



Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

KOLAJEN BAĞLANMA BÖLGESİ İÇEREN VASKÜLER ENDOTELYAL

GROWTH FAKTÖR İLE KOMBİNE SIĞIR KAYNAKLI ASELÜLER

DERMAL MATRİKSİN SİYATİK SİNİR REJENERASYONUNA ETKİSİ

DENEYSEL ÇALIŞMA

DR. İLHAN ERDEM

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2024



Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**KOLAJEN BAĞLANMA BÖLGESİ İÇEREN VASKÜLER ENDOTELYAL
GROWTH FAKTÖR İLE KOMBİNE SIĞIR KAYNAKLI ASELÜLER
DERMAL MATRİKSİN SİYATİK SİNİR REJENERASYONUNA ETKİSİ**

DENEYSEL ÇALIŞMA

DR. İLHAN ERDEM

UZMANLIK TEZİ

Danışman: DOÇ. DR. AHMET HAMDİ SAKARYA

İSTANBUL 2024

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimimin başından itibaren, bilgi ve tecrübesiyle mesleki deneyimimin gelişimine önemli katkılar sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet Bayramiçli'ye ve tez çalışma sürecinde desteğini esirgemeyen, mesleki gelişimimde büyük katkısı olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet Hamdi Sakarya'ya teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve becerilerinden büyük kazanımlar edindiğim emekli öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. Özhan Bekir Çelebiler ve Sn. Prof. Dr. Erdem Tezel'e; bilimsellik ve cerrahi beceri anlamında yetişmemde büyük katkısı bulunan Sayın Prof. Dr. Bülent Saçak'a, Sayın Doç. Fatma Nihal Durmuş Kocaaslan'a, Sayın Doç. Dr. Zeynep Deniz Akdeniz Doğan'a, Sayın Doç. Dr. Dağhan Dağdelen'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şeyda Güray'a teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere ulaşmamda en büyük katkıyı sağlayan sevgili eşim Başak Uyanık Erdem'e ve aileme; anneme, babama ve kardeşime şükranlarımı sunarım.

Son olarak bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi ve sonuçlandırılmasındaki desteklerinden dolayı Marmara Üniversitesi Rektörlüğü ,Bilimsel Araştırma Projeleri Kordinasyon Birimi (BAPKO)'ne teşekkürlerimi sunarım.

Dr. İlhan Erdem

İmza

ÖZET

Giriş ve Amaç: Periferik sinir yaralanmaları, özellikle travma sonrası sık karşılaşılan ciddi sağlık sorunlarıdır ve optimal onarım şartlarında dahi tam fonksiyonel iyileşme sağlanamayabilir. Bu nedenle, sinir rejenerasyonunu destekleyecek alternatif biyomateriyallerin kullanımı önem arz etmektedir. Bu çalışmada, kolajen bağlanma bölgesi içeren vasküler endotelyal büyüme faktörü (Collagen Binding Domain içeren VEGF, CBD-VEGF) ile kombine edilmiş sıgır kaynaklı aselüler dermal matriksin (ADM) siyatik sinir defekti üzerindeki rejeneratif etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, 32 adet Sprague Dawley soyu erişkin sıçan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve sham grubu olarak aynı 8 sıçan kullanılmış, sağ alt ekstremité sham, sol alt ekstremité kontrol grubu olarak belirlenmiş ve toplam 5 grup oluşturulmuştur. Gruplar, kontrol grubu, sham grubu, siyatik sinir grefti (greft) grubu, greft + ADM grubu ve greft+ ADM + CBD-VEGF grubu olarak belirlenmiştir. Son üç grupta siyatik sinir hasarı oluşturulmuş ve greft uygulanmıştır. Operasyondan sekiz hafta sonra hayvanlardan elektromiyografi (EMG) kayıtları alınarak fonksiyonel iyileşme değerlendirilmiş, kas ve siyatik sinir dokuları histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmiştir.

Bulgular: ADM ve CBD-VEGF kombinasyonu, sinir rejenerasyonu üzerinde anlamlı derecede olumlu etki göstermiştir. Histolojik analizler sonucunda, ADM + CBD-VEGF grubunda sinir dokusunda belirgin bir rejenerasyon, daha yoğun miyelin kılıf oluşumu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Gastroknemius kasında ise atrofi derecesinin azaldığı ve kas liflerinin organizasyonunun daha düzenli olduğu gözlenmiştir. Elektrofizyolojik analizlerde, ADM + CBD-VEGF grubunda siyatik sinir iletim hızı ve amplitüdün anlamlı şekilde arttığı, bu grubun motor fonksiyonlarını daha iyi koruduğu belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal boyamalarda ise ADM + CBD-VEGF grubunda Schwann hücre aktivitesinin ve S-100 protein ekspresyonunun artmış olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç: Bu alışma, CBD-VEGF ile kombine edilmiş ADM'nin sinir rejenerasyonunu arttırmada potansiyel bir yöntem olabileceğini ortaya koymaktadır. ADM'nin sağladığı yapısal destek ve CBD-VEGF'nin büyüme faktörü etkisi, sinir iyileşmesinde önemli bir sinerji yaratmıştır. Bu kombinasyonun, gelecekteki sinir onarım yaklaşımlarında umut verici bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sinir iyileşmesi, Aselüler dermal matriks, CBD-VEGF, Sinir hasarı, Sinir greftleme.



ABSTRACT

Aim: Peripheral nerve injuries are common serious health issues, especially after trauma, and even under optimal repair conditions, full functional recovery may not be achieved. Therefore, the use of alternative biomaterials that can support nerve regeneration is of great importance. In this study, the regenerative effects of bovine-derived acellular dermal matrix (ADM) combined with collagen-binding domain-containing vascular endothelial growth factor (CBD-VEGF) on sciatic nerve defect were investigated.

Materials and Method: The study was conducted on 32 adult Sprague Dawley rats. The same 8 rats were used as the control and sham groups, with the right lower extremity designated as the sham group and the left lower extremity as the control group, resulting in a total of 5 groups. The groups were defined as the control group, sham group, sciatic nerve graft (graft) group, graft + ADM group, and graft + ADM + CBD-VEGF group. The groups were designated as the control group, sham group, sciatic nerve graft (graft) group, graft + ADM group, and graft + ADM + CBD-VEGF group. Sciatic nerve injury was created in the last three groups and grafting was performed. Eight weeks after surgery, electromyography (EMG) recordings were taken from the animals to evaluate functional recovery, and the muscle and sciatic nerve tissues were examined histologically and immunohistochemically.

Results: The combination of ADM and CBD-VEGF showed a significant positive effect on nerve regeneration. Histological analyses revealed prominent regeneration, more extensive myelin sheath formation, and reduced inflammatory cell infiltration in the ADM + CBD-VEGF group. In the gastrocnemius muscle, the degree of atrophy was reduced, and muscle fiber organization was more regular. Electrophysiological analyses demonstrated that sciatic nerve conduction velocity and amplitude significantly increased in the ADM + CBD-VEGF group, indicating that this group better preserved motor functions. Immunohistochemical staining showed increased Schwann cell activity and enhanced S-100 protein expression in the ADM + CBD-VEGF group.

Conclusion: This study suggests that ADM combined with CBD-VEGF may be a potential method for enhancing nerve regeneration. The structural support provided by ADM and the growth factor effect of CBD-VEGF created an important synergy in nerve healing. This combination is considered a promising treatment option for future nerve repair approaches.

Keywords: Nerve regeneration, Acellular dermal matrix, CBD-VEGF, Nerve injury, Nerve grafting.



İÇİNDEKİLER TABLOSU

ÖNSÖZ4

ÖZET5

ABSTRACT7

İÇİNDEKİLER TABLOSU9

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ11

ŞEKİLLER, TABLOLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ13

1. GİRİŞ VE AMAÇ1

2. GENEL BİLGİLER4

2.1. Periferik Sinir Anatomisi4

2.2. Periferik Sinir Yaralanmaları5

2.2.1. Periferik Sinir Yaralanmalarının Dereceleri6

2.2.2. Periferik Sinir Yaralanmalarında Onarım Yöntemleri7

2.3. Aselüler Dermal Matriks (ADM)10

2.4. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)11

2.4.1. VEGF Ailesi ve İzofomları12

2.4.2. VEGF Reseptörleri ve VEGF'in Etkili Olduğu Sinyal Yolakları13

2.5. CBD-VEGF15

2.6. Sinir Rejenerasyonu İçin ADM ve CBD-VEGF Kullanımı16

3. GEREÇ VE YÖNTEM18

3.1. CBD-VEGF Üretimi18

3.1.1. Rekombinant His-CBD-VEGF165 Füzyon Proteinin Saflaştırılması19

3.1.2 Saflaştırılmış, Rekombinant His-CBD-VEGF165 Füzyon Proteinin His-Tag Bölgesinin Kesimi19

3.1.3. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi	21
3.1.4. BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Miktarı Tayini	22
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	22
3.3. Deney Prosedürü	23
3.4. Sakrifikasyon, Örneklerin Alınması ve Histolojik Analizler	28
3.5. İmmünohistokimyasal Analizler	28
3.6. EMG – Elektrofizyolojik İncelemeler	29
3.7. Gastroknemius Kas Ağırlık Oranı	30
3.8. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
5. TARTIşMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
7. KAYNAKLAR	47
8. EKLER	72
8.1. Etik Kurul Onay formu	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- % : Yüzde
- °: Derece
- µm: Mikrometre
- ADM: Aselüler Dermal Matriks
- Akt: Protein kinaz B
- ATP: Adenozin Trifosfat
- BCA: Bicinchoninic Asit
- BSA: Sığır Serum Albümini
- CBD-VEGF: Collagen Binding Domain (Kolajen Bağlanma Bölgesi)
içeren VEGF
- DAG: Diasegliserol
- EMG: Elektromiyografi
- eNOS: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
- ERK: Ekstraselüler Sinyal Düzenleyen Kinaz
- g: Gram
- H&E: Hematoksilen ve Eozin
- IMAC: Immobilize Metal Afinite Kromatografisi
- IP3: İnositol Trifosfat
- IPTG: İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid
- kDa: Kilodalton
- LFB: Luxol Fast Blue
- mA: Mili amper
- MEK: Mitojen Etkili Kinaz
- mL: Mililitre
- mm: Milimetre
- mM: Milimolar
- ms: Milisaniye
- mV: Milivolt

- NaCl: Sodyum Klorür
- HisPur: Nikel-Nitrilotriasetik asit
- nm: Nanometre
- OD600: Optik Yoğunluk 600 nm
- PBS: Fosfat Tamponlu Salin
- pH: Asitlik/bazlık ölçüsü
- PLCγ: Fosfolipaz C gama
- PSS: Periferik Sinir Sistemi
- RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Kinaz
- RAS: Rat Sarcoma Onkogen
- rpm: Dakikadaki dönüş sayısı
- SDS-PAGE: Sodium Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
- TEMED: Tetrametiletildiamin
- Tris-HCl: Tris(hidroksimetil)aminometan Hidroklorür Tamponu
- U: Ünite
- VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER, TABLOLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ

Şekil 1. Periferik Sinir Sisteminin yapısı (35).5

Şekil 2. Ekspresyon vektörü pET-28a(+) ve His-Tag kesim bölgesi olan trombin enziminin lokasyonu .20

Şekil 3. Prone pozisyonda sağ ayak cerrahi insizyon sahasının tıraşlanmış hali.24

Şekil 4. (A) Gluteal kıvrıma paralel insizyon hattı. **(B)** Cilt kesisi sonrası kas diseksiyonunu takiben siyatik sinire ulaşılması.24

Şekil 5. (A) Kaliper yardımıyla 10 mm boyutunda fon üzerinde ölçülen ve sinir grefti kesisi için oluşturulan template. **(B)** Siyatik sinir gövdesinden (siyatik çentik-siyatik trifikasyon arası) 10 mm boyutunda sinir grefti eldesi. **(C)** Elde edilen sinir greftinin aynı bölgeye tekrar koaptasyonu. **(D)** 15x10x1 mm boyutunda Aselüler dermal matriks (Matriderm) hazırlanması **(E)** Sinir grefti üzerine Aselüler dermal matriks (Matriderm) sarılması ve fiksasyonu. **(F)** Cilt sütürasyonu.26

Şekil 6. (A) Operasyondan 8 hafta sonra EMG öncesi ADM ve siyatik sinir greftinin görüntüsü. **(B)** Elektrofizyolojik inceleme – Siyatik sinir ve gastrokinemius kas incelemesi. **(C)** Elektrofizyolojik inceleme – uyarı anı.26

Şekil 7. Elektrofizyolojik inceleme analizi.27

Şekil 8. (A) Gastrokinemius (sarı ok, yukarıda) ve soleus (siyah ok, aşağıda) eksizyonu. **(B)** Gastrokinemius kas eksizyonu. **(C)** Sağlıklı taraf siyatik sinir ve gastrokinemius kası (sol taraf) ve işlem uygulanan siyatik sinir ve gastrokinemius kası (sağ taraf).27

Şekil 9. (A) Sham ve kontrol gruplarının gastroknemius kası ağırlıkları ve tedavi gruplarının sağ ve sol bacak gastroknemius kası ağırlıkları. **(B)** Grupların siyatik sinir hasarı verilen bacaklarındaki gastroknemius kası ağırlıkları (* $p<0,05$, **** $p<0,0001$).31

Şekil 10. Grupların EMG aktivitesi sonuçları. **(A)** Amplitüd (mV). **(B)** Latans (ms). (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$, kontrol ve sham gruplarına kıyasla # $p<0,05$ ve ## $p<0,01$).32

Şekil 11. Hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması ile **(a)** kontrol, **(b)** sham, **(c, d)** greft, **(e, f)** greft + ADM ve **(g, h)** greft + ADM + CBD-VEGF gruplarına ait gastroknemius kasının ışık mikroskopik değerlendirmesinde; hasarlı kas lifi (↓), perimisyum (⇓) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (▲) görülmektedir. (Ölçekler: a, b, c, e, g: 50 µm; a inset, b inset, d, f, h: 20 µm.)34

Şekil 12. **(A)** Kas lifi organizasyonunun bozulma/hasarlı kas lifi skoru, **(B)** bağ doku bileşenlerinin artış skoru ve **(C)** inflamatuvar hücre infiltrasyonu skoru. (Kontrol ve sham gruplarına kıyasla # $p<0,05$ ve ## $p<0,01$).35

Şekil 13. **(a1, c1, d1)** Kontrol, **(b1)** sham, **(a2-d2)** siyatik sinir grefti, **(a3-d3)** siyatik sinir grefti + ADM, ve **(a4-d4)** siyatik sinir grefti + ADM + CBD-VEGF, gruplarına ait siyatik sinirin H&E, luxol fast blue (LFB) ve S-100 boyaması. Perinöryum (↑), kan damarı (⇒), akson ve miyelin kılıf dejenerasyonu (↓), fibrotik doku (⇓), ödem (★), S-100 immunreaktivitesi (✓) görülmektedir. (Ölçekler: a1-4, c1-4: 50 µm, b1-4, d1-4: 20 µm.)36

Şekil 14. Siyatik sinirde histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilen parametreler. **(A)** Perinöryum kalınlaşması, **(B)** akson ve miyelin kılıf dejenerasyonu (akson şişkinliği), **(C)** fibrotik doku varlığı, **(D)** inflamasyon, **(E)** ödem ve **(F)** S-100 immunoreaktivitesi. (Kontrol ve sham gruplarına kıyasla # $p<0,05$ ve ## $p<0,01$).37

Tablo 2.1. Elektroforez (SDS-PAGE) deneyinde kullanılan bileşenler (Laemmli, 1970).21

Tablo 2.2. Deney grupları hayvanlar.22

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinir yaralanmaları en sık görülen yaralanmalar arasındadır (1). Optimum şartlarda onarım yapılsa dahi duyu ve motor fonksiyonlar tam olarak düzelmeyebilir. İdeal bir onarım için periferik sinir uçlarının fasiküler ve epinöral yapıları titiz bir şekilde diseke edilmeli, debriler ve doku artefaktları temizlenmeli ve sinir uçları gerilimsiz primer sutureasyona elverişli hale getirilmelidir (2). Ancak ciddi travmatik yaralanmalarda primer onarım yapılacak yeterli sinir uzunluğu sağlanamadığında veya fasiyal palsi, brakial pleksus cerrahisi gibi uygulamalarda bu durum mümkün olmamakta ve ilave sinir dokusuna gereksinim olmaktadır. Bu durumda şu anda altın standart olarak kabul edilen otolog sinir greftleri kullanılabilir (3).

Sinir grefti, donör saha morbiditesine bağlı problemlerden kaçınmak için allogenik sinir greftleri, otolog damar greftleri veya kas dokuları gibi diğer dokuların onarımlarında da kullanılmaktadır (4-6). Ancak fonksiyonel açıdan otolog sinir grefti bu dokulardan çok daha iyi sonuçlar vermektedir (3). Doku mühendisliğindeki gelişmeler sonucunda sinir defektlerinin onarımında çeşitli sentetik ve biyolojik sinir kondüitleri denenmiştir (7). Bu kondüitler sinir grefti ihtiyacını dolayısıyla donör saha morbiditesini azaltan alternatif bir yöntem olmakla beraber özellikle motor sinir başta olmak üzere sinir onarımında otolog sinir greftinin etkinliğine kıyasla beklentiyi karşılamamıştır (3). Kondüitler genellikle 30 mm ye kadar olan sinir defektinin olduğu durumlarda kullanılmakta, bunun üzerinde etkisi belirgin azalmaktadır. Dolayısıyla uzun sinir defektlerinde kondüitlerden daha çok otogreftler veya allogreftler kullanılmaktadır (7).

Allogreftler kadavra veya beyin ölümü gerçekleşen bireylerden elde edilen, dolayısıyla alıcıda donör alan morbiditesi yaratmayan, istenilen uzunluk ve kalınlıkta kullanılabilen doku materyalleridir. Bu özellikleri ile uzun sinir grefti gereken durumlarda kullanılabilir. Büyük hayvanlar, primatlar ve kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilebildiği görülmüştür (1). Ancak doku

reddi ve ret reaksiyonları en önemli sorunlardandır ve genellikle kullanımı immünsüpresyon gerektirmektedir. Ayrıca az da olsa enfeksiyon riski bulunmaktadır. Pahalı olması da diğer bir dezavantajdır. Yeni gelişmelerle birlikte immünojenite çeşitli kimyasal ve termal denatürasyon yöntemleriyle azaltılabilmekle birlikte klinik kullanıma ilişkin yeterli çalışma bulunmaması nedeniyle allogreftler pratik uygulamada çok kullanılmamaktadır (8). Ayrıca kadavra ve diğer donörlere erişim nedeniyle de kullanımı kısıtlılık yaratmaktadır.

Otolog sinir greftleri, sinir defekti onarımında klinik kullanımda diğer yöntemlere kıyasla en sık kullanılan uygulamadır. Allogreftlere kıyasla ek farklı bir donör ihtiyacının olmaması ve ucuz olması, kondütlere kıyasla her ne kadar donör alan morbiditesi yaratabilse de uzun sinir defektlerinde kullanılabilmesi önemli avantajdır. Ayrıca pek çok klinik ve deneysel çalışmada diğer sinir onarım yöntemlerine üstün sonuçlar elde edilmesi pratikte sinir defekti onarımlarında altın standart tedavi yöntemi olarak kabul edilmiştir (9). Otolog sinir greftleri, aksonal rejenerasyonu ve büyümeyi kolaylaştıran Schwann hücrelerini ve yeterli nörotrofik faktörlerinin olduğu ortamı sağlar (10-13). Ancak uzun sinir grefti gereken durumlarda bu ortam içinde bir takım iyileşmeyi etkileyen Schwann hücre denervasyonu, nörotrofik faktörlerin azalması gibi olumsuz durumlar meydana gelmekte, rejenerasyon kapasitesi azalmakta ve bu da fonksiyonel iyileşmeyi zorlaştırmaktadır (14-17). Dolayısıyla bu iyileşme ortamının sinir rejenerasyonu arttıracak şekilde modüle edilmesi kritik öneme sahiptir. Moleküler teknoloji ve biyomühendislik teknolojilerindeki gelişmeler sinir rejenerasyonuna da yansımış bu alanda pek çok çalışma yapılmıştır.

Aselüler dermal matriks (ADM), meme rekonstrüksiyonu ve karın duvarı onarımı gibi plastik cerrahinin çeşitli alanlarında yaygın klinik uygulamaları olan bir materyaldir. Aselüler dermal matriksler insan kaynaklı veya domuz, sığır gibi hayvan kaynaklı olabilen, hücre göçünü ve farklılaşmasını sağlayan, vaskülogenezi arttıran, büyüme faktörlerinin birikmesini ve hedef hücrelere sunulmasını kolaylaştıran rejeneratif iskelet görevi gören materyallerdir (18-21). Bu özellikleri sayesinde sinir rejenerasyonunda kullanımı deneysel anlamda mevcuttur. ADM ile birlikte

rejenerasyon kapasitesini daha da arttırmak için kök hücre, nöral büyüme faktörleri gibi çeşitli biyomateryallerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. (22).

Bu çalışmada siyatik sinir defektinde kollojen bağlanma bölgesi (CBD) içeren vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ile sığır kaynaklı ADM (Matriderm) kullanımının rejeneratif kapasiteyi arttırılabileceği düşünülmüştür. VEGF, endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu etkili bir şekilde iyileştirir ve anjiyogenezi tetikler (23). VEGF'nin kullanımında en önemli problemlerden bir tanesi VEGF'nin yarı ömrünün çok kısa olması ve metabolik bozulmanın hedef bölgede yeterli süre sürdürülemeyecek kadar hızlı olmasıdır. Kolajen binding domain içeren VEGF'nin (CBD-VEGF'nin) füzyon proteininin spesifik olarak kolajen I'e bağlanabildiği ve VEGF aktivitesini hem in vitro hem de in vivo olarak koruyabildiği rapor edilmiştir (24). Sinir dokusunda ve ADM'de bulunan kolajen CBD-VEGF için hedef molekül olarak düşünülmüştür.

Bu çalışmada sinir grefti üzerine aselüler dermal matriks ile birlikte CBD-VEGF uygulayıp bunun sinir rejenerasyona etkisi gözlemlenmek istenmektedir. Literatürde sinir rejenerasyon kapasitesini arttırmaya yönelik birçok yöntem, biyomateryal ve nöromodülatör tanımlanmıştır. ADM ile birlikte nöromodülatör kullanımını içeren çalışma sayısı kısıtlıdır ve VEGF bu kombinasyonlarda bilginiz dahilinde kullanılmamıştır. Ayrıca CBD-VEGF'nin sinir rejenerasyonuna etkisi ve ADM ile birlikte kullanılmasını içeren çalışma olmaması da bu çalışmanın esas amacını oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periferik Sinir Anatomisi

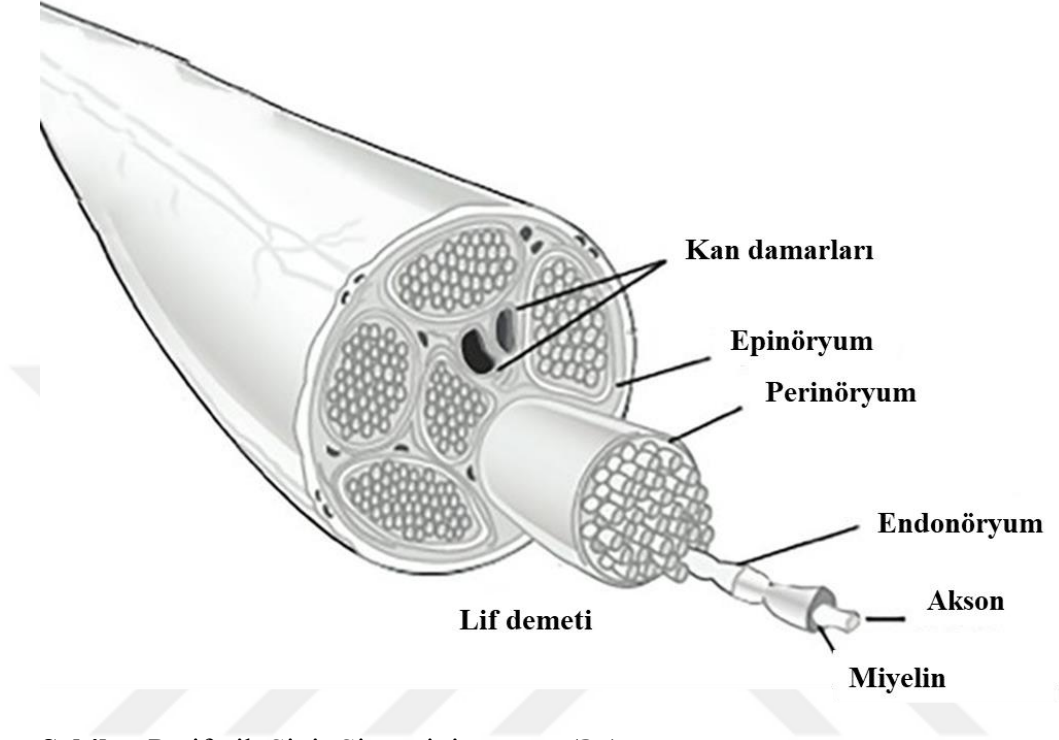
Periferik sinir sistemi (PSS), merkezi sinir sistemi dışında kalan tüm sinir liflerini kapsar ve vücudun beyin ile omurilik dışında kalan bölümlerini kontrol eder (25). PSS, motor, duyu ve otonom sinirleri içerir ve hem istemli hem de otonom işlevleri yerine getirir (26). PSS'nin anatomisi, karmaşık bir ağ yapısı oluşturan sinir lifleri ve bu sinirlerin destekleyici yapılarını kapsar (**Şekil 1**).

Periferik sinirler birden çok akson ve bu aksonları çevreleyen Schwann hücrelerinden oluşmaktadır. Miyelin, elektrik sinyallerinin daha hızlı iletilmesini sağlar ve Schwann hücreleri tarafından üretilir (27). Periferik sinirlerin anatomik bileşenleri aksonlar, miyelin kılıfı, endonöryum, perinöryum, epinöryum ve kan damarlarını içeren vazo nevrorumdan oluşmaktadır kapsar (**Şekil 1**).

Sinir hücresinin uzun, ince uzantısı olan aksonlar, sinir sinyallerini vücudun diğer kısımlarına ileten temel yapılardır (28). Her bir akson, sinyalin hızlı ve etkin bir şekilde iletilmesi için uygun yapı ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Miyelin, aksonları çevreleyen yağlı bir kılıftır ve sinyal iletimini hızlandırır. Miyelinli aksonlarda aksiyon potansiyeli “atlamalı (saltatory) iletim” adı verilen bir mekanizma ile bir Ranvier düğümünden diğerine atlayarak hızla yayılır (29, 30). Miyelin kılıfı, Schwann hücreleri tarafından oluşturulur ve bu hücreler PSS'de miyelin üretiminden sorumludur (30).

Periferik sinirler, sinir liflerini bir arada tutan ve dış çevresel etkilere koruyan birkaç bağ dokusu katmanına sahiptir. Bunlar endonöryum, perinöryum ve epinöryumdur. Endonöryum, her bir aksonu çevreleyen ince bağ dokusu tabakası olup aksonları dış etkenlere karşı korur (31). Perinöryum, bir grup aksonun bir araya gelerek oluşturduğu demetleri çevreleyen bağ dokusu kılıfıdır (32). Perinöryum, sinir liflerini daha fazla izole eder ve sinir sinyallerinin geçişi sırasında çevresel etkenlere karşı koruma sağlar (31). Epinöryum ise periferik sinirin en dış bağ dokusu katmanıdır ve sinirin tüm fasiküllerini çevreler ve sinirleri fiziksel travmalara karşı korur ve

damarları da içermektedir (33). Periferik sinirlerin normal işlevlerini sürdürebilmesi için gereken besin ve oksijen ihtiyaçları, bu sinirlerin içinden geçen kan damarları olan vazo nervorum tarafından sağlanır (34).



Şekil 1. Periferik Sinir Sisteminin yapısı (35).

2.2. Periferik Sinir Yaralanmaları

Periferik sinir yaralanmaları, vücutta en sık karşılaşılan yaralanmalardan biridir ve özellikle travmatik kazalar, cerrahi işlemler, kesici alet yaralanmaları ve spor kazaları gibi durumlar sonrasında sık görülen durumlardır (36). Periferik sinir sistemi, merkezi sinir sisteminden çıkan sinirlerin vücuda yayılmasıyla oluşur ve bu sinirlerin hasar görmesi, ciddi fonksiyon kayıplarına neden olabilir (36). Periferik sinir sistemi, somatosensoriyel sinir sistemi ve otonom sinir sisteminden oluşur (25). Somatosensoriyel sistemin duyuşal yolu, dış çevre hakkında bilgiyi omuriliğe ileten spinal sinirleri içerir. Otonom sinir sistemi, iç çevreyi izlemekten ve homeostazı korumak için efektör organlarda uygun değişiklikleri ortaya çıkarmaktan sorumlu olan viseral duyuşal nöronlara sahiptir (25). Bu nedenle, periferik sinir yaralanmaları sonucunda hem duyu hem de motor fonksiyonlarda kayıplar meydana gelebilir.

Sinirlerin yapısına bağlı olarak, bu tür yaralanmaların iyileşmesi karmaşık olabilir ve hasarın derecesine göre rejenerasyon süresi değişiklik gösterebilir.

Periferik sinir birden çok akson ve bu aksonları çevreleyen Schwann hücrelerinden oluşmaktadır (27). Schwann hücreleri, miyelin kılıfı oluşturarak aksonların elektriksel iletimi hızlandırmasına ve rejenerasyon sırasında aksonlara rehberlik etmesine yardımcı olur (27). Sinir yaralanmalarında aksonlar zarar görebilir veya tamamen kesilebilir ve Schwann hücrelerinin desteği olmadan rejenerasyon süreci zorlaşabilir (37).

2.2.1. Periferik Sinir Yaralanmalarının Dereceleri

Periferik sinir yaralanmaları, hasarın yeri ve türüne bağlı olarak farklı şekillerde sınıflandırılabilir (38). Seddon ve Sunderland sınıflandırmaları, hekimler tarafından periferik sinir yaralanması derecelendirmesi ve tedavisi için kullanılmaktadır (39). Seddon sınıflandırması takip edilmesi daha basit ve elektrofizyolojik değerlendirmeler açısından daha ilgili olsa da Sunderland derecelendirmesi cerrahlar tarafından ne zaman ve nasıl müdahale edileceğine karar vermek için daha sık kullanılmaktadır (39).

Seddon sınıflandırması Sir Herbert Seddon tarafından 1943 yılında tanımlanmış olup sinir yaralanmalarını üç ana kategoriye ayırmaktadır (40, 41). Nöropraksi (Neuropraxia), sinirin iletiminin geçici olarak engellendiği fakat yapısal bir hasarın olmadığı en hafif sinir yaralanması türüdür (42). Bu durumda akson zarar görmez, sinirin miyelin kılıfında bir hasar meydana gelir (43). Bu tür yaralanmalar genellikle sinirin dışarıdan bir baskı veya sıkışması sonucu oluşur (43). Motor ve duyu fonksiyonlarında geçici kayıp görülebilir ve genellikle birkaç hafta içinde tam iyileşme sağlanır (44). Aksonotmezis (Axonotmesis), aksonun hasar gördüğü ancak sinirin bağ dokusu yapısının (endoneuryum, perineuryum, epineuryum) sağlam kaldığı bir sinir yaralanmasıdır (45). Bu tür bir yaralanmada Wallerian dejenerasyon meydana gelir. Aksonların yeniden büyümesi mümkündür ve bu süreç haftada yaklaşık 1-3 mm hızında gerçekleşir (46). Fonksiyonların tam olarak geri dönmesi mümkündür, ancak süreç yaralanmanın yerine ve ciddiyetine bağlı olarak değişir. Nörotmezis

(Neurotmesis) ise, sinirin ve bağ dokusu yapılarının tamamen hasar gördüğü en ciddi sinir yaralanmasıdır (47). Genellikle tam sinir kesisi ya da ciddi bir travma sonucu meydana gelir ve fonksiyon kaybı tamdır (47). Cerrahi müdahale gerektirmekle birlikte iyileşme oranı sınırlıdır ve tam fonksiyonel iyileşme ise nadiren sağlanabilir.

Sunderland sınıflandırması, Seddon'un sınıflandırmasındaki eksiklikleri tamamlamak ve sinir yaralanmalarını daha detaylı olarak açıklamak amacıyla geliştirilmiştir. Bu sınıflandırma sistemi sinir hasarını beş dereceye ayırmaktadır. Birinci derece hasar, Seddon'un nöropraksi tanımına karşılık gelir (48). Sinirin iletimi geçici olarak kesintiye uğrar ama yapısal bir hasar yoktur. İyileşme süreci hızlı ve tamdır. İkinci derece hasarda Akson hasar görmüştür ancak bağ dokusu yapıları (endoneuryum) sağlam kalmıştır (48). Wallerian dejenerasyonu meydana gelir ve aksonların yeniden büyümesi ile iyileşme mümkündür. Üçüncü derece hasarda akson ve endoneuryum hasar görmüştür ancak perineuryum sağlam kalmıştır (49). Bu durumda sinir rejenerasyonu mümkündür, ancak tam fonksiyonel iyileşme sağlanması daha düşük olasılıkla gerçekleşir. Dördüncü derecede akson, endoneuryum ve perineuryum hasar görmüştür, ancak epineuryum sağlam kalmıştır (50). Bu tür hasarlar ciddi bozulmalar içerir ve cerrahi onarım gerektirir. Beşinci derece hasar ise Seddon'un nörotmezisi tanımına karşılık gelir (51). Sinirin tam kopması durumudur ve cerrahi onarım gereklidir. Tam fonksiyonel iyileşme nadiren sağlanabilir.

Seddon sınıflandırması sinir yaralanmalarını üç ana kategoriye ayırarak daha genel bir perspektif sunarken, Sunderland sınıflandırması bu yaralanmaları beş farklı dereceye ayırarak her türlü hasarın detaylı bir şekilde değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Her iki sınıflandırma da sinir yaralanmalarının klinik yönetimi ve tedavi planlaması için önemlidir. Seddon sınıflandırması hızlı ve pratik bir değerlendirme sağlarken, Sunderland sınıflandırması ise hasarın derecesini ve olası iyileşme potansiyelini anlamada daha ayrıntılıdır.

2.2.2. Periferik Sinir Yaralanmalarında Onarım Yöntemleri

Sinir onarımı sırasında kullanılan başlıca yöntemler primer onarım, greft uygulamaları ve sinir kondüitleridir (52, 53). Her yöntemin kendine özgü avantajları

ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemlerin seçimi, sinir yaralanmasının tipi, büyüklüğü, hasarın yeri ve hastanın genel sağlık durumu gibi birçok faktöre bağlıdır (38).

2.2.2.1. Primer Onarım

Primer onarım, sinir uçlarının direkt olarak birbirine suture edilmesiyle gerçekleştirilen onarım türüdür (54). Bu yöntem, özellikle sinir kaybının minimal olduğu durumlarda tercih edilir. Primer onarımın başarılı olabilmesi için sinir uçlarının gerilimsiz bir şekilde bir araya getirilmesi gerekmektedir (53). Gerim, sinir uçlarının kaynaşmasını engelleyebilir ve rejenerasyon sürecini olumsuz etkileyebilir (53). Sinir uçları arasındaki mesafenin fazla olduğu durumlarda ise primer onarım mümkün olmamaktadır. Bu tür durumlarda sinir defektinin doldurulması için greft uygulamaları devreye girmektedir (55).

2.2.2.2. Sinir Greftleri

Sinir greftleri, özellikle büyük sinir defektlerinde kullanılır ve sinir uçları arasındaki boşluğun doldurulmasını sağlar. Sinir greftleri, otolog ve allogenik greftler olmak üzere iki temel tipe ayrılır (56).

Otolog sinir greftleri, hastanın kendi vücudundan alınan sinir dokusunun kullanıldığı bir onarım yöntemidir (57). Genellikle, sural sinir gibi motor fonksiyonu sınırlı olan sinirler donör alan olarak kullanılır (58). Bu yöntemin en büyük avantajı, hastanın kendi dokusunun kullanılması nedeniyle immünolojik reddedilme riskinin olmamasıdır (59). Otolog greftlerin kullanımı, Schwann hücreleri ve nörotrofik faktörler içerdiği için rejenerasyon sürecini destekler (60, 61). Ancak donör saha morbiditesi, hastanın ek bir cerrahi müdahaleye maruz kalması, sinir kaybına bağlı olarak donör bölgede duyu kaybı ve ağrı gibi komplikasyonlar meydana gelebilmesi bu yöntemin önemli dezavantajları arasındadır (61, 62).

Allogenik sinir greftleri, kadavra veya beyin ölümü gerçekleşmiş bireylerden elde edilen sinir dokularının kullanıldığı bir yöntemdir (63). Bu greftlerin en büyük

avantajı, donör saha morbiditesinin olmamasıdır. Allogreftler, istenilen uzunluk ve kalınlıkta kullanılabilir ve bu nedenle özellikle uzun sinir defektlerinde tercih edilebilir. Ancak, allogreftlerin kullanımı immünolojik reddedilme riskini beraberinde getirir (64, 65). Bu durum, genellikle immünsupresif tedavi gerektirmektedir ve bu tedavi de birçok yan etkiye neden olabilir (64, 65). İmmünsupresyonun yanı sıra, kadavra veya donör bulma zorlukları ve bu dokuların sınırlı olması, allogreftlerin yaygın kullanımını engellemektedir (64, 65). Bunları engellemek için çeşitli yöntemler denenmektedir. Hücreleştirilmiş sinir allotransplantları, bağışıklık tepkisini tetikleyebilecek immünojenik materyali azaltan hücresel bileşenleri çıkarmak için işlenir (66). Geriye kalan yapı iskeleti, yapısal proteinleri ve hücre dışı matrisi koruyarak akson rejenerasyonunu desteklerken bağışıklık reddi riskini önemli ölçüde azaltır. Ek olarak greft reddini önlemek için hastalara bağışıklık baskılayıcı ilaçlar verilebilir (67). Bu ilaçlar, bağışıklık dokuya karşı bağışıklık tepkisi olasılığını azaltmaya yardımcı olabilir, ancak uzun süreli bağışıklık baskılayıcının kendine özgü riskleri vardır.

Bunlara ek olarak, doku mühendisliği ve biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle birlikte, sinir greftlerinin yerini alabilecek sentetik ve biyolojik alternatifler geliştirilmiştir (68). Sentetik sinir greftleri, biyouyumlu polimerlerden yapılmış tüplerdir ve sinir defektinin kapatılmasında kullanılır. Biyolojik sinir greftleri ise kolajen, fibrin, laminin gibi biyolojik materyallerden elde edilmiştir ve sinir hücrelerinin büyümesini destekleyen bir mikro ortam sağlar (69, 70). Bu tür greftlerin kullanımıyla donör saha morbiditesi ortadan kalkar ve immünolojik riskler minimize edilir. Ancak, sentetik ve biyolojik greftlerin etkinliği otolog sinir greftleri kadar yüksek değildir ve klinik kullanımları sınırlıdır (71). Bir çalışmada akut total brakial pleksus yaralanmalarında median siniri innervasyon için serbest vaskülarize ulnar sinir grefti kullanımının uzun dönem sonuçlarını incelenmiştir (72). Sinir transferi yöntemlerinin brakial pleksus yaralanmalarında etkili sonuçlar sağladığı belirtilmiştir. Ancak bu yöntemler, donör sinir bulunabilirliği, tam fonksiyonel bağımsızlık sağlanamaması ve ileri mikrocerrahi deneyim gerekliliği gibi sınırlamalara sahiptir.

2.2.2.3. Sinir Kondütleri

Sinir kondütleri, sinir uçları arasındaki boşluğu köprülemek ve rejenerasyonu desteklemek amacıyla kullanılan sentetik veya biyolojik tüplerdir (73). Bu kondütler, sinir uçlarının yönlendirilmesini sağlayarak rejenerasyon sürecine yardımcı olur (74). Kondütler, özellikle kısa mesafeli sinir defektlerinde (30 mm'ye kadar) kullanılır ve bu mesafedeki defektlerin kapatılmasında etkili bir yöntem olarak kabul edilir (75). Ancak uzun sinir defektlerinde kondütlerin etkinliği sınırlıdır ve otolog sinir greftleri kadar başarılı sonuçlar vermemektedir (75). Sinir kondütleri, biyomateryal biliminin gelişmesiyle birlikte farklı malzemelerden üretilmeye başlanmıştır ve bu malzemelerin sinir rejenerasyonuna etkisi araştırılmaktadır (76-79). Bununla birlikte çeşitli çalışmalar sinir kondütlerinin iyi etkinlik gösterdiğini belirtmiştir (80).

2.3. Aselüler Dermal Matriks (ADM)

ADM, hücreleştirilmiş dermal dokudan elde edilen ve çeşitli rejeneratif özelliklere sahip bir biyomateryaldir ve plastik cerrahinin farklı alanlarında geniş bir klinik kullanım alanına sahiptir (81-83). Özellikle meme rekonstrüksiyonu, karın duvarı onarımı ve fasya rekonstrüksiyonu gibi birçok cerrahi prosedürde yaygın olarak kullanılmaktadır (84-87).

ADM, insan kaynaklı veya domuz ve sığır gibi hayvan kaynaklı olabilen bir materyaldir (88). İnsan kaynaklı ADM'ler genellikle daha düşük immünolojik risk taşıırken, hayvan kaynaklı ADM'ler daha fazla immünolojik reaksiyon oluşturma potansiyeline sahiptir ancak uygun hücreleştirme teknikleri kullanılarak bu immünolojik reaksiyonlar minimize edilebilir (89-91). Bunun yanında ADM, kollajen, elastin ve glikozaminoglikanlar gibi yerli ekstraselüler matriks bileşenlerinin çoğunu koruyan benzersiz bir yapıya sahiptir (92). Bu bileşenler, doku rejenerasyonunu desteklemek için mekanik güç ve biyokimyasal sinyaller sağlamak açısından çok önemlidir (92). Hücreleştirme süreci, tüm hücresel içeriği çıkarırken bu önemli bileşenleri koruyarak ADM'nin belirgin bir immün yanıt oluşturmada doku rejenerasyonu için etkili bir iskelet olmasını sağlar (93). ADM'nin biyolojik özellikleri arasında ekstraselüler matriksin temel bileşenlerinin korunması ve bunların doku

yenilenmesini teşvik etmesi öne çıkmaktadır (94). Kollajen, elastin ve glikozaminoglikanlar gibi bileşenler, hücre göçünü ve farklılaşmasını destekler (95, 96). ADM'nin bu bileşenleri, özellikle fibroblastların yara bölgesine göç etmesini ve burada yeni doku oluşumunu teşvik etmesini sağlar (95, 96). ADM ayrıca makrofajlar ve diğer bağışıklık hücreleri için düşük düzeyde immünojenik bir ortam sunarak, inflamasyonun kontrol altına alınmasına yardımcı olur (97). ADM'nin doğal yapısının korunmuş olması, doku iyileşme sürecini hızlandırırken anjiyogenezi de destekler (98, 99). Bu özellikler, ADM'nin yara onarımında ve rejeneratif tıp uygulamalarında etkili bir biyomateryal olmasını sağlamaktadır.

ADM, rekonstrüktif ve estetik cerrahide geniş kullanım alanlarına sahiptir (82). Özellikle meme rekonstrüksiyonları, fitik tamirleri ve yanık tedavisinde önemli bir rol oynar (85). Yanık vakalarında ADM, cilt transplantasyonuna uygun bir ortam hazırlamak ve yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılır (100). ADM ayrıca kronik yaraların tedavisinde de kullanılarak granülasyon dokusunun oluşumunu destekler (101). Kronik yaralar, diyabetik ayak ülserleri ve bası yaraları gibi tedavisi zor yaralardır ve ADM'nin ekstraselüler matriks yapısı, bu tür yaralarda iyileşmeyi hızlandırarak yeni doku oluşumunu teşvik eder (101). Ayrıca fitik tamirlerinde, ADM fitik bölgesine yerleştirilen materyalin vücut tarafından kabul edilmesini ve yeniden yapılandırılmasını sağlar, böylece cerrahi başarının artmasına katkıda bulunur (102). ADM'nin biyouyumlu yapısı, fitik tamirinde kullanılan diğer materyallerle kıyaslandığında daha düşük komplikasyon oranları ve daha iyi uzun dönem sonuçlar sunar (86, 103). ADM'nin klinik uygulamalarındaki tüm bu çeşitliliğin onun esnekliği, biyolojik uyumluluğu ve rejeneratif kapasitesi sayesinde gerçekleşmektedir.

2.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF, vücutta vaskülogenez ve anjiyogenez süreçlerini düzenleyen temel bir büyüme faktörüdür ve endotel hücreleri üzerinde selektif etkiler yapar ve vasküler geçirgenliği artırarak bu süreçleri tetikler (104). VEGF ayrıca oksijen seviyesinin düşük olduğu (hipoksik) dokularda ifade düzeyini artırır ve dokunun oksijenlenmesini sağlamak için yeni damar oluşumunu uyarır (105). VEGF hem embriyolojik gelişim

döneminde hem de yetişkin organizmada birçok fizyolojik ve patolojik durumda kritik rol oynadığından VEGF'nin üretimi ve aktivasyonu sıkı bir şekilde düzenlenir (104).

2.4.1. VEGF Ailesi ve İzofomları

VEGF ailesi, çeşitli ligandlardan ve izofomlardan oluşur. Bu ligandlar VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PlGF (plasental büyüme faktörü), VEGF-E (Orf-VEGF) ve *Trimeresurus flavoviridis* svVEGF'yi içermektedir (104). Son iki VEGF haricinde, memeli genomlarında VEGF ailesinin ilk beş izofomu vardır (63). Bu ligandlar, farklı dokularda ve çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda rol oynar.

VEGF ailesinin en önemli ve en iyi bilinen üyesi VEGF-A'dır. Anjiyogenez ve vaskülogenez süreçlerinde temel rol oynar ve damarlardaki geçirgenliği artırarak bu süreçleri tetikler (105). VEGF-A, alternatif ekzon kesimi mekanizmasıyla farklı izofomlar oluşturabilir. Bu izofomların en önemlileri VEGF121, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206'dır (106-108). VEGF121 heparin bağlama bölgesine sahip olmadığı için ekstraselüler matrikse bağlanmaz ve bu sayede dokular arasındaki yayılım kapasitesi daha fazladır ve bu da anjiyogenezde farklı bir rol üstlenmesine olanak tanır (109). VEGF165, VEGF-A'nın en yaygın izofomlarından biridir ve ekstraselüler matrikse güçlü bir şekilde bağlanabilir (110, 111). Bu izofomun doku spesifik dağılımı ve biyolojik aktivitesi, anjiyogenezi etkin bir şekilde destekler (112). VEGF165 hem serbest halde dolaşabilir hem de ekstraselüler matrikse bağlanarak lokal etkiler gösterebilir (113). VEGF189 ve VEGF206 izofomları ise ekstraselüler matrikse daha sıkı bağlanabilir ve doku içinde depo edilebilirler (110). Bu durum, anjiyogenik sinyallerin daha uzun süreli ve lokalize bir şekilde sağlanmasına olanak tanır. VEGF189 ve VEGF206, damar oluşumu sürecinde lokal etkilerle endotel hücre aktivasyonunu destekler (113, 114).

VEGF-B, özellikle kardiyovasküler sistemde metabolik süreçlerin ve kalp kası sağlığının düzenlenmesinde rol oynar (115). VEGF-B, enerji metabolizmasının düzenlenmesine katkıda bulunarak kalp kasında mitokondriyal yağ asidi taşınmasında rol oynar (116). Bu özelliği nedeniyle, VEGF-B, kardiyak iskemi ve kalp hastalıkları gibi durumların tedavisinde potansiyel bir hedef olarak değerlendirilmektedir (117).

Aynı zamanda, VEGF-B'nin vasküler endotel hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunduğu da bilinmektedir (118).

VEGF-C ve VEGF-D, lenfanjiyogenez sürecinde kritik rol oynar (119-121). VEGF-C, lenfatik damar oluşumu ve lenfanjiyogenezde önemli rol oynar ve bu aktivitesini, VEGF reseptörü-3'e (VEGFR-3) bağlanarak bu reseptörü aktive ederek ve lenf damarlarının olgunlaşmasını düzenleyerek gösterir (122, 123). Özellikle kanser metastazında, tümörlerin lenf sistemi aracılığıyla metastazında rol oynadığı bilinmektedir (123, 124). VEGF-D de benzer bir şekilde VEGFR-3 aracılığıyla lenfanjiyogenezi destekler (125). VEGF-D'nin ayrıca VEGFR-2 ile bağlantı kurarak hem kan hem de lenf damarlarının gelişiminde etkili olduğu belirtilmiştir (126).

PlGF, özellikle plasenta gelişiminde önemli rol oynar (127) ve ayrıca patolojik anjiyogenez süreçlerin gelişiminde etkilidir (128). PlGF, VEGFR-1'e bağlanarak VEGF-A'nın VEGFR-2'ye bağlanmasını modüle edebilir ve bu şekilde anjiyogenez üzerindeki etkisini dolaylı olarak arttırabilir (129). Ek olarak yaralanma ve enflamasyon gibi durumlarda yeni damar oluşumu sürecinde de rol oynar (130, 131).

2.4.2. VEGF Reseptörleri ve VEGF'in Etkili Olduğu Sinyal Yolakları

VEGF ailesi üyeleri, hücre yüzeyindeki belirli reseptörlere bağlanarak etkilerini gösterirler. Bu reseptörler, reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesine aittir ve VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 olarak bilinmektedir (132). Her bir reseptör anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve endotel hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde farklı roller oynamaktadır. VEGFR'lere ek olarak, VEGF sinyali nörolipinler (NRP1 ve NRP2) ve heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG'ler) gibi eş-reseptörler tarafından da modüle edilebilir (133). Nörolipin, özellikle VEGF'nin VEGFR-2'ye bağlanma afinitesini artırarak anjiyogenez düzenlenmesinde önemli rol oynar (134, 135). NRP1 endotel hücrelerde genellikle VEGFR-2 ile birlikte eksprese edilerek VEGF-A sinyalinin etkisini arttırır (135). NRP2 ise VEGFR-2 ve VEGFR-3 ile etkileşime girerek endotel hücrelerinin sağkalımını ve göçünü destekler (136). HSPG'ler ise hücre yüzeyinde ve ekstraselüler matrikste bulunur, VEGF ligandlarının VEGFR'lere

bağlanmasını kolaylaştırır ve reseptör dimerizasyonunu ve aktivasyonunu destekler (137, 138).

VEGF'in modüle ettiği sinyal yolları, endotel hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde, özellikle proliferasyon, göç, hayatta kalma ve geçirgenlik gibi süreçlerde kritik roller oynar (104, 139, 140). Bu yolların aktivasyonu, VEGF'nin spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ile sağlanır ve sonrasında bir dizi hücre içi olayı tetikler. Ana VEGF sinyal yolları RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-Akt ve PLC γ -PKC yollarıdır (141-143). Bu yolların her biri endotel hücre biyolojisi ve anjiyogenezde farklı ancak zaman zaman da birbirleriyle örtüşen fonksiyonlara sahiptir.

RAS-RAF-MEK-ERK yollarından, VEGF reseptörüne (özellikle VEGFR-2) bağlanması sonucunda aktive olan temel yollarından biridir (104). Bu yolak, endotel hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunun desteklenmesinde merkezi bir rol oynar (144). Bu yolda, VEGF VEGFR'ye bağlandığında VEGFR'nin otofosforilasyonu gerçekleştirir ve Grb2 ve SOS gibi adaptor proteinleri aktive eder (145). Bu durum, küçük bir GTPaz olan RAS'ın aktivasyonuna yol açar. Aktif RAS, sırasıyla RAF kinazı aktive eder ve RAF kinaz da MEK1/2'yi fosforile eder (145). MEK1/2 ise, hücre dışı sinyal aracılığıyla düzenlenen kinaz 1/2'yi (ERK1/2) fosfatlar (145). Ardından ERK1/2, çekirdeğe transloke olarak orada ELK1 gibi transkripsiyon faktörlerini fosforile eder ve bu durum da hücre döngüsü ilerlemesi ve proliferasyon ile ilgili genlerin ifadesini düzenler (146, 147). Bu durum endotel hücre proliferasyonunu artırarak yeni kan damarlarının oluşumuna katkı sağlar (148, 149).

PI3K-Akt yolu, endotel hücre hayatta kalması ve apoptozun engellenmesi için gereklidir. Bu yolak, ayrıca endotel hücre göçü ve nitrik oksit (NO) üretimine katkı sağlar, bu durum da vasküler geçirgenlik ve vazodilatasyonu artırır (150, 151). VEGFR'nin VEGF tarafından aktivasyonu PI3K'yi aktive eder ve ardından PI3K, PIP2'yi fosforilleyerek PIP3 oluşturur (152). PIP3, Akt için bir bağlanma yeri oluşturur ve sonrasında PDK1 tarafından fosforile edilip aktive edilir (153). Aktive Akt, BAD gibi pro-apoptotik proteinleri inhibe ederek ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik

proteinlerin aktivitesini arttırarak hücre sağkalımını destekler (154). Akt, ayrıca endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) üretimini uyarır, bu da NO seviyelerini arttırarak vazodilatasyon sağlar ve kan akışını iyileştirir (155).

PLC γ -PKC yolağı, özellikle endotel hücre göçü ve vasküler geçirgenliğin düzenlenmesinde rol oynar (104). Bu yolak aynı zamanda hücre hareketi için gerekli olan hücre iskeletinin yeniden organizasyonuna da katkı sağlar (104). Bu yolak, VEGF VEGFR'ye bağlandığında, fosfolipaz C izoform-gama (PLC γ) reseptör ile etkileşime girer ve fosforilasyon yoluyla aktive edilir (156). Aktive PLC γ , PIP2'yi inozitol trifosfat (IP3) ve diasilgliserol (DAG) olarak hidrolize eder (157). IP3, hücre içi depolardan kalsiyum salınımını tetiklerken DAG protein Kinaz C (PKC)'yi aktifler (158). Hücre içi kalsiyum seviyesindeki artış ve PKC aktivasyonu, hücre iskelet dinamiklerini düzenleyen hedef proteinlerin fosforilasyonuna yol açar (159). Bu durum, anjiyogenezde kritik bir adım olan endotel hücre göçünü artırır (159, 160). Ek olarak PKC aktivasyonu, endotel bağlantılarında VE-kaderin'i modüle ederek vasküler geçirgenliği artırır ve bu da hücrelerin ve besinlerin endotel tabakasından geçişini sağlar (161, 162).

2.5. CBD-VEGF

VEGF, özellikle doku onarımı ve rejenerasyonu süreçlerinde önemli bir biyolojik ajan olarak kabul edilmektedir. Ancak VEGF'nin doğal haliyle klinik uygulamalarında bazı ciddi zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu zorlukların en başında, VEGF'nin biyolojik yarı ömrünün oldukça kısa olması gelir (163). VEGF, dolaşımda veya doku içinde hızlı bir şekilde metabolize edilir ve etkisini göstermeden bozunur (163). Bu durum, büyüme faktörünün hedef dokuya yeterli düzeyde ulaşmasını ve yeterince uzun süre etki göstermesini zorlaştırır.

CBD-VEGF (Collagen Binding Domain-VEGF) bu sorunlara çözüm olarak geliştirilmiş bir VEGF türevidir. CBD-VEGF kolajen bağlanma bölgesi adı verilen spesifik bir bağlanma bölgesi içermektedir (164). Bu bağlanma bölgesi, CBD-VEGF'nin hedef dokularda bulunan kolajen I gibi yapısal proteinlere spesifik olarak bağlanmasını sağlar (165). Kolajen vücutta birçok dokuda, özellikle bağ dokusunda ve

doku rejenerasyonunun gerçekleştiği alanlarda bol miktarda bulunur. CBD-VEGF'nin kolajene bağlanabilme özelliği, bu büyüme faktörünün dokuya spesifik bağlanmasını sağlayarak, hedef doku içinde daha uzun süre aktif kalmasına ve biyolojik etkisini göstermesine yardımcı olur (166).

CBD-VEGF hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde VEGF'nin biyolojik aktivitesini korumasını sağlar (24, 166). CBD-VEGF'nin, doğal VEGF'ye kıyasla daha uzun süre aktif kalabilmesi, onun hedef bölgedeki etkinliğini artırır. Özellikle anjiogenez sürecinde, CBD-VEGF'nin kollajen I ile bağlanması sayesinde büyüme faktörünün lokalizasyonu ve konsantrasyonu artar. Bu da daha yoğun bir vasküler yapı oluşmasını destekler ve iyileşme süreçlerini hızlandırır (167, 168).

CBD-VEGF kolajene bağlanması yoluyla dokuda kalıcılığını artırırken, aynı zamanda büyüme faktörünün dokuya özgü metabolik bozunmaya karşı daha dirençli olur. Bu bağlanma sayesinde CBD-VEGF, vücut içinde veya hedef dokuya uygulandığında çevresel faktörlerden daha az etkilenir ve büyüme potansiyelini korur. Normal VEGF'nin aksine, CBD-VEGF'nin bu avantajı, rejenerasyon gerektiren doku iyileşmelerinde, özellikle de periferik sinir yaralanmaları gibi uzun süreli onarım süreçlerinde önemli bir katkı sağlar (169, 170).

2.6. Sinir Rejenerasyonu için ADM ve CBD-VEGF Kullanımı

ADM, özellikle doku rejenerasyonunda iskelet görevi gören bir yapı sunar ve bu özellikleri nedeniyle sinir rejenerasyonunda potansiyel olarak kullanışlı bir materyaldir (81, 171, 172). ADM'nin yapısında bol miktarda kolajen bulunur ve bu kolajen, CBD-VEGF için doğal bir hedef molekül olarak işlev görür (173).

CBD-VEGF'nin ADM ile kullanımı, ADM'nin sunduğu yapısal iskelet ile büyüme faktörünün rejenerasyon bölgesinde uzun süreli bir aktivite göstermesini sağlar. ADM'nin kolajence zengin yapısı, CBD-VEGF'nin etkinliğini artırarak rejenerasyon bölgesinde büyüme faktörünün stabilitesini ve biyolojik yararlanımını yükseltebilir. ADM, bu bağlanma sayesinde hem biyomateryalin kendisinin hem de büyüme faktörünün sinir iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerini maksimize eder. Sinir

yaralanmalarında ve defektlerinde kullanılan ADM, CBD-VEGF'nin lokal etkisini artırarak, sinir hücrelerinin büyümesi, çoğalması ve farklılaşması için uygun bir ortam hazırlayabilir (174, 175).

Sinir dokusu, kollajen ve diğer hücre dışı matriks proteinleri açısından zengin bir mikroçevre sunar. Sinir yaralanmalarında onarım süreci sırasında kolajen sentezi artar (176) ve bu da CBD-VEGF'nin bağlanması için uygun bir ortam yaratmaktadır. Bu sayede rejenerasyon bölgesinde yerel olarak yüksek konsantrasyonlarda bulunan VEGF, anjiyogenez ve hücre proliferasyonunu indükleyerek onarım sürecine katkıda bulunur (169).

Ayrıca, CBD-VEGF'nin ADM ve sinir dokusu ile kullanımı, sadece sinir rejenerasyonunu desteklemekle kalmaz, aynı zamanda ADM'nin sağladığı yapı sayesinde rejenerasyonun yönlendirilmesine de olanak tanıyabilir ve uzun sinir defektlerinin onarımında, büyüme faktörünün etkinliğini artırarak rejeneratif kapasitenin yükseltilmesine olanak tanır. ADM ve CBD-VEGF kombinasyonu, sinir hücrelerinin büyüme yönünü ve hızını artırırken, aynı zamanda vaskülogenez ve anjiyogenez gibi süreçleri de tetikleyebilir (177, 178).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ACU-HADYEK) onayı sonrası gerçekleştirildi (Tarih: 22.05.2024, Protokol onay numarası: 2024/23). Çalışmada Acıbadem Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edilen 32 adet Sprague Dawley soyu erişkin (Ağırlık= 200 – 250 gram, yaş=4-6 hafta) sıçan kullanıldı. Deney hayvanları Acıbadem Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde takip edildi. Hayvanlar her kafeste cerrahi öncesi üç ve cerrahi uygulama sonrası tek hayvan olacak şekilde, kontrollü ortamda $21,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 12 saat/12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde takip edildi. Araştırma boyunca hayvanların standart kemirgen yemine ve çeşme suyuna erişimi kısıtlanmadan sağlandı.

3.1. CBD-VEGF Üretimi

pET-28a(+)-CBD-VEGF165 genini taşıyan rekombinant *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21(DE3) suşu olan kolonileri, kanamisin (30 µg/ml) içeren besiyerinde, 37°C 'de ve 200 rpm hızında bir gece boyunca inkübe edilerek 10 mL hücre kültürü elde edildi. Bu kültür, 1/10 oranında 400 mL'lik yeni bir besiyerine aktarıldı ve ikincil kültürler oluşturuldu. İkincil kültürler, 37°C 'de $\text{OD}_{600}=0,6$ değerine ulaşana kadar inkübe edildi. $\text{OD}_{600}=0,6$ seviyesine gelindiğinde, final konsantrasyonu 0,25 mM olacak şekilde IPTG eklenerek indüksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İndüklenen hücreler, aynı koşullarda altı saat boyunca inkübe edilip, her saat alınan örneklerle ekspresyon süreci izlendi.

Ekspresyon sonrası *E. coli* BL21(DE3) hücreleri, 10.000 rpm hızında, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika süreyle santrifüj edilerek pelet formunda çöktürüldü. Hücre peletleri, 1X fosfat tamponu içinde çözüldü ve buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Ardından hücreler 64 mikron gücünde sonikasyon uygulanarak parçalandı. Bu işlem, her biri 15 saniye sonikasyon ve 15 saniye soğutma döngülerinden oluşan, toplam 2 dakika süren döngüler halinde gerçekleştirildi. Elde edilen homojenat, 4°C 'de 15.000 rpm hızında 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Homojenat hücre kalıntılarından uzaklaştırıldı. Daha berrak süpernetant elde edildi. Süpernetant protein saflaştırma işlemi için -80°C 'de

saklandı. His-Tag ile işaretlenmiş proteinler %10'luk SDS-PAGE yöntemi kullanılarak analiz edildi ve görüntüldü.

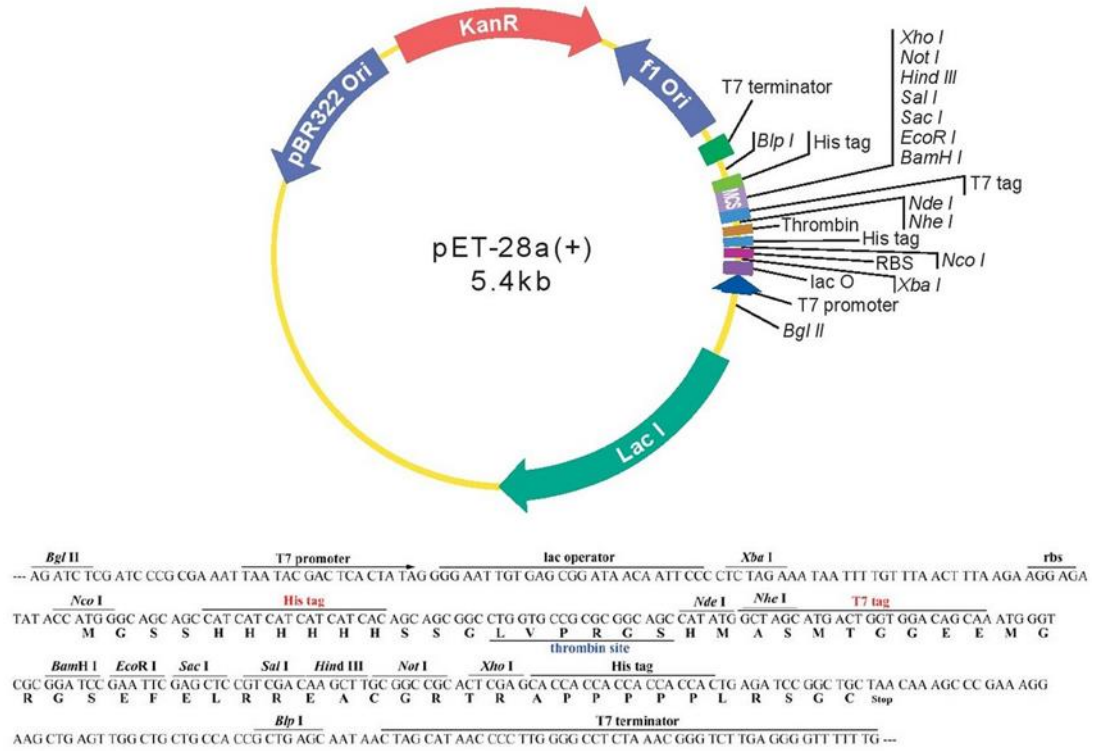
3.1.1. Rekombinant His-CBD-VEGF165 Füzyon Proteinin Saflaştırılması

Amino terminalinde 6xHis etiketi bulunan CBD-VEGF165 proteinini içeren hücre lizatları, 10 mL kapasiteli HisPur-Nitrilotriasetik asit (HisPur-NTA) Resin kolonu (Thermofisher Scientific, ABD) kullanılarak ilgi kromatografisi (IMAC) yöntemiyle tek bir adımda saflaştırıldı. Hücre lizatı kolona yüklendikten sonra, HisPur ile 6xHis-CBD-VEGF165 proteinlerinin bağlanabilmesi için 30 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından kolon, yaklaşık 15 ml pH 7,5 Tris-HCl tampon çözeltisi (20m M Tris-HCL, 150 mM NaCl) ile yıkandı. Kolon yıkanma adımıyla kolona tutunamayan biyomoleküller uzaklaştırıldıktan sonra, 10 mM imidazol içeren 100 mL pH 7,5 Tris-HCl (20m M Tris-HCL, 150 mM NaCl) tamponuyla son bir defa yıkandı. Toplamda 200 mM imidazole içeren Tris-HCl/NaCl pH=7,5 tamponu ile 6xHis-6xHis-CBD-VEGF165 protein fraksiyonları elde edildi. Bu fraksiyonlar %10'luk SDS-PAGE yöntemiyle analiz edildi. Saflaştırılan proteinden imidazolün uzaklaştırılması amacıyla içeriğinde hiç imidazol olmayan pH 7,5 Tris-HCl (20m M Tris-HCL, 150 mM NaCl) tamponuna karşı diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Diyaliz esnasında tampon dört saatte bir değiştirildi ve örnek soğuk bir ortamda bir gece boyunca bekletildi.

3.1.2 Saflaştırılmış Rekombinant His-CBD-VEGF165 Füzyon Proteinin His-Tag Bölgesinin Ayrılması

Saflaştırılan His-CBD-VEGF165 proteinlerinin 6xHis etiketli kısmının ayrılması için HisPur-NTA kolonuna yüklenip LVPRGS (Lösin, Valin, Prolin, Arjinin, Glisin, Serin) amino asit tanıma bölgesini hedefleyen trombin enzimiyle muamele edildi (Şekil 2). HisPur-NTA kolonu, %1 Triton X-100 içeren pH 7,5 Tris-HCl (20m M Tris-HCL, 150 mM NaCl), tampon çözeltisi ile ekülibre edildikten sonra saflaştırılan 6xHis etiketi taşıyan CBD-VEGF165 protein kolona yüklendi. Proteinlerin bağlanması amacıyla kolon 30 dakika inkübe edildi ve ardından kolon,

%1 Triton X-100 içeren pH 7,5 Tris-HCl (20m M Tris-HCL, 150 mM NaCl) tamponuyla yıkandı. Yıkama sonrasında kolona bağlanmış olan 6xHis-füzyon proteini, 6xHis bölgesindeki LVPRGS (Lösin, Valin, Prolin, Arjinin, Glisin, Serin) tanıma bölgesinden kesilmesi için 10 U trombin enzimi ihtiva eden pH 7,5 Tris-HCl (20m M Tris-HCL, 150 mM NaCl) tamponu kolona aktarıldı. Kolona Trombin enzimi ilave edildikten sonra, kesim reaksiyonunun gerçekleşmesi amacıyla 25°C sıcaklığında kolon iki saat bekletildi ve kesim reaksiyonu esnasında pipetaj yapıldı. Serbest proteinlerin ayrılması amacıyla kolon 4°C’de bir gece bekletildi. Ayırma işlemi sonucunda elde edilen protein fraksiyonları, 280 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlendi. Saf olarak elde edilen proteinler %10’luk SDS-PAGE’de görüntülenerek ileri deneylerde kullanılmak amacıyla -80°C’de saklandı.



Şekil 2. Ekspresyon vektörü pET-28a(+) ve His-Tag kesim bölgesi olan trombin enziminin lokasyonu.

3.1.3. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Tablo 2.1’da belirtildiği şekilde, SDS-PAGE yöntemi (Laemmli 1970) kullanılarak %5 yükleme jeli ve %10 ayırma jeli hazırlandı (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Enzim örnekleri, protein yükleme boyası (%1 SDS içeren 2X protein loading dye) ile karıştırıldıktan sonra 100°C’de 5 dakika boyunca inkübe edildi. Aynı jele saflaştırılan proteinlerin moleküler ağırlığının tespit edilmesi amacıyla protein belirteci (Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen) yüklendi. Elektroforez işlemi 100 V’da gerçekleştirildi ve proteinler Coomassie Brilliant Blue-R250 boyası içeren boyama solüsyonu ile boyandı. Protein bantlarını jelde daha net görüntüleyebilmek için boya uzaklaştırma (destain) solüsyonu kullanılarak protein batları belirginleşir. Moleküler ağırlıkları bilinen referans protein bantları ile karşılaştırılarak saflaştırılan proteinler belirlenir.

Tablo 2.1. Elektroforez (SDS-PAGE) deneyinde kullanılan bileşenler (Laemmli, 1970).

Reaksiyon Bileşenleri	%10 Yürütme Jeli	%5 Yükleme Jeli
dH ₂ O	3,3 ml	1,4 ml
30% akrilamid/bis- akrilamid, 37.5:1 (2.7% crosslinker) solusyon	4,0 ml	330 µl
1.5 M Tris Tamponu (pH 8,8)	2,5 ml	-
1 M Tris Tmaponu (pH 6,8)	-	250 µl

%10 SDS	100 µl	20 µl
%10 amonyum persülfat	20 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl

3.1.4. BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Miktarı Tayini

İleri deneylerde kullanmak üzere, Bicinchoninic asit (BCA) yöntemiyle saflaştırılmış protein miktarı belirlenir. Protein örneklerinden 5 µL alınarak 96 kuyucuklu mikropalakaya yerleştirilir. Her bir kuyucuğa, taze hazırlanmış 1:50 oranında Solüsyon A ile Solüsyon B karışımı eklendi. Toplamda reaksiyon hacmi 200 µL olacak şekilde eklemeler yapılır. Standart olarak farklı konsantrasyonda sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Örnekler, 37°C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra, mikropalaka okuyucusu (Bio-Tek, Synergy) ile 490 nm dalga boyunda absorbands değerleri ölçüldü. BSA standart çözeltilerinin konsantrasyon ve absorbands değerlerine göre oluşturulan standart grafiğin eğimi hesaplanarak konsantrasyonu bilinmeyen proteinlerin absorbands değerine göre konsantrasyonlar hesaplandı.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlar rastgele her grupta sekiz hayvan olacak şekilde (ilk 8 sıçanın sol alt ekstremitesi Kontrol, sağ alt ekstremitesi Sham grubu olacak şekilde) beş gruba ayrıldı.(Tablo2.2) Gruplardaki hayvanların sol bacaklarına hiçbir işlem uygulanmadığından kas ağırlık hesaplamalarında kendi kontrol grupları olarak kullanıldı. Elektrofizyolojik analizlerde tüm gruplar ayrı ayrı değerlendirildi.

Tablo 2.2. Deney grupları hayvanlar.

Gruplar	Uygulamalar
Kontrol	Sol bacağı herhangi bir işlem yapılmayıp sağlıklı

		kontrol grubu oluşturuldu
	Sham	Sağ siyatik sinir lokalizasyonu bölgesinde ise cilt, cilt altı ve kas diseksiyonu yapıp diseksiyon dışında müdahale gerçekleştirilmedi
	Greft	Sağ taraf siyatik sinirden 10 mm'lik greft alınıp aynı bölgedeki defekt alanını onarmak amacıyla greft proksimal ve distal uca koapte edildi
Siyatik sinir grefti	ADM	Sağ taraf siyatik sinirden 10 mm'lik greft alınıp aynı bölgedeki defekt alanını onarmak amacıyla greft proksimal ve distal uca koapte edildi ve ardından greft bölgesi üzerine ADM sarıldı ve üzerine NaCl (0,9%) uygulandı
	ADM + CBD-VEGF	Sağ taraf siyatik sinirden 10 mm'lik greft alınıp aynı bölgedeki defekt alanını onarmak amacıyla greft proksimal ve distal uca koapte edildi ve ardından greft bölgesi üzerine ADM sarıldı ve üzerine CBD-VEGF uygulandı

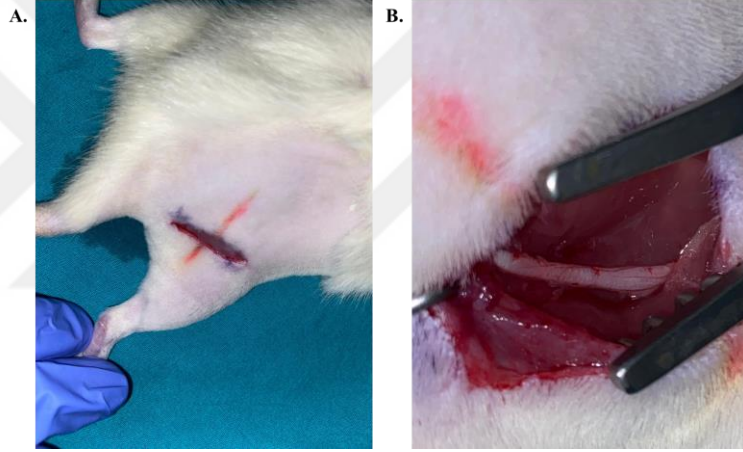
ADM: ASELÜLER dermal matriks; CBD-VEGF: Kolajen bağlanma bölgesi içeren vasküler endotelyal büyüme faktörü

3.3. Deney Prosedürü

Sıçan gruplarına analjezi sağlanması amacıyla işlemden 1 gün önce, operasyon günü ve operasyon sonrası 1. günde 1mg/kg meloksikam (Bavet, 444800) subkutan yolla uygulandı. Operasyon bölgesi tıraşlanıp dezenfekte edildikten sonra Ketamin (Ketalar, 100 mg/kg) ve Ksilazin (Rompun, 10 mg/kg) ile genel anestezi sağlanarak sıçanlar prone pozisyona çevrildi (**Şekil 3**). Ardından sağ tarafta femura paralel gluteal cilt insizyonu yapıp (**Şekil 4A**) hemostaz sonrası kas diseksiyonunu takiben siyatik sinir ekspozite edildi (**Şekil 4B**). 2. Grupta (Sham) sağ tarafa sadece buraya kadar olan işlemler uygulandı (179).



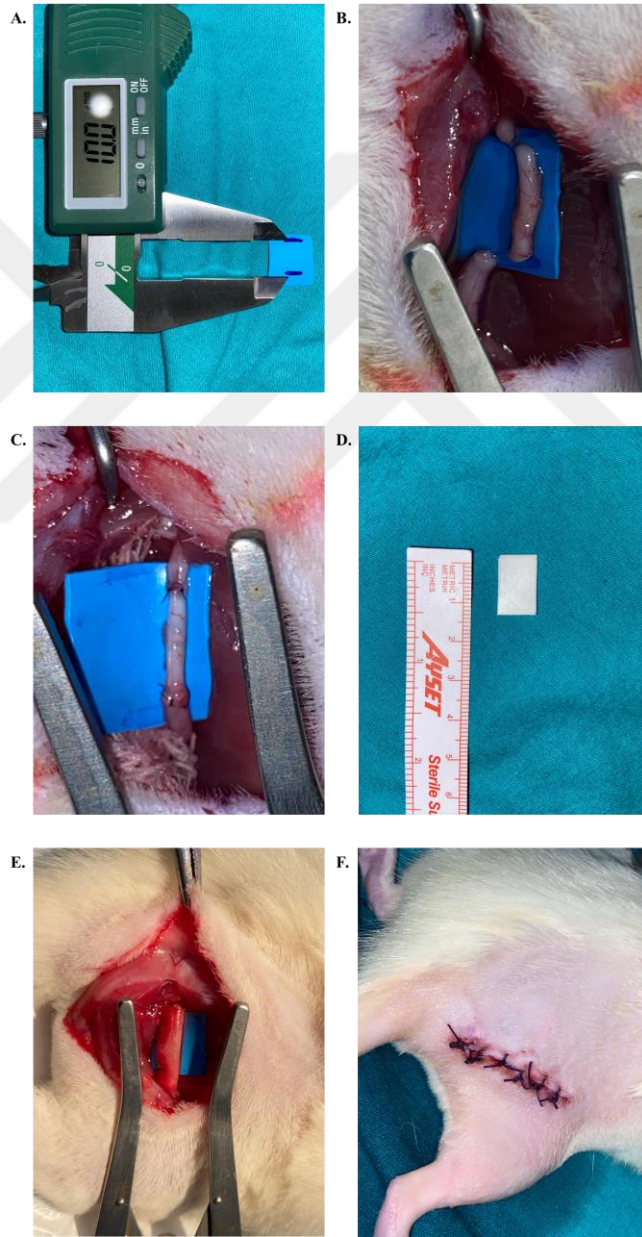
Şekil 3. Prone pozisyonda sağ ayak cerrahi insizyon sahasının tıraşlanmış hali.



Şekil 4. (A) Gluteal kıvrıma paralel insizyon hattı. **(B)** Cilt kesisi sonrası kas diseksiyonunu takiben siyatik sinire ulaşılması.

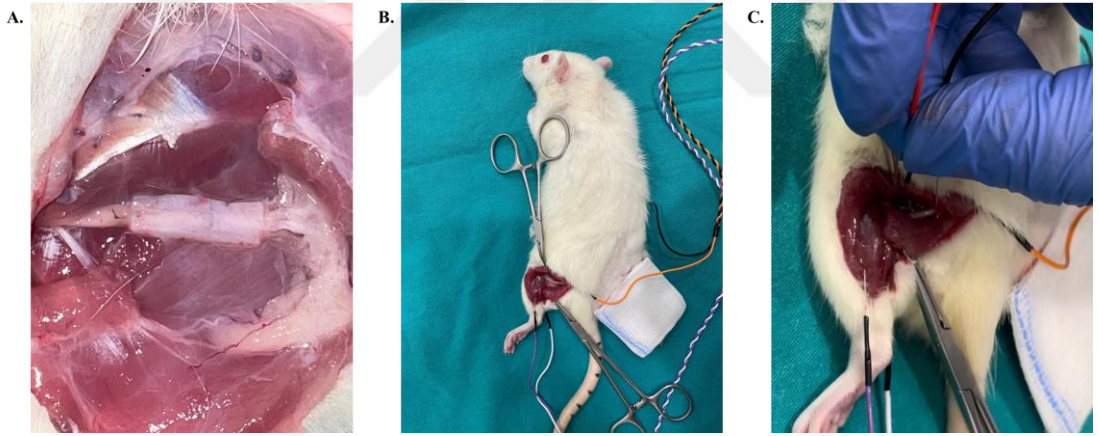
Sinir, proksimalde siyatik çentikten distalde bifurkasyon seviyesinden ekspozе edildi. Mikroskop altında 10 mm’lik sinir segmenti kaliper ile işaretlenip eksize edildi (**Şekil 5A ve B**). Elde edilen sinir grefti aynı bölgeye distalde ve proksimalde üçer adet olacak şekilde naylon 10-0 mikrosütür ile dikildi (**Şekil 5C**). 3.gruba sadece bu işlemler uygulanıp hemostaz sağlandıktan sonra cilt 3-0 ipek sütür ile dikilip pansuman uygulandı. Ardından 15x10x1 mm boyutunda sığır kaynaklı aselüler dermal matriks (Matriderm®) siniri 360° saracak şekilde şekillendirilip iki adet 8-0 naylon

sütür ile uzun kenarları dikilip tüp formu stabilize edildi (Şekil 5D ve E). Bu iki sütür ADM'nin her iki kısa kenarına 3 mm mesafede olacak şekilde konumlandırıldı (180). Bu prosedür 4 ve 5. gruplarda aynı şekilde uygulandı. Ardından 4. grupta ADM üzerine CBD-VEGF ile aynı hacimde NaCl (0,9%) sıkılıp işlem tamamlanıp hemostaz sağlandıktan sonra cilt 3-0 ipek sütür ile dikilip uygun pansuman yapıldı. 5. gruba ADM ile onarım yapılan bölgeye cilt dikilmeden önce 11,12 µg CBD-VEGF sıkılıp ardından cilt dikildi (Şekil 5F).

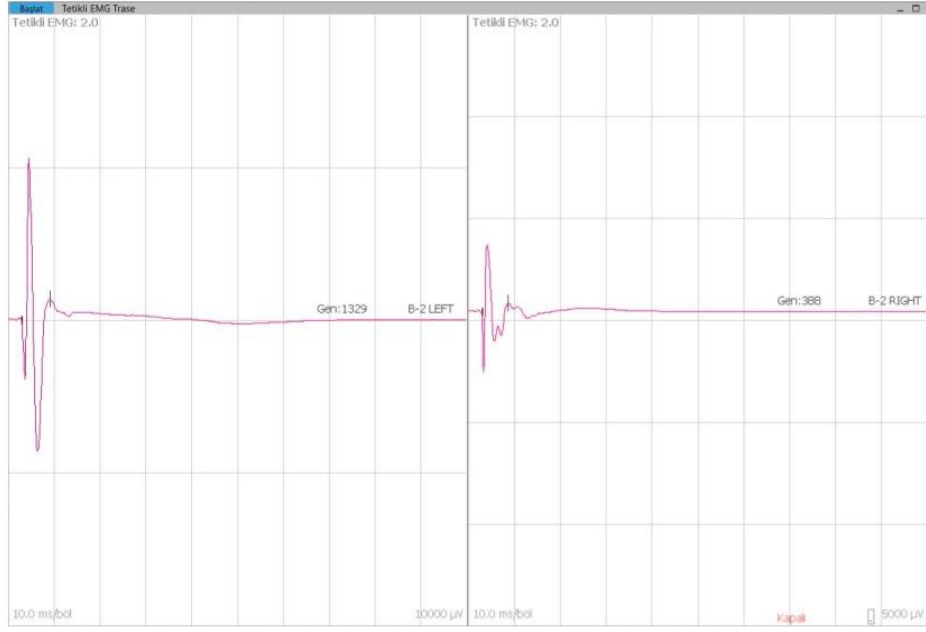


Şekil 5. (A) Kaliper yardımıyla 10 mm boyutunda fon üzerinde ölçülen ve sinir grefti kesisi için oluşturulan template. **(B)** Siyatik sinir gövdesinden (siyatik çentik-siyatik trifikasyon arası) 10 mm boyutunda sinir grefti eldesi. **(C)** Elde edilen sinir greftinin aynı bölgeye tekrar koaptasyonu. **(D)** 15x10x1 mm boyutunda Aselüler dermal matriks (Matriderm) hazırlanması **(E)** Sinir grefti üzerine Aselüler dermal matriks (Matriderm) sarılması ve fiksasyonu. **(F)** Cilt sütürasyonu.

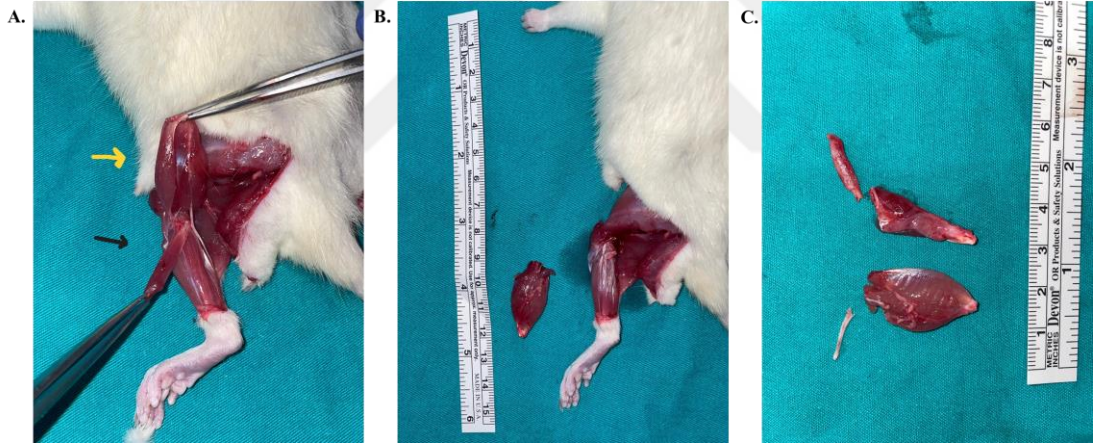
Sıçanlar sekiz hafta takip edildikten sonra daha önce bahsedilen uygun analjezi protokolü sağlanıp ketamin ve ksilazin altında genel anestezi uygulanıp 1. gruptaki sıçanların her iki tarafına, diğer gruplarda ise sağ tarafa siyatik sinir-gastroknemius kas elektrofizyolojik değerlendirmesi yapıldı (**Şekil 6** ve 7) (181, 182). Elektrofizyolojik inceleme sonrası her iki tarafta gastroknemius kas liflerine paralel cilt insizyonu uygulanıp femurdan ve aşıl tendon distalinden kas serbestlenerek eksize edilip hassas tartıyla tartıldı (**Şekil 8**), incelenen taraf kütlesi kontrol sol taraf kütlesine bölünüp 100 ile çarpılarak gastroknemius kas ağırlık oranı hesaplandı (180).



Şekil 6. (A) Operasyondan 8 hafta sonra EMG öncesi ADM ve siyatik sinir greftinin görüntüsü. **(B)** Elektrofizyolojik inceleme – Siyatik sinir ve gastrokinemius kas incelemesi. **(C)** Elektrofizyolojik inceleme – uyarı anı.



Şekil 7. Elektrofizyolojik inceleme analizi.



Şekil 8. (A) Gastrokinemius (sarı ok, yukarıda) ve soleus (siyah ok,aşağıda) eksizyonu. (B) Gastrokinemius kas eksizyonu. (C) Sağlıklı taraf siyatik sinir ve gastrokinemius kası (sol taraf) ve işlem uygulanan siyatik sinir ve gastrokinemius kası (sağ taraf).

Ardından gastroknemius kasındaki atrofik değişiklikler histopatolojik olarak hemotoksilen & eozin (H&E), Masson's trikrom boyamalarıyla incelendi. Siyatik sinir greftinde myelinli akson rejenerasyonu ışık mikroskopu altında luxol fast blue (LFB)

boymasıyla değerlendirildi. Ek olarak S-100 protein ifadesi immünohistokimyasal olarak değerlendirildi (183).

3.4. Sakrifikasyon, Örneklerin Alınması ve Histolojik Analizler

Tüm deney gruplarına ait hayvanlardan alınan gastroknemius kas ve siyatik sinir dokuları %10 nötral tamponlu formaldehit içerisinde oda sıcaklığında fıkse edildi. Örnekler daha sonra artan (%70, %80, %96 ve %100) etanol serisinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilen içinde şeffaflaştırıldı, sıvı parafinde emdirildi ve parafine gömüldü. Bloklardan döner mikrotom (Leica RM2125 RTS) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon 58°C etüvde iki saatte gerçekleştirildi ve ardından kas ve sinir dokularının histopatolojik değerlendirmesi için H&E boyasıyla siyatik sinirde miyelin kılıf ve akson görüntülemesi için LFB ile boyandı. Preparatlar kamera eklentili (Olympus DP 72, Tokyo, Japonya) ışık mikroskopta (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) değerlendirildi ve bilgisayar programı aracılığıyla fotoğraflar alındı. Tüm dokulara ait kesitlerde beş benzer bölge x400 büyültme ile değerlendirildi. Kas dokuları (i) kas lifi organizasyonunun bozulması/hasarlı kas lifi, (ii) bağ doku bileşenlerinin artışı, (iii) inflamatuvar hücre infiltrasyonu parametreleri üzerinden semikantitatif olarak 0 ile 3 skalasında (0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli) skorlandı (184, 185). Siyatik sinir (i) perinöryum kalınlaşması, (ii) akson ve miyelin kılıf dejenerasyonu (akson şişkinliği), (iii) fibrotik doku varlığı, (iv) inflamasyon ve (v) ödem parametreleri üzerinden semikantitatif olarak 0 ile 3 skalasında (0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli) skorlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması istatistiksel olarak analiz edildi.

3.5. İmmünohistokimyasal Analizler

Tüm gruplara ait kesitler 58°C etüvde iki saat ve ksilende 45 dakika deparafinize edildi. Ardından etanol serisinde (%100, %96, %80, %70) rehidrate edildi ve distile suda yıkandı. Örnekler, antijen geri kazanımı için mikrodalgada sitrat tamponunda (ph: 6.0) (Bio-Optica, San Faustino, İtalya) tutuldu ve ardından oda sıcaklığında soğutuldu. %3 hidrojen peroksit ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi ve kesitler fosfat tamponlu salinde (PBS) 3 defa yıkandı. Non-spesifik

reaksiyonu engellemek için örnekler 10 dakika oda ısısında bloklama solüsyonunda inkübe edildi. Daha sonra, solüsyon yıkama yapılmadan uzaklaştırıldı. Schwann hücrelerinin değerlendirilmesi için S-100 (Leica, cat. no: PA0031, Germany) primer antikor 1:200 dilüsyonda damlatıldı ve bir gece +4 °C de inkübe edildi. Ertesi gün 3 kez PBS ile yıkanan kesitlere, sensitek HRP (Anti-polyvalent) kit (ScyTek, cat. no: SHP125, USA) üreticinin protokolüne göre uygulanarak biyotinli sekonder antikor damlatıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından kesitler PBS ile yıkandı ve Streptavidin/HRP damlatılarak 20 dakika beklendi. Kromojenik reaksiyon için örnekler diamimobenzidine (DAB) (ScyTek, cat. No: ACK500, USA) ile 5 dakika boyandı. Zemin boyaması için örnekler Harris hematoxilen ile bir dakika boyandı ve ardından distile suda 5 dakika yıkanarak entellan ile kapatıldı. Dokulardaki S-100 immunoreaktivitesi kamera eklentili ışık mikroskopta (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) değerlendirildi ve reaksiyon gözlenen alanlardan bilgisayar programı aracılığıyla fotoğraflar alındı. Ekspresyon yoğunlukları için negatif (0), zayıf (1), orta (2) ve şiddetli (3) olmak üzere tüm örneklerle yarı kantitatif skorlama yapıldı. Gruplara ait ortalama değerler istatistiksel olarak analiz edildi.

3.6. EMG – Elektrofizyolojik İncelemeler

EMG ilk operasyondan 8 hafta sonra Acıbadem üniversitesi, DEHAM elektrofizyoloji laboratuvarında Netus marka EMG cihazı ile yapıldı. Deneklere işlem öncesi 1mg/kg Ketamin yapıldı. Kas gevşetici yapılmadı İlk işlem alanının povidon iyodin ile temizlenmesinin ardından önceki insizyon hattından girilerek cilt altı plan geçildikten sonra biceps kasına ulaşıldı. Kas diseke edildikten sonra siyatik sinire ulaşıldı. Kayıt elektrotlarından olan aktif elektrot gastrokinemius kasının içine, referans elektrot ise kasın tendonuna yerleştirildi. Stimülatör elektrot ise siyatik sinir çentiğine yakın konumlandırıldı. Karna ise toprak elektrot yerleştirildi. Bu işlemlerin ardından, 2 mA şiddetinde ve belirli bir voltaj ile stimulus verilerek sinirde meydana gelen aksiyon potansiyellerine bakılarak mV olarak bileşik kas aksiyon potansiyeli (Compound Muscle Action Potential-CMAP) değerleri ve latans süreleri ölçüldü.

3.7. Gastroknemius Kas Ağırlık Oranı

EMG işlemi sonlandıktan sonra her iki bacağı gastroknemius kası liflerine paralel şekilde uzunlamasına kesi yapıldı. Ardından kas femoral origosundan aşil tendonuna kadar diseke edildi. Soleus kası ayrı olarak rezeke edilip hesaplamaya dahil edilmedi. Takiben gastroknemius kası eksize edilip hassas tartıyla ölçüm yapıldı. Sonuç kontrol sağlam bacak gastroknemius ağırlığıyla karşılaştırıldı. Gastroknemius ağırlık oranı “*Gastrokinemius ağırlık oranı = (İncelenen kas kütlesi/Karşı taraf sağlam kas kütlesi) x 100*” formülüyle hesaplandı

3.8. İstatistiksel Analiz

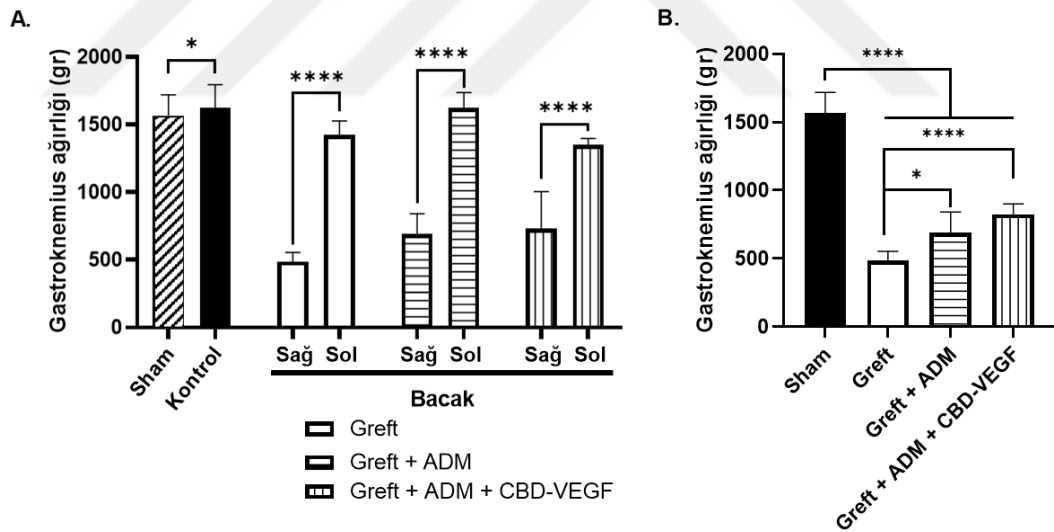
Çalışmadaki her grupta yer alan hayvan sayısını belirleyebilmek “resource equation” yöntemi kullanıldı (186, 187). Değişkenlerin normal dağılımlı olduğu durumda, “resourceequation” yöntemine göre gerekli örneklem büyüklüğü $10/k + 1$ (k = grup sayısı) ile $20/k + 1$ arasındadır (188). 10 ve 20’nin grup sayısı olan 4’e bölünmesi ile çıkan değerlere 1 eklendiğinde her grupta 4-6 arası hayvan olması gerektiği bulunmaktadır. Ağır cerrahi işlemlerde %20 kayıp oranı olduğundan her grupta olması gereken hayvan sayısı 8 olarak belirlendi.

Verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism (versiyon 8.0; GraphPad Software, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Aykırı değerler (uç değerler) ROUT yöntemiyle ($Q=1$) ile belirlendi (189). Normal dağılım gösteren verilerin analizleri parametrik, göstermeyen verilerin analizleri parametrik olmayan testlerle gerçekleştirildi. Grup içi karşılaştırmalar bağımlı örneklem t testi, gruplar arası verilerin analizleri normal dağılım gösteren verilerde tek yönlü varyans analizini takiben Tukey’in çoklu karşılaştırma testi ile, göstermeyen verilerin analizleri Kruskal-Wallis testini takiben Dunn’ın çoklu karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (s.s.) olarak ifade edildi. $P<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra gastroknemius kasları eksize edildi ve tartıldı. Kas ağırlıkları değerlendirildiğinde, Kontrol grubuna kıyasla Sham operasyon grubunda gastroknemius kas ağırlığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Şekil 9A, $p<0,05$). Bununla birlikte diğer tüm gruplarda sol bacak gastroknemius kası ağırlıkları siyatik sinir hasarı verilen sağ bacak gastroknemius kası ağırlıklarına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 9A, $p<0,0001$). Ek olarak gastroknemius kas ağırlıkları siyatik sinir hasarı verilen tüm gruplarda Sham opere gruba kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. (Şekil 9B, $p<0,0001$).

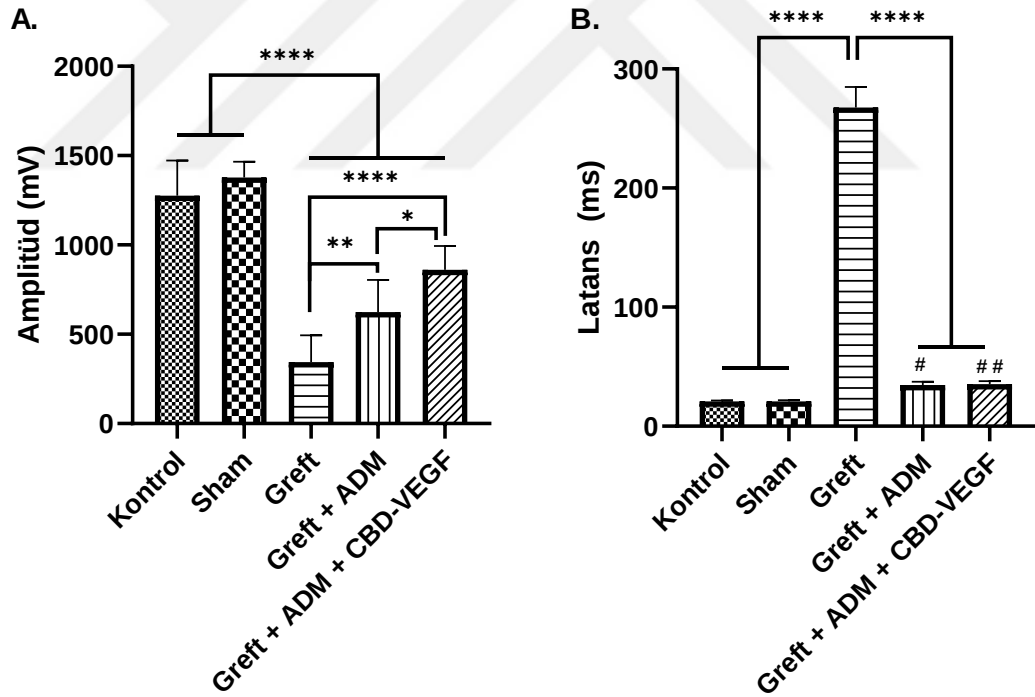
Yalnızca sinir grefti uygulanan grupta gastroknemius kası ağırlığı hem ADM hem de ADM + CBD-VEGF grubu hayvanların kas ağırlıklarına kıyasla düşük bulunmuş olup (Şekil 9B, sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,0001$), ADM ve ADM + CBD-VEGF grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 9B).



Şekil 9. (A) Sham ve kontrol gruplarının gastroknemius kası ağırlıkları ve tedavi gruplarının sağ ve sol bacak gastroknemius kası ağırlıkları. (B) Grupların siyatik sinir hasarı verilen bacaklarındaki gastroknemius kası ağırlıkları (* $p<0,05$, **** $p<0,0001$).

Grupların EMG aktiviteleri incelendiğinde, kontrol ve sham gruplarına kıyasla EMG amplitüd seviyelerinin sinir grefti uygulanan tüm gruplarda anlamlı olarak düştüğü (Şekil 10A, $p<0,0001$), greft + ADM ve greft + ADM + CBD-VEGF gruplarında ise yalnızca greft grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldiği gözlemlendi (Şekil 10A, sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,0001$). Ek olarak amplitüd değerleri greft + ADM + CBD-VEGF grubunda greft + ADM kıyasla anlamlı olarak daha yüksek gözlemlendi (Şekil 10A, $p<0,05$).

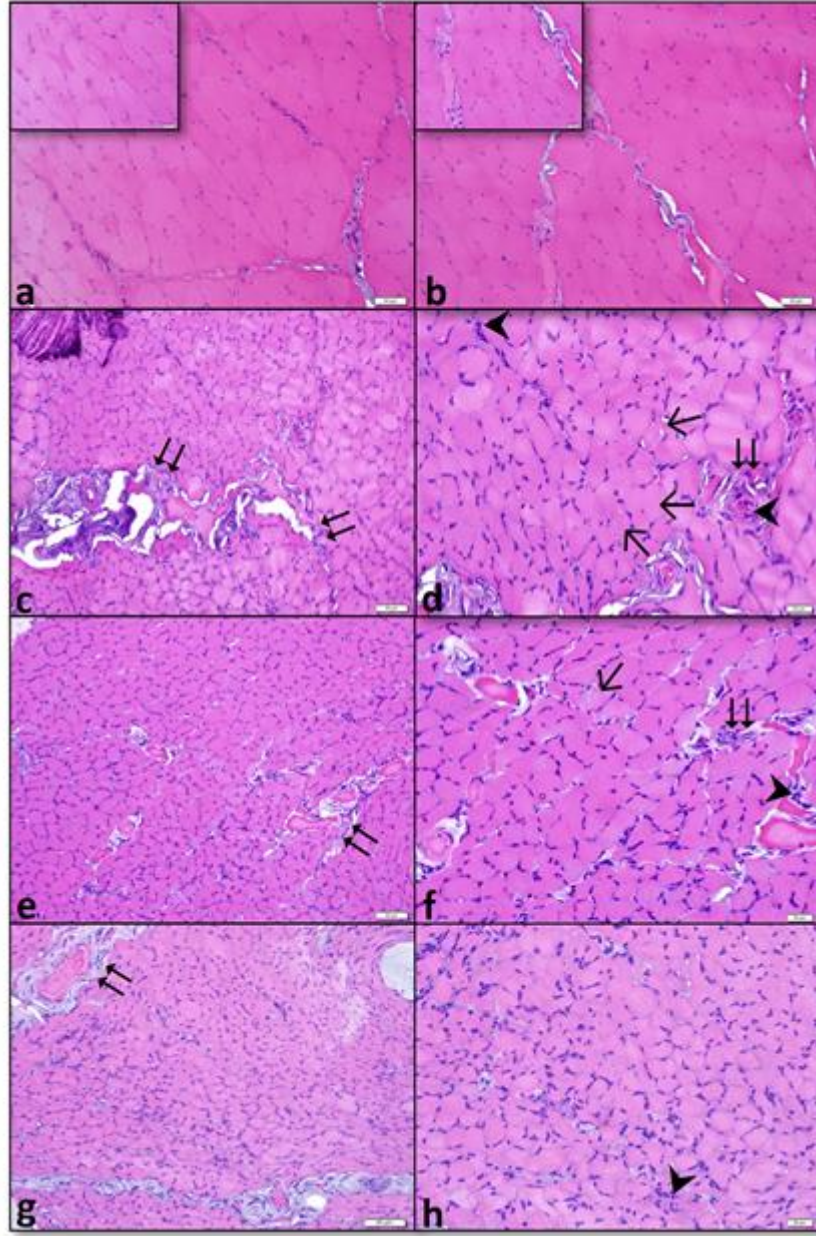
EMG latans periyodu süreleri incelendiğinde, yalnızca greft grubundaki latans diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı olarak yüksek gözlenirken (Şekil 10B, $p<0,0001$), greft + ADM ve greft + ADM + CBD-VEGF gruplarının latans süresi kontrol ve sham gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 10B, sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,01$).



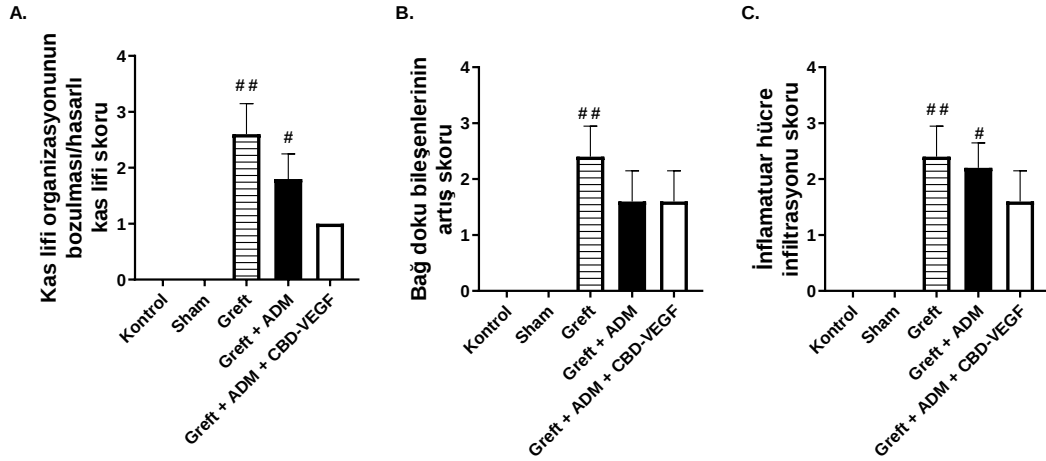
Şekil 10. Grupların EMG aktivitesi sonuçları. **(A)** Amplitüd (mV). **(B)** Latans (ms). (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$, kontrol ve sham gruplarına kıyasla # $p<0,05$ ve # $p<0,01$).

Gastroknemius kasının ışık mikroskopik değerlendirmesinde kontrol (**Şekil 11a**) ve sham (**Şekil 11b**) grubunda perimisyum, endomisyum ve periferik olarak yerleştirilmiş çekirdekleri ile kas lifleri intakt olarak izlenmiştir. Siyatik sinir grefti yapılan grupta düzensiz ve azalmış sitoplazmik boyutlara sahip hasarlı kas lifleri, perimisyum ve endomisyumda (bağ doku bileşenlerinde) artış ve orta düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlemlenmiştir (**Şekil 11c** ve **d**). Siyatik sinir grefti + ADM grubunda hasarlı liflerin bir önceki gruba göre azaldığı, kas lifi sitoplazmik boyutlarındaki düzensizliğin sürdüğü, bağ doku bileşenlerinde hafif azalma olduğu ve inflamasyonunun sürdüğü izlenmiştir (**Şekil 11e** ve **f**). Siyatik sinir grefti + ADM + CBD-VEGF grubunda hasarlı liflerin diğer gruplara karşın belirgin olarak azaldığı, perimisyumun bir önceki gruba benzer olduğu ve inflamasyonun hafif ile orta şiddette sürdüğü belirlenmiştir (**Şekil 11g** ve **h**).

Bunlara ek olarak kas lifi organizasyonun bozulma/hasarlı kas lifi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu skorları hem greft hem de greft + ADM gruplarında kontrol ve sham gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (**Şekil 12A** ve **C**, sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,01$). Bağ doku bileşenlerinin artış skoru ise greft grubunda sham ve kontrol gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (**Şekil 12B**, $p<0,01$).



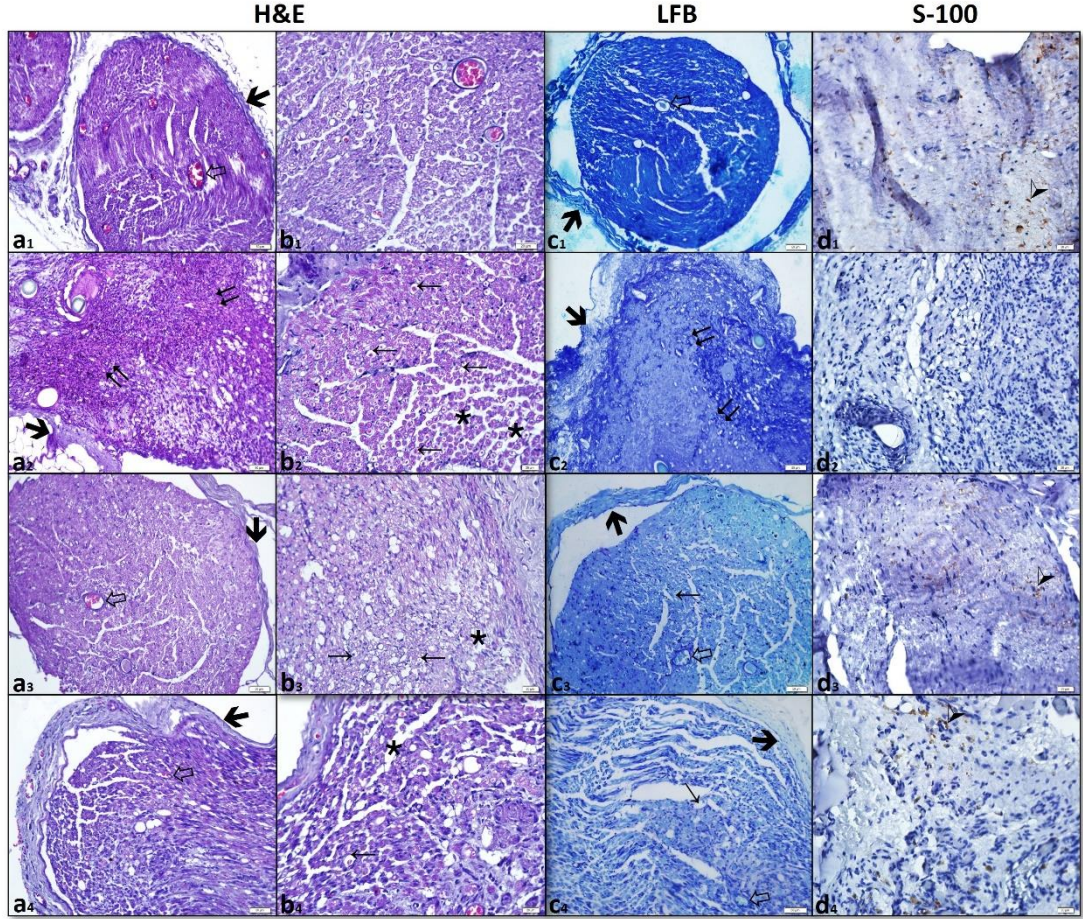
Şekil 11. Hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması ile **(a)** kontrol, **(b)** sham, **(c, d)** greft, **(e, f)** greft + ADM ve **(g, h)** greft + ADM + CBD-VEGF gruplarına ait gastrocnemius kasının ışık mikroskopik değerlendirmesinde; hasarlı kas lifi (↓), perimisyum (⇓) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (▲) görülmektedir. (Ölçekler: a, b, c, e, g: 50 µm; a inset, b inset, d, f, h: 20 µm.)



Şekil 12. (A) Kas lifi organizasyonunun bozulma/hasarlı kas lifi skoru, **(B)** bağ doku bileşenlerinin artış skoru ve **(C)** inflamatuvar hücre infiltrasyonu skoru. (Kontrol ve sham gruplarına kıyasla [#] $p < 0,05$ ve ^{##} $p < 0,01$).

Siyatik sinirin H&E ve LFB boyamasının ışık mikroskopik değerlendirmesinde kontrol ve sham gruplarında perinöryum, endonöryum, akson ve miyelin kılıf, Schwann hücre çekirdekleri intakt yapıda gözlenmiştir (**Şekil 13a₁,c₁**). Siyatik sinir grefti grubunda yoğun merkezi fibrotik doku varlığı ile orta düzeyde inflamasyon ve perinöryumda fibrotik kalınlaşma dikkati çekmiştir (**Şekil 13a₂, c₂**). Aynı gruba ait aksonlarda şişme, miyelin kılıf kaybı ve ödem belirgindir (**Şekil 13b₂**). Siyatik sinir grefti + ADM fibrotik doku miktarında ve perinöryum kalınlığında gerileme ile birlikte inflamasyonun hafif azalarak sürdüğü görülmüştür (**Şekil 13a₃, c₃**). Akson ve miyelin kılıf dejenerasyonunun orta düzeyde sürdüğü, ödemin azaldığı ve endonöral damar duvarında kalınlaşma (endotelyal hiperplazi) izlenmiştir (**Şekil 13b₃**). Siyatik sinir grefti + ADM + CBD-VEGF grubunda akson ve miyelin kılıf dejenerasyonunun, fibrotik doku ve inflamasyonun belirgin olarak azaldığı, ödem ve perinöryal kalınlaşmanın önceki gruba benzer olarak sürdüğü tespit edilmiştir (**Şekil 13a₄-c₄**). Sinir dokularına yapılan S-100 immunohistokimyasal boyamasında kontrol ve sham gruplarına ait Schwann hücre sitoplazmalarında benzer olarak yoğun immunoreaktivite izlenirken (**Şekil 13₁**) siyatik sinir grefti grubunda tutulum çok zayıftı (**Şekil 13₂**). Siyatik sinir grefti + ADM grubunda immünreaktivitenin artarak

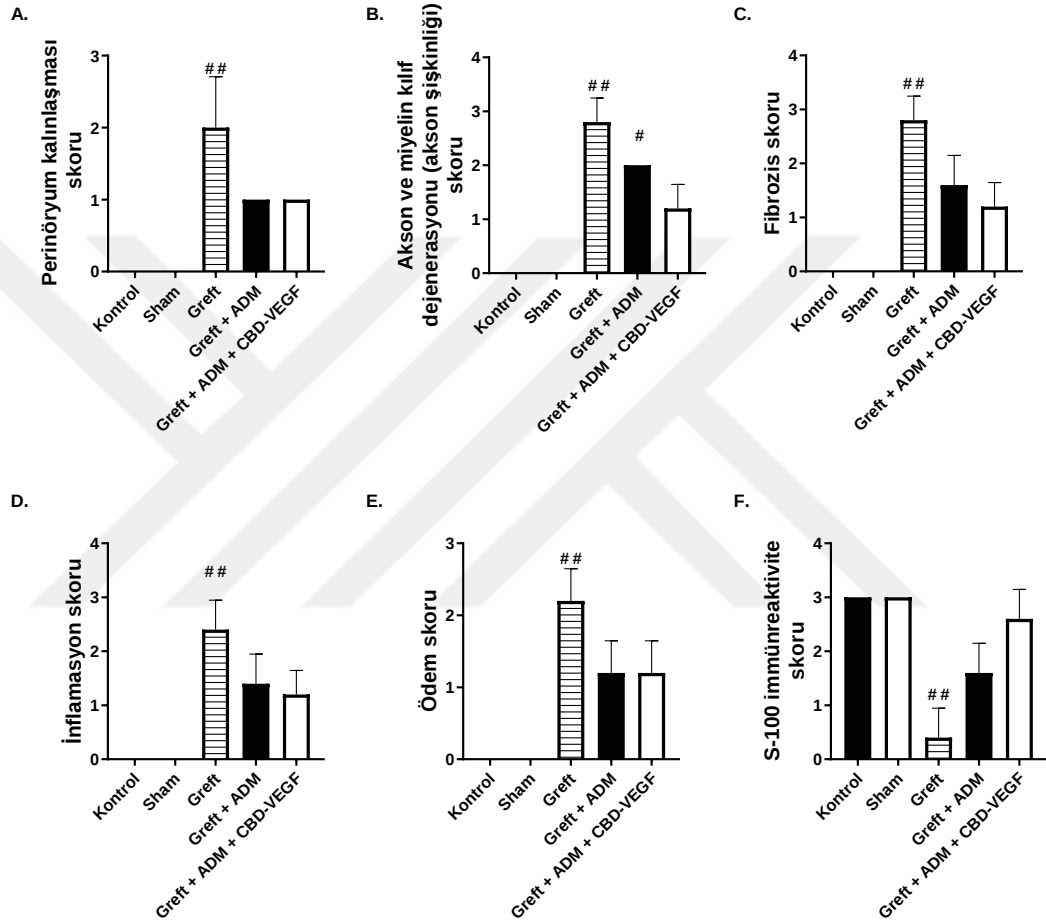
orta düzeyde olduğu (Şekil 13₃) ve siyatik sinir grefti + ADM + CBD-VEGF grubunda kontrol grubuna benzer olarak ortadan şiddetliye değişen tutulum olduğu saptandı (Şekil 13₄).



Şekil 13. (a₁, c₁, d₁) Kontrol, (b₁) sham, (a₂-d₂) siyatik sinir grefti, (a₃-d₃) siyatik sinir grefti + ADM, ve (a₄-d₄) siyatik sinir grefti + ADM + CBD-VEGF, gruplarına ait siyatik sinirin H&E, luxol fast blue (LFB) ve S-100 boyaması. Perinöryum (↑), kan damarı (⇒), akson ve miyelin kılıf dejenerasyonu (↓), fibrotik doku (⇓), ödem (*), S-100 immunreaktivitesi (✓) görülmektedir. (Ölçekler: a₁-4, c₁-4: 50 µm, b₁-4, d₁-4: 20 µm.)

Histopatolojik skorlamalar incelendiğinde perinöryum kalınlaşması, akson ve miyelin kılıf dejenerasyonu (akson şişkinliği), fibrozis, inflamasyon ve ödem varlığı skorlarının sadece greft uygulanan grupta kontrol ve sham gruplarına kıyasla anlamlı

olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 14A-E, $^{##}p<0,01$). Bunların yanı sıra, akson ve miyelin kılıf dejenerasyonu (akson şişkinliği) skoru greft + ADM grubunda kontrol ve sham gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek gözlenmiştir (Şekil 14B, $^{\#}p<0,05$). S-100 immunoreaktivitesi ise greft uygulanan grupta kontrol ve sham gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük gözlenmiştir (Şekil 14F, $^{##}p<0,01$).



Şekil 14. Siyatik sinirde histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilen parametreler. (A) Perinöryum kalınlaşması, (B) akson ve miyelin kılıf dejenerasyonu (akson şişkinliği), (C) fibrotik doku varlığı, (D) inflamasyon, (E) ödem ve (F) S-100 immunoreaktivitesi. (Kontrol ve sham gruplarına kıyasla $^{\#}p<0,05$ ve $^{##}p<0,01$).

5. TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları, duyuşal ve motor fonksiyonların kaybına yol aarak hastaların yaşam kalitesini ciddi şekilde olumsuz etkileyebilen karmaşık patolojik süreçlerdir (36). Bu tür sinir hasarlarının etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi, fonksiyonel iyileşmenin sağlanması ve hastaların günlük yaşamlarına mümkün olan en kısa sürede dönüşlerinin hızlandırılması açısından kritik öneme sahiptir (190). Mevcut tedavi yöntemlerinin sınırlamaları, sinir iyileşmesinin düşük verimlilikle gerçekleşmesine neden olmakta ve bu durum, daha ileri rejeneratif yaklaşımların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Bu çalışmada, CBD-VEGF ile kombine edilmiş sığır kaynaklı ADM'nin siyatik sinir rejenerasyonu üzerindeki etkileri ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiştir. Literatürde ADM ve VEGF'nin ayrı ayrı kullanıldığı pek çok çalışma mevcut olsa da bu çalışmada CBD-VEGF'nin kolajen bağlanma yeteneğiyle ADM'nin rejeneratif iskelet yapısını birleştirmenin sinir iyileşmesini daha etkili hale getirip getirmediği ilk kez ortaya konmuştur. Çalışmamızın bulguları, ADM ve CBD-VEGF kombinasyonunun sinir rejenerasyonunu anlamlı derecede arttırdığını ve fonksiyonel iyileşme süresine olumlu katkılar sunduğunu göstermiştir. ADM ve CBD-VEGF grubunda yapılan histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler, sinir dokusunda belirgin bir rejenerasyon olduğunu, daha yoğun miyelin kılıf oluşumu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda azalma gözlendiğini ortaya koymuştur. Elektrofizyolojik analizler, bu grupta siyatik sinir iletim hızının ve amplitüdün anlamlı şekilde arttığını göstermiştir, bu da motor fonksiyonların daha iyi korunduğunu işaret etmektedir. Gastrocnemius kasında ise atrofi derecesinde azalma ve kas liflerinin organizasyonunda iyileşme saptanmıştır. İmmünohistokimyasal boyamalarda, Schwann hücre aktivitesinde artış ve S-100 protein ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Bu bulgular, ADM'nin yapısal desteği ve CBD-VEGF'nin büyüme faktörü etkisiyle sinerjik bir rejenerasyon etkisi oluşturduğunu ve bu kombinasyonun sinir onarımında potansiyel bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, sinir onarımını değerlendirmek amacıyla deneysel bir model olarak Sprague Dawley sıçanları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu ırk sıçanlar, periferik sinir yaralanma ve rejenerasyonu deney modellerinde sıklıkla kullanılmaktadır (191-194).

EMG, sıçan modellerinde siyatik sinir yaralanmalarını değerlendirmede oldukça sık kullanılmakta olup sinirin işlevsel durumu ve yaralanmanın derecesi hakkında temel bilgiler sağlar (195, 196). Çalışmamızda elektrofizyolojik analiz sonuçları, ADM + CBD-VEGF kombinasyonunun sinir iletim hızı ve aksiyon potansiyeli amplitüdü üzerinde anlamlı bir iyileşme sağladığını göstermiştir. Sonuçlarımız, ADM ve CBD-VEGF kombinasyonu, sinir dokusunda aksonal iletimi artırarak motor fonksiyonların daha hızlı bir şekilde geri kazanılmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu durum, motor fonksiyonların korunmasında ve sinir rejenerasyonunun etkinliğinde bu kombinasyonun önemli bir rol oynadığını açıkça ortaya koymaktadır (197). Sinir iletim hızı, sinir onarımının kalitesi ve rejeneratif sürecin ne derece başarılı olduğuna dair önemli bir göstergedir (197).

ADM'nin yapısında yer alan kollajen ve diğer ekstraselüler matriks bileşenleri, sinir hücrelerinin göçünü, büyümesini ve farklılaşmasını teşvik ederek rejenerasyon sürecine katkı sağlar (198, 199). Bu yapı, sinir hücrelerinin uygun bir iskelete tutunmasını ve yaralanma bölgesinde organize bir şekilde büyümesini kolaylaştırır. CBD-VEGF, VEGF'nin kolajen bağlanma bölgesi içerdiğinden ADM'de yer alan kollajen I ve III gibi yapısal proteinlere spesifik olarak bağlanarak lokalizasyonu ve stabilitesini artırır (24, 164). Bu, büyüme faktörünün lokalize etkisinin artmasını ve dolayısıyla hedef doku üzerinde daha uzun süre kalmasını sağlar. VEGF, sinir iyileşmesinde önemli rol oynayan anjiyogenez sürecini teşvik eder, böylece rejenerasyon bölgesine yeni kan damarları oluşur ve dokunun besin ve oksijen ihtiyacı daha etkili bir şekilde karşılanır. Bu süreç, aksonal rejenerasyon için gerekli ortamı oluşturur ve böylece sinir iyileşme süreci hızlanır (177). Aksonal iletimin artırılmasında önemli olan bir diğer mekanizma ise Schwann hücrelerinin aktivitesidir (200). ADM ve CBD-VEGF kombinasyonu, Schwann hücre proliferasyonu ve aktivasyonunu artırarak aksonal büyüme konisi için uygun bir ortam sağlamaktadır

(200, 201). Schwann hücreleri, aksonların çevresinde miyelin kılıf oluşturarak elektriksel sinyal iletimini hızlandırır. Miyelin kılıfının yeniden oluşumu, sinir iletiminin daha hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleşmesine yardımcı olur. İmmünohistokimyasal boyamalarda gözlemlenen S-100 protein ekspresyonunun artışı, Schwann hücrelerinin rejeneratif süreçte aktif olarak katıldığını ve bu hücrelerin sinir iyileşmesinde destekleyici bir rol oynadığını göstermektedir.

Literatürde çeşitli biyomateryallerin sinir iletim hızını artırarak fonksiyonel iyileşmeyi desteklediği bildirilmiştir (202, 203). Ek olarak CBD-VEGF'nin anjiyogenezi destekleyici etkisi, sinir dokusunda kanlanmanın artırılmasına katkı sağladığı ve bunun da fonksiyonel iyileşmeyi olumlu yönde etkilediğini düşündürmektedir (204). Bulgularımız, ADM ve CBD-VEGF kombinasyonunun sağladığı sinerjik etki sayesinde sinir iletim hızını artırarak motor fonksiyonların daha hızlı ve etkili bir şekilde geri kazanılmasını desteklediğini göstermektedir. ADM kolajen yapısı, kolajen bağlayıcı vasküler endotelial büyüme faktörünün CBD-VEGF bağlanmasını ve sürdürülebilir salınımını artırmada önemli bir rol oynar ve bu da sinir rejenerasyonunu desteklemek için kritik önem taşır (166, 205, 206). Özellikle üç boyutlu bir iskele oluşturma yeteneğiyle kolajenin benzersiz özellikleri, VEGF gibi büyüme faktörlerinin tutulmasını ve lokalize iletimini kolaylaştırır. Bu, anjiyogenez ve sinir tamiri için gereklidir (170, 207). CBD-VEGF'nin hasar bölgesindeki bu sürdürülebilir varlığı, serbest VEGF'nin yaklaşık 30-45 dakika olan yarı ömrüne kıyasla hızlı bozunmasını engelleyerek biyolojik aktivitesini önemli ölçüde uzatabilir (207).

Çeşitli çalışmalar kolajen iskelelerin sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda Schwann hücrelerinin göçünü ve çoğalmasını artırarak rejenerasyon sürecine aktif olarak katıldığını göstermiştir (208, 209). Schwann hücreleri, nörotrofik faktörler salgıladıkları ve yenilenen aksonların etrafında miyelin kılıf oluşumuna yardımcı oldukları için periferik sinirlerin rejenerasyonu açısından hayati öneme sahiptir (210). Kolajen iskelelere CBD-VEGF entegrasyonu, sinir tamir bölgesinin vaskülarizasyonunu iyileştirmiştir. Bu iyileşme yenilenen dokuya besin ve

oksijen sağlanması açısından kritik öneme sahiptir ve iyileşme sürecini hızlandırır (207, 208).

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz histolojik analizler, ADM + CBD-VEGF grubunda sinir dokusunda belirgin bir rejenerasyon olduğunu ve bu grupta miyelin kılıf oluşumunun greft grubuna kıyasla daha yoğun olduğunu göstermiştir. ADM, kollajen temelli yapısı sayesinde sinir dokusunun bütünlüğünü koruyarak, hasarlı bölgeye yapısal destek sağlamaktadır (211). Ayrıca inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azalmış olması, bu kombinasyonun inflamatuvar cevabı modüle ederek rejenerasyon sürecine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır (212-214). Daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi ADM'nin kolajen yapısının CBD-VEGF ile kombine edilmesi, sinir dokusu da dahil olmak üzere dokularda yapısal stabilite sağlarken rejenerasyonu artıran sinyal yolağını da aktive etmektedir (174, 215, 216).

ADM iskeleler, doğal dokuların hücre dışı matriksini yakından taklit ederek hücre adezyonu, göçü ve çoğalması için uygun bir ortam sağlar (217, 218). Bu yapısal benzerlik, Schwann hücreleri ve sinir onarımı için gerekli diğer nöral hücrelerin hareketini kolaylaştırarak rejeneratif süreci destekleyebilir. Ayrıca, bu iskelelerin gözenekli yapısı, hücresel sağlık ve işlevin korunması için hayati önem taşıyan besin ve atık değişimini mümkün kılmaktadır (219). VEGF, yeni kan damarlarının oluşumunu teşvik eden iyi bilinen bir anjiyojenik faktör olup yaralanmış sinir dokusunun kan dolaşımını iyileştirir (220). Anjiyojenik faktörlerin varlığı, sadece vaskülarizasyonu artırmakla kalmaz, aynı zamanda rejenerasyon sürecinde sağkalımı ve büyümeyi kolaylaştıran destekleyici bir mikro çevre sağlar (221).

ADM'nin sağladığı yapısal iskelet, hücresel göçü ve sinir dokusunun yeniden organizasyonunu desteklerken, CBD-VEGF'nin büyüme faktörü etkisi lokal anjiyogenezi tetikleyerek rejeneratif sürece katkı sunmaktadır. Bu sinerji, sinir dokusunun iyileşmesinde kritik rol oynayan Schwann hücrelerinin aktivitesini artırmıştır. Schwann hücreleri, aksonal rejenerasyon ve miyelin kılıf oluşumunda temel rol oynar (222). İmmünohistokimyasal boyamalar, ADM + CBD-VEGF grubunda Schwann hücre aktivitesinde ve S-100 protein ekspresyonunda artış

olduğunu göstermiştir. Bu artış, sinir iyileşmesinde olumlu bir mikro çevrenin oluşturulduğunun ve sinir rejenerasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin bir göstergesidir.

Schwann hücrelerinin artan aktivitesi, aksonların yeniden miyelinleşmesini hızlandırarak sinir iletiminin etkinliğini artırmaktadır. ADM'nin büyüme faktörleriyle kombine edilmesinin Schwann hücrelerinin proliferasyonunu ve aktivitesini artırabilir. Ayrıca bu kombinasyonun, sinir onarımında kritik bir süreç olan hücreyel reorganizasyonu teşvik ederek daha etkin bir rejenerasyon sağlayabileceği düşünülebilir. Çalışmamızın sonuçlarından, ADM ve CBD-VEGF'nin birlikte kullanılması, rejeneratif sürecin biyolojik temelini daha sağlam hale getirdiği ve bunun sinir iyileşmesinde hedeflenen başarı düzeyine ulaşılmasına katkı sunduğu sonucu çıkarılabilir.

Gerçekleştirilen bir çalışmada, VEGF-A ile transdüke edilmiş Schwann hücreleri içeren çift katmanlı bir kondüitin, periferik sinir rejenerasyonunu anjiyogenez yoluyla teşvik ettiğini göstermiştir (223). Ancak bu çalışmanın klinik kullanımı zorludur ve pahalı, erişimi güç ve yalnızca küçük sinir defektlerinde uygulanabilir. Büyük sinir defektlerinde kullanım için uygun olmayan bu yaklaşım, otogreft ile karşılaştırıldığında daha düşük başarı oranlarına sahiptir. Buna karşılık, bizim çalışmamız ucuz, kolay erişilebilir, kolay uygulanabilir olup uzun sinir defektlerinde de başarıyla kullanılabilir. Bu çalışmada dikkat çeken bir diğer nokta, tek başına CBD-VEGF kullanılan bir grup bulunmamasıdır (223). CBD-VEGF'nin kolajen içerikli dokulara yüksek afinite göstermesi, kolajen miktarının yetersiz olduğu ortamlarda etkinliğinin azalabileceği anlamına gelmektedir. Bu bağlamda, ADM'nin bu tür durumlar için bir iskele görevi görebileceği düşünülmektedir.

ADM'nin kolajen yapısının, sinir hücrelerinin daha etkin bir şekilde rejenerasyonunu desteklediği ve dokudaki iyileşmeyi hızlandırdığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, CBD-VEGF'nin eklenmesiyle bu rejeneratif etkinin daha da artırıldığı görülmüştür. CBD-VEGF'nin büyüme faktörü etkisi, özellikle sinir

dokusundaki anjiyogenezi tetikleyerek rejenerasyon sürecine olumlu katkılar sağlamaktadır. Çalışmamız, ADM ve CBD-VEGF kombinasyonunun sinir dokusundaki onarımı artırıcı etkisini ortaya koymaktadır.

Kombinasyonun sağladığı sinerjik etki, literatürdeki benzer çalışmalardan elde edilen verilerle örtüşmektedir ve bu tedavi yönteminin gelecekteki klinik uygulamalar için potansiyel bir alternatif olabileceğini göstermektedir. ADM ve CBD-VEGF'nin birlikte kullanımı, sinir onarım sürecini hızlandırarak hem fonksiyonel hem de yapısal açıdan daha kapsamlı bir iyileşme sunmaktadır. Çalışmamızda ADM ve CBD-VEGF kombinasyonunun sinir rejenerasyonunu hızlandırdığı ve daha iyi fonksiyonel geri kazanım sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu kombinasyonun sinir iyileşme sürecine sağladığı katkıların, uzun vadede sinir fonksiyonlarının tam olarak geri kazanılmasına yönelik potansiyel taşıdığı görülmektedir. Bu durum, ADM ve CBD-VEGF kombinasyonunun gelecekte klinik kullanımda daha yaygın bir şekilde tercih edilebileceğini göstermektedir.

Siyatik sinir yaralanmasını içeren deneylerde bir sham grubun kullanılması, deneysel müdahalelerin etkilerinin ölçülebileceği bir temel oluşturmak için kritik öneme sahiptir. Bu uygulama, özellikle sinir yaralanmaları için tedavilerin etkinliğini değerlendiren çalışmalarda, klinik öncesi araştırmalarda temeldir. Sham grubu, tipik olarak deneysel grupla aynı cerrahi prosedürlerden geçer ancak gerçek sinir yaralanması olmadan, araştırmacıların yaralanmanın etkilerini cerrahi müdahalenin veya tedavinin etkilerinden izole etmelerine olanak tanır. Sham grubunun dahil edilmesinin temel nedenlerinden biri, cerrahinin fizyolojik etkilerini kontrol etmektir. Örneğin, siyatik sinirin açığa çıkarıldığı ancak yaralanmadığı çalışmalarda sham grubu deneysel grupta gözlemlenen herhangi bir sonucun (örneğin, sinir rejenerasyonu veya fonksiyonel iyileşme) cerrahi prosedürün kendisiyle ilişkili stres veya travmadan ziyade sinir yaralanmasından kaynaklandığını göstermeye yarar (224, 225). Bu hayvanlar ile gerçek sinir hasarına maruz kalan hayvanlar arasındaki histolojik ve fonksiyonel sonuçlarda önemli farklılıklar gösteren çeşitli çalışmalardan elde edilen bulgularla desteklenmektedir (226, 227). Ek olarak, Sham grup, sinir hasarının ve onarımının altında yatan biyolojik mekanizmaların anlaşılmasına yardımcı olur.

Çalışmalarda sham grubunu yaralanma grubuyla karşılaştırarak, sinir rejenerasyonu için kritik olan Schwann hücre proliferasyonu ve astrosit aktivasyonu gibi çeşitli hücrel yanıtın rollerini açıklanabilmektedir (228, 229).

Çalışmamızın en önemli sınırlılığı, sadece kısa süreli etkilerin değerlendirilmiş olmasıdır. Bu da uzun dönem rejenerasyon sürecine dair sınırlı bilgi sunmaktadır. Gelecek çalışmaların, daha geniş bir örneklem büyüklüğü ile farklı hayvan modelleri kullanılarak yapılması ve uzun dönem etkilerin değerlendirilmesi önem arz etmektedir. ADM ve CBD-VEGF kombinasyonunun farklı büyüme faktörleri veya kök hücre destekli biyomateryallerle birlikte kullanılması da rejeneratif etkinin daha da artırılmasına olanak sağlayabilir. Ek olarak, CBD-VEGF'nin farklı konsantrasyonlarının etkinliğinin çalışılmamış olması da bir sınırlılık olarak belirtilebilir.

Özellikle farklı büyüme faktörlerinin kombinasyonlarının sinir dokusundaki etkilerinin incelenmesi, bu alandaki bilgi boşluklarının doldurulmasına katkı sağlayacaktır. İnsanlar üzerinde yapılacak klinik çalışmalar, bu tedavi kombinasyonunun klinik potansiyelini değerlendirmek ve güvenilirliğini test etmek için gereklidir. Klinik araştırmalar, bu yaklaşımın insanlar üzerindeki güvenlik ve etkinliğini belirlememize olanak tanıyacaktır. Özellikle uzun sinir defektlerinde ADM ve CBD-VEGF kombinasyonunun kullanımı, sinir rejenerasyonunun daha zor olduğu vakalarda umut vadeden sonuçlar sunabilir.

Farklı dozlarla çalışmalar yapılarak optimum dozun belirlenmesi, bu tedavi yönteminin gelecekteki uygulamaları için önemlidir. Ayrıca, çalışmanın deney hayvanları üzerinde sınırlı bir süre boyunca takip edilmesi, uzun dönemde sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerin tam olarak belirlenememesine yol açmıştır. ADM ve CBD-VEGF kombinasyonunun uzun vadeli etkilerini değerlendirmek için daha uzun takip süresi ve daha fazla sayıda hayvan kullanılması önerilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, CBD-VEGF ile kombine edilmiş ADM'nin sinir rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkilerini ortaya koymuştur. ADM'nin yapısal destek sağlama yeteneği ve CBD-VEGF'nin büyüme faktörü etkisi, sinir iyileşmesinde sinerjistik bir etki yaratmıştır. Elektrofizyolojik, histolojik ve immünohistokimyasal analizlerle elde edilen bulgular, bu kombinasyonun sinir rejenerasyonunu hem fonksiyonel hem de yapısal açıdan iyileştirdiğini göstermektedir. ADM ve CBD-VEGF'nin bir arada kullanılması, mevcut sinir onarım yöntemlerine alternatif bir tedavi yaklaşımı olarak gelecekteki klinik uygulamalarda önemli bir potansiyele sahiptir.

Gelecekte yapılacak olan çalışmalar, bu bulguların farklı hayvan modellerinde ve insan klinik çalışmalarında doğrulanması ile daha güçlü kanıtlar sağlayabilir. Ayrıca, farklı dozajlar ve kombinasyonların etkinliğinin araştırılması, bu tedavi yönteminin etkinliğini daha da optimize edebilir. ADM ve CBD-VEGF kombinasyonunun uzun vadeli etkinliği ve güvenilirliğinin belirlenmesi, bu yöntemin klinik kullanıma geçişini hızlandırabilir.

Bunun yanında, ADM ve CBD-VEGF'nin farklı biyomalzemeler ve büyüme faktörleriyle olan etkileşimlerinin araştırılması da önemlidir. Örneğin, farklı biyomalzeme türleri ile birlikte kullanılabilecek bu kombinasyonun, spesifik olarak karmaşık sinir yaralanmalarında sağladığı etkinliğin belirlenmesi, klinik başarı oranlarını artırabilir. Ek olarak, bu kombinasyonun farklı hastalık modellerinde (örneğin kronik sinir hasarı, diabetes mellitus kaynaklı nöropati) kullanılması ve bu durumlarda rejeneratif potansiyelinin değerlendirilmesi, daha geniş bir tedavi alanı sunabilir.

Farklı yaş gruplarında ve cinsiyetlerde CBD-VEGF ve ADM kombinasyonunun etkinliğini araştırmak, bu yöntemin bireysel hasta gruplarındaki uygunluğunu ve etkisini anlamamıza yardımcı olabilir. Ayrıca, sinir rejenerasyonunu destekleyen diğer moleküler mekanizmaların (örneğin, oksidatif stresin azaltılması, inflamasyonun modüle edilmesi gibi) bu kombinasyonla nasıl etkileşime geçtiğinin incelenmesi, tedavi protokollerini kişiselleştirme açısından kritik olabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada sunulan bulgular, CBD-VEGF ile kombine edilen ADM'nin sinir rejenerasyonundaki rolünü desteklemektedir. Klinik uygulamalarda bu yaklaşımın kullanılması, sinir yaralanmaları sonrasında hastaların yaşam kalitesini iyileştirme potansiyeline sahiptir.



7. 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. *J Trauma*. 1998;45(1):116-22.
2. Lundborg G. Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2004;36(1):1-7.
3. Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(23):2144-51.
4. Tos P, Battiston B, Ciclamini D, Geuna S, Artiaco S. Primary repair of crush nerve injuries by means of biological tubulization with muscle-vein-combined grafts. *Microsurgery*. 2012;32(5):358-63.
5. Lee YH, Shieh SJ. Secondary nerve reconstruction using vein conduit grafts for neglected digital nerve injuries. *Microsurgery*. 2008;28(6):436-40.
6. Marcoccio I, Vigasio A. Muscle-in-vein nerve guide for secondary reconstruction in digital nerve lesions. *J Hand Surg Am*. 2010;35(9):1418-26.
7. Pabari A, Yang SY, Seifalian AM, Mosahebi A. Modern surgical management of peripheral nerve gap. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(12):1941-8.
8. Evans PJ, Mackinnon SE, Levi AD, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, et al. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. *Muscle Nerve*. 1998;21(11):1507-22.
9. Lans J, Eberlin KR, Evans PJ, Mercer D, Greenberg JA, Styron JF. A Systematic Review and Meta-Analysis of Nerve Gap Repair: Comparative Effectiveness of Allografts, Autografts, and Conduits. *Plast Reconstr Surg*. 2023;151(5):814e-27e.
10. Mackinnon SE, Dellon AL. *Surgery of the peripheral nerve*. 2007.

11. Seddon HJ. The use of autogenous grafts for the repair of large gaps in peripheral nerves. *Br J Surg.* 1947;35(138):151-67.
12. Millesi H. Peripheral nerve injuries. Nerve sutures and nerve grafting. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1982;19:25-37.
13. Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg.* 1975;56(2):166-70.
14. Sulaiman OA, Gordon T. Role of chronic Schwann cell denervation in poor functional recovery after nerve injuries and experimental strategies to combat it. *Neurosurgery.* 2009;65(4 Suppl):A105-14.
15. Gordon T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. *J Commun Disord.* 2010;43(4):265-73.
16. Gordon T, Tyreman N, Raji MA. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *J Neurosci.* 2011;31(14):5325-34.
17. Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *J Neurosci.* 1995;15(5 Pt 2):3876-85.
18. Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery.* 1994;15(3):176-8.
19. Cayci C, Santner F, Jacobson SR. Impact and outcome of human acellular dermal matrix size for immediate and two-stage breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2013;132(1):11-8.
20. Veneroso A, Gianquinto D, Trapasso M, Falco E. Breast reconstruction using implant and acellular dermal matrix: "the trapezoidal technique". *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2013;66(11):e332-3.

21. Patel KM, Nahabedian MY, Albino F, Bhanot P. The use of porcine acellular dermal matrix in a bridge technique for complex abdominal wall reconstruction: an outcome analysis. *Am J Surg*. 2013;205(2):209-12.
22. Syu WZ, Chen SG, Chan JY, Wang CH, Dai NT, Huang SM. The Potential of Acellular Dermal Matrix Combined With Neural Stem Cells Induced From Human Adipose-Derived Stem Cells in Nerve Tissue Engineering. *Ann Plast Surg*. 2019;82(1S Suppl 1):S108-s18.
23. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407(6801):242-8.
24. Zhang J, Ding L, Zhao Y, Sun W, Chen B, Lin H, et al. Collagen-targeting vascular endothelial growth factor improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation*. 2009;119(13):1776-84.
25. Koop LK, Tadi P. Neuroanatomy, Sensory Nerves. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

26. Waxenbaum JA, Reddy V, Varacallo M. Anatomy, Autonomic Nervous System. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

27. Belin S, Zuloaga KL, Poitelon Y. Influence of Mechanical Stimuli on Schwann Cell Biology. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:347.
28. Muzio MR, Fakoya AO, Cascella M. Histology, Axon. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

29. Schmidt H, Knösche TR. Action potential propagation and synchronisation in myelinated axons. *PLoS Comput Biol*. 2019;15(10):e1007004.
30. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev*. 2019;99(3):1381-431.
31. Sonawane K, Dixit H, Jayaraj A, Thota N, Sekar C. "Knowing It Before Blocking It," the ABCD of the Peripheral Nerves: Part A (Nerve Anatomy and Physiology). *Cureus*. 2023;15(7):e41771.
32. Mizisin AP, Weerasuriya A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol*. 2011;121(3):291-312.
33. Liu Q, Wang X, Yi S. Pathophysiological Changes of Physical Barriers of Peripheral Nerves After Injury. *Front Neurosci*. 2018;12:597.
34. Prahm C, Heinzel J, Kolbenschlag J. Blood Supply and Microcirculation of the Peripheral Nerve. In: Phillips J, Hercher D, Hausner T, editors. *Peripheral Nerve Tissue Engineering and Regeneration*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 1-46.
35. Pedrosa SS, Caseiro AR, Santos JD, Maurício AC. Scaffolds for peripheral nerve regeneration, the importance of in vitro and in vivo studies for the development of cell-based therapies and biomaterials: state of the art. *Scaffolds in Tissue Engineering Materials, Technologies and Clinical Applications*. 2017;9(12):179.
36. Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*. 2013;29(3):317-30.
37. Bolívar S, Navarro X, Udina E. Schwann Cell Role in Selectivity of Nerve Regeneration. *Cells*. 2020;9(9).

38. Lopes B, Sousa P, Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Mendonça C, et al. Peripheral Nerve Injury Treatments and Advances: One Health Perspective. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2).
39. Chhabra A, Ahlawat S, Belzberg A, Andreseik G. Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: As referenced to Seddon and Sunderland classifications. *Indian J Radiol Imaging.* 2014;24(3):217-24.
40. Seddon H. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943;66(4):237-88.
41. Seddon HJ, Medawar PB, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *J Physiol.* 1943;102(2):191-215.
42. Sonawane K, Dixit H, Thota N, Mistry T, Balavenkatasubramanian J. "Knowing It Before Blocking It," the ABCD of the Peripheral Nerves: Part B (Nerve Injury Types, Mechanisms, and Pathogenesis). *Cureus.* 2023;15(8):e43143.
43. Carballo Cuello CM, De Jesus O. Neurapraxia. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

44. Yossepowitch O, Bochner BH. Chapter 40 - Complications of lymphadenectomy. In: Taneja SS, editor. *Complications of Urologic Surgery (Fourth Edition).* Philadelphia: W.B. Saunders; 2010. p. 463-77.
45. Ditty BJ, Omar NB, Rozzelle CJ. Chapter 24 - Surgery for Peripheral Nerve Trauma. In: Tubbs RS, Rizk E, Shoja MM, Loukas M, Barbaro N, Spinner RJ, editors. *Nerves and Nerve Injuries.* San Diego: Academic Press; 2015. p. 373-81.
46. Fugleholm K. Chapter 45 - The surgery of peripheral nerves (including tumors). In: Said G, Krarup C, editors. *Handbook of Clinical Neurology.* 115: Elsevier; 2013. p. 781-802.

47. Matos Cruz AJ, De Jesus O. Neurotmesis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

48. Goubier J-N, Teboul F. Chapter 38 - Grading of Nerve Injuries. In: Tubbs RS, Rizk E, Shoja MM, Loukas M, Barbaro N, Spinner RJ, editors. Nerves and Nerve Injuries. San Diego: Academic Press; 2015. p. 603-10.

49. Wood MD, Kemp SW, Weber C, Borschel GH, Gordon T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Ann Anat.* 2011;193(4):321-33.

50. Delibaş B, Vianney JM, Kaplan S. The assessment of neuronal plasticity following sciatic nerve injuries in rats using electron microscopy and stereological methods. *J Chem Neuroanat.* 2024;136:102396.

51. Yi S, Zhang Y, Gu X, Huang L, Zhang K, Qian T, et al. Application of stem cells in peripheral nerve regeneration. *Burns Trauma.* 2020;8:tkaa002.

52. Zou X, Dong Y, Alhaskawi A, Zhou H, Ezzi SHA, Kota VG, et al. Techniques and graft materials for repairing peripheral nerve defects. *Front Neurol.* 2023;14:1307883.

53. Griffin M, Malahias M, Hindocha S, Khan WS. Suppl 1: peripheral nerve injury: principles for repair and regeneration. *The open orthopaedics journal.* 2014;8:199.

54. Moore AM, Wagner IJ, Fox IK. Principles of nerve repair in complex wounds of the upper extremity. *Semin Plast Surg.* 2015;29(1):40-7.

55. Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp Neurol.* 2010;223(1):77-85.

56. Murray B. Nerve Repair. In: Aminoff MJ, Daroff RB, editors. *Encyclopedia of the Neurological Sciences.* New York: Academic Press; 2003. p. 424-8.

57. Ansaripour A, Thompson A, Styron JF, Javanbakht M. Cost-effectiveness analysis of Avance(®) allograft for the treatment of peripheral nerve injuries in the USA. *J Comp Eff Res*. 2024;13(1):e230113.
58. Poppler LH, Davidge K, Lu JC, Armstrong J, Fox IK, Mackinnon SE. Alternatives to sural nerve grafts in the upper extremity. *Hand (N Y)*. 2015;10(1):68-75.
59. Lischer M, di Summa PG, Petrou IG, Schaefer DJ, Guzman R, Kalbermatten DF, et al. Mesenchymal Stem Cells in Nerve Tissue Engineering: Bridging Nerve Gap Injuries in Large Animals. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9).
60. Owens CM, Marga F, Forgacs G, Heesch CM. Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft. *Biofabrication*. 2013;5(4):045007.
61. Zhou XH, Ning GZ, Feng SQ, Kong XH, Chen JT, Zheng YF, et al. Transplantation of autologous activated Schwann cells in the treatment of spinal cord injury: six cases, more than five years of follow-up. *Cell Transplant*. 2012;21 Suppl 1:S39-47.
62. Tada K, Nakada M, Matsuta M, Yamauchi D, Ikeda K, Tsuchiya H. Long-Term Outcomes of Donor Site Morbidity After Sural Nerve Graft Harvesting. *J Hand Surg Glob Online*. 2020;2(2):74-6.
63. El Soury M, García-García Ó D, Moretti M, Perroteau I, Raimondo S, Lovati AB, et al. Comparison of Decellularization Protocols to Generate Peripheral Nerve Grafts: A Study on Rat Sciatic Nerves. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5).
64. Aguirre LE, Guzman ME, Lopes G, Hurley J. Immune Checkpoint Inhibitors and the Risk of Allograft Rejection: A Comprehensive Analysis on an Emerging Issue. *Oncologist*. 2019;24(3):394-401.
65. Fox IK, Mackinnon SE. Experience with nerve allograft transplantation. *Semin Plast Surg*. 2007;21(4):242-9.

66. Hsu MW, Chen SH, Tseng WL, Hung KS, Chung TC, Lin SC, et al. Physical processing for decellularized nerve xenograft in peripheral nerve regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11:1217067.
67. Moore AM, Ray WZ, Chenard KE, Tung T, Mackinnon SE. Nerve allotransplantation as it pertains to composite tissue transplantation. *Hand (N Y).* 2009;4(3):239-44.
68. Han F, Wang J, Ding L, Hu Y, Li W, Yuan Z, et al. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:83.
69. Stang F, Keilhoff G, Fansa H. Biocompatibility of Different Nerve Tubes. *Materials [Internet].* 2009; 2(4):[1480-507 pp.].
70. Dietzmeyer N, Förthmann M, Grothe C, Haastert-Talini K. Modification of tubular chitosan-based peripheral nerve implants: applications for simple or more complex approaches. *Neural Regen Res.* 2020;15(8):1421-31.
71. Sanchez Rezza A, Kulahci Y, Gorantla VS, Zor F, Drzeniek NM. Implantable Biomaterials for Peripheral Nerve Regeneration-Technology Trends and Translational Tribulations. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:863969.
72. Lin JA, Lu JC, Chang TN, Sakarya AH, Chuang DC. Long-Term Outcome of 118 Acute Total Brachial Plexus Injury Patients Using Free Vascularized Ulnar Nerve Graft to Innervate the Median Nerve. *J Reconstr Microsurg.* 2023;39(4):279-87.
73. Muheremu A, Ao Q. Past, Present, and Future of Nerve Conduits in the Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Biomed Res Int.* 2015;2015:237507.
74. Zheng S, Wei H, Cheng H, Qi Y, Gu Y, Ma X, et al. Advances in nerve guidance conduits for peripheral nerve repair and regeneration. *Am J Stem Cells.* 2023;12(5):112-23.

75. Guarino V, Cirillo V, Ambrosio L. 6.18 Multicomponent Conduits for Peripheral Nerve Regeneration☆. In: Ducheyne P, editor. *Comprehensive Biomaterials II*. Oxford: Elsevier; 2017. p. 308-20.
76. Rahman M, Mahady Dip T, Padhye R, Houshyar S. Review on electrically conductive smart nerve guide conduit for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2023;111(12):1916-50.
77. Nectow AR, Marra KG, Kaplan DL. Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18(1):40-50.
78. Zarrintaj P, Zangene E, Manouchehri S, Amirabad LM, Baheiraei N, Hadjighasem MR, et al. Conductive biomaterials as nerve conduits: Recent advances and future challenges. *Applied Materials Today*. 2020;20:100784.
79. Pixley SK, Hopkins TM, Little KJ, Hom DB. Evaluation of peripheral nerve regeneration through biomaterial conduits via micro-CT imaging. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2016;1(6):185-90.
80. Kakinoki R, Hara Y, Yoshimoto K, Kaizawa Y, Hashimoto K, Tanaka H, et al. Fabrication of Artificial Nerve Conduits Used in a Long Nerve Gap: Current Reviews and Future Studies. *Bioengineering (Basel)*. 2024;11(4).
81. Petrie K, Cox CT, Becker BC, MacKay BJ. Clinical applications of acellular dermal matrices: A review. *Scars Burn Heal*. 2022;8:20595131211038313.
82. Tork S, Jefferson RC, Janis JE. Acellular Dermal Matrices: Applications in Plastic Surgery. *Semin Plast Surg*. 2019;33(3):173-84.
83. Neiva R, Giannobile WV. 16 - Mucosal and gingival tissue engineering. In: Ferri J, Hunziker EB, editors. *Preprosthetic and Maxillofacial Surgery*: Woodhead Publishing; 2011. p. 305-26.

84. Ibrahim AM, Koolen PG, Ashraf AA, Kim K, Mureau MA, Lee BT, et al. Acellular Dermal Matrix in Reconstructive Breast Surgery: Survey of Current Practice among Plastic Surgeons. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2015;3(4):e381.
85. Mohammadyari F, Parvin S, Khorvash M, Amini A, Behzadi A, HajEbrahimi R, et al. Acellular dermal matrix in reconstructive surgery: Applications, benefits, and cost. *Front Transplant*. 2023;2:1133806.
86. Saiding Q, Chen Y, Wang J, Pereira CL, Sarmento B, Cui W, et al. Abdominal wall hernia repair: from prosthetic meshes to smart materials. *Mater Today Bio*. 2023;21:100691.
87. Silverman RP. Acellular Dermal Matrix in Abdominal Wall Reconstruction. *Aesthetic Surgery Journal*. 2011;31(7_Supplement):24S-9S.
88. Aodi J, Ying L, Chengyang S, Hongfeng Z. Acellular dermal matrix in urethral reconstruction. *Front Pediatr*. 2024;12:1342906.
89. Esmaeili A, Biazar E, Ebrahimi M, Heidari Keshel S, Kheilnezhad B, Saeedi Landi F. Acellular fish skin for wound healing. *Int Wound J*. 2023;20(7):2924-41.
90. Gierek M, Łabuś W, Kitala D, Lorek A, Ochała-Gierek G, Zagórska KM, et al. Human Acellular Dermal Matrix in Reconstructive Surgery-A Review. *Biomedicines*. 2022;10(11).
91. Weng T, Zhang W, Xia Y, Wu P, Yang M, Jin R, et al. 3D bioprinting for skin tissue engineering: Current status and perspectives. *J Tissue Eng*. 2021;12:20417314211028574.
92. Liu C, Pei M, Li Q, Zhang Y. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. *Front Med*. 2022;16(1):56-82.
93. Golebiowska AA, Intravaia JT, Sathe VM, Kumbar SG, Nukavarapu SP. Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects. *Bioactive Materials*. 2024;32:98-123.

94. Chen Z, Du C, Liu S, Liu J, Yang Y, Dong L, et al. Progress in biomaterials inspired by the extracellular matrix. *Giant*. 2024;19:100323.
95. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016;5(3):119-36.
96. Ghatak S, Maytin EV, Mack JA, Hascall VC, Atanelishvili I, Moreno Rodriguez R, et al. Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis. *Int J Cell Biol*. 2015;2015:834893.
97. Wang B, Qinglai T, Yang Q, Li M, Zeng S, Yang X, et al. Functional acellular matrix for tissue repair. *Mater Today Bio*. 2023;18:100530.
98. Kolimi P, Narala S, Nyavanandi D, Youssef AAA, Dudhipala N. Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. *Cells*. 2022;11(15).
99. Xiao H, Chen X, Liu X, Wen G, Yu Y. Recent advances in decellularized biomaterials for wound healing. *Mater Today Bio*. 2023;19:100589.
100. Li X, Meng X, Wang X, Li Y, Li W, Lv X, et al. Human acellular dermal matrix allograft: A randomized, controlled human trial for the long-term evaluation of patients with extensive burns. *Burns*. 2015;41(4):689-99.
101. Kim YH, Shim HS, Lee J, Kim SW. A Prospective Randomized Controlled Multicenter Clinical Trial Comparing Paste-Type Acellular Dermal Matrix to Standard Care for the Treatment of Chronic Wounds. *J Clin Med*. 2022;11(8).
102. Blatnik J, Jin J, Rosen M. Abdominal hernia repair with bridging acellular dermal matrix--an expensive hernia sac. *Am J Surg*. 2008;196(1):47-50.
103. Shiroud Heidari B, Dodda JM, El-Khordagui LK, Focarete ML, Maroti P, Toth L, et al. Emerging materials and technologies for advancing bioresorbable surgical meshes. *Acta Biomater*. 2024;184:1-21.

104. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1097-105.
105. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol*. 2000;156(3):965-76.
106. Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, et al. VEGF_{121b} and VEGF_{165b} are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer*. 2010;9:320.
107. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*. 1993;4(12):1317-26.
108. Cai C, Böttcher MC, Werner JA, Mandic R. Differential expression of VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ in angiomas and squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Anticancer Res*. 2010;30(3):805-10.
109. Kaplan O, Zárubová J, Mikulová B, Filová E, Bártová J, Bačáková L, et al. Enhanced Mitogenic Activity of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor VEGF₁₂₁ Expressed in *E. coli* Origami B (DE3) with Molecular Chaperones. *PLoS One*. 2016;11(10):e0163697.
110. Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(1):1-19.
111. Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Kimata K. Heparin regulates vascular endothelial growth factor₁₆₅-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J Biol Chem*. 2005;280(36):31508-15.

112. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, et al. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem*. 1996;271(13):7788-95.
113. Guzmán-Hernández ML, Potter G, Egervári K, Kiss JZ, Balla T. Secretion of VEGF-165 has unique characteristics, including shedding from the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 2014;25(7):1061-72.
114. Hutchings H, Ortega N, Plouët J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *Faseb j*. 2003;17(11):1520-2.
115. Zafar MI, Zheng J, Kong W, Ye X, Gou L, Regmi A, et al. The role of vascular endothelial growth factor-B in metabolic homeostasis: current evidence. *Biosci Rep*. 2017;37(4).
116. Su N, Zheng J, Zhang G, Guan J, Gao X, Cheng Z, et al. Molecular characterization of vascular endothelial growth factor b from spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and its potential roles in decreasing lipid deposition. *Int J Biol Macromol*. 2024;267(Pt 1):131507.
117. Mallick R, Ylä-Herttuala S. Therapeutic Potential of VEGF-B in Coronary Heart Disease and Heart Failure: Dream or Vision? *Cells*. 2022;11(24).
118. Li X, Lee C, Tang Z, Zhang F, Arjunan P, Li Y, et al. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh Migr*. 2009;3(4):322-7.
119. Varner JA. Lymphangiogenesis. In: Schwab M, editor. *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 1-5.
120. Sweat RS, Sloas DC, Murfee WL. VEGF-C induces lymphangiogenesis and angiogenesis in the rat mesentery culture model. *Microcirculation*. 2014;21(6):532-40.
121. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002;1(3):219-27.

122. Detmar M, Hirakawa S. The formation of lymphatic vessels and its importance in the setting of malignancy. *J Exp Med*. 2002;196(6):713-8.
123. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*. 1996;122(12):3829-37.
124. Chen JC, Chang YW, Hong CC, Yu YH, Su JL. The role of the VEGF-C/VEGFRs axis in tumor progression and therapy. *Int J Mol Sci*. 2012;14(1):88-107.
125. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(2):154-65.
126. Stacker SA, Achen MG. Emerging Roles for VEGF-D in Human Disease. *Biomolecules*. 2018;8(1).
127. Albonici L, Benvenuto M, Focaccetti C, Cifaldi L, Miele MT, Limana F, et al. PlGF Immunological Impact during Pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22).
128. Raevens S, Geerts A, Paridaens A, Lefere S, Verhelst X, Hoorens A, et al. Placental growth factor inhibition targets pulmonary angiogenesis and represents a therapy for hepatopulmonary syndrome in mice. *Hepatology*. 2018;68(2):634-51.
129. Uemura A, Fruttiger M, D'Amore PA, De Falco S, Joussen AM, Sennlaub F, et al. VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. *Prog Retin Eye Res*. 2021;84:100954.
130. Kim KJ, Cho CS, Kim WU. Role of placenta growth factor in cancer and inflammation. *Exp Mol Med*. 2012;44(1):10-9.
131. Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(8).

132. Masoumi Moghaddam S, Amini A, Morris DL, Pourgholami MH. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(1-2):143-62.
133. Dallinga MG, Habani YI, Schimmel AWM, Dallinga-Thie GM, van Noorden CJF, Klaassen I, et al. The Role of Heparan Sulfate and Neuropilin 2 in VEGFA Signaling in Human Endothelial Tip Cells and Non-Tip Cells during Angiogenesis In Vitro. *Cells.* 2021;10(4).
134. Plein A, Fantin A, Ruhrberg C. Neuropilin regulation of angiogenesis, arteriogenesis, and vascular permeability. *Microcirculation.* 2014;21(4):315-23.
135. Herzog B, Pellet-Many C, Britton G, Hartzoulakis B, Zachary IC. VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 2011;22(15):2766-76.
136. Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, et al. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood.* 2006;108(4):1243-50.
137. Hayashida K, Aquino RS, Park PW. Coreceptor functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022;322(5):C896-c912.
138. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7).
139. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell.* 2019;176(6):1248-64.
140. Wang X, Bove AM, Simone G, Ma B. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:599281.
141. Banerjee S, Flores-Rozas H. Monoclonal antibodies for targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer biology & therapy.* 2010;9(8):563-71.

142. Pandey AK, Singhi EK, Arroyo JP, Ikizler TA, Gould ER, Brown J, et al. Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor-Associated Hypertension and Vascular Disease. *Hypertension*. 2018;71(2):e1-e8.
143. Giannotti L, Di Chiara Stanca B, Spedicato F, Nitti P, Damiano F, Demitri C, et al. Progress in Regenerative Medicine: Exploring Autologous Platelet Concentrates and Their Clinical Applications. *Genes (Basel)*. 2023;14(9).
144. Srinivasan R, Zabuawala T, Huang H, Zhang J, Gulati P, Fernandez S, et al. Erk1 and Erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLoS One*. 2009;4(12):e8283.
145. Nilsson M, Heymach JV. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pathway. *Journal of Thoracic Oncology*. 2006;1(8):768-70.
146. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*. 2009;8(8):1168-75.
147. Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*. 2011;2(3):195-209.
148. Trelford CB, Dagnino L, Di Guglielmo GM. Transforming growth factor- β in tumour development. *Front Mol Biosci*. 2022;9:991612.
149. Patel M, Predescu D, Tandon R, Bardita C, Pogoriler J, Bhorade S, et al. A novel p38 mitogen-activated protein kinase/Elk-1 transcription factor-dependent molecular mechanism underlying abnormal endothelial cell proliferation in plexogenic pulmonary arterial hypertension. *J Biol Chem*. 2013;288(36):25701-16.
150. Zhao Y, Qian Y, Sun Z, Shen X, Cai Y, Li L, et al. Role of PI3K in the Progression and Regression of Atherosclerosis. *Front Pharmacol*. 2021;12:632378.
151. Peng XQ, Damarla M, Skirball J, Nonas S, Wang XY, Han EJ, et al. Protective role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling in mechanical stress through inhibition of p38

mitogen-activated protein kinase in mouse lung. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31(2):175-83.

152. Morello F, Perino A, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc Res.* 2009;82(2):261-71.

153. He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):425.

154. Pungsrinont T, Kallenbach J, Baniahmad A. Role of PI3K-AKT-mTOR Pathway as a Pro-Survival Signaling and Resistance-Mediating Mechanism to Therapy of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20).

155. Tran N, Garcia T, Anika M, Ali S, Ally A, Nauli SM. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and the Cardiovascular System: in Physiology and in Disease States. *Am J Biomed Sci Res.* 2022;15(2):153-77.

156. Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(5):601-15.

157. Bill CA, Vines CM. Phospholipase C. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1131:215-42.

158. Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K, Nakamura Y. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res.* 2010;49(4):429-37.

159. Zhang Y, Helm JS, Senatore A, Spafford JD, Kaczmarek LK, Jonas EA. PKC-induced intracellular trafficking of Ca(V)₂ precedes its rapid recruitment to the plasma membrane. *J Neurosci.* 2008;28(10):2601-12.

160. Moccia F, Negri S, Shekha M, Faris P, Guerra G. Endothelial Ca²⁺ Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis: just What It Takes to Make a Blood Vessel. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16).

161. Park-Windhol C, D'Amore PA. Disorders of Vascular Permeability. *Annu Rev Pathol.* 2016;11:251-81.
162. Wettschureck N, Strilic B, Offermanns S. Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation. *Physiol Rev.* 2019;99(3):1467-525.
163. Hazama K, Nishibe T, Shimada T, Miura H, Watanabe S, Kondoh S, et al. Effects of omental wrap on performance of small-caliber high-porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts. *J Surg Res.* 1999;81(2):174-80.
164. Wei S, Li Z, Shi Q, Luan X, Yuan X, Li Y, et al. Collagen-binding vascular endothelial growth factor (CBD-VEGF) promotes liver regeneration in murine partial hepatectomy. *Mol Med Rep.* 2022;26(5).
165. He Q, Zhao Y, Chen B, Xiao Z, Zhang J, Chen L, et al. Improved cellularization and angiogenesis using collagen scaffolds chemically conjugated with vascular endothelial growth factor. *Acta Biomater.* 2011;7(3):1084-93.
166. Shi C, Zhao Y, Yang Y, Chen C, Hou X, Shao J, et al. Collagen-binding VEGF targeting the cardiac extracellular matrix promotes recovery in porcine chronic myocardial infarction. *Biomater Sci.* 2018;6(2):356-63.
167. Bang FS, Leeberg V, Ding M, Dreyer CH. The effect of VEGF stimulation in diabetic foot ulcers: A systematic review. *Wound Repair Regen.* 2024;32(4):384-92.
168. Wu K, Huang R, Wu H, Liu Y, Yang C, Cao S, et al. Collagen-binding vascular endothelial growth factor attenuates CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Mol Med Rep.* 2016;14(5):4680-6.
169. Rocha FG, Sundback CA, Krebs NJ, Leach JK, Mooney DJ, Ashley SW, et al. The effect of sustained delivery of vascular endothelial growth factor on angiogenesis in tissue-engineered intestine. *Biomaterials.* 2008;29(19):2884-90.

170. Ma F, Xiao Z, Meng D, Hou X, Zhu J, Dai J, et al. Use of natural neural scaffolds consisting of engineered vascular endothelial growth factor immobilized on ordered collagen fibers filled in a collagen tube for peripheral nerve regeneration in rats. *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):18593-609.
171. Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12).
172. Reing JE, Brown BN, Daly KA, Freund JM, Gilbert TW, Hsiong SX, et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials.* 2010;31(33):8626-33.
173. Rosadas M, Silva IV, Costa JB, Ribeiro VP, Oliveira AL. Decellularized dermal matrices: unleashing the potential in tissue engineering and regenerative medicine. *Frontiers in Materials.* 2024;10:1285948.
174. Li X, Zhang X, Hao M, Wang D, Jiang Z, Sun L, et al. The application of collagen in the repair of peripheral nerve defect. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:973301.
175. Farzamfar S, Richer M, Rahmani M, Naji M, Aleahmad M, Chabaud S, et al. Biological Macromolecule-Based Scaffolds for Urethra Reconstruction. *Biomolecules.* 2023;13(8).
176. Fertala J, Rivlin M, Wang ML, Beredjikian PK, Steplewski A, Fertala A. Collagen-rich deposit formation in the sciatic nerve after injury and surgical repair: A study of collagen-producing cells in a rabbit model. *Brain Behav.* 2020;10(10):e01802.
177. Hobson MI, Green CJ, Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat.* 2000;197 Pt 4(Pt 4):591-605.

178. Pan Z, Fukuoka S, Karagianni N, Guaiquil VH, Rosenblatt MI. Vascular endothelial growth factor promotes anatomical and functional recovery of injured peripheral nerves in the avascular cornea. *Faseb j*. 2013;27(7):2756-67.
179. Schiraldi L, Sottaz L, Madduri S, Campisi C, Oranges CM, Raffoul W, et al. Split-sciatic nerve surgery: A new microsurgical model in experimental nerve repair. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2018;71(4):557-65.
180. Ceran F, Pilanci O, Ozel A, Ilbay G, Karabacak R, Kanter M, et al. Use of acellular dermal matrix in peripheral nerve reconstruction: an experimental study on rat sciatic nerve defect. *J Plast Surg Hand Surg*. 2023;57(1-6):445-52.
181. Meek MF, Van Der Werff JF, Nicolai JP, Gramsbergen A. Biodegradable p(DLLA-epsilon-CL) nerve guides versus autologous nerve grafts: electromyographic and video analysis. *Muscle Nerve*. 2001;24(6):753-9.
182. Meek MF, Dijkstra JR, Den Dunnen WF, Ijkema-Paassen J, Schakenraad JM, Gramsbergen A, et al. Functional assessment of sciatic nerve reconstruction: biodegradable poly (DLLA-epsilon-CL) nerve guides versus autologous nerve grafts. *Microsurgery*. 1999;19(8):381-8.
183. Zavala A, Lu JC, Chang TN, Daniel BW, Chuang DC. Supercharge End-to-Side Motor Transfer to a Long Nerve Graft to Enhance Motor Regeneration: An Experimental Rat Study. *Plast Reconstr Surg*. 2023;152(1):85e-95e.
184. Akdeniz ZD, Bayramiçli M, Ateş F, Özkan N, Yucesoy CA, Ercan F. The role of botulinum toxin type a-induced motor endplates after peripheral nerve repair. *Muscle Nerve*. 2015;52(3):412-8.
185. Sarıtaş TB, Ertürk C, Büyükdoğan H, Yıldırım B, Gündüz N, Selek Ş. Effects of N-acetylcysteine on sciatic nerve healing: A histopathological, functional, and biochemical study of the rat sciatic nerve. *Jt Dis Relat Surg*. 2024;35(3):618-27.

186. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *Ilar j.* 2002;43(4):244-58.

187. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4):303-6.

188. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malays J Med Sci.* 2017;24(5):101-5.

189. Motulsky HJ, Brown RE. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:123.

190. National Guideline A. NICE Evidence Reviews Collection. Specific programmes and packages in nerve injury for people with complex rehabilitation needs after traumatic injury: Rehabilitation after traumatic injury: Evidence review C2. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE)

Copyright © NICE 2022.; 2022.

191. Dowdall T, Robinson I, Meert TF. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;80(1):93-108.

192. Korkmaz MF, Parlakpınar H, Erdem MN, Ceylan MF, Ediz L, Samdancı E, et al. The therapeutic efficacy of dexpanthenol on sciatic nerve injury in a rat model. *Br J Neurosurg.* 2020;34(4):397-401.

193. Boorman DC, Kang JWM, Keay KA. Peripheral nerve injury attenuates stress-induced Fos-family expression in the Locus Coeruleus of male Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 2019;1719:253-62.

194. Laddha AP, Kulkarni YA. Daidzein ameliorates peripheral neuropathy in Sprague Dawley rats. *Front Pharmacol.* 2024;15:1385419.

195. Dinh P, Hazel A, Palispis W, Suryadevara S, Gupta R. Functional assessment after sciatic nerve injury in a rat model. *Microsurgery*. 2009;29(8):644-9.
196. Varejão AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res*. 2004;26(2):186-94.
197. Walsh ME, Sloane LB, Fischer KE, Austad SN, Richardson A, Van Remmen H. Use of Nerve Conduction Velocity to Assess Peripheral Nerve Health in Aging Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70(11):1312-9.
198. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-801.
199. Diller RB, Tabor AJ. The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. *Biomimetics (Basel)*. 2022;7(3).
200. Salzer JL. Axonal regulation of Schwann cell ensheathment and myelination. *J Peripher Nerv Syst*. 2012;17 Suppl 3(0 3):14-9.
201. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci*. 1999;19(14):5731-40.
202. Fornasari BE, Carta G, Gambarotta G, Raimondo S. Natural-Based Biomaterials for Peripheral Nerve Injury Repair. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:554257.
203. Wang Y, Zhang Y, Li X, Zhang Q. The progress of biomaterials in peripheral nerve repair and regeneration. *Journal of Neurorestoratology*. 2020;8(4):252-69.
204. Cosky EEP, Ding Y. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and brain circulation after stroke. *Brain Circ*. 2018;4(2):73-5.

205. Verboket RD, Henrich D, Janko M, Sommer K, Neijhoft J, Söhling N, et al. Human Acellular Collagen Matrices-Clinical Opportunities in Tissue Replacement. *Int J Mol Sci.* 2024;25(13).
206. Wang YN, Sun N. [Application of acellular dermal matrix loaded collagen binding domain-vascular endothelial growth factor patch in urethral wound repair in beagles]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2021;101(36):2900-5.
207. Wang L, Shi Q, Dai J, Gu Y, Feng Y, Chen L. Increased vascularization promotes functional recovery in the transected spinal cord rats by implanted vascular endothelial growth factor-targeting collagen scaffold. *J Orthop Res.* 2018;36(3):1024-34.
208. Lu C, Meng D, Cao J, Xiao Z, Cui Y, Fan J, et al. Collagen scaffolds combined with collagen-binding ciliary neurotrophic factor facilitate facial nerve repair in mini-pigs. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(5):1669-76.
209. Fujimaki H, Uchida K, Inoue G, Miyagi M, Nemoto N, Saku T, et al. Oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor promote peripheral nerve regeneration in a 15 mm sciatic nerve defect rat model. *J Biomed Mater Res A.* 2017;105(1):8-14.
210. Watanabe Y, Sasaki R, Matsumine H, Yamato M, Okano T. Undifferentiated and differentiated adipose-derived stem cells improve nerve regeneration in a rat model of facial nerve defect. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(2):362-74.
211. Van Vlierberghe S, Graulus GJ, Keshari Samal S, Van Nieuwenhove I, Dubruel P. 12 - Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair. In: Netti PA, editor. *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*: Woodhead Publishing; 2014. p. 335-90.
212. Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, Zhang N, Ueno M, Yao Z, et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:386.

213. Gu D, Xia Y, Ding Z, Qian J, Gu X, Bai H, et al. Inflammation in the Peripheral Nervous System after Injury. *Biomedicines*. 2024;12(6).
214. Yang W, Hu P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J Orthop Translat*. 2018;13:25-32.
215. Dong C, Lv Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers (Basel)*. 2016;8(2).
216. Wang Y, Wang G, Hou X, Zhao Y, Chen B, Dai J, et al. Urethral Tissue Reconstruction Using the Acellular Dermal Matrix Patch Modified with Collagen-Binding VEGF in Beagle Urethral Injury Models. *Biomed Res Int*. 2021;2021:5502740.
217. Zhao X, Hu DA, Wu D, He F, Wang H, Huang L, et al. Applications of Biocompatible Scaffold Materials in Stem Cell-Based Cartilage Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:603444.
218. Li Y, Liu Y, Li R, Bai H, Zhu Z, Zhu L, et al. Collagen-based biomaterials for bone tissue engineering. *Materials & Design*. 2021;210:110049.
219. Qian Y, Song J, Zhao X, Chen W, Ouyang Y, Yuan W, et al. 3D Fabrication with Integration Molding of a Graphene Oxide/Polycaprolactone Nanoscaffold for Neurite Regeneration and Angiogenesis. *Adv Sci (Weinh)*. 2018;5(4):1700499.
220. Wang C, Jia Y, Yang W, Zhang C, Zhang K, Chai Y. Silk fibroin enhances peripheral nerve regeneration by improving vascularization within nerve conduits. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(7):2070-7.
221. Guaiquil VH, Pan Z, Karagianni N, Fukuoka S, Alegre G, Rosenblatt MI. VEGF-B selectively regenerates injured peripheral neurons and restores sensory and trophic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(48):17272-7.
222. Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(7):a020487.

223. Huang Y, Ye K, He A, Wan S, Wu M, Hu D, et al. Dual-layer conduit containing VEGF-A - Transfected Schwann cells promotes peripheral nerve regeneration via angiogenesis. *Acta Biomater.* 2024;180:323-36.
224. Wang Y, Tang Q, Zhu L, Huang R, Huang L, Koleini M, et al. Effects of Treatment of Treadmill Combined with Electro-Acupuncture on Tibia Bone Mass and Substance P Expression of Rabbits with Sciatic Nerve Injury. *PLoS One.* 2016;11(11):e0164652.
225. Lv T, Mo Y, Yu T, Zhang Y, Shao S, Luo Y, et al. An Investigation into the Rehabilitative Mechanism of Tuina in the Treatment of Sciatic Nerve Injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:5859298.
226. Türedi S, Yuluğ E, Alver A, Bodur A, İnce İ. A morphological and biochemical evaluation of the effects of quercetin on experimental sciatic nerve damage in rats. *Exp Ther Med.* 2018;15(4):3215-24.
227. Abdel Mohsen MA, Ali SM, Salama NM, Ali EA. Comparative Histological Study on the Effect of Erythropoietin Versus Curcumin on the Sciatic Nerve Crush Injury in a Rat Model. *Egyptian Journal of Histology.* 2022;45(1):192-207.
228. Ozyigit F, Kucuk A, Akcer S, Tosun M, Kocak FE, Kocak C, et al. Different dose-dependent effects of ebselen in sciatic nerve ischemia-reperfusion injury in rats. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015;15(4):36-43.
229. Guo Y, Du J, Xiao C, Xiang P, Deng Y, Hei Z, et al. Inhibition of ferroptosis-like cell death attenuates neuropathic pain reactions induced by peripheral nerve injury in rats. *Eur J Pain.* 2021;25(6):1227-40.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onay formu

