

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI**

**SİNİR REJENERASYONU AMACIYLA RAPAMİSİNİN
HASARLI BÖLGEYE LOKAL OLARAK FARKLI
MATRİKSLERDE UYGULANMASI VE ETKİNLİĞİNİN
İN VİVO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Hazırlayan
Mehmet CANPOLAT**

**Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNAL**

Doktora Tezi

**Şubat 2023
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI**

**SİNİR REJENERASYONU AMACIYLA RAPAMİSİNİN
HASARLI BÖLGEYE LOKAL OLARAK FARKLI
MATRİKSLERDE UYGULANMASI VE ETKİNLİĞİNİN
İN VİVO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doktora Tezi

**Hazırlayan
Mehmet CANPOLAT**

**Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNAL**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TCD-2022-11568 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Şubat 2023
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Mehmet CANPOLAT

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Sinir rejenerasyonu amacıyla rapamisinin hasarlı bölgeye lokal olarak farklı matrikslerde uygulanması ve etkinliğinin in vivo olarak değerlendirilmesi” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Mehmet CANPOLAT

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNAL

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Prof. Dr. Ali ÜNAL danışmanlığında **Mehmet CANPOLAT** tarafından hazırlanan “**Sinir rejenerasyonu amacıyla rapamisinin hasarlı bölgeye lokal olarak farklı matrikslerde uygulanması ve etkinliğinin in vivo olarak değerlendirilmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

27.02.2023

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr. Ali ÜNAL.....

Üye : Prof. Dr.Gökçen DİNÇ.....

Üye : Prof.Dr.Zuhal HAMURCU

Üye : Prof.Dr.Ahmet Sami GÜVEN

Üye : Prof.Dr.Mustafa ÇALIK.....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....
Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi ve yazılması noktasında göstermiş olduğu destek ve katkılarından dolayı tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ali ÜNAL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

TCD-2022-11568 proje kodu ile bu çalışmayı destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve proje süresince göstermiş oldukları öz veriden dolayı Birim Personeline teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deney aşamasında ve denek hayvanlarının bakım aşamasındaki destek ve katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi "Deneyel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi - DEKAM" Birimi'ne ve Birim Personeline teşekkürlerimi sunarım.

Projenin planlanması, deneyin uygulanması ve deneyin sonlandırılması aşamalarındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve Anesteziyoloji ve Reanimasyon Uzmanı Doç.Dr. Dilek GÜNAY CANPOLAT'a, deneyin uygulanması ve deneyin sonlandırılması aşamalarındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Arş. Gör.Dt. Nijat GASIMOV ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Arş.Gör.Dr. Babek ABBASOV'a, çalışmanın planlanması ve deney hayvanlarına uygulanacak ilaç formülasyonlarının hazırlanmasındaki destek ve katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Arş.Gör.Dr. Sedat ÜNAL'a, fonksiyonel değerlendirme aşamasındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Mesut MEKER'e, deneyin sonlandırılması ve elektrofizyolojik değerlendirme sürecindeki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Mehmet Fatih YETKİN ve Arş.Gör.Dr. Şeyma BENLİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu projenin planlanması, yürütülmesi, histopatolojik analizlerin gerçekleştirilmesi ve yazılması noktasında göstermiş olduğu destek ve katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Arzu Hanım YAY ve Dr.Öğr.Üyesi Menekşe ÜLGER'e, projenin planlanması, istatistik analizlerin yapılması ve yazılması noktasında göstermiş olduğu destek ve katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ahmet ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Meslek hayatım ve bilimsel çalışmalarım süresince birçok konuda fedakârlık gösteren sevgili aileme, bana duydukları güven için en derin duygularla teşekkür ederim.

Saygılarımla,

Dr. Mehmet CANPOLAT

Kayseri, Şubat 2023

SİNİR REJENERASYONU AMACIYLA RAPAMİSİNİN HASARLI BÖLGEYE LOKAL OLARAK FARKLI MATRİKSLERDE UYGULANMASI VE ETKİNLİĞİNİN İN VİVO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet CANPOLAT

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Şubat 2023

Danışman: Prof. Dr. Ali ÜNAL

ÖZET

Travmatik periferik sinir hasarı; ciddi fonksiyonel kayıplara ya da kalıcı sekellere neden olabilen önemli bir halk sağlığı problemidir. Standart bir tedavisi yoktur. Bu çalışmanın hipotezi; rapamisin periferik sinir rejenerasyonu amacıyla hasarlı sinir bölgesine çözelti halinde ve farklı matriksler içerisinde lokal olarak uygulandığında, fizyolojik ve fiziksel faktörler sonucu etki bölgesinde kalış süresinin uzayacağı ve böylece etkinliğinin artabileceğidir.

Çalışmaya, her grupta 10 rat olmak üzere toplam 100 rat dahil edildi. **Grup I (n=10):** Kontrol grubu, **Grup II (n=10):** Sham grubu, **Grup III (n=10):** Hasarlı sinir bölgesine 3mg/kg rapamisin çözelti halinde uygulandı; **Grup IV (n=10):** Hasarlı sinir bölgesine fibrin jel formülasyonu uygulandı; **Grup V (n=10):** Hasarlı sinir bölgesine fibrin jel formülasyonu içinde 3mg/kg rapamisin uygulandı; **Grup VI (n=10):** Hasarlı sinir bölgesine trombosit zengin plazma (plateletten zengin plazma-PRP) uygulandı; **Grup VII (n=10):** Hasarlı sinir bölgesine PRP içinde 3mg/kg rapamisin uygulandı; **Grup VIII (n=10):** Hasarlı sinir bölgesine kollajen membran sarıldı; **Grup IX (n=10):** Hasarlı sinir bölgesine kollajen membran kombine 3mg/kg rapamisin sarıldı; **Grup X (n=10):** İntraperitoneal olarak sistemik 3mg/kg rapamisin 7 gün süre ile uygulandı. Çalışmada sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için cerrahiyi takiben 12.haftanın bitiminde elektronöromiyografi ve siyatik fonksiyonel indeks (SFI) yapıldı. Histomorfometrik inceleme ve immünohistokimyasal çalışmalar (S-100, NF ve GAP-43 ekspresyonunu) yapılmak üzere sakrifikasyondan hemen sonra siyatik sinir doku örnekleri alındı.

Grupların SFI, latans, birleşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) amplitüdü, BKAP alanı, iletim hızı, akson çap, akson sayısı, S100, NF ve GAP-43 ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı (sırasıyla p=0.042, p=0.048, p<0.001, p<0.001, p<0.001, p<0.001, p<0.001, p<0.001, p=0.005, p<0.001). Tedavi gruplarında matriks-ilaç kombinasyonlarında sonuçlar (BKAP amplitüdü, akson sayısı, akson çap, S100, GAP-43) matrikse göre daha iyi bulundu.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular, çalışma hipotezini ve sinerjistik etkiyi destekler nitelikte olup ilaç yan etkilerinden ve sistemik komplikasyonlardan kaçınmak için lokal olarak uygulanan matriks-ilaç kombinasyonlarının etkili ve sinir rejenerasyonunda umut verici olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Fibrin Jel; Kollajen Membran; Rapamisin; Sinir Rejenerasyonu; Trombosit Zengin Plazma.

APPLICATION OF RAPAMYCIN LOCALLY TO THE DAMAGED AREA IN DIFFERENT MATRIX FOR NERVE REGENERATION AND EVALUATION OF ITS EFFECTIVENESS IN VIVO

Mehmet CANPOLAT

Erciyes University, Institute of Health Sciences, Department of Stem Cell

PhD Thesis, February 2023

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÜNAL

ABSTRACT

Traumatic peripheral nerve injury is an important public health problem that can cause serious functional losses or permanent sequelae. There is no standard treatment for it. The hypothesis of this study is when rapamycin is locally applied to the damaged nerve region in solution and in different matrix for peripheral nerve regeneration, the duration of stay in the affected nerve area will be prolonged as a result of physiological and physical factors, and thus its effectiveness may increase.

A total of 100 rats, including 10 rats in each group, were included in the study. **Group I (n=10):** Control group, **Group II (n=10):** Sham group, **Group III (n=10):** 3mg/kg rapamycin was applied in solution to the damaged nerve area; **Group IV (n=10):** Fibrin gel formulation was applied to the damaged nerve area; **Group V (n=10):** 3mg/kg rapamycin in a fibrin gel formulation was applied to the damaged nerve area; **Group VI (n=10):** Platelet-rich plasma (PRP) was applied to the damaged nerve area; **Group VII (n=10):** 3mg/kg rapamycin in PRP was administered to the damaged nerve area; **Group VIII (n=10):** Collagen membrane was wrapped in the damaged nerve area; **Group IX (n=10):** Collagen membrane combined 3mg/kg rapamycin was wrapped in the damaged nerve area; **Group X (n=10):** Systemic 3mg/kg rapamycin was administered intraperitoneally for 7 days.

Electroneuromyography and sciatic functional index (SFI) were performed at the end of the 12th week following surgery to evaluate the potential nerve regeneration, in this study. Sciatic nerve tissue samples were taken instantly following the sacrifice for histomorphometric examination and immunohistochemical studies (expression of S100, NF, and GAP-43).

A statistically significant difference was found among the the following groups: SFI, latency, combined muscle action potential (CMAP) amplitude, CMAP area, conduction velocity, axon diameter, axon number, S100, NF, and GAP-43 mean (respectively $p=0.042$, $p=0.048$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.005$, $p<0.001$). In treatment groups; results of matrix-drug combinations (CMAP amplitude, axon number, axon diameter, S100, GAP-43) were found to be better than the matrix.

In conclusion, our findings support the study hypothesis and synergistic effect and reveal that matrix-drug combinations applied locally to avoid drug side effects and systemic complications have promising and possibly effective results in nerve regeneration.

Keywords: Collagen Membrane; Fibrin Gel; Nerve Regeneration; Platelet-Rich Plasma; Rapamycin.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER	ix
TABLolar LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Periferik Sinir Sistemi	3
2.2. Periferik Sinir Hasarı.....	3
2.3. Travmatik Sinir Yaralanmaları	3
2.4. Siyatik Sinir	4
2.5. Siyatik Sinir Hasarı	4
2.6. Siyatik Sinir Hasarında Tedavi Seçenekleri	5
2.7. Sinir Rejenerasyonu	5
2.8. mTOR (MammalianTarget of Rapamisin) Yolu ve Sinir Rejenerasyonu	7
2.9. Rapamisin	8
2.10. Lokal Rapamisin Uygulaması.....	9
2.11. Scaffold.....	10

2.12. Fibrin Jel	10
2.13. Kollajen Membranlar.....	13
2.14. Plateletten Zengin Plazma (PRP)	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Birinci Aşama: İlaç Formülasyonlarının Hazırlanması.....	17
3.1.1. Rapamisin çözeltisinin hazırlanması.....	17
3.1.2. Rapamisin içeren fibrin jel formülasyonu hazırlanması	18
3.1.3. PRP'nin eldesi ve kullanımı	19
3.1.4. Kollajen membran kullanımı	21
3.2. İkinci Aşama: Sinir Hasarı Oluşturulması ve İlaç Formülasyonlarının İn Vivo Uygulanması.....	22
3.2.1. Sinir hasarı modelinin oluşturulması	22
3.2.2. Cerrahi prosedür	24
3.3. Rapamisin Dozu	24
3.4. Deney Hayvanlarının Bakım ve Takipleri.....	25
3.5. Fonksiyonel ve Elektrofizyolojik Değerlendirme	25
3.5.1. Fonksiyonel değerlendirme	25
3.5.2. Elektronöromiyografik değerlendirme	26
3.6. Histopatolojik Analizler	27
3.6.1. Doku takibi ve gömme	27
3.6.2. Histomorfometrik değerlendirme	28
3.6.3. İmmünfloresan boyama	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. Fonksiyonel ve Elektrofizyolojik Bulgular	30
4.1.1. Fonksiyonel değerlendirme sonuçları	30
4.1.2. Elektronöromiyografik bulgular	31

4.2. Histopatolojik Bulgular	33
4.2.1. Siyatik sinir (Oil Red O).....	33
4.2.2. İmmunofloresan (S-100, NF ve GAP-43)	37
5. TARTIŞMA	48
5.1. Fonksiyonel ve Elektromiyonörografik Bulguların Değerlendirilmesi.....	54
5.2. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
7. KAYNAKLAR	63
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

AKT/PKB:	Protein kinase B / Protein kinaz B
ARIA:	Asetilkolin reseptörü indükleyici aktivite
ATF3:	Activating transcription factor 3 / Aktive transkripsiyon faktörü 3
BDNF:	Brain derived neurotrophic factor / Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BKAP:	Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli
cAMP:	Cyclic adenosine monophosphate / Siklik adenosin monofosfat
CAMs:	Cell adhesion molecules / Hücre adezyon molekülleri
CGRP:	Calcitonin gene-related peptide / Kalsitonin geni ile ilişkili peptit
CNTF:	Ciliary neurotrophic factor / Siliyer nörotrofik faktör
DEKAM:	Erciyes Üniversitesi "Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi"
DMSO:	Dimethyle Sulfoxide / Dimetil Sulfoksit
ECM:	Extracellular matrix / hücre dışı matris
EIT:	Patolojik ayakta 2. ve 4.parmak aralık mesafesi
EMG:	Elektromiyografi
ENMG:	Electroneuromyography / Elektronöromiyografi
EPL:	Patolojik bası uzunluğu (3.parmak topuk arası mesafe),
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase / Hücre-dışı sinyal ile düzenlenen kinaz
ETS:	Patolojik ayakta 1. ve 5. parmak aralık mesafesi,
FDA:	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GBP:	Gabapentin
GAP -43:	Growth associated protein / Büyüme ile ilişkili protein-43
GDNF:	Glial cell-derived neurotrophic factor / Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör
GGF:	Glial growth factor / Glial büyüme faktörü
IGF:	İnsulin-like growth factor / İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1:	İnterleukin 1
IL-6:	İnterleukin 6
İP:	İntraperitoneal
JAK:	Janus kinaz
JNK:	c-Jun N-terminal kinase / c-Jun N-terminal kinaz

LC3-II:	Hafif zincir 3
MAPK:	Mitogen-activated protein (MAP) kinase / Mitojenle aktifleştirilen protein (MAP) kinaz
mTOR:	Mammalian Target of Rapamycin / Rapamisin Memeli Hedefi
MUAP:	Motor Ünite Aksiyon Potansiyelleri
NCS:	Sinir İleti Çalışması
NCV:	Sinir İleti Hızı
NDF:	Neu differentiation factor / Nöü-farklılaşma faktörü
NF:	Nöroflaman
NGF:	Nerve growth factor / Sinir büyüme faktörü
NII:	Nerve injection injury / Enjeksiyon ilişkili sinir yaralanmaları
NIT:	Normal ayakta 2. ve 4.parmak aralık mesafesi,
NPL:	Normal bası uzunluğu (3.parmak topuk arası mesafe)
NRG1:	Neuregulin 1
NT:	Neurotrophin / Nörotrofin
NTS:	Normal ayakta 1. ve 5. parmak aralık mesafesi
OPN:	Osteopontin / Osteopontin
PDGF:	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
P38:	Mitogen-activated protein kinase 38 / Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz 38
PI3-K:	Phosphoinositide 3-kinase / Fosfoinositid 3-kinaz
PLGA:	Poli-laktik-ko-glikolik asit
PMP22:	Peripheral myelin protein 22 / Peripheral myelin protein 22
PRP:	Trombositten zengin plazma (Platelet Rich Plasma / Plateletten zengin plazma)
PRF:	Platelet Zengin Fibrin
PSS / PNS:	Periferik Sinir Sistemi
PTEN:	Phosphatase and tensin homolog / Fosfataz ve tensin homologu
PTN:	Pleiotrofin
RAPA:	Rapamisin
SFI:	Siyatik Fonksiyonel İndeks
SSS:	Santral Sinir Sistemi

STAT:	Signal transducer and activator of transcription / Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü
TGF-β:	Transforming growth factor / Transörme edici büyüme faktörü- β
TPNI:	Travmatik periferik sinir injurisi
TSC:	Tuberous sclerosis / Tuberoskleroz
UUO:	Unilateral üreteral obstrüksiyon
VEGF:	Vascular endothelial growth factor / Vasküler endotelyal büyüme faktörü.
VIP:	Vazoaktif intestinal peptid



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Oil Red-O boyama metodu	28
Tablo 3.2.	İmmunofloresan boyama metodu	29
Tablo 4.1.	Çalışma grupların NPL, NIT, NTS, EPL, EIT, ETS ve SFI değişkenlerinin karşılaştırılması.	30
Tablo 4.2.	Latans, BKAP amplitüdü, BKAP alanı ve iletim hızı verilerinin gruplar arası karşılaştırması.	32
Tablo 4.3.	Grupların akson çap verilerinin karşılaştırması.	35
Tablo 4.4.	Grupların akson sayısı verilerinin karşılaştırılması.	36
Tablo 4.5.	S100 değerlerine göre grup ortalamalarının karşılaştırılması	45
Tablo 4.6.	Grupların GAP-43 ve NF değişkenlerinin karşılaştırılması	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Sinir rejenerasyonunda rapamisin ve doku matrikslerinin etkisi.	12
Şekil 3.1.	Rapamisin içeren fibrin jel hazırlanması ana hatlarıyla özetlenmiştir.	19
Şekil 3.2.	Rat tam kanından trombosit zengin plazma (Platelet Rich Plasma, PRP) eldesi	20
Şekil 3.3.	Kollajen membranın sinir hasarı bölgesine uygulanışı	21
Şekil 3.4.	Seltzer modeline göre; siyatik sinir yerinin tespiti, hasarın oluşturulması, örnek eldesi.	23
Şekil 3.5.	Elektromiyografi cihazı (Sierra® Summit™, US).....	27
Şekil 4.1.	Tüm gruplarda Oil Red O boyamasında rejenere sinir liflerinin değerlendirilmesi (Rejenere siyatik sinirin ışık mikroskobu görüntüleri)....	34
Şekil 4.2.	Tüm gruplara ait sinir S100 boyanması ile elde edilen görüntüler	39
Şekil 4.3.	Tüm gruplara ait sinir NF boyanması ile elde edilen görüntüler	42
Şekil 4.4.	Tüm gruplara ait sinir GAP-43 boyanması ile elde edilen görüntüler	45

1. GİRİŞ VE AMAÇ

En sık görülen periferik nöropati travmatik sinir yaralanmalarıdır (Caillaud M ve ark, 2019). Ciddi fonksiyonel kayıplara ya da kalıcı sekellere neden olabilen travmatik periferik sinir hasarı; önemli bir halk sağlığı sorunudur (Modrak M ve ark, 2020). Periferik sinir hasarlarının ve onunla ilişkili semptomların standart bir tedavisi yoktur, ancak literatürde bu konuyla ilgili çok sayıda invaziv ve noninvaziv yöntem kullanılmıştır (O'Connor AB, 2009; Woolf CJ ve ark, 2009; Canpolat DG ve ark, 2018; Lin Q ve ark, 2011; Mashhoudi Barez M ve ark, 2017; Modrak M ve ark, 2020; Wiffen PJ ve ark, 2017; Alles ve ark, 2018; Sebben AD ve ark, 2011; Penna V ve ark, 2012; Lichtenfels M ve ark, 2013). Bir lipofilik makrolid antibiyotik olan rapamisinin mTOR yolu üzerine etkisiyle Schwann hücrelerinin myelinizasyonunu arttırdığı nöropatik Schwann hücre kültürlerinde gösterilmiştir (Christie KJ, 2010). Son yıllarda rejeneratif tıp alanında, doku mühendisliği ve farmasötik alandaki gelişmeler ilaçların lokal etkilerini artırarak sistemik yan etkileri azaltmak için ilaç yüklü scaffoldları ve nanopartikülleri de içeren tıbbi farmasötik ürünlerin bu alanda kullanımını beraberinde getirmiştir (Angius D ve ark., 2012; Lin MY ve ark., 2013; Gu X ve ark., 2014; Yi S ve ark., 2017; Yi S ve ark., 2019; Hosseinkhani M ve ark., 2014; Vijayavenkataraman S ve ark., 2020; Kuffler DP ve Foy C, 2020; Du J ve ark., 2018; Ye F ve ark., 2012; Braga Silva J ve ark., 2017; Amado S ve ark., 2010). İlaç taşıyıcı matriks sistemleri hem fizyolojik ve fiziksel engellerin aşılabılmesinde hem de başlı başına sinir rejenerasyonunda hasar bölgesinde iskele yapısı oluşturarak olumlu etki göstermektedir. İlaç ve ilaç taşıyıcı matriksin kombine olarak uygulanması ile nihai tedavide sinerjistik etki göstermesi ve tedavinin etkinliğinin artırması mümkün olabilir. Bu kapsamda, "Sinir rejenerasyonu amacıyla rapamisinin hasarlı bölgeye lokal olarak farklı matrikslerde uygulanması ve etkinliğinin in vivo olarak değerlendirilmesi" başlıklı bu çalışmanın hipotezi; rapamisinin periferik sinir rejenerasyonu amacıyla hasarlı sinir

bölgesine çözelti halinde ve farklı matriksler içerisinde lokal olarak uygulandığında, fizyolojik ve fiziksel faktörler sonucu etki bölgesinde kalış süresinin uzayacağı ve böylece etkinliğinin artabileceğidir.

Bu çalışmada, farklı üç matriks formülasyonu içerisinde hazırlayarak lokal olarak uygulayacağımız mTOR (Mammalian Target of Rapamisin) inhibitörü olan rapamisinin, travmatik siyatik sinir hasarında etkinliğini artırmak suretiyle sinir rejenerasyonunu hızlandırmayı ve böylece yeni geliştirilen bu formülasyonların sinir rejenerasyonunda acil durumlarda kullanılabilecek faydalı ve başarılı yeni yöntemler olduğunu göstermeyi hedeflemekteyiz. Bu amaçla, rapamisinin hasarlı siyatik sinir bölgesinde istenilen konsantrasyonda ve daha uzun süre etkinlik göstermesi için lokal ilaç taşıyıcı sistem görevi görecek olan fibrin jel, trombosit zengin plazma (plateletten zengin plazma-PRP) ve kollajen membran ile hazırlanmış kombinasyonlar şeklinde uygulanması hedeflenmiştir.

Rapamisinin ortama kontrollü bir şekilde salınabilmesi için yukarıda bahsedilen üç matriks formülasyonunun geliştirilmesi birincil hedefimizdir. Bu sayede rapamisin, hedef siyatik sinir hücrelerine kolayca ulaşabilecek ve etrafa dağılmadan daha uzun süre ortamda stabil kalmış olacaktır. Geliştirilen üç farklı matriks formülasyonunun, *in-vivo* rat modeline uygulanarak, sinir rejenerasyonundaki etkisinin fonksiyonel, histolojik ve elektrofizyolojik olarak değerlendirilmesi de çalışma projesinin diğer hedefleridir. Bu amaçla, yukarıda bahsi geçen üç yeni formülasyonun elektronörmiyografik değerlendirmede motor sinir iletim hızı, birleşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) amplitüdü, birleşik kas aksiyon potansiyeli alanı, latans zamanları üzerindeki etkilerinin detaylı incelenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca, iyileşmenin fonksiyonel olarak siyatik fonksiyonel indeks (SFI) kullanılarak değerlendirilmesi bir diğer hedefimizdir.

Çalışma sonuçlarımıza göre lokal formun sinir rejenerasyonuna olan etkisi, sistemik uygulamaya göre daha olumlu bulunursa, sistemik uygulamalara bağlı yan etkilerin azaltılması ve sistemik ilaç uygulamaları yerine hedefe yönelik lokal ilaç uygulamalarının teşvik edilmesine yönelik çalışmalara da katkı sağlanmış olacaktır. Bu çalışma sonucunda bu lokal formülasyonların siyatik sinir rejenerasyonunu hızlandırdığı ispatlanırsa, bu formülasyonlarda kullanılacak olan rapamisinin en uygun lokal doz aralığının belirlenmesi ve bunların insanlarda da kullanılabilirliğinin araştırılması için ileri farmasötik çalışmalar yapılarak acil durumlarda kullanımının önü açılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periferik Sinir Sistemi

Periferik sinir sistemi, kraniyal ve spinal sinirlerin motor, duyuşal ve otonom nöronları ile spinal sinirlerin kökleri, gövdeleri, gangliyonlar ve pleksuslardan oluşmaktadır (Caillaud M ve ark, 2019).

2.2. Periferik Sinir Hasarı

Periferik sinirler hasarlanmaya karşı duyarlıdır ve çok sayıda travmatik ya da nontravmatik olay sinir hasarının etiolojisinde yer almaktadır. Periferik sinir hasarı; mekanik travma, iskemik hasar, infeksiyon/inflamasyon, kompresyon, vinka alkaloidleri gibi bazı ilaçlar, tümör invazyonu ya da nöronal yapılara bası etkisi gibi çok sayıda etiolojik nedene bağlı olarak görülebilir ve uzun dönemde sinir hasarı kaynaklı ağrı, duyu kaybı, uyuşukluk gibi çeşitli semptomlara neden olabilir (Woolf CJ ve ark, 2009; Demiryürek Ş ve ark, 2002; Jensen TS ve ark, 2011; Treede RD ve ark, 2007; Gündüz Ö ve ark, 2014; Bridges D ve ark, 2014; O'Connor AB, 2009; Woolf CJ ve ark, 2009; Canpolat DG ve ark, 2018; Lin Q ve ark, 2011; Mashhoudi Barez M ve ark, 2017).

2.3. Travmatik Sinir Yaralanmaları

En sık görülen periferik nöropati travmatik sinir yaralanmalarıdır (Caillaud M ve ark, 2019). Ciddi fonksiyonel kayıplara ya da kalıcı sekellere neden olabilen travmatik periferik sinir hasarı; yüksek morbidite oranları nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur (Modrak M ve ark, 2020). Periferik sinir hasarlarının ve onunla ilişkili semptomların standart bir tedavisi yoktur, ancak önemli bir sağlık sorunu olması nedeniyle literatürde bu konuyla ilgili çok sayıda invaziv ve noninvaziv yöntem araştırılmıştır (O'Connor AB, 2009; Woolf CJ ve ark, 2009; Canpolat DG ve ark, 2018; Lin Q ve ark, 2011; Mashhoudi Barez M ve ark, 2017; Modrak M ve ark, 2020; Wiffen PJ ve ark, 2017; Alles ve ark,

2018; Sebben AD ve ark, 2011; Penna V ve ark, 2012; Lichtenfels M ve ark, 2013). Bu araştırmalar sonucu radyofrekans, fotobiyomodölasyon gibi alternatif tedavi uygulamalarının yanı sıra, son yıllarda kök hücre tedavisi uygulamalarının da sinir hasalarında tedavi edici ve rejenerasyonu artırıcı etkileri üzerinde durulmaktadır (Canpolat DG ve ark, 2018; Liu Y ve ark, 2020; Sayad-Fathi S., 2019; Sasso LL ve ark, 2020). Son yıllarda mTOR (MammalianTarget of Rapamisin) yolağının keşfedilmesi, birçok alanda olduğu gibi sinir hasarı tedavisinde de yeni bir farmakolojik seçenek olarak mTOR inhibitörlerini gündeme getirmiştir (Lisi L ve ark, 2015).

2.4. Siyatik Sinir

L4, L5, S1 ve S2 omurilik sinirlerinin ön ve arka dalları (divisions) ile S3 omurilik sinirinin ön dalları siyatik siniri oluşturur. Ön dallar siyatik sinirin tibial dalını oluştururken, arka dallar siyatik sinirin peroneal dalını oluşturmaktadır (Jung Kim H ve ark, 2014).

2.5. Siyatik Sinir Hasarı

Siyatik sinir hasarı travmatik olabilir. Tek taraflı travmatik akut sinir hasarı çoğunlukla enjeksiyon ilişkilidir. Çocuk nöroloji klinik pratiğinde siyatik sinir hasarı gluteal intramusküler enjeksiyonların en sık ve en ciddi komplikasyonu olarak karşımıza çıkmaktadır (Jung Kim H ve ark, 2014; Geyik S ve ark, 2017; Sitati FC ve ark, 2010; Kadioglu HH, 2018).

Bu sorunların etkin ve doğru tedavisi nörolojik sekel ve özürlülüğün dolayısı ile sağlık maliyetlerinin azaltılması için büyük bir önem arz etmektedir. Seddon ve Sunderland sınıflamaları hem hasarın tipini belirlemede hem de takip ve tedavi stratejilerini belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır (Seddon HJ, 1942; 1943; Sunderland S, 1951). Seddon sınıflamasına göre sinir yaralanmaları nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak 3 temel gruba ayrılmaktadır (Seddon HJ, 1942, 1943). Sunderland sınıflandırmasında ise sinir hasarları 5 evrede ele alınmaktadır (Sunderland S, 1951, 1991).

Evre I'de geri dönüşümlü ileti bloğu, Evre II'de Wallerian dejenerasyon ve reaktif fibrozis, Evre III'de nörolizis gözlenmektedir (Jung Kim H ve ark, 2014). Sinir hasarın evresine göre tedavi planlaması yapılır. Evre I'de konservatif tedavi yeterli olur, Evre II'de iyileşme

yavaş ve sıklıkla inkomplettir, Evre III'de nekroz ve fibrozis nedeniyle spontan iyileşme beklenmemektedir (Jung Kim H ve ark, 2014).

2.6. Siyatik Sinir Hasarında Tedavi Seçenekleri

Siyatik sinir hasarı olan bir olguda uyuşukluk, parestezi, ağrı veya diğer semptomlar varsa sinir hasarını azaltmak için subgluteal bölge serum fizyolojik solüsyon ile dilue edilebilir, ağrı kontrolü için gabapentin ya da trisiklik anti depresanlar sıklıkla kullanılabilir, fizyoterapi ve yardımcı cihazlar (motor fonksiyon kaybı ve atoni bulgularında rehabilitasyon için gereklidir) ve cerrahi başlıca tedavi seçenekleri arasında yer alır (Jung Kim H ve ark, 2014; Gilles FH ve Matson DD, 1970; Topuz K ve ark, 2011; Senes FM ve ark, 2009; Kim DH ve ark, 2004). Cerrahi tedavinin ne zaman yapılacağı, hangi olgularda tercih edileceği tartışmalı olsa da, Evre III ve üzeri hastalarda özellikle sekel oranları yüksek olan Evre IV ve V olgularda cerrahi tercih edilen bir yaklaşımdır (Dikmen PY, 2013). Literatürde genellikle injuri sonrası 3-6 aylık bir zaman periyodunda klinik veya elektromiyografik olarak tibial ya da preoneal sinirde total defisit ya da yetersiz düzelme gözlenen olgularda tercih edilmesi gerektiği belirtilmektedir (Jung Kim H ve ark, 2014). Senes ve arkadaşlarının (Senes FM ve ark, 2009) önerileri cerrahi girişimin injuri sonrası ilk 4 ay içinde yapılması gerektiği yönündedir. Ancak çok daha erken dönemde cerrahi yaklaşımı öneren çalışmalar da mevcuttur. Topuz ve arkadaşları (Topuz K ve ark, 2011) cerrahi eksplorasyonu siyatik sinir hasar bulgularının başlamasından 10-14 gün sonra klinik veya elektromiyografik incelemede spontan iyileşme göstermeyen hastalarda önermekte ve hatta klinik bulgular bir sinirin transeksiyonuna işaret ediyorsa, bu sinirin elektrofizyolojik bulgularını beklemeden eksplorasyon uygulanabileceğini belirtmektedirler. Klinik pratikte enjeksiyon ilişkili kapalı sinir yaralanmalarındaki pratik uygulama ile açık sinir yaralanmalarındaki uygulamalar bir birinden farklılık göstermektedir. Açık siyatik sinir yaralanması olan olgularda sinirde kesi varsa ilk 72 saat içinde cerrahi yaklaşım ile müdahale edilmesi gerektiği unutulmamalıdır (Kim DH ve ark, 2004).

2.7. Sinir Rejenerasyonu

Periferik ve santral sinir sistemindeki nöronların aksonal rejeneratif kapasiteleri birbirinden farklılıklar göstermektedir (Gilles FH ve Matson DD, 1970; Huang Z ve ark, 2017). Periferik sinir sistemindeki nöronlar santral sinir sistemi (SSS) nöronlarından farklı olarak,

hasar sonrası kayda değer rejeneratif kapasiteye sahiptir (Demiryürek Ş ve ark, 2002; Kahraman I ve ark, 2015). Periferik sinir onarım süreci hakkında bilgilerimiz sınırlıdır; sinir hasarının olduğu bölgede makrofajların aktive olması ile distalden başlamak üzere miyelin ve akson artıkları fagosite edilir, proksimal akson ucunda filizlenme ve aksonal rejenerasyon başlar bu süreçte Schwann hücreleri önemli rol oynayarak rejenere olan aksonlara yol gösteren Büngner bandlarını oluşturur, sonrasında filizlenen aksonların çevresinde miyelin kılıfları ve revaskülarizasyon sürecinde tamamlanarak sinir hasarının tamiri gerçekleştirilmiş olur (Caillaud M ve ark, 2019; Dikmen PY, 2013). Günümüzde bu aksonal rejeneratif kapasiteyi kontrol eden mekanizmalar ise tam olarak anlaşılamamıştır. Bu mekanizmaların tam olarak anlaşılması omurilik ve periferik sinir yaralanmaları da dahil olmak üzere travmatik sinir yaralanmalarına yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine, mortalite ve morbidite oranlarının azaltılmasına katkı sunacaktır (Huang Z ve ark, 2017).

Sinir rejenerasyonunda Schwann hücreleri, endonoryal fibroblastlar ve makrofajlar dahil olmak üzere hem hasarlı aksonal hücreler hem de nöronal olmayan hücreler önemli rol oynamaktadır (Caillaud M ve ark, 2019). Sinir büyüme faktörünün (NGF) salgılanmasını indükleyen interleukin (IL)-1, transforming büyüme faktörü (TGF)- β ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), cAMP, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), glial hücre hattı kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), büyümeyle ilişkili protein (GAP)-43 ve c-jun, jun-D, ATF3, Sox11 ve STAT3, MAPK, JNK, JAK, ERK, AKT ve p-38 dahil büyüme ile ilişkili proteinlerin ve kalsitonin gen ilişkili peptit (CGRP) gibi nöropeptitlerin üretimi, vazoaaktif intestinal peptid (VIP), P maddesi ve somatostatin sentezi artarken, nörofilament (NF) sentezi ve asetilkolin gibi nörotransmitterlerin salınımı baskılanır. Tüm bu faktörler rejenerasyonla ilişkili genleri (RAGs) aktive ederek GAP-43 ve BDNF'nin üretimini indüklemektedir (Allodi I ve ark., 2012; Caillaud M ve ark., 2019).

Bunlara ek olarak nörotrofik faktörler de hasar sonrası nöronlar üzerindeki etkileri ile rejenerasyon sürecinde rol alır. Örneğin nörotrofinler, filipodinin çekilmesinde ve itilmesinde merkezi bir rol oynar. Nörotrofin ailesi; NGF, BDNF ve NT-3 ve NT-4/5 nörotrofinlerini içermektedir. Bunlar arasında en dikkat çeken NGF'dir (Allodi I ve ark., 2012). Glial kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) TGFA-1 süper familyasına aittir ve duyusal, motor ve otonom nöronlar üzerinde trofik bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Allodi I ve ark., 2012). İnsülin benzeri büyüme faktörleri IGF-1 ve IGF-2, onarım ve rejenerasyon süreçlerinin endojen düzenlenmesi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Her iki

izoformunda, hasar bölgesine uygulandığında aksotomiden sonra sağ kalmanın yanı sıra motonöron gelişimini desteklediği rapor edilmiştir (Allodi I ve ark., 2012). Bir diğer önemli nörotropik faktör Neuregulinlerdir. NRG1 geninin alternatif ekleme/okumasının en az 16 farklı ürün verdiği vurgulanmakta ve bunlar içinde en çok çalışılanların nöü-farklılaşma faktörü (NDF), heregulin, asetilkolin reseptörü indükleyici aktivite (ARIA), glial büyüme faktör (GGF), heparin bağlayıcı nörotrofik faktör olarak da adlandırılan pleiotrofin (PTN), osteopontin (OPN), siliyer nörotrofik faktör (CNTF) olduğu belirtilmektedir (Allodi I ve ark., 2012). Hücre adezyon molekülleri (CAM'ler), hücre dışı matris molekülleri (ECM) rejenerasyon sürecinde önem arz eder (Allodi I ve ark., 2012). Periferik sinir rejenerasyonu sırasında ekstrasöral ve intrasöral vasküler yapılarının revaskülarizasyonunda bir diğer önemli basamaktır. Bu revaskülarizasyon, nöron sağkalımı ve Schwann hücre proliferasyonu süreçlerinde vasküler endotelial büyüme faktöründe (VEGF) etkili olduğu belirtilmektedir (Kim DH ve ark., 2004).

2.8. mTOR (MammalianTarget of Rapamisin) Yolu ve Sinir Rejenerasyonu

Aksonal yaralanma ile tetiklenen nöronal değişiklikler değerlendirildiğinde son yıllarda tarif edilen Januskinazlar (JAK)/sinyal transdüsörleri ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT) yolunun başka bir olası regülatörünün akson yenilenmesini teşvik eden mTOR olduğu belirtilmektedir (Allodi I ve ark., 2012). mTOR yolunun aktivasyonu, yaralanma sonrası periferik nöronların büyüme kapasitesi için de gereklidir. Spinal Rheb-mTOR yolunun da spinal kord düzeyinde sinir sensitizasyonun kontrolünde rol oynadığı gösterilmiştir (Ma X ve ark., 2020). Abe ve ark., (2010), mTOR aktivitesinin GAP-43 ekspresyonu ve aksonal büyümenin önemli bir bileşeni olduğunu, mTOR aktivasyonunun hasarlı periferik sinirlerin aksonal büyüme kapasitesini artırdığını ve aksonal rejenerasyonda önemli bir rol oynadığını, mTOR aktivitesinin seviyesi ile reinnervasyon ve fonksiyonel iyileşme arasında önemli bir ilişki olabileceğini vurgulamışlardır. mTOR aşırı ekspresyonu yaralanma sonrası GAP43 seviyelerini artırır, ancak mTOR'un kronik aşırı bir ekspresyonu hedef reinnervasyonun olumsuz yönde etkilenmesi ile sonuçlanabilir (Allodi I ve ark., 2012; Abe N ve ark., 2010). mTOR'un yukarı akış inhibitörü olan PTEN (fosfoinositid 3-kinaz (PI3-K)/Akt sinyalini inhibe eder) periferik nöronların rejenerasyon kapasitesinde önemli bir rol oynar, çünkü inhibisyonu mTOR aktivasyonundan bağımsız olarak akson büyümesini teşvik etmektedir (Abe N, 2010; Christie KJ, 2010). Rangaraju ve arkadaşları (Rangaraju S ve ark., 2010) bir makrolid antibiyotik olan rapamisinin

kültürlenmiş fare Schwann hücrelerinde, doz ve zamana bağlı olarak etkili bir şekilde otofajiyi indüklediğini ve PMP22 ilişkili demiyelinizan nöropatilerin tedavisinde rapamisinin ve diğer otofajiyi artırıcı bileşiklerin potansiyel olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Liu F ve ark. (Liu F ve ark., 2014) rapamisinin Schwann hücrelerinde sinir büyüme faktörlerinin salgılanmasını ve büyümeyle ilişkili protein 43 ekspresyonunu arttırdığını, bu nedenle rapamisinin periferik sinir rejenerasyon terapisinde potansiyel bir uygulamaya sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak periferik sinir sisteminde sinir rejenerasyonunun, hasarlanmış nöronların salgıladığı birçok intirinsik faktöre bağlı olduğu bilinmesine karşın, özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar rejenerasyon için mTOR (MammalianTarget of Rapamisin) yolu tarafından salgılanan proteinlerin kontrolünün de önemli olduğunu göstermiştir.

2.9. Rapamisin

Bir lipofilik makrolid antibiyotik olan rapamisinin mTOR yolu üzerine etkisiyle Schwann hücrelerinin myelinizasyonunu arttırdığı nöropatik Schwann hücre kültürlerinde gösterilmiştir (Christie KJ, 2010). Rapamisinin otofajiyi indükleyerek, otofagosomları artırdığı ve LC3-II ekspresyonu ile lezyon bölgesindeki apoptotik hücreleri azalttığı, sinir rejenerasyonunu artırdığı ve bunun sonucu olarakta motor fonksiyonu düzelttiği rapor edilmiştir (Huang HC ve ark., 2016). Nicks ve arkadaşları (Nicks J ve ark., 2014) periferik sinir hasarı verdikleri fareler üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında etken madde halinde üretici laboratuvarlardan temin ettikleri rapamisinin, etanol ile birlikte infüzyon çözelti haline getirilmiş formunu intraperitoneal yoldan 6 mg/kg dozunda uygulamışlar ve rapamisinin myelinizasyona katkısı olduğunu rapor etmişlerdir. Lu Z ve ark. (Lu Z ve ark., 2015) ise çalışmalarında 0.03 mg/kg dozun etkisiz olduğunu, 0.1, 0.3, 1.0 ve 3.0 mg/kg rapamisin dozların doza bağımlı olarak phospho-S6'yı inhibe etmede etkili olduğunu, 1.0 ve 3.0 mg/kg rapamisin dozlarının 4 haftalık izlem sürecinde-S6'yı inhibe etmede etkili olduğunu, ancak nispeten daha az yan etki ile mTOR'u baskılamak için genç sıçanlarda 1 mg/kg rapamisinin optimal doz olabileceğini rapor etmişlerdir. Literatürde; Hadamitzky ve ark. (Hadamitzky M ve ark., 2014) rapamisini intraperitoneal yoldan 3 mg/kg dozda, Liu S ve ark. ise Rapamisini intraperitoneal (İP) yoldan 2 mg/kg, 4 mg/kg ve 6 mg/kg dozunda kullanmışlardır (Liu S ve ark.,2017).

Rapamisinin lokal dozunun değerlendirildiği çalışma yok denecek kadar azdır. Lokal ve sistemik dozun karşılaştırıldığı çalışmalar ise literatürde oldukça sınırlıdır. Rapamisinin lokal kullandığı bir çalışmada Sun ve ark.(Sun Y ve ark., 2004) laminektomi uygulanan ratlarda 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml dozlarda rapamisini 1 ml olarak lokal uygulamışlar ve 0.2 mg/ml dozun sonuçlarının daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Schachner T ve ark. (Schachner T ve ark., 2004) alışmalarında şıanlarda lokal 100 µg ve 200 µg kullamışlar neointimal hiperplazi için lokal perivasküler uygulamanın terapötik potansiyeli olduğunu rapor etmişlerdir. Liu K ve ark. (Liu K ve ark., 2010) alışmalarında tavşan ven greft modelinde intraluminal rapamisin nanopartikül perfüzyon dozunu 100 µg/mL düşük doz, 500 µg/mL yüksek doz olarak kulladıklarını bildirmişler, sonuç olarak lokal uygulamanın etkili olduğu raporlamışlardır. Myckatyn TM ve ark (Myckatyn TM ve ark., 2002) deneysel çalışmalarında 2 mg/kg dozunda subkutan rapamisin uygulamışlardır. Zandstra J ve ark. (Zandstra J ve ark., 2015) renal iskemi-reperfüzyon hasarında lokal uygulamanın etkili olabileceğini vurgulamışlardır. Tyler ve ark. (Tyler B ve ark., 2011) deneysel glioma modelinde ratlarda 3 mg, 0.3 mg ve 0.03 mg lokal, 2 mg/kg doz İP sistemik rapamisin kullandıkları çalışmalarında lokal %30'luk (3 mg) doz uygulamasının da etkin olduğunu rapor etmişlerdir.

2.10. Lokal Rapamisin Uygulaması

Son yıllarda rejeneratif tıp alanında, doku mühendisliği ve farmasötik alandaki gelişmeler ilaçların lokal etkilerini artırarak sistemik yan etkileri azaltmak için ilaç yüklü scaffoldları ve nanopartikülleri de içeren tıbbi farmasötik ürünlerin bu alanda kullanımını beraberinde getirmiştir (Angius D ve ark., 2012; Lin MY ve ark., 2013; Gu X ve ark., 2014; Yi S ve ark., 2017; Yi S ve ark., 2019; Hosseinkhani M ve ark., 2014; Vijayavenkataraman S ve ark., 2020; Kuffler DP ve Foy C, 2020; Du J ve ark., 2018; Ye F ve ark., 2012; Braga Silva J ve ark., 2017; Amado S ve ark., 2010). Bu alışma kapsamında sistemik yan etkilerinden kaçınmak için, rapamisinin periferik sinir rejenerasyonunda lokal olarak farklı matrikslerde kullanılacak olması çalışmaya özgün bir değer katmaktadır.

Zou ve ark. (Zou J ve ark., 2011) ratlarda rapamisin yüklü nanopartikülerin deneysel ven greftlerinde neointimal hiperplazinin inhibisyonu üzerine etkilerini değerlendikleri çalışmalarında 50ug/ml konsantrasyonunda rapamisin kullanmışlar ve umut vaad eden bir tedavi seçeneği olabileceğini bildirmişlerdir. Costa BL ve ark.(Costa BL ve ark., 2018)

deneysel çalışmlarında, biyolojik olarak parçalanabilir sirolimus yüklü implantların kullanımının, uzun süreli anti-enflamatuar ve anti-anjiyojenik etkilere neden olduğunu ve kronik inflamasyonu olan hastalar için alternatif bir seçenek olabileceğini bildirmişlerdir. Bai J ve ark. (Bai J ve ark., 2020) ise çalışmlarında ratlarda intervertebral disk dejenerasyonunda lokal rapamisinin (Rapa@Gel) inflamasyonu azaltmada etkin olduğunu raporlamışlardır. Falke LL ve ark. (Falke LL ve ark., 2015) unilateral üreteral obstrüksiyon (UUO) oluşturulan ratlarda 2 mg rapamisin içeren rapamisin yüklü subkapsüler mikroküreleri kullanarak yaptıkları çalışmlarında, 7 gün UUO süresince sistemik olarak İP rapamisin verilen grupla karşılaştırmışlar ve lokal terapötik etkinliği nedeniyle sistemik yan etkileri azaltmak için subkapsüler mikrokürelerin umut verici bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

2.11. Scaffold

İyi bir scaffold yapısal destek ve şekil sağlar, hücre bağlanması ve büyümesi için yüzey sağlar, genellikle biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumludur. Hücre dışı matris yapı iskeletleri, uygun bir rejeneratif mikro ortam sağlar, dokuya özgü yeniden şekillenmeyi (remodeling) teşvik eder, deri, sinir, kemik, akciğer, kalp, karaciğer, böbrek, ince bağırsak ve diğer organların onarımı ve fonksiyonel yeniden inşası için indüktif bir şablon görevi görür (Aijie C ve ark., 2018; Yi S ve ark., 2017; Yi S ve ark., 2019; Hosseinkhani M ve ark., 2014; Suzuki A ve ark., 2020; Du J ve ark., 2018).

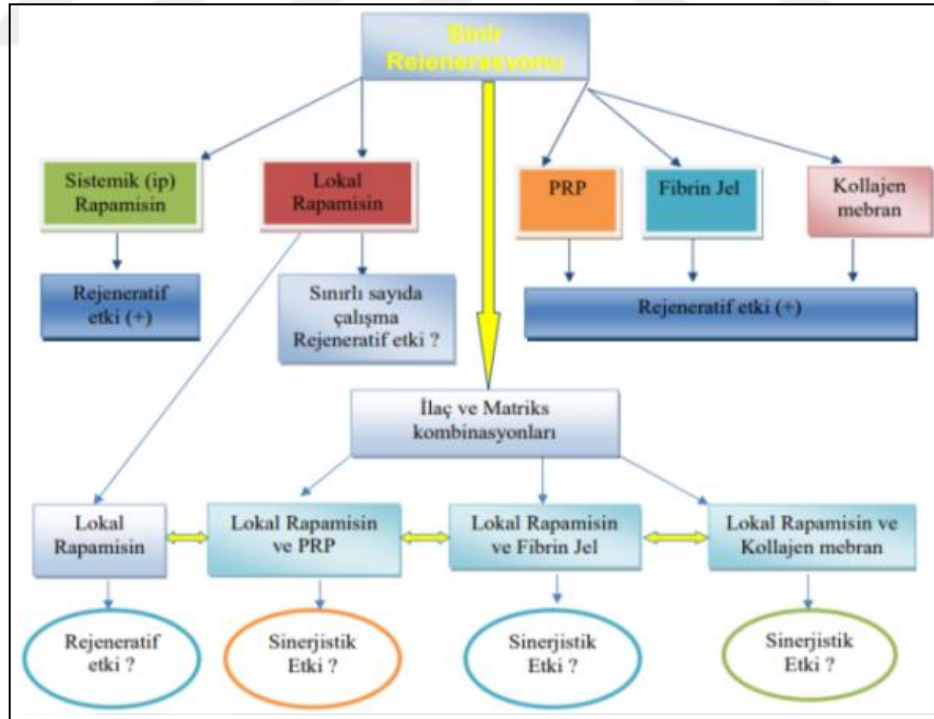
2.12. Fibrin Jel

Proenzim fibrinojen, çözünebilir bir plazma glikoproteinidir ve pıhtılaşma sürecinde çözünmeyen iplikçikler halinde bulunan fibrin proteinine dönüşmektedir. Bu süreç, pıhtılaşma basamağının kritik proteini olan fibrinojenin; trombin ve Ca^{2+} 'nin etkisi ile fibrin formunu alarak monomerler haline gelmesi ve sonrasında bu monomerlerin polimerize olarak fibrin yumağı oluşturması suretiyle kanda çözünmeyen bir pıhtı oluşturmasıyla gerçekleşir. Patolojik süreçlerdeki rolü ve hemostazın sağlanmasındaki görevi yanında fibrinin ilaç taşıyıcısı olarak kullanımına yönelik uygulamalar ve araştırmalar son yıllarda artarak devam etmektedir. Bu kapsamda, fibrinin; sinir büyüme faktörü (Bhang ve ark., 2007) gibi büyüme faktörleri, sefazolin (Tredwell ve ark., 2006), vankomisin, teikoplanin gibi antibiyotikler için (Marone ve ark., 1999; Kram ve ark., 1991) ve kemik morfogenetik proteini gibi ajanlar için bir ilaç taşıyıcısı olabileceği

yönünde çalışmalar vardır. Ayrıca, fibrin polimerinin tek başına kullanıldığı çalışmalardan farklı olarak, doğal ya da sentetik malzemelerle kombine formülasyonları geliştirilerek fizyolojik ortamda hücrelere bir iskele ortamı sağlayıp sinir, kemik, kalp, kıkırdak, karaciğer ve deri gibi farklı dokuların yenilenmesinde ve/veya tedavisinde kullanılarak etkili sonuçlar elde edilebilir (Lai ve ark., 2012; Kuehn ve ark., 2014; Brougham ve ark., 2015). Literatürde, fibrin liflerin travmatik periferik sinir yaralanmalarının tedavisine yönelik olarak aksonal gelişimde iskele olarak kullanımının faydalı ve akılcı bir yaklaşım olabileceği de bildirilmektedir (Gessmann ve ark., 2016). Fibrin jel bileşiminde bulunan bileşenleri (fibrinojen, trombin, aprotinin, CaCl₂) ayrı flakonlar halinde ve standardize olarak bulunduran piyasa müstahzarları mevcut olup klinik anlamda da bahsi geçen etkilerinden dolayı kullanılabilir. Ayrıca, fibrin jelin ilaçlar için bir taşıyıcı sistem olarak araştırıldığı çalışmalarda, jel içerisinde disperse/çözülmüş haldeki ilacın salımının jelden difüzyon sürecine bağlı olması nedeniyle uzadığı ve yavaşladığı da gösterilmiş olup uygulama bölgesinde daha uzun süre kalabilmesi amaçlanan terapötikler için kontrollü/yavaş salım sağlanabilmesine imkan verdiği de bilinmektedir. Bu kapsamda siprofloksasin, teikoplanin, sefoksitin ve gentamisin gibi antibiyotiklerle gerçekleştirilmiş bir çalışmada jelden ilaç salımının 5-7 güne kadar uzatılabildiği bildirilmektedir (Kram HB ve ark., 1991).

Klinik pratik anlamında değerlendirildiğinde ise fibrin jellerin uygulanmasında herhangi bir invazif operasyonun her zaman zorunlu olmayışı ve enjeksiyonla da istenilen bölgeye kolaylıkla implante edilebiliyor oluşu ve fibrin jel dolgu maddesinin fizyolojik olarak biyouyumlu ve biyoparçalanır özellikte olması ise ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabilirliği noktasında önemli avantajlar sağlamaktadır (Tredwell ve ark., 2006). Günümüzde, fibrinin klinik olarak en yaygın kullanımı cerrahi işlemlerde kullanılan topikal hemostatik fibrin kapatıcılardır ve söz konusu preparatlar Avrupa ve Japonya'da uzun yıllardır onaylı olmakla birlikte FDA tarafından da insan kullanımı için de onaylanmıştır (Bhang ve ark., 2007; Tredwell ve ark., 2006). Fibrin jel yapıştırıcılar klinik olarak yara kapatıcı amaçla kullanımlarının yanında büyüme faktörleri için rezervuar olarak da kullanılabilir. Ayrıca biyolojik implantların yapısına girmektedir. Öte yandan pek çok çalışmada fibrin jellerin periferik sinirlerin onarımı ve yeniden büyümesini sağlayabildiği gösterilmiş olup bu bulgular ışığında da fibrin jel yapıştırıcılardan sinir onarımında bir ilaç taşıyıcı sistem olarak da faydalanılabilmesi ile gerek fibrin jelin iskele etkisinden gerekse jel içinde ilacın

taşındığı bir formülasyon geliştirilmesi ile de sinerjistik bir etki elde edilebileceği düşünülmektedir (Nakayama ve ark., 2007). Fibrin'in *in vivo* ve *in vitro* olarak insan fetal pankreas hücrelerinin farklılaşması üzerine etkileri araştırılmış ve sonuçlarına göre fibrin ile kültürü yapılan pankreas hücrelerinde mTOR yolağının, bu hücrelerin proliferasyonunda ve farklılaşmasında pozitif bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte fibrin jel ortamına rapamisin eklendiğinde bu hücrelerde siklin D1 ve Ki67 azalmaları gözlenerek pankreas hücrelerinde proliferasyonun azaldığı tespit edilmiştir (Riopel ve ark., 2015). Ancak pankreas hücreleri endodermden köken alırken, sinir hücreleri ise ektodermden köken almaktadır. Rapamisinin sinir rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkisi bilinmesine rağmen, lokal uygulanan fibrin jel ve rapamisin kombinasyonunun sinir rejenerasyonu üzerinde sinerjistik etkisi olup olmadığını araştıran bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu çalışma, lokal uygulanacak fibrin jel ve bir mTOR inhibitörü olan rapamisin kombinasyonunun sinir rejenerasyonu üzerinde sinerjistik etkisi olup olmadığını hem elektrofizyolojik hem de histolojik olarak araştırarak ve literatüre bu konu hakkında bilgi sunacak olması bakımından özgün değer taşımaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Sinir rejenerasyonunda rapamisin ve doku matrislerinin etkisi.

2.13. Kollajen Membranlar

Sinir hasarında primer tedavi biçimi ‘cerrahi onarım’ olarak bildirilmiş olsa da, bu yöntem sinir defektinin kısa olması halinde başarılı olmakta, uzun ve büyük defekt durumlarında etkisiz kalabilmektedir. Burada gold standard tedavi; otolog sinir grefti implantasyonudur. Ancak, yara yeri enfeksiyonu, hematoma gibi komplikasyonlar bu tedaviyi sınırlandırabilmektedir (Deumens R ve ark., 2010). Otolog sinir greftine alternatif olarak, çeşitli sentetik ve biyolojik materyaller üretilmiş ve sinir defektlerini kapatmak üzere kullanılmıştır (Deumens R ve ark., 2010, Berger JV ve ark., 2011, Rbia N ve ark., 2019; Gao YB ve ark., 2021; Yoo J ve ark., 2019; Fertala J ve ark., 2020; Li G ve ark., 2020; Burks SS ve ark., 2021). Bozkurt ve ark. (Bozkurt ve ark., 2012), kollajen temelli biyomateryalin siyatik sinir onarımında faydalı olduğunu bildirmişlerdir. VanNeerven SGA ve arkadaşları da (vanNeerven SGA ve ark., 2016) sinir hasarında kullanılan kollajen membranın umut vaat edici olduğunu bildirmişlerdir. Kollajen membranlar pek çok tipte olmasına karşın, genellikle doğal ve sentetik olarak ikiye ayrılırlar. Doğal olanlar hayvan kollajeninden elde edilirken, sentetik olanlar poliglikolikasit ve polilaktikasitten elde edilmektedir. Sentetik materyaller hidroliz yoluyla absorbe olurken, kollajen membranlar enzimatik aktivitelerle rezorbe olmaktadır (McAllister BS ve ark., 2007; Owens KW ve ark., 2001; Haggerty CJ ve ark., 2015). Absorbe olan membranların en büyük avantajı ikinci bir cerrahiye gerek kalmamasıdır. Son yıllarda kollajen membranlar adezyon oluşumunu engellemesi, kullanıldığı dokuya geçici destek sağlayarak iyileşme sürecini hızlandırması gibi özellikleri sayesinde rejeneratif tıp uygulamalarında tendon tamiri, sinir rejenerasyonu, dura tamiri, spinal kord hasarı ve nöroliz gibi çok sayıda alanda kullanılmaktadır (Cholas RH ve ark., 2012; Owens KW ve ark., 2001; Haggerty CJ ve ark., 2015; Tordjman D ve ark., 2012; Alluin O ve ark., 2009; Pertici V ve ark., 2014; LeHuec JC ve ark., 2015; Nicot C ve ark., 2021; Dimitriou R ve ark., 2012; Choi S ve ark., 2013). Farklı kollajen membran tipleri mevcuttur; örneğin CovaTM Tip1 kollajen içerir ve ürünün katalogunda da belirtildiği üzere; “Şekil verilebilir ve %100 oranında emilebilir bir yapıya sahip olup; şeffaf, hücresiz, kollajen içeriğiyle kemik, kırıldak oluşumuna katkı sağlayan bir zardır. Duranın minimal defeklerinde duramater olarak kullanılabilir. Suture atılabilir özelliği sayesinde, istenilen bölgeye kolayca implante edilebilmektedir. Ayrıca, kollajen membran ürün kullanım endikasyonları arasında nörolizler de (karpal tünel sendromu onarımı ve ulnar dirsekteki nörolizler) mevcuttur (BIOM UP | COVA – Kollajen Membran

| Gelişim Medikal (gelisimmedikal.com))” (LeHuec JC ve ark., 2015; Nicot C ve ark., 2021; Dimitriou R ve ark., 2012).

Kollajen membranın sinir rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkisi bilinmesine rağmen, kollajen membranın rapamisinle kombinasyon halinde kullanıldığında sinir rejenerasyonu üzerinde sinerjistik etkisi olup olmadığını araştıran bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu proje, kollajen membran ve rapamisin kombinasyonunun sinir rejenerasyonu üzerinde sinerjistik etkisi olup olmadığını hem elektrofizyolojik olarak hem de histolojik olarak değerlendirecek ve literatüre bu konu hakkında bilgi kazandıracak olması bakımından da özgündür (Şekil 2.1).

2.14. Plateletten Zengin Plazma (PRP)

Trombositten zengin plazma (Plateletten zengin plazma/ Platelet Rich Plasma, PRP) gibi platelet konsantreleri, yüksek konsantrasyonda büyüme faktörü içermesinden dolayı doku rejenerasyonunda başarıyla kullanılmıştır (Kuffler DP,2013; Sánchez M ve ark., 2017; Küçük L ve ark., 2014; Roque JS ve ark., 2017; Bastami, Farshid DDS ve ark., 2017, Salarinia R ve ark., 2017; Lichtenfels M ve ark., 2013; Zhu Y ve ark., 2020; Salarinia R ve ark., 2017; Yıldız C ve Özgürtaş T, 2017). Aktive olmuş trombositlerden salınan yüksek kalitedeki büyüme faktörleri, PDGF, TGF- β 1, epidermal büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörleri gibi, hücrel çoğalmayı ve farklılaşmayı destekleyerek kemotaksis ve anjiyogenez sağlayarak yara iyileşmesi sürecini optimize eder (Weibrich G, 20102; Marx RE, 2001). Lichtenfels M ve ark. (Lichtenfels M ve ark., 2013) ratlarda siyatik sinir hasarı modelinde PRP ve PRF (Platelet Zengin Fibrin)’yi lokal olarak uygulamışlar ve otolog sinir transplantasyonu grubuna göre histolojik farklılıklar gözlemlediklerini ancak sinirde belirgin fonksiyonel iyileşme tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Sarıgüney ve ark (Sariguney Y ve ark., 2008) PRP uygulamasının siyatik sinir hasarında rejenerasyona neden olduğunu rapor etmişlerdir. PRP, tam kanın santrifüj edilmesiyle elde edilir, yüksek plazma konsantrasyonu yanında koagülasyon faktörleri ve sekretuar proteinler de içerir. Trombositler kemik iliğindeki megakaryositlerin ürünü olup, içerdiği alfa-granüller doku iyileşmesinde rol oynayan biyoaktif proteinleri salarlar (VEGF, PDGF, platelet kaynaklı büyüme faktörü vb.). PRP içerisindeki bu biyoaktif maddeler fibroblast, endotel ve kök hücrelerin proliferasyonuna ve aktivasyonuna neden olurlar (Marx RE, 2001; Harrison P ve Cramer EM, 1993). PRP’nin avantajı ameliyat

odasında hazırlanabilmesi ve kolayca uygulanabilmesidir. PRP ve fibrin iskeleti sinir hasarında sadece nöroprotektif, nörojenik ve nöromodulator ilaç salınım sistemi olarak görev almakla kalmayıp, aynı zamanda sinirlerde motor ve duyu fonksiyonları iyileştiren bir terapatik potansiyele sahiptir (Giannessi E ve ark., 2014; Zheng C ve ark., 2016). Rapamisinin sinir rejenerasyonu ile ilgili olumlu etkileri yukarıda tartışılmıştır. Ancak literatür incelendiğinde rapamisin ve PRP'nin birlikte kullanıldığında sinir hücreleri ve rejenerasyonu üzerinde sinerjistik etkisinin olup olmadığını değerlendirildiği bir çalışmaya ve literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu bilgi eksikliğinin ilk defa bu çalışma sonuçları ile kapatılacak olması da çalışmamıza ayrı bir özgün değer katmaktadır (Şekil-1).

Periferik sinirler, santral sinir sisteminden ayrıldıktan sonra vücutta oldukça uzun bir yol katlederler ve adeta bir örümcek ağı gibi tüm vücudu sararlar. Bu yol boyunca herhangi bir seviyede, gerek tıbbi müdahaleler gerekse dışardan travmalar nedeniyle periferik sinir hasarı ortaya çıkabilir. Periferik sinir hasarları travmanın derecesine göre hafiften ağıra pek çok komplikasyona neden olabilir. Sinir sisteminde rejenerasyon ve hücre yenilenmesi başka bir ifadeyle “doku iyileşmesi” oldukça sınırlıdır. Spontan iyileşmenin çok kısıtlı olduğu sinirlerdeki hasar giderilmediği takdirde, kalıcı sinir hasarına bağlı; sinir bölgesinde uyuşukluk, karıncalanma, motor kayıp ve ağrı gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu komplikasyonlarla baş edilmesi bazen çok zor ya da imkansız olabilmektedir. Tedavide başarının anahtarı olabildiğince erken müdahaledir. Bu nedenle acil tedavide kullanılmak üzere yeni tedavi metodlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada hipotez oluştururken; sinir hasarından hemen sonra rapamisinin lokal olarak hasarlı bölgeye uygulanmasının pratik ve faydalı bir yöntem olacağı, farklı doku matrisleri içerisinde kullanılarak hasarlı bölgede daha uzun kalabileceği ve bu sayede etkinliğinin artabileceği düşünülmüştür (Şekil 2.1). Literatür incelendiğinde sinir hasarı bölgesine lokal olarak uygulanan rapamisinin sinir rejenerasyonundaki etkinliğinin değerlendirildiği sınırlı sayıda araştırmanın mevcut olduğu görülmüştür. Bu kapsamdaki çalışmalardan birinde, Ding ve ark. (Ding T ve ark., 2015) Rapamisin yüklü Poli-laktik-ko-glikolik asit (RAPA-PLGA) mikroküreleri ile yavaş salım gösteren bir ilaç taşıyıcı sistem hazırlamışlar ve ilaç yüklü mikroküreleri kitosan bazlı bir doku iskelesi içinde disperse ederek akut periferik sinir hasarındaki etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda, biyonik bir tutucu olarak etki gösteren RAPA-PLGA mikrokürelerinin erken faz siyatik sinir rejenerasyonunda, rapamisinin çözelti formunda kitosan iskele yapısıyla uygulanması veya yalnızca kitosan

bazlı iskele yapısının uygulanması durumlarına kıyasla anlamlı derecede faydalı olduğunu ve RAPA-PLGA uygulanan grupta sekonder sinir hasarını azalttığını göstermişlerdir. Ding ve ark.'nın çalışmasında PLGA mikrokürelerinin içerisinde 2mg rapamisin olacak şekilde formülasyon oluşturulmuştur (Ding T ve ark., 2014; Ding T ve ark., 2015). Bu projede Ding ve ark.'dan (Ding T ve ark., 2015) çalışmasından farklı olarak, hasarlı sinir bölgesinde lokal etki göstermesi amacıyla primer hasar bölgesine PLGA'dan farklı iskele matriksleri içerisinde lokal olarak uygulanan rapamisinin etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, sinir hasarı tedavisinde umut vaad eden bir terapötik olarak gerek literatür çalışmalarında bahsedilen gerekse çalışma grubumuz tarafından gerçekleştirilen, rapamisinin sistemik uygulandığı, daha önceki projelerimizin bulguları ışığında, bu çalışma kapsamında rapamisinin lokal olarak uygulandığında sinir rejenerasyonu üzerindeki etkinliğinin daha detaylı incelenmesi ve uygulanacak rapamisinin farklı scaffold formülasyon ve kombinasyon yaklaşımları ile etkinliğinin arttırılabileceği, olası sistemik yan etkilerinin azaltılabileceği hipotezinden hareketle; sinir hasarı bölgesinde lokal olarak; saf çözeltisi halinde, yavaş ve uzun salım sağlayabilecek ve etki bölgesinde fiziksel olarak daha uzun süre kalabilecek bir fibrin jel yapıştırıcı formülasyonu içerisinde, otolog olarak bileşiminde bulundurduğu büyüme faktörleri ve kan bileşenleri ile hücre hasarı tedavisinde etkili bir yaklaşım sunabilen trombosit zengin plazma (plateletten zengin plazma-PRP) içerisinde ve kollajen membran taşıyıcısı ile birlikte uygulanmasının ve bahsi geçen tedavi yaklaşımlarının etkinliğinin karşılaştırmalı olarak araştırılması planlanmıştır (Canpolat M ve ark, 2022).

Literatürde de belirtildiği üzere sinir hasarı tedavisinde etkinliği irdelenmiş ve anlamlı sonuçlar bulunmuş olan rapamisin için çalışmamız kapsamında irdelenmesi gereken önemli husus ve özgün değer; hasarlı bölgeye uygulanan rapamisinin içerisinde bulunduğu taşıyıcı/matriks sistemlerinin etkinlik üzerinde saf çözelti formuna göre daha olumlu sonuçlar sunabileceği sorusunun kısaca sinerjistik bir etki gösterip göstermediğinin cevabını aramaktır (Şekil 2.1). Nöroloji, anestezi ve farmakoloji alanlarında uygulamalarının bir arada yürütüleceği çok disiplinli bu özgün proje sayesinde, bilime katkı sunulması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 03.02.2021 tarihli ve 21/26 nolu onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmaya, ortalama ağırlıkları 200-250 gram olan 90 adet deney yapılacak hayvan ve 10 adet kontrol grubu hayvan olmak üzere 100 adet, aynı cins dişi, Wistar Albino türünde sıçan dahil edildi. Çalışmamız temel olarak iki aşamalı şeklinde yürütüldü. Birinci aşama Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde ilaç formülasyonlarının hazırlanması ile gerçekleştirildi. Çalışmanın ikinci aşamasında deneysel hasar modeli oluşturularak hazırlanmış formülasyonlar *in-vivo* rat modelinde geliştirilen siyatik sinir hasarı bölgesine lokal olarak uygulandı. Çalışmanın bir sonraki aşamasında elektrofizyolojik değerlendirmeler, son aşamasında histopatolojik analizler yapıldı. Çalışmanın ikinci aşaması Erciyes Üniversitesi "Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi - DEKAM"’inde yürütüldü. Çalışmanın histopatolojik analizler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda gerçekleştirildi.

3.1. Birinci Aşama: İlaç Formülasyonlarının Hazırlanması

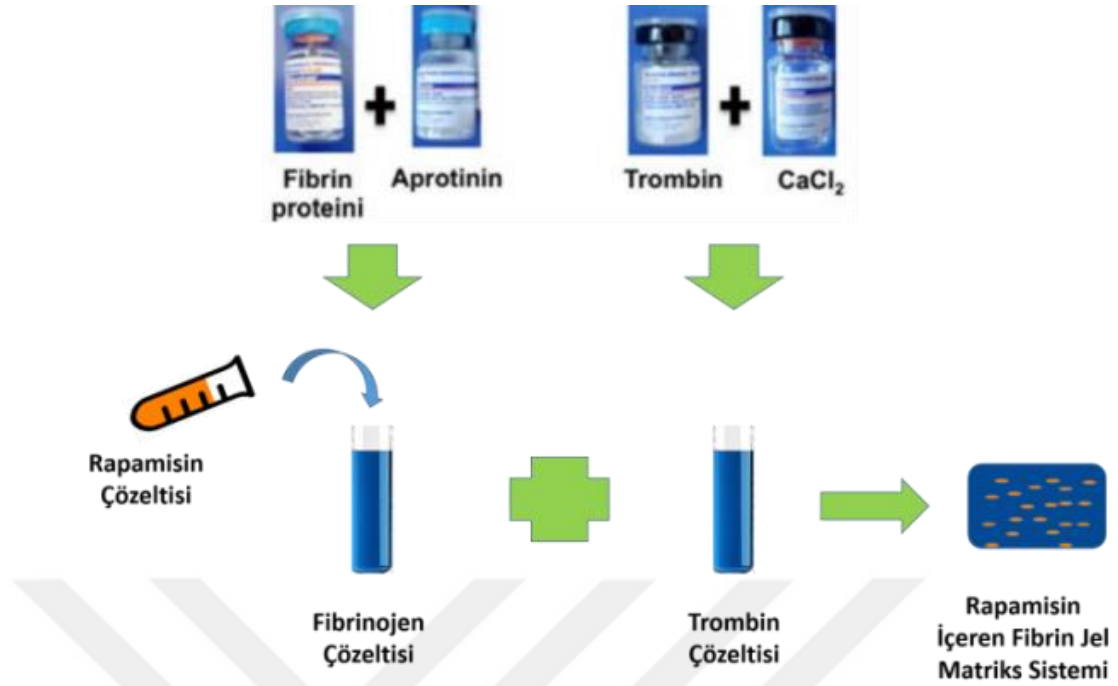
3.1.1. Rapamisin çözeltisinin hazırlanması

Rapamisinin lokal kullanıma hazır hale getirilmesi için yine önceki projemizden (Canpolat M ve ark, 2022) yola çıkarak, gerekli miktar rapamisinin çözelti formunda hazırlanabilmesi için her bir rata uygulama için gerekli rapamisin miktarının (3 mg/kg) hesaplanması ardından ilgili miktar rapamisin çözünürlük değerleri de dikkate alınarak minimum miktar DMSO (Dimetil Sulfoksit) ile çözüldü ardından gerekli uygulama hacmine serum fizyolojik ile seyreltilmek suretiyle uygulamaya hazır hale getirildi. Rapamisinin DMSO’da 200 mg/mL (Simamora ve ark, 2001) çözünürlük gösterdiği bilinmektedir, bu anlamda uygulanacak rapamisinin çözeltisinin hazırlanabilmesi amacıyla kullanılacak DMSO miktarı minimize edilerek (%1-%2) son uygulamada serum fizyolojik

ile seyreltilmiş DMSO'nun muhtemel toksisitesi de minimize edilerek güvenli oranda uygulandı. Deney hayvanlarına uygulanacak bütün ilaç ve formülasyonları aseptik koşullar altında proje ekibinde yer alan formülasyon uzmanı farmasötik teknoloji tarafından (**Ünal S**) hazırlandı.

3.1.2. Rapamisin içeren fibrin jel formülasyonu hazırlanması

Sinir hasarı bölgesine ilaç uygulamak amacıyla planladığımız ilaç taşıyıcısı jel matriks sistemi olarak ticari bir müstahzar şeklinde bulunabilen TISSEEL Lyo (2 ml trombin çözeltisi ve 2ml fibrinojen çözeltisi içeren iki bileşenli fibrin yapıştırıcı, Baxter) fibrin jel yapıştırıcı kitten faydalanıldı. Fibrin jel kitler; içerisinde ayrı ayrı flakonlar halinde; insan fibrinojeni, aprotinin, insan trombini ve CaCl_2 ihtiva eden preparatlardır. Literatürde ilaç taşıyıcısı olarak kullanılan fibrin jel sistemlerden ilaç salımının jelin çapraz bağlanma yoğunluğu, fibrin miktarı, fibrinojen miktarı ve trombin miktarı parametrelerinden etkilendiği belirtilmektedir (Bhang ve ark, 2007; Jeon ve ark, 2006). Çalışmamız kapsamında uygulama bölgesine implante edilebilir bir fibrin jel sistem içerisinde bırakılması planlanan rapamisin için fibrin jel kit (TISSEEL Lyo (2 ml trombin çözeltisi ve 2ml fibrinojen çözeltisi içeren iki bileşenli fibrin yapıştırıcı, Baxter)) kullanılarak implante edilebilir jel formunda bir ilaç taşıyıcı sistem haline getirildi (Şekil 3.1). Bu uygulama ile rapamisinin fiziksel olarak hasar bölgesinde fibrin jel yapıştırıcı sistem içinde uzun süre kalabilmesi ve etki bölgesinde ilacın salımını yavaşlatmasına imkân verecek şekilde implante edilmesi sağlandı. Fibrin jel sistemin fiziksel özelliklerine ilişkin optimum bileşen miktar ve hazırlama prosedürüne ilişkin olarak kit içeriğinde bulunan talimat dikkate alındı. Genel yöntem olarak rapamisin taşıyan fibrin jel yapıştırıcı matriks sistem Şekil 3.1'de şematize edildiği şekilde hazırlandı (Karabey-Akyürek ve ark, 2017).



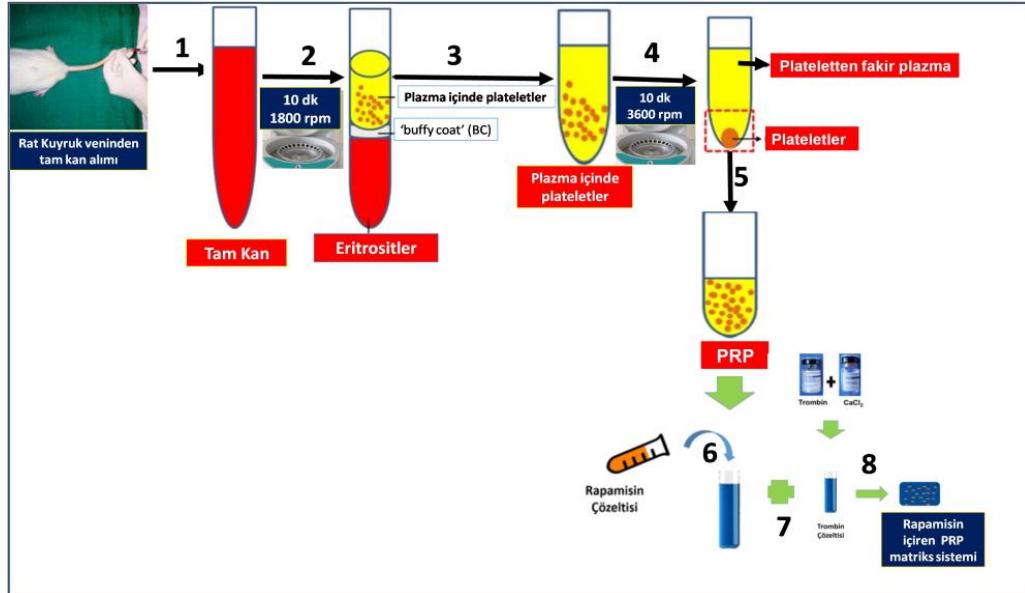
Şekil 3.1. Rapamisin içeren fibrin jel hazırlanması ana hatlarıyla özetlenmiştir.

Yöntemsel sürecin tamamlanmasının ardından hazırlanmış olan tek dozluk rapamisin içeren fibrin jel sistemi sinir hasarı bölgesine uygulanarak cerrahi saha kapatıldı. Uygulama sonrasında daha viskoz bir jel formunda kalarak matriksin içeriğinde taşıdığı rapamisinin etki bölgesinde lokalize olarak bulunmasını sağlaması hedeflendi. Aynı zamanda jel sisteminin sinir hasarı bölgesinde matriks içeriğinde bulundurduğu rapamisini etki bölgesine salabilmesi yanında, fibrin jel yapıştırıcı sistemin hasarlı sinir bölgesinde başlı başına bir iskele yapısı oluşturarak tedavi sürecinde olumlu bir sinerjistik etki gösterebileceği de değerlendirildi. Bu amaçla deneysel gruplarda ilaç içeren ve içermeyen ilaç taşıyıcı matriks formülasyonlar ayrı ayrı uygulandı, gerek ilaç etkisi gerekse ilaç taşıyıcı matriksin olası etkilerinin daha gerçekçi ve sistematik olarak değerlendirilmesi sağlandı.

3.1.3. PRP'nin eldesi ve kullanımı

PRP eldesi iki aşamada gerçekleştirildi (Lichtenfels M ve ark, 2013; Dohan Ehrenfest DM ve ark, 2009; Knezevic NN ve ark, 2016). Önce tam kan santrifüj edilerek plazma ve eritrositler ayrıldı. Sonra, plazma tekrar santrifüj edilerek plateletten fakir kısım ayrılarak PRP elde edildi (Shashikiran N ve ark, 2006; Bhanot S ve Alex JC ve ark, 2002; Okuda K ve ark, 2003; Mohan SP ve ark, 2019; Knezevic NN ve ark, 2016; Dohan Ehrenfest DM ve

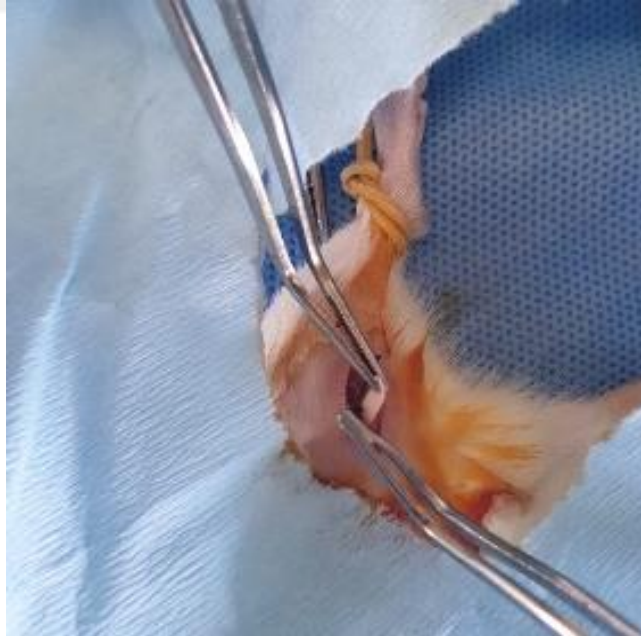
ark, 2009). PRP uygulanacak her rat için kendisinde kullanılmak üzere, anestezi altındaki ratların kuyruk veninden 2 ml otolog kan örneği alınarak sodyum sitrat içeren tüplere yerleştirilip 10 dk 1800 rpm. ile santrifüj edildi (Lichtenfels M ve ark, 2013; Mohan SP ve ark, 2019; Küçük M ve ark, 2017). Böylece, en altta eritrosit, ortada platelet ve lökosit, üst kısımda ise plateletten fakir plazma kısmı katmanları oluştu. Eritrosit (RBC) fraksiyonu atıldıktan sonra, kalan kısım 10 dk. 3600 rpm. ile santrifüj edildi ve böylece plateletten fakir plazma kısmı ve eritrositlerden de arındırılarak yaklaşık 0.5 ml PRP elde edildi (Lichtenfels M ve ark, 2013, Okuda K ve ark, 2003). Plateletten fakir plazma kısmı da ekarte edilerek elde edilen PRP enjektör yardımı ile tüp içerisinden dikkatli bir şekilde alındı ve PRP'yi etkinleştirmek için kalsiyum klorür ve trombin eklendi (kalsiyum klorür, sitratın antikoagülan etkisini nötralize eder ve trombin pıhtılaşma sürecini başlatır) ve aktive edilen PRP sinir hasarı bölgesine uygulanarak cerrahi saha kapatıldı (Lichtenfels M ve ark, 2013, Okuda K ve ark, 2003; Roque JS ve ark, 2017; Liu F ve ark, 2019). Rapamisin+PRP grubunda ise gerekli konsantrasyonda rapamisin içeren ilaç çözeltisi proje ekibinde yer alan formülasyon uzmanı farmasötik teknolog tarafından (Ünal S) hazırlandı ve elde edilen PRP uygun dozda rapamisin (3mg/kg) solüsyonu ile karıştırıldı ve bu kombinasyon hasarlı sinir bölgesine uygulanarak cerrahi saha kapatıldı. Şekil 3.2.'de PRP eldesi özetlenmiştir (Liu F ve ark, 2019).



Şekil 3.2. Rat tam kanından trombositten zengin plazma (Platelet Rich Plasma, PRP) eldesi (Liu F ve ark, 2019).

3.1.4. Kollajen membran kullanımı

Çalışmada absorbe olabilen sentetik kollajen membran (TUTOPATCH®) kullanıldı. Absorbe olabilen membranlar kollagen, polilaktik asit, amniyotik membran, perikardiyal membran ve dura membran gibi çok sayıda tipi vardır (Cholas RH ve ark, 2012; Owens KW ve ark, 2001; Haggerty CJ ve ark, 2015; Tordjman D ve ark, 2012; Alluin O ve ark, 2009; Pertici V ve ark, 2014; Çolpak HA ve ark., 2019). Sinir hasarından hemen sonra, 3 mg/kg rapamisin emdirilmiş halindeki kollajen membran hasarlı sinir bölgesine uygulandı (Şekil 3.3). Rapamisin emdirilmiş formu hazır ticari preparat şeklinde mevcut olmayıp proje ekibinde yer alan formülasyon uzmanı farmasötik teknolog tarafından hazırlandı. Bu amaçla gerekli konsantrasyonda rapamisin içeren ilaç çözeltisi hazırlandı ve çözelti hazır olarak temin edilen ticari kollajen membrana her bir deney hayvanı için ayrı ayrı olacak şekilde yerleştirildi. İlaç çözeltisinin kollajen membrana tatbik edilmesi süreci tamamlandıktan sonra rapamisin emdirilmiş kollajen membran formülasyonları deneysel olarak kullanılmaya hazır hale geldi. Hazırlanmış olan rapamisin+kollajen membran formülasyonu hasarlı sinir bölgesine sarıldı, hemen ardından cerrahi saha kapatıldı.



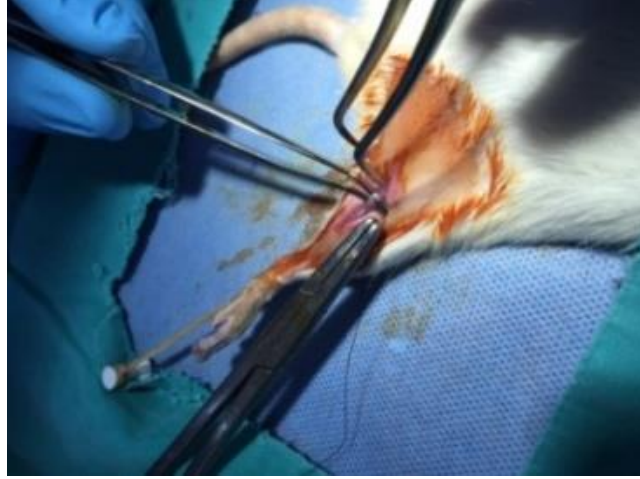
Şekil 3.3. Kollajen membranın sinir hasarı bölgesine uygulanışı

3.2. İkinci Aşama: Sinir Hasarı Oluşturulması ve İlaç Formülasyonlarının İn Vivo Uygulanması

3.2.1. Sinir hasarı modelinin oluşturulması

Literatür taraması sonucunda; çalışmalardan kullanılan hayvan modelleri temel alınarak bu çalışmada ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, Wistar Albino türü, aynı cins (dişi) yaklaşık 12 haftalık sıçanlar kullanıldı. Literatür incelendiğinde sinir hasarı modeli oluşturmak için çeşitli yöntemler kullanıldığı görülmektedir (Seltzer ve ark, 1990; Gündüz ve ark, 2014). İnsan vücudunun en kalın siniri siyatik siniridir. Sıçan siyatik sinirinde insandaki lezyonların benzerleri kolaylıkla oluşturulabildiği için deneysel periferik sinir hasar modellerinde ve rejenerasyon çalışmalarında en sık kullanılan sinirdir (Akakin D ve ark, 2014). Yapıları sayısal olarak tanımlamayı sağlayan akson çapı ve akson sayımı gibi morfolometrik veriler, büyüme, yaşlanma, rejenerasyon, nörotoksisite ile diyabet ve hipertansiyon gibi çeşitli patolojik durumların değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Akalin D ve ark, 2014; Zimmerman IR ve ark, 1980; Urso-Baiarda F ve ark, 2006; Karşıdağ S ve ark, 2008). Bu nedenle projede siyatik sinir modeli kullanılmasına karar verilmiştir.

Sıçanlar 60 mg/kg intramusküler Ketamin (Ketalar 50 mg/ml, Pfizer Inc, New York, USA) ve 10 mg/kg, Xylazine (Rompun 23.32 mg/ml; Bayer, İlaç San AŞ, İstanbul, Türkiye) ile uyutuldu. Cilt sterilizasyonu amacıyla, ratların sol siyatik sinir dermatom bölgeleri makineyle traşlanarak, povidoniodinle temizlendi. Cerrahi alan steril örtülerle kapatıldı, sol siyatik bölgede subkütan 0.2 ml articaine solusyonu ile infiltratif anestezi uygulandı. 1 cm uzunluğunda bir insizyonla siyatik sinire ulaşılarak açığa çıkartıldı. Ratların sol siyatik sinirleri, çapının 1/3-1/2'sini içine alacak şekilde cerrahi 4-0 ipek iplikle bağlanmak suretiyle “*Siyatik sinirin parsiyel sıkı ligasyon modeli*” oluşturuldu (Şekil 3.4) (Seltzer ve ark, 1990; Gündüz ve ark, 2014, Aksu R ve ark, 2010). Tüm hayvanların cilt insizyonu 3-0 rezorbe olabilen dikiş ile kapatılarak cerrahi prosedür sonlandırıldı.



Şekil 3.4. Seltzer modeline göre; siyatik sinir yerinin tespiti, hasarın oluşturulması, örnek eldesi.

Bu denek hayvanları Erciyes Üniversitesi "Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi - DEKAM"'inden temin edildi. Denek hayvanlarının cerrahi ve operasyon sonrası bakımları aynı kurum tarafından sağlandı. DEKAM'da sıçanlar özel, etiketli barınaklarda ayrı ayrı tutuldu. 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsünde, oda sıcaklığında muhafaza edildi. Ameliyat sonrası postoperatif bakımları tarafımızca yapıldı. Beslenmeleri ameliyat sonrası ilk hafta yumuşak diyet sonrasında normal beslenme olacak şekilde düzelendi. Sıvı tüketimi ve beslenmeleri günlük olarak takip edildi.

3.2.2. Cerrahi prosedür

Ratlar 10 gruba ayrıldı;

Grup I (n=10):Kontrol grubu, sağlam siyatik sinir dokusu cerrahi olarak çıkarıldı.

Grup II (n=10):Sham grubu, ligasyon sonrası hasarlı sinir dokusu çıkarıldı.

Grup III (n=10) (Lokal RAPA): Hasarlı sinir bölgesine 3 mg/kg rapamisin (RAPA) çözelti halinde uygulandı.

Grup IV (n=10) (Fibrin jel): Hasarlı sinir bölgesine fibrin jel formülasyonu uygulandı.

Grup V (n=10) (Fibrin jel-RAPA): Hasarlı sinir bölgesine fibrin jel formülasyonu içinde 3mg/kg rapamisin uygulandı.

Grup VI (n=10) (PRP): Hasarlı sinir bölgesine PRP uygulandı.

Grup VII (n=10) (PRP-RAPA): Hasarlı sinir bölgesine PRP içinde 3 mg/kg rapamisin uygulandı.

Grup VIII (n=10) (Kollajen membran): Hasarlı sinir bölgesine kollajen membran sarıldı.

Grup IX (n=10) (Kollajen membran-RAPA): Hasarlı sinir bölgesine kollajen membran kombine 3 mg/kg rapamisin sarıldı.

Grup X (n=10) (İP RAPA): Sistemik intraperitoneal (İP) 3 mg/kg rapamisin 7 gün süre ile uygulandı (Falke LL ve ark, 2015; Kram HB ve ark, 1991).

Rat sayısı; yapılan istatistiksel power analiz değerlendirmesinde; benzer çalışmalardaki ‘kontrol grubu’ ele alınarak difference=3.00, α :0.05, güç:0.80 koşullarında minimum 9 birim olarak hesaplandı. Gruplarda olası 1 birim rat kaybıda göz önüne alınarak deneysel araştırmaya çalışma gruplarında 10 birim rat ile başlandı.

3.3. Rapamisin Dozu

Ding T ve ark. (Ding T ve ark, 2015) çalışmalarında siyatik sinir rejenerasyonunda 2 mg rapamisin içeren yavaş salınımlı biyonomik periferik sinir scaffoldu kullanmışlar ve siyatik sinir rejenerasyonunda umut vaat edici sonuçlar bildirmişlerdir. Bu proje kapsamında Hadamitzky ve arkadaşlarının (Hadamitzky M ve ark, 2014) tek doz 3 mg/kg rapamisin kullandıkları çalışması, Falke LL ve ark. çalışması (Falke LL ve ark, 2015), Ding T ve ark. (Ding T ve ark, 2015) çalışması ve Canpolat ve arkadaşlarının daha önce gerçekleştirmiş

olduğu “Ratlarda Oluşturulan Siyatik Sinir Hasarının Tedavisinde Rapamisin ve Gabapentin Tedavi Yöntemlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması (Comparison of the Effectiveness of Rapamycin and Gabapentin Treatment in Rats with Induced Sciatic Nerve Injury)” başlıklı çalışma sonuçları da (Canpolat M ve ark, 2022) dikkate alınarak ligasyon bölgesine tek doz 3mg/kg rapamisin uygulandı. Bu proje kapsamında öncelikle farklı matrikslerde aynı miktarda rapamisin dozunda (3 mg/kg) sinerjistik etki gösteren en etkin biyouyumlu matriks + rapamisin kombinasyonu belirlenmesi hedeflenmiştir. Sistemik olarak intraperitoneal uygulama yapılacak grupta (Grup X) rapamisin uygulama süresi ise Falke LL ve arkadaşlarının (Falke LL ve ark, 2015) ve Kram HB ve arkadaşlarının (Kram HB ve ark, 1991) çalışmaları da referans alınarak belirlenmiştir.

3.4. Deney Hayvanlarının Bakım ve Takipleri

Cerrahi prosedür gerçekleştirildikten sonra deney hayvanları, her biri için ayrılmış plastik kaplara konuldu. Deney hayvanlarının bakımı aynı odada olacak şekilde, ortam ısısı ve beslenme rejimleri aynı olmak şartı ile optimum yaşam koşulları sağlandı. Deney hayvanlarına 3 ay bakım yapıldı. Denek hayvanlarının cerrahi ve operasyon sonrası bakımları “Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi - DEKAM” tarafından yapıldı. Hayvanlar sakrifiye edilmeden hemen önce (12.hafta bitiminde) intramusküler yolla 60 mg/kg Ketamin (Ketalar 50 mg/ml, Pfizer Inc, New York, USA) ve 10 mg/kg Xylazine (Rompun 23.32 mg/ml; Bayer, İlaç San AŞ, İstanbul, Türkiye) ile uyutularak elektronöromiyografi (ENMG) çekimleri gerçekleştirildi. ENMG sonrası tüm ratlar sakrifiye edilerek, siyatik sinir örnekleri histolog eşliğinde alındı. Örnekler histomorfik çalışmalar yapılmak üzere uygun koşullarda saklandı.

3.5. Fonksiyonel ve Elektrofizyolojik Değerlendirme

3.5.1. Fonksiyonel değerlendirme

Fonksiyonel değerlendirme siyatik fonksiyonel indeks (SFI) ile hayvanlar sakrifiye edilmeden hemen önce (12.hafta bitiminde) test grupları kontrol grubu ile karşılaştırılmak üzere yapıldı. Ratlara uygun olacak şekilde yaklaşık 50*10*10 cm boyutlarında yürüme koridoru oluşturuldu.

Daha sonra bu yürüme koridorunun tabanına uygun olacak şekilde beyaz kağıt yerleştirildi. Ratların ameliyat edilen sağ ayakları mürekkep ile boyandıktan sonra yürüme koridoru

içerisinde yürütölüp uygun şekilde ayak izleri elde edilene kadar beklenildi ve daha sonra SFI hesaplandı. SFI hesaplaması için 1-5.parmak arası mesafe (TS), 2-4.parmak arası mesafe (ITS) ve 3.parmak topuk arası mesafe (PL) parametreleri kullanıldı. Hem işlem yapılan (ETS, EITS, EPL) hem de normal taraf (NTS, NITS, NPL) ekstremitede aynı ölçümler yapıldıktan sonra aşğıdaki formölasyon kullanılarak deneyimli bir ekip tarafından **(Yetkin MF ve Meker M)** hesaplama yapıldı (Bain JR ve ark, 1989; Nichols CM ve ark, 2005); $SFI=13.3 \times (EITS-NITS)/NITS + 109.5 \times (ETS - NTS)/NTS + 13.3 \times (EIT - NITS)/NITS - 8.8$.

3.5.2. Elektronöromiyografik değeriendirme

Çalışmamızda sinir rejenerasyonunu değeriendirmek için elektronöromiyografi (ENMG) yapıldı. Hayvan deneyleri için kullanılan elektromiyografi (EMG) cihaz ve probları proje ekibinin daha önceki çalışmalarından mevcut olduğı için yeni ekipman ya da hizmet alımına gerek olmadı. Nörofizyolojik fonksiyonu değeriendirmek için sinir iletim çalışmaları Cadwell® elektromiyografi (Sierra® Summit™, US) cihazı kullanılarak hayvanlar sakrifiye edilmeden hemen önce (12.hafta bitiminde) test grupları kontrol grubu ile karşılaştırılmak üzere gerçekleştirildi (Şekil 3.5). Nörofizyolojik değeriendirme, deneyimli bir nörofizyoloji ekibi tarafından **(Yetkin MF ve Benli Ş)** yapıldı. Anestezi indüksiyonu sonrası ratlar prone pozisyonunda arka ayaklarından flaster ile fiske edilerek, uyluk ve bacağıın posterior bölgesindeki tüyler temizlendi, böylece elektrod rezistansı düşürölerek daha sağlıklı ölçüm yapıldı. Aktif elektrod gastroknemius kasının şişkin bölgesine, referans elektrod ise yaklaşık 10 mm uzağı kasın tendonu üzerine yerleştirildi. Siyatik sinir, hasar sahasının proksimal ve distalinde perkütan olarak uyarıldı (Oğuzhanoglu A, 2000). Kayıt için ayak kaslarına yerleştirilen iğne elektrodu kullanıldı. Siyatik sinir hasar sahasının proksimal ve distalinde yüzeyel olarak uyarıldı. Distal uyarımda uyluk arka yüzünde bifürkasyon noktasının hemen üstünde, proksimal uyarımda ise sinir siyatik çukurda sinir uyarıldı. Toprak elektrod (klips elektrot) kuyruk bölgesine yerleştirildi. Uyarı süresi 100 milisaniye, uyarı şiddeti 10-50 miliamper (supramaksimal uyarıyı sağlayacak minimum uyarı şiddeti verilmiştir) ve süpürme zamanı 10 msn olarak ayarlandı. Motor sinir iletim hızı, latans, birleşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) amplitüdü, BKAP alanı değeriendirildi.



Şekil 3.5. Elektromiyografi cihazı (Sierra® Summit™, US)

Elektronöromiyografik değerlendirme prosedürü boyunca hayvanların vücut sıcaklıklarının 34.5 ± 0.5 C°'de tutulması planlandı: Hayvanlar, 38 C ° sıcak su içeren su torbasının (ısıtıcı yastıkların) üzerine prone pozisyonunda yatırılarak, vücut sıcaklığı EMG cihazına dahil olan termometre ile monitorize edilerek ve lüzum halinde ısıtıcı lambalar kullanılarak hipotermi önlendi (Oğuzhanoğlu A ve ark, 2000; Meregalli C ve ark, 2018).

3.6. Histopatolojik Analizler

Bu çalışmada histopatolojik analizler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarında çalışma ekibinde yer alan Yay A ve arkadaşları (**Yay A ve Ülger M**) tarafından gerçekleştirildi.

3.6.1. Doku takibi ve gömme

Çalışmada kullanılan sıçanların hayatlarına son verildikten sonra çıkarılan siyatik sinir dokuları %4'lük paraformaldehit içerisine alınarak tespit edildi. Daha sonra Cryomatrix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) içine gömülen dokular sıvı azotta hızla dondurularak kriyo kesit için bloklar elde edildi ve frozen kesitler alınmaya kadar -80°C'de bekletildi. Deney gruplarına ait siyatik sinirleri içeren bloklardan Cryotom cihazı (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ile 10µm kalınlığında kesitler poly L-lysine kaplı özel lamlara alındı. Kriyokesitler, -20°C'de aseton içinde sabitlendi, ardından distile suda 5 dakikalık üç yıkama yapıldı. Kriyokesitler birkaç saniye %70 alkole tabi tutuldu. Daha sonra kesitler Oil Red O çalışma solüsyonu ile 20 dakika boyandı. Boyandıktan sonra

kesitler iki dakika distile su ile yıkandı. Daha sonra slaytlar, bir dakika boyunca nükleer boyama için Harris hematoksin'e tabi tutuldu. Bunları distile su ile iki yıkama takip etti ve Fluoromount-G kapatma solüsyonu ile kesitler kapatıldı. Oil Red O pozitif boyanan miyelinli aksonlar genel histomorfometrik değerlendirme için ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Tokyo, Japonya) altında incelendi ve ardından fotoğrafları çekildi (büyütme, x100) (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Oil Red-O boyama metodu

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	-20°C Aseton	10 dk	7	Harris Hematoksin	3 dk
2	Distile su	10 dk	8	Distile su	10 dk
3	%70 Etanol	1 sn	9	Asit:Alkol	1 sn
4	Oil Red-O	20 dk	10	Distile su	10 dk
5	%70 Etanol	1 sn	11	Kapatma	
6	Distile su	10 dk			

3.6.2. Histomorfometrik değerlendirme

Herbir sıçana ait Oil Red O (Sigma Aldrich, O0625-100G, USA) ile boyanan siyatik sinirlerin enine kesitlerinde, ışık mikroskobu kullanılarak (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) 100X büyütmede olacak şekilde rastgele 5 farklı alandan mikroskopik fotoğraflar elde edildi. Bu fotoğraflardan Image J software programı (ImageJ, National Institute of Health, USA) kullanılarak herbir grupta miyelinli sinir lifleri sayıldı. Ayrıca, Image J software programı kullanılarak herbir deney grubundan 1000 tane olacak şekilde aksonların çapları hesaplandı ve alınan veriler doğrultusunda istatistiksel analiz yapıldı.

3.6.3. İmmü floresan boyama

-80 °C'de muhafaza edilen kriyo kesitler 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra PBS (phosphate buffer saline) ile yıkandı. Nonspesifik fluorofor bağlayıcı bölgeler goat serum (PBS içinde %10 serum) kullanılarak 1 saat boyunca bloklandı ve bloklama işleminin ardından lamalar, içerisine ılık çeşme suyu konulmuş olan nem kabinine yerleştirildi. Daha sonra S100 (bs-3759R, Massachusetts, USA), NF-H (bs-1068R, Massachusetts, USA) ve GAP-43 (bs-0154R, Massachusetts, USA) primer antikorları hazırlanarak her biri için ayrı ayrı doku kesitlerinin üzerine damlatıldı. Lamalar nem kamerasında +4 °C' de 24 saat

boyunca inkübe edildi ve ertesi gün primer antikor ile işlem görmüş kesitler PBS ile yıkandı. Daha sonra hazırlanan sekonder antikor kokteyli doku kesitlerinin yüzeyine eklenerek 1 saat boyunca inkübasyonu sağlandı. Fluoroforun 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 fluoromont kapatıcı kullanılarak bir lamel yardımıyla kapatıldı (Tablo 3.2). Immunfloresan boyama metodu uygulanan doku kesitleri -20°C’de bekletildi ve floresan mikroskop (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) kullanılarak görüntülendi. Tüm deney gruplarına ait sıçanlardan alınan siyatik sinir dokularında immunoreaktivite yoğunluğu Image J programı kullanılarak, her bir dokuya ait 40X büyütmede rastgele alınan 5 farklı alandaki floresan mikroskop görüntüleri üzerinde ölçüm yapılarak değerlendirildi.

Tablo 3.2. İmmunofloresan boyama metodu

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Oda sıcaklığında kurutma	10 dk	7	PBS	3x5 dk
2	Paraformaldehit ile fiksasyon	10 dk	8	Sekonder antikor	10 dk
3	PBS	3x5 dk	9	PBS	3x5 dk
4	PAPPen® işaretleme		10	DAPI çekirdek boyaması	1 dk
5	Goat serum ile preinkübasyon	10 dk	11	PBS	3x5 dk
6	Primer antikor ile +4 °C inkübasyon	1 gece	12	Fluoromount Medium® ile kapatma	1 dk

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin normal dağılımları Shapiro Wilk testi ve Q-Q grafikleri kullanılarak değerlendirildi. İki den fazla bağımsız gruplar arasındaki farkın karşılaştırılmasında One Way ANOVA kullanıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey kullanıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizler TURCOSA (Turcosa Analitik Ltd Co, Türkiye, www.turcosa.com.tr) istatistik yazılım programı kullanılarak çalışma ekibinde yer alan biyoistatistik uzmanı tarafından (Öztürk A) gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. Fonksiyonel ve Elektrofizyolojik Bulgular

Fonksiyonel değerlendirmede siyatik fonksiyonel indeks (SFI), elektrofizyolojik değerlendirmede elektronöromiyografi (ENMG/EMG) verileri değerlendirildi.

4.1.1. Fonksiyonel değerlendirme sonuçları

Tablo 4.1. Çalışma grupların NPL, NIT, NTS, EPL, EIT, ETS ve SFI değişkenlerinin karşılaştırılması.

Gruplar	n	NPL		NIT		NTS		EPL		EIT		ETS		SFI	
		Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma
Kontrol	10	26.94	1.61	9.97	2.01	19.652	1.2023	25.18	2.55	9.25	2.01	17.57	2.26	-18.96	10.39
Sham	10	25.24	1.02	9.73	0.96	18.247	1.5816	24.63	0.9318	9.36	0.90	17.66	1.50	-11.87	1.98
PRP	10	25.64	1.15	10.09	1.48	18.969	0.8568	25.19	1.11	8.75	1.40	16.80	1.27	-22.19	8.48
PRP-RAPA	10	26.85	1.35	10.18	0.72	19.117	1.6194	25.53	1.37	9.02	1.30	17.29	1.59	-18.57	8.42
Fibrin jel	10	26.89	0.87	10.61	1.13	19.5	0.9828	25.84	0.85	9.69	1.35	17.78	0.67	-17.96	5.89
Fibrin jel - RAPA	10	26.37	1.42	11.05	1.40	19.389	1.4735	25.42	1.53	10.07	1.15	17.12	1.20	-21.13	6.61
Kollajen membran	10	27.02	1.35	10.87	1.17	19.284	0.8503	26.07	1.54	9.81	1.56	17.34	1.95	-19.99	8.43
Kollajen membran - RAPA	10	26.44	0.91	10.73	0.61	19.431	0.9719	25.97	0.75	9.67	1.02	18.08	1.25	-17.05	5.03
Lokal RAPA	10	25.87	1.34	9.88	1.55	18.882	0.9552	24.75	1.18	9.42	1.35	17.95	1.11	-13.11	4.99
İP RAPA	10	27.67	1.81	9.74	1.02	19.282	0.7408	26.08	1.56	8.93	0.94	17.75	1.24	-16.26	8.44
p		0.003		0.167		0.307		0.212		0.452		0.685		0.042	

*İP: İntraperitoneal, RAPA: Rapamisin, NPL: Normal bası uzunluğu (3.parmak topuk arası mesafe), NIT: Normal ayakta 2. ve 4.parmak aralık mesafesi, NTS: Normal ayakta 1. ve 5. parmak aralık mesafesi, EPL: Patolojik bası uzunluğu (3.parmak topuk arası mesafe), EIT: Patolojik ayakta 2. ve 4.parmak aralık mesafesi, ETS: Patolojik ayakta 1. ve 5. parmak aralık mesafesi, SFI: siyatik fonksiyonel indeks

Gruplarda NPL ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p=0.003$). Gruplara göre NPL değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, İP RAPA ile PRP ($p=0.027$), İP RAPA ile Sham ($p=0.003$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo 4.1).

Gruplarda NIT ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.167$). Gruplarda NTS ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.307$). Gruplarda EPL ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.212$). Gruplarda ETS ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.685$) (Tablo 4.1).

Gruplarda SFI ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p=0.042$). Gruplara göre SFI değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, PRP ile Kontrol ($p=0.029$), Sham ile Kontrol ($p=0.005$), PRP-RAPA ile PRP ($p=0.042$), Fibrin jel ile PRP ($p=0.035$), Kollajen membran ile PRP ($p=0.020$), İP RAPA ile PRP ($p<0.001$), Sham ile PRP-RAPA ($p=0.008$), Sham ile Fibrin jel ($p=0.006$), Kollajen membran ile Sham ($p=0.003$), İP RAPA ile Sham ($p<0.001$), Kollajen membran -RAPA ile Sham ($p=0.044$), İP RAPA ile Fibrin jel-RAPA ($p=0.029$), İP RAPA ile Lokal-RAPA ($p=0.003$), Kollajen membran ile İP RAPA ($p=0.039$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. PRP-RAPA, Fibrin jel, Fibrin jel-RAPA, Kollajen membran, Kollajen membran-RAPA grupların ortalama değerleri kontrol grubuna yakındı (Tablo 4.1).

4.1.2. Elektronöromiyografik bulgular

Çalışma gruplarının latans, BKAP amplitüdü, BKAP alanı ve iletim hızı verilerinin gruplar arası karşılaştırması Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Latans, BKAP amplitüdü, BKAP alanı ve iletim hızı verilerinin gruplar arası karşılaştırması.

Gruplar	n	Latans (ms)		BKAP amplitüdü, (mV)		BKAP alanı (mvms)		İletim hızı (m/s)	
		Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma
Kontrol	10	0.90	0.01	19.18	3.53	8.19	0.39	36.66	0.34
Sham	10	1.06	0.19	9.68	2.05	3.00	0.72	30.68	4.55
PRP	10	1.01	0.208	11.12	2.89	4.12	1.35	32.33	3.66
PRP-RAPA	10	1.03	0.17	11.83	4.10	5.16	1.07	30.84	3.63
Fibrin jel	10	0.98	0.08	12.71	4.65	4.61	1.71	31.78	2.81
Fibrin jel - RAPA	10	0.95	0.07	14.42	4.69	4.88	1.49	31.73	2.19
Kollajen membran	10	0.92	0.04	12.09	2.43	4.92	0.99	32.02	1.178
Kollajen membran-RAPA	10	0.93	0.05	14.10	4.18	5.45	1.47	32.00	1.13
Lokal RAPA	10	0.96	0.09	13.66	7.61	4.86	1.65	31.19	1.05
İP RAPA	10	0.92	0.04	11.65	4.02	5.19	1.06	31.60	1.32
p		0.048		<0.001		<0.001		<0.001	
*İP: İntraperitoneal, RAPA: Rapamisin									

Gruplar arasında latans ortalamaları açısından istatistiksel olarak sınırda anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0.048$). Gruplara göre latans değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, Sham ile Kontrol ($p=0.012$), PRP-RAPA ile Kontrol ($p=0.039$), Kollajen membran ile Sham ($p=0.025$), Kollajen membran-RAPA ile Sham ($p=0.035$), İP-RAPA ile Sham ($p=0.025$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır (Tablo 4.2).

Gruplar arasında BKAP amplitüdü ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Gruplara göre BKAP amplitüdü değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, Sham ile Kontrol ($p<0.001$), PRP ile Kontrol ($p=0.002$), PRP-RAPA ile Kontrol ($p=0.008$), Fibrin jel - Kontrol ($p=0.034$), Kollajen membran - Kontrol ($p=0.013$), İP RAPA - Kontrol ($p=0.006$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Fibrin jel – RAPA, Kollajen membran-RAPA ve Lokal RAPA gruplarında kontrol grubuna en yakın BKAP amplitüdü ortalamaları elde edildi (Tablo 4.2).

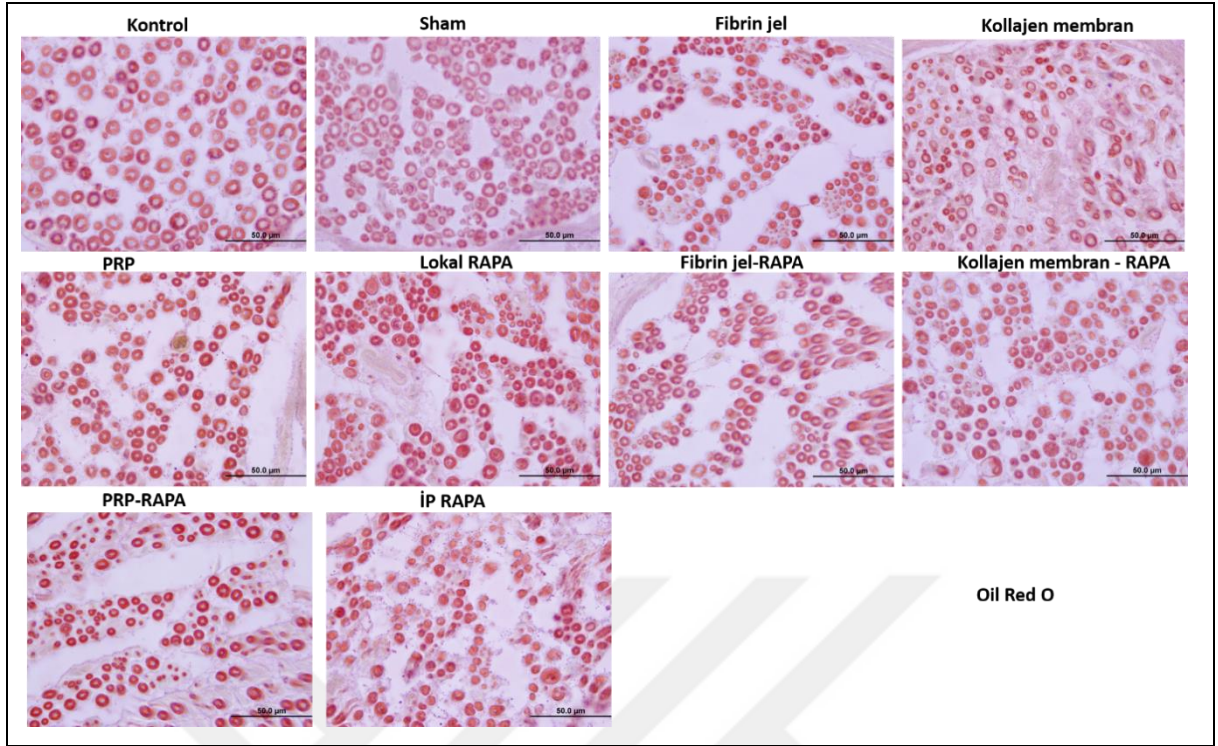
Gruplar arasında BKAP alanı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Gruplara göre BKAP alanı değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, Sham ile Kontrol ($p<0.001$), PRP ile Kontrol ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), Fibrin jel ile Kontrol ($p<0.001$), Fibrin jel-RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), Kollajen membran ile Kontrol ($p<0.001$), Kollajen membran-RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), Lokal RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), İP RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Sham ($p=0.008$), Fibrin jel-RAPA ile Sham ($p=0.039$), Kollajen membran ile Sham ($p=0.041$), Kollajen membran-RAPA ile Sham ($p=0.001$), Lokal RAPA ile Sham ($p=0.043$), İP RAPA ile Sham ($p=0.007$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Kontrol grubuna en yakın BKAP alanı Kollajen membran –RAPA grubunda elde edildi (Tablo 4.2).

Gruplar arasında iletim hızı (Conduction velocity) ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Gruplara göre iletim hızı değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, Sham ile Kontrol ($p<0.001$), PRP ile Kontrol ($p=0.010$), PRP-RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), Fibrin jel ile Kontrol ($p=0.002$), Fibrin jel-RAPA ile Kontrol ($p=0.002$), Kollajen membran ile Kontrol ($p=0.004$), Kollajen membran-RAPA ile Kontrol ($p=0.004$), Lokal RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), İP-RAPA ile Kontrol ($p=0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Kollajen membran, Kollajen membran-RAPA ve PRP gruplarında kontrol grubuna en yakın iletim hızı ortalamaları elde edildi (Tablo 4.2).

4.2. Histopatolojik Bulgular

4.2.1. Siyatik sinir (Oil Red O)

Hasarlı sinir bölgesine farklı matriksler içinde uygulanan rapamisinin sinir rejenerasyonu üzerine etkisinin değerlendirilebilmesi için, tüm deney gruplarına ait sıçanların siyatik sinir dokularından kriyo kesitler alındı ve Oil Red O ile boyanan siyatik sinirlerin enine kesitleri ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca çalışmada, tüm deney gruplarına ait siyatik sinir dokularının genel morfolojik özellikleri, akson sayıları ve akson çapları belirlenerek histomorfometrik değerlendirme gerçekleştirildi. Kontrol grubu, cerrahi grup ve farklı matriksler içinde uygulanan rapamisin ile tedavi edilen sıçanlara ait siyatik sinir görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Tüm gruplarda Oil Red O boyamasında rejenere sinir liflerinin değerlendirilmesi (Rejenere siyatik sinirin ışık mikroskobu görüntüleri).

Kontrol grubunun siyatik sinir kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, aksonlar, miyelin kılıf ve interstisyel kompartmanlar, çok az ayrılma alanları dışında hepsi normal görünümdeydi. Tüm bölümlerde birkaç kan damarı da vardı. Sham grubu örneklerinde, miyelin kılıfında dejeneratif değişikliklere sahip birçok sinir lifi izlendi. Parçalanmış miyelin fragmanları, normal ve ince miyelin kılıflı nispeten az sayıda sinir lifi de dejenere lif grupları arasında gözlendi. Schwann hücrelerinin sitoplazmasında da belirgin vakuoler dejenerasyon gözlendi. İnterstisyel dokunun fibröz bileşenlerinde de nispi bir artış izlendi. Hasar ve rapamisin verilen grup örneklerinde çok sayıda küçük çaplı ve ince miyelinli lifler izlendi. Schwann hücrelerinin vakuoler dejenerasyonlu sitoplazması ve bazı alanlarda mast hücreleri izlendi. Tüm tedavi gruplarında kan damarları da belirgin bir şekilde gözlendi.

Çalışmada görüntüleme işleminin ardından kontrol grubu dahil tüm siyatik sinir örnekleri için histomorfometrik analiz yapıldı. Histolojik olarak belirlenen akson kalınlığı ve akson çapı deney grupları arasındaki ilişkiler değerlendirildi. Oil red O ile boyamadan sonra

deney gruplarının her biri için morfometrik çalışmadan elde edilen sonuçlar Tablo 4.3 ve Tablo 4.4 de verildi.

Tablo 4.3. Grupların akson çap verilerinin karşılaştırması.

Gruplar	n	Ortalama	S.Sapma
Kontrol	1000	6.58	2.05
Sham	1000	3.79	1.92
PRP	1000	5.08	1.54
PRP-RAPA	1000	5.85	2.02
Fibrin jel	1000	5.49	1.86
Fibrin jel-RAPA	1000	5.64	2.06
Kollajen membran	1000	4.88	1.81
Kollajen membran- RAPA	1000	5.29	1.71
Lokal RAPA	1000	5.71	1.85
İP RAPA	1000	4.90	2.08
p	P<0.001		

Grupların akson çap ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($p<0.001$) (Tablo 4.3). Gruplara göre akson çapı değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, Sham ile Kontrol ($p<0.001$), Fibrin jel ile Kontrol ($p<0.001$), Kollajen membran ile Kontrol ($p<0.001$), PRP ile Kontrol ($p<0.001$), Lokal RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), Fibrin jel-RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), Kollajen membran-RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), İP RAPA ile Kontrol ($p<0.001$), Fibrin jel ile Sham ($p<0.001$), Kollajen membran ile Sham ($p<0.001$), PRP ile Sham ($p<0.001$), Lokal RAPA ile Sham ($p<0.001$), Fibrin jel-RAPA ile Sham ($p<0.001$), Kollajen membran-RAPA ile Sham ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Sham ($p<0.001$), İP RAPA ile Sham ($p<0.001$), Kollajen membran ile Fibrin jel ($p<0.001$), PRP ile Fibrin jel ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Fibrin jel ($p=0.001$), İP RAPA ile Fibrin jel ($p<0.001$), Lokal RAPA ile Kollajen membran

($p<0.001$), Fibrin jel-RAPA ile Kollajen membran ($p<0.001$), Kollajen membran-RAPA ile Kollajen membran ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Kollajen membran ($p<0.001$), Lokal RAPA ile PRP ($p<0.001$), Fibrin jel- RAPA ile PRP ($p<0.001$), PRP-RAPA ile PRP ($p<0.001$), Kollajen membran-RAPA ile Lokal RAPA ($p<0.001$), İP RAPA ile Lokal RAPA ($p<0.001$), Kollajen membran-RAPA ile Fibrin jel-RAPA ($p=0.002$), İP RAPA ile Fibrin jel RAPA ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Kollajen membran-RAPA ($p<0.001$), İP-RAPA ile Kollajen membran-RAPA ($p<0.001$), İP RAPA ile PRP-RAPA ($p<0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo 4.3).

Tablo 4.4. Grupların akson sayısı verilerinin karşılaştırılması.

Gruplar	n	Ortalama	S. Sapma
Kontrol	36	188.28	40.23
Sham	36	153.19	38.94
PRP	36	166.67	35.01
PRP-RAPA	36	196.47	43.89
Fibrin jel	36	160.89	49.94
Fibrin jel-RAPA	36	183.67	43.61
Kollajen membran	36	156.50	28.08
Kollajen membran-RAPA	36	185.17	45.71
Lokal RAPA	36	159.78	28.35
İP RAPA	36	150.08	34.45
p	$P<0.001$		

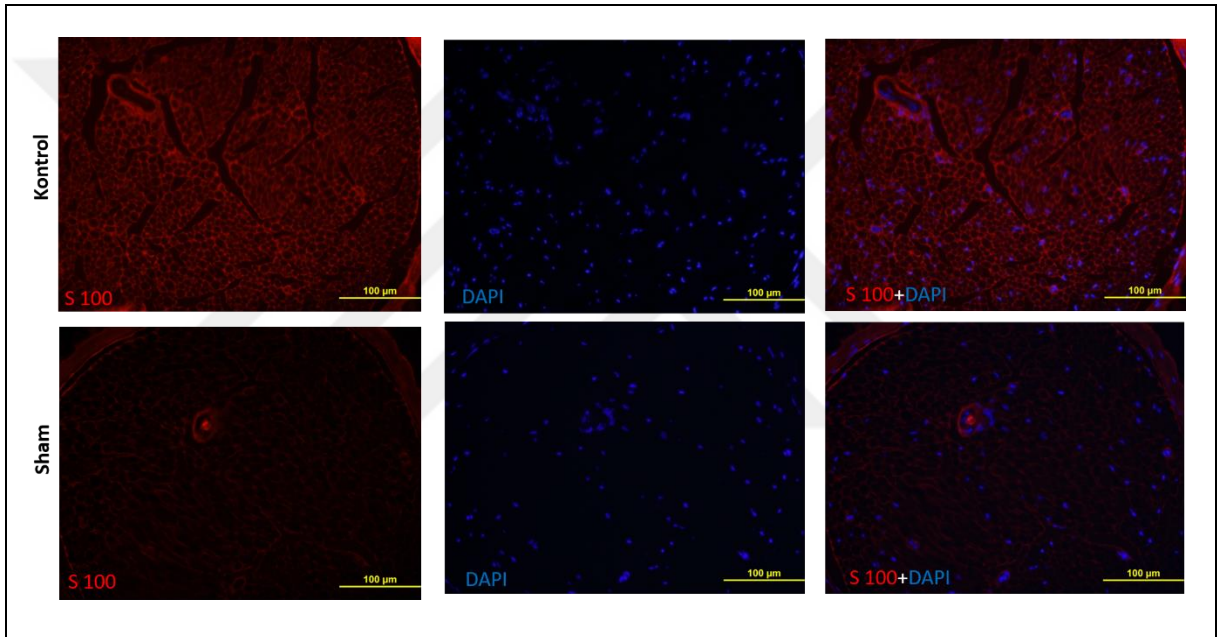
Grupların akson sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Gruplara göre akson sayısı değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre; Sham ile Kontrol ($p=0.007$), Kollajen membran ile Kontrol ($p=0.024$), İP RAPA ile Kontrol ($p=0.002$), Fibrin jel-RAPA ile Sham ($p=0.038$), Kollajen membran-RAPA ile Sham ($p=0.023$), PRP-RAPA ile Sham ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Fibrin jel ($p=0.006$), PRP-RAPA ile Kollajen membran ($p<0.001$), PRP-RAPA ile PRP ($p=0.047$), PRP-RAPA ile Lokal RAPA ($p=0.004$), İP RAPA ile Fibrin jel-RAPA ($p=0.013$), İP

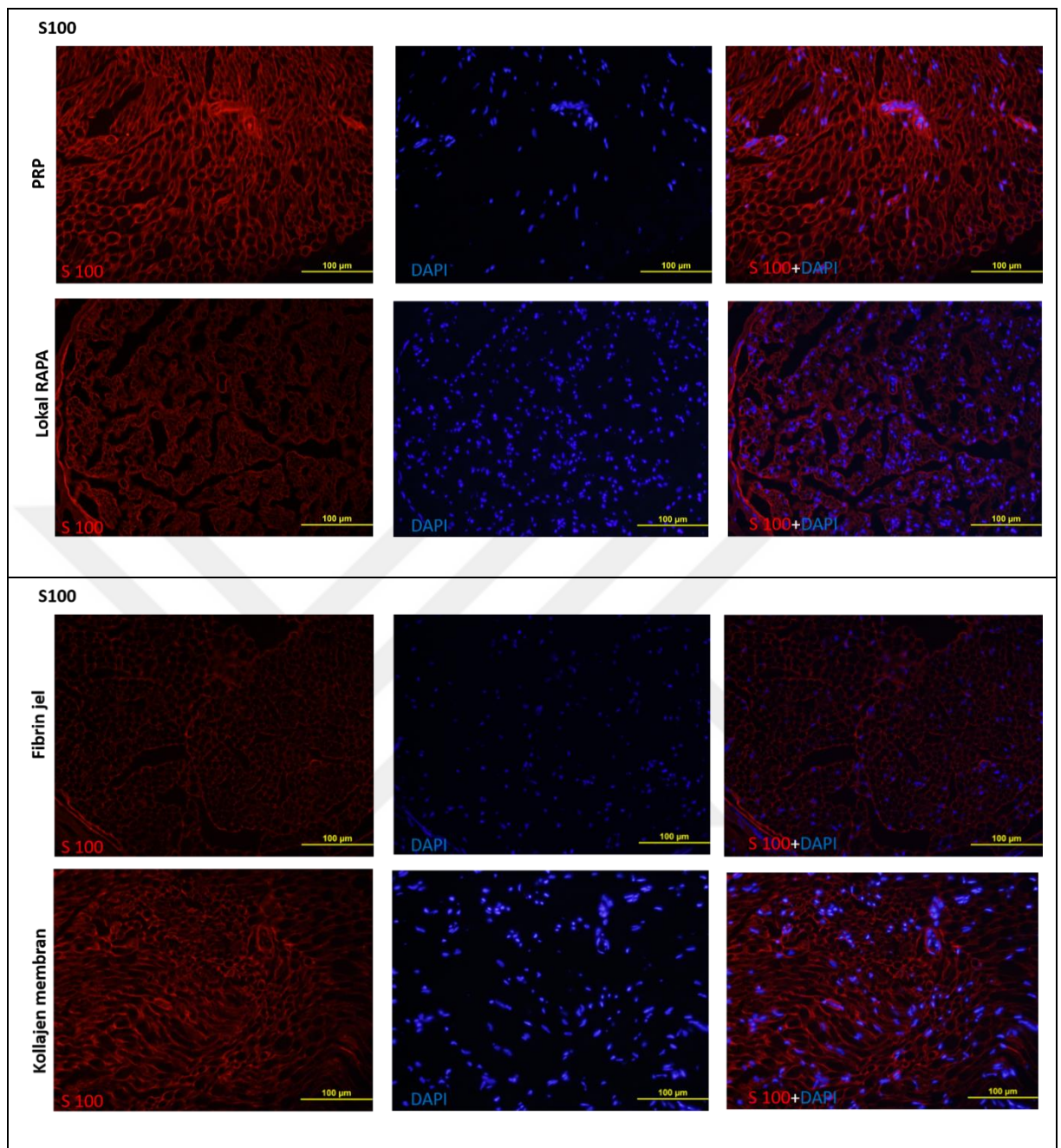
RAPA ile Kollajen membran-RAPA ($p=0.007$), İP-RAPA ile PRP-RAPA ($p<0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo 4.4).

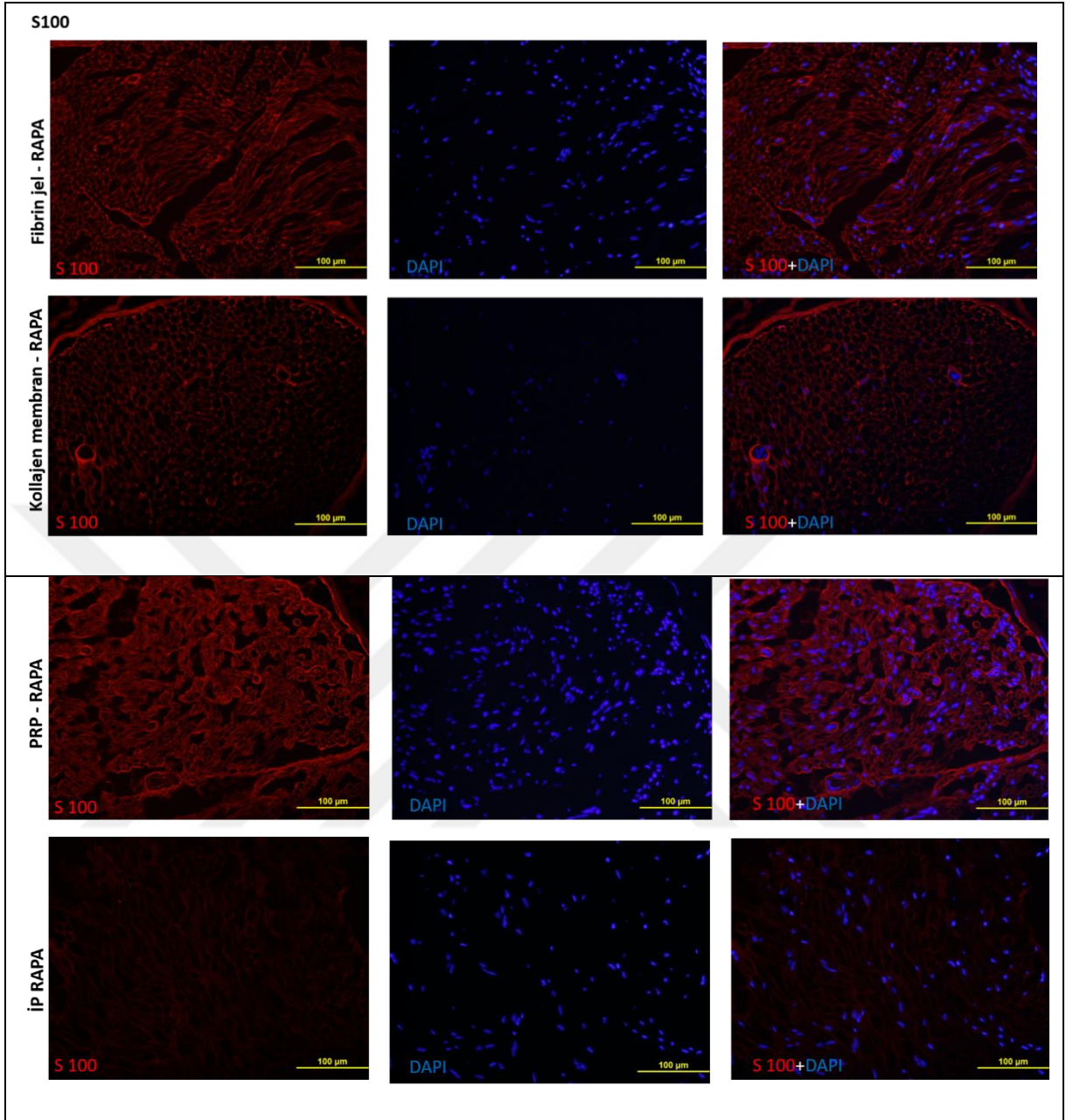
4.2.2. İmmunofloresan (S-100, NF ve GAP-43)

Çalışmada, siyatik sinir lifleri, spesifik bir marker olan S-100, NF ve GAP-43 immünfloresan boyama ile görselleştirilerek değerlendirildi. Tüm deney gruplarına ait siyatik sinir dokularından elde edilen floresan mikroskopik görüntüler Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Şekil 4.2'de S100 boyaması ile elde edilen görüntüler verilmiştir.

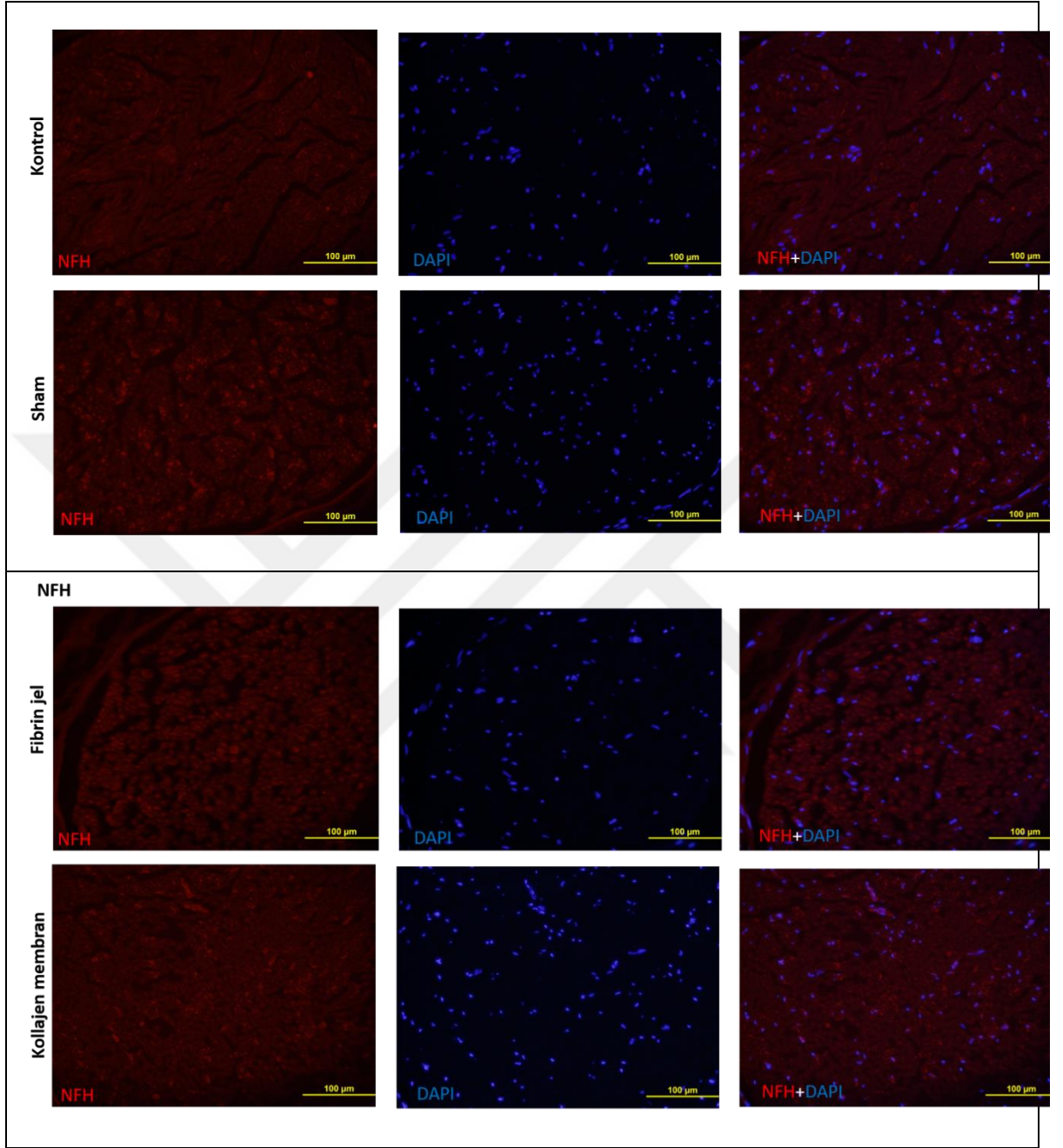


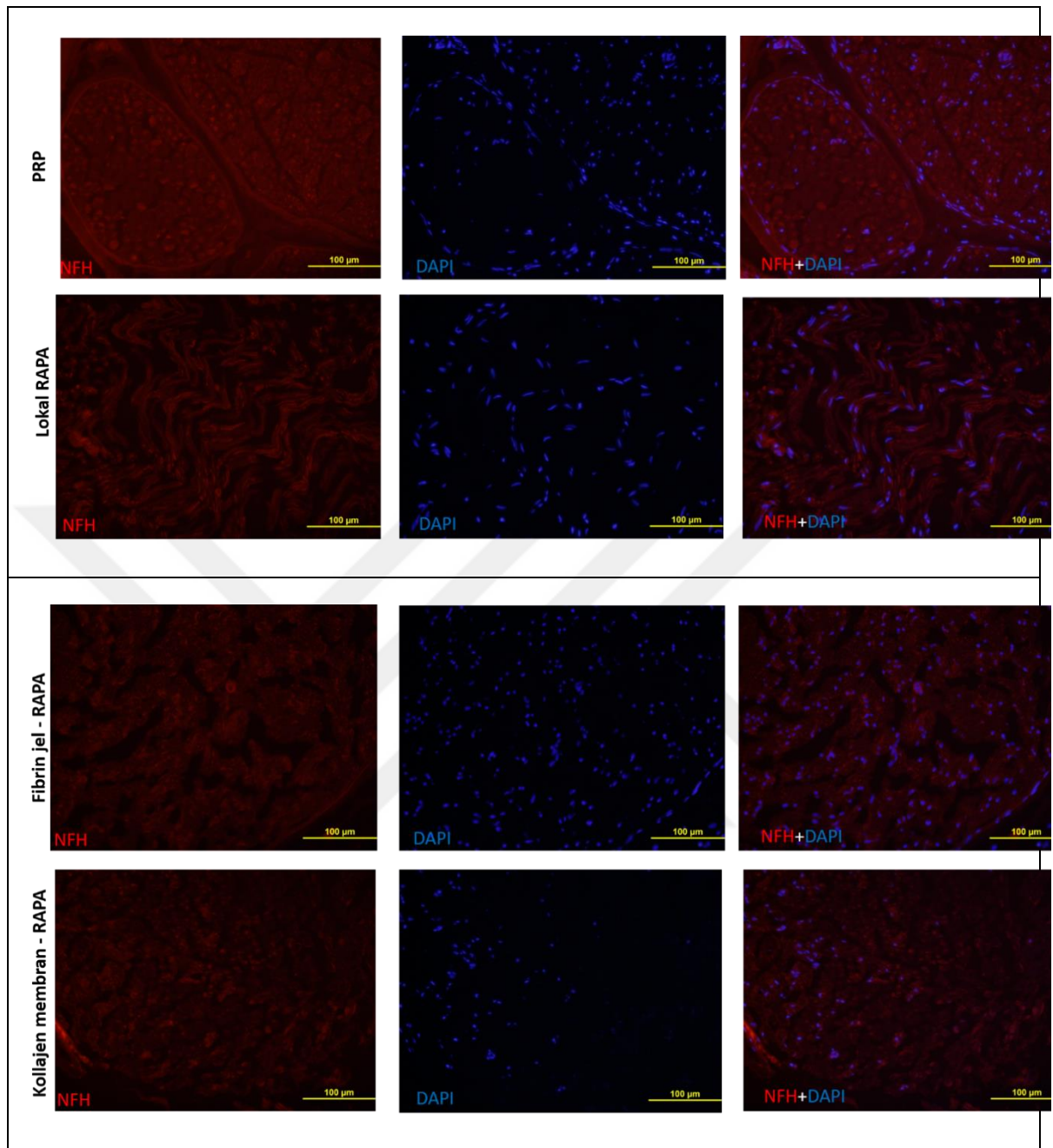


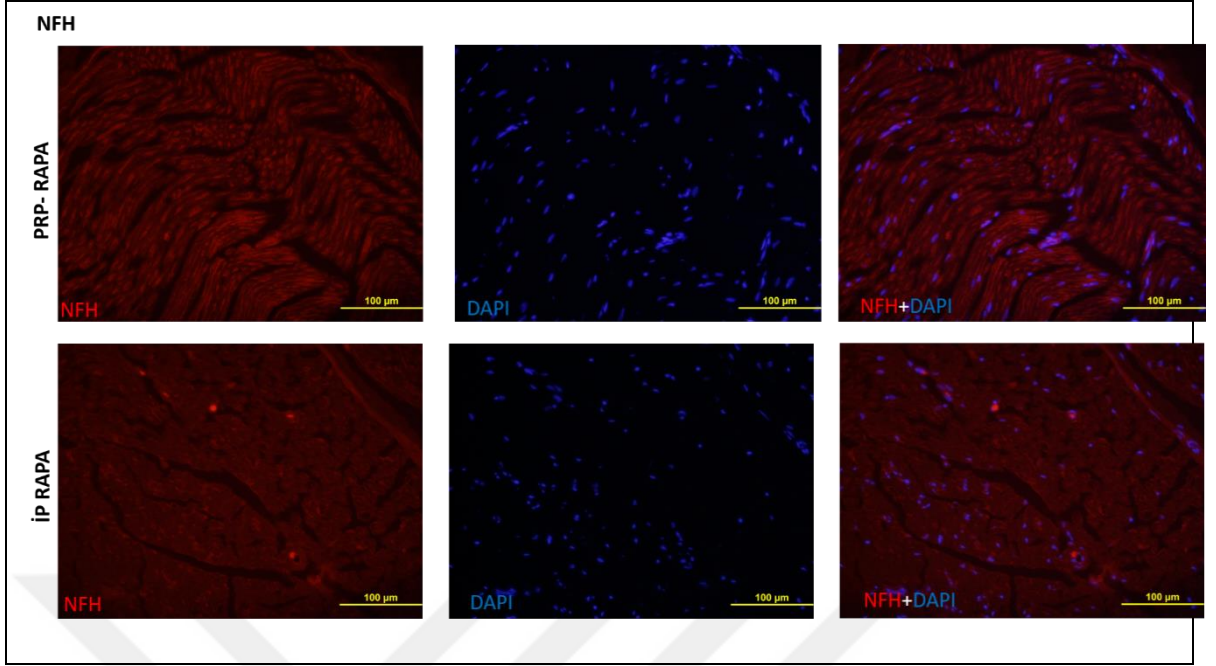


Şekil 4.2. Tüm gruplara ait sinir S100 boyanması ile elde edilen görüntüler

Şekil 4.3’de NF boyaması ile elde edilen görüntüler verilmiştir.

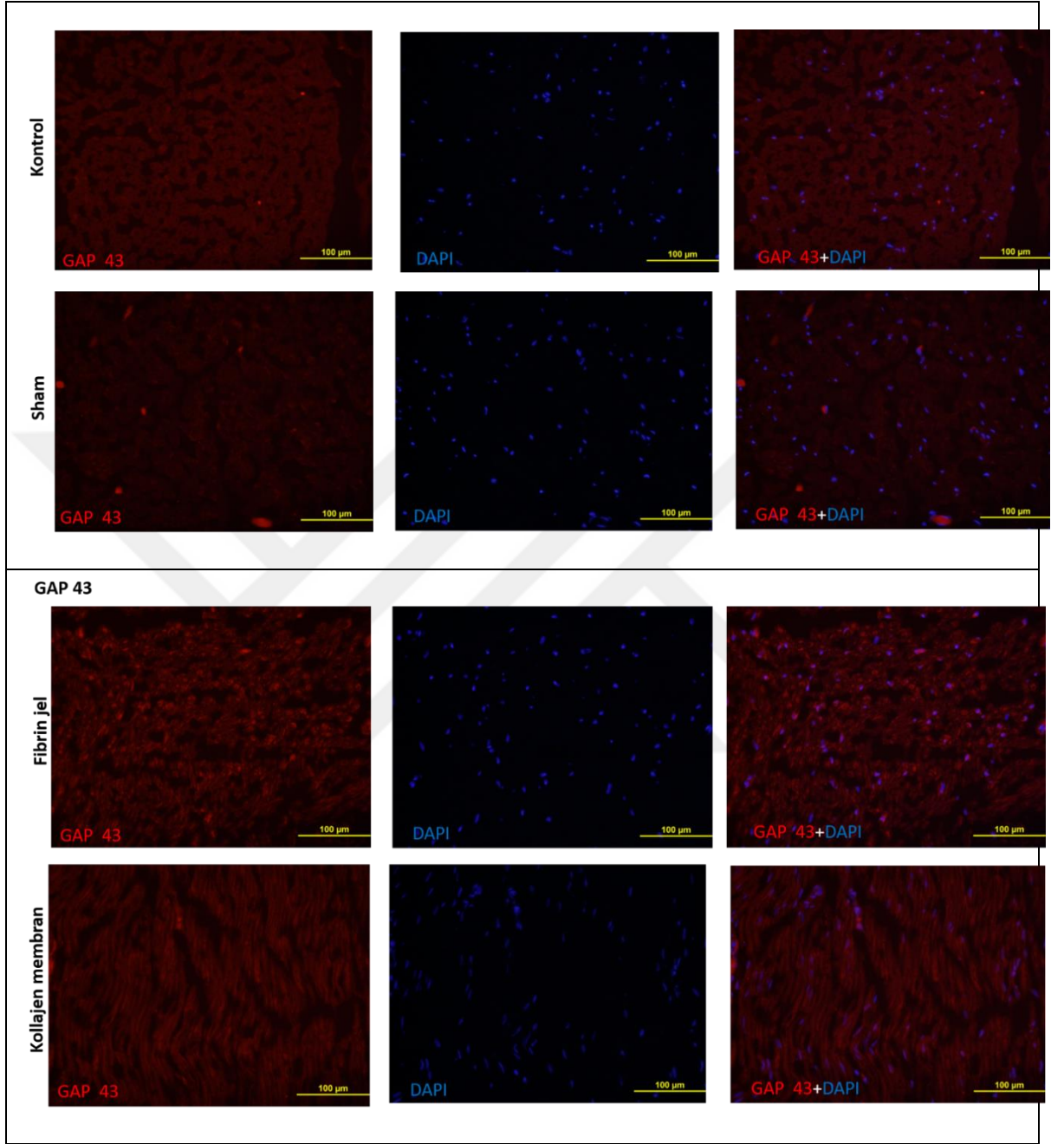


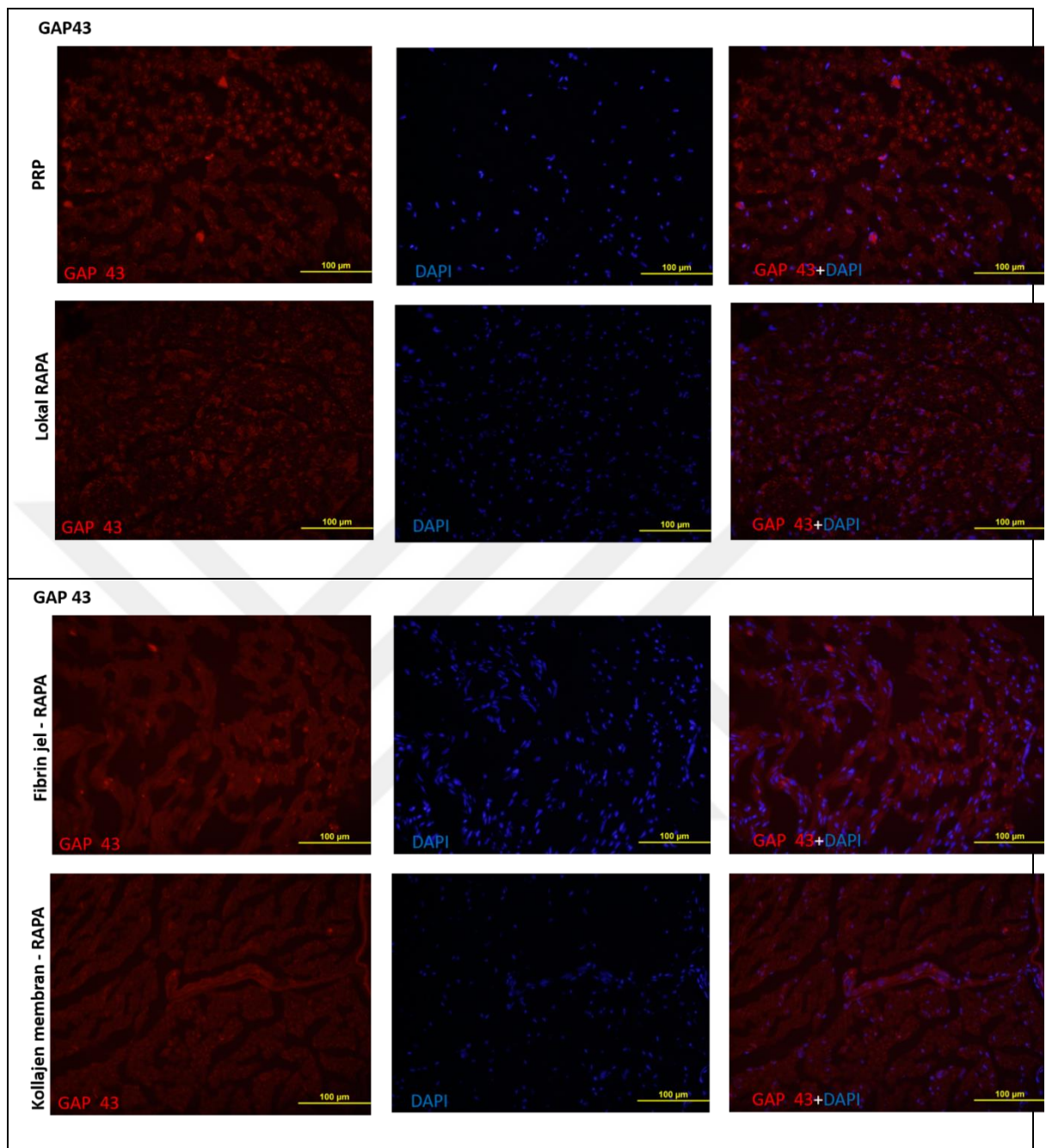


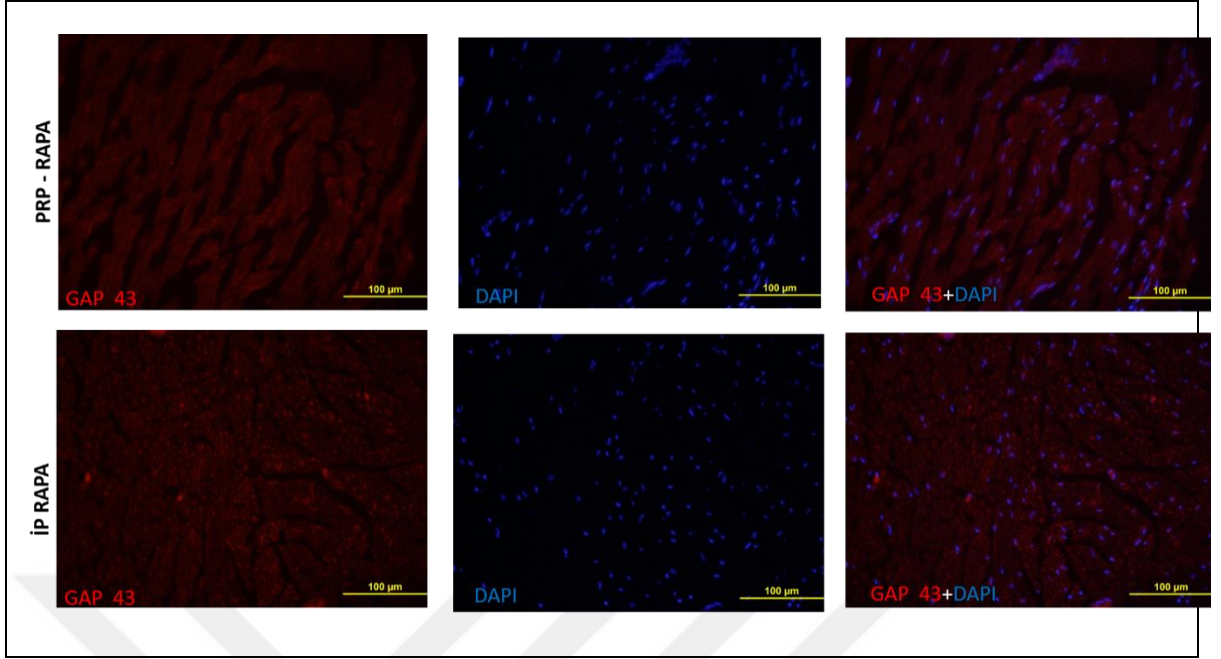


Şekil 4.3. Tüm gruplara ait sinir NF boyanması ile elde edilen görüntüler

Şekil 4.4'te GAP-43 boyaması ile elde edilen görüntüler verilmiştir.







Şekil 4.4. Tüm gruplara ait sinir GAP-43 boyanması ile elde edilen görüntüler

Tablo 4.5. S100 değerlerine göre grup ortalamalarının karşılaştırılması

Gruplar	n	Ortalama	S.Sapma
Kontrol	40	14.53	3.39
Sham	40	12.47	2.53
PRP	40	15.36	2.86
PRP - RAPA	40	16.89	3.09
Fibrin jel	40	12.25	2.81
Fibrin jel - RAPA	40	14.62	4.10
Kollajen membran	40	14.82	3.21
Kolljen membran-RAPA	40	15.33	3.83
Lokal RAPA	40	14.35	2.63
İP RAPA	40	14.55	3.47
p	P<0.001		

S100 immün yoğunluğu değerlerine göre grup ortalamaları arasında yapılan karşılaştırma sonuçlarına göre anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$) (Tablo 4.5). Gruplara göre S100 değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, PRP-RAPA ile Kontrol ($p=0.037$),

Kollajen membran ile Sham ($p=0.040$), PRP ile Sham ($p=0.003$), Kollajen membran-RAPA ile Sham ($p=0.004$), PRP-RAPA ile Sham ($p<0.001$), Kollajen membran ile Fibrin jel ($p=0.015$), PRP ile Fibrin jel ($p<0.001$), Fibrin jel – RAPA ile Fibrin jel ($p=0.036$), Kollajen membran-RAPA ile Fibrin jel ($p=0.001$), PRP-RAPA ile Fibrin jel ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Lokal RAPA ($p=0.016$), İP RAPA ile PRP-RAPA ($p=0.040$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo 4.5).

Tablo 4.6. Grupların GAP-43 ve NF değişkenlerinin karşılaştırılması

		GAP-43		NF	
Gruplar	n	Ortalama	S.Sapma	Ortalama	S.Sapma
Kontrol	40	12.93	1.52	16.36	2.80
Sham	40	10.73	2.71	14.67	2.83
PRP	40	12.05	2.36	15.99	1.32
PRP-RAPA	40	14.70	1.81	16.14	2.14
Fibrin jel	40	12.41	1.56	15.18	3.39
Fibrin jel - RAPA	40	13.94	1.76	16.16	1.71
Kollajen membran	40	13.36	1.67	15.07	2.39
Kollajen membran - RAPA	40	13.69	4.06	15.46	2.94
Lokal RAPA	40	12.82	2.44	16.16	1.97
İP RAPA	40	12.76	3.59	16.51	1.89
p	P<0.001			P=0.005	

Gruplar arasında GAP-43 ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.001$). Gruplara göre GAP-43 değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, Sham ile Kontrol ($p=0.004$), Kollajen membran ile Sham ($p<0.001$), Lokal RAPA ile Sham ($p=0.007$), Fibrin jel-RAPA ile Sham ($p<0.001$), Kollajen-RAPA ile Sham ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Sham ($p<0.001$), İP RAPA ile Sham ($p=0.011$), PRP-RAPA ile Fibrin jel ($p=0.002$), Fibrin jel RAPA ile PRP ($p=0.026$), PRP-RAPA ile PRP ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Lokal RAPA ($p=0.029$), İP RAPA ile PRP-RAPA ($p=0.019$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo 4.6).

Gruplar arasında NF ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p=0.005$). Gruplara göre NF değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, İP RAPA ile Sham ($p=0.024$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı. En yüksek NF değeri İP RAPA grubunda saptandı (Tablo 4.6).



5. TARTIŞMA

Periferik sinir hasarı, metabolik, perfüzyonun bozulması (iskemi, hipoksi gibi), heretider (herediter nöropatiler, infantil nöroaksonal distrofi gibi), infeksiyöz (Lyme hastalığı gibi), nöro-toksik (akrilamid, vinkristin gibi), immün aracılı (Guillian-Barre sendromu ve kronik inflamatuvar demiyelizan nöropati gibi) hastalıklar gibi farklı etiyolojik nedenlere bağlı olarak gözlenebileceği gibi, kompresyona ve mekanik travmaya (sinir kesisi gibi) bağlıda oluşabilir (Woolf CJ ve ark., 1999; Demiryürek Ş ve ark., 2022). Enjeksiyon ilişkili sinir yaralanmaları (NII) intramusküler enjeksiyonun önemli bir komplikasyonudur. Siyatik sinir çocuklarda, yaşlılarda ve kilo fazlalığı olan hastalarda en sık hasar gören periferik sinirdir. Klinik bulgular oldukça değişkenlik gösterir. Olgularda geçici hafif ağrı, şiddetli duyuusal bozukluk, motor kayıp ve sekel ile iyleşme gözlenebilmektedir (Jung Kim H ve ark., 2014). Nöropatik ağrı oldukça önemli bir bulgudur. Nöropatik ağrı “sinir sisteminin primer lezyonundan ya da disfonksiyonundan kaynaklanan ağrı” olarak tanımlanmıştır (Jensen TS ve ark., 2011; Treede RD ve ark., 2008; Gündüz Ö ve ark., 2014; Bridges D ve ark., 2001). Klinik pratikte, travma, iskemik hasar, infeksiyon/inflamasyon, kompresyon, tümör invazyonu ya da nöronal yapılara bası etkisi, kompresyon ve ilaçlar (örn.,vinka alkaloidleri) gibi çok sayı da etiyolojik faktörle ilişkili periferik sinir hasarı sonucu nöropatik ağrı gözlenebilir (Gündüz Ö ve ark., 2014; Bridges D ve ark.,2001; O'Connor AB ve ark., 2009; Woolf CJ ve ark.,1999; Canpolat DG ve ark, 2018; Lin Q ve ark, 2011; Mashhoudi Barez M ve ark, 2017). Günümüzde önemli fonksiyonel kayıplara ve kalıcı sakatlığa neden olan travmatik periferik sinir hasarı (TPNI) önemli bir klinik ve halk sağlığı sorunudur ve halen daha standardize edilmiş bir tedavi yaklaşımı yoktur. Literatürde, nöropatik ağrı modellerinde non-steroidal sistemik analjezikler, steroidler, antipsikotikler, anksiyolitikler, trisiklik antidepresanlar, duloksetin, venlafaksin, gabapentin, pregabalin, mirogabalin, karbamazepin, okskarbazepin, nefopam, opioidler gibi çok sayıda farmakolojik tedavi, cerrahi ve hücre bazlı tedavilerde dahil olmak üzere oldukça fazla sayıda invaziv ve noninvaziv medikal yöntem tedavi amacıyla kullanılmıştır

(Bridges D ve ark.,2001; O'Connor AB., 2009; Woolf CJ ve ark.,1999; Canpolat DG ve ark, 2018; Lin Q ve ark, 2011; Mashhoudi Barez M ve ark, 2017; Modrak M ve ark., 2020; Wiffen PJ ve ark., 2017; Alles SRA ve ark. 2018; Lepić S ve ark,2022; Pan B ve ark., 2021; Hu Y ve ark.,2022; Barnes SL ve ark., 2022; Contreras E ve ark., 2022; Jiang L ve ark., 2022; Lopes B ve ark., 2022; Alles SRA ve Smith PA, 2018; Kim KH ve ark., 2020; Shamoun F ve ark., 2022; Canpolat M ve ark, 2022).

Halen daha standardize edilmiş bir tedavi yaklaşımı olmasa da, Seddon ve Sunderland sınıflamaları hem hasarın tipini belirlemede hem de takip ve tedavi stratejilerini belirlemede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Seddon HJ, 1942; Seddon HJ, 1943; Sunderland S, 1951; Sunderland S, 1991). Siyatik sinir hasarı olan bir olguda uyuşukluk, parestezi, ağrı veya diğer semptomları varsa en kısa sürede subgluteal bölgenin fizyolojik solusyon ile dilue edilmesi sinir hasarını önleyebilir, ağrı kontrolü için gabapentin ya da trisiklik antidepressanlar tercih edilebilir, başlıca tedavi seçenekleri arasında fizyoterapi ve yardımcı cihazlar da (motor fonksiyon kaybı ve atoni bulgularında rehabilitasyon için gereklidir) yer almaktadır (Jung Kim H ve ark., 2014, Gilles FH ve Matson DD, 1970; Topuz K ve ark., 2011; Senes FM ve ark., 2009; Kim DH ve ark.,2004). Cerrahi tedavinin ne zaman yapılacağı, kime yapılacağı tartışılrsa da, Sunderland sınıflamasına göre özellikle de Evre 4 ve Evre 5 olgularda sekel oranları yüksek olduğu için Evre III ve üzeri hastalarda tercih edilebileceği belirtilmektedir (Jung Kim H ve ark., 2014, Sunderland S, 1951). Genellikle injuri sonrası 3-6 ay içinde klinik veya elektromiyografik olarak tibial ya da preoneal sinirde total defisit ya da yetersiz düzelme gözlenen olgularda cerrahi yaklaşım tercih edilir (Jung Kim H ve ark., 2014). Senes ve arkadaşları (Senes FM ve ark., 2009) cerrahi girişimin injuri sonrası ilk 4 ay içinde yapılmasını önermişlerdir. Bununla birlikte çok daha erken dönemde cerrahi yaklaşımı öneren çalışmalar da vardır; Topuz ve arkadaşları (Topuz K ve ark., 2011) cerrahi eksplorasyonu siyatik sinir hasar bulgularının başlangıcından 10-14 gün sonra klinik veya elektromiyografik incelemede spontan iyileşme gözlenmeyen olgularda önermekte ve hatta klinik bulgular bir sinirin transeksiyonuna işaret ediyorsa, bu sinirin elektrofizyolojik bulgularını beklemeden eksplorasyon yapılabileceğini belirtmektedirler. Klinik pratikte hasarın tipine bağlı olarak tedavi algoritmalarında değişiklik gösterebilir, örneğin enjeksiyon ilişkili kapalı sinir yaralanmalarındaki pratik uygulama ile açık sinir yaralanmalarındaki uygulamalar

birbirinden farklılık göstermektedir; açık siyatik sinir yaralanmalarında sinirde kesi varsa ilk 72 saat içinde cerrahi yaklaşım önerilmektedir (Kim DH ve ark.,2004).

Siyatik sinir hasarı farklı deneysel modeller ile oluşturulabilir, siyatik sinirin total kesi modeli (nöroma), siyatik sinirin total kesilmesi ve dikilmesi modeli, siyatik sinirin total ezilmesi modeli, siyatik sinirin total dondurulması modeli başlıca total denervasyon modelleri arasında sıralanabilir (Gündüz Ö ve ark, 2014). Parsiyel sıkı ligasyon modeli ve siyatik sinirin parsiyel dallarının zedelenmesiyle oluşturulan modeller siyatik sinirin parsiyel denervasyon modellerine örnek olarak verilebilir (Gündüz Ö ve ark, 2014). Siyatik sinirin parsiyel sıkı ligasyon modeli sinir kontüzyonuna karşılık gelmektedir (Gündüz Ö ve ark, 2014). Siyatik sinire trifurkasyonun proksimalinden ulaşarak sinirin ½-1/3 kalınlığı ipek iplikle sıkıştırılması ile model oluşturulmaktadır (Gündüz Ö ve ark, 2014). Bizde çalışmamızda çalışma ekibimizde yer alan araştırmacıların daha önceki çalışmalarından edindiği tecrübelerini de göz önünde bulundurarak Seltzer ve arkadaşlarının (Seltzer Z ve ark., 1990) uyguladığı parsiyel siyatik sinir ligasyon modelini kullanarak deneysel hasar modelini oluşturduk (Canpolat M ve ark, 2022; Canpolat DG ve ark., 2018; Seltzer Z ve ark., 1990).

mTOR (mammalian target of rapamycin) yolu, hücre büyümesi, proliferasyon, metabolizma, protein sentezi ve otofaji dahil olmak üzere bir takım fizyolojik fonksiyonda yer alan son yıllarda önemi daha iyi anlaşılan temel hücresel sinyal yollarından biridir (Wong M, 2013). Genetik olarak geçiş gösteren tüberoz skleroz kompleksinde (TSC) olduğu gibi mTOR yolunun hiperaktivasyonu hücre büyümesinin ve proliferasyonunun artışı ile beyinde ve diğer organlarda tümör büyümesine yol açmaktadır. mTOR yolunda regülasyon bozukluğu çok sayıda hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır. Epilepsi, otizm, mental retardasyon ve diğer bilişsel nörogelişimsel bozukluklar, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Fragil X sendromu, Down sendromu, Rett sendromu başta olmak üzere çok sayıda nörolojik hastalığının patogenezinde mTOR yolağındaki bu regülasyon bozukluğu suçlanmaktadır (Wong M, 2013). Bu patogeneze temelinde bir mTOR inhibitörü olan rapamisin son yıllarda başta TSC olgularında olmak üzere tedavide sıklıkla kullanılmıştır (Canpolat M ve ark, 2018; Cinar SL ve ark., 2017; Canpolat M ve ark, 2014). mTOR inhibitörleri benzer şekilde renal transplant olgularında allograft rejeksiyonunda, SEGA ve renal AML tespit edilen TSC olgularında, renal hücreli karsinom ve pankreatik endokrin tümörlerin tedavisinde de kullanılmaktadır, son yıllarda

nörodejeneratif hastalıkların, metabolik hastalıkların tedavisinde ve yaşlanmaya karşı mTOR inhibitörlerinin kullanımı gündeme gelmiştir (Li J ve ark., 2014). mTOR (mammalian target of rapamycin) yolunun PSS'de nöronal aksonların rejenerasyonu üzerindeki etkisi tartışmalı bir konudur. Huang ve arkadaşları (Huang Z ve ark., 2017) mTOR atkivitesinin SSS ve periferik sinir sistemindeki etkilerinin bir birinden farklı olduğunu belirtmişlerdir.

Otofaji, hasarlı organeller ve disfonksiyonel proteinler de dahil olmak üzere sitoplazmik yapıların lizozomal degradasyonunu uyararak hücrel homeostazı koruyan temel bir mekanizmadır (Huang HC ve ark., 2016). Rapamisin otofaji indükleyici olarak kullandığı çalışmalarda, rapamisin ile tedavi edilen sıçanlarda fibrozisin güçlü bir şekilde inhibe edildiği ve fonksiyonel sonuçların iyileştiği belirtilmiş, otofajik aktivite eksikliğinin sinirde skar oluşumunda erken bir olay olabileceği ve otofajiyi modüle etmenin, fonksiyonel sonuçları iyileştirmek için güçlü bir farmakolojik yaklaşım olabileceği belirtilmektedir (Ko PY ve ark., 2018). Huang ve arkadaşları (Huang HC ve ark., 2016) siyatik sinir injurisi oluşturulan ratlarda 1 mg/kg dozunda rapamisin kullandıkları çalışmalarında otofaji indükleyicisi rapamisinin otofagosomların sayısını ve LC3-II ekspresyonunu artırdığını, lezyondaki apoptotik hücre sayısını azalttığını, rapamisinin miyelin bazik protein (MBP) ve NF-200 ekspresyonunun up-regülasyonu ve artan motor fonksiyon geri kazanımı ile ilişkili olduğunu bildirmişler, periferik sinir hasarında otofaji modülasyonunun sinir rejenerasyonu için etkili bir farmakolojik yaklaşım olabileceğini ve motor fonksiyonunların geri kazanımına katkı sağlayabileceğini vurgulamışlardır (Huang HC ve ark., 2016). Liu ve arkadaşları (Liu F ve ark., 2014) düşük doz rapamisinin (1.53 nmol/L) Schwann hücre göçünü en az 100 µmol/L (yüksek doz) FK506 kadar artırdığını, düşük doz rapamisin tedavisinin daha düşük maliyet ve daha az toksik yan etkiye sahip olması nedeniyle yüksek doz rapamisinden daha efektif olduğunu rapor etmişler ve rapamisinin Schwann hücre göçünü ve sinir büyüme faktörlerinin salgılanmasını ve büyümeyle ilişkili protein 43 ekspresyonunu arttırdığını, bu nedenle rapamisinin periferik sinir rejenerasyon terapisinde potansiyel bir uygulamaya sahip olduğunu bildirmişlerdir. Rangaraju ve arkadaşları (Rangaraju S ve ark., 2010) bir makrolid antibiyotik olan rapamisinin kültürlenmiş fare Schwann hücrelerinde, doz ve zamana bağlı olarak etkili bir şekilde otofajiyi indüklediğini ve PMP22 ilişkili demiyelinizan nöropatilerin tedavisinde rapamisin ve diğer otofajiyi artırıcı bileşiklerin potansiyel olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Özet olarak periferik sinir sisteminde sinir rejenerasyonu, hasarlanmış nöronların salgıladığı birçok intirinsik faktöre bağlı olduğu bilinmesine karşın, özellikle son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar sonucu rejenerasyon için mTOR (MammalianTarget of Rapamisin) yolu tarafından salgılanan proteinlerin kontrolünün önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. Rapamisinin otofajiyi indükleyerek, otofagosomları artırdığı ve LC3-II ekspresyonu ile lezyon bölgesindeki apoptotik hücreleri azalttığı, sinir rejenerasyonunu artırdığı ve böylelikle motor fonksiyonu düzelttiği gösterilmiştir (Huang HC ve ark., 2016).

Özellikle sinir rejenerasyonuna yönelik lokal ilaç uygulamalarında ilacın etki bölgesinde uzun süre kalabilmesi, fizyolojik ve fiziksel faktörler sonucu etki bölgesinden uzaklaşmamasını sağlayabilmek daha iyi klinik sonuçlar elde edebilmek için önemlidir. Bu kapsamda, ilaç taşıyıcı matriks sistemin hem söz konusu fizyolojik ve fiziksel engellerin aşılabılmesinde hem de başlı başına sinir rejenerasyonunda hasar bölgesinde iskele yapısı oluşturarak olumlu etki göstermesi, ilaç ve ilaç taşıyıcı matriksin kombine olarak uygun bir şekilde uygulanması ile nihai tedavide sinerjistik etki göstermesi ve tedavinin etkinliğinin artırılabilmesi mühtemeldir. İyi bir scaffoldun yapısal destek ve şekil sağlaması, hücre bağlanması ve büyümesi için yüzey sağlaması, genellikle biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumlu olması gerekir (Aijie C vd, 2018; Yi S vd, 2017; Yi S vd, 2019; Hosseinkhani M vd, 2014; Suzuki A vd, 2020; Du J vd, 2018). Son yıllarda rejeneratif tıp alanında, doku mühendisliği ve farmasötik alandaki gelişmeler ilaçların lokal etkilerini artırarak sistemik yan etkileri azaltmak için ilaç yüklü scaffoldları ve nanopartikülleri de içeren tıbbi farmasötik ürünlerin bu alanda kullanımını beraberinde getirmiştir (Angius ve ark., 2012; Lin MY ve ark., 2013; Gu X ve ark., 2014; Yi S ve ark., 2017; Yi S ve ark., 2019; Hosseinkhani M ve ark., 2014; Vijayavenkataraman S ve ark., 2020; Kuffler DP ve Foy C, 2020; Du J ve ark., 2018; Ye F ve ark., 2012; Braga Silva J ve ark., 2017; Amado S vd, 2010). Ding ve arkadaşları (Ding T ve ark., 2015) yavaş salınan rapamisin kaplı biyonik periferik sinir scaffoldunun (doku iskelesi) hasar sonrası sıçan siyatik sinirinin rejenerasyonu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında histolojik olarak akson rejenerasyonunun durumunu sinir liflerinin ortalama çapı ve miyelin kılıfının ortalama kalınlığı ile değerlendirmişler, elektrofizyolojik olarak sinir iletilerini ve BKAP'ni çalışmışlar, yavaş salınan rapamisin kaplı biyonik periferik sinir scaffoldunun yaralanma sonrası sıçan siyatik sinirinin yenilenmesini desteklediğini deneysel çalışmalarında göstermişlerdir. Sonuç olarak yavaş salınan rapamisin kaplı biyonik

periferik sinir scaffoldunun hasarlı bölgedeki inflamatuvar yanıtı önemli ölçüde azalttığını, periferik sinir rejenerasyonunu belirgin bir şekilde desteklediğini ve sekonder sinir hasarını azalttığını bildirmişlerdir.

Klinik pratik anlamında değerlendirildiğinde fibrin jellerin enjeksiyonla da istenilen bölgeye kolaylıkla implante edilebiliyor oluşu ve fibrin jel dolgu maddesinin fizyolojik olarak biyouyumlu ve biyoparçalanır özellikte olması ise ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabilirlikleri noktasında önemli avantajlar sağlamaktadır (Tredwell ve ark., 2006). Kollajen membranlar adezyon oluşumunu engellemesi, kullanıldığı dokuya geçici destek sağlayarak iyileşme sürecini hızlandırması gibi özellikleri sayesinde tendon tamiri, sinir rejenerasyonu, dura tamiri, spinal kord hasarı ve nöroliz gibi çok sayıda rejeneratif tıp uygulamalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Cholas RH ve ark., 2012; Owens KW ve ark., 2001; Haggerty CJ ve ark., 2015; Tordjman D ve ark., 2012; Alluin O ve ark., 2009; Pertici V ve ark., 2014; LeHuec JC ve ark., 2015; Nicot C ve ark., 2021; Dimitriou R ve ark., 2012; Choi S ve ark., 2013).

Trombositten zengin plazma (Plateletten zengin plazma ya da Platelet Rich Plasma, PRP) gibi platelet konsantreleri, yüksek konsantrasyonda büyüme faktörü içermesinden dolayı doku rejenerasyonunda başarıyla kullanılmıştır (Kuffler DP, 2013; Sánchez M ve ark., 2017; Küçük L ve ark., 2014; Roque JS ve ark., 2017; Bastami, Farshid DDS ve ark., 2017; Salarinia R ve ark., 2017; Lichtenfels M ve ark., 2013; Zhu Y ve ark., 2020; Salarinia R ve ark., 2017; Yıldız C ve Özgürtaş T, 2017). PRP'nin avantajı ameliyat odasında/hasta başında hazırlanabilmesi ve kolayca uygulanabilmesidir. Ayrıca trombositler, içerdiği alfa-granüller doku iyileşmesinde rol oynayan biyoaktif proteinleri salarlar (VEGF, PDGF, platelet kaynaklı büyüme faktörü vb.). PRP içerisindeki bu biyoaktif maddeler, fibroblast, endotel ve kök hücrelerin proliferasyonuna ve aktivasyonuna yol açar (Marx RE, 2001; Harrison P ve Cramer EM, 1993). Bu sayede, PRP ve fibrin iskeleti sinir hasarında sadece nöroprotektif, nörojenik ve nöromodülatör ilaç salınım sistemi olarak görev almakla kalmaz, aynı zamanda sinirlerde motor ve duyu fonksiyonları iyileştiren potansiyel bir teröpatik seçenek olarak ön plana çıkar (Giannessi E ve ark., 2014; Zheng C ve ark., 2016).

Mevcut literatür verileride göz önüne alınarak “Sinir rejenerasyonu amacıyla rapamisinin hasarlı bölgeye lokal olarak farklı matrikslerde uygulanması ve etkinliğinin *in vivo* olarak değerlendirilmesi” başlıklı bu projenin hipotezi; rapamisinin periferik sinir rejenerasyonu amacıyla hasarlı sinir bölgesine çözelti halinde ve farklı matriksler içerisinde lokal olarak uygulandığında, fizyolojik ve fiziksel faktörler sonucu etki bölgesinde kalış süresinin uzayacağı ve böylece etkinliğinin artabileceğidir. Bu kapsamda deney grupların planlanmasında literatür verilerini de göz önünde bulundurarak, periferik sinir rejenerasyonunda bir mTOR inhibitörü olan rapamisinin fibrin jel formülasyonu, PRP ve kollajen membran olmak üzere farklı üç matriks içerisinde lokal olarak kullanıldığında sinir rejenerasyonu artıp artmadığı karşılaştırmalı olarak değerlendirilebilmeyi hedefledik. Bu projede, ilacın çözelti halinin, ilacın çeşitli matriks sistemlerde hazırlanan kombine halinin ve söz konusu matrikslerin ilaçsız olarak uygulanması ile olası ilaç ve formülasyon etkisi net şekilde ortaya konulabilmesi ve dolayısıyla, bu proje kapsamında yapılacak olan *in vivo* deneyler sayesinde canlı ortamda da bu formülasyonların sinir rejenerasyonunda sinerjistik etkinliklerinin hem elektrofizyolojik hem de histolojik olarak araştırılarak ortaya konması ile literatüre oldukça yeni ve özgün katkılar sağlanması amaçlandı (Şekil 2.1).

5.1. Fonksiyonel ve Elektromiyonörografik Bulguların Değerlendirilmesi

Elektrodiagnostik testler TPNI olgularını değerlendirmek için kullanılan en hassas ve spesifik testlerdir. Sinir iletim çalışması (NCS) ve elektromiyografi (EMG) sıklıkla bu amaçla çalışmalarda kullanılmaktadır. NCS, demiyelinizan bozukluklarda aksonal dejenerasyonun değerlendirilmesi amacıyla sinir iletim hızlarını (NCV'ler) değerlendirmek için, EMG ise bir motor ünitenin motor unit aksiyon potansiyelini (MUAP) belirlemek için kullanılmaktadır. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) genliğindeki bir azalma aksonal kayıp derecesi ile orantılı, en güvenilir parametrelerden biridir. Aksonotmezis sonrası reinnervasyon değişiklikleri ilk olarak 2-3 ay sonra ortaya çıkar ve BKAP genliğindeki nominal artışlarla karakterizedir; ancak MUAP yapılandırmasına bağlı olarak muhtemelen daha iyi tahmin edilebilir. Hasardan 1 hafta sonra (7-9 gün) yapılan motor ileti çalışmaları sıklıkla nöropraksi, aksontemezis ayrımı ve hasarın bütünlüğü hakkında bilgi verir. Aynı ayrımı yaralanmadan 11 gün sonra duysal lifler için de yapmak mümkündür. Hasar sonrası 3-4.haftada yapılan çalışmalar yukarıdaki bilgilere ek olarak anormal spontan aktivitenin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Hasar sonrası reinnervasyonu,

hasardan sonra 3-4. ayda yapılan çalışmalar ile değerlendirmek mümkündür (Modrak M ve ark., 2020; Campbell WW., 2008; Canpolat M ve ark., 2022).

Kahraman ve arkadaşları (Kahraman I ve ark., 2015) periferik sinirlerde yaralanma sonrası rejenerasyon sürecini değerlendirdikleri çalışmalarında BKAP genliği, yükselme süresi (DT), yarı düşme süresi ($\frac{1}{2}$ FT) ve latans parametrelerini kullanmıştır. Karşıdağ ve arkadaşları (Karşıdağ S ve ark., 2008) farklı seviyelerde ve onarım tiplerindeki periferik sinir iyileşmesini değerlendirdikleri çalışmalarında, elektrofizyolojik olarak BKAP amplitdlerini, distal latansları, iletim hızlarını, histopatolojik olarak akson çap ve sayımı parametrelerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda Karşıdağ ve arkadaşları (Karşıdağ S ve ark., 2008) literatür verilerini göz önünde bulundurarak akson sayısı ve akson çapı gibi histolojik parametrelerin aksonların niceliğini ve kalitesini belirtmekle beraber işlevsel durumu hakkında yeterli bilgi vermediğini, sinir iyileşmesinin farklı dönemlerinde aksonların iyileşmesine yönelik bilgiler sağladığı için elektrofizyolojik çalışmaların periferik sinir yaralanmaları sonrasında ve iyileşme döneminde oldukça önemli bilgiler verdiğini, bu nedenle de amplitüd, latans ve ileti hızı gibi parametreleri içeren elektrofizyolojik çalışmalar ile sinir iyileşmesinin farklı dönemlerinde aksonların iyileşmesine yönelik bilgi elde edilebileceğini vurgulamışlardır (Karşıdağ S ve ark., 2008; Kanaya F ve ark., 1996; Rupp A ve ark., 2007; Nichols CM ve ark. 2005). Erbilici ve arkadaşları (Erbilici A ve ark, 2010) lazer irradyasyonunun sinir hasarı üzerine etkilerini çalışmalarında bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP), distal motor latansı (DML) ve motor sinir ileti hızını (NCV) kullanarak değerlendirmişler ve Ga-As lazerin sinir iletimi üzerine olumlu etkisi dışında sinir rejenerasyonu veya fonksiyonel iyileşme üzerine belirgin bir fayda sağlamadığını bildirmişlerdir.

Canpolat M ve arkadaşlarının (Canpolat M ve ark., 2022) *“Ratlarda Oluşturulan Siyatik Sinir Hasarının Tedavisinde Rapamisin ve Gabapentin Tedavi Yöntemlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması”* konulu çalışmalarında BKAP amplitüdü, distal latans, BKAP alanı ve iletim hızı değerlendirilmiş elektrofizyolojik bulgular genel olarak değerlendirildiğinde düşük doz 3 mg/kg rapamisin ve 6 mg/kg yüksek doz rapamisin tedavilerinin gabapentin (GBP) tedavisine benzer sonuç verdiğini ve özellikle düşük doz rapamisin tedavisinin GBP tedavisine alternatif bir tedavi seçeneği olarak göz önünde bulundurulabileceği rapor edilmiştir.

Fonksiyonel değerlendirme yöntemi olarak siyatik fonksiyonel indeks (SFI), sıçan siyatik sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için güvenilir bir indekstir ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Shen N ve Zhu J.,1995; Bain JR ve ark., 1989; Nichols CM ve ark., 2005). de Almeida Melo Maciel Manguera M ve ark (de Almeida Melo Maciel Manguera M ve ark., 2022) Sıçan siyatik sinir ezilme yaralanması modelinde düşük seviyeli lazer tedavisinden (LLLT) sonra Raman spektroskopisi ve siyatik fonksiyonel indeksi (SFI) konulu çalışmalarında nörofonksiyonel iyileşmeyi SFI ile değerlendirmişlerdir.

Bu çalışmada da hem daha önceki çalışmamız (Canpolat M ve ark., 2022) hem de literatür verileri dikkate alınarak siyatik sinir hasarı oluşturduğumuz ratlarda elektrofizyolojik olarak latans, BKAP amplitüdü, BKAP alanı ve iletim hızı verilerini değerlendirdik. Fonksiyonel değerlendirme siyatik fonksiyonel indeks (SFI) kullanılarak yapıldı (Tablo 4.2).

Gruplarda SFI ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0.042$). Sham ile PRP-RAPA ($p=0.008$), Sham ile Fibrin jel ($p=0.006$), Kollajen membran ile Sham ($p=0.003$), İP RAPA ile Sham ($p<0.001$), Kollajen membran -RAPA ile Sham ($p=0.044$), Fibrin jel ile PRP ($p=0.035$), Kollajen membran ile PRP ($p=0.020$), İP RAPA ile PRP ($p<0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardı. PRP, PRP-RAPA, Fibrin jel, Fibrin jel-RAPA, Kollajen membran, Kollajen membran-RAPA grupların ortalama değerleri kontrol grubuna yakındı. Matris-ilaç kombinasyonlarında sonuçlarının tek başına ilaç seçeneğine göre kontrol grubuna daha yakın olduğu gözlemlendi (Tablo 4.1).

Bu çalışmadaki elektrofizyolojik bulgular değerlendirildiğinde; Sham grubunda BKAP amplitüdü, BKAP alanı ve iletim hızı değerlerinin istatistiksel olarak kontrol grubuna göre daha düşük, latansın ise daha uzun olduğu saptandı (Tablo 4.2). Bu bulgu deneysel hasar modelinin başarı ile oluşturulduğunu göstermektedir. Tedavi gruplarında Kollajen membran, Kollajen membran- RAPA, İP RAPA grupları ile sham grubun latans değerleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı (Tablo 4.2). Bu gruplardaki latans değerleri kontrol grubuna yakındı. Gruplar arasında BKAP amplitüdü ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($p<0.001$). Fibrin jel – RAPA, Kollajen

membran-RAPA ve Lokal RAPA gruplarında kontrol grubuna en yakın BKAP amplitüdü ortalamaları elde edildi (Tablo 4.2).

Gruplar arasında BKAP alanı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($p<0.001$). Kontrol grubuna en yakın BKAP alanı Kollajen membran –RAPA grubunda elde edildi (Tablo 4.2).

Gruplar arasında iletim hızı (Conduction velocity) ortalamaları açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($p<0.001$). Kollajen membran, Kollajen membran-RAPA ve PRP gruplarında kontrol grubuna en yakın iletim hızı ortalamaları elde edildi (Tablo 4.2).

Tedavi grupları içinde kontrol grubuna en yakın BKAP amplitüdü, Fibrin jel – RAPA ve Kollajen membran-RAPA gruplarında, tedavi grupları içinde kontrol grubuna en yakın latans değerleri Kollajen membran-RAPA, Kollajen membran ve İP RAPA gruplarında, tedavi grupları içinde kontrol grubuna en yakın BKAP alanı Kollajen membran-RAPA grubunda, tedavi grupları içinde kontrol grubuna en yakın iletim hızı PRP, Kollajen membran-RAPA ve Kollajen membran gruplarında elde edildi. SFI ve elektrofizyolojik bulgular birlikte değerlendirildiğinde matriks-ilaç kombinasyonlarında sonuçların kontrol grubuna yakın olduğunu gözlemlendi. Özellikle BKAP amplitüdü ölçümlerinde tek başına matriks ya da tek başına ilaç seçeneğine göre matriks-ilaç kombinasyonlarında sonuçlar kontrol grubuna daha yakındı. Bu bulgularla ilaç yan etkilerinden ve sistemik komplikasyonlardan kaçınmak için lokal olarak uygulanan matriks-ilaç kombinasyonlarının etkili ve sinir rejenerasyonunda umut verici olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlarda çalışma hipotezini ve sinerjistik etkiyi destekler nitelikte bir bulgudur (Tablo 4.2).

5.2. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

Nörofilamentler (NF'ler) dokuya özgü intermediate (ara) filament sınıfları arasında yer alır. NF'ler domain yapıları ve işlevleri farklı olan dört alt birimden oluşur (NF-L [nörofilament hafif]; NF-M [nörofilament orta]; NF-H [nörofilament ağır]; ve a-internexin veya peripherin) (Yuan A ve ark, 2017). Nörofilamentler, miyelinli aksonların radyal büyümesi ve yapısal stabilitesi ve aksonlar boyunca elektriksel uyarıların optimum iletim hızına ulaşması için gereklidir (Yuan A ve ark, 2017). NF büyük miyelinli liflerde iletim hızını artırmaktadır (Yuan A ve ark, 2017). Charcot–Marie–Tooth hastalığı

(CMT2E/CMT1F), amiotrofik lateral skleroz, Alzheimer ve Parkinson hastalığı başta olmak üzere birçok hastalıkta NF bozuklukları üzerinde araştırmalar devam etmektedir (Yuan A ve ark, 2017).

Literatürde, periferik sinir hasarına duyuşal nöronlar ve motor nöronların yanıtları değerdendirdiğinde; transmitter yapımı ile ilgili enzimlerin ve nörofilament proteinlerin azaldığı, tubulin izoformlarının, aktin, GAP-43 ve büyüme faktörü reseptörleri gibi rejenerasyon ile ilgili protelerin ise sentezlerinde artış olduğı, nörofilament proteini miktarındaki azalmanın akson çapı ve iletim hızındaki dramatik azalma ile ilişkili olduğı ve akson kesisi yapılmış neonatal motonöronların hücre ölümüne daha duyarlı olduğı belirtilmektedir (Demiryürek Ş ve ark, 2002).

Farahpour ve Ghayour (Farahpour MR ve Ghayour SJ, 2014) ratlarda oluşturulan siyatik sinir hasarında sinir rejenerasyonu için acetyl-L-karnitin kullandıkları çalışmalarında, elektromiyografik bulguları, akson çap ve akson sayımı gibi morfometrik bulguları ve immünohistokimyasal olarak miyelin klif için anti-S-100'u markır olarak belirlemişlerdir. S-100 reaksiyonunun L-karnitin uygulanan grupta daha fazla pozitif olduğınu raporlamışlar, bunun hem akson rejenerasyonu ile hem de Schwann hücre benzeri hücrelerin varlığı ve miyelinasyon sürecine eşlik etmesi ile ilişkili olduğınu bildirmişler ve L-karnitin tedavisinin hem motor hem de duyuşal rejenerasyon ve reinnervasyona klinik olarak katkı sağlayabileceğini belirtmişlerdir (Farahpour MR ve Ghayour SJ, 2014).

Bir diğerd çalışmada, Mohammadi ve Amini'de (Mohammadi R ve Amini K, 2017) morfometrik olarak rejenere olan lif sayısının ve miyeline lif çapının acetyl-L-karnitin grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğınu, immünohistokimyasal incelemede ise S-100 reaksiyonunun kontrol grubuna göre daha fazla pozitif olduğınu bildirmişlerdir.

S-100'ün protein seviyesinin sinir hasarı olduğıunda azaldığı bilinmektedir, bu nedenle sinir hasarını immünohistokimyasal olarak göstermek için sıklıkla çalışmalarda kullanılmıştır. Bostan ve arkadaşları (Bostan H ve ark., 2018) analjezik ilaç enjeksiyonu ile siyatik sinir hasarı oluşturulan sıçanlardaki anti S-100 pozitifliği, miyelin dejenerasyonu, akson dejenerasyonu, epineuryum dejenerasyonu, fibroz, epineurium kalınlaşması, perinöral kalınlaşma, lenfosit infiltrasyonu, vakuolizasyon ve ödem gibi histopatolojik bulguları değerdendirdikleri çalışmalarında Anti-S100 pozitifliğinin salin grubunda en yüksek ($p<0.05$) oranda tespit edildiğini bildirmişlerdir. S100 periferik sinir dokusunda Schwann

hücrelerinin bir belirticidir. Hasarlı sinirlerde S100 negatifliği sinir hasarının bir bulgusudur (Rezajooi K ve ark., 2004). Schwann hücreleri akson yenilenmesini ve miyelin kılıflarının oluşumunu indükleyebilen, uyarabilen ve düzenleyebilen nörotrofik faktörleri salgırlar ve hücre dışı matris ve hücre adezyon molekülleri üretirler (Hu LN ve ark, 2018). S-100 pozitifliği ise sinir rejenerasyonun olumlu bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Rezajooi K ve ark., 2004).

Ilkhanizadeh ve arkadaşları (Ilkhanizadeh B ve ark., 2019) kemik iliğı kaynaklı mast hücrelerinin lokal transplantasyonunun periferik sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerini bir sıçan siyatik sinir transeksiyon modeli kullanarak değerlendirmişlerdir. Histolojik olarak morfolometrik parametreler için akson çapı, akson sayımı, myelin kılıf kalınlığı ve immünohistokimyasal olarak immünoreaktif S100 proteini kullanmışlar, sonuç olarak tedavi grubunda kontrol grubuna göre immünoreaktif S100 proteinin daha yaygın olduğunu ve S-100 protein sinyal ekspresyonunun esas olarak miyelin kılıfında bulunduğunu bildirmişlerdir. Mohammadi ve arkadaşları (Mohammadi R ve ark, 2013) sıçanlarda siyatik sinir transeksiyonu sonrası Asetil Salisilik Asitin (ASA) fonksiyonel iyileşme üzerine etkilerini morfolometrik olarak akson çapı, lif çapı, lif sayısı, miyelin lif kalınlığını, G-ratio ve immünohistokimyasal olarak da S100 kullanılarak değerlendirmişlerdir. İmmünohistokimyada, S-100 reaksiyonlarının kontrol grubuna göre daha pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Kato ve Satoh (Kato K ve Satoh T, 1983) ratlarda oluşturulan siyatik sinir hasar modelinde S-100 ve enolaz enzim düzeylerini immunoassay yöntemiyle belirlemişlerdir. Hasar döneminde (0.36µg/mg) ve sinir hasarı düzeldikten 4-9 hafta sonra yaptıkları ölçümde (0.63 µg/mg) hasar dönemine göre daha yüksek tespit edildiğini raporlamışlardır. Bu sonuçlarda bize S-100 pozitifliğiniin sinir liflerinde iyileşmenin bir markırı olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir.

Periferik sinirlerde hasar oluştuğunda aksotomize nöronlardan ve denerve Schwann hücrelerinden salınan endojen nörotrofik faktörlerin periferik sinir sistemindeki akson rejenerasyonunun desteklenmesinde kritik bir önemi vardır. Literatürde, beyin kaynaklı nörotrofik faktörün (BDNF) artışı, cAMP artışı ve tubulin, aktin, GAP-43 ve büyümeyle ilişkili genlerin hızlandırılmış up-regülasyonunun ve nörofilament proteinin down-regülasyonunun nörotrofik faktörlerin sinir rejenerasyonundaki rolünü destekler başlıca bulgular olduğu belirtilmektedir (Gordon T., 2019; Gordon T.,2010; Navarro X ve ark., 2007). Sonuçlar yorumlanırken akson ve glia hücreleri arasındaki kompleks ilişki,

nörotrofik faktörler, ekstrasellüler matriks molekülleri ve reseptörleri, eksozomlar, mikroRNA'lar da dahil olmak üzere periferik sinir rejenerasyonunda moleküler mekanizmaların oldukça kompleks olduğuda göz ardı edilmemelidir (Allodi I ve ark., 2012; Klimaschewski L ve ark., 2013; Chen ZL ve ark.,2007; Klimovich P ve ark., 2021).

Bu çalışmada sonuçlarımız değerlendirildiğinde; akson çaplarının Sham grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı, Fibrin jel ile Sham ($p<0.001$), Kollajen membran ile Sham ($p<0.001$), PRP ile Sham ($p<0.001$), Lokal RAPA ile Sham ($p<0.001$), Fibrin jel-RAPA ile Sham ($p<0.001$), Kollajen membran-RAPA ile Sham ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Sham ($p<0.001$), İP RAPA ile Sham ($p<0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo 4.3). Matriks ve Matriks-ilaç kombinasyonlarının akson çapları değerlendirildiğinde Matriks-ilaç kombinasyonlarında sonuçlarının kontrol grubuna daha yakın olduğu gözlemlendi. Bu da sinerjistik etkiyi destekler nitelikte bir bulgudur. Kontrol grubuna en yakın değer PRP-RAPA grubunda elde edildi (Tablo 4.3)

Benzer şekilde Sham grubunun akson sayısının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Fibrin jel-RAPA ile Sham ($p=0.038$), Kollajen membran-RAPA ile Sham ($p=0.023$), PRP-RAPA ile Sham ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Fibrin jel ($p=0.006$), PRP-RAPA ile Kollajen membran ($p<0.001$), PRP-RAPA ile PRP ($p=0.047$), PRP-RAPA ile Lokal RAPA ($p=0.004$), İP RAPA ile Fibrin jel-RAPA ($p=0.013$), İP RAPA ile Kollajen membran-RAPA ($p=0.007$), İP-RAPA ile PRP-RAPA ($p<0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı (Tablo 4.4). Matriks-ilaç kombinasyonlarında sonuçlarının kontrol grubuna daha yakın olduğu gözlemlendi ve tek başına matriks ya da tek başına ilaç seçeneğine göre daha iyi olduğu saptandı. Bu bulguda çalışma hipotezini ve sinerjistik etkiyi destekler nitelikte bir bulgudur. Kontrol grubuna en yakın değerler PRP-RAPA ve Kollajen membran-RAPA grubunda elde edildi (Tablo 4.4).

İmmünohistokimyasal olarak NF, GAP-43 ve S100 immünreaktivite yoğunlukları değerlendirildiğinde S100 immün yoğunluğu değerlerine göre grup ortalamaları arasında yapılan karşılaştırma sonuçlarına göre anlamlı bir farklılık olduğu bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 4.5). Kollajen membran ile Sham ($p=0.040$), PRP ile Sham ($p=0.003$), Kollajen membran-RAPA ile Sham ($p=0.004$), PRP-RAPA ile Sham ($p<0.001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı. Matriks-ilaç kombinasyonlarında sonuçlarının kontrol grubuna daha yakın olduğu gözlemlendi. Tek başına matriks ya da ilaç seçeneğine göre daha

iyi olduğu ve S-100 yoğunluğunun daha fazla olduğu saptandı. Bu bulguda çalışma hipotezini ve sinerjistik etkiyi destekler nitelikte bir bulgudur.

Gruplar arasında NF ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0.005$). Gruplara göre NF değişkeninin çoklu karşılaştırma testine göre, İP RAPA - Sham ($p=0.024$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı. Sham grubunda NF değerinin en düşük olarak saptandığı gözlemlendi. En yüksek NF değeri ise İP RAPA grubunda saptandı. Matriks-ilaç kombinasyonlarında sonuçlarının tek başına matriks seçeneğine göre kontrol grubuna daha yakın olduğu gözlemlendi (Tablo 4.6).

Benzer şekilde bu çalışmada, gruplar arasında GAP-43 ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($p<0.001$). Sham ile Kontrol ($p=0.004$), Kollajen membran ile Sham ($p<0.001$), Lokal RAPA ile Sham ($p=0.007$), Fibrin jel-RAPA ile Sham ($p<0.001$), Kollajen-RAPA ile Sham ($p<0.001$), PRP-RAPA ile Sham ($p<0.001$), İP RAPA ile Sham ($p=0.011$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı. Matriks-ilaç kombinasyonlarında sonuçlarının kontrol grubuna daha yakın olduğu gözlemlendi. Tek başına matriks ya da ilaç seçeneğine göre daha iyi olduğu ve GAP-43 yoğunluğunun daha fazla olduğu saptandı. Bu bulguda çalışma hipotezini ve sinerjistik etkiyi destekler nitelikte bir bulgudur (Tablo 4.6).

Sonuç olarak elde ettiğimiz elektrofizyolojik bulgular, ışık mikroskopik düzeyinde histolojik bulgular ve immünohistokimyasal bulgular birlikte değerlendirildiğinde, Matriks-ilaç kombinasyonlarında sonuçlarının kontrol grubuna daha yakın olduğu ve tek başına matriks seçeneğine göre daha iyi olduğu gözlemlendi. Bu bulguda çalışma hipotezini ve sinerjistik etkiyi destekler nitelikte olup ilaç yan etkilerinden ve sistemik komplikasyonlardan kaçınmak için lokal olarak uygulanan matriks-ilaç kombinasyonlarının etkili ve sinir rejenerasyonunda umut verici olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

“Sinir rejenerasyonu amacıyla rapamisinin hasarlı bölgeye lokal olarak farklı matrikslerde uygulanması ve etkinliğinin in vivo olarak değerlendirilmesi” başlıklı bu projenin hipotezi; rapamisinin periferik sinir rejenerasyonu amacıyla hasarlı sinir bölgesine çözelti halinde ve farklı matriksler içerisinde lokal olarak uygulandığında, fizyolojik ve fiziksel faktörler sonucu etki bölgesinde kalış süresinin uzayacağı ve böylece etkinliğinin artabileceğidir. Bu hipotez doğrultusunda bir mTOR inhibitörü olan rapamisin, hasarlı siyatik sinir bölgesinde istenilen konsantrasyonda ve daha uzun süre etkinlik göstermesi için lokal ilaç taşıyıcı sistem görevi göreceğ olan fibrin jel, PRP ve kollajen membran ile hazırlanmış farklı üç matriks formülasyonu şeklinde hazırlanarak uygulanmıştır. Bu proje sonucunda lokal olarak uygulanan bu formülasyonların siyatik sinir rejenerasyonunu üzerine olumlu sinerjistik etki gösterdiği fonksiyonel, elektrofizyolojik, histomorfometrik ve immünfloresan boyamalar ile gösterilmiştir, bu formülasyonlarda kullanılacak olan rapamisinin en uygun lokal doz aralığının belirlenmesi ve bunların insanlarda da kullanılabilirliğinin araştırması için ileri farmasötik çalışmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

- Abe N, Borson SH, Gambello MJ, Wang F, Cavalli V. Mammalian target of rapamycin (mTOR) activation increases axonal growth capacity of injured peripheral nerves. *J Biol Chem*. 2010;285(36):28034-43. doi: 10.1074/jbc.M110.125336.
- Aijie C, Xuan L, Huimin L, Yanli Z, Yiyuan K, Yuqing L, Longquan S. Nanoscaffolds in promoting regeneration of the peripheral nervous system. *Nanomedicine (Lond)*. 2018;13(9):1067-1085. doi: 10.2217/nnm-2017-0389.
- Akakın D, Kolbaşı B. Periferik sinir çalışmalarında histolojik incelemeler: Morfometrik analiz ve sinir lifi ayırma (teasing) yöntemi, *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*, 2014;7(2): 49-55.
- Aksu R, Uğur F, Bicer C, Menkü A, Güler G, Madenoğlu H, Canpolat DG, Boyacı A. The efficiency of pulsed radiofrequency application on L5 and l6 dorsal roots in rabbits developing neuropathic pain. *Reg Anesth Pain Med*. 2010;35(1):11-5. doi: 10.1097/AAP.0b013e3181c76c21.
- Alles SRA, Smith PA. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacol Rev*. 2018;70(2):315-347. doi: 10.1124/pr.117.014399.
- Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*. 2012;98(1):16-37. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.005.
- Alluin O, Wittmann C, Marqueste T, Chabas JF, Garcia S, Lavaut MN, Guinard D, Feron F, Decherchi P. Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide. *Biomaterials*. 2009;30(3):363-73. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.043.
- Amado S, Rodrigues JM, Luís AL, Armada-da-Silva PA, Vieira M, Gartner A, Simões MJ, Veloso AP, Fornaro M, Raimondo S, Varejão AS, Geuna S, Maurício AC. Effects of collagen membranes enriched with in vitro-differentiated N1E-115 cells on rat

- sciatic nerve regeneration after end-to-end repair. *J Neuroeng Rehabil.* 2010;7:7. doi: 10.1186/1743-0003-7-7.
- Angius D, Wang H, Spinner RJ, Gutierrez-Cotto Y, Yaszemski MJ, Windebank AJ. A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials.* 2012;33(32):8034-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.056.
- Bai J, Zhang Y, Fan Q, Xu J, Shan H, Gao X, Ma Q, Sheng L, Zheng X, Cheng W, Li D, Zhang M, Hao Y, Feng L, Chen Q, Zhou X, Wang C. Reactive Oxygen Species-Scavenging Scaffold with Rapamycin for Treatment of Intervertebral Disk Degeneration. *Adv Healthc Mater.* 2020;9(3):e1901186. doi: 10.1002/adhm.201901186.
- 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. doi: 10.1097/00006534-198901000-00024.
- Barnes SL, Miller TA, Simon NG. Traumatic peripheral nerve injuries: diagnosis and management. *Curr Opin Neurol.* 2022;35(6):718-727. doi: 10.1097/WCO.0000000000001116. PMID: 36367041.
- Bastami F, Vares P, Khojasteh A. Healing Effects of Platelet-Rich Plasma on Peripheral Nerve Injuries. *J Craniofac Surg.* 2017;28(1):e49-e57. doi: 10.1097/SCS.00000000000003198.
- Berger JV, Knaepen L, Janssen SP, Jaken RJ, Marcus MA, Joosten EA, Deumens R. Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Res Rev.* 2011;67(1-2):282-310. doi: 10.1016/j.brainresrev.2011.03.003.
- Bhang SH, Jeon O, Choi CY, Kwon YH, Kim BS. Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel. *J Biomed Mater Res A.* 2007;80(4):998-1002. doi: 10.1002/jbm.a.31050.
- Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2002;18(1):27-33. doi: 10.1055/s-2002-19824.
- Bostan H, Cabalar M, Altinay S, Kalkan Y, Tumkaya L, Kanat A, Balik S, Erkut A, Altuner D, Salihoglu Z, Kocer A. Sciatic nerve injury following analgesic drug

- injection in rats: A histopathological examination. *North Clin Istamb.* 2018;5(3):176-185. doi: 10.14744/nci.2017.28190.
- Bozkurt A, Lassner F, O'Dey D, Deumens R, Böcker A, Schwendt T, Janzen C, Suschek CV, Tolba R, Kobayashi E, Sellhaus B, Tholl S, Eummelen L, Schügner F, Damink LO, Weis J, Brook GA, Pallua N. The role of microstructured and interconnected pore channels in a collagen-based nerve guide on axonal regeneration in peripheral nerves. *Biomaterials.* 2012;33(5):1363-75. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.069.
- Braga Silva J, Marchese GM, Cauduro CG, Debiasi M. Nerve conduits for treating peripheral nerve injuries: A systematic literature review. *Hand Surg Rehabil.* 2017;36(2):71-85. doi: 10.1016/j.hansur.2016.10.212.
- Bridges D, Thompson SW, Rice AS. Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth.* 2001;87(1):12-26. doi: 10.1093/bja/87.1.12.
- Brougham CM, Levingstone TJ, Jockenhoevel S, Flanagan TC, O'Brien FJ. Incorporation of fibrin into a collagen-glycosaminoglycan matrix results in a scaffold with improved mechanical properties and enhanced capacity to resist cell-mediated contraction. *Acta Biomater.* 2015;26:205-14. doi: 10.1016/j.actbio.2015.08.022.
- Burks SS, Diaz A, Haggerty AE, Oliva N, Midha R, Levi AD. Schwann cell delivery via a novel 3D collagen matrix conduit improves outcomes in critical length nerve gap repairs. *J Neurosurg.* 2021;1-11. doi: 10.3171/2020.8.JNS202349.
- Caillaud M, Richard L, Vallat JM, Desmoulière A, Billet F. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. *Neural Regen Res.* 2019;14(1):24-33. doi: 10.4103/1673-5374.243699.
- Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol.* 2008;119(9):1951-65. doi: 10.1016/j.clinph.2008.03.018.
- Canpolat DG, Soylu E, Dogruel F, Kütük N, Ugur F. Comparison of the analgesic effects of pulse radiofrequency and cryoablation in rabbits with mental nerve neuropathic pain. *Niger J Clin Pract.* 2018;21(5):585-590. doi: 10.4103/njcp.njcp_134_17.
- Canpolat M, Çolpak HA, Günay Canpolat D, Önder GÖ, Yetkin MF, Yay AH, et al. Comparison of the Effectiveness of Rapamycin and Gabapentin Treatment in Rats with Induced Sciatic Nerve Injury. *Erciyes Med J* 2022; 44(1): 56–62.

- Canpolat M, Gumus H, Kumandas S, Coskun A, Per H. The use of rapamycin in patients with tuberous sclerosis complex: Long-term results. *Epilepsy Behav.* 2018;88:357-364. doi: 10.1016/j.yebeh.2018.09.020.
- Canpolat M, Per H, Gumus H, Yikilmaz A, Unal E, Patiroglu T, Cinar L, Kurtsoy A, Kumandas S. Rapamycin has a beneficial effect on controlling epilepsy in children with tuberous sclerosis complex: results of 7 children from a cohort of 86. *Childs Nerv Syst.* 2014;30(2):227-40. doi: 10.1007/s00381-013-2185-6
- Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:209-33.
- Choi S, Choi HJ, Cheong Y, Lim YJ, Park HK. Internal-specific morphological analysis of sciatic nerve fibers in a radiofrequency-induced animal neuropathic pain model. *PLoS One.* 2013;8(9):e73913. doi: 10.1371/journal.pone.0073913.
- Cholas RH, Hsu HP, Spector M. The reparative response to cross-linked collagen-based scaffolds in a rat spinal cord gap model. *Biomaterials.* 2012;33(7):2050-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.028.
- Christie KJ, Webber CA, Martinez JA, Singh B, Zochodne DW. PTEN inhibition to facilitate intrinsic regenerative outgrowth of adult peripheral axons. *J Neurosci.* 2010;30(27):9306-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6271-09.2010.
- Cinar SL, Kartal D, Bayram AK, Canpolat M, Borlu M, Ferahbas A, Per H. Topical sirolimus for the treatment of angiofibromas in tuberous sclerosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2017;83(1):27-32. doi: 10.4103/0378-6323.190844.
- Contreras E, Bolívar S, Navarro X, Udina E. New insights into peripheral nerve regeneration: The role of secretomes. *Exp Neurol.* 2022;354:114069. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114069
- Costa BL, Machado RR, Paiva MRB, Serakides R, Coelho MM, Silva-Cunha A, Fialho SL. Sirolimus-loaded biodegradable implants induce long lasting anti-inflammatory and antiangiogenic effects. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 2018;44: 373- 379.doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.018.
- CovaTM, [BIOM UP | COVA – Kollajen Membran | Gelişim Medikal \(gelisimmedikal.com\)](http://BIOM_UP|COVA-KollajenMembran|GelişimMedikal(gelisimmedikal.com)), ©2015 Gelişimmedikal.com.
- Çolpak HA, Gönen ZB, Özdamar S, Alkan A, Kütük N. Vertical ridge augmentation using guided bone regeneration procedure and dental pulp derived mesenchymal stem

- cells with simultaneous dental implant placement: A histologic study in a sheep model. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2019;120(3):216-223. doi: 10.1016/j.jormas.2018.12.011.
- de Almeida Melo Maciel Mangueira M, Caparelli-Dáquer E, Filho OPG, de Assis DSFR, Sousa JKC, Lima WL, Pinheiro ALB, Silveira L Jr, Mangueira NM. Raman spectroscopy and sciatic functional index (SFI) after low-level laser therapy (LLLT) in a rat sciatic nerve crush injury model. *Lasers Med Sci.* 2022;37(7):2957-2971. doi: 10.1007/s10103-022-03565-5.
- Demiryürek Ş, Demiyürek AT, Babül A. Periferik Sinir Hasarı ve Dejenerasyonu. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 2002;27: 43-53,
- Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, Brook GA. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. *Prog Neurobiol.* 2010;92(3):245-76. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.10.002.
- Dikmen PY, Öge E. “Periferik Sinirlerin Akut Fokal Lezyonları.” *Nöroloji Temel Kitabı* (Editör. Emre M), Güneş Tıp Kitapevleri, I. Baskı, Ankara, 2013, p.487-493
- Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med.* 2012;10:81. doi: 10.1186/1741-7015-10-81.
- Ding T, Zhu C, Kou ZZ, Yin JB, Zhang T, Lu YC, Wang LY, Luo ZJ, Li YQ. Neural tissue engineering scaffold with sustained RAPA release relieves neuropathic pain in rats. *Life Sci.* 2014;112(1-2):22-32. doi: 10.1016/j.lfs.2014.07.011.
- Ding T, Zhu C, Yin JB, Zhang T, Lu YC, Ren J, Li YQ. Slow-releasing rapamycin-coated bionic peripheral nerve scaffold promotes the regeneration of rat sciatic nerve after injury. *Life Sci.* 2015;122:92-9. doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.005.
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158-67. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009.
- Du J, Chen H, Qing L, Yang X, Jia X . Biomimetic neural scaffolds: a crucial step towards optimal peripheral nerve regeneration. *Biomater Sci.* 2018;6(6):1299-1311. doi: 10.1039/c8bm00260f.

- Erbilici A, Ünlü E, Şirin YS, Besaltı Ö, Cakıcı A. Ga-As (904nm) Lazer Irradyasyonunun Ratlarda Siyatik Sinir Hasarı Üzerine Etkileri. *J.Clin.Anal.Med.* 2010;1(3):23-27, DOI: 10.4328/JCAM.10.3.11
- Falke LL, van Vuuren SH, Kazazi-Hyseni F, Ramazani F, Nguyen TQ, Veldhuis GJ, Maarseveen EM, Zandstra J, Zuidema J, Duque LF, Steendam R, Popa ER, Kok RJ, Goldschmeding R. Local therapeutic efficacy with reduced systemic side effects by rapamycin-loaded subcapsular microspheres. *Biomaterials.* 2015;42:151-60. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.042.
- Farahpour MR, Ghayour SJ. Effect of in situ delivery of acetyl-L-carnitine on peripheral nerve regeneration and functional recovery in transected sciatic nerve in rat. *Int J Surg.* 2014;12(12):1409-15. doi: 10.1016/j.ijssu.2014.10.023
- Fertala J, Rivlin M, Wang ML, Beredjiklian PK, Steplewski A, Fertala A. Collagen-rich deposit formation in the sciatic nerve after injury and surgical repair: A study of collagen-producing cells in a rabbit model. *Brain Behav.* 2020;10(10):e01802. doi: 10.1002/brb3.1802.
- Gao YB, Liu ZG, Lin GD, Guo Y, Chen L, Huang BT, Yin YB, Yang C, Sun LY, Rong YB, Chen S. Safety and efficacy of a nerve matrix membrane as a collagen nerve wrapping: a randomized, single-blind, multicenter clinical trial. *Neural Regen Res.* 2021;16(8):1652-1659. doi: 10.4103/1673-5374.303040.
- Gessmann J, Seybold D, Peter E, Schildhauer TA, Köller M. Alignment of the Fibrin Network Within an Autologous Plasma Clot. *Tissue Eng Part C Methods.* 2016;22(1):30-7. doi: 10.1089/ten.tec.2015.0207.
- Geyik S, Geyik M, Yigiter R, Kuzudisli S, Saglam S, Elci MA, Yilmaz M. Preventing Sciatic Nerve Injury due to Intramuscular Injection: Ten-Year Single-Center Experience and Literature Review. *Turk Neurosurg.* 2017;27(4):636-640. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.16956-16.1.
- Giannessi E, Coli A, Stornelli MR, Miragliotta V, Pirone A, Lenzi C, Burchielli S, Vozzi G, De Maria C, Giorgetti M. An autologously generated platelet-rich plasma suturable membrane may enhance peripheral nerve regeneration after neurotomy in an acute injury model of sciatic nerve neurotmesis. *J Reconstr Microsurg.* 2014;30(9):617-26. doi: 10.1055/s-0034-1372483

- Gilles FH, Matson DD. Sciatic nerve injury following misplaced gluteal injection. *J Pediatr*. 1970;76(2):247-54. doi: 10.1016/s0022-3476(70)80170-6.
- Gordon T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. *J Commun Disord*. 2010;43(4):265-73. doi: 10.1016/j.jcomdis.2010.04.003
- Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus*. 2009;26(2):E3. doi: 10.3171/FOC.2009.26.2.E3.
- Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 2014;35(24):6143-56. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.064.
- Gündüz Ö, Topuz RD, Ulugöl A. Nöropatik Ağrı Modelleri. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*. 2014;7(2):12-21.
- Hadamitzky M, Herring A, Keyvani K, Doenlen R, Krügel U, Bösch K, Orlowski K, Engler H, Schedlowski M. Acute systemic rapamycin induces neurobehavioral alterations in rats. *Behav Brain Res*. 2014;273:16-22. doi: 10.1016/j.bbr.2014.06.056.
- Haggerty CJ, Vogel CT, Fisher GR. Simple bone augmentation for alveolar ridge defects. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2015;27(2):203-26. doi: 10.1016/j.coms.2015.01.011.
- Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 1993;7(1):52-62. doi: 10.1016/0268-960x(93)90024-x.
- Hosseinkhani M, Mehrabani D, Karimfar MH, Bakhtiyari S, Manafi A, Shirazi R. Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine. *World J Plast Surg*. 2014;3(1):3-7.
- Hu LN, Tian JX, Gao W, Zhu J, Mou FF, Ye XC, Liu YP, Lu PP, Shao SJ, Guo HD. Electroacupuncture and moxibustion promote regeneration of injured sciatic nerve through Schwann cell proliferation and nerve growth factor secretion. *Neural Regen Res*. 2018;13(3):477-483.
- Hu Y, Chen Z, Wang H, Guo J, Cai J, Chen X, Wei H, Qi J, Wang Q, Liu H, Zhao Y, Chai R. Conductive Nerve Guidance Conduits Based on Morpho Butterfly Wings for Peripheral Nerve Repair. *ACS Nano*. 2022;16(2):1868-1879. doi: 10.1021/acsnano.1c11627.
- Huang HC, Chen L, Zhang HX, Li SF, Liu P, Zhao TY, Li CX. Autophagy Promotes Peripheral Nerve Regeneration and Motor Recovery Following Sciatic Nerve Crush

- Injury in Rats. *J Mol Neurosci*. 2016;58(4):416-23. doi: 10.1007/s12031-015-0672-9.
- Huang Z, Wang W, Ma J, Li B, Chen J, Yang H, Saijilafu. mTOR signaling pathway differently regulates central and peripheral axon regeneration. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2017;49(8):689-695. doi: 10.1093/abbs/gmx068.
- Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 2011;152(10):2204-5. doi: 10.1016/j.pain.2011.06.017
- Jeon O, Kang SW, Lim HW, Hyung Chung J, Kim BS. Long-term and zero-order release of basic fibroblast growth factor from heparin-conjugated poly(L-lactide-co-glycolide) nanospheres and fibrin gel. *Biomaterials*. 2006;27(8):1598-607. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.030.
- Jiang L, Mee T, Zhou X, Jia X. Augmenting Peripheral Nerve Regeneration with Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(2):544-558. doi: 10.1007/s12015-021-10236-5.
- Jung Kim H, Hyun Park S. Sciatic nerve injection injury. *J Int Med Res*. 2014;42(4):887-97. doi: 10.1177/0300060514531924.
- Kadioglu HH. Sciatic Nerve Injuries from Gluteal Intramuscular Injection According to Records of the High Health Council. *Turk Neurosurg*. 2018;28(3):474-478. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.19789-16.4.
- Kahraman I, Güven M, Dokuyucu R, Sefil F, Günay İ. Klodronat Periferik Sinirlerde Yaralanma Sonrası Rejenerasyon Sürecini Hızlandırır mı?. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*. 2015;21:6:21-29. Doi: 10.17944/mkutfd.79676.
- Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98(7):1264-71
- Karabey-Akyurek Y, Gurcay AG, Gurcan O, Turkoglu OF, Yabanoglu-Ciftci S, Eroglu H, Sargon MF, Bilensoy E, Oner L. Localized delivery of methylprednisolone sodium succinate with polymeric nanoparticles in experimental injured spinal cord model. *Pharm Dev Technol*. 2017;22(8):972-981. doi: 10.3109/10837450.2016.1143002.
- Karşıdağ S, Ozcan A, Sahin S, Karşıdağ S, Kabukçuoğlu F, Uğurlu K, Baş L. Farkli seviyelerde ve onarım tiplerindeki periferik sinir iyileşmesinin elektrofizyolojik ve

- histopatolojik olarak değerlendirilmesi [Electrophysiologic and histopathologic evaluation of peripheral nerve regeneration at different nerve segments and with different repair techniques]. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2008;42(4):278-83. Turkish. doi: 10.3944/aott.2008.278.
- Kato K, Satoh T. Changes in the concentration of enolase isozymes and S-100 protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerve. *J Neurochem.* 1983;40(4):1076-81.
- Kim DH, Murovic JA, Tiel R, Kline DG. Management and outcomes in 353 surgically treated sciatic nerve lesions. *J Neurosurg.* 2004;101(1):8-17. doi: 10.3171/jns.2004.101.1.0008.
- Kim KH, Seo HJ, Abdi S, Huh B. All about pain pharmacology: what pain physicians should know. *Korean J Pain.* 2020;33(2):108-120. doi: 10.3344/kjp.2020.33.2.108.
- Klimaschewski L, Hausott B, Angelov DN. The pros and cons of growth factors and cytokines in peripheral axon regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2013;108:137-71. doi: 10.1016/B978-0-12-410499-0.00006-X
- Klimovich P, Rubina K, Sysoeva V, Semina E. New Frontiers in Peripheral Nerve Regeneration: Concerns and Remedies. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13380. doi: 10.3390/ijms222413380.
- Knezevic NN, Candido KD, Desai R, Kaye AD. Is Platelet-Rich Plasma a Future Therapy in Pain Management? *Med Clin North Am.* 2016;100(1):199-217. doi: 10.1016/j.mcna.2015.08.014.
- Ko PY, Yang CC, Kuo YL, Su FC, Hsu TI, Tu YK, Jou IM. Schwann-Cell Autophagy, Functional Recovery, and Scar Reduction After Peripheral Nerve Repair. *J Mol Neurosci.* 2018;64(4):601-610. doi: 10.1007/s12031-018-1056-8.
- Kram HB, Bansal M, Timberlake O, Shoemaker WC. Antibacterial effects of fibrin glue-antibiotic mixtures. *J Surg Res.* 1991;50(2):175-8. doi: 10.1016/0022-4804(91)90243-f.
- Kuehn C, Fülöp T, Lakey JR, Vermette P. Young porcine endocrine pancreatic islets cultured in fibrin and alginate gels show improved resistance towards human monocytes. *Pathol Biol (Paris).* 2014;62(6):354-64. doi: 10.1016/j.patbio.2014.07.010.
- Kuffler DP, Foy C. Restoration of Neurological Function Following Peripheral Nerve Trauma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1808. doi: 10.3390/ijms21051808.

- Kuffler DP. Platelet-rich plasma and the elimination of neuropathic pain. *Mol Neurobiol.* 2013;48(2):315-32. doi: 10.1007/s12035-013-8494-7.
- Küçük L, Günay H, Erbaş O, Küçük Ü, Atamaz F, Coşkunol E. Effects of platelet-rich plasma on nerve regeneration in a rat model. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2014;48(4):449-54. doi: 10.3944/AOTT.2014.13.0029.
- Küçük M, Çevik A, Kalaycı R. Laboratuvar Hayvanlarında Temel Uygulamalar: Laboratuvar Hayvanlarından Kan Alma Teknikleri. *Deneysel Tıp Dergisi.* 2017;7(14):12-20.
- Lai VK, Lake SP, Frey CR, Tranquillo RT, Barocas VH. Mechanical behavior of collagen-fibrin co-gels reflects transition from series to parallel interactions with increasing collagen content. *J Biomech Eng.* 2012;134(1):011004. doi: 10.1115/1.4005544.
- LeHuec JC, Sadikki R, Cogniet A, Rigal J, Demezou H, Aunoble S. Role of a collagen membrane in adhesion prevention strategy for complex spinal surgeries. *Int Orthop.* 2015;39(7):1383-90. doi: 10.1007/s00264-015-2767-x.
- Lepić S, Lepić M, Banjanin N, Mandić-Rajčević S, Rasulić L. A review of the diet, nutrients, and supplementation potential for the outcome augmentation in surgical treatment of peripheral nerve injuries. *Front Surg.* 2022;9:942739. doi: 10.3389/fsurg.2022.942739.
- Li G, Han Q, Lu P, Zhang L, Zhang Y, Chen S, Zhang P, Zhang L, Cui W, Wang H, Zhang H. Construction of Dual-Biofunctionalized Chitosan/Collagen Scaffolds for Simultaneous Neovascularization and Nerve Regeneration. *Research (Wash D C).* 2020;2020:2603048. doi: 10.34133/2020/2603048.
- Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.* 2014;19(3):373-9. doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.001.
- Lichtenfels M, Colomé L, Sebben AD, Braga-Silva J. Effect of Platelet Rich Plasma and Platelet Rich Fibrin on sciatic nerve regeneration in a rat model. *Microsurgery.* 2013;33(5):383-90. doi: 10.1002/micr.22105.
- Lin MY, Manzano G, Gupta R. Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin.* 2013;29(3):331-48. doi: 10.1016/j.hcl.2013.04.003.
- Lin Q, Chen H, Lu C, Wang B, Zhang Y, He X, Yu B. Effects of ozone on sciatic nerve in rat. *Interv Neuroradiol.* 2011;17(3):281-5. doi: 10.1177/159101991101700301.

- Lisi L, Aceto P, Navarra P, Dello Russo C. mTOR kinase: a possible pharmacological target in the management of chronic pain. *Biomed Res Int*. 2015;2015:394257. doi: 10.1155/2015/394257.
- Liu F, Xu H, Huang H. A novel kartogenin-platelet-rich plasma gel enhances chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and promotes wounded meniscus healing in vivo. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):201. doi: 10.1186/s13287-019-1314-x.
- Liu F, Zhang H, Zhang K, Wang X, Li S, Yin Y. Rapamycin promotes Schwann cell migration and nerve growth factor secretion. *Neural Regen Res*. 2014;9(6):602-9. doi: 10.4103/1673-5374.130101.
- Liu K, Cao G, Zhang X, Liu R, Zou W, Wu S. Pretreatment with intraluminal rapamycin nanoparticle perfusion inhibits neointimal hyperplasia in a rabbit vein graft model. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:853-60. doi: 10.2147/IJN.S13112.
- Liu S, Huang L, Geng Y, He J, Chen X, Xu H, Li R, Wang Y, Ding Y, Liu X. Rapamycin inhibits spermatogenesis by changing the autophagy status through suppressing mechanistic target of rapamycin-p70S6 kinase in male rats. *Mol Med Rep*. 2017;16(4):4029-4037. doi: 10.3892/mmr.2017.7120.
- Liu Y, Dong R, Zhang C, Yang Y, Xu Y, Wang H, Zhang M, Zhu J, Wang Y, Sun Y, Zhang Z. Therapeutic effects of nerve leachate-treated adipose-derived mesenchymal stem cells on rat sciatic nerve injury. *Exp Ther Med*. 2020;19(1):223-231. doi: 10.3892/etm.2019.8203.
- Lopes B, Sousa P, Alvites R, Branquinho M, Sousa AC, Mendonça C, Atayde LM, Luís AL, Varejão ASP, Maurício AC. Peripheral Nerve Injury Treatments and Advances: One Health Perspective. *Int J Mol Sci*. 2022;23(2):918. doi: 10.3390/ijms23020918.
- Lu Z, Liu F, Chen L, Zhang H, Ding Y, Liu J, Wong M, Zeng LH. Effect of Chronic Administration of Low Dose Rapamycin on Development and Immunity in Young Rats. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135256. doi: 10.1371/journal.pone.0135256.
- Ma X, Du W, Wang W, Luo L, Huang M, Wang H, Lin R, Li Z, Shi H, Yuan T, Jiang W, Worley PF, Xu T. Persistent Rheb-induced mTORC1 activation in spinal cord neurons induces hypersensitivity in neuropathic pain. *Cell Death Dis*. 2020;11(9):747. doi: 10.1038/s41419-020-02966-0.

- Marone P, Monzillo V, Segù C, Antoniazzi E. Antibiotic-impregnated fibrin glue in ocular surgery: in vitro antibacterial activity. *Ophthalmologica*. 1999;213(1):12-5. doi: 10.1159/000027386.
- Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8. doi: 10.1097/00008505-200110000-00002.
- Mashhoudi Barez M, Tajziehchi M, Heidari MH, Bushehri A, Moayer F, Mansouri N, Safavi Naini N, Movafagh A. Stimulation Effect of Low Level Laser Therapy on Sciatic Nerve Regeneration in Rat. *J Lasers Med Sci*. 2017;8(Suppl 1):S32-S37. doi: 10.15171/jlms.2017.s7.
- McAllister BS, Haghighat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol*. 2007;78(3):377-96. doi: 10.1902/jop.2007.060048.
- Meregalli C, Marjanovic I, Scali C, Monza L, Spinoni N, Galliani C, Brivio R, Chiorazzi A, Ballarini E, Rodriguez-Menendez V, Carozzi VA, Alberti P, Fumagalli G, Pozzi E, Canta A, Quartu M, Briani C, Oggioni N, Marmiroli P, Cavaletti G. High-dose intravenous immunoglobulins reduce nerve macrophage infiltration and the severity of bortezomib-induced peripheral neurotoxicity in rats. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):232. doi: 10.1186/s12974-018-1270-x.
- Modrak M, Talukder MAH, Gurgenshvili K, Noble M, Elfar JC. Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. *J Neurosci Res*. 2020;98(5):780-795. doi: 10.1002/jnr.24538.
- Mohammadi R, Amini K, Abdollahi-Pirbazari M, Yousefi A. Acetyl salicylic acid locally enhances functional recovery after sciatic nerve transection in rat. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2013;53(12):839-46.
- Mohammadi R, Amini K. Topically-administered acetyl-L-carnitine increases sciatic nerve regeneration and improves functional recovery after tubulization of transected short nerve gaps. *J Neurosurg Sci*. 2017;61(4):395-402. doi: 10.23736/S0390-5616.16.02845-9.
- Mohan SP, Jaishangar N, Devy S, Narayanan A, Cherian D, Madhavan SS. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Periodontal Regeneration: A Review. *J Pharm Bioallied Sci*. 2019;11(Suppl 2):S126-S130. doi: 10.4103/JPBS.JPBS_41_19.

- Myckatyn TM, Ellis RA, Grand AG, Sen SK, Lowe JB 3rd, Hunter DA, Mackinnon SE. The effects of rapamycin in murine peripheral nerve isografts and allografts. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(7):2405-17. doi: 10.1097/00006534-200206000-00035.
- Nakayama K, Takakuda K, Koyama Y, Itoh S, Wang W, Shirahama N, Mukai T. Regeneration of peripheral nerves by bioabsorbable polymer tubes with fibrin gel. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007;7(3):730-3. doi: 10.1166/jnn.2007.519.
- Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*. 2007;82(4):163-201.
- Nichols CM, Myckatyn TM, Rickman SR, Fox IK, Hadlock T, Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res*. 2005;163(2):143-58. doi: 10.1016/j.bbr.2005.05.003.
- Nicks J, Lee S, Harris A, Falk DJ, Todd AG, Arredondo K, Dunn WA Jr, Notterpek L. Rapamycin improves peripheral nerve myelination while it fails to benefit neuromuscular performance in neuropathic mice. *Neurobiol Dis*. 2014;70:224-36. doi: 10.1016/j.nbd.2014.06.023.
- Nicot C, Césari B, Saint-Cast Y, Raimbeau G, Rabarin F. Benefits of a collagen membrane for recurrent ulnar nerve entrapment at the elbow: A series of 40 cases. *Hand Surg Rehabil*. 2021;40(2):145-149. doi: 10.1016/j.hansur.2020.11.003.
- O'Connor AB. Neuropathic pain: quality-of-life impact, costs and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics*. 2009;27(2):95-112. doi: 10.2165/00019053-200927020-00002.
- Oğuzhanoğlu A, Kurt T, Sahiner T. Nerve conduction parameters during ischemia-reperfusion in the rat sciatic nerve. *Electromyogr Clin Neurophysiol*. 2000;40(8):487-90.
- Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*. 2003;74(6):849-57. doi: 10.1902/jop.2003.74.6.849.
- Owens KW, Yukna RA. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dent*. 2001;10(1):49-58. doi: 10.1097/00008505-200101000-00016.

- Pan B, Jing L, Cao M, Hu Y, Gao X, Bu X, Li Z, Feng H, Guo K. Melatonin promotes Schwann cell proliferation and migration via the shh signalling pathway after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 2021;53(3):720-731. doi: 10.1111/ejn.14998..
- Penna V, Wewetzer K, Munder B, Stark GB, Lang EM. The long-term functional recovery of repair of sciatic nerve transection with biogenic conduits. *Microsurgery.* 2012;32(5):377-82. doi: 10.1002/micr.21974.
- Pertici V, Laurin J, Féron F, Marqueste T, Decherchi P. Functional recovery after repair of peroneal nerve gap using different collagen conduits. *Acta Neurochir (Wien).* 2014;156(5):1029-40. doi: 10.1007/s00701-014-2009-9.
- Piskin A, Kaplan S, Aktaş A, Ayyildiz M, Raimondo S, Aliç T, Bozkurt HH, Geuna S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological, and electron microscopic study. *Microsurgery.* 2009;29(2):144-53. doi: 10.1002/micr.20599.
- Rangaraju S, Verrier JD, Madorsky I, Nicks J, Dunn WA Jr, Notterpek L. Rapamycin activates autophagy and improves myelination in explant cultures from neuropathic mice. *J Neurosci.* 2010;30(34):11388-97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1356-10.2010.
- Rbia N, Bulstra LF, Saffari TM, Hovius SER, Shin AY. Collagen Nerve Conduits and Processed Nerve Allografts for the Reconstruction of Digital Nerve Gaps: A Single-Institution Case Series and Review of the Literature. *World Neurosurg.* 2019;127:e1176-e1184. doi: 10.1016/j.wneu.2019.04.087.
- Rezajooi K, Pavlides M, Winterbottom J, Stallcup WB, Hamlyn PJ, Lieberman AR, Anderson PN. NG2 proteoglycan expression in the peripheral nervous system: upregulation following injury and comparison with CNS lesions. *Mol Cell Neurosci.* 2004;25(4):572-84.
- Riopel M, Li J, Trinder M, Fellows GF, Wang R. Fibrin supports human fetal islet-epithelial cell differentiation via p70(s6k) and promotes vascular formation during transplantation. *Lab Invest.* 2015;95(8):925-36. doi: 10.1038/labinvest.2015.74.
- Roque JS, Pomini KT, Buchaim RL, Buchaim DV, Andreo JC, Roque DD, Rodrigues AC, Rosa GM Júnior, Moraes LHR, Viterbo F. Inside-out and standard vein grafts associated with platelet-rich plasma (PRP) in sciatic nerve repair. *A*

- histomorphometric study. *Acta Cir Bras.* 2017;32(8):617-625. doi: 10.1590/s0102-865020170080000003.
- Rupp A, Dornseifer U, Fischer A, Schmahl W, Rodenacker K, Jütting U, Gais P, Biemer E, Papadopoulos N, Matiassek K. Electrophysiologic assessment of sciatic nerve regeneration in the rat: surrounding limb muscles feature strongly in recordings from the gastrocnemius muscle. *J Neurosci Methods.* 2007;166(2):266-77.
- Salarinia R, Sadeghnia HR, Alamdari DH, Hoseini SJ, Mafinezhad A, Hosseini M. Platelet rich plasma: Effective treatment for repairing of spinal cord injury in rat. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2017;51(3):254-257. doi: 10.1016/j.aott.2017.02.009.
- Sánchez M, Anitua E, Delgado D, Sanchez P, Prado R, Orive G, Padilla S. Platelet-rich plasma, a source of autologous growth factors and biomimetic scaffold for peripheral nerve regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(2):197-212. doi: 10.1080/14712598.2017.1259409.
- Sariguney Y, Yavuzer R, Elmas C, Yenicesu I, Bolay H, Atabay K. Effect of platelet-rich plasma on peripheral nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg.* 2008;24(3):159-67. doi: 10.1055/s-2008-1076752.
- Sasso LL, de Souza LG, Girasol CE, Marcolino AM, de Jesus Guirro RR, Barbosa RI. Photobiomodulation in Sciatic Nerve Crush Injuries in Rodents: A Systematic Review of the Literature and Perspectives for Clinical Treatment. *J Lasers Med Sci.* 2020;11(3):332-344. doi: 10.34172/jlms.2020.54.
- Sayad-Fathi S, Nasiri E, Zaminy A. Advances in stem cell treatment for sciatic nerve injury. *Expert Opin Biol Ther.* 2019;19(4):301-311. doi: 10.1080/14712598.2019.1576630.
- Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, Tzankov A, Mairinger T, Laufer G, Bonatti JO. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg.* 2004;77(5):1580-5. doi: 10.1016/j.athoracsur.2003.10.008.
- Sebben Ad, Lichtenfels M, Da Silva JL. “Peripheral Nerve Regeneration: Cell Therapy And Neurotrophic Factors.”, *Rev Bras Ortop.*, 2015;46(6):643-9.
- Seddon HJ. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J.* 1942;2(4260):237-9. doi: 10.1136/bmj.2.4260.237.

- Seddon HJ. Three Types of Nerve Injury. *Brain*. 1943;66: 237-288. doi.org/10.1093/brain/66.4.237
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990;43(2):205-218. doi: 10.1016/0304-3959(90)91074-S.
- Senes FM, Campus R, Becchetti F, Catena N. Sciatic nerve injection palsy in the child: early microsurgical treatment and long-term results. *Microsurgery*. 2009;29(6):443-8. doi: 10.1002/micr.20632.
- Shamoun F, Shamoun V, Akhavan A, Tuffaha SH. Target Receptors of Regenerating Nerves: Neuroma Formation and Current Treatment Options. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:859221. doi: 10.3389/fnmol.2022.859221.
- Shashikiran ND, Reddy VV, Yavagal CM, Zakirulla M. Applications of platelet-rich plasma (PRP) in contemporary pediatric dentistry. *J Clin Pediatr Dent*. 2006;30(4):283-6. doi: 10.17796/jcpd.30.4.8663xu2610324v36.
- Shen N, Zhu J. Application of sciatic functional index in nerve functional assessment. *Microsurgery*. 1995;16(8):552-5. doi: 10.1002/micr.1920160809.
- Simamora P, Alvarez JM, Yalkowsky SH. Solubilization of rapamycin. *Int J Pharm*. 2001;213(1-2):25-9. doi: 10.1016/s0378-5173(00)00617-7.
- Sitati FC, Naddumba E, Beyeza T. Injection-induced sciatic nerve injury in Ugandan children. *Trop Doct*. 2010;40(4):223-4. doi: 10.1258/td.2010.090354.
- Sun Y, Zhao S, Li X, Yan L, Wang J, Wang D, Chen H, Dai J, He J. Local application of rapamycin reduces epidural fibrosis after laminectomy via inhibiting fibroblast proliferation and prompting apoptosis. *J Orthop Surg Res*. 2016;11(1):58. doi: 10.1186/s13018-016-0391-0.
- Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 1951;74(4):491-516. doi: 10.1093/brain/74.4.491.
- Sunderland S. Miscellaneous causes of nerve injury. In: *Nerve injuries and their repair. A critical appraisal*. London: Churchill Livingstone, 1991, pp.193–199.
- Suzuki A, Kodama Y, Miwa K, Kishimoto K, Hoshikawa E, Haga K, Sato T, Mizuno J, Izumi K. Manufacturing micropatterned collagen scaffolds with chemical-crosslinking for development of biomimetic tissue-engineered oral mucosa. *Sci Rep*. 2020;10(1):22192. doi: 10.1038/s41598-020-79114-3.

- Topuz K, Kutlay M, Simşek H, Atabey C, Demircan M, Senol Güney M. Early surgical treatment protocol for sciatic nerve injury due to injection—a retrospective study. *Br J Neurosurg*. 2011;25(4):509-15. doi: 10.3109/02688697.2011.566380.
- Tordjman D, Schlur C, Mamane W, Masméjean E. Évaluation d'une nouvelle membrane anti-adhérence de collagène résorbable pour la chirurgie nerveuse du membre supérieur (Cova Ortho™)., *Chirurgie de la Main*, 2012;31 (6): Page 416, ISSN 1297-3203.
- Tredwell S, Jackson JK, Hamilton D, Lee V, Burt HM. Use of fibrin sealants for the localized, controlled release of cefazolin. *Can J Surg*. 2006;49(5):347-52.
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008;70(18):1630-5. doi: 10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59.
- Tyler B, Wadsworth S, Recinos V, Mehta V, Vellimana A, Li K, Rosenblatt J, Do H, Gallia GL, Siu IM, Wicks RT, Rudek MA, Zhao M, Brem H. Local delivery of rapamycin: a toxicity and efficacy study in an experimental malignant glioma model in rats. *Neuro Oncol*. 2011;13(7):700-9. doi: 10.1093/neuonc/nor050.
- Urso-Baiarda F, Grobbelaar AO. Practical nerve morphometry. *J Neurosci Methods*. 2006;156(1-2):333-41. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.02.014.
- van Neerven SGA, Haastert-Talini K, Boecker A, Schriever T, Dabhi C, Claeys K, Deumens R, Brook GA, Weis J, Pallua N, Bozkurt A. Two-component collagen nerve guides support axonal regeneration in the rat peripheral nerve injury model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(12):3349-3361. doi: 10.1002/term.2248.
- Vijayavenkataraman S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomater*. 2020;106:54-69. doi: 10.1016/j.actbio.2020.02.003.
- Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*. 2002;30(2):97-102. doi: 10.1054/jcms.2002.0285.
- Wiffen PJ, Derry S, Bell RF, Rice AS, Tölle TR, Phillips T, Moore RA. Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;6(6):CD007938. doi: 10.1002/14651858.CD007938.pub4.

- Wong M. Mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways in neurological diseases. *Biomed J.* 2013;36(2):40-50. doi: 10.4103/2319-4170.110365.
- Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet.* 1999;353(9168):1959-64. doi: 10.1016/S0140-6736(99)01307-0.
- Ye F, Li H, Qiao G, Chen F, Tao H, Ji A, Hu Y. Platelet-rich plasma gel in combination with Schwann cells for repair of sciatic nerve injury. *Neural Regen Res.* 2012;7(29):2286-92. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.29.007.
- Yıldız C, Özgürtaş T. Platelet rich plasma. *TOTBİD Dergisi*, 2017;16:247–258.
- Yi S, Ding F, Gong L, Gu X. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2017;12(3):233-246. doi: 10.2174/1574888X11666160905092513.
- Yi S, Xu L, Gu X. Scaffolds for peripheral nerve repair and reconstruction. *Exp Neurol.* 2019;319:112761. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.05.016.
- Yoo J, Park JH, Kwon YW, Chung JJ, Choi IC, Nam JJ, Lee HS, Jeon EY, Lee K, Kim SH, Jung Y, Park JW. Augmented peripheral nerve regeneration through elastic nerve guidance conduits prepared using a porous PLCL membrane with a 3D printed collagen hydrogel. *Biomater Sci.* 2020;8(22):6261-6271. doi: 10.1039/d0bm00847h.
- Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(4). pii: a018309. doi: 10.1101/cshperspect.a018309.
- Zandstra J, van Beuge MM, Zuidema J, Petersen AH, Staal M, Duque LF, Rodriguez S, Lathuile AA, Veldhuis GJ, Steendam R, Bank RA, Popa ER. Microsphere-Based Rapamycin Delivery, Systemic Versus Local Administration in a Rat Model of Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharm Res.* 2015;32(10):3238-47. doi: 10.1007/s11095-015-1700-8.
- Zheng C, Zhu Q, Liu X, Huang X, He C, Jiang L, Quan D, Zhou X, Zhu Z. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on proliferation, neurotrophic function and migration of Schwann cells in vitro. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;10(5):428-36. doi: 10.1002/term.1756.

- Zhu Y, Jin Z, Wang J, Chen S, Hu Y, Ren L, Wang Y, Song Q, Tian X, Xie F, Peng J, Peng N, Luo Y, Wang Y. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injection and multimodality ultrasound examination of peripheral nerve crush injury. *NPJ Regen Med.* 2020;5(1):21. doi: 10.1038/s41536-020-00101-3.
- Zimmerman IR, Karnes JL, O'Brien PC, Dyck PJ. Imaging system for nerve and fiber tract morphometry: components, approaches, performance, and results. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1980;39(4):409-19. doi: 10.1097/00005072-198007000-00002.
- Zou J, Zhang X, Yang H, Zhu Y, Ma H, Wang S. Rapamycin-loaded nanoparticles for inhibition of neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Vasc Surg.* 2011;25(4):538-46. doi: 10.1016/j.avsg.2011.01.003.





Tarih: 03.02.2021

Toplantı Sayısı: 02

Karar No:21/26

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 03.02.2021 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zühal HAMURCU	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
İzzet Burçin SATICIOĞLU	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTA
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneyisel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D.'dan Prof.Dr.Ali ÜNAL tarafından sunulan "Sinir Rejenerasyonu Amacıyla Rapamisin'in Hasarlı Bölgeye Lokal Olarak Farklı Matrislerde Uygulanması ve Etkinliğinin İn Vivo Olarak Değerlendirilmesi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih

: 03.02.2021

Etik Kurul Başkanı

: Prof. Dr. Gültekin ATALAN

SİNİR REJENERASYONU AMACIYLA RAPAMİSİNİN HASARLI BÖLGEYE LOKAL OLARAK FARKLI MATRİKSLERDE UYGULANMASI VE ETKİNLİĞİNİN İN VİVO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 10	% 4	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 1
3	Fok, W. C., Y. Zhang, A. B. Salmon, A. Bhattacharya, R. Gunda, D. Jones, W. Ward, K. Fisher, A. Richardson, and V. I. Perez. "Short-Term Treatment With Rapamycin and Dietary Restriction Have Overlapping and Distinctive Effects in Young Mice", The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences, 2013. Yayın	% 1
4	www.tod.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Mehmet CANPOLAT

Uyruğu : T.C

EĞİTİM

DERECE

KURUM

MEZUNİYET

Yüksek Lisans

Lisans

Lise

Atatürk Üniversitesi Tıp
Fakültesi
Erzurum Fen Lisesi

2003

1997

İŞ DENEYİMLERİ

YIL

KURUM

GÖREV

2021-Halen

Erciyes Üniversitesi Tıp
Fakültesi

Öğretim Üyesi Prof.Dr

2016-2021

Erciyes Üniversitesi Tıp
Fakültesi

Öğretim Üyesi Doç.Dr

2013-2015

Erciyes Üniversitesi Tıp
Fakültesi

Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr

2009-2012

Erciyes Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları AD, Çocuk
Nörolojisi Bilim Dalı

Yandal Arş.Gör.Dr

2003-2008

Erciyes Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları AD,

Arş.Gör.Dr

YABANCI DİL İngilizce (YÖKDİL, 09.07.2017, puan: 86.250)