

T.C
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

PERİFERİK SİNİR YARALANMALARINDA
EKSOZOMLARIN SİNİR İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Emrah PATAT

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi İlker UYAR

İZMİR
OCAK-2024

T.C
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

PERİFERİK SİNİR YARALANMALARINDA
EKSOZOMLARIN SİNİR İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Emrah PATAT

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi İlker UYAR

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2023-TDU-TIPF-0005 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
OCAK-2024

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince tecrübelerini benimle paylaşan, cerrahi gelişimime büyük katkılar sağlayan ve tezimdeki çalışma sürecim boyunca önemli destek ve katkıları olan tez danışmanım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi İlker UYAR'a

Eğitim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, mesleki gelişimimde büyük katkılar sağlayan kıymetli hocalarım; Prof. Dr. Erhan SÖNMEZ, Prof. Dr. Mustafa DURĞUN, Doç. Dr. Meltem AYHAN ORAL, Doç. Dr. Ersin AKŞAM ve Doç. Dr. Önder KARAASLAN'a

Asistanlığım boyunca birlikte çalışma imkânı bulduğum, tecrübelerini bana aktaran uzmanlarımız Dr. Murat TÜZÜNER ve Dr. Fatih Alp ÖZTÜRK'e

Asistanlık eğitimimde birlikte çalışmaktan mutlu olduğum Dr. Rehber MARŞİL, Dr. Alper DERVİŞ, Dr. Mehmet ALKAN, Dr. Süleyman KÖKEN, Dr. Musa Burak ÇATALKAYA, Dr. Özgür TURAN, Dr. Batuhan AKSOY, Dr. Batuhan SERT, Dr. Aytunç ÖZSOY, Dr. Kadir YİT, Dr. Tunahan Berk BAŞOL, Dr. Burak ŞEN ve çok sevdiğim birlikte çalışmaktan keyif aldığım diğer tüm asistan arkadaşlarıma

Zorlu tez sürecimde ne zaman yardıma ihtiyacım olsa yanımda olan Dr. Batuhan SERT, Dr. Zafer AVCI, Dr. Süleyman Doğukan GEZER, Dr. Burak Bilge Kağan AYNA, Dr. Levent YORGUN ve Dr. İsmail Arda TUFAN'a

Ameliyathanede, poliklinikte ve serviste beraber çalıştığımız ve bana her zaman yardımcı olan çok sevdiğim hemşire, tıbbi sekreter, sağlık personeli arkadaşlarıma ve biricik ablam Mihriban BAYIK'a

Bu zamana kadar her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan ve bana desteğini esirgemeyen çok çok sevdiğim babam Kalender PATAT, annem Yadigar PATAT, ablam Betül KARA ve kardeşim Derya GÜLHAN'a

Onunla oldukça her şeyin kolaylaştığı, bir an bile beni eksik bırakmayan, tüm zor anlarımda bana sabır gösteren ve yanımda olan mutluluğum, hayat arkadaşım, biricik eşim ELİF NUR ÖZTÜRK PATAT'a

Çok teşekkür ederim ...

ÖZET

Periferik sinir yaralanmaları toplumda yüksek insidansta görülen genellikle etkilenen uzuvda duyuşal ve motor fonksiyon kayıplarına sebep olan önemli bir sağıık sorunudur. Yaralanma sonrası sinir rejenerasyonunun optimal düzeyde olması için günümüzde çalışmaları hala devam etmektedir. Eksozomlar, vücutta hemen hemen tüm hücreler tarafından salgılanan hücreler arası iletişimde kilit rol oynayan nanoveziküllerdir. Sinir sisteminin fizyolojik ve patolojik süreçlerinde modülatör olarak birçok aşamada rol almaktadırlar.

Bu çalışmada periferik sinir yaralanmasını takiben onarım alanına uygulanan eksozomların sinir rejenerasyonun etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada toplam 20 adet (10 adet erkek, 10 adet dişi) Wistar cinsi rat kullanıldı. Eksozom grubu (n=10) ve Primer grubu (n=10) olmak üzere 2 grup oluşturuldu. Uygun cilt insizyonu ve diseksiyon ile ratların sağ taraf siyatik sinirine ulaşılp, mikrocerrahi makas ile tam kat sinir hasarı oluşturuldu. Eksozom grubunda, siyatik sinir onarımı sonrası koaptasyon bölgesinin proksimal ve distal uçlarına 0.1ml eksozom solüsyonu epinöral olarak enjekte edildi. Primer grubunda ise koaptasyon bölgesinin proksimal ve distal uçlarına 0.1ml SF solüsyonu epinöral enjeksiyonu yapıldı.

Sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için deneye başlamadan önce ve deney sonrası 7., 14. 21. günlerde yürüyüş yolu analizleri ('walking track') ve Siyatik Fonksiyonel İndeks ölçümleri yapıldı.

Ratların operasyon öncesi ve operasyon sonrası 8. haftada intraperitoneal anestezi altında elektromiyografi değerlendirilmeleri yapıldı. Siyatik sinir tarafından inerve edilen kas gruplarının birleşik kas aksiyon potansiyelleri ölçüldü. Aksiyon potansiyelleri eğrilerinde her bir ratın EMG kayıtlarında Delta-T, aksiyon potansiyeli tepe-tepe amplitüdü (P.P), eğri altında kalan alan (CMAP), P-max değerleri ve toplam süreler ölçüldü.

Histopatolojik değerlendirme için ise deney sonrası 8.haftada siyatik sinir onarımının yapıldığı sinir bölgesinin yaklaşık 1cm distal ve proksimalini içerecek şekilde normal sinir segmentlerine de ulaşarak sinir biyopsileri alındı. Alınan sinir örnekleri vasküler proliferasyon, inflamasyon, fibrozis varlığı ve sinir hasar derecesi açısından 3 üzerinden değerlendirildi ve skora yapıldı.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi sonucu eksozom enjeksiyonu yapılan grupta sinir rejenerasyonu sürecinde inflamasyon ve fibrozisin daha az görüldüğü ayrıca SFİ indeks verilerine bakıldığında eksozom enjeksiyonun sinir rejenerasyonunu hızlandırdığı görüldü.

Anahtar kelimeler: Eksozom, sinir rejenerasyonu, siyatik sinir

SUMMARY

Peripheral nerve injuries are an important health problem that occurs at a high incidence in society and usually causes loss of sensory and motor functions in the affected limb. Today, studies are still on going to ensure optimal nerve regeneration after injury.

Exosomes are nanovesicles secreted by almost all cells in the body and play a key role in intercellular communication. They are involved in many stages as modulators in physiological and pathological processes of the nervous system.

This study aimed to evaluate the effects of exosomes applied to the repair area following peripheral nerve injury on nerve regeneration. A total of 20 Wistar rats (10 male, 10 female) were used in the study. Two groups were created: Exosome group (n = 10) and Primer group (n = 10). With appropriate skin incision and dissection, the right side sciatic nerve of the rats was reached and full-thickness nerve damage was created with microsurgical scissors. In the exosome group, 0.1ml of exosome solution was injected epineurally to the proximal and distal ends of the coaptation area after sciatic nerve repair. In the primary group, epineural injection of 0.1ml SF solution was made to the proximal and distal ends of the coaptation area.

Walking track analysis and Sciatic Functional Index measurements were performed before and 7, 14, 21 days after the experiment to evaluate nerve regeneration.

Rats were evaluated by electromyography under intraperitoneal anesthesia before and 8 weeks after the operation. The combined muscle action potentials of muscle groups innervated by the sciatic nerve were measured. Delta-T, peak-to-peak amplitude of action potential (P.P), area under the curve (AUC), max values and total durations were measured in the action potential curves of EMG recordings of each rat.

For histopathologic evaluation, nerve biopsies were taken at the 8th week after the experiment by reaching the normal nerve segments, including approximately 1 cm distal and proximal to the repaired sciatic nerve nerve region. The nerve samples were evaluated and scored on a 3-point scale for vascular proliferation, inflammation, presence of fibrosis and degree of nerve damage.

As a result of the statistical analysis of the data obtained, it was observed that inflammation and fibrosis were observed less in the exosome injection group during the nerve regeneration process and exosome injection accelerated nerve regeneration when SFI index data were analyzed.

Keywords: Exosome, nerve regeneration, sciatic nerve

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET	II
SUMMARY	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
KISALTMALAR VE SİMGELER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Periferik Sinir Tarihçesi.....	2
2.2 Periferik Sinir Anatomisi.....	2
2.3. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması.....	4
2.3.1. Seddon Sınıflaması	5
2.3.2. Sunderland Sınıflaması	5
2.4. Sinir Dejenerasyonu	7
2.4.1 Proksimal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler	7
2.4.2 Distal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler	8
2.5 Sinir Rejenerasyonu.....	8
2.6 Periferik Sinir Onarımı Prensipleri.....	10
2.6.1 Sinir Onarım Teknikleri	11
2.6.1.1 Uç Uca Onarım	12
2.6.1.2 Uç Yan Onarım	13
2.6.1.3 Sinir Grefti ile Onarım	14
2.7 Eksozom	14
2.7.1 Eksozom Biyogenezi.....	14
2.7.2 Eksozomların Özellikleri ve Fonksiyonları	16
2.7.2.1 Adipozomal Kök Hücreler Kaynaklı Eksozomların Fonksiyonları	17
2.7.3 Eksozom İzolasyon Teknikleri	21
2.7.3.1. Ultrasantrifüjleme Teknikleri.....	21
2.7.3.2. Polimer Çökeltme	22
2.7.3.3. Boyut Bazlı İzolasyon Teknikleri	22
2.7.3.4 Ultrafiltrasyon	22

2.7.3.5. İmmünoaffinite Kromatografisi (IAC)	23
2.7.3.6. Diğer İzolasyon Teknikleri	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Sıçan Siyatik Sinir Anatomisi.....	24
3.2. Deney ve Kontrol Grupları	25
3.3. Rat Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozom İzolasyonu	25
3.4 Cerrahi İşlem	26
3.5. Değerlendirme Yöntemleri	29
3.5.1. Genel Değerlendirme	29
3.5.2. Fonksiyonel Değerlendirme	29
3.5.3. Elektrofizyolojik Değerlendirme	31
3.5.4. Histomorfometrik Değerlendirme.....	33
3.5.5. İstatistiksel Değerlendirme	34
4. BULGULAR	35
4.1. Genel Değerlendirme Bulguları.....	35
4.2. Fonksiyonel Değerlendirme Bulguları	35
4.2.1. Yürüyüş Yolu ve SFİ Bulguları	35
4.3. Histomorfometrik Değerlendirme Bulguları	40
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ	50
7. KAYNAKÇA	51

KISALTMALAR VE SİMGELER

ABD: Amerika Birleşik Devleti

AD-MKH: Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler

ADSC: Yağdan türetilen kök hücre

AUC: Eğri altında kalan alan

Ark: Arkadaşları

Bcl-2: B hücreli lenfoma geni-2

BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör

Cm: santimetre

CMAP: Birleşik kas aksiyon potansiyeli

CO₂: Karbondioksit

DC: Dendritik hücre

DNA: Deoksiriboz nükleik asit

DRG: Dorsal kök ganglion

EGE HAYMER: Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EMG: Elektromiyografi

ESCRT: Taşınım için Gerekli Endozomal Ayırma Kompleks Proteinleri

Exos: Eksozom

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

GDNF: Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör

HaCaT: Ölümsüzleştirilmiş insan keratinosit hücre hattı

H+E: Hematoksilen Eozin

H₂O₂: Hidrojen peroksit

IAC: İmmünoaffinite Kromatografisi

IFN- γ : İnterferon gama

IGF-1: insülin benzeri büyüme faktörü-1

ILV: İntraluminalvezikül

IL-1 β : İnterlökin- 1 beta

ITS: Adım ortası genişliği

Malat-1: Metastazla ilişkili akciğer adenokarsinomu transkripti 1

MHC: Majör histokompatibilite kompleksi

MIP-1 α : Makrofaj İnflamatuvar Proteinleri- 1 alfa

MiRNA: MikroRibonükleik asit
Ml: mililitre
MMP: Matriks metalloproteinaz
MS: Milattan sonra
MVB: Multiveziküler cisimcik
MKH: Mezenkimal kök hücre
MRNA: Mesajcı Ribonükleik asit
N: Sayı
NGF: Sinir büyüme faktörü
Nm: nanometre
PDCD6IP(ALIX): Programlanmış Hücre Ölümü 6 Etkileşimli Protein
PBS: Fosfat tamponlu salin
PEG: Polietilen glikol
PL: Bası uzunluğu
PLP: Proteolipid protein
PLD2: Fosfolipaz D2
P-max: Maksimum pik değeri
P.P: Pozitif ve negatif pikler arası mesafe
RANKL: Reseptör Aktivator Nükleer Kappa- B Ligandı
ROS: Reaktif oksijen türleri
SEC: Boyut dışlama kromatografisi
SF: Serum fizyolojik
SFİ: Siyatik fonksiyonel indeks
TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa
TPP: Hücre Kültür Kabı
TS Adım genişliği
TSG101: Tümör duyarlılık geni 101
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
Vps4p: Vakuoler protein ayırma-ilişkili protein
 α : alfa β : beta γ : gama g: kütleçekimi ivmesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Periferik siniri anatomisi şematik çizimi ¹⁹⁰	4
Şekil 2: Periferik sinir yaralanmalarının sınıflandırılması ²³	7
Şekil 3:Eksozomların biyogenezi, salgılanması ve yapısı ⁸⁰	15
Şekil 4:Adipozomal kök hücreli kaynaklı eksozomların fonksiyonları ⁹³	18
Şekil 5:Ratların operasyona hazırlanması.....	26
Şekil 6: Cerrahi insizyon hattı	27
Şekil 7:A, B) Rat siyatik siniri diseksiyonu.....	27
Şekil 8:A, B) Rat siyatik sinir transeksiyonu.....	28
Şekil 9:Siyatik sinir koaptasyonu	28
Şekil 10:Epinöral eksozom enjeksiyonu.....	29
Şekil 11:A, B) Yürüyüş yolu parkuru.....	30
Şekil 12: SFİ hesaplamasında ayak izlerinde bakılan parametreler, deneysel (E), Normal(N)	31
Şekil 13: SFİ için Bain ve arkadaşlarının geliştirdiği formül	31
Şekil 14: EMG kayıt için elektrotların yerleşimi.....	32
Şekil 15: EMG kaydı ve bakılan parametreler.....	32
Şekil 16: Siyatik sinir biyopsi alınması	33
Şekil 17: Primer grubu sırasıyla preoperatif ve post operatif 1. , 2. ve 3. haftada yürüyüş yolu ayak izleri	35
Şekil 18: Eksozom grubu sırasıyla preoperatif ve post operatif 1. , 2. ve 3. Haftada yürüyüş yolu ayak izleri.....	36
Şekil 19: Sağlam taraf siyatik sinir dokusunun olağan morfolojideki görünümü	42
Şekil 20: Nöral dejenerasyon skor 1, fibrozis skor 1, vasküler proliferasyon skor 1	42
Şekil 21: Nöral dejenerasyon skor 2, fibrozis skor 2, vasküler proliferasyon skor 2	42
Şekil 22: Vasküler proliferasyon skor 2	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Histopatolojik olarak alınan sinir biyopsilerinin değerlendirilmesi.....	34
Tablo 2: Ratların 1. , 2. ve 3. hafta Siyatik Fonksiyonel İndeks değerleri	37
Tablo 3: Grupların SFI Ölçüm Karşılaştırmaları	37
Tablo 4: EMG de Grupların İlk(Operasyon öncesi) ve Son(Operasyon sonrası 8.hafta) Ölçüm Karşılaştırmaları	38
Tablo 5: Her bir rattan alınan biyopsi örneklerinin histopatolojik olarak değerlendirilen parametreleri ve skorları.....	41
Tablo 6: Histopatolojik Bulguların Gruplara Göre Karşılaştırılması	43



1.GİRİŞ

Periferik sinir sistemi, vücudun iç ve dış ortamla etkileşimde bulunmasına yardımcı olan, merkezi sinir sistemi dışında kalan tüm sinirleri içerir. Travma, tümör invazyonları, cerrahi girişimler gibi birçok sebeple hasara uğrayabilir. Genellikle ezilme, penetran, traksiyon veya doku iskemisi şeklindeki yaralanmalar sonrası periferik sinir hasarı ortaya çıkmaktadır¹. Periferik sinir yaralanmaları yüksek insidansa sahiptir ve genellikle etkilenen uzuvda ciddi duysal ve motor fonksiyon kayıplarına yol açabilirler. Yaralanma sonrası periferik sinir rejenerasyonu, araştırmacılar için önemli bir sorun olmaya devam etmektedir.

Travmatik periferik sinir yaralanmaları, birçok hastada fonksiyonel bozulmaya ve kalıcı sakatlığa yol açan önemli bir klinik ve halk sağlığı sorununu temsil eder. Modern tanı ve teşhis prosedürlerine ve gelişmiş mikrocerrahi tekniklere rağmen periferik sinir onarımı sonrası fonksiyonel iyileşme genellikle tatmin edici boyutlarda değildir. Bu nedenle, sinir hasarının görüldüğü hastalarda fonksiyonel iyileşmeyi daha iyi düzeye getirmek için yeni terapötik veya yardımcı stratejilere yönelik karşılanmamış bir ihtiyaç mevcuttur². Periferik sinir yaralanmalarını onarmak için çok sayıda cerrahi prosedür uygulanmaktadır. Her iki sinir ucu arasında çok fazla defekt olmayan sinir lezyonları genellikle uç uca koaptasyon ile tedavi edilir. Daha uzun sinir defektleri olan periferik sinir lezyonlarıyla sonuçlanan travmatik yaralanmalar sıklıkla boşluğu kapatmak için bir greft gerektirir. Her ne kadar otolog sinir greftleri rekonstrüksiyonlarda hala ilk tercih edilen strateji olsa da donör dokusunun sınırlı olması, fonksiyonel bir sinirin feda edilmek zorunda olması ve potansiyel nöroma oluşumu riski nedeniyle çeşitli dezavantajlara sahip olduğu görülmektedir³⁻⁶.

Eksozomlar, mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), immünositler, nöronlar, kanserli hücreler, epitel hücreleri, osteositler ve miyositler dahil olmak üzere hemen hemen tüm hücre tipleri tarafından hücre dışı boşluğa salgılanan membranöz nano boyutlu veziküllerdir^{7,8}. Buna ek olarak eksozomlar kan, tükürük, idrar, amniyotik sıvı ve beyin omurilik sıvısı gibi farklı vücut sıvılarında bulunurlar^{9,10}.

Eksozomlar organizmalarda önemli olan uzak veya yakın bölgelerdeki hedef hücrelerin biyolojik davranışları arasından bağlantı sağlayarak homeostazın sürdürülmesi için modülatör görevi görebilirler¹¹. Hücreler arası iletişimin kilit oyuncuları olarak eksozomlar, sinir sisteminin fizyolojik ve patolojik süreçlerinde temel bir rol oynarlar. Eksozomların tüm hücre tiplerinde bulunuyor olması ve literatürde nöroterapötik etkilerinin gösterilmesi periferik sinir hasarında iyileşme sürecinde umut vermektedir. Bu çalışmada eksozomların, rat siyatik sinirinde oluşturulan transeksiyon sonrası sinirin direkt onarımı sırasında bölgeye implantasyonunun sinir iyileşmesindeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Periferik Sinir Tarihçesi

Literatürde periferik sinir sistemiyle ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında ilk tanımlamalar Hipokrat zamanına kadar dayanmaktadır. Periferik sinir yaralanmaları onarımıyla ilgili yapılan ilk çalışmalar ise Galen tarafında yapıldığı görülmüştür. Galen yaptığı çalışmalarda sinir hasarı sonrası his duyusunda ve kas gücünde azalma olduğunu ortaya çıkarmış ve sinir iyileşmesinin mümkün olmadığını öne sürmekteydi^{12,13}.

Periferik sinir onarımıyla ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında ise ilk kez İbn-i Sina (MS 980-1037) tarafından gerçekleştirilmiş olduğu bulunmuştur. Galvani ise kurbağalarda yaptığı çalışmalarda sinir liflerinin elektrik stimülasyonuna yanıt verdiğini göstermiştir¹³.

Periferik sinirin sütür ile onarımına ait ilk kalıntılar ise 13. yüzyılda William Saliceto'ya aittir. 16. ve 17.yüzyıllardan sonra sinir sistemi ile ilgili daha detaylı bilgiler ortaya çıkmaya başlamıştır. 1847 yılında Paget bir hastada median sinir kesisini primer onarım fonksiyonel dönüşün tam olduğunu belirtmiştir¹⁴.

Theodore Schwann 1839' da Schwann hücresini tanımlayıp kendi adını vermiştir. Johannes Von Purkinje nöron ve aksonlar arasındaki bağlantıları tanımlamıştır. Robert Remak ise sinirlerde miyelinli ve miyelinsiz sinirleri tariflemiştir. 1850'de August Waller kurbağalarda hipoglossal ve glossofaringeal sinirlerde yaptığı deneylerde Wallerian dejenerasyonunu tanımlamıştır¹³. Sinir kesisi sonrası periferik sinir onarımında epinöral onarımı 1873 yılında Hueter tarif etmiştir. Perinöral onarım tekniğini ise Langley ve Hashimoto tanımlamışlardır¹⁵.

Golgi ve Cajal, sinir sistemi ile ilgili yaptığı çalışmalarda sinirlerin yapısı ve fonksiyonel ilişkilerini keşfederek 1906 yılında Nobel Tıp Ödülü'nü kazanmışlardır. Erlenger ve Gasser ise 1945'te sinir liflerinin fonksiyonları ve elektrofizyolojik özelliklerini ortaya koydukları çalışmaları ile Nobel Tıp Ödülü' nü kazanmışlardır. İlerleyen yıllarda Sunderland, Millesi ve Terzis'in sinir hücreleri, Schwann hücrelerinin rolü, sinirin yaralanmaları, aksonlara ait taşıma ve aksonal filizlenmeler konusundaki çalışmaları ile periferik sinir cerrahisinde önemli bir yer tutmaktadırlar^{13,16,17}.

2.2 Periferik Sinir Anatomisi

Periferik sinir sistemi, merkezi sinir sistemi ile vücudun kalan çevre dokuları arasındaki bağlantıyı sağlayan sinir sistemi bölümüdür. Periferik sinir dokusu, sinir lifleri ve etrafında bulunan destek dokudan oluşmaktadır. (ŞEKİL 1)

En küçük fonksiyon birimleri nöron hücreleridir. Nöronlar hücre gövdesi, dentritler ve aksonlardan oluşmaktadır. Hücre gövdesi (soma, perikaryon) sinir hücresinin besleyici ana bölümüdür. Bir akson ve bir veya daha fazla dentritik çıkıntılardan oluşabilir. Çekirdek ve organel bu kısımdadır. Hücre fonksiyonları için gerekli olan enzimler ve diğer biyosentetik sistemleri de içinde bulundurur¹⁸.

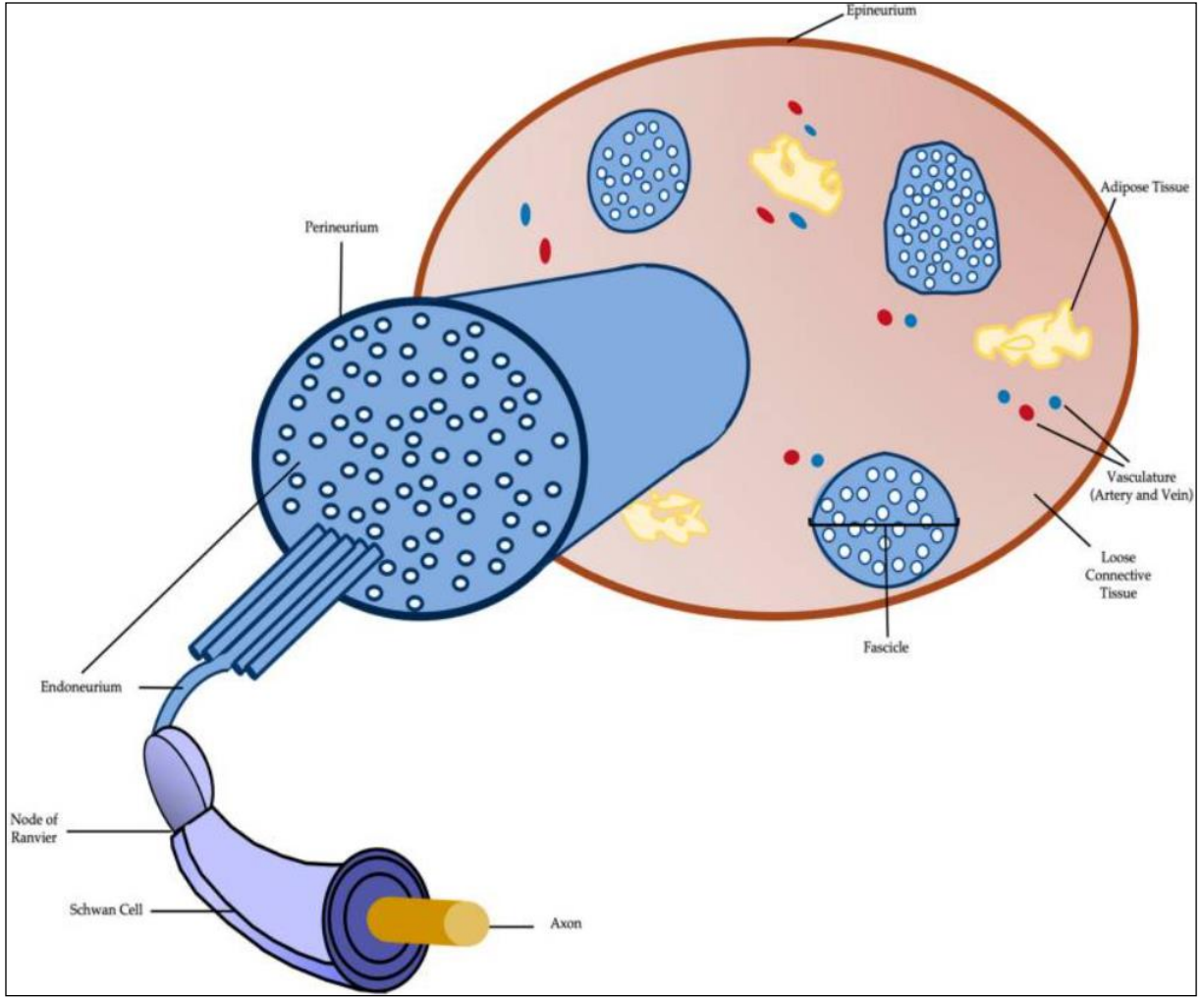
Dentritler ise hücre gövdesinden çıkan çevreden uyarı almak için özelleşmiş reseptör fonksiyonu görürler. Hücre gövdesinin sitoplazmik çıkıntılarıdır. Dentritler temel olarak nöronlar arası iletişime destek sağlarlar.

Aksonlar aksoplazma, aksolemma ve miyelinli veya miyelinsiz kılıflardan oluşmaktadır. Aksolemma aksonu çevreleyen plazma membranına verilen addır¹⁹. Aksoplazma ise hücre sitoplazmasının aksondaki eş değeridir. Aksoplazmada hücre iskeletini oluşturan mikrotübüller ve nörofilamentler bulunur. Bu yapılar aksonun yapısal bütünlüğün devamlılığının sağlanmasında ve aksonal iletimde önemli görev alırlar.

Her periferik sinir, fasiküller olarak bilinen aksonların çok sayıda uzunlamasına düzenlenmesinden oluşur ve her biri üç katmandan oluşan bağ dokusuyla kaplanır. Bu katmanlar fasiküllere ek bir destek sağlar. Ayrıca sinir liflerinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan kan damarlarını içinde bulundurur^{20,21,22}.

Epinöryum, tüm fasikülleri içeren bu katmanlardan en dıştaki olanıdır. Sinir kasılmasını ve genişlemesini sağlayan areolar bağ dokusu epinöryumun ana bileşenidir²². Periferik sinirlerin mekanik olarak korunması ve anatomik şeklini belirleyen sinirin tamamını kaplayan dış tabaka olan epinöryum tarafından sağlanmaktadır²¹. Orta katmanda ise her fasikülü tek tek saran ince ve yoğun bağ dokusu içeren perinöryum bulunur. Bu sayede yapıdaki homeostazın ve endonöral ortamın korunmasına yardımcı olur^{21,22}. En iç tabakada ise her bir fasiküldeki her aksonu çevreleyen ince bir kollajen lif tabakası içeren endonöryum bulunmaktadır²². Çok ince mikro damar ve kılcal damar ağı içeren bu tabaka çok esnektir. Ancak mekanik korumaya katkısı çok azdır.

Schwann hücreleri her bir miyelinli aksonda bulunan aksonu izole eden yağlı, çok katmanlı laminin açısından zengin miyelin tabakaları üretme kapasitesine sahip olan hücrelerdir. Daha hızlı bir uyarı iletilmesini sağlayan miyelinin asıl işlevi hücre zarı boyunca elektrik direncinin artırılmasını sağlamaktır. Schwann hücreleri ayrıca periferik sinir rejenerasyonun ekstrasik mediyatörleridir²². Periferik sinirlerde bulunan bir diğer hücreler ise kasılabilen perisitlerdir. Perisitler ayrıca kan akışını düzenler ve kan damarı duvarlarının sızdırmazlığını sağlarlar. Bu hücreler hem beyin-sinir bariyerinde hem de endonöral mikroçevrede homeostazın korunmasına yardımcı olurlar²².



Şekil 1: Periferik sinirin anatomisi şematik çizimi¹⁹⁰

2.3. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması

Periferik sinirler birçok değişik şekilde travmaya maruz kalabilirler. Bu travma şekilleri ise kabaca gerilim tipi, laserasyonlar, kompresyon tipi şeklinde sıralanabilir. Gerilim tipi yaralanmalarda sinirin esneme kapasitesinin üzerinde bir traksiyon kuvveti vardır. Laserasyonlar ise çoğunlukla bıçak gibi delici aletler sonrası ortaya çıkar. Kompresyon tipi yaralanmalar ise sinir baskıya maruz kalması sonrası oluşan sıkışma ile meydana gelirler.

Sınıflandırmalar, periferik sinir yaralanmalarının daha iyi bir şekilde anlaşılması ve tedavi modalitesinin geliştirilmesi için çok büyük bir önem arz etmektedir. Literatürde 1943 yılında Seddon, periferik sinir yaralanmalarını üç farklı dereceye ayıran bir sınıflandırmayı önermiştir. Bunlar; nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezistir.

Periferik sinir yaralanmalarına yönelik bir diğer sınıflandırma ise 1951 yılında Sunderland tarafından tanımlanmıştır. Sunderland yaralanmaları 5 dereceye ayırmıştır.

Mackinnon ve Dellon bu sınıflamanın çoklu sinir liflerinde oluşan ve kombine yaralanmaları kapsamadığını düşündükleri için Sunderland sınıflamasına 6. Dereceyi eklemişlerdir²³.

2.3.1. Seddon Sınıflaması

Nöropraksi: Sinirde geçici segmental iletim bloğu olup, anatomik bütünlük bozulmamış ve aksonun devamlılığı korunmuştur²⁴. Sinir yaralanmalarının en hafif dereceli olanıdır. Geçici bir blok söz konusudur. Yaralanma bölgesinde lokal miyelin onarımı tamamlandığı zaman spontan iyileşme görülür ve iyileşme tam olur. Cerrahi tedavi gerektirmez. İyileşme süreci 5 gün ile 3 ay arasında değişmektedir. Bu yaralanmalarda makroskopik olarak sinir normal iken histolojik olarak demiyelinizasyon görülür²⁵. Hasar bölgesinin distalindeki kasların uyarılabilirliği devam ettiği için Wallerian dejenerasyon görülmez²⁶.

Aksonotmezis: Bu yaralanmalarda Schwann hücre membranı, endonöryum, perinöryum ve epinöryumda hasar olmayıp, miyelin kılıf ve akson devamlılığında hasar mevcuttur. Lezyon bölgesinin distalinde Wallerian dejenerasyon görülür. Proksimalinde ise aksonal tomurcaklanma oluşmaya başlar. Endonöral tüp bütünlüğü korunmuştur. Bağ doku bütünlüğü devam ettiği için prognozu iyidir ve fonksiyonel geri dönüş oranı tamdır. Rejenerasyon günde yaklaşık 1-2mm hızla olur^{24,27,28}.

Nörotmezis: Periferik sinir yaralanmalarında görülmekte olan en şiddetli yaralanma türüdür. Sinirin anatomik bütünlüğünde kayıp vardır. Endonöryum, perinöryum ve epinöryumda hasar vardır. Sinirin hem proksimalinde hem de distal segmentinde dejenerasyon görülür. Endonöral kılıf bütünlüğü de çeşitli derecelerde bozulur. Bunlara ek olarak kanama, ödem, şiddetli bir enfektif reaksiyon mevcuttur ve bu yüzden fibrozis kaçınılmaz sonudur²⁴. Bu tür yaralanmada nöroma oluşma ihtimali yüksektir. Cerrahi girişim yapılmadan spontan rejenerasyon mümkün olmadığı için cerrahi onarım şarttır^{26,27,29}. Nörotmezis tarzında yaralanan bir periferik sinirde, tam bir fonksiyonel iyileşme olması beklenen bir durum değildir³⁰.

2.3.2. Sunderland Sınıflaması

1.derece hasar

Aksonal devamlılık korunmuş olup sinir iletiminde geçici blok mevcuttur. Seddon sınıflamasındaki nöropraksinin karşılığıdır.

2.derece hasar

Sinir liflerinin kılıfındaki endonöral devamlılık korunur. Lezyonun distalinde Wallerian dejenerasyon meydana gelir ve perifer ile aksonal devamlılık kaybolur. Seddon sınıflamasındaki aksotmezise eşdeğerdir.

3.derece hasar

Aksonal devamlılık, endonöryum ve Schwann hücre kılıfı hasarlanmıştır. Epinöryum ve perinöryum intakttır, fasikül devamlılığı korunmuştur.

4.derece hasar

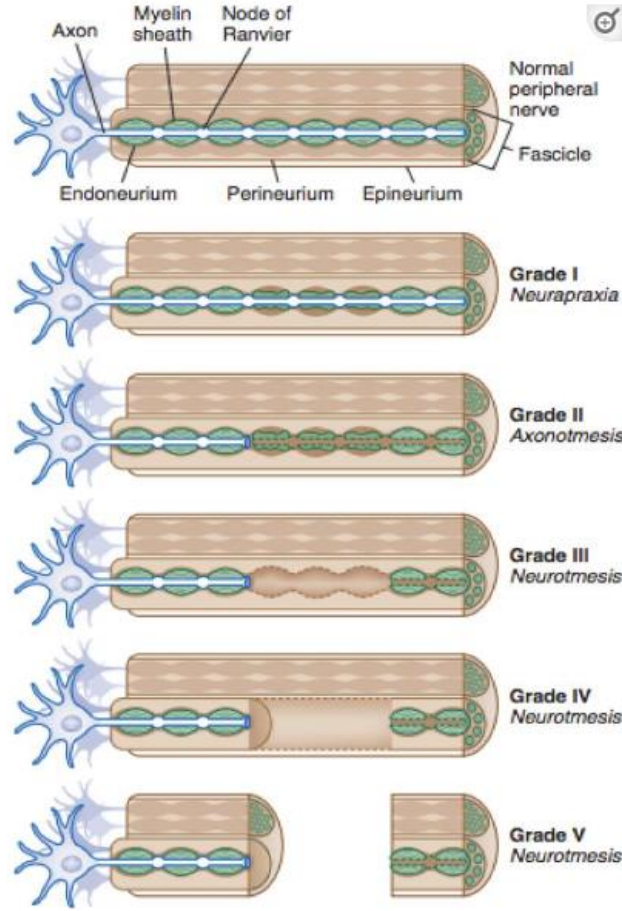
Epinöryum sağlam olmakla birlikte, aksonal devamlılık, endonöryum ve perinöryum hasarlanmıştır. Motor, duyu dallarında ciddi hasar meydana gelme riskinden dolayı cerrahi onarım gerektirir.

5.derece hasar

Sinir gövdesinin devamlılığında total kayıp mevcuttur. Cerrahi onarım zorunludur. Sunderland sınıflamasında 3, 4, 5. derece hasarlar nörotmezise eşdeğer olarak kabul görülür.

6.derece hasar

Sunderland sınıflamasında olmayıp Mackinnon tarafından eklenmiştir. Diğer 5 derece yaralanmaların kombinasyonu olarak tanımlanmıştır²³. Sinir lifi boyunca farklı tipte sinir hasarı birlikte görülür. (Şekil 2)



Classification of nerve trauma

From: Tsao B, Boulis N, Bethoux F, Murray B. Trauma of the Nervous System, Peripheral Nerve Trauma. In: Daroff: Bradley's Neurology in Clinical Practice, 6th ed. 2012 p 984-1001. (Image courtesy Cleveland Clinic, 2006. Illustrator: David Schumick, BS, CML.)

Şekil 2: Periferik sinir yaralanmalarının sınıflandırılması²³

2.4. Sinir Dejenerasyonu

Periferik sinir sistemine yaralanma sonrası bakıldığında santral sinir sisteminden farklı olarak hem dejenerasyon hem de rejenerasyon görülür³¹. Normal şartlarda sinir iyileşmesi o bölgeyi inerve eden sinir hücrelerinin çevresinde yer almakta olan periferik hedef hücrelerinin trofik etkisine bağlıdır³². Periferik sinir yaralanmalarında, yaralanmanın meydana geldiği sinir bölgesinin dışında, yaralanma bölgesinin proksimalinde, distalinde ve sinir hücre gövdesinde birbirini izleyen yapısal ve işlevsel değişiklikler ortaya çıkar. Yaralanma bölgesinin distalindeki tüm miyelinli veya miyelinsiz lifler Wallerian dejenerasyonuna uğrarlar³³.

2.4.1 Proksimal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler

Bir sinir lezyonunu takiben karşılık gelen sinir hücresi gövdeleri karakteristik olarak yapısal ve fonksiyonel değişikliklere uğrar³⁴. Yaralanmanın olduğu seviyeden itibaren

proksimal bölümdeki ilk Ranvier düğümüne kadar olan sinir segmentinde ilk başta dejenerasyonla ilgili süreçler meydana gelmeye başlar. Meydana gelen bu reaksiyonları etkileyen faktörler ise; yaralanmanın şiddeti ve yaralanma bölgesinin sinir gövdesine olan yakınlığına bağlıdır. Yaralanan bölgenin proksimalinde ilk başta akson ve miyelin kılıf çapında Schwann hücre hasarı sebebiyle azalma görülür. Bununla birlikte akson iletim hızı düşer. Aksonal yaralanmayı takiben ilk 6 saat içinde sinirin hücre gövdesi şişer, hacimsel artış olur, hücre çekirdeği merkezden periferik doğru göç eder. Ayrıca nissl cisimcikleri ve granüllü endoplazmik retikulumlar parçalanır. Gerçekleşmekte olan bu değişikliklere kromatoliz denir^{35,36,37,38}.

Hücre gövdesi reaksiyonu lezyonun yakınlığına göre değişebilir, proksimal lezyonlar bazen hücre gövdesinin ölümüne yol açar. Hücre içi değişiklikler yaralanmadan sonraki ikinci ve üçüncü haftada en yoğun olarak gerçekleşmektedir.

2.4.2 Distal Segmentte Meydana Gelen Değişiklikler

Bir sinir gövdesinin kesilmesinden sonra, distal akson segmentleri ilk olarak Wallerian dejenerasyonuna uğrar. Wallerian dejenerasyon Waller adlı araştırmacı tarafından 1850 yılında kurbağa hipoglossal sinir kesilmesi sonrası kesi distalindeki değişiklikleri incelemiş ve bu sürece Wallerian dejenerasyonu ismini vermiştir. Bu dejenerasyon sonrası akson ve miyelin kökenli maddeler temizlenip, rejenerasyon için uygun bir ortam oluşturulur. Bu temizlemeler sonrası ortada oluşan boş tüp yapısına endonöral tüp denir^{39,40,41}.

Kesi sonrası Schwann hücrelerinin mitotik aktivitesinde artış meydana gelir. Dejenerasyondaki proteolitik süreçlerde aksoplazmanın mikrotübül ve nöroflament yapıları bozulur. Aksonal hücre iskeleti yıkılır. Aksonal şişme görülür. Miyelin yapıları fragmente olur. Zaman içinde miyelin kılıfı Schwann hücreleri ve fagositler tarafından ortamdan uzaklaştırılır. Bu süreç ortalama birkaç ayı bulmaktadır^{39,42}. Yaralanmayı takiben 3-4. aylarda ise endonöral tüp küçülür. Endonöral kılıfta kalınlaşma görülür. Daha sonra endonöral tüp rejenere bir akson ile birleşir. Eğer bu bağlantı olmazsa tamamen oblitere olup, kaybolur. Aksonal devamlılık kaybını, distal aksonal segmentte Schwann hücrelerinin yoğun bir şekilde çoğalması takip eder ve hücreler sütunlar halinde sıralanır ve Büngner bantlarını oluştururlar^{43,44,45}.

2.5 Sinir Rejenerasyonu

Periferik sinir yaralanmaları sinir dejenerasyonu ve birbirini takip eden olaylar sonrası en sonunda rejenere olmuş aksonların periferdeki hedef organlara ulaşması ile sonlanır.

Rejenerasyonu başlatan ana olay nöronun etkili bir rejenerasyon yanıtı oluşturabilmesidir. Bu rejenerasyonu cevabı ise retrograd akson reaksiyonu sonrası meydana gelmektedir⁴⁶.

Yaralanma sonrası sinir gövdesinde hücrede hacim artışı, çekirdeğin perifere yerleşimi ve sitoplazmada bazofili kaybı olur. Bunun yanında aksonal büyüme için bazı proteinlerin sentezi de gereklidir⁴⁷.

Nöronun genetik ekspresyonunda meydana gelen hareketsiz bir durumdan rejeneratif bir duruma geçiş süreci, Wallerian dejenerasyonu tamamlandıktan sonra başlar⁴⁸. Yenilenen aksonal filizler yaralanma bölgesinin proksimalindeki ilk Ranvier düğümünden ortaya çıkar. Proksimal sinir güdüğünden çıkan ilk sinir lifleri geniş dallanmaya uğrar. Tek bir akson 50-100 kadar dal verir, ancak bu yeni dallar genellikle daha sonra kaybolan halkalar oluşturur. Eğer bu lifler için distal sinir ucu yok ise yenilenen aksonlar olgunlaşmamış sinir lifleri ve bağ dokusunun bir karışımı olan bir nöroma oluşturabilirler.

Hedef bağlantı yapıldıktan sonra, bir yavru akson hariç hepsi kademeli olarak geri çekilmeye başlar. Distal sinir güdüğünde yeniden oluşmasına izin verilen ancak hedefi yeniden sinirlendirmesi engellenen aksonal filizler 1 ~un çapındaki orijinal boyutlarını aşar, atrofik ana aksonların boyutuna yaklaşır ve miyelinli hale gelir. Büyüme konisi oluşumu hücre gövdesinden doğrudan destek almadan gerçekleşir ve aksonda bulunan malzemeye bağlıdır. Transit halindeki önceden var olan hücre iskeleti elemanları proksimal sinir güdüğünden çıkan yavru aksonlara taşınır¹⁸³(McQuarrie ve Lasek, 1989). Mikrotübüller ana aksonlar ve yavru aksonlar arasında aksonal büyüme için gerekli diğer seçilmiş materyallerin aktarılması için bir köprü oluşturur¹⁸⁴(Miller ve ark., 1987). İzole edilmiş aksonlarda bile devam eden taşıma in vitro büyüme konisi oluşumu için yeterlidir⁴⁹. Bu yüzden ki mikrotübül ve mikrofilament proteinlerinin her ikisi de aksonal büyüme ve fonksiyon artışı için önem arz etmektedir⁵⁰.

Yenilenen aksonların remiyelinizasyonu aksosoma ve Schwann hücreleri arasındaki temas ile başlatılır. Schwann hücreleri miyelin kılıfını sentezlese de miyelinleşmenin kapsamını belirleyen dışarı doğru büyümekte olan aksonlardır¹⁸⁵(Simpson ve Young, 1945). Periferik sinir rejenerasyonunun başarısı, aksonal ve miyelin kalıntılarının çıkarılmasının ardından distal sinir güdüğündeki büyüme ortamına kritik derecede bağlıdır. Yenilenen aksonlar, daha önce sağlam aksonlar ve miyelin kılıfları tarafından işgal edilen endonöral tüpler içindeki denerve hedeflere doğru büyür. İkinci yaralanmalarda, yenilenen aksonlar proksimal ve distal sinir güdükleri arasındaki bir boşluğu geçmelidir, bu da mikrocerrahi onarımla kolaylaştırılabilir. Hem proksimal hem de distal sinir güdüklerinden çoğalan Schwann hücreleri ve fibroblastlar boşluğu doldurmak ve bir hücre-matriks alt yapısı

sağlamak için göç etse de bu boşluğu başarıyla geçen rejenere aksonların sayısı yine de optimalden az olabilir. Yenilenen aksonal filizler yoğun bir şekilde dallanır ve boşalan endonöral tüplere görünüşte rastgele bir şekilde girer. Distal sinir güdüğündeki yoğun değişiklikler uygun bir büyüme ortamını sağlar. İzin verilen büyüme ortamı, istilacı makrofajlar ve yerleşik Schwann hücreleri tarafından miyelinin etkili fagositozunun yanı sıra nöronal olmayan hücreler ve hücre dışı matriks tarafından sağlanan nörotrofik faktörler ve substrat desteğinin sonucudur. Bunlar arasında Schwann hücreleri sinir rejenerasyonunda en kritik rol alan hücrelerdir¹⁸⁶(Cajal, 1928).

Proliferesyonu tamamlanan Schwann hücreleri tomurcukları kabul etmek için longitudinal kolonlar şeklinde birleşerek distal segmentte Büngner bandını oluşturlar⁵¹. Tomurcuklardan sadece Büngner bandına temas edenler yollarına devam edebilir⁵². Kesilmiş olan bölgedeki akson rejenerasyon üniteleri Büngner bandı boyunca distale doğru ilerlemeye devam eder. Son olarak periferik son organla bağlantı kurularak reinnervasyonu meydana getirirler.

2.6 Periferik Sinir Onarımı Prensipleri

Günümüzde Sinir onarımının sonuçları mikrocerrahi tekniklerin ortaya çıkmasıyla önemli ölçüde iyileşmiştir. Hanno Millessi gerilimsiz bir onarımı vurgulayarak bu tekniklere öncülük etmiştir⁵³. Sinir onarımının temel prensipleri, uzun yıllardır önemli ölçüde bir değişiklik olmadan geçerliliğini korumaktadır. Bu ilkeler şunları içermektedir:

- Motor ve duyu muayenesi için ameliyat öncesinde kantitatif bir değerlendirme yapılmalıdır.
- Büyütme, enstrümantasyon ve mikro sütürleri içeren mikrocerrahi tekniği olmalıdır.
- Onarım gerilim olmayacak şekilde yapılmalıdır.
- Eğer gerilimsiz onarım yapmak mümkün değilse, interpozisyonel sinir grefti kullanılmalıdır.
- Koşullar el veriyorsa primer onarım yapılmalıdır.
- Şiddetli ezilme, gerilme veya sinir dokusu kaybı vb. gibi primer onarımın optimal olmadığı durumlarda onarım 3 hafta geciktirilmelidir.
- Sinir kaymasına izin vermek için erken korunan hareket aralığı.
- Klinik sonucu en üst düzeye çıkarmak, hareket aralığını korumak için postoperatif motor ve duyu eğitim rehabilitasyonu gerçekleştirilmelidir.

2.6.1 Sinir Onarım Teknikleri

Sinir transeksiyonundan sonra tercih edilen ana yöntem primer sinir onarımıdır⁵⁴. Yaralanmadan hemen sonra veya iki gün içinde yapılması önerilir. Onarımın düzenli bir yara içinde yapılması önemlidir. Bir sinir gövdesini onarma prosedürü dört adıma bölünebilir. İlk adım sinir uçları nekrotik doku olmadan canlı bir sinir ucu elde etmek için hazırlanmasıyla başlar (hazırlık). Sinir uçları mikrocerrahi aletler kullanılarak dikkatli bir şekilde incelenir. Sinir uçlarının nekrotik kısmını çıkarmak için bir çift keskin mikro makas veya cerrahi bıçak kullanılabilir. Eğer bir laserasyon ya da kontüzyon varsa, örneğin silah atışı yaralanmalarında olduğu gibi rezeksiyonun sınırlarını değerlendirmek zor olabilmektedir.

Sinir uçları hazırlanması tamamlandıktan sonra, boşluğun uzunluğunu ve sinir segmentlerinin gerginliğini ayarlamanın önemi akılda tutularak yaklaştırılmalıdır (yaklaştırma). Yaklaştırma sırasında sinir uçları diseksiyonla hafifçe mobilize edilebilir, ancak geniş intrafasiküler diseksiyondan kaçınılmasına dikkat edilmelidir. Sinir uçları koaptasyonu yapılır. Sinir uçları arasında minimal bir boşluk bırakılması tavsiye edilebilir. Böyle bir boşluk hızla bir kan ile dolar ve yukarıda belirtildiği gibi makrofajlar içeren bir fibrin matriks oluşur. Böyle bir fibrin matriks içinde Schwann hücreleri hem proksimal hem de distal sinir segmentinden göç eder. Proksimal sinir ucundan gelen aksonlar Schwann hücreleri ile uyum içinde büyür⁵⁵.

Sinir onarımı absorbe olmayan dikişlerle yapılır (bakım); 9-0 veya 10-0 naylon (bazen daha kalın sütür materyalleri özel durumlarda uygun olabilir) epinöryuma yerleştirilir. Böylece kesintili epinöral sütürler onarımı sürdürür. Sütürler yerleştirilirken sinir uçlarının malrotasyonundan kaçınılmaya çalışılmalıdır. Longitudinal intranöral kan damarlarının tanımlanması bu konuda yardımcı olabilir.

Belirli vakalarda, spesifik hedefleri olan fasiküllerin iyi tanımlandığı distal seviyede olmak üzere, onarım için bireysel fasiküler grupları tanımlamak mümkündür (grup fasiküler sinir onarımı)⁵⁴.

Tüm sinir onarımları cerrahi büyüteçler (büyütme $\times$ 3,5) kullanılarak gerçekleştirilir, ancak bazı durumlarda mikroskop kullanılması tavsiye edilebilir. Periferik sinir onarımında kullanılan koaptasyon teknikleri şunlardan oluşmaktadır⁵⁶.

- Uç-uca onarım (-Epinöral Onarım, -Grup Fasiküler Onarım, -Fasiküler Onarım)
- Uç-yan onarım
- Sinir greftleri ile onarım

2.6.1.1 Uç Uca Onarım

Uç uca sinir onarımları sinir uçlarının lup altında veya cerrahi mikroskop kullanılarak bir araya getirildikten sonra sütürların atılmasıdır. Epinöral, grup fasiküler ya da fasiküler onarım olarak yapılabilmektedir. Sütür hattı bölgesinde gelişen fibrozis ve skar oluşumunun olabildiğince azaltılması fonksiyonel bir iyileşmenin elde edilebilmesi için önem arz etmektedir. Bu yüzden koaptasyon için kullanılan sütür materyali ve uygulanan cerrahi teknik seçimi önemlidir. Sütür işlemi için kullanılacak iğne mümkün olduğu kadar ince ve minimal travmatik olmalı, suture edilecek sinirin kalınlığına göre 8-0 ya da 10-0 sütür materyalleri kullanılmalı, sütür sayısı çok fazla olmamalıdır^{57,58}.

Epinöral Onarım

Epinöral dikiş onarımı, onarım teknikleri açısından en geleneksel ve sık olarak kullanılan onarım yöntemidir^{59,60,61}. Genellikle gerçekten kesilen bir sinir hasarı olduğu olgularda uygulanır. Dikişler epinöral kılıftan geçilerek atılır. Epinöral onarımın en can alıcı prensibi ise sinir gövdelerinin devamlılığını gerilim altında olmadan ve uygun anatomik hizalamayla sağlamaktır. Epinöryumdaki longitudinal uzanan kan damarları gibi yüzey özellikleri, sinirin rotasyonel hizalanması sırasında bize yardımcı olabilir. Bu, cerrahın fasikülleri doğru bir şekilde birleştirmesine olanak sağlar⁶¹. İlk dikiş atılmadan önce fasiküler düzenleme yeniden kontrol edilip ve özenle eşleştirilir.

Sütür onarımı, büyütme altında 8-0 naylon veya 9-0 naylon emilmeyen dikişler kullanılarak gerçekleştirilir. Sinir onarımı, mobilizasyon sırasında rotasyonel yer değiştirmeyi önlemek için ilk önce epinöryumdan 180 derece aralıklarla iki yönlendirici lateral sütür yerleştirilerek başlanılır. Dikiş epinöryumun proksimal ve distaldeki normal alanına yerleştirildikten sonra çok gergin olmayacak şekilde bağlanır. Lateral sütürler bağlandıktan sonra sütürlerin kuyrukları ince hemostat gibi bir aletle tutulabilir, böylece sinirin rotasyonu arka duvarın koaptasyonu için bize yol gösterici olur. Gündüklerin yan kenarları hafifçe genişletilir, böylece proksimal ve distal epinöral kenarlar net bir şekilde uyum sağlayıp görülmesi kolaylaşır. İki gövdeyi ayarlamak için ilave kesintili dikişler bunlara daha güçlü bir şekilde yaklaşır. Dikiş iğnesi epinöral kılıftan geçerken, daha derindeki yapının küçük bir kısmı genellikle dikişin içinde tutulur, böylece fasiküler koaptasyon uygun şekilde korunur. Epinöryumun sıkı bir şekilde dikiş atılmayıp gevşek bir şekilde sütürasyon yapıldığında ise, uyumsuzluğa, hatalı hizalamaya veya fasiküllerin çıkıntı yapmasına neden olur. Bu durum bir dikişle bir arada tutulan epinöryum arasında küçük bir boşluk bırakılarak önüne geçilebilir.

Sinir gövdelerinin doğru şekilde koaptasyonunu sağlamak için olabildiğince minimum sayıda epinöral sütürün atılması önerilir.

Grup Fasiküler Onarım

Gruplandırılmış fasiküler onarım, epinöral onarıma göre potansiyel olarak çok daha uygun ve pratik bir tekniktir⁶². Bu teknik ana sinir içerisinde en iyi ve en özel işlevleri tanımlanmış olan sinir kesilerinde kullanılır. Eşleşen fasikül gruplarının bağlantısı interfasiküler epinöryuma sütür atılarak sağlanır. Dış epinöryum ayrılıp geriye doğru alınır, bitişik fasikül grupları dikkatli bir şekilde izole edilir. Sinir yaralanmalarında çok fazla hasarlı doku olduğunda fasiküllerin ayırt edilmesi zor olabilir. Bu yüzden hasarlı dokuların normal fasikül grupları görülene kadar debritmanı yapılmalıdır. Fasikül grupları diseke edilip, proksimal ve distal uç hazırlandıktan sonra interfasiküler epinöryuma 8-0 veya 10-0 sütürlar atılarak koaptasyon sağlanır⁶³. Genellikle 2 veya 3 adet sütür kullanılır. Skar oluşumunu engellemek için koaptasyon olabildiğince gerilim olmadan yapılmalı ve en az sayıda sütür atılmalıdır.

Fasiküler Onarım

Fasiküler onarım, optimal hizalamayı sağlamak için proksimal ve distal sinir güdüklerinde karşılıklı gelen sinir fasiküllerinin sütürasyonunu içermektedir. Bu izole fasiküllerinin yeniden bir araya getirilmesi perinöryumun dikilmesiyle sağlanır. Sinir kesisinin olduğu kesit alanının yaklaşık 2 katı kadar dış epinöryum sıyrılır. Fasikül etrafında bulunan paranöral bağ dokusu koaptasyonu örtmek için kullanılabilir, bu nedenle korunmalıdır. Fasiküller izole edilirken fasiküllerin arasındaki gevşek bağ dokuları ve damarların hasarlanmamasına dikkat edilmelidir. Fasiküler diseksiyon lezyon bölgesinin proksimal ve distalinde az miktarda interfasiküler epinöryumun çıkarılması ve fasiküllerin yaralı bölgeye yaklaşırken ayrılmasıyla elde edilir. Her bir fasikül perinöryumda yerleşmiş olan Fontana'nın spiral bantları ile tanımlanabilir⁶⁴.

Fasiküllerin diseksiyonu sonrası proksimal ve distal uç eşleştirilip perinöryum boyunca, birbirinden 120 ila 180 derece uzaklıkta yerleştirilmiş olan 2 veya 3 adet 10-0 veya 11-0 sütürlar ile koaptasyon yapılır. Sütürları yalnızca perinöryuma atılmalı endonöral içeriğin karışmamasına dikkat edilmelidir.

2.6.1.2 Uç Yan Onarım

Periferik sinir onarımında kullanılan tekniklerden biri olan uç yan onarım, 1800'lü yılların sonlarında kullanılmaya başlanmıştır. Kullanılmakta olan bu prosedür, yaralı bir sinirin bir veya iki distal sinir ucunun uçtan uca sağlam bir donör sinirine bağlanmasını içerir.

Uç yan onarım; sağlam donör sinirde hasar yaratmaksızın, distal hedef organların yeniden innervasyonuna imkân sağlayan bir tekniktir. Sağlam donör sinirden, hasarlanmış sinirin distal ucuna aksonların rejenerasyonu ve son organdaki reinnervasyonların lateral filizlenme yoluyla olduğu, deneysel olarak yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{65,66}.

2.6.1.3 Sinir Grefti ile Onarım

Sinir onarımı bölgesinde doğrudan onarımda eğer belirgin bir gerilim söz konusu olduğunda, sinir onarımı bölgesindeki aşırı gerilim en sonunda fonksiyonel iyileşmeyi azaltacağından greftleme önerilir^{67,68,69,70}. Sinir boşluğu onarımı için biyoyapay kondütler, çeşitli sinir dokusu olmayan kanallar ve sinir allogreftleri kullanılmıştır. Proksimal ve distal sinir uçları arasında defekt olduğunda boşluk onarımı için altın standart ise sinir otogrefti olmayı sürdürmektedir^{67,71,72}.

Sinir greftleri, rejenere olan aksonlar için bir kondüt vazifesi görmektedir. Ayrıca Schwann hücrelerinin, büyüme faktörü ve bazal lamina komponentleri için de kaynak oluşturduğu düşünülmektedir. Bu maddeler nörotropik ve nörotrofik etkiler ile nöronal büyümeye yardımcı olmalarına rağmen, konvansiyonel sinir otogreftlemenin nihai sonuçları çoğu zaman istenilen düzeyde olmadığı gözlenmektedir⁷³.

2.7 Eksozom

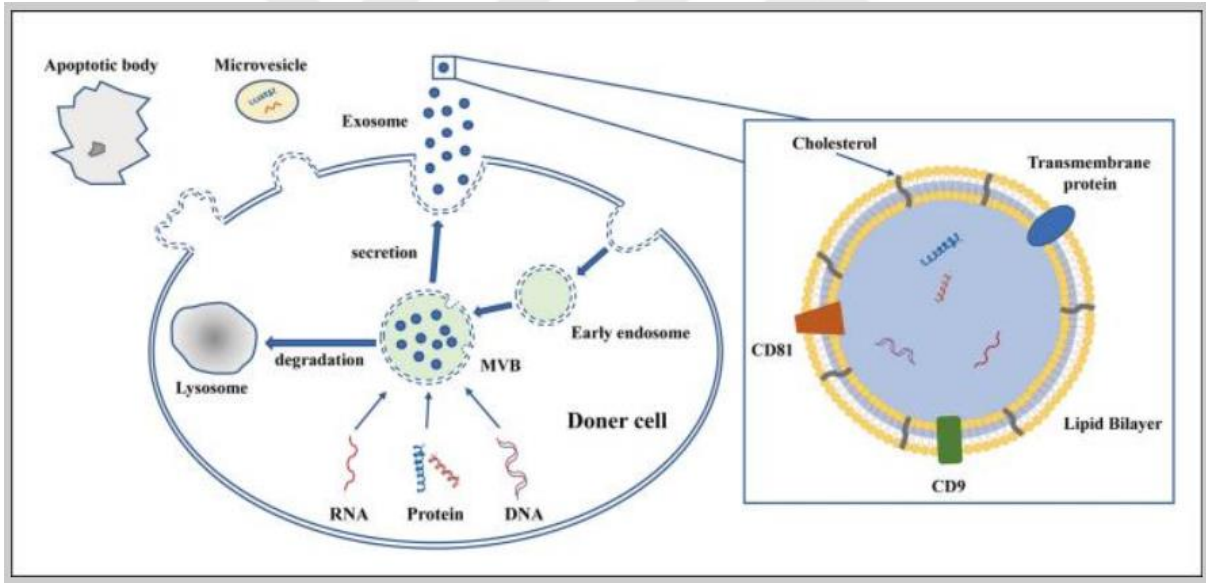
Eksozomlar, mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), immünositler, nöronlar, kanserli hücreler, epitel hücreleri, osteositler ve miyositler dahil olmak üzere vücuttaki neredeyse tüm hücre tipleri tarafından ekstrasellüler boşluğa salgılanan membranöz nano boyutlu veziküllerdir^{74,75}.

Eksozom kavramını, literatürde ilk olarak 1981'de Trams ve ark.⁷⁶ toplu olarak plazma zarı kaynaklı veziküllere eksozomlar olarak atıfta bulunulmuş ve ilk olarak fizyolojik fonksiyonlara sahip olabilecek ve çeşitli hücre hattı kültürlerinin eksüstasyonundan kaynaklanabilecek 5'-nükleotid enzim aktivitesine sahip membran vezikülleri olarak kabul etmişlerdir.

Eksozom kelime olarak başlangıç zamanlarında multiveziküler endozomlar tarafından salınan hücre dışı vezikülleri farklılaştırıcı retikülositlerden ayırt etmek için kullanılmıştır⁷⁷. Eksozomlar, hücrelerde multiveziküler cisimlerden üretilir ve ekzositoz yoluyla hücre dışı boşluğa salınımları gerçekleşir.

2.7.1 Eksozom Biyogenezi

Eksozomların biyogenezi çok çeşitli sinyal yolları aracılığıyla düzenlenmesi sağlanan çok aşamalı bir biyolojik süreç olarak kabul görmektedir. Ökaryotik hücrelerin yaşam döngüsü boyunca, zaman zaman küçük miktarlarda hücre içi sıvı yutulur ve erken endozom adı verilen küçük hücre içi cisimler oluşturulur. Eksozom biyogenezi plazma zarının içe doğru tomurcuklanıp erken endozomların oluşmasıyla başlamaktadır. Erken endozomlar endositik veziküllerle kaynaşıp içeriklerini birleştirir; ortaya çıkan veziküllerin geri dönüşüm, bozunma veya eksozitoz gibi süreçleri olabilir. Erken endozomlar olgunlaştıkça geç endozom zarının daha fazla invaginasyonu ile intraluminal veziküller (ILV'ler) üretilir ve bu da multiveziküler cisimlerin (MVB'ler) oluşumuna neden olur. Bu süreç, belirli molekülleri ILV'lere sıralamak ve kapsüllemek için gerekli mekanizmaları sağlayan taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksleri (ESCRT) bağımlı ve ESCRT'den bağımsız olmak üzere iki farklı yolla tamamlanır⁷⁸. Son olarak, MVB'ler bozunma için lizozomlarla birleşebilir ya da alternatif olarak, MVB'ler, ILV'leri eksozom olarak hücre dışı boşluğa salmak için plazma zarı ile kaynaşabilirler⁷⁹. Yani eksozomlar plazma zarı kaynaklıdır. (Şekil 3)



Şekil 3:Eksozomların biyogenezi, salgılanması ve yapısı⁸⁰.

Eksozomun biyogenezi için kesin mekanizmanın anlaşılmasına yönelik çalışmalar günümüzde de hala devam etmektedir. Tanımlanan mekanizmalar ise; protein sınıflandırması için geniş çapta açıklanan iki yola ayrılmaktadır. Bunlar;

- Endozomal sıralama kompleksi taşınımına (ESCRT) bağımlı yolak
- ESCRT'den bağımsız yolaktır.

Ubikitillenmiş proteinleri tanıyan en iyi karakterize edilmiş yol, taşıma için gerekli endozomal ayırma komplekslerine (ESCRT) dayanmaktadır (Trajkovic ve ark., 2008). ESCRT dört kompleks proteinlerden oluşur: ESCRT-0, ubikitine bağımlı bir şekilde kargo kümelenmesinden sorumludur, ESCRT-I ve ESCRT-II tomurcuk oluşumunu indükler, ESCRT-III vezikül ayrılmasını sağlar ve aksesuar proteinler (özellikle VPS4 ATPaz) ESCRT mekanizmasının ayrışmasına ve geri dönüşümüne izin verir. ESCRT ailesinin üyeleri olan TSG101 ve ALIX (gen adı: PDCD6IP), bu mekanizmaya ait oldukları bilinmeden önce bile, fare dendritik hücre (DC) kaynaklı eksozomların ilk kapsamlı proteomik analizinde bulunmuştur⁸¹.

Son zamanlarda gösterilen bir başka yol da ESCRT'den bağımsız yoldur. Temel ESCRT bileşenlerinin ortadan kaldırılması MVB'lerin kusurlu oluşumuna yol açar, ancak tamamen yok olmalarına yol açmaz, bu da ESCRT'den bağımsız mekanizmanın var olduğunu gösterir. Bu yolda veziküllerin oluşumu, lipid ve kargo alanlarının kendi kendini organize etmesine bağlıdır. Proteolipid protein (PLP), kolesterol, fosfolipaz D2 (PLD2) gibi çeşitli lipidler, ESCRT inhibisyonundan sonra salgılanan eksozom membranlarında zenginleştirilmiştir. Bu lipidlerin ESCRT'den bağımsız yolda eksozom biyogenezi için farklı hücre tiplerinde gerekli olduğu görülmektedir.

2.7.2 Eksozomların Özellikleri ve Fonksiyonları

Eksozomlar canlılardaki metabolik olayların üzerinde pleiotropik etki gösterebildiği görülmüştür. Vücutta pek çok hücre tarafından hücre dışı boşluğa salgılanan; tükürük, idrar ve kan gibi tüm biyolojik sıvılarda bulunan eksozomların en önemli biyolojik özelliği kargo içeriklerini alıcı hücrelere aktararak hücre içi iletişimde anahtar bir rol almalarıdır. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında anlaşılmıştır ki tümör hücrelerinden türetilen eksozomların sahip olduğu onkojenik kargo içeriğini alıcı hücrelere aktararak hedef hücrelerde genetik ekspresyonu düzenler ve tümör gelişimi, metastazı ve ilaç direnci oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir⁸². Eksozomlar, salgılandıkları hücrelere benzer özellik göstermekte olup bu hücrelerin yüzey belirteçlerini de bulundurdıkları için birçok hastalıkta tanı aracı olarak kullanılabilirler⁸³. Eksozomlar bünyesinde bulundurduğu zengin protein içerikleri sayesinde tespit edilemeyecek kadar az oranda eksprese edilen yüzey belirteçlerinin bile bulunmasına imkan vermektedir⁸⁴.

Eksozomların ayrıca vücutta immün modülasyonda da görev aldıkları ortaya konulmuştur. Örnek olarak kanser hücreleri tarafından galektin 9 ve Fas ligandı gibi immün hücrelerin apoptozonu indükleyen kargo içeriğine sahip eksozomların üretimi ve salımı,

kanser hücrelerinin immünsupresif etki için kullandığı mekanizmalardan biridir⁸⁵. Bir diğer yandan antijen sunan hücrelerden salınan eksozomlar ise immünolojik cevap aktivasyonunda çok önemli bir görev alırlar. Antijen sunan dendritik hücrelerden türetilen eksozomların, antijene özgü T hücresi aktivasyonunu indüklediği gösterilmiştir⁸⁶.

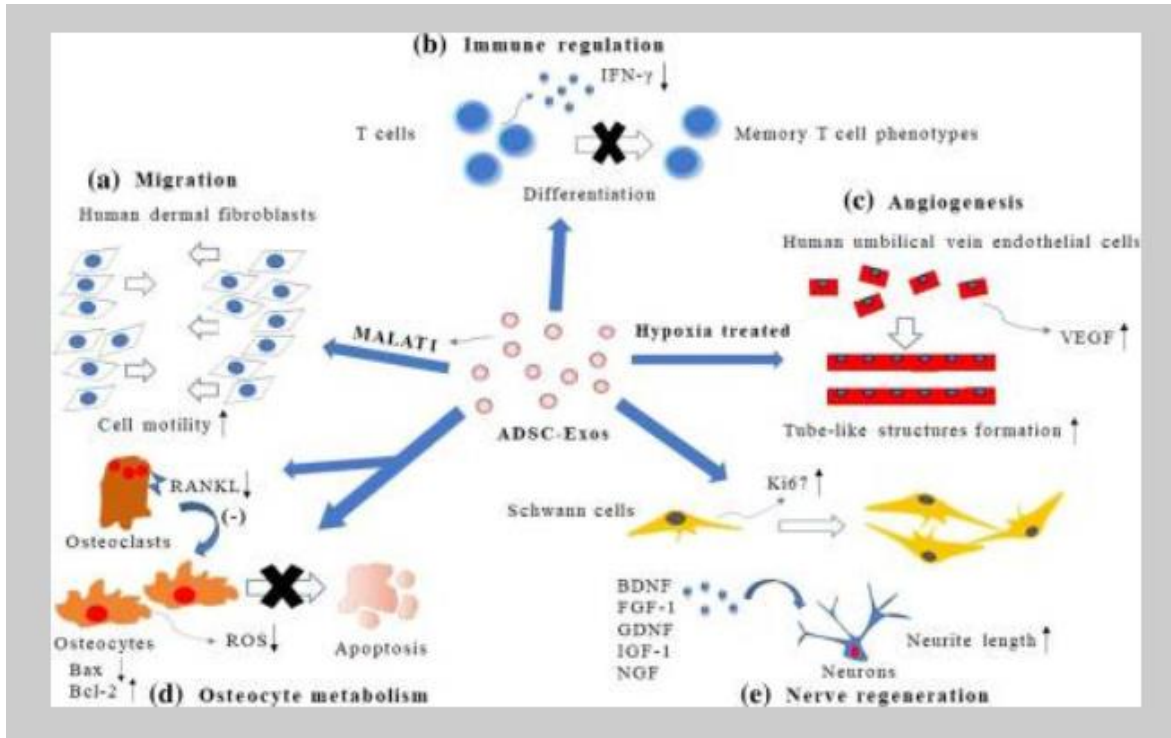
Retikülositlerin eritrositlere olgunlaşması sırasında işlev almayan transferin reseptörlerinin eksozomlar ile hücreden uzaklaştırıldığı gösterilmiştir⁸⁷. Bu sayede eksozomlar hücrelerdeki istenmeyen atıkları hücre dışına atarak hücreleri iç ve dış strese karşı korumaktadır.

Eksozomların, sinir sistemindeki fizyolojik özellikleri, çeşitli sinir hücreleri arasındaki bağlantı, entegrasyon ve sinyal alışverişine dayanır⁸⁸. Eksozomlar, hücreler arası iletişimin kilit oyuncularını olarak, sinir sisteminin gelişimi, bakımı, işlevi ve yenilenmesinde temel bir rol oynar⁸⁹.

2.7.2.1 Adipozomal Kök Hücreler Kaynaklı Eksozomların Fonksiyonları

Adipoz mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların birçok çalışmada hücre proliferasyonu, migrasyon ve apoptozda rol aldığı gösterilmiştir. Birçok çalışma, adipoz dokudan vasküler endotel hücreleri, tümör hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinde farklı mekanizmalarla proliferasyon ve migrasyondaki rolünü göstermiştir^{90, 91, 92}. (Şekil 4)

Adipoz mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların damar oluşumunu uyayabilirdiği ve vasküler endotel hücrelerinin hücre içine invazyonunu ve göçünü arttırmak için matriks metalloproteinaz (MMP) sekresyonunu indükleyebildiği bu çalışmada görülmüştür⁹¹.



Şekil 4: Adipozomal kök hücreli kaynaklı eksozomların fonksiyonları⁹³.

Bu arada, vasküler rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklemeye katkıda bulunan çeşitli büyüme faktörlerini serbest bırakarak nöroprotektif etkiler gösterebilecek oldukları da çeşitli araştırmalarda tartışılmıştır^{94, 95, 96}.

Biriken kanıtlar, eksozomların yaralanma sonrası sinir onarımını modüle etmek için vasküler rejenerasyona aracılık edebileceğini göstermiştir. Zhang ve ark.⁹⁷ multipotent mezenkimal kök hücrelerden kaynaklanan eksozomların, lezyon sınır bölgesinde yeni üretilen endotel hücrelerinin sayısını önemli ölçüde artırdığını ve travmatik beyin hasarından sonra sıçanlarda motor fonksiyonun iyileşmesini etkili bir şekilde iyileştiren daha yeni oluşturulmuş damarlar elde ettiğini göstermiştir.

Yang ve ark.⁹⁸ adipoz mezenkimal kök hücrelerden kaynaklanan eksozomların, miR-181b-5p'nin ekspresyonunu yükselterek ve hedef geçici reseptör potansiyeli melastatin 7'nin ekspresyonunu inhibe ederek oksijen-glikoz yoksunluğundan sonra beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin hareketliliğini ve revaskülarizasyonunu destekleyebileceğini bulmuşlardır. Eksozom tedavisine bağlı revaskülarizasyon, inme sonrası beyinde nörit yeniden büyümesini ve sinaptogenezi artırarak fonksiyonel iyileşmeyi destekleyebilir.

Bu çalışmalar, eksozomların aracılık ettiği vasküler rejenerasyonun, periferik sinir yaralanmaları için potansiyel bir terapötik strateji sağlayan sinir sisteminde doku rejenerasyonuna yardımcı olduğunu göstermektedir.

Son zamanlarda, yapılan çalışmalarda araştırmacılar MKH'lerden türetilen eksozomların anjiyogenezi destekleyebileceğini kanıtlamışlardır⁹⁹. Özellikle adipoz mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların miR-126, miR-130'a, miR-132 gibi anjiyogenezi ile ilgili MiRNA'ların bir alt sınıfı taşıdıkları bulunmuştur^{100,101}. Bu eksozomlar bir diğer yandan endotel hücrelerinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi çeşitli büyüme faktörlerini de artırarak anjiyogeneze destek oldukları da bulunmuştur¹⁰².

Eksozomlar ayrıca hücre apoptozunda, proteinleri ve miRNA'ları aktararak ve düzenleyerek inhibitör bir rol alabileceği görülmüştür. Ma ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, adipoz mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların apoptozu indükleyen Bax proteinin ekspresyonunu azalttığı aynı zamanda antiapoptotik protein olan Bcl-2'nin ekspresyonunu ise artırdığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca HaCaT hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü teşvik ettiğini de göstermişlerdir¹⁰³.

ADSC-Exos immun yanıt ve inflammatuar yanıtların düzenlemesinde de etkileri olduğu görülmüştür. ADSC-Exos interferon-gama sekresyonunu azaltarak T hücre aktivasyonunu engeller. Bu eksozomlar ayrıca MHC sınıf II ve kostimulatör molekülleri olmadığı için T hücre aktive edilmesinde doğrudan inhibitör etkiye sahiptirler¹⁰⁴.

Sinir yaralanmalarında inflammatuar yanıt, sinir onarımı sonrası prognoz üzerinde büyük etkiye sahip olan önemli bir patolojik süreçtir.¹⁰⁵ Periferik sinir yaralanmalarından sonra, Schwann hücreleri Wallerian dejenerasyonu sırasında çeşitli inflammatuar sitokinleri ve kemokinleri aktive eder ve salgılar. Daha sonra, akson ve miyelin kalıntılarının temizlenmesini daha da hızlandırmak ve inflammatuar bir kaskat başlatmak için makrofajlar görev almaya başlar^{104,106}. Sinir hasarından sonra onarım aşamasında birincil bağışıklık hücresi tipi olan makrofajlar, başarılı sinir rejenerasyonu için gerekli olan birbirini takip eden bir takım bağışıklık olayını koordine etmede çok önemli bir rol oynar^{107, 108}. M1 makrofajları, IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IFN- γ gibi inflammatuar sitokinler salgılayabilir ve bu da daha fazla doku hasarına neden olabilir. M2 makrofajları, IL-4 ve IL-10 üreterek bağışıklık tepkisinde inhibe edici bir role sahiptir^{109,110}.

İnflamasyonun erken evresinde, makrofajlar esas olarak M1 pro-inflammatuar fenotipini gösterir ve geç aşamada M2 anti-inflammatuar fenotipine dönüşür, bu sayede inflamasyon gelişimini etkili bir şekilde kontrol edebilir¹¹¹.

İnflammatuar yanıt, periferik sinir dokusunu rejenerasyonu destekleyen bir duruma dönüştürmeye yardımcı olur¹¹². Bununla birlikte, nöroinflamasyonun aşırı aktivasyonu, ikincil hasar üzerinden sinir hasarının derecesini kötüleştirebilir ve bu da gecikmiş veya yetersiz

rejenerasyona yol açabilir. Periferik sinir yaralanmalarını takip eden onarım sürecinde, inflamatuvar yanıtın uygun şekilde düzenlenmesi, nöroinflamasyonun neden olduğu nöron apoptozunu ve akson demiyelinizasyonunu inhibe edebilir^{113,114}.

Birçok çalışma, eksozomların sinir sistemindeki bağışıklık tepkilerini manipüle etmek için modülatör görevi görebileceğini öne sürmüştür¹¹⁵. Parakrin etkilerden sorumlu temel araçlar olarak MKH'den türetilmiş eksozomların, sinir rejenerasyonu için uygun koşullar sağlayabilen ana hücrelere benzer anti-inflamatuvar işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir¹¹⁶. Güneş ve ark.¹¹⁰ göbek kordonu MKH'den türetilen eksozomların, makrofaj polarizasyonunu M1 den M2 fenotipine dönüştürdüğünü bu sayede aşırı inflamatuvar yanıtı inhibe etmeyi desteklediğini bu sayede yaralanma bölgesinin iltihabını hafifleterek omurilik yaralanmasının iyileşmesini destekleyebileceğini göstermiştir. Ayrıca, *in vivo* çalışmalar, makrofaj fenotipinin transformasyonu dışında, bu eksozomların, TNF- α , MIP-1 α , IL-6 ve IFN- γ gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin aşağı regülasyonu yoluyla yaralanma sonrası fonksiyonel iyileşmeyi iyileştirebileceğini ortaya koymuştur.

Ma ve ark.¹¹⁷, yaptığı çalışmada göbek kordonu MSC üretilen eksozomların sıçan siyatik sinir transeksiyonunun onarımı modelinde pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-6 ve IL-1 β seviyesini azaltıp, antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyesini artırarak immünosupresyon fonksiyonuna yardımcı olabileceğini buldular, bu sayede periferik sinir rejenerasyonu için önemli avantajlar sunabilirler.

Diş eti MKH'den türetilen eksozomların, sıçan siyatik sinir hasarında kitin kanallarının terapötik etkilerini iyileştiren IL-1 reseptör antagonistinin salgılanmasını düzenleyerek inflamasyonun inhibisyonuna katıldığı da bildirilmiştir^{118, 119}.

MKH'den türetilmiş eksozomlara ek olarak, Schwann hücrelerinden türetilmiş eksozomların, α B-kristalin ve galektin-1 olmak üzere iki proteinin varlığından dolayı sinir hasarının inflamatuvar fazında düzenleyici bir role sahip olduğu gösterilmiştir¹²⁰.

Bu çalışmalar, eksozom aracılı immünomodülatör etkinin, periferik sinir rejenerasyonu için faydalı mikroçevrenin kurulmasını kolaylaştıran nöroinflamasyonun rasyonel kontrolüne katkıda bulunduğunu göstermiştir.

ADSC-Exos'un Schwann hücre proliferasyonunu uyurabileceğini ve siklin Ki67'nin ekspresyonunu artırabileceğini bulmuşlardır, bu da eksozomların dorsal kök ganglion (DRG) nöronlarının nörit uzunluğunu artırabileceğini göstermektedir. Dahası, araştırmacılar ADSC-Exos'ta¹²¹ beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), sinir büyüme faktörü (NGF), FGF-1 ve glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) gibi nöral büyüme faktörlerinin varlığını göstermiştir.

Bucan ve ark.¹²¹ yağ mezenkimal kök hücre türevi eksozomların, in vitro DRG nöronlarının nörit büyümesini arttırdığını ve siyatik sinirin in vivo ezilme hasarından sonra rejenerasyonu arttırdığını, bunun da esas olarak bu eksozomlarda çoklu nörotrofik faktörlerin varlığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ek olarak, düşük dozlarda ADSC-Exos, bu hücreler H₂O₂ ile oksidatif hasara maruz kaldıktan sonra apoptotik kaskadı inhibe ederek sinir hücrelerinin yaşayabilirliğini arttırdığı ve bu hücreler üzerinde antiapoptotik etkileri olduğunu görülmüştür. Dahası, eksozomlar remiyelinizasyon sürecini artırabilir ve nöro-rejenerasyon fonksiyonlarını yerine getirmek için nestin-pozitif oligodendroglia öncüllerini aktive edebilirler¹²².

2.7.3 Eksozom İzolasyon Teknikleri

Eksozomların her geçen gün yapılan incelemeler sayesinde potansiyel etkinleri görüldükçe, potansiyel uygulama değeri sürekli olarak artmaktadır. Eksozomların çoğaltılabilir izolasyonu ve zenginleştirilmesi, biyolojik işlevlerinin değerlendirilmesine ve daha etkili bir şekilde terapötik olarak kullanılmasına yardımcı olacaktır. Buna bağlı olarak, eksozomlar boyut, işlev, içerik ve donör açıdan çok heterojendirler¹²³. Bu da onların izole edilmesindeki en büyük zorluklardandır. Bu nedenle, eksozomların verimli bir şekilde nasıl zenginleştirileceği şu anda önemli bir konudur. Farklı amaçlar ve uygulamalar için, aralarında ultrasantrifüjleme, boyuta dayalı izolasyon teknikleri, polimer çökeltme, immünoafinite yakalama tekniklerinin ve ticari kitlerin daha yaygın olarak kullanıldığı farklı izolasyon yöntemleri seçilmektedir.

2.7.3.1. Ultrasantrifüjleme Teknikleri

Bu teknik şu anda kullanılan en yaygın izolasyon tekniğidir. Eksozom ekstraksiyonu ve ayrılması için de altın standart olarak kabul görmektedir. Ultrasantrifüjleme temel olarak orijinal çözeltideki her bir bileşenin boyut ve yoğunluk farklılıklarına dayalı olarak gerekli bileşenleri toplar, bu nedenle sedimantasyon katsayısında önemli farklılıklar olan büyük doz örnek bileşenlerinin ayrılması için uygundur¹²⁴.

Ultrasantrifüjleme esas olarak iki aşamaya ayrılır; ilk adımda, ölü hücreleri, hücre kalıntılarını ve büyük boyutlu hücre dışı vezikülleri çıkarmak için bir dizi sürekli düşük-orta hızlı santrifüjleme yapılır. Daha sonra ikinci adımda ise eksozomları ayırmak için 100.000 × g santrifüj kuvvetiyle daha yüksek bir hızda santrifüjleme yapılır ve bu aşamada eksozomlar kontamine edici proteinler gibi safsızlıkları gidermek için PBS ile yıkanır.

Çalışmalarda santrifüj kuvveti, santrifüj süresi, rotor tipi ve parametrelerinin hepsinin hedef eksozomların verimini ve saflığını etkileyebileceği görülmüştür^{124,125}.

Ultrasantrifüjleme tekniğinde eksozomların etiketlenmesine gerek olmayıp bu sayede çapraz kontaminasyonu önleyebilir. Dezavantajları ise uzun zaman, yüksek maliyet, yapısal hasar, bloklar halinde toplama ve lipoproteinlerle birlikte ayırma yapması nedeniyle akış analizi için çok elverişli bulunmamıştır.

Yoğunluk gradyanlı santrifüjlemedeki amaç eksozomları saflaştırmaktır. Genelde ultrasantrifüjleme ile kullanılır. Çalışmalarda genellikle sükroz ortamı kullanılır. Sükroz çözeltisinin yüksek viskozitesi sebebiyle eksozomların sedimasyon hızı azalır ve saflaştırma için daha uzun bir süreye sebep olur¹²⁶.

2.7.3.2. Polimer Çökeltme

Bu yöntem ilk başlarda virüsleri izole etmek için kullanılmıştır. Eksozomların virüslere benzer biyofiziksel özellikleri sebebiyle bu yöntem denenmiştir. Polimer çökeltme yöntemi genellikle ortam olarak polietilen glikol (PEG) kullanır ve eksozomların çözünürlüğünü azaltarak santrifüjleme koşulu altında eksozomlar hasat edilir. Polimer çökeltme yönteminin avantajları kısa analiz süresi, kullanımı kolaylığı ve büyük dozlarda numunelerin izolasyonu için uygundur. Bununla birlikte, saflık ve geri kazanım oranı nispeten düşüktür ve yanlış pozitifler üretilebilir ve üretilen polimerin çıkarılması zordur, bu da sonraki fonksiyonel deneysel analiz için elverişli değildir.

2.7.3.3. Boyut Bazlı İzolasyon Teknikleri

Boyut dışlama kromatografisi (SEC)

Bu yöntemdeki ayırma prensibi, makromoleküllerin jel gözeneklerine girememesi ve gözenekli jeller arasındaki boşluklar boyunca mobil faz ile elüe edilmesi, küçük moleküllerin ise jel gözeneklerinde kalması ve son olarak mobil faz tarafından elüe edilmesidir. SEC uygulaması hızlı, kolay ve düşük maliyetlidir. Ancak eksozom verimi düşüktür. İzole edilmiş olan eksozom tek tip boyutludur. Ayrıca benzer boyuttaki partiküller de izole edilebilir ve bu da saflığın azalmasına neden olabilir¹²⁷.

2.7.3.4 Ultrafiltrasyon

Numunelerin seçici olarak ayrılabilmesi için farklı molekül ağırlıklarına sahip ultrafiltrasyon membranları kullanılır. Ultrafiltrasyon yöntemi çoğunlukla eksozomları düşük maliyet ve yüksek zenginleştirme verimliliği ile ayırmak için ultrafiltrasyon tüpleri kullanır. Eksozom saflığı düşüktür¹²⁸. Ultrasantrifüjemeye göre daha hızlı bir yöntemdir. Uygulanan kuvvete bağlı olarak büyük partiküller parçalanarak izolasyonu olumsuz etkileyebilir.

2.7.3.5. İmmünoaffinite Kromatografisi (IAC)

İmmünoaffinite kromatografisi izole edilecek maddeleri antikor ve ligandların spesifik olarak bağlanmasına dayanan bir izolasyon ve saflaştırma yöntemidir. İmmünoaffinite kromatografisi, heterojen karışımlardan istenen maddeleri ayırmak için antikorların ve ligandların spesifik bağlanmasına dayanan bir ayırma ve saflaştırma teknolojisidir. Prensip olarak, bu yöntemle uygulanan biyobelirteçler (antijenler), dört-transmembran protein süper ailesi, ESCRT kompleksi ile ilişkili proteinler gibi eksozom membranlarının yüzeyinde yüksek bollukta bulunan proteinler olmalıdır. Elbette hedef protein, eksozomların yüzeyindeki ortak bir bileşen veya IAC'nin belirli hücre türevli eksozomları tanımasını destekleyen benzersiz bir bileşen olabilir. Ultrasantrifüjleme ile karşılaştırıldığında, IAC daha az numune hacmiyle karşılaştırılabilir sonuçlar üretebilir. Eksozomların kalitatif ve kantitatif tayini için de kullanılabilir. Güçlü özgülüğe, yüksek hassasiyete, yüksek saflığa ve yüksek verime sahiptir^{129, 130}.

Kantitatif tespit ve analiz, bu yöntemle hasat edilen eksozomların veriminin ultrasantrifüjleme ile eşdeğer olduğunu, ancak numune talebinin çok daha az olduğunu bulmuştur¹³¹. Bununla birlikte, immünoaffinite kromatografisi ile elde edilen eksozomların saklama koşulları daha zordur ve eksozomların büyük miktarlarda ayırtmak için uygun değildir.

2.7.3.6. Diğer İzolasyon Teknikleri

Günümüzde piyasada ExoQuick-TC kiti, exoEasy Maxi kiti (QIAGEN), MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (Wako) ve Minute™ Hi-Efficiency Exosome Precipitation Reagent (Invent) gibi geleneksel izolasyon tekniklerine dayanan çeşitli ticari kitler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda ticari kitlerin zaman olarak daha kısa, yüksek verimlilik ve bütünlük korunması gibi avantajlara sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanında ticari kitler pahalı, eksozomların saflık ve verimi yüksek olmamaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde (EGE HAYMER) gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındı. (30.11.2022 tarih ve 2022-088 sayılı onay). Bu çalışma İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2023-TDU-TIPF-0005 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu çalışma için Wistar ratları, elde edilmesi, üzerinde çalışması kolay olması, düşük maliyetli oluşu ile ve morfolojik, fizyolojik ve periferik sinir rejenerasyonu açısından insanlara benzer olması nedeniyle deney hayvanı olarak tercih edildi¹³². Hayvan modeli olarak 8 haftalık (250-300gr) 10 adet dişi, 10 adet erkek olmak üzere 20 adet Wistar albino ratları kullanıldı. Çalışma süresi boyunca ratlar gruplar halinde ayrı kafeslerde barındırıldı. Gece gündüz döngüsüne maruz bırakıldı. Sınırsız standart yiyecek (kuru pellet) ve içme suyu sağlandı. Girişim öncesinde, geceden itibaren oral beslenme kesilmesi planlandı.

Anestezi tekniği olarak; her rata intraperitoneal ketamin (Ketalar, Pfizer, İstanbul, Türkiye) (90mg/kg) ve ksilazin (Rompun; Bayer, İstanbul, Türkiye) (10mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonu yapılarak anestezi sağlanması planlandı. Anestezi derinliği göz, ayak refleksleri ve solunum hareketleri izlenerek değerlendirildi.

Takip süresi tamamlandıktan sonra anestezi altında elektrofizyolojik kayıtlar ve histopatoloji için sinir biyopsileri alındıktan sonra sakrifikasyon yöntemi olarak hayvanlara yüksek doz anestetik madde (anestezi dozunun 5 katı) enjeksiyonu yapıldı.

Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından uygulandı. Cerrahi işlemlerde 3.5 kat büyütme lup kullanıldı. Hayvanlar cerrahi sahaya rahat ulaşılabilmesi için tespit tahtalarına yüz üstü pozisyonda yerleştirilip sabitlendi. Tüm ratlarda sağ taraf siyatik sinir deney için kullanıldı. Sol taraf siyatik sinir normal doku kontrol grubu olarak kullanıldı.

3.1. Sıçan Siyatik Sinir Anatomisi

Rat siyatik siniri memeli hayvanlar değerlendirildiğinde, mikroskopik düzeyinde bile insan sinir dokusundan ayırt edilemeyen hücresel detaylara sahip, ucuz ve temini kolay sinir dokusu kaynağıdır¹³³. Bu yüzden deneysel sinir çalışmalarında çok sık tercih edilmektedir.

Lumbosakral trunkustan çıkan siyatik sinir farklılık gösterebilmekle birlikte genellikle 4., 5. ve 6. lomber spinal sinirlerin birleşmesi ile oluşur. Ratlardaki en kalın periferik sinir siyatik sinirdir. Pelvis minör içinde siyatik sinir olarak adlandırıldıktan sonra iskiyum dorsal kenarı ile kuyruk sokumu arasındaki derin olukta seyrederek. Siyatik çentikten çıktıktan sonra ise piriform kasın ventralinde devam edip uyluk arkasına ilerler. Sırt derisinin yaklaşık olarak

yarıya yakın kısmını ve arka bacak kaslarının birçoğunun innervasyonunu sağlar. İlk olarak biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kaslarını innerve eden ince bir motor dal verir. Daha sonra diz ekleminin proksimalinde tibial, peroneal(fibular) ve bunlardan hemen önce sural olarak 3 dala ayrılır. Peroneal sinir tibialis anterior ve ekstensör digitorum longus kaslarını innerve eder. Tibial sinir ise plantar fleksörleri, ayak parmak fleksörlerini ve tibialis posterior kasını innerve eder¹³⁴.

3.2. Deney ve Kontrol Grupları

Ratlar iki gruba ayrıldı.

Grup 1 (n=10): eksozom grubu, siyatik sinir transeksiyonu sonrası lup altında 10-0 ethilon ile koapte edilip, koaptasyonun proksimali ve distaline eksozom implantasyonu yapılan grup

Grup 2 (n= 10): primer grubu, siyatik sinir transeksiyonu sonrası koapte edilip, koaptasyon proksimal ve distaline SF enjeksiyonu yapılan grup

3.3. Rat Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozom İzolasyonu

Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi'nden temin edilen rat adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH) 37oC su banyosunda çözdürülerek 75cm² 'lik hücre kültür kaplarına (TPP, İsviçre) ekildi. AD-MKH'ler, %1 antibiyotik (Biological Industries, ABD), %1 stabil L-glutamin (Biological Industries, ABD) ve %10 serum (Foetal Bovine Serum, Biological Industries, ABD) içeren bazal besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose, Biological Industries, ABD) içerisine 37oC de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Sanyo, Japonya) kültüre edildi.

AD-MKH'ler, %90'ın üzerinde yoğunluğa ulaşınca eksozom üretimi için hücrelerin besiyeri bir serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Serum içermeyen besiyeri eklenerek 24 saat sonunda hücrelerin sekretomları toplandı.

Toplanan sekretomdan ExoQuick-TC (#EXOTC50A-1, System Bio sciences, ABD) kiti kullanılarak eksozom üretimi gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre; toplanan sekretomlar 3000 x g'de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek hücreler ve hücrelerden gelen atıklar dibe çöktürüldü. Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve süpernatant hacminin 1/5'i olacak şekilde eksozom izolasyon solüsyonu eklendi. Vorteks yardımı ile homojenize edildi. Ardından +4°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hazırlanan karışım, 1500x g'de 30 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı ve pellet PBS ile resüspanse edildi.

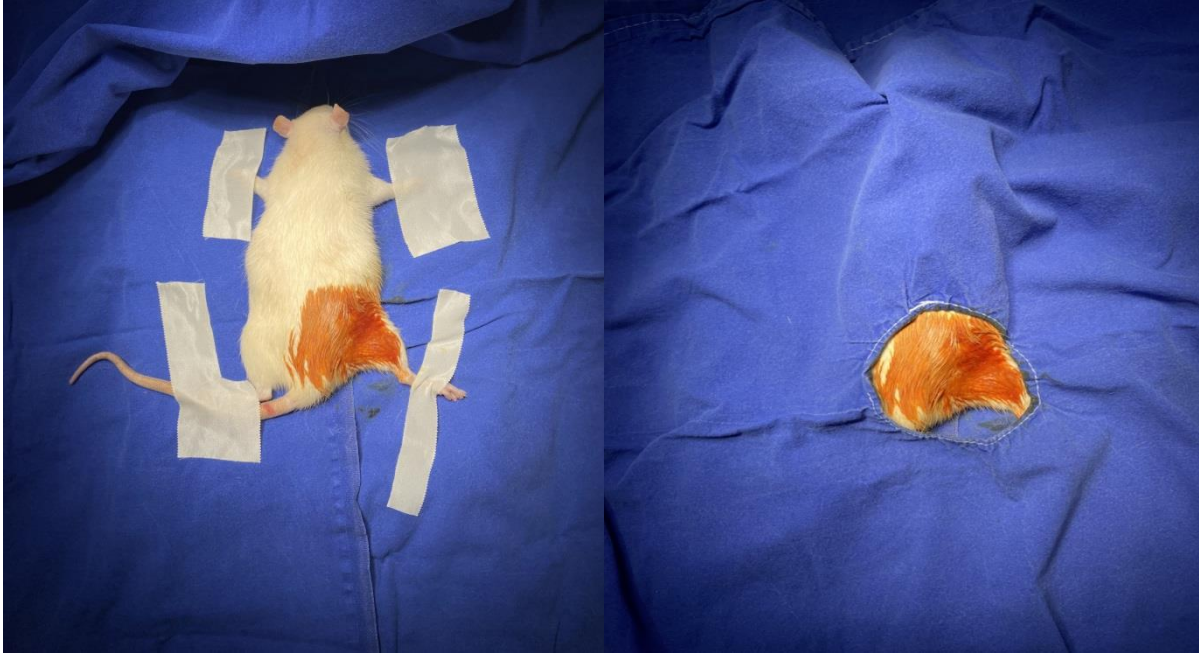
Elde edilen eksozomların miktarı, deney hayvanlarına verilmeden önce, mikrovezikül ölçüm kiti (EXOCET Exosome Quantitation Assay- EXOCET96A-1 SBI, Amerika) yardımı ile belirlendi. Miktar tayini kit protokolüne uygun olarak çalışıldıktan sonra, Glomax Multi ELISA (Promega, ABD) absorbands okuyucuda 450 nm’ de absorbands değerleri okundu. Standartlara göre eksozom miktarı hesaplandı ¹³⁵.

Deney hayvanlarına uygulanacak miktar $0,9 \times 10^{10}$ partikül/ ml olarak belirlendi¹³⁶.

3.4 Cerrahi İşlem

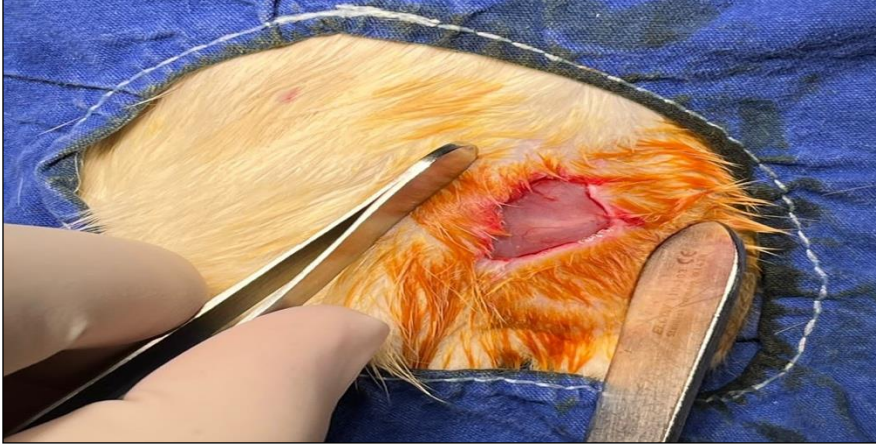
Tüm cerrahi işlemler steril koşullar altında gerçekleştirildi. İntraperitoneal anesteziyi takiben, ratların gluteal ve uyluk bölgeleri tıraş edildi. Yüz üstü pozisyonda denekler tespit tahtasına yerleştirildi. Povidon iyodin solüsyonu ile cerrahi alan boyandı. (Şekil 5)

Girişim yapılacak olan gluteal bölge açık kalacak şekilde ratlar steril örtü ile örtüldü.



Şekil 5:Ratların operasyona hazırlanması

Sağ uyluk posteriorundan yapılan 2-3 cm lik insizyonla cilt açıldı. (Şekil 6)



Şekil 6: Cerrahi insizyon hattı

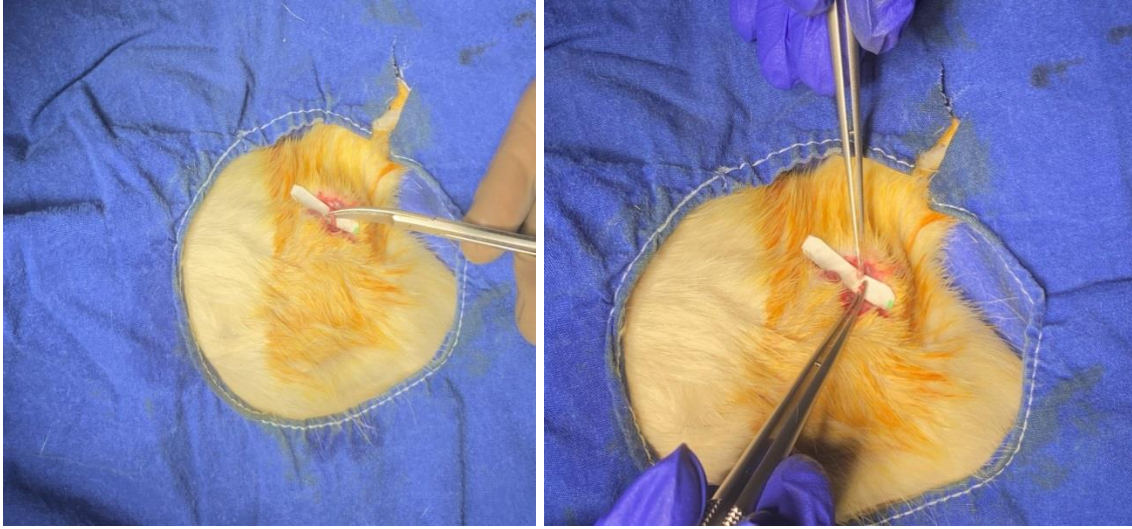
Biceps femoris ve gluteal kaslar künt diseksiyonla ile açılıp siyatik sinir ortaya konuldu. ( ekil 7A)

Daha sonra siyatik sinir mikrocerrahi penset ve makas ile etraf dokulardan diseke edildi. ( ekil 7B)



Şekil 7:A, B) Rat siyatik siniri diseksiyonu

Siyatik sinir mikrocerrahi makas ile total olarak transekte edildi. (Şekil 8A,8B)



Şekil 8:A ve B) Rat siyatik sinir transeksiyonu

Siyatik sinir hasarı oluşturulduktan sonra, siyatik sinir proksimal ve distal uçları 10-0 ethilon suture ile lup altında epinöral koaptasyonu yapıldı.



Şekil 9:Siyatik sinir koaptasyonu

Eksozom grubunda sinir koaptasyonu sonrası siyatik sinir proksimal ve distal uçlarına 0.1ml izole edilmiş eksozom solüsyonu epinöral olarak enjekte edildi. Uygulanan eksozom dozu $0,9 \times 10^{10}$ partikül/ ml dir. Primer grubunda ise koaptasyon sonrası siyatik sinir proksimal ve distal uçlarına 0.1ml SF solüsyonu epinöral enjeksiyonu yapıldı.



Şekil 10:Epinöral eksozom enjeksiyonu

Her iki grupta cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra, kas dokusu 6.0 vikril, cilt ise 5.0 prolene ile devamlı dikiş tekniği ile kapatıldı. İnsizyon hatları povidon iyodin solüsyonu ile pansuman yapıldı. Ratların anesteziden uyanması beklendi. Deney hayvanlarına uygun dozda analjezi ve antibiyotik yapıldı.

3.5. Değerlendirme Yöntemleri

3.5.1. Genel Değerlendirme

Değerlendirilmeye alınan grup 1 ve grup 2 ratları 8 haftalık takip süresince genel değişiklikler belirlendi.

3.5.2. Fonksiyonel Değerlendirme

Deneye başlamadan önce ve deney sonrası 7, 14, 21. günlerde değerlendirme için yürüyüş yolu analizleri ('walking track') ve Siyatik Fonksiyonel İndeks kullanıldı.

Yürüyüş Yolu Analizi ve Siyatik Fonksiyonel İndeks (SFİ)

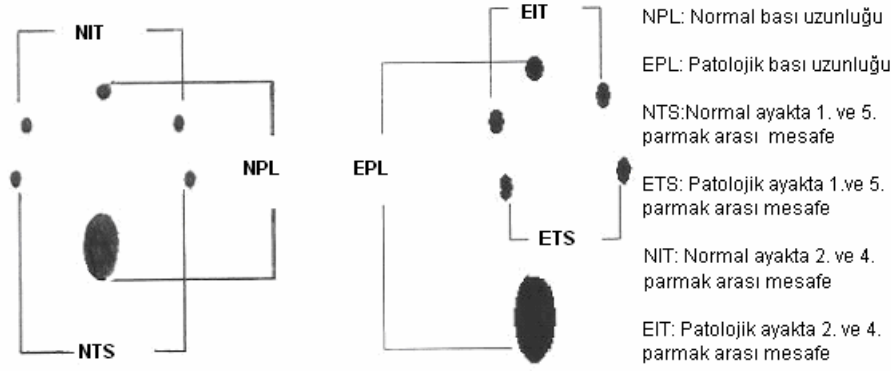
Ratların yürüme paternlerinin değerlendirilmesi için, daha önce sinir lezyonlarının değerlendirilmesi için bir yöntem olarak tanımlandığı ve De Medinaceli ve arkadaşları tarafından modifiye edildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Hayvanların tek bir doğrultuda yürüebilmesi için bir ucu karanlık oda ile biten yürüme parkuru oluşturuldu.



Şekil 11:A ve B) Yürüyüş yolu parkuru

Hayvanların yürüme yolunda analiz için veriler alınmadan önce deneme yürüyüşleri yaptırıldı. Hayvanların parkurda kapalı oda barınağa doğru yürümeyi öğrendikten sonra her iki arka ayakları mürekkep emdirilmiş ıstampaya bastırılıp, yürüyüş parkurunda yürütülerek ayak izleri alındı.

Alınan ayak izleri içinde, topuk ve parmak ucu arasındaki mesafe-bası uzunluğu (print length (PL)), birinci ve beşinci parmaklar arası mesafe-adım genişliği (toe spread (TS)), ikinci ve dördüncü parmaklar arası mesafe- adım ortası genişlik (intermediate toe spread (ITS)) milimetrik cetvel kullanılarak ölçümler yapıldı.



Şekil 12: SFİ hesaplaması için ayak izlerinde bakılan parametreler, deneysel (E), Normal(N)

Milimetrik cetvel yardımıyla yapılan ölçümlerde elde edilen değerler De Medinacelli tarafından geliştirilen ve daha sonra Bain ve ark.¹³⁷ tarafından modifiye edilen formüle göre SFİ hesaplandı. Sıfır ile -100 arası elde edilen değerlerde, sıfır normal fonksiyonu gösterirken, -100 tam fonksiyon kaybına işaret etmektedir.

Bain ve ark.'nın geliştirdikleri formül;

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

Şekil 13: SFİ için Bain ve arkadaşlarının geliştirdiği formül

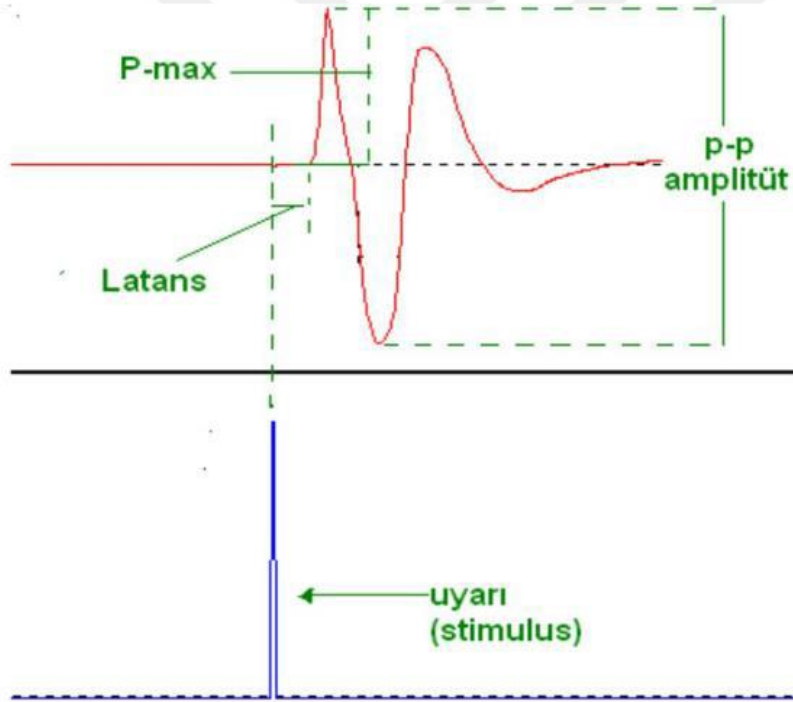
3.5.3. Elektrofizyolojik Değerlendirme

Eksozomların, periferik sinir hasarı olan ratların fonksiyonel iyileşmesi üzerindeki etkinliğini değerlendirmek için ratların operasyon öncesi ve operasyon sonrası 8. haftada intraperitoneal anestezi altında elektromiyografi değerlendirilmeleri yapıldı. Elektrofizyolojik ölçümler bilgisayar destekli MP30 sinir ileti hızı ölçüm kiti (Biopac systems, Inc., USA) kullanılarak yapıldı.

İntraperitoneal anestezi altında ratların deney yapılan sağ taraf siyatik sinir değerlendirilmesi için iğne elektrotlar yerleştirildi. Orta hatta hayvanın sakral bölgesinin sol laterale topraklama için iğne elektrot cilt altına yerleştirildi. Kayıt elektrotları için 2 adet iğne elektrotlar ise hayvanın sağ arka ayağı ayak parmakları arasına distale pozitif, proksimale ise negatif elektrot cilt altına yerleştirildi. Uyarı veren kanca ise sakral bölge ve sağ gluteal sulkus arasından cilt üzerinden uygulandı.



Şekil 14: EMG kayıt için elektrotların yerleşimi



Şekil 15: EMG kaydı ve bakılan parametreler

EMG kayıtları, 1 miliamper akım aralığında %0-%70 arasında akım hızı yavaş yavaş artırılarak uyarı eşikleri bulundu. Her bir hayvan için uygun akım aralığında uyarı verilerek Siyatik sinir tarafından inerve edilen kas gruplarının birleşik kas aksiyon potansiyelleri ölçüldü. Aksiyon potansiyelleri eğrilerinde her bir ratın EMG kayıtlarında Delta-T, aksiyon potansiyeli tepe-tepe amplitüdü (P.P), eğri altında kalan alan (CMAP), P-max değerleri ve toplam süreler ölçüldü.

3.5.4. Histomorfometrik Değerlendirme

Elektrofizyolojik kayıtlar tamamlandıktan sonra, 8. haftada genel anestezi altında histomorfometrik analizler için, eski insizyon sahasından girilerek siyatik sinire ulaşıldı. Siyatik sinir onarımının yapıldığı sinir bölgesinin yaklaşık 1cm distal ve proksimalini içerek şekilde normal sinir segmentlerine de ulaşarak sinir biyopsileri alındı. Biyopsi sonrası sakrifikasyon yöntemi olarak deney hayvanlarına yüksek doz anestezik madde (anestezi dozunun 5 katı) enjeksiyonu yapıldı.



Şekil 16: Siyatik sinir biyopsi alınması

Alınan sinir biyopsi örnekleri, kurutma kâğıdı içerisine konulup, kurşun kalem ile doku örnekleri numaralandırıldıktan sonra kapaklı doku kaseti içerisine yerleştirildi. Kasetler üzerine de numaraları yazıldı. Daha sonra tamponlanmış %10'luk nötral formaldehit solüsyonu içerisine tespit amaçlı alındı.

Elde edilmiş olan parafin bloklardan mikrotomda (Leica) 3-4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler rutin histolojik incelemeler için su banyosundan lamlara alındı. Her bir bloktan Hematoksilen Eozin (H&E) boyamaları için 2'şer adet preparat hazırlandı. Boyanan kesitler, kameralı binoküler mikroskop aracılığıyla incelendi ve fotoğraflandı.

Deneyin 8. haftasında sakrifikasyon sonrası alınan sinir örnekleri H&E boyama sonrası aynı patolog tarafından ışık mikroskobunda büyük büyütmede (x40) histopatolojik parametrelere göre değerlendirildi. Bu parametreler vasküler proliferasyon, inflamasyon, fibrozis varlığı ve sinir dejenerasyonu skorlama yapılarak değerlendirildi. Her bir parametre 0; yok, 1; hafif, 2; şiddetli olarak derecelendirildi. (Tablo 1)

Tablo 1: Histopatolojik olarak alınan sinir biyopsilerinin değerlendirilmesi

DOKU	EVRE
Vasküler proliferasyon	0 yok 1 hafif 2 şiddetli
İnflamasyon	0 yok 1 hafif 2 şiddetli
Fibrozis	0 yok 1 hafif 2 şiddetli
Sinir dejenerasyon derecesi	0 yok 1 hafif 2 şiddetli

3.5.5. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler IBM SPSS Statistics Standard Concurrent User V 26 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) istatistik paket programında değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama $\pm$ standart sapma, medyan, minimum, maksimum ve kartiller arası uzaklık değerleri olarak verildi. Sayısal değişkenlere ait verilerin normal dağılımı Shapiro Wilk normallik testi ile değerlendirildi. Grupların varyans homojenliği Levene testi ile analiz edildi. Normal dağılım gösteren P.P, alan, toplam süre, P-max değeri ve SFI değişkenlerinin ölçüm zamanlarına göre gruplar arası karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizinden yararlanıldı. Tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizinde tüm ikili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Normal dağılım göstermeyen değişkenler için gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Delta-T için grup içi karşılaştırmalar Wilcoxon testi ile yapıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Eksozom grubundaki 1 rat genel anestezi sırasında exitus oldu. Çalışma bu şekilde tamamlandı. (Eksozom grubu 9 rat, Primer grubu 10 rat)

4. BULGULAR

4.1. Genel Değerlendirme Bulguları

8 haftalık takip süresi boyunca eksozom grubundaki 1 hayvanda intraperitoneal anestezi uygulaması sonrası exitus gözlemlendi ve deney dışı bırakıldı. Cerrahi işlem uygulaması sonrası tüm ratların sağ alt ekstremitelerinde paralizisi görüldü. Hiçbir hayvanda otokanibalizasyon görülmeydi.

4.2. Fonksiyonel Değerlendirme Bulguları

4.2.1. Yürüyüş Yolu ve SFI Bulguları

Her iki gruptaki tüm ratların deney öncesi ve deney sonrası 1., 2. ve 3. haftada yürüyüş yolunda yürütülerek ayak izleri alındı. Her bir ratın SFI1, SFI2, SFI3 değerleri hesaplandı. (Tablo 2)



Şekil 17: Primer grubu sırasıyla preoperatif ve post operatif 1., 2. ve 3. haftada yürüyüş yolu ayak izleri



Şekil 18: Eksozom grubu sırasıyla preoperatif ve post operatif 1., 2. ve 3. Haftada yürüyüş yolu ayak izleri

Tablo 2: Ratların 1., 2. ve 3. hafta Siyatik Fonksiyonel İndeks değerleri

ERKEK	SFI 1 WEEK	SFI 2 WEEK	SFI 3 WEEK
8 PRİMER	-64,11666667	-53,42047619	-27,66190476
7 PRİMER	-60,58891892	-50,62	-16,82612613
6 PRİMER	-66,65117354	-92,03355263	-61,73497511
5 PRİMER	-65,65117354	-41,56917735	-31,80048077
4 PRİMER	-64,65117354	-69,66833333	-61,49458333
9 EKSOZOM	-75,82105263	-62,63223684	-45,34276316
3 EKSOZOM	-7,761904762	-24,19047619	-12,10634921
2 EKSOZOM	-73,79140351	-67,31842105	-61,55526316
1 EKSOZOM	-33,88526316	-51,95	-1,458421053
DİŞİ			
10 PRİMER	-58,14692982	-48,43552632	-49,56096491
9 PRİMER	-15,887054	-55,18755981	-76,16642515
8 PRİMER	-37,17818182	-57,92	-40,99878788
7 PRİMER	-43,06437346	-60,58067158	-53,16076986
3 PRİMER	-57,72676768	-59,71969697	-60,31085859
6 EKSOZOM	-57,78666667	-52,28833333	-64,455
5 EKSOZOM	-67,77571429	-66,91714286	-31,01642857
4 EKSOZOM	-45,81585303	-68,76665517	-31,4342591
2 EKSOZOM	-34,60413547	-56,41827094	-14,41935829
1 EKSOZOM	-71,00571429	-73,79441558	-66,62857143

Haftalara göre gruplardan alınan ayak izi örnekleri ile TABLO 3 de gösterilmiştir.

Tablo 3: Grupların SFI Ölçüm Karşılaştırmaları

	Gruplar		Test İstatistikleri ^a	
	Primer	Eksozom	Test değeri	p değeri
SFI				
Birinci Hafta	-53,36±16,45	-52,02±23,21 ^x	<i>F</i> =0,021	0,885
İkinci Hafta	-58,91±13,91	-58,25±13,96 ^{xy}	<i>F</i> =0,010	0,921
Üçüncü Hafta	-47,97±18,38	-36,49±24,39 ^y	<i>F</i> =1,360	0,260
Tİ ^b : <i>F</i> ; <i>p</i>	1,977; 0,171	6,084; 0,011		

Veriler ortalama±standart sapma olarak özetlenmiştir. Tİ: Test istatistikleri, ^a: Gruplar arası karşılaştırmalar, ^b: Grup içi karşılaştırmalar, *F*: Tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi, ^x ve ^y üst simgeleri eksozom grubunda birinci, ikinci ve üçüncü hafta SFI değerleri arasındaki farklılığı göstermektedir. Aynı üst simgeleri içeren haftaların SFI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Tablo 3'te gruplar arası karşılaştırmalara göre birinci hafta SFI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (*p*=0,885). Grupların ikinci ve üçüncü hafta SFI değerleri istatistiksel olarak anlamlı değildir (*p*=0,921; *p*=0,260). Grup içi

karşılaştırmalara göre Primer grubun bir, iki ve üçüncü hafta SFI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,171$). Grup içi karşılaştırmalara göre eksozom grubunun SFI değerleri ölçüm yapılan haftalarda istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p=0,011$). Eksozom grubunda üçüncü hafta SFI değerleri birinci hafta değerlere göre istatistiksel olarak anlamlıdır. İkinci hafta değerleri birinci ve üçüncü haftalardan istatistiksel olarak anlamlı değildir.

4.2. Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları

Tablo 4: EMG de Grupların İlk (Operasyon öncesi) ve Son (Operasyon sonrası 8. hafta) Ölçüm Karşılaştırmaları

	Gruplar		Test İstatistikleri ^a	
	Primer	Eksozom	Test değeri	<i>p</i> değeri
DELTA-T (ms)				
İlk Ölçüm	2,0 (1,7)	2,0 (0,5)	$z^*=0,369$	0,780
Son Ölçüm	2,0 (2,5)	2,0 (0,0)	$z^*=1,146$	0,447
Fark	0,0 (4,2)	0,0 (0,5)	$z^*=0,591$	0,604
Tİ ^b : <i>z</i> ; <i>p</i>	0,106; 0,916	1,342; 0,182		
P.P (mV)				
İlk Ölçüm	6,12±2,80	4,61±1,63	$F=1,995$	0,176
Son Ölçüm	7,47±2,94	5,52±1,26	$F=3,370$	0,084
Fark	-1,35±4,67	-0,91±1,87	$F=0,069$	0,796
Tİ ^b : <i>F</i> ; <i>p</i>	1,375; 0,257	0,564; 0,463		
Alan (mV-sec)				
İlk Ölçüm	0,044±0,045	0,014±0,012	$F=3,768$	0,069
Son Ölçüm	0,041±0,044	0,014±0,003	$F=3,462$	0,080
Fark	0,005±0,066	-0,002±0,010	$F=0,015$	0,905
Tİ ^b : <i>F</i> ; <i>p</i>	0,040; 0,844	0,001; 0,982		
Toplam Süre (ms)				
İlk Ölçüm	32,40±4,86	31,67±4,30	$F=0,120$	0,733
Son Ölçüm	35,20±6,71	31,00±1,50	$F=3,353$	0,085
Fark	-2,80±10,45	0,67±4,95	$F=0,820$	0,378
Tİ ^b : <i>F</i> ; <i>p</i>	1,130; 0,303	0,058; 0,813		

Max Değeri (V)

İlk Ölçüm	3,58±1,91	2,40±0,49	$F=3,226$	0,090
Son Ölçüm	4,07±1,60	3,09±0,66	$F=2,903$	0,107
Fark	-0,49±2,84	-0,69±0,66	$F=0,044$	0,837
Tİ ^b : F ; p	0,535; 0,475	0,964; 0,340		

Veriler ortalama±standart sapma ya da medyan (kartiller arası uzaklık) değerler olarak özetlenmiştir. Tİ: Test istatistikleri, ^a: Gruplar arası karşılaştırmalar, ^b: Grup içi ilk ölçüm ve son ölçüm karşılaştırmaları, z*: Mann-Whitney U testi, z: Wilcoxon testi, F : Tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi

Tablo 4'te gruplar arası karşılaştırmalara göre primer ve eksozom gruplarının ilk ölçüm Delta-T değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,780$). Grupların son ölçüm Delta-T değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,447$). Grup içi karşılaştırmalara göre primer grubun ilk ve son ölçüm Delta-T değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,916$). Grup içi karşılaştırmalara göre eksozom grubun ilk ve son ölçüm Delta-T değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,182$). İlk ve son ölçüm Delta-T farkları alındığında gruplardaki değişim miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,604$).

Primer ve eksozom gruplarının ilk ölçüm P.P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,176$). Grupların son ölçüm P.P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,084$). Grup içi karşılaştırmalara göre primer grubun ilk ve son ölçüm P.P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,257$). Grup içi karşılaştırmalara göre eksozom grubun ilk ve son ölçüm P.P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,463$). İlk ve son ölçüm P.P farkları alındığında gruplardaki değişim miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,796$).

Primer ve eksozom gruplarının ilk ölçüm alan değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,069$). Grupların son ölçüm alan değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,080$). Grup içi karşılaştırmalara göre primer grubun ilk ve son ölçüm alan değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,844$). Grup içi karşılaştırmalara göre eksozom grubun ilk ve son ölçüm alan değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,982$). İlk ve son ölçüm alan farkları alındığında gruplardaki değişim miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,905$).

Primer ve eksozom gruplarının ilk ölçüm toplam süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,733$). Grupların son ölçüm toplam süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,085$). Grup içi karşılaştırmalara göre primer grubun ilk ve son ölçüm toplam süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,303$). Grup

içi karşılaştırmalara göre eksozom grubun ilk ve son ölçüm toplam süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,813$). İlk ve son ölçüm toplam sürelerinin farkları alındığında gruplardaki değişim miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,378$).

Primer ve eksozom gruplarının ilk ölçüm P-max değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,090$). Grupların son ölçüm P-max değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,107$). Grup içi karşılaştırmalara göre primer grubun ilk ve son ölçüm P-max değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,475$). Grup içi karşılaştırmalara göre eksozom grubun ilk ve son ölçüm P-max değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,340$). İlk ve son ölçüm P-max değer farkları alındığında gruplardaki değişim miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,837$).

4.3. Histomorfometrik Değerlendirme Bulguları

Histolojik inceleme aynı patolog tarafından büyük büyütmede (40x) ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Her bir preparattan alınan sinir biyopsi örnekleri tek tek inflamasyon, fibrozis, sinir hasar derecesi ve vasküler rejenerasyon açısından değerlendirildi.

İnflamasyon için kesitlerde yangısal hücre infiltrasyonuna (nötrofil infiltrasyonu) bakıldı. Hücre yoğunluğu yoksa derece 0, az ise hafif, derece 1, şiddetli-yoğun ise derece 2 olarak değerlendirildi.

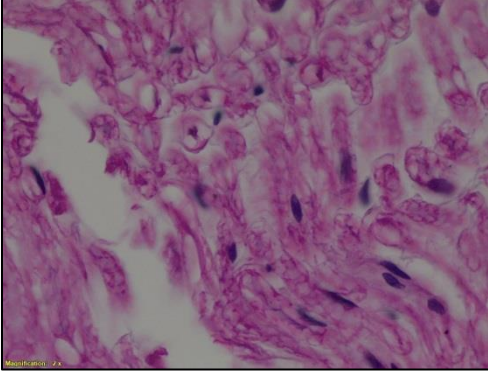
Tablo 5: Her bir rattan alınan biyopsi örneklerinin histopatolojik olarak değerlendirilen parametreleri ve skorları

		PREPERAT	Vasküler Proliferasyon	İnflamasyon	Fibrozis	Sinir Dejenerasyon Derecesi
PRİMER ERKEK	1	A	2	1	1	0
		B	0	0	0	0
	2	A	1	1	1	1
		B	1	1	2	2
	3	A	1	1	1	1
		B	1	1	1	1
	4	A	0	2	1	1
		B	1	2	1	2
	5	A	2	0	1	0
		B	2	0	1	0
PRİMER DIŞI	1	A	2	1	2	2
		B	1	2	1	2
	2	A	1	1	1	1
		B	1	2	1	2
	3	A	0	1	1	1
		B	1	1	1	1
	4	A	1	1	1	1
		B	1	1	1	0
	5	A	1	1	1	2
		B	2	2	2	2
EKSOZOM ERKEK	1	A	1	0	2	1
		B	1	1	1	1
	2	A	1	0	1	2
		B	0	0	1	1
	3	A	0	0	0	0
		B	2	1	1	1
	4	A	1	1	0	1
		B	1	0	0	1
EKSOZOM DIŞI	1	A	2	1	1	2
		B	0	0	2	2
	2	A	1	0	1	2
		B	1	1	1	1
	3	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	1
	4	A	2	0	0	0
		B	1	1	1	0
	5	A	1	0	0	1
		B	0	0	0	0

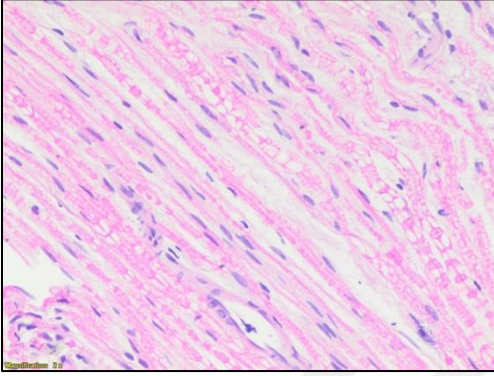
Fibrozis için fibroblast hücre yoğunluğuna bakıldı. Bakılan kesitlerde fibroblastik proliferasyon yoksa 0, hafif fibroblast proliferasyonu 1, şiddetli proliferasyon 2 olarak değerlendirildi.

Nöral dejenerasyon derecesi morfolojik nöral düzensizlik ve ödem varlığına göre değerlendirildi. Nöral kesitlerde düzensizlik ve ödem yoksa 0, hafif ise 1, yoğun ve şiddetli ise 2 olarak değerlendirildi.

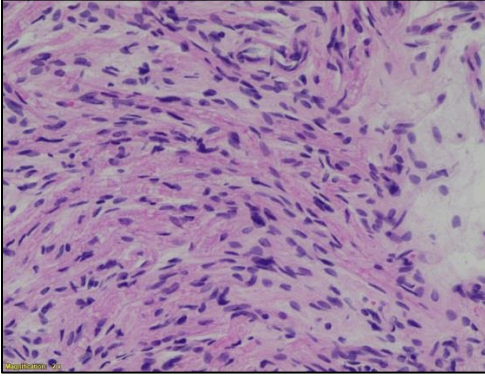
Vasküler proliferasyon için özellikle nöral yapıların etrafındaki vasküler yapılar incelendi. Büyük büyütmede (40x) vasküler yapıların çapları ve sayısına bakıldı. Olağan görünüm için 0, hafif artış, proliferasyon ve ödem varsa 1, şiddetli ve belirgin ise 2 olarak gruplandırıldı.



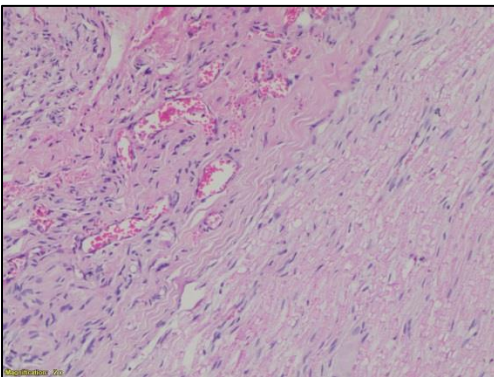
Şekil 19: Sağlam taraf siyatik sinir dokusunun olağan morfolojideki görünümü



Şekil 20: Nöral dejenerasyon skor 1, fibrozis skor 1, vasküler proliferasyon skor 1



Şekil 21: Nöral dejenerasyon skor 2, fibrozis skor 2, vasküler proliferasyon skor 2



Şekil 19: Vasküler proliferasyon skor 2

Tablo 6'ya göre grupların vasküler proliferasyon skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,276$). Eksozom grubunun inflamasyon skorları primer gruba göre istatistiksel olarak düşüktür ($p=0,001$). Eksozom grubunun fibrozis skorları primer gruba göre istatistiksel olarak düşüktür ($p=0,022$). Grupların sinir dejenerasyon dereceleri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,553$).

Tablo 6: Histopatolojik Bulguların Gruplara Göre Karşılaştırılması

	Gruplar		Test İstatistikleri	
	Primer	Eksozom	Test değeri	p değeri
Vasküler Proliferasyon				
M (min-max)	1 (0-2)	1 (0-2)	1,219	0,276 ^{&}
$\bar{x} \pm ss$	1,1 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,7		
İnflamasyon				
M (min-max)	1 (0-2)	0 (0-1)	3,465	0,001^{&}
$\bar{x} \pm ss$	1,1 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,4		
Fibrozis				
M (min-max)	1,0 (0-2)	0,5 (0-2)	2,288	0,022^{&}
$\bar{x} \pm ss$	1,1 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,7		
Sinir Rejenerasyon Derecesi				
M (min-max)	1,0 (0-2)	1 (0-2)	0,643	0,553 ^{&}
$\bar{x} \pm ss$	1,1 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,7		

M : Medyan, $\bar{x}$: ortalama, ss : standart sapma [&]: Mann-Whitney U testi

5. TARTIŞMA

Araştırmacılar ilk zamanlarda periferik sinir yaralanmaları da dahil sinir kesildiği zaman iyileşme olasılığının olmadığını öne sürmekteydiler. Ancak zamanla gelişen cerrahi teknikler ve teknoloji sayesinde periferik sinir sisteminin santral sinir sisteminden farklı olarak iyileştiğinin görüldüğü ortaya konmuştur^{139, 140,141}. Ayrıca insanlarda da travmatize olmuş periferik sinir aksonlarının oldukça yüksek bir rejenerasyon yeteneğinin mevcut olduğu bulunmuştur¹³⁸.

Travmatik periferik sinir yaralanmaları, cerrahları zorlayan tedavi sonrası bile genellikle önemli bir fonksiyonel bozulma veya kalıcı sakatlığa neden olan yaralanma tiplerindendir. Sinir kesilerinden sonra yapılan farklı zamanlardaki onarım sonrası periferik sinirlerde birbirini takip eden dejenerasyon ve rejenerasyon olayları yapılan çalışmalardan beri uzun yıllardır bilinmektedir. Ancak bu çalışmalara rağmen optimal düzeyde onarım sonrası bile sinir iyileşmesinin ne düzeyde olacağı, iyi bir fonksiyonel sonuç ortaya çıkıp çıkmayacağı tam olarak bilinmemektedir^{142, 143}.

Çeşitli sebeplerle meydana gelen periferik sinir yaralanmalarındaki tedavide hedeflenen amaç, denerve olan son organın tekrardan innervasyonunun sağlanması ve sinir devamlılığının sağlanarak iletinin yeniden sağlanması, son organdaki fonksiyonel kaybın minimal düzeye indirilmesidir. Başarılı bir sinir rejenerasyonu, aksonal tomurcaklanma, büyüme, uç organ reinnervasyonu ve rejenere olan sinir liflerinin merkezi sinir sistemi ile integrasyonu gibi çok karmaşık mekanizmaları içeren zor bir süreçtir^{144,145,146}.

Ratların periferik sinir yaralanmalarında kullanılmasının nedenleri arasında kolay elde edilebilir olması, ucuz ve sinir anatomisinin insanlara benzer olması yer alır. Bu sebeplerle sık kullanılan deney hayvanlarıdır. Ratların siyatik sinirinin kolay diseksiyonu, manipülasyona uygun alanda bulunması periferik sinir çalışmalarında eşsiz olmasını sağlamaktadır^{147,148,149, 150}.

Periferik sinir yaralanmalarında sinir kesisinin olduğu durumlarda en iyi çözüm nörorafidir. Sinir kesilerinde onarım sonrası iyileşmenin derecesini ve aksonal rejenerasyonu birçok faktörün etkilediği görülmüştür. Bunlar; yaralanma tipi, şiddeti, hastanın genel durumu ve ek hastalıkları, onarımın şekli, onarım yapıldığı zaman ve onarım gerçekleştiren cerrahın deneyimidir¹⁵¹.

Keskin cisimlerle meydana gelen temiz yaralarda ve vasküler desteğin olduğu durumlarda nörorafi için en iyi seçenek primer sinir onarımıdır⁵⁴. Direkt sinir onarımı, sinir kesisinin proksimal ve distal uçları arasındaki boşluğun minimal olduğu ve gerilimsiz onarımın mümkün olduğu durumlarda yapılmalıdır¹⁵². Yapılan bu onarım sonrası sinir

rejenerasyonunun en iyi düzeyde olabilmesi için sütürasyon gerilimsiz şekilde yapılmalı, dokular minimal travmaya u ratılmalı ve olabildiğince az sayıda sütür atılmalıdır¹⁵³⁻¹⁵⁷.

Periferik sinir yaralanmalarının koaptasyonunda literatüre baktığımızda ilk ba larda vikril, ipek gibi sütür materyalleri kullanılmış, yapılan çalışmalarda sütür sayısının ve materyalin kendisinin sinir iyileşmesini yava lattığı d   n lm   bu yüzden anastomoz için doku yapıştırıcıları, lazer yapıştırıcılar, kollajen, dura, milipor membran veya silastikle sarılarak yenilenme ve onarım sağlanmaya  alı mı lardır. Bu yaklaşımlarda sinir dokusu etrafında skar oluşumu azaltılmış olsa da sinir rejenerasyonuna etkisi olmamı tır¹⁸⁹.

Periferik sinir onarımında mikrocerrahi tekniklerin yaygın kullanılmaya ba lanmasından sonra her ne kadar perinöral onarım ile daha hassas fasiküler dizilim sağlansa da perin ryuma neden olduğu ek travma, sinir rejenerasyonunu azaltmakta ve daha iyi fasiküler dizilimin sağladığı avantajı kaybedilmektedir. Literatürdeki hiçbir klinik çalışma daha hassas fasiküler dizilim sağlayan perinöral tekniğin, daha az travmatik olan epinöral tekniğe olan üstünlüğünü g sterememi tir¹⁸⁸. Bu  alı mamızda 10-0 ethilon sütür kullanılarak uç uca epinöral koaptasyon yapıldı.

Günümüzde sinir kesilerinde onarım sonrası iyileşmenin derecesini ve aksonal rejenerasyonun hızını etkileyen birçok faktör olduğu bilinmektedir. Uç organlardan salınan trofik etkili faktörler bu rejenerasyonu d zenlemektedir¹⁵⁸. Nörotrofik aktivitenin sinir kesisi sonrası ilk 3-6 saat arasında maksimum olduğu ve sonraki 1-7 gün içerisinde normale döndüğü g sterilmi tir¹⁵⁹. Bu nörotrofik faktörler kesilmiş olan sinirlerde distal sinir ucundan da salgılanmaktadır. Salgılanan bu faktörler difüzyon ile sinir proksimalinde belirli bir mesafeye kadar yayılabilirler^{160,161}. Bu yüzden sinir bütünlüğü erken dönemde koaptasyon ile sağlanırsa daha hızlı ve güçlü bir rejenerasyon elde edilmesi hiç  a ırtıcı olmayacaktır.

Periferik sinir yaralanmalarında onarım zamanı ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. İatrojenik veya keskin bir cisimle meydana gelen, ezilme komponentinin olmadığı ya da minimal olduğu temiz yaralarda ve iyi vasküler desteğin mevcut olduğu olgularda fonksiyonun geri kazanılabilmesi için en iyi seçenek primer sinir onarımıdır¹⁶². Tarihsel olarak, primer sinir onarımı, Wallerian dejenerasyonun tamamlanması için zaman kazanmak amacıyla yaralanmadan sonraki ilk 3 hafta içerisinde yapıldı. Mackinnon ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda daha iyi sonuçların alınabilmesi için kesilen sinirin acilen onarılması gerektiğini g stermi lerdir¹⁶². Bu çalışmada rat siyatik siniri mikrocerrahi makas ile tam kat kesi sonrası temiz bir yaralanma olu turuldu u için siyatik sinir kesisinden hemen sonra uç uca anastomoz gerçekleştirildi.

Eksozom çoğu hücre tipi tarafından üretilip ekzositoz yoluyla hücre dışı boşluğa salgılanan 40-200 nm boyutlarında veziküllerdir. Bu veziküller DNA, mRNA, miRNA, proteinler ve lipitleri bulundurlar. İçerilerindeki bu genetik bilgileri alıcı hücrelere, eğer alıcı hücreler hücreye özgü faktörleri taşıyorlarsa, bilgi aktarabilirler. Bu sayede hücreler arası haberleşmelerde ve hücre sinyal taşımacılığında kilit rol oynarlar. Eksozomlar hücre metabolizması, çoğalması, farklılaşması gibi fizyolojik süreçler ve proliferasyon, göç ve apoptoz gibi biyolojik süreçlere de katılırlar.

Mezenkimal kök hücre bazlı tedavilerin periferik sinir yaralanmalarında aksonal yeniden büyüme ve miyelin oluşumuyla birlikte sinir rejenerasyonunu desteklediğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır¹⁶³⁻¹⁶⁷. Bu kök hücreler sinir hücresinin canlılığını koruması ve nörorejenerasyonunu olumlu yönde etkisinin salgıladıkları nörotrofik faktörler sayesinde.

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden salgılanan eksozomların, sinir hücreleri tarafından içselleştirilip yaralanma sonrasında periferik sinir rejenerasyonu artırdığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Yani bu eksozomların sinir yapılarına transferi aksonların rejenerasyonunu kolaylaştırmaktadır¹⁶⁹.

Lopez-Verilli ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Schwann hücre kaynaklı eksozomların nörit büyümesini ve aksonal rejenerasyonu büyük ölçüde artırdıklarını ortaya koymuşlardır¹⁶⁸.

Bucan ve arkadaşları ise yaptığı çalışmada sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal hücrelerden elde edilen eksozomların ezilme tipi sinir yaralanmalarında sıçan siyatik sinir rejenerasyonunu artırdığını göstermişlerdir¹⁶⁹. Bu çalışmada sinirde ezilme tipi yaralanma mevcuttur, bizim çalışmamız sinirde tam kat kesi oluşturmaları bakımından bu çalışmadan farklıdır.

Periferik sinir yaralanması sonrası yapılan çalışmalarda Schwann hücrelerinin ve nöron hücre gövdelerinin miRNA ekspresyon profilinin normal olmadığı gösterilmiş ve bu etkinin periferik sinir hasarı sonrası rejenerasyonuna aracılık ettiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca, spesifik olarak ifade edilen bu miRNA'lar, Schwann hücrelerinin çoğalması ve fenotipik değişiminde, nörojenezde, aksonal büyümede ve makrofaj göçünde rol oynar^{170, 171}.

Önceki çalışmalarda miRNA'ların nöron hücre gövdesinden aksone aktarıldığı gösterilmiştir. Fakat son yapılan çalışmalarda miRNA'ların eksozomlar aracılığı ile hücreler arasında da aktarılabildiği bulunmuştur^{172, 173}.

Eksozom izolasyonu ve elde edilmesi ile ilgili literatürde birçok çalışma ve yayın bulunmaktadır. Ticari kitler de bu yöntemlerden birisidir¹⁷⁴.

Tian ve ark.¹⁷⁴ yaptığı çalışmada farklı ticari ürünler kullanıldığında eksozom verimlerini ve saflıklarını karşılaştırmak için model sistem olarak trombosit içermeyen plazmadan eksozom izolasyonu kullanılmışlar. Test edilen ürünler ise çökeltme bazlı kitler ExoQuick (System Bioscience) ve Total Exosome Isolation (TEI; Thermo Fisher), SEC bazlı qEVsingle kitidir (iZON Science). Referans amacıyla ultrasantrifüj yöntemi de çalışmaya dahil edilmiş. En yüksekten en düşüğe verime sahip yöntemler ExoQuick, TEI, ultrafiltrasyon, qEVsingle ve ultrasantrifüjleme olarak bulmuşlar. En yüksekten en düşük saflığa sahip yöntemler ise ultrasantrifüjleme, qEVsingle, TEI, ultrafiltrasyon ve ExoQuick olarak göstermişlerdir. Bu çalışmamızda ExoQuick ticari eksozom kitini kullanıldı.

Eksozom dozu ve sinir rejenerasyonu arasındaki ilişkiyi incelemek için yapılan çalışmada araştırmacılar, sinir rejenerasyonu ile eksozom dozu arasında net bir pozitif korelasyon olmadığını in vivo deneyler kullanarak ilk kez göstermişlerdir¹⁷⁵. Bizim çalışmamızda da sinir rejenerasyonunun bu çalışmada olduğu gibi en yüksek oranda görüldüğü dozu kullanıldı.

Periferik sinir yaralanmalarında rejenerasyonun incelemesine yönelik yapılan çalışmalarda hem fonksiyonel hem de morfolojik inceleme yapılması önerilmektedir^{176,177}.

Yapılan elektrofizyolojik testler, histomorfolojik incelemeler ve elde edilen yürüyüş yolu analiz verilerinden maalesef hiçbiri tam bir sinir fonksiyonunu ortaya koymamaktadır. Ayrıca genellikle parametreler arasında çoğunlukla tutarsızlıklar olduğu görülmektedir¹⁷⁸.

Her bir araştırmacı çalışmasında sinir yaralanma sonrası rejenerasyonu değerlendirmek için farklı parametreler kullanmaktadır. Bu çalışmada yürüyüş yolu analizi, elektrofizyolojik ölçümler ve histopatolojik incelemeler kullanıldı.

Yürüyüş yolu analizi, sıçanlarda periferik sinir yaralanmaları sonrası, periferik sinir rejenerasyonu sonrasında motor fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan geniş kapsamlı bir testtir¹⁷⁹.

De Medinacelli tarafından 1982 yılında tanımlanmış ve günümüze kadar çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Siyatik fonksiyonel indeks sonrası elde edilen bilgiler sinir rejenerasyonundaki bütünleşmiş motor fonksiyonun göstergesidir¹⁸⁷.

Bu çalışmada Bain ve arkadaşları tarafından modifiye dilmiş olan SFI formülüne göre ölçümler yapılmıştır¹⁸⁰.

Çalışmamızda, gruplar arası karşılaştırmalara göre birinci hafta SFI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,885$). Grupların ikinci ve üçüncü hafta SFI değerleri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,921$; $p=0,260$). Grup içi karşılaştırmalara göre primer grubun bir, iki ve üçüncü hafta SFI değerleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,171$). Grup içi karşılaştırmalara göre eksozom grubunun SFI değerleri ölçüm yapılan haftalarda istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p=0,011$). Eksozom grubunda üçüncü hafta SFI değerleri birinci hafta değerlere göre istatistiksel olarak anlamlıdır. İkinci hafta değerleri birinci ve üçüncü haftalardan istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu verilere dayanarak koaptasyon proksimal ve distaline eksozom implantasyonu yapılan grupta sinir iyileşmesinin daha hızlı olduğunu düşünmekteyiz.

Elektrofizyolojik testler, sinir liflerinin verilen akım sonrası kas liflerini uyarmaları ile oluşan aksiyon potansiyellerinin büyütülerek incelenmesi ile ölçümler ortaya koyar. Elde edilen aksiyon potansiyelleri birleşik kas aksiyon potansiyelleridir. Birleşik kas aksiyon potansiyeli rejenere olan akson sayısı artıkça artmaktadır¹⁸¹. Aksiyon potansiyel grafilinde çeşitli parametreler ölçülebilmektedir.

Pik aksiyon potansiyel amplitüdü ise total sinir fonksiyonu hakkında bilgi sağlamamasına rağmen miyelinli liflerce oluşturulan elektrik akımını bize göstermektedir¹⁷⁸. Pozitif ve negatif pikler arası mesafe uyarı sonrası yanıt veren motor liflerin popülasyonu ve akson tarafından inerve edilen motor ünite boyutu hakkında bize bilgi sağlayabilir. Eğri altında kalan alan ise birleşik kas aksiyon potansiyeli ile korelasyon göstermektedir. Bu çalışmada pik aksiyon potansiyel amplitüdü, pozitif ve negatif pikler arası mesafe, eğri altında kalan alan, delta t ve toplam süre ölçümleri kullanılmıştır.

Her iki grup açısından yapılan elekfizyolojik ölçümler arası elde edilen parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak yapmış olduğumuz klinik gözlemlerinde eksozom implantasyonu yapılan gruptaki ratların yürürken daha rahat bastığı gözlemlendi.

Histomorfometrik incelemelerde verilerin daha sağlıklı olabilmesi için yapılan örnekleme tekniği büyük önem taşımaktadır. Geuna ve ark. yaptıkları çalışmaya göre histomorfometrik analizlerde altın kural tüm sinir lifleri örnek içerisinde olmalı ve değerlendirilmeleri benzer şartlar altında olmalıdır¹⁸². Sinir lifleri kesit alanlarında genellikle homojen bir dağılım göstermezler, yani bir alanda oldukça yoğun bulunurlarken, başka bir alanda seyrek olarak izlenebilirler. Bu yüzden histolojik olarak incelenen örnekleme alanına göre sonuçlar çok farklı bulunabilir. Bu nedenle histomorfometrik analiz yapılacak bölgeler ve her bir örnekleme alanı içerisinde bulunan sinir lifleri titizlikle seçilmelidir¹⁸².

Bu çalışmada deneyin 8. haftasında ratlardan genel anestezi altında siyatik sinir biyopsileri alındı. Alınan sinir biyopsi örnekleri için her bir rat için vasküler proliferasyon, inflamasyon, fibrozis ve sinir dejenerasyon derecesi açısından 3 puanlı (0-1-2) bir

değerlendirme yapıldı. Tablo 3'e göre grupların vasküler proliferasyon skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,276$). Eksozom grubunun inflamasyon skorları primer gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. ($p=0,001$). Eksozom grubunun fibrozis skorları primer gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p=0,022$). Grupların sinir rejenerasyon dereceleri istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,553$).

Sinir yaralanmalarında, inflamatuvar yanıt sinir onarımı sonrası prognoz üzerinde büyük etkiye sahip olan önemli bir patolojik süreçtir. Nöroinflamasyonun aşırı aktivasyonu, ikincil hasar üzerinden sinir hasarının derecesini kötüleştirebilir. Periferik sinir yaralanmalarını takip eden onarım sürecinde, inflamatuvar yanıtın uygun şekilde düzenlenmesi, nöroinflamasyonun neden olduğu nöron apoptozunu ve akson demiyelinizasyonunu inhibe edebilir^{113,114}.

Güneş ve ark.¹¹⁰ göbek kordonu MKH'den türetilen eksozomların, makrofaj polarizasyonunu M1 den M2 fenotipine dönüştürdüğünü bu sayede aşırı inflamatuvar yanıtı inhibe etmeyi desteklediğini bu sayede yaralanma bölgesinin iltihabını hafifleterek omurilik yaralanmasının iyileşmesini destekleyebileceğini göstermiştir. Ayrıca Ma ve ark.¹¹⁷, yaptığı çalışmada göbek kordonu MSC üretilen eksozomların sıçan siyatik sinir transeksiyonunun onarımı modelinde pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-6 ve IL-1 β seviyesini azaltıp, antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyesini artırarak immünosupresyon fonksiyonuna yardımcı olabileceğini buldular.

Bu çalışmada periferik sinir yaralanması sonrası koaptasyon uygulanan bölgenin proksimaline ve distaline eksozom implantasyonu yapılan grupta histopatolojik açıdan inflamasyonun ve fibrozisin daha az olduğu gözlemlenip bununla beraber istatistiksel olarak da anlamlı bir fark olduğu bulundu.

6. SONUÇ

Bu çalışmada periferik sinir tam kat kesilerinde, koaptasyon bölgesinin proksimali ve distaline eksozom implantasyonunun sinir rejenerasyonu üzerindeki etkisi değerlendirildi.

Sinir rejenerasyonu, fonksiyonel (SFİ), elektrofizyolojik ve histopatolojik olarak test edildi.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri sonucunda, eksozom implantasyonu yapılan grupta SFİ ölçümleri sonrası sinir rejenerasyonunun daha hızlı fonksiyonel geri dönüş sağladığını düşünmekteyiz.

Ratlardan alınan siyatik sinir biyopsilerinin histopatolojik olarak incelendikten sonraki istatistiksel analizleri sonucunda ise eksozom implantasyonu yapılan grupta inflamasyon ve fibrozisin anlamlı olarak daha az olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak eksozom implantasyonu periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte periferik sinir rejenerasyonu için büyük bir potansiyel taşıyıp umut vermektedir.

7. KAYNAKÇA

1. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. Supplements to Clinical Neurophysiology Journal Articles.2004;57:173–86.
2. Modrak M, Talukder MAH, Gurgenshvili K, et al., Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. J Neurosci Res. 2020 May;98(5):780-795. doi: 10.1002/jnr.24538. Epub 2019 Oct 13. PMID: 31608497; PMCID: PMC7072007.
3. Chalfoun CT, Wirth GA, Evans GR. Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? J Cell Mol Med. 2006;10:309–317. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
4. Hu J, Zhu QT, Liu XL, et al. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. Exp Neurol. 2007;204:658–666. [PubMed] [Google Scholar]
5. Marchesi C, Pluder M, Colleoni F, et al., Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. Glia. 2007;55:425–438. [PubMed] [Google Scholar]
6. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. Exp Neurol. 2007;207:267–274. [PubMed] [Google Scholar]
7. Hill A.F. Extracellular vesicles and neurodegenerative diseases. J.Neurosci. 2019;39(47):9269–9273. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0147-18.2019. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Hong P., Yang H., Wu Y., et al. The functions and clinical application potential of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells: a comprehensive review. Stem Cell Res. Ther. 2019;10(1):242. doi: 10.1186/s13287-019-1358-y. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Ha D., Yang N., Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. Acta Pharm. Sin. B. 2016;6(4):287–296. doi: 10.1016/j.apsb.2016.02.001. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. Ariston Gabriel A.N., Wang F., Jiao Q., et al. The involvement of exosomes in the diagnosis and treatment of pancreatic cancer. Mol. Cancer. 2020;19(1):132. doi: 10.1186/s12943-020-01245-y. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Kawikova I., Askenase P.W. Diagnostic and therapeutic potentials of exosomes in CNS diseases. Brain Res. 2015; 1617:63–71. doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.070. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
12. Brusthart TM. Nerve repair and grafting. Operative hand surgery. Green DP (eds). New York: Churcill Livingstone; 1999. 1381-403. 29
13. Donaghy R. History of microsurgery. In: Wilkins RH, Rengachary SS (eds). Neurosurgery. New York: McGraw-Hill Book Co; 1985. 20–26. 30

14. Shenaq SM, Kim JYS. Repair and grafting of peripheral nerve. In: Mathes SJ, editor. Plastic surgery. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. Volume 1, p: 719–43
15. Saleh MS, Jhon YSK. Repair and grafting of the peripheral nerve. In: McCarthy GJ (ed). Mathes Plastic Surgery. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. 719-20. 31
16. Terzis JK, Smith KL. Repair and grafting of the peripheral nerve. In McCarthy GJ (ed) Plastic surgery. Philadelphia: WB Saunders; 1990. 19:630–97.
17. Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. Historical and basic science review: past, present and future of nerve repair. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 1997; 13:215-25.
18. Cormack DH, ed. Essential, Histology, Second Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 209-35.
19. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text and atlas. 10th ed, New York, LANGE Mc Graw-Hill, 2003.
20. 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. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
21. Alvites R., Rita Caseiro A., Santos Pedrosa S., et al. Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. *Cogent. Med.* 2018; 5:1466404. doi: 10.1080/2331205X.2018.1466404. [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
22. Wang M.L., Rivlin M., Graham J.G., et al. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connect. Tissue Res.* 2019; 60:3–9. doi: 10.1080/03008207.2018.1489381. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
- 23-Mackinnon SE, Dellon AL. Surgery of the peripheral nerve. New York: Theime; 1988. 903-16.
- 24- Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve.* 1990;13(9):771–84.
25. Maggi SP, Lowe JB 3rd, Mackinnon SE. Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg.* 2003;30(2):109–26
26. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta OrthopScand.* 1987;58:145–69.
27. Terzis JK, Smith KL. Repair and Grafting of the Peripheral Nerve: Plastic Surgery. McCarthy JG (ed), WB Saunders, Philadelphia. 1990; 630- 697.
28. Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 1990; 13:785–800.
29. Fernandez E, Pallini R, Lauretti L, et al. Neurosurgery of the peripheral nervous system: injuries, degeneration and regeneration of the peripheral

- nerves. *Surg Neurol* 1997; 48: 446-7.
30. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle and Nerve*, 2000; 23: 863-73.
 31. Santo Neto H, Teodori RM, Somazz, et al. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local Anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg* 1998; 51(7): 555-60.
 32. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am.* 2000 May;25(3):391-414. doi: 10.1053/jhsu.2000.4165. PMID: 10811744.
 33. Hall SM. Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1989 Nov-Dec;15(6):513-29. doi: 10.1111/j.1365-2990.1989.tb01251.x. PMID: 2693992.
 34. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand.* 1987 Apr;58(2):145-69. doi: 10.3109/17453678709146461. PMID: 3300141.
 35. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A text and atlas.* Baltimore, Philadelphia, 5th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
 36. Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathology* 1999; 9: 313-25.
 37. Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Supplement* 2000; 9:33-38.
 38. Stoll G, Jander S and Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripheral Nervous System* 2002; 7: 13-27.
 39. Dahlin LB. The biology of nerve injury and repair. *J Am Surg Hand.* 2004;4(3):143-5
 40. Brushart TM. Nerve repair and grafting, *Green's Operative Hand Surgery.* Green DP (ed) Churchill Livingstone. New York vol.II 1999; 1381-403.
 41. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 1990; 13:43-60.
 42. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand.* 1987;58:145-69.
 43. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*, 2004; 16: 1-7.
 44. Ansell AD, Fink T, Davey DF. An alternative to nerve grafts in peripheral nerve repair: Nerve guides seeded with adult Schwann cells. *Acta Chirurgicalia Austriaca*, 1998; 147: 19-24.

45. Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Supplement* 2000; 9:33-38.
46. Liuzzi J, Tedeschi B. Peripheral nerve regeneration. *Neurosurgery Clinics of North America*, 1991, 2: 31-99.
47. Watchmaker G, Mackinnon S. Advances in Peripheral Nerve Repair. *Clinics Plastic Surgery*, 1997, 24: 63-73.
48. Dahlin LB. Nerve injury and repair: from molecule to man. In: Slutsky DJ, Hentz VR, editors. *Peripheral nerve surgery: practical applications in the upper extremity*. Churchill Livingstone, Elsevier; Philadelphia: 2006. pp. 1–22. [Google Scholar]
49. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*. 1997 Feb-Apr;14(1-2):67-116. doi: 10.1007/BF02740621. PMID: 9170101.
50. Elizabeth O. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury-international journal of the care of the injured*, 2005, 36: 24-29.
51. Galtrey CM, Fawcett JW. Characterization of tests of functional recovery after median and ulnar nerve injury and repair in the rat forelimb. *J Peripher Nerv Syst*. 2007 Mar;12(1):11-27. doi:10. 1111/j.1529-8027.2007.00113.x. PMID: 17374098.
52. Forman DS, Wood DK, DeSilva S. Rate of regeneration of sensory axons in transected rat sciatic nerve repaired with epineurial sutures. *J Neurol Sci*. 1979 Dec;44(1):55-9. doi: 10.1016/0022-510x (79)90222-3. PMID: 390103.
53. Millesi H, Berger A, Meissl G. Experimentelle untersuchung zur heilung durchtrennter peripherer nerven. *Chir Plast* 1972;1.
54. Jabaley M: Primary nerve repair. In: *Peripheral nerve surgery: Practical applications in the upper extremity*. Slutsky DJ, Hentzvr, Eds. Churchill Livingstone Elsevier. Philadelphia, 2006, pp.23–38
55. Brandt J, Dahlin Lb, Kanje M, Lundborg g: Spatiotemporal progress of nerve regeneration in a tendon autograft used for bridging a peripheral nerve defect. *Exp Neurol* 1999; 160:386–393
56. Takeshi M. Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review *Neurol Med Chir* 2000; 40: 187-99.
57. Sunderland S., *Nerve Injuries and their Repair. A Critical Appraisal.*, Churhill Livingstone, Edinburgh, 1991: 17-26, 47-52, 79-89, 91-113, 201-212, 213-219, 395-411, 439-465.
58. Holmes W., Young J., Nerve Regeneration after Immediate and Delayed Suture, *Journal of Anatomy* 1942; 77: 63-96.

59. Levinthal R, Brown WJ, Rand RW. Comparison of fascicular, interfascicular and epineural suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. *J Neurosurg.* 1977 Nov;47(5):744-50. doi: 10. 3171/jns.1977.47.5.0744. PMID: 333064.
60. Mackinnon SE. Nerve allotransplantation following severe tibial nerve injury. Case report. *J Neurosurg.* 1996 Apr;84(4):671-6. doi: 10. 3171/jns.1996.84.4.0671. PMID: 8613862.
61. Wilgis EFS: Techniques of epineural and group fascicular repair, in Gelberman RH (ed): *Operative Nerve Repair and Reconstruction*, vol 1. Philadelphia, JB Lippincott, 1991, pp 287-293
62. Hudson AR, Hunter D, Kline DG, et al. Histological studies of experimental interfascicular graft repairs. *J Neurosurg.* 1979 Sep;51(3):333-40. doi: 10. 3171/jns.1979.51.3.0333. PMID: 224153.
63. Matsuyama T, Mackay M, Midha R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2000 Apr;40(4):187-99. doi: 10. 2176/nmc.40.187. PMID: 10853317.
64. Tupper JW, Crick JC, Mattek LR. Fascicular nerve repairs. A comparative study of epineurial and fascicular (perineurial) techniques. *Orthop Clin North Am.* 1988 Jan;19(1):57-69. PMID: 3275929.
65. Fereidoon M. End-to-side neurorrhaphy: an experimental study in rabbits. *Microsurgery* 2003; 23: 359-62.
66. Feng Z. End-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery* 2002; 22: 122-7.
67. Millesi H: Nerve grafting, in Terzis JK (ed): *Clinics in Plastic Surgery*. Philadelphia, WB Saunders, 1984, pp 105-113
68. Millesi H: Indications and techniques of nerve grafting, in Gelberman RH (ed): *Operative Nerve Repair and Reconstruction*, vol 1. Philadelphia, JB Lippincott, 1991, pp 525-543
69. Stromberg BV, Vlastou C, Earle AS: Effect of nerve graft polarity on nerve regeneration and function. *J Hand Surg [Am]* 4: 444-445, 1979
70. Tupper JW: Fascicular repair, in Gelberman RH (ed): *Operative Nerve Repair and Reconstruction*, vol 1. Philadelphia, JB Lippincott, 1991, pp 295-303
71. Millesi H, Meissl G, Berger A: The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg [Am]* 54: 727-750, 1972
72. Terzis J: The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg* 56: 166-170, 1975

73. Best TJ, Mackinnon SE, Midha R, Hunter DA, et al., Revascularization of Peripheral Nerve Autografts and Allografts. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 152-160.
74. Tepe AF. Hücre Dışı Veziküller ve Nörodejeneratif Hastalıklar. *J Neurosci*. 2019 Kasım 20;39(47):9269-9273. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0147-18.2019. PMID: 31748282; PMCID: PMC6867808.
75. Hong P., Yang H., Wu Y., et al. The functions and clinical application potential of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells: a comprehensive review. *Stem Cell Res. Ther.* 2019;10(1):242. doi: 10.1186/s13287-019-1358-y. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
76. Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1981;645(1):63–70. doi: 10.1016/0005-2736(81)90512-5 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
77. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 1983 Aug;97(2):329-39. doi: 10.1083/jcb.97.2.329. PMID: 6309857; PMCID: PMC2112509
78. Gorabi A.M., Kiaie N., Barreto G.E., et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in treatment of neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 2019;56(12):8157–8167. doi: 10.1007/s12035-019-01663-0. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
79. Xiao T., Zhang W., Jiao B., et al. The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer' disease. *Transl. Neurodegener.* 2017;6:3. doi: 10.1186/s40035-017-0072-x. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
80. Yu T, Xu Y, Ahmad MA, et al. Exosomes as a Promising Therapeutic Strategy for Peripheral Nerve Injury. *Curr Neuropharmacol*. 2021;19(12):2141-2151. doi: 10.2174/1570159X19666210203161559. PMID: 33535957; PMCID: PMC9185764.
81. Rahmati S, Shojaei F, Shojaeian A, et al. An overview of current knowledge in biological functions and potential theragnostic applications of exosomes. *Chem Phys Lipids*. 2020 Jan; 226:104836. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104836. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31678051.
82. K. Boriachek, M. N. Islam, A. Moller, et al. Shiddiky, Small, vol. 14, 2018 1-21.
83. B. J. Crenshaw, B. Sims, and Q. L. Matthews, Biological Function of Exosomes as Diagnostic Markers and Therapeutic Delivery Vehicles in Carcinogenesis and Infectious Diseases, IntechOpen, 2018,
84. F. Properzi, M. Logozzi, and S. Fais, Biomarkers in Medicine, vol. 7, 2013 769-778.
85. F. M. Barros, F. Carneiro, J. C. Machado, et al. *Frontiers in Immunology*, vol. 9, 2018 1209- 1226.

86. N. Kumar, International Journal of Bioassays, vol. 3, 2014 3435-3437.
87. G. D. Pavlova, Isolation and Characterization of Cancer-Derived Exosomes, 2016.
88. Holm M.M., Kaiser J., Schwab M.E. Extracellular vesicles: multimodal envoys in Neural maintenance and repair. Trends Neurosci. 2018;41(6):360–372. doi: 10.1016/j.tins.2018.03.006. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
89. Tang B.L. Promoting axonal regeneration through exosomes: An update of recent findings on exosomal PTEN and mTOR modifiers. Brain Res. Bull. 2018; 143:123–131. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.10.008. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
90. Lopatina T, Bruno S, Tetta C, et al., Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. Cell Commun Signal. 2014 Apr 11; 12:26. doi: 10.1186/1478-811X-12-26. PMID: 24725987; PMCID: PMC4022079.
91. Ma Tao, Fu Bingchuan, Yang Xin, et al., Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promote cell proliferation, migration, and inhibit cell apoptosis via Wnt/ β -catenin signaling in cutaneous wound healing. Journal of Cellular Biochemistry. 2019;120(6):10847–10854. doi: 10.1002/jcb.28376. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
92. Zhang W, Bai X, Zhao B, et al. Cell-free therapy based on adipose tissue stem cell-derived exosomes promotes wound healing via the PI3K/Akt signaling pathway. Exp Cell Res. 2018;370(2):333–342. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.06.035. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
93. Hong P, Yang H, Wu Yet al. The functions and clinical application potential of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells: a comprehensive review. Stem Cell Res Ther. 2019 Aug 7;10(1):242. doi: 10.1186/s13287-019-1358-y. PMID: 31391108; PMCID: PMC6686455.
94. Jia Y, Yang W, Zhang K, et al. Nanofiber arrangement regulates peripheral nerve regeneration through differential modulation of macrophage phenotypes. Acta Biomater. 2019 Jan 1; 83:291-301. doi: 10.1016/j.actbio.2018.10.040. Epub 2018 Oct 27. PMID: 30541701.
95. Cattin A.L., Burden J.J., Van Emmenis L., et al. Macrophage-induced blood vessels guide schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves. Cell. 2015;162(5):1127–1139. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.021. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
96. Lv L., Sheng C., Zhou Y. Extracellular vesicles as a novel therapeutic tool for cell-free regenerative medicine in oral rehabilitation. J. Oral Rehabil. 2019;47(Suppl. 1):29–54. [PubMed] [Google Scholar]
97. Zhang Y., Chopp M., Meng Y., et al. Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular

plasticity in rats after traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 2015;122(4):856–867. doi: 10.3171/2014.11.JNS14770. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

98. Yang Y., Cai Y., Zhang Y., et al. Exosomes secreted by adipose-derived stem cells contribute to angiogenesis of brain microvascular endothelial cells following oxygen-glucose deprivation In Vitro through MicroRNA-181b/TRPM7 Axis. *J. Mol. Neurosci.* 2018;65(1):74–83. [PubMed] [Google Scholar]

99. Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, et al. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells Dev.* 2015 Jul 15;24(14):1635-47. doi: 10.1089/scd.2014.0316. Epub 2015 May 20. PMID: 25867197; PMCID: PMC4499790.

100. Zhu L. L., Huang X., Yu W., et al. Transplantation of adipose tissue-derived stem cell-derived exosomes ameliorates erectile function in diabetic rats. *Andrologia.* 2017;50(2): e12871. doi: 10.1111/and.12871. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

101. Yang Wen-Zhi, Yang Jin, Xue Li-Ping, et al. MiR-126 overexpression inhibits high glucose-induced migration and tube formation of rhesus macaque choroid-retinal endothelial cells by obstructing VEGFA and PIK3R2. *Journal of Diabetes and its Complications.* 2017;31(4):653–663. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.12.004. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

102. Wang S, Olson EN. AngiomiRs--key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19(3):205–211. doi: 10.1016/j.gde.2009.04.002. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

103. Ma T, Fu B, Yang X, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promote cell proliferation, migration, and inhibit cell apoptosis via Wnt/ β -catenin signaling in cutaneous wound healing. *J Cell Biochem.* 2019 Jun;120(6):10847-10854. doi: 10.1002/jcb.28376. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30681184.

104. Min Q., Parkinson D.B., Dun X.P. Migrating Schwann cells direct axon regeneration within the peripheral nerve bridge. *Glia.* 2020; 69:235–254. [PubMed] [Google Scholar]

105. Huang S., Ge X., Yu J., et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. *FASEB J.* 2018;32(1):512–528. doi: 10.1096/fj.201700673r. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

106. Matsui H., Sopko N.A., Hannan J.L., et al. M1 Macrophages are predominantly recruited to the major pelvic ganglion of the rat following cavernous nerve injury. *J. Sex. Med.* 2017;14(2):187–195. doi: 10.1016/j.jsxm.2016.12.012. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

107. Tomlinson J.E., Žygelytė E., Grenier J.K., et al. Temporal changes in macrophage phenotype after peripheral nerve injury. *J. Neuroinflammation.* 2018;15(1):185. doi: 10.1186/s12974-018-1219-0. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

108. Gaudet A.D., Popovich P.G., Ramer M.S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J. Neuroinflammation*. 2011;8:110. doi: 10.1186/1742-2094-8-110. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
109. Kroner A., Greenhalgh A.D., Zarruk J.G., et al. TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron*. 2014;83(5):1098–1116. doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.027. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
110. Sun G., Li G., Li D., et al. hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation. *Mater. Sci. Eng. C*. 2018; 89:194–204. doi: 10.1016/j.msec.2018.04.006. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
111. Ma Z., Wang Y., Li H. Applications of extracellular vesicles in tissue regeneration. *Biomicrofluidics*. 2020;14(1):011501. doi: 10.1063/1.5127077. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
112. Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J. Neuroinflammation*. 2011;8:109. doi: 10.1186/1742-2094-8-109. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
113. Toh W.S., Zhang B., Lai R.C., et al. Immune regulatory targets of mesenchymal stromal cell exosomes/small extracellular vesicles in tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2018;20(12):1419–1426. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.09.008. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
114. Huang T.C., Wu H.L., Chen S.H., et al. Thrombomodulin facilitates peripheral nerve regeneration through regulating M1/M2 switching. *J. Neuroinflammation*. 2020;17(1):240. doi: 10.1186/s12974-020-01897-z. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
115. Gupta A., Pulliam L. Exosomes as mediators of neuroinflammation. *J. Neuroinflammation*. 2014;11:68. doi: 10.1186/1742-2094-11-68. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
116. Liu W., Wang Y., Gong F., et al. Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by suppressing the activation of a1 neurotoxic reactive astrocytes. *J. Neurotrauma*. 2019;36(3):469–484. doi: 10.1089/neu.2018.5835. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
117. Ma Y., Dong L., Zhou D., et al. Extracellular vesicles from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve nerve regeneration after sciatic nerve transection in rats. *J. Cell. Mol. Med*. 2019;23(4):2822–2835. doi: 10.1111/jcmm.14190. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
118. Rao F., Zhang D., Fang T., et al. Exosomes from human gingiva-derived mesenchymal stem cells combined with biodegradable chitin conduits promote rat sciatic nerve Regeneration. *Stem Cells Int*. 2019; 2019:2546367. doi: 10.1155/2019/2546367. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

119. Kou X., Xu X., Chen C., et al. The Fas/Fap-1/Cav-1 complex regulates IL-1RA secretion in mesenchymal stem cells to accelerate wound healing. *Sci. Transl. Med.* 2018;10(432): eaai8524. doi: 10.1126/scitranslmed.aai8524. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
120. Wei Z., Fan B., Ding H., et al. Proteomics analysis of Schwann cell-derived exosomes: a novel therapeutic strategy for central nervous system injury. *Mol. Cell. Biochem.* 2019;457(1-2):51–59. doi: 10.1007/s11010-019-03511-0. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
121. Bucan Vesna, Vaslaitis Desiree, Peck Claas-Tido, et al. Effect of Exosomes from Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Neurite Outgrowth and Sciatic Nerve Regeneration After Crush Injury. *Molecular Neurobiology.* 2018;56(3):1812–1824. doi: 10.1007/s12035-018-1172-z. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
122. Farinazzo A, Turano E, Marconi S, et al. Murine adipose-derived mesenchymal stromal cell vesicles: in vitro clues for neuroprotective and neuroregenerative approaches. *Cytotherapy.* 2015;17(5):571–578. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.01.005. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
123. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science.* 2020 Feb 7;367(6478): eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977. PMID: 32029601; PMCID: PMC7717626
124. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep.* 2015 Nov 30; 5:17319. doi: 10.1038/srep17319. Erratum in: *Sci Rep.* 2016; 6:21447. Livshits, Mikhail A [corrected to Livshits, Mikhail A]. PMID: 26616523; PMCID: PMC4663484.
125. Cvjetkovic A, Lötval J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014 Mar 25;3. doi: 10.3402/jev.v3.23111. PMID: 24678386; PMCID: PMC3967015.
126. Ford T, Graham J, Rickwood D. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem.* 1994;220(2):360–366. doi: 10.1006/abio.1994.1350 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
127. Boing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles.* 2014;3(1):23430. doi: 10.3402/jev.v3.23430 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
128. Vergauwen G, Dhondt B, Van Deun J, et al. Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. *Sci Rep.* 2017;7(1):2704. doi: 10.1038/s41598-017-02599-y [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

129. Tschuschke M, Kocherova I, Bryja A, et al. Inclusion biogenesis, methods of isolation and clinical application of human cellular exosomes. *J Clin Med*. 2020;9(2):436. doi: 10.3390/jcm9020436 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
130. Fitzgerald J, Leonard P, Darcy E, et al. Immunoaffinity chromatography: concepts and applications. *Methods Mol Biol*. 2017; 1485:27–51. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
131. Zarovni N, Corrado A, Guazzi P, et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods*. 2015;87:46–58. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.05.028 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
132. Marcolino AM, Barbosa RI, das Neves LM, et al. Assessment of functional recovery of sciatic nerve in rats submitted to low-level laser therapy with different fluences. An experimental study: laser in functional recovery in rats. *J Hand Microsurg*. 2013 Dec;5(2):49-53. doi: 10.1007/s12593-013-0096-0. Epub 2013 Apr 25. PMID: 24426674; PMCID: PMC3827659.
133. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic Assessment of Nerve regeneration in the Rat. *Plast Reconstr Surg* 1985; 75: 384-8.
134. Bayramiçli M. Deneysel mikrocerrahi. Temel araştırma, doku ve organ nakil modelleri. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ. 2005, p: 342–43
135. Bahar D, Gonen ZB, Gumusderelioglu M, et al. Repair of Rat Calvarial Bone Defect by Using Exosomes of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Embedded in Chitosan/Hydroxyapatite Scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2022 Sep-Oct;37(5):943-950. doi: 10.11607/jomi.9515. PMID: 36170309.
136. Zhao J, Ding Y, He R, et al. Dose-effect relationship and molecular mechanism by which BMSC-derived exosomes promote peripheral nerve regeneration after crush injury. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Aug 18;11(1):360. doi: 10.1186/s13287-020-01872-8. PMID: 32811548; PMCID: PMC7437056.
137. 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.
138. Tatagiba, M., Rosahl, S., Gharabaghi, A., et al. Regeneration of auditory nerve following complete sectioning and intrathecal application of the IN-1 antibody. *Acta Neurochir. (Wien.)* 2002; 144, 181–7.
139. Snell R.S., *Clinical Neuroanatomy for Medical Students*, Little Brown and Company, Boston. 1980: 87-114.
140. Santo Neto H, Teodori RM, Somazz, et al. Axonal regeneration through muscle autografts submitted to local Anaesthetic pretreatment. *Br J Plast Surg* 1998; 51(7): 555-60.

141. Thanos PK, Okajima S, Terzis JK. Ultrastructure and Cellular Biology of Nerve Regeneration. *J Reconstr Microsurg* 1998; 14: 423-36.
142. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg [Am]*. 2000; 25:391–414.
143. Terzis JK, Smith KL. The peripheral nerve: Structure, function and reconstruction. Raven Press, New York 1990.
144. 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; 98:1264–71, discussion 1272–4. 100
145. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, et al. Comparative electrophysiological, functional and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005; 25:508–19.
146. Schaller E, Lassner F, Becker M, et al. Regeneration of autologous and allogenic nerve grafts in a rat genetic model: preliminary report. *J Reconstr Microsurg*. 1991; 7: 9-12.
147. Luís AL, Amado S, Geuna S, et al. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurosci Methods*. 2007;163(1):92–104.
148. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, et al. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: Walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001;108(1):1–9.
149. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, et al. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*. 2004;21(11):1652–70.
150. Martins RS, Siqueira MG, da Silva CF, et al. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006;64(3B):750–6.
151. Ikeda K. Timing and technique of peripheral nerve repair. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1980; 20:759-67.
152. Diao, E., and Vannuyen, T. Techniques for primary nerve repair. *Hand Clin* 2000; 16: 53–66.
153. Dahlin, L. B., and Lundborg, G. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg. Clin. N. Am* 2001; 12, 341–52.

154. Harris, M. E., and Tindall, S. C. Techniques of peripheral nerve repair. *Neurosurg. Clin. N. Am* 1991; 2: 93–104.
155. Siemionow, M., Tetik, C., Ozer, K., et al. Epineural sleeve neurorrhaphy: Surgical technique and functional results—A preliminary report. *Ann. Plast. Surg* 2002;48: 281–5.
156. Tetik, C., Ozer, K., Ayhan, S., et al. Conventional versus epineural sleeve neurorrhaphy technique: Functional and histomorphometric analysis. *Ann. Plast. Surg* 2002; 49; 397–403.
157. Waller, A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil. Trans. R. Soc. London* 1850: 140, 423–9.
158. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand*. 1987;58:145–69.
159. Amara B, Medinacelli L, Lane GB, et al. Functional Assessment of Misdirected axonal Growth After Nerve Repair in the Rat. *J Reconstr Microsurg*. 2000; 16: 563-7.
160. Francel PC, Francel TJ, Mackinnon SE, et al. Enhancing Nerve Regeneration across a Silicone tube Conduit by using interposed short-segment nerve grafts. *J Neurosurg* 1997; 87: 887-92.
161. Smahel J, Jentsch B. Stimulation of Peripheral Nerve Regeneration by an Isolated Nerve Segment. *Ann Plast Surg*. 1986; 16: 494-501.
162. Mackinnon SE. New Directions in Peripheral Nerve Surgery. *Ann Plast Surg*. 1989; 22: 257-73.
163. Del Fattore A, Luciano R, Pascucci L, et al. Immunoregulatory effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on T lymphocytes. *Cell Transplant*. 2015;1824(12):2615–2627. [PubMed] [Google Scholar]
164. Wang J, Ding F, Gu Y, Liu J, Gu X. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. *Brain Res*. 2009;1262:7–15. [PubMed] [Google Scholar]
165. Mimura T, Dezawa M, Kanno H, et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg*. 2004;101:806–812. [PubMed] [Google Scholar]
166. Cuevas P, Carceller F, Garcia-Gomez I, et al. Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol Res*. 2004;26:230–232. [PubMed] [Google Scholar]
167. Dadon-Nachum M, Sadan O, Srugo I, et al. Differentiated mesenchymal stem cells for sciatic nerve injury. *Stem Cell Rev*. 2011;7:664–671. [PubMed] [Google Scholar]

168. Lopez-Verrilli MA, Picou F, Court FA. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia*. 2013;61(11):1795–1806. [PubMed] [Google Scholar]
169. Bucan V, Vaslaitis D, Peck CT, et al. Effect of Exosomes from Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Neurite Outgrowth and Sciatic Nerve Regeneration After Crush Injury. *Mol Neurobiol*. 2019 Mar;56(3):1812-1824. doi: 10.1007/s12035-018-1172-z. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29931510; PMCID: PMC6394792.
170. Yu B., Zhou S., Qian T., et al. Altered microRNA expression following sciatic nerve resection in dorsal root ganglia of rats. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2011;43(11):909–915. doi: 10.1093/abbs/gmr083. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
171. Chang L.-W., Viader A., Varghese N., et al. An integrated approach to characterize transcription factor and microRNA regulatory networks involved in Schwann cell response to peripheral nerve injury. *BMC Genomics*. 2013;14, article 84 doi: 10.1186/1471-2164-14-84. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
172. Kosik K. S. The neuronal microRNA system. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(12):911–920. doi: 10.1038/nrn2037. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
173. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., Lötvall J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*. 2007;9(6):654–659. doi: 10.1038/ncb1596. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
174. Tian Y., Gong M., Hu Y., et al. Extracell. Vesicles 2020, 9, 1697028. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
175. Zhao J, Ding Y, He R, et al. Dose-effect relationship and molecular mechanism by which BMSC-derived exosomes promote peripheral nerve regeneration after crush injury. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Aug 18;11(1):360. doi: 10.1186/s13287-020-01872-8. PMID: 32811548; PMCID: PMC7437056.
176. Luís AL, Amado S, Geuna S, et al. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurosci Methods*. 2007;163(1):92–104.
177. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, et al. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: Walking track analysis. *J Neurosci Methods*. 2001;108(1):1–9.
178. 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, discussion 1272–4.

179. Tseng T-C, S-h H. Substrate-mediated nanoparticle/gene delivery to MSC spheroids and their applications in peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 2014; 35:2630–2641. [PubMed] [Google Scholar]
180. 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.
181. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, et al. Comparative electrophysiological, functional and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005;25(6):508–19.
182. Geuna S, Gigo-Benato D, Rodrigues Ade C. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. *Microsurgery*. 2004;24(1):72–6.
183. McQuarrie I. G. and Lasek R. J. (1989) Transport of cytoskeletal elements from parent axons into regenerating daughter axons. *J~ Neurosci* 9,436-446.
184. Miller RH, Lasek RJ, Katz MJ. Preferred microtubules for vesicle transport in lobster axons. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):220-2. doi: 10.1126/science.2432661. PMID: 2432661.
185. Simpson SA, Young JZ. Regeneration of fibre diameter after cross-unions of visceral and somatic nerves. *J Anat*. 1945 Apr;79(Pt 2):48-65. PMID: 17104969; PMCID: PMC1272644.
186. Cajal Ramon Y. (1928) *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*, Oxford University Press, London.
187. Koka R, Hadlock TA. Quantification of functional recovery following rat sciatic nerve transection. *Exp Neurol*. 2001;168(1):192–5
188. Iguchi M, Kato K, Ibayashi M. Age dependent reduction in serum melatonin concentration in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol and Metab* 1982; 55: 27-9.
189. Çolak A. Periferik sinir travmasında cerrahi teknik. İçinde Demircan N, Zileli M (ed). *Periferik Sinir Cerrahisi, Buluş Tasarım ve Matbaacılık* 2008:129-36
190. Lopes B, Sousa P, Alvites R, et al. Peripheral Nerve Injury Treatments and Advances: One Health Perspective. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 14;23(2):918. doi: 10.3390/ijms23020918. PMID: 35055104; PMCID: PMC8779751.

