



**DENEYSEL MENTAL SİNİR HASARI OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA METİLKOBALAMİN VE SİTİKOLİN TEDAVİSİNİN
SİNİR DOKUSU ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKSİYONU, SİNİR
REJENERASYONU VE SKAR OLUŞUMUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Okan DEMİR

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Cüneyt Asım ARAL**

Uzmanlık Tezi 2025

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI**

**DENEYSEL MENTAL SİNİR HASARI OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
METİLKOBALAMİN VE SİTİKOLİN TEDAVİSİNİN SİNİR DOKUSU
ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKSİYONU, SİNİR REJENERASYONU VE SKAR
OLUŞUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Okan DEMİR

Periodontoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Cüneyt Asım ARAL**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TDH-
2024-3847 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2025**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığına

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Prof. Dr. Cüneyt Asım ARAL danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Deneyisel Mental Sinir Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Metilkobalamin Ve Sitikolin Tedavisinin Sinir Dokusu Üzerindeki Nöroproteksiyonu, Sinir Rejenerasyonu Ve Skar Oluşumunun Değerlendirilmesi” başlıklı uzmanlık tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 16/09/2025

Okan DEMİR

İMZA

İÇİNDEKİLER

ÖZET	x
ABSTRACT	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Trigeminal Sinir (Nervus Trigemini)	3
2.1.1 Nervus Ophthalmicus (Oftalmik sinir)	3
2.1.2 N. Maxillaris (Maksillar Sinir).....	4
2.1.3 N. Mandibularis (Mandibular Sinir)	5
2.2 Oral ve Maksilofasiyal Bölgede Sinir Yaralanmalarının Nedenleri	8
2.2.1 Lokal Anestezi Enjeksiyonuna Bağlı Gelişen Sinir Yaralanmaları	8
2.2.2 Gömülü Diş Çekimine Bağlı Oluşan Sinir Yaralanmaları.....	9
2.2.3 Dental İmplant Uygulaması Esnasında Oluşabilecek Sinir Hasarları.....	10
2.2.4 Ortognatik Cerrahiye Bağlı Gelişen Sinir Yaralanmaları	11
2.2.5 Maksillofasiyal Travma Kaynaklı Sinir Yaralanmaları	12
2.2.6. Eklem Cerrahisi Sırasında Oluşan Sinir Yaralanmaları.....	13
2.2.7 Periodontal ve Mukogingival Cerrahiye Bağlı Sinir Yaralanmaları.....	14
2.2.8 Periferik Sinir Yaralanmalarının diğer nedenleri.....	16
2.3 Periferik Sinir Yaralanmalarının Genişletilmiş Sınıflandırması	16
2.3.1 Seddon Sınıflaması (1943).....	16
2.3.2 Sunderland Sınıflaması (1951)	17
2.4 Wallerian Dejenerasyonu	18
2.5 Periferik Sinir Hasarı Modelleri.....	20
2.6 Periferik Sinir Hasarı Sonrası Meydana Gelen Değişiklikler ve Rejenerasyon.....	20
2.6.1 Hasar Tipine Göre Oluşan Değişiklikler.....	20
2.6.2 Hüresel ve Moleküler Değişiklikler	21
2.6.3 Rejenerasyonun Başarı Faktörleri	21
2.6.4 Klinik Uygulama ve Tedavi Yaklaşımları	21

2.7 Periferik Sinir Hasarı Sonrası Hücre Gövdesinde Meydana Gelen Değişiklikler.....	22
2.7.1 Kromatolizis (Nissl Substansının Dağılması)	22
2.7.2 Nükleusun Eksantrik Yer Değiştirmesi.....	22
2.7.3 Hücre Büyüklüğünde Artış	22
2.7.4 Gen Ekspresyonunda Değişiklikler.....	23
2.7.5 Mitokondriyal Aktivite ve Oksidatif Stres.....	23
2.7.6 Mikroglia ve Glia Hücresi Etkileşimi	23
2.8 Proksimal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler	23
2.8.1 Aksonal Retraksiyon ve Reorganizasyon	23
2.8.2 Mikrotübül ve Aktin Dinamiği	23
2.8.3 Nörotrofik Faktörlere Yanıt	24
2.8.4 Nöronal Rejeneratif Genlerin Aktivasyonu	24
2.8.5 İmmün Yanıt ve İnflamasyon	24
2.8.6 Rejeneratif Uçların Fagositozu	24
2.9 Distal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler	24
2.9.1 Aksonal Dejenerasyon	25
2.9.2 Miyelin Yıkımı.....	25
2.9.3 Makrofaj İnvazyonu.....	25
2.9.4 Schwann Hücre Aktivasyonu ve Yeniden Dizilimi	25
2.9.5 Ekstrasellüler Matriks ve Bazal Lamina Korunumu.....	25
2.9.6 İmmün Cevap ve Sitokin Salınımı	25
2.10 BDNF’ nin Periferik Sinir Hasarındaki Rolü.....	26
2.11 Caspase-3’ün Periferik Sinir Hasarındaki Rolü	26
2.12 MMP-9’un Periferik Sinir Hasarındaki Rolü.....	27
2.13 Sitikolin ve Sinir Üzerine Etkileri.....	28
2.14. Metilkobalamin ve Sinir Üzerine Etki Mekanizmaları	29
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1 Çalışma Dizaynı.....	31
3.1.1 Kısa dönem grubu (Sinir Hasarı Sonrası 7 Günlük Takip):.....	31
3.1.2 Uzun Dönem Grubu (Sinir Hasarı Sonrası 21 Günlük Takip):.....	32
3.2 Sinir Hasarı Oluşturmak İçin Kullanılan Cerrahi Yöntem.....	32
3.3 Sitikolinin Uygulanması	36
3.4 Metilkobalaminin Uygulanması.....	37

3.5 Soğuk Termal Uyarı Testi.....	38
3.6 Sakrifikasyon İşlemi	38
3.7 Kan Örneklerinin Alınması.....	39
3.8 Mental Sinir Örneklerinin Toplanması	39
3.9 Histopatolojik Analizler.....	40
3.9.1 Doku Takibi ve Gömme.....	40
3.9.2 Histomorfometrik değerlendirme.....	40
3.9.3 Frozen kesitte immünofloresan boyama yöntemi	41
3.9.4 İmmünofloresan Boyama.....	41
3.10 İstatistiksel Analiz	42
3.10.1 Örneklem Büyüklüğü.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1 Tam Kan Sayımı (CBC) Verileri	44
4.2 Biyokimya Verileri	46
4.3 Vücut Ağırlığı Verileri.....	47
4.4 Histolojik Bulgular.....	49
4.5 İmmünohistokimyasal Bulgular.....	54
5.TARTIŞMA	66
5.1. Özet Bulgular	66
5.2. Deneysel Hayvan Modeli.....	67
5.3. Metilkobalamin, Sitikolin ve Kombinasyon Tedavisi	68
5.4. Caspase-3, MMP-9 ve BDNF	71
5.5. Çalışmamızın CBC ve Biyokimya Bulguları.....	73
5.6. Çalışma Bulgularımız	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
KAYNAKLAR	80
EKLER.....	98
EK-1. Özgeçmiş	98
EK-2. Etik Kurul Onayı	99

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı yapmamı nasip eden, bana sağlık, sabır ve irade veren Yüce Allah'a hamd olsun.

Sahip olduğu müthiş akademik birikimi, bilimsel çalışmalarıyla alanımıza yaptığı katkıları ve en önemlisi mütevazı kişiliğiyle genç araştırmacıları cesaretlendiren tutumu için Prof. Dr. Alpdoğan Kantarcı'ya,

Lisans dönemimden itibaren öğrencisi olmaktan büyük bir gurur duyduğum, uzmanlık hayalleri kurmamı sağlayan; tanıdığım ilk günden beri nazik ve kibar yaklaşımıyla bana yol gösteren, bilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen, bizler için büyük bir şans ve ilham kaynağı olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Cüneyt Asım Aral'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisine ve akademik başarılarına hayran olduğum, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yol gösterici olan değerli hocam Doç. Dr. Kübra Aral'a,

Öğrencilik dönemimde önce asistan abim olarak her zaman yanımda hissettiren, uzmanlık dönemimde ise hocam olarak bilgi ve tecrübesiyle sürekli destek olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ömer Alperen Kırmızıgül'e,

Uzmanlık sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Arife Sabancı ve Dr. Öğr. Üyesi Vesile Elif Toy'a,

Deneyin her aşamasını titizlikle planlayan, bilgi ve tecrübesiyle daima yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Onural Özhan'a ve çalışkan, özverili farmakoloji asistanlarına,

Tezimin histolojik incelemelerini titizlikle gerçekleştiren ve tüm aksiliklere rağmen büyük özveriyle çok değerli katkılar sunan hocalarım Prof. Dr. Arzu Hanım Yay ve Arş.Gör Özge Cengiz Mat'a,

Deneysel süreçlerde yardımlarını gördüğüm, sabır ve özverileriyle çalışmamın ilerlemesine katkıda bulunan arkadaşlarıma ve çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca bana koşulsuz sevgi ve destek veren, beni her zaman yüreklendiren, bana her şeyden önce merhameti, ahlakı ve saygıyı öğreten canım annem

Nurgül Demir'e, sevgili babam Ayhan Demir'e, kardeşlerim Muhammed İsmail Demir ve Nida Balcıoğlu'na ve babannem Meryem Demir'e,

Hayatıma girdiği günden beri beni dünyanın en şanslı insanı yapan, en zor anlarımda yanımda olup onları unutturan, desteği ile beni hep daha iyiye yönlendiren, en çok sevdiğim, en kıymetlim canım eşim Tuğba Demir'e ve bana babalığı tattıran, her zaman gözlerinin içi gülen canım oğlum Emir Ahlas Demir'e

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.



ÖZET

Deneyisel Mental Sinir Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Metilkobalamin Ve Sitikolin Tedavisinin Sinir Dokusu Üzerindeki Nöroproteksiyonu, Sinir Rejenerasyonu Ve Skar Oluşumunun Değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan mental sinir hasarında sitikolin ve metilkobalamin tedavisinin tek başına ve kombine kullanımının nöroprotektif etkileri, sinir rejenerasyonu ve immünohistokimyasal belirteçler üzerine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metot: Sprague Dawley ratlarda mental sinir üzerinde travmatik sinir hasarı modeli oluşturulmuştur. Hayvanlar kontrol, hasar ve tedavi gruplarına ayrılmıştır (sitikolin, metilkobalamin ve kombine tedavi). Deneysel gruplar 7. ve 21. günlerde sakrifiye edilerek histolojik (akson sayısı ve çapı), biyokimyasal (AST, ALT, LDH, kreatinin, BUN) ve hematolojik parametreler ile immünohistokimyasal (Caspase-3, MMP-9, BDNF) belirteçler değerlendirilmiştir.

Bulgular: Hasar gruplarında akson sayısı ve çapı anlamlı şekilde azalmışken, kombine tedavi grubunda bu parametreler belirgin artış göstermiştir ($p<0.001$). Tek ajan tedavilerde düzelme olsa da, kombinasyon tedavisi aksonal rejenerasyonda en güçlü etkiyi sağlamıştır. 7. günde tüm gruplara göre hasar grubunda Caspase-3, MMP-9 ve BDNF düzeyleri yüksektir ($p<0.001$). Kombine tedavi grubunda hasar grubuna kıyasla Caspase-3 ve MMP-9 düzeylerinde azalma ($p<0.01$), BDNF’de ise artış gözlenmiştir ($p<0.05$). 21. günde de benzer şekilde, kombinasyon tedavisi Caspase-3 düzeylerini tüm gruplara göre en düşük ($p<0.001$) ve aksonal parametreleri en yüksek düzeyde bulunmuştur ($p<0.001$).

Sonuç: Sitikolin ve metilkobalamin, deneysel mental sinir yaralanmasında tek başına uygulandığında dahi histopatolojik hasarı azaltmış, ancak kombinasyon tedavisi (HCM) akson sayısı ve çapında en belirgin artışı sağlamış ve 21. günde en düşük Caspase-3 düzeylerini ortaya koyarak sinerjik nöroprotektif/nörorejeneratif etki göstermiştir. Kombine tedavi, periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde tek ajanlara kıyasla daha üstün bir terapötik potansiyel taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mental sinir, Sitikolin, Vitamin B12, Nöroproteksiyon, Rejenerasyon

ABSTRACT

Evaluation of the Neuroprotective Effects of Methylcobalamin and Citicoline Treatment on Nerve Tissue, Nerve Regeneration, and Scar Formation in Rats with Experimentally Induced Mental Nerve Damage

Objective: The present study aimed to investigate the neuroprotective effects of citicoline and methylcobalamin, administered alone or in combination, on nerve regeneration and immunohistochemical markers in an experimental model of mental nerve injury.

Materials and Methods: Mental nerve injury was induced in Sprague Dawley rats. Animals were divided into control, injury, and treatment groups (citicoline, methylcobalamin, and combined therapy). On days 7 and 21, animals were sacrificed, and histological (axon number and diameter), biochemical (AST, ALT, LDH, creatinine, BUN), hematological parameters, and immunohistochemical markers (Caspase-3, MMP-9, BDNF) were evaluated.

Results: In the injury groups, axon number and diameter were significantly reduced, whereas all treatment groups showed improvement. Notably, combined therapy demonstrated the most pronounced regenerative effect, with a marked increase in axon number and diameter ($p < 0.001$). On day 7, Caspase-3 and MMP-9 expression increased in the injury group, while BDNF levels were elevated. Combined therapy produced the greatest reduction in Caspase-3 and MMP-9 levels and the highest BDNF increase compared with single-agent groups. On day 21, combined therapy continued to suppress apoptotic activity and maintained the strongest support for regenerative processes, surpassing the effects of citicoline or methylcobalamin alone.

Conclusion: Citicoline and methylcobalamin, particularly in **combination**, exert superior neuroprotective effects following mental nerve injury by enhancing axonal regeneration, strongly suppressing apoptotic pathways, and modulating BDNF. Combined therapy appears to have greater therapeutic potential than single-agent treatments for peripheral nerve injuries.

Keywords: Mental nerve, Citicoline, Vitamin B12, Neuroprotection, Regeneration

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
B12	: Vitamin B12
BCL-2	: B-cell Lymphoma-2 (apoptozis inhibitör proteini)
BDNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (Brain-Derived Neurotrophic Factor)
BSSO	: Bilateral Sagittal Split Osteotomy
BUN	: Kan Üre Azotu (Blood Urea Nitrogen)
CDP-Kolin	: Sitidin-5'-Difosfat Kolin (sitikolin)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DRG	: Dorsal Root Ganglion (Dorsal Kök Gangliyonu)
EMG	: Elektromiyografi
ERK1/2	: Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
GAP-43	: Growth Associated Protein-43 (Büyüme ile İlişkili Protein-43)
GDNF	: Glial-Derived Neurotrophic Factor (Glia Kaynaklı Nörotrofik Faktör)
IAN	: N. alveolaris inferior
IANB	: Inferior Alveolar Nerve Block (Mandibuler Anestezi Bloğu)
IL-1 Beta	: Interlökin-1 Beta
IL-10	: Interlökin-10
IL-6	: Interlökin-6
JAK/STAT	: Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription Yolağı
KIBT	: Konik Işınli Bilgisayarlı Tomografi
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPK/ERK	: Mitogen-Activated Protein Kinase / Extracellular Signal-Regulated Kinase Yolağı
MCAO	: Middle Cerebral Artery Occlusion (Orta Serebral Arter Tıkanıklığı Modeli)
MMP-2	: Matriks Metalloproteinaz-2

MMP-9	: Matriks Metalloproteinaz-9
Mrna	: Messenger RNA (Haberci RNA)
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
N-CAM	: Neural Cell Adhesion Molecule (Sinir Hücre Adezyon Molekülü)
NCS	: Sinir İletim Çalışması (Nerve Conduction Study)
NGF	: Nerve Growth Factor (Sinir Büyüme Faktörü)
ONC	: Optik Sinir Ezilme Modeli (Optic Nerve Crush)
PI3K/Akt	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz / Protein Kinaz B Yolağı
PM2.5	: Partikül Madde 2.5 µm
SAM	: S-Adenosil Metiyonin
SFI	: Sciatic Functional Index (Siyatik Fonksiyonel İndeks)
SIRT-1	: Sirtuin-1 (NAD ⁺ bağımlı deasetilaz)
TIMP-1	: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1
TIMP-3	: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3
TME	: Temporomandibular Eklem
TNF-Alfa	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
TrkB	: Tropomyosin receptor kinase B (BDNF reseptörü)
Val66Met	: BDNF geninde valin → metiyonin polimorfizmi
zVAD-fmk	: Pan-kaspaz inhibitörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 3.1. Çalışma dizaynı ve akış şeması	32
Şekil 3.2. İnsizyon öncesi anesteziye alınmış ve traş edilmiş rat	33
Şekil 3.3. Mental sinirin açığa çıkarılması	34
Şekil 3.4. Açığa çıkarılmış mental sinirine handle ile anevrizma klipsinin uygulanması	34
Şekil 3.5. Mental sinirin 60 saniye boyunca anevrizma klipsi ile hasarlanması	35
Şekil 3.6. Hasara uğramış mental sinir	35
Şekil 3.7. Cildin 6-0 PGA suture ile kapatılması	36
Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan Sitikolin formu.....	36
Şekil 3.9. Sitikolin'in intraperitoneal uygulanması	37
Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan metilkobalamin formu	37
Şekil 3.11. Metilkobalamin'in intraperitoneal uygulanması	38
Şekil 4.1. 7. Ve 21. Gün deney gruplarına ait Oil Red O boyama görüntüleri (X100). Kırmızı ok; miyelinli sinir lifi kaybı, siyah ok; aksonal dejenerasyon, yıldız; ödem. Ölçek çubukları= 20 µm.	53
Şekil 4.2. 7. gün deney gruplarına ait Caspase-3 immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 µm.	54
Şekil 4.3. 21. gün deney gruplarına ait Caspase-3 immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 µm.	55
Şekil 4.4. 7. gün deney gruplarına ait MMP-9 immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 µm.	56
Şekil 4.5. 21. gün deney gruplarına ait MMP-9 immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 µm.	57
Şekil 4.6. 7. gün deney gruplarına ait BDNF immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 µm.	58
Şekil 4.7. 21. gün deney gruplarına ait BDNF immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 µm.	59

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Sitikolinin etki mekanizması	29
Tablo 2.2. Metilkobalaminin etki mekanizması.....	30
Tablo 3.1. Oil Red O boyama protokolü.....	40
Tablo 3.2. İmmüno Floresan boyama protokolü.....	41
Tablo 4.1. 21. Gün tam kan sayımı (CBC) bulguları	44
Tablo 4.2. 21. Gün biyokimya bulguları	46
Tablo 4.3. Vücut ağırlıklarının gruplar ve zaman dilimleri arasında karşılaştırılması	48
Tablo 4.4. Akson sayısı ve çapının 7. ve 21. gün grupları arasında karşılaştırılması	50
Tablo 4.5. Caspase-3, MMP-9 ve BDNF immünreaksiyonlarının 7. gün grupları arasında karşılaştırılması	60
Tablo 4.7. Caspase-3, MMP-9 ve BDNF immünreaksiyonlarının 7. ve 21. gün arasında karşılaştırılması	64

1. GİRİŞ

Periferik sinir yaralanmaları travmatik, cerrahi ya da iatrojenik nedenlerle gelişebilen, sıklıkla motor ve duysal bozukluklarla sonuçlanan önemli klinik durumlardır. Diş hekimliğinde özellikle mandibula bölgesine yönelik cerrahi işlemler, mental sinir gibi kritik yapılar üzerinde iatrojenik hasar riski taşımaktadır. Mental sinir yaralanmaları sonucunda gelişen parestezi, disestezi ve duyu kaybı gibi sekeller hastaların yaşam kalitesini ciddi ölçüde etkileyebilir (1-3). Bu nedenle, sinir rejenerasyonunu destekleyici tedavi modaliteleri araştırmalarda öncelikli alan haline gelmiştir.

Sinir hasarını takiben gerçekleşen Wallerian dejenerasyonu süreci: aksonal yıkım, Schwann hücre proliferasyonu ve makrofaj infiltrasyonu ile karakterizedir (4, 5). Bu süreç, aksonal yeniden büyümeyi başlatmakla birlikte, epinöral skar dokusu oluşumu nedeniyle rejenerasyon çoğu zaman sınırlı kalmaktadır (6). Rejenerasyonun etkinliği, çeşitli hücresel ve moleküler mekanizmaların bir arada çalışmasına bağlıdır. Bu nedenle, sinir rejenerasyonunu artırmaya yönelik farmakolojik ajanlar önemli bir potansiyel taşımaktadır.

Sitikolin (CDP-kolin), fosfatidilkolin sentezinin anahtar ara ürünlerinden biri olup, hücre membran stabilitesinin korunması, nöronal enerji metabolizmasının desteklenmesi ve serbest radikal üretiminin azaltılması yoluyla nöroprotektif etki göstermektedir (7, 8). Yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda, sitikolin uygulamasının siniri çevreleyen bağ dokusunda skar dokusu oluşumunu azalttığı ve fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir (6, 9, 10). Ayrıca, düşük doz uygulamalarında dahi elektriksel iletim fonksiyonlarını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (10).

Metilkobalamin vitamin B12'nin metillenmiş aktif formu olup periferik sinir rejenerasyonunu destekleyen bir diğer önemli ajandır. Özellikle diyabetik nöropati modellerinde protein kinaz C yolları üzerinden nöronal metabolizmayı düzenlemektedir (11). Ayrıca literatürde, metilkobalaminin schwann hücrelerinde miyelin sentezini uyarması (12, 13), sinir ileti hızını artırması (13), oksidatif stresin baskılanması ve mikrotübül/sitoskeletal yapının korunması yoluyla etkili olduğu bildirilmiştir (14, 15). Deneysel çalışmalar, metilkobalaminin diyabetik nöropati, travmatik sinir hasarı ve inflamasyon ilişkili durumlarda sinir iyileşmesini artırdığını göstermiştir (11-15).

Caspase-3, programlı hücre ölümünü (apoptoz) gösteren bir belirteçtir ve nöronal hücre kaybını saptamada kullanılmaktadır (16). Caspase-3, poli(ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1), poli(ADP-riboz) polimeraz-2 (PARP-2), ataksi telenjiyektazi ile ilişkili protein kinaz (ATM), DNA-bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi (DNA-PKcs) gibi DNA onarımında görev alan proteinleri keserek bu proteinlerin tamir aktivitelerini inaktive eder; böylece hücrenin DNA tamir kapasitesini ortadan kaldırarak apoptozun ilerlemesine önemli ölçüde katkıda bulunur (17). Aynı zamanda Caspase-3, apoptotik hücre ölümü ile öncelikli olarak ilişkilendirilen kaspazlar, hücre farklılaşması, hücre döngüsü ilerlemesi, proteostaz ve hücre yeniden yapılanma gibi çok sayıda apoptotik olmayan süreçte de rol almaktadır (18). Matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleri, özellikle tip IV kolajen olmak üzere kollajenleri doğrudan proteolitik olarak yıkarak doku remodelasyonunda ve bazal membran bütünlüğünün bozulmasında kritik rol oynar (19, 20). MMP-9, siniri çevreleyen bağ dokusunda skar dokusunun oluşumuna aracılık eden bir yapıdır (9) ve MMP-9'un, ekstraselüler matriksi parçalayarak ve astrosit migrasyonunu kolaylaştırarak glial skar oluşumunda kritik rol oynadığı bilinmektedir(21). Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF) ise aksonal büyüme ve sinaptik plastisiteyi artırarak rejeneratif kapasiteyi destekler (22, 23). Bununla birlikte BDNF (Beyin Türevi Nörotrofik Faktör), Trozin Kinaz B (TrkB) reseptörü aracılığıyla sinir hücrelerinin hayatta kalmasını teşvik eder ve periferik sinir yaralanması sonrası Schwann hücrelerini aktive ederek sinir dokusunda rejenerasyonu destekler (24). Bu belirteçlerin ekspresyon düzeyleri, uygulanan farmakolojik ajanların etkinliğinin değerlendirilmesinde önemli bir gösterge olarak kullanılmaktadır (9, 16, 22). Literatürde metilkobalamin ve sitikolinin MMP-9, Caspase-3 ve BDNF'yi etkileyerek sinir hasarının onarımında rol oynadıkları gösterilmiştir (12, 25, 26)

Bu çalışmada, ratlarda oluşturulan mental sinir hasarı modelinde sistemik olarak uygulanan sitikolin ve metilkobalaminin tek başına ve kombine uygulamalarının sinir dokusu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Histolojik ve immünohistokimyasal düzeyde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmanın hipotezi, sitikolin ve metilkobalaminin kombine kullanımının sinir rejenerasyonunu hızlandıracağı, apoptoz göstergelerini azaltacağı ve skar dokusu oluşumunu sınırlayarak iyileşme sürecine katkı sağlayacağıdır. Bulguların, diş hekimliğinde sıklıkla karşılaşılan periferik sinir yaralanmalarının farmakolojik tedavisinde yeni yaklaşım modelleri oluşturulmasına katkı sağlaması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Trigeminal Sinir (Nervus Trigeminus)

Trigeminal sinir (N. trigeminus), beyin sapından çıkan beşinci kraniyal sinir olup hem duyuşal hem de motor lifler içerir. İnsan vücudundaki en kalın kraniyal sinir olup baş-boyun bölgesinin duyuşal innervasyonunun büyük kısmından sorumludur ve aynı zamanda çiğneme kaslarının motor innervasyonunu sağlar (27, 28). Trigeminal sinir, embriyolojik olarak nöral krest hücrelerinden köken alır. Gelişimsel olarak ilk brankiyal arkusla ilişkilidir ve bu yapıdan gelişen masseter, temporalis, digastricus anterior gibi kasların motor innervasyonunu sağlar (29). Sinir beyin sapının pons bölgesinin lateral yüzeyinden çıkar. Beyin sapından çıktıktan sonra trigeminal ganglion veya Gasser ganglionu adı verilen geniş bir duyu ganglionu oluşturur. Bu ganglion temporal kemiğin petrous kısmında yer alan Meckel mağarası adı verilen bir çöküntü içinde bulunur. Buradan sonra N. ophthalmicus, N. maxillaris ve N. mandibularis olmak üzere sinir üç ana dala ayrılır. Trigeminal sinirin duyuşal liflerinin hücre gövdeleri Gasser ganglionunda bulunur; bu ganglion, spinal ganglionlara benzer şekilde psödonipolar nöronlardan oluşur. Trigeminal sinirin dalları, kraniyofasiyal bölgedeki ana yapılara yakın ilişkidir. Örneğin: N. maxillaris, foramen rotundumdan geçerek fossa pterygopalatina'ya ulaşır. N. mandibularis, foramen ovale'den geçerek infratemporal fossaya girer. N. ophthalmicus, fissura orbitalis superiordan orbitaya girer. Bu ilişkiler hem cerrahi girişimler hem de radyolojik değerlendirmelerde büyük önem taşır (27-30).

Trigeminal sinirin beyin sapında dört farklı çekirdeği vardır. Bunlardan Nucleus mesencephalicus çiğneme kaslarından gelen kas içiği bilgileri gibi propriyosepsiyon duyuşunu almaktadır. İkincisi Nucleus principalis dokunma ve basınç duyuşunu almaktadır. Bir diğeri Nucleus spinalis nervi trigemini ağrı ve sıcaklık duyuşunu algılayıp servikal omuriliğe kadar uzanmaktadır. Sonuncusu Nucleus motorius nervi trigemini ise trigeminal sinirin motor çekirdeğidir ve çiğneme kaslarını innerve eden lifleri barındırır (31).

2.1.1 Nervus Ophthalmicus (Oftalmik sinir)

Trigeminal sinirin üç ana dalından biri olup sadece duyuşal lifler taşır. Trigeminal gangliondan çıktıktan sonra cavernous sinusun lateral duvarında seyrederek fissure

orbitalis superior (FOS) yoluyla orbita içine girer. Burada n. lacrimalis, n. frontalis ve n. nasociliaris olarak üç ana dala ayrılır (32, 33). Bu dallar; göz, konjonktiva, burun mukozası, frontal sinüs, etmoid sinüs, burun kökü, alın, göz kapakları ve anterior kraniyal fossa dura materine duyuusal innervasyon sağlar (32-34).

N. ophthalmicusun dallarından N. lacrimalis gözyaşı bezine, lateral konjonktivaya ve üst göz kapağına duyuusal lifler taşır. Ayrıca zygomatic sinirden gelen parasempatik lifleri taşır.

N. frontalis, N. supraorbitalis ve N. supratrochlearis olarak ikiye ayrılır ve alın, kafa derisi ve üst göz kapağına duyuusal lif sağlar (32). Son dalı olan N. nasociliaris ise burun mukozası, kornea, iris, corpus ciliare ve anterior etmoid sinüs gibi derin yapılara uzanır. Ayrıca siliyer ganglion ile bağlantı kurarak sempatik ve parasempatik liflerin geçişini sağlar (33).

2.1.2 N. Maxillaris (Maksillar Sinir)

Maksillar sinir, trigeminal sinirin üç ana dalından ikincisi olup, sadece somatik duyuusal lifler taşır. Trigeminal gangliondan ayrıldıktan sonra, cavernous sinüsün lateral duvarında ilerleyerek foramen rotundum aracılığıyla pterygopalatin fossaya girer. Buradan geçerek infraorbital kanal ve foramen infraorbitale yoluyla yüzeysel dallarına ulaşır. Maksillar sinir, başlıca orta yüz bölgesi, yanak, üst dişler, maksilla mukozası, maksiller sinüs, nazal kavite ve dura materin belirli bölgelerinden duyuusal innervasyon sağlar (35, 36).

N. maksillaris, anatomik seyri boyunca çok sayıda dal verir. Bu dallar genel olarak üç anatomik bölgede gruplanabilir: Fossa pterygopalatina'daki dallar; N. zygomaticus (zygomaticofacialis ve zygomaticotemporalis dallarıyla birlikte), Nn. pterygopalatini (n. nasopalatinus, n. palatinus majores ve minores) ve Nn. alveolares posteriores superiores olarak tanımlanır (37). Infraorbital kanal içinde yer alan dallardan n. alveolaris superior medius ve n. alveolaris superior anterior, üst çenenin premolar ve kesici dişlerine uzanır (38). Yüzeysel terminal dallar olan rami palpebrales inferiores, rami nasales externi ve rami labiales superiores; sırasıyla alt göz kapağı, burun kanadı ve üst dudak cildine duyuusal innervasyon sağlar (35-37).

Maxillar sinir, trigeminal sistemin somatik duyuusal komponenti olarak, baş-boyun bölgesinde yüzeysel ve derin duyuuların (ağrı, dokunma, sıcaklık, basınç) beyin sapına iletimini sağlar. Bu duyuular pons düzeyinde bulunan temel duyu çekirdeği ve nucleus spinalis nervi trigemini'ne yönlendirilir (36-39).

Maksillar sinir, özellikle dental ve maksillofasiyal cerrahide sıklıkla hedef alınır. Maxillar sinir blokajı, hem diş çekimleri hem de orta yüz cerrahisi öncesi tercih edilen etkili bir anestezi yöntemidir. Ancak, fossa pterygopalatinaya girilen tekniklerde nadiren de olsa diplopi, hematoma, sinir hasarı gibi komplikasyonlar bildirilmiştir (40). Ayrıca, herpes zoster enfeksiyonları da maksillar sinir bölgesinde şiddetli nevraljik ağrılarla kendini gösterebilir (41).

2.1.3 N. Mandibularis (Mandibular Sinir)

N. mandibularis, N. trigeminus'un (üçüncü ve en kalın dalı olup, diğer iki daldan farklı olarak hem somatik duyuşal hem de brankiyal motor lifler içerir. Embriyolojik olarak birinci faringeal arkustan köken alır ve hem çiğneme kaslarının motor innervasyonunu hem de alt yüz, çene ve ağız bölgesinin duyuşal innervasyonunu sağlar (42, 43). Trigeminal gangliondan çıkan mandibular sinir, kafa boşluğunu foramen ovale'den geçerek terk eder ve infratemporal fossaya girer. Bu bölgede motor ve duyuşal dallarına ayrılır. Duyuşal liflerin hücre gövdeleri trigeminal ganglionda bulunurken, motor lifler beyin sapındaki motor trigeminal çekirdekten kaynaklanır (42).

Duyuşal dallar arasında yer alan N. auriculotemporalis, temporal bölge, dış kulak ve parotis bezine duyuşal innervasyon sağlar. N. buccalis yanak mukozası ve cildinden duyuşal bilgi taşıırken, N. Lingualis dilin ön üçte ikilik kısmının genel duyuşunu iletir. N. alveolaris inferior ise alt dişler, diş etleri ve mandibular bölgeye duyuşal innervasyon sağlamakta olup mental foramen'den çıktıktan sonra N. mentalis adını alarak alt dudak ve çene cildine ulaşır.(43, 44).

Fonksiyonel olarak, N. mandibularis hem çiğneme fonksiyonu hem de alt yüz bölgesinin duyuşal bütünlüğünün sağlanmasında merkezi rol oynar. Ayrıca tensor tympani kası aracılığıyla ses iletimine katkıda bulunur. N. lingualis aracılığıyla chorda tympani ile birleşerek tat duyuşu taşır. (43).

Klinik açıdan, N. mandibularis başta alt çene bölgesindeki dental işlemler olmak üzere lokal anestezi ve cerrahi girişimlerde sıklıkla hedef alınan bir sinirdir. Özellikle N. alveolaris inferior bloğu (IANB), dental işlemler öncesinde yaygın şekilde uygulanmaktadır. Ancak bu işlem sonrasında geçici ya da kalıcı parestezi, disestezi ve nadiren sinir hasarı görülebilir. IANB sonrası kalıcı sinir hasarı riskini yaklaşık 1/26.000 olarak bildirmiştir (45).

Literatürde Amerika'da bildirilen 248 parestezi olgusunun %94.5'inin IANB sonrasında ortaya çıktığı ve bu vakaların %89'unda N. lingualis'in etkilendiğı

raporlanmıştır. Ayrıca %4'lük artikain gibi yüksek konsantrasyonlu lokal anesteziklerin sinir hasarı riskini artırabileceği belirtilmiştir (46).

N. mandibularis, trigeminal nevralji olgularında da sık etkilenen bir daldır. Alt yüz, çene ve dudakta ani elektrik çarpması tarzında ağrılarla karakterize olan bu durum; radyofrekans ablasyon, mikrovasküler dekompresyon gibi yöntemlerle tedavi edilebilir (47).

Ortognatik cerrahilerde, özellikle mandibulanın geriye alındığı operasyonlarda, N. alveolaris inferior travmatize olabilir. Literatürde bu tür cerrahilerden sonra sinir hasarı oranını %3–10 arasında bildirmiştir (48).

N. Alveolaris Inferior

N. alveolaris inferior (IAN), N. mandibularis'in en önemli ve en sık klinik müdahaleye maruz kalan duysal dalıdır. Trigeminal sinirin üçüncü dalı olan mandibular sinir, foramen ovale'den çıktıktan sonra infratemporal fossaya girer ve burada posterior trunkusundan ayrılarak N. alveolaris inferior olarak devam eder (49, 50). Sinir, mandibular foramen yoluyla mandibular kanala girer ve burada alt çene dişlerine, dişetine ve kemik dokusuna duysal innervasyon sağlar.

IAN, mandibula boyunca kanal içinde ilerlerken küçük dallar vererek alt kesici, kanin ve molar dişler, periodontal ligament, alveol kemiği ve vestibüler dişeti gibi yapılara innervasyon sağlar. Mandibular kanalın sonuna ulaştığında foramen mentale'den dışarı çıkar ve burada N. mentalis adını alarak alt dudak, çene derisi ve premolar vestibüler dişetine duysal lifler gönderir (50, 51).

IAN, mandibular kanal içinde seyrederken N. mylohyoideus adlı motor dalı da verir. Bu dal mandibular foramenin hemen proksimalinde ayrılır ve M. mylohyoideus ile M. digastricus'un anterior karnını innerve eder. Bu yönüyle IAN, çoğunlukla duysal bir sinir olmakla birlikte sınırlı motor fonksiyona da sahiptir (49).

IAN, alt çene bölgesindeki tüm dental işlemler, özellikle de üçüncü molar çekimi, dental implant uygulamaları, ortognatik cerrahiler ve lokal anestezi Inferior Alveolar Sinir Bloğu (IAN bloğu) sırasında sıklıkla hedef alınır veya zedelenme riski taşır. Yapılan çalışmalarda, dental implant yerleştirme sonrası sinir hasarı oranları geçici parestezi için %5–13, kalıcı duyu kaybı için ise %1–6 arasında değişmektedir (52).

Üçüncü molar cerrahisi sonrası geçici IAN hasarı riski yaklaşık %2, kalıcı hasar oranı ise %0.2 olarak bildirilmiştir. Özellikle derin gömülü ve sinire yakın pozisyonundaki üçüncü molar çekimlerinde bu oran artış göstermektedir (53).

2024 yılında yayımlanan bir çalışmada, konik ışınli bilgisayarlı tomografi (KIBT) ile görüntüleme vasıtasıyla mandibular kanalın bireysel anatomik varyasyonlarının yüksek doğrulukla saptanabildiği ve sinir hasarı riskinin bu yöntemle önemli ölçüde azaltılabildiği gösterilmiştir (54).

N. Mentalis (Mental Sinir)

N. mentalis, trigeminal sinirin üçüncü dalı olan N. mandibularis'ten çıkan N. alveolaris inferior'un terminal duyusal dalıdır. Mandibular kanalda ilerleyen n. alveolaris inferior, foramen mentale'den çıktıktan sonra N. mentalis adını alır. Bu sinir, alt dudak, çene derisi ve alt anterior bölgedeki vestibüler diş etine duyusal innervasyon sağlar (49, 50).

Anatomik olarak, foramen mentale genellikle ikinci premolar dişin apikalinde konumlanır. Ancak çeşitli çalışmalar, bu konumun bireyler arasında değişkenlik gösterebileceğini ve bazen birinci molar ya da birinci premolar hizasında da bulunabileceğini belirtmektedir. Ayrıca bazı bireylerde, tek değil çift foramen mentale bulunabilir ve bu varyasyonlar sinir hasarı riskini doğrudan etkileyebilir (55).

N. mentalis, foramen mentale'den çıktıktan sonra genellikle üç ana dala ayrılır ve alt dudak cildine, çene derisine ve premolar vestibüler dişetine yönelir. Sinir lifleri süperfisiyel olarak seyrettiğinden dolayı cerrahi işlemler sırasında zedelenme riski yüksektir (56).

N. mentalis klinik olarak en sık implant cerrahisi, alveoler rezeksiyon, le fort I osteotomileri, çene fraktürleri ve foramen mentale çevresindeki tümör rezeksiyonları sırasında zarar görebilir. Özellikle foramen mentale çevresine yerleştirilen dental implantlar sonrası parestezi, hipoestezi ya da nöropatik ağrı gibi duyusal bozukluklar görülebilir (57).

Gözlemsel çalışmalarda, mental sinir çevresine implant uygulanan hastalarda geçici parestezi oranı %5–7 arasında bildirilmiştir. Bu pareteziler çoğunlukla birkaç hafta içinde gerilese de, bazı vakalarda kalıcı olabilir (53).

N. mentalis nöropatisi, onkolojik hastalarda da görülebilen nadir fakat önemli bir klinik tablodur. Özellikle metastatik malignitelere bağlı olarak mandibular sinir tutulumu sonucunda ortaya çıkan bu durum, alt dudakta uyuşma ya da yanma hissiyle karakterizedir. Literatürde bu tabloya mental sinir sendromu adı verilir ve sıklıkla altta yatan maligniteyi gösteren önemli bir bulgudur (58).

Foramen mentale'nin lokalizasyonunun doğru belirlenmesi, özellikle cerrahi planlamada kritik öneme sahiptir. KIBT gibi üç boyutlu görüntüleme yöntemleri, hem foramen mentale'nin yerini belirlemede hem de sinirin hasar riskini azaltmada etkilidir (59).

Cerrahi işlemler sırasında mental sinirin korunması için önerilen başlıca yöntemler arasında, foramen mentale'den en az 2 mm mesafe bırakılması, anatomik varyasyonların preoperatif olarak KIBT ile değerlendirilmesi ve keskin ya da aşırı eğimli kemik yüzeylerinden kaçınılması yer almaktadır (56, 59).

2.2 Oral ve Maksilofasiyal Bölgede Sinir Yaralanmalarının Nedenleri

2.2.1 Lokal Anestezi Enjeksiyonuna Bağlı Gelişen Sinir Yaralanmaları

Diş hekimliğinde sık uygulanan lokal anestezi prosedürleri genellikle güvenli kabul edilse de, nadiren periferik sinir yaralanmalarına yol açabilir. Özellikle N. alveolaris inferior ve N. lingualis, mandibular blok anestezileri sırasında zedelenme açısından en riskli yapılardır (45).

Lokal anesteziye bağlı sinir hasarı, çeşitli mekanizmalarla meydana gelebilir. İğne travması, enjeksiyon sırasında iğnenin doğrudan sinir yapısına temas etmesi sonucu epinöral ya da intranöral travmanın oluşmasıyla gerçekleşir ve bu durumda hasta genellikle enjeksiyon sırasında “elektrik çarpması” benzeri bir his tarif eder (60). Nörotoksisite, özellikle %4 konsantrasyonundaki articaine ve prilocaine gibi lokal anesteziklerin sinir hücrelerinde toksik etkiler yaratabileceği düşüncesine dayanmaktadır (46).

Ayrıca, inflamasyon ve basınç etkisi de bir diğer mekanizmadır; lokal anestezik volümünün fazla olması veya perinöral alana enjeksiyon yapılması, ödem ve basıya bağlı sekonder sinir hasarına yol açabilir (61).

En sık etkilenen sinirler arasında N. lingualis, %70–90 oranla en yüksek sıklıkta görülen sinir hasarı bölgesidir. N. alveolaris inferior'da ise alt dudak ve çene cildinde duyu bozuklukları gelişebilir. Daha nadir olarak N. buccalis veya N. infraorbitalis gibi sinirlerde de komplikasyonlar bildirilmiştir (62).

Klinik olarak uyuşukluk (hipoestezi), karıncalanma ve yanma hissi (parestezi, disestezi), tat duyusu kaybı (özellikle lingual sinir tutulduğunda), spontan ağrı veya allodini gibi belirtiler görülebilir. Bu bulgular genellikle tek taraflıdır ve çoğu vakada 6 ay içinde kısmen ya da tamamen iyileşme gösterebilir (63).

Lokal anesteziye bağı kalıcı sinir hasarı riski genel olarak 1/26.000–1/160.000 arasında değişmektedir. Pogrel bu oranı 1/26.762 olarak bildirmiştir. Garisto ve arkadaşlarının çalışmasında bildirilen 248 parestezi vakasının %94,5'inin IAN bloğu sonrası geliştiği, bu vakaların %89'unda ise lingual sinirin etkilendiği saptanmıştır (46).

Tedavi yaklaşımları üç ana başlıkta değerlendirilebilir. Konservatif yaklaşımda ilk 3 ay içerisinde kortikosteroidler, B12 vitamini (metilkobalamin), nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar (NSAID) ve fotobiyomodülasyon uygulamalarını içerir. Medikal tedavide nöropatik ağrıya yönelik olarak gabapentin veya pregabalin gibi ilaçlar kullanılabilir. Hasarın 6 aydan uzun sürdüğü durumlarda ise cerrahi yaklaşım tercih edilir; bu durumda mikrocerrahi dekompresyon veya sinir grefti uygulanabilir (64).

2.2.2 Gömülü Diş Çekimine Bağlı Oluşan Sinir Yaralanmaları

Gömülü üçüncü molar (20 yaş dişi) çekimleri, ağız, diş ve çene cerrahisinin en yaygın girişimlerinden biridir. Bu işlemler sırasında çeşitli komplikasyonlar gelişebilirken, en ciddi ve kalıcı komplikasyonlardan biri sinir yaralanmalarıdır. Özellikle N. alveolaris inferior ve N. lingualis cerrahi travmaya en açık periferik sinirlerdir (65).

Etkilenen sinirler arasında en sık IAN yer almakta olup, alt çenede mandibular kanal içerisinde seyreder ve alt dudak, dişler ile çene cildinin duyusundan sorumludur. N. lingualis dilin ön üçte ikilik kısmının genel duyusunu ve chorda tympani aracılığıyla tat duyusunu iletir. Daha nadir olarak N. buccalis ve mental sinir de etkilenebilir (63).

Sinir hasarı riskini artıran faktörler arasında sinir ile dişin yakın anatomik ilişkisi, derin gömülü dişler (Pell & Gregory sınıflamasında Class III, Position C) , cerrahin deneyimi, cerrahi sürenin uzunluğu, flap dizaynı ve aşırı kemik kaldırımı yer almaktadır (48).

Klinik bulgular arasında alt dudakta ya da dilde uyuşukluk, karıncalanma, yanma, tat kaybı (N. lingualis zedelenmesi durumunda) ve nöropatik ağrı veya allodini yer alır. Çoğu vakada bu şikâyetler geçici olsa da, %0,5–1,0 oranında kalıcı sinir hasarı rapor edilmiştir (66).

İnsidans verilerine göre IAN yaralanması riski %0,4–8,4 arasında (geçici) ve %0,02–1 arasında (kalıcı) değişmektedir. Lingual sinir yaralanması riski ise %0,1–22 (geçici) ve %0,01–2 (kalıcı) oranında bildirilmiştir. Renton ve Yilmaz lingual sinirin zedelenme riskinin cerrahi teknikle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (60). Ayrıca, KIBT teknolojisi ile yapılan preoperatif değerlendirmelerin sinir-diş ilişkisini

belirlemede önemli katkı sağladığı ve cerrahi planlamayı daha güvenli hale getirdiği bildirilmektedir (67).

Yönetim ve tedavi yaklaşımında, ilk 2–4 hafta içinde B12 vitamini, NSAID, kortikosteroid ve fotobiyomodülasyon (PBM) uygulanabilir. Üç ila altı ay içerisinde düzelme göstermeyen vakalarda nörolojik muayene ve elektromiyografi (EMG) yapılması önerilir. Hasarın kalıcı olduğu durumlarda ise cerrahi onarım (nörolizis veya sinir grefti) gündeme gelebilir (64).

2.2.3 Dental İmplant Uygulaması Esnasında Oluşabilecek Sinir Hasarları

Dental implantlar, diş eksikliği tedavisinde yaygın olarak kullanılan, genellikle başarılı sonuçlar veren cerrahi prosedürlerdir. Ancak, mandibular bölgeye yerleştirilen implantlar sırasında periferik sinir yaralanmaları meydana gelebilir. Bu komplikasyonlar özellikle alt çenede bulunan N. alveolaris inferior, N. mentalis ve nadiren N. lingualis gibi sinirlerin travmatize edilmesiyle ilişkilidir (52).

Etkilenen sinirler arasında IAN, mandibular kanal içerisinde seyreden ve implant cerrahisi sırasında en sık zarar görebilen yapılardan biridir. N. mentalis foramen mentale çevresine yerleştirilen implantlar sonucu hasar görebilirken, N. lingualis ise alt premolar veya molar bölgedeki cerrahi manipülasyonlar sırasında nadiren etkilenir (55).

Sinir hasarı, çeşitli mekanizmalarla meydana gelebilir. Doğrudan mekanik travma, implant uygulaması sırasında sinirin fiziksel olarak zedelenmesine yol açabilir. Overpenetrasyon, implantın planlanan sınırın ötesine geçmesiyle sinir temasına neden olurken, yüksek devirli frez kullanımına bağlı olarak ısı hasarı da görülebilir. Ayrıca cerrahi sonrası gelişen inflamasyon ve ödem basıya bağlı sekonder sinir hasarına yol açabilir (68).

Klinik bulgular arasında uyuşukluk, karıncalanma, ağrılı duyu bozukluğu ve N. lingualis etkilenmesi halinde tat duyusu değişiklikleri yer alır (57). İnsidans verilerine göre geçici parestezi oranı %5,2–13 arasında, kalıcı duyu bozukluğu ise %0,6–2,2 oranında bildirilmiştir (69).

Risk faktörleri arasında yetersiz görüntüleme ile cerrahi planlama yapılması, anatomik varyasyonların göz ardı edilmesi, cerrahın deneyimsizliği ve implantın sinire olan mesafesinin yeterince korunmaması öne çıkmaktadır (70).

Tedavi ve yönetim sürecinde, erken dönemde (24–48 saat içinde) implantın çıkarılması, metilkobalamin ve gabapentin gibi ilaçların kullanılması ile fotobiyomodülasyon (PBM) uygulamaları önerilir. Altı aya kadar düzelme sağlanamayan

olgularda ise cerrahi yöntemler, özellikle nörolizis, sinir grefti veya mikro sinir eksizyonu gibi girişimler tercih edilebilir (67, 71).

2.2.4 Ortognatik Cerrahiye Bağlı Gelişen Sinir Yaralanmaları

Ortognatik cerrahi, maksillofasiyal iskelet deformitelerinin düzeltildiği, fonksiyonel ve estetik hedefleri olan bir cerrahi prosedürdür. Bu cerrahiler sırasında, özellikle mandibula üzerinde gerçekleştirilen işlemler (örn. bilateral sagittal split osteotomi) sırasında N. alveolaris inferior başta olmak üzere çeşitli sinir yapıları zedelenebilir (72).

En sık etkilenen sinirler arasında, mandibular kanal içerisinde seyrettiğinden bilateral sagittal split osteotomi sırasında en çok yaralanan yapı IAN yer almaktadır. IAN'ın terminal dalı olan N. mentalis, osteotomi hattına yakın konumu nedeniyle etkilenebilir. N. lingualis ise nadir olarak manipülasyon veya retraksiyon travmasına bağlı zedelenebilir (73).

Sinir yaralanma mekanizmaları arasında doğrudan travma, osteotomi sırasında kanalın yanlış kesilmesi, sinirin kesilmesi veya ezilmesi gibi durumlar yer alır. Gerilme ve retraksiyon, segmentlerin ayrılması sırasında sinir üzerine aşırı yük binmesine neden olabilir. Postoperatif dönemde gelişen ödem ve hematoma, sinir üzerinde geçici iletim blokajına yol açabilir. Ayrıca segment hareketleri sırasında sinirin kanal dışına taşınması da olası bir yaralanma mekanizmasıdır (74).

Ortognatik cerrahi sonrası görülebilecek sinir yaralanmalarında alt dudak, çene, diş etleri ve dişlerde uyuşukluk (hipoestezi), karıncalanma ve yanma hissi (parestezi, disestezi), nöropatik ağrı ve N. lingualis etkilenmesi halinde tat duyusu değişiklikleri ortaya çıkabilir. Bu bulgular genellikle tek taraflıdır ve hasarın şiddetine bağlı olarak geçici veya kalıcı olabilir (75).

İnsidans verilerine göre BSSO sonrası N. alveolaris inferior etkilenme oranı geçici olarak %30–85, kalıcı olarak ise %5–15 arasında değişmektedir. N. lingualis etkilenme oranı <%1 düzeyindedir. Bataineh ve ark, ortognatik cerrahi sonrası kalıcı duyu bozukluğu oranını %3–10 arasında bildirmiştir (48).

Risk faktörleri arasında mandibular kanalın kortikal duvara çok yakın olması, 40 yaş üzerindeki hastalarda azalmış sinir rejenerasyon kapasitesi, kullanılan cerrahi teknik (Piezo vs. konvansiyonel osteotomi) ve segmentlerin aşırı rotasyonu veya gerilmesi sayılabilir (76).

Cerrahi öncesi KIBT ile mandibular kanalın üç boyutlu değerlendirilmesi, sinir yaralanması riskini önemli ölçüde azaltır. Özelleştirilmiş segmentasyon teknikleri kanalın konumuna göre osteotomi planının kişiselleştirilmesine olanak tanır (77).

Tedavi ve izlem sürecinde ilk 6 haftada B12 vitamini, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID), düşük doz kortikosteroid ve fotobiyomodülasyon (PBM) uygulanabilir (78, 79) Üç ay sonunda iyileşme gözlenmeyen vakalarda elektronörografi veya elektromiyografi (EMG/NCS) ile değerlendirme yapılmalıdır. Altı ay sonrasında ise kalıcı lezyonlar için mikrocerrahi girişimler, örneğin nörolizis veya sinir grefti, düşünülebilir (71).

2.2.5 Maksillofasiyal Travma Kaynaklı Sinir Yaralanmaları

Maksillofasiyal travmalar özellikle mandibula ve orta yüz bölgesindeki kırıklar, N. alveolaris inferior, N. mentalis ve N. lingualis gibi sinirlerde hasarlanmalara yol açabilir. Bu durumlar, hastaların yaşam kalitesini ciddi ölçüde etkileyebilir (80).

Mandibular kırıklarda sinir yaralanmaları en sık N. alveolaris inferior düzeyinde görülür. Özellikle kırık sonrası gelişen ödem, kemik fragmanlarının yer değiştirmesi veya plak-vida yerleşimi gibi faktörler bu sinirde hasara yol açabilir (80). N. mentalis ise kırık hattının mental foramen bölgesinden geçtiği olgularda sıklıkla etkilenir. N. lingualis dilaltı bölgesine yönelik travmalarda veya cerrahi manipülasyon sırasında nadiren zedelenabilir (81).

Hasar mekanizmaları arasında doğrudan travma, kemik fragmanlarının sinir kanalını zedelemesi, cerrahi manipülasyon, özellikle açık redüksiyon ve internal fiksasyon sırasında sinirin kas dokusu içinden retraksiyona maruz kalması, ödem veya hematoma, fraktür sonrası çevresel şişliğin sinir üzerinde geçici iletim blokuna neden olması yer almaktadır (82).

İnsidans verilerine göre mandibular kırıklarda IAN hasarı oranı cerrahi öncesinde %33,7 iken, cerrahi sonrasında %53,8'e çıkabilmektedir. Posterior mandibula kırıklarında bu oranlar sırasıyla %56,2 ve %72,9 olarak bildirilmektedir. Genel mandibular kırıklarda IAN disfonksiyon oranı %5,7–58,5 arasında değişirken, tedavi sonrası bu oran %0,4–91,3'e kadar yükselebilmektedir (82).

Klinik bulgular, hasarın tipine ve şiddetine bağlı olarak değişir. Hipoestezi veya anestezi, alt dudak, çene derisi, gingiva veya dişlerde hissizlik ya da duyu kaybı şeklinde ortaya çıkar ve genellikle sinirin iletiminde kesinti olduğunda görülür (83).

Parestezi veya disestezi, karıncalanma, iğnelenme, yanma ya da normal olmayan fakat ağrısız hislerle karakterizedir ve kısmi sinir rejenerasyonu sırasında sık görülür (84). Nöropatik ağrı ise sinirin kalıcı veya ciddi hasarı sonrasında, genellikle elektrik çarpması tarzında, spontan ya da dokunmaya bağlı ağrı (allodini, hiperaljezi) şeklinde ortaya çıkar (85). Bu bulgular genellikle tek taraflıdır ve nöropraksi, aksonotmezis veya nörotmezis gibi hasar tiplerine bağlı olarak geçici veya kalıcı olabilir (63).

Tanı ve değerlendirmede radyolojik yöntemler (panoramik radyografi, KIBT, Manyetik Rezonans – Nörografi MR-N) kırığın yerleşimini ve sinir kanalının durumunu belirlemek için kullanılır. Fonksiyonel testler (dokunma, sıcak/soğuk duyusu, iki nokta ayrımı) ve elektrofizyolojik ölçümler (EMG/NCS) de tanıda önemli rol oynar (86).

Tedavi ve izlem sürecinde konservatif yaklaşımlar önceliklidir. Travma sonrası sinir çevresinde gelişen ödemi kontrol altına almak amacıyla düşük doz kortikosteroid, B12 vitamini (özellikle metilkobalamin) ve antiinflamatuvar ilaçlar kullanılabilir. Çoğu olguda 3–6 ay içinde duyu fonksiyonlarının kısmen veya tamamen geri dönmesi mümkündür (45, 69).

Kalıcı sensöriyel bozukluk gelişen ve elektrofizyolojik testlerle sinir rejenerasyonunun yetersiz olduğu durumlarda, genellikle 6–12 ay sonrasında, mikrocerrahi nörolizis, epinöral onarım veya sinir grefti gibi cerrahi girişimler uygulanabilir (71, 84).

Rehabilitasyon sürecinde ise sinir iyileşmesini desteklemek amacıyla duysal yeniden eğitim, fotobiyomodülasyon (PBM), düşük seviyeli lazer tedavisi ve nöroprotektif ilaçlar (ör. pregabalin, gabapentin) kullanılabilir. Bu yaklaşımların bazıları, sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu etkiler göstermektedir (64, 87).

2.2.6. Eklem Cerrahisi Sırasında Oluşan Sinir Yaralanmaları

Temporomandibular eklem (TME) cerrahileri arasında artrosentez, artroskopi, disk rekonstrüksiyonu, kondilektomi ve total eklem protezleri yer alır. Bu girişimler sırasında, ekleme komşu olan bazı duysal ve motor sinirler özellikle N. auriculotemporalis, N. facialis (temporalis ve zygomaticus dalları) ve N. buccalis doğrudan veya dolaylı olarak zedelenebilir (88, 89).

TME cerrahilerinde en sık etkilenen sinirler arasında, TME kapsülünün süperolateralinde yer alan ve artrotomi veya artroskopi sırasında hasara açık olan N. auriculotemporalis bulunmaktadır (90, 91). Yüzeysel seyri nedeniyle preauriküler insizyonlarda özellikle temporalis ve zygomaticus dallarında geçici paraliziye yol

açabilen N. facialis de risk altındadır (89, 91). Derin ve geniş diseksiyonlarda ise N. buccalis zarar görebilir (88).

Yaralanma mekanizmaları arasında açık cerrahiler sırasında insizyon hattındaki sinirlerin yanlışlıkla kesilmesi (direkt kesilme) yer alır (89). Ayrıca, gerilme ve retraksiyon travması sonucunda sinir tellerine aşırı basınç uygulanması hasara neden olabilir. Postoperatif dönemde gelişen ödem, hematoma veya skar dokusuna bağlı iskemi ve fibrozis sinire bası yaparak iletim bozukluklarına yol açabilir (92, 93).

Klinik olarak yüz siniri dallarının etkilenmesi, göz kapağını kapatma (zygomatik dal) veya kaş kaldırma (temporalis dal) gibi fonksiyonlarda geçici zayıflık şeklinde kendini gösterebilir (92, 94). N. auriculotemporalis hasarında temporal bölge ve dış kulak önünde uyuşma ve nadiren Frey sendromu gözlenirken (90), N. buccalis hasarında ise yanak mukozası ve derisinde hipoestezi ortaya çıkabilir (88).

İnsidans verilerine göre açık TME cerrahilerinde yüz siniri hasarı oranı geçici olarak %12,5–32, kalıcı olarak ise %2'den az seviyededir. Daha nazik artroskopik prosedürlerde bu oranlar belirgin şekilde düşer (92, 95). Örneğin, TME artroplasti sonrası yapılan bir retrospektif çalışmada geçici yüz siniri disfonksiyonu oranı %56,4, kalıcı zayıflık hissi oranı ise yaklaşık %6,8 olarak bildirilmiştir (91). Preauriküler kesilerde diseksiyon tekniğindeki değişiklikler sayesinde yüz siniri yaralanma oranının %25'ten %1,7'ye kadar düşürülebildiği rapor edilmiştir (89, 96).

Önleme ve yönetim stratejileri arasında preauriküler insizyonlarda sinirlerin korunmasına yönelik dikkatli diseksiyon, optik büyütme ve intraoperatif nöromonitörizasyon kullanımı öne çıkmaktadır (89). Cerrahi sonrası dönemde konservatif yaklaşımlar olarak B12 vitamini, fotobiyomodülasyon (PBM), fizik tedavi ve duyuşsal eğitim önerilir (97). Rehabilitasyon sürecinde hafif yüz zayıflıklarında egzersiz programları uygulanabilir; kalıcı paralizi durumlarında ise mimik kaslarının reinnervasyonu veya sinir greftleri gibi mikrocerrahi yöntemler değerlendirilebilir (89, 97).

2.2.7 Periodontal ve Mukogingival Cerrahiye Bağlı Sinir Yaralanmaları

Periodontal ve mukogingival cerrahilerde sinir hasarı nadir olmakla birlikte, anatomik varyasyonlar, kesi tasarımı, flep traksiyonu ve retraksiyon basısı gibi teknik faktörlere bağlı olarak nörosensoryel komplikasyonlar gelişebilir. En sık risk altındaki yapılar mandibulada mental sinir ve anterior loopu, lingual sinirdir. Maksillada ise nasopalatin sinir ile büyük palatin sinir/damar paketidir. Bu yapıların lokalizasyonu ve

güvenli cerrahi sınırlar, önceden görüntüleme ve uygun flep tasarımı ile komplikasyon riski belirgin şekilde azaltılabilir (98, 99).

Mandibulada mental sinir ve anterior loop: Mandibular premolar bölge fleplerinde mental foramen ve olası “anterior loop” varyasyonunun göz ardı edilmesi, kesiler veya retraksiyon kaynaklı nevropatiye yol açabilir. KIBT temelli çalışmalar anterior loop prevalansının geniş aralıkta bildirildiğini, uzunluğun ise bireysel farklılık gösterdiğini bildirmektedir (100-102). Klinik kılavuz niteliğinde bir çalışma, mental foramenin en anterior noktasından itibaren yaklaşık 4 mm’lik güvenli bir mesafe bırakılmasını önermiştir (103). Ayrıca retraktörlerin kemik oluğa sabitlenmesi sinir üzerinde ezilme yaralanmalarını azaltabilir (103).

Maksillada palatal sinirler (büyük palatin) ve nasopalatin sinir: Serbest dişeti/bağ dokusu grefti (SDG/SEBG) için palatadan greft alımı sırasında en sık komplikasyonlar aşırı kanama ve duysal değişikliklerdir. Sistemik derlemeler, ikinci molar bölgesinde damar-sinir paketinin dişlere olan mesafesinin en fazla, kanin bölgesinde ise en az olduğunu; buna göre palatal “güvenli bölge” sınırlarının diş seviyesine göre değiştiğini bildirmiştir (104, 105). Palatal morbiditeyi ve hematomu azaltmak için güvenli bölgeye uyum ve dikkatli hemostaz önerilir (104, 105). Nasopalatin sinirin cerrahi olarak kesilmesi sonrası anterior palatadaki duysal değişiklikler çoğu olguda geçici olup haftalar içinde düzelebilir; yine de hastaya bilgilendirme yapılmalı ve uzun süren paresteziler izlenmelidir (106, 107).

Sinir yaralanmaları çoğunlukla doğrudan cerrahi kesiyle değil, aşırı traksiyon ve ezilme (retraktör basısı), termal travma veya dikiş materyalinin gerilimine bağlı olarak gelişmektedir. Bu nedenle komplikasyonların önlenmesi için çeşitli koruyucu yaklaşımlar önerilmiştir. Özellikle mandibular premolar bölgede mental foramen ve N.mentalis’in anterior loop yapısının konumunun değerlendirilmesi amacıyla preoperatif KIBT kullanımı önerilmektedir (100-102). Mental foramen üzerinde veya çevresinde dikey serbestleştirici insizyonlardan kaçınılması (103) ve aynı yaklaşımın lingual tarafta da benimsenmesi sinir bütünlüğünün korunmasına katkı sağlar (108). Palatal yumuşak doku grefti alınması sırasında Tavelli ve arkadaşlarının tanımladığı “güvenli bölge” rehberine uyulması ve operasyon öncesinde hemostaz planlamasının yapılması komplikasyon riskini azaltan önemli faktörlerdir (104, 105). Ayrıca, retraksiyon sırasında kemiğe dayalı stabilizasyon sağlanmalı, yumuşak dokuların aşırı gerilmesinden titizlikle kaçınılmalıdır (103).

2.2.8 Periferik Sinir Yaralanmalarının diğer nedenleri

Tonsillektomi, entübasyon, laringoskopi, submandibular bez cerrahisi ya da tükürük beziyle ilişkili operasyonlar sırasında periferik sinirlerin hasar görebileceği bildirilmektedir (109). Bununla birlikte, periferik sinirin fiziksel olarak zarar görmesi durumunda travmatik nöroma gelişimi söz konusu olabilir. Travmatik nöroma Schwann hücreleri ve aksonların, endonöral, perinöral ve epinöral yapıların neoplastik olmayan biçimde çoğalmasıyla karakterize edilen bir patolojik durumdur. Bu hücrelerin onarım süreci ancak ilgili nöroma dokusunun cerrahi olarak eksizyonu ile sağlanabilmektedir (110).

2.3 Periferik Sinir Yaralanmalarının Genişletilmiş Sınıflandırması

Periferik sinir yaralanmaları, sinirin iletim fonksiyonunda geçici blokajdan total kopmaya kadar değişen bir spektrumda yer alır. Histolojik düzeyde hasarın derecesi, iyileşme süresini ve yöntemini doğrudan etkiler. Tanı, tedavi ve prognoz açısından en sık kullanılan sınıflamalar Seddon (1943) ve Sunderland (1951) sistemleridir. Klinik elektrofizyoloji ve görüntüleme teknikleriyle birlikte bu sınıflamalar modern sinir cerrahisinde karar verici araçlardır.

2.3.1 Seddon Sınıflaması (1943)

Nöropraksi

Miyelin kılıfın hasarı nedeniyle sinir iletiminde geçici blokaj söz konusudur. Akson, Schwann hücreleri ve bağ dokusu yapıları sağlamdır. Genellikle travmatik basıya veya geçici iskemik etkene bağlı olur. İletim bloğu aksoplazmik transportun bozulmasıyla ilişkilidir. Histolojik olarak miyelin kılıfta segmental demiyelinizasyon izlenir. Akson yapısı bozulmamıştır. Klinik örnek olarak dental enjeksiyon sonrası geçici alt dudak parestezisi verilebilir. Genellikle birkaç gün ile birkaç hafta içinde tam iyileşme gerçekleşir ve tedavi gerekmez (111).

Aksonotmezis

Bu durumda aksonlar hasarlanır; ancak bağ dokusu kılıfları (özellikle endoneurium) sağlam kalır. Wallerian dejenerasyonu distalde görülür. Schwann hücreleri ve makrofajlar, akson ve miyelin yıkımını temizler. Klinik olarak duyu ve motor fonksiyonlarda tam kayıp olabilir, refleksler kaybolabilir. Örnek olarak mandibular kırık

sonrası inferior alveolar sinir hasarı verilebilir. Rejenerasyon hızla başlar ve genellikle başarılıdır (111).

Nörotmezis

Akson ve tüm bağ dokusu yapıları tamamen yıkılmıştır; sinirin bütünlüğü bozulmuştur. Wallerian dejenerasyonu yaygındır. Travmatik nöroma gelişme riski yüksektir. Klinik olarak tam motor ve duyu kaybı gözlenir. Spontan iyileşme mümkün değildir. Cerrahi onarım (nöroliz, sinir grefti) gerekebilir. Örnek olarak gömülü diş cerrahisi sırasında inferior alveolar sinirin doğrudan kesilmesi verilebilir (111).

2.3.2 Sunderland Sınıflaması (1951)

Sunderland sınıflaması, 1951 yılında Seddon'un üç basamaklı sistemini geliştirerek periferik sinir yaralanmalarını daha ayrıntılı ve prognostik açıdan daha anlamlı hale getirmiştir. Bu sınıflama sinir hasarını beş dereceye ayırır ve ayrıca günümüzde literatürde sıkça yer bulan altıncı derece ise kombinasyon hasarlarını tanımlar.

1. Derece hasar Seddon'un nöropraksisine karşılık gelir. Bu durumda yalnızca miyelin kılıf hasar görmüştür; akson, Schwann hücreleri ve bağ dokusu yapıları sağlamdır. Fonksiyonel olarak iletim geçici olarak durur ancak yapısal bütünlük bozulmamıştır. Klinik iyileşme tamdır ve genellikle birkaç gün ila birkaç hafta içinde gerçekleşir.
2. Derece hasarda akson hasarı mevcuttur ancak endoneurium, perineurium ve epineurium gibi bağ dokusu katmanları korunmuştur. Distal segmentte Wallerian dejenerasyonu gelişir. Rejenerasyon mümkündür ve genellikle başarılıdır, çünkü sinir lifleri doğru yönlendirilmiştir.
3. Derece hasarda akson ve endoneurium hasar görmüştür, ancak perineurium sağlamdır. Bu nedenle sinir liflerinin rejenerasyonu mümkündür fakat yönlendirmede sapmalar ve skar dokusu gelişimi riski yüksektir. Klinik iyileşme düzensiz olabilir.
4. Derece hasarda akson, endoneurium ve perineurium tamamen yıkılmıştır; yalnızca epineurium sağlam kalmıştır. Sinirin iç yapısı ciddi şekilde bozulmuştur ve skar dokusu rejenerasyonu engeller. Spontan iyileşme mümkün değildir; genellikle cerrahi müdahale gerekir.

5. Derece hasarda Sinirin tüm anatomik yapıları – akson, endoneurium, perineurium ve epineurium – kesilmiştir. Sinir tamamen kopmuştur. Bu tür yaralanmalarda spontan iyileşme beklenmez ve sinirin cerrahi olarak onarılması (örneğin sinir greftiyle) zorunludur.
6. Derece hasarda (ek sınıflama) sinir içinde farklı fasiküllerin farklı derecelerde hasar gördüğü kombine lezyonları tanımlar. Bazı fasiküller sağlamken, bazıları 1. ile 5. derece arasında değişen düzeylerde zarar görmüştür. Bu tür karmaşık hasarlar, genellikle elektrofizyolojik testler (EMG/NCS) ile değerlendirilir ve tanı konur. Klinik seyir ve tedavi planı, hasarın dağılımına göre değişkenlik gösterir (112).

Yüksek dereceli sinir hasarlarında sıklıkla Wallerian dejenerasyonu gözlenir. Bu süreçte hasarlanmış akson ve miyelin kılıflar fagositik hücreler ve Schwann hücreleri tarafından uzaklaştırılır. Ardından rejenerasyon için uygun ortam hazırlanır. Ancak sinir onarımı gecikirse ya da bağ dokusu kılıfları bozulmuşsa, sinir uçlarında travmatik nöroma gelişebilir. Travmatik nöromalar Schwann hücresi, fibroblast ve bağ dokusunun düzensiz proliferasyonu ile karakterizedir ve genellikle cerrahi eksizyon gerektirir (110, 113).

Sinir yaralanmasının derecesi tedavi planlamasında belirleyici rol oynar. Düşük dereceli lezyonlar genellikle konservatif yaklaşımlarla (vitamin B12, fotobiyomodülasyon, fizik tedavi) iyileşirken, yüksek dereceli yaralanmalarda cerrahi müdahale (nörolizis, sinir grefti) gerekebilir. Ayrıca elektrofizyolojik testler (EMG, sinir iletim çalışmaları) lezyon derecesinin tanımlanmasında ve izlenmesinde değerlidir (111, 112).

2.4 Wallerian Dejenerasyonu

Wallerian dejenerasyonu, bir sinir lifi (akson) hasar gördüğünde, lezyonun distalindeki akson segmentinin ve miyelin kılıfının parçalanmasıyla karakterize edilen bir olaydır. İlk kez 1850 yılında Augustus Waller tarafından tanımlanmıştır (114). Bu süreç özellikle periferik sinir sistemi yaralanmalarında sinir rejenerasyonunun başlaması için zorunlu bir basamak olarak kabul edilir.

Sinir yaralanmasını takiben fizyopatolojik süreç, belirli bir sıra izleyerek ilerler ve sinir dokusunun yeniden yapılanmasında önemli rol oynar. Yaralanmayı izleyen ilk 24–48 saat içerisinde sinirin distal segmentinde aksonal dejenerasyon başlar. Bu süreçte aksoplazmik akış durur, hücre membran bütünlüğü bozulur ve hücre içi kalsiyum

düzeyleri artar. Artan kalsiyum, başta kalpain olmak üzere çeşitli proteolitik enzimlerin aktivasyonunu tetikler ve bu durum aksonun yapısal yıkımıyla sonuçlanır (115, 116).

Aksonal hasarı takip eden ikinci evrede miyelin yıkımı gerçekleşir. Schwann hücreleri miyelin artıklarını fagositoza hazır hale getirirken dolaşımdan makrofajlar bölgeye göç eder ve hasarlı yapıları ortadan kaldırır. Bu süreç sinir kılıfının yeniden yapılanması ve rejeneratif ortamın hazırlanması açısından kritik öneme sahiptir (117).

Üçüncü aşamada ise rejeneratif süreç devreye girer. Schwann hücreleri Büngner bantları olarak adlandırılan ve uzayan aksonal büyüme konilerini yönlendiren tünel benzeri yapıları oluşturur. Bu yapılar, sinir rejenerasyonunun düzgün bir şekilde ilerlemesini sağlar. Aynı zamanda sinir onarımında etkili olan nörotrofik faktörler özellikle sinir büyüme faktörü (NGF), BDNF ve gliyal kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) Schwann hücrelerinin proliferasyonunu ve aksonal uzamayı destekleyerek iyileşme sürecine katkı sunar (118, 119).

Periferik sinir sisteminde Wallerian dejenerasyonu uygun koşullarda spontan rejenerasyonla sonuçlanabilir. Ancak bu süreç sınırlı zamanlıdır ve hedef organa ulaşamayan aksonlar dejenerasyona uğrar. Merkezi sinir sisteminde (MSS) ise oligodendrositler, Schwann hücrelerinin aksine rejenerasyonu desteklemez. Bu nedenle MSS'deki Wallerian dejenerasyonu daha yavaş ve sınırlıdır (120). Wallerian dejenerasyonun tamamlanma süreci elektrofizyolojik testlerle (EMG/NCS) değerlendirilebilir. Özellikle dental cerrahi, ortognatik müdahaleler, mandibuler fraktürler veya travmalar sonrası oluşan sinir lezyonlarında bu sürecin bilinmesi, tedavi planlamasında önemlidir (60, 71).

Sinir yaralanmasını takiben histolojik düzeyde çeşitli morfolojik değişiklikler gözlenir. En belirgin bulgulardan biri aksonal fragmentasyon olup hasarlı sinir segmentlerinde aksonların parçalanması şeklinde kendini gösterir. Bu süreci sıklıkla miyelin vakuolizasyonu izler ve bu durumda miyelin kılıflarda şişme ve boşluk oluşumu dikkati çeker. Yaralanma bölgesine makrofaj ve Schwann hücresi infiltrasyonu meydana gelir; bu hücreler hem hasarlı yapıların temizlenmesinde hem de rejenerasyonun desteklenmesinde görev alır. Ancak rejeneratif süreç yetersiz kaldığında, sinir liflerinin düzensiz ve dağınık şekilde çoğalması ile travmatik nöroma gelişimi gözlenebilir. Bu durum, başarısız rejenerasyonun patolojik bir sonucu olarak kabul edilir (110).

2.5 Periferik Sinir Hasarı Modelleri

Periferik sinir hasarı çalışmalarında farklı deneysel modeller geliştirilmiş olup bunlar genel olarak in vivo (hayvan çalışmaları) ve in vitro (hücre kültürü) yaklaşımları olarak ikiye ayrılmaktadır. Her modelin kendine özgü avantajları ve sınırlılıkları bulunmaktadır. İn vivo modeller içerisinde en sık kullanılan yöntemler rodent siyatik sinirinde uygulanan crush (ezilme) ve transection (kesilme) modelleridir. Ezilme modelinde sinir belirli süreliğine hemostat ile sıkıştırılırken, kesilme modelinde sinir tam kat kesilmekte ve rejenerasyon süreci takip edilmektedir (121, 122). Klinik olarak kapalı sinir hasarlarını taklit etmek amacıyla geliştirilen stretch (germe) veya traction (çekiş) modeli, fonksiyonel farklılıkların ve neuroma oluşumunun incelenmesine olanak sağlamaktadır (123). Ayrıca, sinir uçlarının fibrin yapıştırıcısı ile birleştirilmesine dayanan basamaklı sinir kesisi ve yapıştırıcı modeli (Stepwise transection and glue-STG), mikrocerrahiye alternatif olarak daha kolay uygulanabilir bir yöntem sunmaktadır (124). Sistematik derlemeler rodentlerin (%91) ve özellikle siyatik sinirin (%88) en sık kullanılan model olduğunu ortaya koymaktadır (4, 5).

İn vitro modellerde ise mikrofluidik sistemler ve lazer transeksiyon yöntemleri kullanılarak hücresel ve moleküler düzeyde akson hasarı incelenmektedir (125, 126). Bununla birlikte, kombine modelleme yaklaşımları ile in vivo, ex vivo ve in vitro yöntemler bir arada kullanılarak sinir hasarı ve rejenerasyon süreçleri çok yönlü olarak değerlendirilebilmektedir (127).

2.6 Periferik Sinir Hasarı Sonrası Meydana Gelen Değişiklikler ve Rejenerasyon

Periferik sinir sistemi, santral sinir sistemine kıyasla oldukça güçlü bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Ancak bu süreç, sinir hasarının türü, şiddeti, onarım süresi ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Sinir hasarı sonrası oluşan yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, rejeneratif sürecin başarısını doğrudan etkiler (128).

2.6.1 Hasar Tipine Göre Oluşan Değişiklikler

Periferik sinir hasarı Seddon'un tanımladığı şekilde nörapraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak üç ana gruba ayrılmaktadır. Daha sonra Sunderland bu sınıflamayı beş evreye genişleterek sinir hasarlarını daha detaylı bir şekilde açıklamıştır (111, 112).

2.6.2 Hücresel ve Moleküler Değişiklikler

Sinir kesisi sonrasında, kesinin distalinde Wallerian dejenerasyonu süreci başlar. Bu dejeneratif evrede aksonlar ve miyelin kılıflar parçalanarak yapısal bütünlüklerini kaybeder. Ardından makrofajlar ve Schwann hücreleri devreye girerek hasarlı dokulardan arta kalan hücresel kalıntıları temizler ve rejenerasyon için uygun bir mikroçevre oluşturur. Özellikle Schwann hücreleri, NGF, BDNF ve siliar nörotrofik faktör gibi çeşitli tropik faktörler salgılayarak sinir iyileşmesini destekler. Aynı zamanda bu hücreler, Büngner bantları adı verilen uzunlamasına hizalanmış yapılar oluşturarak, proksimal akson ucunun doğru yönde uzanması için rehberlik sağlar (117, 118). Proksimal akson ucundan uzanan büyüme konileri, bu rehber tünelleri takip ederek hedef organlara ulaşmaya çalışır. Bu süreci moleküler düzeyde düzenleyen mekanizmalar arasında kalsiyum düzeyindeki artış, MAP kinaz yollarının aktivasyonu ve GAP-43 gibi büyüme ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu önemli rol oynamaktadır. Bu koordineli olaylar bütünü, sinir rejenerasyonunun başarısı açısından belirleyicidir (129).

2.6.3 Rejenerasyonun Başarı Faktörleri

Sinir rejenerasyonunun başarısı birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bunların başında zamanlama gelmektedir. Sinir hasarı sonrası onarımın mümkün olduğunca erken yapılması rejeneratif kapasiteyi artırmakta ve fonksiyonel iyileşmeyi olumlu yönde etkilemektedir (130). Ayrıca aksonun hedef dokuya olan uzaklığı da iyileşme sürecinde belirleyici bir faktördür. Hedef dokudan uzak mesafelerde rejenerasyon süreci gecikebilir ve sonuçlar daha sınırlı olabilir (131). Yaş da önemli bir prognostik değişkendir. Genç bireylerde Schwann hücrelerinin aktivitesi ve nörotrofik yanıt daha güçlü olduğundan rejenerasyon daha hızlı ve etkili gerçekleşmektedir (132). Bununla birlikte, hasarın tipi tedavi yaklaşımını doğrudan belirler. Özellikle nörotmezis gibi tam sinir kesisi durumlarında, spontan iyileşme beklenmez ve cerrahi müdahale zorunludur (111).

2.6.4 Klinik Uygulama ve Tedavi Yaklaşımları

Periferik sinir hasarlarının tedavisinde uygulanan klinik yaklaşımlar, hasarın ciddiyeti, tipi ve süresine göre farklılık göstermektedir. Cerrahi onarım yöntemleri arasında mikronöroşirürji teknikleriyle uygulanan epinöral veya fasiküler sütür ön plandadır. Sinir uçları arasında mesafe varsa, bu boşluk sural sinir gibi otolog greftlerle kapatılabilir. Cerrahiye alternatif veya tamamlayıcı olarak biyomateryaller ve sinir

kılavuzları kullanılmaktadır. Bu yapılar sentetik ya da biyolojik kökenli olabilir ve iki sinir ucu arasında köprü oluşturarak rejenerasyonu destekler. Farmakolojik ajanlar, özellikle metilkobalamin, sitikolin ve çeşitli nörotrofik faktörler, nöronal iyileşme sürecini hızlandırıcı etki gösterir (133, 134). Ayrıca, fiziksel ajanlar da sinir rejenerasyonunu teşvik etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu kapsamda düşük seviyeli lazer uygulamaları (fotobiyomodülasyon - PBM), elektrik stimülasyonu ve manyetik alan terapileri sinir dokusunun yeniden yapılanma kapasitesini artırıcı potansiyele sahiptir (87).

2.7 Periferik Sinir Hasarı Sonrası Hücre Gövdesinde Meydana Gelen Değişiklikler

Periferik sinir yaralanması, yalnızca hasarlı akson segmentinde değil, aynı zamanda nöronun soma (hücre gövdesi) yapısında da çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler nöronal hayatta kalma ve aksonal rejenerasyonun başarısı açısından kritik öneme sahiptir (135, 136).

2.7.1 Kromatolizis (Nissl Substansının Dağılması)

Sinir kesisi sonrası hücre gövdesinde görülen en erken değişikliklerden biri kromatolizistir. Bu süreçte, hücre içindeki Nissl cisimcikleri (granüllü endoplazmik retikulum) dağılır, sitoplazma bazofilisini kaybeder ve nükleus ekzantrik hale gelir. Kromatolizis nöronun protein sentezini artırarak hasarı onarmaya çalıştığını gösteren bir adaptif yanıttır (135, 137).

2.7.2 Nükleusun Eksantrik Yer Değiştirmesi

Normalde hücre gövdesinin ortasında yer alan nükleus, hasar sonrası periferik kayar. Bu da nöronun rejeneratif aktivitesinin bir işareti olarak değerlendirilir (137).

2.7.3 Hücre Büyüklüğünde Artış

Aksonal kesiyeye yanıt olarak nöronun sitoplazmik hacmi artar. Bu durum, artan metabolik aktivite ve protein sentezine bağlı olarak ortaya çıkar. Ancak aşırı büyüme durumunda hücre içi stres artabilir (138).

2.7.4 Gen Ekspresyonunda Değişiklikler

Hasar sonrası hücre gövdesinde bir dizi genetik yeniden programlama meydana gelir. Özellikle Büyüme ile İlişkili Protein-43 (GAP-43), Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü-3 (ATF3), Jun proto-onkogen (c-Jun), Isı Şok Proteini-27 (HSP27) ve Aktive B Hücrelerinde Nükleer Faktör Kappa-Hafif Zincir İyileştirici (NF-κB) gibi rejeneratif süreçlerde rol alan proteinlerde yukarı yönlü regülasyon gözlenir. Bazı nörotransmitterlerde ve ilgili enzimlerde ise aşağı yönlü regülasyon meydana gelir. Bu moleküler değişiklikler, nöronun hem hayatta kalmasını hem de yeniden akson uzatmasını kolaylaştırır (139, 140).

2.7.5 Mitokondriyal Aktivite ve Oksidatif Stres

Artan enerji ihtiyacı nedeniyle mitokondri sayısı ve aktivitesi artar. Ancak bu durum aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin birikmesine neden olabilir. Bu nedenle rejenerasyon sürecinde oksidatif stres dengesinin korunması önemlidir (141).

2.7.6 Mikroglia ve Glia Hücresi Etkileşimi

Hücre gövdesi, çevresindeki glial hücrelerle sinyal alışverişi yapar. Mikroglial aktivasyon, sinyal proteinlerinin salınımı yoluyla rejenerasyonu etkileyebilir. Bu süreçte proinflatuar ve antiinflatuar dengenin korunması kritik rol oynar (142).

2.8 Proksimal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler

Periferik sinir yaralanmalarında yalnızca distal segmentte değil, aynı zamanda proksimal akson segmentinde de belirgin morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler ortaya çıkar. Bu değişiklikler, hem rejenerasyon potansiyelinin hem de nöronal hayatta kalma olasılığının belirleyici unsurları arasında yer alır.

2.8.1 Aksonal Retraksiyon ve Reorganizasyon

Hasar bölgesinin proksimalinde kalan akson parçası, genellikle retraksiyon bulbu adı verilen bir yapı oluşturarak geri çekilir. Bu yapı, büyüme konisi formasyonunun öncüsüdür ve nöronun yeni bir uzantı başlatmak üzere hazırlandığını gösterir (143).

2.8.2 Mikrotübül ve Aktin Dinamiği

Proksimal segmentte sitoskeletal elemanlarda büyük bir yeniden yapılanma gerçekleşir. Özellikle mikrotübüller ve aktin filamentleri, aksonal transportu yeniden

yönlendirmek ve büyüme konisi oluşumunu desteklemek amacıyla reorganize olur. Bu süreçte Mikrotübül ile İlişkili Protein-1B (MAP1B) ve Mikrotübül ile İlişkili Protein Tau (tau) diğer mikrotübül-bağlı proteinlerde değişiklik gözlenir (144, 145).

2.8.3 Nörotrofik Faktörlere Yanıt

Proksimal segmentte bulunan Schwann hücreleri ve fibroblastlar tarafından salınan NGF, BDNF, GDNF gibi nörotrofik faktörlere karşı duyarlılık artar. Bu faktörler Fosfatidilinozitol-3-Kinaz/Akt (PI3K/Akt), Janus Kinaz/Sinyal Transdüktörü ve Transkripsiyon Aktivatörü (JAK/STAT), Mitogenle Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK) gibi rejeneratif sinyal yollarını aktive ederek hücre içi büyüme programlarını tetikler (146, 147).

2.8.4 Nöronal Rejeneratif Genlerin Aktivasyonu

Proksimal segmentteki nöron çekirdeği, aksotomi sonrası Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü-3 (ATF3), Büyüme ile İlişkili Protein-43 (GAP-43), Small Proline-Rich Protein-1A (SPRR1A) gibi genleri aktive ederek rejenerasyon odaklı bir transkripsiyonel profil geliştirir. Bu genlerin ürünleri, aksonal uzamayı, yapısal bütünlüğü ve hücre içi sinyal iletimini destekler (148).

2.8.5 İmmün Yanıt ve İnflamasyon

Proksimal segment çevresinde düşük düzeyde bir steril inflamatuvar yanıt oluşur. İnterlökin-6 gibi sitokinler ve kemokinler rejenerasyon bölgesine özellikle makrofaj ve mikrogliaya benzer hücreler gibi immün hücrelerin yönlendirilmesini sağlar (149).

2.8.6 Rejeneratif Uçların Fagositozu

Retraksiyon bulunun distal uçları, genellikle Schwann hücreleri ve makrofajlar tarafından temizlenir. Bu, rejeneratif sürecin başlaması için gerekli mikroçevresel ortamı sağlar (118).

2.9 Distal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler

Periferik sinir yaralanması sonrası, hasar bölgesinin distalinde kalan sinir parçası rejeneratif sürece hazırlık amacıyla bir dizi moleküler ve hücrel değişikliğe uğrar. Bu sürece Wallerian dejenerasyonu adı verilir ve sinir dokusunun temizlenmesi ile yeniden yapılanmayı başlatan kritik bir evredir (116).

2.9.1 Aksonal Dejenerasyon

Travma sonrası, distal segmentteki aksonlar 24–48 saat içinde parçalanmaya başlar. Mikrotübül ve nörofilament yapıları bozulur, ardından miyelin kılıfları segmentlere ayrılır. Bu olaylar aksonal transportun kesilmesiyle tetiklenir ve nöronun canlı sinyalinin kaybı ile ilişkilidir (150).

2.9.2 Miyelin Yıkımı

Schwann hücreleri dejenerasyona uğrayan miyelini otofajik mekanizmalar ile parçalayıp temizler. Miyelin kalıntıları, daha sonra bölgeye göç eden makrofajlar tarafından fagosite edilir. Bu süreç, regenerasyon için gerekli mikroçevrenin oluşmasına katkı sağlar (151, 152).

2.9.3 Makrofaj İnvazyonu

Sinir hasarından sonraki birkaç gün içinde bölgeye hematopoetik kökenli makrofajlar göç eder. Bu hücreler yalnızca doku temizliği sağlamakla kalmaz, aynı zamanda İnterlökin-6, Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF- α) ve GDNF gibi nörotrofik faktörler salgılayarak rejeneratif süreci destekler (152).

2.9.4 Schwann Hücre Aktivasyonu ve Yeniden Dizilimi

Schwann hücreleri dejenerasyon sonrası farklılaşarak Büngner bantları oluşturur. Bu hücreler, aksonların yeniden büyümesi için bir yol haritası niteliğindedir. Ayrıca laminin, fibronektin ve Nöral Hücre Adezyon Molekülü (N-CAM) gibi rejeneratif ekstraselüler matriks proteinlerini salgılayarak aksonal uzamayı kolaylaştırırlar (118, 153).

2.9.5 Ekstrasellüler Matriks ve Bazal Lamina Korunumu

Distal segmentteki bazal lamina genellikle bozulmaz ve aksonal büyümeye rehberlik eden bir yapı olarak korunur. Bu yapı, yeni oluşacak akson uçlarının doğru hedefe ulaşmasını sağlar. Bazal lamina içinde depolanan heparan sülfat proteoglikanlar, büyüme faktörlerini bağlayarak uzun süre etkili olmalarını sağlar (154).

2.9.6 İmmün Cevap ve Sitokin Salınımı

Distal segmentteki hücreler, hasarı algıladıktan sonra Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP-1), İnterlökin-1 β , İnterlökin-10, Transforming Growth Factor-beta

(TGF- β) gibi sitokinler salgılar. Bu sinyaller, makrofajları ve diğer bağışıklık hücrelerini bölgeye çekerek inflamasyonu başlatır. Ancak bu inflamasyon, merkezi sinir sistemindekine göre daha kısa sürelidir ve rejenerasyonu destekleyicidir (155).

2.10 BDNF' nin Periferik Sinir Hasarındaki Rolü

Sinir hasarını takiben BDNF'nin ekspresyonu Schwann hücreleri tarafından artırılır. Bu artış nöron hayatta kalması ve aksonal rejenerasyon için kritik bir sinyal kaynağı sunar (156). Schwann hücreleri hasardan sonra BDNF üretir ve basal lamina boyunca salgılar. Bu, hem akson büyümesini destekleyen hem de nöronal hayatta kalmayı teşvik eden bir etki sağlar (156). Elektrik stimülasyonu, egzersiz ya da optogenetik uyarımla BDNF salınımı tetiklenir. Bu yaklaşımlar, BDNF ve tropomyosin kinase B reseptörü (TrkB) arasındaki sinyali aktive ederek yüzeysel aksonal rejenerasyonu hızlandırır (157).

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin ürettiği BDNF ve GDNF kombinasyonunun kullanıldığı biyoaktif implantlar, tek başına uygulanan BDNF'ye kıyasla daha güçlü sinir onarma ve işlevsel iyileşme sağlamaktadır (158). Poli(laktik-koglikolik asit) (PLGA) veya kitin bazlı mikrosfer şeklinde kontrollü BDNF salınımı ile yapılan in vivo çalışmalar sinir iletim hızı ve aksiyon potansiyel genliğinde belirgin artış olduğunu göstermiştir (159). BDNF öncül BDNF ve olgun BDNF formunda olup, başlıca TrkB reseptörü üzerinden MAPK/ERK ve PI3K/Akt yollarını aktive ederek, nöronal hayatta kalma, rejenerasyon ve sinaptik plastisiteyi modüle eder (160). Val66Met polimorfizmi taşıyan bireylerde BDNF salgısı azalır ve elektrik stimülasyonu gibi tedavi modellerinin sinir rejenerasyonunu destekleme etkinliği zayıflayabilir (160).

2.11 Caspase-3'ün Periferik Sinir Hasarındaki Rolü

Caspase-3, periferik sinir sisteminde sinir travmasına yanıt olarak aktive olan başlıca efektör kaspastır. Bu molekül, hasarlı nöronlarda apoptozun gerçekleşmesini sağlar ve bu nedenle sinir hasarı sonrası nöronal kayıpta merkezi bir rol oynar. Caspase-3 eksikliğinin dorsal kök ganglionları ve trigeminal ganglion nöronlarında hasara karşı koruyucu etki sağladığı bildirilmiştir (161).

Parsiyel sinir yaralanma modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, dorsal boynuzda caspase-3 aktivasyonunun GABAerjik ara nöronlarda apoptoza yol açtığı, bu durumun da spinal inhibisyonun azalmasına ve ağrı artışına neden olduğu gösterilmiştir.

Caspase inhibitörü zVAD-fmk uygulandığında ise bu etkilerin gerilediği gösterilmiştir (162).

Caspase-3 aynı zamanda sinaptik plastisite ile de ilişkilidir. Anterior singulat kortekste sinir hasarı sonrası caspase-3 düzeylerinin düşmesiyle α -Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit reseptörü (AMPA) reseptörlerinin içeri alınmasının azaldığı ve bu durumun sinaptik güçlenme ile ağrının artışına neden olduğu gösterilmiştir (158).

Kemoterapi kaynaklı periferik nöropati modellerinde de caspase-3'ün mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresi tetiklediği bildirilmiştir. Caspase-3'ün inhibisyonu bu olumsuz etkilerin azaltılmasını sağlayabilmektedir (163).

Bununla birlikte, caspase-3 yalnızca apoptozla sınırlı kalmaz. Bu molekül dendritik diken yapılarında ve sinaptik işlevlerde de görev almaktadır (164).

2.12 MMP-9'un Periferik Sinir Hasarındaki Rolü

MMP-9 periferik sinir hasarının erken evrelerinde önemli rol oynayan bir proteazdır. Yaralanma sonrası ilk 24 saat içinde Schwann hücreleri, endotel hücreleri ve makrofajlar tarafından ifade edilir. Bu süreç, myelin kılıfın bozulmasına ve kan-sinir bariyerinin geçirgenliğinin artmasına neden olur (165).

TNF- α aracılığıyla uyarılan MMP-9, inflamatuvar hücrelerin sinir dokusuna göçünü düzenler. MMP-9 genetik olarak silinen farelerde, yaralanma sonrası bir hafta içinde makrofaj infiltrasyonunda belirgin azalma görülmüştür (166).

MMP-9, öncül-IL-1 β 'yi aktif IL-1 β 'ye çevirerek mikroglia'yı aktive eder. Bu durum, nöropatik ağrının gelişmesine neden olur. MMP-9'un intratekal enjeksiyonu, deneysel modellerde mekanik allodiniyi tetiklerken; genetik silme ya da inhibitör uygulaması bu etkileri önemli ölçüde azaltır (166).

Zamana bağlı olarak, MMP-9 erken dönemde etkiliyken, MMP-2 ise yaklaşık 7 gün sonra etkili olmaya başlar ve kronik ağrının sürdürülmesinde rol oynar. Bu iki proteazın etkileşimi sinir iyileşmesinin dinamiklerini belirler (167).

Deneysel çalışmalarda GM6001 inhibitörü kullanılarak MMP-9'un hedeflenmesiyle inflamasyon, ağrı ve demiyelinizasyonun önüne geçilebildiği gösterilmiştir. Bu da MMP-9'u terapötik müdahale için güçlü bir aday haline getirmektedir (168).

2.13 Sitikolin ve Sinir Üzerine Etkileri

Sitikolin (CDP-Kolin), vücutta doğal olarak bulunan bir nükleotid bileşiğidir. Sitidin ve kolin birleşerek sitikolini oluşturur. Sinir sisteminde fosfolipid sentezi, asetilkolin üretimi ve nöroprotektif mekanizmalarla önemli roller üstlenir. Tablo 2.1’de gösterilmiştir. Özellikle nörodejeneratif hastalıklar, iskemik inme sonrası iyileşme ve periferik sinir hasarlarında faydalı etkiler göstermektedir (169-171).

Sitikolinin en önemli fizyolojik görevlerinden biri nöronal hasar sonrası membran fosfolipidlerinin onarımını desteklemek ve bu sayede hücre içi homeostazı yeniden kurmaktır. Ayrıca, mitokondriyal zar stabilizasyonu sağlayarak apoptotik yolların baskılanmasına katkı sağlar (172).

Sitikolin, aynı zamanda glutamat salınımını düzenleyerek eksitotoksiteyi azaltır. Yapılan çalışmalar, sitikolinin nöron-glia etkileşimlerinde glutamat transporter proteinlerini artırarak sinaptik boşluktaki glutamat düzeylerini düşürdüğünü göstermektedir (173).

Farmakokinetik olarak sitikolin, oral ve parenteral yollarla uygulandığında neredeyse tamamen emilir ve sitidin ile kolin bileşenlerine ayrılır. Bu bileşenler kan-beyin bariyerini geçerek sinir sistemine ulaşır ve nöronal membran bütünlüğüne katkı sağlar. İnsanlarda yapılan farmakokinetik çalışmalar, biyoyararlanımın %90’ın üzerinde olduğunu ve maksimum plazma düzeylerine birkaç saat içinde ulaşıldığını göstermiştir (7).

Deneyisel periferik sinir hasar modellerinde (örneğin siyatik sinir kesilmesi), sitikolinin hem lokal hem sistemik uygulaması sinir rejenerasyonunu desteklemiş; skar dokusu oluşumunu ve sinir ödemi azaltmıştır. Histolojik incelemeler, Schwann hücre aktivitesinin arttığını ve miyelin kalitesinin korunduğunu göstermiştir (174).

Ratlarda mental sinir yaralanması modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, sitikolin uygulaması sonrası trigeminal ganglionda BDNF ekspresyonunun yaklaşık 2,19 kat arttığı gösterilmiştir. Bu artış erken rejeneratif süreçlerin hızlanmasına ve nöronal sağkalımın desteklenmesine katkıda bulunmuştur (26).

Ayrıca, sitikolinin MMP-9 ekspresyonunu düzenleyerek inflamatuvar yanıtı ve ekstrasellüler matriks yıkımını azalttığı bildirilmiştir. Bu mekanizma sayesinde skar oluşumunun sınırlandığı ve aksonal rejenerasyonun desteklendiği öne sürülmektedir (25).

Tablo 2.1 Sitikolinin etki mekanizması

Mekanizma	Açıklama
Fosfolipid Sentezi	Hücre membran onarımı için fosfatidilkolin sentezini destekler (169)
Asetilkolin Üretimi	Kolin kaynağı sağlayarak sinaptik iletimi güçlendirir (171)
Nöroprotektif Etki	Glutamat eksitotoksitesisi ve oksidatif stresini azaltır (171)
Nörotrofik Etki	BDNF artışı ile aksonal büyüme ve sinir rejenerasyonunu teşvik eder (175)
Anti-inflamatuar Etki	İnflamatuar sitokinleri (IL-1 β , TNF- α) baskılar (171)

2.14. Metilkobalamin ve Sinir Üzerine Etki Mekanizmaları

Metilkobalamin, B12 vitamininin aktif koenzim formudur ve sinir sistemi sağlığı üzerinde önemli rol oynayan bir bileşiktir. Diğer B12 formlarından farklı olarak doğrudan nörolojik fonksiyonlarda kullanılır. Özellikle periferik ve santral sinir sisteminde rejenerasyon süreçlerini desteklediği bilinmektedir. Oral ya da parenteral yolla uygulanabilir (176, 177).

Metilkobalamin, insan vücudunda iki temel biyolojik işlevi olan B12 vitamininin aktif koenzim formlarından biridir. Diğer aktif form ise adenzilkobalamindir. Metilkobalamin, özellikle homosistein $\rightarrow$ metiyonin dönüşümünde, metiyonin sentaz enziminin kofaktörü olarak görev yapar. Bu reaksiyon, metil grubu donörü olan S-adenozilmetiyonin'in (SAM) üretimini sağlar. SAM, DNA, protein ve lipidlerin metilasyonunda görevli en önemli metil donörüdür (178).

Bu metilasyon döngüsü, nörolojik fonksiyonların sürdürülebilirliği, miyelin sentezi, DNA sentezi ve epigenetik regülasyon için zorunludur. Tablo 2.2'de gösterilmiştir Metilkobalamin eksikliği durumunda homosistein düzeyi artar, metiyonin ve SAM üretimi azalır, buna bağlı olarak nörolojik hasar, depresyon, parestezi, ve miyelin kaybı gibi belirtiler gelişir (179).

İnsan vücudu metilkobalamini sentezleyemez; bu madde diyetel olarak dışarıdan alınmalıdır. Doğal olarak hayvansal ürünlerde bulunur (karaciğer, et, yumurta, süt). Alınan siyanokobalamin veya hidroksokobalamin formu, vücutta aktif koenzim formlara metilkobalamin ve adenzilkobalamin dönüştürülür (180).

Tablo 2.2 Metilkobalaminin etki mekanizması

Etki Mekanizması	Açıklama
DNA ve Protein Sentezi	Metiyonin üretimini artırarak sinir hücresi yenilenmesini sağlar (176)
Miyelin Onarımı	Miyelin proteinlerinin sentezini destekler (177)
Aksonal Rejenerasyon	Akson büyümesini ve sinaptik yeniden yapılanmayı destekler (176, 181)
Anti-apoptotik Etki	Oksidatif stres ve nörotoksisiteyi azaltır (177)
Nörotrofik Faktör Artışı	NGF ve BDNF ekspresyonunu uyarır (177, 181)

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Çalışma Dizaynı

Ağırlıkları 200 – 300 g arasında değişen toplam 100 adet Spraque Dawley cinsi erkek rat çalışmaya dahil edilmiştir. Hayvanlar su ve yiyeceğe serbest bir şekilde erişebilecekleri standart metal kafeslerde tutulmuş ve normal oda sıcaklığında olacak şekilde, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsüyle otomatize edilmiş odalarda deney süresi boyunca muhafaza edilmiştir. Ratların yem ve vücut ağırlıkları ölçümü ; erken grupta 0., 1., 4. ve 7. günlerde, geç grupta 0., 1., 4., 7., 10., 13., 16. ve 21. günlerde saat 15.00-17.00 arasında tek tek tartılarak yapılmıştır (182).

Çalışma Helsinki Hayvan ve İnsan Araştırmaları Uygulama Prensipleri' ne uygun olarak gerçekleştirilmiş olup T.C İnönü Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onay almıştır (#2024/20-3).

Hayvanlarda sinir hasarı erken ve geç dönem olmak üzere 7. gün ve 21. günde incelenmiştir. Hayvanlar kısa ve uzun dönem sinir hasarının etkilerini incelemek amacıyla rastgele 10 gruba ayrılmıştır.

3.1.1 Kısa dönem grubu (Sinir Hasarı Sonrası 7 Günlük Takip):

Grup NK7 (n=10): Sağlıklı negatif kontrol grubuna 7 gün boyunca her gün serum fizyolojik (1ml SF) uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.

Grup H7 (n=10): Mental sinir hasarı oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca her gün serum fizyolojik (1ml SF) uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.

Grup HS7 (n=10): Mental sinir hasarı oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca her gün tek doz Sitikolin (300mg/kg, intraperitoneal) uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.

Grup HM7 (n=10): Mental sinir hasarı oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca her gün tek doz Metilkobalamin (1mg/kg intraperitoneal) uygulandı ve 7. Günün sonunda sakrifiye edildi.

Grup HMS7 (n=10): Mental sinir hasarı oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca her gün tek doz Metilkobalamin (1mg/kg, intraperitoneal) + tek doz Sitikolin (300mg/kg, intraperitoneal) kombine olarak uygulandı ve 7. günün sonunda sakrifiye edildi.

3.1.2 Uzun Dönem Grubu (Sinir Hasarı Sonrası 21 Günlük Takip):

Grup NK21 (n=10): Sağlıklı negatif kontrol grubuna 21 gün boyunca her gün serum fizyolojik (1ml SF) uygulandı ve 21. günün sonunda sakrifiye edildi.

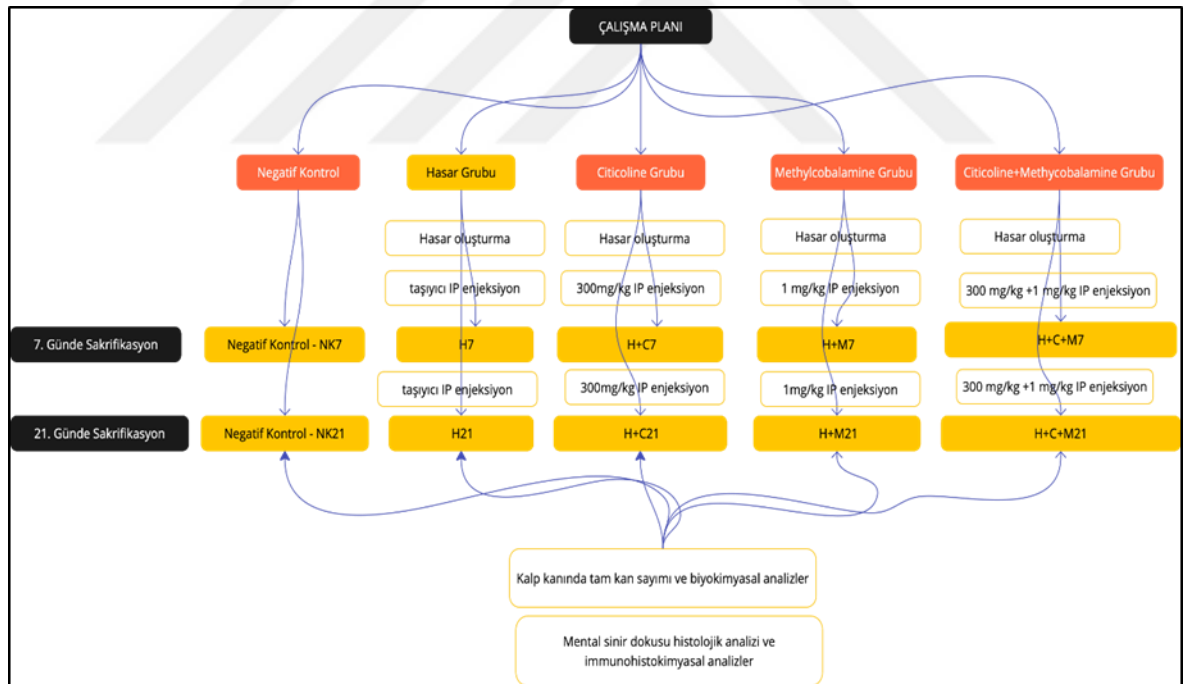
Grup H21 (n=10): Mental sinir hasarı oluşturulduktan sonra 21 gün boyunca her gün serum fizyolojik (1ml SF) uygulandı 21. günün sonunda sakrifiye edildi.

GrupHS21 (n=10): Mental sinir hasarı oluşturulduktan sonra 21 gün boyunca her gün tek doz Sitikolin (300mg/kg, intraperitoneal) uygulandı 21. günün sonunda sakrifiye edildi.

Grup HM21 (n=10): Mental sinir hasarı oluşturulduktan sonra 21 gün boyunca her gün tek doz Metilkobalamin (1mg/kg intraperitoneal) uygulandı 21. günün sonunda kurbanı edildi.

Grup HMS21 (n=10): Mental sinir hasarı oluşturulduktan sonra 21 gün boyunca her gün tek doz Metilkobalamin (1mg/kg, intraperitoneal) + tek doz Sitikolin (300mg/kg, intraperitoneal) kombine olarak uygulandı 21. günün sonunda sakrifiye edildi.

Şekil 3.1’de çalışma dizaynı ve akış şeması gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışma dizaynı ve akış şeması

3.2 Sinir Hasarı Oluşturmak İçin Kullanılan Cerrahi Yöntem

Cerrahi işlemlerden önce deney hayvanlarına 90 mg/kg intramusküler ketamin hidroklorür (Ketalar; Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 10mg/kg xylazin (Dogalazin; Doğa İlaç, İstanbul, Turkey) genel anestezi sağlanmıştır (183). Ratlar genel anesteziye

alındıktan sonra boyun bölgesi traş edildi (Şekil 3.2). Traş edilen bölgeye cerrahi alanın antisepsisini sağlamak amacıyla povidon-iyodin solüsyonu (Poviodex, Kimpa, Türkiye) uygulanmıştır. Gerekli asepti, antisepti ve sterilizasyon koşulları sağlandıktan sonra insizyon hattı belirlenmiştir. Boyun orta noktasından 1 cm uzunluğunda vertikal dermal insizyon yapıldıktan sonra cilt kenarları ekarte edilerek masseter kasına ulaşılmıştır. Masseter kası künt diseksiyonlarla aşılarak mental sinir açığa çıkarılmış (Şekil 3.3), sinir mikrocerrahi penset ve mikrocerrahi makas yardımı ile dikkatli bir şekilde etraf dokulardan serbestleştirilmiştir (184-186). Yaşargil Anevrizma klipsi ile açığa çıkarılan sinir 60 saniye süresince kısırılarak ezilme (Şekil 3.3- 3.5) tarzında sinir hasarı oluşturulmuştur (Şekil 3.6)(187). Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra 6/0 poliglikolid asit esaslı emilebilen suture (Luxcryl, Luxsutures, Weiswampach, Lüksemburg) kas dokusu ve cilt dokusu basit suture tekniği ile suture edilmiş (Şekil 3.7) ve cerrahi alan kapatılmıştır. Cerrahi işlemin ardından enfeksiyon kontrolü için enrofloksasin 2.5 mg/kg i.m. (Baytril-K®) ve operasyon sonrası ağrının olmaması için meloksikam 1mg/kg i.m. (Maxicam ®) enjeksiyonu yapılmıştır (183).



Şekil 3.2. İnsizyon öncesi anesteziye alınmış ve traş edilmiş rat



Şekil 3.3. Mental sinirin açığa çıkarılması



Şekil 3.4. Açığa çıkarılmış mental sinirine handle ile anevrizma klipsinin uygulanması



Şekil 3.5. Mental sinirin 60 saniye boyunca anevrizma klipsi ile hasarlanması



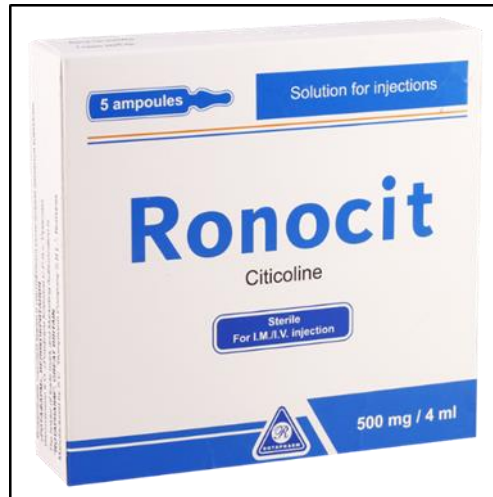
Şekil 3.6. Hasara uğramış mental sinir



Şekil 3.7. Cildin 6-0 PGA suture ile kapatılması

3.3 Sitikolinin Uygulanması

Çalışmadaki tek doz sitikolin 300mg/kg uygulanacak gruplara literatürde daha önce önerilen şekilde 300mg/kg intraperitoneal olarak 7 gün (erken) ve 21 gün (geç) boyunca günde 1 kez uygulanmıştır (188). Şekil 3.8’de çalışmada kullanılan sitikolin formu ve Şekil 3.9’da sitikolinin intraperitoneal uygulaması gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan Sitikolin formu



Şekil 3.9. Sitikolin'in intraperitoneal uygulanması

3.4 Metilkobalaminin Uygulanması

Çalışmadaki tek doz metilkobalamin 1mg/kg uygulanacak gruplara literatürde daha önce önerilen şekilde 1mg/kg intraperitoneal olarak 7 gün (erken) ve 21 gün (geç) boyunca günde 1 kez uygulanmıştır (189). Şekil 3.10'da çalışmada kullanılan metilkobalamin formu ve Şekil 3.11'de metilkobalaminin intraperitoneal uygulaması gösterilmiştir



Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan metilkobalamin formu



Şekil 3.11. Metilkobalamin'in intraperitoneal uygulanması

3.5 Soğuk Termal Uyarı Testi

Soğuk uyaran olarak, -50°C sıcaklığa kadar soğuma sağlayan Roeko Endo-Frost (Coltene/Whaledent, Almanya) sprey kullanıldı. Sprey, operasyon bölgesine 1 cm uzaklıktan sıkılarak uygulanmıştır. Roeko Endo-Frost'un avantajı, kontrollü, sabit ve tekrar üretilebilir soğuk uyarı sağlamasıdır. Sinir hasarından sonra postoperatif 7. (erken grup) ve 21. (geç grup) günlerde uygulandı (190).

Uygulama prosedüründe hayvanlar test öncesi 1 dakika süreyle davranışsal test ortamına adaptasyon için bekletildi. Ardından test sırasında rat sabit pozisyonda tutuldu ve sağ alt çene mental bölgesine soğuk spreyle 1–2 saniye boyunca püskürtüldü. Daha sonra yanıt süresi, patilerini yüzüne götürme, yalama ya da çiğneme gibi refleksif motor davranışları 30 saniye boyunca videoya alındı ve refleks var-yok şeklinde kaydedildi.

3.6 Sakrifikasyon İşlemi

Hayvanlar genel anesteziye alındıktan sonra mental sinirleri toplanmış ve sonrasında sakrifikasyon işlemi hayvanlara servikal dislokasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7 Kan Örneklerinin Alınması

7. gün ve 21. günlerde sakrifiye edilen ratlardan alınan kan örneklerinde biyokimyasal ve hematolojik analizler yapılmıştır. Biyokimyasal parametreler arasında kan üre azotu (BUN), kreatinin, laktat dehidrogenaz (LDH), alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) değerlendirilmiştir (191, 192). Hematolojik analiz kapsamında tam kan sayımı (hemogram) parametreleri incelenmiştir. Tam kan sayımı (hemogram) parametreleri üç ana seri altında incelenmektedir: eritrosit (kırmızı seri), lökosit (beyaz seri) ve trombosit (platelet) parametreleri.

Eritrosit parametreleri arasında eritrosit sayısı (RBC), hemoglobin düzeyi (HGB), hematokrit – eritrositlerin kan hacmindeki oranı (HCT), ortalama eritrosit hacmi (MCV), eritrosit başına düşen hemoglobin miktarı (MCH) ve eritrositlerdeki hemoglobin yoğunluğu (MCHC) yer almaktadır. Ayrıca eritrosit hacim dağılımının standart sapması (RDW-SD) ve eritrosit hacim dağılım varyasyon katsayısı (RDW-CV) eritrositlerin boyut heterojenitesini değerlendirir (193, 194).

Lökosit parametreleri lökosit sayısı (WBC) ile başlar. Lökositlerin alt grupları nötrofiller, lenfositler, monositler, eozinofiller ve bazofiller şeklinde ayrılır. Nötrofil yüzdesi (NE%) ve mutlak nötrofil sayısı (NE#), lenfosit yüzdesi (LY%) ve mutlak lenfosit sayısı (LY#), monosit yüzdesi (MO%) ve mutlak monosit sayısı (MO#), eozinofil yüzdesi (EO%) ve mutlak eozinofil sayısı (EO#), bazofil yüzdesi (BA%) ve mutlak bazofil sayısı (BA#) ile ölçülür. Ayrıca çekirdekli eritrosit yüzdesi (NRBC%) ve mutlak sayısı (NRBC#), immatür granülosit yüzdesi (IG%) ve mutlak immatür granülosit sayısı (IG#) hematopoetik aktivite ve kemik iliği işlevi hakkında bilgi verir (193, 194).

Trombosit parametreleri trombosit sayısı (PLT) ile başlar. Trombositlerin kan hacmindeki oranı (PCT), ortalama trombosit hacmi (MPV), trombosit hacim dağılım genişliği (PDW) ve büyük trombosit oranı (P-LCR) trombositlerin sayısı, hacmi ve morfolojik özellikleri hakkında bilgi sağlar (193, 194).

Bu parametreler, sistemik inflamasyon, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını değerlendirmede literatürde sıklıkla kullanılan biyobelirteçlerdir (191-194).

3.8 Mental Sinir Örneklerinin Toplanması

Eksize edilen mental sinirler taze olarak hazırlanmış %4 lük paraformaldehit içeren ependorf tüplerinde saklanmıştır (195).

3.9 Histopatolojik Analizler

3.9.1 Doku Takibi ve Gömme

Deneyisel prosedür sonunda disekte edilen dokular, taze hazırlanan steril %4'lük paraformaldehit (pH:7.4) içerisinde 24 saat boyunca bekletilerek fikse edildi. Ertesi gün %30'luk sükröz solüsyonu içerisinde 24-36 saat boyunca bekletildi. Dokuların yeterli sükröz doygunluğuna ulaşmış olup olmadığı dibe çökmeleri kontrol edilerek yapıldı. Daha sonra Cryomatrix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) içine gömülen dokular sıvı azotta hızla dondurularak frozen kesit için bloklar hazırlandı ve -80°C'de muhafaza edildi. Deney gruplarına ait sinirleri içeren bloklardan Cryotom cihazı (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ile 10µm kalınlığında kesitler poly L-lysine kaplı lamalara alındı. Genel morfolojik değerlendirmeleri için Oil Red O (Sigma Aldrich, O0625-100G, USA) ile boyanan kesitler Fluoromount-G ile kapatılarak preparatlar hazırlandı (Tablo 3.1). Pozitif boyalı miyelinli aksonlar, bir ışık mikroskobu (Olympus BX-53) kullanılarak gözlemlendi ve fotoğraflandı (büyütme, ×100).

Tablo 3.1. Oil Red O boyama protokolü

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	-20 °C'de asetonda fiksasyon	10 dk	5	Çeşme suyunda yıkama	3*5 dk
2	%70' lik alkol	1 sn	6	Harris hematoksilin ile çekirdek boyaması	1-2 dk
3	Oil Red O ile boyama	20 dk	7	Çeşme suyunda yıkama	3*5 dk
4	%70'lik alkolde yıkama	1 sn	8	Fluoromount Medium ile kapat	

*Oil Red O boyaması karanlık ortamda yapılmıştır.

3.9.2 Histomorfometrik değerlendirme

Herbir sıçana ait, Oil Red-O (Sigma Aldrich, O0625-100G, USA) ile boyanan sinirlerin enine kesitlerinde, ışık mikroskobu kullanılarak (Olympus BX-53, Tokyo, Japan) büyük büyütmede (100X) rastgele 5 farklı alandan mikroskobik fotoğraflar alındı. Elde edilen fotoğraflardan Image J software programı (ImageJ, National Institute of Health, USA) kullanılarak herbir grupta akson sayıları sayılarak kaydedildi. Ayrıca, herbir deney grubunda aksonların çapları yine Image J software programı kullanılarak hesaplandı ve elde edilen verilerden gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırma yapıldı (196).

3.9.3 Frozen kesitte immünofloresan boyama yöntemi

Tablo 3.2. İmmünofloresan boyama protokolü

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Oda sıcaklığında kurutma	10 dk	8	PBS ile yıkama	3*5 dk
2	Paraformaldehit ile fiksasyon	10 dk	9	Sekonder antikor	1 saat
3	PBS ile yıkama	3*5 dk	10	PBS ile yıkama	3*5 dk
4	PAP Pen kalem ile işaretleme		11	DAPI çekirdek boyaması	1 dk
5	Goat serum ile pre inkübasyon	10 dk	12	PBS ile yıkama	3*5 dk
6	Primer antikor ile +4°C inkübasyon	1 gece	13	Fluoromount Medium ile kapat	

3.9.4 İmmünofloresan Boyama

Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde nöronal rejenerasyonu değerlendirmek için Caspase-3 (sc-56053, Santa Cruz), BDNF (sc-65514, Santa Cruz), ve MMP-9 (sc-13520, Santa Cruz) antikorlarıyla immünofloresan boyamalar yapıldı. Özetle, -80 °C’de muhafaza edilen kesitler, 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra PBS (phosphate buffer saline) ile yıkandı. Nonspesifik fluorofofor bağlayıcı bölgeler goat serum kullanılarak 1 saat boyunca blokladı ve bloklama işleminin ardından lamalar, içerisine ılık çeşme suyu konulmuş olan nem kabinine yerleştirildi. Daha sonra Caspase-3 (1/300), BDNF (1/100) veya MMP-9 (1/100) primer antikoruna uygun konsantrasyonlarında hazırlanarak kesitlerin üzerine damlatıldı. Lamalar nem kamerasında +4 °C’ de 24 saat boyunca inkübe edildi ve ertesi gün primer antikor ile inkübe edilen kesitler PBS ile yıkandı. Daha sonra lamalar nem kameralarına yerleştirildi ve hazırlanan sekonder goat anti-rabbit antikor (Goat Anti-Mouse IgG Rhodamine, Millipore) kokteyli doku kesitlerinin yüzeyine eklenerek 1 saat bekletildi. Fluorofoforun ışıktan zarar görmemesi için bu aşamadan sonra tüm aşamalar karanlık ortamda çalışıldı. Sekonder antikor uygulama aşamasından sonra lamalar tekrar PBS ile yıkandı. Boyanan doku kesitleri DAPI ile 1 dakika muamele edilerek, son kez PBS ile yıkandı ve fluoromount G-medium kullanılarak bir lamel yardımıyla kapatıldı (Tablo 3.2). İmmünofloresan boyama metodu uygulanan doku kesitleri -20°C’de bekletildi ve Olympus BX-53 floresan mikroskobu (Tokyo, Japonya) ve DP74 görüntüleme donanımı kullanılarak görüntülendi. Tüm deney gruplarına ait sıçanlardan alınan sinir dokularında immunoreaktivite yoğunluğu Image J software programı kullanılarak, her bir

dokuya ait 40X büyütmede rastgele alınan 5 farklı alandaki floresan mikroskop görüntüleri üzerinde hesaplandı (197).

3.10 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen tüm verilerin analizi IBM SPSS Statistics (versiyon XX, IBM Corp., Armonk, NY, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro–Wilk testi ile değerlendirildi. Parametrik varsayımları sağlayan veriler için gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) uygulandı. Varyans homojenliği Levene testi ile incelendi; homojenlik varsayımı sağlandığında post-hoc analiz olarak Tukey HSD testi, sağlanmadığında ise Tamhane T2 testi kullanıldı.

Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde çoklu grup karşılaştırmalarında Kruskal–Wallis testi uygulandı. Anlamlılık saptandığında ikili karşılaştırmalar için Mann–Whitney U testi kullanıldı ve çoklu karşılaştırmalarda hata riskini azaltmak amacıyla Bonferroni düzeltmesi yapıldı. Zaman içi tekrarlayan ölçümler için parametrik verilerde Friedman testi, non-parametrik verilerde ise ikili karşılaştırmalarda Wilcoxon Signed-Rank testi tercih edildi.

Sonuçlar parametrik veriler için ortalama $\pm$ standart sapma, medyan (IQR) ve minimum–maksimum değerleri; non-parametrik veriler için ise medyan (IQR) ve minimum–maksimum değerleri ile sunuldu. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

3.10.1 Örneklem Büyüklüğü

Çalışmadaki örnek sayısı literatür de benzer yapılan birkaç çalışmaya göre bir program kullanılarak (G power, Germany) güç analizi yöntemiyle tayin edilmiştir.

Akson sayımını karşılaştıran Erhan Aslan ve ark.’nın (6) “CDP-choline and its endogenous metabolites, cytidine and choline, promote the nerve regeneration and improve the functional recovery of injured rat sciatic nerves” çalışmasına göre ; araştırmamızda oluşturulacak 5 çalışma grubunun her birinde 2 örnek olmak üzere toplam 10 örnekte akson sayımı karşılaştırması için güç tayini hesaplandığına, için güç tayini hesaplandığına, "f = 4.5850150" efekt aralığı, " $\alpha = 0.05$ ", "Noncentrality parametresi $\lambda = 210.2236$ ", "Critical F = 5.1921678", "Numerator df = 4", "Denominator df = 5" değerlerinde gerçek güç değeri % 99 olarak hesaplanmıştır.

Akson sayımını karşılaştıran Rafet Özay ve ark.'nın (169) "Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats" çalışmasına göre ; araştırmamızda oluşturulacak 5 çalışma grubunun her birinde 2 örnek olmak üzere toplam 10 örnekte akson sayımı karşılaştırması için güç tayini hesaplandığına, için güç tayini hesaplandığına, " $f = 3.5777088$ " efekt aralığı, " $\alpha=0.05$ ", "Noncentrality papametresi $\lambda = 4.3817805$ ", "Critical $F = 2.1318468$ ", "Numerator $df = 4$ ", "Denominator $df = 5$ " değerlerinde gerçek güç değeri % 97 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda erkek rat kullanmamızın nedeni klinik ve deneysel çalışmalarda sinir sistemi hasarlarının cinsiyete bağlı farklılardan etkilendiğinin bildirilmesinden dolayıdır (198). Ayrıca spesifik cinsiyet hormonlarının sinir hasarı esnasındaki düzeyinin iyileşme ve sinir hasarının sonuca etki edebileceği bildirilmiştir (199).

Araştırmamızda iki farklı sakrifikasyon zamanı olduğundan; erken (7) ve geç dönem (21), ratlarda maksimum güç değerini elde etmek amacıyla ve deney sırasında ratların kaybedilme olasılığı da göz önüne alındığında immünohistokimya ve histolojik inceleme yapılacağından yeterli miktarda örnek elde edilmesi için her grupta 10 rat olmak üzere toplam 100 wistar rat kullanılacaktır.

4. BULGULAR

4.1 Tam Kan Sayımı (CBC) Verileri

Tablo 4.1’de 21. gün tam kan sayımı (CBC) bulguları verilmiştir.

Tablo 4.1. 21. Gün tam kan sayımı (CBC) bulguları

	NK21	H21	HC21	HM21	HCM21	F	p
WBC	7.89±2.39	9.01±2.37 ‡	6.95±1.35	8.85±2.46	9.36±1.65 *, ‡	N/A	0.40 ^l
RBC	7.73±0.22	8.25±0.44 *	7.74±0.50 †	7.80±0.24	7.97±0.27	3.661	0.012 ^s
HGB	15.04±0.42	15.65±0.87	15.03±1.19	15.14±0.51	15.54±0.42	1.536	0.208 ^s
HCT	47.83±1.24	48.79±2.94	46.54±3.83	46.48±1.48	47.86±1.28	1.685	0.170 ^s
MCH	19.45±0.39	19.16±0.63	19.42±0.47	19.42±0.63	19.50±0.43	0.645	0.633 ^s
MCHC	31.46±0.59	32.07±0.38	32.30±0.35 *	32.58±0.25 *, †	32.48±0.43 *, †	N/A	0.000 ^l
PCT	0.59±0.07	0.62±0.05	0.68±0.33	0.58±0.09	0.65±0.08	N/A	0.224 ^l
MPV	6.99±0.17	7.49±0.39 *	7.14±0.16	7.29±0.23 *	7.24±0.20	5.677	0.001 ^s
Ly%	81.73±8.20	81.53±8.18	79.36±4.85	88.15±3.55 *, †, ‡	84.81±3.94 ‡	N/A	0.009 ^l
Mo%	0.44±0.19	0.39±0.19	0.38±0.21	0.23±0.11	0.43±0.32	N/A	0.089 ^l
Ne%	17.00±8.00	17.35±7.70	19.10±5.18	10.78±3.38 *, †, ‡	14.27±3.83	N/A	0.009 ^l
Eo%	0.74±0.45	0.61±0.57	1.08±1.49	0.75±0.37	0.38±0.24	N/A	0.213 ^l
Ba%	0.09±0.09	0.12±0.06	0.08±0.08	0.09±0.09	0.11±0.07	N/A	0.757 ^l
Ba#	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	N/A	0.298 ^l
Eo#	0.06±0.03	0.06±0.07	0.07±0.08	0.06±0.03	0.04±0.02	N/A	0.325 ^l
Ly#	6.48±2.25	7.35±2.09 ‡	5.52±1.18	7.85±2.41 ‡	7.93±1.39 *, ‡	N/A	0.009 ^l
MCV	61.88±0.99	59.75±1.63 *	60.10±1.46 *	59.62±1.77 *	60.05±1.39 *	N/A	0.006 ^l
Mo#	0.04±0.02	0.04±0.03	0.03±0.02	0.02±0.01	0.04±0.02	N/A	0.136 ^l
Ne#	1.31±0.59	1.55±0.96	1.33±0.45	0.91±0.22	1.34±0.51	N/A	0.070 ^l
PDW	6.94±0.31	7.69±0.53 *	7.07±0.33	7.41±0.40	7.37±0.33	5.812	0.001 ^s
IG%	0.06±0.07	0.15±0.16	0.12±0.13	0.09±0.09	0.06±0.08	N/A	0.624 ^l
PLT	835.30±109.59	834.10±81.53	945.10±440.77	792.00±148.39	890.40±106.33	N/A	0.318 ^l
Nrbc#	0.00±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	N/A	0.424 ^l
Nrbc%	0.05±0.07	0.07±0.07	0.08±0.08	0.09±0.07	0.06±0.07	N/A	0.719 ^l
P.LCR	3.89±0.76	6.46±2.28	4.41±1.01	5.20±1.20	5.08±1.00	5.099	0.002 ^s
IG#	0.00±0.01	0.01±0.02	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	N/A	0.545 ^l
Rdw.sd	25.80±1.64	24.56±0.60	25.16±1.46	24.65±1.61	24.96±0.90	N/A	0.306 ^l
Rdv.cv	13.41±1.13	13.97±1.36	13.46±0.66	13.74±1.53	13.94±1.10	0.482	0.749 ^s

Veriler Ortalama ± Standart Sapma olarak gösterilmiştir. WBC: White Blood Cell, RBC: Red Blood Cell, HGB: Hemoglobin, HCT: Hematocrit, MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin, MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, PCT: Plateletcrit, MPV: Mean Platelet Volume, LY%: Lymphocyte Percent, MO%: Monocyte Percent, NE%: Neutrophil Percent, EO%: Eosinophil Percent, BA%: Basophil Percent, BA#: Basophil Count, EO#: Eosinophil Count, LY#: Lymphocyte Count, MCV: Mean Corpuscular Volume, MO#: Monocyte Count, NE#: Neutrophil Count, PDW: Platelet Distribution Width, IG%: Immature Granulocyte Percent, PLT: Platelet Count, NRBC#: Nucleated Red Blood Cell Count, NRBC%: Nucleated Red Blood Cell Percent, P-LCR: Platelet Large Cell Ratio, IG#: Immature Granulocyte Count, RDW-SD: Red Cell Distribution Width–Standard Deviation, RDW-CV: Red Cell Distribution Width–Coefficient of Variation, NK21: Negatif Kontrol Grubu 21. Gün, H21: Hasar Grubu 21. Gün, HC21: Hasar + Sitikolin Tedavi Grubu 21. Gün, HM21: Hasar + Metilkobalamin Tedavi Grubu 21. Gün, HCM21: Hasar + Sitikolin + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu 21. Gün, *, †: NK21 grubuna kıyasla $p<0.05$, ‡: H21 grubuna kıyasla $p<0.05$, ‡: HC21 grubuna kıyasla $p<0.05$, ^s: One-way Analysis of Variance Testi, ^l: Kruskal-Wallis Testi

WBC (Beyaz Kan Küresi) NK21 ile kıyasla HCM21 grubunda istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.046$). WBC HC21 ile kıyasla; H21 ve HCM21 gruplarında istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.038$ ve $p=0.004$).

RBC (Eritrosit Sayısı) açısından ANOVA testi sonucu gruplar arasında zayıf istatistiksel farklılık saptasa da ($F: 3.661$, $p=0.012$), yapılan post-hoc Tamhane testi sonrası gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

MCHC (Ortalama Korpüsküler Hemogloblin Konsantrasyonu) NK21 grubu ile kıyasla; HC21, HM21 ve HCM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.008$, $p<0.001$ ve $p<0.001$). MCHC H21 ile kıyasla; HM21 ve HCM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.011$ ve $p=0.037$).

MPV (Ortalama Trombosit Hacmi) NK21 grubu ile kıyasla H21, ve HM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.028$ ve $p=0.042$).

PDW (Trombosit Dağılım Genişliği) NK21 grubu ile kıyasla H21 grubunda istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulunmuştur ($p=0.017$).

LY% (Lenfosit yüzdesi) NK21 grubu ile kıyasla HM21 grubunda istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulunmuştur ($p=0.034$). LY% H21 grubu ile kıyasla HM21 grubunda istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulunmuştur ($p=0.010$). LY% HC21 grubuna kıyasla; HM21 ve HCM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p<0.001$ ve $p=0.047$).

NE% (Nötrofil yüzdesi) NK21 grubu ile kıyasla HM21 grubunda istatistiksel olarak anlamlı daha düşük bulunmuştur ($p=0.031$). NE% HM21 grubuna kıyasla; H21 ve HC21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.007$ ve $p=0.001$).

Ly# (Lenfosit sayısı) NK21 grubu ile kıyasla HCM21 grubunda istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulunmuştur ($p=0.032$). Ly# HC21 grubuna kıyasla; H21, HM21 ve HCM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.023$, $p=0.008$ ve $p=0.001$).

MCV (Ortalama Eritrosit Hacmi) NK21 grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı daha düşük olduğu gözlenmiştir (H21: $p=0.002$; HC21: $p=0.008$; HM21: $p=0.001$ ve HCM21: $p=0.003$).

P.LCR (Platelet Large Cell Ratio) açısından ANOVA testi sonucu gruplar arasında istatistiksel farklılık saptasa da (F: 5.099, p=0.002), yapılan post-hoc Tamhane testi sonrası gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (p>0.05).

HGB, HCT, MHC, PCT, MO%, EO%, BA%, BA#, EO#, MO#, NE#, IG%, PLT, NRBC#, NRBC%, IG#, RDW.SD, RDW.CV parametreleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0.05).

4.2 Biyokimya Verileri

Tablo 4.2’de 21. gün tam kan biyokimya bulguları verilmiştir.

Tablo 4.2. 21. Gün biyokimya bulguları

	NK21	H21	HC21	HM21	HCM21	F	p
BUN	16.17±1.65	17.34±1.55	16.87±2.55	16.59±1.51	17.99±1.87	1.418	0.244 [‡]
Krea	0.53±0.05	0.51±0.03	0.50±0.00	0.50±0.00	0.55±0.05	N/A	0.014 [§]
AST	165.10±17.30	136.60±21.53	130.90±18.57	144.10±37.64	144.60±30.00	N/A	0.026 [§]
ALT	47.50±2.99	52.70±8.07	49.80±4.69	48.20±6.11	45.90±7.74	1.726	0.161 [‡]
LDH	1473.7±414.4	841.3±311.8	927.0±484.1	816.7±420.3	1063.5±624.5	N/A	0.031 [§]

Veriler Ortalama ± Standart Sapma olarak gösterilmiştir. BUN: Blood Urea Nitrogen, Krea: Kreatinin, AST: Aspartat Aminotransferaz, ALT: Alanin Aminotransferaz, LDH: Laktat Dehidrogenaz, NK21: Negatif Kontrol Grubu 21. Gün, H21: Hasar Grubu 21. Gün, HC21: Hasar + Sitikolin Tedavi Grubu 21. Gün, HM21: Hasar + Metilkobalamin Tedavi Grubu 21. Gün, HCM21: Hasar + Sitikolin + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu 21. Gün, *: NK21 grubuna kıyasla p<0.05, †: HCM21 grubuna kıyasla p<0.05, ‡: One-way Analysis of Variance Testi, §: Kruskal-Wallis Testi.

Kreatin NK21 grubuna kıyasla; H21, HC21 ve HM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı daha düşük bulunmuştur (sırasıyla; p=0.021, p=0.004 ve p=0.004).

AST (Aspartat Aminotransferaz) NK21 grubuna kıyasla; H21, HC21 ve HM21 gruplarında istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur (sırasıyla; p=0.011, p=0.003 ve p=0.016). NK21 ile kıyasla HCM21 grubunda AST daha düşük bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel anlamlılık değerine ulaşmamıştır (p=0.054).

LDH (Laktat Dehidrogenaz) NK21 grubuna kıyasla; H21, HC21 ve HM21 gruplarına istatistiksel olarak anlamlı daha düşük olduğu saptanmıştır (sırasıyla; p=0.009, p=0.020 ve p=0.004). NK21 ile kıyasla HCM21 grubunda LDH daha düşük bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel anlamlılık değerine ulaşmamıştır (p=0.050).

BUN (Blood Urea Nitrogen) ve ALT (Alanin Aminotransferaz) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0.05).

4.3 Vücut Ağırlığı Verileri

Tablo 4.3'te vücut ağırlıklarının gruplar ve zaman dilimleri arasında karşılaştırılması gösterilmiştir.



Tablo 4.3. Vücut ağırlıklarının gruplar ve zaman dilimleri arasında karşılaştırılması

	NK7 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	H7 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	HC7 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	HM7 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	HCM7 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	NK21 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	H21 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	HC21 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	HM21 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	HCM21 Ort±SD Median(IQR) [Min-Max]	F	p
0. GÜN	263.40±10.73 265.50(13.75) [244-280]	265.10±15.94 266.00(24.25) [244-296]	237.80±25.81 228.00(44.00) [210-283]	246.90±26.40 238.50(34.25) [215-303]	261.20±25.75 268.00(48.25) [227-302]	226.40±29.78 232.00(56.00) [183-262]	255.00±24.36 265.50(39.00) [210-278]	256.90±28.04 267.50(41.50) [204-300]	256.10±11.17 250.00(21.00) [246-275]	241.60±19.72 242.50(40.75) [216-268]	N/A	0.010 [§]
1. GÜN	262.00±11.29 263.00(20.75) [244-280]	260.00±10.26 259.00(17.00) [245-278]	236.90±32.18 224.00(52.00) [200-299]	239.90±20.65 233.00(29.50) [219-283]	255.10±25.21 260.00(39.75) [220-302]	227.20±30.38 226.50(62.75) [192-261]	250.90±21.79 251.00(37.50) [215-278]	252.70±31.91 266.50(49.75) [197-297]	250.40±11.28 248.00(20.75) [234-266]	238.50±20.83 243.50(43.25) [210-263]	N/A	0.027 [§]
4. GÜN	265.30±10.38 265.50(15.50) [247-281]	269.50±14.13 263.50(33.00) [255-302]	239.60±22.17 234.50(33.00) [212-287]	246.80±21.38 240.50(28.25) [219-293]	263.30±19.79 267.00(32.75) [238-298]	239.30±29.20 236.50(57.00) [199-275]	265.30±19.28 264.50(30.75) [236-295]	268.90±23.44 277.00(38.00) [225-300]	262.10±11.47 261.50(21.25) [246-280]	249.60±18.61 253.00(38.25) [221-272]	3.636	0.001 [‡]
7. GÜN	279.40±14.44 274.50(26.00) [263-303]	282.10 ± 19.5 277.00(20.75) [256-324]	259.10±20.51 255.00(31.25) [236-297]	263.80±23.16 258.50(32.25) [232-310]	281.40±24.82 278.00(37.25) [254-323]	250.20±26.40 245.50(52.25) [217-284]	275.60±24.48 281.50(31.75) [226-309]	281.80±22.04 289.50(38.00) [239-306]	268.70±13.16 272.00(24.75) [248-283]	260.40±20.43 268.50(36.25) [227-283]	2.886	0.005 [‡]
p	0.002 [!]	0.001 [!]	0.000 [!]	0.000 [!]	0.001 [!]	0.000 [!]	0.000 [!]	0.000 [!]	0.000 [!]	0.000 [!]		
10. GÜN	-	-	-	-	-	256.50±24.66 260.00(47.50) [222-285]	274.70±20.23 279.00(26.00) [232-300]	281.50±20.47 290.00(31.75) [242-306]	268.90±15.30 272.00(23.50) [242-290]	255.80±18.10 257.00(36.25) [232-278]	3.176	0.022 [‡]
13. GÜN	-	-	-	-	-	266.20±25.29 257.00(49.50) [238-300]	286.30±24.57 287.00(32.00) [240-321]	293.30±22.20 302.00(32.75) [247-316]	278.00±20.12 288.00(39.25) [247-299]	274.50±23.09 285.50(44.75) [243-298]	N/A	0.120 [§]
16. GÜN	-	-	-	-	-	269.40±23.89 259.00(44.75) [238-300]	293.20±23.47 297.00(33.00) [246-321]	298.60±22.97 305.50(33.50) [250-323]	283.30±23.01 292.00(42.75) [249-310]	281.10±23.04 291.50(46.25) [250-308]	N/A	0.063 [§]
21. GÜN	-	-	-	-	-	286.10±25.70 276.50(46.25) [255-320]	317.10±23.39 323.00(36.50) [269-344]	321.70±25.60 332.50(32.25) [265-348]	300.80±25.52 310.50(50.25) [267-332]	292.30±24.54 305.00(46.50) [257-321]	N/A	0.013 [§]
p	-	-	-	-	-	0.000 [!]	0.000 [!]	0.000 [!]	0.000 [!]	0.000 [!]		

NK7: Negatif Kontrol Grubu 7. Gün, H7: Hasar Grubu 7. Gün, HC7: Hasar + Sitikolin Tedavi Grubu 7. Gün, HM7: Hasar + Metilkobalamin Tedavi Grubu 7. Gün, HCM7: Hasar + Sitikolin + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu 7. Gün, NK21: Negatif Kontrol Grubu 21. Gün, H21: Hasar Grubu 21. Gün, HC21: Hasar + Sitikolin Tedavi Grubu 21. Gün, HM21: Hasar + Metilkobalamin Tedavi Grubu 21. Gün, HCM21: Hasar + Sitikolin + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu 21. Gün, Ort: Ortalama, SD: Standart Deviasyon, IQR: Interquartile Range, Min: Minimum, Max: Maximum, *: NK21 grubuna kıyasla $p<0.05$, †: HC21 grubuna kıyasla $p<0.05$, ‡: One-way Analysis of Variance Testi, §: Kruskal-Wallis Testi, !: Friedman Testi

0. ve 1. günlerde grupların başlangıç ağırlıkları değerlendirildiğinde Kruskal-Wallis testi sonrası gruplar arasında anlamlı farklılık bulunsa da post-hoc ikili karşılaştırmalar için yapılan Mann-Whitney U testi ve Bonferroni düzeltmesi sonrası gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). 4. günde grupların ağırlıkları değerlendirildiğinde, ANOVA testi sonrası gruplar arasında anlamlı farklılık bulunsa da post-hoc ikili karşılaştırmalar için yapılan Tamhane T2 testi sonrası gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). 7. günde ise NK21 ile kıyasla H7, HCM7 ve HC21 gruplarında istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek vücut ağırlığı tespit edilmiştir (sırasıyla; $p=0.037$, $p=0.046$ ve $p=0.041$).

10. günde HC21 grubunda vücut ağırlığı diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuş ve bu fark HCM21 grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak tespit edilmiştir ($p=0.046$). 21. günde Kruskal-Wallis testi sonrası gruplar arasında anlamlı fark bulunmuş ($p=0.013$), yapılan post-hoc Mann-Whitney U testi ve Bonferroni düzeltmesi sonrası grupların ikili karşılaştırmalarında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

0 ile 7. günler arasında ve 10 ile 21. günler arasında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı biçimde vücut ağırlıklarının arttığı gözlemlenmiştir (sırasıyla; $p<0.01$ ve $p<0.001$).

4.4 Histolojik Bulgular

Tablo 4.4'te akson sayısı ve çapının 7. ve 21. gün grupları arasında karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Akson sayısı ve çapının 7. ve 21. gün grupları arasında karşılaştırılması

	NK	H	HC	HM	HCM	p
	Median(IQR) [min-maks]	Median(IQR) [min-maks]	Median(IQR) [min-maks]	Median(IQR) [min-maks]	Median(IQR) [min-maks]	
7.GÜN	221.0(85.0) [150-345]	110.0(48.0) [20-232] *	189.5(39.5) [133-235] †	187.0(48.0) [54-356] *,†	233.0(91.5) [87-397] †,§	0.000*
Akson Sayısı						
21.GÜN	238.0(96.5) [125-357]	170.0(57.0) [80-225] *	286.5(108.25) [112-387] *,†	258.0(172.5) [115-431] *,†	324.0(156.5) [163-431] *,†,§	0.000*
p	0.003 [†]	0.000 [†]	0.005 [†]	0.000 [†]	0.000 [†]	
7.GÜN	3237(1570.25) [1311-7714]	2875(1136.50) [1164-6969] *	3416(1222.50) [1324-9058] †	3353(1495.00) [1164-8000] †	3497(1197.25) [1385-6861] *,†,§	0.000*
Akson Çapı						
21.GÜN	3744(1826.25) [1273-7810]	2579.5(1158.00) [1060-8917] *	2730(1205.00) [1060-6003] *	2778(1038.00) [1106-6098] *,†	2937(1233.50) [1150-8074] *,†,§	0.000*
p	0.000 [†]	0.000 [†]	0.000 [†]	0.000 [†]	0.000 [†]	

NK7: Negatif Kontrol Grubu 7. Gün, H7: Hasar Grubu 7. Gün, HC7: Hasar + Sitikolin Tedavi Grubu 7. Gün, HM7: Hasar + Metilkobalamin Tedavi Grubu 7. Gün, HCM7: Hasar + Sitikolin + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu 7. Gün, NK21: Negatif Kontrol Grubu 21. Gün, H21: Hasar Grubu 21. Gün, HC21: Hasar + Sitikolin Tedavi Grubu 21. Gün, HM21: Hasar + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu 21. Gün, HCM21: Hasar + Sitikolin + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu 21. Gün, *; NK grubuna kıyasla $p < 0.05$, †; H grubuna kıyasla $p < 0.05$, ‡; HC grubuna kıyasla $p < 0.05$, §; HM grubuna kıyasla $p < 0.05$, †; 7. Gün Grubuna Kıyasla $p < 0.05$, †; Kruskal Wallis Testi, 7. Gün ile 21. Gün Grupları Karşılaştırmalarında Independent samples Mann-Whitney U Testi Kullanıldı.

Çalışmada, tüm deney gruplarına ait siyatik sinir dokularının genel morfolojik özellikleri incelenmiş, akson sayıları ve akson çapları değerlendirilerek histomorfometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu, cerrahi grup ve tedavi uygulanan sıçanlara ait siyatik sinir kesitlerine ilişkin mikroskobik görüntüler Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

NK gruplarına ait sinir kesitlerinin ışık mikroskobu altında yapılan histolojik incelemesinde, Schwann hücreleri ile çevrelenmiş aksonların bağ dokusu kılıfları içerisinde düzenli bir bütünlük sergilediği ve normal doku mimarisini koruduğu gözlemlenmiştir. Hasar oluşturulan grupta ise belirgin aksonal dejenerasyon, miyelinli sinir liflerinde kayıp ve ödem gibi ileri düzey histopatolojik değişiklikler tespit edilmiştir. Benzer bulgular 7. gün hasar grubunda 21. gün hasar grubuna göre daha az izlendi. Tedavi gruplarında ise, bu patolojik bulguların cerrahi gruba kıyasla azaldığı dikkati çekti.

Histopatolojik değerlendirmeyi takiben, kontrol grubu dahil olmak üzere tüm deney gruplarına ait sinir örneklerinde histomorfometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda akson sayısı ve akson çapına ilişkin ölçümler yapılmış ve gruplar arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur.

Akson sayısı açısından 7. gün grupları karşılaştırıldığında; NK grubuna göre, H ve HM gruplarında istatistiksel anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur (sırasıyla; $p<0.001$ ve $p=0.044$). Akson sayıları H grubuna göre; HC, HM ve HCM gruplarında istatistiksel anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Akson sayıları HM grubuna kıyasla HCM grubunda istatistiksel anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p=0.002$).

Akson sayısı açısından 21. gün grupları karşılaştırıldığında; NK grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel anlamlı düzeyde fark vardır, akson sayısı H grubunda daha düşük iken HC, HM ve HCM gruplarında ise daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p<0.001$, $p=0.002$, $p=0.027$ ve $p<0.001$). Akson sayıları H grubuna göre; HC, HM ve HCM gruplarında istatistiksel anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Akson sayıları HM grubuna kıyasla HCM grubunda istatistiksel anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p=0.014$). Akson sayıları tüm 21. gün gruplarında 7. gün gruplarına göre istatistiksel anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (NK: $p=0.003$, H: $p<0.001$, HC: $p=0.005$, HM: $p<0.001$ ve HCM $p<0.001$).

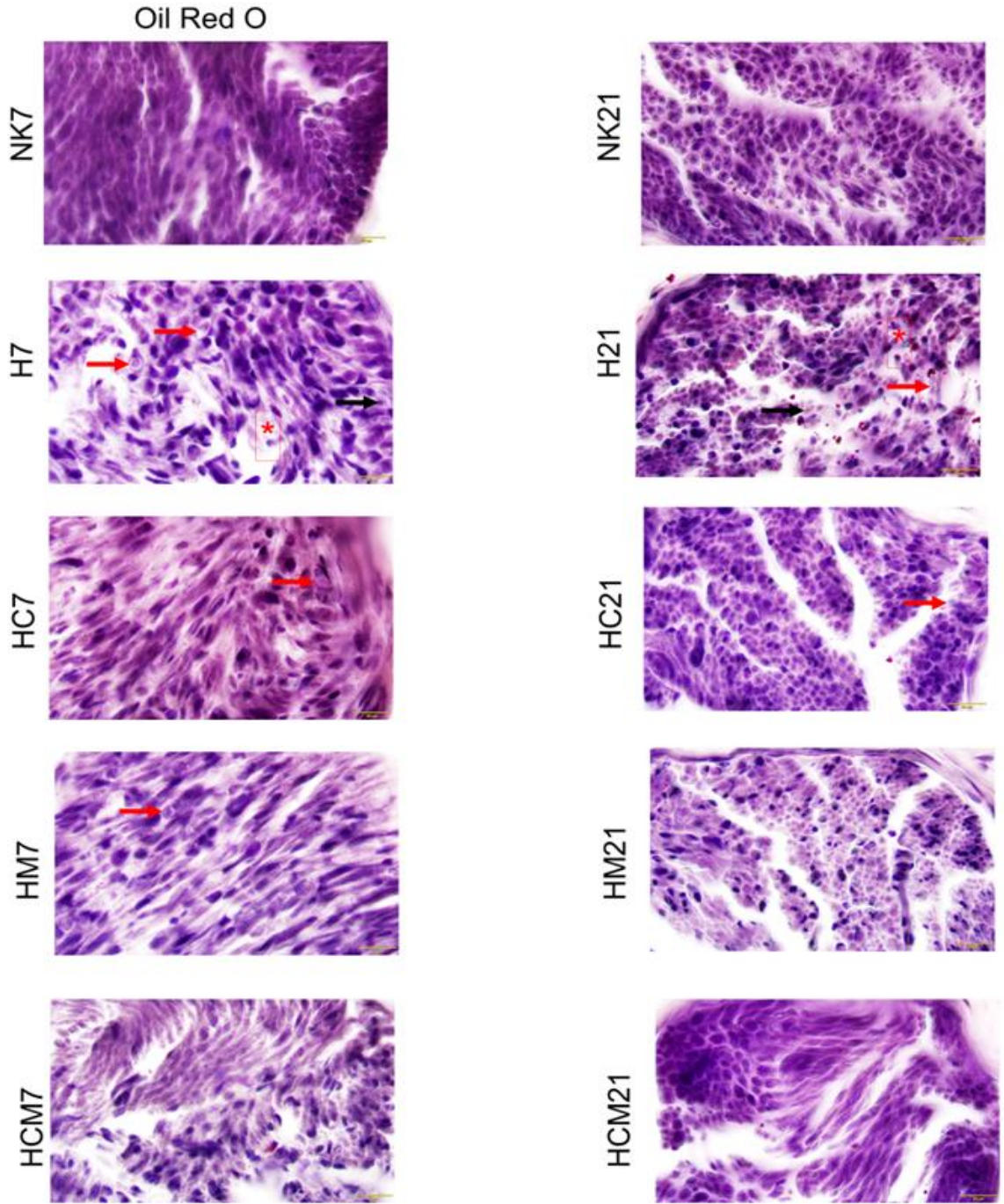
Akson çapı açısından 7. gün grupları karşılaştırıldığında; NK grubuna göre, istatistiksel anlamlı düzeyde H grubunda daha düşük, HCM grubunda ise daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p<0.001$ ve $p=0.001$). Akson çapları H grubuna göre; HC, HM ve HCM gruplarında istatistiksel anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Akson apları HM grubuna kıyasla HCM grubunda istatistiksel anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p=0.028$).

Akson apı açısından 21. gün grupları karşılaştırıldığında; NK grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Aksan apları H grubuna göre HM ve HCM gruplarında istatistiksel anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.023$ ve $p<0.001$). Aksan apları HCM grubunda HC ve HM gruplarına kıyasla istatistiksel anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Akson apları NK21 grubunda istatistiksel anlamlı düzeyde NK7 grubuna göre daha yüksek, diğer tüm 21. gün gruplarında ise 7. gün gruplarında göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$).

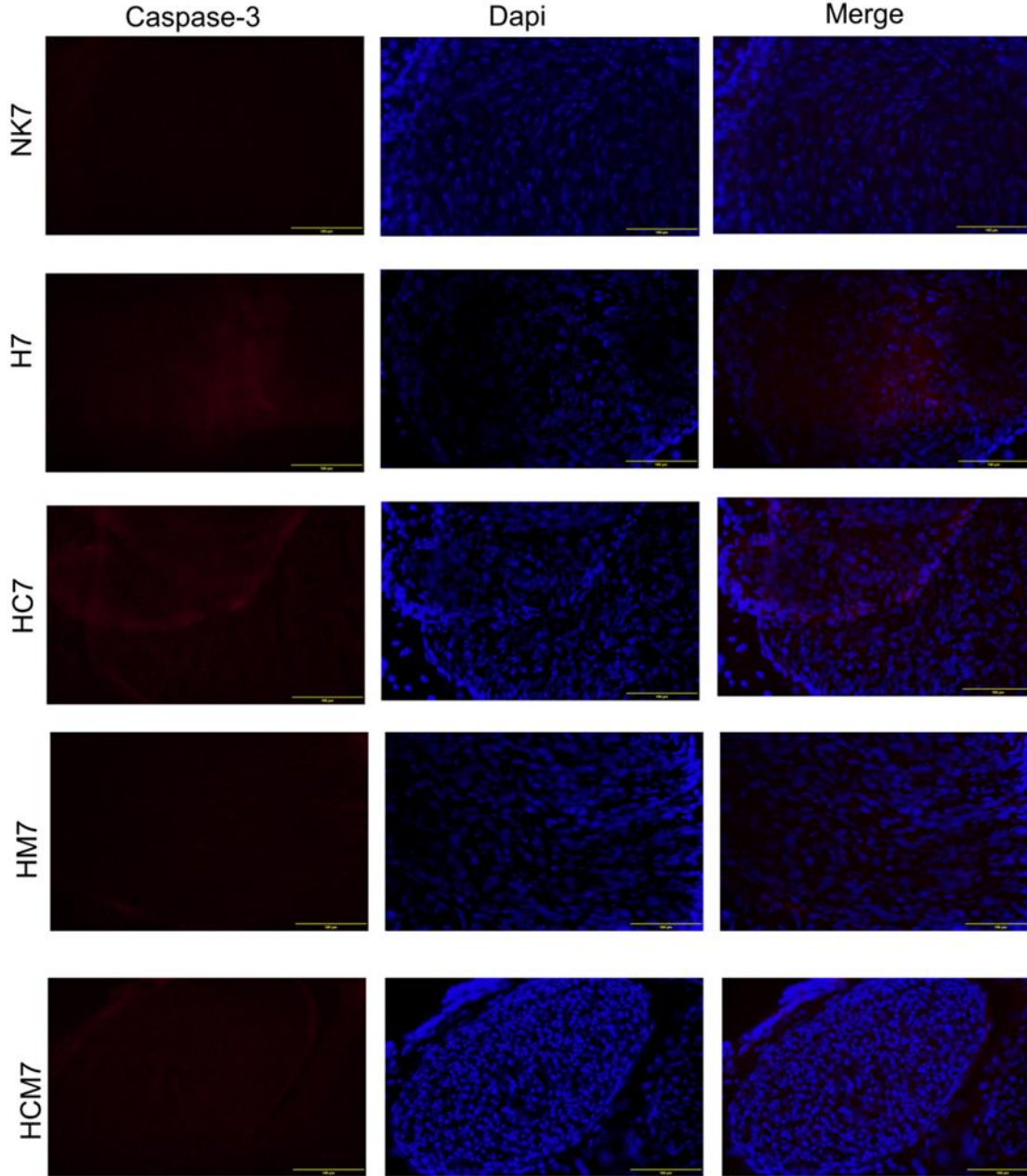




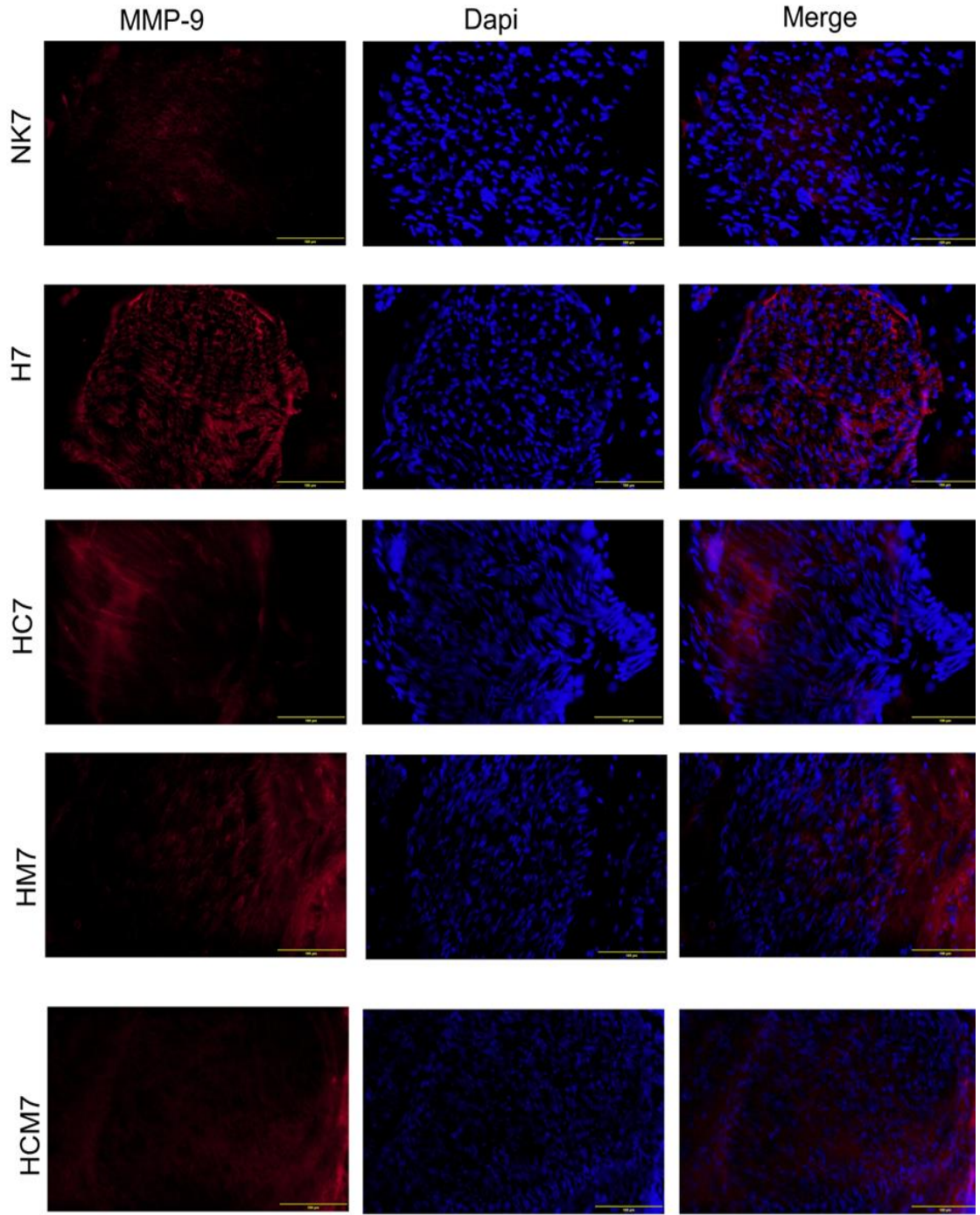
Şekil 4.1. 7. Ve 21. Gün deney gruplarına ait Oil Red O boyama görüntüleri (X100).
 Kırmızı ok; miyelinli sinir lifi kaybı, siyah ok; aksonal dejenerasyon, yıldız; ödem.
 Ölçek çubukları= 20 μ m.

4.5 İmmünohistokimyasal Bulgular

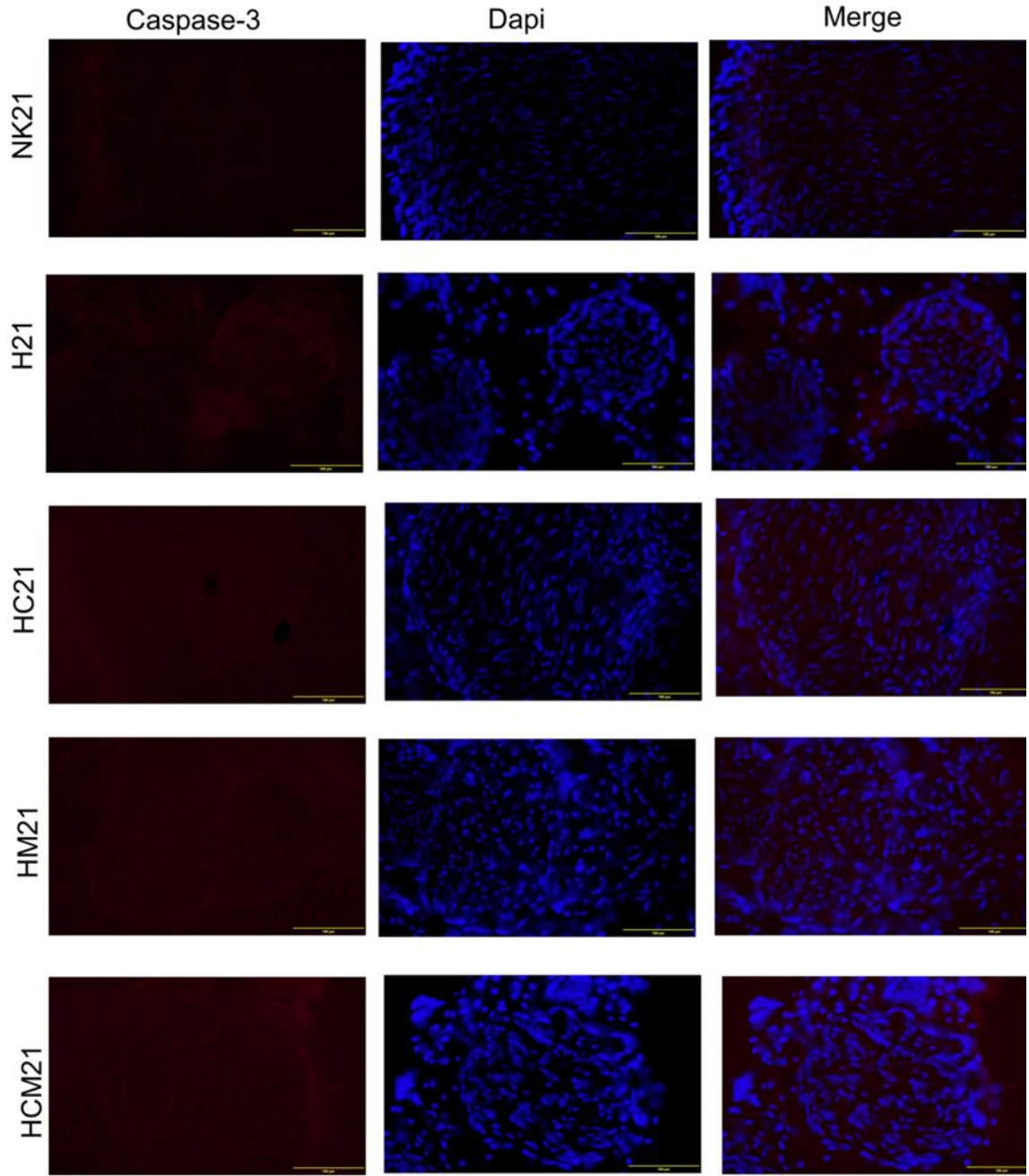
Çalışmada, mental sinir lifleri, spesifik bir marker olan Caspase-3, BDNF ve MMP-9 immünfloresan boyama ile görselleştirildi. Tüm deney gruplarına ait sinir dokularından elde edilen floresan mikroskobik görüntüler Şekil 4.1-4.6’da gösterilmiştir.



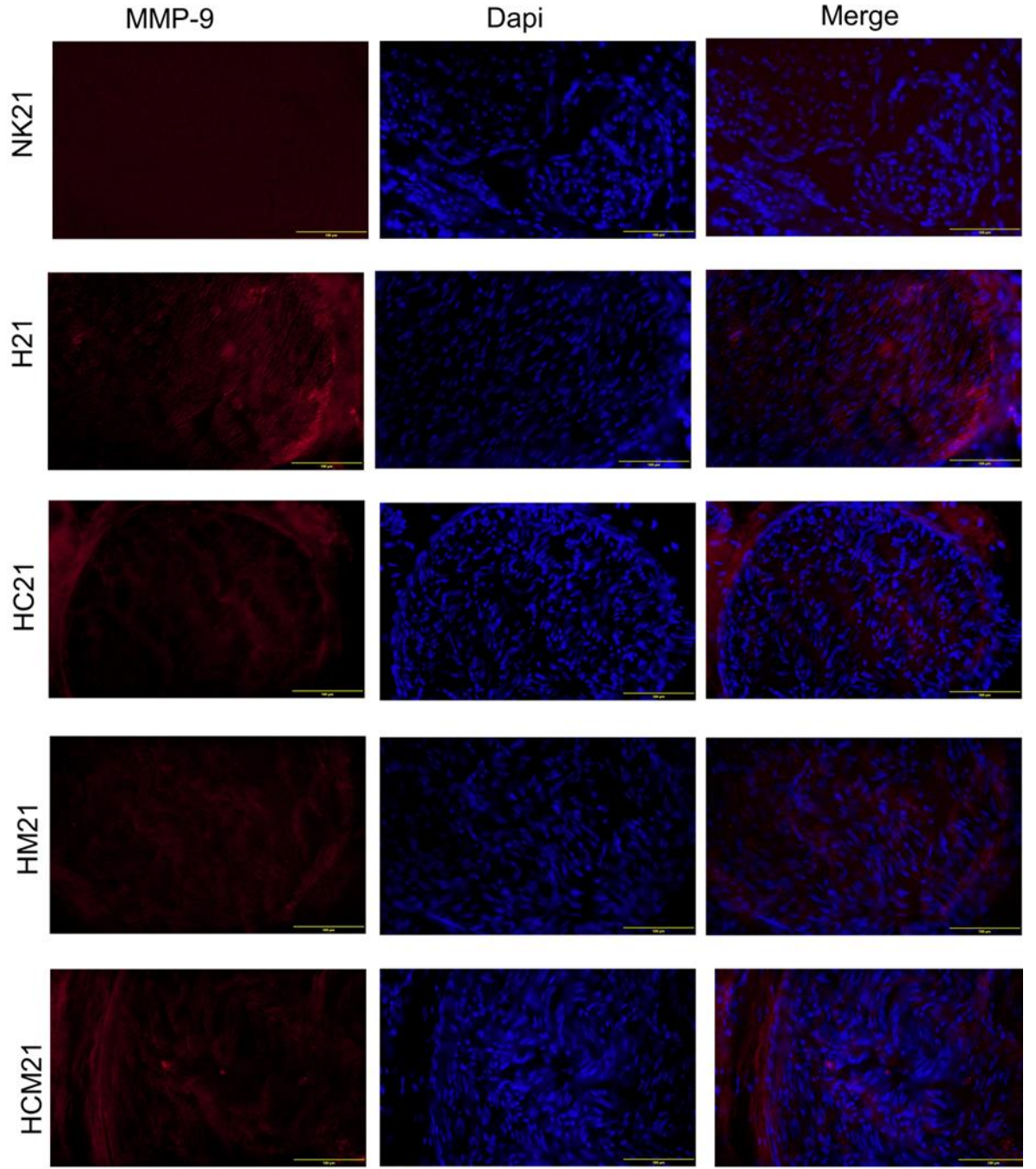
Şekil 4.2. 7. gün deney gruplarına ait Caspase-3 immünfloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 μ m.



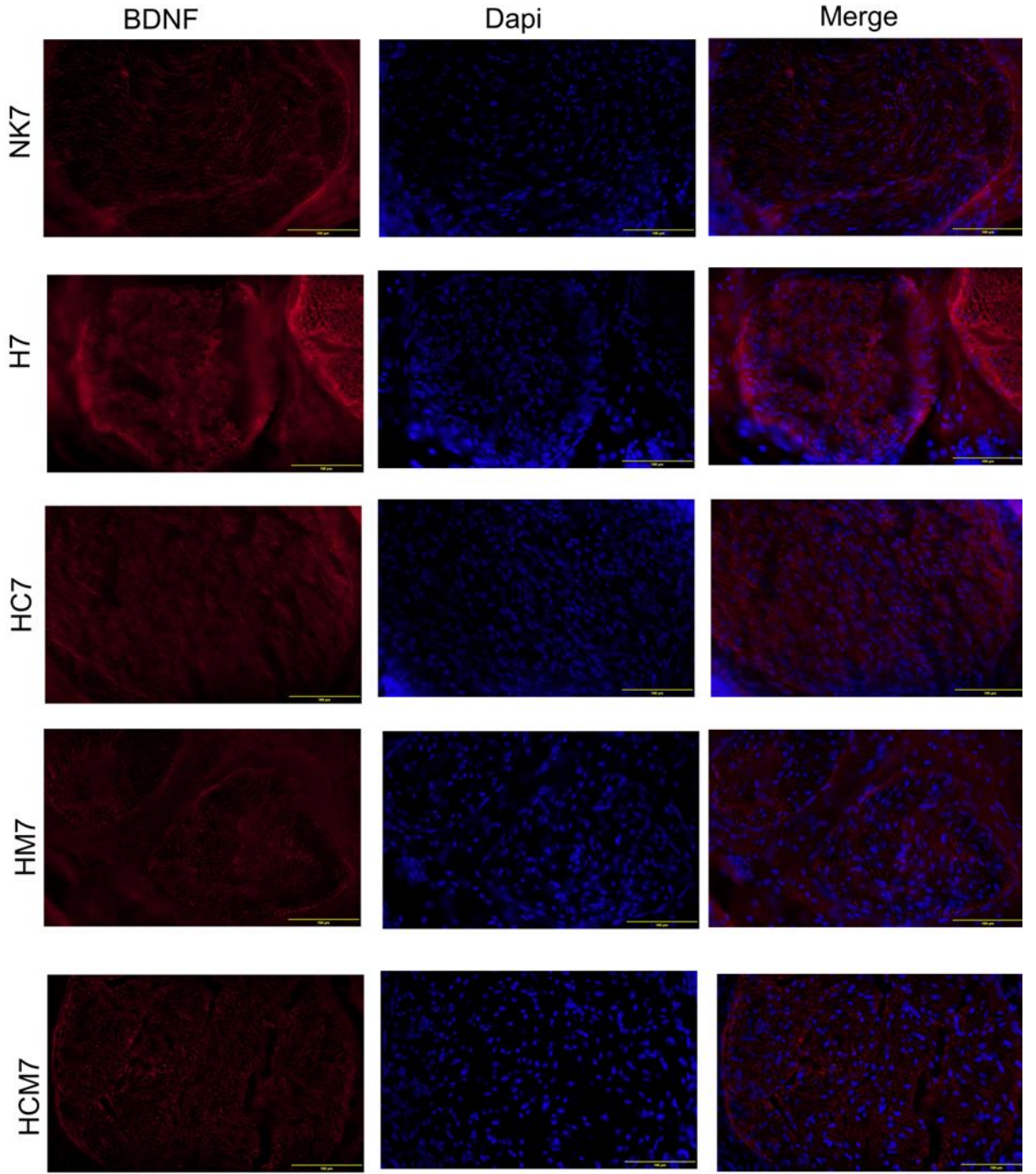
Şekil 4.3. 21. gün deney gruplarına ait Caspase-3 immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 μ m.



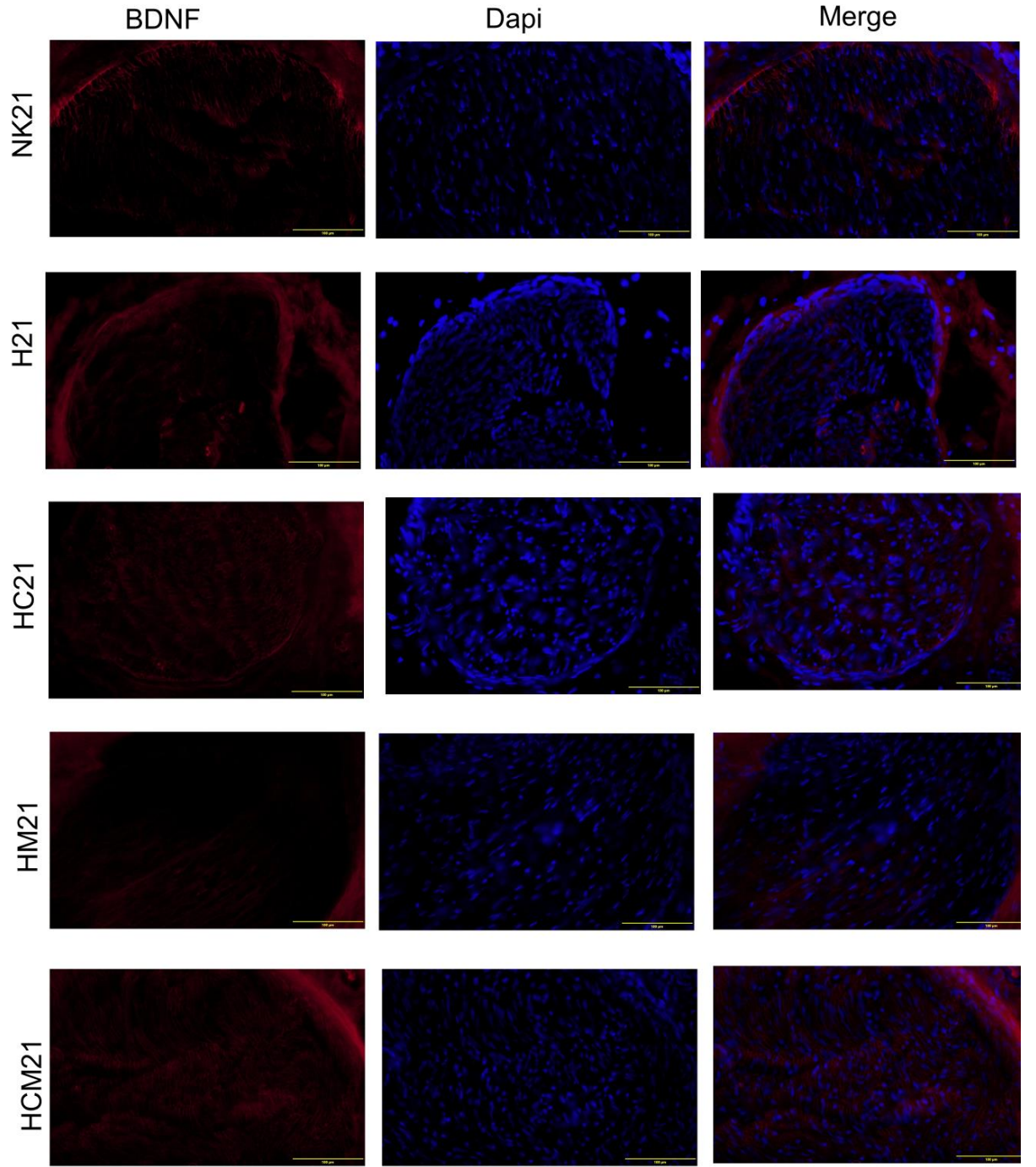
Şekil 4.4. 7. gün deney gruplarına ait MMP-9 immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 μ m.



Şekil 4.5. 21. gün deney gruplarına ait MMP-9 immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 μ m.



Şekil 4.6. 7. gün deney gruplarına ait BDNF immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 μ m.



Şekil 4.7. 21. gün deney gruplarına ait BDNF immunofloresan boyama görüntüleri, (X40). Ölçek çubukları = 100 µm.

Tablo 4.5. Caspase-3, MMP-9 ve BDNF immünreaksiyonlarının 7. gün grupları arasında karşılaştırılması

	NK7 Median (IQR) [min-maks]	H7 Median (IQR) [min-maks]	HC7 Median (IQR) [min-maks]	HM7 Median (IQR) [min-maks]	HCM7 Median (IQR) [min-maks]	p
CASPASE-3	240979(2269) [237681-250850]	248222(4839) [246035 -266398] *	245649(1218) [234273-249088] *, †	244105(1355) [230349-249258] *, †, §	244375(2747) [237313-249147] *, †	0.000 [¶]
MMP-9	243987(3636) [22154-248093]	246269(7838) [236779-267149] *	243283(7536) [234327-247494] †	239594(10139) [225277-248925] *, †	240617(2741) [228734-249388] *, †	0.000 [¶]
BDNF	220101(13003) [208615-246040]	247552(1742) [239733-265537] *	246383(5142) [226053-251668] *, †	245269(1720) [234837-251831] *, †	240196(5729) [202026-246321] *, †, ‡, §	0.000 [¶]

NK7: Negatif Kontrol Grubu 7. Gün, H7: Hasar Grubu 7. Gün, HC7: Hasar + Sitikolin Tedavi Grubu 7. Gün, HM7: Hasar + Metilkobalamin Tedavi Grubu 7. Gün, HCM7: Hasar + Sitikolin + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu 7. Gün, *, †: NK7 grubuna kıyasla $p < 0.05$, ‡: H7 grubuna kıyasla $p < 0.05$, §: HC7 grubuna kıyasla $p < 0.05$, ‡: HM7 grubuna kıyasla $p < 0.05$, †: Kruskal-Wallis Testi, post-hoc Mann-Whitney U testi ve Bonferroni düzelmesi

Tablo 4.5'te Caspase-3, MMP-9 ve BDNF immünreaksiyonlarının 7. gün grupları arasında karşılaştırılması verilmiştir.

7. gün Caspase-3 immünreaktivitesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.001$). İkili karşılaştırmalarda NK7 grubunda diğer gruplara kıyasla Caspase-3 düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (NK7 ile HM7: $p=0.001$, diğerleri: $p<0.001$). HM7 grubu; H7 ve HC7 gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük Caspase-3 düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir (sırasıyla; $p<0.001$ ve $p=0.050$). H7 grubuna kıyasla; HC7 ve HCM7 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$).

7. gün MMP-9 immünreaktivitesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.001$). İkili karşılaştırmalarda MMP-9 seviyesi NK7 grubuna kıyasla; H7 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek, HM7 ve HCM7 gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla; $p<0.001$, $p=0.007$ ve $p=0.009$). HC7 grubunda H7 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük MMP-9 düzeyi görülmüştür ($p<0.001$). H7 grubuna kıyasla; HC7, HM7 ve HCM7 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu izlenmiştir ($p<0.001$).

BDNF düzeyleri açısından 7. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar mevcuttur ($p<0.001$). BDNF düzeyleri NK7 grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda istatistiksel anlamlı derecede artmıştır (NK7 ile H7, HC7 ve HM7: $p<0.001$, NK7 ile HCM7: $p=0.020$). BDNF düzeyleri H7 grubuna kıyasla HC7, HM7 ve HCM7 gruplarında istatistiksel anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla; $p=0.009$, $p=0.003$ ve $p<0.001$). BDNF düzeyleri HCM7 ile kıyasla HC7 ve HM7 gruplarında istatistiksel anlamlı biçimde daha yüksek olduğu izlenmiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.6. Caspase-3, MMP-9 ve BDNF immünreaksiyonlarının 21. gün grupları arasında karşılaştırılması

	NK21 Median(IQR) [min-maks]	H21 Median(IQR) [min-maks]	HC21 Median(IQR) [min-maks]	HM21 Median(IQR) [min-maks]	HCM21 Median(IQR) [min-maks]	p
CASPASE-3	241161(3006) [236326-248703]	245118(2229) [236332-248921] *	244380(2390) [239961-251874] *	243168(1970) [238724-247103] *, †	238836(1493) [233619-242453] *, †, ‡, §	0.000 [¶]
MMP-9	240888(5014) [232085-250891]	246487(4327) [238753-255432] *	241261(5561) [228574-248865] †	243525(5013) [233423-250494] †, ‡	244728(5297) [238034-252166] *, ‡	0.000 [¶]
BDNF	231809(17281) [206583-248459]	248128(2099) [242729-257646] *	241254(7097) [226231-248856] †	239270(10395) [221808-248122] †	225497(14756) [213628-238780] *, †, ‡, §	0.000 [¶]

NK21: Negatif Kontrol Grubu 21. Gün, H21: Hasar Grubu 21. Gün, HC21: Hasar + Sitikolin Tedavi Grubu 21. Gün, HM21: Hasar + Metilkobalamin Tedavi Grubu 21. Gün, HCM21: Hasar + Sitikolin + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu 21. Gün, *: NK21 grubuna kıyasla $p < 0.05$, †: H21 grubuna kıyasla $p < 0.05$, ‡: HC21 grubuna kıyasla $p < 0.05$, §: HM21 grubuna kıyasla $p < 0.05$, ¶: Kruskal-Wallis Testi, post-hoc Mann-Whitney U testi ve Bonferroni düzeltmesi

Tablo 4.6’da Caspase-3, MMP-9 ve BDNF immünreaksiyonlarının 21. gün grupları arasında karşılaştırılması verilmiştir.

Caspase-3 immünreaktivitesi açısından 21. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.001$). Caspase-3 düzeyleri NK21 grubuna kıyasla; H21, HC21 ve HM21 gruplarında istatistiksel anlamlı derecede yüksekken, HCM21 grubunda istatistiksel anlamlı derecede düşük bulunmuştur (NK21 ile H21, HC21 ve HCM21: $p<0.001$, NK21 ile HM21: $p=0.030$). Caspase-3 düzeyleri H21 grubuna kıyasla; HM21 ve HCM21 gruplarında istatistiksel anlamlı derecede daha düşük olduğu izlenmiştir (sırasıyla; $p=0.036$ ve $p<0.001$). Caspase-3 düzeyleri HCM21 grubuna kıyasla; HC21 ve HM21 gruplarında istatistiksel anlamlı derecede daha yüksek olduğu izlenmiştir ($p<0.001$).

MMP-9 immünreaktivitesi açısından 21. gün grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.001$). MMP-9 düzeyleri NK21 grubuna kıyasla; H21 ve HCM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla; $p<0.001$ ve $p=0.003$). MMP-9 düzeyleri H21 grubuna kıyasla; HC21 ve HM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu görülmüştür (sırasıyla; $p<0.001$ ve $p=0.013$). MMP-9 düzeyleri HC21 grubuna kıyasla; HM21 ve HCM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla; $p=0.042$ ve $p<0.001$).

BDNF düzeyleri açısından 21. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.001$). BDNF seviyeleri NK21 ile kıyasla H21 grubunda istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek, HCM21 grubunda ise daha düşük olduğu izlenmiştir (sırasıyla; $p<0.001$ ve $p=0.003$). BDNF seviyeleri H21 ile kıyasla; HC21, HM21 ve HCM21 gruplarında istatistiksel anlamlı biçimde daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$). HCM21 ile kıyasla HC21 ve HM21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.7. Caspase-3, MMP-9 ve BDNF immünreaksiyonlarının 7. ve 21. gün arasında karşılaştırılması

	NK	H	HC	HM	HCM
	Median(IQR) [min-maks]	Median(IQR) [min-maks]	Median(IQR) [min-maks]	Median(IQR) [min-maks]	Median(IQR) [min-maks]
CASPASE-3	7.GÜN	240979(2269) [237681-250850]	248222(4839) [246035-266398]	245649(1218) [234273-249088]	244105(1355) [230349-249258]
	21.GÜN	241161(3006) [236326-248703]	245118(2229) [236332-248921]	244380(2390) [239961-251874]	243168(1970) [238724-247103]
	p	0.446	0.000*	0.009*	0.000*
MMP-9	7.GÜN	243987(3636) [22154-248093]	246269(7838) [236779-267149]	243283(7536) [234327-247494]	239594(10139) [225277-248925]
	21.GÜN	240888(5014) [232085-250891]	246487(4327) [238753-255432]	241260(5561) [228574-248865]	243525(5013) [233423-250494]
	p	0.033*	0.331	0.000*	0.000*
BDNF	7.GÜN	220101(13003) [208615-246040]	247552(1742) [239733-265537]	246383(5142) [226053-251668]	245269(1720) [234837-251831]
	21.GÜN	231809(17281) [206583-248459]	248128(2099) [242729-257646]	241254(7097) [226231-248856]	239270(10395) [221808-248122]
	p	0.000*	0.063	0.000*	0.000*

NK: Negatif Kontrol Grubu, H: Hasar Grubu, HC: Hasar + Sitikolin Tedavi Grubu, HM: Hasar + Metilkobalamin Tedavi Grubu, HCM: Hasar + Sitikolin + Metilkobalamin Kombine Tedavi Grubu, *: 7. Gün Grupları ile kıyasla $p < 0.05$, Independent samples Mann-Whitney U Testi Kullanıldı.

Tablo 4.7’de Caspase-3, MMP-9 ve BDNF immünreaksiyonlarının 7. ve 21. gün grupları arasında karşılaştırılması verilmiştir.

7. ile 21. gün deney grupları karşılaştırmalarında; NK grubunda Caspase-3 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p=0.446$). NK21 grubunda MMP-9 düzeyleri NK7 grubuna göre istatistiksel anlamlı düzeyde daha düşük, BDNF düzeyleri ise daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.033$ ve $p<0.001$). H21 grubunda Caspase-3 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde H7 grubuna göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$). MMP-9 ve BDNF açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır (sırasıyla; $p=0.331$ ve $p=0.063$). HC21 grubunda Caspase-3 ve BDNF düzeyleri HC7 grubuna göre istatistiksel anlamlı düzeyde daha düşük olduğu izlenmiştir ($p<0.001$). MMP-9 açısından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamaktadır ($p=0.926$). HM21 grubunda Caspase-3 ve BDNF düzeyleri HM7 grubuna göre istatistiksel anlamlı düzeyde daha düşük, MMP-9 düzeyleri ise daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0.009$, $p<0.001$ ve $p<0.001$). HCM21 grubunda Caspase-3 ve BDNF düzeyleri HCM7 grubuna göre istatistiksel anlamlı düzeyde daha düşük, MMP-9 düzeyleri ise daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

5.TARTIŞMA

5.1. Özet Bulgular

N. alveolaris inferior, N. lingualis ve N. mentalis gibi sinirlerin üçüncü molar çekimi ve implant uygulamaları gibi dental tedavilerde özellikle sıklıkla hasara uğrayabileceği literatürde bildirilmiştir. Örneğin, Garcia-Blanco ve arkadaşlarının (200) yaptığı çalışmalarda trigeminal sinir yaralanmalarında en yaygın etiyolojik nedenler arasında alt molar diş ekstraksiyonu (47 %), dental implant uygulamaları (20 %) ve lokal anestezi (13 %) yer almıştır (200). Bu durum hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkilemekte ve parestezi gibi istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Bizim çalışmamızda periferik sinir hasarlarının tedavisinde etkili ajanların araştırmak amacıyla deneysel mental sinir hasarı oluşturulan ratlarda sinir hasarı üzerine olumlu etkileri rapor edilen sitikolin ve metilkobalaminin tek başına ve birlikte kullanımının sinir onarımı üzerine etkisini histolojik olarak incelenmiştir. Çalışmamızın sonucunda, sitikolin ve metilkobalaminin tek başına uygulanmalarının yanı sıra kombine kullanımının, mental sinir hasarı sonrasında histolojik ve immünohistokimyasal parametreler üzerinde anlamlı iyileşmeler sağladığı gözlenmiştir. Özellikle kombine tedavi grubunda (HCM), akson sayısında (HCM21>H21, $p<0.001$; Tablo 4.4) ve akson çapında artış (HCM21>Tüm Gruplar, $p<0.001$; HCM21>HC21 ve HM21, $p<0.001$; Tablo 4.4) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, Caspase-3 immünreaktivitesinde azalma (HCM7<H7, $p<0.001$; Tablo 4.5, HCM21< Tüm Gruplar, $p<0.001$; Tablo 4.6) ve MMP-9 immünreaktivitesinde düşüş (HCM7<NK7 ve H7: $p<0.05$; Tablo 4.5) saptanırken, BDNF seviyesinde hasar ve diğer tedavi gruplarında göre daha düzenleyici sonuçlar saptanmıştır (7. günde; NK<HCM7<HC7- HM7<H7: $p<0.05$; 21. Günde; HCM<NK<HC-HM<H: $p<0.01$). Bu bulgular, çalışmamızın başlangıç hipotezi olan sitikolin ve metilkobalaminin özellikle kombine uygulandığında sinir rejenerasyonunu destekleyeceği öngörüsünü doğrulamaktadır. Dolayısıyla, kombine tedavinin sinir rejenerasyonu sürecinde sinir hücrelerini apoptozdan koruyarak ve inflamatuvar süreçleri azaltarak daha etkili bir nöroprotektif yanıt oluşturduğu anlaşılmaktadır.

5.2. Deneysel Hayvan Modeli

Diş hekimliğinde yaşanan periferik sinir yaralanmalarını ve bu yaralanmalara karşı geliştirilecek tedavi yaklaşımlarını laboratuvar ortamında çalışmak amacıyla deneysel hayvan modelleri geliştirilmiştir ve en yaygın olarak kullanılan hayvan modelleri sıçanlar ve fareler olup insan sinir fizyolojisine ve iyileşme süreçlerine büyük oranda benzerlik göstermeleri nedeniyle tercih edilmektedir. Çalışmamızda deneysel sinir hasarı modeli olarak, ratlarda N. mentalis üzerine oluşturulan travmatik sinir hasarı tercih edilmiştir. Mental sinir hasarı dental implant uygulamaları, endodontik tedaviler, osteotomi işlemleri veya travmalar sonrasında sık karşılaşılan bir durumdur (88, 201). Dolayısıyla bu sinir üzerinde oluşturulan bir model, klinik karşılık bulması açısından translasyonel araştırmalara yüksek katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Periferik sinir hasarı oluşturmak amacıyla hayvan modellerinde sinire doğrudan kesisel hasar verilmesi (transeksiyon), ezilme (crush) modeli, ligasyon, kompresyon veya gerilme (stretch) veya boşluk oluşturma (gap) gibi modeller uygulanmaktadır (202-204). Çalışmamızda, standartlaştırılmış ve tekrarlanabilir bir sinir ezilme modeli oluşturmak amacıyla Yaşargil anevrizma klipsi kullanılmıştır. Bu klips belirli bir basınçla belirli bir süre boyunca uygulandığında sinir dokusunda kontrollü, homojen ve tekrarlanabilir bir zedelenme oluşturabilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle, periferik sinir araştırmalarında mekanik sinir hasarını simüle eden güvenilir bir araç olarak literatürde de sıkça kullanılmaktadır (202, 205). Klipsin uygulandığı sinir segmentinde aksonal bütünlük bozulmakta, buna bağlı olarak Wallerian dejenerasyon süreçleri başlamakta ve böylece nörorejeneratif etkileri değerlendirmek için uygun bir model ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda sinir üzerine 60 saniye süreyle uygulanarak kısmi ve geri dönüşümlü bir ezilme travması oluşturulmuştur. Bu süre ve basınç değeri, daha önce yapılmış pek çok çalışmada güvenli ve etkili bir deneysel sinir zedelenmesi modeli oluşturmak için önerilmiştir (206). Ezilme süresi ve basıncı arttıkça, endonöral yapılar üzerindeki harabiyetin artacağı ve skar dokusu oluşumunun daha belirgin hale geleceği bildirilmektedir (207). Çalışmamızda da hasar grubunda histolojik olarak bu değişiklikler saptanmıştır. Yaşargil anevrizma klipsi ile oluşturulan bu kontrollü sinir ezilme modeli sonucunda, hem histopatolojik hem de immünohistokimyasal parametrelerde periferik sinir hasarına özgü değişiklikler elde edilmiştir. Hasar grubunda aksonal bütünlüğün bozulması, myelin kılıf dejenerasyonunun artışı ve Caspase-3 ile MMP-9 düzeylerindeki yükselme bu modelin etkinliğini doğrulamaktadır. Aynı zamanda, tedavi gruplarında

gözlenen akson sayısı ve çapındaki artış, Caspase-3 ve MMP-9 düzeylerindeki azalma ve BDNF regülasyonu, modelin farmakolojik ajanların nöroprotektif ve nörorejeneratif etkilerini karşılaştırmak için uygun bir zemin sunduğunu işaret etmektedir.

5.3. Metilkobalamin, Sitikolin ve Kombinasyon Tedavisi

Metilkobalamin B12 vitamininin iki aktif formundan birisi olup eksikliği durumunda nörolojik hasar, parestezi ve miyelin kaybı rapor edilmiştir (208). İnsan vücudunun sentezleyemediği metilkobalaminin bu nedenle dışarıdan alınması gerekmektedir (180). Gan ve ark.'nın (209) yaptığı çalışmada ratlarda siyatik sinir ezilme modeli kullanılmıştır. Deney grubuna 500 µg/kg/gün metilkobalamin intraperitoneal olarak 28 gün boyunca uygulanmıştır. Metilkobalamin tedavisi, caspase-3 ekspresyonunu azaltarak apoptozu baskılamış, oksidatif stresi sınırlamış ve nöronal kaybı önlemiştir (nöroprotektif etki). Ayrıca Schwann hücre aktivasyonu ve miyelinizasyonu artırmış, aksonal büyümeyi hızlandırmış ve sinir iletimini iyileştirmiştir (nörorejeneratif etki). Histolojik incelemelerde tedavi grubunda daha kalın miyelin kılıfı ve artmış akson yoğunluğu tespit edilmiştir (209). Hsieh ve ark. (210), sıçanlarda oluşturulan deneysel brakial pleksus yaralanması modelinde, 1 mg/kg dozunda metilkobalaminin 12 gün süreyle intraperitoneal uygulanmasının ardından akson yoğunluğu ve miyelin kılıf kalınlığında anlamlı artış sağlandığını ve BDNF ekspresyonunun yukarı yönde regüle edildiğini bildirmiştir (210). Metilkobalamin'in farelerde siyatik sinir yaralanması sonrası BDNF ekspresyonunu artırdığı, Schwann hücre sayısı ile akson çapında artış sağlandığı bildirilmiştir (209). Sun ve ark. (211), Wistar sıçanlarında oluşturulan deneysel siyatik sinir yaralanması modelinde yaptığı çalışmada, deksametazon (1 mg/kg) ve metilkobalamin (2 mg/kg) dozlarının, intraperitoneal yolla, tek başına ve birlikte uygulanmasını karşılaştırmışlardır. Bu uygulamalar sonucunda akson yoğunluğu ve miyelin kılıf kalınlığında artış, Schwann hücre proliferasyonunda gözle görülür bir artış, fonksiyonel toparlanmada anlamlı iyileşme sağlandığı bildirilmiştir. Kritik olarak, tedavinin BDNF ekspresyonunu hem protein hem de mRNA düzeyinde anlamlı şekilde yukarı regüle ettiği de gösterilmiştir (211). Ji ve ark. (212), farelerde 6 ay boyunca hava kirliliğini taklit etmek amacıyla kronik 2.5 µm'den küçük partikül maruziyeti modeli kullanarak metilkobalaminin nöroprotektif etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmada, fareler 6 ay süreyle günde 12 saat 2.5 µm'den küçük partikül odasında tutulmuş ve içme suyuna eklenen 1.25 mg/L metilkobalamin dozuyla tedavi edilmiştir. Sonuçlar, 2.5 µm'den küçük partikül maruziyeti ile birlikte hipokampal nöronlarda apoptoz oranının

arttığını ve caspase-3 ekspresyonunun belirgin şekilde yükseldiğini göstermiştir. Metilkobalamin uygulaması ise bu artışı anlamlı düzeyde baskılamış ve caspase-3 aktivitesini düşürerek nöronal apoptozu azalttığı rapor edilmiştir (212). Zhang ve ark. (213), spontan hipertansif inme eğilimli sıçanlarda orta serebral arter oklüzyonu modeli ile oluşturulan serebral iskemik/reperfüzyon hasarında metilkobalaminin etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 1, 2 ve 5 mg/kg/gün dozlarında metilkobalaminin intragastrik yolla 7 gün süreyle uygulanmıştır. Bulgular, iskemik/reperfüzyon grubunda caspase-3 ekspresyonunun belirgin şekilde arttığını; metilkobalamin tedavisinin ise özellikle orta ve yüksek dozlarda caspase-3 düzeylerini anlamlı derecede azalttığını göstermiştir. Bu sonuçlar, metilkobalaminin nöronal apoptozu baskılayarak nöroprotektif etki gösterebileceğini desteklemektedir (213). Okada ve ark. (189) sıçanlarda gerçekleştirdikleri çalışmada, deneysel siyatik sinir yaralanması modeli kullanmış ve bu modelde metilkobalamin uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada metilkobalamin dozu 500 µg/kg olarak belirlenmiş ve 14 gün boyunca intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Bulgular, metilkobalamin'in sinir rejenerasyonunu anlamlı düzeyde desteklediğini ortaya koymuştur. Özellikle akson uzamasında belirgin artış, Schwann hücre proliferasyonunun uyarılması ve nöronal hayatta kalımın artışı rapor edilmiştir. Yazarlar, bu etkilerin büyük ölçüde ERK1/2 ve PI3K/Akt sinyal yollarının aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştiğini vurgulamaktadır (189). Song ve ark. (214), diyabetik periferik nöropati tanısı konmuş hastalarda metilkobalamin tedavisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada metilkobalamin 0.5–1.0 mg oral dozda, 3 ay (12 hafta) boyunca günlük olarak uygulanmış ve metilkobalamin'in özellikle epalrestat ile kombine kullanımında inflamatuvar yanıtı baskıladığını gösterilmiştir. Tedavi sonrasında MMP-9 düzeyleri anlamlı şekilde azalmış, böylece sinir rejenerasyonunu olumsuz etkileyen matriks yıkımı baskılanmıştır. Ayrıca, metilkobalamin uygulaması ile birlikte nöronal apoptoz oranında azalma olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, metilkobalamin'in MMP-9 ekspresyonunu ve apoptozu azaltarak diyabetik periferik nöropatide sinir korunmasını desteklediğini ortaya koymaktadır (214).

Sitikolin, hücre zarlarının ana bileşenlerinden biri olan fosfatidilkolin sentezinde yer alarak nöronal membran bütünlüğünün ve sıvılığının korunmasında önemli rol oynamaktadır (8). Barrachina ve ark. (215) insan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde yürüttükleri çalışmada, staurosporin (100 nM, 12 saat) ile deneysel apoptoz modeli oluşturmuş ve sitikolini 60 mM konsantrasyonda 24 saatlik ön uygulama şeklinde hücrelere vermişlerdir. Çalışma sonucunda sitikolin uygulamasının sinir hücrelerinin

mitokondriyal zar bütünlüğünü belirgin şekilde koruduğu, glutasyon redoks oranını stabil tuttuğu ve apoptoz sürecinde kritik rol oynayan caspase-3 aktivitesini anlamlı düzeyde baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca PARP yıkım ürünlerinin azalması, sitikolinin apoptotik yolların inhibisyonuna katkı sağladığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, sitikolinin nöronal hücrelerde mitokondriyal zar stabilizasyonu yoluyla apoptotik süreçleri baskıladığını güçlü biçimde desteklemektedir (215). Schuettauf ve ark. (188) yaptığı çalışmada ratlarda parsiyel optik sinir ezilmesi (partial optic nerve crush, ONC) modeli kullanılmıştır. Deneyde sitikolin, ilk 7 gün 1 g/kg/gün, sonrasında 300 mg/kg/gün intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Tedavi ONC'den 1 gün önce başlatılıp örnekleme gününe (3, 7 ve 21. gün) kadar sürdürülmüştür. Sonuç olarak sitikolin, retinal ganglion hücrelerindeki gecikmiş apoptozisi anlamlı derecede azaltmış ve bu etki Bcl-2 ekspresyonunun artışı ile ilişkilendirilmiştir (188). Oshitari ve ark. (216) yaptığı çalışmada, Sprague–Dawley rat retinası yüksek glukoz (45 mM) ortamında 7 gün süreyle kültüre edilmiş ve deney gruplarına 1 µM sitikolin eklenmiştir. Yüksek glukoz koşullarında retinal ganglion hücrelerinde apoptozis (TUNEL-pozitif hücreler ve caspase-3/9 aktivasyonu) belirgin şekilde artarken, sitikolin uygulaması bu artışı anlamlı olarak baskılamış ve ayrıca rejeneratif nörid sayısını artırmıştır. Bu sonuçlar, sitikolinin yüksek glukozun indüklediği apoptozisi azalttığını ve nöronal rejenerasyonu desteklediğini göstermektedir (216). Kaplan ve ark. (170)'nın sıçan siyatik sinir kesisi ve primer anastomoz modelinde intraperitoneal sitikolin (300, 600, 900 µmol/kg, tek doz) uygulanmıştır. C-600 ve C-900 gruplarında siyatik fonksiyon indeksi ve EMG sonuçları anlamlı iyileşme göstermiştir. C-900 grubunda myelinli akson yoğunluğu ve toplam sayısı belirgin artmış, akson çapı ve kalınlığı iyileşmiştir. Tüm sitikolin gruplarında perinöral skar dokusu azalmıştır (170). Hurtado ve ark. (217), ratlarda permanent MCAO modeli ve Sirt1^{-/-} farelerde sitikolin uygulamasını değerlendirmiştir. Sitikolin intraperitoneal yolla 0.2 g/kg (10. dk) ve 2 g/kg (4. saat) dozlarında verilmiş, etkiler 24–48 saatte incelenmiştir. 2 g/kg doz infarkt volümünü anlamlı şekilde azaltmış, 0.2 g/kg ise tek başına etkisiz olup resveratrol ile kombinasyonda güçlü sinerji göstermiştir. Mekanizma olarak sitikolinin SIRT1 ekspresyon ve aktivitesini artırdığı; SIRT1 inhibitörü sirtinol ile etkinin ortadan kalktığı, knockout farelerde (SIRT1 geni genetik olarak silinmiş) ise tamamen kaybolduğu gösterilmiştir (217). Ratlarda siyatik sinir hasarında sitikolinin MMP-9 aktivitesini azalttığını, TIMP-1 ve TIMP-3 düzeylerini yükselttiğini ve skar dokusunda azalma ile birlikte akson sayısı ve çapında artış gözlemlendiğini bildirilmiştir (218). Ayrıca sitikolin uygulaması sonrası sinirlerde skar

dokusunda azalma ve işlevsel iyileşme sağlandığı bildirilmiştir (169). Sprague–Dawley sıçanlarda distal, kalıcı orta serebral arter oklüzyonu (MCAO) modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, sitikolin 500 mg/kg intraperitoneal uygulanmıştır. Uygulama protokolü MCAO’dan 24 ve 1 saat önce ile 23 saat sonra veya MCAO’dan 30 dakika ile 23 saat sonra olacak şekilde düzenlenmiştir. MCAO sonrası 12. ve 24. saatlerde yapılan incelemelerde, sitikolin tedavisinin inaktif form olan pro-caspase ekspresyonunu ve aktif form olan cleaved caspase-3 pozitif hücre sayısını anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca nükleer DNA fragmentasyonu ve caspase-3 aracılı PARP yıkım ürünleri de azalmıştır. Bu bulgular sitikolinin, apoptoz yollarında caspase-3 aktivasyonunu baskılayarak anti-apoptotik etki gösterdiğini ve etkisinin özellikle MCAO öncesi ve sonrası uygulamalarda daha belirgin olduğunu ortaya koymaktadır (219). Nitekim Susilowati ve ark. (26), mental sinir hasarı oluşturulan ratlarda sitikolin uygulamasının trigeminal ganglionda BDNF ekspresyonunu 3. günde yaklaşık 2,19 kat artırdığını bildirmiştir. Bu bulgu, sitikolinin erken dönemde rejeneratif süreci hızlandırıcı bir etki gösterebileceğini desteklemektedir (26).

Thohari ve ark.’nın(220) intrakraniyal hemoraji (ICH) geçiren 115 hasta üzerinde yürüttükleri retrospektif klinik çalışmada, en sık uygulanan nöroprotektif tedavinin sitikolin ve metilkobalamin kombinasyonu olduğu bildirilmiştir. Çalışmada bu kombinasyonun hem en yüksek sağkalım oranına sahip hastalarda (%76,7) hem de en yüksek mortalite görülen grupta (%63,5) kullanıldığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, kombinasyonun tek başına mortaliteyi azaltmada yeterince etkili olmadığını göstermekte ve ICH patofizyolojisinin karmaşıklığı nedeniyle günümüzde halen etkin bir farmakolojik tedavi seçeneğinin bulunmadığını ortaya koymaktadır. Araştırmacılar ayrıca, sitikolin ve metilkobalaminin klinik kullanımda yaygın tercih edilmesine rağmen, intrakraniyal hemoraji sonrası nöroprotektif ve nörorejeneratif etkilerinin sınırlı olduğunu ve bu alanda yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulduğunu vurgulamışlardır (220). İlave olarak diyabetik korneal nöropatisi olan bireylerde topikal olarak uygulanan sitikolin ve metilkobalamin kombinasyonunun korneal sinir lifi yoğunluğunu daha fazla artırarak (kombine: %33, plasebo:%15) nörorejeneratif etkiler gösterdiği saptanmıştır (221).

5.4. Caspase-3, MMP-9 ve BDNF

Caspase-3 intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollarının gerçekleştirici proteazı olup DNA fragmentasyonu ve sitoskeletal yıkım gibi hücre ölümü tamamlayan adımları katalizler. Caspase-3 nöronal dokuda yalnızca hücre ölümü değil, akson dallanması ve

sinaptik budama gibi plastisite süreçlerinde de rol oynamaktadır (222). Travmatik periferik sinir hasarından sonra artmış aktif-caspase-3, Schwann hücre apoptozunu tetikleyerek remiyelinizasyonu geciktirir ve gecikmiş onarım olgularında caspase-3 pozitif Schwann hücresi sayısının belirgin artması da bu ilişkiyi destekler (223). Spinal kord yaralanması modellerinde caspase-3 kaskadının erken aktivasyonu, aksonal kaybı ve fonksiyonel iyileşme süresini olumsuz etkilediği saptanmıştır (224).

MMP-9 sinir yaralanması sonrasında ekstraselüler matriksin yeniden modellendiği ve Schwann hücre göçü, akson uzaması ile remiyelinizasyon süreçlerinde anahtar rol oynayan bir enzimdir. MMP-9'un Schwann hücre tabanı üzerinde nörit büyümesini desteklediği bildirilmiştir (225). MMP-9/TIMP dengesi Schwann hücrelerinin uygun zamanlamada proliferasyonu ve maturasyonunda belirleyici rol oynamaktadır (218). Periferik sinir yaralanması modellerinde artan MMP-9 düzeylerinin Schwann hücre migrasyonunu ve remiyelinizasyonu desteklediğini bildirmiştir. Kawasaki ve ark.(166), nöropatik ağrı modeli olarak L5 spinal sinir ligasyonu kullanılmıştır. Deneyler Sprague–Dawley sıçanlarında ve MMP-9 geni silinmiş ile Friend Virus B-type farelerde yapılmıştır. Spinal sinir ligasyonu modeli, periferik sinir hasarına bağlı mekanik allodiniyi güvenilir şekilde oluşturması nedeniyle tercih edilmiştir. Bu modelde MMP-9'un erken fazda kritik olduğunu göstermiştir. DRG nöronlarında MMP-9 ekspresyonu 1. günde artmış, 3. günden sonra azalmıştır. Bu erken yükseliş IL-1 β aktivasyonu ve mikrogial p38 MAPK yoluyla allodiniyi tetiklemiştir. MMP-9 inhibisyonu yalnızca erken (3.gün) dönemde etkili olmuş, geç (10.gün) fazda rol MMP-2 tarafından üstlenilmiştir (166).

BDNF nöronların hayatta kalması, aksonal büyüme ve sinaptik plastisite için kritik bir nörotrofin olup periferik sinir hasarından sonra dorsal root ganglion ve sinir liflerinde ekspresyonun arttığı ve bu artışında rejeneratif süreçleri desteklediği bildirilmiştir (22). Periferik sinir yaralanmasında artan BDNF düzeyleri Schwann hücre proliferasyonu, aksonal uzama ve sinaptik yeniden yapılanmayı artırdığı saptanmıştır (22). Yoshikawa ve ark.(226) Sprague–Dawley sıçanlarında IAN kesilme ve uç uca onarım modeli oluşturarak periferik sinir rejenerasyonunu incelemişlerdir. Çalışmada özellikle BDNF ekspresyonu değerlendirilmiş ve onarım sürecinde BDNF düzeylerinde anlamlı artış saptanmıştır. Fonksiyonel iyileşme, mental foramen çevresine uygulanan mekanik stimülasyon testleri ile takip edilmiş; histolojik düzeyde ise immünohistokimyasal analizlerle BDNF pozitifliği incelenmiştir. Bulgular, artan BDNF ekspresyonunun

fonksiyonel iyileşme ile korele olduğunu ortaya koymuş ve BDNF'in sinir rejenerasyon sürecinde kritik rol oynadığı sonucuna varılmıştır (226).

5.5. Çalışmamızın CBC ve Biyokimya Bulguları

Periferik sinir yaralanmalarında hematolojik ve biyokimyasal parametreler, immün yanıtın aktivasyonu ve doku hasarının derecesi hakkında önemli ipuçları sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda bu parametrelerde saptanan değişimler, tedavi gruplarında hem immün yanıt modülasyonu hem de doku koruyucu mekanizmaların aktif olduğunu işaret etmektedir. Özellikle kombine tedavi grubunda WBC sayısında anlamlı artış (HCM21>NK21 ve HC21, $p<0.05$; Tablo 4.1) ve lenfosit yüzdesinde yükselme (HCM21>HC21, $p=0.047$; Tablo 4.1), immün yanıtın lenfosit ağırlıklı olarak aktive olduğunu göstermektedir. Nötrofil yüzdesinde azalma (HM21<NK21 ve H21, $p<0.05$; Tablo 4.1) da bu eğilimi desteklemektedir. RBC indekslerinde MCHC'de artış (tedavi grupları>NK21, $p<0.05$; Tablo 4.1) ve MCV'de düşüş eğilimi (tedavi grupları>NK21, $p<0.05$; Tablo 4.1) eritrosit adaptasyonuna işaret eder; benzer biyolojik mekanizmaların hematoloji literatürü ile uyumludur (227, 228). Trombosit parametrelerinden MPV'de anlamlı artış (NK21<H21 ve HM21, $p<0.05$; Tablo 4.1) ve PDW'de yükselme (H21>NK21, $p=0.017$; Tablo 4.1) trombosit aktivasyonu ve üretim dinamiklerindeki değişimi yansıtmaktadır. Bu durum, inflamasyon literatürü ile de uyumludur (229, 230). CBC parametreleri genel olarak değerlendirildiğinde, HCM grubunda WBC artışının özellikle lenfosit yüzdesi ve sayısındaki yükseliş ile birlikte seyrettiği, buna karşılık nötrofil yüzdesinde azalma izlendiği dikkati çekmektedir. Bu durum, immün yanıtın inflamatuvar fazdan çok lenfosit-dominant rejeneratif faza kaydığını düşündürmektedir. WBC artışı, doku turnover sürecinin bir parçası olmakla birlikte, lenfosit ağırlıklı bu patern, inflamatuvar hasarı artırmaktan ziyade rejeneratif immün mekanizmaların ön plana çıktığı ve iyileşme sürecini destekleyen bir bağışıklık yanıtını işaret ettiği düşünülebilir. Periferik sinir rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda da lenfosit aracılı immün yanıtların nöronal iyileşme ve aksonal yeniden yapılanmayı kolaylaştırdığı bildirilmiştir (231, 232).

Biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde, kreatinin düzeylerinin NK grubunda H, HC ve HM gruplarına kıyasla daha yüksek bulunması dikkat çekicidir. Bu bulgu, tedavi kollarında renal fonksiyonların genel olarak korunduğunu desteklemektedir. AST ve LDH düzeylerinin NK grubuna göre H, HC ve HM gruplarında anlamlı olarak düşük saptanması ise ($p<0.05$; Tablo 4.2), doku hasarının ve oksidatif

yükün azaldığını düşündürmektedir. Aminotransferazlar ve LDH'nin yaygın olarak kullanılan doku zedelenmesi biyobelirteçleri olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu sonuçlar biyolojik olarak tutarlıdır. Sitikolin uygulamasının çeşitli deneysel modellerde mitokondriyal bütünlüğü koruyarak ve oksidatif stresi azaltarak hepatoprotektif etki sağladığı, AST ve ALT yükselmelerini engellediği ve karaciğer doku mimarisini koruduğu (233-235); B12 türevlerinin ise organ toksisite deneysel modelinde oksidatif stres belirteçlerini düşürüp karaciğer enzim profillerini iyileştirdiği rapor edilmiştir (236). HCM grubunda AST ve LDH değerlerinde benzer bir düşüş eğilimi izlenmekle birlikte, istatistiksel anlamlılığa ulaşmaması ($p>0.05$; Tablo 4.2), kombinasyon tedavisinde doz, süre veya zamanlama faktörlerinin etkili olabileceğini akla getirmektedir. BUN ve ALT düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmaması ise ($p>0.05$; Tablo 4.2), böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının çalışma koşullarında genel olarak korunduğunu göstermektedir.

5.6. Çalışma Bulgularımız

Periferik sinir yaralanmalarının değerlendirilmesinde histolojik analizler, sinir rejenerasyonunun doğrudan ve objektif biçimde gözlemlenmesini sağlayan temel yöntemlerden biridir. Histopatolojik değerlendirmeler, akson morfolojisi, miyelin kılıf bütünlüğü, Schwann hücre yanıtı, endonöryal organizasyon ve skar dokusu oluşumu gibi birçok yapısal kriteri incelemeye olanak tanır. Bu parametrelerin kantitatif olarak ölçülmesi örneğin akson çapı miyelin kalınlığı, akson sayısı gibi metriklerle iyileşme sürecinin bilimsel olarak yorumlanmasında vazgeçilmezdir (237). Akson çapı, miyelin kalınlığı ve G oranı (akson çapı / total lif çapı) gibi ölçümlerin, sinir rejenerasyonunun kalitesini göstermek açısından önemli parametreler olduğu literatürde bildirilmiştir. G oranının ideal değer aralığı 0.6–0.7 olarak kabul edilmekte olup, rejeneratif başarının yüksek olduğu durumlarda bu aralıkta seyrederek (128). Ikeda ve Oka (238), siyatik sinir transeksiyonu sonrası onarılan ratlarda yaptıkları çalışmada, fonksiyonel iyileşmeyi gösteren motor iletim hızındaki artışın özellikle lif çapındaki (akson+miyelin) artış ile güçlü korelasyon gösterdiğini bildirmiştir. Buna karşın yalnız akson çapı ve g-ratio değerleri motor iletim hızı ile anlamlı ilişki göstermemiştir. Bu sonuç, miyelin kalınlığındaki düzenlenme ve lif çapındaki artışın fonksiyonel iyileşmenin güvenilir morfolojik göstergeleri olduğunu ortaya koymaktadır (238). Zhao ve ark. (239) tarafından gerçekleştirilen çalışmada deney modeli olarak Sprague–Dawley sıçanlarda siyatik sinir üzerine 15 mm'lik defekt oluşturulmuştur. Defekt bölgesi silikon tüp içerisine

yerleştirilmiş ve bu tüp içinde “yalancı sinir grefti (pseudo nerve graft)” adı verilen yapı oluşturulmuştur. Tedavi grubunda tüp içerisine kemik iliği kaynaklı fibroblastik hücreler ve ekstrasellüler matriks benzeri yapılar enjekte edilerek rejeneratif destek sağlanmıştır. Kontrol grubunda ise yalnızca boş silikon tüpler kullanılmıştır. Bulgular, tedavi grubunda miyelinli akson sayısının anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu ve miyelin tabakasının daha kalın ve düzenli geliştiğini göstermiştir. Kontrol gruplarında ise miyelinli akson sayısı düşük ve miyelin tabakası ince kalmıştır. Bu sonuçlar, silikon tüple yönlendirilmiş sinir rejenerasyonu modelinde hücresel desteğin sinir iyileşmesini önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur (239). Liu ve ark. (240) rat siyatik sinir transeksiyonunda 5 mm defekti kolajen tüp ile onarmış ve CDNF-transdükte MSC (Conserved Dopamine Neurotrophic Factor ile genetik olarak modifiye edilmiş Mesenchymal Stem Cell) uygulamıştır. Histolojik analizlerde 4., 8. ve 12. haftalarda bu grupta NF200 (neurofilament-200, akson belirteci) ve S100 (Schwann hücre belirteci) pozitifliği belirgin artmış; TEM (Transmission Electron Microscopy) incelemelerinde 8. ve 12. haftalarda miyelinli akson çapı, miyelin kılıf kalınlığı ve G-ratio (akson çapı/fiber çapı oranı) anlamlı iyileşme göstermiştir. Fonksiyonel olarak SFI (Sciatic Functional Index) skorları ve gastrocnemius kas ağırlığı zamanla progresif düzelme ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, CDNF-MSC tedavisinin sinir rejenerasyonunu hızlandırarak histolojik ve fonksiyonel iyileşmeyi haftalar içinde düzenli artırdığını göstermektedir (240). Zhao ve ark. (241) tarafından yapılan çalışmada Sprague–Dawley ratlarda oluşturulan 15 mm’lik siyatik sinir defekti, hücresiz sinir grefti ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerle desteklenmiş greftler ile onarılmıştır. Fonksiyonel iyileşme Von Frey testi ve triceps surae kasının kontraksiyon gücü ile değerlendirilmiş, histomorfolojik olarak ise akson sayısı, çap dağılımı ve miyelin kalınlığı incelenmiştir. Bulgular, mezenkimal stromal hücreler ile desteklenen gruplarda fonksiyonel iyileşmenin artış gösterdiğini ve bu durumun akson sayısındaki yükselme, miyelin kalınlaşması ve daha düzenli çap dağılımı ile paralellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, fonksiyonel iyileşmenin histolojik parametrelerle yakından ilişkili olduğunu ve fonksiyonel testlerin mutlaka histolojik verilerle desteklenmesi gerektiğini vurgulamaktadır (241). Tüm bu veriler ışığında, çalışmamızda gerçekleştirilen akson çapı ve akson sayımı gibi histomorfometrik ölçümler, tedavi gruplarının mental sinir tamiri ve rejenerasyonu üzerindeki etkilerini bilimsel olarak karşılaştırabilmek açısından yüksek objektivite sunmaktadır. Çalışmamızda erken ve geç dönem rejenerasyon ile ilgili Caspase-3, BDNF

ve MMP-9 gibi parametrelere ek olarak histolojikdeğerlendirmeler yapılmış; akson sayısı, akson çapı ve Oil Red O boyası ile patolojik değişimler incelenmiştir.

Histolojik boyamalarda NK gruplarında normal sinir morfolojisi korunurken, hasar grubunda belirgin aksonal dejenerasyon, miyelin kaybı ve ödem izlenmiş; bu değişiklikler 21. günde 7. güne kıyasla daha ileri düzeyde gözlenmiştir. Tedavi gruplarında ise bu patolojik bulguların azaldığı dikkati çekmiştir. Akson sayısı açısından (Tablo 4.4), 7. günde NK'ye kıyasla H ve HM gruplarında düşüş saptanırken, H grubuna kıyasla HC, HM ve özellikle HCM gruplarında artış gözlenmiştir ($p<0.05$). HCM grubu, HM'ye kıyasla da anlamlı üstünlük göstermiştir ($p=0.002$). 21. günde ise NK'ye kıyasla tüm gruplarda farklılık izlenmiş; H grubunda akson sayısı düşük bulunurken, HC, HM ve HCM gruplarında belirgin artış kaydedilmiştir ($p<0.05$). HCM'nin HM'ye göre daha yüksek değerler sergilemesi ($p=0.014$) dikkat çekici bulunmuş, ayrıca tüm 21. gün gruplarında 7. güne göre akson sayısında anlamlı artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). Akson çapı açısından 7. günde H grubunda daralma, HCM grubunda ise genişleme belirgin olmuş ($p<0.01$); H'ye kıyasla tüm tedavi gruplarında artış kaydedilmiştir ($p<0.001$). HCM'nin HM'den üstün olduğu bu bulgu, 21. günde de devam etmiş ve HCM grubu hem HC hem de HM gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek çap değerleri sergilemiştir ($p<0.05$).

Çalışmamızda akson sayısı ve çapı açılarından NK21'in NK7'ye göre yüksek bulunması, diğer 21. gün gruplarında ise çapların 7. güne kıyasla daha düşük bulunması dikkat çekmiştir. Bu durum deney hayvanlarının büyüme süreciyle uyumlu fizyolojik bir gelişimi olarak değerlendirilebilir. Buna karşılık, hasar oluşturulan gruplarda 21. günde akson çaplarının 7. güne göre daha düşük seyretmesi, travmanın sinir dokusunun doğal büyüme ve olgunlaşma sürecini baskıladığını düşündürmektedir. Bu bulgu, deney modelimizde travma sonrası gerçekleşen rejenerasyonun tam anlamıyla fizyolojik büyüme hızına erişemediğini ve aksonal çap genişlemesinin sınırlı kaldığını ortaya koymaktadır. Genel olarak, bu bulgular hasar grubunda belirgin aksonal kayıp ve çap daralmasının geliştiğini, tedavi gruplarında ise bu dejeneratif sürecin sınırlandığını ortaya koymaktadır. Özellikle kombinasyon tedavisinin (HCM), hem akson sayısı hem de akson çapı açısından tekli ajanlara üstünlük sağlayarak histomorfometrik düzeyde en belirgin tamir ve rejeneratif etkiyi oluşturduğu görülmüştür. Bulgularımızı destekleyecek şekilde literatürde metilkobalaminin Schwann hücre proliferasyonu ve aksonal büyümeyi artırdığı (176, 189, 209), benzer şekilde sitikolinin akson yoğunluğu ve miyelin kalınlığını iyileştirdiği (170) rapor edilmiştir.

Çalışmamızda hem 7. hem de 21. günde hasar grubunda (H) Caspase-3 düzeyleri anlamlı olarak artmış, bu da travmayı takiben apoptozun hızla aktive olduğunu göstermiştir (Tablo 4.5-4.7). Bu bulgu, periferik sinir hasarı sonrası artan apoptoz aktivitesinin rejenerasyon sürecini olumsuz etkilediğini gösteren literatür verileriyle uyumludur (223). Buna karşılık, sitikolin (HC) ve metilkobalamin (HM) gruplarında bu artış belirgin biçimde baskılanmış, özellikle 21. günde kombinasyon grubunda (HCM) en düşük Caspase-3 düzeyleri elde edilmiştir. Bu bulgular, hem tek ajanların hem de kombinasyonun apoptozu sınırlayarak rejeneratif sürece katkı sağladığını ortaya koymaktadır. Literatürde de benzer şekilde metilkobalaminin caspase-3 ekspresyonunu azalttığı ve nöronal hücre kaybını önlediği (209, 213) ve sitikolinin de mitokondriyal zar bütünlüğünü koruyarak caspase-3 aktivasyonunu baskıladığı (215) rapor edilmiştir. Dolayısıyla bulgularımız, apoptoz baskılanmasının sinir rejenerasyonu için kritik olduğunu ve özellikle kombinasyon tedavisinin bu süreçte sinerjik etki oluşturduğunu desteklemektedir. Histolojik verilerle birlikte değerlendirildiğinde, HCM grubunda Caspase-3 düşüşüne paralel olarak akson sayısı ve çapında en yüksek değerlerin elde edilmesi ($p<0.001$; Tablo 4.4), apoptozun baskılanmasının sinir rejenerasyonunu hızlandırdığını ortaya koymaktadır. Böylece, caspase-3 aktivitesinin inhibisyonu ile daha düzenli bir miyelinizasyon ve fonksiyonel iyileşmenin mümkün olabileceği öne sürülebilir.

Erken dönemde (7. gün) hasar grubunda (H) MMP-9 düzeylerinin yükselmesi, akut fazda ekstraselüler matriks yıkımının arttığını göstermektedir (Tablo 4.5-4.7). Bu bulgu, periferik sinir hasarı sonrası erken dönemde MMP-9 ekspresyonunun arttığını bildiren literatür ile uyumludur (166). Tedavi gruplarında ise bu artış baskılanmış, özellikle HM ve kombinasyon grubunda (HCM) belirgin bir azalma saptanmıştır. Bu sonuç, literatürde sitikolinin MMP-9 aktivitesini azaltarak ve TIMP ekspresyonunu artırarak rejenerasyona katkı sağladığını bildiren çalışma ile de örtüşmektedir (9). geç dönemde (21. gün) HCM grubunda MMP-9 düzeylerinin yeniden yükselmesi ve NK'nin üzerine çıkması, histolojik bulgularla birlikte değerlendirildiğinde dikkat çekicidir. Nitekim aynı dönemde HCM grubunda akson sayısı ve çapında kaydedilen belirgin artış, geç fazda MMP-9'un yalnızca doku yıkımıyla değil, aynı zamanda yeniden yapılanma ve remodelasyon süreçleriyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla ekstraselüler matriks yıkımı ve skar oluşumu üzerindeki etkilerin tek yönlü olmadığı, zaman içerisinde farklılaşarak seyrettiği anlaşılmaktadır. Başka bir deyişle, bu değişim yalnızca enzim ekspresyonundaki farklılaşmayı değil, aynı zamanda akut hasarı takiben

tamir fazından rejenerasyon fazına geçişi de yansıtmaktadır. Literatürde de benzer şekilde sinir hasarının akut, tamir ve rejenerasyon fazlarının MMP-9 açısından dinamik geçişlerle seyrettiği vurgulanmıştır (242). Bulgularımız bu verilerle uyumlu olarak, kombinasyon tedavisinin erken dönemde mental sinir travmasını baskılayarak MMP-9 düzeylerini düşürdüğünü, geç dönemde ise ECM yıkımını sınırlarken rejeneratif faza geçişin etkisiyle MMP-9 ekspresyonunda yeniden artışa yol açtığını göstermektedir.

Hasar grubunda (H) 7. günde BDNF düzeylerinin artması, periferik sinir yaralanmasına karşı gelişen endojen nörotrofik yanıtı yansıtmaktadır (Tablo 4.5-4.7). Tedavi gruplarında ise bu artışın daha sınırlı seyretmesi, rejeneratif sürecin daha kontrollü bir biçimde yönlendirildiğini düşündürmektedir. Geç dönemde (21. gün) ise tedavi gruplarında BDNF düzeylerinin belirgin biçimde azalması ve özellikle HCM grubunda NK düzeyinin altına düşmesi dikkat çekicidir. Bu bulgu, BDNF'in rejenerasyonun yalnızca erken fazında kritik rol oynadığını, geç fazda ise apoptozun baskılanması ve ekstrasellüler matriks yeniden yapılanması gibi farklı mekanizmaların ön plana geçtiğini göstermektedir. Nitekim Hsieh ve ark. metilkobalaminin erken dönemde BDNF ekspresyonunu artırdığını (210), Susilowati ve ark. ise sitikolinin trigeminal ganglionda BDNF düzeylerini yükselttiğini bildirmiştir (26). Bizim bulgularımız da bu verilerle uyumlu olup, özellikle HCM grubunda 21. günde BDNF seviyelerinin düşmesine rağmen akson sayısı ve çapında en yüksek değerlerin elde edilmesi, aşırı BDNF artışının fizyolojik sınırlara çekilerek rejeneratif sürecin daha dengeli ilerlediğini düşündürmektedir. Başka bir deyişle, BDNF erken dönemde rejenerasyonu tetikleyen bir faktör iken, geç dönemde farklı moleküler yolların devreye girmesiyle iyileşme süreci devam etmektedir. Bu bağlamda, ileriki çalışmalarda yalnızca BDNF değil, Nerve Growth Factor (Sinir Büyüme Faktörü) ve Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (Glial hücre kökenli Nörotrofik Faktör) gibi diğer nörotrofik faktörlerin de değerlendirilmesi; ayrıca farklı tedavi zamanlamalarının (erken vs. geç başlama), dozlama protokollerinin, erken, geç ve uzun dönem takiplerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, çalışmamızda elde edilen bulguların doğrulanması ve ilaçların klinik uygulamaya aktarılabilmesi açısından önem taşımaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

NK21’de akson sayısı ve çaplarının NK7’ye kıyasla daha büyük olması, deney süresince ratlarda görülen fizyolojik büyüme ve olgunlaşmanın bir yansıması olarak değerlendirilmiştir. Hasar verilen gruplarda 21. günde akson çaplarının 7. güne göre daha düşük seyretmesi, travmanın doğal büyüme sürecini baskıladığını ve rejenerasyonun fizyolojik hızın gerisinde kaldığını göstermektedir. Sitikolin ve metilkobalamin tek başına uygulandığında dahi histopatolojik hasarı azaltmış; ancak kombinasyon tedavisi (HCM) hem akson sayısı hem de akson çapı açısından en belirgin yapısal iyileşmeyi sağlamıştır. Ayrıca kombinasyon tedavisi 21. günde en düşük Caspase-3 düzeylerini ortaya koyarak sinerjik bir nöroprotektif/nörorejeneratif etki göstermiştir. Bu patern, erken dönemde başlanacak kombine tedavinin apoptozu baskılama, ekstraselüler matriks yıkımını sınırlama üzerinden yapısal iyileşmeyi artırabileceğine ve skar dokusu oluşumunu azaltabileceğine işaret etmektedir. Sonuç olarak, sitikolin ve metilkobalamin, özellikle kombine uygulandığında, deneysel mental sinir yaralanmasında anlamlı yapısal iyileşme ve belirgin apoptoz baskılanması ile uyumlu, güçlü bir nöroprotektif/nörorejeneratif aday tedavi profili sergilemektedir.

KAYNAKLAR

1. Savignat M, Vodouhe C, Ackermann A, Haikel Y, Lavallo P, Libersa P. Evaluation of early nerve regeneration using a polymeric membrane functionalized with nerve growth factor (NGF) after a crush lesion of the rat mental nerve. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(4):711-7.
2. Diker N, Caglayan B, Helvacioğlu F, Kilic E. The effect of systemic rifampicin treatment on inferior alveolar nerve regeneration in rats following crush injury. *Eur J Oral Sci.* 2020;128(3):183-9.
3. Barghash Z, Larsen JO, Al-Bishri A, Kahnberg KE. Degeneration and regeneration of motor and sensory nerves: a stereological study of crush lesions in rat facial and mental nerves. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013;42(12):1566-74.
4. Lopes B, Sousa P, Alvites R. Peripheral nerve injury animal models: a systematic review. *Cells.* 2023;12(20):2493.
5. Vela JM, Molina-Holgado E, Arevalo-Martin A. Rat models of peripheral nerve injury: advantages and limitations. *J Peripher Nerv Syst.* 2019;24(4):255-72.
6. Aslan E, Kocaeli H, Bekar A, Tolunay S, Ulus IH. CDP-choline and its endogenous metabolites, cytidine and choline, promote the nerve regeneration and improve the functional recovery of injured rat sciatic nerves. *Neurol Res.* 2011;33(7):766-73.
7. Secades JJ, Lorenzo JL. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2006 update. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2006;28 Suppl B:1-56.
8. Grieb P. Neuroprotective properties of citicoline: facts, doubts and unresolved issues. *CNS Drugs.* 2014;28(3):185-93.
9. Gundogdu EB, Bekar A, Turkyilmaz M, Gumus A, Kafa IM, Cansev M. CDP-choline modulates matrix metalloproteinases in rat sciatic injury. *J Surg Res.* 2016;200(2):655-63.
10. Caliskan SG, Bilgin MD. Effects of Low-Dose Citicoline on the Electrical Conduction Function of the Crushed Sciatic Nerve of Rats. *Dubai Medical Journal.* 2023;6(3):163-8.
11. Mizukami H, Ogasawara S, Yamagishi S, Takahashi K, Yagihashi S. Methylcobalamin effects on diabetic neuropathy and nerve protein kinase C in rats. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(4):442-50.

12. Nishimoto S, Tanaka H, Okamoto M, Okada K, Murase T, Yoshikawa H. Methylcobalamin promotes the differentiation of Schwann cells and remyelination in lysophosphatidylcholine-induced demyelination of the rat sciatic nerve. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:298.
13. Hsieh Y-L, Lu Y-L, Yang N-P, Yang C-C. Methylcobalamin in Combination with Early Intervention of Low-Intensity Pulsed Ultrasound Potentiates Nerve Regeneration and Functional Recovery in a Rat Brachial Plexus Injury Model. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2023; 24(18).
14. Ramadhani A, Astuti I, Widiastuti M, Purwanti N. Methylcobalamin as a candidate for chronic peripheral neuropathic pain therapy: review of molecular pharmacology action. *The Korean journal of pain.* 2024;37:299-309.
15. Wu F, Xu K, Liu L, Zhang K, Xia L, Zhang M, et al. Corrigendum: Vitamin B12 Enhances Nerve Repair and Improves Functional Recovery After Traumatic Brain Injury by Inhibiting ER Stress-Induced Neuron Injury. *Frontiers in Pharmacology.* 2021;Volume 12 - 2021.
16. Wiberg R, Novikova LN, Kingham PJ. Evaluation of apoptotic pathways in dorsal root ganglion neurons following peripheral nerve injury. *Neuroreport.* 2018;29(9):779-85.
17. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation.* 2003;10(1):76-100.
18. Bell RAV, Megeney LA. Evolution of caspase-mediated cell death and differentiation: twins separated at birth. *Cell Death & Differentiation.* 2017;24(8):1359-68.
19. Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors.* 2018;18(10):3249.
20. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda).* 2013;28(6):391-403.
21. Hsu JY, Bourguignon LY, Adams CM, Peyrollier K, Zhang H, Fandel T, et al. Matrix metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord. *J Neurosci.* 2008;28(50):13467-77.
22. McGregor CE, English AW. The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2019;Volume 12 - 2018.

23. Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci*. 2015;11(6):1164-78.
24. Lin G, Zhang H, Sun F, Lu Z, Reed-Maldonado A, Lee Y-C, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes nerve regeneration by activating the JAK/STAT pathway in Schwann cells. *Translational Andrology and Urology*. 2016;5(2):167-75.
25. Cavalu S, Cavalu C. Unveiling citicoline's mechanisms and clinical relevance in the treatment of neurologic injuries. *FASEB Journal*. 2024.
26. Susilowati R, Armandari I, Arindra PK, Pakaya D, Nyengaard JR. Citicoline administration increases the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the trigeminal ganglion of rats post-mental nerve injury. *Biomed Pharmacology Journal*. 2024;17(4):2239-47.
27. Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 41st ed. London: Elsevier; 2016. 442-8 p.
28. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Clinically Oriented Anatomy*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. 938-44 p.
29. Snell RS. *Clinical Neuroanatomy*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. 240-5 p.
30. Sinnatamby CS. *Last's Anatomy: Regional and Applied*. 12th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2011. 362-7 p.
31. Netter FH. *Atlas of Human Anatomy*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018.
32. Vasković J, Johnson EO. The ophthalmic branch of the trigeminal nerve. 2023.
33. Mallya SM, Lam EWN. *Head and Neck Imaging*. 1st ed: Wiley Blackwell; 2019. 112-5 p.
34. Sinnatamby CS. *Last's Anatomy: Regional and Applied*. 12th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2011. 362-4 p.
35. Shankland WE. The trigeminal nerve. Part III: The maxillary division. *Cranio*. 2001;19(2):78-83.
36. Tubbs RS, Shoja MM, Loukas M. *Anatomy and function of the maxillary nerve*: Wiley Blackwell; 2016.
37. Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 41st ed. London: Elsevier; 2016. 447-9 p.
38. Mallya SM, Lam EWN. *Head and Neck Imaging*. 1st ed: Wiley Blackwell; 2019. 115-8 p.

39. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Clinically Oriented Anatomy. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. 936-8 p.
40. Sved AM, Wong JD, Donkor P. Complications associated with maxillary nerve block anesthesia via the greater palatine canal. Australian Dental Journal. 1992;37(5):340-5.
41. Liesegang TJ. Herpes zoster ophthalmicus: natural history, risk factors, clinical presentation, and morbidity. Ophthalmology. 2008;115(2 Suppl):S3-S12.
42. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. 41st ed. London: Elsevier; 2016. 446-50 p.
43. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Clinically Oriented Anatomy. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. 939-45 p.
44. Sinnatamby CS. Last's Anatomy: Regional and Applied. 12th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2011. 369-73 p.
45. Pogrel MA. Damage to the inferior alveolar nerve as the result of mandibular implant placement. Journal of the California Dental Association. 2007;35(4):271-3.
46. Garisto GA, Gaffen AS, Lawrence HP, Tenenbaum HC, Haas DA. Occurrence of paresthesia after dental local anesthetic administration in the United States. J Am Dent Assoc. 2010;141(7):836-44.
47. Zakrzewska JM, Linskey ME. Trigeminal neuralgia. BMJ Clin Evid. 2014;2014:1207.
48. Bataineh AB. Sensory nerve impairment following orthognathic surgery. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;91(2):123-8.
49. Kwon G, Hohman MH. Inferior alveolar and lingual nerve injury. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
50. Betz D, Fane K. Mental Nerve. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
51. Joo W, Yoshioka F, Funaki T, et al. Microsurgical anatomy of the trigeminal nerve. Clin Anat. 2014;27(1):61-88.
52. Ananthan S, et al. Sensory changes related to dental implant placement: a scoping review. J Oral Facial Pain Headache. 2022;36(2):165-86.
53. Renton T, Yilmaz Z. Profiling of patients with postsurgical neuropathy of the trigeminal nerve. J Orofac Pain. 2011;25(4):333-44.

54. Liu Y, Xin R, Yang T, et al. AI-based segmentation of the mandibular canal in CBCT.
55. Greenstein G, Tarnow D. The mental foramen and nerve: clinical and anatomical factors. *J Periodontol*. 2006;77(12):1933-43.
56. Moiseiwitsch JR. Avoiding injury to the inferior alveolar nerve: anatomical and technical considerations. *J Am Dent Assoc*. 1995;126(1):115-9.
57. Wismeijer D, et al. Nerve injury following placement of implants in the anterior mandible: a review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020;35(4):835-42.
58. Lossos A, Siegal T. Numb chin syndrome in cancer patients: etiology, pathogenesis and diagnostic value. *Neurology*. 1992;42(6):1181-4.
59. Tepper G, et al. Position of the mental foramen: an anatomical study using CBCT. *Clin Oral Implants Res*. 2021;32(6):704-10.
60. Renton T, Yilmaz Z. Inferior alveolar nerve injury following mandibular third molar surgery: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(4):393-404.
61. Bendo CB, et al. Incidence of lingual nerve trauma and postoperative sensory recovery after mandibular third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2015;120(3):e114-e22.
62. Tantanapornkul W, et al. Evaluation of local anesthetic-related inferior alveolar nerve injury. *Clin Oral Investig*. 2021;25(1):75-82.
63. Hillerup S. Iatrogenic injury to oral branches of the trigeminal nerve: a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(8):710-6.
64. Miloro M. Management of nerve injuries following local anesthesia. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*. 3rd ed. Shelton: PMPH-USA; 2012. p. 859-64.
65. Hegedus F, Diecidue RJ. Trigeminal nerve injuries after mandibular third molar extractions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(1):e1-e7.
66. Jerjes W, et al. Neurosensory complications after mandibular third molar surgery. *Br Dent J*. 2010;208(7):E15-E.
67. Ghaeminia H, et al. Position of the mandibular canal and risk of nerve injury in mandibular third molar surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(7):718-23.
68. Juodzbalsys G, Wang HL, Sabalys G. Injury of the inferior alveolar nerve during implant placement: a literature review. *J Oral Maxillofac Res*. 2011;2(1):e1-e.

69. Renton T, Yilmaz Z. Implant-related inferior alveolar nerve injuries: current management. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;50(8):732-7.
70. Greenstein G, et al. Relationship between implant position and mental foramen: a radiographic analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008;10(3):161-6.
71. Kim JH, et al. Surgical management of nerve injuries following dental surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 2021;79(4):805-13.
72. Posnick JC. *Principles and Practice of Orthognathic Surgery*. Philadelphia: Saunders; 2022. 875-900 p.
73. Heggie AA. Inferior alveolar nerve injury in orthognathic surgery. *Aust Dent J*. 2021;66(3):218-24.
74. Dujoncquoy JP, et al. Inferior alveolar nerve dysfunction following sagittal split osteotomy: a review. *J Craniomaxillofac Surg*. 2010;38(2):131-5.
75. Panula K, et al. Effects of orthognathic surgery on temporomandibular joint dysfunction. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(6):584-90.
76. Rajchel J, et al. The effects of age on peripheral nerve regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*. 2020;78(10):1872-8.
77. Al-Moraissi EA, et al. Use of cone-beam computed tomography to reduce nerve injury in orthognathic surgery: systematic review. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2020;58(1):45-51.
78. Martins DO, Marques DP, Chacur M. Enhancing nerve regeneration in infraorbital nerve injury rat model: effects of vitamin B complex and photobiomodulation. *Lasers Med Sci*. 2024;39(1):119.
79. Sangalli L, Fernandez-Vial D, Martinez-Porras A, Brazzoli S, Alessandri-Bonetti A. Trigeminal neuropathies following dental anesthetic blocks: a review of the literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Anesthesia*. 2024;3.
80. Tay ABG, Lai JB, Lye KW, Wong WY, Nadkarni NV, Li W, Bautista D. Inferior alveolar nerve injury in trauma-induced mandible fractures. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015;73(7):1328-40.
81. Selvi F, Yildirimyan N, Zuniga JR. Inferior alveolar and lingual nerve injuries: an overview of diagnosis and management. *Front Oral Maxillofac Med*. 2022;4:27.
82. Yadav S, Mittal HC, Malik S, Dhupar V, Sachdeva A, Malhotra V, Singh G. Post-traumatic and postoperative neurosensory deficits of the inferior alveolar nerve in mandibular fracture: a prospective study. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2016;42(5):259-64.

83. Zuniga JR. Sensory disturbances associated with inferior alveolar nerve injuries. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(4):882-90.
84. Bagheri SC, Meyer RA, Khan HA, Kuhmichel A, Steed MB. Retrospective review of 135 patients with trigeminal nerve injuries. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(4):763-71.
85. Renton T. Prevention of iatrogenic inferior alveolar nerve injuries in relation to dental procedures. *Dent Update.* 2010;37(6):350-8.
86. Kämmerer PW, et al. Mandibular nerve and lingual nerve injuries and their management. *Clin Oral Investig.* 2024;28(4):216.
87. Khullar SM, Brodin P. Photobiomodulation in peripheral nerve regeneration. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(5):263-8.
88. Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite P. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery.* Shelton: PMPH; 2012. 1120-9 p.
89. Chossegros C, Guyot L, Cheynet F, Blanc JL. Facial nerve complications after TMJ surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999;57(1):44-50.
90. Brennan PA, Ilankovan V. Injuries to the facial nerve. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2006;44(6):506-12.
91. Liu F, et al. Retrospective study of facial nerve function following temporomandibular joint arthroplasty. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015;73(6):1058-64.
92. Keith DA, et al. Facial nerve injury during TMJ surgery: incidence and prophylaxis. *AOMS.* 2018.
93. Salins PC. Complications of temporomandibular joint surgery. *Indian J Plast Surg.* 2009;42(Suppl):S199-S206.
94. Weinberg S, Kryshtalskyj B. Facial nerve function following temporomandibular joint surgery using the preauricular approach. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992;50:1048-51.
95. Wang H, et al. Facial nerve injury following TMJ arthroplasty: a large cohort study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013.
96. Hall MB, Brown RW, Lebowitz MS. Facial nerve injury during surgery of the temporomandibular joint: a comparison of two dissection techniques. *J Oral Maxillofac Surg.* 1985;43:20-3.
97. Davis JP, Tan CY. Frey syndrome: a review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2013;66(8):e190-e7.

98. Shah R. Oral Flap Design. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
99. Boehm TK. Overview of Periodontal Surgical Procedures. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
100. Hadilou M. Prevalence and extension of the anterior loop of the mental nerve: a systematic review & meta-analysis. *Imaging Science in Dentistry*. 2022;52(3).
101. Gupta A. Evaluation of the dimensions of anterior loop of mental nerve: a CBCT study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2019;13(1).
102. Vujanovic-Eskenazi A. Anterior loop prevalence/length: panoramic vs CBCT. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*. 2014;158(1).
103. Moiseiwitsch JRD. Avoiding the mental foramen during periapical surgery. *Journal of Endodontics*. 1995;21(6):340-2.
104. Tavelli L, Barootchi S, Stefanini M, Zucchelli G, Giannobile WV, Wang HL. Wound healing dynamics, morbidity, and complications of palatal soft-tissue harvesting. *Periodontology 2000*. 2023;92(1):90-119.
105. Tavelli L, Barootchi S, Ravidà A, Oh TJ, Wang HL. What is the safety zone for palatal soft tissue graft harvesting...? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2019;77(2):271.e1-.e9.
106. Liu J, Li X, Ma L, Pan J, Tang X, Wu Y, Hua C. Sensory disorder after nasopalatine nerve division. *Medical Science Monitor*. 2017;23:528-34.
107. Alkhouri N. The prognosis of nasopalatine nerve severance during dental surgery. *Faculty Dental Journal (RCS Eng)*. 2024.
108. Chan HL, Leong DJM, Fu JH, Yeh CY, Tatarakis N, Wang HL. The significance of the lingual nerve during periodontal/implant surgery. *Journal of Periodontology*. 2010;81(3):372-7.
109. Lydiatt DD. Litigation and the lingual nerve. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(2):197-200.
110. Vora AR, Loescher AR, Craig GT, Boissonade FM, Robinson PP. A light microscopical study on the structure of traumatic neuromas of the human lingual nerve. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(4):395-403.
111. Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943;66(4):237-88.
112. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951;74(4):491-516.

113. Kline DG, Hudson AR. Nerve Injuries: Operative Results for Major Nerve Injuries, Entrapments, and Tumors. Philadelphia: Saunders; 1995. 60-75 p.
114. Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 1850;140:423-9.
115. Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. Brain Pathology. 1999;9(2):313-25.
116. Vargas ME, Barres BA. Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? Annual Review of Neuroscience. 2007;30:153-79.
117. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. Journal of Neuroinflammation. 2011;8:110-.
118. Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. Annual Review of Neuroscience. 2007;30:209-33.
119. Beirowski B. Non-cell autonomous mechanisms in Wallerian degeneration. Nature Reviews Neuroscience. 2008;9(12):889-99.
120. Coleman MP, Freeman MR. Wallerian degeneration, wlds and nmnat. Annual Review of Neuroscience. 2010;33:245-67.
121. Dun XP, Parkinson DB. Visualizing peripheral nerve regeneration by whole mount staining. J Neurosci Methods. 2018;304:92-102.
122. Minegishi S, Saito A, Hamaguchi M. Repeated crush model for peripheral nerve injury. Neurosci Res. 2024.
123. Yeoh S, Lin J, Yang L. A rodent traction injury model of peripheral nerve. J Neurosci Methods. 2021;348:109003.
124. Lee JI, Gurjar AA, Talukder MAH, Rodenhouse A, Manto K, O'Brien M, et al. A novel nerve transection and repair method in mice: histomorphometric analysis of nerves, blood vessels, and muscles with functional recovery. Sci Rep. 2020;10(1):21637.
125. Varier P, Karthikeyan R, Narayanan V. In vitro models of peripheral nerve injury. J Neurosci Res. 2022;100(2):377-88.
126. Tusnim J, Zhao Y, Hoke A. In vitro models for studying peripheral nerve injury and repair. Neural Regen Res. 2024;19(7):1481-92.
127. Li A, Yang H, Zhang W. Advances in peripheral nerve injury models: in vivo and in vitro approaches. Neural Regen Res. 2021;16(4):755-61.

128. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G. Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *International Review of Neurobiology*. 2009;87:27-46.
129. Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in Neurosciences*. 1997;20(2):84-91.
130. Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Experimental Neurology*. 2010;223(1):77-85.
131. Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. 2007;82(4):163-201.
132. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & Nerve*. 2000;23(6):863-73.
133. Okada K, Hasegawa M, Matsushima Y, Ichihara N, Kuwabara S. Methylcobalamin promotes nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush model. *Experimental Neurology*. 2010;222(2):191-8.
134. Secer HI, Daneyemez M, Gonul E, Izci Y. Neuroprotective effects of citicoline on experimental peripheral nerve injury. *Neurological Research*. 2007;29(5):490-6.
135. Barron KD, Matthews MR. Morphological changes in the cell body of injured neurons. *International Review of Neurobiology*. 1972;15:97-126.
136. Lieberman AR. Some factors affecting retrograde neuronal responses to axonal lesions. In: Cotman CW, editor. *Neuronal Plasticity*. New York: Raven Press; 1978. p. 53-82.
137. Kreutzberg GW. Axonal transport and neuronal regeneration. In: Waxman SG, editor. *Advances in Neurology*, Vol 47. New York: Raven Press; 1988. p. 69-88.
138. Hanz S, Fainzilber M. Integration of retrograde injury signals in the regenerating neuron. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(8):603-12.
139. Costigan M. Gene expression changes after peripheral nerve injury. *Journal of Neurobiology*. 2002;54(2):221-56.
140. Tsujino H. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motor neurons: a novel neuronal marker of nerve injury. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2000;15(2):170-82.
141. Mar BG, Noebels JL. Electrophysiological and mitochondrial alterations in neurons after axonal injury. *Journal of Neuroscience Research*. 2008;86(6):1307-16.

142. Sango K. Role of glial cells in peripheral nerve regeneration. *Neurochemistry International*. 2017;108:66-73.
143. Eberhardt KA, Irintchev A, Al-Majed AA, Brushart TM. Differential effects of neurotrophic factors on axonal regeneration through peripheral nerve grafts. *Journal of Neuroscience Research*. 2006;83(4):747-57.
144. Gummy LF, Tan CL, Fawcett JW. The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Experimental Neurology*. 2010;223(1):28-37.
145. Bradke F, Fawcett JW, Spira ME. Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2012;13(3):183-93.
146. Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurgical Focus*. 2009;26(2):E3.
147. Heermann S, Schwab MH. Molecular control of axon regeneration in the central nervous system: new players and new insights. *Current Opinion in Neurobiology*. 2013;23(4):628-35.
148. Smith DS, Skene JHP. A transcription-dependent switch controls competence of adult neurons for distinct modes of axon growth. *Journal of Neuroscience*. 1997;17(2):646-58.
149. Dubový P. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Annals of Anatomy*. 2011;193(4):267-75.
150. George EB, Glass JD, Griffin JW. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *Journal of Neuroscience*. 1995;15(10):6445-52.
151. Gomez-Sanchez JA. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *Journal of Cell Biology*. 2015;210(1):153-68.
152. Mueller M. Macrophage response to peripheral nerve injury: the role of chemokines and pro-inflammatory cytokines. *Experimental Neurology*. 2003;183(1):114-24.
153. Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *Journal of Physiology*. 2016;594(13):3521-31.
154. Chernousov MA, Carey DJ. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histology and Histopathology*. 2000;15(2):593-601.
155. Dubový P. Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. *International Review of Neurobiology*. 2013;108:163-92.

156. Katoh-Smith Y. Schwann cell-derived BDNF drives peripheral nerve regeneration. *Scientific Reports*. 2016;6:29121.
157. Höke A. Role of BDNF in activity-dependent nerve repair. *Journal of Neuroscience Research*. 2019;97(7):1234-45.
158. Wang J. Stem cell-based conduits with BDNF/GDNF for sciatic nerve repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:874.
159. Li J. BDNF microspheres in peripheral nerve injury. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2022;17:98.
160. Unal M. BDNF-TrkB signaling pathways in peripheral nerves. *DergiPark*. 2014.
161. Cregan SP. Caspase-3 deficiency rescues PNS neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(5):1234-41.
162. Scholz J, Woolf CJ. Blocking caspase-3 preserves spinal inhibition and reduces neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(32):7317-23.
163. Chen L. Caspase-3 in mitochondrial dysfunction in CIPN. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:898574.
164. Bahatyrevich-Kharitonik B, Medina-Guzman R, Flores-Cortes A, García-Cruzado M, Kavanagh E, Burguillos MA. Cell Death Related Proteins Beyond Apoptosis in the CNS. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;Volume 9 - 2021.
165. Chattopadhyay R. Role of MMP-9 in Schwann cell activation after peripheral nerve injury. *Experimental Neurology*. 2022;354:114103.
166. Kawasaki Y. Distinct roles of matrix metalloproteinase-9 in neuropathic pain. *Nature Medicine*. 2008;14(3):331-6.
167. Remacle AG. MMP-9 versus MMP-2 roles in nerve injury-induced neuropathic pain. *Neuroscience Letters*. 2018;684:1-7.
168. Verma S. Inhibition of MMP-9 reduces neuropathic pain and demyelination. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2023;17:10233756.
169. Özay R. Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Surgical Neurology*. 2007;68(6):615-22.
170. Kaplan T, Kafa IM, Cansev M, Bekar A, Karli N, Taskapilioglu MO, Kanar F. Investigation of the dose-dependency of citicoline effects on nerve regeneration and

- functional recovery in a rat model of sciatic nerve injury. *Turk Neurosurg.* 2014;24(1):54-62.
171. Secades JJ, Gareri P. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2022 update. *Rev Neurol.* 2022;75(s05):S1-s89.
 172. Martinet M, Fonlupt P, Pacheco H. Effects of cytidine diphosphate choline on norepinephrine, dopamine and serotonin synthesis in various regions of the rat brain. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1979;239(1):52-61.
 173. Secades JJ. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2016 update. *Rev Neurol.* 2016;63 Suppl 3:S1-S73.
 174. Yüceer N, et al. The effects of CDP-choline (citicoline) on nerve healing in an experimental rat model. *Neurosurgical Quarterly.* 2020;30(4):330-6.
 175. Acikalin MF. Citicoline increases BDNF expression in trigeminal ganglion after mental nerve injury. *Biomed Pharmacology Journal.* 2024.
 176. Okada K. Methylcobalamin increases nerve regeneration in experimental neuropathies. *Brain and Development.* 1994;16(4):234-8.
 177. Watanabe T, Kaji R, Oka N, Bara W, Kimura J. Ultra-high dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acrylamide neuropathy. *Journal of Neurological Sciences.* 1994;122(2):140-3.
 178. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:217-46.
 179. Scalabrino G. Subacute combined degeneration of the spinal cord: pathogenesis and treatments. *Neurol Sci.* 2020;41(6):1435-43.
 180. O’Leary F, Samman S. Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients.* 2010;2(3):299-316.
 181. Yamatsu K, Yamashita T, Komatsu T. Pharmacological studies on degeneration and regeneration of peripheral nerves: effects of methylcobalamin. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 1976;72(2):185-92.
 182. Hossain MJ, Kendig MD, Wild BM, Issar T, Krishnan AV, Morris MJ, Arnold R. Evidence of Altered Peripheral Nerve Function in a Rodent Model of Diet-Induced Prediabetes. *Biomedicines.* 2020;8(9).
 183. Nunamaker EA, Goldman JL, Adams CR, Fortman JD. Evaluation of Analgesic Efficacy of Meloxicam and 2 Formulations of Buprenorphine after Laparotomy in Female Sprague-Dawley Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2018;57(5):498-507.

184. Lee JH, et al. Enhanced nerve regeneration through NGF-loaded nanofibrous membranes in a rat mental nerve crush injury model. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:5139-51.
185. Taylor BK, Corder G. Female mice and rats exhibit persistent pain after a nerve injury that is spared in males. *Pain*. 2011;152(5):1184-91.
186. Ma Y, et al. Peripheral nerve regeneration after different injury models: a comparative study in the rat mental nerve. *Nat Commun*. 2023;14(1):3705.
187. Feng DF, et al. Standardizing optic nerve crushes with an aneurysm clip. *Neurol Res*. 2010;32(5):476-81.
188. Schuettauf F, Rejdak R, Thaler S, Bolz S, Lehaci C, Mankowska A, et al. Citicoline and lithium rescue retinal ganglion cells following partial optic nerve crush in the rat. *Exp Eye Res*. 2006;83(5):1128-34.
189. Okada K, Tanaka H, Temporin K, Okamoto M, Kuroda Y, Moritomo H, et al. Methylcobalamin increases Erk1/2 and Akt activities through the methylation cycle and promotes nerve regeneration in a rat sciatic nerve injury model. *Experimental neurology*. 2010;222:191-203.
190. Xing H, Chen M, Ling J, Tan W, Gu JG. TRPM8 Mechanism of Cold Allodynia after Chronic Nerve Injury. *The Journal of Neuroscience*. 2007;27(50):13680.
191. Tesch GH. Serum creatinine as a marker of renal function: A brief review of recent advances. *Nephrology (Carlton)*. 2008;13(2):61-5 PMID - 18221429.
192. Tavares AM. The role of LDH, AST, and ALT in the evaluation of liver function and inflammation. *Clin Biochem*. 2021;93:15-20 PMID - 33798479.
193. Kumar P. Hematological markers of inflammation and infection in experimental animal models. *J Immunoassay Immunochem*. 2021;42(6):709-21 PMID - 34524715.
194. Wang H. Inflammatory cytokines and markers of liver injury in patients with COVID-19. *J Hepatol*. 2020;73(2):451-5 PMID - 32298767.
195. LeClair EE, Topczewski J. Development and Regeneration of the Zebrafish Maxillary Barbel: A Novel Study System for Vertebrate Tissue Growth and Repair. *PLOS ONE*. 2010;5(1):e8737.
196. Zhou Y, Bazick H, Miles JR, Fethiere AI, Salihi MOA, Fazio S, et al. A neutral lipid-enriched diet improves myelination and alleviates peripheral nerve pathology in neuropathic mice. *Exp Neurol*. 2019;321:113031.

197. Bayır U, Aksu R, Öz Gergin Ö, Onder GO, Sencar L, Günay E, et al. The effect of pulsed radiofrequency application on nerve healing after sciatic nerve anastomosis in rats. *Ultrastruct Pathol.* 2022;46(4):313-22.
198. Kovačič U, Žele T, Osredkar J, Sketelj J, Bajrović FF. Sex-related differences in the regeneration of sensory axons and recovery of nociception after peripheral nerve crush in the rat. *Experimental Neurology.* 2004;189(1):94-104.
199. Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma.* 2000;17(5):367-88.
200. Garcia-Blanco M, Gualtieri AF, Lovaglio-Rivas AC, Ruffini JM, Puia SA. Trigeminal nerve injuries. Four years' experience at a single Argentine referral center and a literature review. *Acta Odontol Latinoam.* 2021;34(3):263-70.
201. Pogrel MA, Thamby S. The etiology of altered sensation in the inferior alveolar, lingual, and mental nerves as a result of dental treatment. *J Calif Dent Assoc.* 1999;27(7):531-8.
202. Bridge PM. Nerve crush injuries—a model for axonotmesis. *Exp Neurol.* 1994;127(2):284-90.
203. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996;25(2):101-21.
204. Meek MF, Coert JH. US Food and Drug Administration/Conformit Europe—approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Ann Plast Surg.* 2008;60(1):110-6.
205. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83(1):129-38.
206. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, et al. Experimental models for peripheral nerve regeneration: a critical review. *Brain Res Rev.* 2009;60(1):60-71.
207. Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Comparison of crushing techniques to produce a reproducible nerve injury in the rat. *Muscle Nerve.* 1992;15(9):1019-23.
208. Scalabrino G. Cobalamin (vitamin B(12)) in subacute combined degeneration and beyond: traditional interpretations and novel theories. *Exp Neurol.* 2005;192(2):463-79.
209. Gan L, Qian M, Shi K, Chen G, Gu Y, Du W, Zhu G. Restorative effect and mechanism of mecobalamin on sciatic nerve crush injury in mice. *Neural Regeneration Research.* 2014;9(22):1979-84.

210. Hsieh YL, Lu YL, Yang NP, Yang CC. Methylcobalamin in Combination with Early Intervention of Low-Intensity Pulsed Ultrasound Potentiates Nerve Regeneration and Functional Recovery in a Rat Brachial Plexus Injury Model. *Int J Mol Sci.* 2023;24(18).
211. Sun H, Yang T, Li Q, Zhu Z, Wang L, Bai G, et al. Dexamethasone and vitamin B(12) synergistically promote peripheral nerve regeneration in rats by upregulating the expression of brain-derived neurotrophic factor. *Arch Med Sci.* 2012;8(5):924-30.
212. Ji X, Li C, Zhu X, Yu W, Cai Y, Zhu X, et al. Methylcobalamin Alleviates Neuronal Apoptosis and Cognitive Decline Induced by PM2.5 Exposure in Mice. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2022;86(4):1783-96.
213. Zhang X, et al. Effects of mecobalamin on cerebral ischemia/reperfusion injury of spontaneously hypertensive stroke-prone rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2021;83(3):422-9.
214. Song XX, et al. Effects of Mecobalamin and Epalrestat on Diabetic Peripheral Neuropathy and MMP-9 Regulation. *American Journal of Translational Research.* 2025;17(8):2898-909.
215. Barrachina M, Secades JJ, Lozano R. Citicoline increases glutathione redox ratio and reduces caspase-3 activation and cell death in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 2002;957(1):84-90.
216. Oshitari T, Yoshida-Hata N, Yamamoto S. Effect of neurotrophic factors on neuronal apoptosis and neurite regeneration in cultured rat retinas exposed to high glucose. *Brain Research.* 2010;1346:43-51.
217. Hurtado O, Hernández-Jiménez M, Zarruk JG, Cuartero MI, Ballesteros I, Camarero G, et al. Citicoline (CDP-choline) increases Sirtuin1 expression concomitant to neuroprotection in experimental stroke. *Journal of Neurochemistry.* 2013;126(6):819-26.
218. Kim Y, Remacle AG, Chernov AV, Liu H, Shubayev I, Lai C, et al. The MMP-9/TIMP-1 axis controls the status of differentiation and function of myelin-forming Schwann cells in nerve regeneration. *PLoS One.* 2012;7(3):e33664.
219. Krupinski J, Ferrer I, Barrachina M. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression following focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology.* 2002;42(6):846-54.

220. Thohari K, Fauzi AA, Purwanto DA. Neutrophil-lymphocyte ratio: A simple and accurate biomarker for the prognosis of patients with intracerebral bleeding, a study of 115 cases. *Surg Neurol Int.* 2024;15:475.
221. Fogagnolo P, Melardi E, Tranchina L, Rossetti L. Topical citicoline and vitamin B12 versus placebo in the treatment of diabetes-related corneal nerve damage: a randomized double-blind controlled trial. *BMC Ophthalmol.* 2020;20(1):315.
222. Nguyen TTM, Gillet G, Popgeorgiev N. Caspases in the developing central nervous system: apoptosis and beyond. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:702404.
223. Stenberg L, Stößel M, Ronchi G, Geuna S, Yin Y, Mommert S, et al. Regeneration of long-distance peripheral nerve defects after delayed reconstruction in healthy and diabetic rats is supported by immunomodulatory chitosan nerve guides. *BMC Neuroscience.* 2017;18(1):53.
224. Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci.* 2000;20(19):7246-54.
225. Ferguson IA, Muir D. MMP-2 and MMP-9 enhance neurite growth on Schwann cell basal lamina. *Mol Cell Neurosci.* 2000;16(1):157-67.
226. Yoshikawa H, Yamada Y, Kurose M, Yamamura K, Maeda T, Seo K. Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Regeneration Following Inferior Alveolar Nerve Injury in Rats. *J Oral Facial Pain Headache.* 2016;30(4):346-54.
227. Sarma PR. Red Cell Indices and their Clinical Utility. New York: McGraw-Hill; 1990.
228. Bhandari P, Ruguian NU. MCH, MCHC and MCV: Diagnostic Significance and Clinical Insights. 2025.
229. Khaled M. Mean platelet volume as an indicator of inflammation. *International Journal of Inflammation.* 2020;2020:1-6.
230. Zhang Y, Li X. The potential value of MPV and PDW in inflammatory conditions. *Journal of Inflammation Research.* 2024;17:451-60.
231. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of neuroinflammation.* 2011;8(1):110.
232. Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *Journal of neuroinflammation.* 2011;8(1):109.

233. Barrachina M, Secades J, Lozano R, Gómez-Santos C, Ambrosio S, Ferrer I. Citicoline increases glutathione redox ratio and reduces caspase-3 activation and cell death in staurosporine-treated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain research*. 2002;957(1):84-90.
234. Zazueta C, Buelna-Chontal M, Macias-Lopez A, Roman-Anguiano NG, Gonzalez-Pacheco H, Pavon N, et al. Cytidine-5'-Diphosphocholine Protects the Liver From Ischemia/Reperfusion Injury Preserving Mitochondrial Function and Reducing Oxidative Stress. *Liver Transpl*. 2018;24(8):1070-83.
235. Abdel-Aziz N, El-Bahkery A, Ibrahim EA. The synergistic effects of citicoline and silymarin on liver injury and thyroid hormone disturbances in γ -irradiated rats. *Mol Biol Rep*. 2025;52(1):176.
236. Ngatuni D, Wairagu P, Jillani N, Isaac AO, Nyariki JN. A glyphosate-based herbicide disrupted hematopoiesis and induced organ toxicities, ameliorated by vitamin B(12) in a mouse model. *Saudi J Biol Sci*. 2022;29(6):103278.
237. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004;16(5):E1.
238. Ikeda M, Oka Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav*. 2012;2(4):382-90.
239. Zhao Q, Lundborg G, Danielsen N, Bjursten LM, Dahlin LB. Nerve regeneration in a 'pseudo-nerve' graft created in a silicone tube. *Brain Research*. 1997;769(1):125-34.
240. Liu Y, Nie L, Zhao H, Zhang W, Zhang YQ, Wang SS, Cheng L. Conserved dopamine neurotrophic factor-transduced mesenchymal stem cells promote axon regeneration and functional recovery of injured sciatic nerve. *PLoS One*. 2014;9(10):e110993.
241. Zhao Z, Wang Y, Peng J, Ren Z, Zhang L, Guo Q, et al. Improvement in nerve regeneration through a decellularized nerve graft by supplementation with bone marrow stromal cells in fibrin. *Cell Transplant*. 2014;23(1):97-110.
242. Brogan DM, Dy CJ, Wever J, Lee T, Achilefu S. Early Expression of MMP-9 Predicts Recovery of Tibialis Anterior after Sciatic Nerve Crush Injury. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2022;10(4):e4260.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Onayı

