



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

RATLARDA PERİFERİK SİNİR KESİSİ MODELİNDE OTOLOG
ADİPOZİT KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN VE TAKROLİMUS
KOMBİNE KULLANIMININ SİNİR İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Onur OĞAN

Antalya, 2018



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

RATLARDA PERİFERİK SİNİR KESİSİ MODELİNDE OTOLOG
ADİPOSİT KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN VE TAKROLİMUS
KOMBİNE KULLANIMININ SİNİR İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Onur OĞAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlenen ÖZKAN

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Fonu tarafından
desteklenmiştir. (Proje Kodu: TTU-2017-2839)

“Kaynak gösterilerek tezinden yararlanılabilir.”Antalya, 2018

TEŞEKKÜRLER

Çok severek ve isteyerek gelip katılmış bulunduğum Akdeniz Üniversitesi Plastik,Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Kliniği ailesinde geçirmiş olduğum 5 yılı aşkın sürede hem kişilik adına hem de hekimlik adına çok nitelikli bir eğitim almanın huzuru içinde uzmanlık tezimi yazmış bulunmaktayım. Bu süreç boyunca hüznün, sevinç, yorgunluk, neşe gibi duyguları yaşamamanın yanı sıra birbirinden güzel yürekli insanlarla çalışma fırsatı verdi. Ayrıca dünya çapında nam salmış bir ekibin bu başarısının altında yatan alın terinin, kararlılığın, çalışkanlığın, iradenin bizzat şahidi ve parçası olmanın gururunu yaşamaktayım.

Tüm asistanlık hayatım ve hatta tıp fakültesi öğrenciliğim de dahil bana bilgi, beceri ve samimiyeti ile yol gösterici olmuş saygıdeğer tez danışmanı hocam Doç. Dr. Özlenen Özkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman desteğini arkamda hissettiğim sadece hekimlik adına değil hayata dair birçok konuda bana örnek olan, sayesinde dünyada çok az cerrahın şahit olabileceği ameliyatlarda bizzat bulunmama olanak veren, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ömer Özkan'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Plastik cerrahiye seçmeme etkisi olan ve beni bu alanda heveslendiren, kısa dönem de olsa çalışma, bilgi ve tecrübesinden yararlanma olanağı bulduğum değerli hocam Prof. Dr. Koray Coşkunfırat'a teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık hayatının güzelliklerini ve zorluklarını beraber yaşama fırsatı bulduğum Uzm. Dr. Ahmet Harun Şimşek, Uzm. Dr. Mehmet Can Ubur, Uzm. Dr. Serkan İlhan, Dr. Adil Cümşüdoğru, Dr. Hasan Tuna Türkmen, Dr. Yalçın Leymunçiceği, Dr. Sinem Çilingir, Dr. Mehmet Bilgehan Sarı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarına yüksek oranda katkıları olan çalışma arkadaşım Uzm. Dr. Mustafa Gökhan Ertosun'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın varolmasında büyük emekleri olan ve bana kılavuzluk eden saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Hilmi Uysal ve Doç. Dr. Cumhuri İbrahim Başsorgun' a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimimin farklı dönemlerinde çalışma fırsatı bulduğum kendisinden hem tıp adına hem de insan ilişkileri adına bir çok şey öğrendiğim, ağabeyim, Uzm. Dr. Polat Biçici'ye teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık hayatımda bana arkadaşlıklarını ve desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr. Kerim Ünal ve Uzm. Dr. Matteo Amoroso' ya teşekkürlerimi sunarım.

Sayesinde plastik cerrahinin gerçek yönleriyle tanışma fırsatı bulduğum, bu işi sevmemde çok büyük role sahip olan ilham kaynağı Uzm. Dr. Anı Çinpolat'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde beni cesaretlendiren, güven ve güç kaynağım annem Saadet Oğan ve kardeşim Sabahattin Alper Oğan'a çok teşekkür ederim.

Belki de hayatımın en zor zamanlarını benimle yaşayan, sevgi ve saygı ile bana bu dönemde kucak açan, hoşgörü ve alçakgönüllülük sahibi sevgili eşim Dr. Nur Oğan'a teşekkür ederim.

Son olarak bugün varolduğum benliğin mimarı, mesleki ilham kaynağım, yol gösteren babam Op. Dr. Mehmet Nuri Oğan'a teşekkür ederim.

İçindekiler:

1-Giriş.....	1
Periferik Sinir Anatomisi.....	1
Periferik Sinir Yaralanmaları.....	3
Periferik Sinir Kesilerinin Onarımı.....	8
Periferik Sinir Rejenerasyonuna Farmakolojik Ajanların Etkisi.....	11
Periferik Sinir Rejenerasyonuna Kök Hücrelerin Etkileri.....	14
2-Materyal-Metod.....	22
Adiposit Kaynaklı Kök Hücre Elde Edilmesinde Kullanılacak Olan	
İnguinal Yağ Yastıkçığının Toplanması.....	23
Kök Hücre Eldesinde Kullanılan Gereç ve Yöntemler.....	24
Siyatik Sinir Kesi Modeli Oluşturulması ve Kök Hücre Sunumunun	
Yapıldığı Cerrahi İşlem.....	25
Takrolimus İçeren Solusyonların Hazırlanması ve Verilişi.....	28
Yürüme Analizleri.....	28
Elektrofizyolojik Ölçümler.....	29
Histopatolojik İnceleme.....	30
3-Sonuçlar.....	31
Yürüme Analizi.....	31
Elektrofizyolojik Sonuçlar.....	37
Gastrocnemius Islak Kas Ağırlıkları.....	39
Histopatolojik Değerlendirme.....	40

4-Tartışma.....	42
5-Özet.....	54
6-Abstract.....	56
7-Kaynaklar.....	58

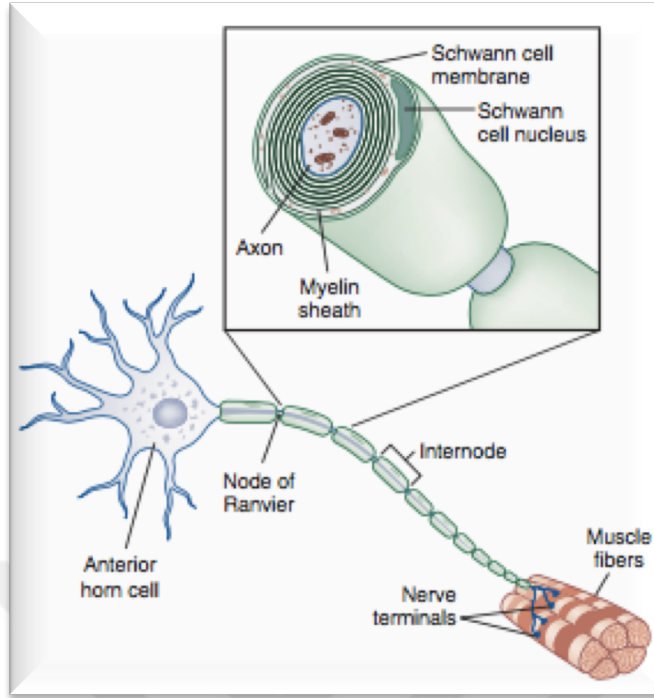


GİRİŞ

Periferik sinirlere yönelik tarihi merak yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. Leonardo da Vinci tarafından yapılan, brakial pleksusa yönelik detaylı anatomik çizimler mevcuttur. 1885 yılında Erb, Duschenne ve Klumpke farklı brakial pleksus yaralanmaları üzerine noktalar tanımlamışlardır. Birleşik Devletler iç savaşı, her iki dünya savaşları esnasında periferik sinir yaralanmaları hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Noble ve arkadaşlarına göre 1.basamak travma merkezlerine başvuruların %5' i periferik sinir yaralanması, pleksus yaralanması, sinir kökü yaralanmasına sahip olduğu bildirilmiştir (1).

Periferik Sinir Sistemi Anatomisi:

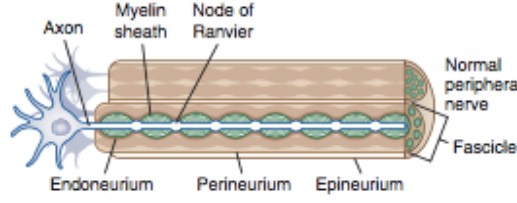
Periferik sinir sistemi, santral sinir sistemi ile hedef organlar arasındaki iletişimi sağlayan nöral elementlerden oluşmaktadır. Sinir hücrelerinin gövdelerinden hedef organlara doğru uzatmış oldukları aksoplazmik uzantılar akson adını alırlar. Aksonlar myelinli veya myelinsiz olabilirler. Myelinsiz aksonlar schwann hücre membranlarının invajinasyonlarıyla parsiyel olarak sarılmış iken myelinli aksonlar, spiral şekilde düzenlenmiş schwann hücre membranlarının konsantrik şekilde kompakt hal alması ile oluşmaktadır (Şekil 1.1). Myelin örtüleri arasında bulunan ranvier düğümlerine kadar olan akson kısmında iletim iyon akışı ile sağlanırken; düğümler seviyesinde bu iyon akışı, elektriksel aksiyon potansiyeline dönüşerek ilerler. İletim bu bölgelerde “atlayıcı” şekilde ilerlemektedir. Bu sebeplerle insanlarda myelinli geniş çaplı bir sinir hücresinde ileti hızı 73m/sn yi bulurken, myelinsiz hücrelerde bu hız 0.5m/sn ye kadar düşmektedir (2).



Şekil 1.1: Periferik sinir hücresi

Periferik sinir hücrelerinin organizasyonunda destekleyici yumuşak doku varlığı yapısal destek, gerim dayanıklılığı ve elastisite için gereklidir. Her bir sinir hücresini çevreleyen bağ doku endonörיום adını alır. Bu lifler birleşerek fasikül adı verilen sinir demetlerini oluşturur. Fasiküller içinde myelinli ve myelinsiz aksonlar bir arada bulunabildiği gibi fasiküller içindeki sinirler arasında da birbirleri ile çapraz yaparlar. Bu çaprazlar “Sunderland Pleksusu” olarak bilinirler. Sunderland pleksusunun periferik sinirin proksimal segmentlerinde daha karmaşık bir halde iken distallerde daha paralel seyrettiği bilinmektedir. Fasikülleri çevreleyen bağ doku ise perinörיום olarak bilinir. Bu doku perinörיום sıkı bağlantılar yapan destek hücrelerinden oluşmaktadır. Bu katman, kan-sinir bariyeri özelliği taşıması ve buna bağlı olarak endonörיום özellikli mikroçevrenin korunması açısından önemlidir. Fasiküllerin etrafını saran bağ doku ise epinörיום olarak bilinir (Şekil 1.2). Bu katman ise santral sinir sistemindeki dura materin devamlılığı niteliğindedir. Epinörיום ile sarılı sinir dokusunun çevre yumuşak dokularla bağlantısını sağlayan gevşek areolar yumuşak doku ise mesonörיום olarak adlandırılır. Bu yumuşak doku

segmenti ise etraf dokuların hareketleri esnasında periferik sinir dokusunun longitudinal ve transvers eksenlerdeki hareketliliğini sağlar. Ayrıca periferik sinir dokusunun vaskülarizasyonunu sağlayan arterler epinöral aralıktan girdikten sonra interfasiküler epinöryumda uzanırlar. Bu esnada fasiküllere arterioller verirler. Periferik sinir dokusu güçlü vasküler akıma sahiptir.



Şekil 1.2: Periferik sinir dokusu ve kılıfları

Periferik Sinir Yaralanmaları:

Periferik sinir yaralanmaları, uzamış iyileşme zamanları sebebiyle önemlidir. Fonksiyon kaybının engellenebilmesi için, motor-son-plakda geri dönüşümsüz fibrozis ve atrofi oluşmadan canlı aksonların oluşması gereklidir. Bu sağlanmadığı takdirde hastalarda kronik ağrı, günlük hayat için gerekli fonksiyonların kısmi veya tam kaybı söz konusu olabilir. Denervasyondan sonraki 1 yılda kaslarda geri döndürülemez hasarlar oluşacaktır. Bu bağlamda kasa daha erken dönemde reinervasyonun sağlanması gerekmektedir (3).

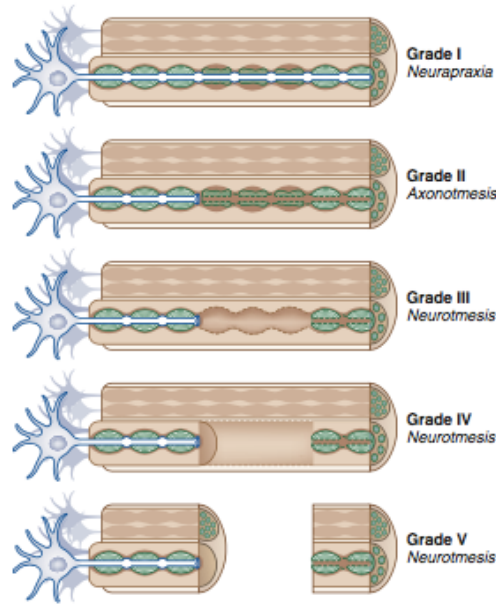
Periferik Sinir Yaralanmaları Sınıflandırmaları:

2. Dünya savaşı zamanında Birleşik Krallık'ta yapılan çalışmalar sırasında Seddon tarafından sinir yaralanmaları 3 sınıfta ele alınmıştır. Seddon'un sınıflandırma sistemine göre en hafif yaralanma şekli olan "nöropraksi" de sinir iletiminde fokal bloğa sebep olan myelin hasarı söz konusu iken akson korunmuştur. Bu şekildeki periferik sinir yaralanmaları tedaviye gerek duymadan en geç 6 hafta içinde tamamen iyileşme potansiyeline sahiptirler.

Seddon'un sınıflandırmasında ikinci grubu oluşturan yaralanma şekli olan aksonotmezis ise aksonun tamamen kesildiği ancak etraftaki destek yumuşak dokunun bütünlüğünün tamamen kaybolmadığı yaralanma modelini tanımlar. Bu modelde sinir kompleksi bütünlüğü korunmuştur ancak aksonda kesi mevcuttur. Aksonotmezis şeklindeki yaralanmalar, klinikte genellikle ezilme tarzı yaralanmalar, displace olmuş kemik fragmanlarının yarattıkları hasar sonucu karşımıza çıkmaktadır. Tamamen iyileşme nöropraksiye göre çok daha düşüktür. Çünkü yaralanma olduğu andan itibaren wallerian dejenerasyon süreci başlar. Rejenerasyonun kalitesini belirleyici etken çoğunlukla endonörium, perinörium gibi destek bağ dokularının korunmuşluk oranıdır.

Seddon'un sınıflamasına göre en ciddi yaralanma sınıfı ise nörotmezis olarak tanımlanmıştır. Sinirin tamamen kopmuş olduğu modeli tanımlar. Bu modelde myelin kılıf, akson, destek yumuşak doku yaralanmıştır. Nörotmezis şekli yaralanmada, spontan iyileşme söz konusu değildir.

Seddon sınıflandırmasına ek olarak, Sunderland tarafından yapılan sınıflandırma sisteminde ise nöral bağ dokudaki hasarının derecesi de göz önüne alınmıştır. Seddon'un tanımladığı nöropraksi ve aksonotmezis, Sunderland sınıflamasında sırasıyla evre 1 ve evre 2 ile eşdeğerdir. Ancak Sunderland sınıflaması nörotmezisi 3 evrede tanımlamaktadır. Evre 3 de perinörium, epinörium korunmuştur. Evre 4 tanımlamasında ise korunan tek yapı epinöriumdur. Evre 5 ise tüm nöral ve bağ dokunun bütünlüğünün bozulduğu tam kat sinir kesisini tarif etmektedir (Şekil 1.3). Bu sınıflama modelinin üzerine daha sonradan MacKinnon tarafından farklı evrelerdeki sinir hasarlarına farklı alanlarda sahip olan altıncı bir evre eklenmiştir.



Şekil 1.3: Periferik sinir sistemi yaralanma evrelemesi

Periferik Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu:

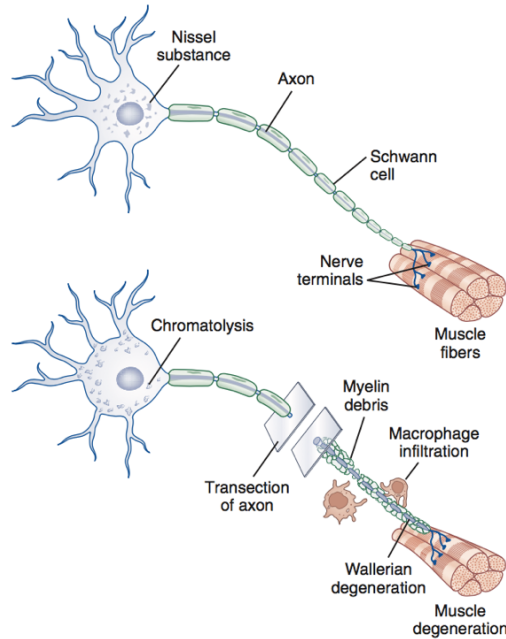
Periferik sinir dokusu yaralanmalara karşı 3 şekilde cevap gösterebilir. Bunlar segmental demyelinizasyon, wallerian dejenerasyon ve aksonal dejenerasyon olarak tanımlanmaktadır. Segmental demyelinizasyon ve wallerian dejenerasyon daha çok travmatik yaralanmalar sonucu oluşurken; aksonal dejenerasyon diabetes mellitus, renal yetmezlik gibi metabolik veya toksik durumlar sonucu oluşan bir cevaptır.

Segmental demyelinizasyon sinirin fokal bir segmentinin basıya veya gerime maruz kalması ile oluşur. Hasarın proksimal ve distal segmentlerinde kalan sinir dokusu ve iletim hızı normaldir. Hasarlı bölgedeki myelin distorsiyonu birden fazla ranvier düğümünü de bozması sonucu bu bölgede iletim bozulmuş veya yavaşlamıştır. Aynı fasikül içinde korunan ve korunmayan liflerin beraber olması durumunda asenkronize iletim olacağından bu durum yüksek senkronizasyon gereken iletilerde bozulmaya ve milisaniyeler düzeyinde gecikmelere sebep olmaktadır. Bu durumun klinik yansımaları ise; derin tendon reflekslerinde yavaşlama, vibrasyon hissinde bozulma gibi durumlardır. Daha ciddi travmalarda ise tüm myelinli liflerin hasarı söz konusu

olabilir. Bu durumlarda ise duyuusal ve motor kayıplar söz konusu olabilmektedir.

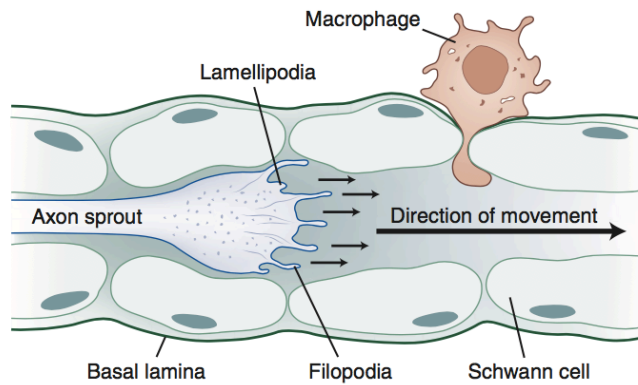
Wallerian dejenerasyon, evre 2-5 arasındaki tüm yaralanma modellerinde gerçekleşen akson hasarının olduğu yaralanmadır. Bu cevapta aksonda, hücre gövdesinde, hücresel etkileşimde ve çevre yumuşak bağ dokuda değişiklikler meydana gelir.

Sinir yaralanmasını takiben ilk değişiklikler kesinin distal kısmında başlar. Kalsiyum ve sodyum gibi iyonların hızlı bir şekilde hücre içine nüfuzu sonrasında hücre membranında gelişen bozukluklara bağlı olarak programlı hücre ölümü süreci başlar. Aynı zamanda aksonal yaralanma, lökosit kümelenmesini ve sitokin bağımlı kaskadlarla komşu nöronal olmayan hücre gruplarının aktive olmasını sağlar. Tüm bunların sonucu olarak nörotrofinler, kemokinler, ekstraselüler matriks molekülleri ve proteolitik enzimler ve interlökinler sentezlenir. Tüm wallerian dejenerasyon süreci yaklaşık 1 hafta sürerken, 3. günde schwann hücreleri Ranvier düğümlerine doğru retrakte olurlar ve aktive olan schwann hücreleri myelini sindirmeye başlar. Nöronal dejenerasyon proksimal güdüğe atlar ve nöronal rejenerasyon başlar. Proksimaldeki yaralanma ise nöronal apoptozis veya kromatolizise gidiş ile sonuçlanabilir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4: Akson kesisi sonrasında, distaldeki segmentte myelin kılıf ve akson düzeyinde dejenerasyon başlar. Makrofajlar bölgeye nüfuz eder. Hücre gövdesinde kromatoliz başlar.

Nörorejenerasyon konusu ele alındığı zaman yaralanma tipi önemlidir. Fokal demyelinizasyonu takiben Schwann hücreleri tarafından oluşturulan myelin orijinale göre çoğunlukla daha incedir. Bir başka rejenerasyon mekanizması olan kollateral dallanma ise; bir kası uyaran liflerin bir kısmında gelişen hasar sonrası, sağlam liflerden oluşan kollateral dalların kası reinerve etmesini tanımlar. Bu dallanmalar çoğunlukla yaralanmayı takiben 4. günde ranvier düğümleri veya sinir uçlarından başlar. Denerve olan kasların inervasyonunu üstlenen kollateral dallanmalar sayesinde kas kontraktilesinin artması ve hipertrofi ile sonuçlanan motor son plak ebatlarında artma olabilir. Ancak kesilen bir sinir ucunda büyüme konisi adı verilen yapı oluşur. Bu yapı filopodia ve lamellopodia isimli nörotrofik reseptörlerden zengin ayaklı çıkıntılar içerir. Kesi distalinde makrofajlar tarafından aksonal debris ve myelin kesecikleri temizlenerek aksonal büyüme için oluşacak Büngner bandlarına yer açılır (4)(Şekil 1.5). Büyüme konisi bu açılan alan boyunca günde 1-3 mm hızla olacak şekilde ilerleyerek sinirde büyüme sağlar. Bu hız lezyonun lokalizasyonuna göre değişiklik gösterebilir. Proksimal yaralanmalar 3 mm/gün kadar hızla rejenere olurken daha distaldeki yaralanmalarda bu hız 1 mm/gün olabilmektedir.

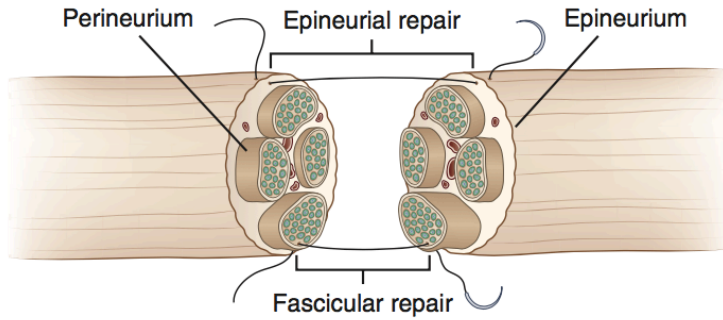


Şekil 1.5: Aksonal rejenerasyonun şematize edilmesi. Dejenere olan distal aksonal güdük boyunca klavuzluk eden Büngner bandlarının proksimal segmentin rejenerasyonu.

Yaralanma bölgesindeki endonöral tüplerin durumu da rejenerasyonun kalitesi açısından önem taşımaktadır. Endonöral tüplerde oluşan dezoryantasyon sonucu çevre yumuşak dokuya uzanan sinir lifleri nöroma formasyonları oluşturabilir. Bununla beraber yaralanma bölgesini geçmeyi başaran bir aksonal rejenerasyon son-organa ulaşmakta çoğunlukla başarılı olur. Ancak bu süre 4 ayı geçtiği durumlarda distal segmentteki endonöral tüp çapları 3 µm ve altına düşmesiyle rejenerasyon ihtimali daha düşüktür.

Periferik Sinir Kesilerinin Onarımı:

Günümüze kadar sinir yaralanmalarının onarılmalarına yönelik birçok yöntem gündeme gelmiş olsa da periferik sinir kesilerinin primer onarımı hala altın standart olma özelliğini korumaktadır. Bununla beraber sinir onarımında, onarım yapılan sinirdeki gerginliğin fazla olmaması onarım sahasında skar oluşumunu azaltacağından dikkat edilmesi gereken bir husustur. Sinir defekti olan yaralanmalarda ise birçok iletken modeli öne sürülmüş olsa da sinir grefti ile onarım en iyi sonuçları veren yöntem olarak görünmektedir. Ancak sinir grefti ile yapılan onarımların hiçbirinin primer onarım yapılan kesilerin sonuçları kadar iyi olmadığı bilinmelidir.



Şekil 1.6: Primer onarıma örnek olarak epinöral ve fasiküler sinir onarım

Yaralanma sonrası uygun koşullar mevcutsa periferik sinir kesisinin acil onarımının daha başarılı olacağı görüşü mevcuttur(5). Erken dönemde eksplorasyon kolaylığı, vazo nervorumların daha belirgin olması sayesinde daha başarılı koaptasyonlar yapılabilmektedir. Daha geç yapılan sinir onarımlarında sinir uçlarında fibrotik skar dokuları oluşabileceği için segment rezeksiyonu ve sonrasında greftleme ihtiyacı oluşabilir.

Genel olarak acil onarımlar yaralanmayı takiben ilk 48 saatte yapılabileceği gibi bazı otörler tarafından 1-3 haftada da yapılabileceği görüşü vardır. İlk 48 saat içinde onarımı yapılamayan yaralanmalarda iatrojenik enfeksiyonları önlemek adına 2-3. Haftalarda onarımın yapılması tercih edilebilir. Sinir onarımını yapmak için bu süreden daha fazla beklemek ise sinir uçlarındaki skarlaşmaya bağlı olarak sinir uçlarının rezeksiyonu, aşırı mobilizasyon veya sinir grefti kullanma ihtiyacı doğurabileceğinden önerilmemektedir. 3 haftadan sonraya kalan sinir onarımlarında çoğunlukla sinir grefti gerekmekle beraber, nöronların ve schwann hücrelerinin rejeneratif yanıt potansiyellerinin düşmesine bağlı olarak iyileşme sonuçlarının daha kötü olmasına sebep olmaktadır (3).

Temel olarak sinir kesilerinin primer onarımlarında epinöral veya fasiküler onarımlar tercih edilebilir. Epinöral onarımlar esnasında fasiküllerin uzanımı dikkate alınmalı, proksimal ve distal uçlar doğru eşleri ile karşı karşıya gelecek şekilde koordinasyon sağlanarak onarım yapılmalıdır. Bu amaç uğrunda vazo-nervorumlar klavuz olarak kullanılabilir. Diğer bir yöntem olan fasiküler onarım ise perinöryumun proksimal ve distal güdüklerde birbirine dikilmesini tanımlar. Bu onarım şeklinde de doğru eşleşmenin sağlanması önemlidir (Şekil 1.6). Örneğin duyuusal bir proksimal ucla motor bir ucun koaptasyonu rejeneratif sonuç vermeyecektir. Neyse ki proksimal uçların çoğunlukla bu sinir gruplarını mikst olarak barındırması bu sorunun klinik yansımasının seyrek olmasına sebep olmaktadır. Ayrıca fonksiyonel geri kazanım için motor-son-plağa ulaşan rejenerasyon olması yeterlidir. Bu rejenerasyonun orijinal akson ile aynı yerlerde sinapslara sahip olması gerekmez. Santral sinir sistemindeki plastisite sayesinde fonksiyon korunmuş olur. Primer sinir onarımlarında ortalama başarı %70 lerde iken bazı çalışmalarda %80-90 lı rakamlar

bildirilmiştir (6-8).

Ayrıca onarımda sinir dokuda gerim oluşmamasına özen gösterilmelidir. Sinir uçlarında oluşacak ufak bir gerimin dahi sinirdeki mikrosirkülasyonu bozduğu bilinmektedir. Sinir uçlarında % 8 lik bir uzamaya sebep olacak gerimin sinir uçlarındaki gerime bağlı olarak sinir mikrosirkülasyonunu %50 ye yakın azalttığı; %15 lik uzamaya sebep olan gerimin ise % 80 lik kan akımında azalmaya sebep olduğu bilinmektedir. Bu durumu engellemek adına sinir uçlarının her iki yöne de diseksiyonunu uzatarak sinirler daha mobil hale getiririlebileceği gibi bu işlemin de yine sinir uçlarında mikrosirkülasyon bozukluklarına sebep olabileceği akılda tutulmalıdır (3). Bu gibi sinir defektlerinde sinir grefti ile onarım yöntemleri kullanılmaktadır.

Periferik sinir onarımlarını yaparken sinirin uzanımına, distal ve proksimal güdüklerin birbiri ile doğru şekilde oryantasyonuna özen gösterilmelidir. Bu sayede fasiküller, dallar doğru uçlarla karşı karşıya gelerek iyileşme fırsatı yakalayabilir. Bu amaç doğrultusunda vazo nervorumların uzanımı göz önüne alınması ve iki uçtaki doğru damarların karşı karşıya gelecek şekilde koaptasyonlarının sağlanması nöronal yapıların doğru dizilimde karşı karşıya gelmesine sebep olacağından dikkat edilmesi gereken bir hususdur. Ayrıca sinir uçları koaptasyonunda kullanılan sütürlerin sayısı mümkün olduğunca az tutulması faydalıdır. Vasküler anastomozlarda olduğu gibi sızdırmazlık problemi de olmadığından düğümlerin çok fazla sıkılmaması önerilir. Düğümlerin fazla sıkılması fasiküllerde distorsiyona sebep olabileceğinden iyileşmeyi kötü yönde etkileyebilir. Dikiş hatlarının arasından dışarıya doğru protrüde olan fasiküller ise eksize edilmelidir.

Tüm bunlar göz önüne alındığı zaman periferik sinir tarafından inerve edilen son organ olan kas dokusunun reinervasyonu sağlanmadığı takdirde bazı geri dönüşümsüz değişiklikler oluşabilir. Endomisyum ve perimisyumda kollajen depositleri oluşur. Ancak 1 yıla kadar süreyle, motor son plak bütünlüğü ile beraber kas yapısının asıl mimarisi korunabilir. Geri dönüşümsüz kas fibrozisi ve dejenerasyon ise çoğunlukla 2 yıl gibi sürede tamamlanır (9-

11). Bu bağlamda periferik sinir hasarı sonrası rejenerasyonu arttırmanın fonksiyonel sonuçları ve iyileşmeyi olumlu yönde etkilediği laboratuvar çalışmalarıyla gösterilmiştir (12).

Periferik Sinir Rejenerasyonuna Farmakolojik Ajanların Etkisi:

Periferik sinir rejenerasyonunu arttırmak amacı ile çeşitli farmakolojik ajanların etkilerinden yararlanılmaya çalışılmıştır. Bu ajanlar araştırılırken nöronal gelişmeden ve nöron sağkalımından sorumlu yollar hedeflenmiştir. Bunlar arasında PI3K/PKB sinyal kaskadı, Ras-ERK yolağı, Rho-ROK ve cAMP/PKA sinyal mekanizmaları sayılabilir. PI3K/PKB sinyal mekanizması nöronlara trofik destek sağlar, büyümeyi ve diferansiasyonu artırır, apoptozu önler, direk sinyalleşmeyi sağlar. Ras-ERK yolağı ise nöronal büyümede anahtar role sahip olup aksonal sağkalımı arttırmaktadır (13). cAMP/PKA sinyal mekanizması ise nöronal büyüme, sağkalımı ve diferansiasyonu arttırmaktadır (14). Bu mekanizmaya etki eden ilaçlar rolipram ve testosteron olduğuna dair veri mevcuttur (15). Rho-ROK sinyal mekanizmasında ise Rho-GTPaz aktivitesi sayesinde büyüme konilerindeki ekstraselüler ligandlarla hücre iskeleti elemanı olan aktinler arasında bağlar oluşur (16). Fasudil, ibuprofen ve proteoglikan sindiren enzim olan kondroitinaz ABC bu yolla etki ettiği düşünülen ajanlardandır. Literatürdeki periferik sinir rejenerasyonuna etkisi olduğu düşünülen başlıca ajanlar insülin-benzeri büyüme faktörü (17) , prosaposin (18), silier nörotrofik faktör (19) , asidik fibroblast faktör (20) , hyalüronik asit (21), lepeptin (22) , ganglioizid GM1 (23) , eritropoetin (24) , geldanamisin (25) , kreatin mono-hidrat (26) ,asetil-L-karnitin (27) , rolipram (28) , testosteron (29) , fasudil (30) , kondroitinaz ABC (31) , ibuprofen (32) , melatonin (33) , transtretin (34) ,takrolimus olarak sayılabilir. Takrolimusun myelinli aksonların sayısını, myelin kalınlığını, akson saçılımını, aksonal rejenerasyonu arttırdığı ve nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir (9).

Takrolimus (FK-506) , 1984 yılında Streptomyces tsukubaensis isimli bakteriden elde edilmiş doğal bir makrolid laktondur (35). İn vivo ve in vitro

ortamlarda immünsupresif özellik göstermektedir. 1989 yılından beri karaciğer nakillerinde rejeksiyonu önlemek amacıyla kullanılmasına ek olarak yıllar içinde diğer organ nakillerinde de kullanılmaya başlanmıştır. Takrolimusun immünsupresif etkisi; düşük molekül ağırlıklı immünofilin olan FKBP-12 ile bağlanması sonucu oluşan FK506/FKBP-12 kompleksinin, T lenfositler üzerinde bulunan PP2B/kalsinörin' in selektif inhibitörü olarak çalışması ile oluşur (36). İnterlökin-2 salınımının inhibisyonu ile devam eden süreç sonunda T hücre proliferasyonu azalır ve hücreyel immün yanıt zayıflar. Bununla beraber takrolimusun myelinli aksonların sayısını, myelin kalınlığını, akson saçılımını, aksonal rejenerasyonu arttırdığı ve nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada yine takrolimusun ilginç olarak nörotrofik ve nöroprotektif etkileri de olduğu da farkedilmiştir (37). Literatürde bunlar gibi çok sayıda takrolimusun nörorejeneratif etkisini destekler nitelikte çalışma mevcuttur. Ancak takrolimusun nörorejeneratif etki mekanizması hala net bilinmemektedir. FKBP-12 nin ortadan kaldırılması ile nörotrofik etkilerin devam ettiğinin görülmesi ise takrolimusun başka bağlayıcı moleküllerle etkileşimini düşündürmektedir. Nörorejeneratif etkiden sorumlu olabilecek mekanizmaların FKBP-52, GAP43, HSP'ler ve hücre içi iskelet dinamikleri olduğu yönünde veriler vardır (38). Gold tarafından yapılan çalışmada FKBP-52 ye bağlanan antikorların takrolimusun nörotrofik etkilerini engellediği belirtilmiştir (39). Daha yeni bir çalışmada ise FKBP-52'nin ekspresyonunun susturulmasının nöral diferansiasyonu önlediği ve yakın partneri olan FKBP-51 ile arasındaki dengenin bozulmasının diferansiasyon ilerlemesini durdurduğu gösterilmiştir (40). Takrolimus bağımlı nöronal diferansiasyonun erken evrelerinde FKBP-52 nin ekspresyonunun, HSP-90'ın ve HSP-90 ilişkili koşaperon olan p23'ün stimüle olduğu gösterilmiştir. FKBP-52, HSP-90 ve p23'ün glukokortikoid reseptörlerine bağlanan heterokompleksler halinde bulunduğu bilinmektedir. Bu heterokompleksler nükleer laminada bulunmakla beraber takrolimusun stimulusu ile sitoplazmaya salınmaktadır. Sitoplazmadaki bu heterokompleks sitoskeleton ile, aktif aksonal alanlarla etkileşime geçer. Diferansiye olmuş nöronlarda kesi oluştuğunda bu kompleksin tekrar nükleer laminaya döndüğü düşünülmektedir. Takrolimusun HSP-90 ve FKBP-52

üzerinden etki ederek bu kompleksi sitoplazmaya salınımını sağlayarak mekanik etki ile nörorejenerasyonun erken evresine katkıda bulunduğuna yönelik çalışmalar vardır (41). Tüm bu hücre içi mekanizmalara ek olarak takrolimusun sinir iyileşmesinde skarlaşmayı azaltarak da etki ettiğine dair çalışmalar mevcuttur (42).

Literatürde takrolimusun periferik sinir rejenerasyonuna olumlu yönde etkileri olduğuna dair bilgi birikimi mevcuttur. Farklı sinir yaralanma modellerinde kullanımının sinir iyileşmesini arttırdığı gösterilmiştir. Ezilme tarzı yaralanmalar (43, 44) , tam kat kesi şeklinde yaralanmalar (45) , kronik aksotomi modelleri (46) , izograft (47) ve allograft (48) modellerinde kullanılıp olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiş olsa da takrolimusun uzun dönem kullanımının gerekmektedir. Takrolimusun sinir yaralanmasını takiben geçici bir süre ile kullanımı ile aynı olumlu etkinin oluşturulup oluşturulamayacağını incelemek üzere yapılan çalışmada; ezilme, tam kat kesi onarımı ve greft ile sinir defekti onarımı modellerinde kısa dönem takrolimus uygulanmasının rejenerasyonu hızlandığı yönünde veriler elde etmiştir (9). Ancak bu hız devamlı uygulanan takrolimus seviyesine göre daha düşük bulunmuştur. Takrolimusun kısa dönem kullanılması halinde bilinen artmış diabetes mellitus riski, hipertansiyon, hiperlipidemi, anormal renal fonksiyon, gastrointestinal bozukluklar, lökopeni, sitomegalovirüs enfeksiyonu ve fırsatçı enfeksiyonlara yatkınlık gibi yan etkilerinin minime indirilebilmesi söz konusu olabilmektedir (49).

Tüm bu veriler ışığında günümüzde klinik kullanımı olan nörorejeneratif etkisi olan bir farmakolojik ajan bulunmamaktadır.

Periferik Sinir Rejenerasyonuna Kök Hücrelerin Etkileri:

Yaralanmış bir periferik sinirin tamamen doğru tekniklerle onarımı yapılmış olması, postoperatif uygun bakımın uygulanmış olmasına rağmen optimal sonuçları elde etmek her zaman mümkün olmayabilir. Sonuçların

istenilenlerin gerisinde kalması sebebiyle bilim insanları, sinir rejenerasyonunu arttıracak ve hızlandıracak alternatif tedavi metodlarını araştırma yoluna gitmişlerdir. Bu noktada kök hücreler ile yapılan çalışmalar önem taşımaktadır.

Birçok kök hücre tedavisinde olduğu gibi sinir rejenerasyonunda kullanılan kök hücre terapilerinde de hedef rejenere olmakta olan aksonlar için daha uygun bir biyoçevre sağlamak ve mümkünse bunu uzun süre sürdürebilmektir. Boşalmış motor ve duyu nöron havuzlarını kök hücreler ile doldurmak sayesinde daha fazla sayıda nöron rejenerasyonuna imkan veren mikroçevre elde edilebileceği düşünülmektedir.

Periferik sinir rejenerasyonunda kullanılmak üzere elde edilecek kök hücre seçilirken dikkat edilmesi gereken hususlar; dokunun kolay ulaşılabilir olması, hücrelerin kültür ortamında hızlı çoğalması, in vivo ortamda hayatta kalabilir olması, konak dokulara entegre olabilir olması, transfeksiyona ve eksojen gen ekspresyonuna dayanıklı olması şeklinde sıralanabilir (50). Bununla beraber seçilen kök hücre tipi, diferansiasyon derecesi, bulunduğu hücre iskelesi ve verilmiş metodu önemlidir (51).

Kök hücreler sinir sisteminde kaybedilen nöronların yerini alabilirken glial destek hücrelerinin sayılarının artmasında da rol oynarlar. Spinal kordun dorsal kök veya ventral boynuzunda henüz gösterilememiş olsa da aksotomize nöronlarda sağkalıma yardımcı olma potansiyelleri olduğu ve rejeneratif süreçte mikroçevreyi değiştirerek etki ettikleri düşünülmektedir. Periferik sinir sistemi söz konusu olduğunda ise kök hücreler etkilerini Schwann hücre sayısı ve aktivitesini artırarak yapmaktadır. Otolog schwann hücrelerinin kültüre edilmesi uzun süreler gerektirmesi sebebiyle pratik olmayan bir seçenektir. Bu sebeple kök hücrelerinin bu etkisinden yararlanılabileceği düşünülmüştür. Eksojen Schwann-benzeri kök hücrelerle Büngner bandları entegre olup aksonal gelişmeye klavuzluk edebilir. Transplante edilmiş olan hücreler büyüme faktörleri salgılıyor veya parakrin etkilerle endojen konak olan schwann hücre gruplarına büyüme faktörleri salgılatarak etki ediyor olabilirler (52).

Kök hücre nakli sonrasında sinir büyüme faktörü (NGF), beyin-derive-nörotrofik faktör (BDNF) (53) , glial hücre serisi-derive-nörotrofik faktör (GDNF), silier nörotrofik faktör ve nörotrofin-3 gibi büyüme faktörlerinin endojen Schwann hücreleri ve nakledilen kök hücrelerce salgılandığı gösterilmiştir. Bunların yanı sıra vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü ve anjiopietin-1 gibi anjiogenik faktörlerin salındığına dair veriler de mevcuttur (54-57). Kök hücrelerin bilinen immünomodülatör etkileri ise granülosit (G-CSF) ve makrofaj (M-CSF) koloni-stimüle edici faktörleri arttırması, interlökin 6-7-8-11 ve TNF-alfa gibi faktörleri arttırdığı yönündedir. Konak immün cevabını baskılamakla beraber kök hücre tedavisinin uygulanması sinir onarımı sonrası oluşacak inflamasyon ve fibrozisi azaltacağından iyileşmeyi olumlu yönde etkileyebilir.

Kök hücrelerin sinir iyileşmesinde kullanılmadan önceki getirileceği diferansiasyon aşaması ise tartışmalı bir konu olmakla beraber Schwann hücresi-benzeri kök hücrelere kadar veya daha önceki seviyelere kadar diferansiye edilmiş hücre grupları ile yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiş çalışmalar mevcuttur (58, 59). Bu görüş doğrultusunda diferansiye edilmemiş kök hücrelerin nakledilmesi halinde in-vivo istenmeyen diferansiasyonlar oluşabileceği ve bu hücrelerin yaralanma bölgesinde toparlanabileceği yönünde bir karşıt düşünce mevcuttur. Ancak ilginç olarak diferansiye edilmemiş kök hücrelerle yapılan çalışmalarda da olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Bu görüşü savunanlar ise in-vitro ortamda diferansiasyon sağlanması için gereken sürenin gereksiz gecikmeye sebep olduğu, klinik uygulanabilirliği kısıtladığını düşünmektedir. Hatta yapılan bir çalışmada diferansiasyon sürecinin nörotrofik faktörlerin salgılanmasında azalmaya sebep olduğu yönünde sonuçlar bildirilmiştir (60). Aynı zamanda in-vitro ortamda elde edilen diferansiasyondaki hücrelerin, in-vivo ortama nakledilmesi sonrasında in-vitro ortamdaki uyaranların ortadan kalkmasına bağlı olarak orijinal fenotipine dönme eğiliminde olduğuna dair veri mevcuttur (61). Literatürde diferansiye olmamış kök hücrelerin in-vivo ortamda lokal uyaranlarla uygun

diferansiasyona gittiğini gösteren yayınlar olduğu gibi bunu gösterememiş yayınlar da mevcuttur.

Kök hücre kaynağı olabilecek hücre grupları:

-Embriyonik kök hücreler: 1998 yılında Thomson ve arkadaşları tarafından insan blastokistinden pluripotent hücre gruplarının izolasyonu tanımlanmıştır (62). Bu kök hücre grubu 3 germinal yaprağa dönüşebilme özelliği olan, üstün diferansiasyon kapasitesi olan diğer kök hücre gruplarına göre daha uzun süre proliferasyon kapasitesine sahip, özel bir kök hücre grubudur. Ancak nöronal hücre gruplarının diferansiasyonu çok daha özellikli bir süreç olup, günümüzde tanımlanmış diferansiasyon protokolleri sınırlı sayıda hücre grubuna dönüşüme uyum göstermektedir. Bu hücre gruplarının kullanımında diğer engeller ise yüksek immünojenite (63) , yüksek tümörojenite (64) ve etik problemler olarak sayılmaktadır. Bu hücrelerin temin edilebilmesi embriyonun blastokist aşamasında sakrifiye edilmesi ile mümkündür. Bu zorluklar ise araştırmacıları embriyonel kök hücrelerden, mezenkimal prekürsörler üzerine çalışmalar yapmaya itmiştir.

-Nöronal Kök Hücreler: İlk olarak 1990 yılında erişkin mürin beyinlerinde elde edilmiş bu kök hücreler doğal olarak nöronal ve glial hücre gruplarına diferansiye olurlar. Ancak bu değişim özelleşmiş olarak embriyolojik dönemde ve erişkin çağda santral sinir sisteminin sadece sınırlı bölgelerinde sınırlı miktarda gerçekleşebilir (65). Memelilerde bu hücre grupları subventriküler ve subgranüler alanlarda primer olarak bulunmaktadır. İnsan striatumunda da bu hücre gruplarına rastlanmıştır. Literatürde bu hücre gruplarının uygulandığı periferik sinir yaralanmalarına dair çalışmalarda pozitif sonuçlar bildirilmiştir (66, 67). Bununla nöral kök hücre transferi sonrasında nöroblastom oluştuğu da gözlenmiştir (68). Ayrıca elde edilmesi zor olan bir hücre çeşidi olması da kullanımını kısıtlamaktadır.

-Mezenkimal Kök Hücreler: Bu hücre grubu multipotent olarak bilinir. Mezenkimal kök hücreler, kemik iliğinden elde edilebildiği gibi adipoz dokudan, fetal dokulardan, kıl köklerinden, diş pulpalarından da elde

edilebilmektedir. Genel olarak bu hücre grubunun diferansiasyonunun mezodermal gruba olduğu kanısı var olsa da non-mezodermal hücre serilerine de transdiferansiasyon olabildiği kabul edilmektedir. Bu karakteristik özelliği sayesinde nörorejeneratif etkileri olabileceği düşünülmektedir.

-Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler: Bu hücrelerin elde edilmesi, embriyonel kök hücrelerin ve nöronal kök hücrelerin aksine daha kolay olmakla beraber etik problemler daha azdır. Uygun koşullarda kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler; non-mezodermal hücre serilerine dönüşüp astrositler, nöronlar ve Schwann hücrelerini oluşturabildiği bilinmektedir (69). Bu hücre grupları üzerinde yapılan periferik sinir rejenerasyonu etkilerini araştıran çalışmalarda kök hücrelerle doldurulmuş kondüit ve aselüler greftlerin boş kanallara oranla etkili olduğunu gösterenler mevcuttur. Buna karşın olarak kültüre edilmiş Schwann hücrelerinin etkilerinin daha etkili olduğunu destekleyen çalışmalar da mevcuttur (70). Bu kök hücrelerin kullanımının, sinir defekti modellerinde altın standart olarak kabul edilen sinir grefti tekniğinden başarılı olduğunu ve aynı oranda başarılı olabileceğini destekleyen çalışmalar mevcuttur (71, 72). Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler, yukarıda ismi geçen kök hücre grupları ile kıyaslandığında bazı dezavantajlar taşımaktadırlar. Bu hücreleri elde etmek klinik olarak mümkün olsa da elde edilen dokudaki kök hücre fraksiyonunun düşük olması, kök hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyon kapasitelerinin düşük olması, elde edilmiş yolunun göreceli invaziv ve ağırlı olması olumsuz yönleri olarak sayılabilir. Bu sebeple daha az invaziv yollarla elde edilebilecek mezenkimal kök hücre kaynakları aranmıştır.

-Adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücreler: Yağ doku kolaylıkla bulunabilen, liposuction gibi yöntemlerle sıklıkla elde edilebilen bir dokudur. Yağ doku, kemik iliği ile kıyaslandığında yüksek kök hücre fraksiyonuna sahip bir doku olup buradan elde edilen kök hücreler de yüksek diferansiasyon ve proliferasyon özelliklerine sahiptir (73). Bu hücrelerle yapılan çalışmalarda diferansiye edilmiş adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, multipl nöronal ve Schwann hücre belirteçlerini taşıdıkları görülmüştür (53, 74-76).

Tüm bu veriler göz önüne alındığında; adipöz kaynaklı kök hücrelerin, hasatındaki düşük morbidite riski, geniş kullanım alanı ve üstün kök hücre özellikleri barındırması preklinik çalışmalarda bu hücre grubunun daha çok tercih edilen bir seçenek olmasına sebep olmuştur.

-Fetal Kaynaklı Kök Hücreler: Bu hücreler; amniyotik membran, amniyon sıvısı, umbilikal kord hücreleri ve kanı, wharton jölesinden elde edilebilirler. Fetal dokular, mezenkimal kaynaklı kök hücrelerin en primitif hallerine ev sahipliği yapar. Hücrelerin yaşı 42 haftayı geçemediğinden erişkinden alınan kök hücrelere oranla çevresel ve zamanın oluşturduğu olumsuz etkilere daha az maruz kalmışlardır (77). Bu hücreler kültürde genişlemeye ve uygun ortamda nöral fenotipe diferansiye olmaya uygundurlar (78, 79). Kök hücre gruplarının naklinden sonra sağkalımının sınırlı olduğu bilinmesi üzerine bu hücrelerin sağkalımını artırıcı yöntemler araştırılmalıdır. İnflamatuvar mediatörlerin inhibe edilmesi apoptotik kaskadın zayıflamasına katkıda bulunabilir. Bu kök hücre grubunun otolog kullanımı doğası gereği mümkün olmadığından allojenik kullanımlar gündeme gelebilir. Ancak allojenik hücrelerin kullanılması da immünreaktivite gibi problemler sebebiyle klinik uyarlamaya uygun olmadığı düşünülmektedir.

-Cilt Derive Prekürsör Hücreler: Bu hücreler dermis içinde hazır halde bulunan, kültürde yüksek çoğalma oranları gösteren, kolay erişilebilen multipotent hücre gruplarıdır. Wallerian dejenerasyon esnasında schwann hücre gruplarında proliferasyona sebep olan nöroregulin isimli faktör ile, insan ve rodent kaynaklı cilt derive prekürsör hücreler kültüre edildiklerinde Schwann hücre belirteçleri eksprese ettikleri ve onlar gibi davrandıklarına yönelik çalışmalar mevcuttur (80-84).

-Kıl Folikülü Kök Hücreleri: Kıl folikülleri dinamik dermis uzantısı olan hücrelerdir. Bu hücrelere erişim kolay olmakla beraber nöral krestten köken alan hücre gruplarıdır. Ancak kültürde genişleme hızı yavaş olması sebebiyle klinik uyarlaması sınırlı olabileceği düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda mürin siyatik sinir yaralanma modellerinde bu hücrelerin, GFAP

pozitif schwann-benzeri hücrelere diferansiye olup myelinizasyona yardımcı olduğu bildirilmiştir.

-Dental Pulpa Kök Hücreleri: Bu hücreler eksfoliye edilmiş desidöz dişten elde edilebilen nöral krest kökenli hücreler olup tartışmalı olmakla beraber en kullanışlı multipotent kök hücre kaynağı dokulardır. Otolog geniş kullanıma geçmesi için erken yaşta bu dişlerin toplanması ve saklanması gerekmektedir. Bu hücre grupları daha yeni olmakla beraber periferel sinir rejenerasyonunda olumlu etkileri olduğuna dair bilgiler mevcuttur.

-İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler: 2006 yılında farelerin somatik hücrelerde, transkripsiyon faktörlerinin ko-ekspresyonunu takiben indüklenmiş pluripotens saptanmıştır (85). Somatik hücrelerin, viral vektörler aracılığı ile transkripsiyon faktörlerine maruz kalması veya ex vivo ciddi manipölasyonlarla elde edilebilmektedir (86). Bu hücre gruplarının embriyonel kök hücrelerle benzer özellikler gösterse de küçük farklılıkları da vardır. Hücreleri bu şekilde yeniden programlama gündeme geldiğinde, somatik hücrelerin kimliklerinin stabilitei sorgulanmaya başlanmıştır. Bu sayede embriyonel kök hücrelerin kullanımı ile ilgili kısıtlamaları atlayan, hastaya özgü pluripotent bir kök hücrenin elde edilebilmesi söz konusu olmuştur. Ancak indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin, nöronal hücre serilerine dönüşümü in-vitro olarak gösterilmiş olmakla beraber (87, 88) bu diferansiasyonun azalan etkinlik ve artan varyasyonlarla olduğu düşünülmektedir (89). Tüm bu verilere rağmen bu hücrelerin orijinal hücrelerin epigenetik hafızalarını taşıması ve tekrar programlamanın kromozomal yozlaşmasını taşıyor olabileceği ve bu sebepten dolayı embriyonel kök hücrelerden bile daha tümörojenik özellik taşıyabileceğine dair çekince mevcuttur (64).

Günümüzde bu bilgiler ışığında bakıldığında adipöz kaynaklı kök hücreler; yüksek fraksiyona sahip olmaları, yüksek diferansiasyon ve proliferatif özellik barındırmaları, kolay ve düşük morbidite ile toplanabilme özelliklerinin olması sebebiyle öncelikli tercih edilen hücre grubu olmuştur. Mevcut bilgilerle bu hücrelerin diferansiye edilip nakledilmesinin kesin

üstünlüğü kanıtlanmadığından diferansiye edilmeden verilmesi daha pragmatik ve uygulanabilir olacaktır. Bu seçeneğin de etkilerini optimize edebilmek için kök hücrelerin uygun veriliş metodunun ve sağlanacak desteğin seçilmesi önemlidir.

Kök hücreler yerleştirilebileceği iskeleler; bu hücrelere canlılık, proliferasyon desteği ve hücreler arası iletişim için destek veren bir zemin oluşturan yapılardır. Bu amaçla kullanılmakta olan iskeleler olarak N-metakrilat glikol sitozan, hyaluronik asit, polietilen glikol, fibrin ve matrijel gibi yapılar kullanılmıştır. Destek rollerinin yanı sıra bu yapılar, kök hücrelerin uygulandığı alandan yayılmalarını önleyen bir görev üstlenirler.

Kök hücrelerin periferik sinir iyileşme modellerinde verilme metodları ile ilgili çeşitli uygulamalar mevcuttur. Hücrelerin içinde yüzdüğü medium solüsyonların sinir uçlarına enjeksiyonu onarım yapılan modellerde kullanılmıştır. Ancak bu yöntemle hücrelerin verilmesi sinir uçlarında travmaya sebep olarak nöronal mimariyi bozabilmektedir. Buna bağlı olarak da ön görülemez hücre dağılımı olacağından sonuçları optimize etmek mümkün olmayabilir. Bunun üzerine hücrelerin fibrin matrikse ekilerek, sinir onarım sahasının çeresine enjekte edilmesi de denenmiştir. Ancak fibrin matrikse ekilip onarım sahasına verilerek elde edilen sonuçların sinir uçlarına enjeksiyon yapılarak elde edilenle arasında fark olmadığı görülmüştür (90). Diğer çalışılan kök hücre verilme metodlarından birisi de bu hücrelerin kondüit lümenine yerleştirilmesidir. Bir başka yol ise kondüit bir matrikse bu hücrelerin gömülmesidir. Bu amaçla kollajen ve fibrin gibi ekstraselüler matriksden oluşan doğal kondüitler kullanılabileceği gibi poliglikolik asit, polilaktik-ko-glikolik asit, silikon tüp, polihidrosibütirat, politetrafloroetilen, ipek fibroin ve sitozan gibi sentetik ürünlerden oluşan kondüitler de kullanılabilmektedir. Ancak karar verirken bu kondüitlerin bozunabilirlikleri göz önüne alınmalıdır. Bu bağlamda doğal kondüitler daha öngörülebilir, non-toksik şekilde bozunma gösterirler. Bu özellikleri gösterirken doğal kondüitler, hızlı bozunma göstermesi ile periferik sinir rejenerasyonu için gerekli olan süre boyunca rejenerasyon sahasında kalamayabilirler. Sentetik kollajenler ise bozunma

süreci içinde asidik biyoçevreye sebep olabilirler. Bu ise hücresel aktivitelerde bozulmalara sebep olabilmektedir.

Zaman içinde aksonal ilerlemede, özellikle distal segmentteki ekstraselüler matriks elemanları ve bazal laminanın öneminin daha iyi anlaşılması sebebiyle yeni üretilen kondüitlerin boş tüplerden ziyade lümen içi yapılara sahip olmalarına önem verilmiştir. Bu çabalarla lümenler içinde farklı şekilde düzenlenmiş lif yapıları denenmiştir. Tüm bu gelişmelere rağmen içinde hücre desteği olmadan taklit edilmeye çalışılan nöronal yapı yeterli başarıyı yakalayamamıştır.

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda kök hücrelerin sistemik uygulanmasının uygun dozaj aralığında olmak kaydıyla rejeneratif destek sunabileceğini destekleyen çalışmalar mevcuttur (52, 91). Ayrıca nöromusküler kavşak seviyesine kök hücre uygulanması da diğer bir hücre verilme yöntemi olarak literatürde yer almaktadır (92).

Kök hücrelerin periferik sinir rejenerasyonu ile ilgili kullanımı ile ilgili yapılmış başarılı preklinik ve *in vitro* çalışmalara rağmen bu hücrelerin klinik kullanımı henüz mümkün gözükmemektedir. Bununla beraber kök hücre kullanımına ve periferik sinir rejenerasyonunu arttırdığına yönelik birçok veri olmasına rağmen bunların hiçbirisi konvansiyonel yöntemlerine üstün bulunmamıştır. Literatürde kullanılan kök hücrelerin; farklı tiplerde olması, diferansiasyon aşamalarının farklı seviyelerinde bulunmaları, farklı hücre iskelelerine ekilmeleri ve farklı verilme metodlarının kullanılması ise bu çalışmalar arasında homojen değerlendirmeler yapılmasını engellemektedir.

İdeal kök hücre uygulanma stratejisi ise kök hücrelerin periferik yolla uygulandığında spesifik olarak ihtiyaç olduğu bölgeyi tanıyıp orada kümelenmesi veya etkilerini o bölgede meydana getirmesini içermektedir.

Bu çalışmada; kök hücreler ile elde edilebilecek nörorejeneratif pozitif etkinin, yine periferik sinir rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediği bilinen takrolimus isimli ajan ile kombine kullanımının sinir iyileşmesinde sinerjistik etkiye sahip olabileceği görüşü savunulmaktadır. Takrolimusun, immünsupresif etkisi sayesinde otolog kök hücrelerin cerrahi saha çevresinde immun

baskılanmış süreç sayesinde daha efektif sinir iyileşmesine olanak sağlayacağı görüşü öne sürülmektedir.

MATERYAL METOD

T.C. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan B.30.2.AKD.0.05.07.00/54 sayılı etik kurul onayı doğrultusunda bu çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada ağırlıkları 200-260 gram arasında değişkenlik gösteren, Dişi Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar rastgele seçim olmak üzere her grup 1'de 11 hayvan, grup 2 de 10 hayvan, grup 3 de 12, grup 4'de 15 hayvan, grup 5'de 13 hayvan içerecek şekilde 5 farklı gruba ayrılmıştır. Tüm hayvanlar Cities Yönergesine göre bakımları ve beslenmeleri yapılmış gündüz ve gece sikluslerine uyacak şekilde aydınlık ve karanlık maruziyetleri sağlanmıştır. Çalışmanın herhangi bir zaman diliminde anestezi indüksiyonu sonrasında exitus olan denekler çalışmadan çıkarılmıştır. Grup 1 kontrol grubu olarak seçilmiştir. Bu gruptaki canlılarda siyatik sinir kesi ve onarımı yapılmıştır. Grup 2 ise sham grubunu temsil etmektedir. Sham grubunda cerrahi stresi tetiklemek ve taklit etmek amaçlı siyatik sinir explore edilmiş ancak kesi ve onarım gerçekleştirilmeden cerrahi sonlandırılmıştır. Grup 4 ise sinir kesisi ve onarımını takip eden 10 günlük uygun dozda takrolimus tedavisini almıştır. Grup 3 ve 5 deki sıçanların inguinal bölgelerinden eksize edilen yağ yastıkçıklarından uygun ortamda adiposit kaynaklı kök hücreler elde edilmiştir. Bu hücreler uygun konsantrasyonlarda taşıma solüsyonları ile beraber sinir kesi ve sonrasındaki primer onarım sahasına verilmiştir. Grup 3'de sinir rejenerasyonunu desteklemek amaçlı sadece adiposit-kaynaklı kök hücreler kullanılırken; grup 5'de bu hücrelere ek olarak postoperatif belirli bir süre içinde takrolimus uygulanmıştır.

Tüm hayvanlar 2 cerrahi süreçten geçmişlerdir. İlk cerrahi işlem yağ yastıkçıklarının izolasyonunu içerirken, ikinci cerrahi işlem ise siyatik sinirin explore edilmesini içermektedir.

Adiposit Kaynaklı Kök Hücre Elde Edilmesinde Kullanılacak Olan İnguinal Yağ Yastıkçığının Toplanması:

Bu işlem için 75mg/kg dozda ketamin ve 15mg/kg dozda ksilazin karışımının intraperitoneal enjeksiyonu ile sağlanan genel anestezi sonrasında sol inguinal bölge traşlanmış ve uygun steril saha izolasyonu yapılmıştır. Sıçanların sol inguinal bölgelerinden inguinal ligaman 0.5 cm inferolateralinden yapılan, ligamana paralel insizyonla ciltaltı yağ yastıkçığına ulaşılmıştır. Bu yağ dokuya giren superficial inferior epigastrik arter ve ven bipolar koter yardımı ile koagule edilmiştir. İşlem esnasında minimal kanama olmasına özen gösterilmiştir. Kök hücrelerin kullanıldığı gruptaki sıçanlar numaralandırılmış ve ilk seansda sol inguinal bölgeden yağ yastıkçıkları toplanmıştır. Bu yağ yastıkçıkları sıçan numarası ile uyumlu şekilde numaralandırılmış transfer solüsyonları ile kök hücre elde edilmek üzere laboratuara nakledilmiştir. Kök hücrelerin kullanılmadığı grup 1-2 ve 4 de ise cerrahi süreci ve işlemi taklit etmek amacı ile sol inguinal yağ yastıkçığı eksizyonları yapılmıştır. Tüm cilt insizyonları 4.0 ipek dikiş materyaliyle basit sütür tekniği ile onarılmıştır. Tüm hayvanlar ilk cerrahi sonrasında ayrı kafeslere yerleştirilerek 500mg parasetamol-500cc su karışımı olacak şekilde içme sularına analjezik konulmuştur. Otofajiyi önlemek amacı ile rodentlere uygun Elizabeth Yakalığı takılıp postop 3. günde çıkarılmıştır.

Adipöz-Kaynaklı Kök Hücre İzolasyonu

Cerrahi yolla elde edilen yağ yastıkçıkları antibiyotik içerikli transfer besiyeri ile laboratuvar ortamına taşındı. Laboratuvar ortamında steril kabin içerisinde yağ yastıkçıkları/fat-padler cerrahi makas yardımıyla mekanik parçalanmaya uğratıldı. 1X PBS ile yıkanan makas ile mekanik parçalanmaya

tabii tutulan yağ dokusu %0.75 Kollajenaz Tip 1 ile 37 °C’de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 mikronluk meshden geçirilen yağ dokusu kimyasal parçalanmanın ardından ikinci kez mekanik parçalanmaya tabii tutuldu. Üzerine %10 FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek 1600 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemine tabii tutuldu. Kimyasal hücre ayrışması sonucu elde edilen tüp içeriği santrifigasyon işlemi ile gradient ayrışmasına uğratılmış olundu. 50 ml’lik falkon tüp içerisinde santrifüj sonrası oluşan pellet Stromal Vasküler Fraksiyon %10 FBS içeren DMEM ile çözülerek petrilere ekildi ve 37 °C’de %5’lik CO₂’li ortamda inkübasyona bırakıldı. İki gün sonra tutunan hücrelerin (adipoz kaynaklı kök hücre) gün ardışık besiyeri değiştirilerek çoğalması sağlandı. İki kere %0.25’lik tripsin solüsyonu ile pasajlanan hücreler pasaj sayısı üç’ü bulduğunda nakledilecek hücre sayısının elde edilmesi sağlandı. Gerekli sayıya ulaşan hücreler (1x100000 hücre/100 ul/ sıçan) 1X HBSS (Sigma, Cat: 55021C) içerisinde çözülerek insülin iğnelerine çekilerek enjekte edilebilir hale getirildi.

Kök Hücre Eldesinde Kullanılan Gereç ve Yöntemler:

1. Hücre Kültürü

Hücrelerin tamamı L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pürivat, %10 Fetal Dana Serum (FBS-Biochrom cat. No:S0115), Penisilin/Streptomisin/Amfotersin B (BI-03 033 113) ve gentamisin eklenmiş DMEM (Dulbecco’s Modifeid Eagle Medium – Biochrom FG0415) içinde monolayer külterler %5 CO₂’lik atmosfer, %95 nem ve 37 °C’lik inkübatörde çoğaltıldı.

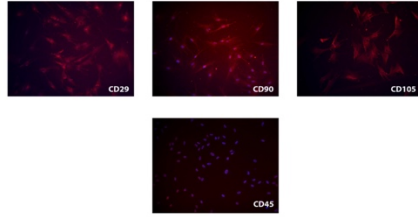
2. PBS Hazırlanması

5X PBS: 40gr NaCl, 1gr KCl, 7,2gr Na₂HPO₄ , 1,2gr KH₂PO₄ tartılıp, 800ml bidistile su içerisinde çözüldü. NaOH ve HCl ile pH 7.4’e ayarlandı. Hacim 1L’ye tamamlandı ve otoklavlandı.

1X PBS: 200ml, 5X PBS, 800ml bidistile su ile 1litreye tamamlandı.

3. %0.75 Kollajenaz Tip 1 Solüsyonunun Hazırlanması

Toz şeklinde ticari olarak alınan Kollajenaz Tip 1 (Sigma; Cat:C3867) kimyasalı 1 X PBS içerisinde çözündürülerek w/v oranı %0.75 olacak şekilde çözüldü ve kullanım zamanına kadar -200 °C’de saklandı.

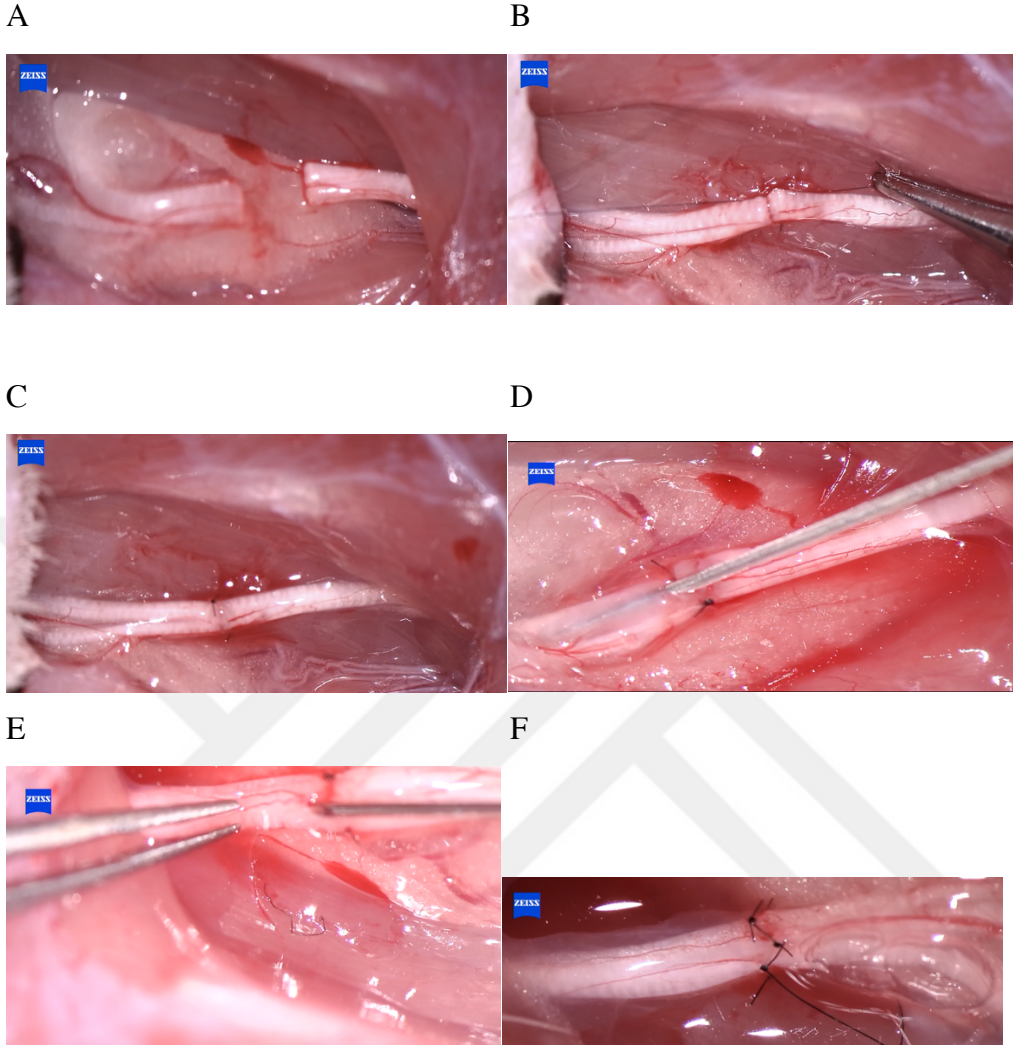


Şekil 2.1: Kök hücrelerin immünmarkerlarla izlenmesi

Siyatik Sinir Kesi Modeli Oluşturulması ve Kök Hücre Sunumunun Yapıldığı Cerrahi İşlem

Kök hücrelerinin labaratuvar ortamında kültürlerde yeterli sayıya ulaşması için gereken 1 haftalık sürenin tamamlanması tüm gruplarda beklenmiştir. İkinci cerrahi işlem, ilkinden 1 hafta sonra gerçekleştirilmiştir. İkinci cerrahi işlemde ise tekrardan 75mg/kg dozda ketamin ve 15 mg/kg dozda ksilazin karışımı intraperitoneal olarak enjekte edilerek genel anestezi sağlanmıştır. Sol sırt bölgesi ve alt ekstremitenin dorsal yüzü traşlandıktan sonra rata yüzüstü pozisyon verilmiştir. Kalça ve diz eklemine hafif fleksiyonu sağlanıp ratın kuyruğu alt ekstremitenin altına yerleştirilerek pozisyon verilmiştir. Steril saha izolasyonu sağlanmıştır. İskial tüberkülden diz eklemine uzanan bir hatta cilt insizyonu yapılmıştır. Karşılaşılan biceps femoris ve gluteus maksimus kasları arasından yapılan ayrı bir split insizyon ile siyatik sinir eksplere edilmiştir. Bu noktadan sonraki cerrahi işlemler Zeiss cerrahi mikroskop ile yapılmıştır. Siyatik sinir diz eklemine yakın seviyedeki trifurkasyonunun görülebileceği şekilde proksimale doğru gluteus maksimus kasının altında kaldığı alana kadar diseke edilmiştir. Sinir, çevre yumuşak dokulardan tamamen ayrılıp serbestlenmiştir. Grup 2’de bu eksplorasyon yapıldıktan sonra kas ve cilt insizyonları sırası ile 4.0 vikril ve 4.0 ipek

dikişlerle onararak cerrahi sonlandırılmıştır. Diğer gruplarda ise sinir eksplorasyonu sonrasında cerrahi devam etmiştir. Distal seviyede sinir trifurkasyonunun 8 mm proksimalinde keskin bir makas ile mümkün olan en atravmatik şekilde sinir kesisi yapılmıştır. Saat 6 yönünde 1 adet epinöral sütür 9.0 etilon materyal kullanılarak yerleştirilmiştir. Sinir uçları bu sütür etrafında çevrilerek arka duvar olan saat 3 seviyesinde bir epinöral sütür daha yerleştirilmiştir. Saat 6 seviyesine de yine epinöral bir sütür daha yerleştirildikten sonra sinirin cerraha bakan kısmında epinöral aralık açık kalmaktadır. Bu aralık daha sonra perifasiküler aralığa girip hücreleri vermek üzere kullanılacaktır. Kök hücre kullanılan grup 3 ve grup 5 için otolog kök hücre içeren HBSS solüsyonu; kök hücre içermeyen grup 1 ve grup 4 ise sadece volüm ve kimyasal etkiyi taklit etmek amaçlı izole HBSS solüsyonu kullanılmıştır. 26 Gauge kalınlığındaki branül iğnesi takılmış insülin enjektörlerinde bu solüsyonlar bulunmaktadır. Sinirin kesisinin öncelikle distal güdüğüne doğru 26 gauge çapındaki iğne perifasiküler aralığa yerleştirilmiştir. İğne yaklaşık 5 mm distale doğru bulunduğu aralıkta ilerletilmiştir. Bu işlem yapılırken fasiküllere hasar verilmemesine özen gösterilmiştir. Kök hücre içeren solüsyonlar distale 50 ul miktarda perifasiküler aralığa verilmiştir. Bu işlemten sonra sinirin proksimal güdüğüne doğru tekrar perifasiküler aralıktan aynı iğne ucu ile girilerek 5mm proksimale ilerlenmiştir. 50ul miktarda kök hücre solüsyonu buraya enjekte edilmiştir. Kök hücre bulunmayan gruplarda ise sadece HBSS solüsyonu aynı teknikle perifasiküler aralığa eşdeğer miktarda verilmiştir. Bunu takiben daha önceden epinöral onarımda, sinirin cerraha bakan saat 9 seviyesindeki epinöral sütürü mümkün olan en kısa süre içinde yerleştirildi (Şekil 2.1). Bu sayede enjekte edilen kök hücre içeren solüsyon kaçağı minimize edildi. Sinir onarımı tamamlandıktan sonra kas insizyonu 4.0 vikril dikiş materyali ile, cilt ise 4.0 ipek dikiş materyali ile basit sütür tekniğinde onarıldı. Postoperatif analjezi için 500 mg parasetamol-500 cc su karışımı ilk cerrahi işlem sonrasındaki gibi uygulandı. Ratlar tek başlarına kalacakları kafeslerde Elizabeth Yakalığı ile 3 gün izlendi. Postoperatif sosyal izolasyonu engellemek adına 1. haftadan sonra sıçanlar 5'i bir kafesde olacak şekilde tekrar biraraya konuldu.



Şekil 2.1: a: Siyatik sinir kesi seviyesi - b: Saat 6 seviyesine yerleştirilen epinöral sütün etrafında sinirin çevrilerek arka duvara epinöral sütün yerleştirilmesi – c: Epinöral sütünler yerleştirildikten sonra önyüzde enjeksiyon yapmak üzere açık bırakılmış epinöral pencere – d: Distal segmentin perifasiküler aralığına yapılan enjeksiyon – e: Proksimal segmentin perifasiküler aralığına yapılan enjeksiyon – f: Epinöral pencere onarıldıktan sonra sinirin mikroskopik görüntüsü

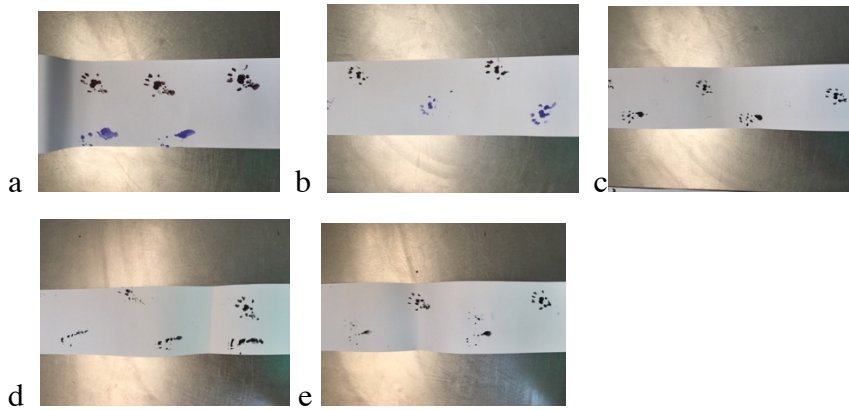
Takrolimus İçeren Solusyonların Hazırlanması ve Verilişi

Takrolimus enjeksiyonu için, 5 mg/ml dozunda ilaç içeren intravenöz kullanım için hazır preperatlar 4 ml salin ile dilüe edilerek 1mg/ml lik

konsantrasyonda takrolimus elde edildi. Takrolimus enjekte edilecek olan grup 4 ve grup 5'e bu solüsyondan 2 mg/kg/gün takrolimus içerecek şekilde intraperitoneal enjeksiyonlar yapıldı. Bu enjeksiyonlar siyatik sinir kesisi ve onarımının yapıldığı gün ilk gün kabul edilerek 10 gün süre ile yapıldı. Takrolimus tedavisi almayan grup 1, grup 2, grup 3 de ise yukarıdaki ilaç volümüne eşdeğer volüm olan 0.2 ml/kg/gün dozunda intraperitoneal salin solüsyon enjeksiyonu 10 gün süre ile yapıldı. Enjeksiyonda kullanılmak üzere hazırlanan solüsyon günlük kullanıldı. 3 gün aralıklarla denekler tekrar tartılarak doz ayarlamaları yapıldı. Hazırlanan enjeksiyonluk solüsyon 3 günde bir yenilendi (9, 12, 38, 93).

Yürüme Analizleri:

Sıçanlarda postoperatif 14. günde başlayarak haftalık olarak yürüme analizi daha önceden tarif edildiği şekilde yapılmıştır (94). Haftalık yürüme analizinde ratların her iki ayakları mürekkep ile boyandıktan sonra 60 cm uzunluğunda 7 cm genişliğindeki yürüme koridoruna yerleştirilen beyaz bir kağıttan oluşan zemin üzerinde serbest halde yürümeleri beklenmiştir. Bu yürüyüş esnasında sıçanların arka ayaklarının yürüme izleri beyaz kağıt zemin üzerinde boyanmaya sebep olmuştur. Bu kağıtlar üzerinden yapılan ölçümler neticesinde fonksiyonel iyileşme derecesinin belirlenmesi için siyatik fonksiyon endeksi hesaplanmıştır (94).



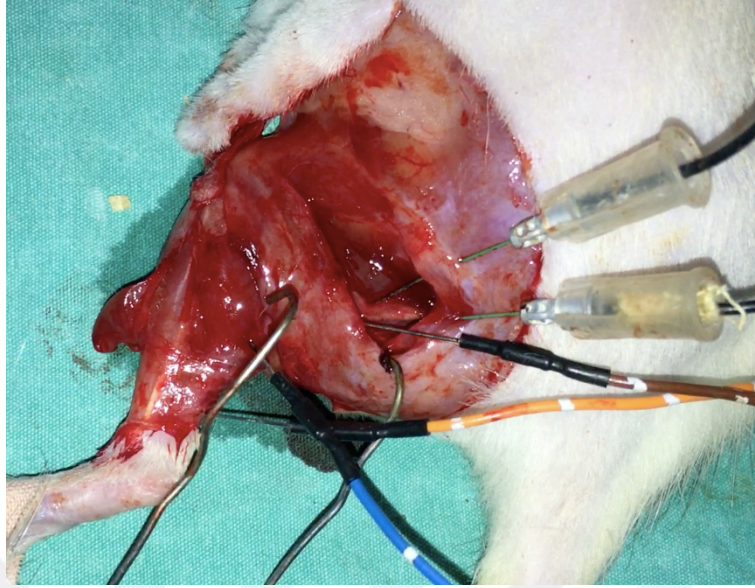
Şekil 2.2: 42.günde yürüme analizleri a: 1.grup b: 2.grup c: 3.grup d: 4.grup e: 5.grup

Elektrofizyolojik Ölçümler:

Sıçanlarda 14.günde başlayarak gastrocnemius kas aksiyon potansiyellerini tespit etmek amaçlı siyatik sinir stimulasyonları 2, 4, 6, 8, 10. haftalarda yapılmıştır. Bu amaçla bir stimülatör ve kas aksiyon potansiyelini gözlemlemek amaçlı elektrotlar kullanılmıştır. Stimülatör ve elektrotlar her seferinde perkütan olarak yerleştirilmektedir. Stimulatörün pozitif ucu lomber vertebralardan sol siyatik sinirin çıktığı seviyeye, negatif ucu ise eksplorasyonun yapıldığı biceps femoris ve gluteus maksimus kasları arasında siyatik sinir trasesine yerleştirilmiştir. Kayıt elektrotlarının toprak ucu sol diz lateralinde hemen ciltaltına, negatif elektrod sol gastrocnemius kasının hemen üzerine, pozitif elektrod ise aşil tendonunun hemen üzerine yerleştirildi. Biopac MP150 cihazı kullanılarak, verilen stimuluslarla gastrocnemius kas aksiyon potansiyelleri kaydedilmiştir.

91. günde sıçanlar 100 mg/kg dozda ketamin anestezisi altında sol alt ekstremiteleri traşlandıktan sonra yüzüstü yatar pozisyonda sol bacak ve kalça posteriorlarından cilt insizyonları yapıldı. Bacak insizyonundan gastrocnemius kası ekspozite olacak şekilde diseksiyon yapıldı. Sol kalçadaki insizyondan, biceps femoris ve gluteus maksimus kasları arasında eski insizyondan girilerek siyatik sinir tekrardan explore edildi. Sıçan anestezik madde etkisi altında iken sinir stimülatörü koaptasyon sahası proksimaline temas edecek şekilde yerleştirildi. İğne elektrodlar ise gastrocnemius kası görülerek üzerine yerleştirildi. Gastrocnemius kas aksiyon potansiyelleri kayıtları alındı (Şekil 2.3). Ardından mikroskop altında sinir koaptasyon sahası ortalanacak şekilde 1 cm lik sinir segmenti eksize edildi. Bu segmentin proksimal ucuna ayrımı yapabilmek amaçlı 9.0 etilon dikiş materyali ile epinöral işaret sütürü konularak formolde fikse edildi. Sinir segmenti eksizyonu tamamlandıktan hemen sonra ratlar sevikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Bilateral olarak cilt eksizyonları yapıldıktan sonra gastrocnemius kasları tamamen explore edildi. Origo ve insersiyon noktalarından ayrılarak gastrocnemius ağırlıkları hassas tartı aracılığı ile ölçülüp kaydedildi. Ratların ağırlıkları ile beraber kas kütlelerinin değişkenlik gösterebileceği göz önüne alınarak normal taraf ile deney yapılan

tarafklar arasında ıslak ağırlıkların oranları hesaplandı.



Şekil 2.3: 90. günde siyatik sinir ve gastrocnemius kasının eksplorasyonu sonrasında açık elektromyografi yapılarak aksiyon potansiyellerinin kaydedilmesi

Deney süreci boyunca sol ayakta kontraktür deformitesi olan ve minimal otoamputasyon olan hayvanlarda yürüme analizleri yapılamadı. Ancak bu ratlar sakrifiye edilmedi. Gastrocnemius ıslak ağırlık oranlarının hesaplanması, elektromyografik inceleme ve histopatolojik incelemeye tabi tutuldu.

Histopatolojik inceleme:

Patolojik incelemeye alınacak olan sinir materyalleri formol kaplarında patoloji laboratuvarına taşındı. Anastomoz sahası ortada kalacak şekilde her bir sinir; proksimali “A”, distali “B” ile işaretli kasetlere alındı. Kasetler hematoksilin eozin li solüsyonda bekletildikten sonra parafin bloklama işlemi yapıldı. Bloklamayı takiben anastomoz hattından 3mm mesafe uzaklıkta kesitler alınarak hematoksilin eozin boyası ile boyanarak incelendi. Sonrasında nöronal yapıyı incelemek için S100 antikor ile boyamalar yapılarak myelin lif sayısı hesaplandı.

SONUÇLAR

Çalışma süresi içinde tüm gruplar içinde kannibalizm sonucu otoamputasyon ve kontraktür gelişen hayvanlarda yürüme analizleri olay süresi sonrasında kaydedilememiştir. Bu hayvanlarda gastrocnemius aksiyon potansiyeli ölçümleri öngörüldüğü zamanlarda yapılmış sonuçları kaydedilmiştir. Buna bağlı olarak grup 1’de 6 ratta kontraktürler gelişmiştir. 56. günde 1 ratta kontraktür gelişmişken 63. günde ise 5 ratta kontraktür gelişmiş bu sebeple yürüme analizi testleri bu tarihten sonra alınamamıştır. Grup 2 de ise 1 ratta 63. günde gelişen kontraktür sebebiyle kayıt alınamamıştır. Grup 3 de 1 rat postoperatif erken dönemde ekstremite distalini otoampute etmesi sebebiyle bu rattan hiç yürüme analizi kaydı alınamamıştır. Aynı grupta 1 ratta 56. günde kontraktür gelişmiştir. Grup 4 de 1 rat 20. günde oluşan otoamputasyon sebebiyle sonrasındaki yürüme analizleri alınamamıştır. Yine bu gruptaki ratların 2 sinde 56.günden itibaren, 2 ratta 70.günden itibaren ve 1 ratta 77.günden itibaren gelişen kontraktürler sebebiyle kayıt alınamamıştır. Grup 5 de ise 2 hayvanda 14 ve 21.günlerde otoamputasyonlar gözlenmiştir. Yine aynı grupta 49. günde, 70. günde, 77.günde 1’er ratta opere edilmiş ekstremitede kontraktürler gelişmiştir. Tüm bunların neticesinde grup 1 de 6 rat, grup 2 de 9 rat, grup 3 de 10 rat, grup 4 de 9 rat, grup 5 de 7 rat tüm deney süreci boyunca yürüme analizi verisi elde edilebilen hayvanlar olmuşlardır.

Yürüme Analizi:

Yürüme analizi neticesinde elde edilen siyatik fonksiyon endeksi verilerine yönelik yapılan istatistiksel incelemede grup 2’nin tüm zaman dilimlerinde diğer gruplara üstün olduğu gözlenmiştir ($p<0.01$). Grup 3’ün grup 4’e göre 14, 28,35,42, 56, 63,77. günlerde istatistiksel üstünlüğü sonucu elde edilmiştir ($p<0,05$). Grup 3 ile grup 1 arasında yapılan karşılaştırmada ise 14,35,42,56. günlerde istatistiksel fark saptanmıştır ($p<0,05$). Grup 5 ile grup 4 arasında 28. günde istatistiksel fark saptanmıştır ($p<0,05$).Grup 3 ile 5 arasında ise 35.günde istatistiksel anlamlı fark izlenmiş olup ($p<0,05$) ; 56, 63. günlerde

kısmi bir fark söz konusudur($p=0,061$, $p=0,088$). Grup 5 ile grup 3 arasında 56,70 ve 90.günlerde yapılan ölçümlerde istatistiksel fark saptanmıştır ($p<0.05$). Grup 2'nin dışındaki gruplar arasında 84.günde ve 90.günde istatistiksel fark ortadan kalkmıştır. Grup 1 ve 4 arasında hiçbir zaman diliminde istatistiksel fark bulunamamıştır.

Yürüme analizinde rejenerasyonun ne kadar sürdüğünün saptanması için her grubun kendi içinde; ölçümün yapıldığı günün, sonraki günlerle arasında istatistiksel farkın olmadığı ilk zaman noktası tespit edildi. Bu bağlamda grup 2'nin hiçbir zaman noktası arasında anlamlı değişiklik göstermediği görüldü. Grup 1 ve grup 5'in ise 49.güne, grup 3'ün 56.güne, grup 4'ün 42.güne kadar aktif rejeneratif süreç içinde olduğu sonucu elde edildi (Tablo 1-4).

Değişken ölçüm	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a
				Lower Bound	Upper Bound
1	26,057*	6,277	,000	13,315	38,799
2	19,532*	5,901	,002	7,552	31,512
3	18,620*	5,709	,002	7,030	30,211
4	13,682*	5,254	,013	3,015	24,349
5	12,572*	4,472	,008	3,493	21,650
7	6,062	5,431	,272	-4,963	17,088
8	,899	5,518	,872	-10,303	12,101
9	2,273	7,295	,757	-12,536	17,082
10	1,699	7,207	,815	-12,933	16,330
11	-5,344	6,804	,437	-19,156	8,468
12	-3,504	7,143	,627	-18,005	10,997

Tablo 1: Grup 1 için siyatik fonksiyon endeksi verilerinin 6. ölçümden (49.gün) sonraki dönemlerle kıyaslanması

Değişken ölçüm	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a
				Lower Bound	Upper Bound
1	49,212*	4,441946877	,000	40,19453401	58,22979716
2	38,280*	4,786237239	,000	28,56365804	47,99681437
3	28,462*	4,877120757	,000	18,5611525	38,36331553
4	13,810*	4,008770766	,002	5,671830794	21,94830542
5	10,655*	3,121978348	,002	4,317327829	16,99323382
6	11,047*	3,840150494	,007	3,250987882	18,84282781
8	0,189018384	3,359427329	,955	-6,63098167	7,009018438
			,942	-	
9	0,371720521	5,107385224		9,996822716	10,74026376
	-		,435		
10	3,724712712	4,715566576		-13,2978218	5,848396381
11	4,150645558	4,423655596	,355	-4,82985274	13,13114386
	-		,892	-	
12	0,663783925	4,866951656		10,54422107	9,216653218

Tablo 2: Grup 3 için siyatik fonksiyon endeksi verilerinin 6. ölçümden (56.gün) sonraki dönemlerle kıyaslanması

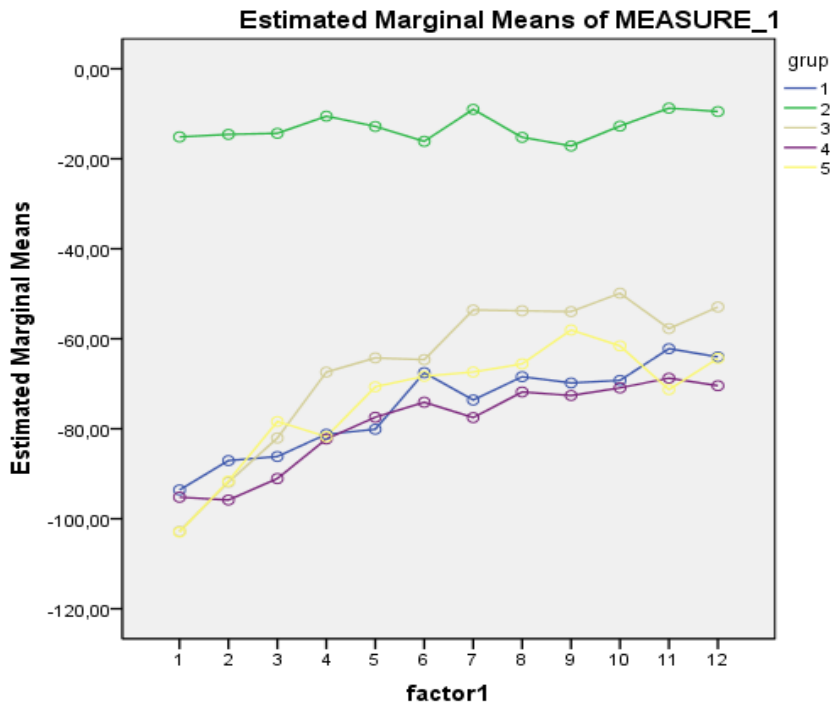
Değişken ölçüm	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a
				Lower Bound	Upper Bound
1	17,768*	4,564487183	,000	8,501179433	27,03398267
2	18,396*	4,542675348	,000	9,174158241	27,61840072
3	13,628*	4,252204857	,003	4,995547875	22,26041746
			,258	-	
4	4,819343674	4,195103345		3,697168886	13,33585623
	-		,324	-	
6	3,335729708	3,333179534		10,10244391	3,430984489
			,980	-	
7	0,0838539	3,290854129		6,596935157	6,764642958
	-		,153		
8	5,611644718	3,844397912		-13,4161874	2,192897962
			,326	-	
9	-4,83274693	4,847477148		14,67364872	5,00815486
	-		,246	-	
10	6,537246181	5,542437711		17,78899292	4,714500558
	-		,072	-	
11	8,691700207	4,684482152		18,20170456	0,818304149
	-		,159	-	
12	6,997016066	4,857096693		16,85744657	2,863414439

Tablo 3: Grup 4 için siyatik fonksiyon endeksi verilerinin 5. ölçümden (42.gün) sonraki dönemlerle kıyaslanması

Değişken ölçüm	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a
				Lower Bound	Upper Bound
1	34,624*	5,304632651	,000	23,85489085	45,39284445
2	23,292*	4,98738493	,000	13,16716372	33,41702309
3	10,044*	4,825078788	,045	0,24856308	19,83942448
4	13,429*	4,440784399	,005	4,413462613	22,44400584
			,540	-	
5	2,336810071	3,779470338		5,335922626	10,00954277
	-		,837	-	
7	0,951485335	4,589857735		10,26939191	8,366421243
	-		,559	-	
8	2,750114831	4,663464666		12,21745142	6,71722176
	-		,104	-	
9	10,29123562	6,16523976		22,80733774	2,224866495
	-		,275	-	
10	6,757008895	6,091188334		19,12277862	5,608760833
	-		,610	-	
11	2,962989606	5,750176097		8,710488477	14,63646769
	-		,513	-	
12	3,986059218	6,037002467		16,24182579	8,269707352

Tablo 4: Grup 5 için siyatik fonksiyon endeksi verilerinin 5. ölçümden (49.gün) sonraki dönemlerle kıyaslanması

Ortalama yürüme fonksiyon endeksleri incelendiğinde ise grup 2 nin en yüksek seviyede olan grup olduğu görülmüştür. Diğer gruplar incelendiğinde ise 21. gün ile 49-63. günlere kadar siyatik fonksiyon endeksinde iyileşme gözlenirken bu dönemden sonra kısmi dalgalanmalarda beraber son siyatik fonksiyon endeksine yakın veriler elde edilmiştir (Grafik 1).

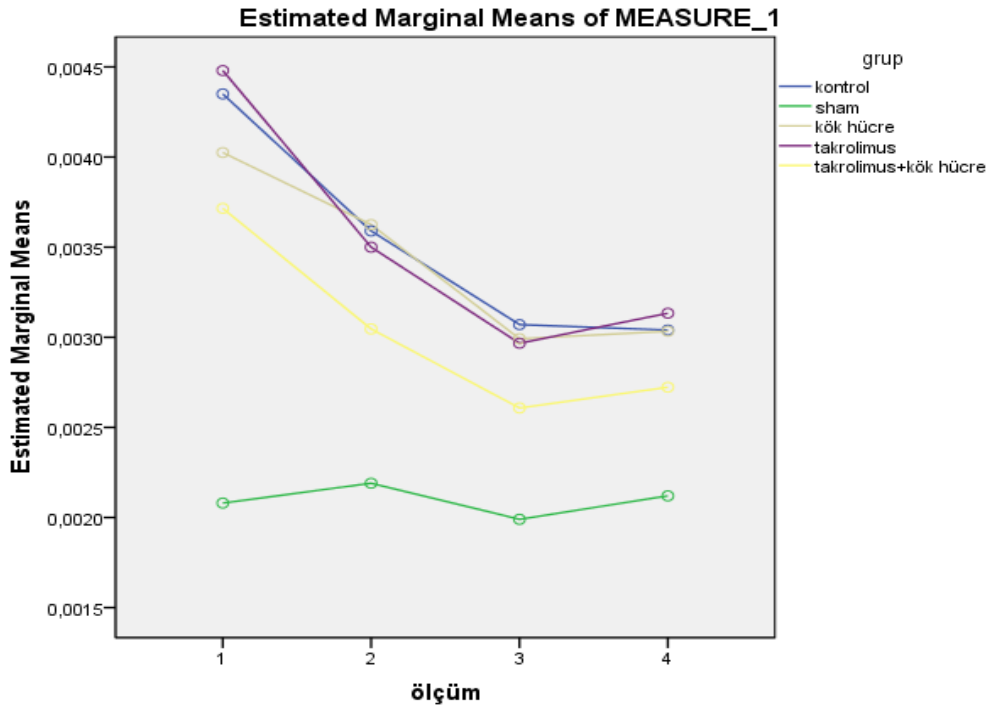


Grafik 1: Gruplar arasında ortalama siyatik fonksiyon endeksinin zamana göre dağılımı

Elektrofizyolojik Sonuçlar

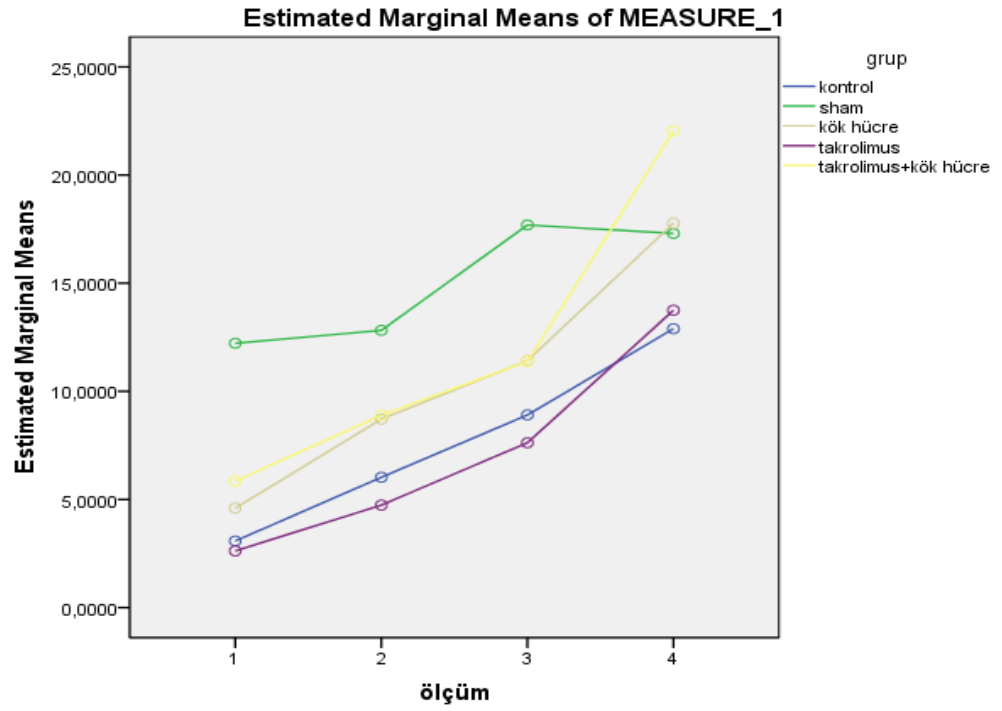
Elektrofizyolojik incelemede grup 1 deki 1 rat haricinde tüm gruplarda 42. günde aksiyon potansiyelleri kaydedilebilmiştir. Grup 1 de 28.günde yapılan elektromyografide 3 ratta düşük amplitüdlü aksiyon potansiyelleri elde edilmiştir. 1 ratta ise ilk aksiyon potansiyeli 56. günde elde edilebilmiştir. Grup 2 de tüm ölçüm zamanlarında aksiyon potansiyelleri elde edilmiştir. Grup 3 de 8 ratta 28. günde aksiyon potansiyelleri gözlenmiş olup 1 ratta ise 14. günnde yapılan ölçümde aksiyon potansiyeli elde edilebilmiştir. Grup 4 de 4 ratta ilk aksiyon potansiyeli 28. günde izlenmiştir. Grup 5 de ise 3 ratta 14. günde aksiyon potansiyeli elde edilmişken 28.günde aksiyon potansiyeli elde edilemeyen rat sayısı sadece 2 olarak bulunmuştur. İstatistiksel değerlendirme tüm gruplar arasında 42,56,70 ve 90. günlerdeki aksiyon potansiyellerinin birleşik kas aksiyon potansiyelleri ve latanslarının karşılaştırılması ile yapılmıştır.

Elektrofizyolojik çalışmanın verilerine yapılan istatistiksel analizde grup 2'nin tüm ölçüm zamanlarında diğer tüm gruplara göre latans açısından üstün olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Grup 5'in latans ve kıyaslamasında grup 3 ve 4'e tüm zaman dilimlerinde üstün bulunmuştur ($p<0.05$). grup 5'in grup 1' e karşı latans değerlendirmesinde üstün görünmekle beraber 90. günde istatistiksel anlam yakalanamamıştır ($p=0.054$). Kök hücrelerin takrolimusla beraber uygulandığı grup olan 5. grubun sadece kök hücre uygulanan grup 3 e oranla ölçüm zamanlarında daha düşük latansa sahip olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$).



Grafik 2: 42,56,70 ve 90.günlerde yapılan elektromyografik ölçümlerde elde edilen grupların latans sürelerinin zamana göre dağılımı

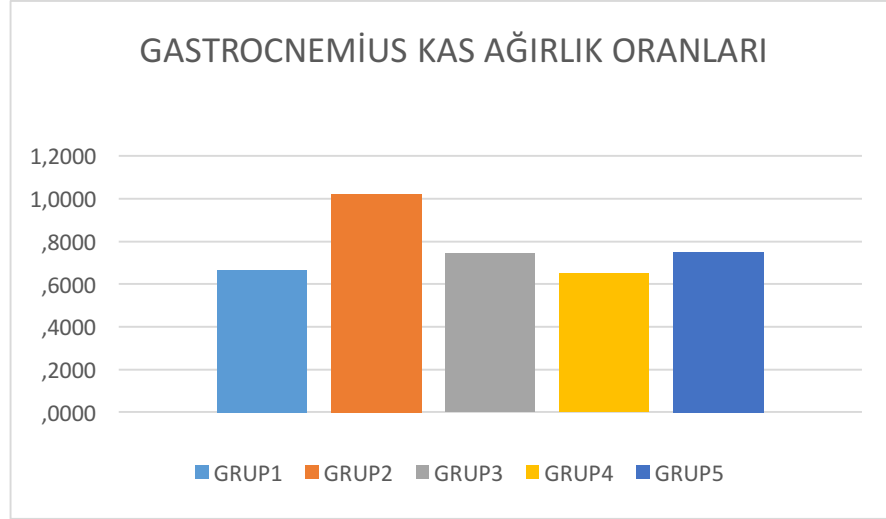
Birleşik kas aksiyon potansiyelleri açısından yapılan karşılaştırmada ise zaman dilimlerinde grup 1 ve 4 arasında istatistiksel fark gözlenememiştir. Grup 5 in tüm zaman dilimlerinde grup 1 ve 4 e üstünlüğü gözlenmiştir ($p<0.05$). Grup 3 ise 90. güne dek grup 1 ve 4 den üstün görünmekte olup ($p<0.05$); 90.günde bu üstünlük istatistiksel değeri taşımamaktadır ($p>0.05$). Tüm zaman dilimleri arasında yapılan ölçümlerde grup3 ve 5 arasında istatistiksel farklılık saptanamamış olup 90.günde grup 5, grup 3'e kıyasla hafif yüksek amplitüdlere göstermiştir ($p=0.083$). Grup 2 de ise 90.güne kadar elde edilen kas aksiyon potansiyelleri tüm gruplara göre üstün görünmekle beraber ($p<0.01$), 90. günde yapılan ölçümde bu üstünlük istatistiksel değerini kaybetmektedir ($p>0.05$).



Grafik 1: 42,56,70 ve 90.günlerde yapılan elektromyografik ölçümlerde elde edilen grupların ortalama birleşik aksiyon potansiyellerinin zamana göre dağılımı

Gastrocnemius Islak Kas Ağırlıkları:

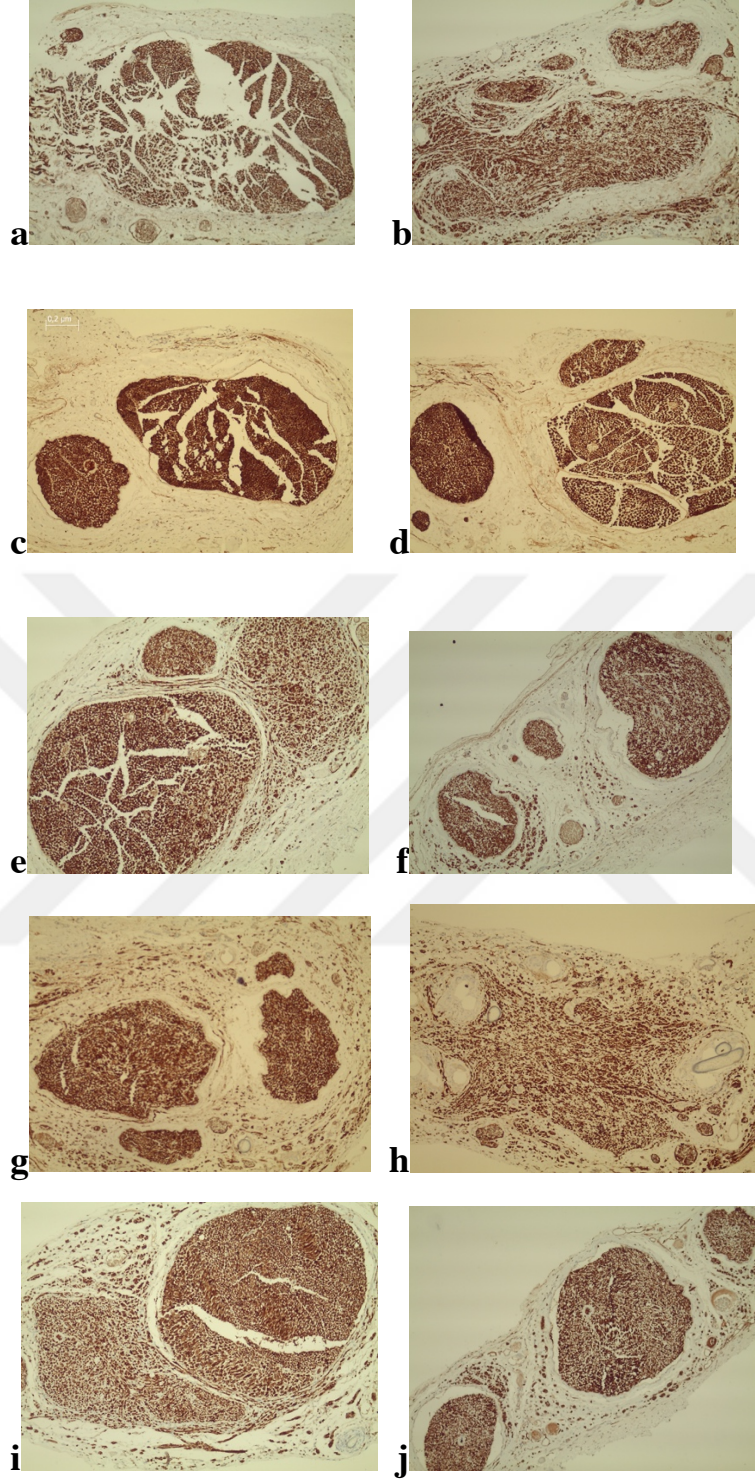
Gastrocnemius kas ağırlıkları tüm gruplarda sol tarafın sağa oranı hesaplandı. Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırma istatistiksel analizinde grup 2 nin diğer tüm gruplardan üstün olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmasa da grup 3 ve 5'in grup 1 ve 4 e göre kısmen daha iyi olduğu gözlemlendi (Grafik 3).



Grafik 3: Ötenazi sonrasında gruplarda ortalama sol gastrocnemius kasının ıslak ağırlığının sağ gastrocnemius kasının ıslak ağırlığına oranı

Histopatolojik Değerlendirme:

Histopatolojik incelemede proksimal ve distal sinir segmentlerdeki lif sayıları hesaplanmıştır. Distal segmentteki sinir lifleri proksimal segmente oranları yüzde olarak hesaplanmıştır. Ancak gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanamamıştır ($p=0.116$). Bununla beraber sinir kesitlerine bakıldığında grup 1 ve grup 4 de fasiküller içinde ödemin hakim olduğu göze çarpmıştır. Bu sebepten ışık mikroskobu görüntülerinde sinir fasikülüne genel bakışta sinir yoğunluğu daha düşük gözlenirken grup 2, 3 ve 5 de sinir liflerinin daha yoğunluklu bir dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak grup 3 ve 5 de perifasiküler yumuşak bağ doku içinde S100 ile boyanan sinir hücresi morfolojisine benzeyen hücreler izlenmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: a: 1. grup proksimal sinir kesiti b: 1. grup distal sinir kesiti c:2. grup proksimal sinir kesiti d:2.grup distal sinir kesiti e:3. grup proksimal sinir kesiti f:3 grup distal sinir kesiti g:4. grup proksimal sinir kesiti h:4. grup distal sinir kesiti i:5. grup proksimal sinir kesiti j:5. grup distal sinir kesiti (S100 boyama)

TARTIŞMA

Sinir kesilerinin olduğu yaralanmalar, yarattıkları morbidite sebebiyle plastik cerrahi için aşılmaya çalışılan önemli bir sorundur. Basit bir sinir kesisi sonrası yapılan primer onarımda dahi elde edilen sonuçlar normale göre düşük olabilmektedir (38). Bu bağlamda gecikmiş kas denervasyonunun fonksiyonel iyileşmeyi kısıtladığı bilinmektedir (10). MacKinnon ve Dellon'un klinik pratiklerinden bildirdiklerine göre proksimal kasların denervasyona tolerans süresi, yaklaşık olarak 12 aydır. Sinir hasarı sonrasında reinnervasyonun sağlanmasının mümkün olan en kısa sürede yapılması fonksiyonel iyileşmenin mümkün olan en iyi şekilde olması için esansiyeldir (95). Proksimal seviyedeki yaralanmalarda dorsal kök ganglionlarında ve ön boynuzda çok sayıda hücre ölümü de fonksiyonel iyileşmenin kısıtlayıcı etkenlerindendir (96). Proksimal yaralanma sonrası iyileşmenin uzun sürmesi hedef organda disfonksiyonlara sebep olabilmektedir (90). Bu sebeple bilim insanları daha iyi sinir iyileşmesine yardımcı olacak metodlar araştırmışlardır. Klinik kullanımı da olan takrolimus isimli immunsupresor ajanın aynı zamanda nöronal iyileşmede olumlu etkileri olduğu prelinik çalışmalarla desteklenmiştir. Nöronal iyileşmeden sorumlu olan mekanizma halen net bilinmemekle beraber immünsupresif mekanizmadan bağımsız olduğu yönünde görüşler mevcuttur. Takrolimus gibi, kalsinörin inhibisyonu ile etki gösteren siklosporin A ile yapılan çalışmalarda nöronal iyileşme izlenmemesi bu görüşü desteklemektedir (97). Tüm bunlarla beraber takrolimus kullanımının sistemik yan etkileri olmaktadır. Bu yan etkileri minimize ederken optimal etkinin sağlandığı muhtemel terapötik doz aralığı, uygulama şekli, uygulama süresi, uygulama zamanlamasını araştıran çalışmalar mevcuttur. Takrolimusun immünsupresif ve nörorejeneratif etki mekanizmasının farklı olduğunun anlaşılması üzerine doz ayarlamaları ile bu mekanizmaların ayrı ayrı tetiklenilebileceği düşünülmüş ve nörorejeneratif etkinin maksimum elde edilebileceği takrolimus dozu araştırılmıştır. Tibial sinir modelinde yapılan bir çalışmada subimmünsupresif dozların etkinliği araştırılmış olup cerrahi sonrası ilacın kullanıldığı süre arttıkça subimmünsupresif dozların da sinir dansitesi, lif oranı ve kalınlığında anlamlı

artışlara sebep olduğu gösterilmiştir (12). Takrolimusun nörorejeneratif etkilerinin, uygulandığı zamana bağımlı olarak değişkenlik gösterebildiğini destekler çalışmalar da literatürde mevcuttur. Ratlarda siyatik sinir kesisi ve onarımı modelinde takrolimusun geciktirilmiş uygulanmasının nörorejeneratif etkileri araştırılmıştır. Çalışma neticesinde operasyon günü uygulanan takrolimusun, 3 gün sonra uygulanması ile aynı nörorejeneratif etkilere sahip olabileceği bilgisi elde edilmiştir. Bununla beraber bu etkinin 3. Günden sonra takrolimus uygulanmaya başlanması halinde azaldığı görülmüştür (98). Ratlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise operasyon öncesinde, takrolimus uygulanmaya başlanması sinir iyileşmesi üzerine etkileri tibial sinir modelinde araştırılmıştır. Bu modelde tibial sinir kesisini takiben yapılan onarım öncesinde takrolimus uygulanmaya başlanmış ve 3 hafta sonunda nörorejeneratif etkiler histomorfometrik olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuç; operasyon öncesinde takrolimus uygulanmaya başlanması, sonrasında takrolimus başlamaya göre sinir lif sayısında artmaya sebep olduğu yönünde olmuştur (38). Sinir kesilerinin acil onarımları için uygun bir yaklaşım olmamakla beraber elektif yapılan sinir rekonstrüksiyonları için yol gösterici bilgiler verebilir. Ayrıca halihazırda takrolimus kullanmakta olan hastalarda olan sinir kesilerinin acil onarımı halinde faydalı olduğu görüşü ortaya çıkmaktadır. Yan ve arkadaşları tarafından takrolimusun kısa dönem uygulanmasının nörorejeneratif etkileri araştırılmıştır. Takrolimus kısa dönemde uygulanarak yan etkilerini minimize etmek amaçlanmıştır. Kısa dönem uygulamalar arasında optimal nörorejeneratif etkisini gösterebileceği süreyi araştırmak amaçlı yapılan bu çalışmada yine tibial sinir üzerinde ezilme, kesi ve sinir defekti modelleri üzerinde kısa dönemlerde takrolimus uygulanmasının sinir iyileşmesi üzerine etkileri fonksiyonel açıdan değerlendirilmiştir. Fonksiyonel iyileşmenin takrolimusun uygulandığı sürenin uzaması ile daha hızlı olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu çalışmada histomorfometrik olarak yapılan sinirin kantitatif analizinde gruplarda farklılık saptanamamıştır (9). Tavşan siyatik sinirinin kesi modeli üzerinde yapılan bir çalışmada hyaluronik asit ve takrolimusun lokal uygulanması halinde oluşacak sinir iyileşmesi incelenmiştir. Bu çalışmada siyatik sinir kesi onarım hattı

etrafına, gelatin süngere emdirilmiş takrolimus ve hyaluronik asit ayrı ayrı olarak yerleştirilmiş ve kontrol grubu ile kıyaslamalar yapılmıştır. Her iki ajanın da sinir iyileşmesini kontrol grubuna göre daha olumlu etkilediğini elektrofizyolojik ve fonksiyonel olarak test edilip olumlu sonuçlar bildirilmiştir (99). Hyaluronik asit ve takrolimusun bu yolla uygulanmasının perinöral skarlaşma ve adezyonları azalttığı düşünülmektedir. Skar formasyonunu azaltıcı bu etkinin fibroblast proliferasyonunun baskılanması, makrofaj mobilitesinin artması, granülosit fagositozunun artması, lenfosit migrasyonunun artması aracılı olabileceği düşünülmüştür (42, 100).

Takrolimusun muhtemel yan etkilerinden kaçınarak sinir iyileşmesini arttırıcı etkisinin sağlanmasının bir başka yolu da nörorejeneratif etkinin sağlandığı mekanizmayı anlamaktan geçmektedir. Bu yönde yapılan çalışmalar doğrultusunda takrolimusun immünsupresif etkilerine aracılık eden bağlayıcı proteini olan FKBP-12'nin susturulması, nörorejeneratif etkilerin ortadan kalkmadığı gösterilmiştir. FKBP-52 isimli yüksek molekül ağırlıklı immünofilin ligandın antikorlarla bağlanması halinde sinir iyileşmesi üzerindeki etkilerin ortadan kalktığının gösterilmiş olması üzerine dikkatin daha çok bu alana yönelmesine sebep olmuştur (39). FKBP-52, 52 kDa ağırlığında takrolimusu hedef alan, şaperon özellikleri taşıyan bir proteindir (101). Takrolimus bu proteinin cis/trans izomeraz kısmına bağlanmaktadır. Bu kısım immünofilin ligand ailesinin ortak bağlanma noktası özelliği taşımaktadır. FKBP-52 ile FKBP-12 proteinleri bu kısım sebebi ile %55 homoloji göstermektedir (102). Bu sebeptendir ki FKBP-52, FKBP-12 gibi immünsupresör etkiler göstermemektedir. FKBP-52 üzerinde ilaç bağlayan kısma ek olarak tetratrikopeptid tekrarlayan kısımlar bulunmaktadır. Bu kısımlar ise heat-shock-protein-90 (HSP90) için bağlanma alanı oluştururlar. İşte bu bağlanma alanları FKBP-52'nin bilinen selüler etkilerinden sorumludur (103).

Nöronal hücrelerin, takrolimus bağımlı diferansiasyonunun erken basamaklarında FKBP-52'nin ekspresyonunun kuvvetli bir şekilde indüklendiği gösterilmiştir (41). Bununla beraber HSP-90 ve HSP-90 ko-şaperonu olan p23

de indüklenmektedir. FKBP-52, HSP-90 ve p23 heterokompleks formları oluşturmakta ve bu formlarda glukokortikoid reseptörlerine bağlanmaktadır (104, 105). Ancak nöral diferansiasyon etkileri glukokortikoid reseptörlerinden bağımsız oluşmaktadır. Bu heterokompleks diferansiye olmamış hücrelerde normal şartlarda nükleer lamina üzerinde yerleşim göstermektedir. İlginç olarak hücrelerin takrolimus ile uyarılması halinde bu heterokompleks stoplazmaya dağılmaktadır. Nöronal diferansiasyonun ve rejenerasyonun oluşması ile bu nükleer şaperon heterokompleksi yapının varlığının ve ayrışmasının ilişkili olduğu düşünülmektedir. Diferansiasyonun erken evrelerinde bu şaperonlar perinükleer düzenden ayrılıp stoplazma içine göç ederler. Sitoskeletal yapılarla etkileşime geçerek terminal uç veya dallanma cisimleri gibi aksonal alanları aktive ederler. Bunun sonucunda FKBP-52, HSP-90, p23 heterokompleksinin nörorejeneratif ve diferansiatif etkilerini mekanik yollarla gösterdikleri düşünülmektedir (41).

Takrolimusun nöronal etkilerine aracılık ettiği düşünülen bir başka yapı ise “growth-cone associated protein-43” (GAP-43) olarak bilinmektedir. Bu proteinin sinir büyümesi ve plastisitesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda büyüme konisinin yol bulmasında da etkindir. Embriyolojik dönemde ve periferik sinir kesileri sonrasında GAP-43 ekspresyonu artmaktadır (106). Takrolimusun, GAP-43 fosforilasyonu ve aktivasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir. Spinal kord yaralanması modeli üzerinde yapılan bir çalışmada takrolimus uygulamasının, GAP-43 eksprese eden sinir sayılarının ikiye katlanması ile sonuçlandığı gözlenmiştir (107). Tüm bunlarla beraber kalsinörinin GAP-43’ü defosforile ettiği bilinmektedir. Takrolimusun GAP-43 üzerinden olduğu düşünülen nörorejeneratif etkisine kalsinörin inhibisyonunun aracılık edebileceği düşünüldüğü bir çalışma mevcuttur (44).

Nörorejenerasyonun araştırılması ile ilgili çalışmalar çoğunlukla deney hayvanları üzerinde yapılmıştır. Bu sayede araştırılmakta olan nörorejeneratif etkinin ve mekanizmalarının insan çalışmalarına geçmeden önce daha anlaşılır olabilmesi amaçlanmaktadır. Literatürde çok sayıda farklı yöntemlerle sinir iyileşmesini araştıran çalışma mevcuttur. Ancak hayvan modellerindeki

yorumlamanın uygun yapılması, çalışmanın etkinliğinin değerlendirilmesi aşamasında kritik role sahiptir. İnsanlara kıyasla hayvan modellerindeki sinir yaralanma modellerinde iyileşmesi beklenen sinir segmenti daha kısa olduğundan fonksiyonel dönüşü daha hızlı olmaktadır. Bu sebeple sinir iyileşmesinin olduğu evreyi saptamak önemlidir. Yapılan araştırmada ölçüm sürelerinin uzun veya geç olması sonucunda gruplar arasındaki farklılıklar ortadan kaybolabilmektedir. Deney süreci içinde öne geçen bir grubun saptanması bu durumda mümkün olmayabilir (108). Çalışma süresi boyunca yapılabilecek seri ölçümler bu sorunun önüne geçilmesini sağlayabilir. Bu sebeple çalışmamızda fonksiyone iyileşmeyi değerlendiren yürüme analizleri haftalık aralarla, elektrofizyolojik çalışmalar ise 2 ve 3 hafta aralarla yapılmıştır. Değerlendirme sıklığının fazla olması ile rejenerasyonun başlangıç ve sürecinin takibi planlanmıştır.

Sinir iyileşmesi değerlendirilirken, değerlendirilmek istenen parametreye yönelik ölçüm metodunu kullanmak önemlidir. Örneğin histomorfometrik veya elektrofizyolojik ölçümler sonucunda elde edilen veri, motor veya duysal iyileşme ile örtüşmeyebilir. Akson sayılarının ve myelinizasyonun değerlendirildiği ölçüm yöntemleri ile nöronal iyileşmenin hedef organa kadar ilerleyip ilerlemediğini bilmek mümkün değildir (107). Bu değerlendirme yönteminde genellikle sinir koaptasyonu etrafındaki sinir dokusu incelemeye alınmaktadır. Ayrıca boylu boyunca iyileşmenin organizasyonunu göstermekte yetersiz kalabilirler. Siyatik sinir yaralanma modellerindeki fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için, “siyatik fonksiyon endeksi” literatürde yoğun olarak kullanılan bir ölçüm yöntemidir. Yürümenin maksimum efor gerektiren bir aktivite olmaması sebebiyle yürüme analizleri ile maksimum kas kuvveti ölçen yöntemler arasında korelasyon olmaması olağan karşılanabilir (109). Yürüme analizinin değerlendirme yöntemi olarak kullanıldığı çalışmalarda karşılaşılabilen sorunlar olarak ekstremitelerde distalde ototomiler, kontraktür formasyonları sayılabilir. Bu problemlerle karşılaşıldığı takdirde yürüme analizinin doğru sonuçlar vermeyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (110). Bu sebeple çalışmamızda yürüme analizi değerlendirmelerinde kontraktür veya ototomi olan deneklerde yürüme

analizleri patoloji geliştiği tarihten sonra yapılmamıştır.

Takrolimusun periferik sinirlerdeki nörorejeneratif etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için siyatik fonksiyon endeksi ve türevleri literatürde yoğun olarak kullanılmıştır. Ancak bir çalışmada takrolimusun sistemik olarak tremor, astheni, parestezi, nöbetler, ataksik yürüme gibi yan etkilere sebep olduğundan bahsedilmiş ve bu çalışmada yürüme analizinin uygun olmadığı görüşü belirtilmiştir (38). Tüm bunlara rağmen yürüme analizleri literatürde halen en sık kullanılan fonksiyonel değerlendirme metodu olarak yerini korumaktadır. Çalışmamızda takrolimus alan deneklerin hiçbirisinde yukarıda bahsedilen yan etkiler görülmemiştir. Ancak çalışmamızda takrolimus uygulamasının belirli bir süre olması sebebiyle bahsi geçen yan etkilerin görülme sebebi olabilir.

Periferik sinir yaralanmalarının iyileşmesi için olumlu etki yarattığı düşünülen diğer bir etken olan kök hücreler ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Farklı orijinli kök hücre modellerinin nörorejeneratif etkileri araştırılmıştır. Örneğin nöral kök hücreler, schwann hücrelerinin prekürsörleri olması sebebiyle mantıklı bir tercih olarak görünmektedir. Hayvan modellerinde periferik sinir iyileşmesini olumlu yönde etkilediği gözlenmiş (111) olmasına karşın elde edilmesindeki güçlükler ve etik sorunlar nedeniyle kullanımları kısıtlıdır. Aynı gerekçeler iyileşmeyi arttırdığı düşünülen embriyonel kök hücrelerin de bu alanda kullanımını kısıtlamaktadır (112). En çok çalışılmış hücre grubu olan adiposit kaynaklı kök hücrelerin *ex vivo* ortamda sinir büyüme faktörü (NGF), glial hücre serisi-derive büyüme faktörü ve beyin-kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) sekrete ettiği gösterilmiştir. Buna ek olarak adiposit derive kök hücrelerin glial fenotipe ait olduğu bilinen nöron fonksiyon ve metabolizmasından sorumlu genleri eksprese ettiği gösterilmiştir (53). Literatürde bu kök hücrelerin ekildiği kondüit modelleri ile yapılan sinir onarımlarının boş kondüitlerle yapılanlara göre üstün olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu hücrelerin otolog Schwann hücreleri kadar etkili olduğunu destekler çalışmalar da bulunmaktadır (113, 114). Kemik iliği kaynaklı ve adipöz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin birbiri üzerine

etkinliklerini kıyaslayan çalışmalarda ise ikisinin etkinliği arasında belirgin farklılık olmadığı gözlenmiştir (113, 115). Ancak tüm bunlara rağmen adiposit derive kök hücrelerin nöronal iyileşme üzerine etki mekanizmasının nasıl olduğu hala bilinmezliğini korumaktadır (116).

Kök hücrelerin periferik sinir sistemi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda genellikle sinir defekti modelleri kullanılmış olup bu defektlere uygun uzunlukta biyolojik veya sentetik kondüitlere kök hücreler farklı şekillerde yerleştirilmiştir (117-123). Bununla beraber adiposit derive kök hücrelerin kaynağı olan lipoaspiratlarla doldurulmuş ven greftlerinin sinir defekti modellerinde rejenerasyonun engellendiği görülmüştür (124). Bu bağlamda periferik sinir rejenerasyonunun araştırılacağı çalışmalarda kök hücrelerin elde edildikleri kaynaklardan ziyade izole edilip kullanılması daha efektif görünmektedir. Ayrıca adiposit kaynaklı kök hücrelerin, schwann hücre benzeri seriye diferansiye olduğuna dair veriler mevcut olmakla beraber bu dönüşüm neticesinde kök hücrelerin otolog schwann hücrelerine alternatif olabileceği düşünülmüştür (74, 76, 125). Elde edilen kök hücrelerin diferansiyasyon evreleri de önem taşımaktadır. Ancak yapılmış bir çalışmada diferansiye edilmiş adiposit kaynaklı kök hücrelerin, diferansiye olmamış kök hücrelere göre daha yüksek seviyelerde nörotrofik faktörleri salgıladığı, nöronal gelişmeyi daha kuvvetli desteklediği sonucu elde edilmiştir (56). Sinir iyileşmesinin fonksiyonel ve histolojik olarak değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise diferansiye olmuş adiposit kaynaklı kök hücrelerin, diferansiye olmamış kök hücrelere oranla üstün olmadığı görülmüştür. Diferansiye edilmiş kök hücrelerin *in vitro* ortamda gözlenen pozitif mediatör etkileri *in vivo* ortamda fonksiyonel ve histolojik farklılıklar sağlayamayabilir. Bunun sebebi ise diferansiye hücrelerin *in vitro* ortamlarından alındıktan sonra diferansiye durumlarını koruyamamaları veya diferansiyasyon protokollerinin yetersizliği olabilir (126). Nitekim schwann hücre grubuna diferansiye edilmiş adiposit derive kök hücrelerin, diferansiyasyon medium'u ortadan kalktıktan sonra schwann hücre büyüme faktörlerinin ekspresyonunun azaldığı ve daha immatür hücre morfolojisi göstermeye eğimli olduğunu gösteren bir çalışma da mevcuttur (127). Fibrin kondüitlere yüklenmiş diferansiye adiposit derive kök

hücreler, diferansiye kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve otolog schwann hücrelerinin karşılaştırıldığı siyatik sinir defekti modelinde en iyi sonuçlar otolog schwann hücreleri ile elde edilmiştir. Buna ek olarak kök hücre içeren iki grubun da kontrol grubuna oranla daha iyi olduğu görülmüştür (50). Ven kondüitlerine ekilen omentum kaynaklı diferansiye edilmemiş adiposit derive kök hücrelerin ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin siyatik sinir modelinde karşılaştırıldığı çalışmada gruplar arasında histolojik, morfolometrik veya fonksiyonel açıdan anlamlı farklılıklar saptanmamıştır. Adiposit kaynaklı kök hücre grubunun kısmen daha kalın myelin oluşumu gösterdiği izlenmiştir (115).

Adiposit kaynaklı kök hücrelerin immünmodülatör etkileri olduğu bilinmektedir. Makrofajlar, nötrofiller, NK hücreler, dendritik hücreler ve lenfositlerin aktivasyonunu engelleyebilirler (128-130). Bu hücrelerin denervasyon kas atrofisi modeli üzerindeki etkileri incelenmiştir. Siyatik sinir kesisi yapılan deneyde, 2 hafta sonra gastrocnemius kası üzerinde yapılan incelemelerde kastaki inflamasyon neticesinde oluşan fibrozisin daha az olduğu, nöromusküler kavşak sayısının daha fazla olduğu, angiogenezin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (131).

Periferik sinir yaralanmaları sonrasında kök hücrelerin rejeneratif süreci başlatabilmesi için veriliş metodu da önem taşımaktadır. Primer sinir onarımının mümkün olduğu modellerde kök hücrelerin sunumu fibrin yapıştırıcılarla yapılabilir. Bu yöntemle sutureasyon işleminin getireceği inflamatuvar süreçten kaçınılmış olabilir. Fibrin yapıştırıcı matriksinin, kök hücrelerin maruz kalacağı ciddi çevresel strese karşı sağkalımına destek olduğu *in vitro* gösterilmiştir. Bu esnada büyüme faktörleri salgılamaya devam edebildikleri ancak migratuar özelliklerinin azaldığı gösterilmiştir (132). Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin fibrin yapıştırıcıya gömülerek aselüler sinir greftlerinde intragraft ve extragraft kullanımının sinir rejenerasyonunu arttırdığı gözlenmiştir (90). Sinir uçlarına hücrelerin mikroenjeksiyonu ise ayrı bir metod olarak sayılsa da intranöral hassas anatomiye bozabilir ve öngörülemez sonuçlara sebep olabilir (133). Literatürde sinir defekti

modelleri için hazırlanmış birçok çeşit hücre sunum metodu vardır. Bu metodlarda kök hücrelerin farklı metodlarla yerleştirildiği farklı kondüit modelleri vardır. Ancak sinir defekti oluşturmada yapılacak kök hücre sunumu metodları sınırlıdır.

Sinir iyileşmesinin değerlendirilmesi farklı anlamlar ifade eden metodların sonuçlarının yorumlanmasını gerektirir. Deneysel aşamada kullanılan yöntemlerinin tek başına değerlendirilmesinden ziyade birden fazla metodun sonuçlarının kıyaslanması iyileşme hakkında daha sağlıklı sonuçlar verecektir. Bu sebeple çalışmamızda ratlarda elektrofizyolojik ve fonksiyonel iyileşme, uygun yöntemlerle periyodik aralıklarla ölçülmüştür. Sonrasında histopatolojik incelemeler yapılmıştır.

Çalışmamızda yaptığımız periferik enjeksiyon, primer onarım modellerinde uygulanabilir bir methodur. Bu enjeksiyon yönteminde epinöral onarım yapılırken son dikiş kapatılmadan bırakılan bir epinöral pencereden girilerek yapılan enjeksiyon esnasında nöronal mikroyapı korunarak periferik gevşek bağ doku içine kök hücreler bırakılmaktadır. Akabinde hızlı bir şekilde epinöryumda açık olan pencerenin sütüre edilerek kapatılması sonrasında kök hücreler bu bağ doku içinde yüzebilir durumda olması sayesinde onarım hattı ile teması mümkündür. Matrigel gibi kısmi akışkan taşıyıcıların aksine bu hücrelerin içinde bulunduğu HBSS solüsyonunun tam akışkan olması sayesinde, hücrelerin maksimal migratuar etki göstereceği düşünülmüştür. Bu sayede hem onarım hattı hem de proksimal seviyede büyüme konisi oluşması beklenen noktaya hücrelerin etki etmesi söz konusu olabilir. Distal segmente de yapılan enjeksiyon sayesinde wallerian dejenerasyon sonrası rejenerasyon oluşacak yol üzerinde kök hücrelerin myelinizasyona destekleyici etkisi olabilir.

Elektrofizyolojik incelemeler neticesinde gastrocnemius kasından elde ettiğimiz aksiyon potansiyelleri kasın reinnervasyonunu göstermektedir. Grup 3 ve grup 5’de 14 ve 28. günlerde alınabilmiş aksiyon potansiyeli ölçümleri,

adiposit kaynaklı kök hücrelerin periferik sinirlerin rejenerasyonunun başlamasında hızlanmaya sebep olabileceğini işaret etmektedir. Bununla beraber bu aksiyon potansiyellerinin amplitüdüleri henüz çok düşük ve latans süresi uzun izlenmektedir. Daha sonraki günler için yapılan elektrofizyolojik ölçümlerde de adiposit kaynaklı kök hücrelerin kullanıldığı bu iki grubun kendi kontrol gruplarına oranla (grup 1 ve grup 4) daha yüksek amplitüdü ve daha kısa latanslı aksiyon potansiyellerine sahip oldukları görülmüştür. Bu bağlamda kök hücre kullanımının periferik sinir rejenerasyonunu hızlandırmasının yanı sıra bu rejenerasyonun daha yüksek kas kontraktilesi ile sonuçlandığı düşünülebilir.

Fonksiyonel iyileşmenin incelendiği siyatik fonksiyon endeksi ölçümlerinde elde edilen sonuçlara göre en iyi iyileşmeyi gösteren grubun, sadece kök hücrenin uygulandığı grup olduğu görülmektedir. Fonksiyonel iyileşmenin olabilmesi için, sinirden iletinin son organa ulaşması yeterli olmadığı unutulmamalıdır. Fonksiyonel iyileşmenin değerlendirildiği yürüme sürecinde, duysal input, kortikal entegrasyon ve uygun yanıtın oluşabilmesi gerekir (110). Rejeneratif sürece giren bir periferik sinirin uygun fonksiyon gösterebilmesi için bu sürecin içine kortikal plastisite de girmektedir. Motor organ olan kasa gelen iletinin santral açıdan organize edilebilir olması fonksiyonelliği belirler.

Elektrofizyolojik ölçümler ve yürüme analizleri neticesinde elde edilen veriler doğrultusunda, adiposit kaynaklı kök hücre uygulamasının periferik sinir rejenerasyonunu arttırdığı düşünülebilir. Ancak kök hücre ile takrolimusun beraber uygulanması ile ilgili elde edilen veriler doğrultusunda elektrofizyolojik açıdan beraber uygulamanın avantajlı olduğu, fonksiyonel açıdan izole kök hücre uygulamanın daha avantajlı olduğu gözlenmiştir. Gastrocnemius kasına gelen maksimal iletiyi gösteren elektromyografi değerlendirmeleri, maksimal efor gerektirmeyen yürüme fonksiyonu ile farklı sonuçlar vermesi olağandır (109).

Çalışmamız ışığında gözlenen net fark kök hücre uygulanan grupların

kesi yapılan diğer gruplara oranla daha iyi rejeneratif süreç geçirdikleri yönündedir. Çalışmamızda kesi modellerinde takrolimusun izole uygulaması ile sadece primer onarımın yapıldığı gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bunun gerekçesi, daha önceki bir çalışmada takrolimusun kısa dönem uygulamasının yapıldığı tibial sinir kesisi modellerinde gösterdiği rejeneratif etkiyi; daha yüksek bir seviye olan siyatik sinir kesi modellerinde 10 günlük uygulama ile gösterememesinden kaynaklanabilir. Takrolimusun yan etkilerinden kaçınmak için sürenin kısa tutulması nörorejeneratif etkilerin de geri kalmasına ve yeterli gözlenememesine sebep olabilir. Yaptığımız çalışma neticesinde takrolimusun yan etkilerinden kaçınmak için süreyi kısaltmak yerine , nörorejeneratif etkinin tam anlaşılması ve bu bağlamda hedefe yönelik, nokta atışı tedavi araçları planlamak daha uygun bir yaklaşım olabileceği görüşündeyiz.

Kök hücre uygulamasının sinir rejenerasyonunu arttırdığı, fonksiyonelliği arttırdığı bilinmekle beraber çalışmamız da bunu destekler niteliktedir. Adiposit kaynaklı kök hücrelerin otolog seçilmesi ve takrolimus ile beraber uygulanması ile immünsupresif etkinin ekarte edilmesi planlanmıştır. Adiposit kaynaklı kök hücrelerin kaynağı olan dokuları toparlamanın kolay ve hızlı olması bu işlemin otolog uygulanabilir olmasına olanak sağlamıştır. Ancak fonksiyonel iyileşme açısından takrolimusun beraber uygulanmasının daha az iyileşmeye sebep olduğu görülmüştür. Bunun sebebi takrolimusun kök hücrelerin büyüme faktörü salgılaması veya diferansiasyonuna engel olması olabilir. Bu yönde *in vitro* yapılacak çalışmalarda takrolimus ile kök hücrelerin aynı ortama yerleştirilmesi sonucunda kök hücrelerin büyüme faktörü salgılama etkileri ve diferansiasyon etkileri bir sonraki araştırma konusu olabilir. Bilindiği üzere periferik sinir kesisi sonrasında rejeneratif sürecin oluşması için distal segmentte wallerian dejenerasyon oluşması, immun sistem tarafından myelinin yıkılarak debrislerin açığa çıkması ve proksimaldeki büyüme konisini uyaran mediatörler açığa çıkması gerekmektedir. Bunun sebebi, kök hücrelerin immun sistemi baskılayıcı özellikleri ile takrolimusun immünsupresif etkisinin birleşmesi sonucu sinir kesisi distalinde rejenerasyon sürecinin başlamasına sebep olan inflamatuvar etkiyi baskılaması olabilir.

Histopatolojik incelemelerde kök hücrenin uygulanmadığı onarım modellerinde fasiküller içinde artmış ödemin göze çarpması ayrı bir değerlendirme konusudur. Kök hücrenin kullanıldığı gruplarda bu morfolojik sonucun oluşmaması kök hücrelerin immun modulan etkilerinden kaynaklanabilir. Diğer değerlendirme metodları ile beraber yorumlandığında kök hücre alan grupların daha iyi rejeneratif fonksiyonel sonuçlar vermesinin altında yatan etken kontrollü bir inflamatuvar süreç olabilir. Bununla beraber bu hücrelerin parakrin etkileri ve konak hücrelere veridiği nörotrofik destek sonucunda daha yüksek iyileşme oranları gözlenebilir. Ayrıca grup 3 ve 5 de görülmüş perifasiküler alanlardaki S100 ile boyanmış hücreler, perifasiküler aralığa verilmiş adiposit kaynaklı kök hücreler olabilir. Bu hücreler 90 günlük süreç sonunda sağ kalmış ve nöronal diferansiasyon göstermiş olabilir. Hücrelerin otolog seçilmesi sonucunda bu hücreler hayatta kalabilmiş rejeksiyona uğramamış ve immunmodulan etkilerinin yanı sıra nörorejenerasyonu destekleyici etkiler göstermiş olabilirler. Tüm bunlarına netliğe kavuşabilmesi için ileri bir çalışmada bu hücreler floresan boyamalarla boyanıp takip altına alınabilir. Ayrıca kök hücrelerin diferansiatif etkilerini göstermek üzere nöronal ve kök hücre işaretleyicileri ile işaretlenmesi yapılabilir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler ışığında literatür bilgi birikimini destekler nitelikte, otolog adiposit kaynaklı kök hücrelerin perifasiküler aralığa verilmesinin nörorejenerasyonu arttırdığı görüşündeyiz. Bu çalışmada takrolimus ile beraber uygulamanın nörorejeneratif süreçte avantajlı olmadığı gözlenmiştir. Ancak bu iki nörorejeneratif yöntemin beraber uygulanmasının birbirlerini kısıtlayıcı sebepleri olabilir. Takrolimusun ve kök hücrelerin nörorejenerasyondan sorumlu mekanizmalarının daha aydınlatılması için çalışmalar gerekmektedir.

ÖZET

Periferik sinir kesileri sonrası yapılan sinir onarımlarında, fonksiyonel geridönüşün maksimize olmasında rejenerasyon süresi önemli rol almaktadır. Kesi sonrasında oluşan ileti kaybına bağlı olarak son organlarda fonksiyon kaybı oluşmaktadır. Motor sinirlerin kesileri sonrasında iskelet kaslarında motor-son plakta dejenerasyonun gelişmesinden sonra yapılacak ileti getirici yöntemlerin fonksiyonel geri dönüş üzerine etkisi olmadığı bilinmektedir. Periferik sinir kesisi sonrasında iskelet kaslarının nöronal uyarılmasının kısa sürede ve nitelikli olarak sağlanması ile fonksiyonel kayıplar azaltılabilmektedir.

Literatürde sinir onarımları sonrasında rejenerasyonun başarılı ve hızlı olması amacıyla denenmiş çeşitli ajanlar, cerrahi yöntemler ve kök hücre çalışmaları bulunmaktadır. Takrolimus (FK506) isimli immüsupresif ajanın nörorejeneratif etkisini destekleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Takrolimusun immüsupresif yan etkilerinden kaçınmak amacıyla kısa dönemli kullanımında nörorejenerasyonu arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur.

Adiposit kaynaklı kök hücrelerin nörorejeneratif etkisi literatürde incelenmiştir. Farklı diferansiasyon evrelerindeki adiposit kaynaklı kök hücreler ve schwann hücrelerine benzeyen transdiferansiye adiposit kaynaklı kök hücrelerin periferik sinir kesi modellerinde nörorejenerasyona olumlu etki ettiğine yönelik çalışmalar mevcuttur. Ancak kök hücrelerin sinir koaptasyon bölgesine sunum yöntemleri ile ilgili sorunlar bulunmaktadır. Çalışmamızda bu hücrelerin perifasiküler aralığa sunulması planlanmıştır.

Bu çalışmada koaptasyon yapılmış sinir kesisi modellerinde, otolog adiposit kaynaklı kök hücre ve kısa dönem kullanılan takrolimusun (FK506) birlikte kullanımının nörorejenerasyon üzerine etkileri incelenmektedir. Ayrıca bu ayrı iki rejenerasyon artırıcı yöntemin birbirlerine olan üstünlükleri ve zayıflıkları ele alınmıştır.

Sonuçların incelenmesi aşamasında fonksiyonel geri dönüşümün gösterilmesi için yürüme analizi yapılmıştır. Rejenerasyonun başlangıcını bulmak amacıyla ratlarda ilgili gastrocnemius kasına yönelik EMG uygulanmıştır. Rejenerasyon kalitesini incelemek amacıyla histopatolojik olarak sinir kesitleri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar neticesinde yürüme analizi verileri izole kök hücre alan grubun sinir kesisi olan diğer gruplara oranla daha iyi fonksiyonel sonuçlar gösterdiğini işaret etmektedir ($p<0,05$). Elektrofizyolojik çalışmada ise maksimum kas aksiyon potansiyelleri ve latans süreleri değerlendirilmiş ve kök hücre ve takrolimusun beraber uygulandığı deneklerde latans süresinin daha kısa olduğu gözlenmiştir. Her iki kök hücre uygulanan grupta ise kesi yapılan diğer gruplara oranla daha yüksek amplitüdlü aksiyon potansiyelleri ve daha kısa latans süreleri elde edilmiştir ($p<0,05$). Islak kas ağırlıkları kıyaslandığında kök hücre kullanılan iki grubun, kesi yapılan gruplara kısmi üstünlüğü gösterilmiştir ($p>0,05$). Histopatolojik incelemede kesinin proksimal ve distalindeki sinir lif sayıları oranları arasında gruplar arası farklılık saptanmamıştır ($p=0,116$). Ancak morfolojik bakılarda kök hücre kullanılmayan kesi modellerinde fasikül içi ödem ve lif yoğunluğunda azalma dikkati çekmiştir. Ek olarak perifasiküler alana enjekte edilmiş hücrelerde S100 boyanma izlenmiştir.

Bu sonuçlar ışığında kök hücrelerin sinir kesi modellerinde maksimum kas aksiyon potansiyelini ve fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı görülmektedir. Kök hücrelerin izole olarak nörorejeneratif etkisinin takrolimusla beraber kullanımı arasında kısmi farklılıklar gözlenmiştir. Ancak nörorejenerasyona pozitif etkisi olan bu iki etkenin beraber kullanımının etkilerinin ve mekanizmalarının daha net anlaşılması için ileri çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Periferik sinir rejenerasyonu, Takrolimus, Kök Hücre, Yürüme analizi, Elektromyografi

ABSTRACT

Neuroregenerative process has a great role in maximizing functional recovery after repairing peripheral nerve lacerations. Functional loss occurs at the end-organs due to conduction loss. It is well known that repairing the injured nerve can not recover the function after motor-end plates are degenerated. As a result skeletal muscles should be reinnervated as soon as possible to minimize the functional loss.

Various pharmacological agents, surgical methods, stem cell researchs are tested in altering and accelerating nerve regeneration while increasing regeneration quality. Tacrolimus, an immunosuppressive agent which is investigated in neuroregeneration, is found to impore neuroregeneration. In order to avoid side effects of this immunosuppressive agent some researchers administered this drug temporarily and found that it can still play an effective role in neuroregeneration.

The neuroregenerative effect of adipocyte derived stem cells are investigated. Several differantiaton status of adypocyte derived stem cells and schwann-like transdifferentiated adipocyte derived stem cells are found to improve nerve regeneration process in peripheral nerve injury models Unfortunately there are some problems about delivering stem cells to the injury site in primary repair models. We have planned to deliver these cells to the repair site by injecting these cells to the perifascicular areolar soft tissue proximally and distally.

In this study, we investigated neuroregenerative effects of using tacrolimus and adipocyte derived stem cells together in peripheral nerve laceration model.

We have evaluated the funcional recovery by intemittent walking track analysis. Electrophysciological evaluation was made to get compuond muscle action potential and latency duration. Histopathological evaluation was made to understand the quality of regenerating nerves. Wet gastrocnemius muscle weight was assessed and recorded.

Walking track analysis showed that subjects that received only stem cells regained walking function better than other subjects ($p<0,05$). Electrophysiological assessments showed that the subjects which receives tacrolimus and stem cells together have shorter latency duration compared to the other nerve injury subjects. In addition Two groups which received stem cells have demonstrated better compound muscle action potential levels and during the experiment ($p<0,05$). Groups which treated with stem cells had partially higher wet muscle weight compared to non-stem cell received groups ($p>0,05$). Histopathological distal to proximal fiber ratio assessment did not demonstrated significant difference between groups ($p=0,116$). However morphological evaluation showed that non-stem cell received groups had intrafascicular edema and low nerve density. In contrast groups treated with stem cells showed less edema and high density compared to other nerve lacerated groups. In stem cell received groups perifasciular loose tissue contained cells which had S100 dye.

Stem cells can enhance compound muscle action potentials and improve functional recovery in laceration models. There are some partial differences between subjects which received only stem cells and tacrolimus with stem cells. However further studies are required to investigate neuroregenerative mechanisms of tacrolimus and adipocyte derived stem cells.

Key words: Peripheral nerve regeneration, Tacrolimus, Stem Cells, Walking Track Analysis, Electromyography

Kaynaklar

1. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *The Journal of trauma*. 1998;45(1):116-22.
2. Kimura J. Nerve conduction and needle electromyography. . 4th ed. Dyck P, Thomas, P. , editor2005.
3. Nelligan PC. Repair and Grafting of Peripheral Nerve. Third Edition ed: Elsevier; 2013.
4. Dahlin LB, Wiberg M. Nerve injuries of the upper extremity and hand. *EFORT open reviews*. 2017;2(5):158-70.
5. Walton RL, Brown RE, Matory WE, Jr., Borah GL, Dolph JL. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. *Plast Reconstr Surg*. 1989;84(6):944-9; discussion 50-2.
6. Kim DH, Kam AC, Chandika P, Tiel RL, Kline DG. Surgical management and outcome in patients with radial nerve lesions. *J Neurosurg*. 2001;95(4):573-83.
7. Kim DH, Kam AC, Chandika P, Tiel RL, Kline DG. Surgical management and outcomes in patients with median nerve lesions. *J Neurosurg*. 2001;95(4):584-94.

8. Murovic JA. Lower-extremity peripheral nerve injuries: a Louisiana State University Health Sciences Center literature review with comparison of the operative outcomes of 806 Louisiana State University Health Sciences Center sciatic, common peroneal, and tibial nerve lesions. *Neurosurgery*. 2009;65(4 Suppl):A18-23.
9. Yan Y, Sun HH, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Efficacy of short-term FK506 administration on accelerating nerve regeneration. *Neurorehabil Neural Repair*. 2012;26(6):570-80.
10. Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, et al. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve*. 1997;20(7):858-66.
11. Daroff RB, MD; Jankovic, Joseph, MD; Mazziotta, John C., MD, PhD; Pomeroy, Scott L., MD, PhD. *Trauma of the Nervous System: Peripheral Nerve Trauma*. *Bradley's Neurology in Clinical Practice*. 7th ed 2016.
12. Yang RK, Lowe JB, 3rd, Sobol JB, Sen SK, Hunter DA, Mackinnon SE. Dose-dependent effects of FK506 on neuroregeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg*. 2003;112(7):1832-40.
13. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*. 2000;10(3):381-91.
14. Fujioka T, Fujioka A, Duman RS. Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(2):319-28.
15. Chan KM, Gordon T, Zochodne DW, Power HA. Improving peripheral nerve regeneration: from molecular mechanisms to potential therapeutic targets. *Experimental neurology*. 2014;261:826-35.

16. Cheng C, Webber CA, Wang J, Xu Y, Martinez JA, Liu WQ, et al. Activated RHOA and peripheral axon regeneration. *Experimental neurology*. 2008;212(2):358-69.
17. Kanje M, Skottner A, Sjoberg J, Lundborg G. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res*. 1989;486(2):396-8.
18. O'Brien JS, Carson GS, Seo HC, Hiraiwa M, Kishimoto Y. Identification of prosaposin as a neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(20):9593-6.
19. Yao M, Moir MS, Wang MZ, To MP, Terris DJ. Peripheral nerve regeneration in CNTF knockout mice. *Laryngoscope*. 1999;109(8):1263-8.
20. Laird JM, Mason GS, Thomas KA, Hargreaves RJ, Hill RG. Acidic fibroblast growth factor stimulates motor and sensory axon regeneration after sciatic nerve crush in the rat. *Neuroscience*. 1995;65(1):209-16.
21. Seckel BR, Jones D, Hekimian KJ, Wang KK, Chakalis DP, Costas PD. Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. *Journal of neuroscience research*. 1995;40(3):318-24.
22. Badalamente MA, Hurst LC, Stracher A. Neuromuscular recovery after peripheral nerve repair: effects of an orally-administered peptide in a primate model. *J Reconstr Microsurg*. 1995;11(6):429-37.
23. Wang MS, Chen ZW, Zhang GJ, Chen ZR. Topical GM1 ganglioside to promote crushed rat sciatic nerve regeneration. *Microsurgery*. 1995;16(8):542-6.

24. Elfar JC, Jacobson JA, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ. Erythropoietin accelerates functional recovery after peripheral nerve injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90(8):1644-53.
25. Sun HH, Saheb-Al-Zamani M, Yan Y, Hunter DA, Mackinnon SE, Johnson PJ. Geldanamycin accelerated peripheral nerve regeneration in comparison to FK-506 in vivo. *Neuroscience.* 2012;223:114-23.
26. Ozkan O, Duman O, Haspolat S, Ozgentas HE, Dikici MB, Gurer I, et al. Effect of systemic creatine monohydrate supplementation on denervated muscle during reinnervation: experimental study in the rat. *J Reconstr Microsurg.* 2005;21(8):573-9.
27. Kostopoulos VK, Davis CL, Terzis JK. Effects of acetylo-L-carnitine in end-to-side neurorrhaphy: a pilot study. *Microsurgery.* 2009;29(6):456-63.
28. Udina E, Ladak A, Furey M, Brushart T, Tyreman N, Gordon T. Rolipram-induced elevation of cAMP or chondroitinase ABC breakdown of inhibitory proteoglycans in the extracellular matrix promotes peripheral nerve regeneration. *Experimental neurology.* 2010;223(1):143-52.
29. Sharma N, Coughlin L, Porter RG, Tanzer L, Wurster RD, Marzo SJ, et al. Effects of electrical stimulation and gonadal steroids on rat facial nerve regenerative properties. *Restor Neurol Neurosci.* 2009;27(6):633-44.
30. Madura T, Kubo T, Tanag M, Matsuda K, Tomita K, Yano K, et al. The Rho-associated kinase inhibitor fasudil hydrochloride enhances neural regeneration after axotomy in the peripheral nervous system. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(2):526-35.
31. Zuo J, Neubauer D, Graham J, Krekoski CA, Ferguson TA, Muir D. Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation

of chondroitin sulfate proteoglycan. *Experimental neurology*. 2002;176(1):221-8.

32. Mohammadi R, Hirsae MA, Amini K. Improvement of functional recovery of transected peripheral nerve by means of artery grafts filled with diclofenac. *Int J Surg*. 2013;11(3):259-64.

33. Odaci E, Kaplan S. Chapter 16: Melatonin and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:317-35.

34. Fleming CE, Saraiva MJ, Sousa MM. Transthyretin enhances nerve regeneration. *J Neurochem*. 2007;103(2):831-9.

35. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987;40(9):1256-65.

36. Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, et al. Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry*. 1992;31(16):3896-901.

37. Gold BG, Villafranca JE. Neuroimmunophilin ligands: the development of novel neuroregenerative/ neuroprotective compounds. *Curr Top Med Chem*. 2003;3(12):1368-75.

38. Snyder AK, Fox IK, Nichols CM, Rickman SR, Hunter DA, Tung TH, et al. Neuroregenerative effects of preinjury FK-506 administration. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(2):360-7.

39. Gold BG, Densmore V, Shou W, Matzuk MM, Gordon HS. Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12)

mediates the neurotrophic action of FK506. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1999;289(3):1202-10.

40. Quinta HR, Maschi D, Gomez-Sanchez C, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD. Subcellular rearrangement of hsp90-binding immunophilins accompanies neuronal differentiation and neurite outgrowth. *J Neurochem*. 2010;115(3):716-34.

41. Quinta HR, Galigniana MD. The neuroregenerative mechanism mediated by the Hsp90-binding immunophilin FKBP52 resembles the early steps of neuronal differentiation. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2):637-49.

42. Que J, Cao Q, Sui T, Du S, Kong D, Cao X. Effect of FK506 in reducing scar formation by inducing fibroblast apoptosis after sciatic nerve injury in rats. *Cell Death Dis*. 2013;4:e526.

43. Lee M, Doolabh VB, Mackinnon SE, Jost S. FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve*. 2000;23(4):633-40.

44. Udina E, Ceballos D, Gold BG, Navarro X. FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers. *Experimental neurology*. 2003;183(1):220-31.

45. Jost SC, Doolabh VB, Mackinnon SE, Lee M, Hunter D. Acceleration of peripheral nerve regeneration following FK506 administration. *Restor Neurol Neurosci*. 2000;17(1):39-44.

46. Sulaiman OA, Voda J, Gold BG, Gordon T. FK506 increases peripheral nerve regeneration after chronic axotomy but not after chronic schwann cell denervation. *Experimental neurology*. 2002;175(1):127-37.

47. Doolabh VB, Mackinnon SE. FK506 accelerates functional recovery following nerve grafting in a rat model. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103(7):1928-36.
48. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2001;107(6):1419-29.
49. [http:// www.prograf.com/index.php](http://www.prograf.com/index.php) [Available from: [http:// www.prograf.com/index.php](http://www.prograf.com/index.php)].
50. di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(9):1544-52.
51. Widgerow AD, Salibian AA, Kohan E, Sartinferreira T, Afzel H, Tham T, et al. "Strategic sequences" in adipose-derived stem cell nerve regeneration. *Microsurgery*. 2014;34(4):324-30.
52. Marconi S, Castiglione G, Turano E, Bissolotti G, Angiari S, Farinazzo A, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(11-12):1264-72.
53. 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):e17899.
54. Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev*. 2014;23(7):741-54.

55. Liu G, Cheng Y, Guo S, Feng Y, Li Q, Jia H, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. *Int J Mol Med*. 2011;28(4):565-72.
56. Tomita K, Madura T, Sakai Y, Yano K, Terenghi G, Hosokawa K. Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience*. 2013;236:55-65.
57. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2003;181(2):115-29.
58. Wakao S, Hayashi T, Kitada M, Kohama M, Matsue D, Teramoto N, et al. Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Experimental neurology*. 2010;223(2):537-47.
59. 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. *Eur J Neurosci*. 2001;14(11):1771-6.
60. Hong SQ, Zhang HT, You J, Zhang MY, Cai YQ, Jiang XD, et al. Comparison of transdifferentiated and untransdifferentiated human umbilical mesenchymal stem cells in rats after traumatic brain injury. *Neurochem Res*. 2011;36(12):2391-400.
61. 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.

62. 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.
63. Swijnenburg RJ, Schrepfer S, Govaert JA, Cao F, Ransohoff K, Sheikh AY, et al. Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(35):12991-6.
64. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(4):268-77.
65. Paspala SA, Murthy TV, Mahaboob VS, Habeeb MA. Pluripotent stem cells - a review of the current status in neural regeneration. *Neurol India*. 2011;59(4):558-65.
66. Zhang H, Wei YT, Tsang KS, Sun CR, Li J, Huang H, et al. Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model. *J Transl Med*. 2008;6:67.
67. Liard O, Segura S, Sagui E, Nau A, Pascual A, Cambon M, et al. Adult-brain-derived neural stem cells grafting into a vein bridge increases postlesional recovery and regeneration in a peripheral nerve of adult pig. *Stem cells international*. 2012;2012:128732.
68. 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. *J Reconstr Microsurg*. 2008;24(8):545-50.
69. Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;40(Pt 1):17-24.

70. Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2004;362(3):200-3.
71. Yang Y, Yuan X, Ding F, Yao D, Gu Y, Liu J, et al. Repair of rat sciatic nerve gap by a silk fibroin-based scaffold added with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(17-18):2231-44.
72. Zheng L, Cui HF. Enhancement of nerve regeneration along a chitosan conduit combined with bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2012;23(9):2291-302.
73. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005;54(3):132-41.
74. 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.
75. Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Experimental neurology*. 2004;187(2):319-28.
76. Xu Y, Liu Z, Liu L, Zhao C, Xiong F, Zhou C, et al. Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells in vitro. *BMC neuroscience*. 2008;9:21.
77. Fairbairn NG, Randolph MA, Redmond RW. The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014;67(5):662-75.

78. Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006;24(1):115-24.
79. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21(1):50-60.
80. 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.
81. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001;3(9):778-84.
82. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*. 2005;23(6):727-37.
83. Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbett JA. Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(5):1642-59.
84. McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, Midha R, Miller FD. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(24):6651-60.

85. 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.
86. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322(5903):949-53.
87. Denham M, Dottori M. Neural differentiation of induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;793:99-110.
88. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2009;27(8):743-5.
89. Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(9):4335-40.
90. Zhao Z, Wang Y, Peng J, Ren Z, Zhang L, Guo Q, et al. Improvement in nerve regeneration through a decellularized nerve graft by supplementation with bone marrow stromal cells in fibrin. *Cell Transplant*. 2014;23(1):97-110.
91. Yang DY, Sheu ML, Su HL, Cheng FC, Chen YJ, Chen CJ, et al. Dual regeneration of muscle and nerve by intravenous administration of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells regulated by stromal cell-derived factor-1alpha in a sciatic nerve injury model. *J Neurosurg*. 2012;116(6):1357-67.
92. Dadon-Nachum M, Sadan O, Srugo I, Melamed E, Offen D. Differentiated mesenchymal stem cells for sciatic nerve injury. *Stem Cell Rev*. 2011;7(3):664-71.

93. Myckatyn TM, Hunter DA, Mackinnon SE. The effects of cold preservation and subimmunosuppressive doses of FK506 on axonal regeneration in murine peripheral nerve isografts. *Can J Plast Surg*. 2003;11(1):15-22.
94. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Experimental neurology*. 1982;77(3):634-43.
95. Mackinnon SE DA. *Surgery of the Peripheral Nerve*.
96. Scheib J, Hoke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nature reviews Neurology*. 2013;9(12):668-76.
97. Wang MS, Zeleny-Pooley M, Gold BG. Comparative dose-dependence study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997;282(2):1084-93.
98. Sobol JB, Lowe IJ, Yang RK, Sen SK, Hunter DA, Mackinnon SE. Effects of delaying FK506 administration on neuroregeneration in a rodent model. *J Reconstr Microsurg*. 2003;19(2):113-8.
99. Mekaj AY, Morina AA, Manxhuka-Kerliu S, Neziri B, Duci SB, Kukaj V, et al. Electrophysiological and functional evaluation of peroneal nerve regeneration in rabbit following topical hyaluronic acid or tacrolimus application after nerve repair. *Niger Postgrad Med J*. 2015;22(3):179-84.
100. Mekaj AY, Morina AA, Bytyqi CI, Mekaj YH, Duci SB. Application of topical pharmacological agents at the site of peripheral nerve injury and methods used for evaluating the success of the regenerative process. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2014;9:94.

101. Davies TH, Sanchez ER. FKBP52. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(1):42-7.
102. Callebaut I, Renoir JM, Lebeau MC, Massol N, Burny A, Baulieu EE, et al. An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(14):6270-4.
103. Sivils JC, Storer CL, Galigniana MD, Cox MB. Regulation of steroid hormone receptor function by the 52-kDa FK506-binding protein (FKBP52). *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(4):314-9.
104. Echeverria PC, Mazaira G, Erlejman A, Gomez-Sanchez C, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD. Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(17):4788-97.
105. Galigniana MD, Echeverria PC, Erlejman AG, Piwien-Pilipuk G. Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus (Austin, Tex)*. 2010;1(4):299-308.
106. Gold BG, Yew JY, Zeleny-Pooley M. The immunosuppressant FK506 increases GAP-43 mRNA levels in axotomized sensory neurons. *Neurosci Lett*. 1998;241(1):25-8.
107. Madsen JR, MacDonald P, Irwin N, Goldberg DE, Yao GL, Meiri KF, et al. Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Experimental neurology*. 1998;154(2):673-83.

108. Brenner MJ, Moradzadeh A, Myckatyn TM, Tung TH, Mendez AB, Hunter DA, et al. Role of timing in assessment of nerve regeneration. *Microsurgery*. 2008;28(4):265-72.
109. Urbanchek MS, Chung KC, Asato H, Washington LN, Kuzon WM, Jr. Rat walking tracks do not reflect maximal muscle force capacity. *J Reconstr Microsurg*. 1999;15(2):143-9.
110. Sarikcioglu L, Demirel BM, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol (Warsz)*. 2009;68(1):1-7.
111. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, et al. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res*. 2003;974(1-2):17-24.
112. Cui L, Jiang J, Wei L, Zhou X, Fraser JL, Snider BJ, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem Cells*. 2008;26(5):1356-65.
113. Erba P, Mantovani C, Kalbermatten DF, Pierer G, Terenghi G, Kingham PJ. Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in peripheral nerve conduits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(12):e811-7.
114. Sun F, Zhou K, Mi WJ, Qiu JH. Repair of facial nerve defects with decellularized artery allografts containing autologous adipose-derived stem cells in a rat model. *Neurosci Lett*. 2011;499(2):104-8.
115. Mohammadi R, Azizi S, Delirez N, Hobbenaghi R, Amini K. Comparison of beneficial effects of undifferentiated cultured bone marrow

stromal cells and omental adipose-derived nucleated cell fractions on sciatic nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 2011;43(2):157-63.

116. Salibian AA, Widgerow AD, Abrouk M, Evans GR. Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. *Arch Plast Surg*. 2013;40(6):666-75.

117. Jones I, Novikova LN, Novikov LN, Renardy M, Ullrich A, Wiberg M, et al. Regenerative effects of human embryonic stem cell-derived neural crest cells for treatment of peripheral nerve injury. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018.

118. Masgutov R, Masgutova G, Mukhametova L, Garanina E, Arkhipova SS, Zakirova E, et al. Allogenic Adipose Derived Stem Cells Transplantation Improved Sciatic Nerve Regeneration in Rats: Autologous Nerve Graft Model. *Front Pharmacol*. 2018;9:86.

119. Hsueh YY, Chang YJ, Huang TC, Fan SC, Wang DH, Chen JJ, et al. Functional recoveries of sciatic nerve regeneration by combining chitosan-coated conduit and neurosphere cells induced from adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2014;35(7):2234-44.

120. Sun F, Zhou K, Mi WJ, Qiu JH. Combined use of decellularized allogeneic artery conduits with autologous transdifferentiated adipose-derived stem cells for facial nerve regeneration in rats. *Biomaterials*. 2011;32(32):8118-28.

121. Wang Y, Zhao Z, Ren Z, Zhao B, Zhang L, Chen J, et al. Recellularized nerve allografts with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2012;514(1):96-101.

122. 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. *Plast Reconstr Surg*. 2016;137(2):318e-30e.

123. Eren F, Oksuz S, Kucukodaci Z, Kendirli MT, Cesur C, Alarcin E, et al. Targeted mesenchymal stem cell and vascular endothelial growth factor strategies for repair of nerve defects with nerve tissue implanted autogenous vein graft conduits. *Microsurgery*. 2016;36(7):578-85.

124. Papalia I, Raimondo S, Ronchi G, Magaudo L, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Repairing nerve gaps by vein conduits filled with lipoaspirate-derived entire adipose tissue hinders nerve regeneration. *Ann Anat*. 2013;195(3):225-30.

125. Radtke C, Schmitz B, Spies M, Kocsis JD, Vogt PM. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27(8):817-23.

126. Armaiz Flores A, Wang H. The Use and Delivery of Stem Cells in Nerve Regeneration: Preclinical Evidence and Regulatory Considerations. *Ann Plast Surg*. 2018;80(4):448-56.

127. Faroni A, Smith RJ, Lu L, Reid AJ. Human Schwann-like cells derived from adipose-derived mesenchymal stem cells rapidly de-differentiate in the absence of stimulating medium. *Eur J Neurosci*. 2016;43(3):417-30.

128. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1009-16.

129. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):392-402.

130. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(5):383-96.
131. Park JU, Kwon ST. Potential of autologous adipose-derived stem cells to regenerate atrophied muscle in a rat model. *Wound Repair Regen*. 2017;25(6):944-55.
132. Kim I, Lee SK, Yoon JI, Kim DE, Kim M, Ha H. Fibrin glue improves the therapeutic effect of MSCs by sustaining survival and paracrine function. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(21-22):2373-81.
133. 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):11-26.