

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**METİLKOBALAMİN ve TAKROLİMUS İÇEREN POLİKAPROLAKTON
(PCL) NANOFİBERLERİN PERİFERİK SİNİR REJENERASYONUNA
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr.Mahmut TEKECİK
UZMANLIK TEZİ

KONYA
2023

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**METİLKOBALAMİN ve TAKROLİMUS İÇEREN POLİKAPROLAKTON
(PCL) NANOFİBERLERİN PERİFERİK SİNİR REJENERASYONUNA
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr.Mahmut TEKECİK
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. ZEYNEP ALTUNTAŞ

KONYA
2023

TEŞEKKÜR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği'nde geçirdiğim 5 senenin ardından tezimi tamamlamış bulunuyorum. Bana bu süreçte destek olan herkese teşekkür ederim.

Meram Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Kliniği'nin kurucusu, bizlere eğitim hayatımız boyunca her türlü fırsatı değerlendirmemizde konusunda destek olan ve engin tecrübelerini aktaran Anabilim Dalı başkanımız **Prof.Dr. Nedim Savacı**'ya ,

Sıcakkanlı ve güleryüzlü yaklaşımıyla hem akademik hem de kişisel gelişimime katkıda bulunan, estetik cerrahi ameliyatlarına bakış açımı geliştiren tez danışmanım **Prof.Dr.Zeynep Altuntaş**'a,

Akademik konulardaki tecrübeleri ile bizleri her zaman bilimselliğe ve araştırmaya teşvik eden, fikirleri ve öğrettikleri ile neler başarabileceğimiz konusunda ufukumuzu genişleten **Prof.Dr.Bilsev İnce**'ye ,

Plastik cerrahi vakalarında en uygun ve doğru kararı verebilmemiz için bizlere farklı bakış açıları kazandıran , başımız sıkıştığında cerrahi tecrübesi ile bizlere destek olup güvende hissettiren **Prof.Dr.Mehmet Dadacı**'ya ,

Kliniğe ilk başladığım günden beri bana destek olup bilgilerini aktaran kıdemlilerim ; **Dr.Mehmet Emin Cem Yıldırım**'a, **Dr.Majid İsmayılzade**'ye, **Dr.Orkun Uyanık**'a , **Dr. Münür Selçuk Kendir**'e , **Dr. Zikrullah Baycar** 'a, **Dr. Pınar Öztürk**'e, birlikte birçok anı paylaştığım bu süreçte yan yana yürüdüğüm eş kıdemlilerim **Dr.Moath Zuhour** ve **Dr.Arda Soylu**'ya ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım **Dr.Hayri Ahmet Burak Nursen**'e, **Dr.Orhan Gök**'e, **Dr.Melikhan Tatar**'a, **Dr.Ahmet Koyuncu**'ya, **Dr.Yiğitcan Kaya**'ya,**Dr.Kadir Tezer**'e, **Dr.Cansu Baş**'a, **Dr.Zekeriya Aktar**'a, **Dr.Mutlu Soy**'a, **Dr.Ferhat Açılan**'a, **Dr.Betül Şahin**'e ,

Tezimin histopatolojik değerlendirmesini yapan **Doç.Dr.Sıdıka Fındık**'a, tezimin istatistiksel değerlendirmesini yapan **Doç.Dr.Mehmet Uyar**'a ,

Hayatım boyunca benden hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen ne olursa olsun yanımda olan aileme ,

Bazen zorlu ve yorucu olan bu süreçte hep yanımda olan , bana destek olup cesaret veren yol arkadaşım biricik eşim **Dr. Zülal Taflıoğlu Tekecik**'e

Teşekkür ederim.

ÖZET

Periferik sinir yaralanmaları sık görülen; etkilenen hasta grubunda, duyuşsal ve motor fonksiyonlarda kayba neden olabilen bir durumdur. Kusursuz yapılan cerrahiler sonrasında bile motor ve duyuşsal fonksiyonlarda tatmin edici sonuçlara ulaşılamayabilir. Periferik sinir yaralanmalarının tam olarak iyileşmemesi genellikle etkilenen uzuvlarda uyuşma, kronik ağrı , duyuşsal ve/veya motor fonksiyonlarda azalma gibi birçok olumsuz sonuca yol açmakta ve bu nedenlerle periferik sinir yaralanmaları dünya çapında bir klinik sorun teşkil etmektedir. Tam anlamıyla başarılı olarak uygulanabilecek farmakolojik ajanın bulunması için güncel araştırmalar bu yöne doğru evrilmiştir. Bu araştırmalardan bir tanesi de nanoteknoloji ve bu yöntemle üretilen nanomateryallerdir. Çalışmamızda periferik sinir rejenerasyonuna farklı mekanizmalar üzerinden katkı yapan metilkobalamin ve takrolimus içeren nanofiber sinir sargılarının etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Her grupta 8'er adet sıçan olacak şekilde 6 grup oluşturularak işlemler gerçekleştirildi. Tüm gruplarda anestezi altında sıçanların sol siyatik siniri dorsal yaklaşım ile explore edildi ve Grup 1 hariç diğer tüm gruplarda sol siyatik trifurkasyonunun 1 cm proximalinde mikroskop altında mikromakas ile tam kat düz kesi yapıldı. Kesi sonrası aynı seansta siyatik sinir 9/0 nylon dikişler ile epinöral onarım yapılarak koaptasyon sağlandı. Grup 2 için sadece epinöral onarım yapıldı. Grup 3 için epinöral onarım hattı etrafına elektro-eğirme yöntemi ile üretilen PCL sinir sargısı sarıldı. Grup 4 için epinöral onarım hattı etrafına içerisinde Metilkobalamin bulunan, Grup 5 için Takrolimus bulunduran, Grup 6 için hem Metilkobalamin hem de Takrolimus bulunduran PCL nanofiber sinir sargıları sarıldı. Sıçanlar 8 hafta süre ile takip edildi. Sıçanlar sakrifiye edilmeden önce fonksiyonel değerlendirme için yürüme testi ve elektrofizyolojik değerlendirmeler yapıldı. Sakrifikasyon anestezi altında gerçekleştirildikten sonra sol siyatik sinirden örnek alınarak histopatolojik inceleme yapıldı. Bilateral gastroknemius kasları origo-insersiyolarından ayrılarak hassas laboratuvar terazisi ağırlıkları ölçüldü ve gastroknemius kas ağırlık indeksi hesaplandı.

8. hafta sonunda yapılan değerlendirmelerde siyatik sinirde tam kat kesi yapılarak cerrahi işlem uygulanan gruplar arasında en iyi SFI değeri Grup 4'te bulundu. Siyatik sinirde tam kat kesi yapılarak cerrahi işlem uygulanan gruplar arasında sham grubuna en yakın, en iyi gastroknemius kas ağırlık indeksi değerleri Grup 4 ve 5 'te bulundu. Grup 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.600$). Grup 1'den Grup 6'ya sırasıyla ortalama latans süreleri; $1,42\pm 0,13$, $2,15\pm 0,47$, $1,83\pm 0,22$, $1,63\pm 0,22$, $1,74\pm 0,25$, $1,82\pm 0,16$ ms olarak bulundu. Grup 1'den Grup 6'ya sırasıyla ortalama amplitüd değerleri; $11,91\pm 2,30$, $3,59\pm 0,76$, $4,86\pm 3,71$, $9,27\pm 2,41$, $7,75\pm 2,51$, $5,62\pm 3,37$ mV olarak bulundu. Histopatolojik değerlendirmede ortalama fibrozis değeri Grup 5'te en düşük olarak bulundu. İnflamasyona bakıldığında Grup 5 ve 6'da diğer gruplara göre daha az inflamasyon görüldü. Grup 4 ve 5'te aksonal dejenerasyon derecesi %50'den fazla olan sıçan görülmeydi. Ortalama vaskülarizasyon değerinin en yüksek Grup 3'te olduğu ve Grup 4,5 ve 6'nın da benzer vaskülarizasyon değerlerine sahip olduğu görüldü. Gruplar mm^2 'deki aksonal yoğunluk açısından karşılaştırıldığında en fazla ortalama akson sayısının Grup 5'te olduğu görüldü. Fasiküler organizasyon bozukluğunun siyatik sinire tam kat kesi yapılarak cerrahi işlem uygulanan gruplar arasında en az Grup 4'te olduğu görüldü. Grup 4'te %50 fazla fasiküler organizasyon bozukluğu bulunan sıçan görülmeydi.

Sonuç olarak hem metilkobalamin hem takrolimus içeren nanofiber sinir sargılarının ayrı ayrı kullanıldığında fonksiyonel ve histopatolojik olarak sinir rejenerasyonuna olumlu katkıda bulunduğu görüldü. İki ajan fonksiyonel ve histopatolojik olarak karşılaştırıldığında sinir rejenerasyonu açısından birbirlerine belirgin üstünlüğü olmadığı görüldü. Metilkobalamin ve takrolimusun birlikte kullanımının sinir rejenerasyonu üzerinde sinerjistik bir etki yaratmadığı ve sinir iyileşmesi için olumlu katkıları bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı gözlemlendi.

AnahtarKelimeler: metilkobalamin, nanofiber, periferik sinir rejenerasyonu polikaprolakton, sinir sargısı, takrolimus

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries are common and can cause loss of sensory and motor functions in the affected patient group. Even after successful surgeries, satisfactory results in motor and sensory functions may not be achieved. Incomplete healing of peripheral nerve injuries often leads to many adverse consequences such as numbness, chronic pain, and decreased sensory and/or motor function in the affected limbs, and for these reasons, peripheral nerve injuries constitute a worldwide clinical problem. Current research has evolved in this direction in order to find a pharmacological agent that can be successfully administered. One of these researches is nanotechnology and nanomaterials produced with this method. In our study, we aimed to compare the effects of nanofiber nerve wraps containing methylcobalamin and tacrolimus, which contribute to peripheral nerve regeneration through different mechanisms.

Six groups were constituted with 8 rats in each group and the studies were performed. The left sciatic nerve of rats was explored by dorsal approach under anesthesia in all groups. In all groups except Group 1, a full-thickness straight transection was performed with micro scissors 1 cm proximal to the left sciatic trifurcation under the microscope. After the transection, epineural repair of the sciatic nerve was performed with 9/0 nylon sutures in the same session and coaptation was achieved. For Group 2, only epineural repair was performed. For group 3, PCL nerve wrap produced by electrospinning method was wrapped around the epineural repair site. PCL nanofiber nerve wraps containing Methylcobalamin for Group 4, Tacrolimus for Group 5 and both Methylcobalamin and Tacrolimus for Group 6 were wrapped around the epineural repair site. The rats were followed up for 8 weeks. Before the rats were sacrificed, walking track test and electrophysiologic evaluations were performed for functional assessment. After sacrifice under anesthesia, the left sciatic nerve was sampled for histopathological examination. Bilateral gastrocnemius muscles were separated from their origo-insertions and weights were measured on a sensitive laboratory scale and gastrocnemius muscle weight index was calculated.

At the end of the 8th week, the best SFI value was found in Group 4 among the groups that underwent surgical procedure with a full-thickness transection of the sciatic nerve. The highest and best gastrocnemius muscle weight index values were found in Groups 4 and 5, which were closest to the sham group among the groups that underwent surgical procedure by making a full-thickness transection in the sciatic nerve. There was no statistically significant difference between Groups 4 and 5 ($p=0.600$). The mean latency periods from Group 1 to Group 6 were 1.42 ± 0.13 , 2.15 ± 0.47 , 1.83 ± 0.22 , 1.63 ± 0.22 , 1.74 ± 0.25 , 1.82 ± 0.16 ms, respectively. The mean amplitude values from Group 1 to Group 6 were 11.91 ± 2.30 , 3.59 ± 0.76 , 4.86 ± 3.71 , 9.27 ± 2.41 , 7.75 ± 2.51 , 5.62 ± 3.37 mV, respectively. In histopathological assessment, the mean fibrosis value was found to be the lowest in Group 5. When inflammation was evaluated, less inflammation was observed in Groups 5 and 6 compared to the other groups. In Groups 4 and 5, there were no rats with more than 50% axonal degeneration. Group 3 had the highest mean vascularization value and Groups 4, 5 and 6 had similar vascularization values. When the groups were compared in terms of axonal density per mm^2 , the highest mean axon number was seen in Group 5. Fascicular disorganisation was found to be the least in Group 4 of the groups that underwent surgery with full-thickness transection of the sciatic nerve. In group 4, there were no rats with more than 50% fascicular disorganisation.

In conclusion, nanofiber nerve wraps containing either methylcobalamin or tacrolimus contributed favorably to nerve regeneration functionally and histopathologically when used separately. When the two agents were compared functionally and histopathologically, no significant superiority was observed in terms of nerve regeneration. It was observed that the combined use of methylcobalamin and tacrolimus did not have a synergistic effect on nerve regeneration and did not result in a statistically significant difference, although there were positive contributions to nerve regeneration.

Keywords: methylcobalamin, nanofiber, nerve wrap, peripheral nerve regeneration, polycaprolactone, tacrolimus

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER.....	xi
TABLOLAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sinir Sistemi.....	3
2.2. Periferik Sinir Sistemi (PSS).....	3
2.2.1. Periferik Sinir Anatomi ve Histolojisi.....	3
2.3. Periferik Sinir Yaralanmaları.....	7
2.3.1. Periferik Sinir Yaralanmaları Sınıflandırması	10
2.4. Periferik Sinir Cerrahisi	13
2.5. Periferik Sinir Rejenerasyonunda Nanofiber Materyal Kullanımı	16
2.5.1. Polikaprolakton(PCL)	17
2.5.2. Takrolimus (FK506)	18
2.5.3. Metilkobalamin.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Gruplandırılması	20
3.2. Nanofiber Sinir Sargılarının Üretimi ve Özellikleri.....	22
3.3. Anestezi.....	26
3.4. Cerrahi Yöntem.....	26
3.5. Sinir Rejenerasyonu Değerlendirme Yöntemleri	28
3.5.1. Yürüme testi	28
3.5.2. Elektrofizyolojik Ölçümler.....	29
3.5.3. Gastroknemius Kas İndeksi	30
3.5.4. Histopatolojik Değerlendirme	32
3.6. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Makroskopik Bulgular	35
4.2. Yürüme Testi	35
4.3. Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi	36
4.4. Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları.....	38

4.5.Histopatolojik Değerlendirme Bulguları	40
5.TARTIŞMA.....	49
6.SONUÇ.....	58
7.KAYNAKLAR	59

KISALTMALAR

CMAPs: Compound Muscle Action Potentials (Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli)

DMF:Dimetilformamid

EMG:Elektromiyografi

FK506 : Takrolimus

FDA : U.S. Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi)

FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

H&E: Hemotoksilen&Eozin

ITS: Intermediate Toe Spread (Adım Ortası Genişlik)

MSS : Merkezi Sinir Sistemi

MTK:Masson Trikrom

NGF: Nerve Growth Factor

PCL : Polikaprolakton

PSS : Periferik Sinir Sistemi

PLA: Polilaktikasit

PLGA:Poli-laktik ko-glikolik asit

PGA: Poliglikolikasit

SFI: Siyatik Fonksiyonel İndeks

PL: Print Lenght (Bası Uzunluğu)

TEM: Taramalı Elektron Mikroskopi

TS: Toe Spread (Adım Genişliği)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

ŞEKİLLER

Şekil 1. Periferik Sinir Anatomisi Şematik Çizim.....	4
Şekil 2. Standart nöron yapısı	5
Şekil 3. Nöronların şekillerine göre sınıflandırılması.....	5
Şekil 4. Periferik sinir yapısı	6
Şekil 5. Periferik sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu şematik çizim	9
Şekil 6. Periferik sinir yaralanmaları sınıflandırması şematik çizim	13
Şekil 7. Epinöral Sinir Onarımı Şematik Gösterimi	15
Şekil 8. Fasiküler Sinir Onarımı Şematik Gösterimi	15
Şekil 9. Grupların şematik gösterimi	22
Şekil 10. Üretimi yapılan nanofiber materyallerden örnekler	24
Şekil 11. TEM görüntüleri	25
Şekil 12. Su kontakt açıları,FTIR spektroskopisi analizi,Biyobozunurluk oranları	25
Şekil 13. Sol siyatik sinir diseksiyonu	27
Şekil 14.Siyatik sinirde epinöral onarım ve nanofiber sinir sargısının sarılması	27
Şekil 15. SFI hesaplamasında kullanılan değerlerin sıçan ayak izi üzerindeki şematize görüntüsü.....	29
Şekil 16.Gastroknemius kas diseksiyonu ve kasın ortaya konması	31
Şekil 17. Gastroknemius kas ağırlıklarının ölçülmesi	31
Şekil 18. Gruplara göre SFI ortalama değerleri grafiği	35
Şekil 19. Gruplara göre Gastroknemius kas ağırlık indeksi değerleri grafiği.....	37
Şekil 20. Gruplara göre ortalama latans süreleri grafiği	38
Şekil 21. Gruplara göre ortalama amplitüd değerleri grafiği	39
Şekil 22. Histopatolojik ödem görüntüleri.....	41
Şekil 23. Histopatolojik fibrozis görüntüleri.....	42
Şekil 24. Histopatolojik inflamasyon görüntüleri	43
Şekil 25. Histopatolojik yabancı cisim reaksiyonu görüntüleri	44
Şekil 26. Aksonal dejenerasyon derecesine göre gruplardaki sıçan sayısı	45
Şekil 27. Histopatolojik aksonal dejenerasyon görüntüleri	45
Şekil 28. Histopatolojik vaskülarizasyon görüntüleri.....	46
Şekil 29. Gruplara göre mm ² ‘deki ortalama akson sayıları.....	47
Şekil 30. Disorganizasyon derecelerine göre gruplardaki sıçan sayısı.....	48
Şekil 31. Histopatolojik fasiküler organizasyon bozukluğu görüntüleri.	48

TABLÖLAR

Tablo 1. Histopatolojik Değerlendirme Kriterleri.....	33
Tablo 2. Gruplara göre dem, fibrozis, inflamasyon ve yabancı cisim reaksiyonu sonuçlarının ortalama \pm standart deviasyon değerleri.....	40
Tablo 3. Gruplara göre dem, aksonal dejenerasyon, vaskularizasyon, akson yoğunluğu ve disorganizasyon sonuçlarının ortalama \pm standart deviasyon değerleri.....	41

1. GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmaları sık görülen; etkilenen hasta grubunda, duyuşal ve motor fonksiyonlarda kayba neden olabilen bir durumdur. Periferik sinir yaralanmalarında en sık sebep travma olmakla birlikte enfeksiyon, iskemi, iyonize radyasyon, eksternal kompresyon, zor doğum, inflamasyon gibi durumlar diğer yaralanma nedenleri olarak gösterilebilir. Periferik sinir yaralanması multitravma hastalarında %2.8'lik insidansa sahiptir (1,2).

Periferik sinirde travma sonrası birçok morfolojik, metabolik ve patofizyolojik değişiklik meydana gelmektedir. Bu değişiklikler yalnızca hasar bölgesinde değil, sinir gövdesinde, hasarın proksimal ve distalindeki segmentlerde, sinir lifinin sonlandığı nöromusküler kavşak veya duyu reseptörlerinde de görülmektedir (3). Periferik bir sinirde iyileşme süreci rejener olmuş aksonların periferdeki hedef organlarla fonksiyonel bağlantı kurması ile sonlanmaktadır. Schwann hücreleri rejenerasyon safhasında önemli bir yer tutmaktadırlar. Her ne kadar yaralanan periferik sinirlerin rejenerasyon kapasitesi olsa da , aksonal rejenerasyon 1-3 mm/gün olarak yavaş ilerlemektedir (4). Bu nedenle yaralanma hedef organa uzak olduğunda fonksiyonel sonuçlar zayıf olmaktadır (5).

Mikrocerrahi yöntemlerindeki gelişmeler ve nörobiyolojik araştırmalara rağmen; sinir uçları arasında küçük defekt olduğunda veya keskin cisimle meydana gelen şiddetli nörotmeziste mikrosüturlarla yapılan epinöral sinir onarımı halen altın standart olarak kabul edilmektedir (6). Kusursuz yapılan cerrahiler sonrasında bile motor ve duyuşal fonksiyonlarda tatmin edici sonuçlara ulaşamayabilir. Periferik sinir yaralanmalarında tam anlamıyla başarılı olarak uygulanabilecek farmakolojik ajanın bulunması için güncel araştırmalar bu yöne doğru evrilmiştir. Bu araştırmalardan bir tanesi de nanoteknoloji ve bu yöntemle üretilen nanomateryallerdir. Nanoteknoloji son yıllarda periferik sinir rejenerasyonunda önemli rol oynamakta olup nanofiberlerin aksonal büyüme katkı sağlayabileceği gösterilmiştir (7).

Polikaprolakton (PCL) biyobozunur polimerlerden biridir. Bu polimerlerden elektro-eğirme yöntemiyle üretilen nanofiberler özellikle nanofiber yapılu doku iskeleleri olarak sıklıkla kullanılmaktadır. PCL kabul edilebilir mekanik mukavemeti olan, kolay polimer işlenebilirliğe ve kontrol edilebilir bozulma oranına sahip biyobozunur sentetik bir polimerdir. Polikaprolakton (PCL) nanofiberler diğer materyallere göre avantajlı olup biyouyumlu, biyobozunur ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylıdır (8).

Metilkobalamin bir vitamin B12 analogu olup, sinir rejenerasyonuna ve fonksiyonel iyileşmeye katkı sağladığı bildirilmiştir (9). Takrolimus'un (FK506) lokal kullanımda sistemik yan etkilerden kaçınarak fonksiyonel sinir rejenerasyonunu artıran etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (10).

Literatürde son yıllarda nanoteknoloji ile üretilen nanomateryallerin sinir iyileşmesine etkilerini araştıran çalışmaların sayısı artmaya başlamıştır. Metilkobalamin ve takrolimusun sinir rejenerasyonuna yaptığı etkiler farklı çalışmalarda değerlendirilmesine karşın polikaprolakton polimer üzerine eklenerek birlikte kullanımının ve ayrı ayrı kullanılarak fonksiyonel, histopatolojik, elektrofizyolojik etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmaya literatürde rastlamadık. Çalışmamızda periferik sinir rejenerasyonuna farklı mekanizmalar üzerinden katkı yapan metilkobalamin ve takrolimus içeren nanofiberlerin etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi

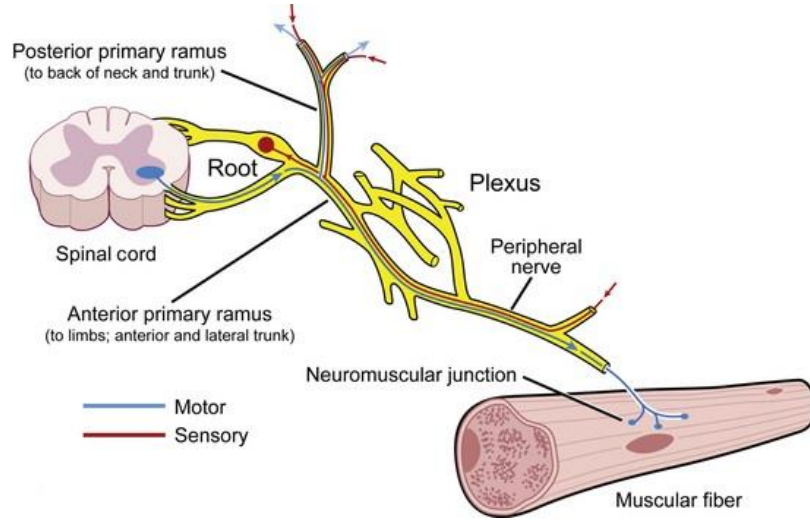
Sinir sistemi merkezi ve periferik olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Merkezi sinir sistemi (MSS) , beyin ve medulla spinalisten oluşurken; bu kısımlar dışındaki bütün sinir hücreleri ve uzantıları periferik sinir sistemine dahil edilmektedir. Merkezi sinir sistemi duyu bilgilerin alınması, işlenmesi ve yanıtlanmasından sorumludur (11). Aynı zamanda organlarımız arasındaki koordinasyonun sağlanması, istemli ve istemsiz hareketlerin yapılması için gerekli uyarıların verildiği; zeka, hafıza, öğrenme ve emosyonel fonksiyonların düzenlendiği merkezdir (12).

2.2. Periferik Sinir Sistemi (PSS)

Periferik sinir sistemini; periferik sinirler, gangliyonlar ve serbest sinir sonlanmaları oluşturur. Periferik sinirler uyarıları periferden MSS'ne, MSS'den ise perifere taşırken hedef organlar ile merkezi sinir sistemi arasında çift yönlü uyarı iletimini sağlarlar (13). Embriyolojik olarak PSS ektodermden gelişir. Gelişimin 4. haftasında nöroektoderm içinde nöral krest gelişir ve bu yapı mezoderm içine göç eder. Schwann hücreleri ve diğer nöroblastik hücrelerinin gelişimi burada başlar (14).

2.2.1. Periferik Sinir Anatomi ve Histolojisi

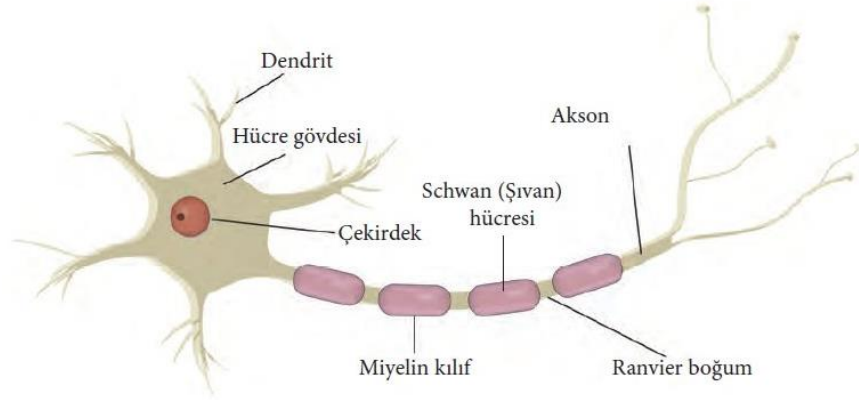
Duyu, motor ve otonom olmak üzere 3 tip periferik sinir vardır. Duyusal sinir lifleri medulla spinalisin arka köklerinden, motor sinir lifleri ise medulla spinalisin ön köklerinden çıkarlar (15).(Şekil 1) Afferent liflerle alınan duyu mesajları arka kök gangliyonlarına, oradan da arka boynuz gelir ve motor iletiler omurilik ön boynuz hücrelerinden perifere uzanarak iletilirler (13).



Şekil 1. Periferik Sinir Anatomisi Şematik Çizim (Illustration by David Schumick, BS, CMI. Reprinted with the permission of the Cleveland Clinic Center for Medical Art & Photography © 2009)

Nöronlar ve nöroglial hücreler sinir sisteminin ana hücreleridir. Nöronlar; dendritler, hücre gövdesi (perikaryon) ve akson olmak üzere 3 bölümden oluşurlar (16).(Şekil 2) Reseptör görevi gören dendritler birbiri ile bağlantı sağlarken, çevre ile iletişimi sağlayan uzantılar aksonlardır. Genellikle sinir hücresinin birçok dendriti varken bir tane aksonu olur.

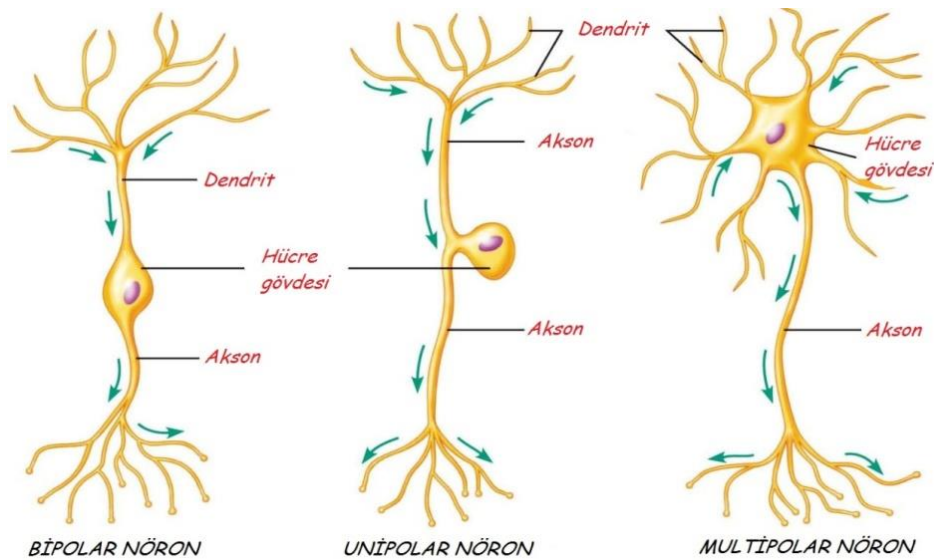
Aksonlar myelinli veya myelinsiz olabilirler. Schwann hücreleri nöral krest kökenli hücrelerdir ve aksonun çevresinde myelin kılıfın oluşumundan sorumludur. Schwann hücreleri elektrik yalıtımını sağlarlar, aksonların yeniden büyümesi için rehberlik ederler, periferik sinir sisteminde oluşan artıkları temizlerler. Myelinsiz aksonlar schwann hücre membranlarının invajinasyonlarıyla parsiyel olarak sarılmış iken myelinli aksonlar, spiral şekilde düzenlenmiş schwann hücre membranlarının konsantrik şekilde kompakt hal alması ile oluşmaktadır. Myelin örtüleri arasında bulunan ranvier düğümlerine kadar olan akson kısmında iletim iyon akışı ile sağlanırken; düğümler seviyesinde bu iyon akışı, elektriksel aksiyon potansiyeline dönüşerek ilerler. İletim bu bölgelerde “atlayıcı” şekilde ilerlemektedir. Bu sebeplerle insanlarda myelinli geniş çaplı bir sinir hücresinde ileti hızı 73 m/sn yi bulurken, myelinsiz hücrelerde bu hız 0.5 m/sn ye kadar düşmektedir (17).



Şekil 2. Standart nöron yapısı

Hücre gövdesi sinir liflerinin devamlılığını, beslenmesini ve korunmasını sağlayan, nöronda metabolik olayların gerçekleştiği kısımdır. Nükleus, nükleolus ve Nissl cisimcikleri gövdede yer alır. Nissl cisimcikleri sinirde rejenerasyon zamanı artış gösterir. Aksonlar yüksek fosfolipit özelliğe sahip üç katlı aksolemma ile çevrili olan ve nöronun gövdesinden çıkan lifsi uzantılardır. Sinirsel uyarıyı aksiyon potansiyeli olarak hedef organa taşırlar (18).

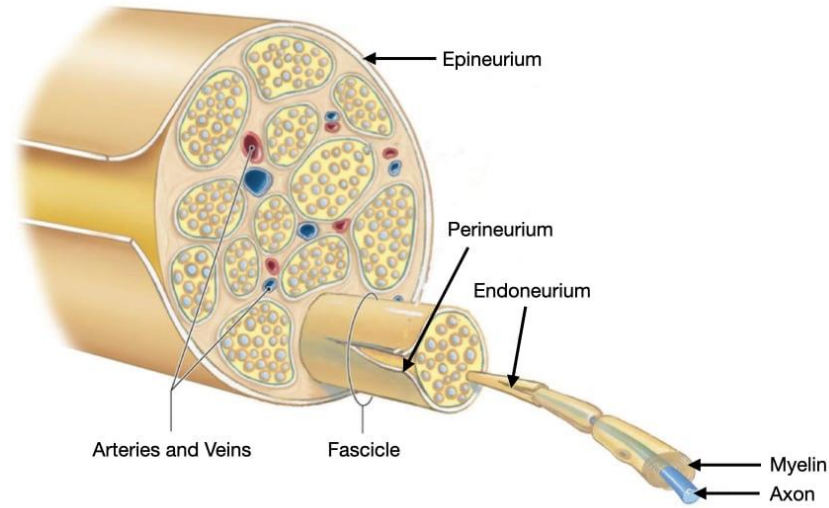
Nöronların şekli ve boyutu işlevine göre değişir. Bazıları iletiyi beyne veya omuriliğe taşır. Bazıları ise tam tersini yapar. Nöronlar şekillerine göre unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere 3 grupta değerlendirilir (16). (Şekil 3.)



Şekil 3. Nöronların şekillerine göre sınıflandırılması

Bir akson ve birden çok dendriti olan nöronlara multipolar nöron, bir akson ve bir dendriti olan nöronlara bipolar nöron, tek bir uzantısı olan nöronlara unipolar nöron (pseudounipolar nöron) denir. Unipolar nöronların perikaryonundan çıkan tek uzantı bir süre sonra T veya Y şeklinde dallanarak ikiye ayrılır. Bu nedenle literatürde daha çok psödounipolar olarak isimlendirilmektedir (12).

Periferik sinirlerin transvers kesiti incelendiğinde birbirinden ayrı olarak siniri saran destek bağ dokusu yapılarının olduğu görülmektedir. Endonöryum, perinöryum, epinöryum yapıları santralden perifere doğru sinir kılıfını çevreleyen yapılardır (19).(Şekil 4.)



Şekil 4. Periferik sinir yapısı

Endonöryum: Endonöryum, Schwann hücresi ve miyelin kılıfıyla birlikte aksonu çevreleyen, hassas bir fibröz doku örtüsüdür. Endonöryum gevşek kollajenöz matriksle geniş ekstraselüler boşluklardan oluşmaktadır. Perinöryumdan farklı olarak daha gevşek, yumuşak ve sıkı olmayan bağ dokudan zengin olup vücut hareketleri sırasında sinirin kaygan bir ortam içerisinde uygun ekskürsasyonu sağlamasına yardımcı olmaktadır (19).

Perinöryum: Aynı hedefe yönelen aksonlar birleşerek fasikülleri oluştururlar. Fasiküler grupları saran konnektif doku ise perinöryumdur. Endonöral ortamın korunması ve regülasyonunu sağlamak için kan sinir bariyeri görevi de olan perinöryum, çok katlı tabakası sayesinde mekanik bariyer olarak koruma görevi de vardır (20).

Epinöryum: Sinir bağ dokusunun en dış tabakası olan epinöryum yoğun düzensiz bağ dokusu, kollejen (tip 1 ve tip 3), elastik lifler ve yağ dokusundan oluşur. Fasiküllerin etrafını çevreleyerek birarada olmalarını sağlamakla birlikte beslenme ve zarar verecek etkenlere karşı koruma özelliği vardır (21). Embriyolojik olarak mezodermden gelişen epinöryum insan vücudunda sinir paketinin total kesit alanının yaklaşık % 30-70 kısmını oluşturmaktadır. Genel kural olarak, bir sinir ne kadar çok fasikül içerirse çevresinde o kadar kalın epinöryum barındırır. Periferik sinirlerdeki epinöral tabaka miktarı bireysel farklılıklar göstermekte olup sinirin anatomik lokalizasyonu ve sorumlu olduğu iş yüküne göre de değişmektedir (22).

2.3. Periferik Sinir Yaralanmaları

Periferik sinirde travma sonrası birçok morfolojik, metabolik ve patofizyolojik değişiklik meydana gelmektedir. Bu değişiklikler yalnızca hasar bölgesinde değil, sinir gövdesinde, hasarın proksimal ve distalindeki segmentlerde, sinir lifinin sonlandığı nöromusküler kavşak veya duyu reseptörlerinde de görülmektedir.(Şekil 5.) Nöronların bölünme yetenekleri yoktur. Nöronların aksine; periferik sinir sisteminde yer alan Schwann hücreleri ile gangliyonlardaki satellit hücrelerin bölünme yetenekleri vardır. Bir sinirin aksonu kesildiğinde; önce dejenerasyon, sonrasında ise rejenerasyon meydana gelir (12).

Hasarlanma sonrasında sinir gövdesinde meydana gelen değişiklikler yaklaşık ilk 6 saat içerisinde başlar, 14-21. Günlerde tepe noktasına ulaşır. Öncelikle gövdede hacimce artış olur. Ardından hücre çekirdeğinde perifere doğru kayma meydana gelir, granüllü endoplazmik retikulum ve Nissl cisimcikleri kaybolarak kromatoliz adı verilen sitoplazmik değişiklikler hasarlanmaya sekonder gerçekleşir (23).

Hasarlanmanın ardından hücrede meydana gelen değişiklikler hasarın hangi şiddette meydana geldiği ve hasarlanmanın hücre gövdesine olan mesafesi ile ilişkilidir. Hasar sonrasında kromatoliz ve hücre tamir mekanizmaları başlasa bile süreç hücre ölümü ile sonuçlanabilir (24). Bu nöral kayıp motor nöronlarda duyu nöronlarına göre daha az olur(25). Sinir hasarının olduğu bölgenin sinir gövdesine uzaklığı ile sinir rejenerasyon hızı ters orantılıdır. Yani proksimalden distale ilerledikçe rejenerasyon hızı azalır, yaralanma gövdeden uzaklaştıkça hücrenin hayatta kalma ihtimali artar (26).

Proksimal segmentte aksonlar yaralanma sahasının bir miktar daha gerisinden dejenere olduğu için mevcut alanda sadece endonöral tüpler (Schwann hücrelerinin bazal laminası) boş silindir şeklinde kalmaktadır. Lezyonun ciddiyetine bağlı olarak proksimal segmentte ortaya çıkan bu retrograd dejenerasyon bir veya daha fazla sayıda internodal segment içerebilir (27). Hasar sonrası 24 saatlik sürenin ardından proksimal uçta kollateral ve terminal tomurcuklanma oluşumu başlar. Bu tomurcukların ranvier düğümünden köken alanına kollateral, proksimal aksonal uçtan köken alana terminal tomurcuk denir ve bu tomurcuklar antegrad ilerleme gösterirler. Tomurcuğun uç kısmına büyüme konisi, kendisine de rejenerasyon tomurcuğu denir (28). Tomurcukların uç bölümleri (büyüme konisi), mitokondri, lizozom ve düz endoplazmik retikulum gibi yapılardan zengindir. Bu tomurcukların hareket özelliği de vardır. Schwann hücresindeki fibronektin ve laminine olan afiniteleri büyüme tomurcuklarında büyüme yönünü belirlerler (29).

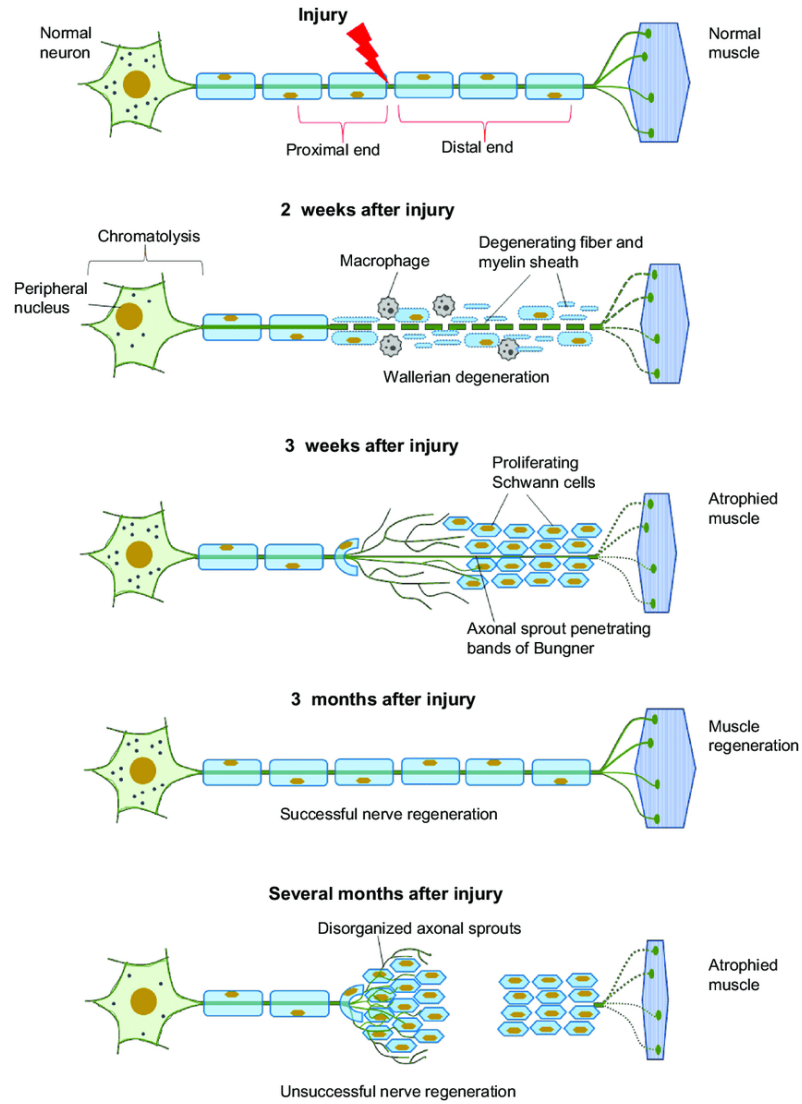
Distalde yer alan sinir segmentinde Wallerian dejenerasyon olarak adlandırılan hücresel dejeneratif değişiklikler meydana gelir. Bu sayede akson ve miyelin kaynaklı maddeler ortamdaki uzaklaştırılır, yenilenen aksonun büyümesi için çevresel şartlar olması gereken uygun hale gelmiş olur (30). Rejenere olan lifler hem doku hem de son organ seçiciliği göstermektedir. Bu sürece nörotropizm denir.

Sinir liflerinin diğer dokular yerine sinire doğru büyüebilmesi için distal parçanın etki gösterebileceği kritik aralık mesafesi önem arz etmektedir. Distal sinir segmentinde Schwann hücreleri, fibroblastlar, miyositler ve hasarlı aksonlar belirli yoğunluk ve zamanlarda bir dizi nörotrofik faktör ekspresyonu yaparlar. Nörotrofinler sinir liflerinin uzamasını ve olgunlaşmasını sağlarlar (31,32). Schwann hücre proliferasyonunu tetikleyen önemli etkenlerden birisi akson- Schwann iletişiminin ortadan kalkmasıdır. Schwann hücreleri NGF gibi çeşitli nörotrofik faktörlerin üretimini arttırmaktadır (33).

Schwann hücreleri çoğalarak hücre sütunları oluşturmaya başlarlar. Bu sütunlar akson uzamasına yol gösterici işlev üstlenir. Akson büyür ve dallanarak, Schwann hücrelerinin oluşturduğu sütunlar doğrultusunda ilerleyerek birkaç filaman oluşturur. Yalnızca bu sütunlara girebilen lifler büyüme devam edip efektör organa ulaşabilir. Rejenerasyonun işlevsel olması için liflerin doğru yere yönelmesi gerekmektedir. Bununla birlikte miks tip sinirlerde rejenere olan duyu sinirleri motor son plağa yönelirse işlev geri dönmeyecektir (34).

Nörojenerasyonun başarılı olması boşluk mesafesi, Wallerian dejenerasyonu, nörotrofizm özgüllüğü, ortamdaki debrislerin temizlenme hızı ve son organ canlılığı gibi faktörlere bağlıdır. Boşluk mesafesi artması ile rejenerasyon hızı azalacaktır ve bu lokal bir nöroma oluşmasına neden olabilir. Ortamdaki debrislerin temizlenmemesi fibrozise yol açarak hedef organa ulaşmayı engelleyebilir (35).

Reinervasyon ile fonksiyonel iyileşme eş anlamlı değildir. İletim tam olarak sağlansa bile sağlıklı olmayan bir hedef organ varlığında fonksiyonel sonuç elde edilemez. Klinik olarak rejenerasyonu Tinel testi ile değerlendirmek mümkündür. Tinel işaretinin hareket hızı yaklaşık olarak 1 ila 2 mm/gün'dür. Tinel işaretinin konumunun zamanla ilerlememesi, muhtemelen sinir rejenerasyonunun engellendiğini gösterir (36).



Şekil 5. Periferik sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu şematik çizim (37)

2.3.1. Periferik Sinir Yaralanmaları Sınıflandırması

Periferik sinir lezyonlarında sınıflandırılma sinir liflerinde ve trunkuslarda olan yapısal veya fonksiyonel değişikliklere göre değerlendirilebilir. Mekanik iletim bloğunda kompresyon gibi lokal intranöral mikrosirkülasyon bloğu varsa metabolik (fizyolojik) iletim bloğundan söz edilir. Bu durumda yapısal olarak sinir sağlam olsa bile impuls iletiminde sorun oluşur. Beslenmedeki eksikliğe bağlı bir iletim bozukluğu olan metabolik iletim bozukluğu, kompresyonun ortadan kaldırılması halinde hemen geri döner. Uzun süren iskemilerde geri dönüş, iskemik kalma zamanına bağlıdır. Altı-sekiz saatlik iskemi sinir liflerinin geri dönüşsüz hasarı için kritik bir zamandır (38).

Sinir yaralanmaları Seddon tarafından yapılan tanımlamada nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olmak üzere 3 tip sinir hasarı şeklinde tariflenmiştir (39). Sunderland ise 1951 yılında sinir hasarlanmalarını genişleterek 5 kısımda tarif etmiştir (40). Mackinnon ise Sunderland tarafından yapılan sınıflandırmaya 6. derece miks yaralanmayı ekleyerek sınıflandırmayı 1988 yılında güncellemiştir (41). (Şekil 6.)

2.3.1.1. Seddon Sınıflandırması

Nöropraksi: Anatomik bütünlük ve aksonal devamlılık korunmuştur, fakat geçici ileti bloğu oluşmuştur. Yaralanmanın en basit şeklidir. Genellikle kompresyon veya traksiyon yaralanmaları ile oluşur. Histolojik incelemede en sık demiyelinizasyon görülür, iyileşme kendiliğinden gerçekleşir, tam sinir iyileşme şansı vardır ancak bunun için 6-8 haftalık bir süre gerekmektedir. Sinir lifleri boyunca belirli bir noktada yaralanmaya rağmen, sinir yapıları sağlam kalır ve wallerian dejenerasyon oluşmaz (39).

Aksonotmezis: Perinöryum, epinöryum, Schwann hücreleri bazal membranı ve endonöryum dahil olmak üzere çevre mezenkimal yapılar korunurken sinir aksonunun ve çevredeki miyelinin tamamen kesintiye uğraması durumunda ortaya çıkar. Eğer hasarlanma sonucunda sinir hücresinin ölümü olmamışsa lezyon distalinde Wallerian dejenerasyon, lezyon proksimalinde aksonal tomurcuklanma gerçekleşir. Bazal membran ve endonöral doku Schwann hücreleri için kılavuz tüp görevi yaparak proliferasyona yardımcı olur (39,42). Endonöral kılıfta bozulma olmadığı için nöroma oluşumu yoktur.

Spontan rejenerasyon olması beklenir, yaralanma düzeyinde Tinel bulgusu belirgindir ve sinir rejenerasyonu sırasında proksimalden distale doğru ilerlemesi beklenir (39).

Nörotmezis: Sinir gövdesinin tam olarak kopması, geniş bir avulsiyon veya şiddetli bir kompresyon ile ortaya çıkabilir. Aksonlar ve periferindeki dokular tamamen bozulmuştur. Perinöryum ve epinöryumda tam olarak kopma olmayabilir ancak hasara bağlı fonksiyon gösteremezler. Lezyon distalinde duyu, motor ve otonomik yanıtlar alınmaz. Yaralanma genellikle proksimal güdükte nöroma oluşumuna yol açar. İnflamasyon ve endonöryal kılıf bütünlüğündeki bozulma nedeniyle fibrozis görülmektedir. Bu grupta önemli bir spontan iyileşme beklenemez. Kendiliğinden onarım mümkün olmadığı için sinir fonksiyonunu geri kazanmanın tek yolu cerrahi müdahaledir (23).

2.3.1.2. Sunderland Sınıflandırması

1.Derece Yaralanma: Seddon sınıflanmasındaki nöropraksiye denk gelmektedir. Lokal iskemi, traksiyon, hafif ezilme, kompresyon gibi nedenlerle oluşabilir. Yaralanma bölgesinde sinir iletimi durur ancak akson yapısında bir bozulma olmaz, Wallerian dejenerasyon görülmez. Segmental demiyelinizasyon görülebilir. Cerrahi müdahale gerektirmez ve çoğunlukla spontan iyileşmenin birkaç haftaya kadar tamamlanması beklenir (41,43).

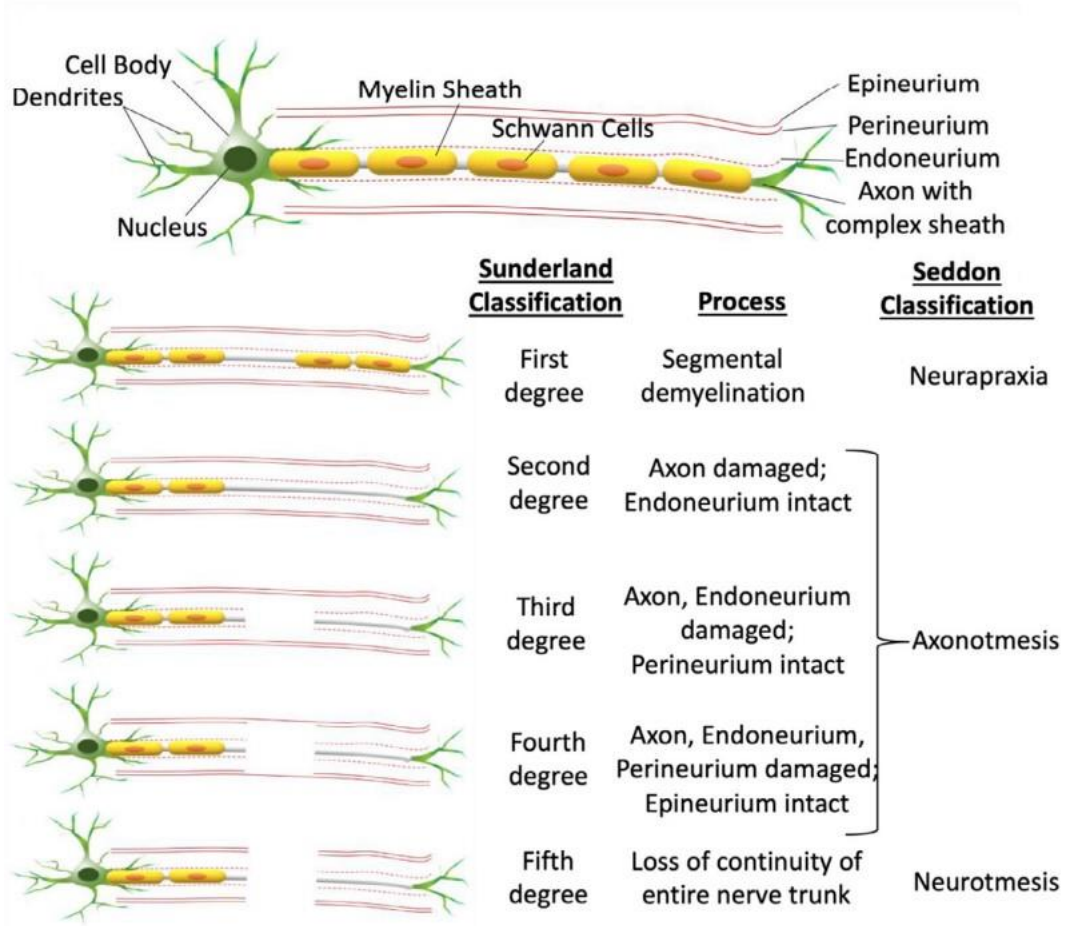
2.Derece Yaralanma: Seddon sınıflamasındaki aksonotmezise eşdeğer olarak kabul edilmiştir. Akson ve miyelin hasarı olmasına rağmen endonöryum, perinöryum ve epinöryumda hasar olmamıştır. Distal segmentte Wallerian dejenerasyon gelişir. Schwann hücre bazal membranı ve endonöral kılıf sağlam olduğu için spontan iyileşme beklenir (40,41).

3.Derece Yaralanma: Seddon sınıflamasındaki aksonotmezis ve nörotmezisin bir karışımı olarak kabul edilir. Bu tip yaralanmalarda epinöryum ve perinöryum sağlamdır, ancak Schwann hücre kılıfı, endonöryum ve akson devamlılığı bozulmuştur. 3. Derece yaralanmalar endonöral hasar ve ardından skar dokusu oluşumunu içerir. Endonöryumdaki hasarın derecesine bağlı olarak iyileşme miktarı değişkenlik gösterebilir. Schwann hücre kılıfı ve endonöryum hasarlanma nedeniyle tam iyileşme olmaz (41,44).

4.Derece Yaralanma: Sinirin epinöryum dışındaki tüm tabakalarının devamlılığı bozulmuştur. Fiziksel olarak sinir bütünlüğü devam etmekle birlikte, oluşacak skar dokusunun yaratacağı blok sinir rejenerasyonunu engeller ve hasar bölgesinde nöroma oluşumuna neden olur. Distalde Wallerian dejenerasyon meydana gelir. Gerilim, traksiyon, ezilme, sinire yapılan hatalı enjeksiyon sonucu görülen yaralanmalar genellikle bu tip hasara sebep olur. Spontan iyileşme ihtimalinin düşük olması nedeniyle skarlı bölgenin eksizyonu ve cerrahi onarım önerilir (40,41).

5.Derece Yaralanma: Sinir gövdesinin tam olarak kopması ve epinöryum da dahil olmak üzere sinir devamlılığının kaybolduğu yaralanmalardır. Spontan iyileşme beklenmez.Cerrahi onarım sinir iyileşmesi için tek seçenek olarak görülmektedir. Sıklıkla penetran travmalar ile meydana gelir (40,41).

1988 yılında Mackinnon ve Dellon miks (karışık) yaralanma biçimini tariflemiş, Sunderland sınıflandırmasına 6. Derece yaralanmayı ekleyerek modifiye etmişlerdir. Bu grupta, aynı sinir boyunca değişik seviyelerde ve farklı derecelerde sinir hasarları bir aradadır. Tedavisinde de hasarlı segmentler arasında farklı yaklaşım yapılmaktadır, 4. ve 5. derece hasarın olduğu fasiküllere cerrahi onarım mutlaka yapılmalıdır (41,45).



Şekil 6. Periferik sinir yaralanmaları sınıflandırması şematik çizim (46)

2.4. Periferik Sinir Cerrahisi

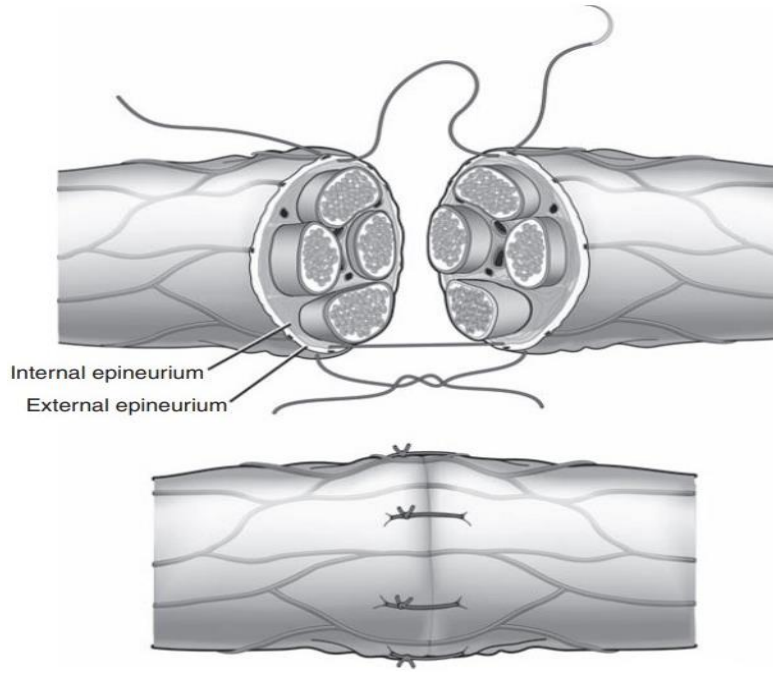
Sinir onarımının asıl amacı, yenilenen duyuşal, motor ve otonomik aksonları distal sinir ortamına yönlendirerek, suture hattında minimum lif kaybıyla hedef organların yeniden innervasyonunu sağlamaktır (47). Sinir hasarının tipi, yeri ve kapsamı, ameliyatın zamanlaması, onarım türü, fasiküllerin uygun hizalanması, cerrahi teknik ve hasta komorbiditeleri gibi periferik sinir onarımının sonucuna etki eden birçok faktör bulunmaktadır. Tarihte ilk kez sinir onarımı sonrası başarılı sinir rejenerasyonu Cruikshank tarafından bildirilmiştir (48).

Sinir onarımının zamanlaması sinir hasarının tipine, yaranın durumuna ve sinir yatağına vasküler beslenmesine bağlıdır (49). Keskin sinir transeksiyonlarında ezilme komponentinin olmaması veya minimal olması, iyi vasküler beslenme ve temiz yara durumunda fonksiyonun geri kazanılması için primer sinir onarımı en iyi seçenektir. Operasyon sırasında kopan sinirin proksimal ve distal segmentleri incelenerek üzerlerindeki vasküler yapıların seyrinin belirlenmesi ve koronal düzlemde bu damarların yönüne göre düzgün onarım yapılarak uç uca gelmesi önemlidir. Nöroma gelişmesi, kesilen sinir uçlarında meydana gelen retraksiyon proksimal ve distal sinir güdüklerinin tam uç uca gelmesini zorlaştırır (50).

Günümüzde literatürde farklı görüşler bulunsa da yaralanma sonrası 3-7 gün arasında yapılan onarımlar primer sinir onarımı olarak adlandırılmaktadır ve kesilen sinirin hemen yeniden onarımı daha iyi sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (51). Acil onarım kriterleri karşılanmadığında gecikmeli onarım gerekir. Sekonder sinir onarımları, sinir yaralanma bölgesinin net olmadığı ve spontan iyileşmenin cerrahi onarımdan daha iyi sonuç verebileceği, ciddi vasküler yetmezlik gibi durumlarda tercih edilir. 3-6 ay sonra spontan iyileşmenin klinik ve elektrofizyolojik belirtilerinin olmaması durumunda cerrahi müdahale gerekmektedir (52).

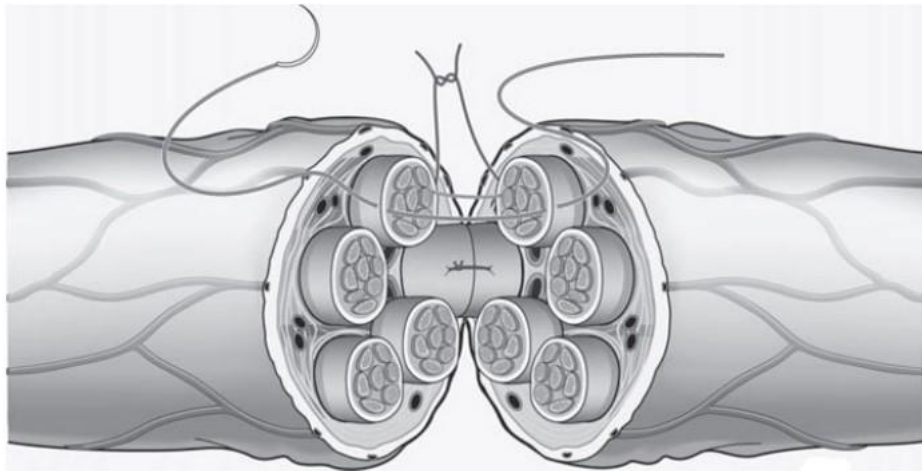
Sinir uçları arasında minimal gap olan ve minimum gerilimle sinir uçlarının yaklaştığı durumlarda direkt sinir onarımı tercih edilir. Onarımdan sonra optimal sinir rejenerasyonu için sinir güdükleri gerginlik olmadan hassas bir şekilde hizalanmalı ve minimum doku hasarı, minimum sayıda dikişle atravmatik olarak onarılmalıdır (51). Periferik sinir yaralanmalarında uç-uca onarım sırasında en sık kullanılan 2 teknik; epinöral ve fasiküler onarımlardır (53).

Epinöral Onarım: En sık kullanılan tekniktir. Epinöral vasküler yapılar kılavuz olarak kullanılarak optimal koaptasyon sağlanabilir. Proximal ve distal güdükte süturlar sadece epinöryumdan geçer. Avantajları arasında; kısa operasyon süresi, daha basit bir teknik olması, intranöral dokuya müdahale edilmediğinden fibroziste azalma sayılabilir. Dezavantaj olarak ise aynı fasiküller karşı karşıya gelmeyebilir (54).



Şekil 7. Epinöral Sinir Onarımı Şematik Gösterimi (Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. Int Rev Neurobiol. 2009;87:141-72.)

Fasiküler Onarım: Fasiküler onarım tekniğinde esas hedef büyüyen sinir liflerinin yanlış yönlendiğini engellemek adına ilişkili iki fasikülün sutureasyonu sağlamaktır. Fasiküler onarımda dikişler perinörium içine yerleştirilir. Bu teknik interfasiküler epinöriumun diseksiyonunu ve fasiküllerin ayrılmasını gerektirir. Fasikül başına 2-3 suture gerektirmesi, teknik olarak zorlayıcı olması, skar ve fibrozise eğilim yaratması dezavantajları arasındadır (53).



Şekil 8. Fasiküler Sinir Onarımı Şematik Gösterimi (Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. Int Rev Neurobiol. 2009;87:141-72.)

2.5. Periferik Sinir Rejenerasyonunda Nanofiber Materyal Kullanımı

Günümüzde popülerliği giderek artan ve hemen hemen tüm disiplinlere ve bilim dallarına uygulanabilirliği olan nanoteknoloji, gerçek dünya teknolojilerinin nano boyuta indirgenmesi olarak tanımlanabilir. Nanoteknoloji maddenin atomik ve moleküler düzeyde, yaklaşık 1-100 nm arası ölçekte kontrolü veya yeniden yapılandırılması sürecini kapsar (55).

Nanobiyoteknoloji ise nanoteknoloji ve biyoteknolojinin kesişimi ile ortaya çıkan son derece disiplinler arası bilim alanıdır. Araştırma konularını tanımlamak kesin olarak mümkün olamamakla birlikte nanobiyoteknoloji; organik ve inorganik nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile moleküler klonlama, farklı biyolojik türlerden elde edilen DNA moleküllerinin mühendislik yöntemleri ile birleştirilmesi, protein teknolojisi ve immünoloji uygulamaları gibi araştırma konularını ele alır. Nanobiyoteknolojinin son zamanlarda ortaya çıkan bir diğer çalışma alanının hedefi ise malzeme bilimi ve biyoteknolojinin birleşimiyle oluşturulan yeni akıllı materyalleri ve fizikokimyasal teknikleri biyolojik problemleri çözmek için kullanmaktır (56).

Biyomedikal çalışmalarda nanopartiküller, manyetik rezonans ve bilgisayarlı tomografi gibi moleküler görüntüleme sistemlerinde, ilaç salınımı ve ilaç salınım sistemleri geliştirmede, hedef gen veya hücreye yönelik teşhis ve tedavilerde, aşı geliştirmede ve biyomalzemelerde takviye malzemesi olarak kullanılmaktadır (57).

Elyaf biliminde, genellikle çapı 50 ila 300 nm arasında değişen ve geometrik açıdan ise ince, uzatılmış, ipliksi yapıda bulunan elyaflar nanofiber olarak adlandırılır (58). Bu elyafların diğerlerinden farkı, daha küçük ve oldukça gözenekli bir yapıya sahip olması ve yüzey alanlarının hacimlerine oranla daha fazla olmasıdır (59). Nanofiberler çok çeşitli malzemelerden üretilir. Nanofiberlerin üretimi için çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bu yöntemler çekme, şablon sentez, faz ayrımı işlemi, kendiliğinden tutunma, eriyik üfleme ve son olarak geliştirilen elektro-eğirme yöntemidir. Bu yöntemler arasında elektro-eğirme yöntemi uygulama alanının çok geniş olması ve üretimin tek aşamalı, kısa zamanlı ve düşük maliyetli olması sebebiyle en çok tercih edilen yöntemdir (60).

2.5.1. Polikaprolakton (PCL)

Sentetik biyobozunur polimerler, biyoyumlulukları nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedirler. Polilaktikasit (PLA), Poliglikolikasit (PGA), PCL gibi polimerler yalın halde kullanıldıkları gibi bu polimerlerin kopolimerleri veya karışımları da biyomedikal alandaki çalışmalarda kullanılmaktadır. Sentetik malzemeler genellikle belirli hücresele reseptörleri aktive etmez ve bu nedenle kendi başlarına aksonele büyüme veya hücre göçü gibi istenele hücresele tepkileri ortaya çıkaramaz. Bunun yanı sıra, bu malzemelerin bozunma hızı ve mekanik özellikleri uygulamalara göre kontrol edilebildiğinden sinir doku iskelelerinin inşası için kullanılmaktadır. Genel olarak, bu sentetik malzemeler nöral hücre büyümesini destekler, ancak hücre proliferasyonunu ve canlılığını destekleme yetenekleri çeşitli özelliklerinden dolayı farklılık gösterir.

PCL, FDA onaylı bir polimerdir ve uygun mekanik ve kimyasal özellikleri ve nispeten yavaş bozunma hızı nedeniyle ilaç dağıtımı, cerrahi sütürler ve doku mühendisliği iskeleleri gibi çeşitli biyomateryal uygulamalarında kullanılmaktadır (61). PCL'nin bozunması PLA ve PGA'dan daha yavaştır ve bozunma süresi 2-3 yıl aralığındadır (62). PCL nanofiberler, toksik olmayan, enflamatuar olmayan bozunma ürünlerine sahip, ucuz, imalatı kolay, yüksek oranda çözünür, biyoyumlu ve yavaş biyolojik bozunma özelliklerinden dolayı nöronların yapışması ve farklılaşmasına uygun nöral iskeleler üretmek için kullanılmaktadır (63).

Ayrıca, yapılan çalışmalar bir PCL sinir kanalının, implante edilen bölgede uygun gözeneklilik oluşturması ve vaskülarizasyonu artırması nedeniyle siyatik fonksiyonel indeks (SFI) değerlerinde artış, kas atrofisinde iyileşme ve siyatik sinir boşluklarında yenilenen akson sayısında artış sağladığı bildirilmiş ve motor fonksiyonlarda iyileşmeyi destekleyebileceğini göstermiştir (64). Destek hücreleri veya büyüme faktörlerinin oluşturulan nöral iskele yapısına dahil edilmesi, çok kanallı bir mimari oluşturulması, biyoaktif inorganik partiküllerin veya nanopartiküllerin ilave edilmesi sinir onarımını desteklemektedir.

2.5.2. Takrolimus (FK506)

Takrolimus (FK506) , 1984 yılında *Streptomyces tsukubaensis* isimli bakteriden elde edilmiş doğal bir makrolid laktondur (65). Takrolimus, karaciğer transplantasyonu için güçlü bir immünosupresan olarak FDA tarafından onaylanmıştır ve nörotrofik özelliklerinin ilk deneysel raporları benzer zamanlarda yayınlanmıştır (66). Takrolimusun immünsupresif etkisi; düşük molekül ağırlıklı immünofilin olan FKBP-12 ile bağlanması sonucu oluşan FK506/FKBP-12 kompleksinin, T lenfositler üzerinde bulunan PP2B/kalsinörin' in selektif inhibitörü olarak çalışması ile oluşur (67). İnterlökin-2 salınımının inhibisyonu ile devam eden süreç sonunda T hücre proliferasyonu azalır ve hücrel immün yanıt zayıflar.

Bununla beraber takrolimusun myelinli aksonların sayısını, myelin kalınlığını, aksonal rejenerasyonu arttırdığı ve nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir (68). Nöroprotektif etkisinin keşfedildiği zamandan beri, FK506'nın periferik sinir rejenerasyonu için uygulanması, FK506'nın sistemik uygulamasının olumsuz etkilerini azaltmak için özellikle lokal dağılım açısından klinisyenlerin ve bilim adamlarının ilgisini çekmiştir (69). Literatürde çok sayıda benzer takrolimusun nörorejeneratif etkisini destekler nitelikte çalışma mevcuttur fakat takrolimusun nörorejeneratif etki mekanizması hala net olarak bilinmemektedir. Takrolimusun hücre içi mekanizmalarla etkisine ek olarak sinir iyileşmesinde skarlaşmayı azaltarak da etki ettiğine dair çalışmalar mevcuttur (70).

Takrolimusun nonselektif etki mekanizması nedeniyle sistemik uygulamasının nefrotoksisite, hipertansiyon, hiperestezi, santral sinir sistemi toksisitesi, enfeksiyon, hiperglisemi, kas güçsüzlüğü ve gastrointestinal semptomlar gibi olumsuz etkileri vardır (66).

2.5.3. Metilkobalamin

Metilkobalamin, bir B12 vitamini analogudur ve homosisteinden transmetilasyon reaksiyonu ile metionine dönüşüm sonucu oluşur (71). Aynı zamanda metilkobalamin, memeli sinir sisteminin biyokimyasal metabolizması, motor ve duyuşal işlevleri için güçlü bir afiniteye sahiptir (72). Metilkobalaminin; aksonal büyüme ve nöronal sağlığını

artırdığı (73), Schwann hücre farklılaşmasını ve miyelinizasyonu hızlandırdığı (74) yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Metilkobalamin birçok ülkede klinik olarak kullanılmaktadır, ucuz ve oldukça az yan etkisi vardır. Doz aşımının bilinen bir yan etkisi yoktur (75). Ancak Metilkobalamin 20-50 dakika gibi kısa bir yarı ömüre sahiptir. Bu yüzden yüksek plazma konsantrasyonunu korumak için tekrarlayan uygulamalar gerektirmektedir (76).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DeneY Hayvanlarının Temini ve Gruplandırılması

Çalışma öncesi Necmettin Erbakan Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı 2022-006 sayılı karar ile alınmış ve çalışma boyunca hayvan deneYleri araştırma protokollerine uyulmuştur. Çalışma ve deneY hayvanlarının bakımı Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. "Metilkobalamin ve Takrolimus İçeren Polikaprolakton (PCL) Nanofiberlerin Periferik Sinir Rejenerasyonuna Etkilerinin Karşılaştırılması" adlı tez projesi Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Bu deneYde, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişiklik gösteren 48 adet dişi 2-5 aylık Wistar Albino cinsi ratlar kullanılmıştır. DeneY başlamadan önce ve sonrasında ratlara standart yaşama koşulları altında bakıldı. Ratlar oda sıcaklığında 12 saat gündüz / 12 saat gece olacak şekilde bakılmıştır. DeneY Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda uygulanmıştır.

Her grupta 8'er adet sıçan olacak şekilde 6 grup oluşturularak işlemler gerçekleştirildi. Tüm gruplarda anestezi altında sıçanların sol siyatik siniri eksplore edildi ve Grup-1 hariç diğer tüm gruplarda siyatik sinirde mikromakas yardımıyla keskin ve düz kesi yapıldı. Kesi sonrası aynı seansta siyatik sinire cerrahi olarak epinöral onarım yapıldı.

Grup 1: Sham grubu. Sol siyatik sinir dorsal yaklaşımla eksplore edildikten sonra sinire müdahale yapılmayan grup. Siyatik sinir görüldükten sonra cilt insizyonu 4/0 propylene (Doğsan®, Polipropilen sentetik, emilmeyen, monofilaman suture, Türkiye) ile suture edilerek onarıldı.

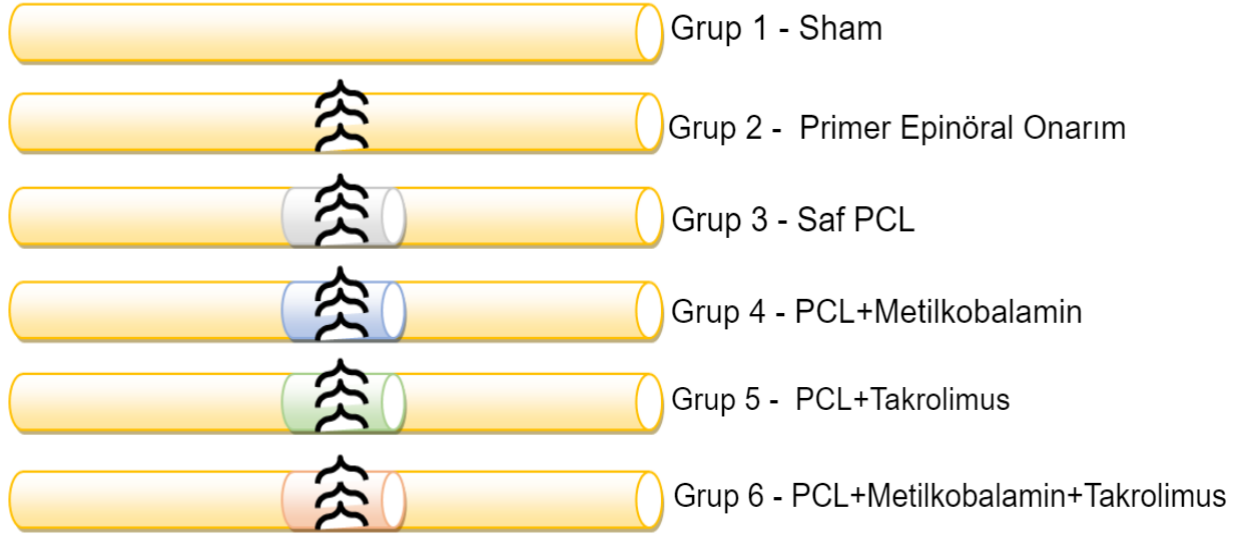
Grup 2: Sol siyatik sinir dorsal yaklaşımla eksplore edilip, siyatik sinir trifurkasyonunun 1 cm proximalinde mikromakas yardımıyla tam kat düz kesi yapıldı. Aynı seansta siyatik sinir 9/0 nylon dikişler ile (Ethicon, Monofilament polyamide 6 suture, Ethicon Ltd) epinöral onarım yapılarak koaptasyon sağlandı. Daha sonra cilt insizyonu 4/0 propylene (Doğsan®, Polipropilen sentetik, emilmeyen, monofilaman suture, Türkiye) ile suture edilerek onarıldı.

Grup 3: Sol siyatik sinir dorsal yaklaşımla eksplore edilip,siyatik sinir trifurkasyonu 1 cm proximalinde mikromakas yardımıyla tam kat düz kesi yapıldı. Aynı seansta siyatik sinir 9/0 nylon dikişler ile (Ethilon, Monofilament polyamide 6 suture ,Ethicon Ltd) epinöral onarım yapılarak koaptasyon sağlandı. Daha sonra epinöral onarım hattı etrafına 1x0,6 cm'lik PCL nanofiber sinir sargısı sarıldı. Daha sonra cilt insizyonu 4/0 propylene (Doğsan®, Polipropilen sentetik, emilmeyen, monofilaman suture,Türkiye) ile suture edilerek onarıldı.

Grup 4: Sol siyatik sinir dorsal yaklaşımla eksplore edilip, siyatik sinir trifurkasyonu 1 cm proximalinde mikromakas yardımıyla tam kat düz kesi yapıldı. Aynı seansta siyatik sinir 9/0 nylon dikişler ile (Ethilon, Monofilament polyamide 6 suture ,Ethicon Ltd) epinöral onarım yapılarak koaptasyon sağlandı. Daha sonra epinöral onarım hattı etrafına 1x0,6 cm'lik Metilkobalamin içeren PCL nanofiber sinir sargısı sarıldı. Daha sonra olarak cilt insizyonu 4/0 propylene (Doğsan®, Polipropilen sentetik, emilmeyen, monofilaman suture,Türkiye) ile suture edilerek onarıldı.

Grup 5: Sol siyatik sinir dorsal yaklaşımla eksplore edilip,siyatik sinir trifurkasyonu 1 cm proximalinde mikromakas yardımıyla tam kat düz kesi yapıldı. Aynı seansta siyatik sinir 9/0 nylon dikişler ile (Ethilon, Monofilament polyamide 6 suture ,Ethicon Ltd) epinöral onarım yapılarak koaptasyon sağlandı. Daha sonra epinöral onarım hattı etrafına 1x0,6 cm'lik Takrolimus içeren PCL nanofiber sinir sargısı sarıldı. Daha sonra olarak cilt insizyonu 4/0 propylene (Doğsan®, Polipropilen sentetik, emilmeyen, monofilaman suture,Türkiye) ile suture edilerek onarıldı.

Grup 6: Sol siyatik sinir dorsal yaklaşımla eksplore edilip,siyatik sinir trifurkasyonu 1 cm proximalinde mikromakas yardımıyla tam kat düz kesi yapıldı. Aynı seansta siyatik sinir 9/0 nylon dikişler ile (Ethilon, Monofilament polyamide 6 suture ,Ethicon Ltd) epinöral onarım yapılarak koaptasyon sağlandı. Daha sonra epinöral onarım hattı etrafına 1x0,6 cm'lik Metilkobalamin ve Takrolimus içeren PCL nanofiber sinir sargısı sarıldı. Daha sonra olarak cilt insizyonu 4/0 propylene (Doğsan®, Polipropilen sentetik, emilmeyen, monofilaman suture,Türkiye) ile suture edilerek onarıldı.



Şekil 9. Grupların şematik gösterimi

3.2. Nanofiber Sinir Sargılarının Üretimi ve Özellikleri

Çalışmamızda kullanılan nanomateryallerin üretimi Necmettin Erbakan Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Nanomateryallerin üretimi için Takrolimus (%0.1 Takrolin Merhem,Farma-Tek İlaç Sanayi), Metilkobalamin (Osense Vitamin B12 tablet-1000 mcg,TAB ilaç), PCL (Mw = 80,000 g/mol, Sigma-Aldrich), dimetilformamid (DMF,73.09 g/mol, Sigma-Aldrich), kloroform (119.38 g/mol, Carlo Erba Reagents), fosfat tampon solüsyonu (pH=7.4, Gündüz Kimya, Türkiye) temin edilerek üretim aşamasına geçildi.

İlk olarak ilaçsız PCL üretimi için, PCL (%10) 1:1 oranında DMF ve kloroform karışımı içerisinde çözülerek 4 saat manyetik olarak karıştırıldı. PCL nanofiber tabakasına eklenecek ilaç oranı tüm nanofiberler (PCL+Metilkobalamin, PCL+Takrolimus, PCL+Metilkobalamin+Takrolimus) için PCL ağırlığının %30'u olarak belirlendi. PCL+Metilkobalamin+Takrolimus nanofiber üretimi için fraksiyonu eşitlemek üzere Takrolimus ve Metilkobalamin ayrı ayrı olarak PCL ağırlık oranının %15'i olacak şekilde eklendi.

Ardından, ilaç yüklü nanofiber çözeltilerinin her biri için ölçülen ilaç önce çözücü karışımında çözülmüştür. Daha sonra bu ilaç-çözücü karışımına belirli miktarda PCL eklenmiş ve her bir çözeltide homojen bir kıvam elde edene kadar karıştırılarak aynı şekilde hazırlanmıştır.

Elektro-eğirme işlemi, 22 G iğnelere bağlı çözelti yüklü plastik şırıngaları iten şırınga pompası ve toplayıcı olarak alüminyum folyo kaplı silindirik döner tambur kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektro-eğirme cihazının besleme hızı, uygulanan voltaj ve metalik iğne ucu ile toplayıcı tambur arasındaki mesafe parametreleri sırasıyla 1 mL/saat, 25-27 kV ve 14 cm olarak ayarlanmıştır. Tüm nanofiber tabakalar için standart ortam koşullarında elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektro-eğirme işlemi sonucunda tambur üzerinde oluşan nanofiber tabaka alüminyum folyodan ayrılarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

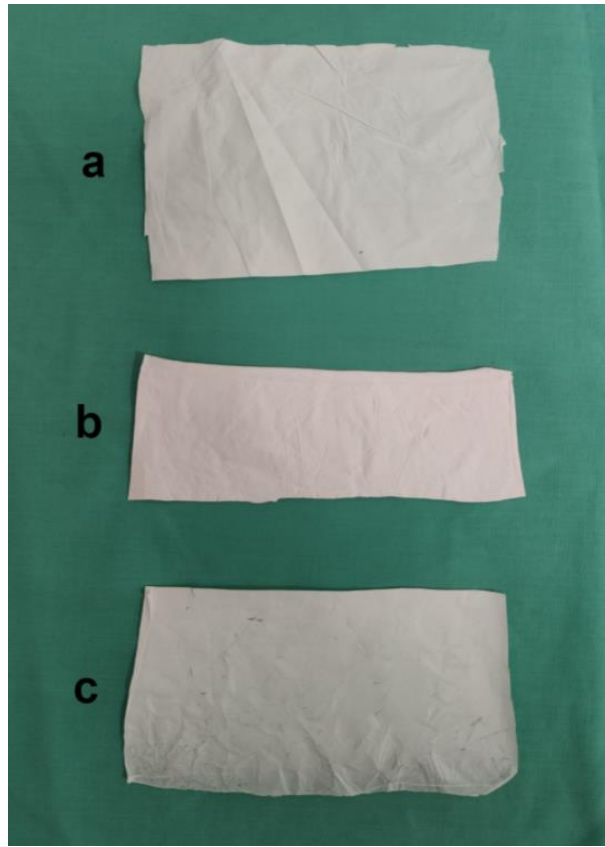
Nanofiber materyallerin in vitro karakterizasyon analizi değerlendirmesinde Taramalı Elektron Mikroskopisi (TEM) ile görüntü analizi, hidrofilik/hidrofobik özelliklerin analizi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile spektrum analizi ve biyobozunurluk testleri yapıldı.

İlaç yüklü nanofiber yüzeylerinin morfolojik yapıları, püskürtme yoluyla altın nano tabaka ile kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskopu (TEM, Hitachi - SU 1510) kullanılarak birkaç farklı büyütme ölçeğinde tarandı. Nanofiberlerin ortalama lif çapları, 5 kat büyütülmüş görüntüler kullanılarak Image J yazılımı yardımıyla tanımlandı.

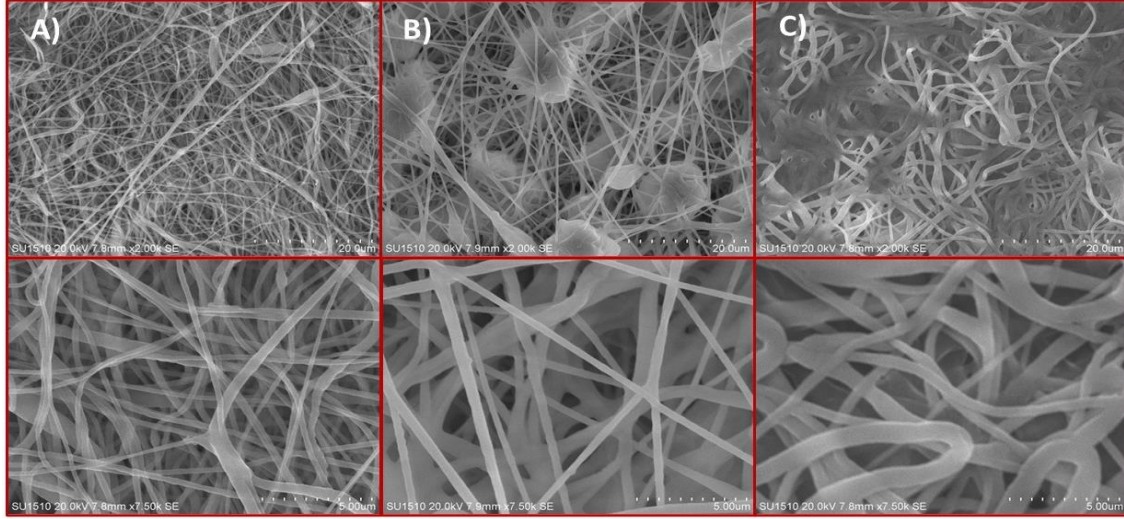
Nanofiber tabakaların hidrofiliklik/hidrofobiklik özellikleri bir su temas açısı tansiyometresi (Biolin Scientific Attension, ThetaLite) ile değerlendirildi. Nanofiber tabakalardan 2×2 cm boyutlarında kesilen numuneler düzeneğe yerleştirilerek temas açılarının kaydı sırasında 5 μ L'lik su damlacıkları nanofiber parçaların dış yüzeylerine bir dakika süreyle damlatıldı. Ölçümlerin ortalama değeri her bir numune için nihai temas açısı olarak hesaplandı.

Nanofiber örneklerinin FTIR spektroskopisi analizi, fonksiyonel gruplar ve moleküller arasındaki kimyasal bağları belirlemek için $400-4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boylarında FTIR spektrometresi (Thermo Scientific, Nicolet iS20) kullanılarak gerçekleştirildi.

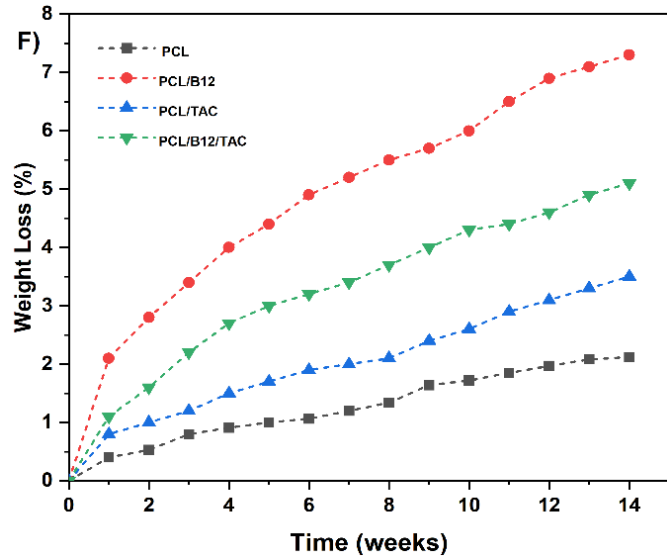
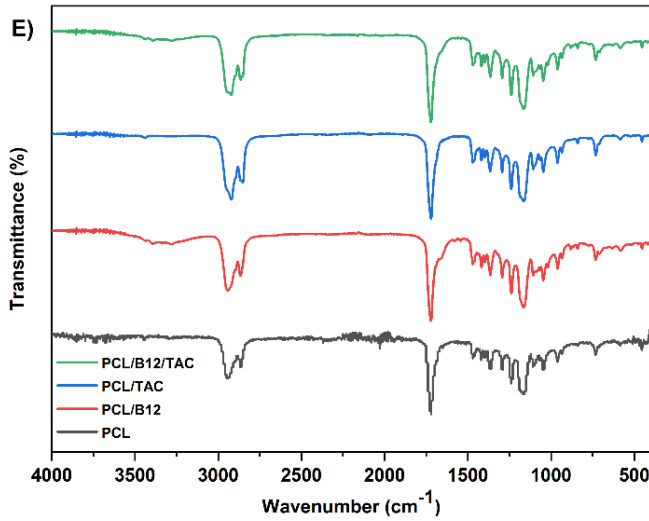
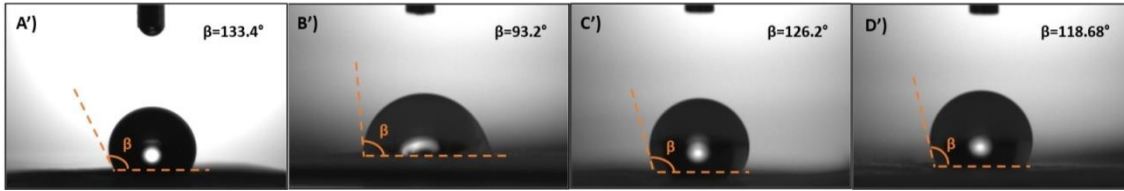
Fosfat tampon solüsyonuna batırma yöntemi kullanılarak 3 x 3 cm kesilmiş nanofiber örneklerinin biyobozunurluk testi 14 hafta sürdü ve her bir örneğin ağırlık kayıpları hafta hafta kaydedildi. Örnekler başlangıçta kuru halde tartılarak bir haftalık süreç boyunca 37 °C'de inkübasyon için 15 mL fosfat tampon solüsyonu içeren tüplere aktarıldı. Her haftanın sonunda, numuneler tüplerden çıkarıldı ve filtre kağıdı ile kurutuldu ve ardından her ölçüm için kurumaya bırakıldı. Sonuçta, her bir nanofiber numunesinin bozunma eğrileri, zaman içindeki ağırlık değişimlerine (%) göre çizildi.



Şekil 10. Üretimi yapılan nanofiber materyallerden örnekler (a) Saf PCL , (b) PCL+Metilkobalamin, (c) PCL+Takrolimus



Şekil 11. TEM görüntüleri (A) PCL+Metilkobalamin (B) PCL+Takrolimus (C)PCL+Metilkobalamin+Takrolimus.



Şekil 12. Su kontakt açıları (A')SafPCL (B')PCL+Metilkobalamin (C')PCL+Takrolimus (D') PCL+Metilkobalamin+Takrolimus. (E) Nanofiber sargıların FTIR spektroskopisi analizi . (F) Nanofiber sargıların haftalara göre in vitro biyobozunurluk oranı.

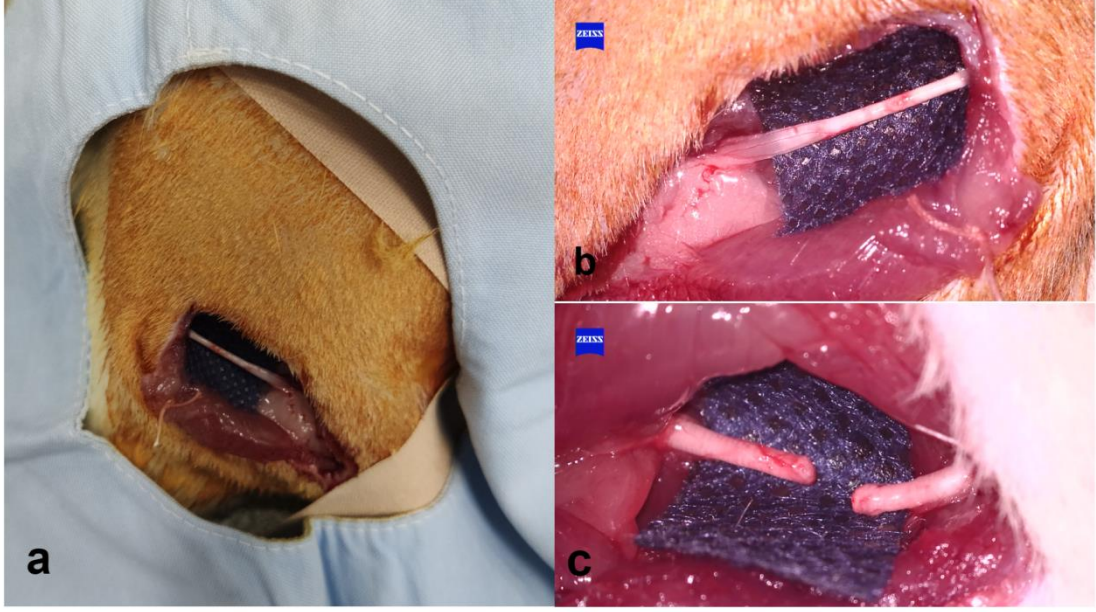
3.3.Anestezi

Tüm cerrahi prosedürler ve deney sonunda sakrifikasyon işlemi anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Xylazine (10mg/kg- Rompun®, Bayer,Türkiye) ve Ketamin (40 mg/kg - Ketalar®,Eczacıbaşı, Türkiye) karışımı birlikte uygulanmıştır. Cerrahi sonrasında analjezi amacıyla 100 mg/kg Parasetamol içme sularına karıştırılmıştır.

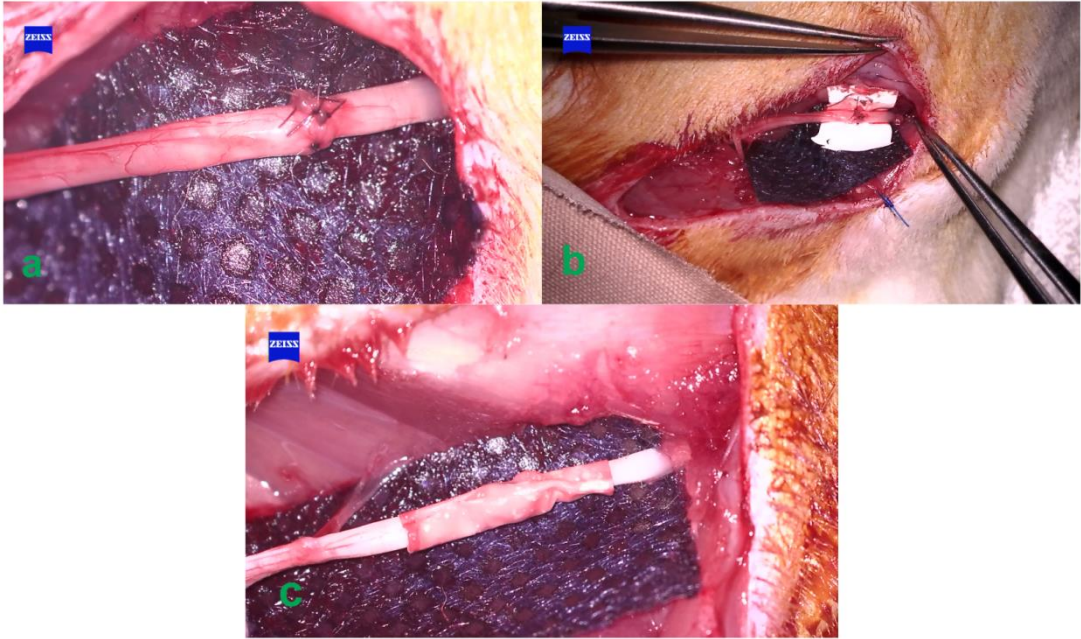
3.4.Cerrahi Yöntem

Tüm gruplarda cerrahi işlemler uygun anestezi sonrası sıçanların sol siyatik siniri üzerinde uygulandı. Sıçanların sağ siyatik sinirleri üzerinde herhangi bir işlem uygulanmadı. Siyatik sinir diseksiyonu için sol posterior bacak ve gluteal bölge traş edildi. Cerrahi bölgeler Baticinol® (Alg, İstanbul) ile temizlendi ve ratlar operasyon tahtası üzerine yüz üstü yatırıldı. Sol gluteal bölgeden sol uyluğa doğru uzanan yaklaşık 2 cm'lik insizyonla girildikten sonra cilt flepleri eleve edildi. İntermuskuler diseksiyon sonrası siyatik sinir eksplore edildi. Yeterli ekspozisyon sağlandıktan sonra siyatik sinir mikroskop altında etraf dokulardan nazikçe diseke edildi. (Carl Zeiss, f170, Opmi pico, Germany)

Grup 1 hariç diğer tüm gruplarda sol siyatik trifurkasyonunun 1 cm proximalinde mikroskop altında mikromakas ile tam kat düz kesi yapıldı. Kesi sonrası aynı seansta siyatik sinir 9/0 nylon dikişler ile (Ethilon, Monofilament polyamide 6 suture ,Ethicon Ltd) epinöral onarım yapılarak koaptasyon sağlandı. Grup 2 için sadece epinöral onarım yapıldı. Grup 3 için epinöral onarım hattı etrafına elektro eğirme yöntemi ile üretilen PCL sinir sargısı sarıldı. Grup 4 için epinöral onarım hattı etrafına içerisinde Metilkobalamin bulunan PCL sinir sargısı sarıldı. Grup 5 için epinöral onarım hattı etrafına içerisinde Takrolimus bulunan PCL sinir sargısı sarıldı. Grup 6 için içerisinde hem Metilkobalamin hem de Takrolimus bulunan PCL sinir sargısı sarıldı. Sinir onarımı tamamlandıktan sonra kas insizyonu 4/0 vikril dikiş materyali ile, cilt insizyonu 4/0 propylene (Doğsan®, Polipropilen sentetik, emilmeyen, monofilaman suture,Türkiye) ile primer suture edilerek onarıldı. Cerrahi sonrası 5 gün boyunca insizyon hatlarına günlük Baticinol® (Alg, İstanbul) sürülerek pansumanla takip edildi.



Şekil 13. (a) Sol siyatik sinir diseksiyonu, (b) Siyatik sinir , (c) Siyatik sinirde tam kat kesi yapılması



Şekil 14. (a) Siyatik sinirde kesi sonrası epinöral onarım, (b) Nanofiber sinir sargısının epinöral onarım hattı etrafına yerleştirilmesi , (c) Nanofiber sinir sargısının sarılmış hali

3.5.Sinir Rejenerasyonu Değerlendirme Yöntemleri

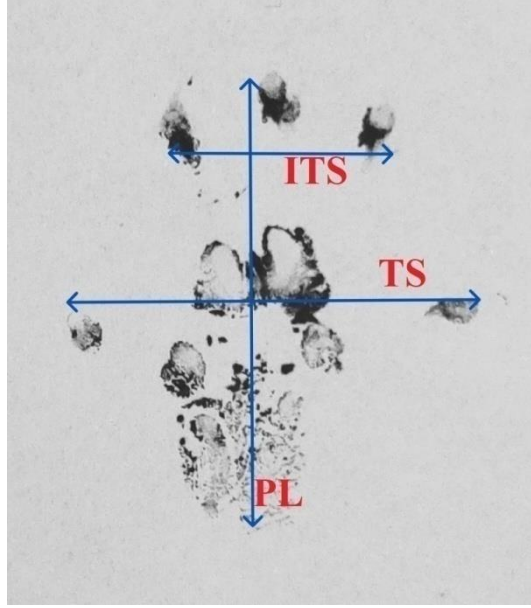
Siyatik sinirde epinöral onarım yapıldıktan sonra sıçanlar 8 hafta süre ile takip edildi. Sıçanlar sakrifiye edilmeden önce fonksiyonel değerlendirme için yürüme testi ve elektrofizyolojik çalışmalar yapıldı. Sakrifikasyon anestezi altında geręekleřtirildikten sonra sol siyatik sinirden örnek alınarak histopatolojik inceleme yapıldı. Bilateral gastroknemius kasları origo-insersiyolarından ayrılarak hassas laboratuvar terazisi yardımıyla ağırlık ölçümleri geręekleřtirildi.

3.5.1.Yürüme testi

Motor fonksiyonel değerlendirme için yapıldı. 8. hafta sonunda sıçanların her iki ayakları mürekkep ile boyandıktan sonra 90 cm uzunluğunda 10 cm genişliğindeki yürüme koridoruna yerleştirilen beyaz bir kağıttan oluşan zemin üzerinde yürütüldü. Bu yürüme sonrası hayvanların ayak izleri alındı. En uygun ayak izleri kullanılarak, topuk ve 3. parmak ucu arasındaki mesafe-bası uzunluğu (print length (PL)), birinci ve beşinci parmaklar arası mesafe-adım genişliği (toe spread (TS)), ikinci ve dördüncü parmaklar arası mesafe- adım ortası genişlik (intermediate toe spread (ITS)) milimetrik cetvel yardımı ile ölçüldü .

Bu değerler kullanılarak Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFI) hesaplandı. SFI De Medinacelli tarafından geliştirilen daha sonra Bain ve ark. tarafından modifiye edilen formülasyona göre hesaplandı (77,78). 0 ile -100 arası elde edilen değerlerde 0'a yakın değerler daha iyi fonksiyonel sonuçları gösterirken, -100'e yaklaşan değerlerde fonksiyonel kaybın derecesi artmaktadır. Elde edilen SFI değerlerinde gruplar arası fark olup olmadığı istatistiksel olarak araştırıldı.

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



Şekil 15. SFI hesaplamasında kullanılan değerlerin sıçan ayak izi üzerindeki şematize görüntüsü, PL (bası uzunluğu), TS (adım genişliği), ITS (adım ortası genişlik).

3.5.2. Elektrofizyolojik Ölçümler

Elektromiyografi (EMG), sıçanlar ve fareler de dahil olmak üzere serbestçe hareket eden hayvanlarda kas içi veya yüzey elektrotları kullanılarak kas gruplarından aktivite kaydetmek için kullanılabilir (79). Motor ünitelerinin çalışma şekli ve düzeltilmiş EMG kaydının genliği, kas aktivitesinin doğrudan ölçülmesini sağlar. Sıçan arka bacak kaslarına yerleştirilen EMG elektrotları sık ve seri kayıtlar sağlayarak reinnervasyonun zamansal seyrinin analizine olanak tanır (80). Bileşik kas aksiyon potansiyellerinin (Compound Muscle Action Potentials) (CMAPs) amplitüdü hedef kası innerve eden sinir liflerinin sayısı ile doğru orantılı olduğundan ve motor sinirin iletim hızının hesaplanmasına olanak sağladığından, CMAPs incelemeleri periferik sinirlerin iletim fonksiyonu için önemli bir göstergedir (81). Distal latans, en hızlı ileten sinir liflerinin aktivasyonu için gereken süreyi temsil ederken, nöromüsküler kavşaktan sinir iletimi ve ardından kas lifi aktivasyonu için geçen zaman aralığını da içerir.

Latans : Elektriksel uyarı ile bileşik kas aksiyon potansiyeli arasındaki zaman farkı

Tepeden Tepeye Genlik (Amplitüd): Bileşik kas aksiyon potansiyelinde iki tepe noktası (en yüksek potansiyel ile en düşük potansiyel) arasındaki voltaj farkı

Sıçanlarda 8. hafta sonunda bileşik kas aksiyon potansiyellerini tespit etmek amaçlı siyatik sinir stimulasyonu yapıldı. CMAPs üzerinden latans ve amplitüd değerleri hesaplandı. Sonucu etkilememesi açısından myelorelaksan ilaç kullanılmadı. Elektromiyografik değerlendirme öncesi direnci azaltmak amacıyla sıçanların uyluk ve bacak bölgesindeki tüyler traş edildi. Ölçüm için iki uçlu ve uçları arasındaki genişliği 20 mm olan stimülatör, aktif ve toprak elektrodlar kullanıldı. Aktif elektrod gastroknemius kasının orta bölgesine ve toprak elektrod kuyruğa yerleştirildi. Stimülatörün bir ucu lomber vertebralardan sol siyatik sinirin çıktığı seviyeye, diğer ucu ise distalde siyatik sinir trasesine yerleştirildi ve 1 Hz frekanslı 0,2 ms süreli olarak verilen uyarı sonrasında elde edilen yanıtlar kayıt altına alındı.

3.5.3.Gastroknemius Kas İndeksi

Gastroknemius kas ağırlığı, siyatik sinir hasarı ve onarımından sonra fonksiyonel iyileşmeyi araştırmak için kullanılmıştır (82). Ayak bileği plantar fleksör kaslarından olan gastroknemius siyatik sinirin tibial dalı tarafından inerve olur. Denervasyonun kas üzerindeki etkileri hızlı bir şekilde ortaya çıkar ancak iyileşme reinnervasyon miktarını yansıtmayacak şekilde yavaştır (83). Siyatik sinirin kesilmesi, gastroknemius kasının nöral innervasyonunun kaybına ve gastroknemius kas kütlelerinde azalmaya yol açmaktadır.

8. hafta sonunda tüm sıçanların bilateral gastroknemius kasları origo ve insersiyon noktalarından ayrılarak çıkarıldı ve ıslak kas ağırlıkları dijital hassas laboratuvar terazisi ile tartıldı. Ratların ağırlıkları ile beraber kas kütlelerinin değişkenlik gösterebileceği göz önüne alınarak kas indeksi hesaplandı. Kas indeksi opere olan tarafın kas ağırlığı kontralateral taraf kas ağırlığına bölünerek hesaplandı (84).

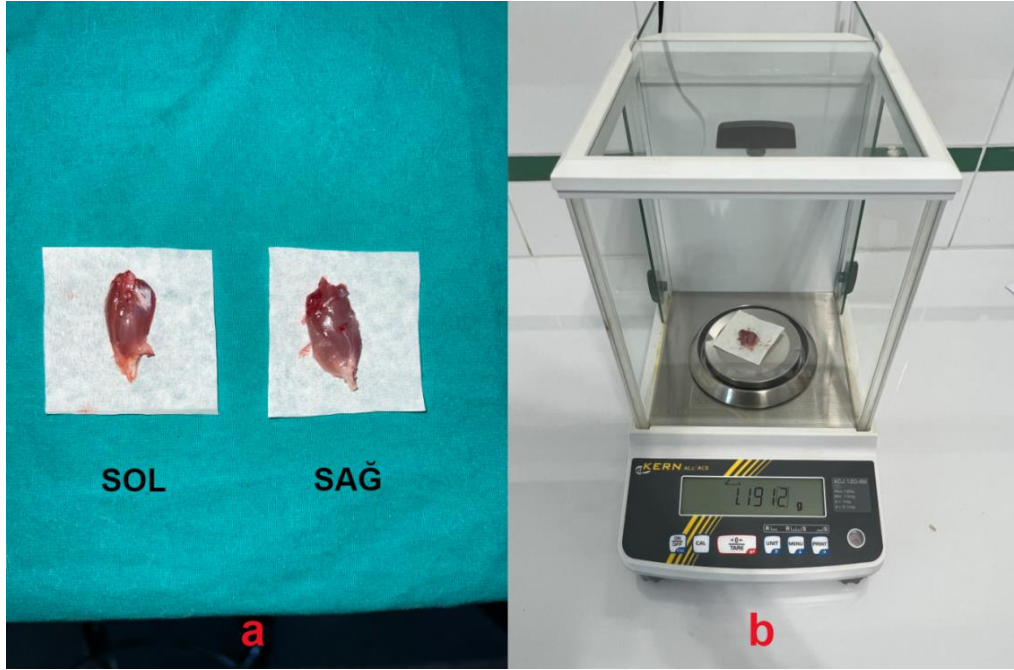


a

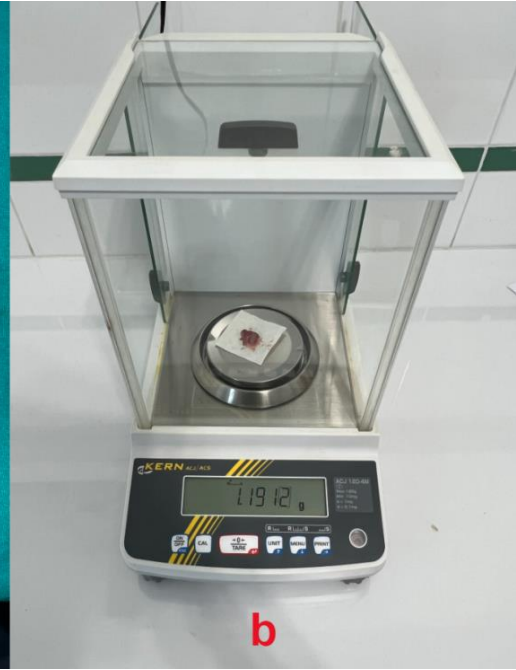


b

Şekil 16. Kas indeksi hesaplaması için (a) Gastrocnemius kas diseksiyonu ve kasmn ortaya konması (b) Gastrocnemius kasmın insersiyosundan ayrılması



a



b

Şekil 17. (a) Bilateral gastrocnemius kasmın origo-insersiyu noktalarından ayrılarak çıkarılması (b) Kasların tek tek dijital hassas laboratuvar terazisi yardımıyla ağırlıklarının ölçülmesi

3.5.4.Histopatolojik Değerlendirme

8. haftanın sonunda tüm sıçanlar anestezi altında sakrifiye edilerek sol siyatik sinirden sinir rejenerasyonunun histopatolojik değerlendirilmesi için sinir onarım hattını içerisine alacak Şekilde 1 cm'lik uzunlamasına örnekler alındı. Histopatolojik değerlendirme için örnekler %10'luk nötral formalin solüsyonunda 24-48 saat tespit edildikten sonra makroskobik olarak örnekleme yapıldı. Periferik sinirlerin proksimal ve distallerinden ayrı ayrı örnekleme yapıldı ve proksimal ve distal olarak kodlandı. Dokular otomatik doku takip cihazında rutin doku takip iŐlemlerine alındı. Takip sonrasında doku gömme cihazında hazırlanan parafin bloklardan Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile histokimyasal Masson Trikrom (MTK) ve Alcian Blue boyamalar için mikrotom ile 4-5 mikron (μm) kalınlığında kesitler alındı. DakoArtisan Link Pro tam otomatize histokimya cihazı ile MTK ve Alcian Blue boyamaları uygulandı.

H&E ve histokimyasal boyalı lamalar ışık mikroskopunda Olympus BX 46 ile uzman patolog tarafından değerlendirildi. Mikroskopik incelemede inflamasyon yoğunluğu, vaskülarizasyon, fibrozis, yabancı cisim reaksiyonu, ödem, fasiküler organizasyon bozukluğu (disorganizasyon) ve akson dejenerasyonu değerlendirildi. Ayrıca mm^2 'lik alanda periferik sinirdeki aksonların sayımı (akson yoğunluğu) yapıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Histopatolojik Değerlendirme Kriterleri

	Histopatolojik Görünüm	Puan Skalası
İnflamasyon Yoğunluğu	Yok	0
	Hafif	1
	Orta	2
	Yoğun	3
Vaskülarizasyon (1 Büyük Büyütme Alanı içerisinde)	0-5 adet	1
	6-10 adet	2
	>10 adet	3
Fibrozis (Fibroblast Proliferasyonu)	Yok	0
	Hafif	1
	Orta	2
	Yoğun	3
Yabancı Cisim Reaksiyonu	Yok	0
	Hafif	1
	Orta	2
	Yoğun	3
Fasiküler Organizasyon Bozukluğu	Normal sinir morfolojisi	0
	Normal sinir yapısına yakın, fasiküller arası düzgün geçiş, disorganizasyon az <%10	1
	Sinir fasikülleri arası düzgün geçiş azalmış %10-%50	2
	Sinir fasikülleri arası düzgün geçiş belirgin azalmış >%50	3
Ödem	Yok	0
	Var	1
Aksonal Dejenerasyon	Dejenerasyon Yok	0
	%10'dan az	1
	%10-50 arası	2
	%50'den fazla	3

3.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics v25 (IBM Corp, New York , USA) programı kullanılarak yapıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistik (ortalama,ortanca,25-75 persentil vb.) değerleri hesaplandı. Normal dağılıma sahip olmayan bağımsız değişkenlerin değerlendirilmesi için Kruskal-Wallis varyans analizi yapılarak gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Grupların kendi arasındaki ikili karşılaştırmaları için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ değeri kabul edildi.

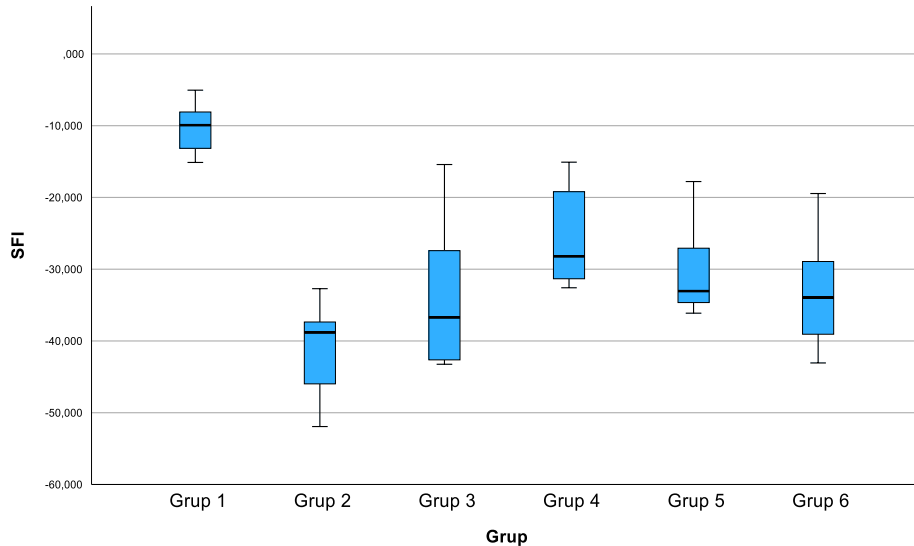
4. BULGULAR

4.1.Makroskopik Bulgular

Sıçanların siyatik sinir eksplorasyonu için yapılan insizyon hattında komplikasyon görülmedi. Grup 2’de bir sıçanın sol alt ekstremitesinde bası yarası görüldü. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra Grup 3’te bir sıçanın epinöral onarım hattı etrafında kist oluşumu görüldü. Histopatolojik inceleme örneği alınması için sol siyatik sinirler tekrar explore edildiğinde nanofiber sargıların PCL’nin biyobozunma süresi uzun olması sebebiyle sinir üzerinde sarılı halde kaldığı ve bu sinir sargılarının sinir üzerinde herhangi bir kompresyon etkisi yapmadığı görüldü.

4.2.Yürüme Testi

Fonksiyonel değerlendirme için 8. haftanın sonunda sıçanlar sakrifiye edilmeden önce yürüme testi yapıldı. Elde edilen ayak izlerinden SFI formüle uygun olarak hesaplandı. Gruplar arasında SFI değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$).



Şekil 18. Gruplara göre SFI ortalama değerleri grafiği

SFI değerlerinin gruplara göre ortalama ve standart sapma sonuçları Grup 1'den Grup 6'ya sırasıyla $-10,31 \pm 3,35$, $-41,11 \pm 7,02$, $-34,01 \pm 10,41$, $-25,63 \pm 6,88$, $-30,42 \pm 6,34$ ve $-33,30 \pm 7,76$ olarak bulundu. Grup 1 ile diğer tüm gruplar arasında SFI değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$). Siyatik sinirde tam kat kesi yapılarak cerrahi işlem uygulanan gruplar arasında en iyi SFI değeri Grup 4'te bulundu. Grup 4 ile diğer tam kat kesi sonrası cerrahi işlem yapılan gruplar karşılaştırıldığında Grup 2,3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken (sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.036$), Grup 5,6 ile arasında SFI değeri daha iyi olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p = 0.074$, $p = 0.059$).

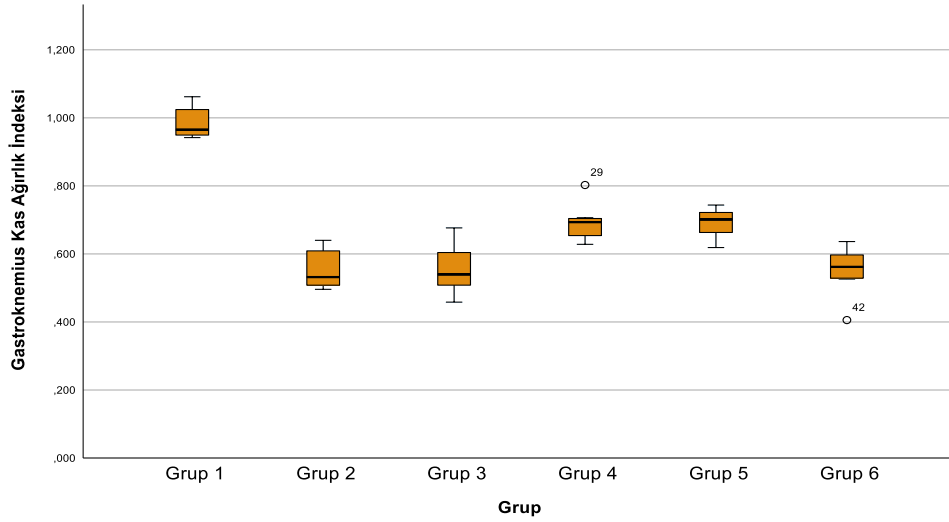
Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 onarım hattı etrafına nanofiber sinir sargısı yapılan diğer gruplar karşılaştırıldığında; Grup 3 ve 6 ile arasında (sırasıyla $p = 0.401$, $p = 0.059$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken, Grup 4 ve 5 ile arasında (sırasıyla $p < 0.001$, $p = 0.003$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında sadece Grup 4 ile arasında ($p = 0.036$) anlamlı fark bulunurken Grup 5,6 ile arasında ($p = 0.248$, $p = 0.6$) anlamlı fark bulunmadı.

4.3. Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi

Fonksiyonel değerlendirme için 8. haftanın sonunda tüm sıçanların sağ ve sol gastroknemius kasları origo-insersiyon noktalarından ayrılarak eksize edildi. Hassas laboratuvar terazisi ile yapılan ağırlık ölçümleri sonrası siyatik sinire cerrahi işlem yapılan taraf (Sol) cerrahi işlem yapılmayan (Sağ) tarafa oranlanarak gastroknemius kas ağırlık indeksi hesaplandı. Gruplar arasında gastroknemius kas ağırlık indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.001$).

Gastroknemius kas ağırlık indeksi değerlerinin gruplara göre ortalama ve standart sapma sonuçları Grup 1'den Grup 6'ya sırasıyla; $0,985 \pm 0,046$, $0,554 \pm 0,056$, $0,554 \pm 0,071$, $0,691 \pm 0,054$, $0,691 \pm 0,044$, $0,552 \pm 0,070$ olarak bulundu. Grup 1 ile diğer tüm gruplar arasında gastroknemius kas ağırlık indeksi değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$).



Şekil 19. Gruplara göre Gastroknemius kas ağırlık indeksi değerleri grafiği

Siyatik sinirde tam kat kesi yapılarak cerrahi işlem uygulanan gruplar arasında sham grubuna en yakın, en iyi gastroknemius kas ağırlık indeksi değerleri Grup 4 ve 5 'te bulundu. Grup 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.600$). Grup 4 ve 5 diğer gruplarla karşılaştırıldığında Grup 2,3 ve 6 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.002$ $p=0.002$, $p=0.003$ $p=0.002$, $p=0.002$ $p=0.002$).

Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 onarım hattı etrafına nanofiber sinir sargısı yapılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında; Grup 3 ve 6 ile arasında anlamlı fark bulunmazken (sırasıyla $p=0.916$, $p=0.674$), Grup 4 ve 5 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.002$).

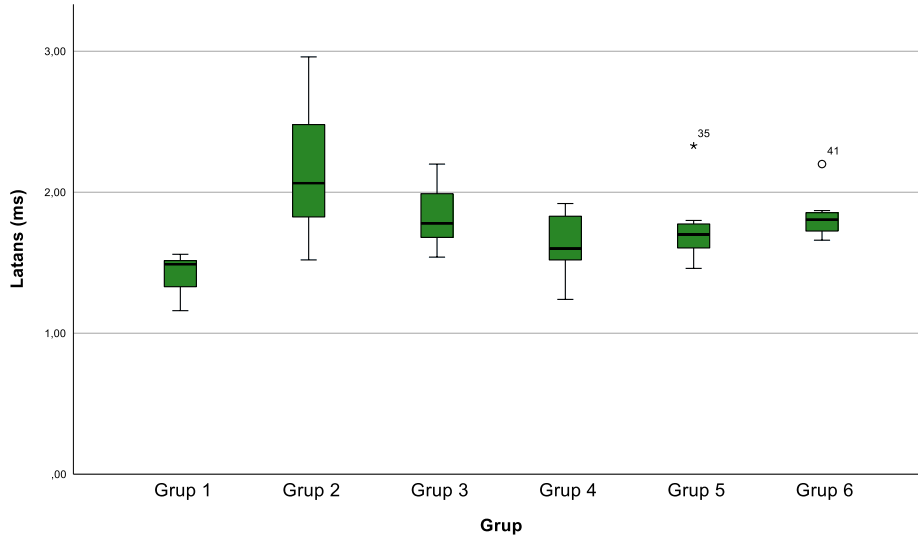
Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında Grup 4 ve 5 ile arasında ($p=0.003$, $p=0.002$) anlamlı fark bulunurken Grup 6 ile arasında ($p=0.674$) anlamlı fark bulunmadı.

4.4.Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları

Elektromiyografik incelemede 8. hafta sonunda tüm grupların bileşik kas aksiyon potansiyelleri ölçülerek elde edilen aksiyon potansiyelleri üzerinden latans süresi ve amplitüd değeri hesaplandı.

4.4.1 Latans (ms)

Tüm gruplar arasında latans süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0.009$). Grup 1'den Grup 6'ya sırasıyla ortalama latans süreleri; $1,42\pm 0,13$, $2,15\pm 0,47$, $1,83\pm 0,22$, $1,63\pm 0,22$, $1,74\pm 0,25$, $1,82\pm 0,16$ ms olarak bulundu.



Şekil 20. Gruplara göre ortalama latans süreleri grafiği

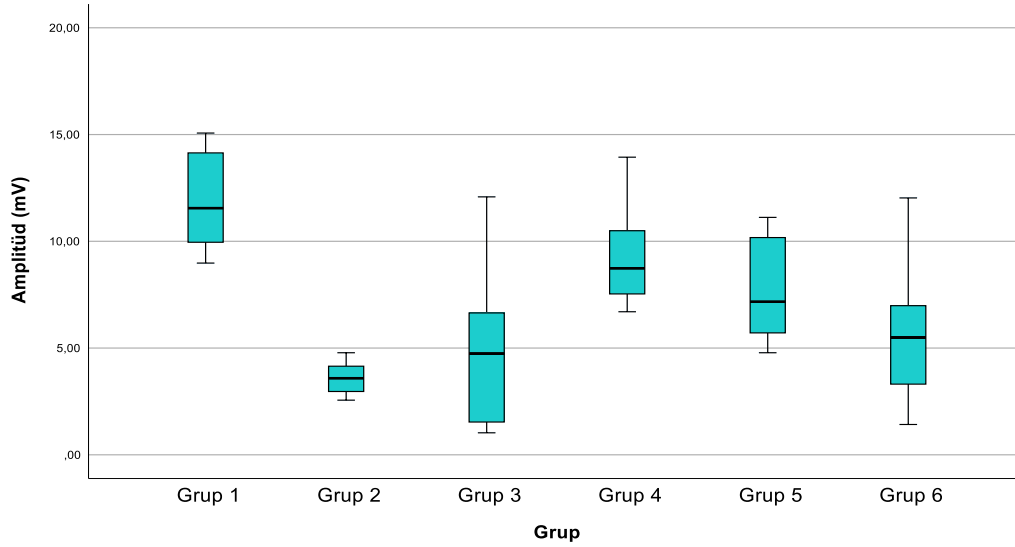
Grup 1 ile Grup 2,3,4,5 ve 6 arasında latans süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.001$, 0.023 , $p=0.005$, $p<0.001$) .

Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 onarım hattı etrafına nanofiber sinir sargısı yapılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında; Grup 3 ve 6 ile arasında anlamlı fark bulunmazken (sırasıyla $p=0.156$, $p=0.093$), Grup 4 ve 5 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.002$, $p=0.036$).

Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında; daha kısa latans süresine sahip olmalarına rağmen Grup 4,5 ile arasında ($p=0.141, p=0.293$) anlamlı fark saptanmadı. Grup 6 ile benzer latans süre ortalamalarına sahip olduğu görüldü.

4.4.2. Amplitüd (mV)

Tüm gruplar arasında amplitüd değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Grup 1'den Grup 6'ya sırasıyla ortalama amplitüd değerleri; $11,91\pm 2,30$, $3,59\pm 0,76$, $4,86\pm 3,71$, $9,27\pm 2,41$, $7,75\pm 2,51$, $5,62\pm 3,37$ mV olarak bulundu.



Şekil 21. Gruplara göre ortalama amplitüd değerleri grafiği

Grup 1 ile Grup 2,3,4,5 ve 6 arasında amplitüd değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.005$, $p=0.021$, $p=0.012$, $p=0.003$) .

Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 , onarım hattı etrafına nanofiber sinir sargısı yapılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında; Grup 3 ve 6 ile arasında anlamlı fark bulunmazken (sırasıyla $p=0.462$, $p=0.093$), Grup 4 ve 5 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında; Grup 4 ile arasında ($p=0.012$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken Grup 5 ve 6 ile arasında ($p=0.115$, $p=0.600$) anlamlı fark saptanmadı.

4.5.Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

Tüm sıçanlar 8. haftanın sonunda sakrifiye edildikten sonra sol siyatik sinirlerinden epinöral onarım hattını da içerisine alacak şekilde patolojik örnekler alındı. Alınan patolojik örnekler ödem, fibrozis, aksonal dejenerasyon, inflamasyon, vaskülarizasyon,akson yoğunluğu,fasiküler organizasyon bozukluğu(disorganizasyon) ve yabancı cisim reaksiyonu açısından değerlendirildi.

Tablo 2. Gruplara göre ödem,fibrozis,inflamasyon ve yabancı cisim reaksiyonu sonuçlarının ortalama \pm standart deviasyon değerleri

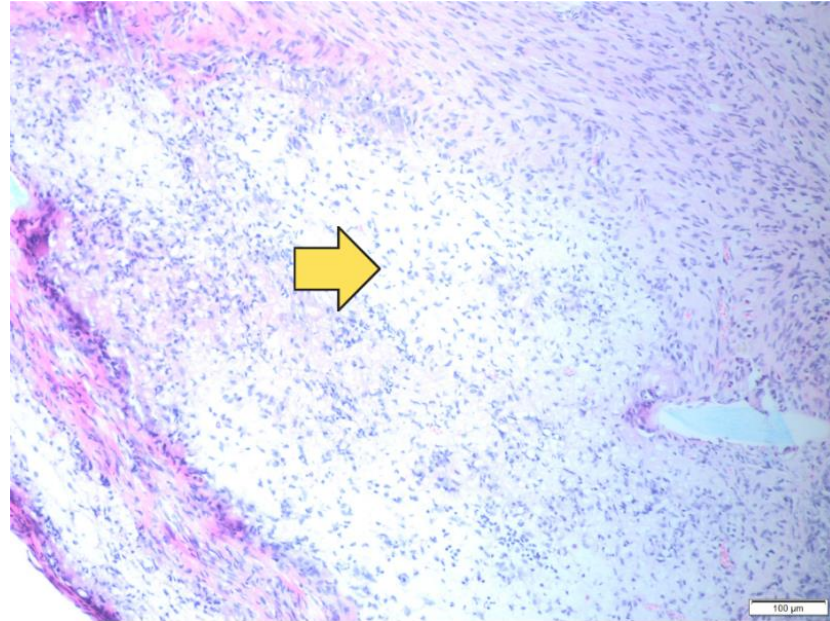
	Ödem	Fibrozis	İnflamasyon	Yabancı Cisim Reaksiyonu
Grup 1	0	0	0.125 \pm 0.354	0.125 \pm 0.354
Grup 2	0.875 \pm 0.354	1.625 \pm 0.744	2 \pm 0.756	0.375 \pm 0.518
Grup 3	1 \pm 0	2 \pm 0.756	2 \pm 0.756	2.375 \pm 0.518
Grup 4	1 \pm 0	1.625 \pm 0.744	1.500 \pm 0.535	2.500 \pm 0.535
Grup 5	1 \pm 0	1.250 \pm 0.463	1.250 \pm 0.463	1.625 \pm 0.744
Grup 6	1 \pm 0	1.375 \pm 0.744	1.250 \pm 0.463	1.750 \pm 0.707

Tablo 3. Gruplara göre ödem, aksonal dejenerasyon, vaskülarizasyon, akson yoğunluğu ve disorganizasyon sonuçlarının ortalama±standart deviasyon değerleri

	Aksonal Dejenerasyon	Vaskülarizasyon	Akson Yoğunluğu (mm ²)	Fasiküler Organizasyon Bozukluğu
Grup 1	0.125±0.354	1±0	49.625±8.484	0±0
Grup 2	2±0.756	1.875±0.835	137.625±25.662	1.875±0.835
Grup 3	1.750±0.707	2.750±0.463	142.875±14.327	1.500±0.756
Grup 4	1.125±0.641	2.625±0.518	154±19.004	1.125±0.354
Grup 5	1±0.535	2.625±0.518	177.875±16.418	1.625±0.744
Grup 6	1.125±0.991	2.625±0.518	173.625±15.371	1.375±0.916

4.5.1. Ödem

Siyatik sinirdeki ödem değerlendirildiğinde gruplar arasında sadece Grup 1’de ödem bulunmazken diğer tüm gruplarda ödem mevcuttu ve bu fark Grup 1 ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).



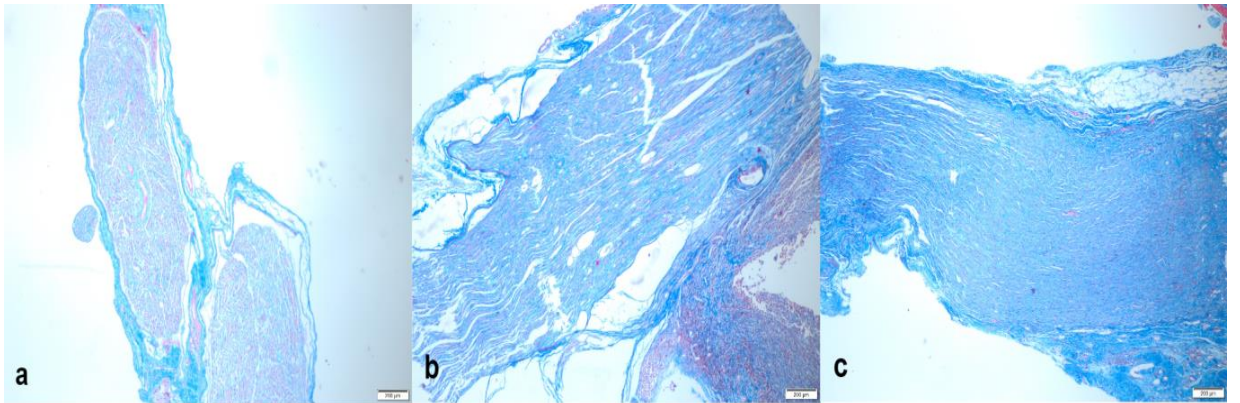
Şekil 22. x100 H&E Ödem (Ok ile işaretli alan)

4.5.2. Fibrozis

Fibrozis değerleri açısından tüm gruplar arasında istatiksels olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Siyatik sinirde tam kat kesi yapılarak cerrahi işlem uygulanan gruplar arasında ortalama fibrozis değeri Grup 5'te en düşük olarak bulundu. Grup 5 siyatik sinire cerrahi işlem uygulanan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında sadece Grup 3 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p=0.037$) Grup 2,4 ve 6 ile arasında ortalama fibrozis değeri düşük olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.268$, $p=0.268$, $p=0.890$).

Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 , onarım hattı etrafına nanofiber sinir sargısı yapılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında;Grup 3,4,5 ve 6 ile arasında fibrozis değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.308$, $p=1$, $p=0.268$, $p=0.393$).

Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında;Grup 4 ve 6 ile arasında anlamlı farklılık bulunmazken ($p=0.308$, $p=0.086$) Grup 5 ile arasında fibrozis değerleri açısından anlamlı fark bulundu ($p=0.037$).



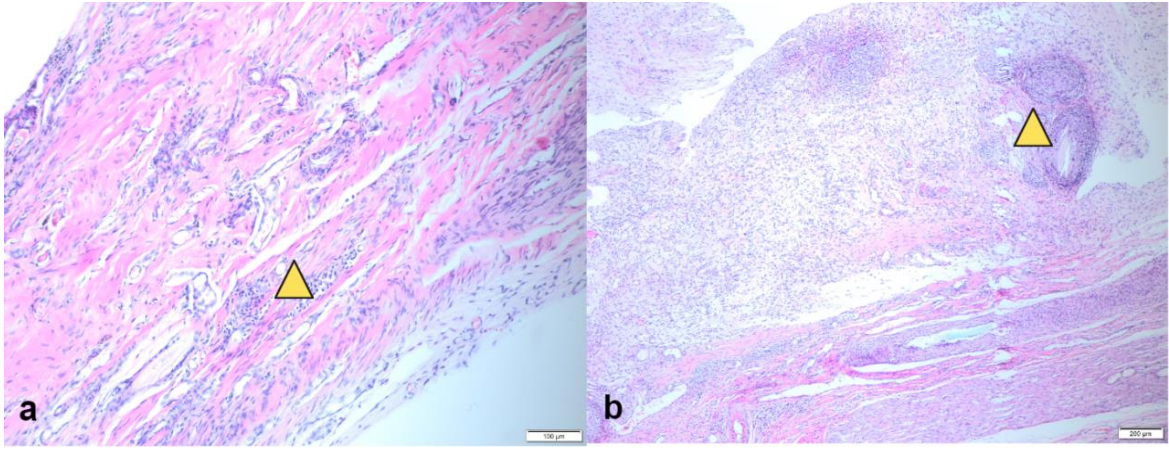
şekil 23. (a) x40 MTK fibrozis yok , (b) x40 MTK orta derecede fibrozis ,(c) x40 MTK yoğun fibrozis.

4.5.3. İnflamasyon

İnflamasyon değerleri açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Grup 1 ile diğer tüm gruplar arasında inflamasyon değerleri açısından anlamlı farklılık saptandı ($p<0.001$).

Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 , onarım hattı etrafına nanofiber sinir sargısı yapılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında;Grup 5 ve 6 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p=0.037$), Grup 3 ve 4 ile arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=1$, $p=0.165$).

Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında; Grup 5 ve 6 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p=0.037$), Grup 4 ile arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.165$).



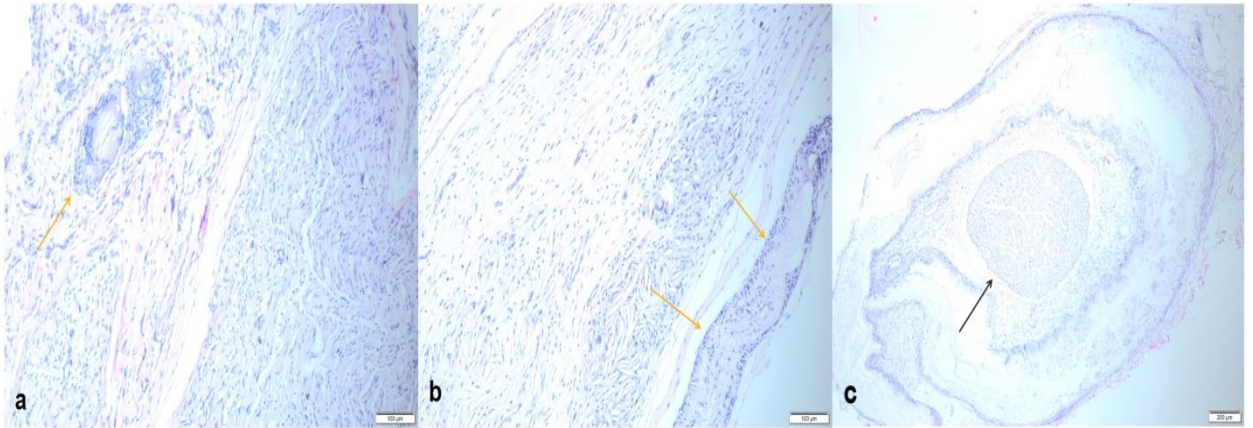
Şekil 24. (a) X100 H&E Hafif İnflamasyon, (b) x40 H&E Yoğun İnflamasyon (işaretli alanlar)

4.5.4.Yabancı Cisim Reaksiyonu

Siyatik sinirde tam kat kesi yapılarak cerrahi işlem uygulanan gruplar ortalama yabancı cisim reaksiyonu açısından değerlendirildiğinde sham grubuna en yakın değer Grup 2’de saptandı.Grup 1 ve 2 arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.264$).

Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 epinöral sinir onarımı sonrası sinir sargısı kullanılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ;Grup 3,4,5 ve 6 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.004$, $p=0.002$). Siyatik sinir etrafına sarılan nanofiber sinir sargıları ışık mikroskopi incelemesinde multinükleer dev hücreler açısından daha yoğun olup belirgin yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaktadır.

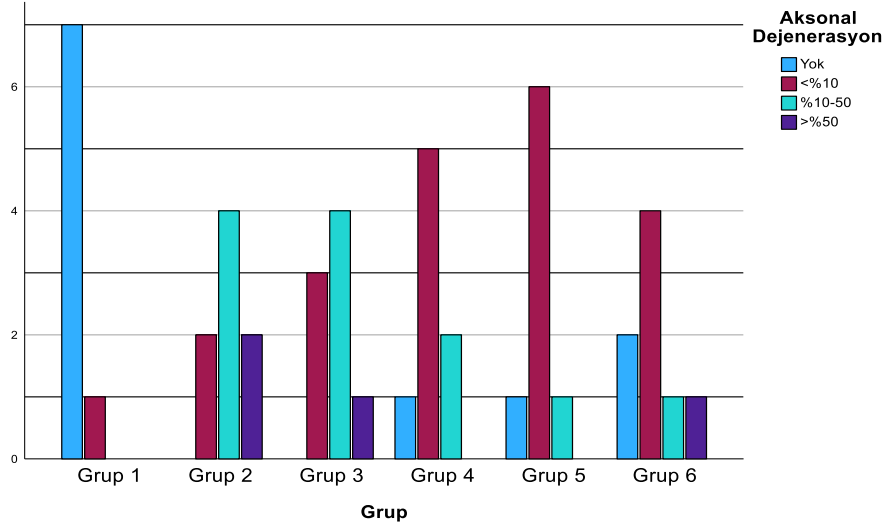
Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında; Grup 5 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p=0.04$), Grup 4 ve 6 ile arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.626$ $p=0.069$).



Şekil 25. (a,b) x100 H&E Yabancı cisim reaksiyonu (ok ile işaretli), (c) x40 H&E Santralde periferik sinir ve periferde onu çevreleyen yoğun yabancı cisim reaksiyonu (ok ile işaretli)

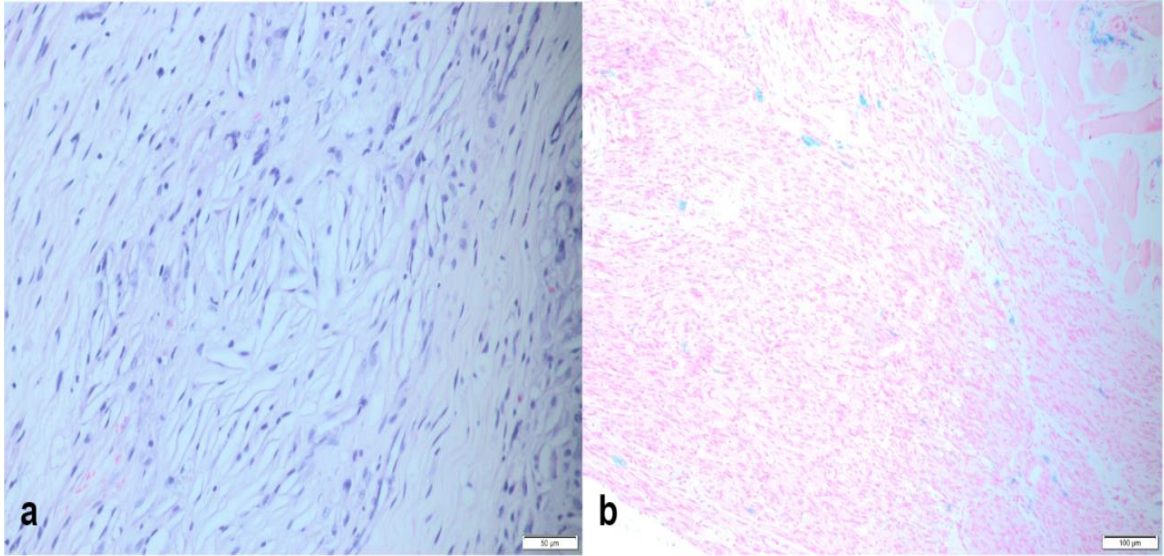
4.5.5.Aksonal Dejenerasyon

Aksonal dejenerasyon değerleri açısından sham grubuna en yakın değerler Grup 5'te elde edilmiştir. Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 epinöral sinir onarımı sonrası sinir sargısı kullanılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ; Grup 4 ve 5 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0.032$, $p=0.012$).Grup 3 ve 6 ile arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.492$, $p=0.062$).Grup 4 ve 5'te aksonal dejenerasyon derecesi %50'den fazla olan sıçan görülmedi.



Şekil 26. Aksonal dejenerasyon derecesine göre gruptaki sıçan sayısı

Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında; Grup 5 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p=0.034$), Grup 4 ve 6 ile arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.094$ $p=0.132$).

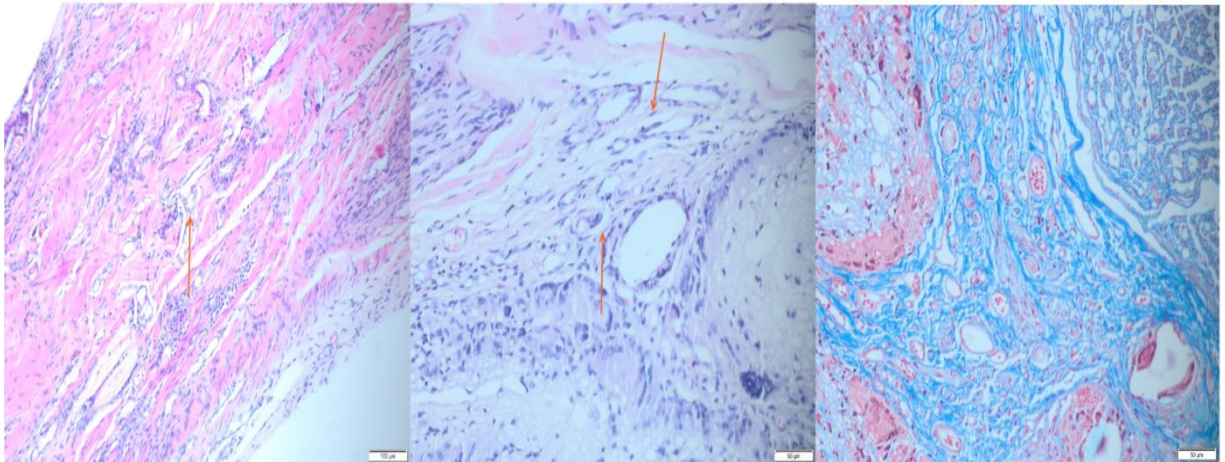


Şekil 27. (a) x200 H&E Aksonal dejenerasyon , (b) x100 Alcian Blue Aksonal dejenerasyon

4.5.6.Vaskülarizasyon

Gruplar vaskülarizasyon değerleri açısından karşılaştırıldığında Grup 1 ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Grup 2'den Grup 6'ya sırasıyla ($p=0.010$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$). Ortalama vaskülarizasyon değerinin en yüksek Grup 3'te olduğu görüldü. Grup 4,5 ve 6'nın benzer vaskülarizasyon değerlerine sahip olduğu görüldü.

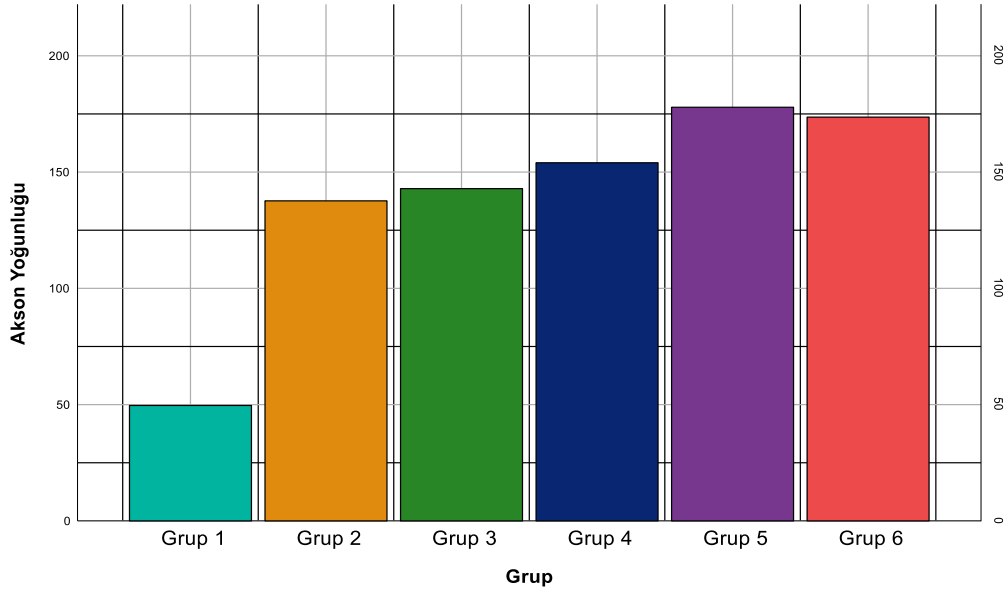
Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 epinöral sinir onarımı sonrası sinir sargısı kullanılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında; sadece Grup 3 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0.030$). Grup 4,5 ve 6 ile arasında ortalama vaskülarizasyon değerleri Grup 2'de daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü.



Şekil 28. (a) x100 H&E Vaskülarizasyon, (b) x200 H&E Vaskülarizasyon (Oklarla işaretli alanlar), (c) x200 MTK Vaskülarizasyon

4.5.7.Akson Yoğunluğu

Gruplar mm^2 'deki aksonal yoğunluk açısından karşılaştırıldığında en fazla ortalama akson sayısının Grup 5'te olduğu görüldü. Grup 5 diğer ilaç içeren nanofiber sinir sargıları ile karşılaştırıldığında Grup 4 ile arasında anlamlı fark bulunurken ($p=0.021$), Grup 6 ile arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p=0.834$).



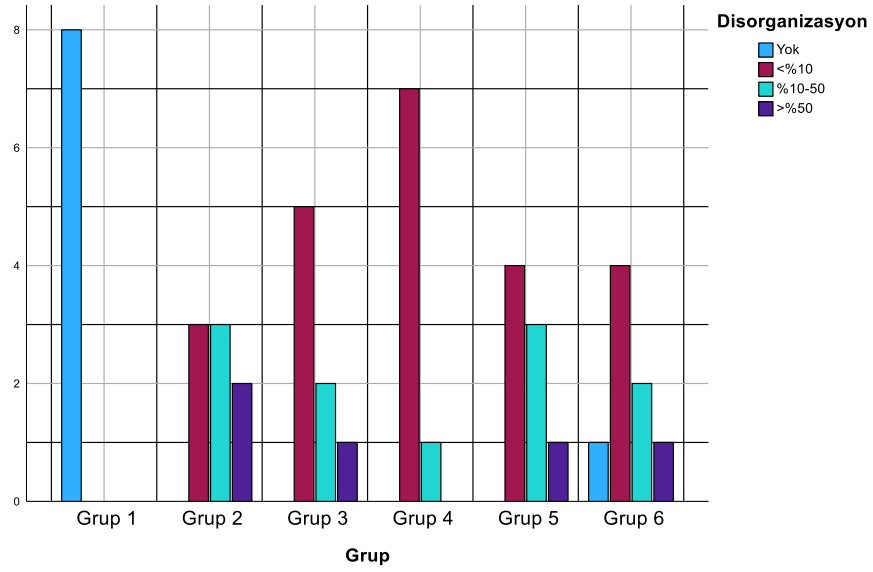
Şekil 29. Gruplara göre mm² 'deki ortalama akson sayıları

Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 epinöral sinir onarımı sonrası sinir sargısı kullanılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında; Grup 3 ve 4 ile arasında ortalama akson sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.293$, $p=0.074$). Grup 5 ve 6 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.006$, $p=0.010$).

Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında; Grup 5 ve 6 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p=0.002$, $p=0.005$), Grup 4 ile arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.172$).

4.5.8.Fasiküler Organizasyon Bozukluğu (Disorganizasyon)

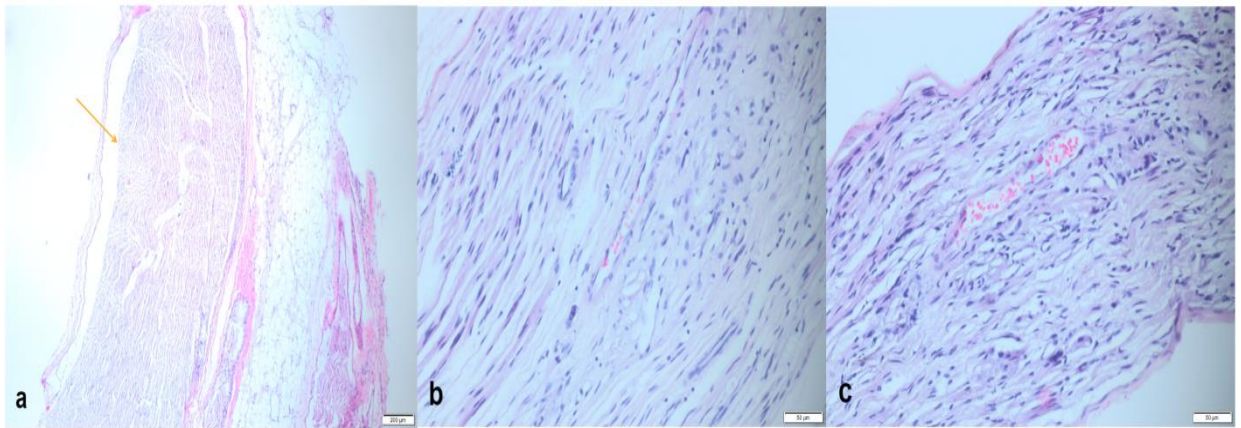
Gruplar disorganizasyon derecelerine göre karşılaştırıldığında fasiküler organizasyon bozukluğunun siyatik sinire tam kat kesi yapılarak cerrahi işlem uygulanan gruplar arasında en az Grup 4'te olduğu görüldü. Grup 4'te %50 fazla fasiküler organizasyon bozukluğu bulunan sıçan görülmedi. Grup 4 ilaçlı nanofiber sinir sargısı yapılan diğer gruplarla karşılaştırıldığında; Grup 5 ve 6 ile arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.107$, $p=0.521$).



Şekil 30. Disorganizasyon derecelerine göre gruptaki sıçan sayısı

Primer sinir onarımı yapılan Grup 2 epinöral sinir onarımı sonrası sinir sargısı kullanılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında; sadece Grup 4 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0.038$). Grup 3,5 ve 6 ile arasında Grup 2’de ortalama disorganizasyon değerleri yüksek olmasına karşın anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.330$, $p=0.533$, $p=0.264$).

Saf PCL nanofiber sinir sargısı sarılan Grup 3 ile ilaçlı nanofiber sinir sargısı kullanılan gruplar karşılaştırıldığında;Grup 4,5 ve 6 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=0.239$, $p=0.680$, $p=0.770$).



Şekil 31. (a) x40 H&E Normal sinir yapısı , (b) x200 H&E Periferik sinirde sol üst tarafta fasiküler organizasyon bozukluğu yok , sağ alt tarafta fasiküler organizasyon bozukluğu <%10 , (c) x200 H&E Periferik sinirde fasiküler organizasyon bozukluğu %10-50.

5.TARTIŞMA

Periferik sinir sistemi rejenerasyon yeteneğine sahip olmasına rağmen, sinir onarımını takiben fonksiyonel iyileşme yavaş ve genellikle yetersizdir (85). Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık milyonda 43,8 kişi travmatik sinir yaralanmalarına maruz kalmaktadır ve bunların çoğu önemli el fonksiyonlarını kontrol eden üst ekstremité sinirlerini etkilemektedir (86). Artan dünya nüfusu ve uzayan ortalama yaşam süresi göz önünde bulundurulduğunda, daha fazla sayıda yaralanma ortaya çıkma eğilimindedir ve sonuç olarak, hasarlı sinirlerin onarılması için çok sayıda tedavi ve ameliyat gerekecektir.

Periferik sinir yaralanmaları , maruziyetleri göz önüne alındığında travmatik yaralanmalar, ameliyat komplikasyonları, konjenital yaralanmalar ve savaş yaraları gibi birçok farklı mekanizmadan kaynaklanabilir (87). Travmatik yaralanmalarda yaralanmanın oluşum mekanizması değişiklik gösterebilir. Bunlar arasında; penetran yaralanmalar, ezilme, traksiyon, iskemi ve termal, elektrik şoku ve radyasyon gibi daha az yaygın mekanizmalar sayılabilir. Bir diğer yaygın yaralanma mekanizması da mekanik deformasyonun yanı sıra iskemiye de içeren kompresyondur. Çok çeşitli hastalıklar da periferik sinir yaralanmalarının temel nedeni olabilir, örneğin diyabetik periferik nöropati sonucu gelişen sinir hasarları (88,89).

Periferik sinir yaralanmalarının tam olarak iyileşmemesi genellikle etkilenen uzuvlarda uyuşma, kronik ağrı , duyuşsal ve/veya motor fonksiyonlarda azalma ve hastalarda rahatsız edici kalıcı sakatlık gibi birçok olumsuz sonuca yol açmaktadır. Bu sonuçlar hastanın hem fiziksel hem de zihinsel olarak yaşam kalitesinde büyük bir kayıptır ve yukarıda belirtilen gerçekler göz önüne alındığında, periferik sinir yaralanmalarını dünya çapında bir klinik sorun olarak değerlendirmek gerekir (90).

Sinir patofizyolojisindeki mevcut durum göz önüne alındığında, son yıllarda tıbbi ve ameliyat tekniklerinde yalnızca küçük ilerlemeler kaydedilmiştir. Epinöral onarım, iyi vaskülarize her iki sinir ucunun doğrudan, gerilimsiz sütürler ile gerçekleştirilebildiğinde tercih edilen cerrahi onarım seçeneği olmaya devam etmektedir (91).

Periferik sinir yaralanmalarında tam anlamıyla başarılı olarak uygulanabilecek farmakolojik ajanın bulunması için güncel araştırmalar bu yöne doğru evrilmiştir. Bu araştırmalardan bir tanesi de nanoteknoloji ve bu yöntemle üretilen nanomateryallerdir. Nanoteknoloji son yıllarda periferik sinir rejenerasyonunda önemli rol oynamakta olup nanofiberlerin aksonal büyümeye katkı sağlayabileceği gösterilmiştir (7). Aksonal rejenerasyonu hızlandırabilecek stratejiler, denervasyon süresini azaltabilir ve hedeflerine ulaşan nöron sayısını artırabilir. Periferik sinir yaralanmalarının belirtilen önemi göz önüne alındığında, bu yaralanmaların klinik yönetiminde ortaya çıkan bazı zorlukların ele alınmasına ve çözülmesine yardımcı olmak için nanoteknolojinin kullanılması, araştırılmaya değer bir alandır ve önümüzdeki yıllarda araştırmaların artarak devam edeceğini düşünmekteyiz.

Periferik sinir rejenerasyonunu engelleyen en önemli fizyopatolojik durumlardan bazıları; inflamatuvar yanıt, fibrozis veya skar dokusu oluşumu ve uygun vaskülarizasyon eksikliğidir.

Nöroinflamasyon, sinir dejenerasyonu ve ardından gelen rejenerasyonda önemli bir fenomendir. İyileşme süreci boyunca değişen canlı ve aktif bir süreçtir. İnflamasyonun hem zamanlaması hem de derecesi rejenerasyon sürecinin iyileşmesine ya da engellenmesine yol açacaktır. Bu süreç bireyler arasında da önemli ölçüde farklılık gösterir ve bu da kontrol edilmesini zorlaştırır (92). Bağışıklık sistemi sinir rejenerasyonu sırasında kritik bir rol oynar ve bir yaralanmadan sonra her zaman inflamatuvar bir yanıt söz konusudur. Sitokin ve kemokinler salgılandıkça, granüositler (nötrofiller ve mast hücreleri) ve agranüositler (monositler/makrofajlar ve lenfositler) dahil olmak üzere farklı immün hücre tipleri travmatik olaydan sonraki ilk saatlerde kritik bölgeye toplanır (93). Nörodejeneratif olaylarda ortaya çıkan inflamasyonun kontrol altına alınması, hastaya özgü müdahaleler gerektiren oldukça karmaşık bir sorundur. Son zamanlarda nanoteknoloji alanındaki araştırmalar bu sorunu ele almaya çalışmaktadır (94).

İmplant çevresinde fibrozis veya skar dokusu oluşumu, bir yaralanmadan sonra beklenen ve doğal olarak meydana gelen bir olaydır (95). Bununla birlikte ekstraselüler matriks'in aşırı birikimi ve bunun sonucunda yeniden şekillenme kalıcı skar oluşumuna yol açtığından sinir rejenerasyonu için kritik olabilir. Fibrozis rejenerasyonu iki şekilde engelleyebilir: (1) intranöral fibrozis aksonların proksimal segmentten distal segmente

geçişini engeller,(2) ekstrasöral fibrozis hastaların hareketi sırasında sinirlerin fizyolojik hareketini sınırlayarak ağrıya ve fonksiyonel kısıtlamaya yol açar (96).

Uygun vaskülarizasyon eksikliği, yani yaralı bölgede anjiyogenez sürecinin yetersizliği, son zamanlarda sinir rejenerasyonunu sınırlayan ana faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Vaskülarizasyon ve nöral doku mühendisliği arasındaki ilişki 1990'larda keşfedilmiştir(97). Sinir rekonstrüksiyonundan sonra sinir, rejeneratif ortamı ve sonucu potansiyel olarak değiştiren iskemik koşullara maruz kalır (98). Uzun süreli iskemiye maruz kalan dokular, oksijenasyon ve besin kaynağı eksikliği nedeniyle hücre hasarı ve ölümü de dahil olmak üzere çok sayıda patolojik süreçle ilişkilendirilir. Bu durum, çok daha hızlı yeniden damarlanan normal otogreftlere kıyasla gecikmiş yeniden damarlanma gözlemlendiğinden doku mühendisliği ürünü greftlerin zayıf rejeneratif sonuçları için bir açıklama olarak kabul edilmiştir (99). Her şeye rağmen, rejenerasyon sürecinin başlangıcı (örn. Wallerian dejenerasyon ve schwann hücrelerinin düzenlenmesi) hipoksi tarafından başlatılır (100). Bu tür olaylar,vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılamaya başlayan makrofajlar tarafından özellikle algılanır. Schwann hücreleri daha sonra kan damarlarını boşluktan göç etmek ve yol boyunca yenilenen aksonları getirmek için fiziksel kılavuz olarak kullanır.

Çalışmamızda periferik sinir rejenerasyonunu etkileyen önemli fizyopatolojik durumlara farklı mekanizmalar üzerinden etki eden nanofiber sinir sargılarını kullandık. Sinir onarımında kullanılacak bir sargının arzu edilen nitelikleri, sinir kaymasına izin veren (siniri sıkıştırmadan) ve onarım bölgesinde intranöral skarlaşmayı sınırlayan ve dolayısıyla aksonal büyümeyi teşvik eden bir ortam yaratabilen inert, biyolojik olarak parçalanabilir bir malzeme içermelidir. Optimal rejenerasyonun gerçekleşmesi için, büyüyen aksonların öncelikle skarlı onarım bölgesini proksimalden distal segmente doğru geçebilmesi gerekir (96).

Metilkobalamin ve takrolimusun sinir rejenerasyonuna yaptığı etkiler farklı çalışmalarda değerlendirilmesine karşın PCL polimer üzerine eklenerek birlikte kullanımının ve ayrı ayrı kullanılarak fonksiyonel, histopatolojik, elektrofizyolojik etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmaya literatürde rastlamadık (101,103).

PCL, uygun mekanik mukavemeti, sağlamlığı, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve sitouyumluluğu nedeniyle rejeneratif tıpta artan bir ilgi görmüştür (104). Çekme mukavemeti düşük olan PCL yüksek kopma uzaması ile oldukça iyi elastik özellikler göstermektedir . PCL'nin yavaş bir bozunma hızına sahip olduğu iyi bilinmektedir (105). Bir çalışmada polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) polimerin fizyolojik sıcaklıkta büzülmesi nedeniyle sinir ileti sargısı olarak kullanım için uygun olmadığı belirtilmiştir (102). Çalışmamızda saf PCL sinir sargısı kullanılan Grup 3 hem primer epinöral onarımla hem de ilaçlı nanofiber sinir sargıları ile karşılaştırma ve kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda saf PCL nanofiber sinir sargısı kullanılan Grup 3 sadece epinöral onarım yapılan Grup 2 ile karşılaştırıldığında; nanofiber grubunda daha iyi SFI değerleri elde edildi ($34,01 \pm 10,41$, $-41,11 \pm 7,02$). Elektromiyografik incelemede daha kısa latans süresi ve daha yüksek amplitüd değerleri bulundu, fakat bu değerlendirme sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Histopatolojik değerlendirmede fibrozis ve inflamasyon açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ,Grup 3'te daha yüksek vaskülarizasyon ve akson yoğunluğu ve daha az disorganizasyon görüldü.

Sarhane ve ark. 2019 yılında yaptıkları çalışmada makroporöz PCL sinir sargısını epinöral onarım ve biyolojik bir sinir sargısı ile karşılaştırmıştır. Çalışmada sinir rejenerasyonu 5. haftada erken ve 16. Haftada geç dönem olmak üzere iki farklı zamanda değerlendirilmiş. Çalışmanın sonucunda nanofiber grubunda kontrol grubuna göre kollajen depolanmasında azalma, akson yoğunluğunda artış, miyelin kılıf kalınlığında artış, inflamasyon ve fibroziste azalma, latans süresinde kısalma, kas ağırlık kaybında azalma bulunmuş (106). Çalışmada inflamasyon ve fibrozis erken dönemde değerlendirilmiş. Akson yoğunluğu, miyelin kılıf kalınlığı ve elektrofizyolojik değerlendirme sonuçlarının erken dönemde nanofiber grubu lehine olduğu geç dönemde (16. Hafta) birbirine oldukça benzer sonuçlara ulaştığı belirtilmiş. Bu benzer sonuçların insanlar üzerinde yapılacak bir klinik senaryoda değerlendirilmesi halinde sinir rejenerasyonunun kasa ulaşması ve atrofisini önlemesi için birkaç hafta ekstra zaman vermenin önemli olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmamızda Sarhane ve ark.'larının geç dönem sonuçları ile uyumlu şekilde akson yoğunluğu ve latans süresi Grup 3'te daha iyi olmasına rağmen Grup 2 ile oldukça benzer değerlere sahipti. Fibrozis, inflamasyon ve fonksiyonel değerlendirmelerin çalışmamız ile farklı sonuçlara sahip olmasının değerlendirme zamanlarının farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca Sarhane ve ark. inflamasyonun erken zamanda değerlendirilmesinin daha değerli sonuç verebileceğini belirtmiştir.

Metilkobalamin, bir B12 vitamini analogudur ve homosisteinden transmetilasyon reaksiyonu ile metionine dönüşüm sonucu oluşur (71). Metilkobalamin dahil olmak üzere B12 vitamininin sinir sistemi üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğuna dair raporlar vardır. İn vitro ortamda, B12 vitamini de dahil olmak üzere B vitamini kompleksi nörit büyümesini destekler ve B12 vitamini ile zenginleştirilmiş ortam en yüksek ortalama nörit büyümesini sağlar (107). İn vivo çalışmalarda, yüksek doz metilkobalamin , sıçan siyatik sinir hasarı modelinde sinir iletimini ve rejenerasyonunu iyileştirmiştir (108). Ancak metilkobalamin 20-50 dakika gibi kısa bir yarı ömüre sahiptir. Bu yüzden yüksek plazma konsantrasyonunu korumak için tekrarlayan uygulamalar gerektirmektedir (76).

Çalışmamızda Metilkobalamin içeren sinir sargısı kullanılan Grup 4 sadece epinöral onarım yapılan Grup 2 ile karşılaştırıldığında; nanofiber sinir sargısı grubunda daha iyi SFI ve gastroknemius kas indeksi, daha kısa latans süresi ve yüksek amplitüd süresi bulunmuş ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Histopatolojik incelemelerde ise metilkobalamin içeren sinir sargısı grubunda aksonal dejenerasyon ve disorganizasyonun daha istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az olduğu, daha az inflamasyon ve daha yüksek vaskülarizasyon ile akson yoğunluğu değerlerine sahip olmasına rağmen istatistiksel olarak fark saptanmadı.

Suzuki ve ark. rat siyatik siniri üzerinde ezilme tipi yaralanma modeli oluşturmuş ve metilkobalamin içeren sinir sargıları ile sinir rejenerasyonunu değerlendirmiş ve metilkobalaminin lokal olarak uygulanmasının muhtemelen aksonal mRNA seviyelerini ve lokal protein sentezini düzenleyerek in vivo fonksiyonel, elektrofizyolojik ve histolojik iyileşme sağladığı sonucuna ulaşmışlardır (101). Bazı vakalarda sinir dokusundaki hasar tuzak nöropatisi ve sinir ezilme yaralanmasına göre daha ağırdır ve periferik siniri çevreleyen epinöryum dahil tüm bağ dokuları ayrılır. Bizim çalışmamızda da siyatik sinir üzerinde tam kat kesi oluşturulmuş (daha ağır sinir yaralanması) ve epinöral bütünlük

tamamen bozulmuştur. Aynı çalışmada iyileştirilmemiş CMAP değerleri için nöromusküler kavşaktaki iyileşme için 6 haftanın erken olabileceği belirtilmiştir. Bir başka çalışmada ise siyatik sinir ezilme yaralanması modelinde CMAP'nin tam olarak iyileşmesi için 90 günden daha uzun bir sürenin gerekli olduğu belirtilmiştir (109). Motora özgü nörotrofik faktörlerin mRNA seviyeleri 15 gün içinde en yüksek değerlere ulaştığında, kalan tüm aksotomize motonöronlar aksonlarını 8 ila 10 haftalık bir süre içinde aşamalı olarak uygun motor dalını yeniden oluşturur (110). Bizim çalışmamız da 8. hafta sonunda amplitüd ve latans değerleri sham grubuna yaklaşmıştır.

Takrolimus FDA onaylı bir kalsinörin inhibitörü olup klinikte yaygın olarak immüsupresif bir ajan olarak kullanılmaktadır (111). İmmüsupresif etkilerinden bağımsız olarak, takrolimus FKBP52'nin aracılık ettiği doğrudan nörotrofik etkiler sergilemektedir (112,113). Takrolimusun hücre içi mekanizmalarla etkisine ek olarak sinir iyileşmesinde skarlaşmayı azaltarak da etki ettiğine dair çalışmalar mevcuttur (70). Bununla birlikte, FK506'nın uzun süreli sistemik uygulaması enfeksiyon, böbrek toksisitesi ve karaciğer toksisitesi riskinde artış ile ilişkilidir (114). Bir çalışmada takrolimusun sistemik uygulaması ile sinir sargısı olarak kullanılması arasında böbrek, beyin ve kalp gibi organ birikimi arasında belirgin derece lokal uygulamada düşük olduğu ayrıca 24 saatlik plazma konsantrasyonları arasında da lokal uygulamanın belirgin olarak daha düşük olduğu görülmüş (102). Çalışmamızda da takrolimusun sistemik toksisitesini önlemek amacıyla lokal etkili takrolimus içeren nanofiber sinir sargısı kullanıldı.

Yapılan çalışmalarda takrolimusun nörorejeneratif etkisine dair birkaç farklı mekanizma öne sürülmüştür. Çalışmalar FK506 aktivitesine FK506 bağlayıcı proteinler (FKBP) olarak adlandırılan bir protein ailesinin ve 12-kDA reseptörünün (FKBP-12) aracılık ettiğini göstermiştir (67). Araştırmacılar FKBP'nin sadece T hücrelerinde değil, aynı zamanda nöronal dokularda da bulunduğunu göstermiştir (115). FK506 ve FKBP-12 kompleksi, kalsiyumla aktive olan fosfataz kalsinörünü inhibe ederek kalsinörin substratlarının büyüme ile ilişkili protein-43(GAP-43) ile fosforilasyon seviyelerini artırır (116). Nöronlarda bir kalsinörin substratı olan GAP-43, akson uzamasında (117) ve büyüme konisi oluşumunda önemli bir rol oynar (118). Takrolimusun prorejeneratif etkilerine, nöral hücrelerde skarlaşmanın azalması ve ERK yolaklarının aktivasyonuna aracılık ettiği düşünülmektedir (119).

Çalışmamızda takrolimus içeren sinir sargısı yapılan Grup 5'te sadece epinöral onarım yapılan Grup 2'ye göre fonksiyonel olarak daha iyi SFI ve gastroknemius kas ağırlık indeksi elde edildi. Elektromiyografik incelemede ise daha kısa latans süresi ve daha yüksek amplitüd değeri elde edildi. Histopatolojik incelemede inflamasyon, akson yoğunluğu ve aksonal dejenerasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. İnflamasyondaki azalma özellikle T lenfositlerini inhibe etmek üzere hareket eden FK506'nın immünsupresif etkisine bağlanabilir (120). Bir çalışmada, FK506'nın Schwann hücre proliferasyonunu ve sinir büyüme faktörü salgılanmasını teşvik ettiği ve başka bir çalışma, FK506'nın fibroblast regülasyonu yoluyla rejenerasyon bölgesindeki sinir dokusu içindeki skarlaşmayı azaltarak sinir rejenerasyonunu desteklediğini öne sürmektedir (70,121). Çalışmamızda siyatik sinire tam kat kesi sonrası onarım yapılan gruplar arasında en düşük fibrozis değeri Grup 5 'te elde edilmesine rağmen sadece Grup 3 ile arasında anlamlı fark saptandı. Bunun nedeni fibrozis değerlendirmesinin sadece 8. haftada değerlendirilmesi olabilir. Bir çalışmada makrofajların yaralanma sonrası 7. günde pik yaptığı ve kolajen VI'nın M2 tip makrofaj polarizasyonunda önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (122,123). Erken dönemlerde yapılacak fibrozis ve inflamasyon değerlendirmesi gruplar arasında anlamlı fark oluşturup daha değerli sonuçlar verebilir.

Metilkobalamin içeren nanofiber sinir sargısı kullanılan Grup 4 ile takrolimus içeren nanofiber sinir sargısı kullanılan Grup 5 karşılaştırıldığında; SFI değerlendirmesinde Grup 4'te daha iyi değerler elde edilmesine karşın (-25,63±6,88 , -30,42±6,34) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Gastroknemius kas ağırlık indeksi açısından her iki grupta benzer değerler elde edildi. Elektrofizyolojik incelemede latans ve amplitüd değerlerinde birbirine çok yakın değerler saptandı ve istatistiksel fark görülmedi. Histopatolojik incelemede inflamasyon, fibrozis, aksonal dejenerasyon, akson yoğunluğu ve yabancı cisim reaksiyonu açısından Grup 5 'te daha iyi değerler elde edildi fakat bu değerler içinde sadece akson yoğunluğu ve yabancı cisim reaksiyonu açısından istatistiksel olarak fark bulundu. Grup 4'te daha az disorganizasyon görülmesine karşın anlamlı fark bulunmadı. Grup 5'te bazı patolojik değerlendirmelerde daha iyi değerler elde edilmesine karşın istatistiksel olarak anlamlı olmamasının nedeninin deney hayvan sayısından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Fonksiyonel ve histopatolojik incelemeler birlikte değerlendirildiğinde Grup 5'te akson yoğunluğu fazla olmasına karşın disorganizasyonunda Grup 4'e göre kısmen fazla olması proximalden distale geçişi azaltmış ve Grup 5'teki SFI ve elektrofizyolojik değerlendirmeyi etkilemiş olabilir. Grup 5'te nispeten yüksek olan disorganizasyonun sebebi değerlendirmenin 8. haftada yapılmış olması ve sinirde tam kat kesi yapılması olabilir. Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada traksiyon sinir yaralanması modeli oluşturulup 2. ve 4. haftalarda yapılan patolojik inceleme sonucunda; 4. haftada takrolimus içeren kollajen sargı modelinde sinir organizasyonunun 2. haftaya göre daha iyi olduğunu belirtmişlerdir (124). Traksiyon sinir yaralanması epinöral bütünlüğün devamlılığı nedeniyle tam kat kesi yapılan sinir yaralanma modellerine göre daha hafif yaralanmalardır.

Sinir rejenerasyonuna farklı mekanizmalar üzerinden etki eden metilkobalamin ve takrolimus birlikte içeren nanofiber sinir sargısı yapılan Grup 6, primer epinöral yapılan Grup 2 ile karşılaştırıldığında SFI, latans ve amplitüd değerleri açısından Grup 6'da daha iyi ortalama değerler elde edilmesine karşın istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Patolojik incelemede ise Grup 6'da fibrozis, aksonal dejenerasyon, vaskülarizasyon ve disorganizasyon ortalama değerleri daha iyi olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. İnflamasyon, yabancı cisim reaksiyonu ve akson yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Grup 6'da takrolimus olması sebebiyle inflamasyon daha az saptandı.

Grup 6 metilkobalamin ve takrolimusun ayrı ayrı kullanıldığı Grup 4 ve 5 ile karşılaştırıldığında; fonksiyonel değerlendirmede sadece gastroknemius kas ağırlık indeksinde anlamlı fark olduğu ve Grup 4 ile 5 'te daha iyi sonuçlar elde edildiği görüldü. Patolojik incelemede ise sadece Grup 4 ile arasında yabancı cisim reaksiyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Diğer patolojik incelemelerde anlamlı fark görülmedi.

Fonksiyonel ve histopatolojik incelemeler birlikte değerlendirildiğinde metilkobalamin ve takrolimusun birlikte kullanımının sinir rejenerasyonunda epinöral onarıma göre daha iyi ortalama değerlere sahip olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı ve belirgin sinerjistik bir etki yaratmadığı görüldü.

İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamasının sebebi kullanılan deney hayvan sayısının az olması olabilir. Daha fazla deney hayvanı ile yapılacak çalışmada daha iyi olan değerlerde istatistiksel fark oluşabilir. Ayrıca PCL+Takrolimus+Metilkobalamin karışımı yapılırken, metilkobalamin ve takrolimus PCL ağırlık oranının %15'i olacak şekilde eklendi. Çalışmamızda metilkobalamin ve takrolimus içeren nanofiber sinir sargısının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturamamasının bir diğer sebebi de doz bağımlı etki olabilir. Önceki in vivo çalışmalar, takrolimusun sinir rejenerasyonunu artırmasının, etkili immünsüpresyon için gerekenden daha düşük dozlar kullanılarak ortaya çıkarılabileceğini göstermiştir (114). Rejenerasyonu teşvik etmek için bildirilen optimum takrolimus konsantrasyonu modeller arasında farklılık göstermektedir. İmmünsüpresyon için gereken optimum lokal takrolimus dozunun belirlenmesinde zorluklar vardır çünkü çoğu çalışma sistemik immünsüpresyon kullanmış ve lokal doku seviyelerini bildirmek yerine minimum 5-15 ng/ml plazma seviyesini korumaya odaklanmıştır (125). İn vitro olarak, sıçan siyatik sinir ezilme modelinde 0.25 mg'a kadar olan bölgede iyi sonuçlar göstermiştir (112). Tajdaran ve arkadaşları önceki çalışmalara dayanarak 200 µg'lık bir konsantrasyon bildirmiştir (126). Önceki çalışmalar, in vitro ortamda 100 nm ila 100 µm arasında değişen metilkobalamin konsantrasyonlarının nörit büyümesini etkili bir şekilde hızlandırabildiğini göstermektedir (74). Bir diğer çalışmada rat siyatik sinir defektinde %15'lik metilkobalamin içeren PCL sinir konduiti kullanılmış ve CMAP değerleri açısından belirgin farklılık elde edilmiş (127).

6. SONUÇ

Periferik sinir yaralanmaları sık görülen, etkilenen hastalarda fonksiyonel kayba neden olabilen bir durumdur. Sinir rejenerasyon sürecinde optimal koşullarda dahi tam iyileşme sağlanamayabilir. Çalışmamızda sinir rejenerasyonuna etkilerini göstermek amacıyla PCL nanofiberler içerisine B12 vitamin analogu olan metilkobalamin ve immüsupresif bir ajan olan takrolimus eklenerek sinir sargısı oluşturuldu. 8. hafta sonunda hem metilkobalamin hem takrolimus içeren sinir sargılarının ayrı ayrı kullanıldığında fonksiyonel ve histopatolojik olarak sinir rejenerasyonuna olumlu katkıda bulunduğu görüldü. İki ajan fonksiyonel ve histopatolojik olarak karşılaştırıldığında sinir rejenerasyonu açısından birbirlerine belirgin üstünlüğü olmadığı görüldü. Metilkobalamin ve takrolimusun birlikte kullanımının sinir rejenerasyonu üzerinde sinerjistik bir etki yaratmadığı ve sinir iyileşmesi için olumlu katkıları bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı gözlemlendi. Üretilen bu nanofiber sinir sargıları daha düşük maliyetli, uygulanması kolay ve lokal kullanım nedeniyle sistemik etkilerden uzak nanomaterayallerdir. İlerleyen çalışmalarda farklı dozlar uygulanarak optimal ilaç konsantrasyonu belirlenip, daha fazla sayıda deney hayvanı kullanımını ile daha değerli sonuçlar elde edilebilir. Elde edilen bu verilerin literatür birikimi ile beraber klinik çalışmalar için yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

7.KAYNAKLAR

- 1- J. Noble, C.A. Munro, V.S. Prasad, R. Midha, Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries, *J. Trauma* 45 (1998) 116–122.
- 2- Mackinnon SE, Dellon AL, Hudson AR, Hunter DA. Nerve regeneration through a pseudosynovial sheath in a primate model. *Plast Reconstr Surg.* 1985 Jun;75(6):833-41.
- 3- Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, Di Scipio F, Tos P, Czaja K, ve ark. Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *International Review of Neurobiology.* 2009;87:27-46.
- 4- S. Sunderland, Rate of regeneration of sensory nerve fibers, *Arch. Neurol. Psychiatry* 58 (1947)1-6.
- 5- C.B. Novak, D.J. Anastakis, D.E. Beaton, S.E. Mackinnon, J. Katz, Relationships among pain disability, pain intensity, illness intrusiveness, and upper extremity disability in patients with traumatic peripheral nerve injury, *J. Hand Surg. Am.* 35 (2010) 1633–1639.
- 6- Isaacs J. Treatment of acute peripheral nerve injuries: current concepts. *J Hand Surg Am.* 2010;35:491–497.
- 7- N. Chen, L. Tian, L. He, S. Ramakrishna, Nanobiomaterials for neural regeneration, *Neural Regen. Res.* 11 (2016) 1372–1374.
- 8- J.R. Potas, F. Haque, F.L. Maclean, D.R. Nisbet, Interleukin-10 conjugated electrospun polycaprolactone (PCL) nanofibre scaffolds for promoting alternatively activated (M2) macrophages around the peripheral nerve in vivo, *J. Immunol. Methods* 420 (2015) 38–49.
- 9- Miyamura S, Iwahashi T, Sayanagi J, Hirai Y, Okada K, Oka K, Niiyama E, Uto K, Ebara M, Yoshikawa H, Murase T, Tanaka H. A Nanofiber Sheet Incorporating Vitamin B12 Promotes Nerve Regeneration in a Rat Neurotomy Model. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2019 Dec 12;7(12):e2538.
- 10- Davis B, Hilgart D, Erickson S, Labroo P, Burton J, Sant H, Shea J, Gale B, Agarwal J. Local FK506 delivery at the direct nerve repair site improves nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 2019 Nov;60(5):613-620.
- 11- Thau L, Reddy V, Singh P. Anatomy, Central Nervous System. [Updated 2020 May 24]. In: StatPearls [Internet].
- 12- Mescher AL, Junqueira LCU. Junqueira's basic histology : text and atlas. New York: McGraw-Hill Medical; 2013.
- 13- Eşrefoğlu M. Genel ve özel histoloji : renkli resimli. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2004.

- 14- Stewart, J.D. , Peripheral nerve fascicles: anatomy and clinical relevance. *Muscle Nerve*, 2003. 28(5): p. 525-41.
- 15- Catala, M. and N. Kubis, Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handb Clin Neurol*, 2013. 115: p. 29-41.
- 16- Shier D., Butler J., Lewis R. twelfth ed. McGraw–Hill; New York: 2009. *Hole’s Human Anatomy and Physiology*.
- 17- Kimura J. Nerve Conduction and Needle Electromyography. In DyckPJ, Thomas PK, eds. *Peripheral Neuropathy*, 4th ed. Philadelphia:Elsevier Saunders, 2005:899–969.
- 18- Laura F. G, Chin L. T, James W. F. The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Exp Neurol*. 2010 May; 223(1): 28–37.
- 19- Lundborg G. *Nerve Injury and Repair*. (2004) Elsevier, Philadelphia, PA.
- 20- Reina MA, López A, Villanueva MC, De Andrés JA, Machés F. The blood-nerve barrier in peripheral nerves. *Rev Esp Anesthesiol Reanim*. 2003 Feb;50(2):80-6.
- 21- Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg*. 2000;8(4):243-52.
- 22- Sunderland S S. *Nerves and Nerve Injuries*, 2nd Ed. (1978). Churchill Livingstone,Edinburgh.
- 23- Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical Focus*. 2004;16(5):1-7.
- 24- Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *The Journal of Hand Surgery*. 2000;25(3):391-414.
- 25- Michael Fricker, Aviva M. Tolkovsky, Vilmante Borutaite, Michael Coleman, and Guy C. Brown. Neuronal Cell Death. *Physiol Rev*. 2018 Apr 1; 98(2): 813–880
- 26- Winograd J, Mackinnon S. *Peripheral Nerve Injuries Repair and Reconstruction*. 2th ed. (Mathes S, ed.). Saunders Elsevier; 2006.
- 27- Cajal RS. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. (1928) Oxford University Press, London.
- 28- Eric A. Huebner and Stephen M. Strittmatter. Axon Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems. *Results Probl Cell Differ*. 2009; 48: 339–351.
- 29- Priestley J. V. Promoting anatomical plasticity and recovery of function after traumatic injury to the central or peripheral nervous system. *Brain*. 2007 Apr;130(Pt 4):895-7.
- 30- Terzis J, Sun D, Thanos P. Historical and Basic Science Review: Past, Present, and Future of Nerve Repair. *J reconstr Microsurg*. 1997;13(03):215-225.

- 31- Mackinnon SE, Colbert SH. Principles and techniques of peripheral nerve repair, grafts, and transfers. Thorne C, editor. Grabb and Smith's plastic surgery. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/ Lippincott Williams&Wilkins; 2014.
- 32- Karanth S, Yang G, Yeh J, Richardson P. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Experimental neurology*. 2006;202(1):161-6.
- 33- Heumann R. Regulation of the synthesis of nerve growth factor. *J. Exp. Biol* 1987 Sep;132:133-150.
- 34- Sulaiman W, Gordon T. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *Ochsner Journal*. 2013;13(1):100-8.
- 35- Menorca RMG, Fussell TS, Elfar JC. Peripheral nerve trauma: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*. 2013;29(3):317.
- 36- Tinel J, Rothwell F. Nerve wounds: symptomatology of peripheral nerve lesions caused by war wounds. Baillière, Tindall and Cox; 1917.
- 37- Arslantunali D, Dursun T, Yucel D, Hasirci N, Hasirci V. Peripheral nerve conduits: technology update. *Med Devices (Auckl)*. 2014 Dec 1;7:405-24.
- 38- Çoban YK, Çıralık H, Kurutaş EB. Ischemic preconditioning reduces the severity of ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve in rats. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* 2006; 29: 1-2.
- 39- Seddon HJ. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J*. 1942;2(4260):237-239.
- 40- Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951 Dec;74(4):491-516.
- 41- Maggi SP, Lowe JB, Mackinnon SE. Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg*. 2003;30(2):109-126.
- 42- Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle & Nerve*. 1990;13(9):785-800.
- 43- Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Qasim M, Zafar S, et al. Current status of therapeutic approaches against peripheral nerve injuries: a detailed story from injury to recovery. *Int J Biol Sci*. 2020;16(1):116.
- 44- Sunderland SS. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve*. 1990;13(9):771-784.
- 45- Mackinnon S, Dellon A. Diagnosis of nerve injury. In *Surgery of the peripheral nerve* 1988; 74–79. New York, NY: Thieme.

- 46- Vijayavenkataraman S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomater.* 2020 Apr 1;106:54-69.
- 47- T. M. E. Brushart, "The mechanical and humoral control of specificity in nerve repair," in *Operative Nerve Repair*, R. H. Gelberman, Ed., pp. 215–230, JB Lippincott, Philadelphia, Pa, USA, 1991.
- 48- Cruikshank W, Experiments on the nerves particularly on their reproductions, *Philos Trans Soc, London*, 85-190, 1795.
- 49- Siemionow M, Sari A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the Cleveland Clinic microsurgery laboratory. *Neurol Res.* 2004 Mar;26(2):218-25.
- 50- Lipinski LJ, Spinner RJ. Neurolysis, neurectomy, and nerve repair/reconstruction for chronic pain. *Neurosurg Clin N Am.* 2014;25(4):777-87.
- 51- Dvali L, Mackinnon S. Nerve repair, grafting, and nerve transfers. *Clin Plast Surg.* 2003 Apr;30(2):203-21.
- 52- Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol.* 2008 Sep;119(9):1951-65.
- 53- Hirasawa Y. Peripheral nerve suture. *J Orthop Sci.* 1996; 1(3):214–229.
- 54- Kayıkçıoğlu A, Karamürsel S, Demirci M, Erdem S, Keçik A. A new epineural nerve repair technique with external metallic circle. *Surgical Neurology.* 2004;62(5):387-92.
- 55- M.S. El Naschie, Nanotechnology for the developing world. *Chaos, Solitons and Fractals*, 2006. 30 (4): 769-773.
- 56- Niemeyer, C. M.; Mirkin, C. A. *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives*; John Wiley & Sons: New York, 2006.
- 57- Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol.* 2007 Mar;150(5):552-8.
- 58- Hagewood, J. F. Polymeric Nanofibers – Fantasy or Future?. *Technical Textile Technology*, 1(1),(2002).
- 59- Almetwally, A. A., El-Sakhawy, M., Elshakankery, M. H., & Kasem, M. H. (2017). Technology of nano-fibers: Production techniques and properties-Critical review. *J. Text. Assoc*, 78(1), 5-14.
- 60- Subbiah, T., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S. and Ramkumar, S.S. (2005), Electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 96: 557-569.

- 61- Más Estellés J, Vidaurre A, Meseguer Dueñas JM, Castilla Cortázar I. Physical characterization of polycaprolactone scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jan;19(1):189-95.
- 62- Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2003 May 20;5:1-16; discussion 16.
- 63- Donoghue PS, Lamond R, Boomkamp SD, Sun T, Gadegaard N, Riehle MO, Barnett SC. The development of a ϵ -polycaprolactone scaffold for central nervous system repair. *Tissue Engineering Part A* 2012; 19(3–4): 497– 507.
- 64- Zhu L, Wang K, Ma T, Huang L, Xia B, Zhu S, Yang Y, Liu Z, Quan X, Luo K, Kong D, Huang J, Luo Z. Noncovalent Bonding of RGD and YIGSR to an Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) Conduit through Peptide Self-Assembly to Synergistically Promote Sciatic Nerve Regeneration in Rats. *Adv Healthc Mater*. 2017 Apr;6(8).
- 65- Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987;40(9):1256-65.
- 66- Li X, Wang W, Wei G, et al. Immunophilin FK506 loaded in chitosan guide promotes peripheral nerve regeneration. *Biotechnol Lett* 2010;32:1333–7.
- 67- Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, et al. Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry*. 1992;31(16):3896-901.
- 68- Gold BG, Villafranca JE. Neuroimmunophilin ligands: the development of novel neuroregenerative/ neuroprotective compounds. *Curr Top Med Chem*. 2003;3(12):1368-75.
- 69- Tung TH. Clinical strategies to enhance nerve regeneration. *Neural Regen Res*. 2015 Jan;10(1):22–4.
- 70- Que J, Cao Q, Sui T, Du S, Kong D, Cao X. Effect of FK506 in reducing scar formation by inducing fibroblast apoptosis after sciatic nerve injury in rats. *Cell Death Dis*. 2013;4:e526.
- 71- Akaike, A., Tamura, Y., Sato, Y., & Yokota, T. (1993). Protective effects of a vitamin B12 analog, methylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *European journal of pharmacology*, 241(1), 1-6.
- 72- Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, Akaike A. Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B12 analog, against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997 Apr;38(5):848-54.
- 73- Okada K, Tanaka H, Temporin K, Okamoto M, Kuroda Y, Moritomo H, Murase T, Yoshikawa H. Methylcobalamin increases Erk1/2 and Akt activities through the methylation cycle and promotes nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model. *Exp Neurol*. 2010 Apr;222(2):191-203.

- 74- Nishimoto S, Tanaka H, Okamoto M, Okada K, Murase T, Yoshikawa H. Methylcobalamin promotes the differentiation of Schwann cells and remyelination in lysophosphatidylcholine-induced demyelination of the rat sciatic nerve. *Front Cell Neurosci.* 2015 Aug 4;9:298.
- 75- Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Amelioration by methylcobalamin of subclinical carpal tunnel syndrome involving unaffected limbs in stroke patients. *J Neurol Sci.* 2005 Apr 15;231(1-2):13-8.
- 76- Nava-Ocampo AA, Pastrak A, Cruz T, Koren G. Pharmacokinetics of high doses of cyanocobalamin administered by intravenous injection for 26 weeks in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005 Jan-Feb;32(1-2):13-8.
- 77- De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982;77:634–643.
- 78- Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83:129–138.
- 79- Biedermann, F., Schumann, N. P., Fischer, M. S., & Scholle, H. C. (2000). Surface EMG-recordings using a miniaturised matrix electrode: a new technique for small animals. *Journal of neuroscience methods*, 97(1), 69–75.
- 80- English, A. W., Chen, Y., Carp, J. S., Wolpaw, J. R., & Chen, X. Y. (2007). Recovery of electromyographic activity after transection and surgical repair of the rat sciatic nerve. *Journal of neurophysiology*, 97(2), 1127–1134.
- 81- Yang, Y., Ding, F., Wu, J., Hu, W., Liu, W., Liu, J., & Gu, X. (2007). Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 28(36), 5526–5535.
- 82- Meyer RS, Abrams RA, Botte MJ, Davey JP, Bodine-Fowler SC. Functional recovery following neurotomy of the rat sciatic nerve by epineurial repair compared with tubulization. *J Orthop Res* 1997; 15: 664–669
- 83- Evans GRD, Brandt K, Widmer MS, Lu L, Meszlenyi RK, Gupta PK, Mikos AG, Hodges J, Williams J, Gurlek A, Nabawi A, Lohman R, Patrick Jr CW. In vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 1999; 20: 1109–1115
- 84- Geuna S, Tos P. Comparison of biodegradable conduits within aged rat sciatic nerve defects. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2008;121(2):705-6; author reply 6-7.
- 85- Lan, C. Y., Tien, H. Y., Lin, Y. T., Hsu, C. C., Lin, C. H., & Chen, S. H. (2019). Prognosis of Traumatic Ulnar Nerve Injuries: A Systematic Review. *Annals of plastic surgery*, 82(1S Suppl 1), S45-S52.

- 86- Tapp, M., Wenzinger, E., Tarabishy, S., Ricci, J. & Herrera, F. A. The Epidemiology of Upper Extremity Nerve Injuries and Associated Cost in the US Emergency Departments. *Annals of plastic surgery* 83, 676-680
- 87- Robinson L. R. (2000). Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & nerve*, 23(6), 863-873. doi:10.1002/(sici)10974598(200006)23:6<863::aid-mus4>3.0.co;2-0
- 88- Plastaras, C. T., Chhatre, A., & Kotcharian, A. S. (2014). Perioperative upper extremity peripheral nerve traction injuries. *The Orthopedic clinics of North America*, 45(1), 47–53.
- 89- Won, J. C., & Park, T. S. (2016). Recent Advances in Diagnostic Strategies for Diabetic Peripheral Neuropathy. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*, 31(2), 230–238.
- 90- Gu, X., Ding, F., & Williams, D. F. (2014). Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 35(24), 6143–6156.
- 91- Saied, A., Shekaari, M. A., Sadeghifar, A., & Karbalaieikhani, A. (2015). Introduction of a New Suture Method in Repair of Peripheral Nerves Injured with a Sharp Mechanism. *The archives of bone and joint surgery*, 3(4), 254–259.
- 92- Benga, A., Zor, F., Korkmaz, A., Marinescu, B., & Gorantla, V. (2017). The neurochemistry of peripheral nerve regeneration. *Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 50(1), 5–15.
- 93- Gaudet, A. D., Popovich, P. G., & Ramer, M. S. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of neuroinflammation*, 8, 110.
- 94- Patel, S. K., & Janjic, J. M. (2015). Macrophage targeted theranostics as personalized nanomedicine strategies for inflammatory diseases. *Theranostics*, 5(2), 150–172.
- 95- Chen, Y., Xu, M., Guo, Y., Tu, K., Wu, W., Wang, J., Tong, X., Wu, W., Qi, L., & Shi, D. (2017). Targeted chimera delivery to ovarian cancer cells by heterogeneous gold magnetic nanoparticle. *Nanotechnology*, 28(2), 025101.
- 96- Mathieu, L., Adam, C., Legagneux, J., Bruneval, P., & Masméjean, E. (2012). Reduction of neural scarring after peripheral nerve suture: an experimental study about collagen membrane and autologous vein wrapping. *Chirurgie de la main*, 31(6), 311–317.
- 97- Hobson, M. I., Brown, R., Green, C. J., & Terenghi, G. (1997). Inter-relationships between angiogenesis and nerve regeneration: a histochemical study. *British journal of plastic surgery*, 50(2), 125–131.
- 98- Farber, S. J., Hoben, G. M., Hunter, D. A., Yan, Y., Johnson, P. J., Mackinnon, S. E., & Wood, M. D. (2016). Vascularization is delayed in long nerve constructs compared with nerve grafts. *Muscle & nerve*, 54(2), 319–321.

- 99- Fansa, H., Schneider, W., & Keilhoff, G. (2001). Revascularization of tissue-engineered nerve grafts and invasion of macrophages. *Tissue engineering*, 7(5), 519–524.
- 100- Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, et al. Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell*. 2015;162(5):1127-1139.
- 101- Suzuki, K., Tanaka, H., Ebara, M., Uto, K., Matsuoka, H., Nishimoto, S., Okada, K., Murase, T., & Yoshikawa, H. (2017). Electrospun nanofiber sheets incorporating methylcobalamin promote nerve regeneration and functional recovery in a rat sciatic nerve crush injury model. *Acta biomaterialia*, 53, 250–259.
- 102- Daeschler, S. C., Chan, K., Feinberg, K., Manoraj, M., Cheung, J., Zhang, J., ... & Borschel, G. H. (2021). A biodegradable, tacrolimus-releasing nerve wrap promotes peripheral nerve regeneration. *bioRxiv*, 2021-10.
- 103- Chan, K. J. W. (2020). Engineering a core-shell electrospun fibrous nerve wrap for the local release of FK506 (tacrolimus) (Order No. 27737022). Available from ProQuest Dissertations & Theses Global. (2425930181). Retrieved from <https://www.proquest.com/dissertations-theses/engineering-core-shell-electrospun-fibrous-nerve/docview/2425930181/se-2>
- 104- Seyednejad, H., Ghassemi, A. H., van Nostrum, C. F., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2011). Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 152(1), 168–176.
- 105- H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, P. Wang, The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant, *Biomaterials* 27 (2006) 1735–1740,
- 106- Sarhane, K. A., Ibrahim, Z., Martin, R., Krick, K., Cashman, C. R., Tuffaha, S. H., Broyles, J. M., Prasad, N., Yao, Z. C., Cooney, D. S., Mi, R., Lee, W. A., Hoke, A., Mao, H. Q., & Brandacher, G. (2019). Macroporous nanofiber wraps promote axonal regeneration and functional recovery in nerve repair by limiting fibrosis. *Acta biomaterialia*, 88, 332–345.
- 107- Fujii, A., Matsumoto, H., & Yamamoto, H. (1996). Effect of vitamin B complex on neurotransmission and neurite outgrowth. *General pharmacology*, 27(6), 995–1000.
- 108- Yamatsu, K., Yamanishi, Y., Kaneko, T., & Ohkawa, I. (1976). *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica*, 72(2), 269–278.
- 109- Navarro X. (2016). Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview. *The European journal of neuroscience*, 43(3), 271–286.
- 110- Gordon T. (2020). Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8652.

- 111- Webster, A., Woodroffe, R. C., Taylor, R. S., Chapman, J. R., & Craig, J. C. (2005). Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *The Cochrane database of systematic reviews*, (4), CD003961.
- 112- Gold, B. G., Densmore, V., Shou, W., Matzuk, M. M. & Gordon, H. S. ImmunophilinFK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophicaaction of FK506. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 289,1202-1210 (1999).
- 113- Daneri-Becerra, C., Patiño-Gaillez, M. G. & Galigniana, M. D. Proof that the high molecular weight immunophilin FKBP52 mediates the in vivo neuroregenerativeeffect of the macrolide FK506. *Biochem Pharmacol* 182, 114204
- 114- Konofaos, P., & Terzis, J. K. (2013). FK506 and nerve regeneration: past, present, and future. *Journal of reconstructive microsurgery*, 29(3), 141–148.
- 115- Steiner, J. P., Dawson, T. M., Fotuhi, M., Glatt, C. E., Snowman, A. M., Cohen, N., & Snyder, S. H. (1992). High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature*, 358(6387), 584–587.
- 116- Lyons, W. E., Steiner, J. P., Snyder, S. H., & Dawson, T. M. (1995). Neuronal regeneration enhances the expression of the immunophilin FKBP-12. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(4), 2985–2994.
- 117- Skene, J. H., & Willard, M. (1981). Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. *The Journal of cell biology*, 89(1), 96–103.
- 118- Skene, J. H., Jacobson, R. D., Snipes, G. J., McGuire, C. B., Norden, J. J., & Freeman, J. A. (1986). A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4765), 783–786.
- 119- Gold, B. G., & Zhong, Y. P. (2004). FK506 requires stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and the steroid receptor chaperone protein p23 for neurite elongation. *Neuro-Signals*, 13(3), 122–129.
- 120- Wallemacq, P. E., & Reding, R. (1993). FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clinical chemistry*, 39(11 Pt 1), 2219–2228.
- 121- Jiang HJ, Qu W, Han F, Zhang WG, Lu DC. FK506 effects on proliferation and secretion of Schwann cells. *Neural Regen Res*. 2011;6(1):29-33.
- 122- P. Chen, X. Piao, P. Bonaldo, Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury, *Acta Neuropathol*. 130 (2015) 605–618.

- 123- P. Chen, M. Cescon, G. Zuccolotto, L. Nobbio, C. Colombelli, M. Filafferro, G. Vitale, M.L. Feltri, P. Bonaldo, Collagen VI regulates peripheral nerve regeneration by modulating macrophage recruitment and polarization, *Acta Neuropathol.* 129 (2015) 97–113.
- 124- Kim, J. H., Choi, Y. J., Park, H. I., & Ahn, K. M. (2022). The effect of FK506 (tacrolimus) loaded with collagen membrane and fibrin glue on promotion of nerve regeneration in a rat sciatic nerve traction injury model. *Maxillofacial plastic and reconstructive surgery*, 44(1), 14.
- 125- Toll, E. C., Seifalian, A. M., & Birchall, M. A. (2011). The role of immunophilin ligands in nerve regeneration. *Regenerative medicine*, 6(5), 635–652.
- 126- Tajdaran, K., Chan, K., Shoichet, M. S., Gordon, T., & Borschel, G. H. (2019). Local delivery of FK506 to injured peripheral nerve enhances axon regeneration after surgical nerve repair in rats. *Acta biomaterialia*, 96, 211–221.
- 127- Zhang, D., Yang, W., Wang, C., Zheng, H., Liu, Z., Chen, Z., & Gao, C. (2020). Methylcobalamin-Loaded PLCL Conduits Facilitate the Peripheral Nerve Regeneration. *Macromolecular bioscience*, 20(3), e1900382.