



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

**PERİFERİK SİNİR DEFEKT ONARIMINDA BİYOLOJİK  
KONDÜİT MODELİ: DE-EPİTELİZE İNSAN AMNİYOTİK  
MEMBRANI VE ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRE TABAKASI İÇEREN SİNİR KONDÜİT MODELİNİN  
SİNİR İYİLEŞMESİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Mahmut Muhsin YILMAZ**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**

**2020**





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

**PERİFERİK SİNİR DEFEKT ONARIMINDA BİYOLOJİK  
KONDÜİT MODELİ: DE-EPİTELİZE İNSAN AMNİYOTİK  
MEMBRANI VE ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRE TABAKASI İÇEREN SİNİR KONDÜİT MODELİNİN  
SİNİR İYİLEŞMESİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Mahmut Muhsin YILMAZ**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Mert ÇALIŞ**

**ANKARA**

**2020**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Mert Çalış'a,

Hem hekimlik mesleğine hem de hayata yaklaşımlarıyla her daim rehber edineceğim, eğitim sürecimde ve yetişmemde büyük emekleri ve katkıları olan Hacettepe Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nın tüm değerli hocalarına,

Bu çalışmaya destek sağlayan TUBİTAK'a,

Çalışmanın kurgulanmasında ve yürütülmesinde büyük emekleri olan Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na,

Çalışmada kullanılan biyolojik kondütlerin üretilmesinde ve değerlendirilmesinde emeği geçen Biyomühendislik bölümünden Özge Ekin Akdere, Gökçe Kaynak Bayrak ve Sena Koç'a,

Çalışmanın histolojik analizlerini gerçekleştiren Prof. Dr. Gülnur Take Kaplanoğlu, titiz ve özverili çalışmasından dolayı Dr. Özen Akarca'ya,

Çalışmanın fizyolojik analizlerini gerçekleştiren, çalışmanın yürütülmesinde büyük katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ayşen Erdem, Doç. Dr. Meltem Tuncer'e,

Çalışmanın istatistiksel analizini yapan Ebru Öztürk'e,

Hem çalışmanın fizyolojik analizlerinde görev alan ve aynı zamanda çalışmamda bana büyük yardımları olan, uzun saatler boyunca yorulmadan beraber çalıştığımız Arş. Gör. Özbeyen Atalay'a,

Hayvan deneyleri sırasında bana yardımları dokunan Dr. Etkin Boynuyoğun'a

Asistanlık sürecimi birlikte geçirdiğim ve çalışmaktan büyük keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin özverili ve güler yüzlü hemşirelerine, sekreterlerine ve personeline,

Her alanda olduğu gibi çalışma ve tez yazım süresince de desteğini, sabrını esirgemeyen sevgili eşim Tuğçe Ertürk Yılmaz'a,

Beni bugünlere getiren, destekleyen ve yüreklendiren canım aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

**Dr. M. Muhsin YILMAZ**

**Ankara, 2020**

## ÖZET

**Yılmaz, M.M., Periferik Sinir Defekt Onarımında Biyolojik Kondüit Modeli: De-Epitelize İnsan Amniyotik Membranı ve Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Tabakası İçeren Sinir Kondüit Modelinin Sinir İyileşmesine Etkisinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2020.** Periferik sinir yaralanmalarında oluşan sinir defektlerinin rekonstrüksiyonu için ilk tercih otolog sinir grefti olmasına rağmen fonksiyonel sinir sakrifikasyonu gerektirmesi, ciddi donör alan dezavantajları ve nöral rejenerasyonun suboptimal olması nedeniyle yeni arayışlar devam etmektedir. Çalışmada sinir greftine alternatif olarak, sinir rejenerasyonu için elverişli bir ortam oluşturacağı düşünülen adiposit kökenli mezenkimal kök hücre tabakası (AKMKH) ve amniyotik membrandan (AM) oluşan biyolojik bir kondüit tasarlanmıştır. Üretilen kondüitin nöral rejenerasyona etkisini değerlendirmek üzere sıçanlarda 10 mm'lik siyatik sinir defekti oluşturulmuş olup, kontrol grupları olarak; sham kontrol grubu, negatif kontrol grubu ve otolog sinir grefti grubu; deney grupları olarak, AKMKH tabakası ve AM'den oluşan kondüit, PGA tüp kondüit, sadece AM'den oluşan kondüit kullanılmıştır. Farklı sinir onarım yöntemlerinin periferik sinir ve gastrokinemius kası üzerindeki etkileri fonksiyonel, histolojik ve immünohistokimyasal testler ile değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda; miyelinli akson sayısı, orta (rejenerasyon) bölümde AM ve AKMKH tabakası kullanılan grup PGA tüp kondüit ve sadece AM kullanılan gruplara göre, distal bölümde ise AM ve AKMKH tabakası kullanılan grup PGA tüp kondüit kullanılan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Proksimal sinir bölümünde S100 pozitif alan yüzdesi, AM ve AKMKH tabakası kullanılan grup, PGA tüp kondüit ve sadece AM kullanılan gruplara göre anlamlı olarak yüksek (sırasıyla;  $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ); orta bölümde ise AM ve AKMKH tabakası kullanılan grup sadece AM kullanılan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Gastroknemius kollajen lif alan yüzdesi AM ve AKMKH tabakası kullanılan grupta, PGA tüp kullanılan gruba göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Kas lifi çapı değerlendirmesinde ise; AM ve AKMKH tabakası kullanılan grup, otolog sinir grefti kullanılan gruba göre daha düşük iken, PGA tüp kondüit ve sadece AM kullanılan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0,001$ ). AM ve AKMKH tabakası kullanılan grupta kas ağırlık indeksi, PGA tüp kondüit kullanılan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). AM ve AKMKH tabakası kullanılan grupta PGA tüp kondüit ve sadece AM kullanılan gruplara göre iğne batırma (pin-prick) testi ve SFİ'de daha erken iyileşme saptanarak sinir rejenerasyonunun daha hızlı olduğunu gözlenmiştir. Sonuç olarak; AM ve AKMKH tabakasından oluşturulmuş biyolojik kondüitin periferik sinir defektlerinde otolog sinir greftine alternatif yeni bir biyolojik kondüit olduğu ve klinik uygulamalarda da kullanılabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre, amniyotik membran, hücre tabaka mühendisliği, kondüit, periferik sinir cerrahisi.

Çalışmamız Tübitak 1001 programı kapsamında 119S133 proje numarasıyla desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Yilmaz, M.M., Biological Conduit Model in Peripheral Nerve Defect Repair: Evaluation of Nerve Healing Effect of Nerve Conduit Model Including De-Epithelialized Human Amniotic Membrane and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Layer. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Ankara, 2020.** Although the first choice for reconstruction of nerve defects in peripheral nerve injuries is autologous nerve graft, new searches continue due to the fact that it requires functional nerve sacrifice, severe donor site disadvantages and suboptimal neural regeneration. In the study, as an alternative to the nerve graft, a biological conduit, consisting of an adipocyte-derived mesenchymal stem cell sheet (ADMSC) and amniotic membrane (AM), which is thought to create a favorable environment for nerve regeneration, was designed. In order to evaluate the effect of the produced conduit on neural regeneration, 10 mm sciatic nerve defect was created in rats and as control groups; sham control group, negative control group and nerve autograft group; As the experimental groups, the conduit consisting of the ADMSC sheet and AM, the PGA tube conduit, only the conduit consisting of AM were used. The effects of different nerve repair methods on the peripheral nerve and gastrocnemius muscle were evaluated by functional, histological and immunohistochemical tests. When comparing the number of myelinated axons between groups; The mean value of the number of myelinated axons of the mid section was significantly higher in the group using the AM and ADMSC sheet compared to the groups using PGA tube conduit and only AM. It was observed that the number of myelinated axons belonging to the distal part of the peripheral nerve was significantly higher in the group using AM and ADMSC sheet than the group using PGA tube conduit ( $p < 0.05$ ). Percentage of S100 positive area in the proximal nerve section the group using AM and ADMSC sheet were found to be significantly higher than groups that PGA tube conduit and using only AM (respectively;  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ); in the middle part, the AM and ADMSC sheet were found to be significantly higher than the group using AM only ( $p < 0.05$ ). Percentage of gastrocnemius collagen fiber area AM and ADMSC sheet was found to be statistically lower than the group using PGA tube ( $p < 0.05$ ). In the evaluation of muscle fiber diameter; While the group using AM and ADMSC sheet was lower than the group using autologous nerve graft, the PGA tube conduit was found to be significantly higher than the group using only AM ( $p < 0.001$ ). Muscle weight index was significantly higher in the group using AM and ADMSC sheet compared to the group using PGA tube conduit ( $p < 0.05$ ). In the group using AM and ADMSC sheet, it was observed that nerve regeneration was faster by detecting PGA tube conduit and earlier improvement in pin-prick test and SFI compared to the groups using only AM. As a result; It is thought that the biological conduit formed from the AM and ADMSC sheet is a new biological conduit that is an alternative to nerve autograft in peripheral nerve defects and can be used in clinical applications.

**Keywords:** Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, amniotic membrane, cell sheet engineering, conduit, peripheral nerve surgery.

Our research was funded with the project number 119S133 under the Tübitak 1001 program.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Sinir Sistemi .....	3
2.1.1. Periferik Sinir Sistemi.....	3
2.2. Periferik Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu.....	9
2.2.1. Nörotrofik Faktörler.....	11
2.3. Sinir Yaralanmaları ve Sınıflandırılması.....	12
2.4. Periferik Sinir Cerrahisi.....	14
2.4.1. Uç-Uca Sinir Onarım Seçenekleri .....	15
2.4.2. Sinir Uçları Arasında Boşluk Kaldığında Seçenekler.....	16
2.5. Sinir Kondüitleri.....	18
2.5.1. Biyolojik Kondüit Materyalleri .....	19
2.5.2. Sentetik Kondüit Materyalleri .....	21
2.6. Periferik Sinir Rejenerasyonunda Kök Hücreler .....	23
2.6.1. Kök Hücre Kaynakları ve Çeşitleri.....	24
2.6.2. Kök Hücrelerin Etki Mekanizması .....	29
2.7. Hücre Tabaka Teknolojisi .....	31
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>33</b>
3.1. Deney Grupları .....	33
3.2. Kondüit Tasarımı.....	36
3.2.1. Amniyotik Membranların Hazırlanması.....	36
3.2.2. Hücre Tabakalarının Elde Edilmesi .....	37

3.2.3. Biyolojik Kondüitin Hazırlanması .....	38
3.2.4. Kök Hücre Tabakasının 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) İşaretlenmesi.....	38
3.2.5. Biyolojik Kondüitin SEM ile Görüntülenmesi.....	38
3.2.6. Biyolojik Kondüitin F-aktin/Çekirdek Boyaması .....	39
3.3. Cerrahi işlem .....	40
3.4. Fonksiyonel Değerlendirme .....	42
3.4.1. Bileşik Kas Aksiyon Potansiyelleri (Compound Muscle Action Potentials) (CMAPs) .....	43
3.4.2. İğne Batırma (Pin-Prick) Testi .....	45
3.4.3. Parmak Ayırma (Toe-Spread) Testi .....	45
3.4.4. Gastrokinemius Kas İndeksi .....	45
3.4.5. Yürüyüş Yolu Analizi ve Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ) .....	46
3.5. Histolojik Değerlendirme .....	48
3.5.1. Işık Mikroskopik yöntem.....	48
3.5.2. İmmünohistokimyasal Analiz .....	50
3.6. İstatistiksel Analizler .....	52
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>53</b>
4.1. Genel Değerlendirme Bulguları .....	53
4.2. AM ve AKMKH Tabakasından Oluşturulan Biyolojik Kondüitin İncelenmesi.....	54
4.2.1. AKMKH Işık Mikroskopi Değerlendirilmesi.....	54
4.2.2. Biyolojik Kondüitin SEM ile Görüntülenmesi .....	54
4.2.3. Biyolojik Kondüitin F-aktin/Çekirdek Boyaması.....	55
4.3. Fonksiyonel Değerlendirme .....	57
4.3.1. Bileşik Kas Aksiyon Potansiyelleri (Compound Muscle Action Potentials) (CMAPs) .....	57
4.3.2. İğne Batırma (Pin-Prick) Testi .....	63
4.3.3. Parmak Ayırma (Toe-Spread) Testi .....	64
4.3.4. Gastrokinemius Kas Ağırlık İndeksi .....	65
4.3.5. Yürüyüş Yolu Analizi ve Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ) Bulguları.....	67



4.4. Histolojik Bulgular .....	68
4.4.1. Gastrokinemius Kası Masson Trikrom Bulguları.....	68
4.4.2. Periferik Sinir Hematoksilen-Eosin Bulguları.....	72
4.4.3. Periferik Sinir Bölümlerine Ait Miyelinli Akson Sayısı .....	74
4.4.4. S100 İmmünohistokimyasal Bulguları .....	79
4.4.5. NF-H İmmünohistokimyasal Bulguları .....	83
4.4.6. CD68 Pozitif Hücre Sayısı.....	87
4.4.7. BrdU İmmünohistokimya Bulguları .....	91
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>92</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>101</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>102</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>v/v</b>	: Hacim/Hacim oranı
<b>w/v</b>	: Kütle/Hacim oranı
<b>ADKKH</b>	: Amniyon doku kökenli kök hücreler
<b>AKMKH</b>	: Adiposit kökenli mezenkimal kök hücre
<b>AM</b>	: Amniyotik membran
<b>BDNF</b>	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
<b>BrdU</b>	: 5-bromo-2'-deoksiüridin
<b>BSA</b>	: Sığır Serum albümini
<b>CDNF</b>	: Serebral dopamin nörotrofik faktör
<b>CKPKH</b>	: Cilt kökenli prekürsör kök hücreler
<b>CNTF</b>	: Silier nörotrofik faktör
<b>DAB</b>	: Diaminobenzedin
<b>DAPI</b>	: 4,6-diamidine-2'-phenylindole
<b>D-PBS</b>	: Dulbecco fosfat tampon çözeltisi
<b>DPKH</b>	: Diş pulpası kök hücreleri
<b>ECM</b>	: Ekstrasellüler matriks
<b>EGF</b>	: Endotelyal büyüme faktörü
<b>EKH</b>	: Embriyonik kök hücreler
<b>FBS</b>	: Fetal bovine serum
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>GDNF</b>	: Glia kaynaklı nörotrofik faktör
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen-Eosin
<b>HMDS</b>	: Hekzametildisilazan
<b>IL-6</b>	: İnterlökin-6
<b>ILGF-1 ve 2</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 ve 2
<b>iPKH</b>	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
<b>KIKMKH</b>	: Kemik İliği Kökenli mezenkimal kök hücreler
<b>KKKPH</b>	: Kas kökenli kök-prekürsör hücreler
<b>LIF</b>	: Lösemi inhibitör faktör
<b>MKH</b>	: Mezenkimal kök hücreler

<b>NKH</b>	: Nöral kök hücreler
<b>NGF</b>	: Sinir büyüme faktörü
<b>NT-3</b>	: Nörotrofin-3
<b>NT-4/5</b>	: Nörotrofin-4/5
<b>NT-6</b>	: Nörotrofin-6
<b>PCL</b>	: Polikaprolakton
<b>PDGF</b>	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>PGA</b>	: Polyglykolik Asit
<b>PLA</b>	: Polilaktik asit
<b>PVA</b>	: Polivinil alkol
<b>PLGA</b>	: Poli-L-Laktid Glikolik Asit
<b>PLLA</b>	: Poli-L-laktik asit
<b>P/S</b>	: Penisilin-streptomisin
<b>PU</b>	: Poliesterüretan
<b>SEM</b>	: Taramalı elektron mikroskopu
<b>SFİ</b>	: Siyatik fonksiyonel indeks
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforme edici büyüme faktörü beta
<b>TMC</b>	: Poli 1,3-trimetilen karbonat- -kaprolakton
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>UKKMKH</b>	: Umbilikal kord kökenli mezenkimal kök hücre
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>WJKMKH</b>	: Wharton jeli kökenli mezenkimal kök hücre
<b><math>\alpha</math>-MEM</b>	: Minimum essential medium alpha modification

## ŞEKİLLER

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1. Motor nöron çizimi.....	4
Şekil 2.2. Başlıca nöron tipleri .....	5
Şekil 2.3. Schwann hücre sitoplazması ve miyelin kılıf arasındaki ilişkinin üç boyutlu çizimi .....	6
Şekil 2.4. Periferik sinir çizimi .....	8
Şekil 2.5. Periferik sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu .....	10
Şekil 2.6. Sinir yaralanmalarının sınıflandırılması .....	14
Şekil 2.7. Sinir onarım teknikleri .....	16
Şekil 2.8. Periferik sinir onarımında kullanılabilen bazı kök hücre kaynakları .....	25
Şekil 2.9. Kök hücrelerin periferik sinir rejenerasyonunda etki mekanizması.....	31
Şekil 3.1. Çalışmanın yönetsel akış şeması.....	34
Şekil 3.2. Deney gruplarının şematik gösterimi .....	35
Şekil 3.3. AM'lerin hazırlanması .....	37
Şekil 3.4. Sinir onarımında kullanılan sinir grefti ve kodüit materyalleri.....	39
Şekil 3.5. Sıçanlarda, siyatik sinir mikrodiseksiyonu aşamaları .....	41
Şekil 3.6. Deney gruplarında siyatik sinir ve sinir onarımlarının makroskobik görüntüleri .....	42
Şekil 3.7. Non-invaziv elektromiyografi .....	44
Şekil 3.8. Bileşik kas aksiyon potansiyeli kayıt örneği.....	45
Şekil 3.9. Elektrofizyolojik parametreler .....	46
Şekil 3.10. SFİ hesaplamaları için kullanılan .....	47
Şekil 3.11. SFİ hesaplaması için ayak izlerinde bakılan parametreler .....	48
Şekil 4.1. 16 haftanın sonunda histolojik inceleme için siyatik sinirin eksize edilmeden önceki görünümü .....	53
Şekil 4.2. AKMKH'lerin ışık mikroskobu fotoğrafları.....	54
Şekil 4.3. AKMKH tabakası ve AM' den oluşturulan kondüite ait SEM fotoğrafları.....	55
Şekil 4.4. AKMKH tabakası ve AM'den oluşturulan kondüitin immünofloresan boyama sonrası floresan mikroskop fotoğrafları. ....	56

<b>Şekil 4.5.</b> Gruplara ait tepeden tepeye genlik (sol uzuv) zaman değişim grafiği .....	57
<b>Şekil 4.6.</b> Gruplara ait tepeden tepeye genlik indeksi zaman değişim grafiği .....	58
<b>Şekil 4.7.</b> Gruplara ait eğim (sol) zaman değişim grafiği.....	59
<b>Şekil 4.8.</b> Gruplara ait eğim indeksi zaman değişim grafiği .....	60
<b>Şekil 4.9.</b> Gruplara ait genlik (sol) zaman değişim grafiği.....	61
<b>Şekil 4.10.</b> Gruplara ait genlik indeksi zaman değişim grafiği .....	62
<b>Şekil 4.11.</b> Gruplara ait iğne batırma (pin-prick) testi sonuçları zaman grafiği.....	63
<b>Şekil 4.12.</b> Gruplara ait parmak ayırma (toe-spread) testi sonuçları zaman grafiği .....	64
<b>Şekil 4.13.</b> Gruplara ait gastroknemius kas ağırlık indeksi karşılaştırmalı grafiği .....	65
<b>Şekil 4.14.</b> Gastroknemius kas spesmenleri .....	66
<b>Şekil 4.15.</b> Gruplara ait siyatik fonksiyonel indeks zaman grafiği .....	67
<b>Şekil 4.16.</b> Gruplara ait kollajen lif alan yüzdesi karşılaştırma grafiği .....	69
<b>Şekil 4.18.</b> Gruplara ait kas lifi çapı karşılaştırma grafiği .....	71
<b>Şekil 4.19.</b> Periferik sinir longitudinal kesitlerde proksimal, orta ve distal bölümlere ait görüntüler (I).....	73
<b>Şekil 4.20.</b> Periferik sinir longitudinal kesitlerde proksimal, orta ve distal bölümlere ait görüntüler (II).....	74
<b>Şekil 4.21.</b> Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (proksimal) karşılaştırma grafiği.....	75
<b>Şekil 4.22.</b> Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (orta) karşılaştırma grafiği .....	76
<b>Şekil 4.23.</b> Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (distal) karşılaştırma grafiği .....	77
<b>Şekil 4.24.</b> Luxol Fast Blue ile boyanmış periferik sinir transvers kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait görüntüler .....	78
<b>Şekil 4.25.</b> Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (proksimal) karşılaştırma grafiği.....	79
<b>Şekil 4.26.</b> Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (orta) karşılaştırma grafiği .....	80

<b>Şekil 4.27.</b> Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (distal) karşılaştırma grafiği .....	81
<b>Şekil 4.28.</b> Periferik sinir kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait S100 immünreaktivitesi gösteren Schwann hücreleri (►) izlenmekte. (DAB-Hematoksilen, 400 X, bar 50 µm) .....	82
<b>Şekil 4.29.</b> Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (proksimal) karşılaştırma grafiği.....	83
<b>Şekil 4.30.</b> Gruplara ait NF-H immunpozitif alan yüzdesi (ortal) karşılaştırma grafiği .....	84
<b>Şekil 4.31.</b> Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (distal) karşılaştırma grafiği .....	85
<b>Şekil 4.32.</b> Periferik sinir kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait NF-H immunreaktivitesi gösteren akson yapıları (→) izlenmekte (DAB-Hematoksilen, 400 X, bar 50 µm).....	86
<b>Şekil 4.33.</b> Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (proksimal) karşılaştırma grafiği .....	87
<b>Şekil 4.34.</b> Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (orta) karşılaştırma grafiği .....	88
<b>Şekil 4.35.</b> Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (distal) karşılaştırma grafiği.....	89
<b>Şekil 4.36.</b> Periferik sinir kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait CD68 immunreaktivitesi gösteren CD68 pozitif hücreler (►) izlenmekte (DAB-Hematoksilen, 400 X, bar 50 µm) .....	90
<b>Şekil 4.37.</b> BrdU immünohistokimya boyaması .....	91
<b>Şekil 5.1.</b> AKMKH tabakası ve AM den oluşturulan sinir kondüitin periferik sinir yaralanmalarında kullanımına yönelik klinik senaryo .....	100

## TABLOLAR

	<u>Sayfa No:</u>
<b>Tablo 2.1.</b> Periferik sinir hasar sınıflandırmaları .....	12
<b>Tablo 4.1.</b> Gruplara ait tepeden tepeye genlik (sol) tanımlayıcı verileri .....	58
<b>Tablo 4.2.</b> Gruplara ait tepeden tepeye genlik indeksi tanımlayıcı verileri .....	58
<b>Tablo 4.3.</b> Gruplara ait eğim (sol) tanımlayıcı verileri .....	59
<b>Tablo 4.4.</b> Gruplara ait eğim indeksi tanımlayıcı verileri .....	60
<b>Tablo 4.5.</b> Gruplara ait genlik (sol) tanımlayıcı verileri .....	61
<b>Tablo 4.6.</b> Gruplara ait genlik indeksi tanımlayıcı verileri .....	62
<b>Tablo 4.7.</b> Gruplara ait gastroknemius kas ağırlık indeksi tanımlayıcı verileri .....	65
<b>Tablo 4.8.</b> Gruplara ait siyatik fonksiyonel indeks ortalama değerleri .....	68
<b>Tablo 4.9.</b> Gruplara ait kollajen lif alan yüzdesi tanımlayıcı verileri .....	69
<b>Tablo 4.10.</b> Gruplara ait gastrokinemius kas lifi çapı tanımlayıcı verileri.....	72
<b>Tablo 4.11.</b> Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (proksimal) tanımlayıcı verileri .....	75
<b>Tablo 4.12.</b> Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (orta) tanımlayıcı verileri .....	76
<b>Tablo 4.13.</b> Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (distal) tanımlayıcı verileri .....	77
<b>Tablo 4.14.</b> Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (proksimal) tanımlayıcı verileri .....	79
<b>Tablo 4.15.</b> Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (orta) tanımlayıcı verileri .....	80
<b>Tablo 4.16.</b> Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (distal) tanımlayıcı verileri .....	81
<b>Tablo 4.17.</b> Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (proksimal) tanımlayıcı verileri .....	83
<b>Tablo 4.18.</b> Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (orta) tanımlayıcı verileri .....	84

<b>Tablo 4.19</b> Gruplara ait NF-H immunpozitif alan yüzdesi (distal) tanımlayıcı verileri.....	85
<b>Tablo 4.20.</b> Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (proksimal) tanımlayıcı verileri.....	87
<b>Tablo 4.21.</b> Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (orta) tanımlayıcı verileri.....	88
<b>Tablo 4.22.</b> Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (distal) tanımlayıcı verileri.....	89



## 1. GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmalarında, yetersiz sinir iyileşmesi sonucu kalıcı fonksiyon kayıpları olabilmektedir. Bu nedenle tedavi motor, duyuşal ve otonomik iyileşmeyi en üst düzeyde tutacak şekilde planlanmalıdır. Travmaya uğrayan periferik sinirlerde yaralanma bölgesinin proksimalinde ve distalinde belirli değışiklikler izlenir. Sinir liflerinin diğer dokular yerine sinire doğru büyümesi kesik uçlar arasındaki mesafeye bağlıdır. Sinir yaralanmalarında tam kat kesi olduğu durumlarda, sinir gerginlik olmadan onarılabilir ise uç uca onarım sağlanmış olur. Ancak sinir proksimal ve distal kısmı uç uca gelmediği durumlarda sinir greftleri, kondüitler, allogreftler ve sinir transferleri tedavi seçenekleri arasındadır (1, 2).

Sinir defektlerinin onarımında altın standart yaklaşım otolog sinir greftlerinin kullanımınıdır (3). Ancak sinir greftlerinin kullanımını için aynı bireyin fonksiyonel bir sinirinin bu amaçla sakrifiye edilmesi, yürütmekte olduğu işlevin feda edilmesi gerekmektedir ve fonksiyonel iyileşme hala optimal değildir. Verici alanda da enfeksiyon, parestezi, nöroma oluşumu, ağrı gibi dezavantajları bulunmaktadır. Dolayısıyla periferik sinir kayıplarının tedavisinde morbiditesi daha az, daha kolay ve daha iyi fonksiyonel sonuçlar sağlayacak bir yöntem ihtiyacı vardır (4).

Sinir grefti kullanımına alternatif olarak öne çıkan yaklaşımlardan biri biyolojik veya sentetik sinir kondüitleridir. Ancak bazı sentetik kondüitlerin rezorbe olmaması, vücutta yabancı cisim reaksiyonu meydana getirmesi ve kontrolsüz inflamasyon geliştirmesi gibi kısıtlamaları öne çıkmaktadır. Sinir kondüitleri boş tüp olarak da dizayn edilebilir, hücre desteği ile nöral rejenerasyonu arttırması da hedeflenebilir. Schwann hücrelerinin ve kök hücre temelli tedavilerin sinir rejenerasyonuna etkisi bilinmektedir. Yapılan pek çok çalışmada sıçan AKMKH'lerin periferik sinir onarımında Schwann hücreleri yerine alternatif hücre kaynağı olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (5, 6).

Çalışmamızda; biyomühendislik alanında yeni bir yöntem olan hücre tabaka teknolojisi (cell sheet technology) ile AKMKH'leri tabaka haline getirip kök hücrelerin transplante edildiği bölgede kalması ve böylece sinir rejenerasyonunun desteklenmesi planlanmıştır. Amniyotik membranın biyobozunur bir doku olması

nedeniyle, diğer çalışmalarda kullanılmış sentetik kondüitlerde rastlanan bazı komplikasyonların (yabancı cisim reaksiyonu, artmış inflamatuvar reaksiyon vb.) önüne geçilmesi için kök hücre tabasına skafold olarak kullanılması planlanmıştır. Tasarlanan biyolojik kondüitin hem amniyotik membran hem de kök hücre tabakalarını içermesi ve bu tabakalardan salgılanacak büyüme faktörleri ve sitokinlerin rejenerasyon sürecine olumlu etki yapması beklenmektedir (7).

Sunulan çalışmada; doku mühendisliği alanında güncel bir yaklaşım olan hücre tabaka teknolojisi (cell sheet technology) ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücre tabakası üretip, rejeneratif tıpta etkinliği bilinen amniyotik membran ile kombine ederek tamamen biyolojik bir kondüit üretilmesi ve sıçanlarda siyatik sinir hasarı oluşturularak periferik sinir iyileşmesi üzerine etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sinir Sistemi

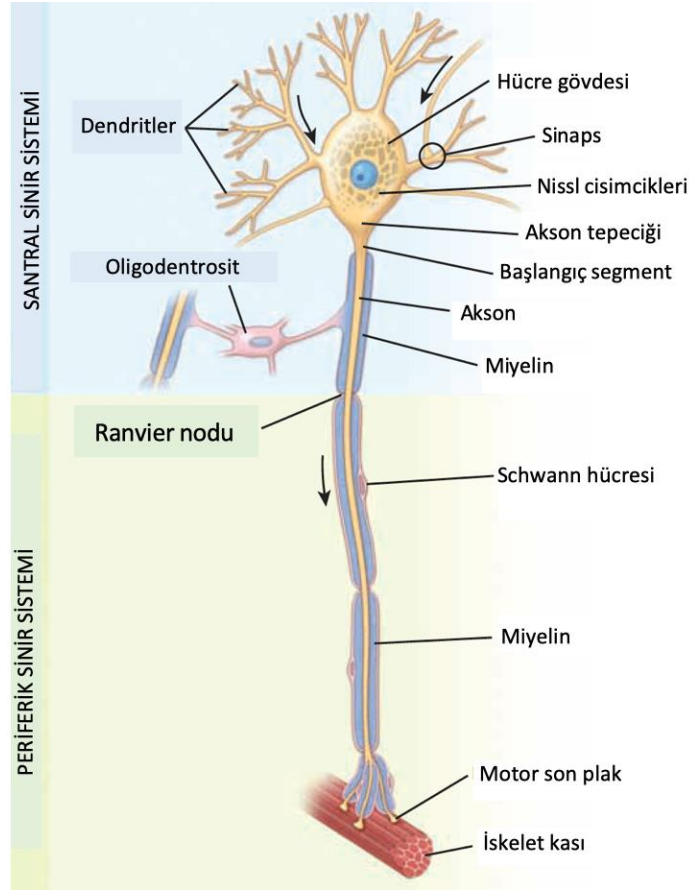
Sinir sistemi, iç ve dış ortamdan gelen uyarıları alıp analiz eden ve uygun cevaplar oluşturarak ilgili organlara ileten benzersiz bir sistemdir. Sinir sistemi anatomik olarak santral sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki bölüme ayrılır (8). Santral sinir sistemi, beyin ve medulla spinalisten oluşur. Vücudumuzun içinden ve çevreden gelen bilgilerin değerlendirilip entegre edildiği, istemli ve istemsiz hareketlerin yapılması için gerekli uyarıların verildiği; zeka, hafıza, öğrenme ve emosyonel fonksiyonların düzenlendiği merkezdir (9).

#### 2.1.1. Periferik Sinir Sistemi

Periferik sinir sistemini; periferik sinirler, gangliyonlar ve serbest sinir sonlanmaları oluşturur. Periferik hedef organlar ile santral sinir sistemi arasında çift yönlü uyarı iletimini sağlar. Motor, duyu ve otonom olmak üzere 3 tip periferik sinir bulunmaktadır. Bunlardan motor sinirlerin hücre gövdeleri medulla spinalis ön boynuzunda, duyu sinirlerinin hücre gövdeleri ise dorsal spinal arka kök gangliyonları içerisinde yerleşmiştir. Afferent liflerle alınan duyu mesajları arka kök gangliyonlarına, oradan da arka boynuza gelir ve motor iletiler omurilik ön boynuz hücrelerinden perifere uzanarak iletilirler (8).

#### Nöronlar

Sinir hücreleri ya da nöronlar, karmaşık yapısal özellik gösteren bağımsız anatomik ve işlevsel birimlerdir. Nöronlar; dendritler, hücre gövdesi (perikaryon) ve akson olmak üzere 3 bölümden oluşurlar (Şekil 2.1). Dendritler, uyarıyı almak üzere özelleşmiş çok sayıda uzantılardır. Hücre gövdesi, tüm hücrenin beslenmesi ile ilgili merkezdir. Akson ise tek bir uzantıdır; sinir uyarısını iletmek üzere özelleşmiştir (1, 10).

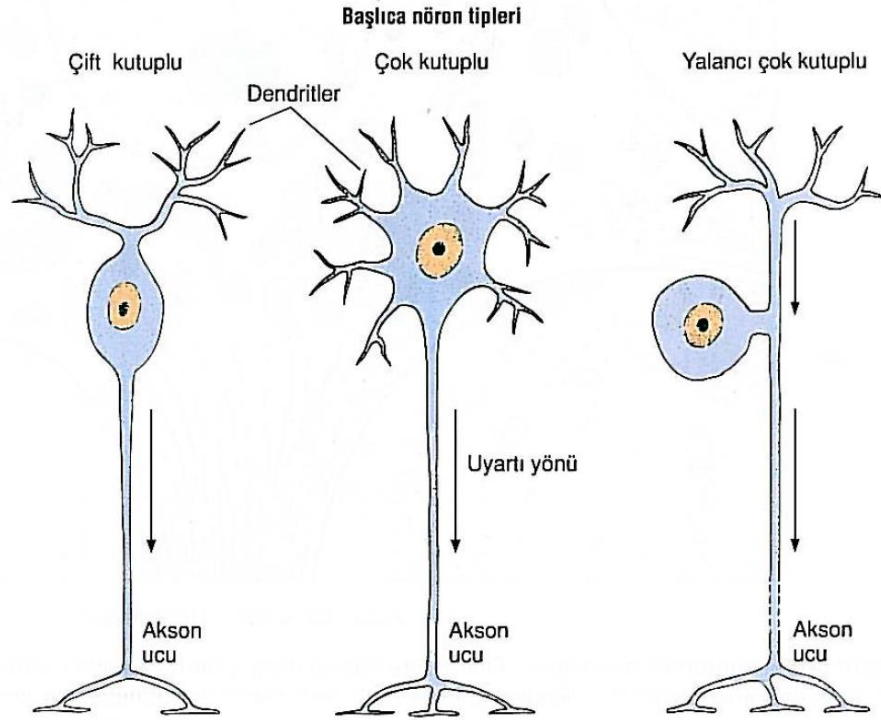


**Şekil 2.1.** Motor nöron çizimi (11)

Dendritler çok sayıda sinyal alırlar ve sinyallerin nöronda işlenmeye başladığı bölgelerdir. Dendritlerin dallanması, nöronun diğer sinir hücrelerinden daha fazla sayıda akson ucu almasını mümkün kılar. Perikaryon olarak da adlandırılan hücre gövdesi, nöronun çekirdek ve çevresindeki sitoplazmasını kapsayan bölümdür. Algılama özellikleri bulunmasına karşın esas olarak beslenmeyle ilgili merkezdir (8, 9, 11). Nöronlar tek bir aksona sahiptir, çok az bir kısmında hiç akson bulunmaz. Aksonlar çok uzun yapılardır, bazı aksonların boyu 100 cm'e ulaşabilir. Aksonlar, perikaryonda oluşan akson tepesi denilen bir bölgeden çıkarlar. Aksonun plazma zarına aksolemma, içeriğine ise aksoplazma denir. Aksoplazma da poliribozomlar ve granüllü endoplazmik retikulumlar bulunmaz, perikaryona bağımlıdır. Bu nedenle akson kesilecek olursa kesğin çevresel bölümü bozunur ve yaşamına devam edemez (3, 8, 9).

Nöronlar sitoplazmik uzantılarının sayısına göre isimlendirilirler. 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 (pseödonipolar nöron) denir (Şekil 2.2). Unipolar nöronların perikaryonundan çıkan tek uzantı bir süre sonra T veya Y şeklinde dallanarak ikiye ayrılır. Bu nedenle literatürde daha çok pseödonipolar olarak isimlendirilmektedir (9, 11).



Şekil 2.2. Başlıca nöron tipleri (9)

Nöronlar fonksiyonel olarak 3 grupta incelenirler. Duyusal nöronlar; çevredeki reseptörlerden aldıkları uyarıyı santral sinir sistemine taşırlar.

Motor nöronlar; santral sinir sistemi ve gangliyonlardan periferdeki efektör hücrelere uyarıyı taşırlar. İnternöronlar (ara nöronlar); duyu ve motor nöronlar arasında entegrasyonu sağlayan aracı sistem olarak görev alırlar (12).

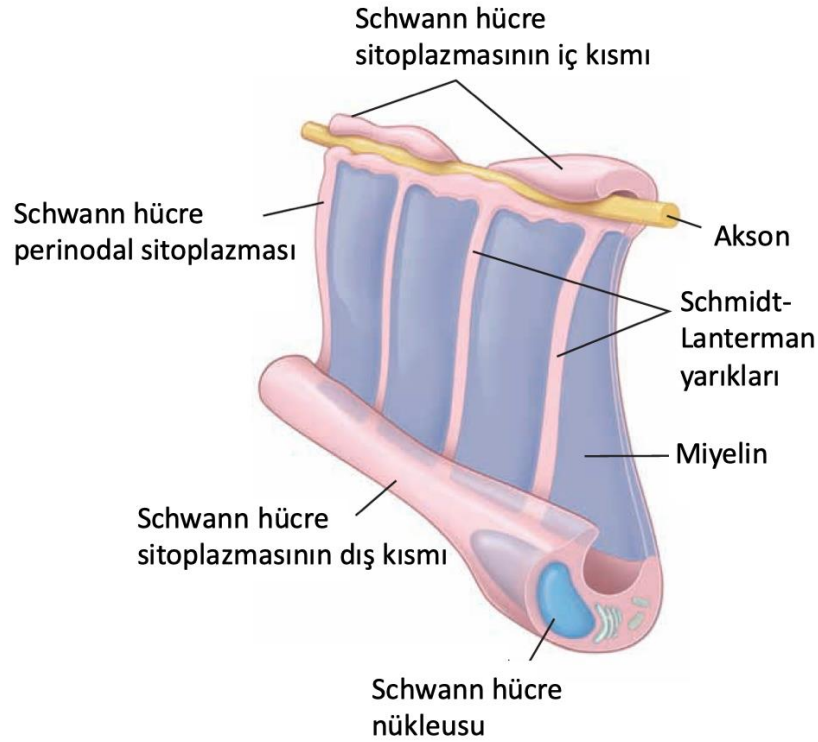
Sinir sisteminde hücreler birbirleri ile ve efektör hücrelerle sinaps olarak bilinen özel temas bölgeleri aracılığı ile iletişim kurarlar. Sinapslar aksoaksonik, aksodentrik veya aksosomatik olabilir. Sinapslar; kimyasal ve elektriksel sinapslar olarak da sınıflandırılabilir. Kimyasal sinapslarda uyarı iletimi; presinaptik nöronun nörotransmitter salınması ve post-sinaptik membranın polarizasyonunun değişmesi ile gerçekleşir. Elektriksel sinapslar ise neksus (gap junction) içeren sinapslardır,

iyonların hücreden hücreye hızla geçişini sağlayan bu bağlantılar sayesinde elektrik akımı hücreden hücreye aktarılır (8, 13).

### Schwann Hücreleri ve Miyelin Kılıf

Nöral krest kökenli hücrelerdir. Bu hücreler merkezi sinir sisteminde bulunan oligodendrositlerle aynı işleve sahiptir; ancak periferik sinir sisteminde bulunurlar. Schwann hücreleri; aksonun çevresinde myelin kılıfı oluşturarak elektrik yalıtımını sağlarlar, aksonların yeniden büyümesi için rehberlik ederler, periferik sinir sisteminde oluşan artıkları temizlerler (8, 9).

Periferik sinirler; somatik veya otonom sinir sistemlerinin afferent veya efferent sinir liflerinden oluşan yapılardır. Sinir lifi, bir akson ve çevresinde yer alan kılıflardan meydana gelir. Sinir liflerine ait hücre gövdeleri santral sinir sisteminde veya gangliyonlarda yer alır. Periferik sinir sistemindeki bütün aksonların çevresi Schwann kılıfı (nörolemma) ile baştan sona kadar sarılmıştır. Geniş çaplı aksonlarda Schwann kılıfının altında miyelin kılıfı vardır (14).

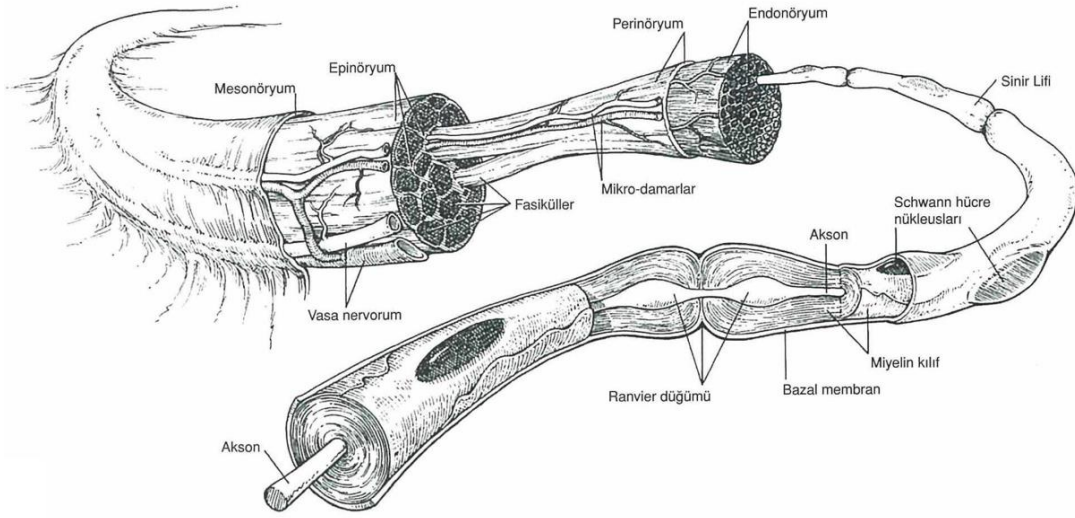


**Şekil 2.3.** Schwann hücre sitoplazması ve miyelin kılıf arasındaki ilişkinin üç boyutlu çizimi (11)

Normal bir sinir, miyelinli ya da miyelinsiz aksonlar olarak fasiküler demetler halinde organize olmuş yapılardır (1). Periferik sinir sisteminde, Schwann hücresinin plazma zarı akson etrafında dönerek onu sarar ve lipoprotein kompleksi olan miyelin kılıfı oluşturur (Şekil 2.3). Miyelin kılıf; yağ oranı diğer hücre zarlarına göre daha yüksek olan, çok sayıda değişmiş hücre zarından oluşur (9). Miyelin kılıfı, aksonu endonöriumun bağ dokusundan ayırır. Miyelin kılıfın varlığı uyarın hızlı yayılmasını sağlar. Akson tepesinde ve aksonun sinaps yapacağı bölümlerde miyelin kılıf bulunmaz (8). Sinir lifi boyunca miyelin kılıf yer yer kesintiye uğrar. Myelin kılıfın bulunmadığı bu alanlara Ranvier nodları veya Ranvier boğumları denir. Schwann hücreleri akson boyunca sıralandığı için, iki komşu Schwann hücresi arasında miyelin kılıf bulunmaz. Miyelin kılıfta izlenen ince yarıklara ise Schmidt-Lanterman yarıkları denir (1, 8, 9).

### **Periferik Sinir Bağ Dokusu**

Periferik nöral doku; endonörium, perinörium ve epinörium olmak üzere üç ana konnektif doku ile desteklenirler (Şekil 2.4). En içteki tabaka; akson ve Schwann hücresini saran, mikrodamarlar aracılığı ile beslenmesini sağlayan gevşek areolar doku endonöriumdur. Aynı hedefe yönelen aksonlar birleşerek fasikülleri oluştururlar. Fasiküler grupları saran konnektif doku ise perinöriumdur. Fasiküller sinirin gerilme direncinden sorumludurlar. Perinörium, kan-sinir bariyerine katkıda bulunan, metabolik olarak aktif bir difüzyon bariyeridir. Perinöriumun aynı tabakasında bulunan hücreler arasında sıkı bağlantı kompleksleri bulunur. En dış tabaka epinöriumdur. Mezonörium; epinöriyumu çevre yapılarla bağlayan ve hareketler sırasında sinirin diğer dokular üzerinden kaymasına yardımcı olan, ince areolar konnektif dokudur (1, 2).



**Şekil 2.4.** Periferik sinir çizimi (1)

### **Vasküler Yapı**

Periferik sinirlerin beslenmesi, sinir içerisinde damar ağı oluşturmuş segmental besleyici arterler aracılığı ile olur (15). Vasa nervorum isimli damarlar epinöryum boyunca yüzeysel ve longitudinal olarak seyreder. Vasa nervorumlar interfasiküler perinöryumda bulunan intranöral damarlara dal gönderirler ve bu damalar da endonöryum içerisinde uzanan bir kapiller ağına dönüşür. Bu zengin kanlanma sayesinde sinir, uzun bir segment boyunca mobilize edilebilir (1).

### **Gangliyonlar**

Bağ dokusu ile desteklenmiş, sinir hücre gövdelerini, uzantılarını ve satellit hücrelerini içeren yapılardır. Santral sinir sisteminde hücre gövdeleri nükleuslarda, santral sinir sistemi dışında ise gangliyonlarda yerleşir. Periferik sinir sisteminde kraniospinal (duyusal) ve otonom (motor ve viseral) gangliyonlar olmak üzere iki tip gangliyon bulunur (16).

### **Serbest Sinir Sonlanmaları**

Duyusal reseptörler, iç ve dış ortamdan gelen uyarıları afferent sinir uyarısı şekline dönüştüren sinir sonlanmaları veya özelleşmiş hücrelerdir. Santral sinir



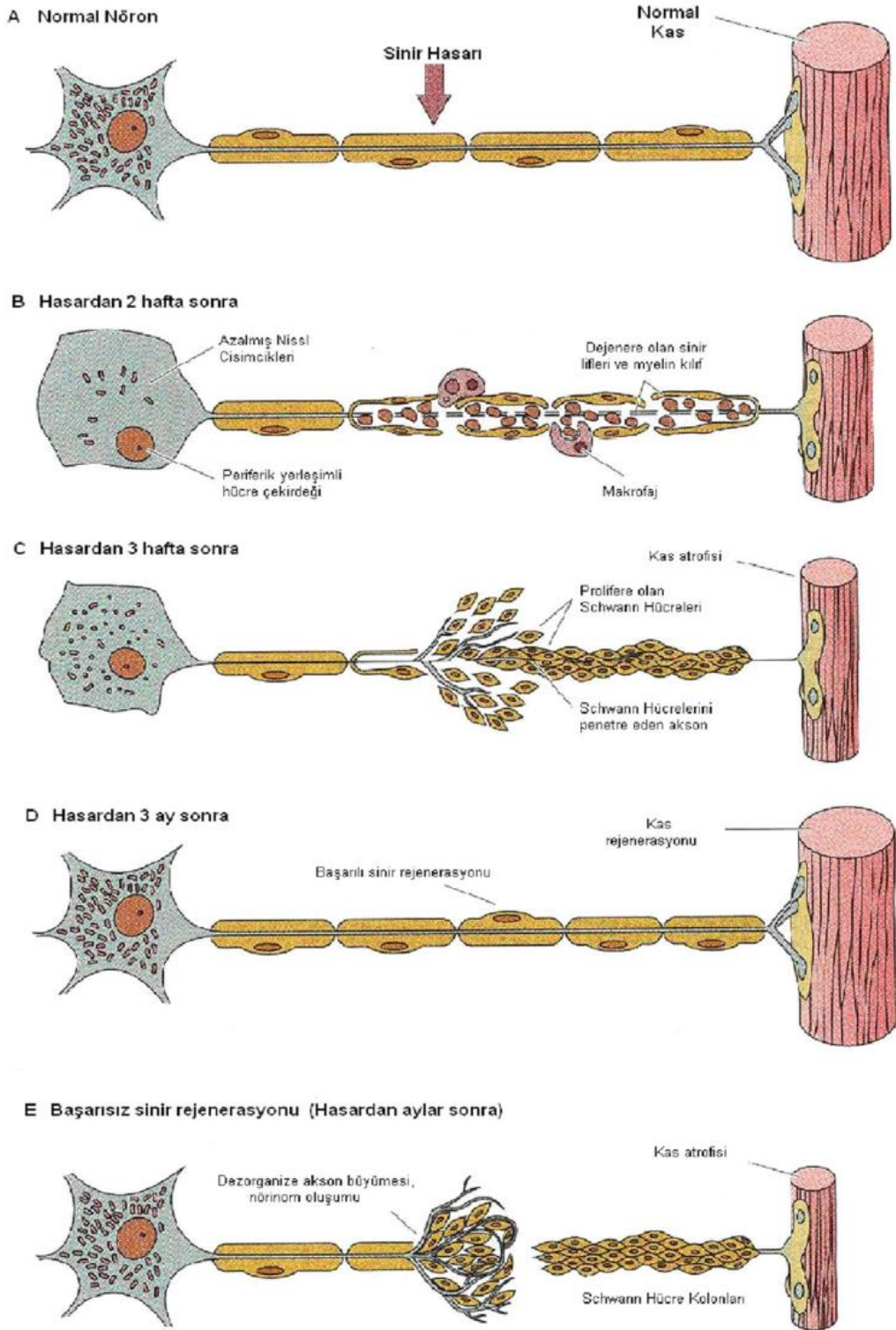
sistemine ulaştırılan bu uyarılara karşı uygun cevaplar gelişir. Duyusal reseptörler eksteroseptör, interoseptör ve propriyoseptör olmak üzere üçe ayrılır. Meissner korpüskülleri, Pacini korpüskülleri, Krause korpüskülleri ve Ruffini korpüskülleri bütün vücutta bağ dokusu içinde rastlanan serbest sinir sonlanmalarıdır (8, 9).

## 2.2. Periferik Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu

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. Periferik sinirlerde yaralanma sonrası, hasar bölgesinin proksimalinde ve distalinde belirli değişiklikler gözlenir (Şekil 2.5). Proksimal parça trofik merkezle (perikaryon) bağlantısı sürdürür ve çoğunlukla onarılır (9). Distal kısımdaki akson ve miyelin kılıf birkaç gün içinde parçalara ayrılır. Fagositik hücreler bu alanı temizler. Bu dejenerasyona anterograd dejenerasyon veya Wallerian dejenerasyonu denir (17, 18).

Yaralanma sonucu perikaryondaki gelişen dejenerasyona ise kromatoliz denir. Sitoplazmadaki bazofililiğin azalması sonucunda Nissl cisimciklerinin merkezden periferine doğru dağılması, perikaryon hacminde artış ve çekirdeğin periferine çekilmesi meydana gelmektedir. Yaralanma zonundaki aksonun proksimal kısmının küçük bir bölümü dejenere olduktan sonra rejenere olmaya başlar (9, 19). Schwann hücreleri; pro-rejeneratif fenotip kazanarak rejenere olan aksonları rezidü endonöral tüpler boyunca hedeflerine yönlendirme ve tekrar miyelinize etme görevini üstlenirler (1, 20, 21).

Rejenere olan lifler hem doku hem de son organ seçiciliği göstermektedir. Bu sürece nörotopizm 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 (1, 22).



**Şekil 2.5.** Periferik sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu (14)

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 büyümeye devam edip efektör organa ulaşabilir. Rejenerasyonun işlevsel olması için liflerin doğru yere yönelmesi gerekmektedir. Bununla birlikte miks tip sinirlerde rejenera olan duyuşal sinirler motor son plağa yönelirse işlev geri dönmeyecektir (9, 23).

Schwann hücreleri; makrofajlar ile etkileşerek immun cevapta rol oynaması, distal güdükte miyelin debrislerin ortadan kaldırılmasına aktif yardım ederek Wallerian dejenerasyonuna katkıda bulunması, Büngner bantlarını oluşturarak aksonal filizlenmenin hedef organa doğru olmasını sağlaması, sinir rejenerasyonuna yardım edip kolaylaştıran birçok sitokin ve nörotrofik faktör salgılaması nedenleriyle sinir rejenerasyonunda kilit rol oynamaktadır (24-26).

### 2.2.1. Nörotrofik Faktörler

Nörotrofik faktörler, nöronların sağ kalımını ve büyümesini artıran makromoleküler yapıda polipeptitlerdir. Travma sonrası, distal sinir güdüğü ya da denervasyona uğramış kas gibi hedef organ veya distal yapılardan salınırlar. Retrograd aksonal transport ile somaya taşınırlar ve burada etkilerini gösterirler (27-29).

Nörotrofik faktörler; nörotrofinler, nörokinler ve transforme edici büyüme faktörü beta süper ailesi (TGF- $\beta$ ) olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılırlar (30).

Nörotrofinler; sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3), nörotrofin-4/5 (NT-4/5) ve nörotrofin-6 (NT-6)'dan oluşmaktadır (25, 28).

Nörokinler; silier nörotrofik faktör (CNTF), lösemi inhibitör faktör (LIF) ve interlökin-6 (IL-6)'dan oluşmaktadır (31).

TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3'e ek olarak glia kaynaklı nörotrofik faktör de (GDNF) transforme edici büyüme faktörü beta süper ailesi (TGF- $\beta$ )'ne dahildir (32).

Bu faktörlerin dışında, sinir rejenerasyonunun farklı aşamalarında etki gösteren; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), tümör nekroz faktörü (TNF),

insülin benzeri büyüme faktörü-1 ve 2 (ILGF-1 ve 2), endotelial büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri de vardır (33-37).

Nörotrofinler ‘p75’ olarak adlandırılan düşük affiniteli NGF reseptörlerine ve ‘trk’ olarak adlandırılan yüksek affiniteli tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler. Nörotrofik faktörler, farklı duyu nöronlarında aynı biyolojik etkiyi göstermezler. Örneğin mekanoresöpteler ve proprioseptörler farklı nörotrofik faktörlerden etkilenmektedir (33, 38).

### 2.3. Sinir Yaralanmaları ve Sınıflandırılması

Sinir yaralanmasının sınıflandırılması, ilk olarak 1943’de Seddon ve 1951’de Sunderland tarafından önerilmiştir. Mackinnon tarafından karışık yaralanmayı tarif eden altıncı kategorinin eklenmesiyle genişletilmiştir (Tablo 2.1, Şekil 2.6). Yaralanmanın seviyesi ve derecesi tedavide belirleyici noktalardandır (1, 39, 40).

**Tablo 2.1.** Periferik sinir hasar sınıflandırmaları (41)

Seddon Sınıflaması	Sunderland Sınıflaması	Patoloji	İyileşme
Nöropraksi	1.Derece	Miyelin hasarı ve iskemi	Hızlı /mükemmel
Aksonotmezis	2.Derece	Akson bütünlüğü kaybolmuş; endonöryum, perinöryum, epinöryum sağlam	Yavaş/mükemmel
	3.Derece	Akson ve endonöryum bütünlüğü kaybolmuş; perinöryum ve epinöryum sağlam	Yavaş/ İnkomplet Cerrahi gerekebilir
	4.Derece	Akson, endonöryum ve perinöryum bütünlüğü kaybolmuş, epinöryum sağlam	Kötü Cerrahi genelde gerekli
Nörotmezis	5.Derece	Sinir bütünlüğünün tamamının kaybolması	Kötü Cerrahi gerekli
	6.Derece (Mackinnon)	1-4. derece sinir yaralanmalarının kombinasyonu ± normal fasikül	Kötü Cerrahi gerekli

Cerrahi uygulanmadan iyileşme potansiyeli olan yaralanmalar birinci, ikinci ve üçüncü derece yaralanmalardır. Birinci derece yaralanma fonksiyonel olarak hızla iyileşir. İkinci derece yaralanma daha yavaş iyileşir, üçüncü derece yaralanma ise

yetersiz veya yavaş iyileşme gösterir. Dört ve beşinci derece yaralanmalar cerrahi müdahale olmadan iyileşme göstermezler. Altıncı derece yaralanma değişken iyileşme gösterir (1).

**Birinci derece yaralanma (nöropraksi):** Segmental demiyelinizasyona yol açabilecek bölgesel bir iletim bloğu oluşmuştur. Aksonlar hasar görmemiştir. Remiyelinizasyon sonrası kendiliğinden iyileşme görülür.

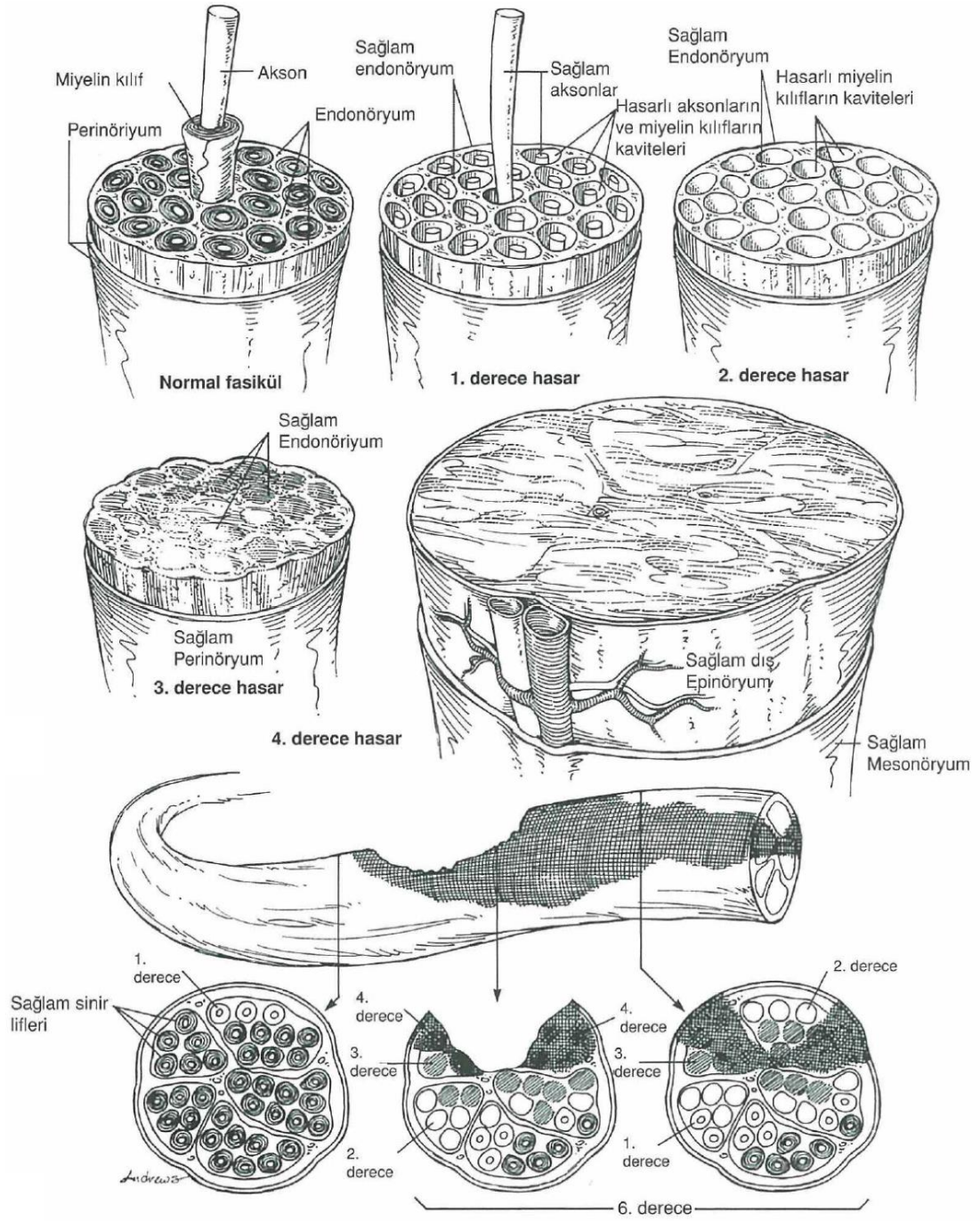
**İkinci derece yaralanma (aksonotmezis):** Aksonal hasar oluşur ve distal segment Wallerian dejenerasyonuna uğrar. Destek bağ doku tabakalarında hasar görülmez. İyileşme tam olarak beklenmektedir. Tinel bulgusu ile rejenerasyon takip edilebilir.

**Üçüncü derece yaralanma (aksonotmezis):** Aksonlar, miyelin kılıfı ve endonöriyum hasar görmüştür. Distal segmentte Wallerian dejenerasyonu ve endonöriyumda fibrozis gerçekleşir. Endonöriyumdaki skara sekonder olarak sinir liflerinin son organa ulaşması engelleneceği için iyileşme eksik olacaktır.

**Dördüncü derece yaralanma (aksonotmezis):** Sinir devamlılık halindedir ancak endonöriyum ve perinöriyumun yaralanması sebebiyle tam bir skar bloğu mevcuttur. Cerrahi tedavide skar bloğunun eksizyonu ve onarımı önerilmektedir.

**Beşinci derece yaralanma (nörotmezis):** Sinir kesilerek bütünlüğünü tamamen kaybetmiştir. Rejenerasyonun gerçekleşebilmesi için cerrahi müdahale gerekmektedir.

**Altıncı derece yaralanma (nörotmezis):** Bu yaralanma tipi, daha önce tariflenen beş yaralanma tipinin herhangi bir şekilde kombinasyonunu belirtir. Özellikle ezilme tipi yaralanmalarda hasar sinirde uzunlamasına meydana gelmektedir. Hasar derecesi sinir boyunca fasikülden fasiküle farklılık gösterebilir (1).



**Şekil 2.6.** Sinir yaralanmalarının sınıflandırılması (1)

#### 2.4. Periferik Sinir Cerrahisi

Periferik sinir cerrahisinde en iyi sonuçların, keskin temiz kesi sonrası, sinirin anında onarımı ile elde edilebildiği belirtilmektedir. Onarım; ilk 24 saat içerisinde yapılırsa primer onarım, ilk bir hafta içerisinde yapılırsa gecikmiş primer onarım, bir

haftadan daha uzun süre gecikme olursa sekonder onarım olarak tanımlanır. Gecikmiş onarım; fibrozis, retraksiyon, kompliyans kaybı gibi nedenlerle direkt sinir onarım şansını ortadan kaldırabilir. Primer onarım; keskin laserasyonlarda, temiz yaralarda endikedir. Sinir yaralanma bölgesinin net olmadığı, ekstremitte iskeletinin instabil olduğu, ciddi vasküler yetmezlik, eşlik eden hayati tehdit oluşturan durumlar varlığında gecikmiş primer onarım ya da sekonder onarım uygulanır (10, 42, 43).

### **2.4.1. Uç-Uca Sinir Onarım Seçenekleri**

#### **Perinöral (Fasiküler) Onarım**

Perinöral onarımın epinöral onarıma üstünlüğü kanıtlanmamıştır. Ancak beş fasikülden daha az fasikül içeren sinirlerde veya sinir grefti kullanıldığı durumlarda perinöral onarım uygun olabilir (Şekil 2.7). Diğer onarım tekniklerine göre avantajları arasında; sinir güdüğünde daha iyi miyelinizasyon potansiyeli olması, rejenere olan aksonların distal güdüğe geçme oranlarında artış ve bunun sonucunda daha iyi duyu ve motor son organ iyileşmesi gösterilebilir. Dezavantajları ise; operasyon süresinde uzama, dikiş kalabalığı, yanlış fasiküllerin karşılıklı onarım ihtimali, potansiyel dolaşım bozukluğu ve daha fazla fibrozis olarak söylenebilir (10, 44, 45).

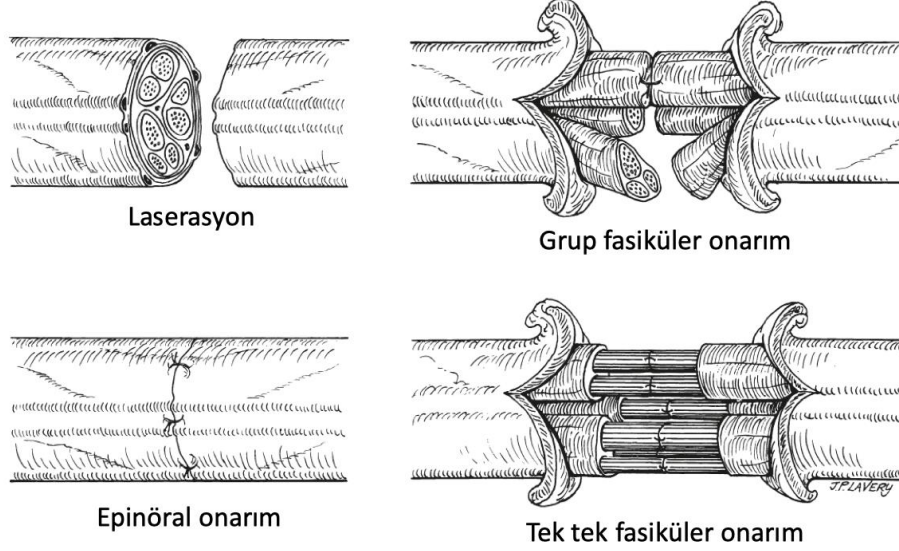
#### **Grup Fasiküler Onarım**

Periferik sinir onarımının amaçlarından biri proksimal segmentteki motor ve duyu fasiküllerin, distalde kendilerine karşılık gelen fasiküller ile devamlılığının sağlanmasıdır (1). Yaralanma seviyesi motor ve duyu fasikül gruplarının ayırt edilebildiği bir seviyede ise tercih edilebilir (Şekil 2.7). Bu onarım tekniğine, ulnar ve median sinirin ön koldaki onarımları örnek olarak verebilir (10, 46, 47).

#### **Epinöral Onarım**

Dijital sinir onarımlarında en uygun tekniktir (Şekil 2.7). Literatürde epinöral onarım ile diğer onarım tekniklerinin sonuçlarının benzer olduğu bildirilmiştir. Avantajları arasında; kısa operasyon süresi, daha basit teknik, intranöral dokuya müdahale edilmediğinden fibroziste azalma ve daha az büyütme altında

gerçekleştirilmesi sayılabilir (48). Dezavantajları ise; spesifik fasiküler yerleşimin yapılamaması ve sinir uçları kısaltıldığı için gerginlik oluşma ihtimali olarak belirtilebilir (10, 49, 50).



**Şekil 2.7.** Sinir onarım teknikleri (10)

#### 2.4.2. Sinir Uçları Arasında Boşluk Kaldığında Seçenekler

Bir sinirin primer onarımı esnasında sinire ait uçlar gerginliksiz durmalıdır. Bu durumlarda gerginliksiz primer koaptasyon yapılabilmesi için sinir mobilize edilebilir, transpoze edilebilir ve kemik kısaltılması yapılabilir. Distal sinir ucunun hedef dokuya direkt olarak implantasyonu, yani nörotizasyon da bir seçenektir. Onarım primer yapılamıyorsa; defektif alanın onarımında seçenekler arasında olan olog sinir grefti, sinir allogrefti, uç yan onarım tekniği aşağıda sıralanmıştır (10, 51). Sinir kondüitleri de ayrı bir başlık altında incelenmiştir.

#### Otolog Sinir grefti

Uç uca koaptasyonun gergin olduğu durumlarda endikedir. Sinir uçları arasında boşluk kaldığı durumlarda kullanılacak teknikler arasında altın standart konumundadır. İdeal donör sinirin özellikleri; önemli olmayan duyu kusuru yaratması, uzun dallanmayan segmentler içermesi, kolayca ulaşılabilir olması, az interfasiküler bağlantı içeren büyük fasiküllerden oluşması olarak sıralanabilir (10, 44).



Otolog Sinir grefti uygulamalarında önemli noktalardan biri, proksimal ve distal nörorafi hatlarından maksimum aksonun geçmesini sağlayabilmektir. Distale maksimum sayıda aksonun yönlendirilebilmesi için sinir greftleri ters döndürülerek onarım yapılır. Sinir greftinin ters döndürülmesi özellikle dallar içeren uzun bir sinir grefti kullanıldığında önemlidir. Graft anatomik olarak yerleştirilirse bazı rejenere olan aksonlar distal onarım hattını geçmek yerine bu dallar boyunca ilerleyebilir. Eğer greft ters konumlandırılır ise tüm rejenere olan aksonlar distale doğru ilerleyecektir (1, 52).

İnsanda en sık kullanılan donör sinir, saf duyu siniri olan sural sinirdir. Sık kullanılan diğer donör sinirler arasında; medial ve lateral antebrakiyal kütanöz sinir, posterior interosseöz sinirin distal segmenti sayılabilir (53). Sural sinirin dezavantajları; üst ekstremité için kullanılacak ise ayrı bir donör sahada olması ve nöral bağ doku bileşen oranının medial ve lateral antebrakiyal kütanöz sinir gibi üst ekstremité sinirlerine göre daha verimsiz olması olarak söylenebilir.

Periferik sinir rekonstrüksiyonunda vaskülarize sinirlerin rolü kısıtlıdır (54). Radyasyon hasarına sekonder olgular gibi alıcı alanın ileri derecede fibrozisi ve vasküler yetmezliği durumlarında vaskülarize sinir greftlerinin kullanımı literatürde yer almaktadır (10, 55, 56).

### **Uç-yan onarım**

Proksimal sinir ucunun bulunamadığı sadece distal ucun bulunduğu duyu siniri yaralanmalarında yapılması düşünülebilir. Motor sinirlerde bu onarım tekniği önerilmemektedir. Sonuçları primer onarım ve otolog sinir grefti uygulamalarına göre daha kötüdür (57). Bu onarımda mükemmel bir duyu restorasyonu sağlanmasa da bir miktar duyu kazanımı olacaktır, bununla birlikte distal kaynaklı sinir ağrısı da engellenebilir (10, 58, 59).

### **Sinir Allogrefti**

Sinir allogreftlerinin, geniş periferik sinir yaralanması durumunda, donör sinir miktarı yetmediğinde kullanıldığı yayınlar mevcuttur (60). Alıcı immünsüpresyonu gerektiren bir yöntemdir (61). Nöral rejenerasyon tamamlandıktan sonra allogreftteki

bileşenler alıcı orijinli olur (62). Hem immünsüpresif hem de nörorejeneratif özelliklerinden dolayı periferik sinir allogreftleri ile tedavi edilen hastalarda en uygun ajanın takrolimus olduğu düşünülmektedir. Takrolimus aksonların sinir allogrefti içerisinden geçiş hızını arttırarak, immünsüpresif kullanım süresini kısaltır ve immünsüpresif kullanımından ortaya çıkacak komplikasyonları azaltmaya yardımcı olabilir (63, 64).

Periferik sinir allotransplantasyonu öncesinde hem sinir allogreftleri hem de potansiyel alıcı adaylar belirli işlemlerden geçerler. Sinir allogreftleri, ABO kan tiplendirmesi yapılmış ve seronegatif vericilerden alınır. Bu greftler 5°C’de soğuk saklama solüsyonunda en az 7 gün saklanır. Solüsyona penisilin G, deksametazon ve insülin takviye edilir. Alıcıda ise işlemde önce takrolimus, azatiyoprin ve prednizondan oluşan immünsüpresyon tedavisine başlanır. Fırsatçı enfeksiyonları engellemek için antibiyotik profilaksisi yapılır (64).

İmmünsüpresyon sinir iyileşme bulgusu başladıktan 6 ay sonrasına kadar devam ettirilir. Rejeksiyon akut ya da daha geç dönemde olabilir. Periferik sinir allogreft rejeksiyonu yüzeysel flebit tablosuna benzer şekilde enflamasyon, kızarıklık, hassasiyet şeklinde kliniğe yansır (1).

Kadavra kaynaklı işlenmiş sinir allogreftlerinin klinik uygulamaları literatürde mevcuttur (Avance Nerve Graft; AxoGen, Inc, Alachua, FL) (65). Bu tip allogreft deselülarize insan sinir dokusu içerir, bu nedenle immün yanıt gelişmez. Sinir dokusunun mikroyapısının korunduğu belirtilmektedir. Bu greftler değişik çap ve uzunlukta hazır bulunurlar (66).

## 2.5. Sinir Kondüitleri

Yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki otojen sinir greftlerine benzer şekilde çeşitli biyolojik ve sentetik iletici tüp yapı kullanımı ile de nöral rejenerasyon için uygun mikroçevre sağlanmaktadır. Kullanılan biyolojik kondüitlere amniyotik membran, arter, ven, kas, tendon örnek verilebilir. Sentetik materyaller ise biyodegrade olabilen [kollajen, hyalüronik asit, jelatin, polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) vb.] ve degrade olmayan [silikon, plastik, polivinil alkol (PVA) vb.] sinir kondüitleri olarak sınıflandırılabilir (67).

İdeal bir sinir kondüiti; bükülebilir olmalı, uygulama esnasında ya da sonrasında kollapsa uğramamalı, inflamatuvar cevabı az olmalı, dokuya uyumlu olmalı, immünreaktif veya sitotoksik etkili olmamalı, akson rejenerasyonunu hızlandırmalı ve arttırmalı, sterilizasyonu kolay olmalı, enfeksiyon oluşum riskini arttırmamalı, biyoaktif moleküllerin geçişine izin vermeli, kolay bulunabilir olmalı ve rezorbe olmalıdır (68, 69).

Ancak sentetik kondütlerin vücutta rezorbe olmaması, yabancı cisim reaksiyonu meydana getirmesi ve kontrolsüz inflamasyon geliştirmesi gibi kısıtlamaları öne çıkmaktadır (70). Sentetik sinir kondütleri günümüzde, küçük çaplı sinirler için 3 cm'nin altındaki defektlerde, büyük çaplı sinirler için 5 mm'nin altındaki defektlerin rekonstrüksiyonunda önerilmektedir (1, 71).

Kondütler; rejenere olan aksonları çevre ortamdan ayırarak rejenerasyonu hızlandırır, makromoleküllerin lümen ile çevre doku arasındaki serbest difüzyonunu sınırlarlar. Kondütün boyutu, duvar geçirgenliği, luminal kompartmanın yüzey özelliği, elektriksel içerik gibi özellikleri sinir rejenerasyonunu etkiler (68, 72).

Kondütün yapısal özelliklerindeki değişiklikler sonucu; yüzey içeriği, rejenerasyon kapasitesi, geçirgenlik, biyodegradasyon gibi özellikler kontrol edilebilir. Tek lümenli kondütlerde nörotrofinler daha hızlı salınır. Çok lümenli kondütlerde daha yavaş ve uzun süreli salınır. Sinir rejenerasyonu için daha optimal olan, uzun süreli yavaş nörotrofin salınımıdır. Kondütlerdeki lümen sayısındaki artış Schwann hücre yapışması için daha çok yüzey alanı sağlar (73, 74).

### **2.5.1. Biyolojik Kondüt Materyalleri**

#### **Amniyotik membran (AM)**

İnsan amniyon zarı, yaklaşık olarak 0.02 mm ile 0.05 mm kalınlığındadır. Başlıca üç tabakadan oluşmaktadır: tek katlı kübik epitel, bazal membran ve stroma. Zarın iki yüzü makroskobik olarak farklılık göstermektedir. Pürüzsüz, parlak, saydam ve yapışkan olmayan epitel yüzü, mat ve yapışkan olan ise stromal yüzüdür. İnsan AM'sinin immünojenik olmadığı kabul edilmektedir. AM'nin elastik olması ve hücre yapışmasını kolaylaştırması nedeniyle, AM sıklıkla tercih edilen bir biyomalzemedir.

Esnek yapısı tip 3, 4, 5 ve 7 kollajen içeriğinin yanı sıra, fibronektin, laminin 1 ve 5 içermesinden kaynaklanmaktadır. AM transplantasyonu ilk kez 1910 yılında deri grefti olarak gerçekleştirilmiştir. 1940'lı yıllardan beri oftalmolojide en çok kullanılan greft materyalleri arasında yer almaktadır. AM'nin gerek yapısal bütünlüğü gerekse elastisitesi; bu dokunun doku mühendisliği alanında da kullanımını gündeme getirmektedir (75). Sinir rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda insan AM'sinin hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda nöral rejenerasyonu desteklediği gösterilmiştir (76).

AM'nin; uygun boyut ve miktarda kolayca hazırlanabilmesi, immünojenik olmaması, neovaskülarizasyonu desteklemesi, biyouyumlu olması ve sinir rejenerasyonu oldukça biyodegrade olabilmesi, kolay manipüle edilebilmesi ve sinir iyileşmesini desteklemesi nedenleriyle AM, deneysel ve klinik çalışmalarda nöral rejenerasyonu artırma amacıyla kullanılmaktadır (7, 77, 78).

### **Ven grefti**

Periferik duyu sinirlerinde 3 cm'den daha az sinir defekti olan olgularda kullanılabilir (79). Ven greftinin dezavantajları; kıvrılma ve kollaps riski, fibrotik kontraksiyona uğraması olarak sayılabilir. Kollaps, dejenerasyon ve fibrozis sonucu sinir rejenerasyonu duracaktır. Ven kondüitlerinin kollapsını engellemek amacı ile ven içerisine çeşitli materyaller yerleştirilmesi denenmiştir. Kas segmentleri, kolajenden zengin adventisya kollapsı engellemek için araştırılan materyallerden birkaçıdır. Venlerin valv mekanizmasının sinir rejenerasyonunu engelleyeceğini söyleyen yazarlar da bulunmaktadır. Sonuçları primer onarım veya sinir otogrefti kullanımına göre daha kötü olarak literatürde belirtilmektedir (10, 80, 81).

### **Kas grefti**

Akut yaralanmalarda duyu sinirlerinde interpozisyonel greft olarak kas lifleri kullanılabilmesine yönelik literatürde çalışmalar mevcuttur. İstenen çap ve boyutta kondüit olarak hazırlanabilirler, dezavantajları arasında ise sinir rejenerasyonunun kas içine doğru olması bulunmaktadır. Nadiren kullanılır (10, 82, 83).

## **Tendon grefti**

Deneysel çalışmalarda, rat siyatik siniri üzerinde defekt oluşturulup çeşitli şekillerde tendon grefti kullanılmış ve sinir onarımlarında tendon greftlerinin kullanımının yararlı olabileceği raporlanmıştır (84, 85).

### **2.5.2. Sentetik Kondüit Materyalleri**

#### **Degrade olmayan sentetik sinir konduitleri**

Degrade olmayan materyaller bariyer görevi görürler ve çevre doku ile kondüit arasında molekül geçişini azaltırlar (86). Bu nedenle deneysel çalışmalar da kondüit içerisine konulan materyaller değiştirilerek farklı çalışma grupları oluşturulabilir. Silikon tüp, polietilen, elastomer hidrojel, akrilik polimer ve poröz paslanmaz çelikten üretilenler (87, 88).

Bu materyaller üzerine poröz özellik kazandırma, mekanik gerginlik oranı gibi modifikasyonlar yapılarak istenilen kondüit hazırlanabilir. Degrade olmayan materyallerin dezavantajları arasında; yabancı cisim reaksiyonu, kronik inflamasyon, skar dokusu formasyonu, bükülmemeleri ve stabil olmamaları, kompresyon sonucu nöral dokuda hasar oluşması sayılabilir. Bu dezavantajlarından dolayı uzun dönemde ikinci bir ameliyat ile çıkarılmaları gerekebilir (89).

Silikon tüp, sinir onarımında kullanılabilen inert bir materyaldir. Büyük moleküllere karşı geçirgenliği olmayan, rijit yapıda, rezorbsiyona uğramayan bir maddedir. Çevre dokudan eksojen büyüme faktörlerinin geçişine izin vermez. Silikon tüp etrafında inflamasyon ve fibrotik reaksiyon gelişir ve bu durum nöral rejenerasyona zarar verir. Oksijen ve diğer besleyici maddelere karşı geçirgen değildir. Kronik irritasyon nedeni ile uzun dönemde çıkarılmaları gerekebilir (90).

#### **Biyodegrade olabilen sentetik sinir konduitleri**

Degrade olmayan materyallerin vücutta yabancı cisim reaksiyonu oluşturması gibi dezavantajları ve ikinci bir cerrahi işlem ile çıkarılmaları ihtiyacını ortadan kaldırmak için biyodegrade sinir kondüitleri arayışı içine girilmiştir. Biyodegrade kondüitlerin;

bükülebilir ve poröz yapıları, mekanik gerilmelere dayanıklı olmaları, Schwann hücreleri ve biyoaktif moleküllerin bağlanabilmeleri avantajları arasındadır (80, 87).

### **Poliglikolik Asit (PGA)**

Poliglikolik asit (PGA), doku mühendisliği uygulamaları ile üç boyutlu kompozisyonda elde edilen bir materyaldir. PGA uzun süredir cerrahide; cilt altı sutür ve abdominal mesh olarak da kullanılabilen, eriyebilen sentetik bir materyaldir. Vücutta ortalama olarak 90 günde erir. Ticari olarak farklı çap ve uzunlukta kullanılan formları bulunmaktadır. Çevre dokudan oksijen difüzyonuna izin verir ve fibroblast çoğalmasına olanak tanır. İki katmanlı olarak dizayn edilen kondüitlerle ilgili yapılan çalışmalarda iç katman olarak kullanılmıştır (87, 91, 92).

### **Poli-L-Laktid Glikolik Asit (PLGA)**

Poliglaktin veya 10:90 PLGA içeren vikril mesh literatürde bahsi geçen ilk biyodegrade sentetik kondüitlerdendir (93). Bükülgen yapıdadır, 180° bükülmeler sonrası dahi orijinal yapısına dönebilir, sutüre edilmesi kolaydır, poröz yapıdadır, madde geçişine izin verir, istenen boyutta hazırlanabilir. PLGA'nın sinir rejenerasyonuna irritan etkisinin olabileceği belirtilmiştir ve diğer dezavantajı ısı ve kimyasallara karşı dirençli değildir (72).

### **Kollajen**

Kollajen, domuz derisinden enzimatik reaksiyon ile elde edilen tip 1 ve tip 3 kollajen içeriğinden oluşmaktadır (94). Telopektidleri enzimatik reaksiyon ile elimine edilmiş olsa da antijenik özelliği az miktarda devam edebilmektedir. Helikal yapıdadır ve vücutta altı ayda hidrolize uğrar. Geçirgen yapıdadır ve oksijen ile besleyici moleküllerin transportuna izin verir (72, 95, 96).

### **Jelatin**

Kollajenin denatüre edilmesi sonucu elde edilir. Kollajenden farkı, antijenik değildir ve daha ucuzdur. Doku uyumu iyi, eriyebilen bir polimerdir. Biyodegrade sentetik kondüitler arasında ilk denenen materyallerdendir (87, 97).

### **Hyalüronik Asit**

Ekstrasellüler matriks bileşenlerinden olan hyalüronik asit; fibrozisi azaltıcı ve fibrin matriks oluşumunu arttırıcı özelliktedir. Hyalüronik asit bazlı sinir kondüitleri; rejenere olan aksonların migrasyonunu arttırır, sitotoksite riski azdır ve emilebilir bir materyaldir (34, 98).

### **Aljinat**

Aljinat, deniz yosunundan elde edilen bir kopolimerdir. Beta-d-mannuronik asit ve alfa-1-glukuronik asitten oluşur. Doku uyumu yüksektir, vücutta biyodegrade olur. Sinir rejenerasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (99, 100).

### **Polyester ve Kopolyester**

Poli-L-laktik asit (PLLA), polilaktik asit- -kaprolakton, poli-L-laktid-koglikolid, poli 1,3-trimetilen karbonat- -kaprolakton (TMC), poliesterüretan (PU) ve polikaprolakton (PCL) gibi polyester ve kopolyesterlerin sinir rejenerasyonunda kullanılabileceği bildirilmiştir (87, 101-103).

## **2.6. Periferik Sinir Rejenerasyonunda Kök Hücreler**

Kök hücreler; çok hücreli organizmalarda bulunan, mitoz bölünme ile çoğalabilen, kendini yenileme özelliği olan ve çeşitli özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir (20, 104).

Gelişim basamağına göre, embriyonik olan ve embriyonik olmayan (yetişkin, fetal ve kadavra kök hücreleri) kök hücre olarak sınıflandırılır. Farklılaşma potansiyellerine göre ise totipotent, pluripotent ve unipotent kök hücre olarak adlandırılırlar (105). Totipotent kök hücreler, embriyonik ya da ekstraembriyonik hücre tiplerine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Ekstraembriyonik dokular da dahil olmak üzere tüm embriyoyu oluşturabilirler. Pluripotent kök hücreler; bütün embriyonik hücrelere farklılaşabilen ancak 'totipotent' veya ekstraembriyonik hücrelere dönüşemeyen kök hücrelerdir (106). Endoderm, mezoderm ve ektoderm germ tabakaları oluşumunu tetiklerler. Yetişkin kök hücreler sadece bir germ

tabakasında çok yönlü farklılaşma kapasitesine sahiptir. Unipotent veya progenitor kök hücre ise belirlenmiş bir hücre tipine farklılaşabilir. Farklılaşma potansiyeli, embriyonik kök hücreden özelleşmiş doku hücrelerine doğru geldikçe azalma gösterir. Yetişkin somatik hücrelerin farklılaşma kapasitesi yoktur (6, 107).

Periferik sinir onarımında kök hücre çalışmalarının sayısı son yıllarda giderek artmaktadır. Kök hücre, progenitor hücre veya Schwann hücre benzeri farklılaşmış kök hücreler ile yapılan hücre terapilerinin, sinir rejenerasyonunda yapısal veya fonksiyonel yaklaşımlarla etkinliği araştırılmaktadır (108, 109).

Schwann hücreleri, periferik sinir rejenerasyonunda primer yapısal ve fonksiyonel hücre grubudur. Ancak kısa süre içerisinde yeterli sayıda otolog Schwann hücresi elde etmek zordur, bu nedenle otolog Schwann hücresi klinik uygulamaları sınırlıdır. Rejenerasyon desteği için Schwann hücrelerinden başka hücre tiplerinin kullanılması potansiyel klinik uygulamalar için büyük önem taşımaktadır (110-112).

Periferik sinir rejenerasyonunda kök hücrelerin etkisi; Schwann hücrelerine farklılaşması, nörotrofik faktörler salgılaması ve miyelin oluşumuna katkıda bulunması olarak sıralanabilir (104, 113, 114).

### **2.6.1. Kök Hücre Kaynakları ve Çeşitleri**

Periferik sinir onarımında kullanılan kök hücre temelli tedavilerde ideal kaynağın özellikleri; vakaya özgü ve kolay ulaşılabilir olması, non-invaziv veya minimal invaziv hasat imkanı, *in vitro* kültürlerde hızlıca çoğaltılabilmesi, immün toleransının olması, tümörijenik olmaması, alıcı sinir dokuda yaşayabilmesi ve integre olabilmesi, kararlı transfeksiyona ve eksojen genlerin ekspresyonuna yatkın olmasıdır (6, 115, 116). Periferik sinir onarımında kullanılabilen bazı kök hücre kaynakları Şekil 2.8.'de gösterilmiştir.

### **Embriyonik Kök Hücreler (EKH)**

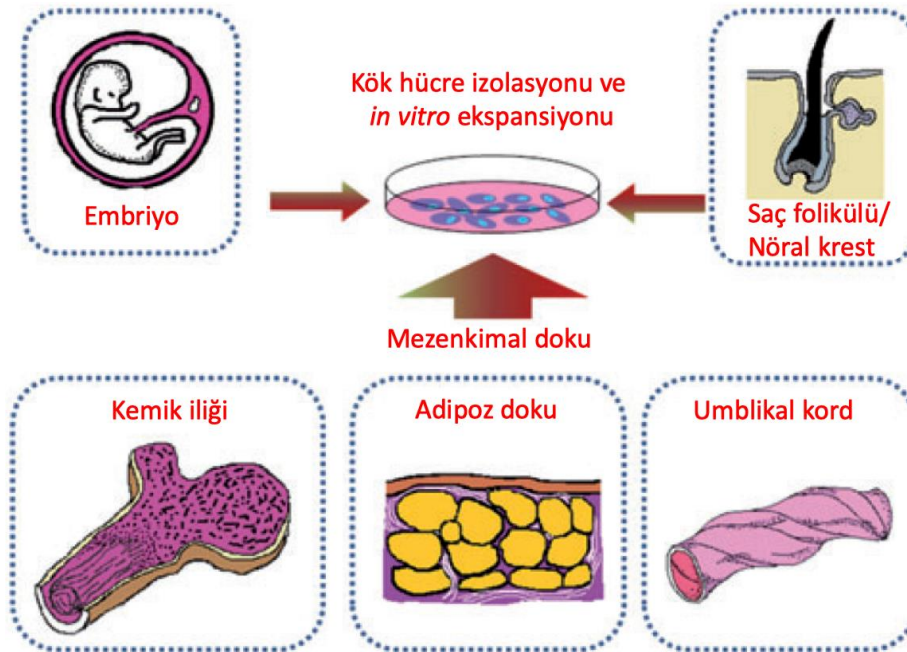
Embriyonik kök hücreler, pluripotent kök hücreler olup blastokist evresinde embriyodan elde edilirler (117). Üç germ tabakasına da farklılaşabilirler. Ziegler ve ark. (118) tarafından sinir rejenerasyonu için gereken Schwann hücrelerinin %60



verimlilik ile EKH'den elde edilmesine yönelik protokol geliştirilmiştir. EKH ile yapılan deneysel çalışmalarda farklılaşmış Schwann hücrelerinin sinir rejenerasyonunu arttırdığı raporlanmıştır. Yetişkin kök hücrelerin üretiminde de EKH kullanılabilir. EKH'lerin avantajlarının yanında dezavantajları da bulunmaktadır. EKH'lerin kullanımı, teratom oluşumu için risk faktörüdür. EKH'lerin üretimi için kısıtlı miktarda embriyo bulunmaktadır. En önemlisi; EKH ile klinik çalışmalar yapmak etik nedenlerden dolayı kısıtlanmıştır (6, 119).

### Nöral Kök Hücreler (NKH)

Nöral kök hücreler, nöronlara veya glial hücrelere farklılaşma özelliği olan hücrelerdir. NKH'ler erişkin insan beyinde iki ana bölgede bulunmaktadır. Birincisi hipokampus, ikincisi ise lateral ventrikülün subventriküler zonudur (120, 121). NKH implantasyonunun akut ve kronik periferik sinir yaralanmasında faydalı olduğunu belirten yayınlar bulunmaktadır (122, 123). NKH'nin kısıtlamaları ve dezavantajları bulunmaktadır. Beyinden alınan NKH'lerin miktarı yeterli olmayabilir ve beyinde bulunduğu her iki bölgeye de ulaşılması zordur. Ticari murin C17.2 NKH'lerin kullanıldığı siyatik sinir defekti oluşturulmuş sıçan modelinde yüksek oranda nöroblastom oluşumu görülmüştür (124).



**Şekil 2.8.** Periferik sinir onarımında kullanılabilen bazı kök hücre kaynakları (104)

### **Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)**

Mezenkimal kök hücreler; yağ dokusu, kemik iliği, umbilikal kord, periferik kan, amniyotik sıvı, tendon ve ligamentler, sinovyal membran, olfaktör mukoza, diş pulpası, saç folikülü, fetal dokular gibi birçok dokuda bulunan multipotent kök hücrelerdir (114, 125, 126). Organizmada en fazla bulunan ve insan kök hücrelerinin en karakteristik özelliklerini taşıyan kök hücrelerdir. Bağ dokusunun büyük bir çoğunluğunu oluşturan hücrelerin öncüleridir.

MKH'lere farklılaşma potansiyelleri, kolay elde edilebilmesi ve immünmodülasyon özellikleri nedeniyle doku rejenerasyonunda fazlaca ilgi duyulmaktadır (127). MKH'lerin doğası gereği yağ, kemik, kas ve kıkırdak dokular gibi tüm mezodermal yapılara farklılaşabilme yeteneği bulunmaktadır. Uygun koşullar altında ise MKH; nöron, astrosit ve Schwann benzeri hücreler gibi non-mezenkimal hücre gruplarına da farklılaşarak sinir rejenerasyonunu destekleyebilirler (128, 129).

Günümüzde, kök hücre kaynağı araştırmaları; adipoz doku, cilt, saç folikülü ve umbilikal kord gibi non-invaziv veya minimal invaziv işlemler sonrası elde edilebilecek kaynaklara odaklanmış durumdadır (104, 130).

### **Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler (KİMKH)**

Mezenkimal kök hücreler, ilk olarak kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden farklı fibroblastik hücre topluluğu olarak fark edilmiştir (131). KİMKH'lerin, *in vitro* ve *in vivo* aksonal filizlenme ve periferik sinir rejenerasyonuna katkıda bulunduğu yönelik birçok yayın bulunmaktadır (110, 132, 133). Ancak KİMKH'lerin klinik kullanımında bazı dezavantajları bulunmaktadır. Tedarik işlemi acı vericidir bu nedenle genel ya da lokal anestezi gerekmektedir. Ayrıca işlem sonrası az miktarda MKH elde edilmektedir.

### **Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler (AKMKH)**

Adiposit Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler, liposakşın ile yağ dokudan elde edilirler. AKMKH'ler hem minimal invaziv bir işlem ile elde edilmeleri hemde her bir

mililitre sıvı yağ başına  $(0.25-0.375) \times 10^6$  hücre içeriğiyle yüksek miktarda elde edilmeleri nedenleriyle avantajlıdır (113, 134).

Yağ dokudan elde edilen AKMKH'lerin fenotipik profili, KİKMKH'lerle benzerlik göstermektedir (135). KİKMKH ile kıyaslandığında AKMKH'de, daha üstün proliferasyon ve farklılaşabilme özellikleri bulunmaktadır (136). AKMKH; kas atrofisini azaltır, miyelinizasyonu artırır, aksonların düzenlenmesine yardımcı olur, anjiyogenezi artırır ve inflamasyonu azaltır (6). Schwann benzeri hücrelere farklılaşabilir bu nedenle geçerli bir Schwann hücresi alternatifidir. Schwann benzeri hücrelere farklılaşmaktan ziyade, temel olarak NGF, VEGF ve BDNF salınımı ile endojen Schwann hücresi toplanmasını sağlayarak sinir rejenerasyonunu arttırdığına yönelik çalışmalar da vardır (137, 138).

Ulaşım ve hasat kolaylığı, daha iyi kök hücre karakteristiği göstermesi AKMKH'leri prelinik çalışmalar için en optimal seçeneklerden biri haline getirmektedir.

### **Fetal Kökenli Kök Hücreler**

Fetal dokular; yaş, çevre ve hastalıkların neden olduğu genetik hasara maruz kalmadığı için en temel MKH kaynaklarından (139). Amniyotik sıvı, amniyotik membran, umbilikal kord ve Wharton jeli gibi birçok fetal dokudan elde edilebilir. Doğum sonrası bu dokular bırakıldığı için, kök hücre kaynağı olarak invaziv işleme gerek kalmadan fazlasıyla kullanılabilir. Elde edilen hücreler kültür ortamında çoğaltılıp nöral fenotipe farklılaştırılabilir (6, 20).

### **Amniyon Doku Kökenli Kök Hücreler (ADKKH)**

Amniyotik sıvı veya amniyotik membrandan köken alan kök hücrelere denir. Hem MKH hem de NKH karakteristiği gösterirler ve nöral dokulara farklılaşabilirler (6, 140). Yüksek anjiyogenik potansiyelleri de bulunmaktadır. İmplantasyon sonrası periferik sinir rejenerasyonunu arttırmakla beraber, intranöral vaskülariteyi de arttırdığı gösterilen çalışmalar mevcuttur (141, 142).

### **Umbilikal Kord Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (UKKMKH)**

UKKMKH'ler, proliferasyon ve farklılaşma potansiyellerinden dolayı hücre terapilerinde iyi bir aday olabileceği düşünülmektedir (130). Postnatal dokular doğum sonrası kullanılmadığı için kolay ulaşılabilir durumdadır. UKKMKH transplantasyonu sonrası tümör oluşumları raporlanmıştır (143). Deneysel çalışmalarda, UKKMKH'lerin periferik sinir rejenerasyonunu desteklediği bildirilmiştir (6, 144).

### **Wharton Jeli Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (WJKMKH)**

Wharton Jeli, umbilikal kord içerisindeki damarları koruyan özel primitif bir konnektif dokudur. WJKMH'lerin, Schwann benzeri hücrelere farklılaşma potansiyelleri bulunmaktadır. Ayrıca *in vitro* ortamda NGF, BDNF ve NT-3 gibi nörotrofik faktörlerin salınmasını sağlayıp aksonal büyümeyi başlattığı gösterilmiştir (145, 146).

### **Cilt Kökenli Prekürsör Kök Hücreler (CKPKH)**

Cilt kökenli prekürsör kök hücreler dermiste bulunan somatik multipotent hücrelerdir. Proliferasyon yeteneğinin dışında, melanosit, kraniyofasyal kıkırdak, kemik, konnektif doku, vasküler düz kas, endokrin hücreleri, nöron ve glial hücrelere farklılaşma özelliği de bulunmaktadır. Akut ve kronik sinir yaralanmalarında, nöral rejenerasyonunu desteklediği bildirilmiştir (147, 148).

### **Diş Pulpası Kök Hücreleri (DPKH)**

Ciddi diş hasarı sonrası cevap olarak yeni odontoblast formasyonu ve dentin üretimi, diş pulpasında mezenkimal kök hücre olduğunu desteklemektedir. DPK hücreleri ilk defa 2000 yılında izole edilmiştir. Uygun kültür ortamında da nöral hücrelere farklılaştığı gösterilmiştir (149). DPK hücreleri; nöral belirteçler gösterebilir, nörotrofik faktör oluşturabilir, akson oluşumu destekler ve fonksiyonel olarak aktif nöronlara dönüşebilirler (150, 151).

### **Kas Kökenli Kök-Prekürsör Hücreler (KKKPH)**

Kas Kökenli Kök-Prekürsör Hücreler; kendini yenileme, proliferasyon ve multipotent farklılaşma gösteren iskelet kasından elde edilen kök hücrelerdir. İnsan sinir onarımı üzerindeki rolü hakkında henüz sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Periferik sinir hasarlarına sıklıkla kas iskelet sistemindeki travma da eşlik ettiğinden dolayı, KKKPH'lerin sinir rejenerasyonunun yanında kas atrofisini de azaltacağı düşünülmektedir (6, 152).

### **İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (iPKH)**

İndüklenmiş pluripotent kök hücre, pluripotent olmayan bir hücreden, bazı genleri üretmesi sağlanarak veya dışarıdan faktörler verilerek, farklılaşmanın tersine çevrilmesi sonucu elde edilen hücredir (153). İlk olarak Takahashi ve ark. (154) fare ve insan fibroblastlarında pluripotensi indüklemek için tanımlanmış transkripsiyon faktörlerinin bir protokolünü yayınlamışlardır. İPKH'lerin nöral hücrelere farklılaşmasını indükleyecek yöntemler de yayınlanmıştır. Farklılaşma sürecindeki azalmış verimlilik ve artmış değişkenliğe rağmen, iPKH'lerin hayvan modellerinde santral ve periferik sinir sistemindeki hasarlarda rejenerasyon potansiyeli olduğu belirtilmektedir (155, 156). Etik nedenler ve immünsüpresyon ihtiyacı olmaması nedeniyle EKH'lerden üstün olmasına rağmen; orjinal somatik hücreden gelen epigenetik hafıza, kromozomal anormallikler ve tümör oluşumu aşılması gereken problemlerdir (6).

## **2.6.2. Kök Hücrelerin Etki Mekanizması**

### **Schwann hücre tipine farklılaşma**

Kök hücrelerin kendini yenileme özelliği sayesinde hasarlı alana sayısız hücre gönderiminde bulunabilir. Kök hücreler hasarlanmış sinir alanına göç eder ve sonrasında proliferasyona başlar, mikroçevrenin uygun olması durumunda da onarım için gereken hücre tipine farklılaşırlar (Şekil 2.9), (157).

Kök hücreler; kimyasal uyarı, biyolojik uyarı veya gen transfeksiyonu ve nöral hücrelerle ko-kültürü içeren belirlenmiş kültür ortamlarının uygulanması sonucu *in*

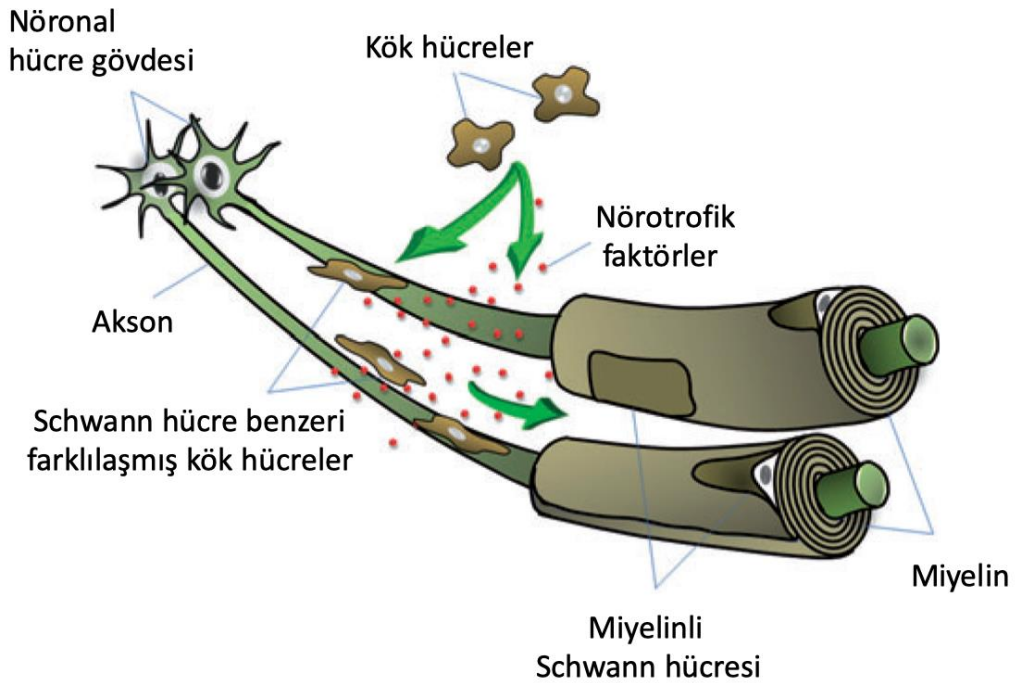
*vitro* ortamda Schwann hücresi ve diğer nöral fenotipteki hücelere farklılaşması için de indüklenebilir (6, 104).

### Nörotrofik Faktör Salgılanması

Kök hücreler, nöral hücrelerin yaşaması ve nörogenezin devamı için biyoaktif nörotrofik faktörler salgılayarak uygun mikroçevreyi oluşturular (Şekil 2.9). NGF, BDNF, GDNF, NT-3, VEGF, serebral dopamin nörotrofik faktör (CDNF) kök hücrelerin sentezleyip serbestlediği nörotrofik faktörlerin bir kısmıdır (6, 158, 159).

### Miyelinizasyonun Desteklenmesi

Miyelinizasyon, periferik sinir yaralanmalarında rejenerasyonun kalitesini ve fonksiyonel dönüşü belirleyen majör faktörlerden biridir (Şekil 2.9). *In vitro* ve *in vivo* ortamda birçok kök hücrenin Schwann benzeri hücre formunda miyelizasyonu arttırdığı gösterilmiştir (129, 160).



**Şekil 2.9.** Kök hücrelerin periferik sinir rejenerasyonunda etki mekanizması (104)

## 2.7. Hücre Tabaka Teknolojisi

Hücre tabaka mühendisliği, Okano ve ekibi tarafından önerilen ve umut vadeden doku mühendisliği tekniklerinden biridir. Sıcaklık duyarlı modifiye kültür kapları ile hücreler 32°C'nin altındaki sıcaklıklarda 30 dakikadan daha kısa sürede enzim ya da şelatlayıcı ajan kullanılmasına gerek olmadan tabaka halinde elde edilebilmektedir (161). Hücre tabakası hücre dışı matriks, iyon kanalları, büyüme faktörü reseptörleri ve diğer önemli hücre yüzey proteinlerini içeren bir tabaka olarak tanımlanabilir.

Enzimatik yöntemde hücreler arasındaki hücre-hücre ve hücre- ekstrasellüler matriks (ECM) bağlantıları parçalandığı için hücreler tek tek ve süspansiyon halinde yüzeyden kaldırılırlar. Hücre tabakası teknolojisinde ise hücrelerin birbirleri ile bağlantıları ve ECM yapısı parçalanmadan yüzeyden kaldırılabilirler, böylece enzimlere karşı duyarlı hücreler (hepatosit, glial hücreler vb.) farklılaşmış fenotiplerini koruyabilirler (162).

Hücre tabakaları yalnız başına veya diğer biyomalzemeler ile kombine edilerek doku mühendisliğinde kullanılabilir. Hücre tabaka teknolojisi yaklaşımı ile deri, kalp, kornea, kemik ve kırıkta gibi dokuların rejenerasyonu için yapılan pek çok *in vitro* ya da *in vivo* çalışma bulunmaktadır (163-166).

Hücre tabakalarının elde edilmesi için, sıcaklık duyarlı kültür kaplarının kullanımına ek olarak çeşitli yöntemler de geliştirilmiştir. Bunlar; askorbik asit uygulaması, amniyotik membran, enzim takviyeleri, manyetik kuvvet uygulaması, elektrokimyasal-uyarılı pH değişimi, elektrokimyasal polarizasyon, iyonik çözünme, ışık etkisi, fibrin kaplı yüzeyler, yüksek hücre yoğunluğu ve serum etkisidir (164, 167).

Hücre tabaka teknolojisinin doku mühendisliği ve rejeneratif çalışmalarda sağladığı pek çok avantaj bulunmaktadır. Hücreler ECM, iyon kanalları, büyüme faktörü reseptörleri ve diğer önemli fonksiyonel yüzey proteinlerini kaybetmezler. Hücre süspansiyonu enjeksiyonuna göre minimum hücresel kayıp olması doğrudan hücre enjeksiyonuna karşı avantaj sağlar. Hücre tabakalarının transplantasyonu hücre süspansiyonu enjeksiyonuna göre daha güçlü doku fonksiyonu, daha bütün doku rejenerasyonu ve daha güçlü terapötik etki sağlamaktadır (164, 165, 168).

Sunulan çalışmada; doku mühendisliği alanında güncel bir yaklaşım olan hücre tabaka teknolojisini (cell sheet technology) ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücre tabakası üretip, rejeneratif tıpta etkinliği bilinen amniyotik membran ile kombine ederek tamamen biyolojik bir kondüit üretilmesi ve sıçanlarda siyatik sinir hasarı oluşturularak periferik sinir iyileşmesi üzerine etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

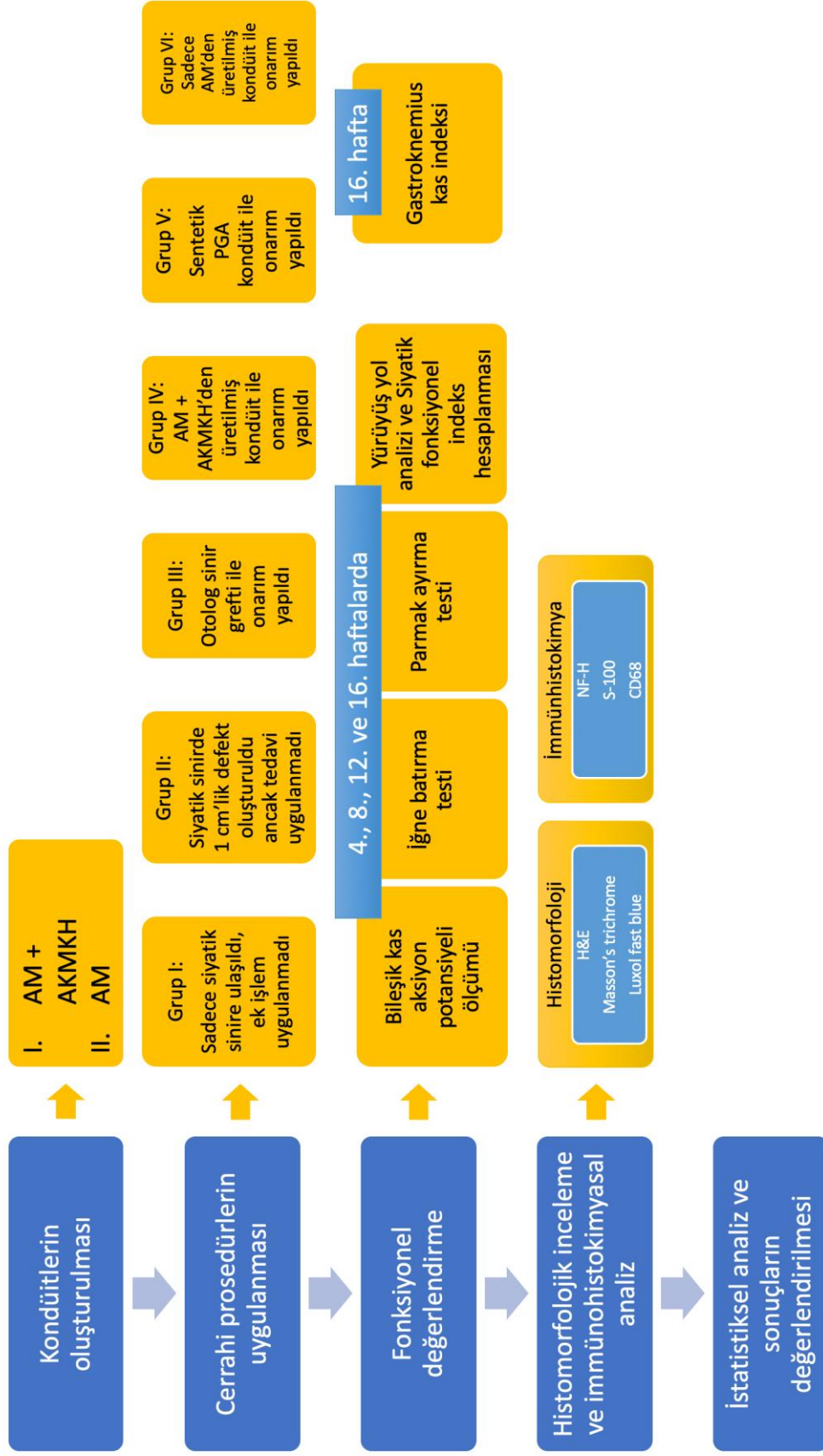
Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan (tarih, 15.01.2019; karar no, 2019/01-06) ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (tarih, 5.06.2018; karar no, GO 18/529-33) gerekli izinlerin alınmasını takiben Hacettepe Üniversitesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmanın yöntemsel akış şeması Şekil 3.1'de verilmiştir.

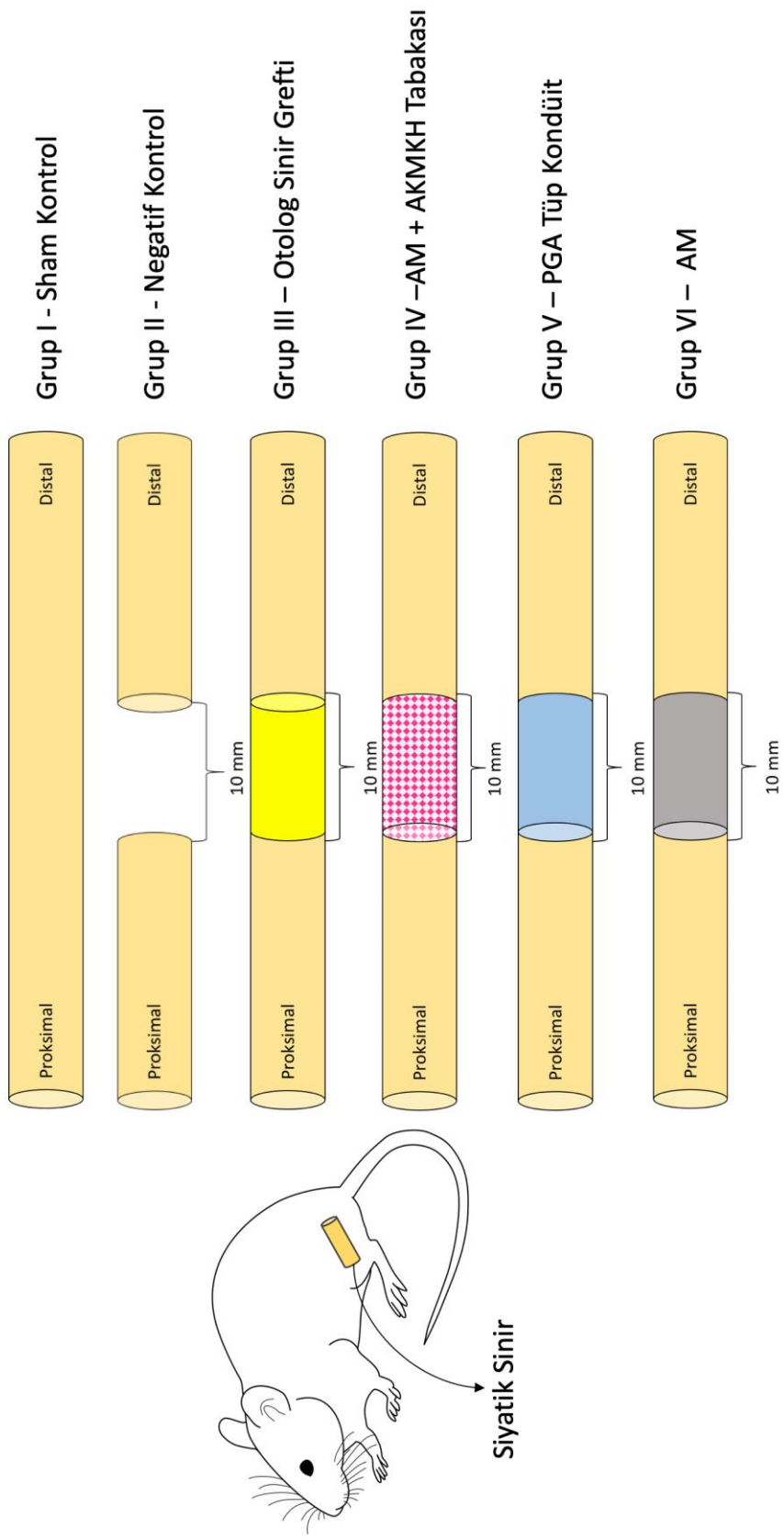
#### 3.1. Deney Grupları

Geliştirilen kondüitin işlevselliğinin belirlenmesi amacıyla deney grupları her grupta 12 hayvan (n=12) olacak şekilde 6 grup olarak belirlendi (Şekil 3.2). Çalışma kapsamında 72 adet yetişkin erkek Wistar sıçan kullanıldı. Olasılık değerinin 0.05'ten küçük olması anlamlı kabul edilerek örneklem büyüklüğü belirlendi.

- Grup 1- Sham kontrol grubu
- Grup 2- Negatif kontrol grubu (siyatik sinir üzerinde defekt oluşturulup herhangi bir tedavi uygulanmayan)
- Grup 3- Otolog sinir grefti kullanılan grup
- Grup 4- Amniyotik membran (AM) ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücre (AKMKH) tabakasından oluşturulmuş kondüit kullanılan grup
- Grup 5- Poliglolikolik asit (PGA) tüp kondüit Neurotube® (Synovis Life Technologies, St. Paul, MN) kullanılan grup (Sentetik ticari kondüit)
- Grup 6- Sadece AM'den oluşturulmuş kondüit kullanılan grup



**Şekil 3.1.** Çalışmanın yöntemsel akış şeması



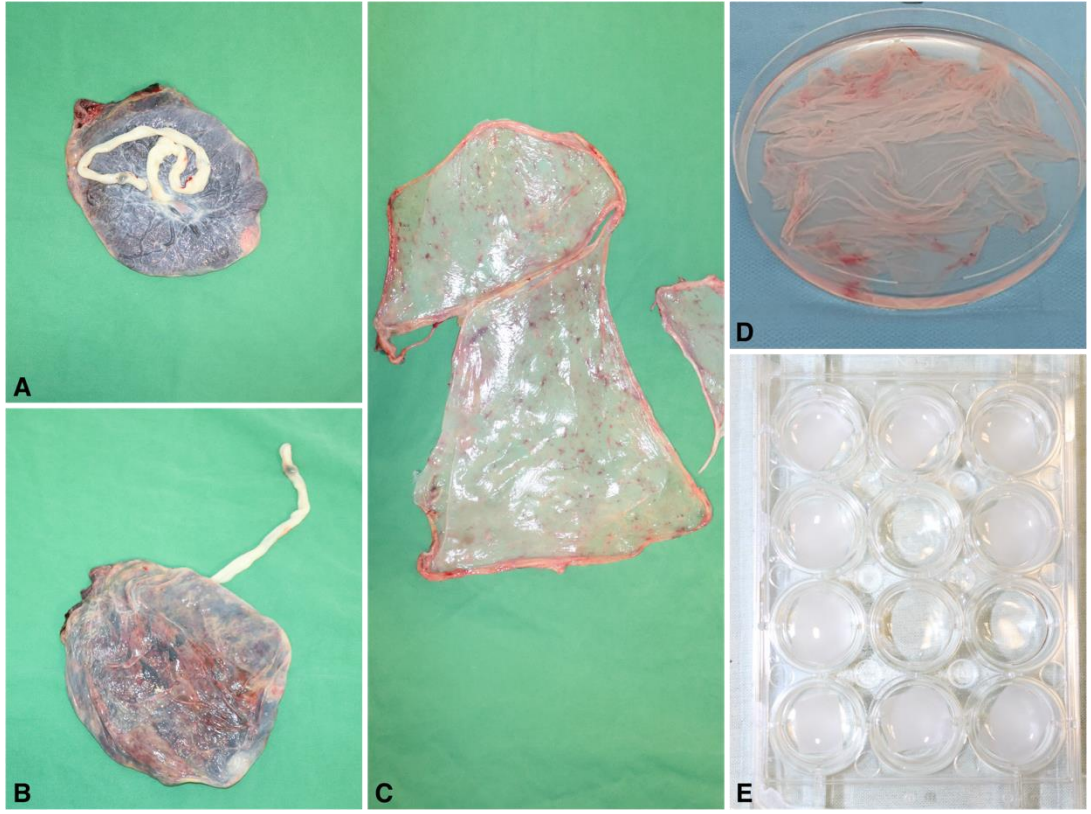
**Şekil 3.2.** Deneç gruplarının şematik gösterimi

### 3.2. Kondüit Tasarımı

Dizayn edilen kondüit dış tarafta amniyotik membran ve içe bakan tarafta adipoz kökenli mezenkimal kök hücre tabakası olmak üzere 2 ana katmandan oluşmaktadır. Adipoz kökenli kök hücre tabakası elde edildikten sonra yüzeyden destek membran yardımıyla kaldırılıp, de-epitelize amniyotik membran üzerine yerleştirilerek birleştirilmiştir. Hücre tabakalarının hücre dışı matris yapısı etkilenmeden elde edilmiş olması tabakanın yüksek adeziv özellikte olmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda hücrelerle birleştirme için amniyotik membranın de-epitelize adeziv bazal membran yüzeyinin kullanılmış olması iki yapının sağlam bir şekilde bir araya getirilmesini kolaylaştırmıştır. Tasarımın detayları aşağıdaki başlıklar altında açıklanmıştır.

#### 3.2.1. Amniyotik Membranların Hazırlanması

Kök hücre tabakasıyla birlikte oluşturulan biyolojik kondüitin AM tabakası donmuş-çözdürülmüş ve epiteli soyulmuş olarak kullanılmıştır. AM'lerin hazırlanma aşamaları Şekil 3.3' te gösterilmiştir. Hepatit (HbsAg, anti-HCV), sifiliz (RPR) ve AIDS (HIV) gibi bulaşıcı hastalıklar açısından seronegatif gebelerden sezaryen sırasında steril şartlarda alınan plasentalardan elde edilen amniyotik membranlar antibiyotikli Dulbecco fosfat tampon çözeltisi (D-PBS) içerisinde laboratuvara nakledilmiştir. Laminar akış altında kan pıhtılarından temizlenen AM'ler 50 µg/mL penisilin, 50 µg/mL streptomisin, 100 µg/mL gentamisin ve 2.5 µg/mL amfoterisin B içeren D-PBS içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. Künt diseksiyon ile koryondan ayrılan AM'ler 3x4 cm boyutlarında kesilmiştir. Ardından, her bir parça steril nitroselüloz kağıt üzerine epitel tarafı yukarıya gelecek şekilde yapıştırılarak, 1:1 oranında DMEM-HAM's F12: gliserol ortamında -80°C dondurucuda saklanmıştır. Kök hücre tabakalarıyla bir araya getirilmeden önce oda sıcaklığında çözdürülen AM'ler %0.25 Tripsin/EDTA içinde 37C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve epitel tabakası hücre kazıyıcı yardımıyla kaldırılmıştır (169).



**Şekil 3.3.** AM'lerin hazırlanması: A-B) Plasenta ve umbilikal kord; C) AM; D) AM'lerin kan pıhtılarından arındırılması; E) De-epitelize AM tabakaları

### 3.2.2. Hücre Tabakalarının Elde Edilmesi

Hücre tabakası eldesinde daha önce izole edilmiş ve karakterizasyonu tamamlanmış AKMKH stokları kullanılmıştır (170). Hücreler, laminar akışlı kabinde (Bioair, Type II Laminar Flow Cabinet) %15 (v/v) fetal sığır serumu (FBS), %1 L-glutamin, %0,2 (v/v) gentamisin, %0,2 (v/v) amfoterisin B ve %0,4 (v/v) P/S içeren  $\alpha$ -MEM kültür ortamında 6 gözlü hücre kültürü kaplarına  $5 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> yoğunluğunda ekilmiştir. Ekimin ikinci günü 100  $\mu$ g/mL L-askorbik asit 2-fosfat (AA2P) (Cayman Chem., USA) uygulanmış ve 4 günün sonunda elde edilen hücre tabakaları D-PBS ile yıkanarak yüzeyden soyularak kaldırılmıştır ve basit pipetleme yöntemi ile yeni 6 gözlü kültür kaplarına aktarılmıştır (171).

### 3.2.3. Biyolojik Kondüiti Hazırlanması

Biyolojik kondüiti hazırlamak için yüzeyden kaldırılıp yeni bir kültür kabına aktarılan hücre tabakalarının üzerine, steril nitroselüloz kağıda epitel tarafı yukarıya gelecek şekilde yerleştirilmiş olan de-epitelize amniyotik membranlar yerleştirilmiş tabakaların membranlara fiziksel olarak tutunması sağlanmıştır. Ardından steril pens yardımı ile kondüit, destek membrandan tutularak hücre tabakası yukarıda olacak şekilde steril bir kültür kabına alınmış, hücre tabakalarının amniyotik membrana tutunmaları için bir gece etüvde kültüre edilmiştir. Tabakanın amniyotik membranlara tutunmasının ardından, hazırlanan kondüit steril bir makas yardımı ile sinir defektinin boyutuna uygun olarak yaklaşık 1 cm boyutlarında olacak şekilde kesilmiştir. Destek membran yardımı ile defektin altına rahatlıkla yerleştirilen kondüit cerrahi işlem ile defekt bölgesine yerleştirilmiştir.

### 3.2.4. Kök Hücre Tabakasının 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) İşaretlenmesi

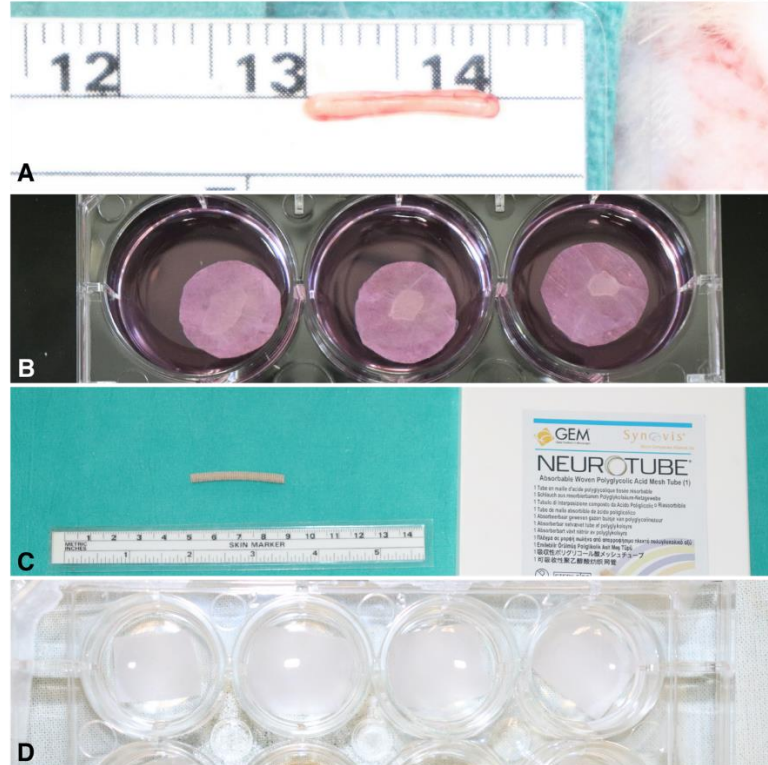
Biyolojik kondüit yapısında yer alan hücre tabakasındaki AKMKH varlığının transplantasyon sonrasında izlenmesi için AKMKH'ler kültürün üçüncü gününde 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) (1mM BrdU in 1X Dulbecco's PBS, BD Pharmingen, San Jose, CA) antikoruna ile işaretlenmiştir. Kültür ortamı ile 1/30 oranında seyreltilen BrdU stok çözeltisi, 0.22 µm filtreden geçirilerek steril hale getirilmiş ve her bir göze 1250 µL olacak şekilde eklenmiştir. Üç saatlik inkübasyon (37°C) süresinin ardından BrdU içeren hücre kültür ortamı gözlerden çekilmiş ve hücre tabakaları D-PBS ile yıkanmıştır.

### 3.2.5. Biyolojik Kondüiti SEM ile Görüntülenmesi

Hücre tabakaları D-PBS ile 2 kez yıkanmış ve %2,5 (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile 30 dakika fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, örnekler 3 kez PBS ile yıkanmış ve analiz gününe kadar 4°C'de %1 P/S içeren PBS ortamında muhafaza edilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Tescan, GAIA 3) analizinden 1 gün önce örnekler etanol serisinden (%10, %30, %50, %70, %90 ve %100, v/v) geçirilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve 5 dakika heksametildisilazan (HMDS) muamelesi yapılan örnekler 1 gece boyunca çeker ocakta kurutulmuştur. Görüntüleme öncesi örnekler altın-palladyum ile kaplanmıştır.

### 3.2.6. Biyolojik Kondüitin F-aktin/Çekirdek Boyaması

AM üzerindeki kök hücre tabakasını oluşturan hücrelerin morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla biyolojik kondütler immün boyama yapılarak floresan mikroskop (Olympus, ABD) ile görüntülenmiştir. Öncelikle biyolojik kondütlerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılıp 2 kez D-PBS ile yıkanmıştır. Kök hücre tabakasını oluşturan hücrelerin fiksasyonu için örnekler %4'lük (w/v) soğuk paraformaldehit çözeltisi ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından, 3 kez D-PBS ile yıkanan örneklerin üzerine hücre membran geçirgenliği arttırmak amacıyla %0,1 (v/v) TritonX-100 çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Biyolojik kondütler 3 kez daha %10 Sığır Serum Albümini (BSA) (w/v) içeren PBS (PBSA) ile yıkandıktan sonra hücre iskeletini boyamak için her bir göze Alexa Fluor 488 Phalloidin (1:100) ve hücre çekirdeğini boyamak için 4,6-diamidinde-2'-phenylindole (DAPI) (1:1000) çözeltisi eklenerek 30 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Görüntüleme öncesi biyolojik kondütler 3 kez daha PBS-A ile yıkanmış ve floresan mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir.

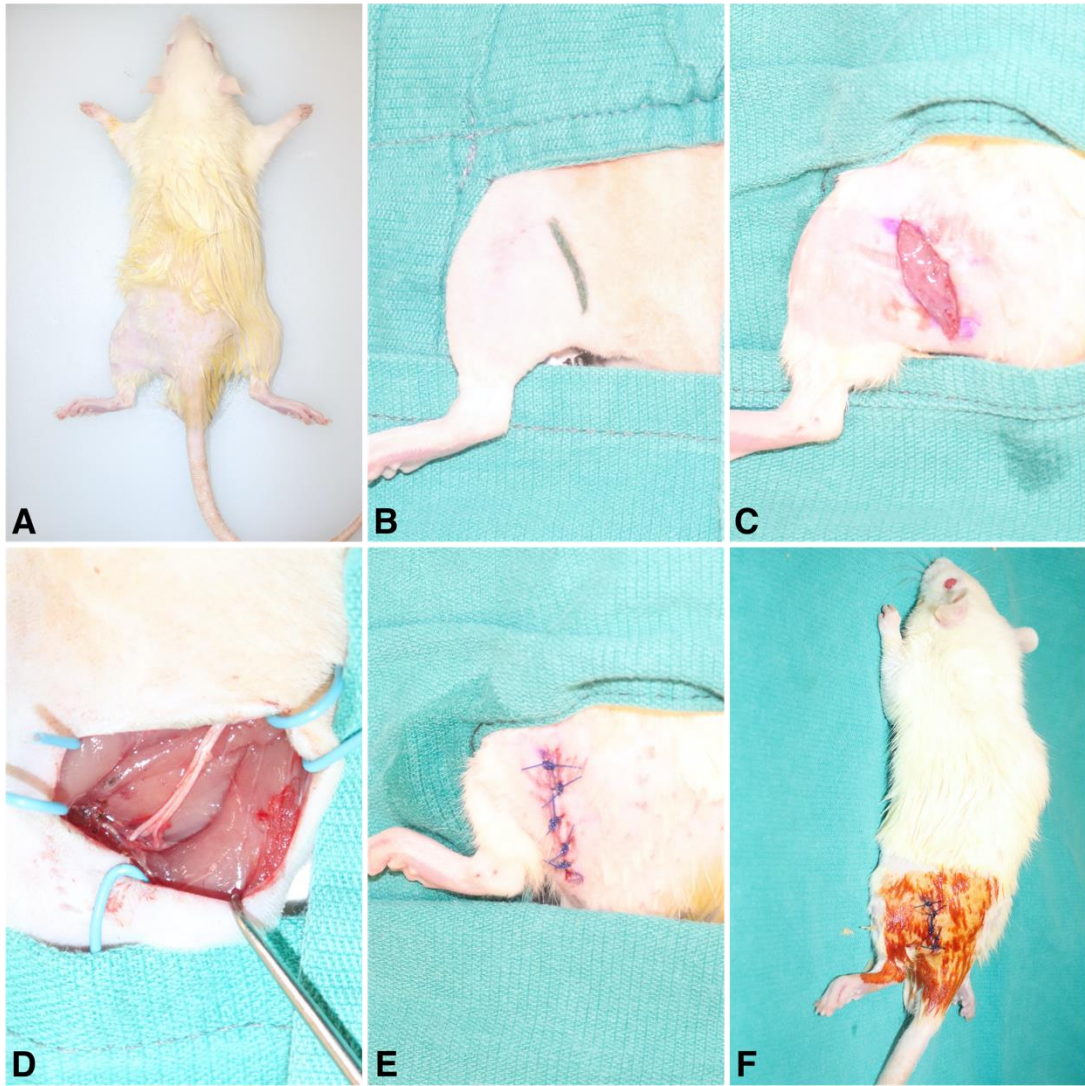


**Şekil 3.4.** Sinir onarımında kullanılan sinir grefti ve kodüt materyalleri: A) Sinir grefti; B) De-epitelize AM ve üzerinde AKMKH tabakası; C) PGA tüp kondüt; D) De-epitelize AM tabakaları

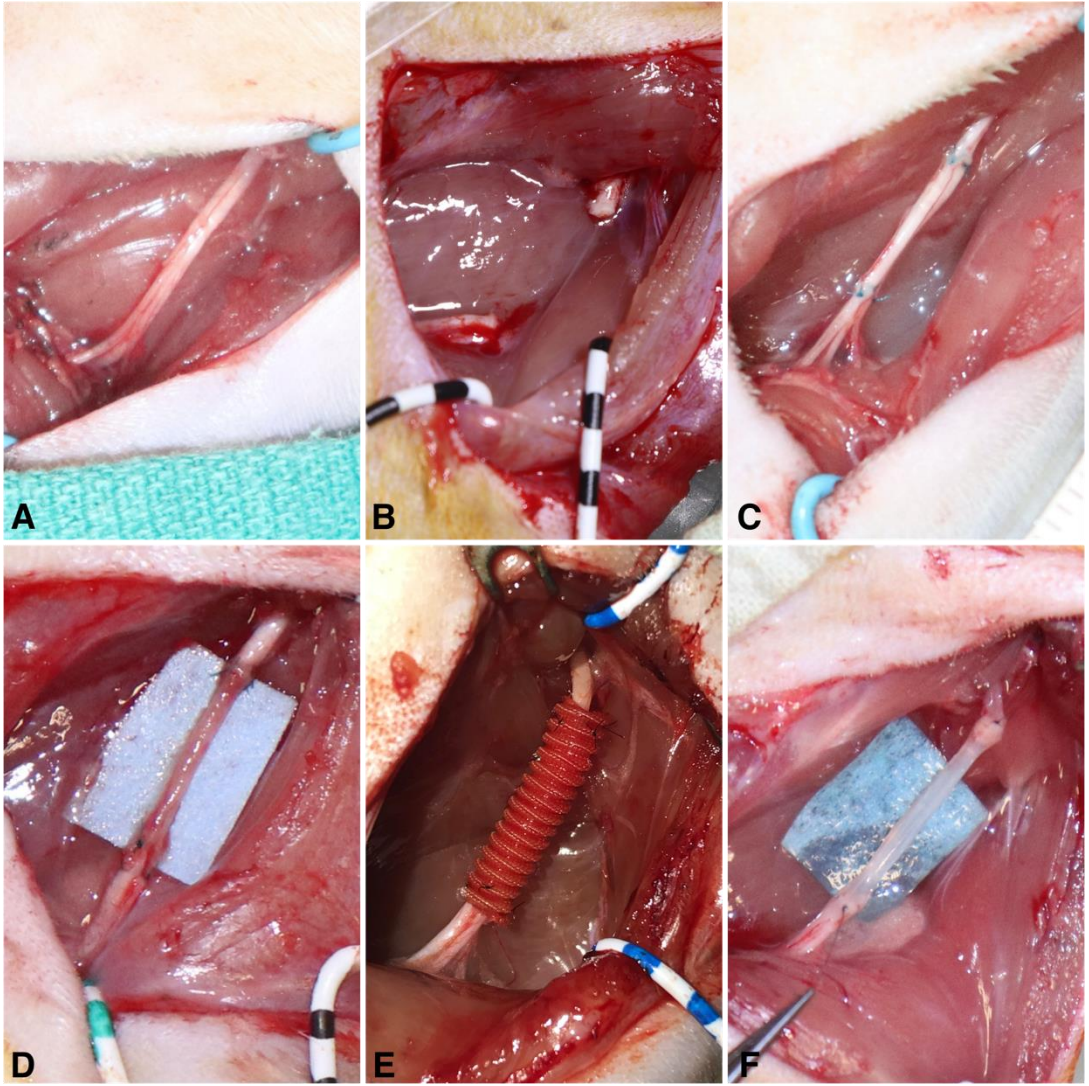
### 3.3. Cerrahi işlem

Sıçanlar oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda, ad-libitum olarak beslendi. Hayvanların anestezisi ksilazin 10 mg/kg ve ketamin 90 mg/kg intraperitoneal yol ile sağlandı. Tüm gruplarda cerrahi prosedürler sıçanların sol arka uzuvlarına uygulandı, sağ arka uzva herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı ve kontrol amacıyla kullanıldı. Anestezi ve antisepsi tamamlandıktan sonra dorsal transgluteal insizyon ve mikrocerrahi diseksiyon ile siyatik sinire ulaşıldı (Şekil 3.5), (172). Sham kontrol grubunda sıçanların sol siyatik siniri görülüp tekrardan cilt onarımı yapıldı, yani siyatik sinire herhangi bir işlem yapılmadı. Negatif kontrol grubunda siyatik sinir üzerinde, bu hayvan cinsi için kritik boyut olarak kabul edilen, 1 cm defekt olacak şekilde düzgün cerrahi kesiler yapılarak sinir doku eksize edildi ve herhangi bir tedavi uygulanmadı. Grup 3' te sıçanların siyatik siniri görülüp siyatik sinirde 1 cm'lik defekt düzgün cerrahi kesi ile oluşturulduktan sonra sinir grefti kullanılarak onarım sağlandı. Defekt oluşturmak için eksize edilen 1 cm'lik sinir greft olarak kullanıldı. Grup 4' te siyatik sinirde düzgün cerrahi kesi ile 1 cm'lik defekt oluşturulduktan sonra AM ve AKMKH tabakasından oluşturulmuş kondüit kullanılarak onarım yapıldı. Düz bir tabaka şeklinde elde edilen iki katmanlı yapı *in vivo* transplantasyon sırasında sinir defektinin iki ucunuda kapsayacak şekilde sarıldı ve sinir iyileşmesi sırasında biyolojik bir kılavuz görevi görmesi planlandı. Grup 5' te siyatik sinirde düzgün cerrahi kesi ile 1 cm'lik defekt oluşturulduktan sonra PGA tüp kondüit kullanılarak onarım sağlandı. Grup 6' da siyatik sinirde düzgün cerrahi kesi ile 1 cm'lik defekt oluşturulduktan sonra sadece AM kullanılarak oluşturulmuş kondüit ile onarım sağlandı. Siyatik sinir ve cilt onarımları sonrasında sıçanlara günlük uygun bakım yapıldı (Şekil 3.5), (173). Sinir onarımında kullanılan sinir grefti ve kodüit materyalleri Şekil 3.4.'te; deney gruplarında siyatik sinir ve sinir onarımlarının makroskobik görüntüleri Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.





**Şekil 3.5.** Sıçanlarda, siyatik sinir mikrodiseksiyonu aşamaları: A) Sıçanların operasyona hazırlanması; B) İnsizyon hattının belirlenmesi; C) Dorsal transgluteal insizyon; D) Siyatik sinir; E) Cilt katlarının sütüre edilmesi; F) Yara bakımı



**Şekil 3.6.** Deney gruplarında siyatik sinir ve sinir onarımlarının makroskopik görüntüleri: A) Normal sinir; B) Sinir defekti; C) Otolog sinir grefti ile sinir onarımı; D) AM ve AKMKH tabakasından oluşturulan kondüit ile sinir onarımı; E) PGA kondüit ile sinir onarımı; F) Sadece AM ile sinir onarımı

### 3.4. Fonksiyonel Değerlendirme

Sıçanların elektrofizyolojik ölçümleri intraperitoneal ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) anestezisi altında gerçekleştirildi (Şekil 3.7).

### 3.4.1. Bileşik Kas Aksiyon Potansiyelleri (Compound Muscle Action Potentials) (CMAPs)

Sıçanlar derin anestezi altında iken hem sağ hem sol bacaklarından en az on kez uyarı verilip elektromiyografik ölçümler alındı. Uyaran şiddeti 12 mV olarak belirlendi. Uyarı elektrodu olarak HSTM01 elektrodu, kayıt için ise Biopac EL254S ve EL254 elektrotları kullanıldı. Bu elektrotlardan biri aktif, diğeri referans ve üçüncü elektrot ise toprak elektrodu olarak kullanıldı. Sıçanlar anestezi altında iken ölçüm yapılacak bölge tıraşlanıp alkolle temizlendi. Sıçanların yüzeye direkt temasının önlenmesi ve sıcaklığın sabit tutulması amacıyla altlarına ısıtıcı ped (30-35 °C) yerleştirildi. Kayıt için gastroknemius kasının orta bölgesine aktif elektrot, tendon bölgesine referans elektrot ve kuyruğa da toprak elektrodu yerleştirildi. Uyarı elektrodu lumbal 3-4 omurları arasına gelecek şekilde yerleştirildi ve 1 Hz frekanslı 0,1 ms süreli olarak verilen uyarı sonrasında elde edilen yanıtlar Biopac (MP36) studentlab pro yazılım programı kullanılarak kayıt edildi (Şekil 3.8.). Analizler için ise en iyi 5 kayıt seçilerek hesaplamalar yapıldı. Bu kayıt sistemine aktarılan verilerden; latans, tepeden tepeye genlik, eğim ve genlik değerlendirildi (Şekil 3.9), (174). Ayrıca tepeden tepeye genlik indeksi (amplitude index), eğim indeksi (slope Index) ve genlik indeksi formül 3.1.'e göre hesaplandı. İndeks hesaplamada kullanılan formülde E, deneysel uzuv verisi; N, normal uzuv verisini ifade etmektedir. Sıfır ile -100 arası elde edilen değerlerde, değerler negatif yönde ilerledikçe fonksiyon kaybına işaret etmektedir. Elde edilen veriler, gruplar arasındaki istatistiksel fark açısından değerlendirildi (175).

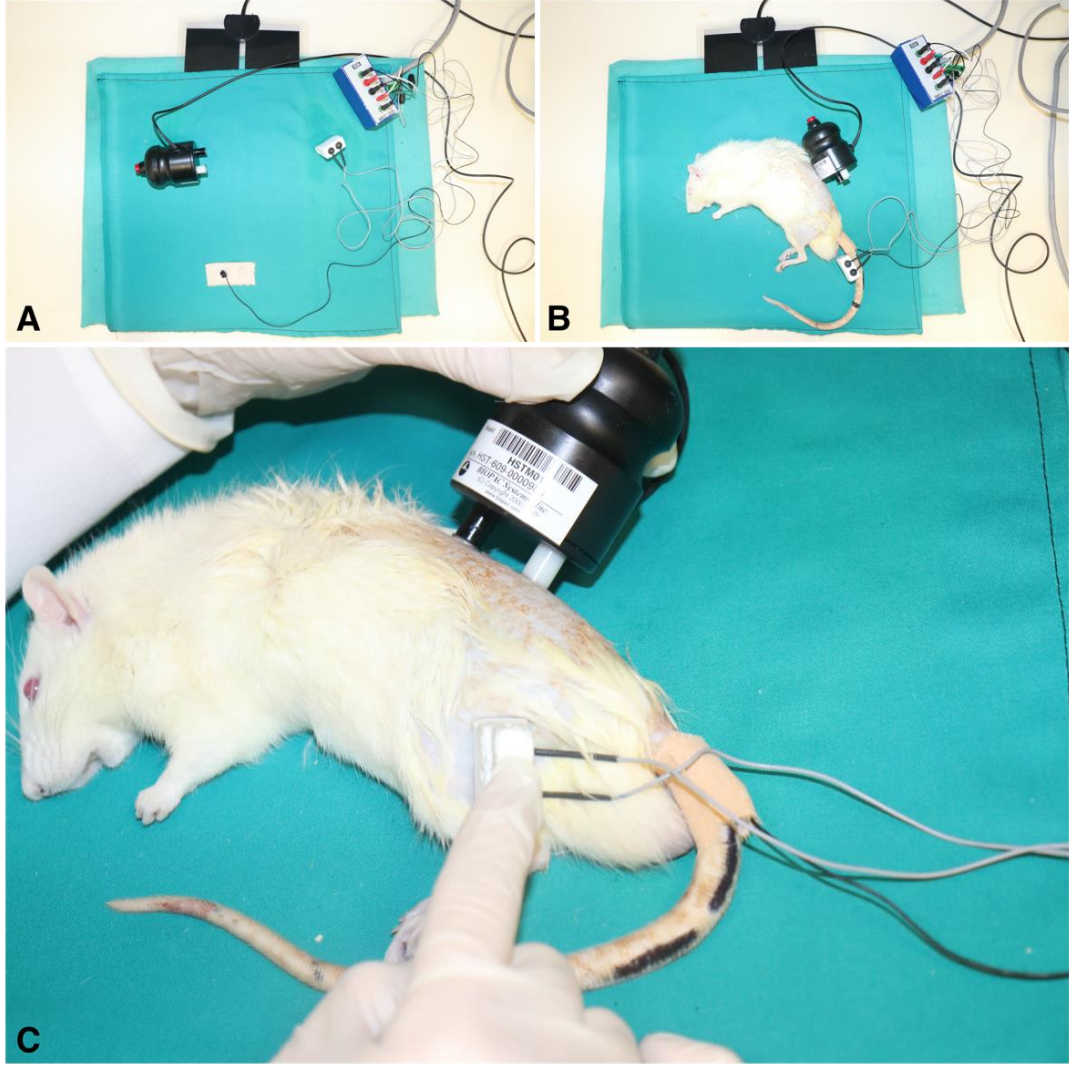
$$(E-N) / N \times 100 \quad (3.1.)$$

**Latans (Latency):** Elektriksel uyarı ile bileşik kas aksiyon potansiyeli arasındaki zaman farkı

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

**Eğim (Slope):** Bileşik kas aksiyon potansiyelindeki birim zamandaki voltaj değışikliği

**Genlik:** Bileşik kas aksiyon potansiyelindeki maksimum pozitif değer ile izoelektrik hat arasındaki voltaj farkı



**Şekil 3.7.** Non-invaziv elektromiyografi: A) Kurulum düzeneği, elektrotlar ve ısıtıcı ped; B) Anestezi altındaki sıçanın düzeneğe yerleştirilmesi; C) Non-invaziv elektromiyografik ölçüm

### 3.4.2. İğne Batırma (Pin-Prick) Testi

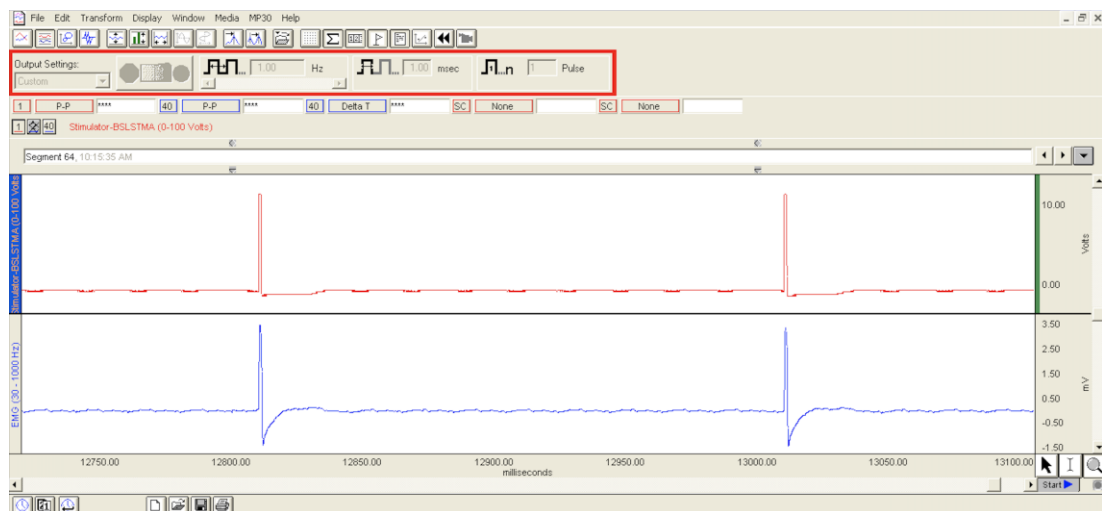
Duyusal (sensory) iyileşmenin değerlendirilmesi için uygulandı. Sıçanın derisi ayak parmaklarından başlayarak dize kadar sıkıldı ve 0-3 arası skorlandı; hiç hareket yoksa 0, diz seviyesinin üstünde geri çekme 1, diz ile ayak bileği arasında geri çekme 2, ayak bileğinin altında geri çekme 3 olarak skorlandı (176).

### 3.4.3. Parmak Ayırma (Toe-Spread) Testi

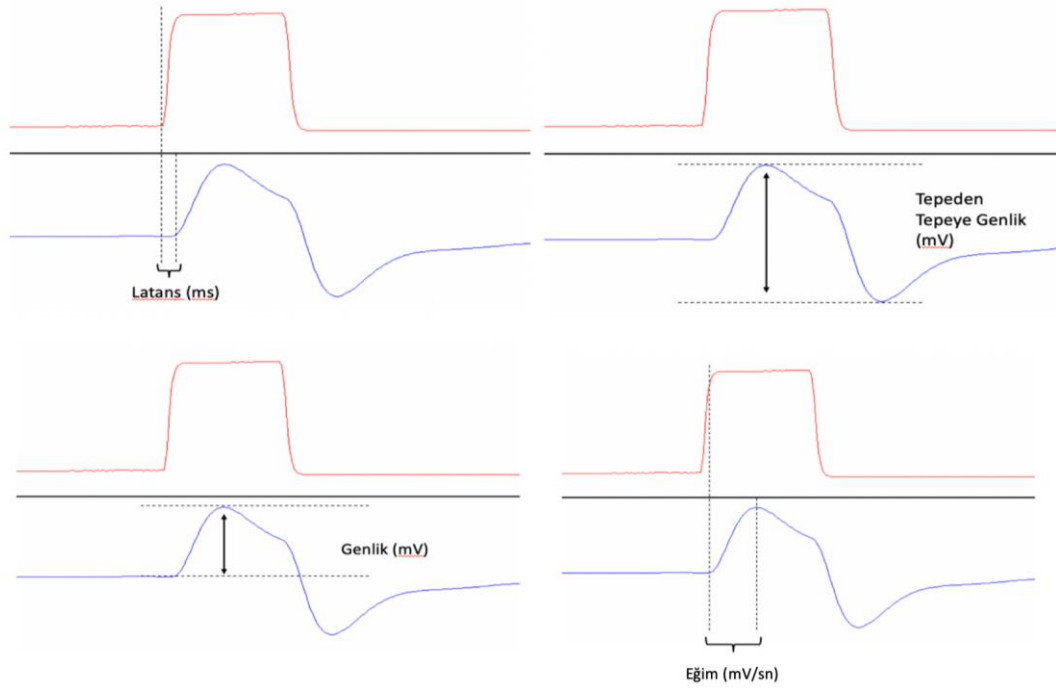
Motor işlevin değerlendirmesi için kullanıldı. Sıçan kuyruğundan tutulduğunda spontan ayak hareketleri değerlendirildi ve 0-2 arası skorlandı: tam ayak parmağı ekstansiyonu ve abduksiyonu 2, abduksiyonu veya ekstansiyon 1, hiç hareket yoksa 0 olarak skorlandı.

### 3.4.4. Gastrokinemius Kas İndeksi

16. haftanın sonunda tüm sıçanların bilateral gastroknemius kasları çıkarılarak ıslak kas ağırlıkları dijital hassas laboratuvar terazisi ile tartıldı. Kas indeksi, opere olan tarafın kas ağırlığı kontralateral taraf kas ağırlığına bölünerek hesaplandı (173).



Şekil 3.8. Bileşik kas aksiyon potansiyeli kayıt örneği

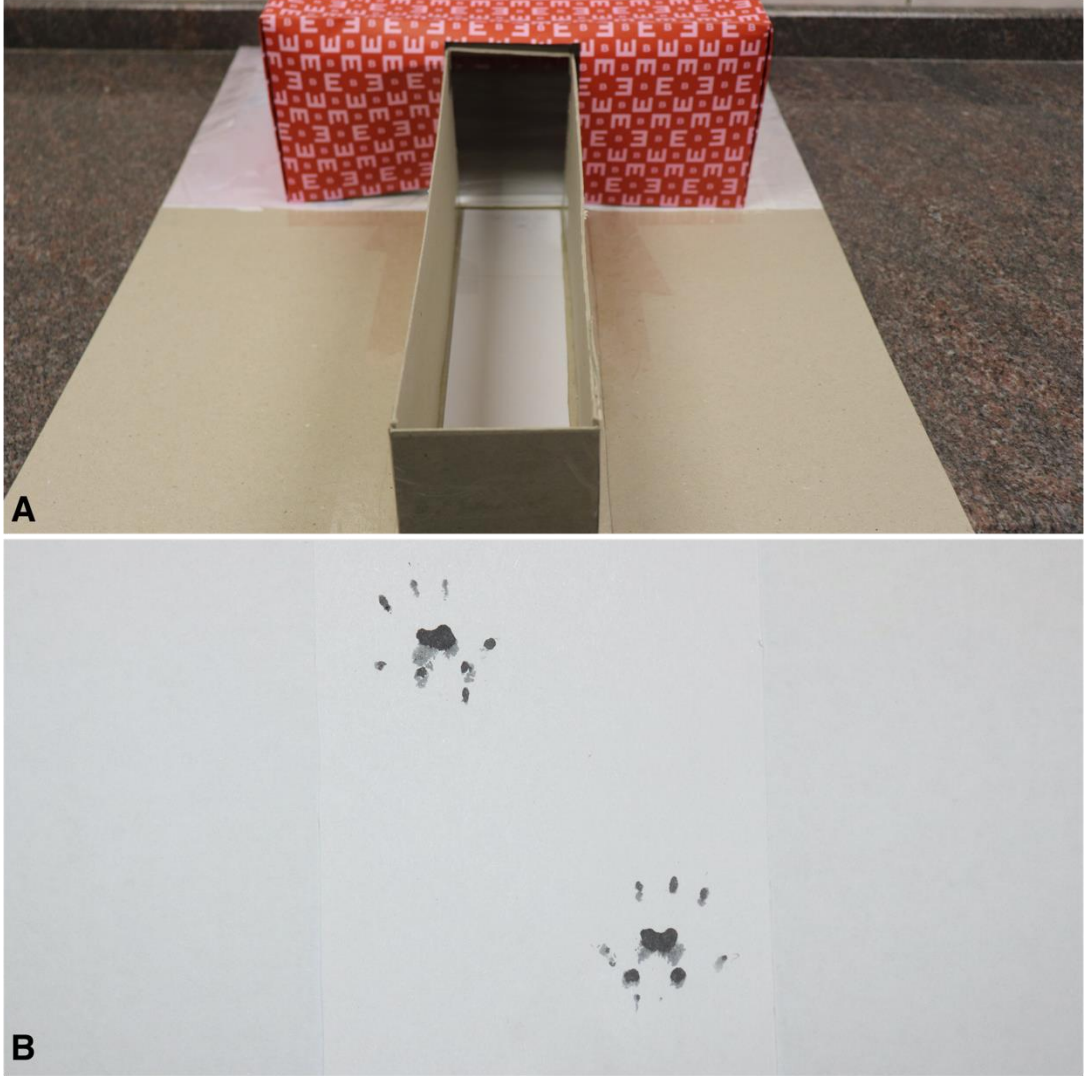


**Şekil 3.9.** Elektrofizyolojik parametreler

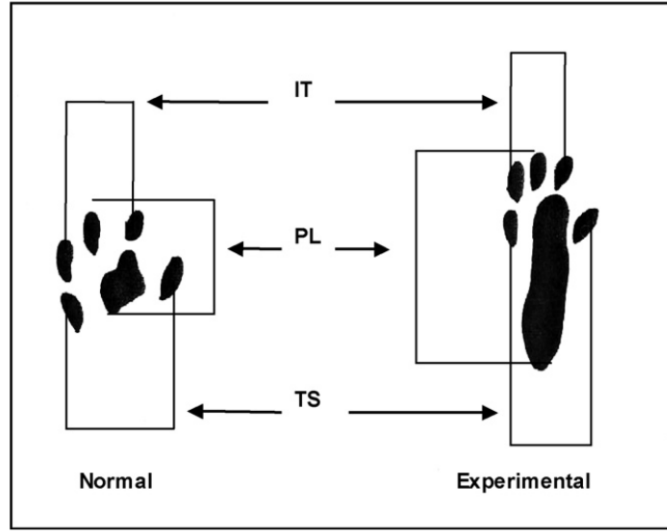
### 3.4.5. Yürüyüş Yolu Analizi ve Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ)

Motor fonksiyon değerlendirmesi için kullanıldı. Sıçanların aynı doğrultuda yürümelerini sağlamak için 8 cm eninde 40 cm uzunluğunda 12 cm yüksekliğinde sonu karanlık oda ile biten bir yürüyüş yolu düzeneği hazırlandı (Şekil 3.10), (177). Yürüyüş yolu analizi yapılan yürüme kulvarı içine kulvar ile aynı boyutta kesilerek hazırlanan beyaz dosya kağıtları yerleştirildi, sıçanların her iki arka ayakları mürekkep emdirilmiş ıstampaya bastırıldı ve hazırlanan kulvarda yürütülerek ayak izleri alındı. Kayıtlar alınmadan önce hayvanlar birkaç kez yürüyüş yolunda eğitim amaçlı yürütüldü ve hayvanlar net bir şekilde kapalı barınağa doğru yürümeyi öğrendikten sonra ayak izleri alındı. Kağıt şeritlerdeki en uygun ayak izleri kullanılarak, topuk ve 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 (Şekil 3.11). Ölçümler ile elde edilen değerler De Medinacelli tarafından geliştirilen ve daha sonra Bain ve ark. (178) tarafından modifiye edilen formül 3.2.'ye yerleştirilerek SFİ hesaplandı. Sıfır ile -100 arası elde edilen değerlerde,

sıfır normal fonksiyonu gösterirken, -100 tam fonksiyon kaybına işaret etmektedir. Elde edilen SFİ değerlerinde gruplar arası fark olup olmadığı istatistiksel olarak araştırıldı.



**Şekil 3.10.** SFİ hesaplamaları için kullanılan: A) Yürüyüş yolu düzeneği; B) Kağıt şerit üzerinde sıçanların ayak izi



**Şekil 3.11.** SFİ hesaplaması için ayak izlerinde bakılan parametreler (179)

$$SFİ = -38.3 \frac{(EPL-NPL)}{NPL} + 109.5 \frac{(ETS-NTS)}{NTS} + 13.3 \frac{(EIT-NIT)}{NIT} - 8.8 \quad (3.2.)$$

### 3.5. Histolojik Değerlendirme

#### 3.5.1. Işık Mikroskopik Yöntem

Deney gruplarına ait periferik sinir ve gastrokinemius kas dokuları ışık mikroskopik inceleme için %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edilerek tespit işlemi sonrasında 24 saat akarsuda yıkandı. Rutin histolojik takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklar elde edildi ve parafin bloklardan mikrotom ile (Leica SM 2000, Germany) rodajlı ve polilizinli lamalar üzerine 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

#### Hematoksilen-Eosin (H-E) Boyama Protokolü

Rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafin bloklardan elde edilen 4 µm kalınlığındaki longitudinal ve transvers periferik sinir kesitleri, deparafinizasyon işlemi için 37°C'lik etüvde bir gece bırakıldıktan sonra deparafinizasyonun devamında etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat bekletildi. Kesitler daha sonra 3 kez 20'şer dakika ksilolde bekletilerek deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Rehidratasyon işlemi için



azalan etil alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70 ve %50) 10'ar dakika tutulan kesitler, havada kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, 10 dakika akan musluk suyu ile yıkanıp alkolden uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi sonrasında 10 dakika Harris Hematoksilen boya solüsyonunda tutulan kesitler daha sonra akan musluk suyu altında 10 dakika daha yıkandı. Glasiyel asetik asit ile alkol karışımı olan solüsyona 2-3 kez batırılıp çıkarılarak akan musluk suyu altında tekrar 10 dakika yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 10 dakika Eosin boya solüsyonunda bekletilerek, tekrar 10 dakika akan musluk suyu ile yıkamanın ardından dehidratasyon işlemi için sırasıyla %50, %70, %80, %90 ve %100'lük artan etil alkol serilerinden hızlıca geçirildi. 45 dakika ksilolde bekletilip lamlar kapama mediumu ile kapatıldı. Hazırlanan kesitlerden Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda elde edilen görüntüler, Leica LAS V4.9 programında değerlendirildi.

### **Masson Trichrome Boyama Protokolü**

Deney gruplarına ait gastrokinemius kas dokusu bloklarından alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon işlemi için, 37 °C'lik etüvde bir gece kaldıktan sonra deparafinizasyonun devamında etüv ısı 57 °C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. Kesitler daha sonra, 2 kez 5'er dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sonlandırıldı. Ardından 2 kez 3 dakika %100'lük etil alkolden geçirildikten sonra sırasıyla %90, %80, %70 ve %50 azalan etil alkol serilerinden geçirildi ve akan musluk suyunda yıkanarak boyamaya hazır hale getirildi. Kesitlere Masson Trichrome boyama kiti (Kod: RRSK20-100, Atom Scientific, United Kingdom) uygulandı. Weigert'in Demirli Hematoksilen solüsyonu ile 20 dakika çekirdek boyaması yapıldı. Suda hızlıca yıkanarak, %1'lik asit alkol solüsyonunda farklılaştırılarak, tekrar yıkamaya alındı. Ponceau Fuchsin solüsyonunda 5 dakika boyama yapıldı ve ardından distile suda ile yıkandı. Fosfotungustik asit solüsyonu ile 15 dakika mordantlaştırılan kesitler ardından % 2,5'lik asetik asit - % 2'lik Metil Blue Solüsyonu ile 5 dakika boyandı. Suda yıkama işleminin ardından kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilole alındı ve kapama mediumu ile kapatıldı. Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda elde edilen görüntüler, Leica LAS V4.9 programında değerlendirildi.

Gastrokinemius kas dokusuna ait kesitlerden x200 büyütmede alınan görüntülerden rastgele seçilen 10 alanda kollajen lif alan yüzdesi ImageJ software (National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak hesaplandı (180).

### **Luxol Fast Blue Boya Protokolü**

Deney gruplarına ait transvers periferik sinir kesitlerine Luxol Fast Blue Boya kiti uygulandı (Kod: RRSK345-100, Atom Scientific, United Kingdom). Kesitler deparafinizasyon işleminin ardından %95'lik alkole alındı ve yıkama işlemi olmadan 60 °C'de Luxol Fast Blue solüsyonu ile 2 saat boyama işlemi gerçekleştirildi. %70 alkol ve ardından musluk suyunda yıkandı. Lityum karbonat solüsyonuna etkin bırakıldı ve tekrar musluk suyu ile yıkamaya alındı. 10-12 dakika Cresyl Violet solüsyonu ile boyama yapıldı. Tekrar musluk suyu ile yıkandıktan sonra, Cresyl Violet farklılaştırıcısı ile 4-8 saniye farklılaştırıldı. Dehidrasyon işleminin ardından ksilolde bekletilerek kapama mediumu ile kapatıldı.

Boyama sonrasında miyelinizasyon, Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda, Leica LAS V4.9 programında değerlendirildi. Gruplar arası bölümlere ait ortalama miyelinli akson sayısı x 40'lık objektif kullanılarak rastgele seçilen üç alanda ImageJ software (National Institutes of Health, USA) programında sayılarak gerçekleştirildi (181).

### **3.5.2. İmmünohistokimyasal Analiz**

İmmünohistokimyasal analizler için periferik sinirlere ait parafin bloklardan polilizinli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, deparafinizasyon işleminin ardından azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %80 ve %70) geçirildi. Dehidrate edilen dokular alkolden uzaklaştırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirilerek, sitrat tamponu (Thermo, UK) (pH 6.0) ile yüksek ısıda retrieval işlemi uygulandı. Dokular oda ısısında 20 dakika soğutulduktan sonra, 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Ardından dokuların çevresi Pap pen (Patolab) ile sınırlandırıldı. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Thermo, AP-9009-10, UK) (pH:7.4) ile yıkandı. Daha sonra, 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Thermo, TA-125-HP, UK) etkin bırakıldı.

İşlem sonrasında PBS ile lamlar yıkandı ve immünohistokimyasal yöntemle Ultra Vision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) (Thermo, TP-125-HP, UK) kiti kullanılarak devam edildi. Yıkanan lamlara 5 dakika UltraV block uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkandıktan direkt primer antikor aşamasına geçildi. Kesitler uygun dilüsyonda S100 (1:100, Thermo, MS-296-P1, UK), NF-H (1:200, Bioss, bs-0708R) ve CD-68 (1:300, Bioss, bs-0649R) primer antikorları ile gece boyunca + 4 °C'de inkübe edildi. Bu uygulamadan sonra lamlar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından 10 dakika biotinli sekonder antikor uygulanarak, tekrar PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Dokular 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakıldı ve işlem sonrasında 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Diaminobenzedin (DAB) substratı içeren kromojen DAB (Thermo, TA-125-HD, UK) ile gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer'in Hematoksilen'i (Thermo, TA-125-MH, UK) kullanıldı. DAB ile boyanan lamlar azalan alkol serilerinden geçirildi. 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatılan kesitlerin immünohistokimyasal analizlerin görüntülenmesi Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda ve Leica LAS V4.9 (Germany) programında gerçekleştirildi.

Deney gruplarına ait periferik sinirlerde S100, NF-H ve CD-68 antikorlarına ait immunohistokimyasal analizler ImageJ programı (Java-based software program, National Institutes of Health) ile S100 ve NF-H immün pozitif alan yüzdesi ölçülerek, CD-68 pozitif hücre sayımı yapılarak değerlendirildi (182).

### **BrdU İmmünboyama Yöntemi**

Periferik sinirlere ait kesitlerde deparafinizasyon işleminin ardından BrdU pozitif hücreler işaretlemek için BrdU *In-Situ* Detection Kit (BD Pharmingen™) kullanıldı. Deparafinizasyonun ardından BD™ Retrieval A solüsyonu ile antijen retrieval işlemi gerçekleştirildi. Kesitler 5 dakika 3'er kez PBS'de yıkandıktan, daha sonra anti-BrdU antikorunu ile 1 saat inkübe edildi. Üç kez 2'şer dk PBS'de yıkanan kesitler, Streptavidin-HRP ile 40 dakika inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra DAB ile muamele edilen dokular su ile yıkamaya alındı. Hematoksilen ile 30-60 saniye

arasında boyandıktan sonra tekrar yıkanıp dehidrasyonun ardından ksilolde bekletildi. Daha sonra kapama mediumu ile kapatıldı. Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda ve Leica LAS V4.9 (Germany) programında görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.

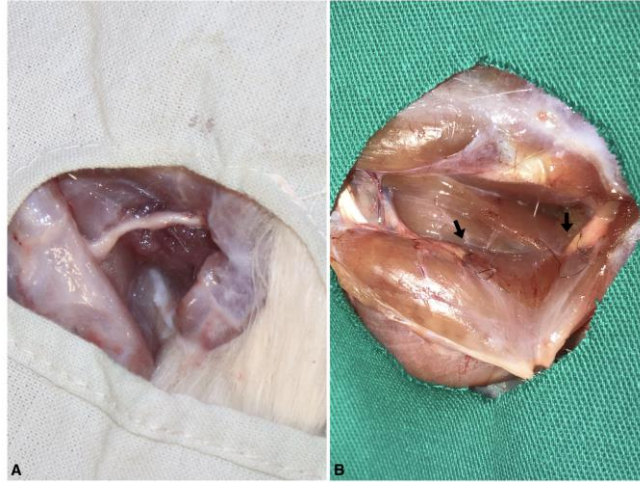
### 3.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analiz ve hesaplamalar IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp, NA, USA) programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede  $p < 0.05$  değeri anlamlı farklılık olarak kabul edildi. Tanımlayıcı istatistikler; normal dağılıma sahip sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma, normal dağılıma sahip olmayan sürekli değişkenler ortanca, 25.-75 persentiller ve kategorik değişkenler içinse sıklıklar, yüzde olarak ifade edilmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi, histogram, kutu-çizgi ve Q-Q grafikte değerlendirildi. İki'den fazla bağımsız grup için normal dağılım ve varyans homojenliği varsayımları sağlandığında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Tukey HSD ikişerli karşılaştırmaları ile; normal dağılım sağlandığı, varyans homojenliği sağlanmadığı durumunda Welch ANOVA Dunnet T3 ikişerli karşılaştırmaları ile; varsayımlar sağlanmadığında ise Kruskal-Wallis varyans analizi Dunn-Bonferonni ikişerli karşılaştırmaları ile ele alınmıştır. Grupların ölçümlerinin zaman içindeki değişimini karşılaştırabilmek için iki yönlü tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanılmıştır. Ordinal değişkenlerin zaman içindeki değişimi Friedman testi ile incelenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Genel Değerlendirme Bulguları

Tedavi sonrası takip sürecinde farklı haftalarda; grup 2'den 2 sıçan, grup 4'ten 1 sıçan, grup 5'den 2 sıçan, grup 6'dan 4 sıçan ölüm sonucu çalışma dışı kaldı ve değerlendirmeye 63 sıçan dahil edildi. Grup 2, 3, 4, 5 ve 6'da cerrahi işlem sonrasında tüm sıçanların sol arka uzuvlarında paralizisi gözlemlendi ve bazı sıçanların ayak bilekleri ve dizlerinde kontraktür gelişimi izlendi. Gruplara göre değişmekle beraber farklı dönemlerde paralizilerde kısmi düzelme olduğu görüldü. Grup 2, 5 ve 6'da bakım sürecinde bazı sıçanların birbirine saldırdıkları ve stresleri oldukları gözlemlendi. Bu gruplardaki sıçanların bazılarında otokanibalizasyon sonucu; uzuvlarının bir kısmı eksik, bir kısmında ise şiddetli enfeksiyon bulunmaktaydı. Bu sıçanlara yürüyüş analizi ve sfi, iğne batırma testi (pin-prick), parmak ayırma testi (toe spread) uygulanmadı ve elektrofizyolojik incelemeye alınmadılar. Cerrahi sonrası 16. haftanın sonunda sıçanlar sakrifiye edildi ve her iki arka uzuv siyatik sinir ve gastroknemius kasları histolojik inceleme için alındı. Dikkat çeken bir diğer nokta, PGA tüp kondüit uygulanan grupta sinir spesmenlerinin alınması için siyatik sinir ortaya konduğunda bir kısım sıçanda, sinir defektinde rejenerasyonun makroskobik olarak gerçekleşmediği görüldü (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** 16 haftanın sonunda histolojik inceleme için siyatik sinirin eksize edilmeden önceki görünümü: A) Pozitif kontrol grubu, normal siyatik sinirin görünümü; B) PGA tüp kondüit ile sinir onarımı yapılan grup, nöral rejenerasyonun gerçekleşmediği dikkat çekmektedir (Siyah oklar proksimal ve distal sinir ucunu göstermektedir).

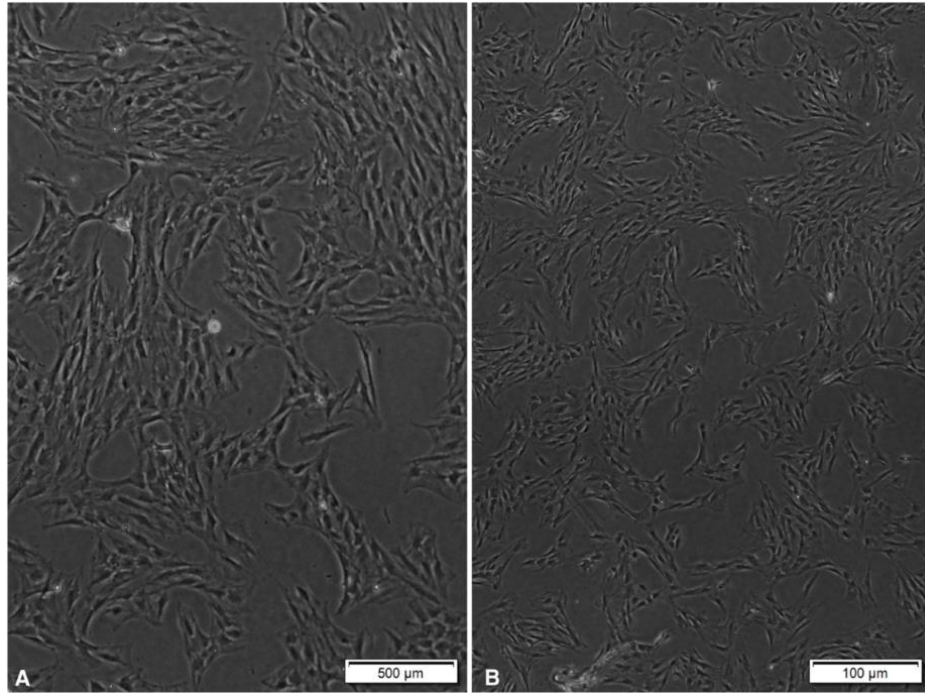
## 4.2. AM ve AKMKH Tabakasından Oluşturulan Biyolojik Kondüitin İncelenmesi

### 4.2.1. AKMKH Işık Mikroskobu Değerlendirilmesi

AKMKH'lerin tabaka haline getirilmeden önceki ışık mikroskobu fotoğrafları Şekil 4.2'de verilmiştir. Işık mikroskobu incelemesinde kök hücre morfolojilerinin sağlıklı kök hücre görünümüleriyle uyumlu olduğu görülmektedir.

### 4.2.2. Biyolojik Kondüitin SEM ile Görüntülenmesi

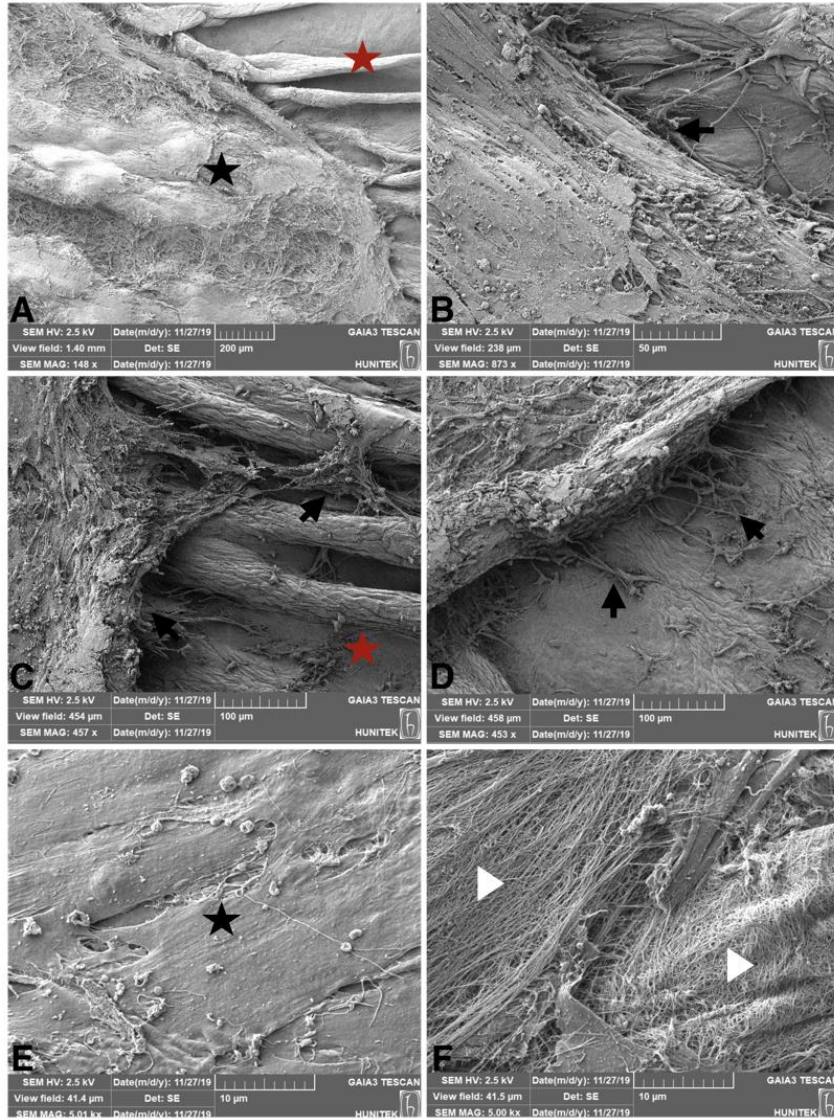
AKMKH tabakası ve AM'den oluşturulan kondüitin morfolojisinin incelenmesi için, tabakaların birleştirilmesinden sonra SEM görüntüleri alınmıştır ve fotoğrafları Şekil 4.3'te verilmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde; düşük büyütmelerde hücre tabakası ve AM yapısı, daha yüksek büyütme görüntülerde ise hücre tabakasının AM'ye tutunma bölgeleri ve hücre tabakasındaki ekstrasellüler matriks artışı görülmektedir.



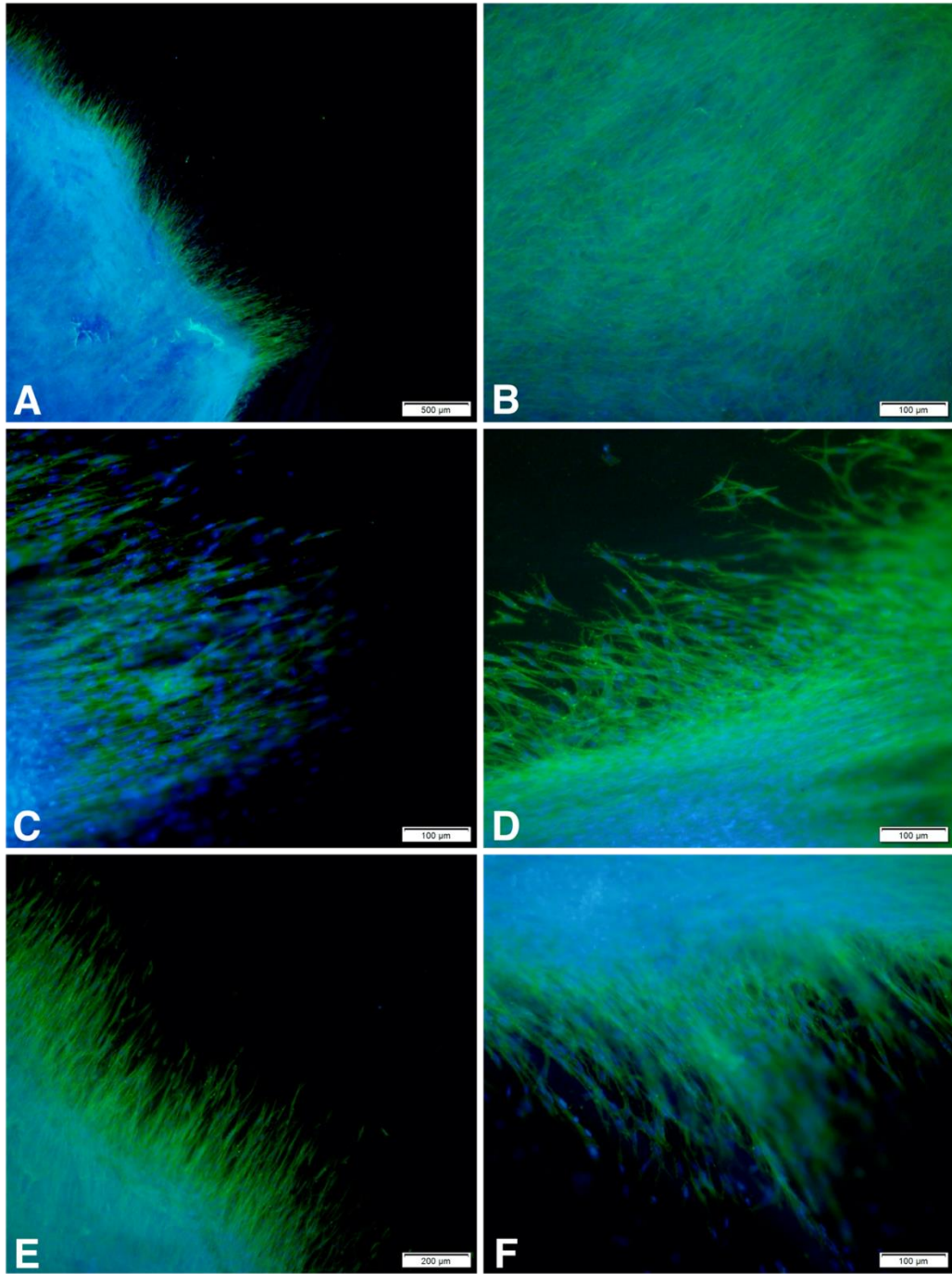
Şekil 4.2. AKMKH'lerin ışık mikroskobu fotoğrafları: A) 4 X, bar 500 µm; B) 20 X, bar 100 µm

### 4.2.3. Biyolojik Kondüitin F-aktin/Çekirdek Boyaması

AM üzerindeki kök hücre tabakasını oluşturan hücrelerin morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla biyolojik kondüitler immün boyama yapılarak floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. İmmünofloresan boyama fotoğrafları Şekil 4.4'te verilmiştir. Hücre iskeletindeki aktin filamentleri yeşil, çekirdekler ise mavi renge boyanmıştır. Boyama fotoğraflarında AKMKH tabakasının tamamen AM yüzeyine tutunduğu görülmektedir.



**Şekil 4.3.** AKMKH tabakası ve AM' den oluşturulan kondüite ait SEM fotoğrafları: A) AKMKH tabakası (siyah yıldız) ve AM (kırmızı yıldız); B-C-D) AKMKH tabakasının AM'ye tutunma bölgeleri (siyah ok); E) AKMKH tabakası (siyah yıldız); F) Ekstrasellüler matrikteki artış gösterilmiştir (beyaz üçgen)



**Şekil 4.4.** AKMKH tabakası ve AM'den oluşturulan kondüitin immüno Floresan boyama sonrası floresan mikroskop fotoğrafları. Hücre çekirdekleri mavi, F-aktin filamentleri ise yeşil renkte boyanmıştır: A) AKMKH tabakasının tamamen AM yüzeyine tutunduğu gösterilmeye çalışılmıştır; B) AKMKH tabakasının merkezindeki immüno Floresan boyama; C-D-E-F) AKMKH tabaka kenarlarının, AM yüzeyi ile tutunma immüno Floresan boyaması. (A, 40 X, bar 500 µm; B, C, D, F, 20 X, bar 100 µm; E, 10 X, bar 200 µm)



### 4.3. Fonksiyonel Değerlendirme

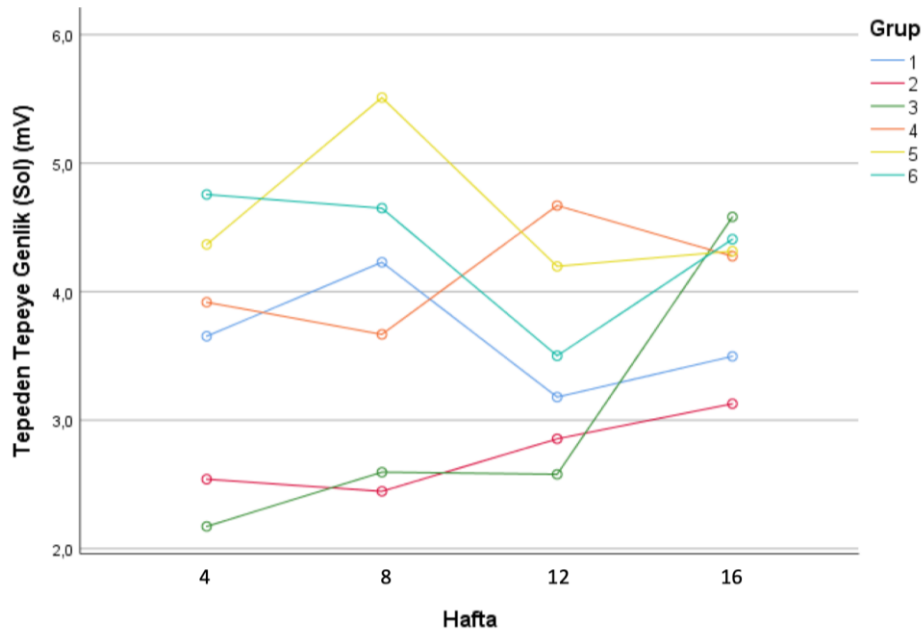
#### 4.3.1. Bileşik Kas Aksiyon Potansiyelleri (Compound Muscle Action Potentials) (CMAPs)

Tüm grupların 4 haftada bir bileşik kas aksiyon potansiyelleri ölçüldü. Aksiyon potansiyeli üzerinden; latans, tepeden tepeye genlik, eğim ve genlik değerleri incelendi. Ayrıca tepeden tepeye genlik indeksi (amplitude index), eğim indeksi (slope Index) ve genlik indeksi hesaplandı.

#### Latans (Latency)

İzoelektrik hattaki parazitlenme sebebiyle bir kısım latans verileri doğru toplanamamıştır, bu nedenle latans istatistiki değerlendirmeye alınmamıştır.

#### Tepeden Tepeye Genlik (Amplitüde)



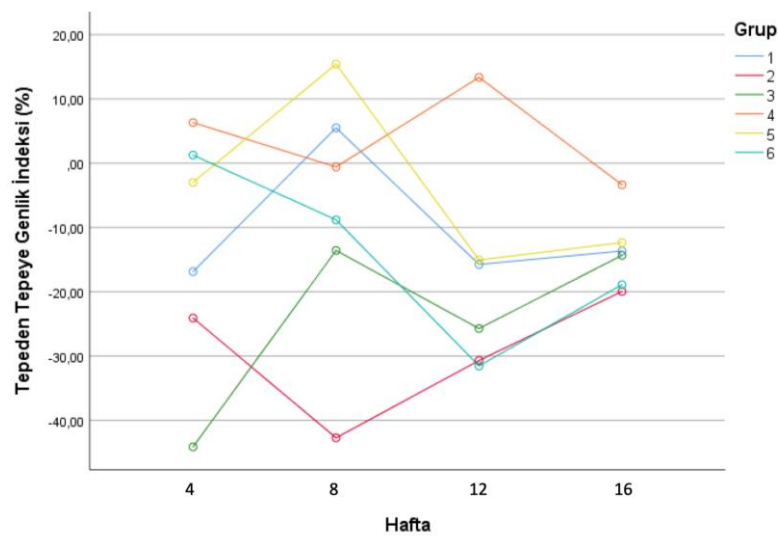
Şekil 4.5. Gruplara ait tepeden tepeye genlik (sol uzuv) zaman değişim grafiği

Grupların zaman içindeki deneysel uzuv (sol) tepeden tepeye genlik değişimleri değerlendirildiğinde (Şekil 4.5, Tablo 4.1); Grup 1, grup 2'den yüksekti, grup 5'den anlamlı olarak düşüktü ( $p < 0.05$ ). Grup 2, grup 4, 5 ve 6'dan anlamlı olarak düşüktü ( $p < 0.001$ ). Grup 3, grup 4, 5 ve 6'dan anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla;  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı ilişki yoktu.

**Tablo 4.1.** Gruplara ait tepeden tepeye genlik (sol) tanımlayıcı verileri

		<b>Tepeden Tepeye Genlik <math>\pm</math> Standart Sapma</b>			
		<b>4. Hafta</b>	<b>8. Hafta</b>	<b>12. Hafta</b>	<b>16. Hafta</b>
<b>Grup</b>	<b>1</b>	3,65 $\pm$ 1,17	4,23 $\pm$ 1,03	3,18 $\pm$ 0,61	3,50 $\pm$ 1,44
	<b>2</b>	2,54 $\pm$ 0,95	2,45 $\pm$ 0,71	2,85 $\pm$ 0,99	3,13 $\pm$ 1,15
	<b>3</b>	2,17 $\pm$ 0,59	2,59 $\pm$ 1,31	2,58 $\pm$ 0,64	4,58 $\pm$ 1,06
	<b>4</b>	3,92 $\pm$ 1,48	3,67 $\pm$ 1,69	4,67 $\pm$ 0,88	4,28 $\pm$ 0,89
	<b>5</b>	4,37 $\pm$ 1,66	5,51 $\pm$ 1,51	4,20 $\pm$ 1,08	4,31 $\pm$ 0,56
	<b>6</b>	4,76 $\pm$ 1,70	4,65 $\pm$ 1,01	3,50 $\pm$ 0,54	4,41 $\pm$ 1,11

### Tepeden Tepeye Genlik İndeksi (Amplitüde İndex)

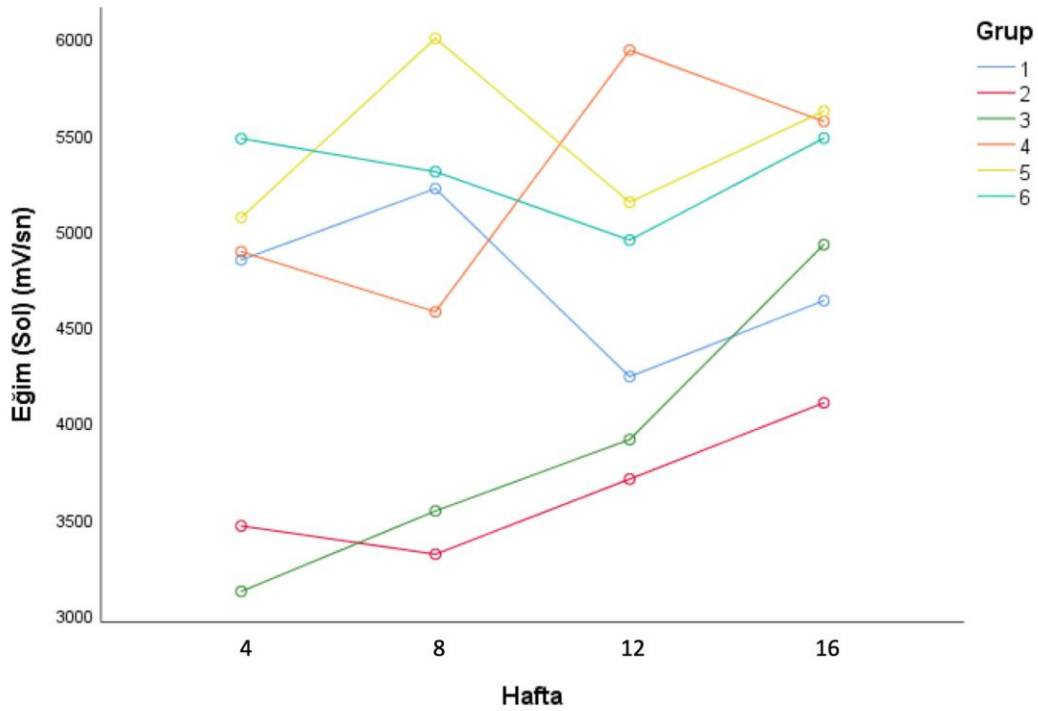
**Şekil 4.6.** Gruplara ait tepeden tepeye genlik indeksi zaman değişim grafiği

Grupların zaman içindeki tepeden tepeye genlik indeksi değişimleri değerlendirildiğinde (Şekil 4.6, Tablo 4.2); grup 2, grup 4 ve 5'ten anlamlı olarak daha düşüktü (sırasıyla;  $p < 0.001$ ,  $p = 0.008$ ). Grup 3, grup 4 ve 5'ten anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla;  $p = 0.003$ ,  $p < 0.05$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı ilişki yoktu.

**Tablo 4.2.** Gruplara ait tepeden tepeye genlik indeksi tanımlayıcı verileri

		<b>Tepeden Tepeye Genlik İndeksi <math>\pm</math> Standart Sapma</b>			
		<b>4. Hafta</b>	<b>8. Hafta</b>	<b>12. Hafta</b>	<b>16. Hafta</b>
<b>Grup</b>	<b>1</b>	-16,87 $\pm$ 28,98	5,50 $\pm$ 22,10	-15,75 $\pm$ 17,54	-13,66 $\pm$ 15,88
	<b>2</b>	-24,08 $\pm$ 23,88	-42,72 $\pm$ 15,60	-30,69 $\pm$ 15,14	-19,95 $\pm$ 32,19
	<b>3</b>	-44,13 $\pm$ 18,16	-13,57 $\pm$ 33,45	-25,71 $\pm$ 14,14	-14,33 $\pm$ 20,12
	<b>4</b>	6,32 $\pm$ 33,31	-0,58 $\pm$ 22,71	13,36 $\pm$ 30,33	-3,36 $\pm$ 22,90
	<b>5</b>	-2,98 $\pm$ 41,34	15,43 $\pm$ 38,91	-15,05 $\pm$ 23,98	-12,34 $\pm$ 13,79
	<b>6</b>	1,26 $\pm$ 16,98	-8,81 $\pm$ 19,53	31,54 $\pm$ 10,50	-18,89 $\pm$ 25,59

### Eğim (Slope)



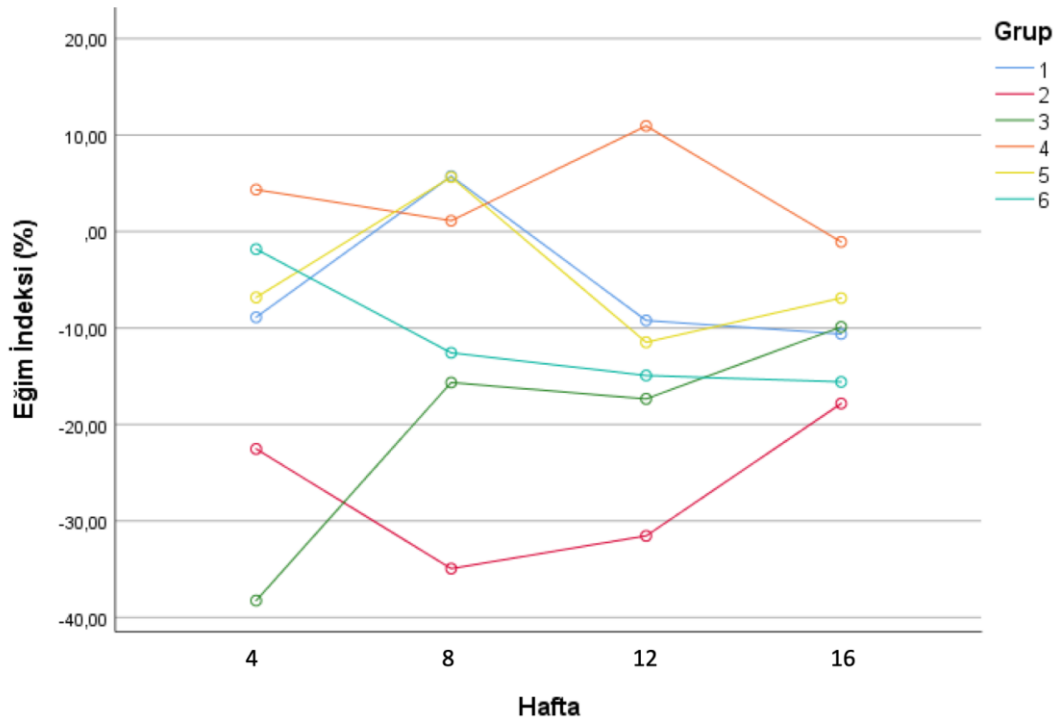
Şekil 4.7. Gruplara ait eğim (sol) zaman değişim grafiği

Grupların zaman içindeki deneysel uzuv (sol) eğim değişimleri değerlendirildiğinde (Şekil 4.7, Tablo 4.3); grup 1, grup 2 anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.05$ ). Grup 2, grup 4,5 ve 6'dan anlamlı olarak düşüktü ( $p < 0.001$ ). Grup 3, grup 4,5 ve 6'dan anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla;  $p = 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı ilişki yoktu.

Tablo 4.3. Gruplara ait eğim (sol) tanımlayıcı verileri

		Eğim ± Standart Sapma			
		4. Hafta	8. Hafta	12. Hafta	16. Hafta
Grup	1	4845,6 ± 1281,27	5217,17 ± 1083,43	4238,11 ± 759,94	4634,06 ± 1250,67
	2	3461,49 ± 1237,87	3314,11 ± 710,27	3705,05 ± 1324,74	4101,92 ± 1336,56
	3	3120,51 ± 929,68	3538,88 ± 1253,93	3910,83 ± 754,47	4925,33 ± 1569,41
	4	4888,29 ± 1148,93	4575,71 ± 1365,69	5937,46 ± 949,95	5566,71 ± 1108,68
	5	5066,74 ± 1286,29	5998,97 ± 1140,63	5146,23 ± 1012,57	5620,03 ± 474,45
	6	5477,17 ± 1216,72	5305,05 ± 1127,41	4948,93 ± 434,39	5479,57 ± 534,55

### Eğim İndeksi (Slope Index)

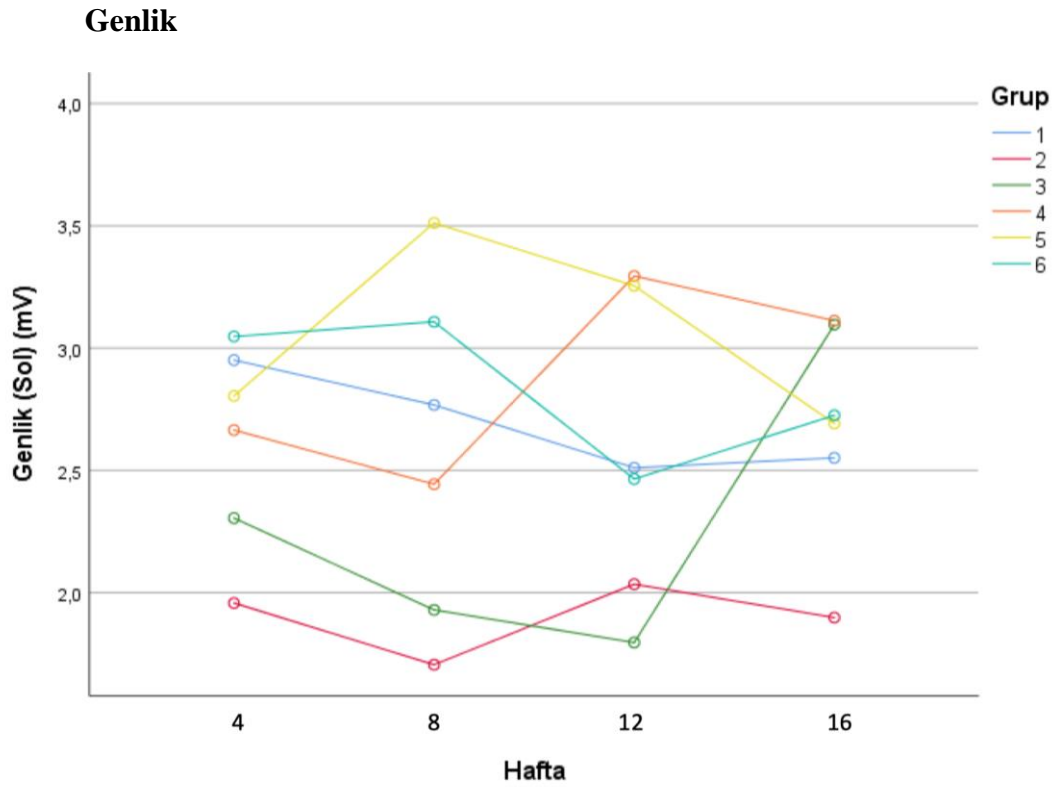


Şekil 4.8. Gruplara ait eğim indeksi zaman değişim grafiği

Grupların zaman içindeki eğim indeksi değişimleri değerlendirildiğinde (Şekil 4.8, Tablo 4.4); grup 2, grup 1, 4 ve 5'den anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla;  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ). Grup 4, grup 3'ten anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.01$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı ilişki yoktu.

Tablo 4.4. Gruplara ait eğim indeksi tanımlayıcı verileri

		Eğim İndeksi ± Standart Sapma			
		4. Hafta	8. Hafta	12. Hafta	16. Hafta
Grup	1	-8,89±14,18	5,75±20,26	-9,22±20,60	-10,62±13,15
	2	-22,54±17,86	-34,94±16,71	-31,54±12,68	-17,83±32,18
	3	-38,26±24,56	-15,66±20,14	-17,35±15	-9,88±20,48
	4	4,34±24,76	1,12±13,04	10,94±22,70	-1,07±17,022
	5	-6,83±26,29	5,64±22,02	-11,49±16,51	-6,90±9,52
	6	-1,83±9,51	-12,57±20,45	-14,93±13,12	-15,59±11,90



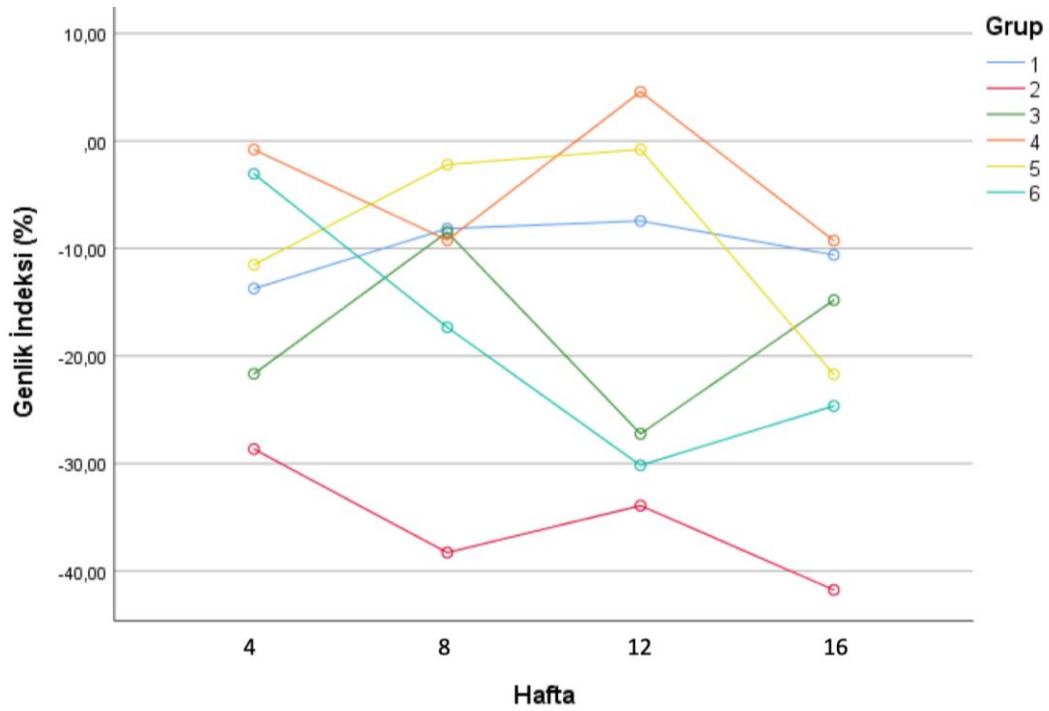
**Şekil 4.9.** Gruplara ait genlik (sol) zaman değişim grafiği

Grupların zaman içindeki deneysel uzuv (sol) genlik değişimleri değerlendirildiğinde (Şekil 4.9, Tablo 4.5); grup 2, grup 1, 4, 5 ve 6'dan anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla;  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ ). Grup 5, grup 3'de anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.01$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı ilişki yoktu.

**Tablo 4.5.** Gruplara ait genlik (sol) tanımlayıcı verileri

		<b>Genlik <math>\pm</math> Standart Sapma</b>			
		<b>4. Hafta</b>	<b>8. Hafta</b>	<b>12. Hafta</b>	<b>16. Hafta</b>
<b>Grup</b>	<b>1</b>	2,95 $\pm$ 1,02	2,76 $\pm$ 0,72	2,51 $\pm$ 0,76	2,55 $\pm$ 1,22
	<b>2</b>	1,96 $\pm$ 1,02	1,7 $\pm$ 0,49	2,03 $\pm$ 0,75	1,9 $\pm$ 0,73
	<b>3</b>	2,3 $\pm$ 1,04	1,93 $\pm$ 0,85	1,8 $\pm$ 0,33	3,1 $\pm$ 0,70
	<b>4</b>	2,66 $\pm$ 0,80	2,44 $\pm$ 0,74	3,29 $\pm$ 0,38	3,11 $\pm$ 0,42
	<b>5</b>	2,8 $\pm$ 0,87	3,51 $\pm$ 0,88	3,25 $\pm$ 0,92	2,69 $\pm$ 0,29
	<b>6</b>	3,04 $\pm$ 0,91	3,1 $\pm$ 0,70	2,47 $\pm$ 0,84	2,72 $\pm$ 0,78

### Genlik İndeksi



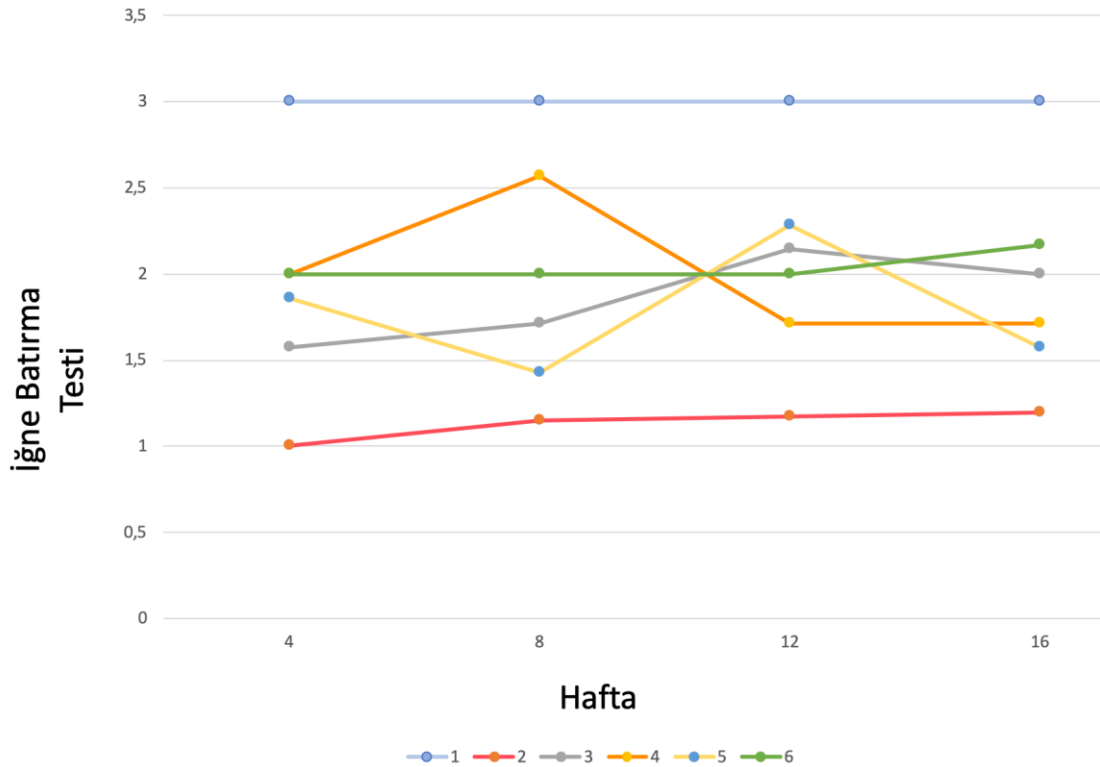
Şekil 4.10. Gruplara ait genlik indeksi zaman değişim grafiği

Grupların zaman içindeki genlik indeksi değişimleri değerlendirildiğinde (Şekil 4.10, Tablo 4.6); grup 2 anlamlı olarak en düşük gruptu (sırasıyla;  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı ilişki yoktu.

Tablo 4.6. Gruplara ait genlik indeksi tanımlayıcı verileri

Genlik İndeksi $\pm$ Standart Sapma				
	4. Hafta	8. Hafta	12. Hafta	16. Hafta
<b>Grup</b>				
1	-13,74 $\pm$ 22,46	-8,16 $\pm$ 16,47	-7,44 $\pm$ 15,71	-10,61 $\pm$ 18,99
2	-28,66 $\pm$ 19,15	-38,29 $\pm$ 23,44	-33,92 $\pm$ 15,18	-41,76 $\pm$ 12,63
3	-21,66 $\pm$ 18,52	-8,48 $\pm$ 24,04	-27,24 $\pm$ 15,13	-14,81 $\pm$ 13,21
4	-,81 $\pm$ 19,20	-9,22 $\pm$ 20,46	4,57 $\pm$ 21,87	-9,27 $\pm$ 5,46
5	-11,51 $\pm$ 31,46	-2,21 $\pm$ 22,97	-0,80 $\pm$ 25,19	-21,71 $\pm$ 13,96
6	-3,06 $\pm$ 13,48	-17,34 $\pm$ 14,19	-30,17 $\pm$ 15,79	-24,65 $\pm$ 16,74

### 4.3.2. İğne Batırma (Pin-Prick) Testi



**Şekil 4.11.** Gruplara ait iğne batırma (pin-prick) testi sonuçları zaman grafiği

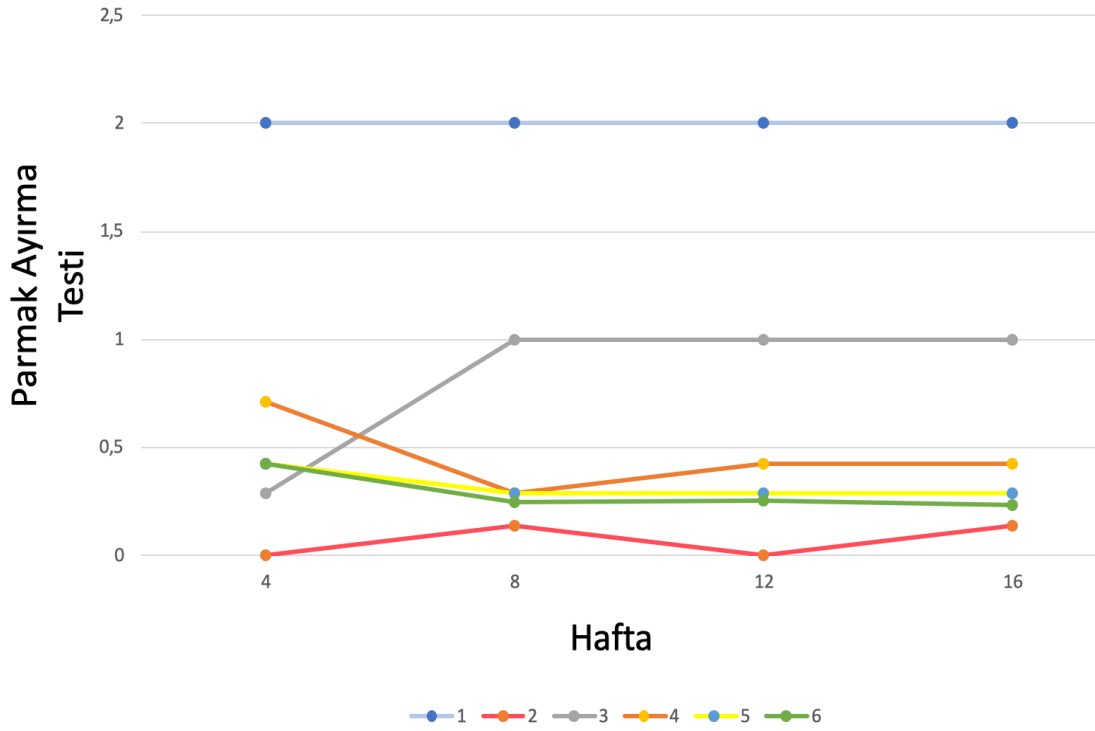
Tüm gruplarda 4 haftada bir iğne batırma (pin-prick) testi yapıldı. 4. hafta pin-prick testinde; grup 1, grup 2 ve 3'ten anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p < 0.001$  ve  $p < 0.05$ ).

8. hafta pin-prick testinde; grup 1, grup 4 hariç diğer gruplardan anlamlı olarak yüksekti. Grup 4 ise yükselişte olup, grup 2,3 ve 5'ten anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ).

12. haftada grup 1, grup 2 ve 4'ten anlamlı olarak yüksekti, diğer gruplar arasında anlamlı ilişki yoktu (sırasıyla;  $p < 0.001$  ve  $p < 0.01$ ).

16. haftada grup 1, grup 2, 4 ve 5 ten anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p < 0.001$ ,  $p = 0.01$ ,  $p < 0.01$ ). Gruplara ait iğne batırma (pin-prick) testi sonuçları zaman grafiği Şekil 4.11'de verilmiştir.

### 4.3.3. Parmak Ayırma (Toe-Spread) Testi

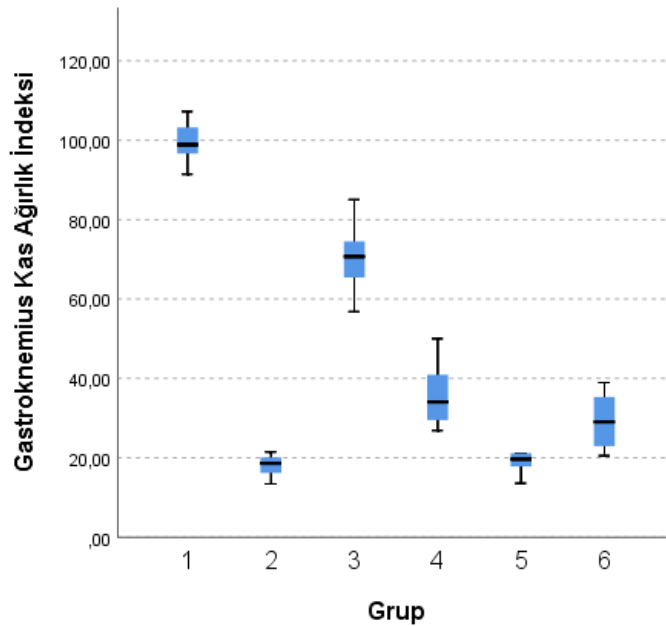


Şekil 4.12. Gruplara ait parmak ayırma (toe-spread) testi sonuçları zaman grafiği

Tüm gruplarda 4 haftada bir parmak ayırma (toe-spread) testi yapıldı. 4. haftada grup 1 tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. 8, 12, 16. haftalarda grup 1, grup 3 hariç diğer gruplara göre anlamlı yüksekti. Diğer gruplar arasında istatistiki farklılık bulunmamaktaydı. Gruplara ait parmak ayırma (toe-spread) testi sonuçları zaman grafiği Şekil 4.12’de verilmiştir.



#### 4.3.4. Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi

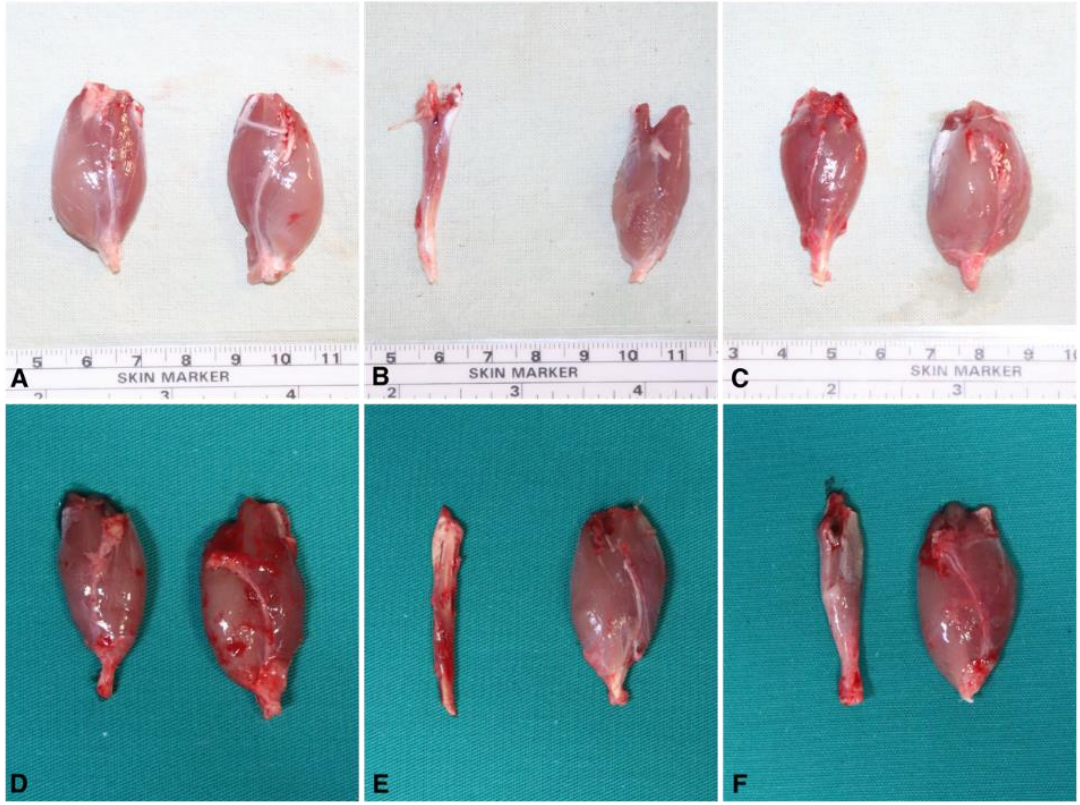


**Şekil 4.13.** Gruplara ait gastroknemius kas ağırlık indeksi karşılaştırmalı grafiği

16. haftanın sonunda tüm sıçanların bilateral gastroknemius kasları eksize edildi ve gastroknemius kas ağırlık indeksleri hesaplandı (Şekil 4.14). Gastroknemius kas ağırlık indeksleri değerlendirildiğinde (Şekil 4.13, Tablo 4.7); grup 1; grup 2, 4, 5 ve 6 ya göre anlamlı olarak yüksekken (sırasıyla;  $p < 0.001$ ,  $p = 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.003$ ); grup 3 ile arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık yoktu. Grup 2, grup 3 ve 4'e göre anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla;  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ). Grup 3, grup 5 ve 6'ya göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p = 0.001$ ,  $p < 0.05$ ). Grup 4 gastroknemius kas indeksi grup 5'e göre anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.05$ ), grup 6 ya göre yüksek olsa da bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi.

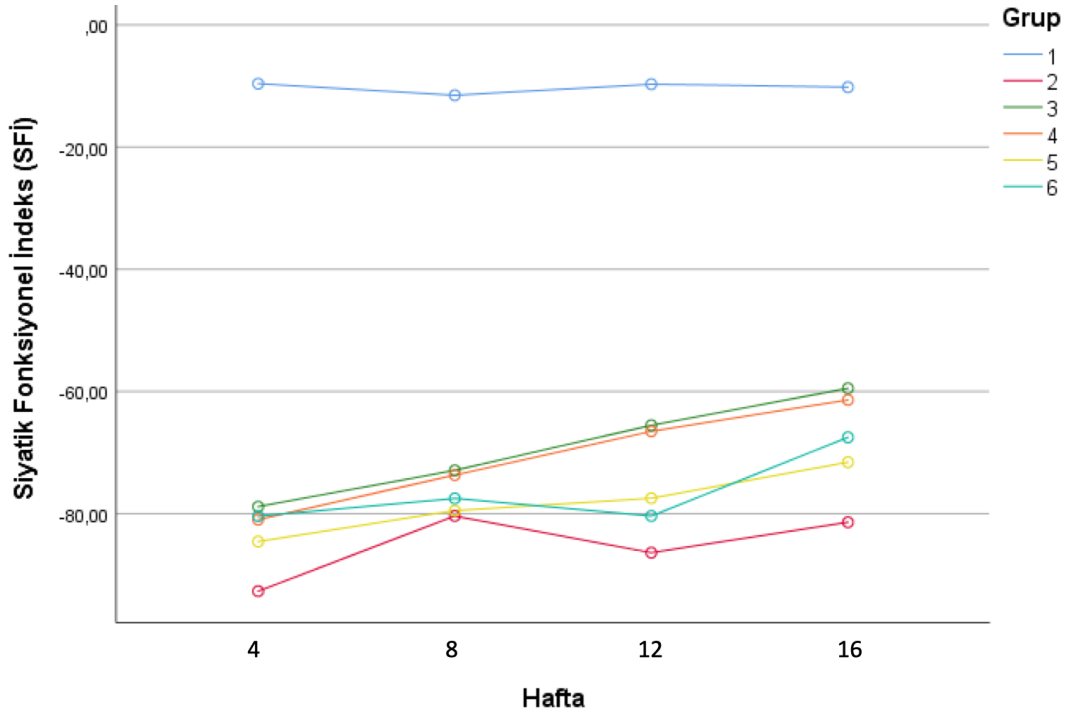
**Tablo 4.7.** Gruplara ait gastroknemius kas ağırlık indeksi tanımlayıcı verileri

	Gastroknemius Kas Ağırlık İndeksi						
	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
<b>1</b>	98,90	96,64	103,25	97,97	79,41	107,27	7,22
<b>2</b>	18,62	16,17	20,07	18,72	13,42	27,23	3,96
<b>3</b>	70,69	65,44	74,54	70,32	56,81	85,06	7,54
<b>4</b>	34,04	29,46	45,18	37,68	26,84	65,57	11,66
<b>5</b>	19,67	17,82	21,14	19,84	11,11	29,31	5,56
<b>6</b>	29,06	22,94	35,33	32,75	20,53	66,85	15,05



**Şekil 4.14.** Gastroknemius kas spesmenleri, (her grup için fotoğrafın sol kısmında sol gastroknemius kası, fotoğrafın sağ kısmında sağ gastroknemius kası gösterilmektedir): A) Sham kontrol grubu gastroknemius kas spesmenleri, her iki uzuv gastroknemius kasının benzer hacim ve ağırlıkta olduğu dikkat çekmektedir; B) Negatif kontrol grubu gastroknemius kas spesmenleri, opere edilen uzuvdaki gastroknemius kasının belirgin atrofisi dikkat çekmektedir; C) Sinir otogreti ile onarım yapılan grup gastroknemius kas spesmenleri; D) AM+AKMKH tabakasından oluşturulmuş kondüit ile onarım yapılan grup gastroknemius kas spesmenleri; E) PGA tüp kondüit ile onarım yapılan grup gastroknemius kas spesmenleri; F) AM'den oluşturulmuş kondüit ile onarım yapılan grup gastroknemius kas spesmenleri

#### 4.3.5. Yürüyüş Yolu Analizi ve Siyatik Fonksiyonel İndeks (Sfİ) Bulguları



Şekil 4.15. Gruplara ait siyatik fonksiyonel indeks zaman grafiği

Tüm gruplarda 4 haftada bir yürüme analizi yapıldı ve sfi hesaplandı (Şekil 4.15, Tablo 4.8). 4. hafta sfi analizinde grup 1 diğer gruplara göre anlamlı yüksekken, grup 2 diğer gruplara göre anlamlı olarak düşüktü.

8.hafta sfi analizinde; grup 1 diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu.

12. hafta sfi analizinde grup 1, tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). Grup 3, grup 2, 5 ve 6'ya göre anlamlı yüksekti ( $p<0.05$ ). Grup 4, grup 2, 5 ve 6 ya göre anlamlı yüksekti ( $p<0.05$ ).

16. hafta sfi analizinde grup 1, tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ,  $p=0,001$ ). Grup 2, grup 3 ve 4'e göre anlamlı düşüktü (sırasıyla;  $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ).

Her grubun kendi içinde haftalara göre değişiminin anlamlılığı değerlendirildiğinde; grup 2 için 4. ve 8. haftalar kıyaslandığında anlamlı olarak

yükseliş görülmekte ( $p<0.01$ ). Grup 3 için 4.-12., 4.-16. haftalar kıyaslandığında anlamlı yükseliş görülmekte (sırasıyla;  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ). Grup 4 için, 4-12, 4-16 ve 8.-16. haftalar arasında anlamlı yükseliş bulunmakta (sırasıyla;  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ). Grup 5 ve 6 için 4.-16. haftalar arasında anlamlı artış görülmekte ( $p<0.01$ ).

**Tablo 4.8.** Gruplara ait siyatik fonksiyonel indeks ortalama değerleri

SFİ Ortalama Değer ± Standart Sapma					
	4. Hafta	8. Hafta	12. Hafta	16. Hafta	
Grup	1	-9,62 ± 7,04	-11,52 ± 4,46	-9,71 ± 5,41	-10,20 ± 5,08
	2	-90,90 ± 3,28	-79,55 ± 8,24	-85,52 ± 7,76	-81,41 ± 6,75
	3	-79,90 ± 5,59	-72,66 ± 8,46	-65,54 ± 5,23	-59,48 ± 7,87
	4	-80,98 ± 4,08	-73,69 ± 5,24	-66,52 ± 3,53	-61,39 ± 5,88
	5	-83,51 ± 4,66	-79,18 ± 5,06	-77,48 ± 4,71	-71,58 ± 9,30
	6	-81,76 ± 4,66	-77,57 ± 4,16	-80,39 ± 6,31	-67,51 ± 8,46

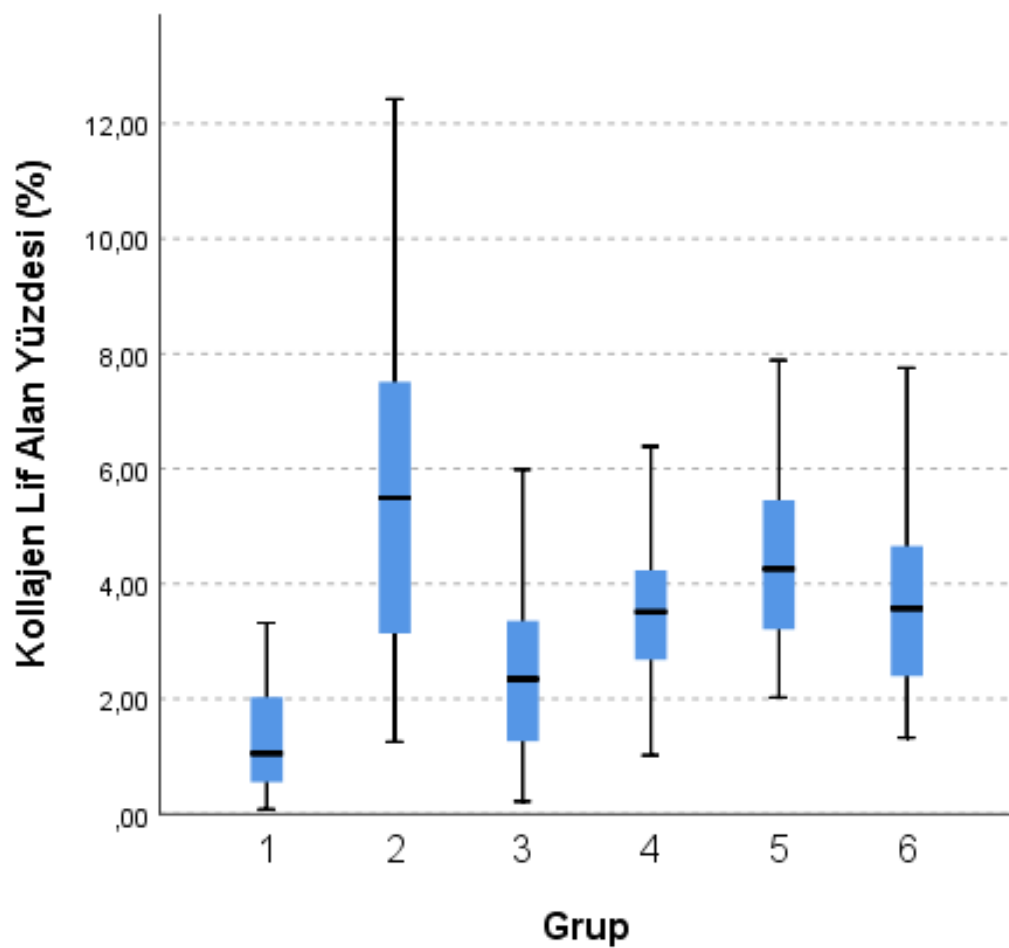
#### 4.4. Histolojik Bulgular

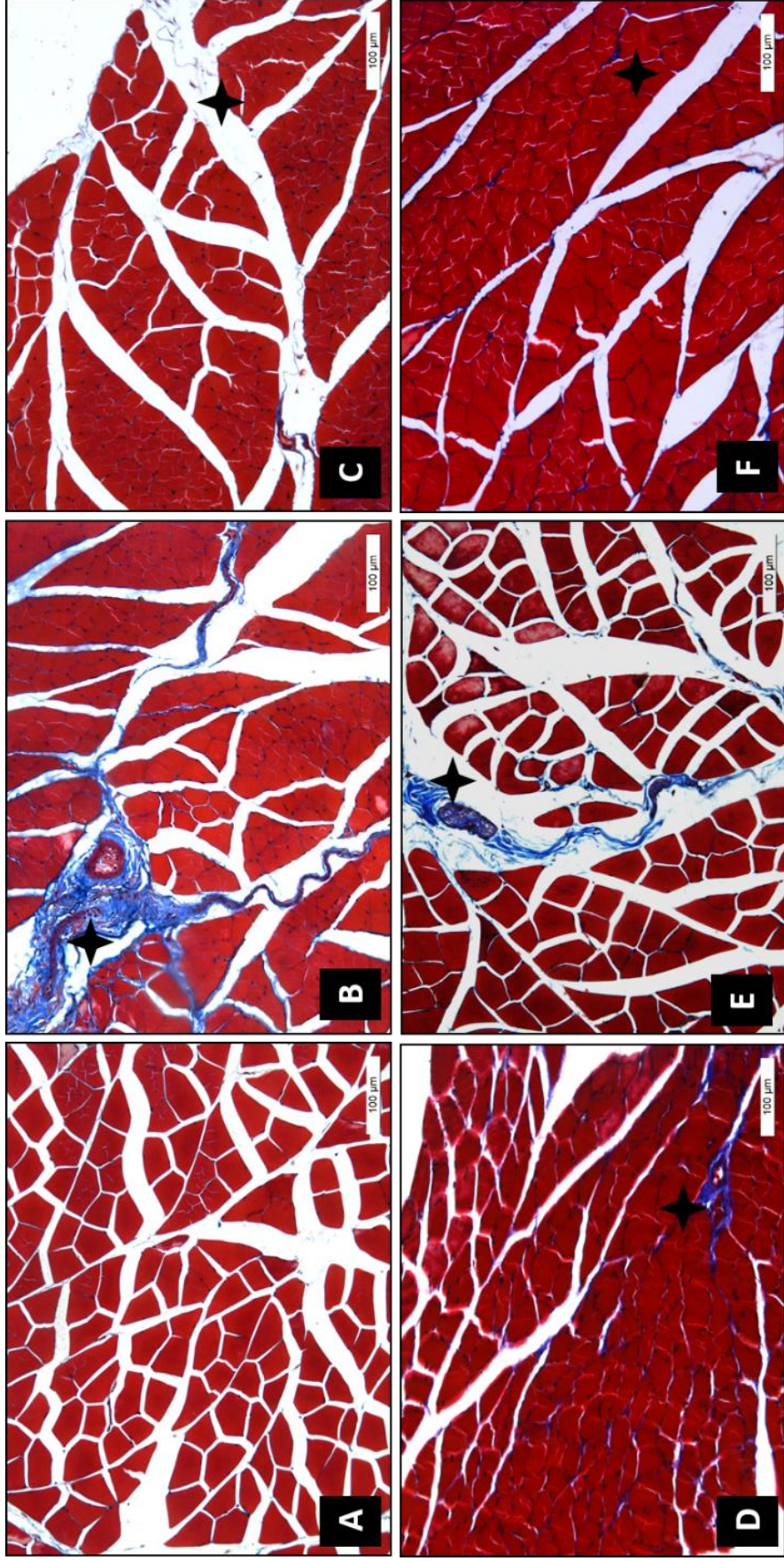
##### 4.4.1. Gastrokinemius Kası Masson Trikrom Bulguları

Gruplara ait gastrokinemius kas dokuları Masson Trikrom ile boyandıktan sonra kas lifi çapı ve kollajen lif alan yüzdesini kapsayan histomorfometrik ölçümler yapıldı (Şekil 4.17). Grup 1' e ait gastrokinemius kas dokusunun Masson's Trikrom boyama sonrasında enine kesitlerde, kas liflerinin normal morfolojiye sahip olduğu izlendi. Grup 2' de belirgin kas atrofisi ve artmış kollajen lif yoğunluğu ile karakterize fibrotik değişimler dikkati çekti. Deney gruplarına ait gastrokinemius kası kollajen lif alan yüzdesi verileri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Şekil 4.16, Tablo 4.9); gruplar arası en düşük kollajen lif alan yüzdesi grup 1' de, en yüksek değer ise grup 2' de izlendi. Grup 3 kollajen lif alan yüzdesi grup 4, grup 5 ve grup 6' ya göre anlamlı olarak daha düşüktü (sırasıyla;  $p=0.011$ ,  $p<0.001$  ve  $p=0.006$ ). Grup 4 kollajen lif alan yüzdesi ortalama değeri grup 5'e göre anlamlı düşüktü ( $p<0.05$ ), grup 6' ya göre de daha düşük olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

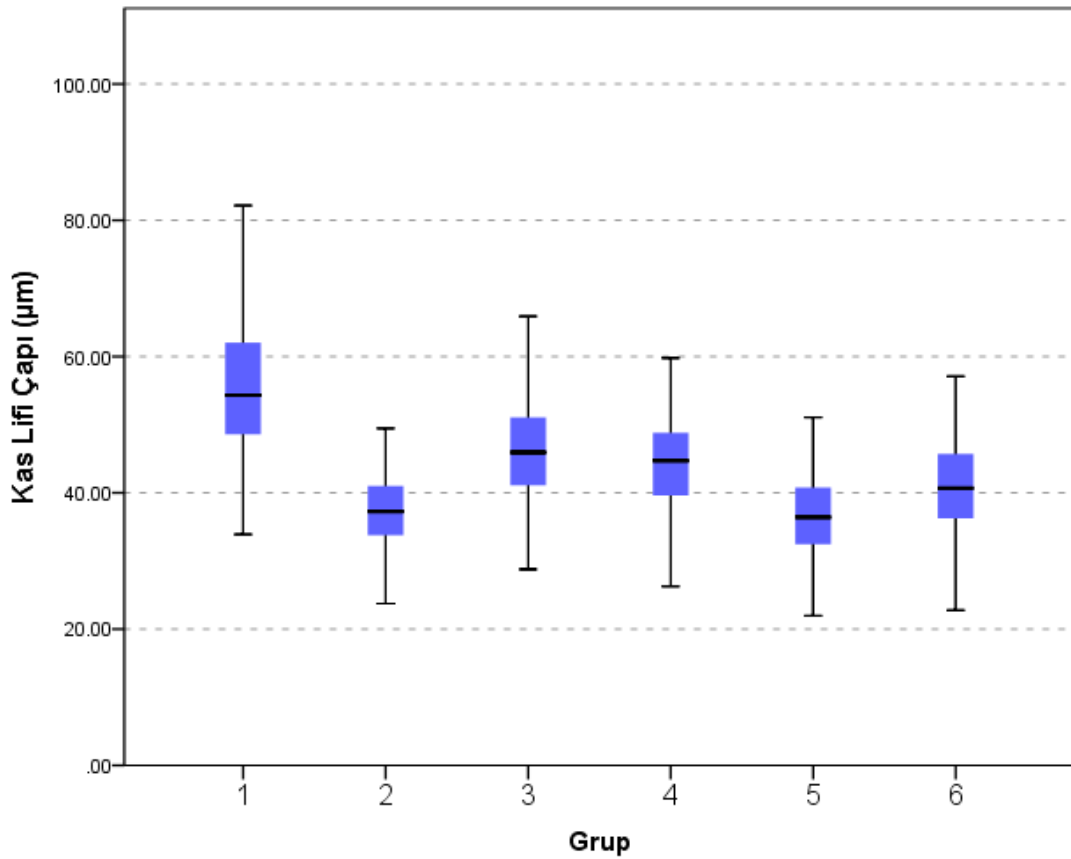
**Tablo 4.9.** Gruplara ait kollajen lif alan yüzdesi tanımlayıcı verileri

		Kollajen Lif Alan Yüzdesi (%)						
Grup		Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
1		1,05	,55	2,03	1,41	,08	7,84	1,35
2		5,50	3,14	7,51	5,41	1,25	12,42	2,57
3		2,35	1,27	3,36	2,59	,22	9,09	1,83
4		3,51	2,68	4,24	3,59	1,02	7,36	1,31
5		4,26	3,21	5,46	4,33	2,03	7,89	1,40
6		3,57	2,40	4,66	3,74	1,32	7,76	1,58

**Şekil 4.16.** Gruplara ait kollajen lif alan yüzdesi karşılaştırma grafiği



**Şekil 4.17.** Deneş grupları gastrokinemius kaslarına ait transvers kesit görüntüleri (Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C), Grup 4 (D), Grup 5 (E) ve Grup 6 (F)). Grup 2' de artış gösteren kollajen lif yoğunluğu (★) izlenmekte Masson's Trichrome, 200 X, bar 100 µ m).



**Şekil 4.18.** Gruplara ait kas lifi çapı karşılaştırma grafiği

Gruplar arası gastrokinemius kas lifi çap ölçümleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde (Şekil 4.17, Tablo 4.10); grup 1 en yüksek kas lifi çapına sahipti ( $p < 0.001$ ). Grup 2 ve grup 5 arasında kas lifi çapı açısından istatistiksel olarak herhangi bir farklılık izlenmedi ( $p > 0.99$ ). Grup 2; grup 3, 4 ve 6 ile karşılaştırıldığında grup 2 kas lifi çapında diğer gruplara göre anlamlı düşüş söz konusuydu (sırasıyla;  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  ve  $p < 0.001$ ). Grup 4 kas lifi çapı grup 3'e göre anlamlı olarak düşükken ( $p < 0.001$ ), grup 5 ve 6'ya göre ise anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Grup 5 ve 6 karşılaştırıldığında ise; kas lifi çapının grup 6'da istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu dikkati çekti ( $p < 0.001$ ).

**Tablo 4.10.** Gruplara ait gastrokinemius kas lifi çapı tanımlayıcı verileri

	Kas Lifi Çapı (µm)						
	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
<b>1</b>	54,33	48,60	62,04	56,14	33,89	105,45	11,27
<b>2</b>	37,25	33,78	41,01	37,45	20,59	88,17	5,67
<b>3</b>	45,95	41,09	51,07	46,53	28,77	77,45	7,85
<b>4</b>	44,72	39,60	48,82	44,11	26,26	59,77	6,48
<b>5</b>	36,41	32,45	40,77	37,05	21,96	53,68	5,93
<b>6</b>	40,67	36,27	45,73	40,93	22,77	61,76	6,79

#### 4.4.2. Periferik Sinir Hematoksilen-Eosin Bulguları

Deney gruplarına ait periferik sinir dokularının H&E boyama sonrasında genel durumu değerlendirildi (Şekil 4.19, 4.20). Grup 1'e ait longitudinal kesitlerde periferik sinir yapısının, düzenli sinir lifleri, Schwann hücrelerine ait nukleuslar ve düzenli akson yapıları ile tüm bölümlerde normal histolojik yapıda olduğu izlendi. Aksonal organizasyon bütünlüğünü korurken, inflamasyon bulgusuna rastlanmadı.

Grup 2'ye ait H&E kesitlerinde, periferik sinir doku bütünlüğünün kaybolduğu dikkati çekti. Distal bölümde sinir liflerinin düzensiz dağılımı, azalan akson yoğunluğu ve artan dejeneratif değişimler izlendi. Schwann hücre proliferasyonu, fibrotik alanlar, aksoplazmik vakuolizasyon, lifler arasında dağılım gösteren enflamatuar hücre varlığı ve konjesyon ile birlikte vaskulerize değişimler dikkati çekti.

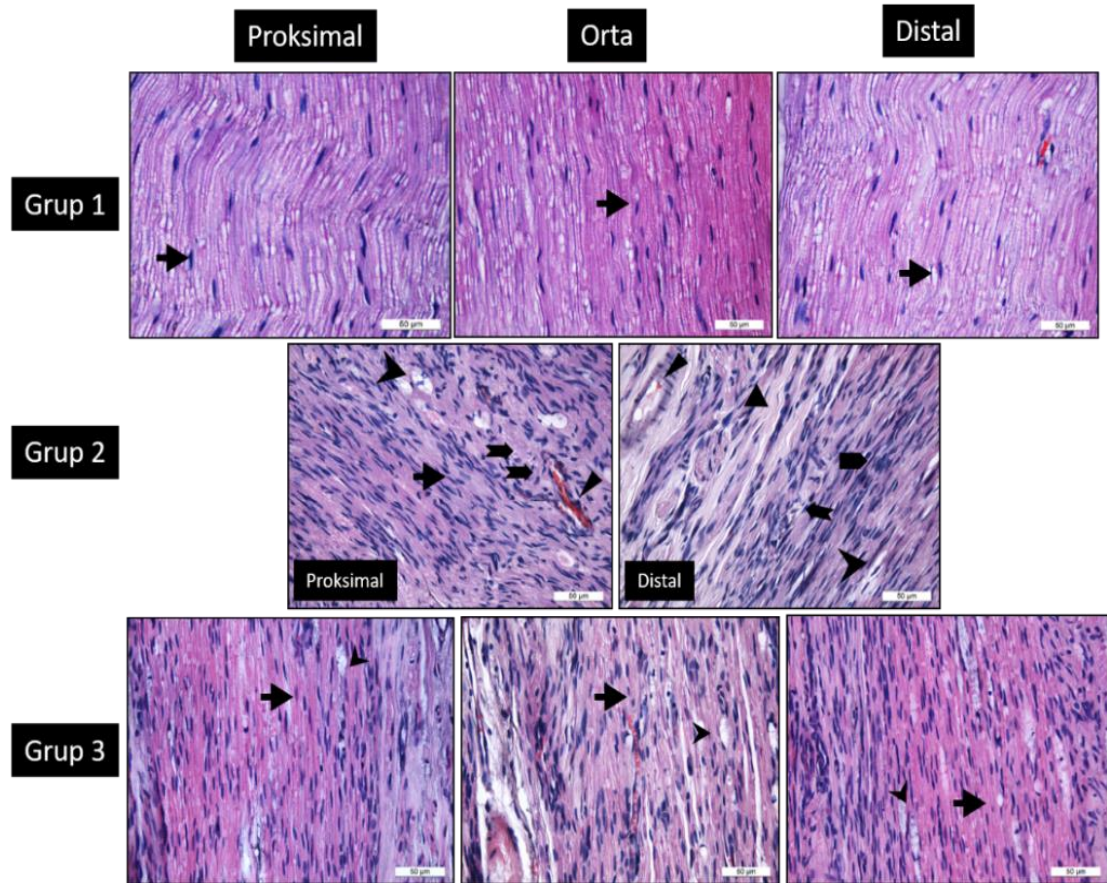
Grup 3'e ait H&E ile boyanmış kesitlerde, yer yer dejeneratif bulguların devam ettiği, Schwann hücre proliferasyonunun yanı sıra bazı alanlarda düzenli akson yapılarının varlığı izlendi. Grup 3 orta bölümlerine ait kesitlerde, grup 2'ye göre akson yapısının daha düzenli olduğu ve fibrotik alanların azaldığı görüldü. Grup 4'e ait kesitlerde ise periferik sinir bölümlerinde grup 1'e göre dejeneratif histolojik değişimlerin, konjesyonun ve bazı alanlarda fibrozisin görüldüğü, ancak akson ve miyelin organizasyonunun yer yer düzenlendiği dikkati çekti. Grup 2'ye göre aksoplazmik vakuolizasyon ve enflamatuar hücre yoğunluğunun azaldığı görüldü.

Grup 5'e ait histolojik kesitlerde ise kontrol grubuna göre devam eden dejeneratif değişimlerin yanı sıra, grup 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında, distal ve orta bölümde aksonal bütünlüğün kaybolduğu sinir liflerinin ve Schwann hücre nukleus

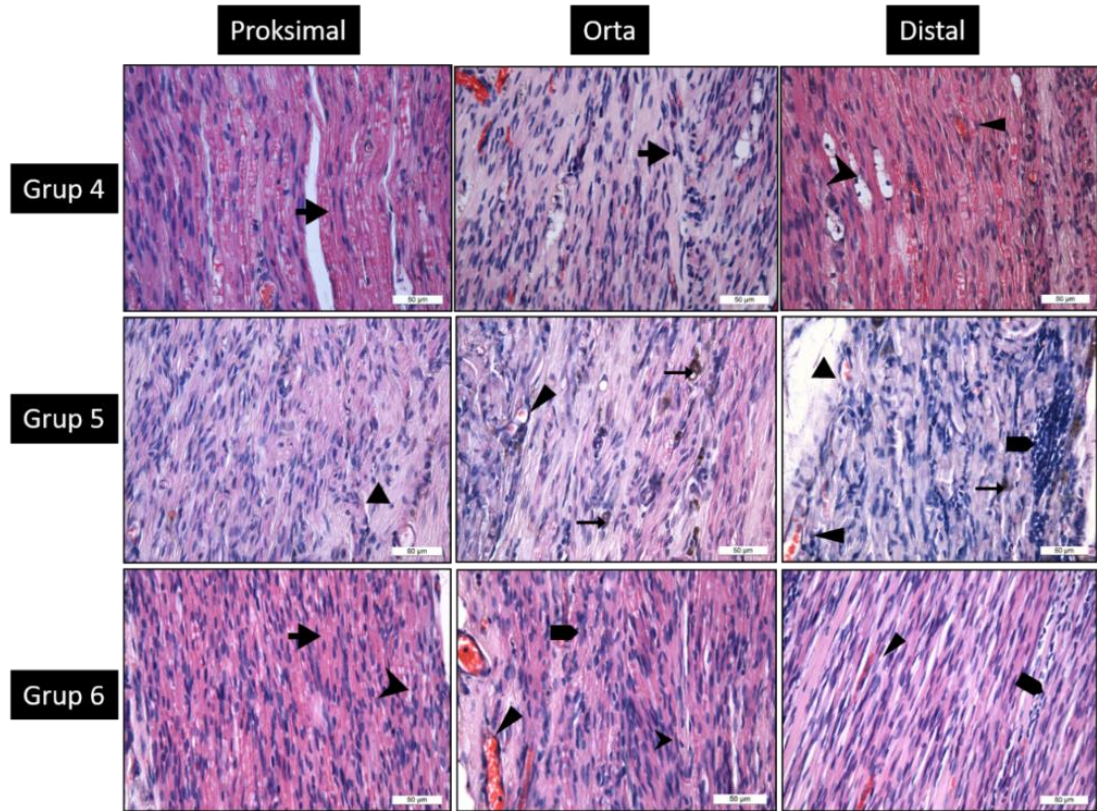


yapısındaki değişimlerin devam ettiği izlendi. Distal bölüme ait kesitlerde bazı alanlarda yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibrotik değişimler ve hemosiderin varlığı dikkati çekti. Grup 2 ile karşılaştırıldığında aksonal vakuolizasyonun bazı alanlarda azaldığı görüldü.

Grup 6'ya ait periferik sinir dokusunun H&E boyama sonucu değerlendirilen kesitlerde ise, proksimal bölümde aksonal düzenlenim ve miyelin organizasyonunun diğer tedavi grupları ile benzer olduğu izlendi. Distal bölümde dejenere akson yapıları ve fibrotik doku varlığı devam ediyordu.



**Şekil 4.19.** Periferik sinir longitudinal kesitlerde proksimal, orta ve distal bölümlere ait görüntüler (I). Schwann hücre nükleusu (➔), dejenere aksonlar (➔), fibrotik doku (➤), vakuolizasyon (➤), konjesyon (➤), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➤), izlenmekte (H&E, 400 X, bar 50 µm)



**Şekil 4.20.** Periferik sinir longitudinal kesitlerde proksimal, orta ve distal bölümlere ait görüntüler (II). Schwann hücre nükleusu (→), dejenere aksonlar (↗), fibrotik doku (▴), vakuolizasyon (↘), konjesyon (▴), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (■), hemosiderin (→) görülmekte (H&E, 400 X, bar 50 µm)

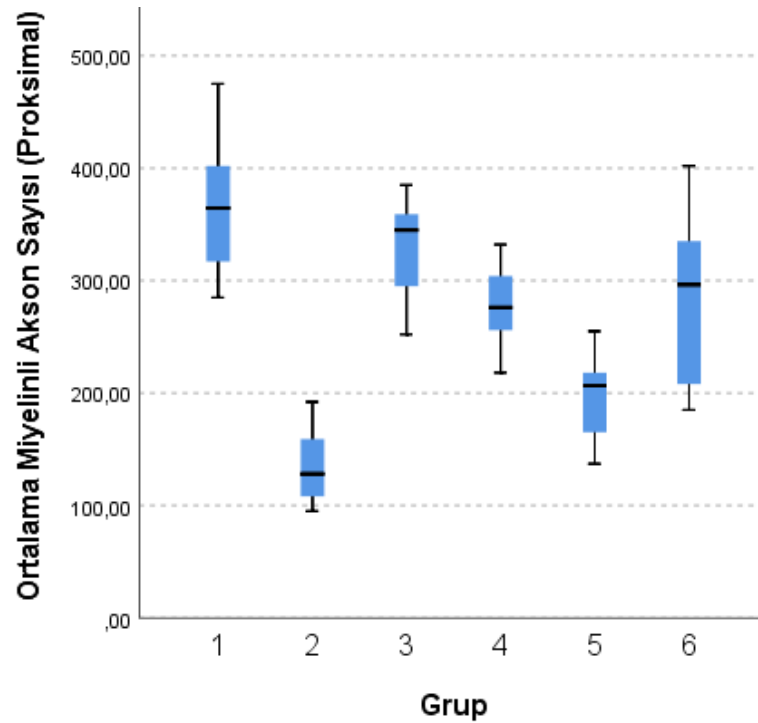
#### 4.4.3. Periferik Sinir Bölümlerine Ait Miyelinli Akson Sayısı

Miyelinli akson sayısını değerlendirmek için periferik sinir enine kesitlerine Luxol Fast Blue ile boyama yapıldı (Şekil 4.24). Gruplar arası proksimal bölüme ait kesitlerde ortalama miyelinli akson sayısı değerlendirildiğinde (Şekil 4.21, Tablo 4.11); grup 1 de miyelinli akson sayısı grup 2,4 ve 5'e göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p < 0.001$ ,  $p = 0.026$ ,  $p < 0.001$ ), grup 6 ile arasında istatistiksel anlamlılık yoktu ancak daha yüksekti ( $p = 0.051$ ). Grup 2' ye ait miyelinli akson sayısı ile grup 5 arasında istatistiksel olarak anlamlılık yokken ( $p = 0.647$ ), diğer gruplar arasında grup 2' de daha düşük olmak üzere anlamlılık mevcuttu. Grup 3, grup 5'e göre istatistiksel olarak anlamlı daha

yüksek miyelinli akson sayısına sahipti ( $p<0,001$ ). Grup 4 ile grup 3, 5 ve 6 arasında istatistiksel olarak anlamlılık yoktu (sırasıyla;  $p=0.664$ ,  $p=0.27$  ve  $p>0.99$ ).

**Tablo 4.11.** Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (proksimal) tanımlayıcı verileri

		Ortalama Miyelinli Akson Sayısı (Proksimal)						
		Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
Grup	1	364,50	317,00	402,00	370,22	285,00	475,00	55,20
	2	128,00	108,00	159,00	134,61	95,00	192,00	31,05
	3	345,00	295,00	359,00	329,83	252,00	385,00	41,09
	4	276,00	256,00	304,00	278,89	218,00	332,00	29,46
	5	206,50	165,00	218,00	205,06	137,00	355,00	49,25
	6	296,50	208,00	335,00	280,67	185,00	402,00	68,20



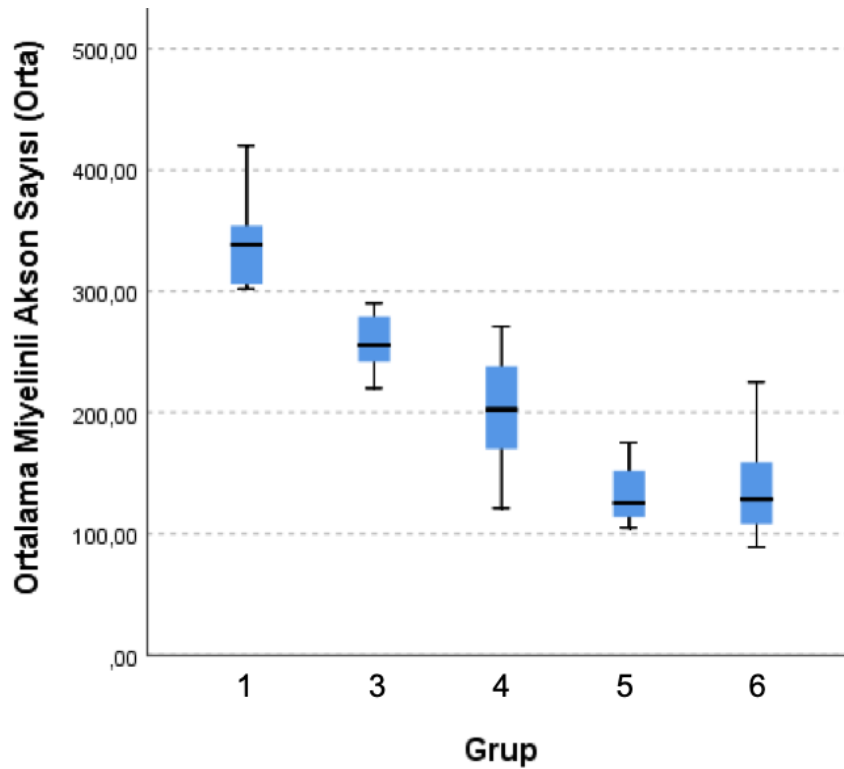
**Şekil 4.21.** Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (proksimal) karşılaştırma grafiği

Periferik sinir orta bölüme ait miyelinli akson sayısı değerlendirildiğinde (Şekil 4.22, Tablo 4.12); grup 1’de grup 4, 5 ve 6’ya göre anlamlı artış söz konusuydu (sırasıyla;  $p=0.001$ ,  $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ). Grup 1 ve grup 3 arasında herhangi bir anlamlılık izlenmedi. Grup 3, grup 5 ve 6 ile karşılaştırıldığında anlamlı artış vardı (sırasıyla;  $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ). Grup 4 miyelinli akson sayısı ortalama değeri grup 5

ve 6'ya göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p<0.05$ ,  $p<0.05$ ). Grup 5 ve grup 6 arasında da istatistiksel olarak anlamlılık izlenmedi.

**Tablo 4.12.** Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (orta) tanımlayıcı verileri

		Ortalama Miyelinli Akson Sayısı (Orta)					
	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
1	338,50	306,00	354,00	339,22	202,00	474,00	70,81
3	255,50	242,00	279,00	261,06	220,00	342,00	28,52
Grup 4	202,50	170,00	238,00	200,67	121,00	271,00	41,33
5	125,50	114,00	152,00	132,33	105,00	175,00	21,89
6	128,50	108,00	159,00	140,44	89,00	254,00	47,46



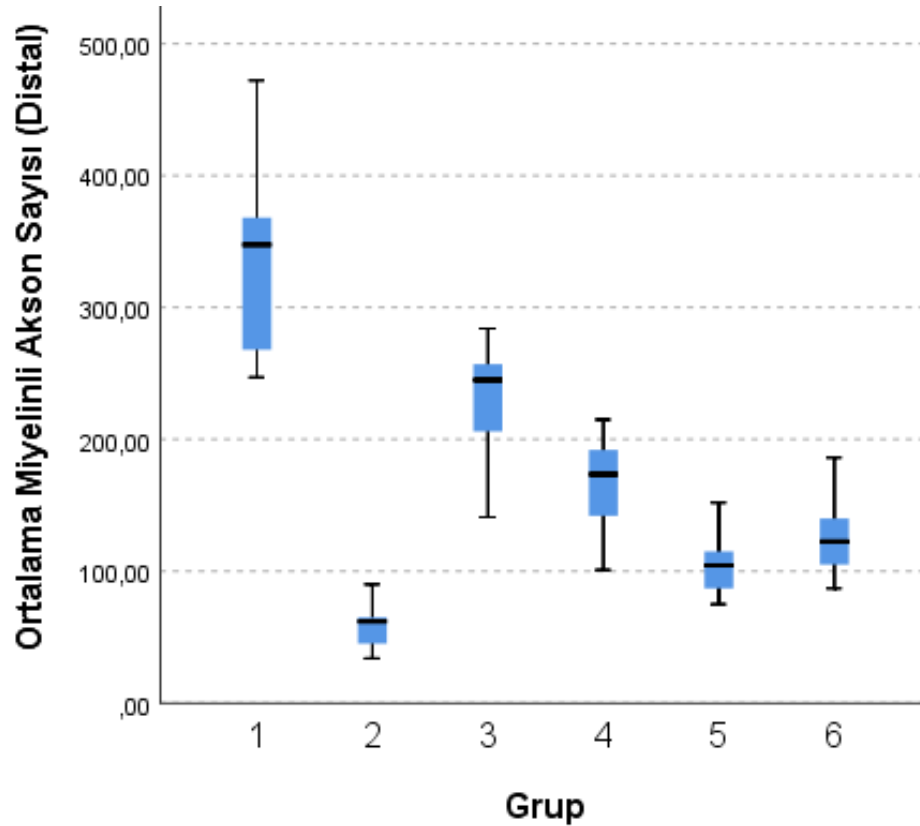
**Şekil 4.22.** Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (orta) karşılaştırma grafiği

Gruplar arası distal bölüme ait kesitlerde miyelinli akson sayısı değerlendirildiğinde (Şekil 4.23, Tablo 4.13); grup 1 ile grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi. Diğer gruplara ait distal bölümlerde grup 1'e göre miyelinli akson sayısında istatistiksel olarak anlamlı düşüş görüldü ( $p<0.001$ ). Grup 2 miyelinli akson sayısı distal bölümde anlamlı olarak düşüktü.

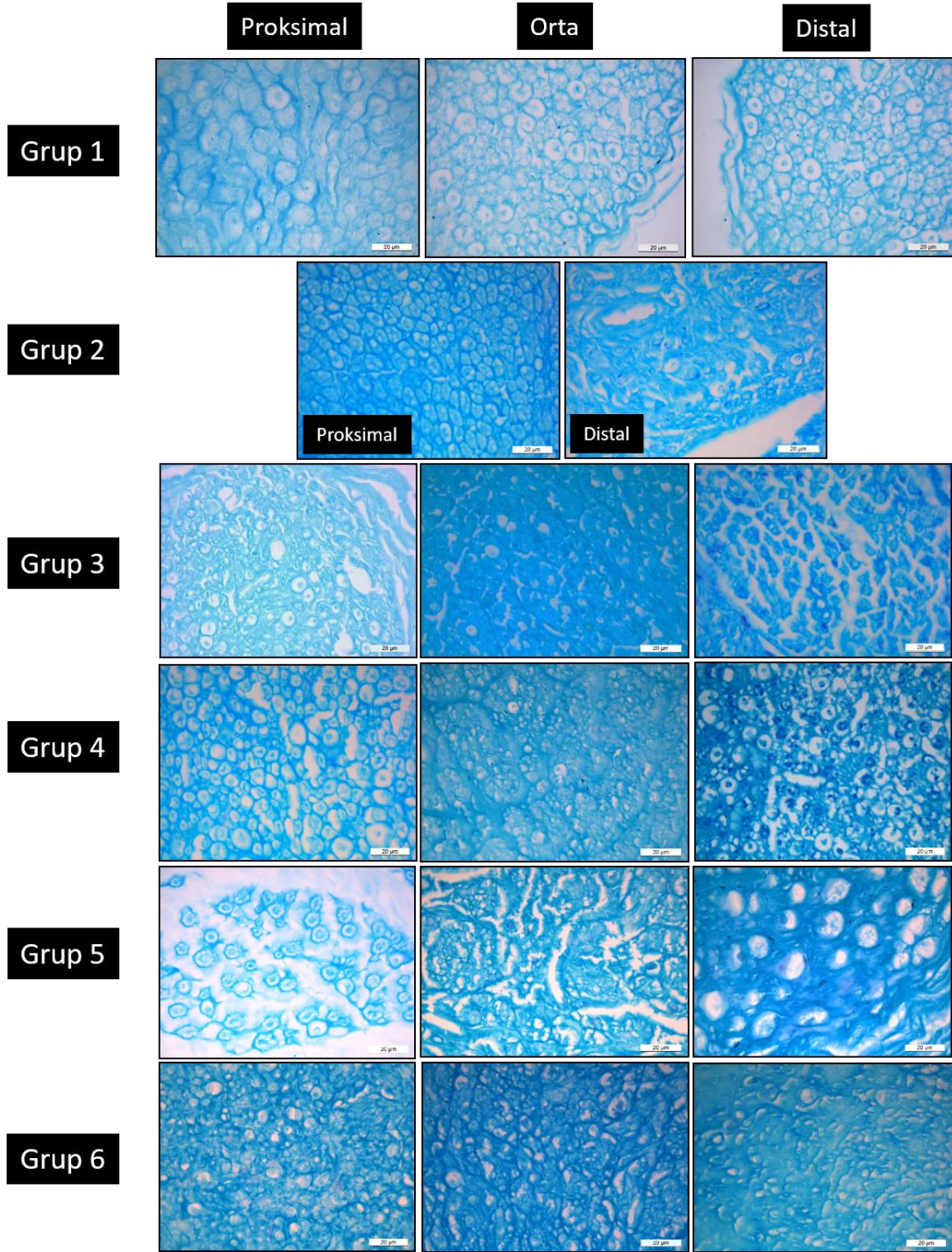
Grup 3 ile grup 5 ve 6 arasındaki miyelinli akson sayısı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla;  $p<0.001$  ve  $p<0.01$ ). Grup 3 ile grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlılık yoktu. Grup 4, grup 5' e göre anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.05$ ), grup 6 ile arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık izlenmedi. Grup 5' e ait miyelinli akson sayısı grup 6' ya göre daha düşük olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

**Tablo 4.13.** Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (distal) tanımlayıcı verileri

		Ortalama Miyelinli Akson Sayısı (Distal)						
		Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
Grup	1	347,50	268,00	368,00	330,56	247,00	472,00	60,93
	2	62,00	45,00	65,00	56,83	34,00	90,00	15,21
	3	245,00	206,00	257,00	228,00	141,00	284,00	43,51
	4	173,50	142,00	192,00	166,06	101,00	215,00	33,04
	5	104,50	87,00	115,00	104,72	75,00	152,00	20,44
	6	122,50	105,00	140,00	125,11	87,00	186,00	24,88



**Şekil 4.23.** Gruplara ait ortalama miyelinli akson sayısı (distal) karşılaştırma grafiği



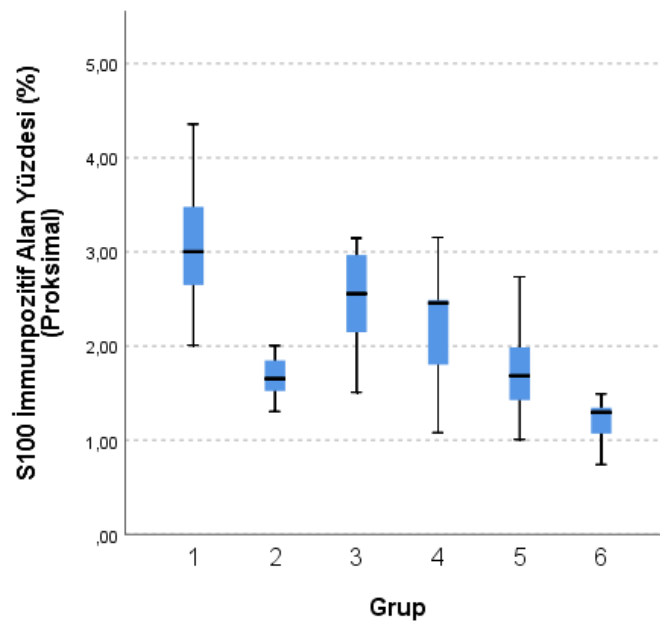
**Şekil 4.24.** Luxol Fast Blue ile boyanmış periferik sinir transvers kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait görüntüler (Luxol Fast Blue, 1000 X, bar 20 µm)

#### 4.4.4. S100 İmmünohistokimyasal Bulguları

Periferik sinir S100 immünopozitif alan yüzdesi gruplar arası değerlendirildiğinde (Şekil 4.25, Tablo 4.14); proksimal bölümde S100 immünopozitif alan yüzdesi grup 1’de grup 2, 5 ve 6 ya göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ). Grup 2’ de grup 3 ve 4’e göre anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla;  $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ). Grup 3, grup 5 ve 6’ ya göre anlamlı olarak daha yüksek değere sahipken (sırasıyla;  $p<0.01$ ve  $p<0.001$ ), grup 4 ile arasında anlamlılık yoktu. Grup 4, grup 5 ve 6’ ya göre anlamlı daha yüksek S100 pozitif alan yüzdesine sahipti (sırasıyla;  $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ).

**Tablo 4.14.** Gruplara ait S100 immünopozitif alan yüzdesi (proksimal) tanımlayıcı verileri

		S100 İmmünopozitif Alan Yüzdesi (%) (Proksimal)						
	Grup	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
	1	3,00	2,65	3,48	3,06	2,01	4,36	,60
	2	1,65	1,52	1,85	1,63	,55	2,00	,34
	3	2,55	2,15	2,97	2,44	1,51	3,15	,51
	4	2,46	1,80	2,49	2,33	1,08	3,91	,71
	5	1,68	1,43	1,99	1,72	1,01	2,74	,46
	6	1,30	1,07	1,35	1,29	,58	2,09	,41

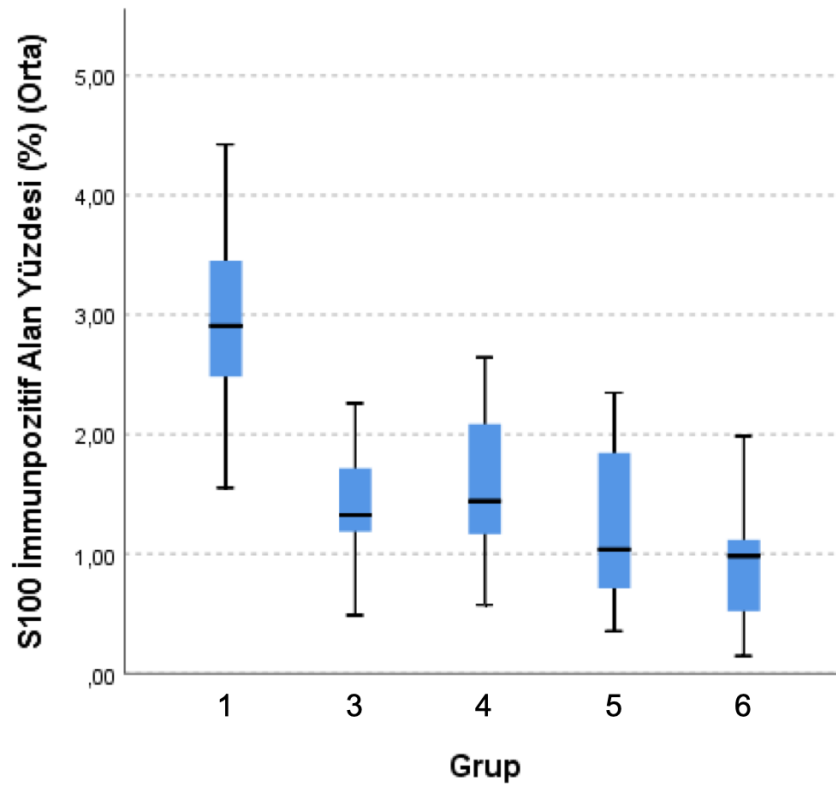


**Şekil 4.25.** Gruplara ait S100 immünopozitif alan yüzdesi (proksimal) karşılaştırma grafiği

Gruplar arası periferik sinir orta bölümüne ait S100 immünpozitif alan yüzdesi değerlendirildiğinde (Şekil 4.26, Tablo 4.15); grup 1 immünpozitif alan yüzdesi gruplar arasında en yüksek değere sahipti. Grup 4 immünpozitif alan yüzdesi grup 6'dan anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0,05$ ), grup 3 ve 5' den yüksek olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

**Tablo 4.15.** Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (orta) tanımlayıcı verileri

S100 İmmünpozitif Alan Yüzdesi (%) (Orta)							
	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
<b>Grup 1</b>	2,91	2,48	3,45	2,90	1,55	4,43	,74
<b>Grup 3</b>	1,33	1,19	1,72	1,43	,49	2,26	,48
<b>Grup 4</b>	1,44	1,17	2,09	1,66	,57	3,99	,79
<b>Grup 5</b>	1,04	,71	1,84	1,35	,35	4,43	,99
<b>Grup 6</b>	,98	,52	1,12	,94	,15	1,99	,53



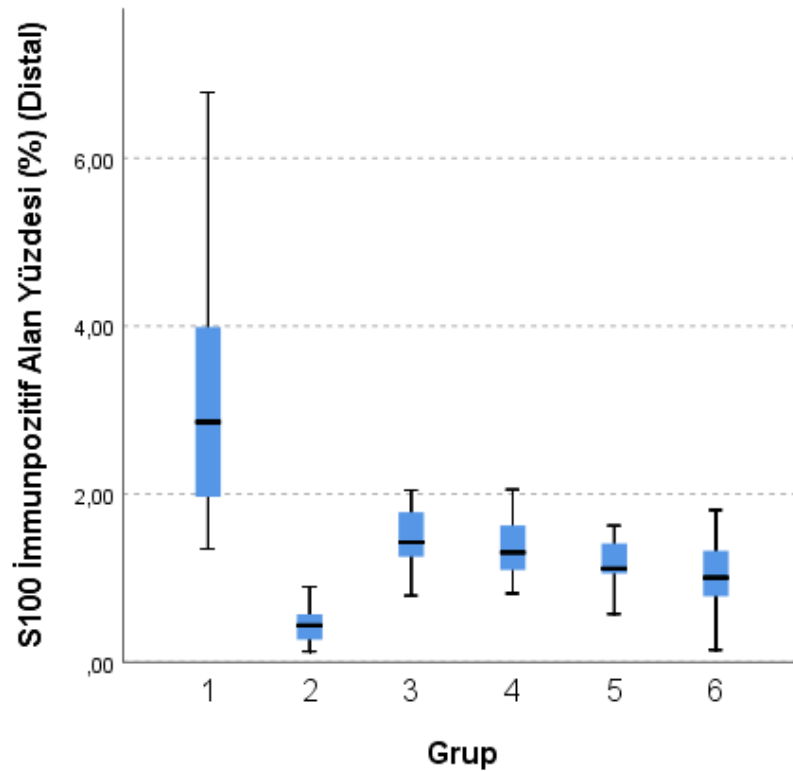
**Şekil 4.26.** Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (orta) karşılaştırma grafiği



Gruplar arası distal bölüme ait S100 immünpozitif alan yüzdesi değerlendirildiğinde (Şekil 4.27, Tablo 4.16); grup 1 en yüksek değere sahipti. Grup 2 distal bölümündeki S100 immünpozitif alan yüzdesi grup 6 dışında ( $p=0.110$ ), grup 1, 3, 4 ve 5'e göre istatistiksel olarak düşük izlendi (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  ve  $p=0.005$ ). Grup 4 grup 5 ve 6' ya göre daha yüksek S100 immünpozitif alan yüzdesine sahip olsa da bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi.

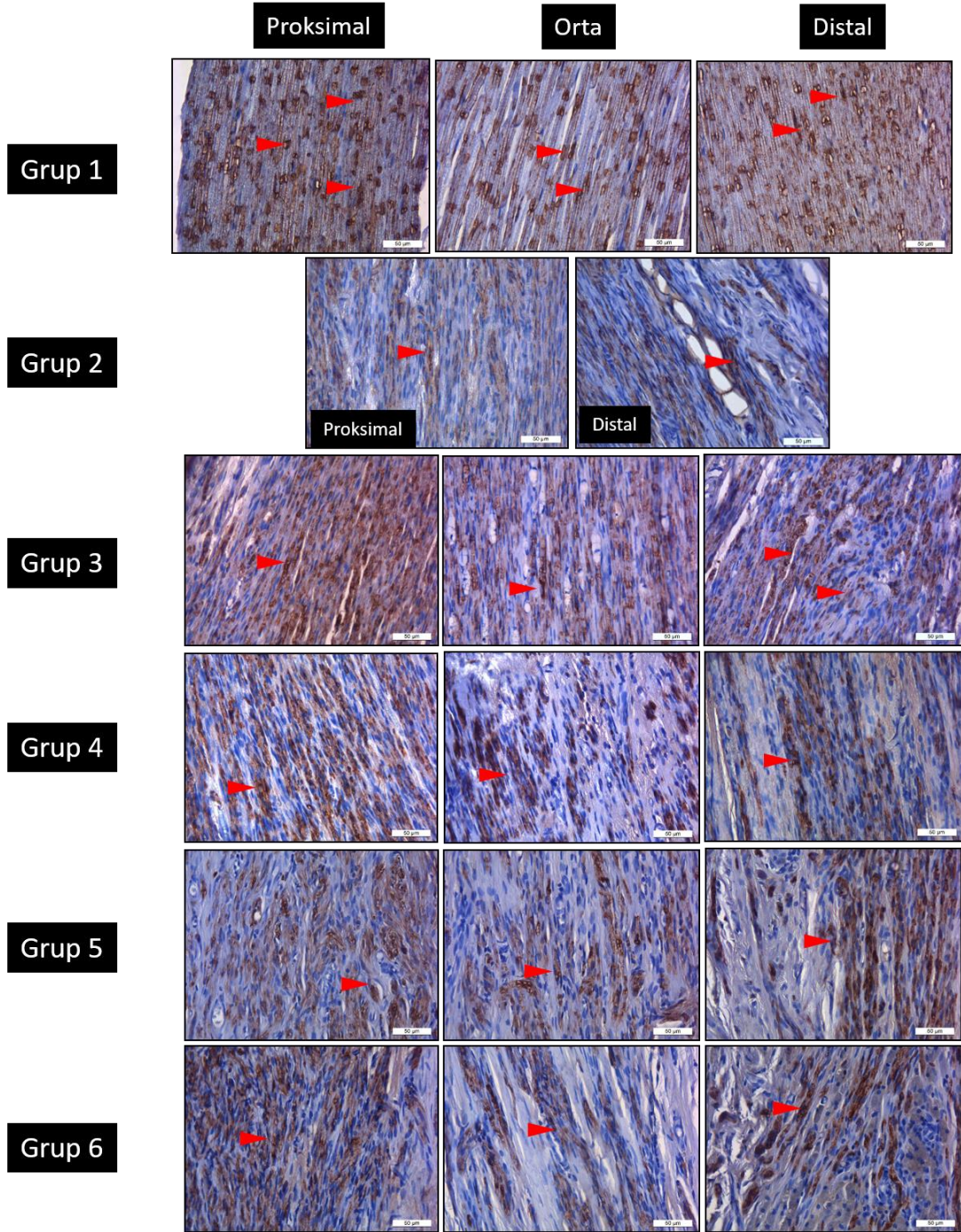
**Tablo 4.16.** Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (distal) tanımlayıcı verileri

		S100 İmmünpozitif Alan Yüzdesi (%) (Distal)						
Grup		Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
	1		2,86	1,97	3,99	3,16	1,35	6,78
2		,44	,27	,57	,47	,13	1,05	,26
3		1,43	1,25	1,79	1,47	,79	2,05	,35
4		1,31	1,10	1,63	1,40	,82	2,60	,43
5		1,11	1,05	1,41	1,18	,57	1,63	,26
6		1,01	,78	1,33	1,06	,14	2,32	,52



**Şekil 4.27.** Gruplara ait S100 immünpozitif alan yüzdesi (distal) karşılaştırma grafiği

Grupların periferik sinir kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait S100 immünboyama görüntüleri Şekil 4.28’de verilmiştir.



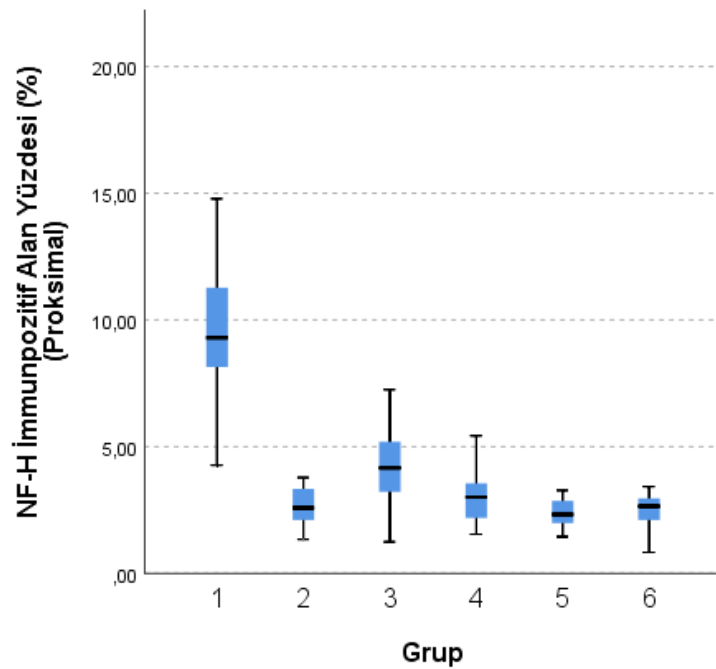
**Şekil 4.28.** Periferik sinir kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait S100 immünreaktivitesi gösteren Schwann hücreleri (►) izlenmekte. (DAB-Hematoksilen, 400 X, bar 50 µm)

#### 4.4.5. NF-H İmmünohistokimyasal Bulguları

Gruplar arası periferik sinir proksimal bölüm NF-H immünpozitif alan yüzdesi değerlendirildiğinde (Şekil 4.29, Tablo 4.17); Grup 1’de immünpozitif alan yüzdesi diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksekti. Grup 3’de immünpozitif alan yüzdesi grup 2,5 ve 6’ya göre anlamlı şekilde yüksekken (sırasıyla;  $p=0.006$ ,  $p<0.001$  ve  $p=0.001$ ), grup 4 ile istatistiksel olarak bir anlamlılık yoktu ( $p=0.156$ ). Grup 4 proksimal bölüme ait, NF-H immünpozitif alan yüzdesi ortalama değeri grup 5 ve 6’ya göre yüksek olmasına rağmen bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla;  $p=0.489$  ve  $p>0.99$ ).

**Tablo 4.17.** Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (proksimal) tanımlayıcı verileri

		NF-H İmmünpozitif Alan Yüzdesi (%) (Proksimal)						
	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma	
Grup	1	9,30	8,15	11,27	9,77	4,26	15,99	2,52
	2	2,58	2,11	3,33	2,67	1,34	3,78	,70
	3	4,16	3,22	5,20	4,17	1,25	7,25	1,39
	4	3,01	2,18	3,55	3,06	1,55	6,91	1,13
	5	2,32	1,99	2,86	2,42	1,45	4,37	,60
	6	2,65	2,10	2,96	2,59	,83	5,09	,86

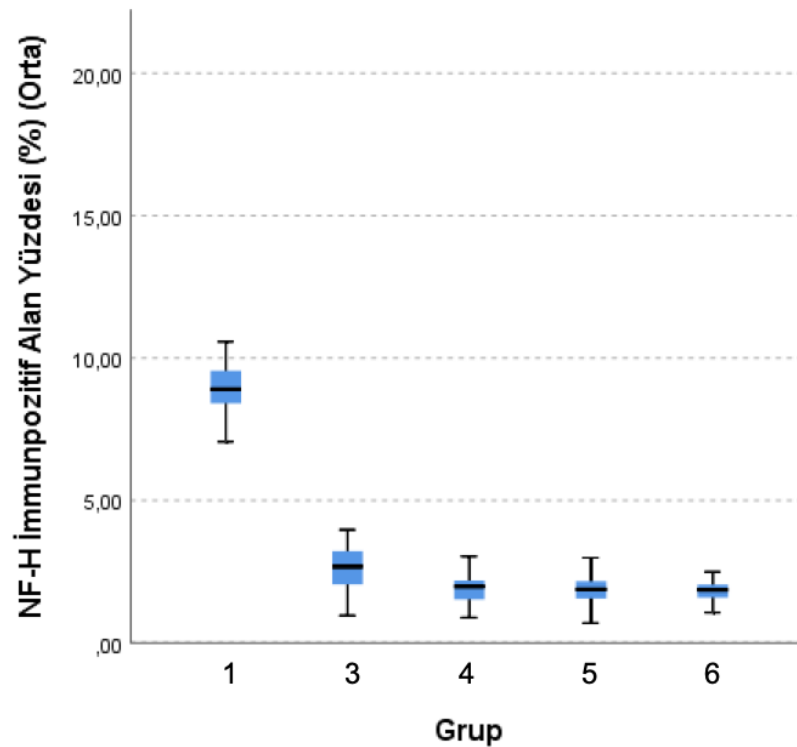


**Şekil 4.29.** Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (proksimal) karşılaştırma grafiği

Orta bölüme ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi gruplar arası karşılaştırıldığında (Şekil 4.30, Tablo 4.18); en yüksek NF-H immünpozitif alan yüzdesi grup 1’ de izlendi ( $p < 0.001$ ). Grup 4 ile grup 5 ve 6 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla;  $p > 0.99$  ve  $p > 0.99$ ). Grup 5 ve 6 arasında istatistiksel olarak anlamlılık izlenmedi ( $p > 0.99$ ).

**Tablo 4.18.** Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (orta) tanımlayıcı verileri

NF-H İmmünpozitif Alan Yüzdesi (%) (Orta)							
	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
<b>Grup 1</b>	8,90	8,41	9,55	9,32	7,06	15,99	1,96
<b>Grup 3</b>	2,67	2,05	3,22	2,57	,95	3,97	,89
<b>Grup 4</b>	1,98	1,52	2,19	1,99	,89	3,53	,60
<b>Grup 5</b>	1,88	1,55	2,16	1,89	,47	2,98	,65
<b>Grup 6</b>	1,85	1,59	2,04	1,93	,68	5,62	,86

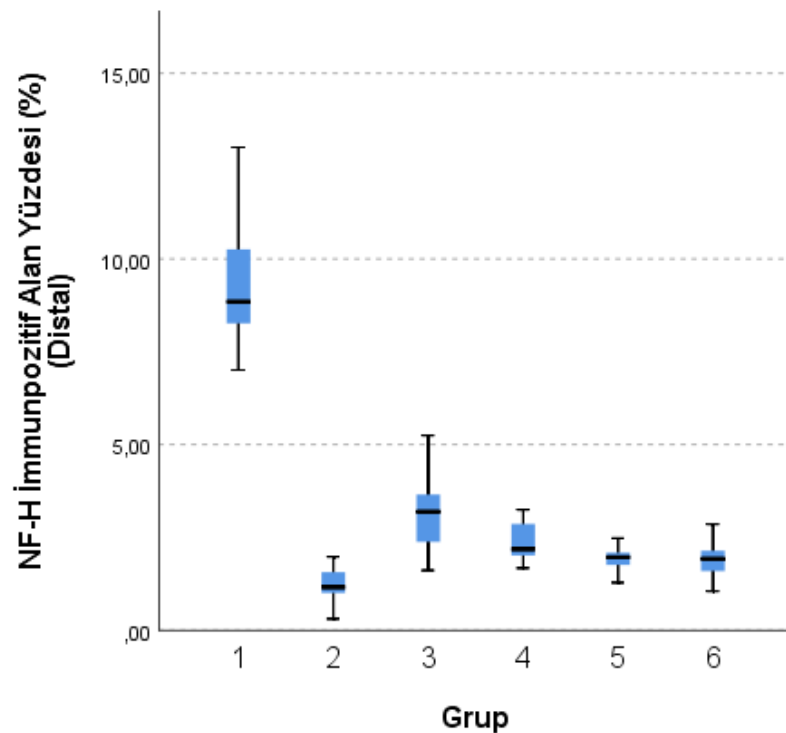


**Şekil 4.30.** Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (orta) karşılaştırma grafiği

Distal bölüme ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi değerlendirildiğinde (Şekil 4.31, Tablo 4.19); anlamlı en düşük NF-H immünpozitif alan yüzdesi grup 2’de iken, anlamlı en yüksek değer ise grup 1’de izlendi. Grup 3 NF-H immünpozitif alan yüzdesi grup 5 ve 6’ya göre anlamlı olarak yüksekken (sırasıyla;  $p=0.001$  ve  $p<0.001$ ); grup 4 ile arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık yoktu. Grup 4’ e ait immünpozitif alan yüzdesi grup 5 ve 6’ ya göre yüksek olsa da bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla;  $p=0.303$  ve  $p=0.247$ ). Grup 5 ve 6 arasında istatistiksel olarak anlamlılık izlenmedi.

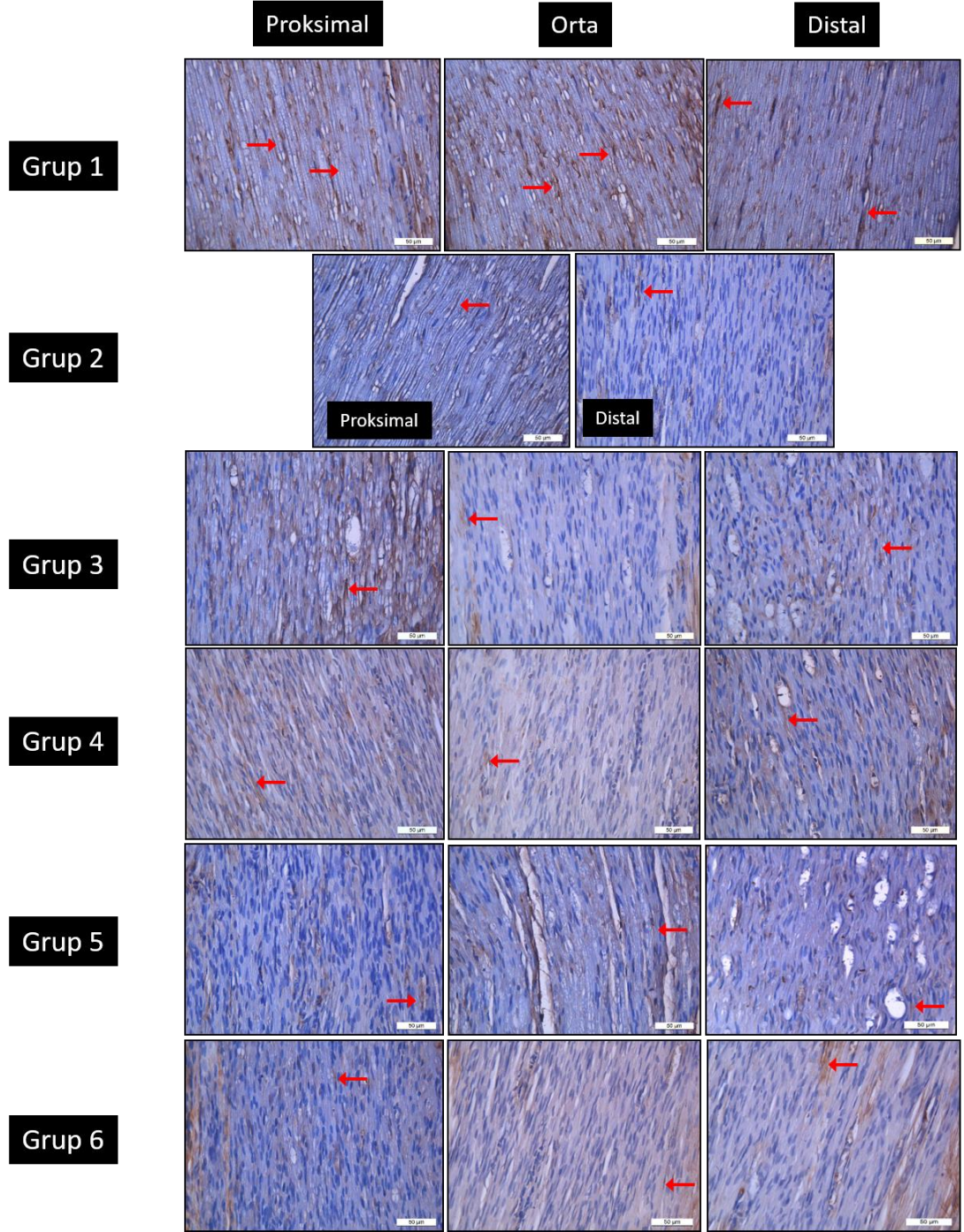
**Tablo 4.19.** Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (distal) tanımlayıcı verileri

		NF-H İmmünpozitif Alan Yüzdesi (%) (Distal)						
		Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
Grup	1	8,85	8,26	10,26	9,39	7,01	14,34	1,81
	2	1,17	1,01	1,57	1,14	,15	1,98	,52
	3	3,20	2,38	3,66	3,16	1,62	5,25	,92
	4	2,19	2,02	2,87	2,39	1,67	3,25	,46
	5	1,97	1,76	2,09	1,92	1,05	2,60	,36
	6	1,92	1,60	2,15	1,91	,13	2,99	,61



**Şekil 4.31.** Gruplara ait NF-H immünpozitif alan yüzdesi (distal) karşılaştırma grafiği

Grupların periferik sinir kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait NF-H immünboyama görüntüleri Şekil 4.32’de verilmiştir.



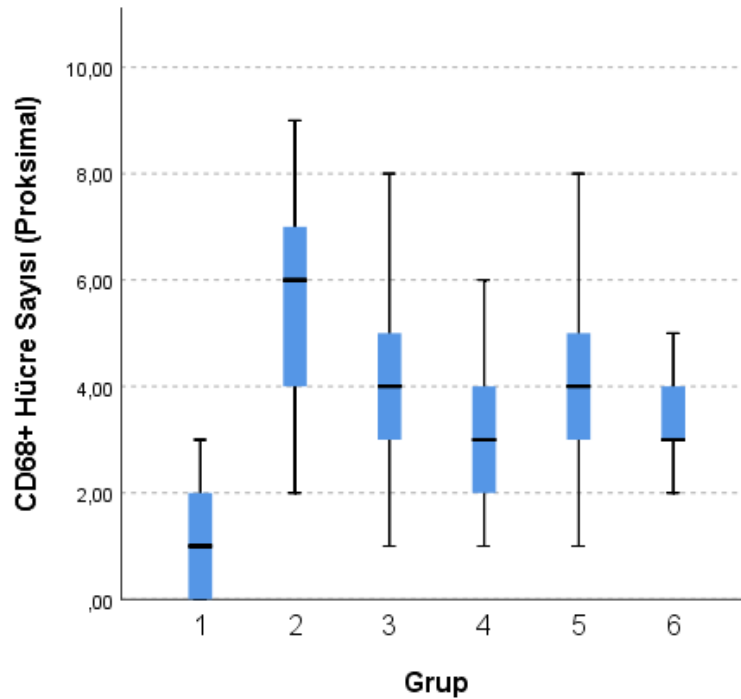
**Şekil 4.32.** Periferik sinir kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait NF-H immunreaktivitesi gösteren akson yapıları (→) izlenmekte (DAB-Hematoksilen, 400 X, bar 50 µm).

#### 4.4.6. CD68 Pozitif Hücre Sayısı

Deney grupları arasındaki CD68 pozitif hücre sayısı periferik sinir proksimalinde değerlendirildiğinde (Şekil 4.33, Tablo 4.20); grup 1 tüm gruplar arasında en düşük CD68 immünpozitif hücre sayısına sahipti ( $p<0.001$ ). Grup 4 grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı daha düşük CD68 pozitif hücre sayısına sahipken ( $p<0.001$ ), grup 3, 5 ve 6 ile arasında bir anlamlılık izlenmedi. Grup 2, grup 6'ya göre daha yüksek pozitif hücreye sahipken ( $p=0.009$ ), grup 3 ve 5 ile arasında bir anlamlılık yoktu (sırasıyla;  $p=0.135$  ve  $p=0.082$ ).

**Tablo 4.20.** Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (proksimal) tanımlayıcı verileri

		CD68 Pozitif Hücre Sayısı (Proksimal)					
	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
1	1,00	2,00	,00	1,03	,00	3,00	,89
2	6,00	7,00	4,00	5,67	2,00	9,00	1,97
3	4,00	5,00	3,00	4,03	1,00	8,00	1,79
4	3,00	4,00	2,00	3,07	1,00	6,00	1,17
5	4,00	5,00	3,00	3,90	1,00	8,00	1,73
6	3,00	4,00	3,00	3,57	1,00	7,00	1,48

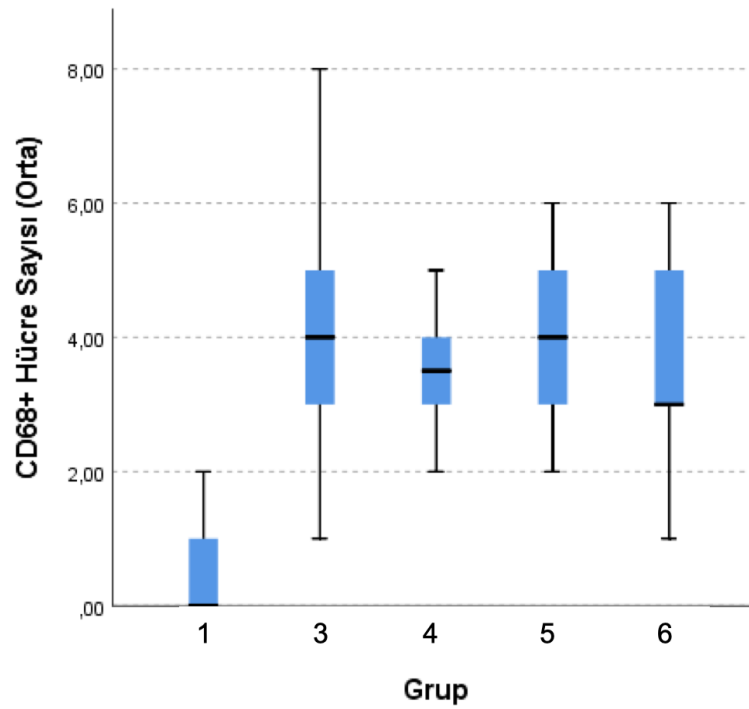


**Şekil 4.33.** Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (proksimal) karşılaştırma grafiği

Orta bölüme ait CD68 immünpozitif hücre sayıları değerlendirildiğinde (Şekil 4.34, Tablo 4.21); grup 1’de izlenen istatistiksel olarak anlamlı en düşük CD68 immünpozitif hücre sayısının devam ettiği ( $p<0.001$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık olmadığı gözlemlendi.

**Tablo 4.21.** Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (orta) tanımlayıcı verileri

		Cd68 Pozitif Hücre Sayısı (Orta)					
	Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
<b>1</b>	,00	,00	1,00	,47	,00	2,00	,63
<b>3</b>	4,00	3,00	5,00	4,00	1,00	8,00	1,53
<b>Grup 4</b>	3,50	3,00	4,00	3,70	2,00	8,00	1,37
<b>5</b>	4,00	3,00	5,00	3,97	2,00	6,00	1,19
<b>6</b>	3,00	3,00	5,00	3,50	1,00	6,00	1,31



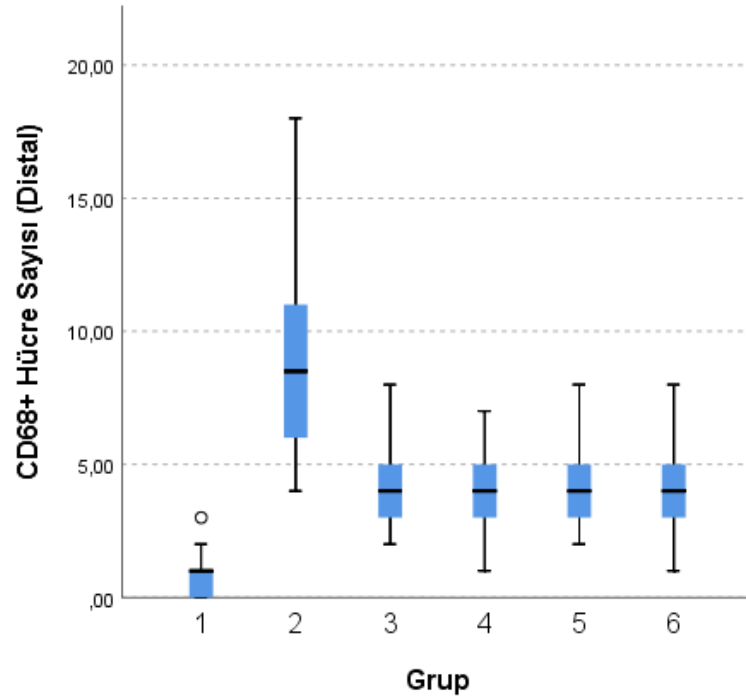
**Şekil 4.34.** Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (orta) karşılaştırma grafiği



CD68 pozitif hücre sayısı periferik sinir distalinde değerlendirildiğinde (Şekil 4.35, Tablo 4.22); anlamlı olarak grup 1’de en düşük iken ( $p<0.001$ ), grup 2’de en yüksek sayıya sahipti ( $p<0.001$ ). Grup 4 ile grup 5 ve 6 arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık izlenmedi.

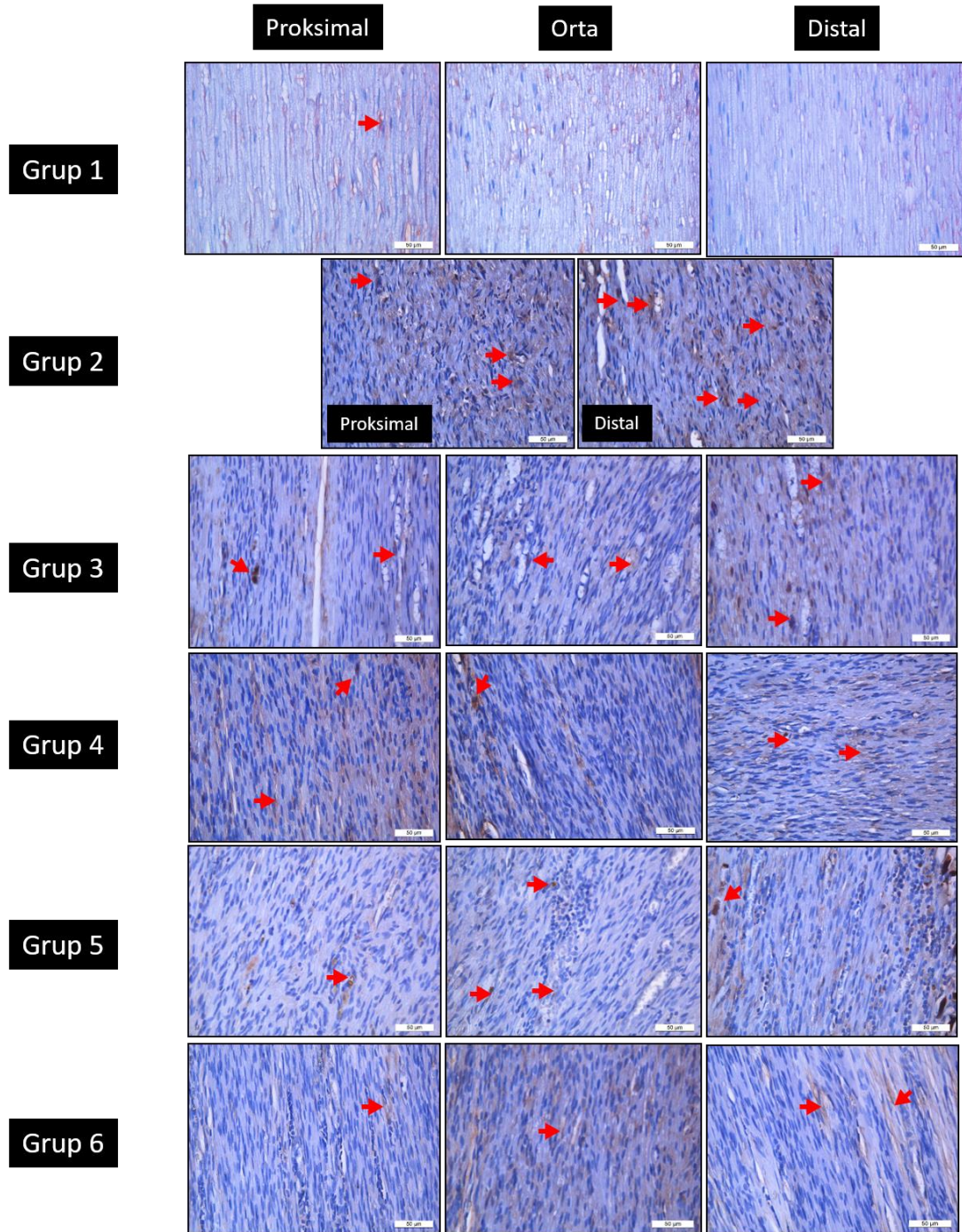
**Tablo 4.22.** Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (distal) tanımlayıcı verileri

		CD68 Pozitif Hücre Sayısı (Distal)						
		Ortanca	Persentil 25	Persentil 75	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma
Grup	1	1,00	,00	1,00	,73	,00	3,00	,83
	2	8,50	6,00	11,00	9,17	4,00	18,00	3,59
	3	4,00	3,00	5,00	4,07	2,00	8,00	1,34
	4	4,00	3,00	5,00	4,03	1,00	7,00	1,59
	5	4,00	3,00	5,00	4,27	2,00	8,00	1,48
	6	4,00	3,00	5,00	4,23	1,00	8,00	1,57



**Şekil 4.35.** Gruplara ait CD68 pozitif hücre sayısı (distal) karşılaştırma grafiği

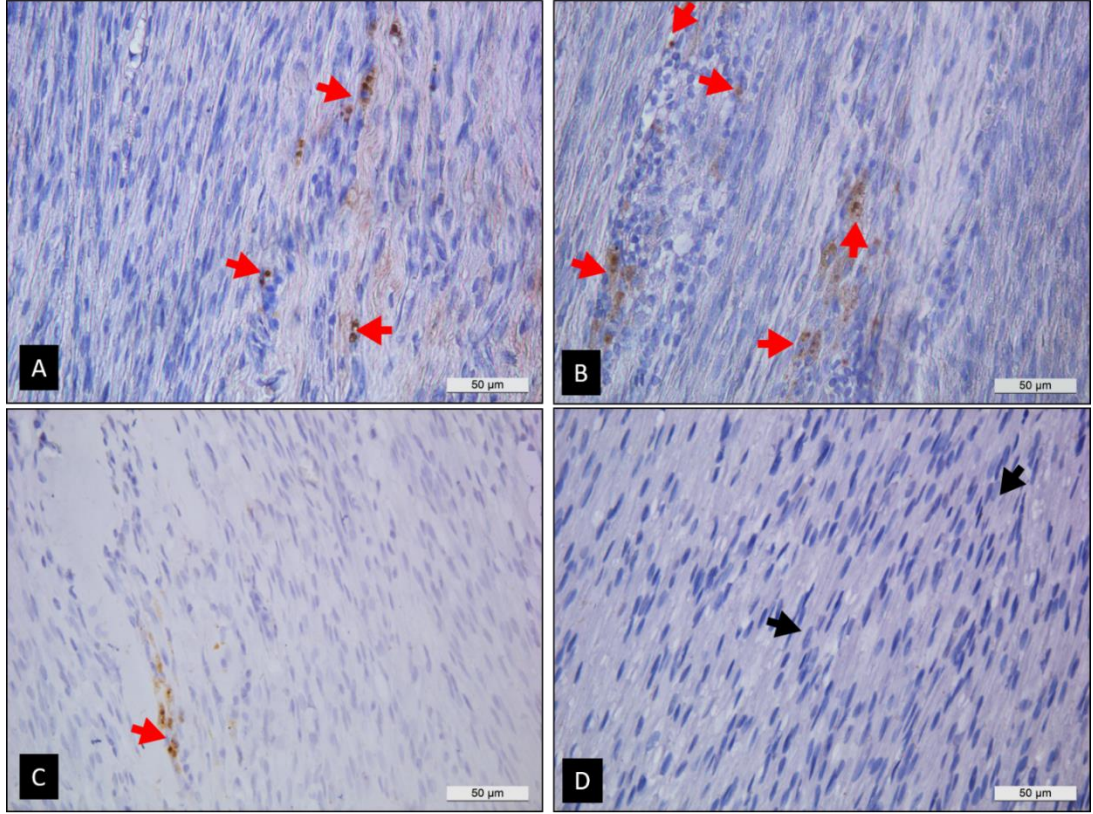
Grupların periferik sinir kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait CD68 immünboyama görüntüleri Şekil 4.36'da verilmiştir.



**Şekil 4.36.** Periferik sinir kesitlerinde proksimal, orta ve distal bölümlere ait CD68 immunreaktivitesi gösteren CD68 pozitif hücreler (➔) izlenmekte (DAB-Hematoksilen, 400 X, bar 50 µm)

#### 4.4.7. BrdU İmmünohistokimya Bulguları

4. grup yapısında yer alan hücre tabakasındaki AKMKH varlığının transplantasyon sonrasında izlenmesi için AKMKH tabakası BrdU ile işaretlenmişti. Sakrifikasyon sonrası sinir şpemenleri incelendiğinde, 4. Gruba ait sinir şpemenlerinde BrdU pozitif hücrelerin halen sebat ettiği görüldü (Şekil 4.37).



**Şekil 4.37.** BrdU immünohistokimya boyaması. Grup 4'e ait kesitlerde BrdU pozitif hücreler (kırmızı ok) (A-C) izlenirken, kök hücre uygulanmayan grupta BrdU negatif hücreler görülmekte (D). (DAB-Hematoksilen, 400 X, bar 50 µm)

## 5. TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmalarında, yetersiz sinir iyileşmesi sonucu kalıcı motor, duyuşal ve otonomik fonksiyon kayıpları olabilmektedir. Tedavide, tam kat sinir kesisi olduğu durumlarda, sinir gerginlik olmadan onarılabiliyor ise uç uca onarım yapılır. Ancak sinir proksimal ve distal kısmı uç uca gelmediği durumlarda sinir greftleri, kondüitler ve allogreftler gibi başka tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır (1, 2, 183).

Sinir dokusunda kayıp olan periferik sinir yaralanmalarının rekonstrüksiyonunda tedavide altın standart yöntem otolog sinir greftleridir. Otolog sinir greftleri yapısal, kimyasal ve hücreşel bileşimi açısından sağlıklı sinirlere en yakın benzerliği sağlamasına rağmen, optimal fonksiyonel iyileşme henüz sağlanamamıştır (3). Verici alanda fonksiyonel kayıp, yara iyileşme bozuklukları, enfeksiyon, anestezi, parestezi, nöroma oluşumu, ağrı ve ek yara izleri oluşturma gibi dezavantajlarının yanı sıra, alıcı ve greft sinir uçları arasındaki çap uyumsuzlukları, yabancı cisim reaksiyonu yaratan fazla dikiş kullanılması ve uzamış ameliyat süresi otolog sinir grefti kullanımının olumsuz yönlerindedir (4, 184). Ayrıca, insan vücudundaki donör sinirlerin sınırlı mevcudiyeti nedeniyle de otolog sinir greftlerine alternatifler geliştirme zorunluluğu doğmuştur (185).

Allogreft ile tedavide; antijenik problemler öne çıkmaktadır. Uygun ilaç tedavisi ve proksimal sinir ucunun allogreft kılıf içerisinde ilerlemesi süresince alıcı immünsüpresyonu gerektirmektedir (60). Bu durum, sinir rekonstrüksiyonunda allogreft tercih edilmeme nedenlerinden en önemlisi olarak söylenebilir (10).

Nöral rejenerasyon için biyolojik (amniyotik membran, arter, ven, kas vb.) ve sentetik kondüit [polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), kollajen, silikon, plastik vb.] kullanımı da tedavi seçenekleri arasındadır (186, 187). Ancak sentetik kondüitlerin; yabancı cisim reaksiyonu meydana getirmesi ve kontrolsüz inflamasyona neden olması gibi kısıtlamaları öne çıkmaktadır. Sentetik materyallerden yüksek saflıkta polimer kondüit üretmek fazlaca zaman gerektirmektedir ve maliyetli olmaktadır. Sentetik kondüitlerin elastisite ve sertlik karakterleri de yetersiz olmaktadır (188, 189). Arter ve ven greftleri de bir tedavi yöntemi olarak

düşünülmekle birlikte otogreft tedavi ile karşılaştırıldığında bu tedavilerin başarı oranları düşük seyretmektedir (190, 191).

Bu nedenle periferik sinir kayıplarının tedavisinde morbiditesi daha az, daha kolay ve daha iyi fonksiyonel sonuçlar sağlayacak bir yöntem bulma çalışmaları sürmektedir. Biyolojik skafold materyalleri, hücre temelli tedaviler, nörotrofik faktörler ve ekstrasellüler matriks sinir rejenerasyonunu arttırmak için periferik sinir doku mühendisliğinde araştırılan dört temel konudur (24, 188).

Uzun süredir ana hedef, doğal sinir dokusunun geometrik tasarımına ve moleküler bileşimine benzeyen bir implantın geliştirilmesidir. İlk başlarda proksimal ve distal sinir uçlarını birleştiren boş tüpler kullanılmış (192), sonraki çalışmalarda aksonal rejenerasyonu yönlendirmek için mikro yapılandırılmış sinir yönlendirici öğeler (örn; mikrokanallar, nano-lifler ve ekstrasellüler matriks) eklenerek geliştirilmiştir (193). Yönlendirilmiş yapısal bileşenlerin yanı sıra, kondüitler sinir boşlukları boyunca aksonal rejenerasyonu desteklemek için bir dizi hücre tipiyle zenginleştirilmiştir. Zenginleştirme Schwann hücreleri, mezenkimal stromal hücreler veya adipositler gibi alternatif hücre tipleri ile gerçekleştirilmiştir (190, 194).

Sinir rejenerasyonunda hücre temelli tedavi yaklaşımlarında transplante edilecek popüler hücre Schwann hücreleri olmuştur (195). Ancak Schwann hücreleri, zor hasat edileceğinden ve kültürde hızlı ekspande edilememesi nedeniyle rejenerasyon desteği için Schwann hücrelerinden başka hücre tiplerinin kullanılması potansiyel klinik uygulamalar için büyük önem taşımaktadır (196). Alternatif olarak; MKH'lerin, aksonal rejenerasyonu destekleyen Schwann hücresi benzeri hücreler arasında farklılaşma için iyi bir aday olabileceği düşünülmektedir (110, 111). MKH'ler, Schwann hücrelerine kıyasla kolaylıkla hasat edilebilir ve periferik sinir rejenerasyonunu destekleme gereksinimlerine göre ayarlanabilen bir hücre plastisitesine sahiptir (111, 197).

Yapılan pek çok çalışmada sıçan AKMKH'lerin periferik sinir onarımında Schwann hücreleri yerine alternatif hücre kaynağı olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (5, 198).

Di Summa ve ark. 2010 yılında sıçanlarla yaptığı çalışmada, 10 mm boşluklu siyatik sinir hasarı oluşturulduktan sonra; boş fibrin kondüit, fibrin kondüit ile birlikte

AKMKH, KİKMKH ve Schwann hücreleri ile tedavi uygulanmış. 2 hafta sonra sıçanlar sakrifiye edilmiş ve kondüitler proksimal ve distal segmentleri ile birlikte analiz edilmek üzere eksize edilmiştir. Anti-S-100 ve anti-PGP 9,5 immünohistokimyasal boyalar ile değerlendirme sonucunda, boş fibrin kondüite göre tüm gruplarda daha iyi sinir iyileşmesi elde edildiği raporlanmıştır. Bu çalışmada AKMKH'nin sinir iyileşmesini anlamlı ölçüde arttırdığı ve Schwann hücre izolasyonunun yarattığı donör alan morbiditesi limitasyonuna alternatif olduğu belirtilmiştir (199).

Çalışmamızda grupların periferik sinir proksimal bölümünün S100 immünopozitif alan yüzdesi değerlendirildiğinde; AM ve AKMKH tabakası kullanılan grup, PGA tüp kondüit ve sadece AM kullanılan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek S100 pozitif alan yüzdesine sahip olduğu görülmüştür. Sinir orta (rejenerasyon) bölümünde ise; AM ve AKMKH tabakası kullanılan grup S100 immünopozitif alan yüzdesi sadece AM kullanılan gruba göre anlamlı olarak yüksek olup, sinir grefti ve PGA tüp kondüit kullanılan gruplara göre anlamlı olmasa da yüksek olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, AKMKH tabakasının miyelinizasyonu ve sinir rejenerasyonunu arttırdığını düşündürmektedir.

Orbay ve ark. 2011 yılında farklılaştırılmış ve farklılaştırılmamış AKMKH'nin sinir rejenerasyonuna etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, sıçanlar denek olarak seçilmiş ve 10 mm sinir defekti oluşturulmuş. Silikon kondüit, silikon kondüit ile kollajen jel, sinir grefti, silikon kondüit ile farklılaştırılmış AKMKH, silikon kondüit ile farklılaştırılmamış AKMKH ile sinir onarımları yapılmış. SFI ile yapılan değerlendirmede, 3. ve 6. ayda farklılaştırılmış ve farklılaştırılmamış AKMKH uygulanan gruplarda istatistiksel farklılık saptanmazken, 6. ayda AKMKH uygulanan gruplar diğer gruplara göre daha iyi fonksiyonel iyileşme göstermiştir. Sinir ileti hızlarına bakıldığında, farklılaştırılmış ve farklılaştırılmamış AKMKH uygulanan gruplar arası farklılık görülmemiş. Histolojik incelemede miyelin organizasyonu ve miyelin rejenerasyonu değerlendirilmiş; miyelinli akson yoğunluğu orta bölüm ve distal bölümde AKMKH uygulanan gruplarda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulunmuş olup, kendi aralarında anlamlı farklılık bulunamamıştır (200).

Çalışmamızda; gruplar arası miyelinli akson sayısını karşılaştırmak amacıyla yapılan Luxol Fast Blue boyama sonrasında, orta bölüme ait miyelinli akson sayısı; AM ve AKMKH tabakası kullanılan grupta ortalama değeri PGA tüp kondüit ve sadece AM kullanılan gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Periferik sinir distal bölüme ait miyelinli akson sayısının, AM ve AKMKH tabakası kullanılan grupta ortalama değeri PGA tüp kondüit kullanılan gruptan anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür.

Klein ve ark. 2016 yılında otolog AKMKH'nin sinir rejenerasyonuna etkisini değerlendirmek üzere sıçanlarla yaptığı çalışmada, 10 mm boşluklu siyatik sinir hasarı oluşturulmuş. AKMKH ile ekim yapılmış tip 1 kollajen sinir kondüiti ve ekim yapılmamış tip 1 kollajen sinir kondüiti grupları kullanılarak gruplar arası karşılaştırma yapılmış. Grupların sinir ileti hızları hesaplanmış ve S100 immunreaktiviteyi değerlendirilmiş. AKMKH ile ekim yapılan grupta sinir ileti hızlarının ve S100 immunreaktivitelerinin anlamlı olarak yüksek bulunduğu raporlanmıştır (201).

Çalışmamızdaki grupların fonksiyonel sonuçlarına bakıldığında; iğne batırma (pin-prick) testi 8. hafta sonuçları AM ve AKMKH tabakası ile hazırlanan kondüit grubu, PGA tüp kondüit ve otolog sinir grefti ile yapılan onarımlardan anlamlı olarak daha yüksekken; 16. hafta sonunda istatistiksel fark saptanmamıştır. Sfi analizinde AM ve AKMKH tabakası ile hazırlanan kondüit grubu 12. haftanın sonunda PGA tüp kondüit ve sadece AM kullanılan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı daha iyi sonuç göstermiştir. 16. haftada da değerlerde yükseklik saptansa da istatistiksel anlam bulunamamıştır. Bu sonuçlar, AM ve AKMKH tabakası kullanılan grupta rejenerasyonun daha hızlı olduğuna işaret etmektedir.

Perkütan non-invaziv elektrofizyolojik testler; sıçanın cilt kalınlığı, yağ oranı, elektrotların konulduğu yer, tıraşın kalitesi dahil olmak üzere birçok parametreden etkilenebilmektedir. Bu nedenle elektrofizyolojik verileri standardize hale getirmek ve nöral iyileşmeyi zamana göre takip edebilmek için her sıçanın deneysel uzvunun bileşik kas aksiyon potansiyellerini, sağlam taraf ile kıyaslayıp indeks değerler elde edilebilmektedir (175). Bu çalışmada indeks değerler daha yorumlanabilir bulunmuştur.

Çalışmamızda tüm grupların 4 haftada bir bileşik kas aksiyon potansiyelleri ölçülmüş ve sinir rejenerasyonunun zamana göre değişimleri incelenmiştir. İzoelektrik hattaki parazitlenme sebebiyle bir kısım latans verileri doğru toplanamamıştır bu nedenle sinir ileti hızları hesaplanamamıştır. Sinir ileti hızını yorumlamamıza yarayacak bir diğer parametre mV/sn değerlerini verdiği için eğim ve eğim indeksi olarak düşünülmüştür. Her iki parametrede de en düşük değerler negatif kontrol grubunda elde edilmiştir. Diğer elektrofizyolojik verilerimiz değerlendirildiğinde de negatif kontrol grubu diğer gruplardan düşük olarak bulunmuştur.

AKMKH kullanımının birçok avantajı bulunmaktadır. Yağ dokusunda birçok dokuya göre daha fazla kök hücre popülasyonunun bulunması sayesinde elde edilebilirliğinin daha kolay olmasının yanında AKMKH'lerin nörotrofik faktörler salgılaması, miyelin oluşumunda rol alabilmesi, alıcı Schwann hücrelerini, rejenerasyona yardımcı olmaları için uyarmaları bu avantajlar arasında yer almaktadır (5, 202, 203).

Kök hücrelerin transplantasyonu sırasında enjeksiyon ya da mikroenjeksiyon yöntemlerinin kullanılması hem kök hücrelere hem de intra-nöral mimariye travmatik bir yöntemdir. Aynı zamanda enjeksiyon yöntemleri anormal kök hücre dağılımlarına neden olup, sinir iyileşmesi için gerekli olan optimal 3 boyutlu geometrik yapının oluşmasına engel bir durumdur (6, 108). Uygun koşullar sağlandığında AKMKH ile hücre tabakası yapısı elde edilebileceği bilinmektedir. AKMKH kullanılan bazı çalışmalarda 6 gözlü hücre kültür kaplarında  $2 \times 10^6$  hücre/göz yoğunlukta AKMKH ekimi yapılmış ve 48 saatlik kültür sonunda hücre tabakaları elde edilmiştir (204, 205). Yu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kültür ortamına askorbik asitin kararlı bir formu olan askorbat-2-fosfat ilave ederek 7 gün içerisinde hücre tabakası elde etmişler ve askorbik asitin pluripotensi genlerinde artışa neden olduğunu belirtmişlerdir (206). AM biyobozunur bir doku olduğundan diğer çalışmalarda kullanılmış olan sentetik kondüitlerde rastlanan bazı komplikasyonların (yabancı cisim reaksiyonu, artmış inflamatuvar reaksiyon vb.) gelişmediği görülmüştür. AM'nin; uygun boyut ve miktarda kolay hazırlanabilmesi, immünojenik olmaması, neovaskülarizasyonu desteklemesi, biyoyumlu olması ve sinir rejenere oldukça biyodegrade olabilmesi, kolay manipüle edilebilmesi ve sinir iyileşmesini desteklemesi nedeniyle deneysel ve klinik çalışmalarda nöral rejenerasyonu arttırma amacıyla kullanılmaktadır (7, 77, 78).



Mohammad ve ark. Sprague-Dawley türü sıçanların siyatik sinirleri üzerinden 1 cm'lik defekt oluşturduktan sonra amniyotik membranı kondüit olarak kullanmış ve amniyotik membran; sinir otogreftleri ve silikon kondüitlerle karşılaştırmıştır. Sıçanların periferik sinir rejenerasyonunu 2,4,10 ve 17. haftalarda siyatik fonksiyonel indeks ve histomorfolojik testlerle değerlendirilmiştir. Amniyotik membran kullanılan hayvan grubu ile otogreft kullanılan grup karşılaştırıldığında 4. ay akson sayımlarının birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Amniyotik membran kullanılan grupta sinir rejenerasyonunun silikon tüp kullanılan gruba göre daha üstün olduğu belirtilmiştir (77).

Li ve ark. 2012 yılında Sprague-Dawley türü sıçanların siyatik sinirleri üzerinde 6-8 mm'lik defekt oluşturduktan sonra, sıçanları iki gruba ayırmış. Bir grubu AM kondüitten, diğer grubu AM kondüit içerisine UKMKH enjekte ederek oluşturmuş ve sinir rejenerasyonuna etkisini değerlendirmiş. 8,12,16 ve 20. haftalarda yapılan sfi ve gastroknemius kas ağırlık indeksi, kök hücre enjekte edilen grupta daha yüksek bulunmuş. H&E boyama sonrasında kök hücre enjekte edilen grupta sinir liflerinin daha düzenli olduğu belirtilmiş ve gastroknemius kas çapı daha yüksek bulunmuş (207).

Çalışmamızda, H&E boyama sonrasında periferik sinir genel histolojik yapısı ve aksonal organizasyon değerlendirildiğinde; sinir defekti oluşturulan grupta görülen ileri derecede dejenerasyon bulguları ile karşılaştırıldığında, AM ve AKMKH tabakası kullanılan grupta dejeneratif histolojik değişimlerin yanı sıra, rejenere sinir lifleri ve aksonal organizasyonda iyileşme izlenmiştir. Gastrokinemius kas dokularının histomorfometrik ölçümlerine bakıldığında; gastroknemius kollajen lif alan yüzdesi ortalama değeri AM ve AKMKH tabakası kullanılan grupta, PGA tüp kullanılan gruba göre anlamlı düşük bulunmuş olup, sadece AM kullanılan gruba göre de daha düşük olmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kas lifi çapı değerlendirmesinde ise; AM ve AKMKH tabakası kullanılan grup, otolog sinir grefti kullanılan gruba göre daha düşük iken, PGA tüp kondüit ve sadece AM kullanılan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. 16. haftanın sonunda gastroknemius kas atrofilerinin değerlendirilmesinde; AM ve AKMKH tabakası kullanılan grupta kas ağırlık indeksi, PGA tüp kondüit kullanılan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Sadece AM kullanılan gruba kıyasla kas ağırlık indeksinde istatistiki fark saptanmasa da yüksek olarak bulunmuştur.

Proinflamatuvar sitokinler aracılığıyla inflamasyonda önemli role sahip makrofajlar CD68 ile belirlenmiştir. CD68 pozitif hücre sayısının değerlendirilmesi sonucu, sinir defekti oluşturulan grupta en fazla sayıda iken diğer gruplarda azalan yoğunluk, makrofaj infiltrasyonunun sinir hasar derecesi ile korelasyonunu göstermektedir. AM ve AKMKH tabakası kullanımında, endonöral makrofajların aktivasyonunun dejeneratif alanlarda miyelin debris uzaklaştırılmasında ve hasar sürecindeki rolünü ortaya koymaktadır.

AM'nin sinir defektlerinde kondüit olarak kullanımının yanı sıra, sinir onarım hatlarının üzerine sararak koruyucu bariyer olarak kullanıldığı çalışmalarda literatürde mevcuttur.

Meng ve arkadaşları insan amniyotik membranının sinir iyileşmesi üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile Sprague-Dawley türü sıçanlar üzerinde siyatik sinir üzerinde 1 cm'lik defekt oluşturup otolog sinir grefti ile onarım yapmıştır. 32 adet sıçan randomize olarak 2 gruba ayrıldıktan sonra 1. grup sinir onarım hattı insan amniyotik membranı ile sarılmış, 2. grup insan amniyotik membranı ile sarılmamıştır. Sıçanlar morfolojik ve fonksiyonel olarak değerlendirildikten sonra insan amniyotik membranı kullanılarak yapılan onarımda adhezyon ve skar formasyonunun daha az olduğu belirtilmiştir. Yazarlar ayrıca özellikle erken dönemde insan amniyotik membranı kullanımının fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığını yazmaktadır (7).

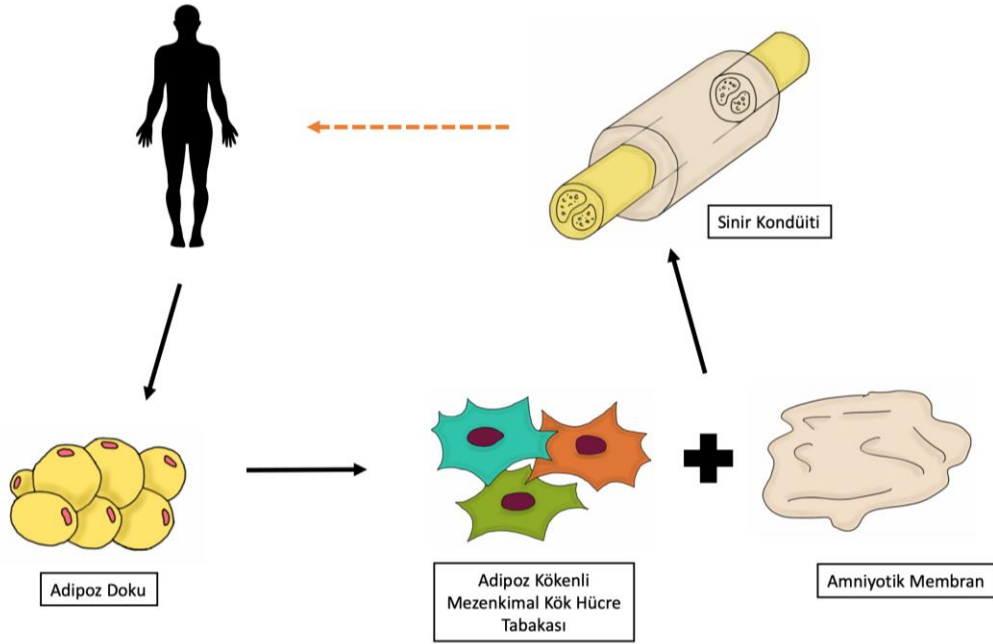
Li ve arkadaşlarının 2013 yılında 32 hasta üzerinden yaptıkları klinik bir çalışmada, radial sinir hasarı olan hastalarda AM ve UKMKH kullanılarak periferik sinir iyileşmesine etkisi değerlendirilmiştir (78). Çalışma, radius kemik kırığı sonrası sinir bütünlüğünün devam ettiği, ama sinir hasarı oluşmuş hastalar üzerinden yapılmıştır. Çalışmada sinir bütünlüğünün bozulduğu, defektif (boşluklu) sinir hasarı tipi bulunmamaktadır. Çalışma 2 grup içermektedir; 1. grupta radial sinir nöroliz (sinirin çevre dokulardan ve yapışıklıklardan serbestlenmesi) edildikten sonra hasarlı görünen kısım amniyotik membran ile sarılmış ve umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücreler enjekte edilmiştir. 2. grupta ise radial sinire sadece nöroliz uygulanmıştır. Gruplar 12 hafta sonunda kas gücü, dokunma ve ağrı duyuları üzerinden karşılaştırıldıklarında 1. gruptaki iyileşmenin daha fazla olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda; doku mühendisliği alanında güncel bir yaklaşım olan hücre tabaka teknolojisi (cell sheet technology) ile elde edilen AKMKH tabakası ve AM'nin kombinasyonu ile üretilen, tamamen biyolojik 2 tabakalı sinir kondüiti kullanılmıştır. AKMKH'ler tabaka şeklinde üretilip daha sonra AM ile birleştirilmiştir. Kök hücre tabakasının ECM içeriğinin yapışkan özelliği ve AM'nin esnek yapısı iki tabakanın kolaylıkla birleştirilmesine olanak sağlamıştır (Bkz. Şekil 4.3). Elde edilen 2 tabakalı biyolojik kondüit *in vivo* transplantasyon sırasında alıcı dokuya kolaylıkla yerleştirilebilmesini sağlamıştır. Ek olarak hücre tabakası şeklinde yapılan uygulama sayesinde kök hücreler transplantasyon öncesi tripsin gibi enzimatik uygulamalar kullanılmadan yüzeyden kaldırıldığı için hücrelerin zarar görmedikleri öngörülmektedir. Kök hücre tabakası sayesinde, doğal dokularda olduğu gibi hücreler, uygulama sırasında birbirleriyle iletişim halinde kalmışlardır. Ayrıca süspanse halde kondüit içerisine verilen hücrelerin dolaşıma katılarak hedef iyileşme bölgesinden uzaklaşması söz konusu olabilirken, *in vitro* da amniyotik membran ile hücre tabakasının bir araya getirilmesiyle transplantasyon sonrası hücreler nöral rejenerasyon bölgesinde kalmışlardır.

Çalışmamızda; 4. grup yapısında yer alan hücre tabakasındaki AKMKH varlığının transplantasyon sonrasında izlenmesi için AKMKH tabakası BrdU ile işaretlenmişti. Sakrifikasyon sonrası sinir spesmenleri incelendiğinde, 4. gruba ait sinir spesmenlerinde BrdU pozitif hücrelerin halen sebat ettiği saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.37). Bu sonuç 16 haftanın sonunda kök hücre tabakasının hedef bölgede kaldığını ve bu hücrelerin çoğaldığını immünohistokimyasal olarak göstermektedir.

Periferik sinirler, defekt oluştuğunda sinir uçlarında meydana gelen tomurcuklanma (neuronal sprouting) yoluyla iyileşme göstermektedir (9, 208). Bu nedenle sinir defektlerinin onarımlarına ilişkin deneysel çalışmalar ve geliştirilen sinir kondüitleri temelde bu prensibi dikkate alarak tasarlanmaktadır. Bu kapsamda kritik boyutlu sinir defektinin (tercih edilen hayvan türü için siyatik sinir modelinde 1 cm.) oluşturulmasını takiben mutlaka sinirin iyileşmesine ve ilerlemesine olanak sağlayacak şekilde, luminal yapısı olan yani ortasında boşluk içeren bir kondüit olmalıdır. Çalışmamızda da amniyotik membran ve kök hücre tabakası ile tamamen biyolojik bir kondüit tasarlanmış olup, merkezinin boş olması ve luminal yapının oluşturulması dikkate alınmıştır.

AM ve AKMKH tabakası kullanılarak oluşturulan kondüitin periferik sinir yaralanmalarında klinik uygulamalarda da kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Periferik sinir yaralanması ile başvuran hastadan, öncelikle adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler izole edilip, kök hücre tabakası ile amniyotik membran birleştirildikten sonra hastaya implante edilerek sinir onarımı yapılabilir. Klinik kullanımına örnek olabilecek senaryo Şekil 5.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 5.1.** AKMKH tabakası ve AM den oluşturulan sinir kondüitin periferik sinir yaralanmalarında kullanımına yönelik klinik senaryo

Çalışmamızda kullanılan kondüitin literatürdeki diğer çalışmalardan farkı; **‘hücre tabaka teknolojisi (cell sheet technology)’** ile elde edilen **‘adipoz kökenli mezenkimal kök hücre tabakası’** ile kondüitin iç tabakasının oluşturulmuş olmasıdır.

Literatürde mevcut olan ve kök hücrelerin kullanıldığı çalışmalarda kök hücreler sentetik/doğal olarak hazırlanmış kondüitler içerisine süspanse halde ekilmiştir. Bilgimiz dahilinde, şu ana kadar sinir kondüitlerinin geliştirilmesinde hücre tabakalarının tek başına ya da amniyotik membran ile birlikte kullanıldığı herhangi bir araştırma çalışması ve/veya klinik uygulama bulunmamaktadır. Çalışma, bu yenilikçi yaklaşımıyla kondüit tasarımında öncü niteliği taşımaktadır.

## 6. SONUÇ

Sonuç olarak; adipoz kökenli mezenkimal kök hücre tabakası ve amniyotik membrandan oluşturulan biyolojik kondüitin, periferik sinir rejenerasyonunda olumlu etkileri gözlenmiştir. Analizler sonucunda, adipoz kökenli mezenkimal kök hücre tabakası ve amniyotik membran kullanılan grup; rejenere akson sayısı, miyelin formasyonu ve denerve kas atrofisinin restorasyonunda PGA tüp kondüit ve amniyotik membran kullanılan gruptan üstün bulunmuştur. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücre tabakası ve amniyotik membrandan oluşturulan biyolojik kondüitin klinik uygulamalarda sinir otogreftine alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. 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.
2. Weber RV, Mackinnon SE. Bridging the neural gap. *Clinics in plastic surgery*. 2005;32(4):605-16, viii.
3. 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.
4. Ciaramitaro P, Mondelli M, Logullo F, Grimaldi S, Battiston B, Sard A, et al. Traumatic peripheral nerve injuries: epidemiological findings, neuropathic pain and quality of life in 158 patients. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*. 2010;15(2):120-7.
5. Georgiou M, Golding JP, Loughlin AJ, Kingham PJ, Phillips JB. Engineered neural tissue with aligned, differentiated adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration across a critical sized defect in rat sciatic nerve. *Biomaterials*. 2015;37:242-51.
6. Jiang L, Jones S, Jia X. Stem Cell Transplantation for Peripheral Nerve Regeneration: Current Options and Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(1).
7. Meng H, Li M, You F, Du J, Luo Z. Assessment of processed human amniotic membrane as a protective barrier in rat model of sciatic nerve injury. *Neuroscience letters*. 2011;496(1):48-53.
8. Eşrefoğlu M. Genel ve özel histoloji : renkli resimli. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2004.
9. Mescher AL, Junqueira LCU. *Junqueira's basic histology : text and atlas*. New York: McGraw-Hill Medical; 2013.
10. Janis JE. *Essentials of plastic surgery*. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing; 2014.

11. Ross MH, Pawlina W. *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2016.
12. Rolls MM, Jegla TJ. Neuronal polarity: an evolutionary perspective. *Journal of Experimental Biology*. 2015;218(Pt 4):572-80.
13. Südhof TC, Malenka RC. Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron*. 2008;60(3):469-76.
14. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2007.
15. Lundborg G. The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: structural and functional aspects. *Journal of Hand Surgery*. 1979;4(1):34-41.
16. Sternini C. Organization of the peripheral nervous system: autonomic and sensory ganglia. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 1997;2(1):1-7.
17. Li R, Li DH, Zhang HY, Wang J, Li XK, Xiao J. Growth factors-based therapeutic strategies and their underlying signaling mechanisms for peripheral nerve regeneration. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020.
18. Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, et al. Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap. *Progress in Neurobiology*. 2010;92(3):245-76.
19. Stoll G, Griffin J, Li CY, Trapp B. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *Journal of Neurocytology*. 1989;18(5):671-83.
20. Fairbairn NG, Meppelink AM, Ng-Glazier J, Randolph MA, Winograd JM. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World Journal of Stem Cells*. 2015;7(1):11.
21. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2000;8(4):243-52.
22. 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.

23. 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.
24. Faroni A, Terenghi G, Reid AJ. Adipose-derived stem cells and nerve regeneration: promises and pitfalls. *International Review of Neurobiology*. 2013;108:121-36.
25. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998;18(7):397-405.
26. Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(12):1995-9.
27. Bibel M, Barde Y-A. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & development*. 2000;14(23):2919-37.
28. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *The Journal of Anatomy*. 1999;194(1):1-14.
29. Apfel SC. Neurotrophic factors in peripheral neuropathies: therapeutic implications. *Brain pathology*. 1999;9(2):393-413.
30. Markus A, Patel TD, Snider WD. Neurotrophic factors and axonal growth. *Current opinion in neurobiology*. 2002;12(5):523-31.
31. Newman JP, Verity AN, Hawatmeh S, Fee WE, Jr., Terris DJ. Ciliary neurotrophic factor enhances peripheral nerve regeneration. *Archives of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery*. 1996;122(4):399-403.
32. Barras FM, Pasche P, Bouche N, Aebischer P, Zurn AD. Glial cell line-derived neurotrophic factor released by synthetic guidance channels promotes facial nerve regeneration in the rat. *Journal of Neuroscience Research*. 2002;70(6):746-55.
33. Johnson EO, Charchanti A, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. *Injury*. 2008;39 Suppl 3:S37-42.



34. Chen MB, Zhang F, Lineaweaver WC. Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair. *Annals of Plastic Surgery*. 2006;57(4):462-71.
35. Thoenen H, Sendtner M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nature neuroscience*. 2002;5(11):1046-50.
36. Hoyng SA, De Winter F, Gnani S, de Boer R, Boon LI, Korvers LM, et al. A comparative morphological, electrophysiological and functional analysis of axon regeneration through peripheral nerve autografts genetically modified to overexpress BDNF, CNTF, GDNF, NGF, NT3 or VEGF. *Experimental neurology*. 2014;261:578-93.
37. Madduri S, Gander B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2010;15(2):93-103.
38. Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Differential effects of neurotrophins on neuronal survival and axonal regeneration after spinal cord injury in adult rats. *Journal of Comparative Neurology*. 2002;452(3):255-63.
39. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951;74(4):491-516.
40. Sunderland S, Williams HB. Nerve injuries and their repair: a critical appraisal. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1992;89:1170
41. Gurtner G, Neligan P. *Plastic surgery*. Volume 1. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018.
42. Wang E, Inaba K, Byerly S, Escamilla D, Cho J, Carey J, et al. Optimal timing for repair of peripheral nerve injuries. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2017;83(5):875-81.
43. Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2013;95(23):2144-51.
44. Boyd KU, Nimigan AS, Mackinnon SE. Nerve reconstruction in the hand and upper extremity. *Clinics in plastic surgery*. 2011;38(4):643-60.

45. Panagopoulos GN, Megaloikonomos PD, Mavrogenis AF. The present and future for peripheral nerve regeneration. *Orthopedics*. 2017;40(1):e141-e56.
46. Mafi P, Hindocha S, Dhital M, Saleh M. Advances of peripheral nerve repair techniques to improve hand function: a systematic review of literature. *The Open Orthopaedics Journal*. 2012;6:60-8.
47. Dagum AB. Peripheral nerve regeneration, repair, and grafting. *Journal of Hand Therapy*. 1998;11(2):111-7.
48. 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.
49. Orgel MG. Epineurial versus perineurial repair of peripheral nerves. *Clinics in plastic surgery*. 1984;11(1):101-4.
50. Karol A. Peripheral nerves and tendon transfers. *Selected Reading in Plastic Surgery*. 2003;9:23.
51. Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1975;56(2):166-70.
52. Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Experimental Neurology*. 2010;223(1):77-85.
53. Poppler LH, Davidge K, Lu JC, Armstrong J, Fox IK, Mackinnon SE. Alternatives to sural nerve grafts in the upper extremity. *Hand (N Y)*. 2015;10(1):68-75.
54. Serel S, Kaya B, Sara Y, Onur R, Heper AO. Is it possible to prefabricate a vascularized peripheral nerve graft? *Annals of Plastic Surgery*. 2010;64(3):323-6.
55. Taylor GI, Ham FJ. The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1976;57(4):413-26.
56. Vargel I, Demirci M, Erdem S, Firat P, Sürücü HS, Tan E, et al. A comparison of various vascularization-perfusion venous nerve grafts with conventional nerve grafts in rats. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2009;25(7):425-37.

57. Kayıkçıoğlu A, Karamürsel S, Ağaoğlu G, Keçik A, Celiker R, Cetin A. End-to-side neurorrhaphies of the ulnar and median nerves at the wrist: report of two cases without sensory or motor improvement. *Annals of Plastic Surgery*. 2000;45(6):641-3.
58. Dorsi MJ, Chen L, Murinson BB, Pogatzki-Zahn EM, Meyer RA, Belzberg AJ. The tibial neuroma transposition (TNT) model of neuroma pain and hyperalgesia. *Pain*. 2008;134(3):320-34.
59. Dvali LT, Myckatyn TM. End-to-side nerve repair: review of the literature and clinical indications. *Hand Clinics*. 2008;24(4):455-60, vii.
60. Aydın MA, Nasır S, Ökten F, Koyuncuoğlu HR. Sinir allogreft nakli ile sinir tamiri yapılan replante edilmiş kollar: ikinci yıllarının sonunda iki olgunun sunumu. *Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi (Turkish Journal of Plastic Surgery)*. 2006;14(1).
61. Ağaoğlu G, Kayıkçıoğlu A, Sargon M, Erk Y, Mavili E. Comparison of immune response to nerve allograft segments in fetal and adult rabbits: a histological study. *Annals of Plastic Surgery* 2000;44(4):398-404.
62. Siemionow M, Sonmez E. Nerve allograft transplantation: a review. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2007;23(8):511-20.
63. Glaus SW, Johnson PJ, Mackinnon SE. Clinical strategies to enhance nerve regeneration in composite tissue allotransplantation. *Hand Clinics*. 2011;27(4):495-509, ix.
64. Evans PJ, Midha R, Mackinnon SE. The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Progress in neurobiology*. 1994;43(3):187-233.
65. Leckenby JJ, Furrer C, Haug L, Juon Personeni B, Vögelin E. A Retrospective Case Series Reporting the Outcomes of Avance Nerve Allografts in the Treatment of Peripheral Nerve Injuries. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2020;145(2):368e-81e.

66. Cho MS, Rinker BD, Weber RV, Chao JD, Ingari JV, Brooks D, et al. Functional outcome following nerve repair in the upper extremity using processed nerve allograft. *The Journal of hand surgery*. 2012;37(11):2340-9.
67. Chrząszcz P, Derbisz K, Suszyński K, Miodoński J, Trybulski R, Lewin-Kowalik J, et al. Application of peripheral nerve conduits in clinical practice: A literature review. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*. 2018;52(4):427-35.
68. Huang YC, Huang YY. Biomaterials and strategies for nerve regeneration. *Artificial Organs*. 2006;30(7):514-22.
69. Taras JS, Nanavati V, Steelman P. Nerve conduits. *Journal of Hand Therapy*. 2005;18(2):191-7.
70. Shin RH, Friedrich PF, Crum BA, Bishop AT, Shin AY. Treatment of a segmental nerve defect in the rat with use of bioabsorbable synthetic nerve conduits: a comparison of commercially available conduits. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2009;91(9):2194-204.
71. Deal ND, Griffin JW, Hogan MV. Nerve conduits for nerve repair or reconstruction. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2012;20(2):63-8.
72. Mehmet B, Emin K, Külahçı Y. Periferik sinir onarımlarında konduit uygulamaları, temel ve güncel yaklaşımlar: literatürün gözden geçirilmesi. *Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi (Turk J Plast Surg)*. 2006;17(2).
73. Hadlock T, Sundback C, Hunter D, Cheney M, Vacanti JP. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Journal of Tissue Engineering*. 2000;6(2):119-27.
74. Vleggeert-Lankamp C, De Ruiter G, Wolfs J, Pego A, Van Den Berg R, Feirabend H, et al. Pores in synthetic nerve conduits are beneficial to regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;80(4):965-82.
75. Jirsova K, Jones GLA. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting-a review. *Cell and tissue banking*. 2017;18(2):193-204.

76. Davis GE, Blaker SN, Engvall E, Varon S, Manthorpe M, Gage FH. Human amnion membrane serves as a substratum for growing axons in vitro and in vivo. *Science*. 1987;236(4805):1106-9.
77. Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Plastic and reconstructive surgery*. 2000;105(2):660-6.
78. Li Z, Qin H, Feng Z, Liu W, Zhou Y, Yang L, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-loaded amniotic membrane for the repair of radial nerve injury. *Neural regeneration research*. 2013;8(36):3441-8.
79. İmamaliyev R. Periferik sinir kayıplarında vaskülarize ven grefti ile sinir onarımı. [Uzmanlık Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2013.
80. Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Reviews in the neurosciences*. 1996;7(1):47-84.
81. Chiu D, Strauch B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plastic and reconstructive surgery*. 1990;86(5):928-34.
82. Meek MF, Varejão AS, Geuna S. Use of skeletal muscle tissue in peripheral nerve repair: review of the literature. *Journal of Tissue Engineering*. 2004;10(7-8):1027-36.
83. Brunelli GA, Battiston B, Vigasio A, Brunelli G, Marocolo D. Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits. *Microsurgery*. 1993;14(4):247-51.
84. Brandt J, Dahlin LB, Lundborg G. Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects. *Journal of hand surgery (Edinburgh, Scotland)*. 1999;24(3):284-90.
85. Itoh S, Suzuki M, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, et al. Development of a nerve scaffold using a tendon chitosan tube. *Artificial organs*. 2003;27(12):1079-88.

86. Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clinics in plastic surgery*. 1999;26(4):617-28, ix.
87. Ciardelli G, Chiono V. Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromolecular bioscience*. 2006;6(1):13-26.
88. Yucel D, Kose GT, Hasirci V. Polyester based nerve guidance conduit design. *Biomaterials*. 2010;31(7):1596-603.
89. Danielsson PA, Adolfsson L, Dahlin LB. Different effect on axonal outgrowth of application of non-absorbable or absorbable tubes around a nerve repair. *Scandinavian Journal Of Plastic And Reconstructive Surgery And Hand Surgery*. 2001;35(4):347-53.
90. Wang-Bennett LT, Coker NJ. Analysis of axonal regeneration through the silicone regeneration chamber: a retrograde tracing study in the rabbit facial nerve. *Experimental neurology*. 1990;107(3):222-9.
91. Weber RA, Breidenbach WC, Brown RE, Jabaley ME, Mass DP. A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2000;106(5):1036-45; discussion 46-8.
92. Waitayawinyu T, Parisi DM, Miller B, Luria S, Morton HJ, Chin SH, et al. A comparison of polyglycolic acid versus type 1 collagen bioabsorbable nerve conduits in a rat model: an alternative to autografting. *The Journal of hand surgery*. 2007;32(10):1521-9.
93. Bini TB, Gao S, Xu X, Wang S, Ramakrishna S, Leong KW. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004;68(2):286-95.
94. Entekhabi E, Haghbin Nazarpak M, Shafieian M, Mohammadi H, Firouzi M, Hassannejad Z. Fabrication and in vitro evaluation of 3D composite scaffold based on collagen/hyaluronic acid sponge and electrospun PCL nanofibers for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2020.

95. Inada Y, Morimoto S, Takakura Y, Nakamura T. Regeneration of peripheral nerve gaps with a polyglycolic acid-collagen tube. *Neurosurgery*. 2004;55(3):640-6; discussion 6-8.
96. Yao L, de Ruitter GC, Wang H, Knight AM, Spinner RJ, Yaszemski MJ, et al. Controlling dispersion of axonal regeneration using a multichannel collagen nerve conduit. *Biomaterials*. 2010;31(22):5789-97.
97. Chen Y-S, Chang J-Y, Cheng C-Y, Tsai F-J, Yao C-H, Liu B-S. An in vivo evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials*. 2005;26(18):3911-8.
98. Sakai Y, Matsuyama Y, Takahashi K, Sato T, Hattori T, Nakashima S, et al. New artificial nerve conduits made with photocrosslinked hyaluronic acid for peripheral nerve regeneration. *Bio-medical materials and engineering*. 2007;17(3):191-7.
99. Sufan W, Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi K, Suzuki K, Endo K, et al. Sciatic nerve regeneration through alginate with tubulation or nontubulation repair in cat. *Journal of Neurotrauma*. 2001;18(3):329-38.
100. Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G. Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits. *Tissue engineering*. 2003;9(2):209-18.
101. Yang F, Murugan R, Ramakrishna S, Wang X, Ma YX, Wang S. Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials*. 2004;25(10):1891-900.
102. Yu W, Zhao W, Zhu C, Zhang X, Ye D, Zhang W, et al. Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate. *BMC neuroscience*. 2011;12(1):68.
103. Dadaci M, Karagülle N, Sönmez E, Dadaci Z, İşci ET, İnce B, et al. Evaluation of the effectiveness of biodegradable electrospun caprolactone and poly(lactic acid- $\epsilon$ -caprolactone) nerve conduits for peripheral nerve regenerations in a rat sciatic nerve defect model. *Turkish Journal Of Medical Sciences*. 2016;46(2):539-48.

104. Ren Z, Wang Y, Peng J, Zhao Q, Lu S. Role of stem cells in the regeneration and repair of peripheral nerves. *Reviews in the Neurosciences*. 2012;23(2):135-43.
105. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287(5457):1433-8.
106. Lensch MW, Daheron L, Schlaeger TM. Pluripotent stem cells and their niches. *Stem Cell Reviews*. 2006;2(3):185-201.
107. Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Current opinion in cell biology*. 1995;7(6):862-9.
108. Walsh S, Midha R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurgical Focus*. 2009;26(2):E2.
109. Ladak A, Olson J, Tredget E, Gordon T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Experimental neurology*. 2011;228(2):242-52.
110. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *European Journal of Neuroscience*. 2001;14(11):1771-6.
111. Keilhoff G, Goihl A, Langnase K, Fansa H, Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *European journal of cell biology*. 2006;85(1):11-24.
112. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*. 2007;100(9):1249-60.
113. Marconi S, Castiglione G, Turano E, Bissolotti G, Angiari S, Farinazzo A, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Engineering Part A*. 2012;18(11-12):1264-72.
114. Wang J, Ding F, Gu Y, Liu J, Gu X. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. *Brain research*. 2009;1262:7-15.
115. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino



- rats--similarities to astrocyte grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(7):3908-13.
116. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95.
  117. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
  118. Ziegler L, Grigoryan S, Yang IH, Thakor NV, Goldstein RS. Efficient generation of schwann cells from human embryonic stem cell-derived neurospheres. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2011;7(2):394-403.
  119. Dhara SK, Stice SL. Neural differentiation of human embryonic stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;105(3):633-40.
  120. Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*. 2016;167(4):897-914.
  121. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*. 1994;13(5):1071-82.
  122. Lim SH, Liu XY, Song H, Yarema KJ, Mao H-Q. The effect of nanofiber-guided cell alignment on the preferential differentiation of neural stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(34):9031-9.
  123. Heine W, Conant K, Griffin JW, Höke A. Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves. *Experimental neurology*. 2004;189(2):231-40.
  124. Johnson TS, O'Neill AC, Motarjem PM, Nazzal J, Randolph M, Winograd JM. Tumor formation following murine neural precursor cell transplantation in a rat peripheral nerve injury model. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 2008;24(8):545-50.

125. Yi S, Zhang Y, Gu X, Huang L, Zhang K, Qian T, et al. Application of stem cells in peripheral nerve regeneration. *Burns Trauma*. 2020;8:tkaa002.
126. Pan H-C, Chin C-S, Yang D-Y, Ho S-P, Chen C-J, Hwang S-M, et al. Human amniotic fluid mesenchymal stem cells in combination with hyperbaric oxygen augment peripheral nerve regeneration. *Neurochemical research*. 2009;34(7):1304-16.
127. Aksu AE, Calis M. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and the Concept of Stromal Vascular Fraction. *Turkiye Klinikleri J Plast Surg-Special Topics*. 2015;4(3):19-26.
128. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
129. Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2004;40(Pt 1):17-24.
130. Guo Z-y, Sun X, Xu X-l, Zhao Q, Peng J, Wang Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms. *Neural regeneration research*. 2015;10(4):651.
131. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*. 1976;4(5):267-74.
132. Keilhoff G, Gohl A, Langnäse K, Fansa H, Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *European Journal of Cell Biology*. 2006;85(1):11-24.
133. Goel RK, Suri V, Suri A, Sarkar C, Mohanty S, Sharma MC, et al. Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2009;16(9):1211-7.
134. Gimble JM, Bunnell BA, Frazier T, Rowan B, Shah F, Thomas-Porch C, et al. Adipose-derived stromal/stem cells: a primer. *Organogenesis*. 2013;9(1):3-10.

135. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. 2001;7(2):211-28.
136. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio Journal of Medicine*. 2005;54(3):132-41.
137. Sowa Y, Kishida T, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Tabata Y, et al. Adipose-Derived Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration In Vivo without Differentiation into Schwann-Like Lineage. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2016;137(2):318e-30e.
138. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental neurology*. 2007;207(2):267-74.
139. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem cells*. 2007;25(11):2886-95.
140. Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, Cheng FC, Lee JL, Chang YJ. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biology Reproduction*. 2006;74(3):545-51.
141. Li Y, Guo L, Ahn HS, Kim MH, Kim SW. Amniotic mesenchymal stem cells display neurovascular tropism and aid in the recovery of injured peripheral nerves. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014;18(6):1028-34.
142. Insausti CL, Blanquer M, García-Hernández AM, Castellanos G, Moraleda JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem cells and cloning: advances and applications*. 2014;7:53.
143. Bongso A, Fong CY, Gauthaman K. Taking stem cells to the clinic: Major challenges. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008;105(6):1352-60.
144. Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2010;69(9):973-85.

145. Peng J, Wang Y, Zhang L, Zhao B, Zhao Z, Chen J, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain Research Bulletin*. 2011;84(3):235-43.
146. Gärtner A, Pereira T, Simões MJ, Armada-da-Silva PA, França ML, Sousa R, et al. Use of hybrid chitosan membranes and human mesenchymal stem cells from the Wharton jelly of umbilical cord for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model. *Neural regeneration research*. 2012;7(29):2247.
147. Biernaskie JA, McKenzie IA, Toma JG, Miller FD. Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nature Protocols*. 2006;1(6):2803-12.
148. Marchesi C, Pluderi M, Colleoni F, Belicchi M, Meregalli M, Farini A, et al. Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. *Glia*. 2007;55(4):425-38.
149. Yamamoto T, Osako Y, Ito M, Murakami M, Hayashi Y, Horibe H, et al. Trophic effects of dental pulp stem cells on schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Cell transplantation*. 2016;25(1):183-93.
150. Askari N, Yaghoobi MM, Shamsara M, Esmaeili-Mahani S. Tetracycline-regulated expression of OLIG2 gene in human dental pulp stem cells lead to mouse sciatic nerve regeneration upon transplantation. *Neuroscience*. 2015;305:197-208.
151. Ullah I, Park J-M, Kang Y-H, Byun J-H, Kim D-G, Kim J-H, et al. Transplantation of human dental pulp-derived stem cells or differentiated neuronal cells from human dental pulp-derived stem cells identically enhances regeneration of the injured peripheral nerve. *Stem cells and development*. 2017;26(17):1247-57.
152. Lavasani M, Thompson SD, Pollett JB, Usas A, Lu A, Stolz DB, et al. Human muscle-derived stem/progenitor cells promote functional murine peripheral nerve regeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(4):1745-56.
153. Wang A, Tang Z, Park I-H, Zhu Y, Patel S, Daley GQ, et al. Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2011;32(22):5023-32.

154. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
155. Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Kazuki K, Tabata Y, et al. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(5):1370-8.
156. Xu W, Cox CS, Li Y. Induced pluripotent stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of stem cells*. 2011;6(1):39.
157. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neurology*. 2000;164(2):247-56.
158. Kemp SW, Walsh SK, Midha R. Growth factor and stem cell enhanced conduits in peripheral nerve regeneration and repair. *Neurological research*. 2008;30(10):1030-8.
159. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PloS one*. 2011;6(3).
160. Keilhoff G, Goihl A, Stang F, Wolf G, Fansa H. Peripheral nerve tissue engineering: autologous Schwann cells vs. transdifferentiated mesenchymal stem cells. *Tissue engineering*. 2006;12(6):1451-65.
161. Tang Z, Okano T. Recent development of temperature-responsive surfaces and their application for cell sheet engineering. *Regenerative Biomaterials*. 2014;1(1):91-102.
162. Ducheyne P. *Comprehensive biomaterials*. Amsterdam: Elsevier; 2015.
163. Kirby GT, Michelmore A, Smith LE, Whittle JD, Short RD. Cell sheets in cell therapies. *Cytotherapy*. 2018;20(2):169-80.

164. Chen G, Qi Y, Niu L, Di T, Zhong J, Fang T, et al. Application of the cell sheet technique in tissue engineering. *Biomedical reports*. 2015;3(6):749-57.
165. Owaki T, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for regenerative medicine: current challenges and strategies. *Biotechnology journal*. 2014;9(7):904-14.
166. Toyoda E, Sato M, Takahashi T, Maehara M, Okada E, Wasai S, et al. Transcriptomic and Proteomic Analyses Reveal the Potential Mode of Action of Chondrocyte Sheets in Hyaline Cartilage Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(1):149.
167. Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*. 2010;46(2):418-24.
168. Matsuda N, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Tissue engineering based on cell sheet technology. *Advanced Materials*. 2007;19(20):3089-99.
169. Dereli Can G, Akdere Ö E, Can ME, Aydın B, Cagil N, Gümüşderelioğlu M. A completely human-derived biomaterial mimicking limbal niche: Platelet-rich fibrin gel. *Experimental Eye Research*. 2018;173:1-12.
170. Akdere O E, Shikhaliyeva İ, Gumusderelioglu M. Boron mediated 2D and 3D cultures of adipose derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. 2019;71(2):611-22.
171. Kaynak Bayrak G, Gümüşderelioğlu M. Construction of cardiomyoblast sheets for cardiac tissue repair: comparison of three different approaches. *Cytotechnology*. 2019;71(4):819-33.
172. Hernández-Cortés P, Toledo-Romero MA, Delgado M, Sánchez-González CE, Martín F, Galindo-Moreno P, et al. Peripheral nerve reconstruction with epsilon-caprolactone conduits seeded with vasoactive intestinal peptide gene-transfected mesenchymal stem cells in a rat model. *Journal of Neural Engineering*. 2014;11(4):046024.
173. 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.

174. Zencirci SG. Deneysel siyatik sinir hasarında melatonin etkisinin elektrofizyolojik ve teorik olarak incelenmesi. [Yüksek Lisans Tezi ]. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi; 2008.
175. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalbruch H, Krarup C. Comparative electrophysiological, functional, and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005;25(6):508-19.
176. Nijhuis TH, Brzezicki G, Klimczak A, Siemionow M. Isogenic venous graft supported with bone marrow stromal cells as a natural conduit for bridging a 20 mm nerve gap. *Microsurgery*. 2010;30(8):639-45.
177. Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plastic and reconstructive surgery*. 1996;98(7):1264-71, discussion 72-4.
178. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and reconstructive surgery*. 1989;83(1):129-38.
179. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible. *The Journal of Neuroscience Methods*. 2008;170(2):255-61.
180. Zhu Y, Jin Z, Luo Y, Wang Y, Peng N, Peng J, et al. Evaluation of the Crushed Sciatic Nerve and Denervated Muscle with Multimodality Ultrasound Techniques: An Animal Study. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2020;46(2):377-92.
181. Chen J, Zhou XJ, Sun RB. Effect of the combination of high-frequency repetitive magnetic stimulation and neurotrophin on injured sciatic nerve regeneration in rats. *Neural regeneration research*. 2020;15(1):145-51.
182. Tawab SA, Omar SM, Zeid AAA, Saba C. Role of Adipose Tissue-Derived Stem Cells versus Differentiated Schwann-like cells Transplantation on the Regeneration of Crushed Sciatic Nerve in Rats. A Histological Study. *International Journal of Stem Cell Research and Therapeutics*. 2018; 1(1): 1-10.
183. Trumble TE, McCallister WV. Repair of peripheral nerve defects in the upper extremity. *Hand clinics*. 2000;16(1):37-52.

184. Schoeller T, Huemer GM, Shafiqi M, Gurunluoglu R, Wechselberger G, Piza-Katzer H. Microsurgical repair of the sural nerve after nerve biopsy to avoid associated sensory morbidity: a preliminary report. *Neurosurgery*. 2004;54(4):897-900; discussion -1.
185. Lundborg G. Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2004;36(1):1-7.
186. Brandt J, Dahlin L, Lundborg G. Autologous tendons used as grafts for bridging peripheral nerve defects. *The Journal of Hand Surgery: British & European Volume*. 1999;24(3):284-90.
187. Arslantunali D, Dursun T, Yucel D, Hasirci N, Hasirci V. Peripheral nerve conduits: technology update. *Medical Devices (Auckland, NZ)*. 2014;7:405.
188. Zhang P-X, Han N, Kou Y-H, Zhu Q-T, Liu X-L, Quan D-P, et al. Tissue engineering for the repair of peripheral nerve injury. *Neural regeneration research*. 2019;14(1):51-8.
189. Strauch B. Use of nerve conduits in peripheral nerve repair. *Hand clinics*. 2000;16(1):123-30.
190. Keilhoff G, Fansa H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration--a real hope or just an empty promise? *Experimental neurology*. 2011;232(2):110-3.
191. Tang J-b. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. *Journal of reconstructive microsurgery*. 1995;11(01):21-6.
192. Bushnell BD, McWilliams AD, Whitener GB, Messer TM. Early clinical experience with collagen nerve tubes in digital nerve repair. *The Journal of hand surgery*. 2008;33(7):1081-7.
193. Ao Q, Wang A, Cao W, Zhang L, Kong L, He Q, et al. Manufacture of multimicrotubule chitosan nerve conduits with novel molds and characterization in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006;77(1):11-8.
194. Battiston B, Geuna S, Ferrero M, Tos P. Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery*. 2005;25(4):258-67.



195. Mosahebi A, Fuller P, Wiberg M, Terenghi G. Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Experimental neurology*. 2002;173(2):213-23.
196. Radtke C, Vogt PM. Peripheral nerve regeneration: a current perspective. *Eplasty*. 2009;9.
197. Liu G-B, Cheng Y-X, Feng Y-K, Pang C-J, Li Q, Wang Y, et al. Adipose-derived stem cells promote peripheral nerve repair. *Archives of medical science*. 2011;7(4):592.
198. Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galié M, Sbarbati A, et al. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 2008;17(5):909-16.
199. di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *Journal of plastic, reconstructive and aesthetic surgery*. 2010;63(9):1544-52.
200. Orbay H, Uysal AC, Hyakusoku H, Mizuno H. Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps. *Journal of plastic, reconstructive and aesthetic surgery*. 2012;65(5):657-64.
201. Klein SM, Vykoukal J, Li DP, Pan HL, Zeitler K, Alt E, et al. Peripheral Motor and Sensory Nerve Conduction following Transplantation of Undifferentiated Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells in a Biodegradable U.S. Food and Drug Administration-Approved Nerve Conduit. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2016;138(1):132-9.
202. Zack-Williams SD, Butler PE, Kalaskar DM. Current progress in use of adipose derived stem cells in peripheral nerve regeneration. *World journal of stem cells*. 2015;7(1):51.
203. Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Fushiki S. Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem cells and development*. 2012;21(11):1852-62.

204. Hsu MN, Liao HT, Li KC, Chen HH, Yen TC, Makarevich P, et al. Adipose-derived stem cell sheets functionalized by hybrid baculovirus for prolonged GDNF expression and improved nerve regeneration. *Biomaterials*. 2017;140:189-200.
205. Yeh TS, Fang YH, Lu CH, Chiu SC, Yeh CL, Yen TC, et al. Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction. *Biomaterials*. 2014;35(1):174-84.
206. Yu J, Tu YK, Tang YB, Cheng NC. Stemness and transdifferentiation of adipose-derived stem cells using L-ascorbic acid 2-phosphate-induced cell sheet formation. *Biomaterials*. 2014;35(11):3516-26.
207. Li D, Wang C, Shan W, Zeng R, Fang Y, Wang P. Human amnion tissue injected with human umbilical cord mesenchymal stem cells repairs damaged sciatic nerves in rats. *Neural regeneration research*. 2012;7(23):1771-8.
208. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Molecular neurobiology*. 1997;14(1-2):67-116.