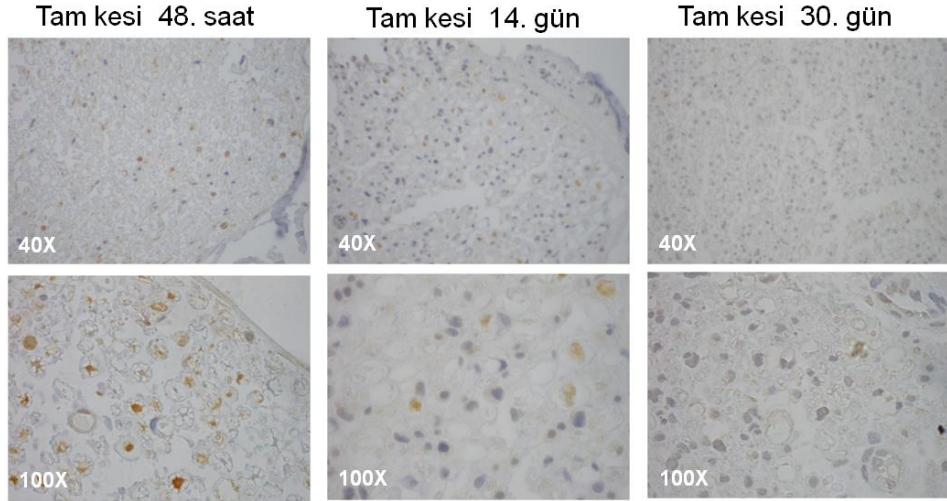
Şekil 4.41. Sham grubunun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



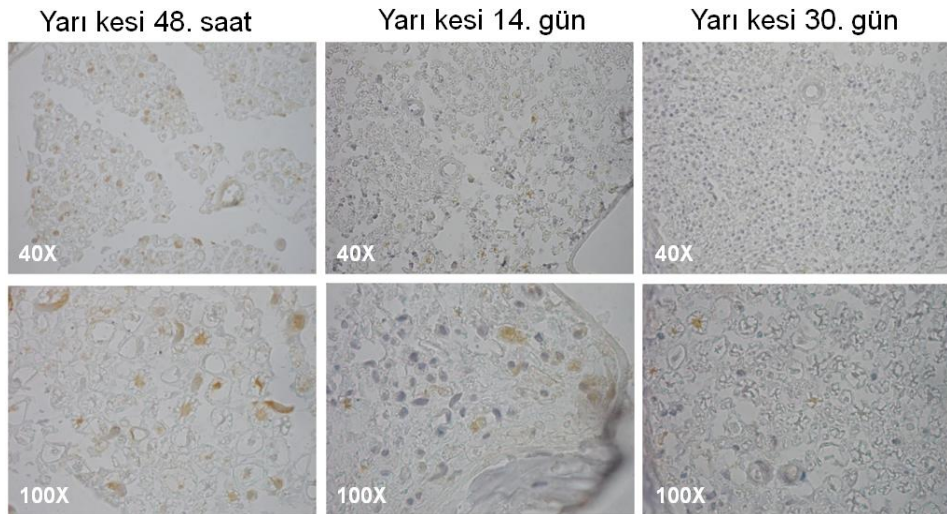
Şekil 4.42. Kontrol grubunun VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



Şekil 4.43.Ezi 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



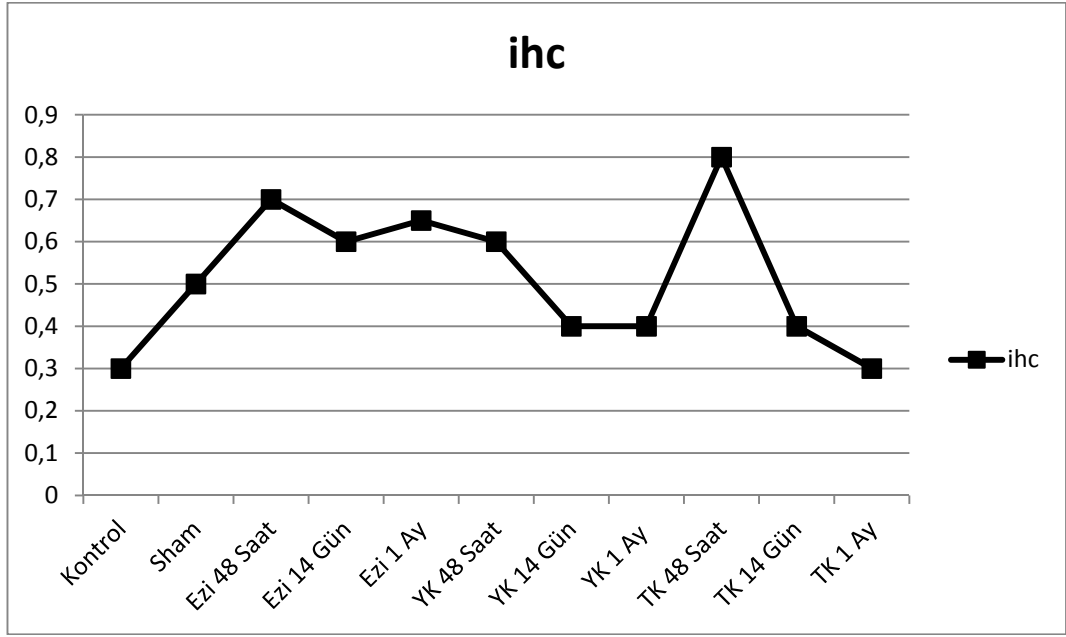
Şekil 4.44.Tam kesi 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



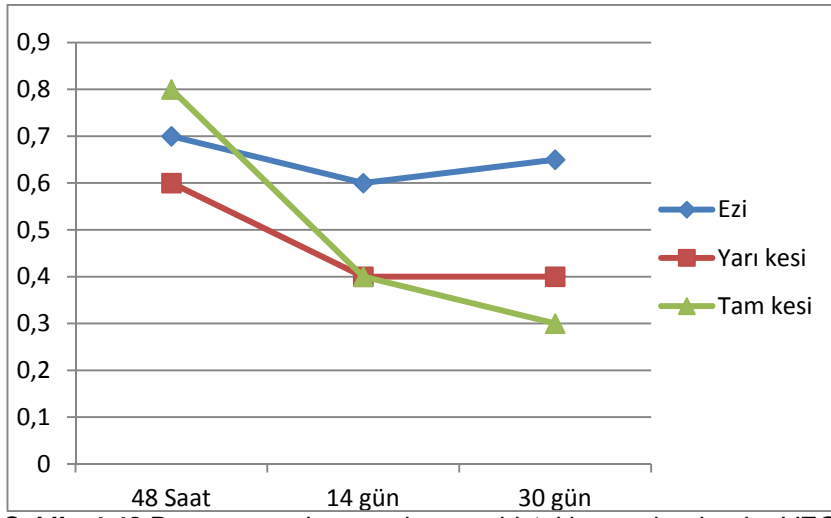
Şekil 4.45.Yarı kesi 48. saat, 14. gün ve 30. gün alt gruplarının VEGF ekspresyonu ve dağılımı.

		40X	100X
Ezi	48. saat		
	14. gün		
	30. gün		
Tam kesi	48. Saat		
	14. gün		
	30. gün		
Yarı kesi	48. saat		
	14. gün		
	30. gün		
Sham			
Kontrol			

Şekil 4.46.Tüm grupların VEGF ekspresyonu ve dağılımı.



Şekil 4.47. Tüm grupların immünohistokimyasal olarak VEGF ekspresyonunun grafiği.



Şekil 4.48. Deney gruplarının immünohistokimyasal olarak VEGF ekspresyonunun karşılaştırılması grafiği.

4.6. Western Blot Değerlendirmesi

Kontrol ve sham gruplarında VEGF ekspresyonlarının aynı düzeyde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.48 ve Şekil 4.49).

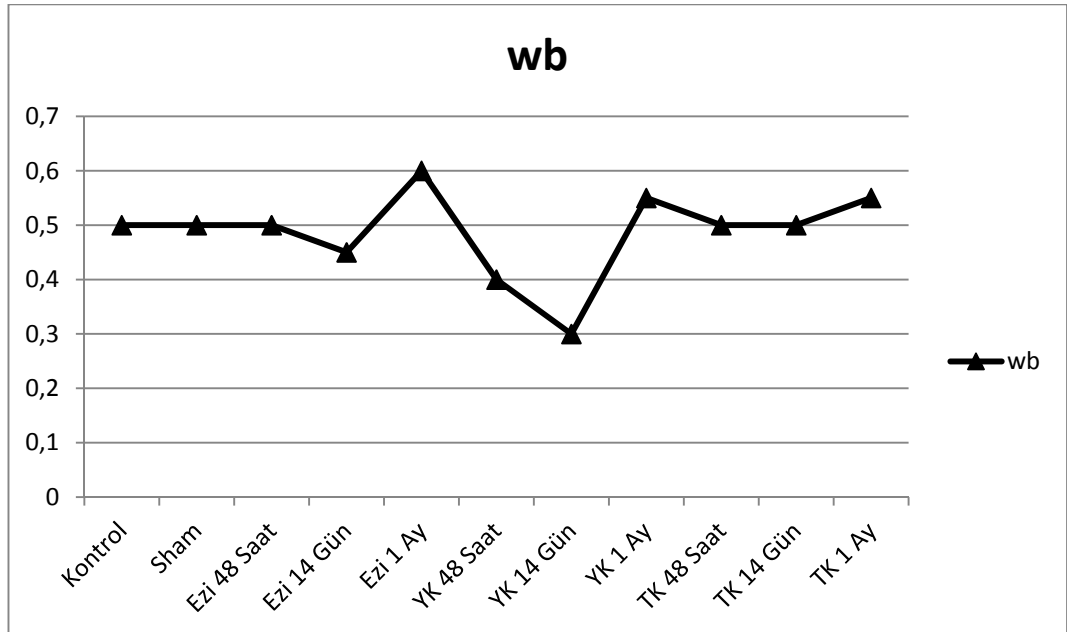
Ezi grubunun alt gruplarını oluşturan 48 saatlik, 14 günlük ve 30 günlük gruplarda VEGF ekspresyonu immünohistokimyasal bulgularla benzerlik göstermektedir. En fazla ekspresyon ezi 30 günlük alt grubunda iken, en az ekspresyon 14 günlük alt gruptadır (Şekil 4.48 ve Şekil 4.49).

Yarı kesi grubunda ise 48 saatlik ve 14 günlük alt grupların western blot değerlendirilmesi immünohistokimyasal sonuçlar ile korele olup. En az VEGF ekspresyonu 14 günlük alt grupta bulunurken, en fazla ekspresyon 30 günlük alt grupta saptanmıştır (Şekil 4.48 ve Şekil 4.49).

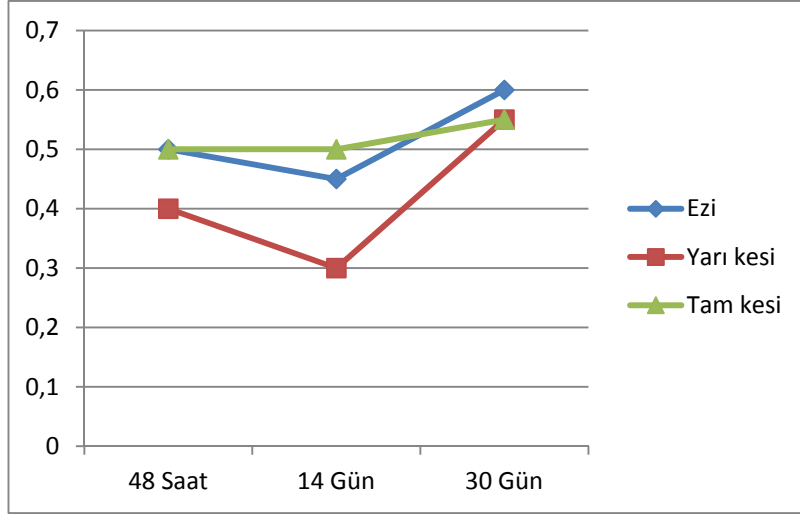
Tam kesi grubunun 48 saatlik ve 14 günlük alt gruplarının VEGF ekspresyon seviyesi aynı olup, 30 günlük tam kesi alt grubundan ise daha düşük düzeyde oldukları görülmüştür (Şekil 4.48 ve Şekil 4.49).



Şekil 4.49. Western blot uygulaması sonrası elde edilen VEGF ve beta actin ekspresyonun bantlarını gösteren film.



Şekil 4.50. Western blot uygulaması sonrası elde edilen VEGF ekspresyon grafiği.



Şekil 4.51.Deney gruplarının Western blot analizine göre VEGF ekspresyonunun karşılaştırılmalı grafiği.

TARTIŞMA

Periferik sinirler olmadan hareket ve his olmaz. Periferik sinir hasarları sık görülen durumlardan biridir. Bu sebeple periferik sinir yaralanmalarının sık görülmesi ekonomik ve sosyal aktivite kaybına neden olur [54]. Sinire yapılan uygun cerrahi onarıma rağmen duyu ve motor fonksiyon zayıflar [54, 55]. Periferik sinir yaralanmaları çok çeşitli tiplerde görülebilir. Bunlardan en sık rastlanılanı da ezici ve kesici tipte yaralanmalardır [56]. Sinir yaralanmalarından sonra tam fonksiyonel iyileşme başarılı sinir onarımı ile mümkündür. Bu da yaralanma süresi ve cerrahi onarım ve arasında geçen süre, cerrahi teknik, çeşitli büyüme faktörleri ve mediatörler, cerrahi sahasında skar dokusu oluşumu gibi birçok faktörler sinirin fonksiyonel iyileşmesine etki eder. Periferik sinirlerin aksonal rejenerasyonunun hızlı olmasına rağmen fonksiyonel iyileşme yavaştır [56]. Zayıf fonksiyonel iyileşme, probleminin rejenerasyon ve onun hedef kasında görülen anatomik ve fizyolojik değişikliklerle direkt olarak bağlı olabileceği vurgulanmıştır.

Sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonunu daha iyi anlamak için çeşitli hasar modelleri kullanılmaktadır. Bunlardan en çok tercih edilenleri ezi ve kesi modelleridir. Birçok periferik sinirde bu modellerde hasarlanma için kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda ezi ve kesi modellerini kullanarak periferik sinir hasar modelleri oluşturduk.

Periferik sinirlerin dejenerasyon ve rejenerasyon süresince siniri ve mikroçevresini etkileyen birçok faktör rol oynamaktadır. Bunlardan bir tanesi de trofik faktörlerdir. Bu trofik faktörler spesifik hücre reseptörlerine etki ederek onların protein sentezi yapması, gelişmesi yada hücreye destek sağlayacak mekanizmalar üzerinde rol alırlar. Sinir sisteminde, sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofinler olarak bilinen büyüme faktörleri ailesine öncülük eder. Nörotrofin en basit tanımıyla, nöronun yaşam gelişme ve protein sentezi gibi farklılaşmış fonksiyonları düzenleyen endojen bir proteindir [57]. Bu nörotrofik faktörlerden bir tanesi de vasküler endotel büyüme faktörüdür (VEGF).

VEGF anjiyogenezdeki rolüyle bilinse de periferik sinirler üzerinde de etkisi vardır [21]. VEGF küçük ganglia nöronlarından sentezlenmektedir ve reseptörü olan flk-1 sensorial ganglia nöronlarında ve Schwann hücresi gibi büyüme konisinde bulunur. VEGF'in sensorial nöron kültürlerinde akson gelişmesini stimüle ettiği ve nöronların ve satellit hücrelerin hayatta kalmasında etkin olduğu bulunmuştur [17]. VEGF ayrıca Schwann hücre proliferasyonunu da indükler. VEGF'in bu özelliklerinden dolayı periferik sinir yaralanmalarında akson ve damar gelişimi üzerine etkili olabileceğine dair çalışmalar yapılmaktadır.

Periferik sinirler son derece iyi gelişmiş damarsal yapıya sahiptirler. Bu damarlar sinirlere oksijen desteği sağlayarak, hücre devamlılığının sürdürülmesi için gerekli olan enerjiyi ve impuls iletiminde gerekli olan membran potansiyelinin onarımını ve devamlılığını sağlamaktadırlar. Uzun süreli anoksi veya kronik hipoksi irreversibl hasara yol açabilir [58]

Bu literatür bilgisine dayanarak bizde çalışmamızda periferik sinir hasar modeli olarak ezi ve kesi tipi hasar modellerini, denek olarakda temini, bakımı, çalışılması kolay olması sebebiyle dişi sıçanları kullandık. Periferik sinir olarak sinire ulaşım açısından ve operasyonun operasyonun rahatlığı açısından ve literatürde sık kullanılan bir periferik sinir olması dolayısıyla siyatik siniri tercih ettik.

Siyatik sinir hasarı sonrası deneklerin kendi ayaklarını kemirme davranışına otofaji adı verilir [9]. Otofaji tırnaklarla başlayıp, falanks ve parmaklar kadar ilerleyebilir. Biz de bazı deneklerimizde otofaji davranışını gözlemledik.

Morfolojik olarak tüm gruplarda 48 saatlik alt grubunda damarlanmada artış görülürken, yarı kesi grubunda sadece kesilen tarafta artış görülmüştür. Ayrıca benzer durum skar dokusu için de geçerlidir. Bu sonuç yarı kesi grubunda sinirin diğer yarısını sağlam olmasının dolayı şaşırtıcı değildir. Tüm gruplarda 14 günlük süreçte skar dokusunun kaybolmadığı gözlenmiştir. Periferik sinirler hasarı kompanse edebilecek bir damar ağına sahiptir, fakat Castaigne ve ark. damarlanmanın az olduğu periferik sinir bölgelerinin zedelenmeye daha duyarlı olduğunu bildirmiştir [59]. Sarıkcıoğlu ve ark. ise siniri besleyen damarların kaldırmasının sinir hasarına yol açtığını belirtmişlerdir [13]. Bizde benzer şekilde sinir bütünlüğünün bozulmadığı ezi grubunda yaniden damarlanmaya birlikte skar dokusundaki azalma, sinirin bütünlüğünün bozulduğu tam kesi grubunda daha az olduğunu tespit ettik.

Elektron mikroskopik incelemede tüm grupların 48 saatlik 14 gruplarında dejenerasyonun başlangını gösteren, myelin lif şişmeleri ve ayrılmaları, makrofa infiltrasyonu ve Schwann hücresi artışını gördük. 14 günlük alt grup ise dejenerasyonun ilerlemesimne paralel yoğun bağ dokusu artışı, myelinli ve çok sayıda myelinsiz sinir lifler, myelin residüleri, vokuol artışı ve fagositik aktivitede artış gözlemledik. 30 günlük alt gruplarda ise aynı anda hem myelinli hem de myelinsiz sinir liflerini gözlemledik. Rejenere liflerle birlikte az miktarda da olsa myelin rezidülerini gözlemledik. Yarı grubunda ise dejenerasyonun, sinirin yarısının harabiyeti sebebiyle fasiküler tipte olduğunu gördük. Bazı fasiküller sağlam iken, bazı fasiküller dejenere halde tespit edildi. Powell ve ark ise Schwann hücrelerini hasar sonrası birinci haftada tespit etmişlerdir [60].

İmmünohistokimyasal olarak VEGF ekspresyonu en fazla tam kesi 48 saatlik grupta görülmekte iken, en az tam kesi 30 günlük grupta

görülmüştür. Tüm gruplar kendi içerisinde en fazla ekspresyonu 48 saatlik grupta göstermiş, 14 günlük ve 30 günlük alt gruplarda bu ekspresyon seviye düşmüştür. Höke ve ark ise tam tersi olarak VEGF ekspresyonun 48. Satte azaldığını 14. günde en üst seviyeye çıktığını belirtmiştir [49]. Yarı kesi grubunda ise VEGF ekspresyonu diğer gruplara göre hada düşük düzeydedir. Bunu sebebini sinirin diğer yarısının sağlam olmasına bağlamaktayız.

Western blot analizinde ise VEGF ekspresyonu en fazla ezi 30 günlük alt grupta, en az ise yarı kesi 14 günlük grupta görülmüştür. Tüm gruplar kendi arasında incelendiğinde Höke ve ark. [49] tersine en az ekspresyon 14 günlük alt gruplarda en fazla ekspresyon ise 30 günlük alt guruplarda tespit edilmiştir. Pola ve ark. ise hasar sonrası ilk haftada VEGF ekspresyonunun yaşla farelerde genç fareler göre daha az olduğunu tespit etmiştir [61]. Yine western blot analizinde immünohistokimyasal sonuçlara paralel olarak en az ekspresyon seviyei yarı kesi grubunda görülmüştür. En fazla ekspresyon ise tam kesi grubundadır.

İslamov ve akr. yaptıkları çalışmada VEGF ve reseptörlerinin ekspresyon seviyelerine medulla spinaliste bakmışlardır [62]. Bu VEGF'in kaynağı yönünden önemlidir. VEGF ekspresyonu immünohistokimyasal olarak en fazla tam kesi 48 saatlik grupta görülmesine karşın, western blot ezi 30 günlük grupta ekspresyon fazladır. Bunun sebebinin, immünohistokimyasal analizde aksondaki ekspresyon göz önüne alınırken, western blot analizinde değer içerisinde bağ dokusundan ve damarlardan gelen VEGF'in etkisi olduğunu düşünüyoruz. Bunun için VEGF ekspresyonu ile birlikte reseptörlerinin değerlendirilmesinin daha, VEGF'in sinir rejenerasyonundaki etkisinin daha da iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

SONUÇLAR

1) Siyatik sinirin ezi, kesi ve yarı kesi modellerinde yürüme patern analizi sonuçlarına göre yarı kesi grubunun 14 günlük ve 30 günlük alt gruplarıyla, ezi grubunun 30 günlük alt grubunda siyatik fonksiyon indeksinde -50 değerini geçmesi sebebiyle daha iyi bir rejenersayon olduğunu düşünüyoruz. Pinch test sonuçlarına göre yarı kesi grubunun tüm alt gruplarında tam geri çekme refleksi gösteren denekeler operasyon sonrası ilk günden itibaren görüldü.

2) Morfolojik olarak tüm grupların 48. saatlik alt gruplarında, hasar bölgesinde yeniden damarlanmada artış ve belirgin skar dokusu ve ödem görüldü. Yarı kesi grubunda ise damarlanma özellikle hasarın yapıldığı sinir yarısında diğer yarıya oranla daha fazla olduğu tespit edildi.

3) Elektron mikroskopik olarak tüm grupların 48 saatlik alt gruplarında dejenerasyonun başlangıcı ultrastrüktürel olarak gözlemlendi. 30 günlük alt gruplarda ise rejenerasyonla birlikte aynı anda hem myelinli hem de myelinsiz sinir lifleri görülürken, bazı alanlarda myelin rezidülerine rastlanılmasının rejenerasyonun hala devam ettiğinin işareti olduğunu düşünüyoruz. Yarı kesi modelinde dejenerasyonun ve rejenerasyonun fasiküler olmasını uygulanan hasar modeli tipinden kaynaklandığı düşünmekteyiz.

4) İmmünohistokimyasal olarak en fazla VEGF ekspresyonu tam kesi 48 saatlik alt grupta görülürken en az VEGF ekspresyonu tam kesi 30 günlük alt grupta görüldü.

5) Western blot analizinde ise en fazla VEGF ekspresyonun ezi 30 günlük alt grupta, en az VEGF ekspresyonunu yarı kesi 14 günlük alt grupta tespit ettik.

6) Elde ettiğimiz morfolojik, ultrastrüktürel ve moleküler sonuçlardan üç hasar modeli arasında tam kesi modelinin en ağır hasarı oluşturduğunu, ezi modelinde sinirin bütünlüğü bozulmadığı için daha az katastrofik olduğunu; en az hasarın ise yarı kesi modelinde oluştuğunu düşünüyoruz.

7) Bu bulgular ışığında yeniden damarlanmanın hasarlanma sonrası arttığını ve uygulanan hasar modeline göre damarlanmada ve VEGF ekspresyonunda farklılık olduğunu düşünüyoruz.

8) VEGF'in reseptörlerinin ekspresyonunu gösteren çalışmaların yapılmasının sinir hasarında VEGF ekspresyon sürecini daha iyi anlamamızı sağlayacağını düşünüyoruz.

9) Ayrıca arka kök gangliyonunda ve medulla spinalisin segmentlerinde, özellikle de L4-5 segmentlerde VEGF ekspresyonunun araştırılmasının üretilen VEGF ile hasar bölgesinde tespit edilen VEGF ekspresyonlarının karşılaştırılmasında etkili ve böylece VEGF'in periferik sinir hasarı üzerinde olan etkisinin anlaşılmasına ışık tutacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Wang LX, Wang ZJ (2003) Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev.* 55:949-65.
2. Zhang M, Yannas IV (2005) Peripheral nerve regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 94:67-89.
3. Decosterd I, Allchorne A, Woolf CJ (2002) Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non-noxious mechanical stimulus-induced neuropathic pain. *Pain.* 100:155-62.
4. Devor M, Schonfeld D, Seltzer Z, Wall PD (1979) Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J Comp Neurol.* 185:211-20.
5. Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 50:355-63.
6. Sarikcioglu L, Ozkan O (2003) Yasargil-Phynox aneurysm clip: a simple and reliable device for making a peripheral nerve injury. *Int J Neurosci.* 113:455-64.
7. Sarikcioglu L, Yaba A, Tanriover G, Demirtop A, Demir N, Ozkan O (2007) Effect of severe crush injury on axonal regeneration: a functional and ultrastructural study. *J Reconstr Microsurg.* 23:143-9.
8. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.* 43:205-18.
9. Wall PD, Devor M, Inbal R, et al. (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain.* 7:103-11.
10. DeLeo JA, Coombs DW, Willenbring S, et al. (1994) Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain.* 56:9-16.
11. DeLeo JA, Yeziarski RP (2001) The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain.* 90:1-6.
12. Shimoyama M, Tanaka K, Hasue F, Shimoyama N (2002) A mouse model of neuropathic cancer pain. *Pain.* 99:167-74.
13. Sarikcioglu L, Demirel BM, Demir N, Yildirim FB, Demirtop A, Oguz N (2008) Morphological and ultrastructural analysis of the watershed zones after stripping of the vasa nervorum. *Int J Neurosci.* 118:1145-55.
14. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 219:983-5.
15. Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9:653-60.

16. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P (2004) VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*. 26:943-54.
17. Sondell M, Lundborg G, Kanje M (1999) Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci*. 19:5731-40.
18. Hobson MI, Green CJ, Terenghi G (2000) VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat*. 197 Pt 4:591-605.
19. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, et al. (2009) Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 87:27-46.
20. Çelebi G (1984) *Sinir, Kas ve Sinaps*. İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası.
21. Zochodne DW (2008) *Neurobiology of peripheral nerve regeneration*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press, viii, 276 p., 32 p. of plates.
22. Asato F, Butler M, Blomberg H, Gordh T (2000) Variation in rat sciatic nerve anatomy: implications for a rat model of neuropathic pain. *J Peripher Nerv Syst*. 5:19-21.
23. Greene CE (1968) *The anatomy of the rat*. New York: Hafner Publishing Company, 127-33.
24. Lundborg G, Dahlin LB (1992) The pathophysiology of nerve compression. *Hand Clin*. 8:215-27.
25. Lundborg G, Dahlin LB (1996) Anatomy, function, and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression. *Hand Clin*. 12:185-93.
26. Mackinnon SE, Dellon AL (1998) *Surgery of the peripheral nerve*. New York.
27. Avcı G, Akan M, Yıldırım S, Aköz T (2002) Sinir Onarımı ve Greftleme. *T Klin Tıp Bilimleri*. 22:428-37.
28. Stoll G, Muller HW (1999) Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*. 9:313-25.
29. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks H (1999) *Ganong's Review of Medical Physiology*. 23rd ed. New York: McGraw-Hill Medical, 56.
30. Seckel BR (1990) Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 13:785-800.
31. Manthorpe M, Skaper SD, Williams LR, Varon S (1986) Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neurotrophic factor. *Brain Res*. 367:282-6.
32. Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J, Madison R (1989) Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg*. 83:1013-9; discussion 20-1.
33. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 161:851-8.

34. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 407:242-8.
35. Ferrara N (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 280:C1358-66.
36. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 359:843-5.
37. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:11946-50.
38. Fabel K, Tam B, Kaufer D, et al. (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 18:2803-12.
39. Silverman WF, Krum JM, Mani N, Rosenstein JM (1999) Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience*. 90:1529-41.
40. Krum JM, Mani N, Rosenstein JM (2002) Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience*. 110:589-604.
41. Krum JM, Khaibullina A (2003) Inhibition of endogenous VEGF impedes revascularization and astroglial proliferation: roles for VEGF in brain repair. *Exp Neurol*. 181:241-57.
42. Schratzberger P, Schratzberger G, Silver M, et al. (2000) Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med*. 6:405-13.
43. Hayashi T, Abe K, Suzuki H, Itoyama Y (1997) Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 28:2039-44.
44. Plate KH, Beck H, Danner S, Allegrini PR, Wiessner C (1999) Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J Neuropathol Exp Neurol*. 58:654-66.
45. Beck H, Acker T, Puschel AW, Fujisawa H, Carmeliet P, Plate KH (2002) Cell type-specific expression of neuropilins in an MCA-occlusion model in mice suggests a potential role in post-ischemic brain remodeling. *J Neuropathol Exp Neurol*. 61:339-50.
46. Lennmyr F, Ata KA, Funa K, Olsson Y, Terent A (1998) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol*. 57:874-82.
47. Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, et al. (2002) Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 22:379-92.
48. Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 5:146-56.

49. Hoke A, Sun HS, Gordon T, Zochodne DW (2001) Do denervated peripheral nerve trunks become ischemic? The impact of chronic denervation on vasa nervorum. *Exp Neurol*. 172:398-406.
50. Podhajsky RJ, Myers RR (1993) The vascular response to nerve crush: relationship to Wallerian degeneration and regeneration. *Brain Res*. 623:117-23.
51. Podhajsky RJ, Myers RR (1994) The vascular response to nerve transection: neovascularization in the silicone nerve regeneration chamber. *Brain Res*. 662:88-94.
52. De Koning P, Brakkee JH, Gispen WH (1986) Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function. Beneficial effects of melanocortins. *J Neurol Sci*. 74:237-46.
53. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA (1989) Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 83:129-38.
54. Dagum AB (1998) Peripheral nerve regeneration, repair, and grafting. *J Hand Ther*. 11:111-7.
55. Glickman LT, Mackinnon SE (1990) Sensory recovery following digital replantation. *Microsurgery*. 11:236-42.
56. Fricker B, Muller A, Rene F (2008) Evaluation tools and animal models of peripheral neuropathies. *Neurodegener Dis*. 5:72-108.
57. Loughlin SE, Fallon JH (1993) Neurotrophic factors. San Diego: Academic Press, xxi, 607 p.
58. Terzis JK, Smith KL (1990) *The Peripheral Nerve Structure, Function and Reconstruction*. New York: Raven Press, 15-8.
59. Castaigne P, Brunet P, Hauw JJ, Leger JM, Gherardi R, Guillevin L (1984) [Peripheral nervous system and panarteritis nodosa. Review of 27 cases]. *Rev Neurol (Paris)*. 140:343-52.
60. Powell HC, Myers RR, Lampert PW (1982) Changes in Schwann cells and vessels in lead neuropathy. *Am J Pathol*. 109:193-205.
61. Pola R, Aprahamian TR, Bosch-Marce M, et al. (2004) Age-dependent VEGF expression and intraneural neovascularization during regeneration of peripheral nerves. *Neurobiol Aging*. 25:1361-8.
62. Islamov RR, Chintalgattu V, Pak ES, Katwa LC, Murashov AK (2004) Induction of VEGF and its Flt-1 receptor after sciatic nerve crush injury. *Neuroreport*. 15:2117-21.

ÖZGEÇMİŞ

Bahadır Murat Demirel 17.02.1980 tarihinde İzmit'te doğdu. İlköğrenimini Kütahya Atatürk ilköğretim okulunda, orta ve lise öğrenimini ise Kütahya Ali Güral Anadolu Lisesi'nde 1998 yılında tamamladı. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden lisans derecesi ise 2002 yılında mezun oldu. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamlayıp, 2006 yılında aynı bölümde doktora başladı. 2002 yılından beri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda araştıma görevlisi olarak çalışmaktadır.

EKLER



The hypoglossal–facial nerve repair as a method to improve recovery of motor function after facial nerve injury

Umut Ozsoy^a, Arzu Hizay^a, Bahadir Murat Demirel^a, Ozlem Ozsoy^b, Sureyya Bilmen Sarikcioglu^c, Murat Turhan^d, Levent Sarikcioglu^{a,*}

^a Department of Anatomy, Akdeniz University Faculty of Medicine, 07070 Antalya, Turkey

^b Department of Physiology, Akdeniz University Faculty of Medicine, 07070 Antalya, Turkey

^c Department of Biochemistry, Akdeniz University Vocational School of Health, 07070 Antalya, Turkey

^d Department of Otorhinolaryngology, Akdeniz University Faculty of Medicine, 07070 Antalya, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2010

Received in revised form 3 January 2011

Accepted 5 January 2011

Keywords:

Hypoglossal nerve

Facial nerve

Recovery of function

SUMMARY

Nerve repair after facial nerve injury provides neural input to the distal facial nerve and facial musculature via a variety of motor nerves such as hypoglossal, spinal accessory, masseteric branch of the trigeminal nerve and motor branches of the cervical plexus. The most commonly used procedure is the hypoglossal–facial nerve transfer. This cross-nerve paradigm is a unique nerve repair method as one motor nerve takes over the function of another motor nerve. The hypoglossal–facial nerve repair was reviewed by means of history, terminology, technical variations, and its capacity for recovery of function.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Facial injuries are commonplace in today's society. Motor vehicle accidents, accidental injuries, and falls comprise the majority of causes for complex facial wounds (Thaller and McDonald, 2004). Apart from traffic-accident injuries (temporal bone fractures or lacerations of the face), most chronic facial nerve lesions are post-operative (radical parotidectomy, petrous bone surgery, removal of the cerebellopontine angle tumors, and iatrogenic injury) (Bascom et al., 2000; Gharabaghi et al., 2007; Guntinas-Lichius, 2004; Guntinas-Lichius et al., 2007; Hundeshagen, 2006; Skouras and Angelov, 2010; Sood et al., 2000).

The main goal of any surgical technique is to restore the symmetry of the face not only during rest but also in expressing emotion and voluntary motions such as smiling and eye closure. Severe and long-standing facial paralysis and loss of facial expression is a social handicap and leads to significant deterioration in quality of life owing to serious aesthetic, psychological and economic hardships (May and Schaitkin, 2000; Terzis and Konofaos, 2008). Regretfully, despite the numerous microsurgical and neuro-otological techniques proposed in the literature, the understanding of different aspects of nerve regrowth and facial reanimation remains a challenge for the reconstructive surgeon (Terzis and Konofaos, 2008).

* Corresponding author. Tel.: +90 242 2496952; fax: +90 242 2274482.

E-mail addresses: sarikcioglu@akdeniz.edu.tr, sarikcioglu@yahoo.com (L. Sarikcioglu).

Furthermore, despite the use of advanced techniques, cerebello-pontine angle surgical interventions (e.g. during acoustic neuroma removal) still result in a postoperative facial motor deficit owing to an astonishingly frequent (20–40%) facial nerve injury. Of course, during removal of facial nerve schwannoma, the resection of the facial nerve is inevitable (Magliulo et al., 2001). Several techniques have been proposed to repair facial nerve deficit, such as nerve transposition with the hypoglossal nerve, cross-face nerve graft, muscle transposition (temporalis, masseter muscles), and free muscle flap. Each of the techniques has specific indications, contraindications and complications (Arai et al., 1995; Atlas and Lowinger, 1997; Conley and Baker, 1979; May et al., 1991; Pensak et al., 1986; Pitty and Tator, 1992; Sawamura and Abe, 1997; Schaitkin et al., 1991), but the quality of the reanimated face has been a matter of controversy. Usually, functional recovery of voluntary coordinated movements of all 42 facial muscles, and emotional expression of the face following repair of transected facial nerve remains disappointing in human patients (Ferreira et al., 1994; Kerrebijn and Freeman, 1998; Robinson and Madison, 2005; Robinson and Madison, 2009; Vaughan and Richardson, 1993; Zochodne, 2008). A surgical technique to obtain optimal cosmetic results, such as a natural smile without synkinesis, has yet to be developed (Schaitkin et al., 1991).

When the proximal stump of the facial nerve is not available for direct repair, surgical transpositions of cranial nerves to the distal facial nerve stump are the only feasible reconstruction approach. For this purpose, several cranial nerves have been employed for reinnervation of the distal facial nerve stump. The spinal accessory,

glossopharyngeal, and trigeminal nerves have all been described as potential donors, though none has gained great popularity since they cause more morbidity in the donor region and show less satisfactory results (Hadlock et al., 2005). Among these nerves, the neural compatibility achieved with the hypoglossal nerve was better than that with the other ones, mainly due to their functional similarities to the facial nerve: both tongue and facial muscle have close cortical representation (Chen et al., 2000; Hammerschlag, 1999; May and Schaitkin, 2000).

This review article will focus on hypoglossal–facial nerve repair as one of a wide variety of surgical therapies available to reconstructive surgeons for successful facial nerve refunctioning.

2. Terminology

Misapplied, or sometimes patently incorrect terms and words have found their way into common usage in the literature; some examples of these have been found in journals and textbooks over the years. This is true of the frequently used term “anastomosis” between two nerves in any part of the body. The term “anastomosis” has been used for nervous connections from Galen’s time until the “Jena Nomina Anatomica”. According to Stedman’s Medical Dictionary, the term “anastomosis” refers to a “union of the two hollow structures”. This definition does not include solid structure such as nerves (Menovsky and van Overbeeke, 1997). Although “hypoglossal–facial anastomosis” is a widely accepted term, some authors prefer to use the correct term. Darrouzet et al. (1999) used the term “side-to-end hypoglossal–facial nerve attachment” throughout their study and abbreviated this term as HFA being the common abbreviation for hypoglossal–facial anastomosis. Menovsky and van Overbeeke (1997) put it more clearly and stated that the appropriate term should be “repair”, “reconnection”, or “reconstruction”.

In accordance, we will avoid the use of “anastomosis” to denote nerve repair in this paper.

3. History

The idea of transposition of an alternative motor nerve dates back to 1895. Zachariasz Thomasz Drobnik is credited with the first successful reconnection of the spinal accessory nerve to the facial nerve in 1879 (May and Schaitkin, 2000; Terzis and Konofaos, 2008). Interestingly, it turns out Drobnik was in high school at the time and it is postulated that this was a typographical error. It is now assumed that the real date is 1899 (Rosson and Redett, 2008; Van de Graaf et al., 2009). Therefore, it is concluded that Drobnik was not the first to operate on the facial nerve in 1899. Instead, the first was Sir Charles Alfred Balance (Streppel et al., 2000; Van de Graaf et al., 2009). In 1895, Dr. Balance operated an 11 year old boy for left-sided otitis media and paralyzed the facial nerve iatrogenically. Six months later, Dr. Balance re-operated the boy and reconstructed his facial nerve. For this purpose, he exposed the spinal accessory nerve, incised its sheath and fixed the remnants of the facial nerve to the accessory nerve by means of fine silk sutures (Van de Graaf et al., 2009).

The concept of usage of the hypoglossal nerve for reanimation of the facial nerve was first proposed by Körte and Bernhardt in 1901 (May and Schaitkin, 2000). Dr. Körte operated on a female patient suffering from facial paralysis secondary to infectious petrositis and attached the peripheral facial stump to the side of the hypoglossal nerve by interposition of a free nerve graft. After 6 months, initial facial movements appeared. The ipsilateral tongue became atrophic; however, the initially completely paralyzed hypoglossal nerve regained full activity after 2 years. In 1932, Ballance and Duel propagated the direct end-to-end nerve repair by complete tran-

section of the hypoglossal nerve (Rebol et al., 2006). The importance of sparing part of the hypoglossal nerve was originally emphasized by Zehm and Hartenau (1981), but May et al. (1991) definitively refined, popularized, and actually named the interpositional-jump graft technique in 1991 (Ferraresi et al., 2006). In last two decades, some modifications of the hypoglossal–facial repair technique have also been proposed in the literature (Atlas and Lowinger, 1997; Darrouzet et al., 1999; Ferraresi et al., 2006).

4. Surgical nerve repair

The nerve transfer procedure, also termed nerve substitution, is the technique yielding the best results. However, in many cases the proximal stump of the nerve cannot be used for reconstruction due to injury of the long contiguous or multiple segments of the facial nerve. For this reason, other methods should be applied such as nerve replacement by innervation of another cranial nerve, transfer contralateral facial nerve (cross-facial nerve repair), or muscle transpositions/transfers (May and Schaitkin, 2000). Combination of repair techniques has also been reported in the literature (Guntinas-Lichius et al., 2006; Hadlock et al., 2005; May and Schaitkin, 2000; Stennert, 1979; Terzis and Konofaos, 2008; Terzis and Tzafetta, 2009). Using this technique, the upper face is reconstructed by a direct facial nerve repair with interpositional graft and the lower face with a hypoglossal–facial nerve repair. The functional results are convincing as synkinesis between upper and lower face is avoided.

Nerve repair after facial nerve injury provides neural input to the distal facial nerve and facial musculature via a variety of motor nerves such as hypoglossal, spinal accessory, masseteric branch of the trigeminal nerve and motor branches of the cervical plexus. The most commonly used procedure is the hypoglossal–facial nerve transfer (Mehta, 2009). Its proximity to the extratemporal facial nerve, its dense population of myelinated motor axons, the relative acceptability of the resultant hemitongue weakness, and highly predictable and reliable result make it a logical choice (Hadlock et al., 2005).

Preferred treatment protocols and specific techniques for management of facial nerve paralysis often differ among surgeons. The goal of surgical intervention is to achieve an aesthetic result at rest while enhancing sphincter control (ocular, nasal, and oral). The choice of treatment plan is dependent on the type of facial nerve injury, the resultant deficit, the prognosis for recovery, and the expectations of the patient (Galli et al., 2002). It is particularly important to differentiate complete paralysis from partial or reversible denervation. It is possible that it would be an error to sacrifice a potentially intact or recoverable facial nerve with nerve substitution. The surgeon must use all available information in making this determination such as history, operative records, evoked and spontaneous electromyography, MRI, and, clinical observations regarding tone and volitional movements. EMG is more reliable than clinical observation due to the possible occurrence of autoperalytic syndrome as a special situation of synkinesis simulating a palsy. Another important tool is MRI to determine the status of the muscles of expression. This type of dilemma might occur following acoustic neuroma surgery where facial nerve may be injured by crush, stretch, or cauterization, rather than totally transected (May and Schaitkin, 2000).

From the functional point of view, one must distinguish between two different situations: (i) patients showing no sign of facial nerve regeneration (Hofmann–Tinel sign, recovery of tone, and movement on the affected side) due to complete hindrance of regrowth of axons proximal to the lesion site are candidates for surgical intervention. For this purpose, the muscles of expression themselves, the cerebral cortex and the other cranial nerves have to be

examined. (ii) Patients who have developed spontaneous axonal regrowth but in whom defective healing has occurred, hindering recovery of function, are also candidates for surgical reconstruction. In these patients, the problem remains because residual weakness and synkinesis are inevitable components of the healing process. Physician should evaluate the severity of dyskinesia, synkinesia, and autoparalytic syndrome in these patients (Volk et al., 2010).

The hypoglossal–facial nerve repair has remained popular despite a few successes with other cranial nerve reconnection procedures for facial nerve rehabilitation. Both dynamic (e.g., nerve grafting and interpositional nerve grafting, end-to-side nerve repair, or as a complete transection and reconnection, muscle transposition) and static (e.g., fascial and alloplastic slings) procedures have been described to achieve architectural integrity and functional restoration of the totally or partially paralyzed face (Rose, 2005). In an effort to reduce the side effects, a Z-plasty technique interdigitating the tongue musculature has been proposed (Krespi and Ossoff, 1993). The aim of this technique is to provide muscular neurotization from the intact normal side across the midline into the atrophic side.

4.1. Hypoglossal–facial nerve repair and its technical variations

Several modifications of the hypoglossal–facial nerve repair technique (split hypoglossal–facial nerve repair, interpositional nerve grafting, transposition of the mastoid segment of facial nerve) have been described in the literature (Hadlock et al., 2005). Other techniques used to reduce the postoperative tongue atrophy are suturing of the ansa cervicalis to the distal stump of the facial nerve or longitudinal splitting of the hypoglossal nerve and performing a split hypoglossal–facial nerve repair (Manni et al., 2001).

4.1.1. End-to-end repair (classical hypoglossal–facial nerve repair, hook-up)

Transposition of the hypoglossal nerve to the facial nerve as end-to-end manner is a popular, effective, and reliable technique with consistent and satisfying results. Hypoglossal–facial nerve repair is most appropriately performed for complete and permanent paralysis when reconnection of the facial nerve is not possible for repair or grafting and when performed up to 2 years after injury (May and Schaitkin, 2000).

The idea behind the hypoglossal–facial nerve repair is summarized metaphorically by the adage “rob Peter to pay Paul” (May and Schaitkin, 2000). In this procedure, the hypoglossal nerve is sacrificed (rob Peter) in order to transfer its motor power to the facial nerve (to pay Paul). The requirements for the successful performance of the hypoglossal–facial nerve repair are an intact extracranial facial nerve, a nonatrophic facial musculature, an intact donor hypoglossal nerve, and a patient who can physiologically and psychologically accept the neurologic deficit created by sacrifice of the hypoglossal nerve. Contraindications to the procedure occur when these criteria are not fulfilled (May and Schaitkin, 2000). Patients with congenital facial paralyses are not candidates for this surgical intervention, since neuromuscular units had never developed. Thus, sacrifice of an intact hypoglossal nerve may compound future functional deficit (Hadlock et al., 2005). In 10% of patients who have undergone the classic hypoglossal–facial nerve repair no improvement may be seen even two years after operation (Park et al., 2005).

The classic hypoglossal–facial nerve repair involves hypoglossal nerve transection distal to the ansa cervicalis and suturing to the main trunk of the facial nerve (Fig. 1) (Hadlock et al., 2005; May and Schaitkin, 2000; Mehta, 2009). Since the hypoglossal nerve is directly and purposely neurectomized, the complete transection of the hypoglossal nerve inevitably results in homolateral paral-

ysis and hemitongue atrophy, which interferes with mastication, speech, and swallowing, particularly when the facial expression function is less than normal (May and Schaitkin, 2000; Pannucci et al., 2007). Mackinnon and Dellon (1995) demonstrated that the human hypoglossal nerve is monofascicular until passing under the posterior belly of the digastric muscle. Graft repair distal to the level at this point may specifically affect individual fascicles. Since other fascicles will not be damaged their function will be spared. Thus post-operative deficit will be decreased due to individually neurolysed fascicles.

Moreover, it is emotionally difficult for the patient to sacrifice another cranial nerve after having lost the vestibular, acoustic, and occasionally the lower cranial nerves or trigeminal nerve as a result of cerebellopontine angle surgery (Manni et al., 2001). Patients undergoing facial nerve repair by means of classical hypoglossal–facial nerve repair often complain of subjective oral dysfunction, such as difficulty in mastication, articulation, and swallowing (Conley and Baker, 1979; Graeber et al., 1993; Hundeshagen, 2006). Pensak et al. (1986) reported in 74% of patients some functional difficulties with eating, of which 21% were debilitating. Hammerschlag (1999) observed both speech and swallowing problems in 45%.

The classical type of hypoglossal–facial nerve repair using the entire proximal hypoglossal nerve should be avoided nowadays. This intervention leads to unpleasant long-term sequelae, because the unilateral tongue atrophy leads to permanent speech and swallowing problems. For that reason, basis science research has to be performed to find refinements of techniques which promise anatomic restoration of structure and, hopefully, function.

4.1.2. Interpositional nerve grafting (IPNG, hypoglossal–facial jump grafting, indirect hypoglossal–facial nerve repair)

End-to-side nerve repair, in which the well-preserved distal stump of a transected nerve is reconnected to the side of an uninjured donor nerve, has been suggested as a reconstructive technique for repair of peripheral nerve injuries with an inaccessible central facial nerve stump, or there is a large nerve gap (Dvali and Myckatyn, 2008; Pannucci et al., 2007).

Tension-free reconnection warranted by the use of 10–0 (or thinner) suture material is needed in peripheral nerve surgery. Otherwise scar formation can occur and axons will regrow outside the facial nerve. If a tension-free reconnection is not possible, interposition of a nerve graft should be performed.

In 1991, May et al. (1991) described a modified technique originally conceived by Julia K. Terzis, wherein the hypoglossal nerve and the facial nerve were repaired with the aid of interposition of a free nerve graft (end-to-end to the facial nerve stump, and end-to-side to the hypoglossal nerve) (Fig. 2). May et al. (1991) reported improvement of tone and symmetry in more than 90% of patients undergoing hypoglossal–facial nerve repair procedure. They also analyzed results and complications between end-to-end repair (classical hypoglossal–facial nerve repair) and interpositional nerve grafting techniques (interpositional jump grafting) and found that only 8% of patients who underwent interpositional grafting experienced permanent tongue deficit. Good facial movement and expression was noted in 41% of interpositional grafting patients, and they experienced less synkinesis than those who had undergone classical hypoglossal–facial nerve repair (May et al., 1991).

The idea behind placing a hypoglossal–facial nerve interpositional graft is similar to those for classic hypoglossal–facial nerve repair. It includes complete interruption of the facial nerve, with lack of availability of the central stump for repair, intact extracranial facial nerve and nonatrophic facial musculature. Interpositional nerve grafts are used to bridge the missing segment or gap. A partial hypoglossal-to-facial nerve transfer using a free nerve graft

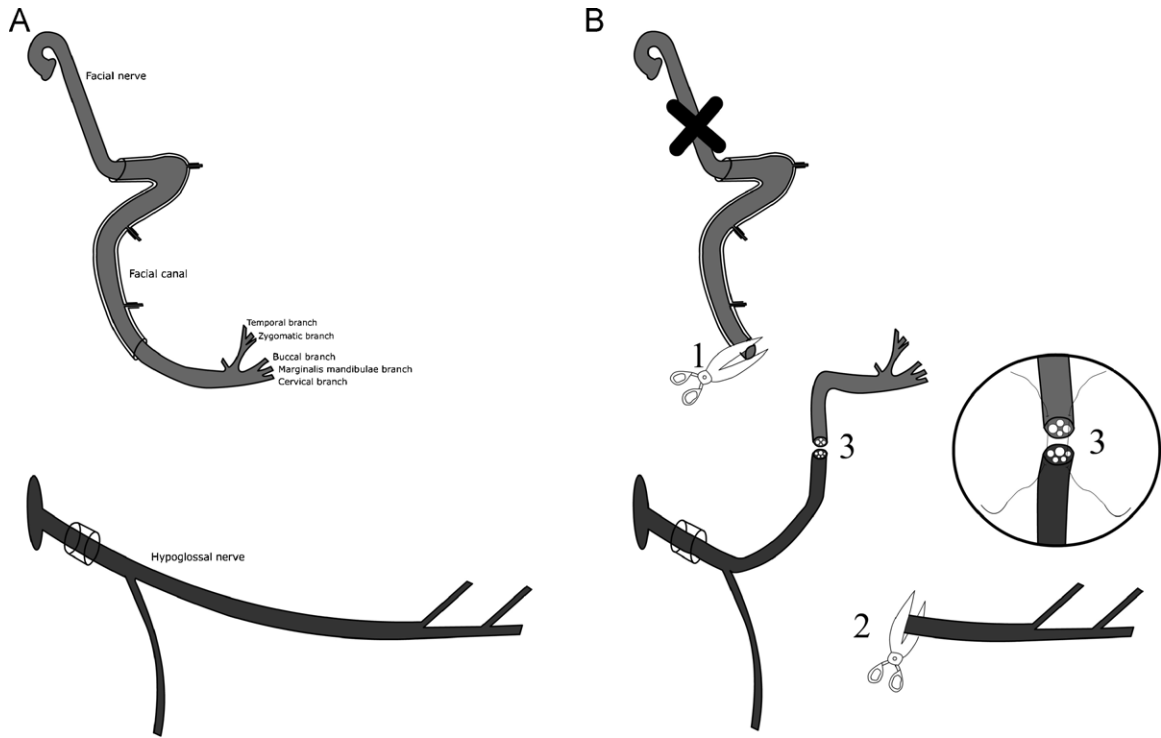


Fig. 1. Schematic drawing of the classical hypoglossal–facial nerve repair. (A) Normal anatomy of the facial and hypoglossal nerves. (B) Classic hypoglossal–facial nerve repair. 1 and 2: Transection of the hypoglossal and facial nerves. 3: Repair of the two nerve stumps in an end-to-end manner. Large X indicates the lesion site of the facial nerve.

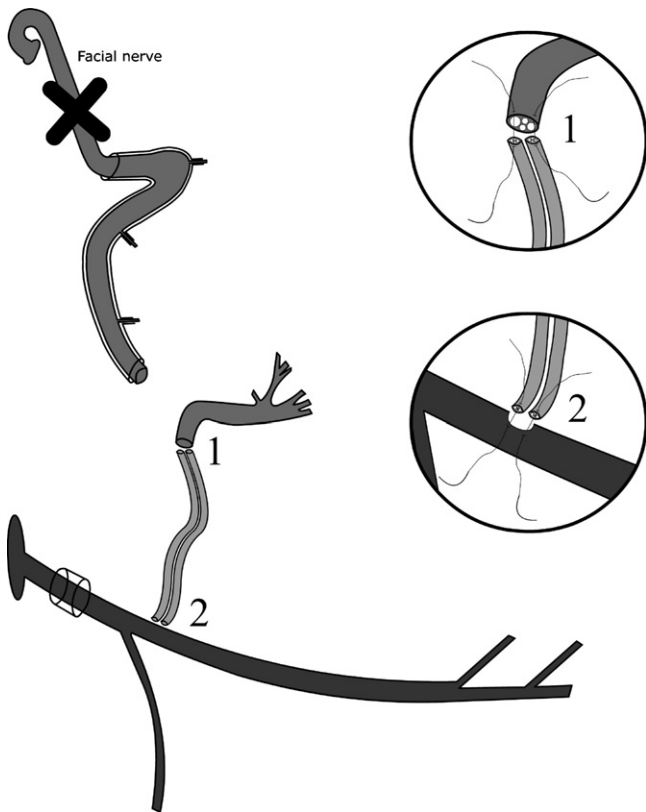


Fig. 2. Schematic drawing of the interpositional nerve grafting. 1: Repair of the free nerve graft(s) to the distal stump of the facial nerve in an end-to-end manner. 2: Repair of the free nerve graft(s) to the hypoglossal nerve in an end-to-side manner. Large X indicates the lesion site of the facial nerve.

can reanimate the facial muscles while curbing the complications, mainly tongue paralysis, of complete hypoglossal sacrifice (Sawamura and Abe, 1997). This procedure leaves the hypoglossal nerve axons in a healthy condition to spare tongue function while a sufficient number of axons are redirected to regenerate across the interpositional nerve graft to reinnervate the paralyzed mimetic muscles (Park et al., 2005). Spontaneous, symmetric movement is unlikely following this type of procedure. Therefore motor sensory re-education to learn voluntary control of movement to decrease synkinesis, and limit facial grimacing that can occur with mastication would be necessary.

Several branches of the extratemporal part of the facial nerve may be damaged during parotid cancer surgery. Reanimation of the facial nerve will require several nerve grafts. Discrepancies in caliber between the thick proximal stump and the thin distal branches are overcome by pooling the peripheral branches, or by splitting the interposition graft (Guntinas-Lichius, 2004). Despite these difficulties, interpositional nerve grafting restores some voluntary facial expression and function after resection of parotid neoplasms (Fisch and Lanser, 1991).

Grafts are used to avoid tension at the suture site and to bridge the missing segment or gap (Bailey, 2001). The two most popular donor grafts are the greater auricular nerve and sural nerves. Although shorter and smaller in caliber than the sural nerve, the greater auricular nerve resides adjacent to the surgical area. If the caliber is inadequate, two or three separate grafts could be united to match the caliber of both nerve stumps (Hadlock et al., 2005). A limitation of the of this technique is the necessity of a graft together with its obvious double line of suture to be crossed by sprouting axons as well as the resultant scarring and morbidity at the donor site (Ferraresi et al., 2006).

In hypoglossal–facial nerve repair practice, Ueda et al. (2007) simultaneously performed cross-facial nerve repair and interpositional nerve grafting. They found that the patients in whom

reinnervation by both nerve repairs succeeded could smile without closing their eyes by moving the tongue and could close the eye on the affected side without an accompanying oral movement. The movement supplied by the hypoglossal nerve will be volitional (nonemotive), which is why the cross-facial nerve repair is placed at the same time. Only the motor fibers coming through the opposite facial nerve (crossfacial nerve repair) can give volitional and emotive mimetic movement (Rosson and Redett, 2008). However, Koh et al. (2002) performed interpositional nerve grafting in which the grafted sural nerve was sutured to the facial nerve at a level near its emergence from the stylomastoid foramen but they reported failure of the graft in their patients. The reason for poor result has been attributed to the double line of sutures to be crossed by sprouting axons (Ferraresi et al., 2006).

Animal models have attempted to quantify the degree of hypoglossal axotomy necessary for return of motor function while minimizing tongue atrophy. Denervation of the orbicularis oculi muscle in the rat model demonstrated that 40% axotomy provides a good reinnervation of the eye sphincter when sutured to the upper zygomatic branch of the facial nerve with minimal tongue atrophy (Kalantarian et al., 1998).

The primary advantage of the interpositional nerve grafting is a satisfactory reinnervation of the facial nerve musculature with less mass movement than is evident in the classic hypoglossal–facial nerve repair. Another advantage is the possibility of the direction of the nerve graft to the main trunk of the facial nerve or its cervicofacial division, depending on the rehabilitation plan for the eye or mouth. Some of the drawbacks and limitations of the classic hypoglossal–facial nerve repair would be overcome by using the interpositional nerve grafting. However, correct orientation of the sprouting axons to cross the double line of sutures should be one of the more important research areas.

4.1.3. Split hypoglossal–facial nerve repair

This technique involves a partial hypoglossal nerve transfer to the ipsilateral facial nerve (Fig. 3). Only 30–50% of the ipsilateral hypoglossal nerve is finely transected longitudinally, especially fibers in the superior aspect of the nerve which do not contribute to the ansa cervicalis and are destined only for the tongue musculature. Part of the hypoglossal nerve (or fascicles) are sutured to the distal stump of the facial nerve, the other part of the hypoglossal nerve remains projecting to the tongue to prevent atrophy of the tongue musculature (Conley, 1982; May and Schaitkin, 2000).

Conley and Baker (1979) and Conley (1982), in reviewing their experience with 137 cases of hypoglossal–facial nerve repair over a period of 30 years, reported that the use of a split hypoglossal nerve or a descending branch of the hypoglossal nerve was not advisable due to failure of results in expected facial reanimation and improvement in facility of the tongue. Furthermore, Pitty and Tator (1992) reconnected a descending hypoglossal branch to a distal stump of the hypoglossal nerve following classic hypoglossal–facial nerve repair. However, they did not succeed in achieving improvement in lingual dexterity with this procedure. Dellon (1992) reported excellent results in facial reanimation and facility of the tongue with hemihypoglossal–facial nerve repair and with an interpositioning nerve grafting, respectively. In a recent study, Shipchandler et al. (2010) also reported that split hypoglossal–facial nerve transposition provides good rehabilitation of facial nerve paralysis with reduced lingual morbidity. Long-term rest symmetry and potential learned movement can be achieved. Although reported clinical results are contradictory and this technique has been said to be an alternative to the traditional method of complete hypoglossal sacrifice or interpositional nerve grafting (Shipchandler et al., 2010), the axons in the hypoglossal nerve do not travel in strict linear paths

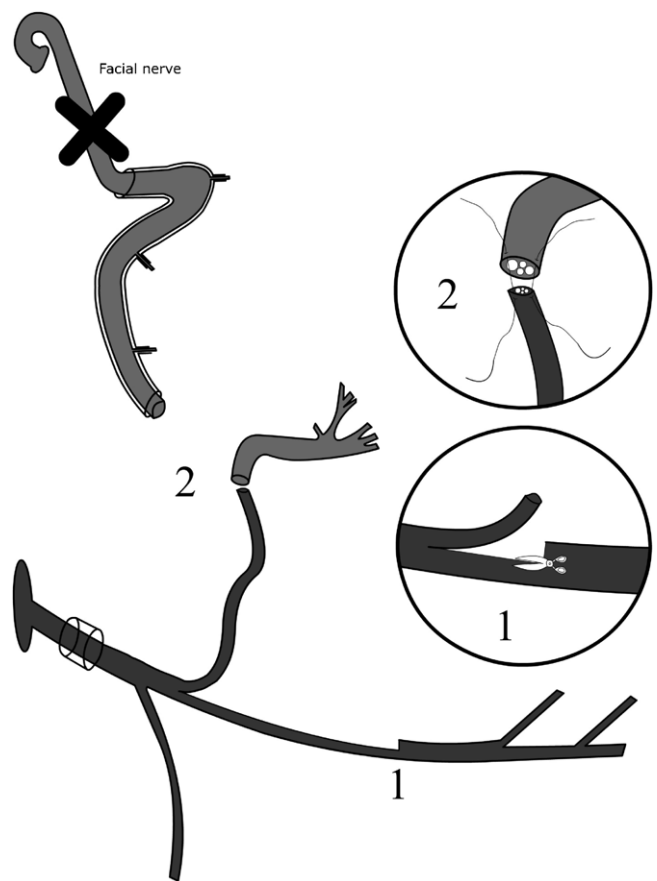


Fig. 3. Schematic drawing of the split hypoglossal–facial nerve repair. 1: Longitudinal incision of the hypoglossal nerve; 2: end-to-end repair of the split nerve segment to the distal stump of the facial nerve. Large X indicates the lesion site of the facial nerve.

through the epineurium. Therefore splitting the nerve may cause damage to more fascicles than anticipated.

4.1.4. Transposition of the facial nerve

The facial nerve can be mobilized in its mastoid segment from the second genu distally and transposed inferiorly to allow direct repair to the hypoglossal nerve (Fig. 4). This typically requires removal of the mastoid tip (Darrouzet et al., 1999; Hadlock et al., 2005; Martins et al., 2008; Rebol et al., 2006). This procedure provides enough extension of the facial nerve to perform a tensionless suture without the need of an interposed nerve graft. Therefore, after its intratemporal transection the facial nerve is reflected inferiorly to the neck, and is sutured directly to a partially sectioned hypoglossal nerve by end-to-side manner (Martins et al., 2008).

Although this procedure preserves the tongue function when compared with classical hypoglossal–facial nerve repair, there are some important facts to be considered. Anatomy of the facial nerve and temporal bone and its dissection at the mastoid bone should be well known to surgeons who perform hypoglossal–facial nerve transfer for accurate and safe dissection of the facial nerve remnant and its canal. Additionally, mobilization of the mastoid segment of the facial nerve is a time-consuming procedure because dissection should be very carefully performed to avoid additional injury (e.g. cerebrospinal fluid leakage). Since there have been few reports using this technique, we think that demonstration of the superiority of this technique to other commonly used techniques would require following a larger patient series and clinical experience reporting on indications and application of this technique.

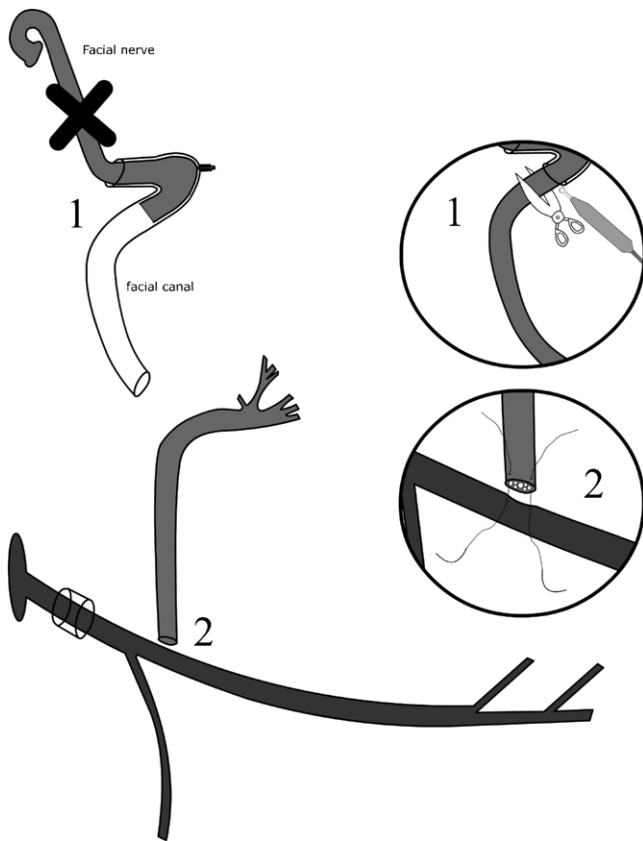


Fig. 4. Schematic drawing of the transposition of the intratemporal segment of the facial nerve and end-to-side repair. 1: Mobilization of the facial nerve in the facial canal by drilling the facial canal. 2: Repair of the mobilized facial nerve remnant to the hypoglossal nerve (end-to-side). Large X indicates the lesion site of the facial nerve.

5. Clinical results after hypoglossal–facial nerve repair

The major disadvantage of donor nerve techniques is that a functional cranial nerve must be purposely sacrificed. Consequently, homolateral paralysis and hemitongue atrophy, which interferes with mastication, speech, and swallowing are inevitable after complete transection of the hypoglossal nerve.

Many authors have chosen to establish their own grading scales for facial nerve injury (Brackmann and Barrs, 1984; House and Brackmann, 1985). Although results of facial nerve reconstruction have been commonly evaluated using the House–Brackmann grading system (Coulson et al., 2005), this grading system was designed for acute palsies and for reconstructions. Synkinesis is not scored correctly when using House/Brackmann grading system. Whatever the technique or evaluation scale used, data reported in the literature depend on personal evaluation by the surgeon or surgical team. However, there is very little consensus between the surgeon's evaluation and the overall judgment of the patient (Darrrouzet et al., 1999).

In a study by Manni et al. (2001), 39 consecutive patients were followed up after the use of this technique. Postoperatively, all patients had normal tongue movements without swallowing or speech dysfunction. Patient distributions according to the House–Brackmann scale were grade II (20.9%), III (44.6%), IV (24.1%), V (6.8%), and grade VI (3.4%). In a retrospective evaluation of a series of 66 patients evaluated according to a House–Brackmann grade, Malik et al. (2005) compared three different techniques (end-to-end nerve repair, interpositional nerve grafting, and transposition of the facial nerve) and reported that end-to-end nerve

repair gave the best facial function, followed by interpositional nerve grafting and then transposition of the facial nerve.

Flores (2007) performed hypoglossal–facial interpositional nerve grafting technique and found facial symmetry and improvement in the facial tone in all his cases (House–Brackmann grade IV in three (37.5%) and grade III in five (62.5%) patients) with the exception of definitive hemitongue atrophy and complaint of swallowing or speech difficulty.

The formulation of a diagnosis, treatment plan, and prognosis can be largely accomplished by means of a careful and detailed history and physical examination. Additionally, motivation and expectations of the patients who have undergone hypoglossal–facial nerve transfer, indications, and complications of the surgical intervention differ from patient to other. For that reason, achievement of the best results depends on several factors such as history of the patient, surgery, applied technique, severity of the injury, time of injury etc. Therefore all factors affecting the recovery of function should be thoroughly known and analyzed. Only after having taken these precautions will the proper surgical intervention technique and subsequent rehabilitation be successful.

6. Factors affecting the recovery of function

6.1. Axonal regrowth

Growing axons in the hypoglossal nerve and all other peripheral nerves move through their environment via the growth cone at random in an interweaving fashion, so that splitting the epineurium or excision of the nerve trunk invariably results in transection of axons at multiple points along the course (May and Schaitkin, 2000).

Earlier studies on the rat have shown that transected hypoglossal axons readily regrow into the facial “periphery” (Guntinas-Lichius et al., 2007; Watson, 1965). After hypoglossal–facial nerve repair, the cut hypoglossal axons are able to reach and reinnervate the whisker pad muscles. Counts of neurons in adult rats have revealed that practically 100% of the hypoglossal motoneurons survive after hypoglossal–facial nerve repair. Indeed, the number of hypoglossal motoneurons that project into the muscles of the whisker pad increases steeply and, 2 months after hypoglossal–facial nerve repair, reinnervation of the vibrissal muscles was almost complete (Guntinas-Lichius et al., 2007).

6.2. Collateral branching at the lesion site

One of the more important issues affecting recovery of function is the misdirection of regenerating axons to incorrect targets. This may be caused by collateral branching of the severed axons and nonselective random regrowth of the collaterals along different nerve fascicles (Brushart and Seiler, 1987; Nguyen et al., 2002). Misdirected regeneration is so commonly encountered that motor axons appear to enter and regenerate to muscles in an almost random manner. As a consequence, the myotopic organization of muscle innervation is lost (Guntinas-Lichius et al., 2005). Individual neurons re-establish contacts with the correct target, with false targets or both. Thus, misdirected reinnervation accounts in many incidences for a poor quality of functional restoration (Sumner, 1990).

After injury, each parent axon may give rise to 25 daughter axons (Shawe, 1955; Waxman, 1975). As regeneration proceeds, some of these supernumerary branches are pruned off over a period of up to 12 months (Angelov et al., 2005; Brushart and Seiler, 1987; Heathcote and Sargent, 1985; Mackinnon et al., 1991). Those that are lost presumably fail to make a connection with a peripheral target. There are, however, persistently higher numbers of myelinated and unmyelinated axons in regenerated segments of peripheral

nerves than in the corresponding parent nerves (Angelov et al., 2005; Horch and Lisney, 1981; Murphy et al., 1990). The end-to-end suture of the proximal stump of a transected normal hypoglossal nerve to the distal stump of a transected facial nerve enables the outgrowth of hypoglossal axons into facial nerve branches and reinnervate the paralyzed facial musculature (Angelov et al., 1993; Chen et al., 2000; Guntinas-Lichius et al., 2007). Projecting through several fascicles of a nerve, a single motoneuron thus can reinnervate different (often antagonistic) muscles, which is the morphological correlate of the pathological synkinesis (mass movements, abnormally associated movements). Extending daughter axons are guided in part by diffusible chemoattractants that lure them to their targets by finely tuned codes of attractive and repulsive cues (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005).

Many studies have addressed the issue of collateral branching at the lesion site of transected axons. For this purpose different treatment modalities have been tested to reduce the collateral branching, thus to improve quality of reinnervation (Angelov et al., 1996, 1999; Dohm et al., 2000; Guntinas-Lichius et al., 1997, 2001, 2002; Skouras and Angelov, 2010; Streppel et al., 2002). It is believed that a major reason for the poor functional recovery after peripheral nerve lesion is collateral branching and regrowth of axons to incorrect muscles (Guntinas-Lichius et al., 2005).

Literature on end-to-side nerve repair suggests that collateral sprouting develops from the nodes of Ranvier and can occur spontaneously, without injury. Many studies (Giovanoli et al., 2000; Tarasidis et al., 1997; Zhang et al., 1999, 2000) have confirmed that axons of an intact “parent” motor nerve can sprout into another “stepchild” motor nerve when the stepchild is sutured to the side of the parent motor nerve without displaying the fascicle(s) of the parent nerve. Other investigators (Bertelli et al., 1996; Noah et al., 1997), however, believe that an epi- or perineurotomy is required to induce collateral branching and grow through the end-to-side repair (Pannucci et al., 2007). Axonal branching occurs in response to nerve injury, and is widely accepted to occur in both end-to-end and end-to-side nerve repair. At the level of injury, axonal branching occurs, but the injured axons may also retract and send nodal collateral branches. Additionally, terminal intramuscular sprouting occurs at the most distal aspect of an axonal projection which may be injured or uninjured (Pannucci et al., 2007).

The end-to-side nerve repair technique is currently a subject of debate in the literature because the results have proved to be controversial as compared to those with the classical end-to-end nerve repair technique (Schmidhammer et al., 2009). It is currently believed that end-to-side nerve repair without epi- or perineurial window and axonal incision of the donor nerve can induce reinnervation through the suture site. Although studies initially suggested that layers (epineurium and/or perineurium) of the peripheral nerve represent a barrier to regenerating axons, other reports show that epineurium is the more formidable barrier (al-Qattan and al-Thunyan, 1998; Pannucci et al., 2007). Some studies suggest that regenerating axons can penetrate both the epi- and perineurium when a window is not created (Liu et al., 1999; Noah et al., 1997). Others report no significant difference in axon counts distal to the reconnection in groups with and without epi- or perineurial windows (Hayashi et al., 2004; Viterbo et al., 1994).

6.3. Intramuscular (terminal) sprouting

Denervated muscles produce sprouting stimuli coming from a class of muscle preparations in which denervation-like changes have occurred and sprouting has been stimulated even though nerve-induced activity is normal (Brown et al., 1981a,b). In rats, there are two major groups of muscles possessing different physiological activities (whisking at a frequency of 5–10 per second, but eye closure of 1–3 times per minute). It might be, that, upon dener-

vation the two groups secrete different trophic factors or different amounts of them.

A second major factor contributing to poor recovery is intramuscular axonal sprouting. On reaching a muscle target, regenerating axons undergo additional sprouting to reinnervate many incorrect muscle fibers and thus form new and larger motor units (Guntinas-Lichius et al., 2005). Reinnervation of motor end-plates by more than one motoneuron, or “polyinnervation”, is maladaptive due to one muscle fiber being controlled by two or more asynchronously, and often functionally different, motoneurons (Brown et al., 1981a,b; MacIntosh et al., 2006; Rich and Lichtman, 1989)

6.4. Timing

The significance between time of injury and repair is supported by physiologic, experimental, and clinic data (May and Schaitkin, 2000). Nerve biopsy may provide some useful information concerning the potential for success of a surgical procedure, although this is not indicated for most patients. Ylikoski et al. (1981) studied biopsy specimens of distal facial nerves prior to performing hypoglossal–facial nerve repair at time intervals varying between 2 weeks and 30 months in five patients. They reported that the distal stump of the human facial nerve appears to undergo less denervation atrophy than demonstrated in the peripheral nerves of experimental animals. Additionally, they found that success in reanimation of facial function correlated with histologic findings in that no recovery of facial function was seen when complete neurofibrosis had occurred in the injured facial nerve prior to hypoglossal–facial nerve repair (May and Schaitkin, 2000).

The effect of delayed nerve repair on nerve regeneration and muscle reinnervation is still not well understood. This is surprising because in the clinical routine an immediate reconstruction of the lesioned nerve is seldom possible. Pathophysiology of the muscles dictates that muscle that is denervated for longer than 1 year displays a reduced activity of the acetylcholinesterase receptor, muscle fiber volume diminishes, and intramuscular fibrosis occurs. These sequelae minimize the possibility of a proper, functional reinnervation (Rosson and Redett, 2008). Although there is a lack of controlled studies for peripheral nerve reconstruction, there is common agreement that the earliest possible repair will result in best functional outcome (Bascom et al., 2000; Guntinas-Lichius, 2004). Kunihiro et al. (2003) reported hypoglossal–facial nerve repair can be delayed up to 2 years with only minimal effect on the recovery of facial movement. Tate and Tollefson (2006) reported that the ideal time window is 6 months to 2 years after the initial nerve injury to ensure the presence of intact distal nerves with viable motor end plates. Although it is possible to expect some recovery 2 years after paralysis, a recovery after 4 years of denervation is not anticipated. When the time following the injury exceeds 4 years, collagenization and fibrosis of the distal facial nerve have advanced too far to permit functional regrowth after nerve repair procedure. While the state of the facial muscles also plays a role, complete atrophy and myofibrosis take longer to occur than distal neurofibrosis. This renders the muscle component a less a limiting factor for recovery of reinnervation and function (May and Schaitkin, 2000).

Contrary to typical animal studies, in the clinical routine, an immediate reconstruction of the lesioned facial nerve by means of hypoglossal–facial nerve repair is seldom possible. Furthermore, the results of the few animal studies using different nerves, animal models, and methods are contradictory (Bignotti et al., 1986; Bolesta et al., 1988; Fu and Gordon, 1995; Grabb, 1968; Irintchev et al., 1990; Van Beek et al., 1975). Some of them found that an immediate nerve suture is superior to any delayed nerve suture, whereas others report no differences. Guntinas-Lichius et al. (1997)

studied delayed hypoglossal–facial nerve repair up to 224 days denervation. They lesioned at first the facial nerve and following varying times, sutured the proximal stump of a freshly cut hypoglossal nerve to the facial predegenerated periphery. Their morphological and electrophysiological results showed that the target muscles can recover well even after a long-term denervation of 224 days. This finding is in agreement with previous studies showing the ability of long-term-denervated muscle fibers to accept reinnervation if not impaired and that muscle recovery is successful if motoneurons reinnervate the target muscle in sufficient number (Anzil and Wernig, 1989; Fu and Gordon, 1995; Irintchev et al., 1990). With longer denervation periods there was a trend towards smaller muscle fiber area (atrophy) (Anzil and Wernig, 1989).

Most experimental studies on the effects of delayed nerve suture were performed using end-to-end nerve repair (Barrs, 1991; Bolesta et al., 1988; Brunetti et al., 1985; Guntinas-Lichius et al., 1997; Urabe et al., 1995; Van Beek et al., 1975). These studies are influenced by an initial “dieback” of the Schwann cells plus subsequent axonal regrowth/branching in the proximal stump (Fu and Gordon, 1995). However, after varying periods of permanent target deprivation (Guntinas-Lichius et al., 1994; Neiss et al., 1992) there a slowly progressing degeneration of the motoneurons occurs. Therefore, it is not surprising that these studies generally show poor regeneration after long-term pre-degeneration.

In general, nerve regeneration is slower in older patients and the functional results are of poorer quality (Streppel et al., 1998). Postoperative radiotherapy is not a contraindication for nerve repair. In conclusion, the facial and hypoglossal nerves are affected by a variety of parameters. Depending on the extent of nerve resection, prognosis, motivation, health, age, desires of the patient, and several other factors, the surgeon has to choose the method of treatment, often as a combination of several measures, in the individual situation (Guntinas-Lichius, 2004). It has been reported that, presuming a correct selection of the best method in the individual situation, the various facial reanimation techniques seem to lead to nearly similar and satisfactory results (Guntinas-Lichius et al., 2006).

Although the time between facial nerve injury and its repair has been identified as an important predictor of the final outcome in experimental and clinical studies (Chen et al., 1994, 2000; Conley and Baker, 1979; Gavron and Clemis, 1984; Guntinas-Lichius et al., 1997, 2006; Pitty and Tator, 1992), poor education, low socioeconomic status of the patients and late delivery to a health center may increase the time delay and therefore, the final result.

7. Artificial stimulation of nerve and target muscle for facial reanimation

Clinically, soft tissue massage following nerve damage has been shown to result in improved blood flow, facial symmetry and smiling (Beurskens, 1990; Coulson, 2005). In line with these findings, muscle activity imposed artificially by mechanical muscle stimulation during the phase of synaptic formation and consolidation also leads to reduction of the intramuscular sprouting (Brown et al., 1980; Deschenes et al., 2006; Tam et al., 2001). In a recent study, a positive effect of manual stimulation has been reported. Improved recovery of vibrissal motor performance after classical hypoglossal–facial nerve repair and interpositional nerve grafting was found to be associated with a significant reduction in the proportion of polyinnervated motor end-plates (Guntinas-Lichius et al., 2007).

Furthermore, previous studies in experimental animals have shown that mild electrical activation of the denervated soleus muscle inhibits intramuscular sprouting and diminishes motor-end plate polyinnervation (Love et al., 2003). Direct electrical stimu-

lation of partly denervated muscle suppresses terminal sprouting activation of the denervated fibers which is required for the inhibitory effect of chronic direct muscle stimulation (Brown et al., 1981a,b). Skouras and Angelov (2010) showed that the brief electrical stimulation immediately after transection and for 1 h prior to end-to-end suture of the severed facial nerve, did not lead to improved motor recovery at 4 months. Regardless of whether the animals were electrically stimulated or not, the degree of collateral branching of axons at the lesion site was high (50–70%), the proportion of polyinnervated motor end-plates in the musculature was approximately 50% and the amplitude of vibrissal whisking remained at 25–30% of that in intact animals.

Despite increasing knowledge of cellular and molecular mechanisms determining the success or failure of peripheral nerve regeneration, no effective treatments for peripheral nerve injury exist. Therefore novel strategies in experimental animals should be developed and validated to reduce collateral branching at the lesion site, terminal sprouting and synkinesia. All of the aforementioned factors affecting the recovery of function address the bench of basic science.

8. Future perspectives in facial nerve repair

Although the classical form of the hypoglossal–facial nerve repair is a technically simple and consistently efficient intervention, some modifications are needed to spare patient function after total or partial hypoglossal nerve sacrifice. Additionally, experimental studies should be continued to shed more light onto the clinical studies.

One of the promising strategies in peripheral nerve repair is the use of tubes as nerve guides. Silicone tubes have already been used successfully in peripheral nerve repair (Tos et al., 2000, 2007). Experimental studies using substances that decrease axonal branching at the suture site applied into the silicone or bioresorbable tubes are still anticipated for the hypoglossal–facial nerve repair model: the insertion of the facial and hypoglossal nerves into a Y-shaped tube would allow the regenerating axons to select their own way through the Y-tube and regrow towards the two major groups of facial muscles; i.e. those around the mouth and nose (innervated by the buccal branch of the facial nerve) and those around the eye (supplied by the zygomatic branch of the facial nerve).

Facial nerve repair by its original proximal stump (facial–facial nerve repair) shows better recovery of function comparing to the hypoglossal–facial nerve repair. A possible explanation might lie in the different physiological properties of facial and hypoglossal motoneurons (Guntinas-Lichius et al., 2007). Since the aforementioned Y tube model had been studied on mixed nerves of the upper and lower extremities (Tos et al., 2000, 2007), intermingling of the different fibers (motor, sensory, autonomic) had not been discarded in their models. Therefore, pure motor nerves such as the hypoglossal nerve and the extratemporal segment of the facial nerve should be used to test the different physiological properties of both nerves. This model may reduce collateral branching at the lesion site, terminal sprouting and synkinesia after facial nerve injury.

Acknowledgements

This study was financially supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (U.Ö.) and Akdeniz University Research Fund (2010.01.0103.017) (L.S.).

References

- al-Qattan, M.M., al-Thunyan, A., 1998. Variables affecting axonal regeneration following end-to-side neurotaphy. *Br. J. Plast. Surg.* 51, 238–242.

- Angelov, D.N., Gunkel, A., Stennert, E., Neiss, W.F., 1993. Recovery of original nerve supply after hypoglossal–facial anastomosis causes permanent motor hyperinnervation of the whisker–pad muscles in the rat. *J. Comp. Neurol.* 338, 214–224.
- Angelov, D.N., Guntinas-Lichius, O., Wewetzer, K., Neiss, W.F., Streppel, M., 2005. Axonal branching and recovery of coordinated muscle activity after transection of the facial nerve in adult rats. In: Beck, F.F., Christ, B., Clascá, F., Haines, D.E., Korf, H.-W., Kummer, W., Marani, E., Putz, R., Sano, Y., Schiebeler, T.H., Zilles, K. (Eds.), *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 3–25.
- Angelov, D.N., Neiss, W.F., Streppel, M., Andermahr, J., Mader, K., Stennert, E., 1996. Nimodipine accelerates axonal sprouting after surgical repair of rat facial nerve. *J. Neurosci.* 16, 1041–1048.
- Angelov, D.N., Skouras, E., Guntinas-Lichius, O., Streppel, M., Popratiloff, A., Walther, M., Klein, J., Stennert, E., Neiss, W.F., 1999. Contralateral trigeminal nerve lesion reduces polynuclear muscle innervation after facial nerve repair in rats. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1369–1378.
- Anzil, A.P., Wernig, A., 1989. Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation. *J. Neurocytol.* 18, 833–845.
- Arai, H., Sato, K., Yanai, A., 1995. Hemihypoglossal–facial nerve anastomosis in treating unilateral facial palsy after acoustic neuroma resection. *J. Neurosurg.* 82, 51–54.
- Atlas, M.D., Lowinger, D.S., 1997. A new technique for hypoglossal–facial nerve repair. *Laryngoscope* 107, 984–991.
- Bailey, B., 2001. *Atlas of Head & Neck Surgery—Otolaryngology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Barrs, D.M., 1991. Facial nerve trauma: optimal timing for repair. *Laryngoscope* 101, 835–848.
- Bascom, D.A., Schaitkin, B.M., May, M., Klein, S., 2000. Facial nerve repair: a retrospective review. *Facial Plast. Surg.* 16, 309–313.
- Bertelli, J.A., dos Santos, A.R., Calixto, J.B., 1996. Is axonal sprouting able to traverse the conjunctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor, and sensory study of end-to-side nerve anastomosis. *J. Reconstr. Microsurg.* 12, 559–563.
- Beurskens, C.H.G., 1990. The functional rehabilitation of facial muscles and facial expression. In: Castro, D. (Ed.), *Facial Nerve. Proceedings of the Sixth International Symposium on the Facial Nerve*. Kugler Publications, Amsterdam, pp. 509–511.
- Bignotti, B., Origo, C., Schenone, A., Ratto, S., Mancardi, G.L., Ferrari, M.L., 1986. Experimental studies on peripheral nerve repair following early or delayed suture. *Ital. J. Orthop. Traumatol.* 12, 259–266.
- Bolesta, M.J., Garrett Jr., W.E., Ribbeck, B.M., Glisson, R.R., Seaber, A.V., Goldner, J.L., 1988. Immediate and delayed neurotaphy in a rabbit model: a functional, histologic, and biochemical comparison. *J. Hand Surg. Am.* 13, 352–357.
- Brackmann, D.E., Barrs, D.M., 1984. Assessing recovery of facial function following acoustic neuroma surgery. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 92, 88–93.
- Brown, M.C., Holland, R.L., Hopkins, W.G., 1981a. Motor nerve sprouting. *Annu. Rev. Neurosci.* 4, 17–42.
- Brown, M.C., Holland, R.L., Hopkins, W.G., Keynes, R.J., 1981b. An assessment of the spread of the signal for terminal sprouting within and between muscles. *Brain Res.* 210, 145–151.
- Brown, M.C., Holland, R.L., Ironton, R., 1980. Nodal and terminal sprouting from motor nerves in fast and slow muscles of the mouse. *J. Physiol.* 306, 493–510.
- Brunetti, O., Carretta, M., Magni, F., Pazzaglia, U., 1985. Role of the interval between axotomy and nerve suture on the success of muscle reinnervation: an experimental study in the rabbit. *Exp. Neurol.* 90, 308–321.
- Brushart, T.M., Seiler, W.A.T., 1987. Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp. Neurol.* 97, 289–300.
- Carmeliet, P., Tessier-Lavigne, M., 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436, 193–200.
- Chen, Y.S., Hsu, C.J., Liu, T.C., Yanagihara, N., Murakami, S., 2000. Histological rearrangement in the facial nerve and central nuclei following immediate and delayed hypoglossal–facial nerve anastomosis. *Acta Otolaryngol.* 120, 551–556.
- Chen, Y.S., Yanagihara, N., Murakami, S., 1994. Change in facial nerve innervation following hypoglossal–facial anastomosis. An animal study. *Acta Otolaryngol.* 114, 637–642.
- Conley, J., 1982. Hypoglossal–facial nerve anastomosis. In: Brackmann, D.E. (Ed.), *Neurological Surgery of the Ear and Skull Base*. Raven Press, New York, pp. 93–98.
- Conley, J., Baker, D.C., 1979. Hypoglossal–facial nerve anastomosis for reinnervation of the paralyzed face. *Plast. Reconstr. Surg.* 63, 63–72.
- Coulson, S.E., 2005. Physiotherapy rehabilitation following facial nerve paresis. In: Beurskens, C.H.G., van Gelder, R.S., Heymans, P.G., Manni, J.J., Nicolai, J.P.A. (Eds.), *The Facial Palsies. Complementary Approaches*. Lemma Publishers, Utrecht, pp. 263–274.
- Coulson, S.E., Croxson, G.R., Adams, R.D., O'Dwyer, N.J., 2005. Reliability of the “Sydney,” “Sunnybrook” and “House Brackmann” facial grading systems to assess voluntary movement and synkinesis after facial nerve paralysis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 132, 543–549.
- Darrouzet, V., Guerin, J., Bebear, J.P., 1999. New technique of side-to-end hypoglossal–facial nerve attachment with translocation of the infratemporal facial nerve. *J. Neurosurg.* 90, 27–34.
- Dellon, A.L., 1992. Restoration of facial nerve function: an approach for the twenty-first century. *Neurosurg. Q.* 2, 199–222.
- Deschenes, M.R., Tenny, K.A., Wilson, M.H., 2006. Increased and decreased activity elicits specific morphological adaptations of the neuromuscular junction. *Neuroscience* 137, 1277–1283.
- Dohm, S., Streppel, M., Guntinas-Lichius, O., Pesheva, P., Probstmeier, R., Walther, M., Neiss, W.F., Stennert, E., Angelov, D.N., 2000. Local application of extracellular matrix proteins fails to reduce the number of axonal branches after varying reconstructive surgery on rat facial nerve. *Restor. Neurol. Neurosci.* 16, 117–126.
- Dvali, L.T., Myckatyn, T.M., 2008. End-to-side nerve repair: review of the literature and clinical indications. *Hand Clin.* 24, 455–460, vii.
- Ferraresi, S., Garozzo, D., Migliorini, V., Buffatti, P., 2006. End-to-side intrapetrous hypoglossal–facial anastomosis for reanimation of the face. *Technical note. J. Neurosurg.* 104, 457–460.
- Ferreira, M.C., Besteiro, J.M., Tuma Junior, P., 1994. Results of reconstruction of the facial nerve. *Microsurgery* 15, 5–8.
- Fisch, U., Lanser, M.J., 1991. Facial nerve grafting. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 24, 691–708.
- Flores, L.P., 2007. Surgical results of the hypoglossal–facial nerve jump graft technique. *Acta Neurochir. (Wien)* 149, 1205–1210, discussion 1210.
- Fu, S.Y., Gordon, T., 1995. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *J. Neurosci.* 15, 3886–3895.
- Galli, S.K., Valauri, F., Komisar, A., 2002. Facial reanimation by cross-facial nerve grafting: report of five cases. *Ear Nose Throat J.* 81, 25–29.
- Gavron, J.P., Clemis, J.D., 1984. Hypoglossal–facial nerve anastomosis: a review of forty cases caused by facial nerve injuries in the posterior fossa. *Laryngoscope* 94, 1447–1450.
- Gharabaghi, A., Heckl, S., Kaminsky, J., Torka, W., Nagele, T., Tatagiba, M., Lowenheim, H., 2007. Hirnnervenausfälle durch ungewöhnliche Schädelbasisläsionen des Sinus cavernosus. *Hno* 55, 278–280.
- Giovanoli, P., Koller, R., Meuli-Simmen, C., Rab, M., Haslik, W., Mittlbock, M., Meyer, V.E., Frey, M., 2000. Functional and morphometric evaluation of end-to-side neurotaphy for muscle reinnervation. *Plast. Reconstr. Surg.* 106, 383–392.
- Grabb, W.C., 1968. Median and ulnar nerve suture. An experimental study comparing primary and secondary repair in monkeys. *J. Bone Joint Surg. Am.* 50, 964–972.
- Graeber, M.B., Bise, K., Mehraein, P., 1993. Synaptic stripping in the human facial nucleus. *Acta Neuropathol.* 86, 179–181.
- Guntinas-Lichius, O., 2004. The facial nerve in the presence of a head and neck neoplasm: assessment and outcome after surgical management. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 12, 133–141.
- Guntinas-Lichius, O., Angelov, D.N., Tomov, T.L., Dramiga, J., Neiss, W.F., Wewetzer, K., 2001. Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. *Exp. Neurol.* 172, 70–80.
- Guntinas-Lichius, O., Hundeshagen, G., Paling, T., Streppel, M., Grosheva, M., Irintchev, A., Skouras, E., Alvanou, S.K., Kuerten, S., Sinis, N., Dunlop, S.A., Angelov, D.N., 2007. Manual stimulation of facial muscles improves functional recovery after hypoglossal–facial anastomosis and interpositional nerve grafting of the facial nerve in adult rats. *Neurobiol. Dis.* 28, 101–112.
- Guntinas-Lichius, O., Irintchev, A., Streppel, M., Lenzen, M., Grosheva, M., Wewetzer, K., Neiss, W.F., Angelov, D.N., 2005. Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. *Eur. J. Neurosci.* 21, 391–402.
- Guntinas-Lichius, O., Neiss, W.F., Gunkel, A., Stennert, E., 1994. Differences in glial, synaptic and motoneuron responses in the facial nucleus of the rat brainstem following facial nerve resection and nerve suture reanastomosis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 251, 410–417.
- Guntinas-Lichius, O., Streppel, M., Angelov, D.N., Stennert, E., Neiss, W.F., 1997. Effect of delayed facial–facial nerve suture on facial nerve regeneration. A horseradish peroxidase tracing study in the rat. *Acta Otolaryngol.* 117, 670–674.
- Guntinas-Lichius, O., Streppel, M., Stennert, E., 2006. Postoperative functional evaluation of different reanimation techniques for facial nerve repair. *Am. J. Surg.* 191, 61–67.
- Guntinas-Lichius, O., Wewetzer, K., Tomov, T.L., Azzolin, N., Kazemi, S., Streppel, M., Neiss, W.F., Angelov, D.N., 2002. Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *J. Neurosci.* 22, 7121–7131.
- Hadlock, T.A., Cheney, M.L., McKenna, M.J., 2005. Facial reanimation surgery. In: Nadol, J.B., McKenna, M.J. (Eds.), *Surgery of the Ear and Temporal Bone*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 461–472.
- Hammerschlag, P.E., 1999. Facial reanimation with jump interpositional graft hypoglossal facial anastomosis and hypoglossal facial anastomosis: evolution in management of facial paralysis. *Laryngoscope* 109, 1–23.
- Hayashi, A., Yanai, A., Komuro, Y., Nishida, M., Inoue, M., Seki, T., 2004. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurotaphy. *Plast. Reconstr. Surg.* 114, 129–137.
- Heathcote, R.D., Sargent, P.B., 1985. Loss of supernumerary axons during neuronal morphogenesis. *J. Neurosci.* 5, 1940–1946.
- Horch, K.W., Lisney, S.J., 1981. On the number and nature of regenerating myelinated axons after lesions of cutaneous nerves in the cat. *J. Physiol.* 313, 275–286.
- House, J.W., Brackmann, D.E., 1985. Facial nerve grading system. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 93, 146–147.
- Hundeshagen, G., 2006. Effect of Mechanical Stimulation of the Vibrissae Muscles on the Recovery of Whisking After Hypoglossal–Facial Nerve Anastomosis (HFA) in Adult Rats. Department of Anatomy, University of Cologne, Cologne.
- Irintchev, A., Draguhn, A., Wernig, A., 1990. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. *Neuroscience* 39, 231–243.
- Kalantarian, B., Rice, D.C., Tiangco, D.A., Terzis, J.K., 1998. Gains and losses of the XII–VII component of the “baby-sitter” procedure: a morphometric analysis. *J. Reconstr. Microsurg.* 14, 459–471.
- Kerrebijn, J.D., Freeman, J.L., 1998. Facial nerve reconstruction: outcome and failures. *J. Otolaryngol.* 27, 183–186.

- Koh, K.S., Kim, J.K., Kim, C.J., Kwun, B.D., Kim, S.Y., 2002. Hypoglossal–facial crossover in facial-nerve palsy: pure end-to-side anastomosis technique. *Br. J. Plast. Surg.* 55, 25–31.
- Krespi, Y.P., Ossoff, R.H., 1993. *Complications in Head and Neck Surgery*. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Kunihiro, T., Higashino, K., Kanzaki, J., 2003. Classic hypoglossal–facial nerve anastomosis after acoustic neuroma resection. A review of 46 cases. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 65, 1–6.
- Liu, K., Chen, L.E., Seaber, A.V., Goldner, R.V., Urbaniak, J.R., 1999. Motor functional and morphological findings following end-to-side neurotomy in the rat model. *J. Orthop. Res.* 17, 293–300.
- Love, F.M., Son, Y.J., Thompson, W.J., 2003. Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J. Neurobiol.* 54, 566–576.
- MacIntosh, B.R., Gardiner, P.F., McComas, A.J., 2006. *Skeletal Muscle: Form and Function*. Human Kinetics.
- Mackinnon, S.E., Dellon, A.L., 1995. Fascicular patterns of the hypoglossal nerve. *J. Reconstr. Microsurg.* 11, 195–198.
- Mackinnon, S.E., Dellon, A.L., O'Brien, J.P., 1991. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve* 14, 1116–1122.
- Magliulo, G., D'Amico, R., Forino, M., 2001. Results and complications of facial reanimation following cerebellopontine angle surgery. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 258, 45–48.
- Malik, T.H., Kelly, G., Ahmed, A., Saeed, S.R., Ramsden, R.T., 2005. A comparison of surgical techniques used in dynamic reanimation of the paralyzed face. *Otol. Neurotol.* 26, 284–291.
- Manni, J.J., Beurskens, C.H., van de Velde, C., Stokroos, R.J., 2001. Reanimation of the paralyzed face by indirect hypoglossal–facial nerve anastomosis. *Am. J. Surg.* 182, 268–273.
- Martins, R.S., Socolovsky, M., Siqueira, M.G., Campero, A., 2008. Hemihypoglossal–facial neurotomy after mastoid dissection of the facial nerve: results in 24 patients and comparison with the classic technique. *Neurosurgery* 63, 310–316, discussion 317.
- May, M., Schaitkin, B.M., 2000. *The Facial Nerve*, second edition. Thieme, New York.
- May, M., Sobol, S.M., Mester, S.J., 1991. Hypoglossal–facial nerve interpositional-jump graft for facial reanimation without tongue atrophy. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 104, 818–825.
- Mehta, R.P., 2009. Surgical treatment of facial paralysis. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2, 1–5.
- Menovsky, T., van Overbeeke, J.J., 1997. Hypoglossal–facial nerve anastomosis. *J. Neurosurg.* 87, 649, author reply 650–2.
- Murphy, E.H., Brown, J., Iannuzzelli, P.G., Baker, R., 1990. Regeneration and soma size changes following axotomy of the trochlear nerve. *J. Comp. Neurol.* 295, 685–697.
- Neiss, W.F., Guntinas-Lichius, O., Angelov, D.N., Gunkel, A., Stennert, E., 1992. The hypoglossal–facial anastomosis as model of neuronal plasticity in the rat. *Ann. Anat.* 174, 419–433.
- Nguyen, Q.T., Sanes, J.R., Lichtman, J.W., 2002. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat. Neurosci.* 5, 861–867.
- Noah, E.M., Williams, A., Jorgenson, C., Skoulis, T.G., Terzis, J.K., 1997. End-to-side neurotomy: a histologic and morphometric study of axonal sprouting into an end-to-side nerve graft. *J. Reconstr. Microsurg.* 13, 99–106.
- Pannucci, C., Myckatyn, T.M., Mackinnon, S.E., Hayashi, A., 2007. End-to-side nerve repair: review of the literature. *Restor. Neurol. Neurosci.* 25, 45–63.
- Park, S.S., Day, T.A., Farrow, E.H., Frodel, J.L., Sykes, J.M., Toriumi, D.M., 2005. *Facial Plastic Surgery: The Essential Guide*. Thieme, New York.
- Pensak, M.L., Jackson, C.G., Glasscock 3rd, M.E., Gulya, A.J., 1986. Facial reanimation with the VII–XII anastomosis: analysis of the functional and psychologic results. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 94, 305–310.
- Pitty, L.F., Tator, C.H., 1992. Hypoglossal–facial nerve anastomosis for facial nerve palsy following surgery for cerebellopontine angle tumors. *J. Neurosurg.* 77, 724–731.
- Rebol, J., Milojkovic, V., Didanovic, V., 2006. Side-to-end hypoglossal–facial anastomosis via transposition of the intratemporal facial nerve. *Acta Neurochir. (Wien)* 148, 653–657, discussion 657.
- Rich, M.M., Lichtman, J.W., 1989. In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. *J. Neurosci.* 9, 1781–1805.
- Robinson, G.A., Madison, R.D., 2005. Manipulations of the mouse femoral nerve influence the accuracy of pathway reinnervation by motor neurons. *Exp. Neurol.* 192, 39–45.
- Robinson, G.A., Madison, R.D., 2009. Influence of terminal nerve branch size on motor neuron regeneration accuracy. *Exp. Neurol.* 215, 228–235.
- Rose, E.H., 2005. Autogenous fascia lata grafts: clinical applications in reanimation of the totally or partially paralyzed face. *Plast. Reconstr. Surg.* 116, 20–32, discussion 33–5.
- Rosson, G.D., Redett, R.J., 2008. Facial palsy: anatomy, etiology, grading, and surgical treatment. *J. Reconstr. Microsurg.* 24, 379–389.
- Sawamura, Y., Abe, H., 1997. Hypoglossal–facial nerve side-to-end anastomosis for preservation of hypoglossal function: results of delayed treatment with a new technique. *J. Neurosurg.* 86, 203–206.
- Schaitkin, B.M., Young 3rd, T., Robertson, J.S., Fickel, V., Wiegand, D.A., 1991. Facial reanimation after acoustic neuroma excision: the patient's perspective. *Laryngoscope* 101, 889–894.
- Schmidhammer, R., Nogradi, A., Szabo, A., Redl, H., Hausner, T., van der Nest, D.G., Millesi, H., 2009. Synergistic motor nerve fiber transfer between different nerves through the use of end-to-side coaptation. *Exp. Neurol.* 217, 388–394.
- Shawe, G.D., 1955. On the number of branches formed by regenerating nerve-fibres. *Br. J. Surg.* 42, 474–488.
- Shipchandler, T.Z., Seth, R., Alam, D.S., 2010. Split hypoglossal–facial nerve neurotomy for treatment of the paralyzed face. *Am. J. Otolaryngol.* doi:10.1016/j.amjoto.2010.09.007.
- Skouras, E., Angelov, D.N., 2010. Experimental studies on post-transectional facial nerve regrowth and functional recovery of paralyzed muscles of the face in rats and mice. *Anatomy* 4, 1–27.
- Sood, S., Anthony, R., Homer, J.J., Van Hille, P., Fenwick, J.D., 2000. Hypoglossal–facial nerve anastomosis: assessment of clinical results and patient benefit for facial nerve palsy following acoustic neuroma excision. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 25, 219–226.
- Stennert, E., 1979. I. Hypoglossal facial anastomosis: its significance for modern facial surgery. II. Combined approach in extratemporal facial nerve reconstruction. *Clin. Plast. Surg.* 6, 471–486.
- Streppel, M., Angelov, D.N., Guntinas-Lichius, O., Neiss, W.F., 1998. Nervenplastische Eingriffe des N. facialis beim alteren Patienten—Morphologische Erklärung für entauschende funktionelle Ergebnisse. *Laryngorhinotologie* 77, 332–336.
- Streppel, M., Azzolin, N., Dohm, S., Guntinas-Lichius, O., Haas, C., Grothe, C., Wevers, A., Neiss, W.F., Angelov, D.N., 2002. Focal application of neutralizing antibodies to soluble neurotrophic factors reduces collateral axonal branching after peripheral nerve lesion. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1327–1342.
- Streppel, M., Heiser, T., Stennert, E., 2000. Zur geschichtlichen Entwicklung der Fazialischirurgie unter besonderer Berücksichtigung der Hypoglossus-Fazialis-Anastomose. *Hno* 48, 801–808.
- Sumner, A.J., 1990. Aberrant reinnervation. *Muscle Nerve* 13, 801–803.
- Tam, S.L., Archibald, V., Jassar, B., Tyreman, N., Gordon, T., 2001. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. *J. Neurosci.* 21, 654–667.
- Tarasidis, G., Watanabe, O., Mackinnon, S.E., Strasberg, S.R., Haughey, B.H., Hunter, D.A., 1997. End-to-side neurotomy resulting in limited sensory axonal regeneration in a rat model. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 106, 506–512.
- Tate, J.R., Tollefson, T.T., 2006. Advances in facial reanimation. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 14, 242–248.
- Terzis, J.K., Konofaos, P., 2008. Nerve transfers in facial palsy. *Facial Plast. Surg.* 24, 177–193.
- Terzis, J.K., Tzafetta, K., 2009. The “babysitter” procedure: minihypoglossal to facial nerve transfer and cross-facial nerve grafting. *Plast. Reconstr. Surg.* 123, 865–876.
- Thaller, S., McDonald, W., 2004. *Facial Trauma*. Marcel Dekker.
- Tos, P., Battiston, B., Geuna, S., Giacobini-Robecchi, M.G., Hill, M.A., Lanzetta, M., Owen, E.R., 2000. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. *Microsurgery* 20, 65–71.
- Tos, P., Battiston, B., Nicolino, S., Raimondo, S., Fornaro, M., Lee, J.M., Chirila, L., Geuna, S., Perroteau, I., 2007. Comparison of fresh and predegenerated muscle–vein-combined guides for the repair of rat median nerve. *Microsurgery* 27, 48–55.
- Ueda, K., Akiyoshi, K., Suzuki, Y., Ohkouchi, M., Hirose, T., Asai, E., Tateshita, T., 2007. Combination of hypoglossal–facial nerve jump graft by end-to-side neurotomy and cross-face nerve graft for the treatment of facial paralysis. *J. Reconstr. Microsurg.* 23, 181–187.
- Urabe, M., Mizobuchi, N., Funabiki, H., Seki, E., Okada, T., Sakakibara, N., 1995. A case of liposarcoma originating in the chest wall. *Nippon Geka Hokan* 64, 131–138.
- Van Beek, A., Glover, J.L., Zook, E., 1975. Primary versus delayed-primary neurotomy in rat sciatic nerve. *J. Surg. Res.* 18, 335–339.
- Van de Graaf, R.C., Ijma, F.F.A., Nicolai, J.P.A., 2009. Sir Charles Alfred Ballance (1856–1936) and the introduction of facial nerve crossover anastomosis in 1895. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 62, 43–49.
- Vaughan, E.D., Richardson, D., 1993. Facial nerve reconstruction following ablative parotid surgery. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31, 274–280.
- Viterbo, F., Trindade, J.C., Hoshino, K., Mazzoni, A., 1994. Two end-to-side neurotomy and nerve graft with removal of the epineurial sheath: experimental study in rats. *Br. J. Plast. Surg.* 47, 75–80.
- Volk, G.F., Pantel, M., Guntinas-Lichius, O., 2010. Modern concepts in facial nerve reconstruction. *Head Face Med.* 6, 25.
- Watson, W.E., 1965. An autoradiographic study of the incorporation of nucleic acid precursors by neurones and glia during nerve regeneration. *J. Physiol.* 180, 741–753.
- Waxman, S.G., 1975. Ultrastructural observations on branching patterns of central axons. *Neurosci. Lett.* 1, 251–256.
- Ylikoski, J., Hittelsberger, W.E., House, W.F., Sanna, M., 1981. Degenerative changes in the distal stump of the severed human facial nerve. *Acta Otolaryngol.* 92, 239–248.
- Zehm, S., Hartenau, F., 1981. Die Hypoglossus-Fazialisanastomose. *Laryngol. Rhinol. Otol. (Stuttg)* 60, 437–440.
- Zhang, Z., Soucacos, P.N., Beris, A.E., Bo, J., Ioachim, E., Johnson, E.O., 2000. Long-term evaluation of rat peripheral nerve repair with end-to-side neurotomy. *J. Reconstr. Microsurg.* 16, 303–311.
- Zhang, Z., Soucacos, P.N., Bo, J., Beris, A.E., 1999. Evaluation of collateral sprouting after end-to-side nerve coaptation using a fluorescent double-labeling technique. *Microsurgery* 19, 281–286.
- Zochodne, D.W., 2008. *Neurobiology of Peripheral Nerve Regeneration*. Cambridge University Press, London.

Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat

L. Sarikcioglu, B.M. Demirel, A. Utuk

Department of Anatomy, Akdeniz University Faculty of Medicine, Antalya, Turkey

[Received 29 August 2008; Accepted 5 November 2008]

Walking track analysis was first described by de Medinaceli et al. This technique has been significantly modified to provide methods of indexing nerve function that are more valid. Moreover, it has been questioned by several authors. The aim of the present review is to offer a combined knowledge about walking track analysis for scientists who deal with neuroscience. (Folia Morphol 2009; 68, 1: 1–7)

Key words: walking track analysis, sciatic function index, print length, toe spread, intermediate toe spread

THE RAT SCIATIC NERVE AS A MODEL FOR PERIPHERAL NERVE REGENERATION

In the biological sciences, a number of animal models have been developed in order to study peripheral nerve regeneration. However, rats are used extensively in the biological sciences because of their small size and the availability of a large number of animals of identical genetic stock at a reasonable cost. An additional advantage is that it is easy to work with and well studied by many scientists. The sciatic nerve shows an equivalent capacity for regeneration in rats and subhuman primates [29]. For this reason, the rat sciatic nerve model is a widely used model for the evaluation of motor and sensory nerve function at the same time [11, 29].

APPROPRIATE PARAMETERS FOR THE ASSESSMENT OF PERIPHERAL NERVE REGENERATION

Nerve regeneration has been experimentally quantified using three commonly employed classes of measures: electrophysiology, histomorphometry, and functional tests such as walking track analysis [11, 30], external postural thrust [16], and

ankle stance angle [26]. Selection of the appropriate assessment parameter to measure neural regeneration will be critical for the success of any experimental study. It has been assumed that these three classes are highly correlated to each other. Many nerve studies report the usage of more than one outcome measure, yet fail to report any correlation analysis. Traditional methods of assessing nerve recovery, such as electrophysiology and histomorphometry, do not necessarily correlate with a return of motor and sensory functions [11]. There is no indication of whether poor electrical results equate with poor histological results or poor function [30]. With axon count and degree of myelination studies it is not possible to know if the axon reaches the appropriate target organ or not [23, 28]. Therefore, extrapolation of the electrophysiological and histomorphometric parameters may lead to inappropriate interpretation of return of function [23, 30].

Research questions should be tested using the most appropriate measures. If the nature of the question is about functional outcome, then a functional analysis is best. However, if the research

question relates to enhancement of fibre regeneration, then an electrophysiological or morphological analysis is more appropriate. The clinical reports, as well as the experimental results demonstrating no correlation between measures, underscore the need to consider which aspects of nerve regeneration are of interest when designing studies [23, 28].

Walking track analysis is a measure of overall coordinated distal motor function requiring intact motor and sensory functions. After nerve injury, the nerve fibres innervate the muscles aselectively; because of this, the activation patterns of the muscles is abnormal during locomotion [14]. Because maximal effort is not necessary for walking, there is no correlation between walking track parameters and maximal muscle forces [35]. Although a muscle or sensory receptor may be reinnervated, cortical control may not permit adequate muscle activation [11].

WALKING TRACK ANALYSIS

Walking track analysis was first described by de Medinaceli et al. [10] in 1982. The approach they described is utilized increasingly by the researchers who deal with neuroscience. It combines gait analysis and the temporal and spatial relationship of one footprint to another during walking (Fig. 1). Their data analysis employed a complicated mathematical formula, empirically derived, comparing four measurements between the experimental and the normal sides. The numerical value of the formula is termed the sciatic function index (SFI). This index of measuring functional recovery has been used by numerous investigators with consistent results.

DATA OBTAINED FROM WALKING TRACKS

Several measurements are taken from footprints, these are as follows:

- print length (PL): distance from the heel to the third toe;
- toe spread (TS): distance from the first to the fifth toe;
- intermediate toe spread (ITS): distance from the second to the fourth toe (Fig. 1).

All three measurements are taken from the experimental (injured) and normal (uninjured or opposite) sides [1]. Dellon and Dellon [12] discussed the validity of the normal hind limb, since it is theoretically possible that a given strain of rat will have a change in the measurements of the contralateral

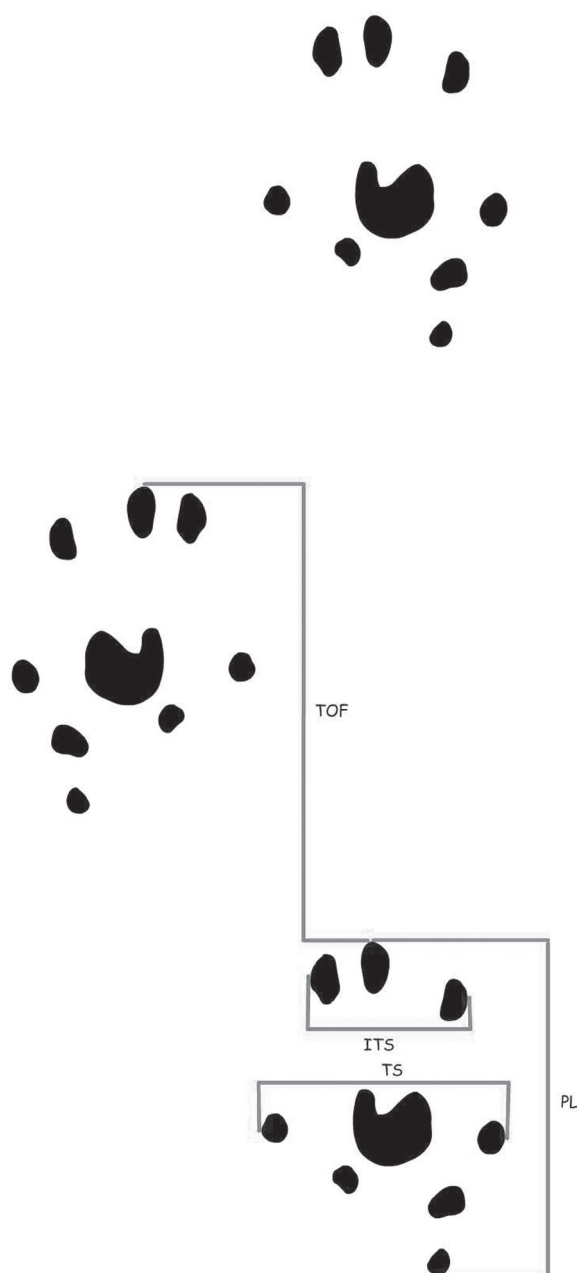


Figure 1. The temporal and spatial relationship of one footprint to another during walking; measurements are taken from the footprints; PL — distance from the heel to the third toe, the print length; TS — distance from the first to the fifth toe, the toe spread; ITS — distance from the second to the fourth toe, the intermediate toe spread; TOF — distance to opposite foot.

hind footprint parameters as a result of carrying increased weight after nerve injury to the opposite leg, it may be invalid to assume that the contralateral leg has a normal footprint. However, many authors have used the opposite leg as normal.

After obtaining the data from the tracks, they are used to calculate the index SFI. An SFI of 0 indicates

normal, and -100 indicates total impairment. However, de Medinaceli et al. [10] reported the normal values between +11 and -11. As a result, many modified calculations accept 0 as normal and -100 as total impairment [5, 9].

CHANGES AFTER SPECIFIC NERVE INJURIES

As a result of a complete peroneal nerve lesion, the toe extensors and foot dorsiflexors and evertors are denervated. Therefore, owing to the opposed action of the toe and foot flexors, the animal has a shortened print length. The distance between the intermediate toes is relatively unaffected owing to the normal functioning of the foot intrinsics. Only a slightly decreased toe spread is noted [1].

A complete posterior tibial nerve lesion results in a more significantly impaired gait and walking track. Secondary to the loss of ankle plantar flexion, foot inverters, toe flexors, and foot intrinsics, the footprint characteristically demonstrates an increased print length, a decreased toe spread and a decreased intermediate toe spread. There is also a tendency toward foot eversion. Significantly, the loss of intrinsic muscle function results in a decreased toe spread. The unopposed dorsiflexion from intact peroneal nerve function pushes the heel down, causing the animal to walk on the entire sole of the foot. This results in a longer print length [1].

A complete sciatic nerve lesion is similar to that of the posterior tibial nerve lesion; however, the pattern attributable to the unopposed action of the peroneal innervated musculature is not present. Hence, the walking track shows an increased print length, decreased toe spread, and decreased intermediate toe spread without the tendency of foot eversion. Owing to the loss of the peroneal nerve function, there is a more abnormal print with evidence of toe dragging and a more slurred print [1].

HISTORY OF SCIATIC INDEX FORMULA

Prior to de Medinaceli et al. [10], gait analysis had been described comprehensively by Hruska et al. [19, 20]. However, de Medinaceli's group [10] was interested in an assay of the end result of neurological function in contrast with electrophysiological recordings of conduction velocity or amplitude, and with morphometric analysis of nerve fibre numbers or axon-myelin ratios. Furthermore, de Medinaceli's group [10] was interested in an assay they could apply to a model of localized severe nerve in-

A. De Medinaceli, Freed and Wyatt, 1982

$$SFI = \left[\left(\frac{ETOF - NTOF}{NTOF} \right) + \left(\frac{NPL - EPL}{EPL} \right) + \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) \right] \frac{220}{4}$$

B. Carlton and Goldberg, 1986

$$SFI = \left[\left(\frac{NPL - EPL}{EPL} \right) + \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) \right] \frac{220}{3}$$

$$TFI = 125 \left(\frac{NPL - EPL}{EPL} \right) - 43.8 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 252 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right)$$

$$PFI = (2 \times SFI) - TFI$$

C. Bain, Machinnon, and Hunter, 1989

$$SFI = -38.3 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

$$TFI = -37.2 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 104.4 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 45.6 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

$$PFI = 174.9 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 80.3 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) - 13.4$$

Figure 2. Index formulas; **A.** Index formula described by De Medinaceli, Freed, and Wyatt [10]; **B.** Index formula described by Carlton and Goldberg [5]; **C.** Index formula described by Bain, Mackinnon, and Hunter [1]; SFI — sciatic function index, PFI — Peroneal function index, TFI — tibial function index.

jury. Therefore, they incorporated the parameters that directly measured from the rat's footprints: TOF (distance to opposite foot), PL (print length), TS (toe spread), ITS (intermediate toe spread), angle of feet, and width between feet and toe. But, they selected four variables, TOF, PL, TS, and ITS for calculation of the index formula. The TOF (the swing of the opposite limb) measures the capacity of the experimental limb to support the animal's weight. TS and ITS, indicators of condition of the peroneal nerve, were based on previous studies [3, 15, 18]. They found the PL to be short in normal animals that walk only on their toes whereas animals with nerve damage place the whole foot on the ground and sometimes even drag their toes. De Medinaceli et al. [10] gave equal importance to the different components in the index formula (Fig. 2A). In 1986, Carlton and Goldberg [5] eliminated from the formula the variable relating to distance to the opposite foot (Fig. 2B). Later, in 1989, Bain et al. [1] reported that the indices of sciatic function, as described by De Medinaceli et al. [10] and Carlton and Goldberg [5], led to values that were not indicative of the nerve lesions created. Bain et al. [1] provided indexes for the three nerve functions (sciatic, posterior tibial, peroneal) that were statistically, not empirically, derived. Indices for a sciatic, peroneal, and posterior tibial function index are created based on the coefficients

derived from multiple linear regression analysis. They suggested a new modification of the SFI, calculating the factors as follows: print length factor (PLF); toe spread factor (TSF); and intermediary toe spread factor (ITF). These factors were then incorporated into the Bain-Mackinnon-Hunter sciatic function index formula (Fig. 2C). A similar set of sciatic nerve indices was developed in mice [21]. Inserra et al. [21] reported high correlation for SFI with PL and TS, for peroneal function index with TS, and for posterior tibial index with PL in mice. By these observations, they constructed an index formula based on weighted contributions of the components of the sciatic function index.

SOME PROBLEMS IN OBTAINING WALKING TRACKS

Sometimes it is difficult to obtain clear print marks. The reported difficulties are as follows.

Long print length

One of the most difficult points to determine is that for the heel. When a rat is first placed in the corridor, it may remain still, pressing the entire footpad and heel down, creating a very long print length but not a walking print. At the end of the walkway, before entering the dark box, it might put all its weight onto its hind legs, again creating a very long print [12]. To discard this behaviour, the rat should first be allowed two or three conditioning trials, during which it can stop to explore the walking pathway. After these trials, the rat should walk steadily to the darkened cage [37].

Autotomy

After transection of the sciatic nerve, rodents frequently scratch and bite their anaesthetised foot, resulting in amputation of one or more toes (especially the last two digits). This is termed autotomy or autophagy. This phenomenon was first described and named by Wall et al. [39]. Mice show autotomy very similar to that seen in rats but the onset is somewhat faster [39]. Autotomy is usually seen in the beginning of the third postoperative week. Autotomy starts with nibbling of toenails (Fig. 3) and then extends progressively to the toes and feet (Fig. 4). Subsequently, infection and oedema may start in the attacked regions. The extent of autotomy is scored according to the scale used by Wall et al. [39]. Briefly, one point is tallied for the loss of one or more toenails, and an additional point is scored for each one-half toe amputated, and for a total score when all toes are removed.



Figure 3. Nibbling of toenails.

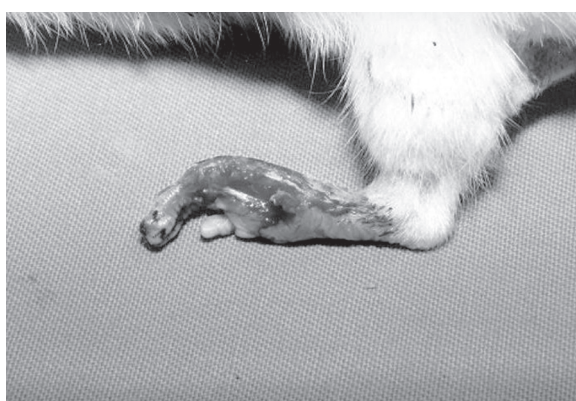


Figure 4. Appearance of severe autotomy.

Although it has been suggested that this behaviour is simply an effort to shed an insensate appendage, several researchers have attributed it to the animal's response to a painful condition that it perceives as arising from the denervated body part, named *anaesthesia dolorosa*. The painful perception arising from the injured nerve may originate from impulses spontaneously generated in the regenerating axonal sprouts because of mechanical compression within the neuroma [8, 39].

When these rats or mice are part of a study using the sciatic function index, autotomy results in unusable data, since the necessary foot marks have been removed. Therefore, in most cases where autotomy occurs the hind limb can no longer serve as the site at which nerve repair can be studied. For the prevention of this problem, a deterrent in the form of a foul-tasting substance [34] or some chemical substances [2, 24, 31] have been used with beneficial results. This behaviour can be significantly limited when housing male rats with females [43].



Figure 5. Appearance of contracture formation.

It would be helpful, therefore, to be familiar with the phenomenon of autotomy and know which rats are least likely to mutilate themselves. It is reported that female Sprague-Dawley rats are significantly less likely to perform autotomy than males [40]. In contrast to Weber et al. [40], Carr et al. [6] mentioned that Lewis rats have been demonstrated to exhibit the least autotomy.

Contracture formation

Sciatic and peroneal nerve injuries often cause joint contractures such that the rats use the dorsum of the affected foot (Fig. 5). Tibial nerve injuries cause some rats to bear weight on the medial aspect of the foot with the fifth toe elevated [17]. The formation of flexion contracture may occur due to a faster or more complete reinnervation of the flexor muscles in comparison with the extensor muscle group [7]. Contractures may also have contributed to the unexpected findings of a decline in the mean SFI. Contracture formation can be seen not only in rats but also in mice. The incidence of contracture formation in mice [42] is similar to that reported for rats [17]. As a result of contracture formation, it is difficult to measure the print length. To solve this problem, Chamberlain et al. [7] developed a new method to measure the print length in the presence of flexion contracture after sciatic transection, whereby the sum of the distance from the heel to the proximal knuckle on the print and the distance from the proximal knuckle to the end of the toe is calculated. To prevent the development of flexion contractures, the injured leg must be exercised manually on a weekly or biweekly basis, or a wire mesh must be used, where the animal is allowed to play freely, to provide continuous physiotherapy throughout the

period of denervation [25]. Daily physical activity has a positive influence in the early phase of nerve regeneration, including motor and sensory function [33, 36], as would be provided in real clinical situations [42].

MATERIALS USED TO OBTAIN TRACKS: THEIR ADVANTAGES AND DISADVANTAGES

An overview of the literature shows that in some experiments, the bottom of the track was lined with various kinds of materials, or the rat's hind feet were dipped or painted with various substances, in order to refine and improve the prints for walking track analysis.

De Medinaceli et al. [10] used an X-ray developer and film to observe the prints. Prior to Medinaceli's group, attempts to record the rat's footprints for gait analysis used Vaseline and white paper [32], or grease and polygraph chart paper [19, 20]. These techniques produce prints subject to error regarding the actual anatomy of the rat plantar surface. A complex technique requiring dye staining of paper has been reported by Lowdon et al. [27], in which water is utilized to produce a blue track image on yellow brown paper. Johnston et al. [22] suggested that the paint and paper method had many advantages over the original method of X-ray developer and film. The reported advantages are as follows: paper is more readily available than x-ray film; it is easier to cut and provides better traction; paint is a non-toxic agent and can be washed easily; the rat's feet are not chronically exposed to potentially caustic developer; slippage and print smearing are kept to a minimum; it is easy to visualize the paint of the plantar surface before the rat walks so that all the important anatomical structures will be imaged.

Westerga and Gramsbergen [41] introduced the use of a mirror to obtain two views of the rat's hind paw, the plantar and the side-view. A video recording technique to measure SFI was reported by Walker et al. [38] and Dijkstra et al. [13]. The rats are placed in a Perspex runway, and a single mirror placed at an angle of 45° below the animal, being filmed from the side. Each frame of the video image is selected from a non-hesitant step. The video analysis of standing was described by Bervar [4], to introduce a new functional loss index, in static conditions: the static sciatic index (SSI).

CONCLUSIONS

Standardization of track analysis will be essential in interlaboratory comparisons of data. While most reports have specified the Sprague-Dawley rat, it is reemphasized that the normative data should not be applied to other rat strains; rather, each laboratory should obtain normative data for the strain of *Rattus norvegicus*, such as Wistar or Lewis. We suggest that verification of SFI with other modified index formulas is important prior to use of these functional indices for rat strains available in the researcher's laboratory.

The use of walking track analysis provides a non-invasive method of assessing the functional status of the sciatic nerve during the regeneration process. Because proper walking requires coordinated function involving sensory input, motor response, and cortical integration, SFI may therefore be better than simply using basic electrophysiology and histomorphometry of axon growth and muscle reinnervation, if the research focus concerns functional outcome.

REFERENCES

- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA (1989) Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 83: 129–138.
- Banos JE, Verdu E, Buti M, Navarro X (1994) Effects of dizocilpine on autotomy behavior after nerve section in mice. *Brain Res*, 636: 107–110.
- Berenberg RA, Forman DS, Wood DK, DeSilva A, Demaree J (1977) Recovery of peripheral nerve function after axotomy: effect of triiodothyronine. *Exp Neurol*, 57: 349–363.
- Bervar M (2000) Video analysis of standing — an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods*, 102: 109–116.
- Carlton JM, Goldberg NH (1986) Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surg Forum*, 37: 611–614.
- Carr MM, Best TJ, Mackinnon SE, Evans PJ (1992) Strain differences in autotomy in rats undergoing sciatic nerve transection or repair. *Ann Plast Surg*, 28: 538–544.
- Chamberlain LJ, Yannas IV, Hsu HP, Strichartz GR, Spector M (2000) Near-terminus axonal structure and function following rat sciatic nerve regeneration through a collagen-GAG matrix in a ten-millimeter gap. *J Neurosci Res*, 60: 666–677.
- Coderre TJ, Grimes RW, Melzack R (1986) Autotomy following sciatic and saphenous nerve sections: sparing of the medial toes after treatment of the sciatic nerve with capsaicin. *Exp Neurol*, 91: 355–365.
- De Koning P, Gispen WH (1987) Org.2766 improves functional and electrophysiological aspects of regenerating sciatic nerve in the rat. *Peptides*, 8: 415–422.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ (1982) An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, 77: 634–643.
- Dellon AL, Mackinnon SE (1989) Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg*, 23: 197–202.
- Dellon ES, Dellon AL (1991) Functional assessment of neurologic impairment: track analysis in diabetic and compression neuropathies. *Plast Reconstr Surg*, 88: 686–694.
- Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A (2000) Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*, 96: 89–96.
- Gramsbergen A, J IJ-P, Meek MF (2000) Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of hindleg muscles. *Exp Neurol*, 161: 183–193.
- Gutmann E (1942) Factors affecting recovery of motor function after nerve lesions. *J Neurol Psychiatr*, 5: 81–95.
- Hadlock TA, Koka R, Vacanti JP, Cheney ML (1999) A comparison of assessments of functional recovery in the rat. *J Peripher Nerv Syst*, 4: 258–264.
- Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA (1992) Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg*, 89: 251–258.
- Hasegawa K (1978) A new method of measuring functional recovery after crushing the peripheral nerves in unanesthetized and unrestrained rats. *Experientia*, 34: 272–273.
- Hruska RE, Kennedy S, Silbergeld EK (1979) Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci*, 25: 171–179.
- Hruska RE, Silbergeld EK (1979) Abnormal locomotion in rats after bilateral injection of kainic acid. *Life Sci*, 25: 181–194.
- Insera MM, Bloch DA, Terris DJ (1998) Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery*, 18: 119–124.
- Johnston RB, Zachary L, Dellon AL, Seiler WAT, Teplica DM (1991) Improved imaging of rat hindfoot prints for walking track analysis. *J Neurosci Methods*, 38: 111–114.
- Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC (1996) Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*, 98: 1264–1271 (discussion 1272–1264).
- Kingery WS, Castellote JM, Maze M (1999) Methylprednisolone prevents the development of autotomy and neuropathic edema in rats, but has no effect on nociceptive thresholds. *Pain*, 80: 555–566.
- Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, Kuzon WM, Jr. (1997) The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve*, 20: 858–866.
- Lin FM, Pan YC, Hom C, Sabbahi M, Shenaq S (1996) Ankle stance angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery after complete transection. *J Reconstr Microsurg*, 12: 173–177.

27. Lowdon IM, Seaber AV, Urbaniak JR (1988) An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de Medinaceli. *J Neurosci Methods*, 24: 279–281.
28. Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP (1991) Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve*, 14: 1116–1122.
29. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA (1985) Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 75: 384–388.
30. Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R (1998) Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve*, 21: 1095–1097.
31. Rappaport ZH, Seltzer Z, Zagzag D (1986) The effect of glycerol on autotomy. An experimental model of neuropathic pain. *Pain*, 26: 85–91.
32. Rushton R, Steinberg H, Tinson C (1963) The effects of a single experience on subsequent reactions to drugs. *Br J Pharmacol*, 29: 99–102.
33. Sarikcioglu L, Oguz N (2001) Exercise training and axonal regeneration after sciatic nerve injury. *Int J Neurosci*, 109: 173–177.
34. Sporel-Ozkat RE, Edwards PM, Hepgul KT, Savas A, Gispens WH (1991) A simple method for reducing autotomy in rats after peripheral nerve lesions. *J Neurosci Methods*, 36: 263–265.
35. Urbanchek MS, Chung KC, Asato H, Washington LN, Kuzon WM, Jr. (1999) Rat walking tracks do not reflect maximal muscle force capacity. *J Reconstr Microsurg*, 15: 143–149.
36. van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, Helder PJ, Gispens WH (1997) Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*, 78: 70–77.
37. Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM (2001) Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*, 108: 1–9.
38. Walker JL, Evans JM, Meade P, Resig P, Siskin BF (1994) Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. *J Neurosci Methods*, 52: 47–52.
39. Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*, 7: 103–111.
40. Weber RA, Proctor WH, Warner MR, Verheyden CN (1993) Autotomy and the sciatic functional index. *Microsurgery*, 14: 323–327.
41. Westerga J, Gramsbergen A (1990) The development of locomotion in the rat. *Brain Res Dev Brain Res*, 57: 163–174.
42. Yao M, Inserra MM, Duh MJ, Terris DJ (1998) A longitudinal, functional study of peripheral nerve recovery in the mouse. *Laryngoscope*, 108: 1141–1145.
43. Zelle RT, Miller DW, Kenning JA, Hoenig EM, Buchheit WA (1989) Experimental peripheral nerve repair: environmental control directed at the cellular level. *Microsurgery*, 10: 290–301.

MORPHOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF THE WATERSHED ZONES AFTER STRIPPING OF THE VASA NERVORUM

**LEVENT SARIKCIOGLU
BAHADIR MURAT DEMIREL**

Akdeniz University
Faculty of Medicine, Department of Anatomy
Antalya, Turkey

NECDET DEMIR

Akdeniz University
Faculty of Medicine, Department of Histology and
Embryology
Antalya, Turkey

FATOS B. YILDIRIM

Akdeniz University
Faculty of Medicine, Department of Anatomy
Antalya, Turkey

ARIFE DEMIRTOP

Akdeniz University
Faculty of Medicine, Electron Microscopy Unit (TEMGA)
Antalya, Turkey

Received 3 November 2006.

The present study was supported by Akdeniz University Research Fund (project no: 2005.01.0103.010). The authors thank Mr. Oktay Kuru for his constrictive comments and help with this manuscript.

Address correspondence to Levent Sarikcioglu, Ph.D., Department of Anatomy, Akdeniz University Faculty of Medicine, 07070 Antalya, Turkey. E-mail: sarikcioglu@akdeniz.edu.tr, sarikcioglul@yahoo.com

NURETTIN OGUZ

Akdeniz University
Faculty of Medicine, Department of Anatomy
Antalya, Turkey

Peripheral nerve trunks are well-vascularized structures where a well-developed collateral system may compensate for local vascular damage. Vasculitis in nerve has a predilection for epineurial vessels and causes to the peripheral neuropathy, which is a major clinical feature of primary and secondary systemic vasculitides. In the present study, the goal was to simulate the vasculitic neuropathy in rat sciatic nerve and to investigate the watershed zones after stripping of the epineurial vessels of the sciatic nerve. Sciatic function index values, light and electron microscopic evaluations of the experimental sciatic nerve suggested that the sciatic nerve was normal except for some watershed zones located in the peripheral part of the nerve. Although there is abundant collateral circulation in the peripheral nerve, distribution of the vessels of the watershed zones as observed in the present study should be elucidated by further studies.

Keywords epineurial vessels, sciatic nerve, vasa nervorum, watershed zones

INTRODUCTION

Vasculitis in nerve has a predilection for epineurial vessels with diameters of 75 to 250 μm (Dyck et al., 1987; Hawke et al., 1991). Active lesions are characterized by predominant T cell and macrophage infiltration to affected nerves showing reduced myelinated nerve fiber density (with large fibers most susceptible), wallerian-like degeneration, and minimal demyelination/remyelination. Nerve fiber loss is typically asymmetric within and between fascicles (Collins & Kissel, 2003).

Special problems are incurred in the study of peripheral nerve ischemia. Unlike brain and heart, where ischemic effects are readily produced, peripheral nerve is relatively resistant because of its low energy needs and extensive anastomoses (Schmelzer et al., 1989).

Peripheral neuropathy is a major clinical feature of primary and secondary systemic vasculitides, often observed during the early phases of the disease and therefore carrying an important diagnostic value. The vasculitic processes defining these diseases may indeed affect the vasa nervorum and epineurial arteries and cause axonal neuropathy (Pagnoux & Guillemin, 2005). The identification of hypoxic mechanism of peripheral nerve disease supports a

need for investigation of distribution of vasa nervorum. In the present study, the goal was to simulate the vasculitic neuropathy in rat sciatic nerve and to investigate the watershed zones after stripping of the epineural vessels of the sciatic nerve.

MATERIALS AND METHODS

Animals

A total number of 24 male Wistar rats (200–250 gr) were randomly divided into two groups, control and experimental. The animals were housed in Makrolon cages (5 per cage) and maintained on a 12-h light-dark cycle; lights on from 7.00–19.00 h. Food and water were provided *ad libitum*. All procedures were reviewed and approved by Animal Care and Usage Committee of Akdeniz University.

Surgery

After being prepared for aseptic surgery, animals of the experimental group were anaesthetized with a mixture of xylazin HCl (15 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) via intramuscular injection. Left side of the hind limb was shaved and swabbed with an antiseptic solution. The sciatic nerve was exposed by lateral incision of the thigh and reflection of the superficial musculature. Careful blunt dissection was performed to isolate the sciatic nerve from the surrounding connective tissue over a length of 3 to 3.5 cm. Then, epineural vessels of the sciatic nerve (vasa nervorum) (Figure 1) was stripped for 2–2.5 cm by microdissection using two pairs of microforceps (TAAB, T302, and T145) and a trinocular operating microscope (Olympus SZ61, x150 to 200) with fiber optic illumination. Additionally, the sources of these vessels from the gluteal and popliteal tributaries were also ligated. After stripping was completed, two sutures were tied in the adjacent muscle to mark the border of the stripped areas. The wound was closed with a 2-0 Ethilon[®] suture and rats were allowed to recover.

Evaluation Tests

Walking Pattern Analysis. The return of motor function was monitored by analysis of the free walking pattern. The overall index of sciatic nerve function was used as a parameter to evaluate the recovery of coordinated motor function

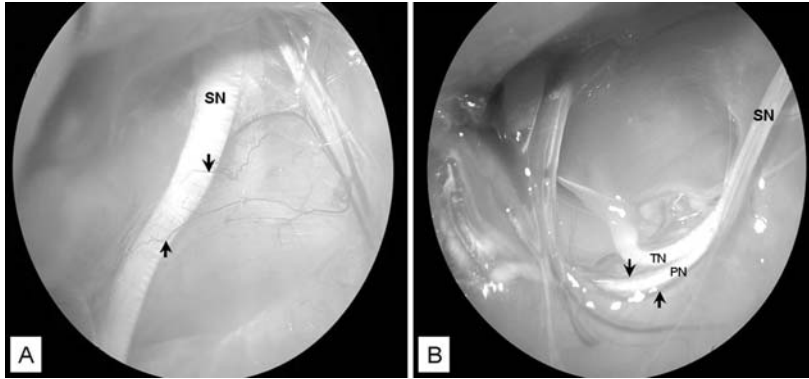


Figure 1. Blood supply of the sciatic nerve in the rat. **A:** Vasa nervorum originating from the gluteal vessels. **B:** Vasa nervorum originating from the popliteal vessels. Epineural vessels (arrows), sciatic nerve (SN), peroneal nerve (PN), tibial nerve (TN).

of the injured hind paw. The test procedure is as follows. After dipping the both hind feet of the rats in the ink, the rats were walked on a corridor (80 cm long, 7 cm wide, and inclining 10°) covered by a photocopy paper. From the footprints, sciatic function index (SFI) was calculated using the formula developed by Bain and colleagues (1989). The walking patterns were analyzed by weekly intervals starting on the day of surgery to second postoperative week by an experienced author (LS).

Sensory Function. The sensory functional recovery was analyzed by pinch test. Using a Yasargil aneurysm clip (Aesculap, FE-752 K), the lateral side of the foot of the animals was pinched. Animals showing withdrawal response to pinching were recorded.

Electron Microscopic Evaluation. At the end of the second postoperative week the animals were sacrificed. Then, a stripped part of the sciatic nerve was sampled and fixed with 4% glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen's phosphate buffer solution (pH:7.3). Then, it was post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffered solution and after dehydration through a graded series of ethanol. It was embedded in epoxy resin (Araldite CY212, Agar Scientific Ltd, Stansted, UK). Semi-thin sections were stained with toluidine blue and were examined with a light microscope (Olympus CX41). Afterwards, ultrathin sections (400–600 \AA) were contrasted with uranyl acetate and lead

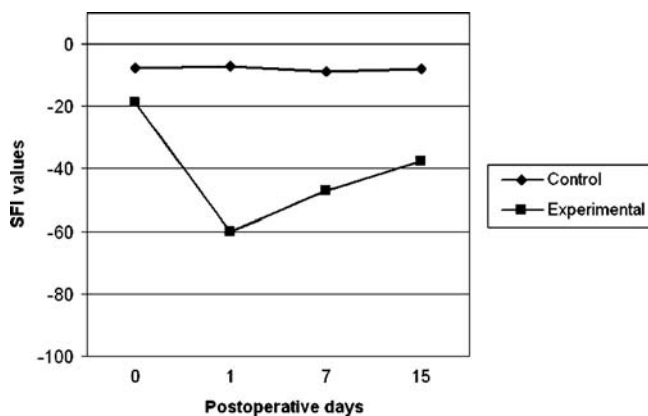


Figure 2. SFI values of the control and experimental groups.

citrate and finally examined with Zeiss LEO 906E transmission electron microscope.

Data Analysis

All measurements were carried out in a blind fashion. Data obtained from the free walking patterns are expressed as mean SFI for each group. All statistical analyses were done by using SPSS (version 10.0) for PC. Differences were considered to be statistically significant at the $p < .05$ level.

RESULTS

SFI Values

The print length (PL) of the animals was longer, toe spreading and intermediate toe spreading narrower on the experimental animals. Before surgery, SFI values of the experimental group showed no significant difference ($t: 0.79, df: 18, p > .05$) compared with the control group. On the following day of the surgery (postoperative day 1), the SFI values were -7.12 ± 0.6 , and -60.12 ± 5.11 for control and experimental groups, respectively. The SFI levels were recovered to the -50 values at postoperative day 5 in the experimental group (Figure 2). Significant differences were observed between control and experimental groups in postoperative days 1 ($t: 31.85, df: 18, p < .05$), 7 ($t: 55.46, df: 18, p < .05$), and 15 ($t: 55.57, df: 18, p < .05$).

Onset Day of Withdrawal to Pinching

All experimental animals showed withdrawal to pinching in every postoperative days. There was no significant difference between control and experimental group ($X^2: 0, df: 1, p > .05$).

Autotomy

No animals in the experimental and control groups showed autotomy.

Light and Electron Microscopic Evaluations

Light microscopic evaluation of sciatic nerve of the control group revealed normal peripheral nerve structure that consisted of myelinated and unmyelinated fibers, and did not show myelin deformation and damaged fibers. Light microscopic evaluations of the sciatic nerve of experimental group revealed that some watershed zones located especially in the peripheral part of the sciatic nerve were observed (Figure 3). The watershed zones showed fascicular localization where they contained numerous damaged myelinated fibers (Figure 4). Fascicles in central part of the sciatic nerve of experimental group had intact nerve fibers and normal endoneurium structure. Electron microscopic observation supported the aforementioned findings. Electron microscopic evaluations on the watershed areas of experimental group revealed endoneurial proteolysis, demyelination, and numerous macrophage infiltrations. The endoneurium, perineurium, and axons showed severe deformation. Collagen and reticular fibrils in interfibrillar endoneurium were not recognized. Their normal fibrillar structure and bundle organization were lost. There were numerous myelin residues in the cytoplasm of active Schwann cells and macrophages. The cytoplasm of the active Schwann cells had numerous mitochondrion, myelin debris (Figure 5).

DISCUSSION

Peripheral nervous system involvement in vasculitides typically results from focal or multifocal axonal ischemia caused by vasculitis of the vasa nervorum in the branches of small epineurial vessels. Under normal conditions, the nervous system is supposed to be protected from immunologic attack by the blood–brain and blood–nerve barriers. However, the peripheral nerves are affected frequently and early in vasculitides, which might be explained by the

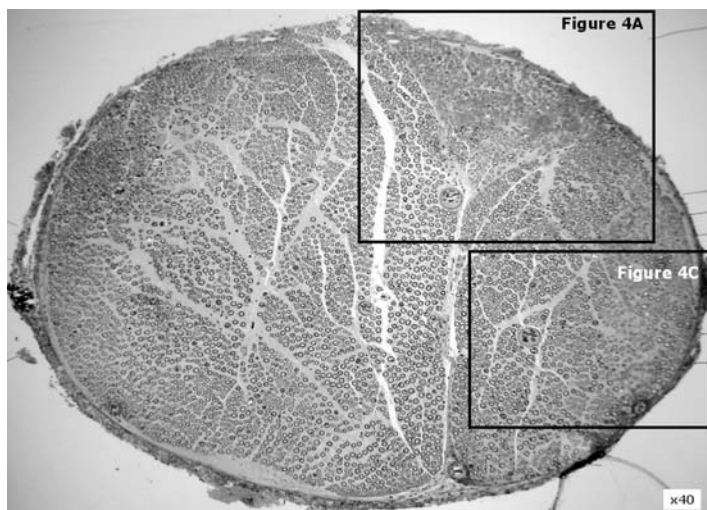


Figure 3. Photomicrograph showing watershed zones in sciatic nerve after epineurial vessels stripping. Rectangular lines show areas illustrated in panels of the Figure 4.

breakdown of the blood–nerve barrier at the precise level of epineurial vessels, in contrast with endoneurial vessels (Lundborg, 1975; Younger, 2004).

Ischemic neuropathy is an indirect sign of vasculitis and is characterized by a predominantly axonal type of degeneration with often more than 55% fiber loss (Fressinaud et al., 2003) and patchy fascicular involvement. Castaigne et al. (1984) reported that lesions are located in the less vascularized nerve parts, that is, predominantly in the fascicle center, which is more vulnerable to ischemia. However, the results of the present study indicated that there were subperineurial demyelination not centrifascicular.

Sladky et al. (1985) performed an acute occlusion of the femoral artery and found reduced regional sciatic blood flow. They observed that the flow was especially depressed within the endoneurial core of the proximal posterior tibial branch, which lies in a watershed zone between adjacent segmental arterial fields. They attributed the centrifascicular distribution of nerve infarcts to the topography of the arterial supply to nerves and their abundant collateral circulation. Nukada et al. (1993) also studied morphologic changes after ligation of the femoral, internal iliac, or superior gluteal arteries at various levels and identified watershed zones. Femoral artery ligation produced the most severe ischemia, focally reducing nerve blood flow by 80% in the tibial nerve at a level just below the knee. Within these ischemic nerve segments there were

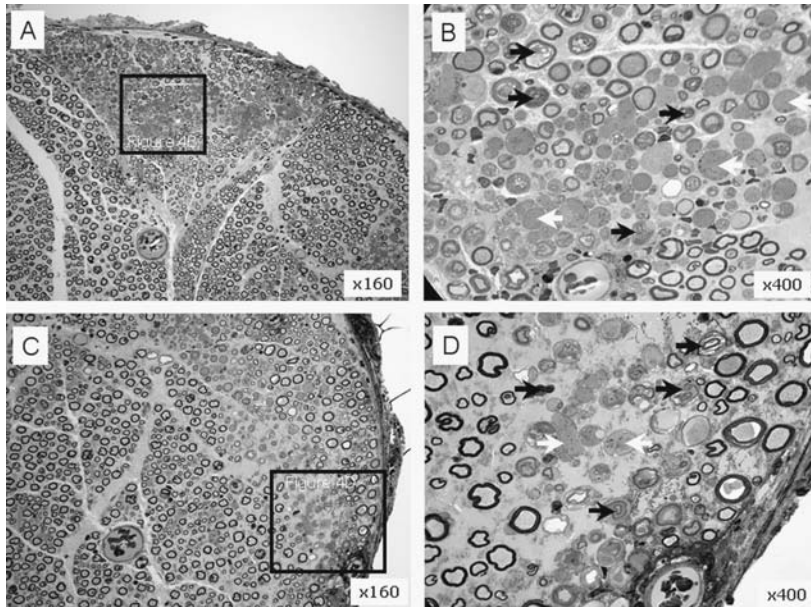


Figure 4. Magnification of the selected portions in the Figure 3. **A:** Magnified view of the upper-right portion of the Figure 3 shows the degeneration of the peripheral fascicle. **B:** Magnified rectangular area illustrated in Figure 4A. There were numerous degenerated myelin sheaths (black arrows) and active Schwann cells (white arrows). **C:** Lower-right portion of the sciatic nerve as shown in Figure 3, **D:** Magnification of the area illustrated in Figure 4C. Black arrows: Degenerated myelin sheaths, white arrows: Active Schwann cells.

degenerative changes of nerve fibers seen mainly in the subperineurial region. During another pilot study of the present research, the authors compressed the common iliac artery over 30 or 60 minutes and found no evidence of ischemic injury due to insult of the sciatic nerve (unpublished data). It is thought that further studies should be performed to understand the real mechanism.

Using laser Doppler measurements of nerve blood flow and electron microscopy, Myers et al. (1991) determined that removal of the vasa nervorum from the surface of rat peripheral nerve results in an immediate reduction in nerve blood flow and subsequent subperineurial demyelination. They also reported Wallerian degeneration in fibers surrounding central endoneurial vessel. They suggested that ischemia is the mechanism for subperineurial fiber injury after epineurial devascularization and highlighted the importance of the transperineurial vessels, which connect the epineurial anastomotic circulation

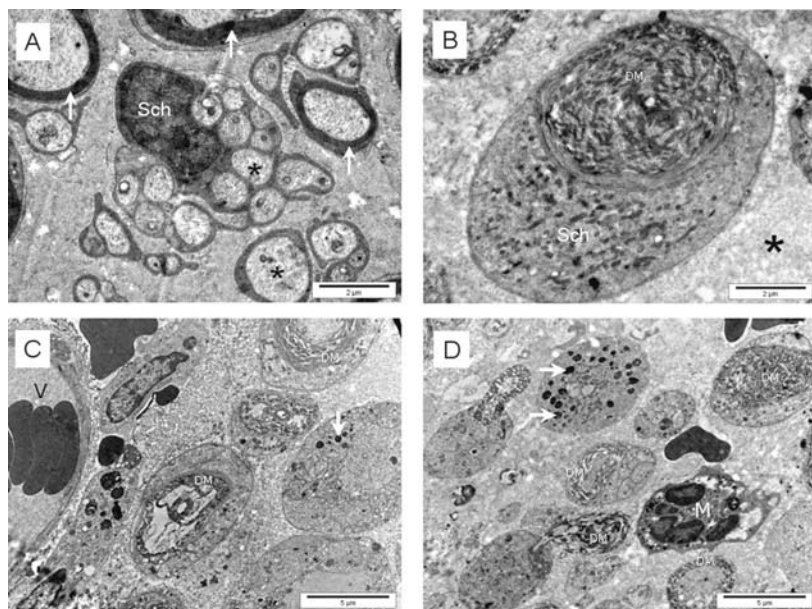


Figure 5. Electron micrographs of the sciatic nerve. **A:** Normal sciatic nerve with intact myelinated (white arrows) and unmyelinated fibers (*). **B:** An active Schwann cell (Sch) with degenerated myelin sheath (DM) and several mitochondria in the cytoplasm (arrows). Note that Collagen and reticular fibrils in interfibrillar endoneurium were not recognized (*). **C, D:** Degenerated myelinated fibers (DM) with numerous myelin residues (white arrows) in the active Schwann cells and macrophages (M). Vessel (V).

and endoneurial capillary network. Approximately normal appearance of the sciatic nerve except for watershed zones was supported by the SFI values. It is thought that the parts (print length, toe spreading, intermediate toe spreading) of the SFI calculation were also not totally affected from the stripping of the vasa nervorum. SFI values, light and electron microscopic evaluations of the experimental sciatic nerve were suggested that the sciatic nerve were not totally normal. Although there is a well-developed collateral system in the peripheral nerve (Lundborg, 1988), distribution of the vessels of these watershed zones as observed in the present study should be elucidated by further studies. Myers et al. (1991) reported that vessels entering the endoneurium from the epineurium give off immediate and repeated branches in the subperineurial region. Because the authors stripped the epineurial vessels around the sciatic nerve and ligated the source of these vessels from the gluteal and popliteal tributaries, appearance of the watershed zones in the peripheral parts of the

nerve after vascular stripping should be due to existence of the vessels that entered either from the lower part of the popliteal vessels or upper part of the gluteal vessels. It is thought that studies focusing on that issue might answer the configuration of the vascular network inside the sciatic nerve and give valuable knowledge about ischemic and vasculitic neuropathy.

REFERENCES

- Bain, J. R., Mackinnon, S. E., & Hunter, D. A. (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic Reconstructive Surgery*, *83*, 129–138.
- Castaigne, P., Brunet, P., Hauw, J. J., Leger, J. M., Gherardi, R., & Guillevin, L. (1984). Systeme nerveux peripherique et panarterite noueuse: Revue de 27 cas. *Revue Neurologique*, *140*, 343–352.
- Collins, M. P., & Kissel, J. T. (2003). Vasculitis of the peripheral nervous system. In Noseworthy J. & Dyck, P. J., eds. *Neurological therapeutics: Principles and practice* (pp. 2079–2110). London: Martin Dunitz Ltd.
- Dyck, P. J., Benstead, T. J., Conn, D. L., Stevens, J. C., Windebank, A. J., & Low, P. A. (1987). Nonsystemic vasculitic neuropathy. *Brain*, *110*(Pt 4), 843–853.
- Fressinaud, C., Jean, I., & Dubas, F. (2003) Necrotizing vasculitis of the peripheral nervous system: Comparison of the axon cytoskeleton abnormalities with other types of neuropathies. *Revue Neurologique*, *159*, 293–299.
- Hawke, S. H., Davies, L., Pamphlett, R., Guo, Y. P., Pollard, J. D., & McLeod, J. G. (1991). Vasculitic neuropathy. A clinical and pathological study. *Brain*, *114*(Pt 5), 2175–2190.
- Lundborg, G. (1975). Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. *Journal of Bone and Joint Surgery*, *57*, 938–948.
- Lundborg, G. (1988). Intraneural microcirculation. *Orthopedic Clinics of North America*, *19*, 1–12.
- Myers, R. R., Heckman, H. M., Galbraith, J. A., & Powell, H. C. (1991). Subperineurial demyelination associated with reduced nerve blood flow and oxygen tension after epineurial vascular stripping. *Laboratory Investigation*, *65*, 41–50.
- Nukada, H., Powell, H. C., & Myers, R. R. (1993). Spatial distribution of nerve injury after occlusion of individual major vessels in rat sciatic nerves. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *52*, 452–459.
- Pagnoux, C., & Guillevin, L. (2005). Peripheral neuropathy in systemic vasculitides. *Current Opinion in Rheumatology*, *17*, 41–48.
- Schmelzer, J. D., Zochodne, D. W., & Low, P. A. (1989). Ischemic and reperfusion injury of rat peripheral nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*, 1639–1642.

Sladky, J. T., Greenberg, J. H., & Brown, M. J. (1985). Regional perfusion in normal and ischemic rat sciatic nerves. *Annals of Neurology*, *17*, 191–195.

Younger, D. S. (2004). Vasculitis of the nervous system. *Current Opinion in Neurology*, *17*, 317–336.