



**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİYATİK SİNİR HASARI OLUŞTURULAN SIÇANLARDA**  
**ERİTROPOETİNİN VE UMBİLİKAL KORD KAYNAKLI**  
**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN SİNİR**  
**REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Menekşe ÜLGER**

**KAYSERİ-2019**



**T.C.**

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİYATİK SİNİR HASARI OLUŞTURULAN SIÇANLARDA  
ERİTROPOETİNİN VE UMBİLİKAL KORD KAYNAKLI  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN SİNİR  
REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Menekşe ÜLGER**

**Danışman**

**Prof. Dr. Birkan YAKAN**

**Bu çalışma TTU-2018-8163 nolu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel  
Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.**

**KAYSERİ-2019**

## TEŞEKKÜR

Başta danışman hocam ve anabilim dalı başkanımız olan Prof.Dr. Birkan YAKAN'a ve ikinci danışman hocam olan Dr. Öğ. Gör. Gülay SEZER'e olmak üzere,

Asistanlığım ve tez sürecim boyunca bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Arzu YAY ve Öğ. Gör. Esra BALCIOĞLU'na

Deney sürecimde emeğini esirgemeyen Prof. Dr. İrfan ÖZYAZGAN ve asistanı Dr.Hakan ÖZOCAK'a,

Asistanlık sürecinde edindiğim değerli dostlarım Araş. Gör. Dr. Rümeysa GÖÇ, Araş. Gör. Dr. Tuğçe Merve ÖZYAZGAN, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Araş. Gör. Betül YALÇIN ve Araş. Gör. Gözde Özge ÖNDER 'e

Asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Özge Göktepe, Özge CENGİZ, Demet BOLAT' a,

Destegini her daim yanımda hissettiğim değerli eşim Uz. Dr. Birkan ÜLGER' e tez döneminde de bana en çok destek olan o olduğu için,

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan annem Fatma ODABAŞ, babam Fehmi ODABAŞ, ablam Neşe ODABAŞ YÜKSEL, kardeşim Uğurcan ODABAŞ'a

Sonsuz teşekkürler...

Menekşe ÜLGER

Kayseri, 2019

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                   |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR.....                                                                     | i    |
| KISALTMALAR LİSTESİ.....                                                          | iv   |
| TABLO LİSTESİ .....                                                               | vii  |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                                                | viii |
| ÖZET.....                                                                         | x    |
| ABSTRACT .....                                                                    | xii  |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                             | 1    |
| 2.GENEL BİLGİLER.....                                                             | 4    |
| 2.1.SİNİR SİSTEMİ .....                                                           | 4    |
| 2.1.1.Nöron .....                                                                 | 4    |
| 2.1.2.Sinir sisteminin destek hücreleri (Nöroglia) .....                          | 9    |
| 2.1.3.Somatik sinir sistemi.....                                                  | 13   |
| 2.1.4.Otonomik sinir sistemi.....                                                 | 13   |
| 2.1.5.Merkezi sinir sistemi.....                                                  | 14   |
| 2.1.6.Periferik sinir sistemi .....                                               | 14   |
| 2.1.7.Periferik sinir histolojisi.....                                            | 15   |
| 2.1.8.Periferik sinir embriyolojisi .....                                         | 16   |
| 2.1.9.Sıçan sıyatik siniri.....                                                   | 17   |
| 2.1.10.Nöronların hasara yanıtı.....                                              | 19   |
| 2.2.KÖK HÜCRE .....                                                               | 23   |
| 2.2.1.Kök hücre türleri .....                                                     | 26   |
| 2.3.ERİTROPOETİN .....                                                            | 31   |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                            | 34   |
| 3.1.UMBİLİKAL KORDDAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU.....                        | 34   |
| 3.1.1.Hücrelerin karakterizasyonlarının yüzey belirteçleri ile belirlenmesi ..... | 36   |
| 3.1.2.Adipojenik ve osteojenik dönüşüm yetenekleri.....                           | 37   |
| 3.1.3.Hücrelerin PKH26 ile işaretlenmesi .....                                    | 37   |
| 3.2.DENEY PROSEDÜRÜ.....                                                          | 37   |
| 3.3.CERRAHİ YÖNTEM .....                                                          | 38   |
| 3.4.SİYATİK FONKSİYONEL İNDEX TESTİ:.....                                         | 41   |
| 3.5.HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLER .....                                                | 42   |

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.1.Doku takibi yöntemi .....                                                     | 43        |
| 3.5.2.PKH 26 işaretli kök hücrelerin gösterilmesi.....                              | 43        |
| 3.5.3.Frozen kesitte oil red o boyama yöntemi.....                                  | 43        |
| 3.5.4.Frozen kesitte immunofloresan boyama yöntemi.....                             | 44        |
| 3.6.HİSTOMORFOLOJİK ANALİZLER .....                                                 | 44        |
| 3.7.İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME .....                                               | 45        |
| <b>4.BULGULAR.....</b>                                                              | <b>46</b> |
| 4.1.UMBİLİKAL KORDDAN MKH ELDESİ.....                                               | 46        |
| 4.2.HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONLARINDA YÜZEY<br>BELİRTEÇLERİNİN ANALİZİ.....         | 47        |
| 4.3. ADİPOJENİK VE OSTEOJENİK DÖNÜŞÜM YETENEKLERİ.....                              | 48        |
| 4.4.HÜCRELERİN PKH26 İLE İŞARETLENMESİNİN AKIM SİTOMETRİSİNDE<br>GÖSTERİLMESİ ..... | 49        |
| 4.5.SFİ TESTİ .....                                                                 | 49        |
| 4.6.PKH 26 İLE İŞARETLİ KÖK HÜCRELERİN GÖSTERİLMESİ .....                           | 51        |
| 4.7.İŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR .....                                                 | 51        |
| 4.8.İMMUNOFLORESAN BULGULAR .....                                                   | 54        |
| <b>5.TARTIŞMA .....</b>                                                             | <b>60</b> |
| <b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                                     | <b>65</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                              | <b>67</b> |

## KISALTMALAR LİSTESİ

|                |                                                                      |
|----------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>Bax</b>     | : BCL2 associated x                                                  |
| <b>Bcl-xL</b>  | : B-cell lymphoma extra large                                        |
| <b>Bcl-2</b>   | : B-cell lymphoma 2                                                  |
| <b>BDNF</b>    | : Brain Derived Neurotrophic Factor                                  |
| <b>BOS</b>     | : Beyin Omurilik Sıvısı                                              |
| <b>CFU-F</b>   | : Colony-Forming Unit-Fibroblast (Fibroblast Koloni Oluşturan Birim) |
| <b>DPBS</b>    | : Dulbecco's fosfat buffer solution                                  |
| <b>EKH</b>     | : Embriyo Kök Hücresi                                                |
| <b>ELISA</b>   | : Enzim Linked İmmunoSorbent Assay                                   |
| <b>EPO</b>     | : Eritropoetin                                                       |
| <b>EPO-R</b>   | : Epo-Reseptörleri                                                   |
| <b>GABA</b>    | : γ-aminobutirik asit                                                |
| <b>GDNF</b>    | : Glial Cell Derived Neurotrophic Factor                             |
| <b>gER</b>     | : Granüllü endoplazmik redikulum                                     |
| <b>GFAP</b>    | : Glial Fibrillary Acidic Protein                                    |
| <b>GGF</b>     | : Gliyal Growth Factor                                               |
| <b>GKS-MKH</b> | : Göbek Kordonu Stroması Mezenkimal Kök Hücresi                      |
| <b>HLA-A</b>   | : Human Leukocyte Antigen A                                          |
| <b>HLA-B</b>   | : Human Leukocyte Antigen B                                          |
| <b>HLA-C</b>   | : Human Leukocyte Antigen C                                          |

|               |                                             |
|---------------|---------------------------------------------|
| <b>HLA-DR</b> | : Human Leukocyte Antigen DR                |
| <b>HKH</b>    | : Hematopoetik Kök Hücre                    |
| <b>İHK</b>    | : İ Hücre Kitlesi                          |
| <b>Kİ-MKH</b> | : Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre |
| <b>MAP2</b>   | : Microtubule-Associated Protein 2          |
| <b>MBP</b>    | : Miyelin Bazik Protein                     |
| <b>MHC</b>    | : Major Histocompatibility Complex          |
| <b>MKH</b>    | : Mezenkimal Kök Hücre                      |
| <b>MSS</b>    | : Merkezi Sinir Sistemi                     |
| <b>NeuN</b>   | : Neuronal Nuclei                           |
| <b>NF-H</b>   | : Neurofilament-h                           |
| <b>NGF</b>    | : Nerve Growth Factor                       |
| <b>NKH</b>    | : Nöral Kök Hücre                           |
| <b>OSS</b>    | : Otonom Sinir Sistemi                      |
| <b>PLP</b>    | : Proteolipid protein                       |
| <b>PMP-22</b> | : Periferik Miyelin Protein                 |
| <b>PSS</b>    | : Periferik Sinir Sistemi                   |
| <b>P0</b>     | : Protein 0                                 |
| <b>rhEPO</b>  | : Rekombinant Human Eritropoetin            |
| <b>SCID</b>   | : Severe Combined Immuno Deficiency         |
| <b>SFİ</b>    | : Siyatik Fonksiyonel İndex                 |

**SSS** : Somatik Sinir Sistemi

**YKH** : Yetişkin Kök Hcrei



## TABLO LİSTESİ

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1:</b> Periferik sinirlerin çap ve ileti hızlarına göre sınıflandırılması .....        | 13 |
| <b>Tablo 2.2:</b> Kök hücre türleri .....                                                         | 27 |
| <b>Tablo 3.1:</b> Oil red o boyama protokolü .....                                                | 43 |
| <b>Tablo 3.2:</b> İmmunofloresan boyama protokolü .....                                           | 44 |
| <b>Tablo 4.1:</b> Siyatik fonksiyonel indeks testi istatistikleri .....                           | 50 |
| <b>Tablo 4.2:</b> Oil red o ile boyanan siyatik sinirde akson çap ve sayısı istatistik tablosu .. | 54 |
| <b>Tablo 4.3:</b> Akson çap ve sayı grafiği .....                                                 | 54 |
| <b>Tablo 4.4:</b> İmmunreaktivite değerlendirme istatistikleri .....                              | 55 |

## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1: Nöron anatomik sınıflaması .....                                          | 5  |
| Şekil 2.2: Nöron.....                                                                | 6  |
| Şekil 2.3: Sinaps morfolojik sınıflandırılması .....                                 | 7  |
| Şekil 2.4: Kimyasal sinaps diyagramı .....                                           | 8  |
| Şekil 2.5: Miyelin kılıf oluşumu .....                                               | 10 |
| Şekil 2.6: Periferik Sinir .....                                                     | 15 |
| Şekil 2.7: Sıçan Siyatik Sinir Anatomisi .....                                       | 18 |
| Şekil 2.8: Sıçan arka bacağının kas, sinir ve damar yapıları .....                   | 18 |
| Şekil 2.9: Akson dejenerasyonu .....                                                 | 21 |
| Şekil 2.10: Kök hücre farklılaşması .....                                            | 25 |
| Şekil 2.11: İnsan göbek kordonu .....                                                | 30 |
| Şekil 3.1: Umbilikal korddan damarların çıkartılması .....                           | 36 |
| Şekil 3.2: Sıçanları tespit edilmesi ve sinir hasarının oluşturulması .....          | 39 |
| Şekil 3.3: Sinir hasarının gösterilmesi .....                                        | 40 |
| Şekil 3.4: SFİ ölçümü .....                                                          | 40 |
| Şekil 3.5: SFİ ölçüm şeması .....                                                    | 41 |
| Şekil 3.6: Siyatik fonksiyonel index testi formülü .....                             | 42 |
| Şekil 4.1: MKH'lerin 10. gün invert mikroskop görüntüleri .....                      | 46 |
| Şekil 4.2: MKH'lerin akım sitometri histogram grafikleri .....                       | 47 |
| Şekil 4.3: MKH'lerin 21. gün farklılaşmalarının mikroskobik görüntüleri .....        | 48 |
| Şekil 4.4: MKH'ların 21. gün farklılaşmalarının floresan görüntüleri .....           | 48 |
| Şekil 4.5: PKH 26 ile boyanan MKH'lerin akım sitometrisinde verdikleri ışımaya ..... | 49 |
| Şekil 4.6: PKH26 ile boyalı hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü.....             | 49 |
| Şekil 4.7: Siyatik fonksiyonel indeks testi istatistikleri grafikleri.....           | 51 |
| Şekil 4.8: PKH 26 işaretli kök hücreler .....                                        | 51 |
| Şekil 4.9: Grupların oil red o boyama ile görüntüleri.....                           | 53 |
| Şekil 4.10: NF-H immunreaktivite değerlendirme grafikleri .....                      | 56 |
| Şekil 4.11: NGF immunreaktivite değerlendirme grafikleri.....                        | 56 |

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.12:</b> NF-H boyama görüntüler .....      | 57 |
| <b>Şekil 4.13:</b> NGF boyama görüntüleri.....       | 58 |
| <b>Şekil 4.14:</b> Kaspaz-3 boyama görüntüleri ..... | 59 |



# **SIYATİK SİNİR HASARI OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ERİTROPOETİNİN VE UMBİLİKAL KORD KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN SİNİR REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

## **ÖZET**

**Amaç:** Periferik sinirler pek çok travmaya maruz kalır ve mevcut tedavilerle tam bir rejenerasyon mümkün olmamaktadır. Bu sebeple siyatik sinir ‘crush hasar’ modelinde kök hücre ve eritropoetinin sinir rejenerasyonuna olan katkılarını araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Umbilikal korddan elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterizasyonu yapıldı. Ağırlıkları 130-150 g arasında olan 50 adet Wistar albino türü erişkin dişi sıçan rastgele 5 gruba ayrıldı. Gruplar; sadece cilt kesisi oluşturulan Sham grubu, siyatik sinirde hasar oluşturulup herhangi bir tedavi uygulanmayan hasar grubu, sinirde hasar oluşturulup insan rekombinant eritropoetinin 5000 U/kg olacak şekilde intraperitoneal yolla verildiği hasar+eritropoetin grubu, sinirde hasar oluşturulup lokal olarak mezenkimal kök hücre (350.000 adet) verilen hasar+mezenkimal kök hücre grubu ve sinirde hasar oluşturulup eritropoetin ve kök hücrenin verildiği hasar+eritropoetin+mezenkimal kök hücre grubu şeklinde belirlendi. 0. gün, 14. gün ve 28. günlerde tüm gruplara siyatik fonksiyonel indeks testi yapıldı ve 28. günde deney sonlandırıldı. Siyatik sinirlerin oil red o boyası ile genel histopatolojik görünüm, akson sayısı, akson çapı değerlendirildi. İmmüno Floresan olarak da dokudaki Nerve Growth Factor, Neurofilament-h ve kaspaz-3 immunreaktiviteleri belirlendi.

**Bulgular:** Genel histopatolojik görünüm değerlendirildiğinde Sham grubuna ait histolojik yapı aksonların görünümü ve sinir demetleri düzgündü. Sham grubuna en yakın grup hasar+mezenkimal kök hücre grubundaydı. Akson sayısı kök hücre verilen gruplarda hasar grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmıştı. Nerve Growth Factor immunreaktivite yoğunluğu ise hasar+mezenkimal kök hücre grubunda Sham’e en yakın değeri ve hasar+mezenkimal kök hücre grubu ile hasar grubu arasında anlamlı fark vardı. Neurofilament-h yoğunluğu Sham grubunda en yüksekti ve hasar grubu ile tüm tedavi grupları kıyaslandığında tedavi gruplarında anlamlı olarak artmıştı.

**Sonuç:** Bu çalışmada sıçanların siyatik sinirinde bulldog klemp ile oluşturulan crush hasarın rejenerasyonuna umbilikal korddan elde edilen kök hücre ve insan rekombinant eritropoetin tedavilerinin katkı sağladığı bulunmuştur. Kullandığımız Neurofilament-H, Nerve Growth Factor ve oil red o boyamaları bu ayrımı sağlamaya yardımcı olmuştur. Bu çalışmada irdelenen çok sayıda histolojik bulgunun istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde sadece kök hücrenin kullanılmasının daha faydalı olabileceğini gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Crush Hasar, Eritropoetin, Mezenkimal Kök Hücre, Siyatik Sinir, Umbilikal Kord



**THE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN AND UMBILICAL CORD MEDIATED  
MESENCHYMAL STEM CELLS ON NERVE REGENERATION IN RATS  
WITH SCIATIC NERVE INJURY**

**ABSTRACT**

**Objectives:** Peripheral nerves are subjected to many traumas and complete regeneration is not possible with the available treatments. Therefore, we aimed to investigate the contribution of mesenchymal stem cells and erythropoietin to nerve regeneration in the sciatic nerve ‘crush injury’ model.

**Materials and Methods:** The characterization of the cells obtained from the umbilical cord were performed and it is determined that these cells expressed mesenchymal stem cell markers. Fifty adult female Wistar albino rats weighing between 130-150 g were randomly divided into 5 groups. Groups; only skin incision created Sham group, damage group of sciatic nerve without any treatment, damage + erythropoietin group where human recombinant erythropoietin is administered intraperitoneally to 5000 U / kg, mesenchymal stem cell group, mesenchymal stem cells (350,000 units) is administered locally and damage + erythropoietin + mesenchymal stem cell group, sciatic nerve damage treated with both erythropoietin and stem cell. On the 0th, 14th and 28th days, all groups underwent sciatic functional index test and the experiment was terminated on 28th day. Histopathological appearance, axon number and axon diameter of the sciatic nerves were evaluated with oil red o stain. Immunoreactivity of Nerve Growth Factor, Neurofilament-h and caspase-3 was determined by immunofluorescence in the tissue.

**Results:** When the histopathological appearance was evaluated, histologically the appearance of axons and nerve bundles were smooth in Sham group. Damage + mesenchymal stem cell group have similar histological appearance to the Sham group. The number of axons was significantly increased in the stem cell groups compared to the damage group. Nerve Growth Factor immunoreactivity density was the closest value to Sham in damage+mesenchymal stem cell group and there was a significant difference between damage+mesenchymal stem cell group and damage group. Neurofilament-h

density was highest in the Sham group and significantly increased in the treatment groups when compared to the damage group and all treatment groups.

**Conclusion:** In this study, it was found that stem cell obtained from umbilical cord and human recombinant erythropoietin treatments contributed to the regeneration of crush injury caused by bulldog clamp in the sciatic nerve of rats. We used Neurofilament-H, Nerve Growth Factor and oil red o staining helped to achieve this separation. It showed that the use of only stem cells could be more beneficial, as the histological findings discussed in this study were statistically significant.

**Keywords:** Crush injury, Erythropoietin, Mesenchymal Stem Cell, Sciatic Nerve, Umbilical Cord

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günlük hayatta travma ve kazalar sonucunda sinirlerde hasarlar meydana gelebilir ve güncel tedavilerle bu hasarları tam olarak geri döndürmek mümkün olmamaktadır. Pek çok kaynaktan elde edilen kök hücreler, çeşitli doku ve organlardaki hasarları geri döndüren geleceğin tedavi yöntemleri olarak görülmektedirler.

Her yıl 100.000 kişiden yaklaşık 13-23'ü periferik sinir hasarına uğramaktadır (1). Son zamanlarda bu bilgiyi destekleyen çalışmalarda, travma hastalarında periferik sinir yaralanma oranının yaklaşık % 2,8'e yükselmiş olduğu ve bu hastaların % 50'sinden fazlasının tedaviyi takiben normal motor ve duyu işlevlerini geri kazanamadığı bildirilmiştir (2,3). Periferik sinir yaralanmaları, operasyon gerektiren, operasyon öncesi ve sonrasında da morbiditede ciddi artışlara yol açan önemli bir sağlık problemi olarak görülmektedir. Operasyon sonrasında uzun süren bir iyileşme dönemi gerekmekte ve sinir fonksiyonlarının tam olarak geri dönüşü pek mümkün olmadığından iş gücü kaybına neden olmaktadır (4).

Siyatik sinir crush (ezilme) hasarı, periferik sinir yenilenmesini inceleyen yaygın olarak kullanılan akut nöropati modelidir. Siyatik sinir hasar gördükten sonra Schwann hücreleri ve makrofajlar myelin enkazını çabucak giderir ve enflamatuvar sitokinler, kemokinler, hücre dışı matriks molekülleri ve proteolitik enzimlerin yanı sıra nöronal sağkalımda ve aksonal rejenerasyonda kritik rol oynayan bir takım büyüme faktörleri üretirler (5,6). Periferik sinir büyüklüğü nedeniyle sıçan siyatik siniri, periferik sinir rejenerasyonu ve muhtemel terapötik yaklaşımlarla ilgili

çalışmalarda tercih edilen modellerden biridir (7,8). Sinir crush hasarını tercih etmemizin sebebi uygulanmasının göreceli olarak kolay olmasıdır.

Yaşamın öncüsü olan kök hücreler eski yazılarda karşımıza botanik ile ilgili bir terim olarak çıksa da ünlü patolog Rudolph Virchow'un dediği gibi her hücre kendine benzeyen bir başka hücreden meydana gelir (9). Kök hücre nakli son zamanlarda nörodejenerasyona karşı bir ilgi alanı haline gelmiştir. Sinir kök hücrelerinin ya da kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin (Kİ-MKH) lokal implantasyonu; trofik faktör sekresyonu, hücre dışı matriks molekülünün sentezi, mikro çevre stabilizasyonu ve immün modülasyon gibi periferik sinir rejenerasyon etkileri deneysel sinir aralığı modellerinde gösterilmiştir (5,6).

Göbek kordonunun kolay elde edilebilir ve etik sınırlamalardan uzak olması nedeniyle bu oluşum gerek stroma hücreleri gerekse de arter ve ven duvarında yer alan çeşitli hücrelerin kök hücre özelliklerinin irdelenmesi amacıyla birçok araştırmaya konu olmuştur. Tip 1 MHC (major histocompatibility complex) molekülleri olan HLA-A (human leukocyte antigen A), HLA-B (human leukocyte antigen B), HLA-C (human leukocyte antigen C) barındırırlarken; tip 2 MHC molekülü olan HLA-DR (human leukocyte antigen DR)'yi barındırmazlar. Böylece otolog ve allojenik hücre nakillerinde çoğunlukla red yanıtı oluşurmazlar. Göbek kordonundan elde edilen kök hücreler; SCID (Severe combined immunodeficiency) farelere verildikleri zaman embriyonik kök hücrelerin tersine teratom geliştirmezler, sıçan beynine verildiklerinde tümör oluşurmazlar ve en az 50 pasaj boyunca sabit karyotip sergilerler (9). Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücreler in-vitro ortamda sinir hücresine dönüşüm uyarısını aldığında nöron veya nöron öncüsü hücreye farklılaşmanın birçok yapısal özelliğini ((beta 3 tubulin, nöroflamin, GFAP (Glial fibrillary acidic protein), MAP2 (Microtubule-associated protein 2), NeuN (neuronal marker) ve nestin vb.)) kazanır (10). Bunlardan bazıları nörotrofik faktörler (GDNF (Glial derived nörotrofik factor), BDNF (brain derived nörotrofik factor)) salgılamaya başlar (9).

Kemik iliği, yağ dokusu, deri ve amniyotik sıvı gibi kolay erişilebilir kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler (MKH) periferik sinir rejenerasyonunun artırılmasında yüksek potansiyel gösterirler ve periferik sinir hasarı modelinde potansiyel uygulamalar için araştırılmaktadırlar. Kök hücre tedavileri, periferik sinir

hasarından sonra fonksiyonel düzelme sağlayabilmesine rağmen, sonuçların kapsamı hala sınırlıdır. MKH transplantasyonunun genel terapötik etkinliğini arttırmak için MKH'lerin terapötik hedeflere doğru yönelim yeteneğini arttırmak önemlidir (11). Kök hücrelerin yönlü bir kemotaktik etkiye sahip olduğunu ve bunun eritropetin tedavisi ile daha da geliştirilebileceği önerilmektedir (12). EPO, eritropoetik faktör rolüne ilaveten güçlü bir kemotaktik ajan olarak da bilinir. EPO'nun, böbrek ve kalp gibi akut yaralanma geçiren organların mikro ortamına kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin yönlü göçünü uyardığı bildirilmiştir (13,14). Pek çok çalışma, EPO'nun periferik sinir iyileşmesini artırdığını göstermektedir. Michael ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, EPO'nun apoptozu inhibe etmesi, oksidatif hasara karşı koruması ve yaralanmadan sonra anjiyogenezi teşvik etmesine ek olarak Schwann hücreleri üzerindeki etkisiyle aksonal gelişimi uyardığı düşünülmektedir (15).

Bu sebeplerle mevcut çalışmada, doğumla birlikte bebek eşi de denilen insan göbek kordonundan elde edilebilen kök hücreler çoğaltılarak ve Rekombinant Human Eritropoetin (rhEPO) ile birlikte ve tek başlarına uygulanarak crush hasar oluşturduğumuz siyatik sinirlerde hasarın iyileşmesine olan etkilerini karşılaştırmayı amaçladık. Elde edilecek sonuçlarla siyatik sinir hasarının rejenerasyon kapasitesinin artırılması ve böylece yaşam kalitesinin yükseltilmesinde klinik tedavilere yardımcı olacak yeni bilgilerin ortaya konmasını sağlayacağını düşünmekteyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

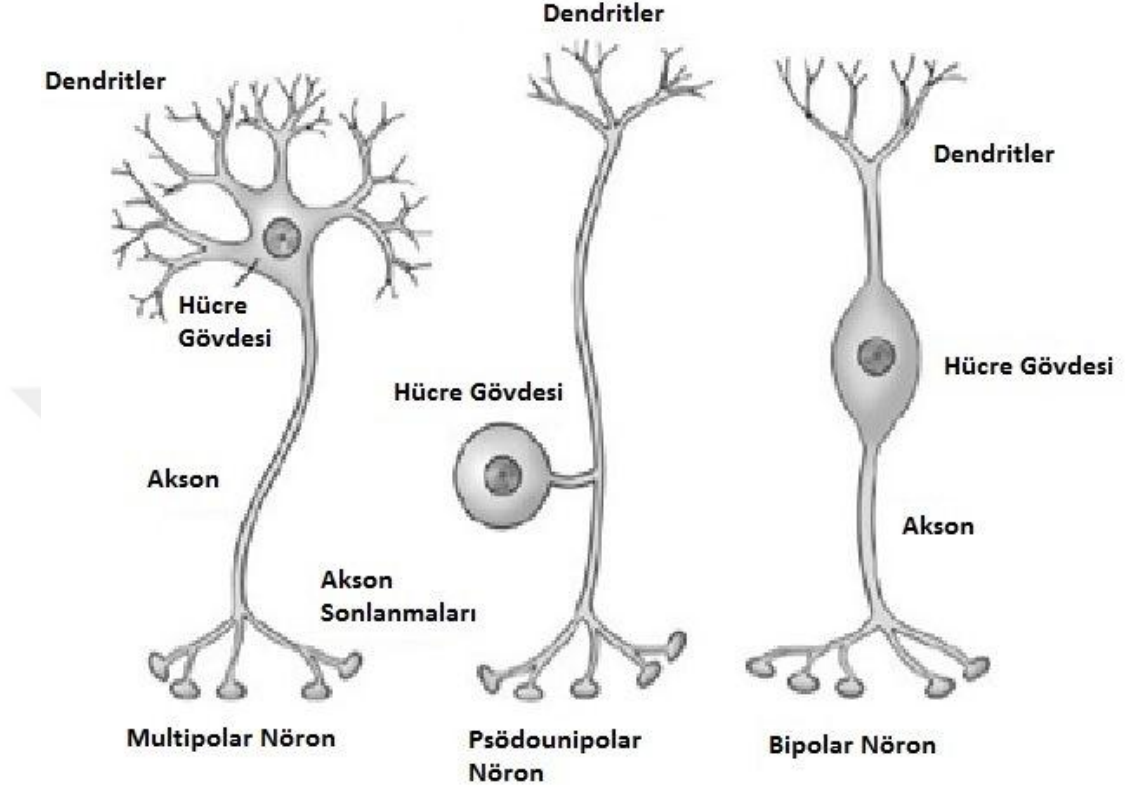
### 2.1. SİNİR SİSTEMİ

Vücudun, organ ve organlara ait iç uyaranları ile dış kısmında meydana gelen ve/veya süreklilik arz eden bütün uyarılarının algılanması, düzenlenmesi, iletilmesi ve yanıt vermesini sağlar. Nöron ve destek hücrelerinden oluşur. Sinir sistemi, fonksiyonel olarak; somatik sinir sistemi (SSS) ve otonomik sinir sistemi (OSS) diye ikiye ayrılırken, anatomik olarak da; merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olarak ikiye ayrılır (16) .

#### 2.1.1. Nöron

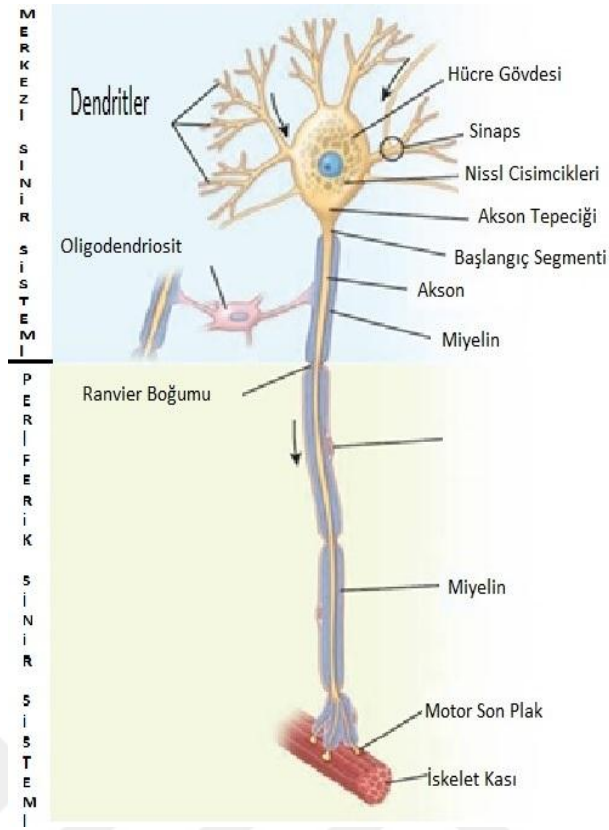
Sinir sisteminin yapısal ve fonksiyonel en küçük birimine nöron denir. Uyarıları almak, iletmek, hücresel aktiviteleri başlatmak, nörotransmitterleri salgılamaktan sorumludurlar. Gövde, akson ve dendritlerden oluşur. Nöron gövdesi, dendritleri ve aksonun proksimal kısmı MSS içinde yer alır. Akson MSS'yi terk eder ve PSS'de bir periferik sinirin parçası olarak efektörlere ilerler. MSS'de miyelin oligodendrosit tarafından yapılır ve oligodendrositin bir parçasıdır. PSS'de ise Schwann hücresi tarafından yapılır ve Schwann hücresinin bir parçasıdır. Nöronlar vücutta farklı şekil ve büyüklükte olmakla birlikte 3 genel kategoriye ayrılırlar. Bunlar duyuşal, motor ve ara nöronlardır. Reseptörlerden gelen impulsları MSS'ye ileten nöronlara duyuşal nöronlar denir. Somatik olan afferent lifler vücut yüzeyindeki ağrı, ısı, temas ve basınç duyuları ile vücuttaki kas, tendon gibi organlardan ağrı ve propriyosepsiyon duyularını alırlar ve beyin ile vücudun uyumunu sağlarlar. Visseral afferent lifler ise iç organlar, müköz membranlar, bezler ve kan damarlarındaki ağrı ve diğer duyuları

iletir. Nöronlar anatomik olarak hücre gövdesinden çıkan uzantı sayısına göre; multipolar, bipolar ve psödounipolar şeklinde sınıflandırılır (Şekil 2.1) (16).



Şekil 2.1: Nöron anatomik sınıflaması (16)

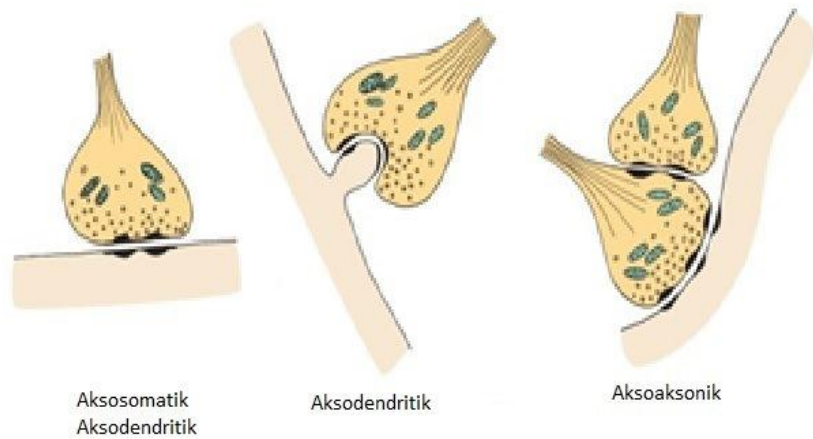
Multipolar nöronların bir aksonu, iki ya da daha fazla dendriti vardır. Motor ve inter nöronlar daha çok multipolardır. İmpulsların yönü dendritten hücre gövdesine oradan da aksona doğru ya da hücre gövdesinden aksona doğrudur. Psödounipolar nöronlarda tek bir uzantı vardır, bu uzantı hücre gövdesinin yakınında kısa bir süre sonra biri merkezi akson diğeri de periferik akson (dendrit olur) diye ikiye ayrılır. MSS'ye yakın olan duyu nöronların çoğu psödounipolar nöronlardır. Hücre gövdeleri arka kök ganglionlarında ve kranial sinir ganglionlarında yer almaktadır. Bipolar nöronlarda ise bir akson ve bir dendrit bulunur. Sıklıkla özel duyu (görme, işitme, koku, tat, denge) reseptörü ile ilişkilidir (16).



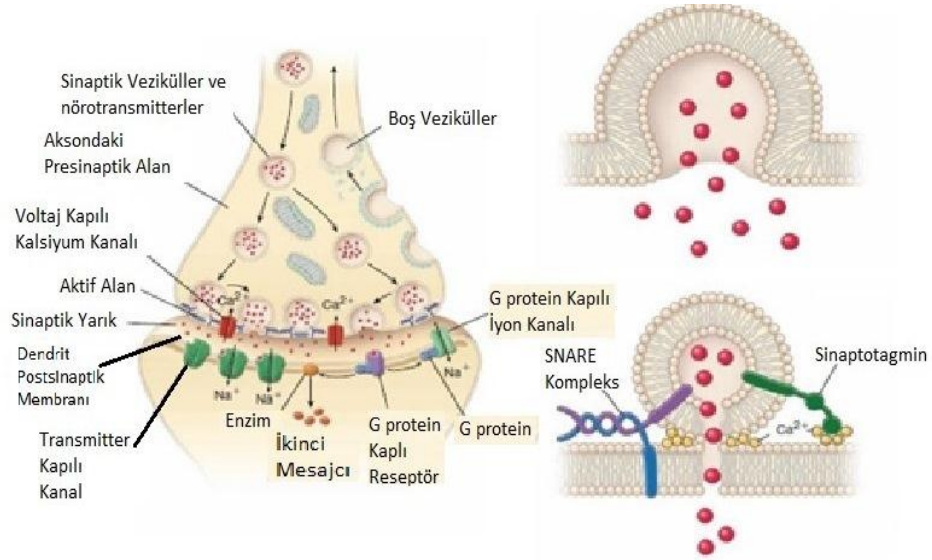
**Şekil 2.2: Nöron (16)**

Nöronların sitoplazmaları yuvarlak, oldukça büyük ve ökromatik belirgin tek bir çekirdek taşır. Perinükleer sitoplazmada protein sentez aktivitesi ile uyumlu bir özellik olarak bol miktarda granüllü endoplazmik redikulum (gER) ve serbest ribozomlar bulunur. Bunlar ışık mikroskobunda temel olarak koyu, tiyinin boyama ile de metakromatik boyanan Nissl cisimciği şeklinde görülürler. Akson tepeciğinde Nissl cisimcikleri yoktur. Akson nöronun tipine göre değişen uzunluk ve çapta silindirik bir yapıdır. Akson sitoplazması mitokondri, mikrotübül ve nörofilaman içerir. gER ve poliribozom içermemesi nedeniyle perikaryona (hücre gövdesine) bağımlıdır. Bazı büyük akson sonlanmaları hafıza süreçlerinde görev alabilecek proteinleri lokal olarak sentezleyebilmektedir, bu alanlara periaksoplazmik plaklar denilir (16). Genellikle standart bir yapıya sahip olan aksonların çapları 1-24  $\mu\text{m}$  arasında olabileceği gibi, uzunlukları da 50  $\mu\text{m}$ 'den birkaç metreye kadar uzayabilmektedir (17). Akson ile akson tepeciğin birleştiği bölgeye "başlangıç segmenti" denir. Başlangıç segmenti kısa, dar ve miyelinsiz bir bölgedir. Aksiyon potansiyelinin oluşturulduğu yerdir. Hücre gövdesinden çıkan uyarıları bir nörona ya da kas hücresi gibi efektör bir hücreye iletmektir. Aksonun çıktığı akson tepesi dışında, nöronun tüm yüzeyi çeşitli sinaptik terminallerle doludur. Akson

tepeciğinden sonra akson miyelinlenir, çapını artırır ve sonlanacağı hedef organa kadar aynı çapta devam eder. Nörotübüller ve nörofilamentler hücre gövdesinin iskeletini oluştururlar, dendrit ve akson uzantılarının içine kadar uzanırlar. Dendritler; diğer nöronlardan ya da dış ortamdan uyarıları alan reseptör uzantılarıdır. Daha geniş çaplı, hücre gövdesine yakın yerleşimli, miyelinsiz ve genelde konik uçlara sahiptirler. Oluşturdukları dendritik ağaç dallanmaları ile reseptör yüzeyini artırmış olurlar. Golgi cisimciği bulundurmazken hücre gövdesine ait diğer sitoplazma içeriği aynıdır (Şekil 2.2) (16). Nöronlar bölünmezler, bununla birlikte beynin bazı bölgelerinde bulunan nöronal kök hücreler, hasara uğramış bölgelere göç edip farklılaşarak hasarlı sinir hücrelerinin yerini alabilirler. Nöronlar, diğer nöronlar ve efektör hücrelerle sinapslar sayesinde ilişki kurmaktadır. Sinapslar morfolojik olarak aksodendritik, aksosomatik ve aksoaksonik sınıflandırıldığı gibi (Şekil 2.3) (16); nörotransmitterler aracılığıyla olan kimyasal sinapslar ve vertebrasız canlılarda iyon geçişi şeklindeki elektriksel sinapslar olarak da sınıflandırılmaktadır. Memelilerde ise elektriksel sinapslar düz kas ve kalp kası hücrelerindeki oluklu bağlantılarda görülür. Tipik kimyasal bir sinapsda presinaptik element, sinaptik yarık ve postsinaptik membran bulunmaktadır. Aksona gelen uyarılarla akson ucunda oluşan veziküller presinaptik düğüme gelerek presinaptik membran ile birleşip içeriğini sinaptik aralığa boşaltırlar. Sinaptik aralığa salınan kimyasal içerik postsinaptik membrandaki G proteini eşlenik reseptörlere veya trasnmmitter kapılı kanallara bağlanarak kimyasal ileti tamamlanmış olur (Şekil 2.4) (16).



**Şekil 2.3:** Sinaps morfolojik sınıflandırılması (16)



**Şekil 2.4: Kimyasal sinaps diyagramı (16)**

Sinapsda sinir impulsu oluşumundaki eksitator ya da inhibitör yanıtın tipini nörotransmitterin kimyasal yapısı belirlemektedir. Başlıca nörotransmitterler; asetilkolin, katekolaminler (norepinefrin, epinefrin, dopamin), serotonin, aminoasitler (  $\gamma$ -aminobutirik asit (GABA), glutamat, aspartat, glisin), nitrik oksit ve küçük peptidler (substans P, enkefaliler, vazoaaktif intestinal peptit, kolesistokinin, nörotensin, hipotalamik serbestleştirici hormonlar) dir. Asetilkolin, glutamin ve serotonin gibi eksitator nörotransmitterler transmitter kapılı  $\text{Na}^+$  kanallarını açarak içeri  $\text{Na}^+$  akışı ile postsinaptik membran voltajını tersine çevirerek eşik değere ulaşmasına (depolarizasyon) neden olur. Böylece aksiyon potansiyelinin başlaması sinir impulsu oluşmasını sağlar. GABA ya da glisin gibi inhibitör nörotransmitterlerin salıverilmesi transmitter kapılı  $\text{Cl}^-$  kanallarını açarak  $\text{Cl}^-$  'un hücre içine girmesine ve postsinaptik membranın hiperpolarize olmasına neden olarak aksiyon potansiyeli oluşumunu daha zor hale getirir. Sinaptik aralığa salınan nörotransmitterlerin etkisi parçalanarak ya da geri alınarak sonlandırılır (16).

### **Aksonal Transport Sistemleri**

Hücre gövdesinde sentezlenen maddeler aksonal transport sistemi ile akson ve dendritlere taşınır. Bilgi ve moleküllerin mikrotübül ve ara filamentler aracılığıyla anterograd ve retrograd transport olarak adlandırılan iki yönlü olarak taşındığı hücre içi haberleşme şeklidir. Moleküllerin taşınma hızına göre sadece anterograd transport sisteminde kullanılan yavaş transport sistemi ve her iki yönlü taşınmada da kullanılan hızlı transport sistemi olarak ikiye ayrılmaktadır. Vücuda giren toksin ve virüsler

retrograd transport yoluyla MSS'ye taşınmaktadır. ATPaz aktivitesi gösteren mikrotübül ilişkili dinein proteini retrograd transportta yer alırken, kinezin ise anterograd transportta yer almaktadır (16).

### **2.1.2. Sinir sisteminin destek hücreleri (Nöroglia)**

Nöron aralıklarına yerleşerek hem sinir hücre gövdesini hem de akson ve dendrit uzantılarını saran destek hücrelerine nöroglia denir. Bulundukları anatomik bölgelere göre PSS'de bulunanlara periferik nöroglia ve MSS'de bulunanlara ise merkezi nöroglia denir.

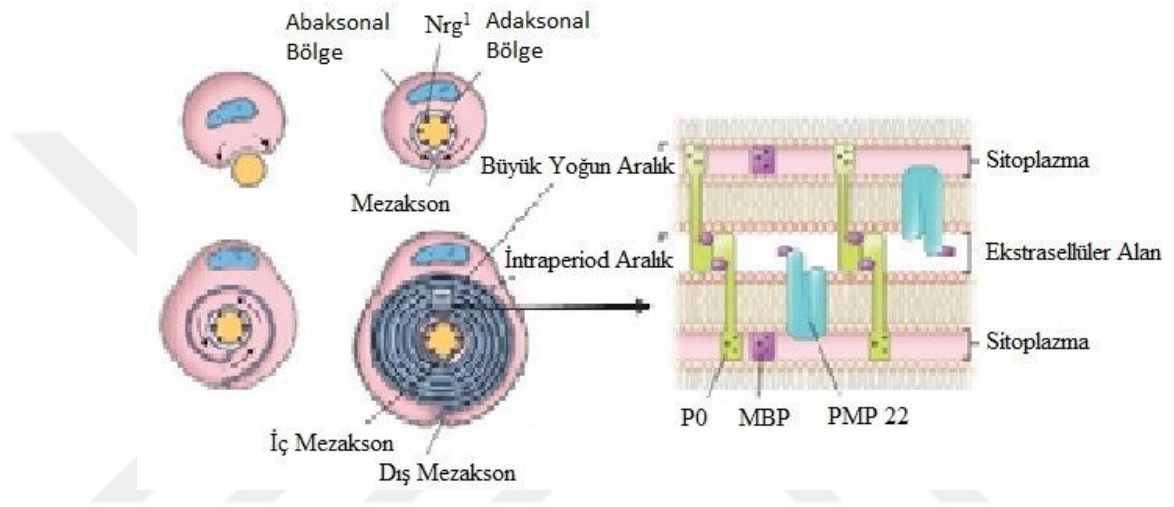
#### **Periferik nöroglia:**

Schwann hücreleri, satellit hücreleri ve spesifik organ ve dokularla ilişkili çeşitli diğer hücrelerdir. Motor son plakta yer alan terminal nöroglia, sindirim kanalı duvarındaki ganglionlarda bulunan enterik nöroglia ve retinadaki Müller hücreleri örnek verilebilir.

#### **Schwann hücreleri ve miyelin kılıf**

Periferik sinir sisteminde lipidce zengin miyelin kılıfı Schwann hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Nöral krista hücrelerinden gelişen Schwann hücrelerinin esas görevi miyelinli ve miyelinsiz sinir hücresi liflerini desteklemektir. Periferik sinirlerdeki yıkıntıların temizlenmesi ve aksonların yeniden büyümelerine yol gösterir. Miyelin kılıf sinir impulslarının hızlı iletimini sağlar. Miyelin kılıf kalınlığını aksonun çapı belirler. Yeni liflerin miyelin tabakası daha kalın olmaktadır. Ayrıca aynı çapa sahip motor nöronların miyelin tabakası duyu nöronlarına göre daha kalındır. Akson etrafındaki schwann hücre yoğunluğunu akson içindeki trofik faktörler belirler. Schwann hücresi aksonun etrafını oluk şeklinde sardığında ve hücre membranı polarize olduğunda miyelinizasyon başlar. Schwann hücresinin sinire temas eden kısmı adaksonal diye adlandırılırken dış ortama bakan kısım ise abaksonal olarak adlandırılır. Schwann hücresin abaksonal ve adaksonal membranlarının uç kısımları birbirine değerek mezaksonu oluşturur. Mezaksonun bir uzantısı aksonu spiral hareketlerle sararak konsantrik lameller şeklinde miyelin kılıf oluşur. Miyelin; PSS ve MSS'de benzer yapısal özellik gösterip, protein ve lipidden oluşur. PSS'de miyelin kılıf daha fazla sfingomiyelin ve glikoprotein içerir. Yapısında yer alan başlıca proteinler miyelin bazik protein (MBP), proteolipid

protein (PLP) ve protein 0 (P0)'dır. PLP yalnızca MSS'deki miyelin kılıfta bulunur (18). Kılıfın sıkılaşması P0, periferik miyelin proteini (PMP22), MBP gibi transmembran miyelin spesifik proteinlerin ekspresyonu ile aynı zamanda gerçekleşmektedir. P0 ve MBP elektriksel aktivite ile plazma membranının iç yaprakçıklarını karşılıklı olarak yaklaşıtırlar (Şekil 2.5). P0 transmembran bir glikoprotein olup karşı iki membran tabakası arasındaki kuvvet adezyonu sağlayan moleküldür. P0 kodlayan gen mutasyonlarında demiyelinizan hastalıkların geliştiği görülmüştür (16).



**Şekil 2.5:** Miyelin kılıf oluşumu (16)

Miyelin kılıf iyon akımını engelleyen mükemmel bir yalıtıcıdır. Membranın iyon akış direncini 5.000 kat artırırken, membran kapasitesini 50 kat düşürür (19). İki komşu Schwann hücresi arasında miyelin kılıf bulunmayan bu bağlantı noktalarına Ranvier nodu (düğümü) denir. İki Ranvier düğümü arasındaki miyelin bölgesine de internodal segment denir. Miyelin segmentlerini birbirinden ayıran sirküler ya da oblik aralıklarda bulunan küçük sitoplazma adacıkları Schmidt-Lantermann yarıkları diye adlandırılır. Schwann hücrelerinin bazal laminası, Ranvier boğumlarında da Schwann hücrelerinin dış tabakasını kesintiye uğramadan sarar. Ranvier boğumlarından kolayca geçen iyonlar, miyelinli liflerde miyelin kılıflarından geçemezler. Bu nedenle aksiyon potansiyeli ancak bu boğumlarda gelişir ve bir boğumdan diğerine sıçrayıcı (saltator) tipte iletim olur. Ranvier düğümündeki sinir elemanları buraya gelen akımı artırıcı özellikte olduğu için, bu bölgelerde mitokondri gibi enerji üreten hücre elemanlarının sayısı normal alanlara oranla 5 kat fazladır (20). Sinir lifi boyunca uzun aralarla sıçraması miyelinli liflerde iletim hızını

5-7 kat artırır. Ayrıca aksonda iyon kaybını 100 kat azaltarak enerjinin korunmasını sağlar. Seri impulslardan sonra membran sodyum ve potasyum farkını sağlamak için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyacaktır (21).

Sinir liflerinin neye göre miyelinlendiği belirsizdir. Miyelinsiz sinir lifleri de Schwann hücre sitoplazması tarafından sarılmıştır. Aksonlar hücre yüzeyindeki oluklara oluğun dudakları açık kalacak şekilde ya da kapanarak mezakson oluşturacak şekilde yerleşmişlerdir. Schwann hücreleri ve bazal lamina tabakası miyelinsiz sinirlerde de aynen miyelinli sinirlerde olduğu gibi dizilidir (22).

### **Satellit hücreler**

Ganglionlardaki nöronların hücre gövdeleri satellit hücresi adı verilen ve nöron gövdesi çevresinde kontrollü bir mikro çevre oluşmasına ve sürdürülmesine yardım eden küçük kübik hücrelerle çevrilidir. Fonksiyonel olarak elektriksel izolasyon sağlaması yönüyle Schwann hücresi ile analogdur. Ancak miyelin kılıf oluşturmaz.

### **Merkezi nöroglia:**

Astrositler, oligodendrositler, mikroglia ve ependim hücrelerinden oluşur. Gliyal hücrelerin ana görevi destekleyici hücreler olarak geçse de embriyolojik gelişim sırasında beyin ve spinal kord embriyonik nöral tüpten gelişirken, embriyonik gliyal hücreler nöral tüpün bütün kalınlığı boyunca radyal şekilde uzanarak nöronların beyindeki uygun yerlere doğru göçlerini yönlendirirler.

### **Astrositler**

Morfolojik olarak heterosit hücrelerdir. MSS hücrelerine fiziksel ve metabolik destek sağlarlar. Nöronları desteklemek ve aktivitelerini düzenlemenin yanı sıra beyin tüm kalınlığı boyunca uzanarak beyin gelişimi sırasında göç etmekte olan nöronlar için iskelet oluşturur. Gri cevherde bulunan protoplazmik ve beyaz cevherde daha fazla bulunan fibröz astrositler olmak üzere iki çeşidi vardır. Her iki tip astrositte gliyal fibriller asidik proteinden (GFAP) oluşan ara filament demetleri içermektedir. Kapillerlerin kan-beyin bariyerini oluşturan sıkı bağlantılarının sürdürülmesine yardımcı olur. Miyelinli sinirlerin açıkta kalan Ranvier düğümleri ve sinapslarını kaplarlar. Sinaptik aralıktaki fazla nörotransmitterleri uzaklaştırırlar. Protoplazmik astrositler piamaterin bazal laminasına uzantılarını uzatarak nispeten geçirgen

olmayan ve MSS'yi saran gliya limitansı oluşturlar. Beynin ekstrasellüler alanındaki potasyum konsantrasyonunu tamponlayarak nöronal aktiviteyi düzenler. Hasar durumunda çoğalarak yara iyileşme dokusu oluşturlar (16).

### **Oligodendrositler**

MSS'de nöronların elektriksel yalıtımını sağlayan miyelin kılıf oluşumunu ve devamlılığını sağlayan küçük hücrelerdir. MSS'de oligodendrositler birden fazla aksonun miyelizasyonunu aynı anda yapabilirken, PSS'de Schwann hücreleri tek bir aksonun miyelizasyonunu yapar. PSS'de P0 ve PMP-22 yerine, MSS'de proteolipid protein, miyelin oligodendrosit protein ve oligodendrosit miyelin glikoproteinleri benzer görevler yaparlar.

### **Mikroglia**

Küçük, koyu ve uzun nukleuslu, fagositöz özelliğine sahip hücrelerdir. Mononükleer fagositik sistemin üyesi olan mikroglia hücreleri hasar ve hastalık bölgelerinde proliferasyon olarak aktif fagositik (reaktif mikroglial hücreler) hale gelirler. Mikroglia prekürsör hücreleri MSS parankimine vasküler sistemden girerler.

### **Ependim hücreleri**

Beyin ventriküllerini ve spinal kordun santral kanalını (kanalis sentralis) döşeyen prizmatik hücrelerdir. Tek katlı kübik-prizmatik, apikal yüzeyinde silya, mikrovillus ve bağlantı kompleksleri bulunduran birbirlerine sıkıca bağlanmış hücrelerdir. Beyin omurilik sıvısının (BOS) sentezlendiği koroid pleksuslar modifiye ependim hücreleri ve bu hücrelerle ilişkili olan kapillerden meydana gelmektedir (16).

### **İmpuls iletimi**

Aksiyon potansiyeli, akson tepciğindeki başlangıç segmentinden başlayan akson boyunca yayılan membran depolarizasyon dalgasıdır. Başlangıç segmentinin membranında çok sayıda voltaj kapılı  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  kanalları bulunur. Voltaj kapılı  $\text{Na}^+$  kanalları gelen stimuluslara yanıt olarak açılır ve aksoplazmaya doğru olan  $\text{Na}^+$  akışı ile dinlenme durumundaki negatif membran potansiyeli (-70 mVolt) kısa bir süre için pozitif (+30mVolt) dönerek depolarizasyon gerçekleşir. Depolarizasyondan sonra voltaj kapılı  $\text{Na}^+$  kanalları kapanarak voltaj kapılı  $\text{K}^+$  kanalları açılır, böylece potasyum aksondan dışarı çıkarak membran dinlenme potansiyeline geri döner. Kısa

bir dinlenme periyodu olan refrakter periyoddan sonra nöron tekrar aksiyon potansiyeli oluşturabilir (16). Aksiyon potansiyeli oluşturan uyarılar için eşik değeri -59 mV'dur. Bu eşik değeri aşmayan potansiyeller aksiyon potansiyeli yaratmazken, eşik değerin üzerine çıkan potansiyellerin şiddeti ne kadar farklı olursa olsun aynı aksiyon potansiyelini oluşturur. Buna "hep ya da hiç" kuralı denir. Aksiyon potansiyeli bir kez oluşuktan sonra durdurulamaz ve komşu bölgeleri uyarak yayılır (23).

1937'de Erlanger, Grundfest ve Gasser periferik sinir liflerini çaplarına ve ileti hızlarına göre sınıflandırmışlardır. A grubu lifler, miyelinli somatik afferent ve efferent liflerden, B grubu lifler ise miyelinli otonomik preganglionik liflerden oluşur. C grubu miyelinsiz somatik ve visseral afferent lifler ile postganglionik lifler olup, en ince çaplı ve en yavaş iletim sağlayan liflerdir (Tablo 2.1) (23).

**Tablo 2.1:** Periferik sinirlerin çap ve ileti hızlarına göre sınıflandırılması (23)

| GRUP                                            | ÇAP ( $\mu$ ) | İLETİM HIZI (m/saniye) | FONKSİYON                                                                                      |
|-------------------------------------------------|---------------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A</b><br>( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) | 2.5–22        | 15–100                 | Miyelinli somatik afferent ve efferent                                                         |
| <b>B</b>                                        | 3             | 3–15                   | Miyelinli preganglionik otonomik ("visseral")                                                  |
| <b>C</b>                                        | 0.2–1.5       | 0.3–1.6                | Miyelinsiz somatik afferent ve otonomik postganglionik efferent (ağrı, pilomotor ve vazomotor) |

### 2.1.3. Somatik sinir sistemi

MSS ve PSS'nin somatik kısımlarından oluşur. Somatik SS bilinçli, istemli kontrol edilen fonksiyonları denetler ve düzenler. İç organlar, düz kaslar, kalp kası ve bezler dışında vücudun bütün kısımlarının duyu ve motor sinir dağılımını sağlar (16).

### 2.1.4. Otonomik sinir sistemi

MSS ve PSS'nin otonomik bölümlerinden oluşur. OSS, düz kasların, kalbin iletim sisteminin ve bezlerin efferent istemsiz motor uyarılarını sağlar. Ayrıca iç organların afferent duyu (ağrı ve otonomik refleksler) uyarılarını sağlar. OSS, kendi içinde sempatik ve parasempatik olarak ikiye ayrılır. OSS'nin üçüncü bölümü ise sindirim kanalını düzenleyen enterik bölümdür. Enterik bölüm, MSS ile parasempatik ve sempatik sinir lifleri aracılığıyla bağlantı kurabildiği gibi, bağımsız olarak da fonksiyon görebilir (16).

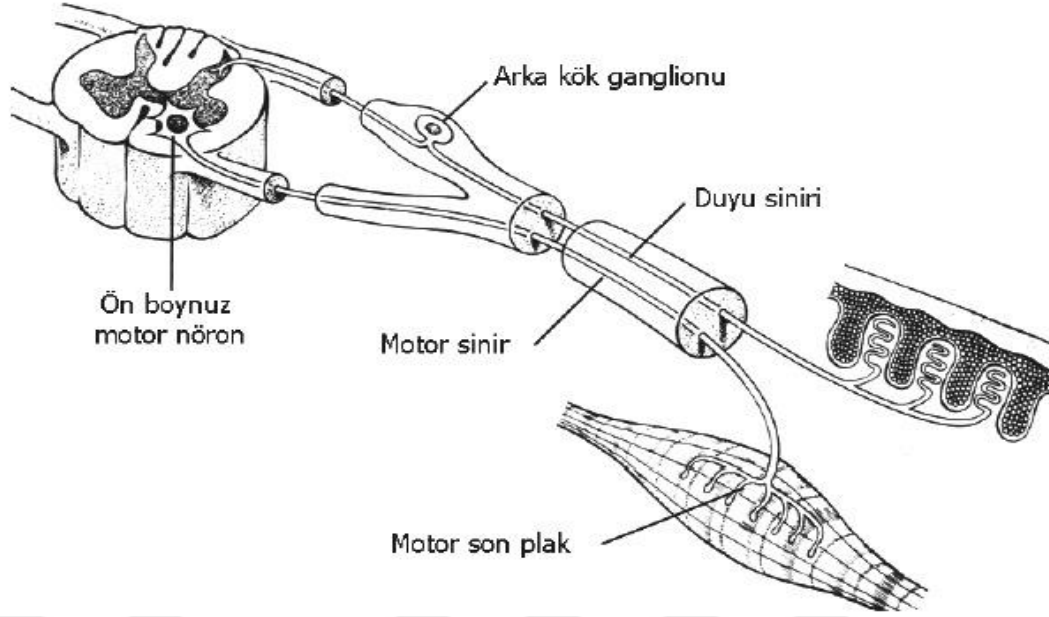
### **2.1.5. Merkezi sinir sistemi**

Kafatası içinde bulunan beyin ve vertebral kanal içinde yer alan medulla spinalisten (omurilik) oluşmaktadır (16). Yumuşak kıvamda olup gerçek anlamda bir bağ dokusu içermez. Akson ve miyelini yapan oligodendrositler beyaz maddeyi meydana getirirken, nöronların hücre gövdeleri, gliya hücreleri, akson ve dendritler de gri maddeyi oluşturur. Beyin ve beyincik de merkezde beyaz madde yer alırken gri madde dış kısmında bulunur. Omurilikte ise tam tersi durum mevcuttur. Kafatası beyni sert darbelere karşı korunaklı hale getirirken, meninksler de beyni sımsıkı sararak korur. Meninksler; pia, araknoid ve duramaterden oluşan bir zar tabakasıdır. Subaraknoid alanlarda ve ventrikül içerisinde bulunan BOS hem beyni korumada hem de beslenme ve atık madde uzaklaştırılmasında görevlidir. Şeffaf düşük dansiteli ve protein yönünden fakir bir sıvıdır.

### **2.1.6. Periferik sinir sistemi**

PSS; motor, duyu ve otonomik fonksiyonları olan, MSS ile hedef organlar arasında iki yönlü haberleşmeyi sağlayan bir sistemdir. Ana bileşenleri sinirler, ganglionlar ve sinir sonlanmalarıdır. MSS’de oluşturulan uyarıların hedef dokuya taşınmasını efferent lifler sağlarken, periferde oluşan uyarılar ise MSS’ye afferent liflerle taşınır. Şekil 2.6’da (24) gösterildiği gibi motor nöron gövdeleri medulla spinalisin ön (ventral) boynuzunda, duyu sinirlerin gövdeleri ise arka (dorsal) kökte bulunur. PSS arka kök ve ön boynuzdaki motor ve duyu sinirlerinin birleşmesi ile meydana gelir. Periferik sinir aksonlarının hücre gövdeleri MSS’de veya ganglionlarda yer alır. Ganglionlar nöron hücre gövdesi ve gliyal hücrelerin bağ dokusuyla çevrenmesi sonucu oluşur ve uyarıları dağıtır (25).

Sinirsel uyarıları alan duyu sinirler, bunları değerlendiren MSS ve yanıtları başlatan motor sinirler arasındaki etkileşimler nöral yolları oluşturur. Bu yollar refleks arkı olarak adlandırılan refleks hareketlere aracılık ederler. İnsanlarda çoğu duyu siniri direkt olarak beyne girmez. Bunun yerine sinapslar ile spinal korddaki motor nöronlarla bağlantı kurarlar (16).



**Şekil 2.6:** Periferik Sinir (24)

### 2.1.7. Periferik sinir histolojisi

Çevresinde koruyucu ve besleyici tabaka olarak bulunan bağ dokusu, periferik sinirin %21-81'ini meydana getirir. Bu oran eklem bölgelerinde daha yüksektir (26). Bağ dokusu epinöryum, perinöryum ve endonöryum adı verilen üç tabakadan oluşur. Periferik sinir lifleri ve Schwann hücreleri bir araya gelerek yoğun fasikül demetlerini oluştururlar. Sinir lifleri, retikulin lifleri ile fibroblastlarca üretilen kollajen lifleri ile birlikte mukopolisakkaritten oluşan temel maddenin içinde bulunurlar. Endonöryum her bir sinir lifini çevreleyen gevşek bağ dokusudur. Sinir liflerini bir araya getirerek fasikül ya da demet şeklinde bağlarlar. Temel madde, hücreler, kollajen ve retikulinin oluşturduğu yapıya endonöryum denir. Hematojen kaynaklı olduğu düşünülen makrofaj ve mast hücreleri endonöryum içerisinde bulunur (26). Yapısında elastin bulunmaz (27). Tip I kollajen içermesi sebebiyle gerilmeye karşı direçlidir. Sinirdeki endonöral damarlar, Schwann hücrelerini ve miyelini sarar. Dalgalı yapısı sayesinde uzamaya uyumludur. Endonöryumun içerdiği endonöral sıvı basıncı çevre dokulardaki basınca göre daha yüksek olması sebebiyle toksik maddelerin aksona girişini engeller. Perinöryum bir sinir demetini çevreleyen ve kan sinir bariyerinin oluşumuna katkıda bulunan özelleşmiş bağ dokusudur. Fasikülleri hafif bir basınç altında tutan perinöryum, sağlam olduğu sürece sinirin elastikiyetini ve bütünlüğünü korur. Kılıfla sarılmış olan sinir liflerinin iyonik çevrelerinin devamlılığını sağlar. Perinöryal hücreler; maddelerin aktif transportu

için gerekli olan reseptör, taşıyıcı ve enzimlere sahiptir. Yassı hücrelerce oluşturulan perinöryum sinirin çapına bağlı olarak birkaç hücre kalınlığında olabilir. Aktin filamenti içermesi sebebiyle kasılma yeteneği mevcuttur. Cerrahi olarak manipüle edilebilir en küçük sinir yapısına fasikül denir. Kişiden kişiye ve sinir boyunca farklılık gösteren fasikül sayıları birbirlerine paralel uzanmayan pleksiform yapısı nedeniyle trase boyunca trunkusun içindeki fasikül ve akson sayısı değişkenlik gösterir. Bundan dolayı da histolojik kesitlerde farklı morfolojik yapılar görülebilir (21).

Epinöryum periferik siniri çevreleyen ve sinir fasiküllerinin arasındaki boşlukları dolduran düzensiz sıkı bağ dokusudur. Eksternal epinöryum siniri mekanik etkilerden koruyan en dış tabaka, internal epinöryum ise perifasiküler ve interfasiküler bölgelerin arasını dolduran ve fasikülleri ayırarak birbiri üzerinde kaymasına izin veren tabakadır. Büyük sinirlerde epinöryumla ilişkili adipoz doku sıklıkla bulunmaktadır. Siniri besleyen kan damarları epinöryum içinde seyrederek, damarlar perinöryuma penetre olurken endonöryum seviyesindeki dokunun damarlanması zayıftır. Sinir kesilerinden sonra oluşan skar dokusunun çoğu yine epinöryumda bulunan fibroblastların proliferasyonundan kaynaklanır. Sinir lifinde perinöryumun cerrahi olarak diseke edilmesi sinir iletimini bozarken, epinöryumun diseke edilmesinin böyle olumsuz bir etkisi yoktur (28).

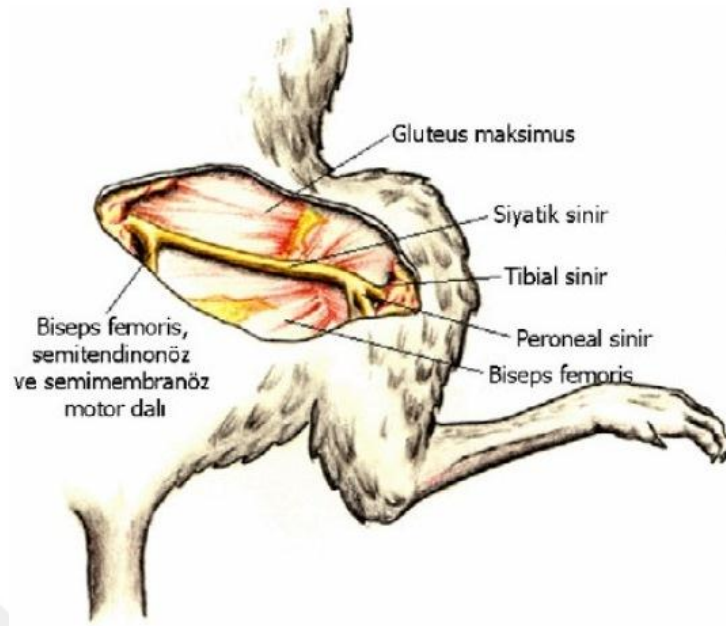
#### **2.1.8. Periferik sinir embriyolojisi**

Ektodermden gelişen nöral krest hücreleri nöral plağın katlanması ile nöral oluğun her iki kenarında birer hücre grubu olarak ortaya çıkar ve nöral tüp uzunluğu boyunca bu hücreler mevcuttur. Laterale göç eden nöral krest hücreleri spinal sinirlerin duyu ganglionlarını ve diğer hücre tiplerini oluştururlar. Gelişim devam ettikçe duyu ganglionlarının nöral blastlarından çıkan uzantıların ilki merkeze doğru büyüyerek nöral tüpün dorsal parçasına gömülürken, diğer uzantısı spinal kordun arka boynuzu veya marjinal tabakadan yukarı çıkarak beyin merkezlerine ulaşır. Yukarı çıkan bu uzantılara spinal sinirin dorsal duyu kökü denir. Perifere doğru büyüyen uzantılar ise ventral motor kök lifleri ile birleşerek spinal sinirin gövdesinin oluşumuna katılırlar. En sonunda nöral krest hücrelerinden köken alan duyu ganglionlarındaki nöroblastların dorsal kök nöronlarını meydana getirir. Nöral krest hücrelerinden, Schwann hücreleri, sempatetik nöroblastlar, pigment hücreleri, odontoblastlar, meninksler ve faringeal arkusların mezenkimi de oluşur (29) .

Motor sinir hücreleri, gelişimin 4. haftasında ortaya çıkar ve spinal kordun ön boynuz sinir hücrelerinden köken alır. Bir araya gelerek oluşan demetler "ventral sinir kökleri" olarak adlandırılırlar. Dorsal kök gangliyonlarındaki demetlerden de dorsal sinir kökleri oluşur. Dorsal gangliyonlardan çıkan merkezi çıkıntılar da demetler halinde arka boynuzların tersi yönünde spinal kord içine doğru büyürler. Ventral sinir kökleriyle birleşen distal çıkıntılar da spinal sinirleri oluştururlar. Hemen ardından da spinal sinir dorsal ve ventral primer ramuslara bölünür. Ventral primer ramuslar ekstremiteleri ve vücut ön duvarını innerve ederler ve major sinir pleksuslarını oluştururlar. Nöral krestten kaynaklanan Schwann hücreleri, periferik doğru göç ederek aksonların çevresini sararlar ve böylelikle nörolemma kılıfını oluştururlar. Fetal yaşamın 4. ayının başında sinir liflerinin çoğu, Schwann hücresi membranının akson üzerinde birçok defa kıvrılması sonucu oluşan miyelinin birikmesiyle beyazımsı bir görünüme bürünürler (29). Spinal kord içindeki sinir liflerinin miyelinizasyonu intrauterin 4. ayda başlasa da beyin merkezlerinden spinal korda inen motor liflerin bazıları miyelinizasyonunu ancak doğumdan sonraki 1. yılda tamamlar (30).

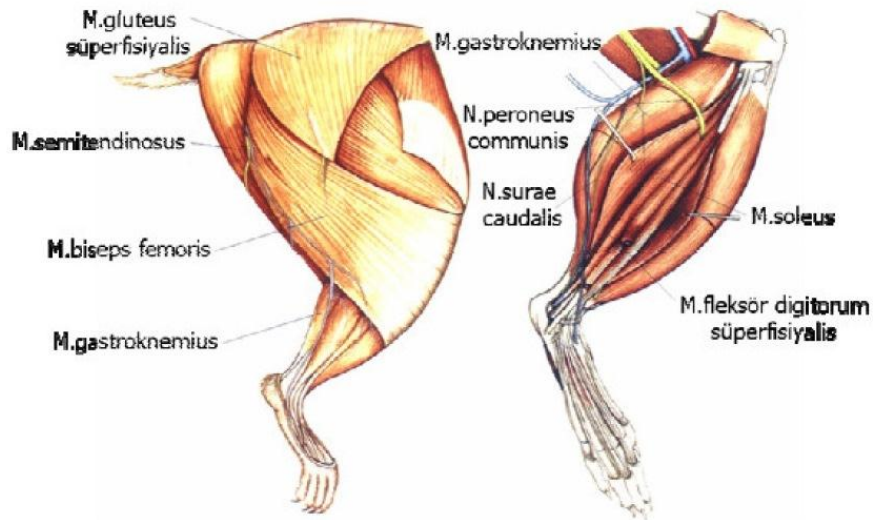
#### **2.1.9. Sıçan siyatik siniri**

Memeli hayvanlar içinde, sıçan siyatik siniri, elektron mikroskopi düzeyinde dahi hücresel özellikler açısından insan sinir dokusundan ayırt edilemeyen temini kolay bir sinir dokusudur (31). Sıçan siyatik siniri L3 (az bir sinir demeti), L4, L5 ve L6 dan az bir lif demetinin katılması ile oluşur. S1'den de bir miktar sinir lifi katılabilir. Siyatik sinir çapı 0,9 – 1,1 mm arasındadır. Pelvisin içerisine geldiğinde siyatik sinir adını alıp, iskiyumun dorsal kenarı ile kuyruk sokumu arasındaki derin olukta ilerler ve siyatik çentikten çıktıktan sonra piriform kasın ventralinde seyrederek. Sırt derisinin bir kısmını ve arka bacak kaslarının tamamına yakını inerve eden siyatik sinirin ana gövdesi piriformis kas seviyesinin 1-2 mm aşağısında kuadratus femoris kasının üzerinden ilerleyerek abduktör femoris fasyasının üzerinde oblik olarak bacağı doğru uzanır. Piriformis hizasında siyatik sinirin ana gövdesiyle birlikte çıkan ince bir dal ventrale doğru kuadratus femorisin altından geçer ve biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kaslarının motor inervasyonunu sağlar (Şekil 2.7) (32).



**Şekil 2.7:** Sıçan Siyatik Sinir Anatomisi (32)

Siyatik sinirin fleksör kas grubuna verdiği motor dal ile terminal dallanma noktası arasındaki mesafe yaklaşık 2 cm uzunluğundadır (33). Siyatik sinir, diz eklemi hizasının yaklaşık yarım santimetre üzerinde ventrale doğru seyreden kalın tibial sinir ve dorsale doğru seyreden ince peroneal (fibular) sinir dallarına ayrılır (Şekil 2.8) (32).



**Şekil 2.8:** Sıçan arka bacağının kas, sinir ve damar yapıları (32)

Peroneal sinir siyatik sinirden ayrıldıktan sonra aşağıya doğru gastroknemiusun lateral karnını ve derin parmak fleksörlerini çaprazlayarak ilk önce daha ince olan peroneus longus dalını verir ve daha sonra yüzeysel ve derin peroneal sinirlere

ayrılarak sonlanır. Yüzeyel dal, peroneus longus ve brevis kaslarını ve parmak ekstansörlerini inerve edip aynı zamanda ayak sırtı ve parmakların bir bölümünün duyusunu alır. Derin dal ise tibialis anterior ve uzun parmak ekstansörlerini inerve ederek ikinci parmak arası bölgesine ulaşır. Ventrale uzanan tibial sinir ise, sural sinir olarak ilk dalını ayırma noktasının 1-2 mm proksimalinde popliteaya girmeden hemen önce gastroknemiusun iki başı arasında vererek plantaris, soleus, gastroknemiuslar, fleksör hallucis longus, fleksör digitorum longus ve tibialis posteriorları inerve eder. Bu dalları verdikten sonra ayak bileğinin üzerinde lateral ve medial plantar sinirlere ayrılarak sonlanır (32).

#### **2.1.10. Nöronların hasara yanıtı**

Nöronal hasar; aksonal dejenerasyon ve nöral rejenerasyon denen karmaşık olayları başlatır. Bu karmaşık olayda nöronlar, Schwann hücreleri, oligodendrositler, makrofajlar ve mikroglialar rol alır. PSS’de aksonal rejenerasyon hızla olurken, MSS’de genellikle rejenere olamamaktadırlar. Bunun sebebi kan beyin bariyerinden yeterince geçemeyen makrofajlardır, ayrıca oligodendrositler ve mikroglia hücrelerinin miyelin yıkıntılarını hızla ortamdaki uzaklaştıramamalarıdır. Çünkü miyelin yıkıntıları akson rejenerasyon inhibitörleri içermektedir. Periferik sinir yaralanması mekanik, kimyasal ve termal sebeplerle oluşabilir. En sık yaralanma nedeni travmadır. Hasarlanan periferik sinirin tüm lifleri aynı derecede yaralanabileceği gibi farklı derecede yaralanmalar da görülebilir. Periferik sinir hasarı sonrası iyileşmenin zamanı ve başarısı yaralanmanın derecesine bağlıdır. İlk kez 1941 yılında Cohen tarafından önerilen ve 1943 yılında Seddon tarafından bildirilen mikroskopik değişiklikler ve hastanın kliniğine bağlı olarak periferik sinir hasarı sınıflaması yapılmıştır. Bu sınıflamaya göre; nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olmak üzere 3’e ayrılmıştır (34).

#### **Nöropraksi**

En hafif yaralanma tipi olup, tuzak nöropatilerde görülür, geçici semptomları vardır, yaralanma yerinde iletim kesintiye uğrarken, proksimal ve distalinde iletim normaldir. Sinir bütünlüğü korunmuştur. Kendiliğinden düzelir, konservatif tedavi yeterlidir.

#### **Aksonotmezis**

Sinirin epinöryum ve perinöryumu korunurken akson ve çevresindeki miyelin kılıfda total kesi mevcuttur. Trafik kazası, akut ezilme ve kronik kompresyon gibi sık

nedenleri vardır. Yaralanma noktasının distalinde akson ve miyelinde Wallerian dejenerasyon gerçekleşir. Sinir çevresindeki hasarlanmamış mezenkimal doku aksonların filizlenmesine kılavuzluk etmesi nedeniyle iyileşme oranı yüksektir.

### **Nörotmezis**

Sinirin tamamen kopması ya da akson iyileşmesini engelleyecek şekilde fibröz dokunun oluşmasını tanımlar. Aksonların yeniden uzaması için kılavuzluk edecek mezenkimal doku olmaması sebebiyle cerrahi tamir yapılmazsa iyileşme imkansızdır (35; 36).

Akut yaralanmaların sınıflandırılmasında bu sınıflama günümüzde hala geçerliliğini korumaktadır (37). Sunderland tarafından ise sinir hasarı 1'den 5'e kadar derecelendirilmiş, Mackinnon ise 6.dereceyi ekleyerek modifiye etmiştir.

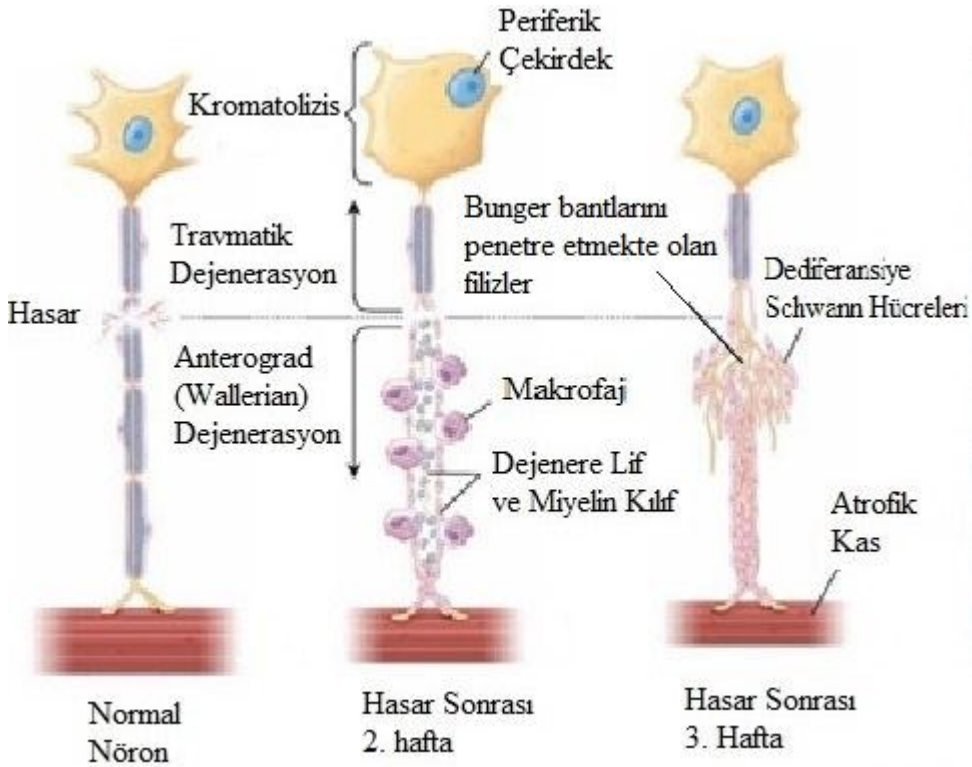
### **Sunderland sınıflaması**

- a. Birinci derece; Seddon'ın sınıflandırmasında nöropraksi ile eş değerdir.
- b. İkinci derece; Seddon'ın sınıflandırmasında aksonotmezis karşılığıdır.
- c. Üçüncü derece; aksonlarda bozulma ve kısmi endonöryum hasarı vardır ve Seddon'ın sınıflandırmasında aksonotmezis ile nörotmezis arasında yer alır. Kronik kompresyon, akut ezilme ya da gerilme sonucunda oluşabilir. Endonöryum ve Schwann hücrelerinin bazal laminaları hasarlıdır. Perinöryum intaktır, gelişmekte olan filizlenmeler endonöryum ve Schwann hücrelerinin hasarlı olması yüzünden oluşan skar dokusu boyunca ilerlemesi zordur. Tam olarak rejenere olamayan sinir liflerine veya rejenere olan sinir liflerinin yanlış sinir uçlarıyla eşleşmesine sebep olabilir. Bu tip hasarda iyileşme fonksiyonel olarak tam olmayabilir. Rejenere olan sinir liflerinin büyüme hızı ikinci dereceye (1-2 mm/ gün) benzerdir. Fakat skar dokusu olduğu için büyüme hızı buna bağlı olarak daha yavaş olmaktadır. Dördüncü ve beşinci derece Sunderland; Seddon'ın nörotmezisi olarak değerlendirilmiştir (38).
- d. Dördüncü derece; Epinöryum hariç sinirin tüm bölümleri hasarlanmıştır. En sık sebepleri esneme ve akut ezilmedir. İleri derecede sinir içindeki skarlaşma sinir liflerinin yeniden büyümesini kısıtlar. Üç ayın sonunda birinci, ikinci ve üçüncü derece hasarlanmadaki iyileşme bulguları gelişmezse bu yaralanma dördüncü derece kabul edilir, cerrahi müdahale gerekmektedir (38).
- e. Beşinci derece; Sinirin tamamı kopmuştur. Cerrahi tedavi olmaksızın iyileşme mümkün değildir (39).

- f. Altıncı derece; Yakın zamanda eklenmiştir (40). Mikst tip yaralanmadır ve bazı fasiküller veya liflerin farklı bölgelerinde birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü veya beşinci derecede hasar olabilir.

### Dejenerasyon

Hasarlanan sinirin distalinde aksonal transportun kesilmesi sonucu dejenerasyon gelişir. Akson hasar bölgesinin distalinde kalan kısımda anterograd (Wallerian) dejenerasyon gelişir. İlk hasar belirtileri 8-24 saat sonra akson şişmesi ve disintegrasyondur. Mikrotübüller, nörofilamentler ve diğer hücre iskeleti komponentleri parçalanarak hücre iskeleti yıkılır ve 'aksonal hücre iskeletinin granüler disintegrasyonu' adını alan akson fragmentasyonu gelişir. Nörofilamanlar ve mikrotübüller sitoplazmada görülmez ve yerini amorf granüler sitoplazmik materyal alır. PSS'de akson temaslarının kaybolması Schwann hücrelerinde dediferansiasyona neden olarak miyelin kılıfın yıkımına neden olur ve miyelin ovoidler oluşur. Schwann hücreleri güçlü proliferasyon stimülatörleri olan gliyal büyüme faktörlerinin (GGF) üretimini artırır ve salgılar. GGF etkisi ile Schwann hücreleri bölünerek eksteral lamina boyunca bir hat halinde dizilirler. Hasar bölgesinin distalindeki aksonal uzantı fagositozla ortadan kaldırıldığı için Schwann hücrelerinin düzenlediği lümen boş tüp benzeri bir görünüm alır (16).



Şekil 2.9: Akson dejenerasyonu (16)

Miyelin yıkıntılarının hasar bölgesinden temizlenmesindeki en önemli hücre monosit kaynaklı makrofajlardır. Makrofajlar olay yerine gelene kadar miyelin yıkıntılarını Schwann hücreleri uzaklaştırmaktadır. Periferik sinirde az sayıda bulunan yerleşik makrofajlar hasar oluştuğunda sinir hasar bölgesine göç edip proliferer olurken asıl yıkıntıların temizlenmesi kan-sinir bariyeri bozulduğu için kan dolaşımından göç eden monosit kaynaklı makrofajlarca gerçekleştirilir. Debris birkaç hafta içerisinde ortadan kaldırıldıktan sonra makrofajlar vasküler alana göç ederler. Periferik sinirlerde miyelinin uzaklaştırılması 2 hafta içinde tamamlanır. Aksonal rejenerasyon inkomplet ise önceden aksonun yer aldığı alan kollajen ile doldurulur (16).

Hasarlanmış sinirin proksimalinde retrograd olarak gerçekleşen dejenerasyona travmatik dejenerasyon denir. Histolojik olarak Wallerian dejenerasyona benzese de travmatik dejenerasyon hasarın şiddetine bağlıdır ve çoğunlukla bir ya da birkaç internodal segmenti kapsarken bazen birkaç Ranvier düğümünden daha proksimale uzanarak hücre gövdesinin ölümü ile sonuçlanabilir. Motor lif kesintiye uğradığında inerve ettiği kas da atrofiye uğrar. Hasarlanmış sinirin hücre gövdesi şişer, nükleus perifere kayar ve Nissl cisimcikleri kaybolarak kromatolizis gerçekleşir. Hasardan bir iki gün sonra başlayan kromatolizis yaklaşık iki haftada en yüksek seviyeye ulaşır. Yaşanan bu değişiklikler tahrip olan aksoplazma miktarı ile doğru orantılı olup harabiyet çok fazla ise hücrenin ölümü gerçekleşebilir (16).

### **Segmental demiyelinizasyon**

Schwann hücrelerinin miyelini koruma ve tamir görevindeki patolojik olaylara “demiyelinizasyon” denir. Schwann hücresi iki Ranvier düğüm arasındaki aksonun miyelizasyonunu yaptığı için hasarı ile sadece o akson üzerinde miyelin kaybı oluşur. Bu olay ile miyelin kayıp olurken akson korunur ve Schwann hücreleri miyelinizasyon için proliferer olur. Aksonal integral membran proteinleri Schwann hücrelerini bölünmeleri için uyarırlar. Schwann hücre proliferasyonu aksonal filizlenmenin hasarlı alana ulaşmasından çok önce gerçekleşir. Bu sebeple aksonal hasarlanma, Schwann hücre mitojenlerinin oluşumuna sebep olmaktadır. Schwann hücre proliferasyonunun ilk fazında miyelin üretilmezken ikinci fazda demiyelinizan segmentin tamiri için miyelin üretilir. Segmental demiyelinizasyon parafine gömülü kesitlerde değerlendirilemez. Bu oluşum plastik gömülü kesitlerde, glutaraldehid tespitli epoksi rezin preparatlarda ve frozen takip yöntemleriyle fark edilebilir. Remiyelinizasyon sonrası Ranvier boğumlarının arası (internod) farklı uzunlukta ve

miyelin kalınlıkları farklıdır. Birçok kronik demiyelinizan hastalıkta görülen soğan kabuğu şeklinin oluşmasına konsantrik tabakalanma şeklinde Schwann hücre proliferasyonu sebep olmaktadır (41).

### **Rejenerasyon**

Periferik sinirin rejenerasyonunda ilk olarak dediferansiye Schwann hücreleri bölünerek endonöryal tüp adı verilen bir seri hücresel bantlar oluştururlar. Miyelin ve akson yıkıntılarının bu tüpler içerisinden uzaklaştırılması ile tüpler kollabe olur. Uzunlamasına sütun şeklinde oluşan bu bandlara Bungner bandları denir. Bu bandlar rejenere olan sinir filizlerinin büyümesine rehberlik eder. Bu filizlerin distal kısmında aktin filamentlerinden zengin büyüme konisi gelişir. Eğer bir filiz Bungner bandı ile ilişkili hale gelirse yaklaşık 3mm/gün hızında büyüyerek Schwann hücresinin eksternal tabakaları arasında rejenere olur (Şekil 2.9) (16). Aksonal filizlerin Schwann hücreleri ile uygun teması sağlanmazsa düzensiz bir büyüme ve sonuçta travmatik nöroma ya da amputasyon nöroması denen aksonal uzantıların karmaşık bir şekilde uzadığı kitlesel bir tablo oluşur. Travmatik nöroma hasar bölgesinde serbestçe hareket eden ve palpasyonla ağrılı nodül olarak görülür (16).

### **2.2. KÖK HÜCRE**

Kendini yenileme, farklı hücrelere farklılaşma yetkinliği (potensi) ve klon oluşturma yeteneği (klonalite) (42) özelliklerini taşıyan hücrelere kök hücre denir. Bu özellikler embriyo kök hücreleri, fetüs ve bazı yetişkin kök hücrelerine uymakla birlikte, organizmanın yaşamı boyunca süren kök hücrelerin özelliklerinin tamamını açıklayamaz. En geçerli ortak özellikler aşağıdaki gibidir (9);

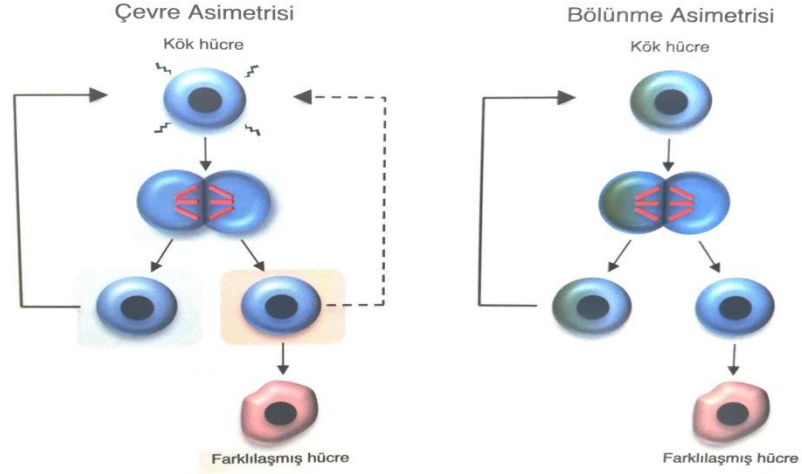
1. Dokularda az sayıda bulunurlar,
2. Yaşam boyu belli oranda bölünürler ve bölündükçe sayılarını korurlar,
3. Bölündüklerinde ortaya çıkan iki yavru hücreden en az birisi kök hücre olarak mevcut kök hücre havuzuna katılır,
4. Çok kez bölünerek geçici (transit) hücreleri oluştururlar ki, bu hücreler kısa süre içinde farklılaşma yoluna giderek dokuya özgü farklılaşmış hücreleri oluşturur.
5. Genellikle bölünme hızları yavaştır, ancak doku yaralanması sonrasında yoğun bölünme etkinliği kazanırlar. Eğer yaralanma ve doku kaybı çok

şiddetliyse, kendi hücre havuzlarının yenilenmesi için doğal bölünme hızlarını arttırmaları.

6. Dokuların en kalıcı ve en uzun süre yaşayan hücreleridir, organizmanın yaşamı boyunca varlıklarını korurlar, ancak yaşla birlikte sayıları azalır,
7. Büyüme faktörlerine ve sinyal moleküllerine oldukça duyarlıdırlar ve hızla yanıt verirler; TGF, Notch, Wnt ve Jak/ Stat gibi sinyal yollarını etkin bir biçimde kullanırlar.
8. Kök hücrelerin birçoğu hücre dönüşümünün G0 evresinde sessiz olarak bulunurlar. Embriyo kök hücreleri veya yetişkindeki çoğalan kök hücreler gibi bir grup hücre ise bu süreci çok hızlı geçerek hücre döngüsünü çok çabuk tamamlar.
9. Diğer hücrelere oranla farklı kromatin örüntüsüne sahiptirler. DNA metilazlar veya histon deasetilazların transkripsiyon baskılayıcıları tarafından veya Groucho ailesi proteinleri tarafından özgün DNA düzenlenmesi kök hücrelere özgün DNA özelliği kazandırır,
10. Tüm kök hücreler strese karşı dayanıklıdır. Bu özelliklerini çoklu ilaç direnci taşıyıcıları, özgün protein katlanma mekanizmaları, ubiquitin ve detoksifikasyon sistemleriyle başarırlar.

Kök hücre; “infinite/ölümsüz”, “sınırsız”, “sürekli”, “ileri derecede çoğalabilen” anlamlarına gelse de, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 40-60 kez bölündükten sonra ciddi anlamda yaşlandıkları ve diğer kök hücre özelliklerini de kaybettikleri gösterilmiştir (43).

Hücre yenilenmesi, eskiyen organellerin onarılması anlamında değil, kök hücre havuzunun yenilenmesi anlamındadır. Kök hücre havuzunun tükenmemesi için her bölünen kök hücrenin biri yedek kök hücreyi oluştururken, diğeri de sonraki aşama için farklılaşma yoluna gider. Bu tür bölünmeye ‘‘asimetrik hücre bölünmesi’’ denir. Asimetrik hücre bölünmesi; çevre asimetrisi ve bölünme asimetrisi şeklinde iki farklı yolla gerçekleşir (44) (Şekil 2.10).



**Şekil 2.10: Kök hücre farklılaşması (9)**

Çevre asimetrisinde çevre faktörleri belirleyici rol oynadığı için ortaya çıkan her iki hücre de kök hücre havuzuna katılabilir. Ancak bölünme asimetrisinde hücrenin yapısı ve-veya çevredeki bir başka hücre ile olan ilişkisi sonucunda sitoplazmadaki faktörlerin farklı dağılımıyla iki farklı yapıda hücre oluşur. Bunlardan birisi kök hücre olmayı sürdürürken diğeri farklılaşır. Kök hücrelerin birçoğu, ilk bölünmeden sonra hemen farklılaşma yoluna gitmezler. Bir kısmı kök hücre olarak kalmayı seçerken diğerk kısmı da bir dizi bölünme sürecine daha girer ve bunun sonucunda farklılaşmadan bölünen hücreler ortaya çıkar ve bunlara çoğalan geçici hücreler denir. Bu da kök hücrelerin organizmada idareli kullanıldığı anlamına gelir. Çoğalan geçici hücreler, belli bir sayıya ulaştıklarında, koşullar da uygunsa, farklılaşmaya giderler ve böylece sonuna kadar farklılaşmış hücelere dönüşürler (9).

Farklılaşma yetkinliği (potensi) bir kök hücrenin gelişim hiyerarşisinde hangi basamakta yer aldığı ile ilgili olup en tartışmalı konulardan birisidir. Kök hücrelerden köken alıp bir veya iki farklı hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip, sınırlı sayıda çoğalabilen hücreleri unipotent kök hücre yerine progenitor hücre olarak isimlendirmek daha doğrudur. Bir hücrenin farklılaşması ancak bir başka hücre ile kıyaslandığında anlam kazanır. Bir hücrenin farklılaşmasında rol oynayan en önemli faktörün epigenetik mekanizmalar olduğu biliniyor. Hücre farklılaşması üzerinde rol oynayan ve kalıtılabilen genom ötesi düzenlemeler hücrenin hangi farklılaşma durumunda olabileceğini belirler (9,45).

Farklılaşma, ileriye ve geriye farklılaşma şeklinde ele alınıp plastisite kavramından söz edilebilir. Bu farklılaşmanın ileri gitmesi daha olağan bir durum iken, farklılaşmaya başladığı noktaya kısmen veya tamamen geri dönmeye de 'geriye

farklılaşma-dediferansiyasyon' denir ve deneysel olarak elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücreler bu mekanizma ile gerçekleşir.

Klonalite kök hücrelerin önemli özelliklerindendir ve bir kök hücreden çok sayıda klon oluşturabilmeye denir. Kök hücreler klon oluşturma hızı ve klonun büyüklüğüne göre (içerdiği hücre sayısı) kıyaslanırlar. Primer kültürlerden kök hücre dizisi oluşturulmak amacıyla karışık hücre topluluğunu saf hücre topluluğuna dönüştürmek isteniyorsa ve hedeflenen kök hücrelerin de kendi başına çoğalma ve klon oluşturma yeteneğini korumak gerekir. Telomeraz enzim etkinliğinin artırılması ile elde edilecek sınırlı sayıda çoğalabilen, erken yaşlanan hücrelerin daha uzun süre yaşlanmadan kültürünü yapmak ve saklamak mümkün olabilir (9).

### **2.2.1. Kök hücre türleri**

İki haploid gametin (spermatozoon ve oosit) bir araya gelmesi ile zigot oluşur. Zigotun mitoz bölünmesi ile en yüksek farklılaşma kapasitesine sahip (totipotent) blastomerler oluşur. Kısa süre içinde blastomerler önce embriyoya daha sonra da tüm dokuların ortaya çıkmasına öncülük ederler. Blastokist evresindeki hücreler önce ara oluşumları daha sonra da kalıcı doku ve organları oluşturmak üzere çoğalır (proliferasyon), kararlanır (commitment, determination) ve farklılaşır (diferansiyasyon). Blastokistin iç hücre kitlesinde (İHK) yer alan hücreler embriyo kök hücresi (EKH) olarak isimlendirilen pluripotent özellikteki kök hücrelerdir. Pluripotent hücreler embriyon gövdesi dışına çıkarıldıklarında deneysel yolla farklılaşmaları ve dokudaki hücrelere benzer hücrelere dönüşebildikleri birçok kez gösterilmiştir. Ancak bu hücreler yüksek telomeraz aktivitesine sahip oldukları için kontrolsüz çoğalarak tümör hücrelerine dönüşebilirler (9). Yetişkinlerde hücre ve dokuların yenilenmesi ve onarımı yetişkin kök hücrelerce bazı dokularda devamlı ve hızlı şekilde gerçekleşir.

**Tablo 2.2: Kök hücre türleri (46)**

|     | <b>Hücre Türleri</b>                     | <b>Farklılanma Etkinliği</b> | <b>Farklılanma Yönü</b>                                    |
|-----|------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------|
| EKH | Morula aşamasındaki hücreler             | Totipotent                   | Embriyon ve embriyon dışı tabakalar                        |
| EKH | Blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesi | Pluripotent                  | Embriyon gövdesi (tüm somatik ve germ hücreleri)           |
| EKH | Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri | Pluripotent                  | Endoderm , mezoderm ve ektoderm                            |
| EKH | Ektoderm, endoderm ve mezoderm hücreleri | Pluripotent                  | Tüm somatik hücreler                                       |
| YKH | Özgün doku hücreleri                     | Multipotent                  | Hücresinin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla hücre |
| YKH | Bir dokuya yerleşik hücreler             | Unipotent                    | Bir hücre tipi                                             |

Gelişmekte olan organizmada ise fetüsten çocukluk dönemine kadar embriyo kök hücreleri bulunmamakla birlikte çeşitli organ ve dokularda gerektiğinde kendini çoğaltabilen, kararlanabilen, farklılaşabilen yetişkin kök hücreler veya dokuya özgü kök hücreler yer alır. Yetişkin kök hücreler deri epitelinde, bağırsak epitelinde ve kan hücrelerini yenileyen (hematopoetik) hücrelerde bulunur. Kök hücreleri sınıflandırırken organizmanın yaşam süreci içinde bulundukları döneme (embriyo, fetüs veya sonrası) ve köken verebileceği hücre türlerinin zenginliğine göre sınıflandırmak en doğru olanıdır (Tablo 2.2) (46).

Son yıllardaki onarımsal tıptaki gelişmelerle birlikte embriyo dışı dokular olan plasenta, amniyon zarı ve göbek kordonundan elde edilen kök hücreler, kök hücrelerin bir başka bölümünü oluşturmaktadır. Bu hücrelere fetüs kök hücreleri denir (9). Fetüs kök hücreleri çoğalma ve farklılaşma yetenekleri açısından yetişkin kök hücreleri ile embriyo kök hücreleri arasındadır. Bu hücrelerin en önemli özelliklerinden biri de doğum esnasında kolaylıkla, fetüse zarar vermeden ve etik problemlere yol açmadan elde edilebilir olmasıdır. Bu hücrelerin hem embriyo hem de yetişkin kök hücrelere ait yüzey işaretleyicilerini barındırdıkları ortaya konmuştur (10,47).

Erken embriyo gelişimini tamamlamış organizmalarda bulunan, hasarlanan dokuların yenilenmesinde görev alan kök hücreler yetişkin kök hücrelerdir (YKH). Somatik kök hücre veya dokuya özgü kök hücreler olarak da adlandırılır. Pluripotent embriyo kök hücreleri, ilkel cinsiyet hücreleri, nöral kista kök hücrelerinin bir bölümü ve embriyo dışı mezoderm kaynaklı bazı hücrelerin dışında kalan tüm kök hücrelere yetişkin kök hücreler diyebiliriz. En çok çalışma yapılan YKH tipleri; hematopoetik

kök hücreler (HKH), mezenkimal kök hücreler (MKH), nöral kök hücreler (NKH), bağırsak kök hücreleri ve endotel kök/öncü hücreleridir. Ayrıca kalp, karaciğer, akciğer, pankreas, göz, burun, kulak gibi organlarda yer alan parankim hücrelerinin köken aldığı kök hücreler bulunur. YKH; multipotent, oligopotent hatta unipotent özellikte olabilir. Bu yüzden YKH öncü kök hücreler olarak da algılanmaktadır. Öncü hücrelerden ayıran özelliği ise asimetrik hücre bölünme özelliğini taşımalarıdır. Bununla kök hücre havuzu yenilenmesi ve sayısının sabit bir düzeyde kalmasını sağlar (9).

### **Mezenkimal kök hücreler**

“Mezenkim” terimi epiblastın farklılaşmasından başlayarak embriyonun gelişmesinde ve fetüsün yaşamında önemli yer tutan, bağ dokusu yapısındaki dokulara verilen genel isimdir. Hematopoetik kök hücre (HKH)’nin keşfinden kısa süre sonra Friedenstein ve ark. farede kemik iliği stromasını bir başka dokuya naklettiklerinde kemik, yağ, kıkırdak ve retikulum hücrelerine dönüşebileceğini göstermişlerdir (48). Bu sebeple kemik iliğinde hematopoetik olmayan başka bir grup hücre olduğu düşünülmüş olup bu hücrelerin fibroblast öncüsü hücreler olduğu ileri sürülmüş ve fibroblast koloni oluşturan birim (colony-forming unit-fibroblast CFU-F) etkinliğiyle ölçülmüştür (49). MKH; plastik yüzeye yapışma, in-vitro olarak çoğalabilme özellikleri ile tanımlanmıştır. Ayrıca tek bir koloniden ayrıştırıldıklarında in-vitro çalışmalarda osteoblast, adiposit ve kondrosite farklılaştırıldığı gösterilmiştir (50). Multipotensi, kendini yenileme ve köklülük özelliği göstermeleri nedeniyle bu hücreler MKH olarak isimlendirilirler (51,52). 2008 uluslararası hücresel tedavi derneğine göre CD73, CD90, CD105 molekülleri temel belirteç olarak kabul edilmektedir. MKH’nin elde edilmesi ve tanımlanmasında; CD serisi bazı belirteçlerin yüksekliği, bazılarının ise yok denecek kadar azlığı veya yokluğu, plastik kültür yüzeyine yapışarak büyümeleri/çoğalmaları ve in-vitro olarak en az üç seriye farklılaştırılmaları altın standart olarak kabul edilmektedir (9).

Fetüs döneminde gelişip postnatal dönemde elde edilen dokulardan (örneğin göbek kordonu) ayrıştırılan MKH’nin koloni morfolojisi, farklılaşma yetisi ve gen ifadesi farklılık gösterir (53). Bu durum MKH’nin farklı anatomik ve gelişim dönemlerinden elde edilen hücrelerin tamamının aynı olmadığını göstermektedir. Bu özellikler bu hücrelere büyük bir plastisite ve tipik olarak “dokuya özgü kök hücre” tanımını

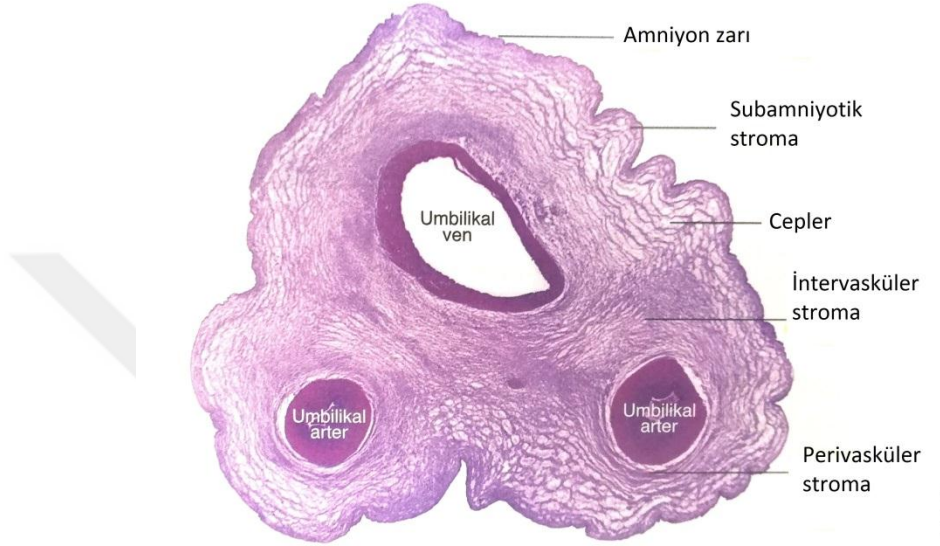
kazandırır. MKH insan vücudunun özellikle damardan zengin bağ dokusu içeren dokularında bulunsa da, kemik iliği, yağ dokusu göbek kordonu stromasından da elde edilmektedir (9).

#### **2.2.1.1. Göbek kordonu kaynaklı kök hücre**

Göbek kordonu; uzunluğu 50-60 cm, kalınlığı 1-2 cm olan yaklaşık 40 gr ağırlığında içinden iki arter ve bir ven geçen esnek sağlam yarı şeffaf görünümlü bir yapıdır. Dışı amnion zarı ile örtülü olup stroması Warton peltesi (jölesi) denilen embriyoya özgü müköz bağ dokusu yapısındadır. İçindeki arterler ve ven stroma içine gömülüdür, kendilerine ait belirgin bir adventisya tabakaları bulunmaz. Stroma dokusu damarsızdır ve histolojik olarak homojen görülür ancak son yıllarda yapılan çalışmalar farklı alanlardaki hücrelerin farklı çoğalma ve farklılaşma özelliklerinin olduğu gösterilerek stromayı en az 3 ayrı bölüme ayırmışlardır (54). Bu alanlar; subamniotik stroma, intervasküler stroma ve perivasküler stroma olarak adlandırılırlar (Şekil 2.11) (9). Tek katlı yassı-kübik epitel özelliğinde olan amniyon zarının altında kalan stromaya subamniyotik stroma adı verilir. Bu stromadaki hücrelerin diğer alanlardaki hücrelere göre daha az farklılaşmış ve çoğalma yeteneğinin de daha fazla olduğu belirlenmiştir (55). Ayrıca içeriğinde tip1, tip3 ve tip 6 kollajenlerce zengin, stroma hücresi bakımında fakir olup hücreler arası bol sıvı içeren bir ortamdır. Kordonun gerilme ve sıkışmalarında arterleri ve veni koruyucu yastıkçık görevi yapan sıvı dolu cepler subamniotik stromanın hemen altında bulunur.

Intervasküler stroma en çok alan kaplayan ve eskiden beri Warton jölesi olarak bilinen bölgedir (56). Bu alandaki hücreler miyofibroblast özellikteki uzun uzantıları olan hücrelerdir. Hücreler arasındaki kalın demetleri tip1 ve tip3 kollajen oluşturur. Warton jölesini kollajen eriten enzimlere ve birçok kuvvete karşı dayanıklı hale gelmesini tip3 kollajen sağlar. Stromada elastin bulunmaz. Vücuttaki glikozaminoglikan yoğunluğu en fazla göbek kordonunda yer alıp, %70'ini hyaluronik asit oluşturur. Hücreler arası matriks bozuklukları göbek kordonu anomalilerinin önemli bir kısmını oluşturur. Damarların etrafındaki stromada bulunan hücreler ve bu hücreler arasındaki madde perivasküler stromayı meydana getirir. Bu stromadaki hücreler daha dar ve küçük bir sitoplazmaya sahiptir. Özel yöntemlerle bu doku parçasını damar duvarından ve intervasküler stromadan ayırmak mümkündür. Böylece bu bölgeye ait hücrelerle oluşturulan bir kültür yapmak

mümkündür. Perivasküler stromadaki hücrelerin kemik hücrelerine dönüşme kabiliyeti daha yüksektir (57). Stroma hücrelerinin kök hücre özellikleri; göbek kordonu stromasındaki kök hücrelerin MKH tanımlamasına uyduğu ancak embriyo ve yetişkin kök hücrelerinin bazı özelliklerine de sahip olduğu gösterilmektedir (10). Multipotent mezenkimal stroma hücresi ve (GKS-MKH) göbek kordonu stroması mezenkimal kök hücresi olarak da isimlendirilebilir (9).



**Şekil 2.11:** İnsan göbek kordonu (9)

GKS-MKH'ler; sahip olduğu immun baskılayıcı, apoptozu engelleyici ve tümör baskılayıcı özellikler bakımından, diğer MKH'lerden daha üstün özelliklere sahip multipotent hücrelerdir. Her üç germ yaprağının türevlerine in vitro ortamda farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Tip 1 MHC molekülü olan HLA-A, HLA-B ve HLA-C yi barındırırken, tip 2 MHC molekülü olan HLA-DR'yi barındırmazlar. Bu sebeple hipoinmunojenik olduğu için otolog ve allojenik hücre nakillerinde çoğunlukla red yanıtı oluşturmazlar. SCID farelere verildiklerinde teratom ve tümör oluşturmazlar (EKH'nin tersine). Pasajlanırken en az elli pasaj boyunca karyotip değiştirmezler, bazı sitokin ve kemokinleri salgılayarak apoptozu engellerler. İn vitro koşullarda tümör hücrelerinin yaşamını durdururlar, invivo ortamda ise bazı tümör kitlelerini küçültürler (9).

Göbek kordonu embriyonel hayatın 12-13. gününde ekstraembriyonik mezodermin ileri gelişmesi ile ortaya çıkar. Mezenkim hücre serileri olan osteoblastlar, kondroblastlar ve adipositler üçlü serisine farklılaşmaları gösterilmiştir (10). Gelişim süreci açısından değerlendirildiğinde epiblasttan kaynaklanan embriyo dışı

mezodermin bir türevi olan GKS-MKH, Kİ-MKH'ye kıyasla daha ilkel, EKH'ye daha yakın konumda yer alır. GKS-MKH diğer birçok MKH'ye oranla daha fazla kök hücre ve germ hücresi belirteci içerir. Daha hızlı çoğalma özelliğine sahiptir (58). Telomeraz etkinlikleri yüksek olup bölünme sayıları 20-80 arasındadır. Kök hücre özelliklerini 9-10 pasaj sürdürürken Kİ-MKH'de genellikle daha erken pasajlarda sona erer (59).

MKH'lerde olan CD105, CD90 ve CD73 GKS-MKH'de de yüksek oranda mevcuttur. Hematopoetik ve endotel hücrelerinde bulunan ancak GKS-MKH'de bulunmayan CD45, CD34 ve CD31 belirteçleri kontrol edilerek bu oranın %1-2'yi geçmemesi gerekir. Bir hyaluronik asit reseptörü olan CD44'de GKS-MKH için pozitif belirteçtir. GKS-MKH sinir hücrelerine özellikle tirozin hidroksilaz enzimi içeren dopamin sentezleyen hücrelere dönüşebildiği bildirilmiştir (60). GKS-MKH in vitro ortamda sinir hücresine dönüşüm uyarısı aldığı anda;  $\beta$ 3 tubulin, nörofilamin, GFAP, MAP2, NeuN ve nestin gibi nöron ve nöron öncüsü hücrelere farklılaşmanın yapısal özelliklerini edinirler (10). Bu dönüşen hücrelerden bazıları (GDNF, BDNF gibi) nörotrofik faktörler salgılar (61). Sıçanda oluşturulan deneysel serebrovasküler tıkanıklık modelinde meydana gelen nörolojik sekel ve korteksdeki sinir etkinliğindeki artış yaklaşık 1 milyon GKS-MKH verilmesi ile sağlanmıştır (62). Bu hücrelerin tıkanma bölgesine giderek gliya, nöron ve endotel hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir. Sıçan retinasında meydana getirilen hasar sonrası verilen GKS-MKH'ler retinal fotoreseptörlerde iyileşmeyi IL-6 ve BDNF gibi salgılamış oldukları moleküllerle gerçekleştirmişlerdir (63). GKS-MKH'ler uzun kültür süresine gerek kalmadan çok sayıda hücreye ulaşılabilirdiği için yüksek kültür giderleri gerekmez. Kİ, yağ ve periferik kandan elde edilen kök hücrelere göre bir diğer üstünlüğü de plasenta engeli sebebi ile anne kaynaklı bakteri bulaşı ihtimali bulunmamaktadır. Ayrıca çok verimli bir şekilde dondurulup çözülebilmektedir (64).

### 2.3. ERİTROPOETİN

Eritropoetin (EPO), 34 kilodalton molekül ağırlığında glikoprotein yapısında bir hormon olup, kemik iliğindeki eritrosit öncülü hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve canlılığının korumasını sağlayarak eritrosit üretimini kontrol eder. EPO üretimi doku oksijenizasyonunun sağlanması yönünden çok önemlidir. Böbrek kortekslerindeki peritübüler hücrelerden üretilirken, intrauterin dönemde başlıca karaciğerden üretilir.

Yetişkin çağda bu oran yaklaşık %20'lere düşer. Ayrıca az miktarda kemik iliği, dalak, gastrointestinal sistem, kalp, akciğer, testis, overler ve santral sinir sisteminde de sentezlenir (65).

1985 yılında Jacobs ve arkadaşlarınca (66) aminoasit sıralaması belirlenmesi ile eritropoetin geni ve gen ekspresyonu yapılabilmiş ve rekombinant insan eritropoetini (rhEPO) klinik kullanıma girmiştir. Organ gelişimi ve anjiyogeneizde hayati bir rol oynadığı düşünülen Epo-Reseptörleri (EPO-R) intrauterin gelişim sırasında neredeyse tüm embriyonik dokularda görülmektedir. Molekül ağırlığının yüksek olması nedeniyle kan beyin bariyerini geçemezken hipokampus, kapsula interna, korteks ve orta beyinde ayrı bir parakrin EPO sistemi olduğu gösterilmiştir (67). EPO-R; kemik iliği, karaciğer, endotelyal hücreler, epikardiyum ve perikardiyum hücreleri, renal mezengial ve epitelyal hücreleri, pankreatik ada hücreleri, plasenta, beyin, retina, periferik sinirler, spinal kord, testis, akciğer, dalak gibi birçok dokuda bulunduğu gösterilmiştir (68). Hematopoetik olmayan dokularda eritropoetin reseptörlerinin saptanması ile EPO'nun sadece eritroid seri üretiminden sorumlu olmadığı ve değişik dokulara etki eden (pleiotrofik) ve doku koruyucu etkisi olan bir hormon olduğu hipotezi savunulmaya başlanmıştır (68). Eritropoietin nöroprotektif/nörorejeneratif etkinliğini; "apoptozisi inhibe ederek, antiinflamatuvar ve anti-oksidan etki göstererek, kan-beyin bariyerini onararak, nöral kök hücrelerin mobilizasyonu ve proliferasyonu sağlayarak, hipoksi ilişkili glutamat toksisitesinden koruyup, nörogenezis ve angiogenesisi uyatarak, nöral hücreleri hipoglisemiye karşı koruyarak" gösterir (69).

EPO ve Epo-R genleri baskılanan fare embriyolarında nöroblastların göçünün etkilendiği ve nöral tüp defektlerinin geliştiğini bildirmiştir (70). Ayrıca nöronal öncül hücrelerin azalması ve apoptozun artması ile beyin gelişiminin bozulduğu gösterilmiştir (68). EPO, EPO-R üzerinden Janus kinase 2 (JAK2) moleküllerini aktive ederek nöronal sağkalım ve korumada görev alır (71). Çekirdekte transkripsiyon faktörü olarak hareket eder, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ve B-cell lymphoma extra large (Bcl-xL) anti apoptotik genlerin ifadesini sağlar ve hücrenin apoptoza girmesini engeller. Pro-apoptotik bir molekül olan Bcl-2 associated X (Bax)'in, Bcl/Bax oranını düzenler (72). EPO ve EPO-R travma sonrası arttığı, sağlam nöron ve glial hücrelerde ise daha düşük olduğu bir çok çalışma bulguları ile gösterilmiştir (73). Yapılan çalışmalarda sistemik rh-EPO uygulamalarının dorsal root gangliyonlarında apoptozisi azalttığı, periferik sinir hasarı sonrası mekanik

allodininin düzelmesini desteklediği ve nöropatik ağrının tedavisinde de etkili olabileceği gösterilmiştir (74). EPO'nun yalnızca anti apoptotik özelliğinin olmadığını, aynı zamanda aksonal dejenerasyona karşı da koruma sağladığını göstermişlerdir. Aksonal hasar sonrası Schwann hücreleri tarafından salınan nitrik oksitin EPO üretimini uyardığı bulunmuştur (75). Spinal kord hasarı yapılan çalışmada travma sonrası EPO uygulanan gruplarda travmatik nötrofil infiltrasyonunu gösteren ve 24. saatte belirgin olarak artan myeloperoksidaz seviyesinde azalma ve kaspaz-3 enzim aktivitesinde düşüş gösterilmiştir (76).



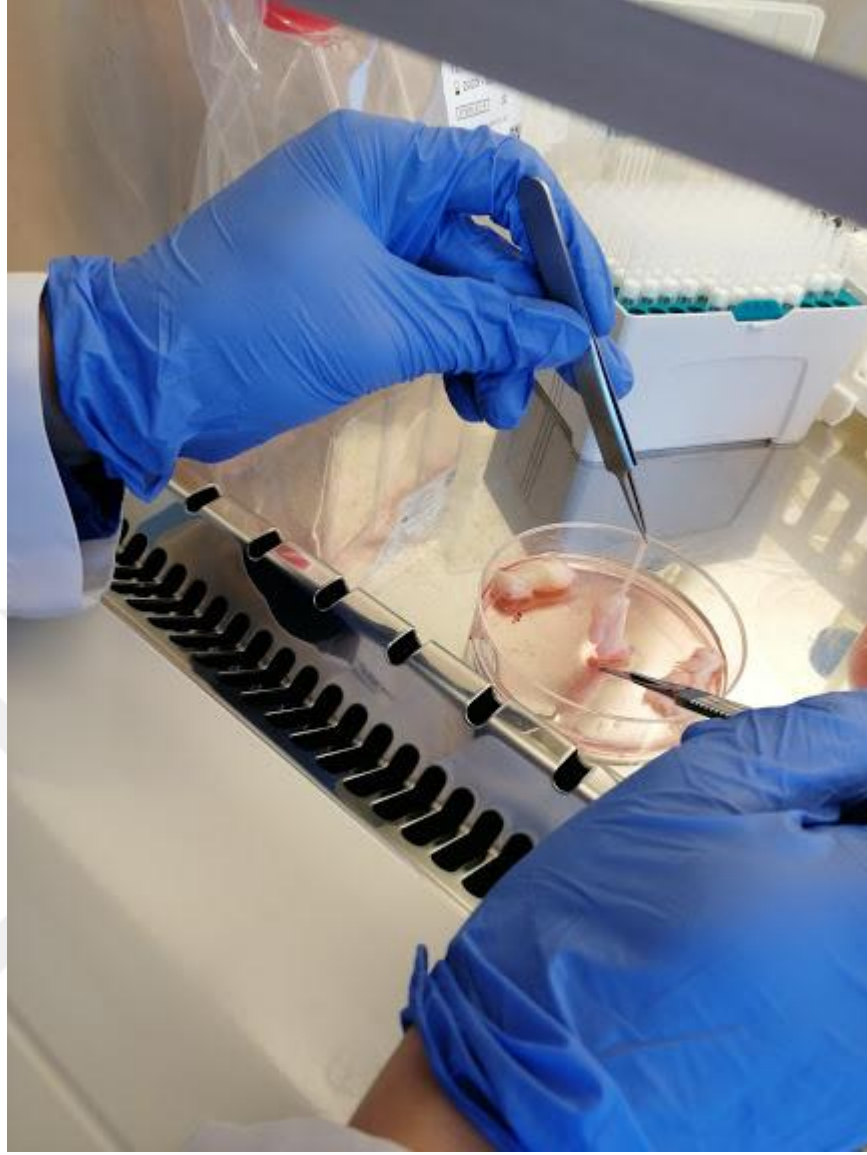
### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından 14/02/2018 tarih ve 18/030 no'lu onayı alınmış olup, TTU-2018-8163 no'lu proje kodu ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın deneysel aşamaları Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvar'ında gerçekleştirildi.

#### **3.1. UMBİLİKAL KORDDAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU**

Çalışmada kullanılacak olan MKH elde etmek için gerekli olan umbilikal kordun temini Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 04.04.2018 tarih ve 2018/182 nolu onayı ile sağlanmıştır. Gönüllülerden aydınlatılmış onam formu onayı alınmıştır. MKH izolasyonu için gerekli olan umbilikal kordlar Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ameliyathanesinde gerçekleşen doğumlardan 2 adet 10 cm uzunluğunda olacak şekilde; göbek kordonları (umbilikal kordlar) steril HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) solüsyonu içine alınarak hızlı bir şekilde Erciyes Üniversitesi GENKÖK'e transferi sağlanmıştır. Umbilikal kordların warton jölesinden hücre kültürü şartlarında MKH'lerin izolasyon işlemleri yapılmıştır. Bu işlem için umbilikal kordlar biyogüvenlik kabini içerisine alındıktan sonra steril PBS ile birkaç kez yıkanarak ve %70'lik etanol içerisinde birkaç dakika bekletildi. Daha sonra tekrar PBS ile yıkanarak 3-5 cm'lik parçalara bölündü.

Longitudinal olarak açılan her parçadan arterler ve ven dikkatli bir şekilde bütünlüğü bozulmadan çıkarıldı (Şekil 3.1). Umbilikal kordun dış kısmındaki amniyon zarı uzaklaştırıldıktan sonra Warton jölesi sıyrılarak çıkarıldı ve bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrıldı. Elde edilen materyal 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelletler 37 °C'deki % 10 Fetal Bovin Serum (FBS), % 1 Glutamax ve % 1 penisillin+streptomisin eklenmiş Dulbecco Modifiye Eagle Medium (DMEM) besiyeri içeren 175 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilmiştir. Flasklar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem ihtiva eden karbondioksit inkübatöründe (Sanyo, Gunma, Japonya) inkübe edildi. Kültür ortamına alınan hücrelerin besiyeri 2-3 günde bir değiştirilerek çoğalmaları sağlandı. Çoğalan hücreler % 0.05'lik Tripsin-EDTA ile flasktan kaldırılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar flasklara ekilerek pasajlama işlemine devam edildi.



**Şekil 3.1:** Umbilikal korddan damarların çıkartılması

### **3.1.1. Hücrelerin karakterizasyonlarının yüzey belirteçleri ile belirlenmesi**

Karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere üçüncü pasajdaki hücrelerin bir bölümü ayrılarak akım sitometride (BD FACS Aria III, San Jose, ABD) pozitif yüzey belirteçleri olan CD73, CD90, CD105'i ve negatif belirteçler olan CD19 ve HLA-DR'yi hangi oranda taşıdıklarını belirlemek için uygun antikorlar aracılığıyla muamele sonrası araştırılmıştır. Yüzey belirteç antikorlarının uygulama prosedürü üretici firmaların talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Kullanılan antikorlar: APC anti-human CD19 Antibody (Biolegend Kat. No: 302211, 5/100 µl, San Diego, ABD), APC anti-human CD90 (Thy1) Antibody (Biolegend Kat. No: 328114, 5/100 µl, San Diego, ABD), FITC anti-human CD105 Antibody (Biolegend Kat. No:

323204, 5/100 µl, San Diego, ABD), FITC anti-human HLA-DR Antibody (Biolegend Kat. No: 307604, 5/100 µl, San Diego, ABD) ve PerCP/Cy5.5 anti-human CD73 (Ecto-5'-nucleotidase) Antibody (Biolegend Kat. No: 344014, 5/100 µl, San Diego, ABD)

### **3.1.2. Adipojenik ve osteojenik dönüşüm yetenekleri**

Karakterizasyon çalışmalarına ilaveten MKH'lerin osteojenik ve adipojenik dönüşüm yeteneklerini gösterebilmek için 3. pasajdaki hücrelerden 24 kuyulu plakalara kontrol grupları da göz önünde bulundurularak ekim yapılmıştır. Ertesi gün plakalardan birine adipojenik diğerine osteojenik farklılaşma besiyerleri (Rat Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit SC020, R&D Systems) eklenerek uygulama talimatnamesinde belirtilen şekilde besiyerleri 2-3 günde bir değiştirilip 21 gün bu şekilde gözlenmiştir. 22. günde % 10'luk formaldehit ile fikse edilen hücrelerden adipojenik dönüşüme uğrayan grup Oil Red O (Sigma, Taufkirchen, Almanya) ile osteojenik dönüşüme uğrayan grup ise % 2'lik Alizarin Red S (Sigma, Taufkirchen, Almanya) solüsyonu ile boyanarak invert mikroskopta fotoğrafları çekilmiştir.

### **3.1.3. Hücrelerin PKH26 ile işaretlenmesi**

İn vivo koşullarda hücrelerin hasarlı dokuya yerleşimlerini gösterebilmek için 3. pasajdaki  $15 \times 10^6$  hücre floresan özellikteki membran boyası olan PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma, Taufkirchen, Almanya) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda boyanmışlardır. Hücrelerin hangi oranda boyandıkları akım sitometri cihazında araştırılmıştır. Boyanan hücrelerin canlılık tespiti ve sayımı ise tripan mavisi ile muamele edilerek thoma lamında (Marienfeld, Marienfeld, Almanya) sayılarak belirlenmiştir. Ayrıca boyanan hücreler Olympus BX51 marka (Olympus Corp. Tokyo, Japonya) floresan mikroskobunda da görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir.

## **3.2. DENEY PROSEDÜRÜ**

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen ağırlıkları 130-150 g arasında olan toplam 60 adet Wistar albino türü erişkin dişi sıçanlardan 10 tanesi ön çalışma amaçlı kullanılırken, 50 tanesi de deney için kullanıldı. Tüm denekler, deney süresince uygun laboratuvar koşulları ( $22 \pm 2$  °C, 12 saat aydınlık/karanlık) altında, günlük içme suyu ve pelet yemlerle serbestçe beslenmiştir. Rastgele seçilen hayvanlar 5 gruba ayrıldı;

**1-Sham grubu (n=10):** Sıçanların sağ siyatik siniri etraf dokulardan ayrılarak açığa çıkartıldı ve bu diseksiyon sonrası başka işlem yapılmadan doku kapatıldı.

**2- Hasar grubu (Hasar) (n=10):** Sıçanların sağ siyatik siniri etraf dokulardan ayrılarak açığa çıkartıldıktan sonra sinire sabit basınç uygulayan bulldog klemp ile 90 saniye boyunca kuvvet uygulanarak ezilme hasarı oluşturulduktan sonra sinir primer iyileşmeye bırakılarak cilt tabakaları orjinal anatomiye uygun şekilde kapatıldı.

**3- Hasar+Mezenkimal Kök Hücre grubu (H+MKH) (n=10):** Sıçanların sağ siyatik siniri etraf dokulardan ayrılarak açığa çıkartıldıktan sonra sinire sabit basınç uygulayan bulldog klemp ile 90 saniye boyunca kuvvet uygulanarak ezilme hasarı oluşturuldu. Hasarlı sinir üzerine lokal olarak 50 mikrolitre hacimde 350.000 adet kök hücre verilip cilt tabakaları orjinal anatomiye uygun şekilde kapatıldı.

**4- Hasar+EPO grubu (H+EPO) (n=10):** Sıçanların sağ siyatik siniri etraf dokulardan ayrılarak açığa çıkartıldıktan sonra sinire sabit basınç uygulayan bulldog klemp ile 90 saniye boyunca kuvvet uygulanarak ezilme hasarı oluşturuldu. Cilt tabakaları orjinal anatomiye uygun şekilde kapatılıp, intraperitoneal olarak 5000 U/kg dozunda rhEPO (PROCRIT; Amgen, Thousand Oaks, CA) uygulandı.

**5- Hasar+EPO+Mezenkimal Kök Hücre grubu (H+EPO+MKH) (n=10):** Sıçanların sağ siyatik siniri etraf dokulardan ayrılarak açığa çıkartıldıktan sonra sinire sabit basınç uygulayan bulldog klemp ile 90 saniye boyunca kuvvet uygulanarak ezilme hasarı oluşturuldu. Hasarlı sinir üzerine lokal olarak 50 mikrolitre hacimde 350.000 adet kök hücre verildi. Cilt tabakaları orjinal anatomiye uygun şekilde kapatılıp, intraperitoneal olarak 5000 U/kg dozunda rhEPO uygulandı.

Grupların tamamı deneyden önceki gün, deney sonrası 14. ve 28. gün yürüyüş platformunda yürütülerek ayak izleri toplanarak siyatik fonksiyonel index (SFI) hesaplaması yapıldı. 28. gün anestezi altına alınan hayvanlar sakrifiye edilip siyatik sinir dokuları alındı.

### **3.3. CERRAHİ YÖNTEM**

Tüm denekler, deney süresi boyunca uygun laboratuvar koşulları (22±2 °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, her biri tek bir kafesde olacak şekilde, günlük

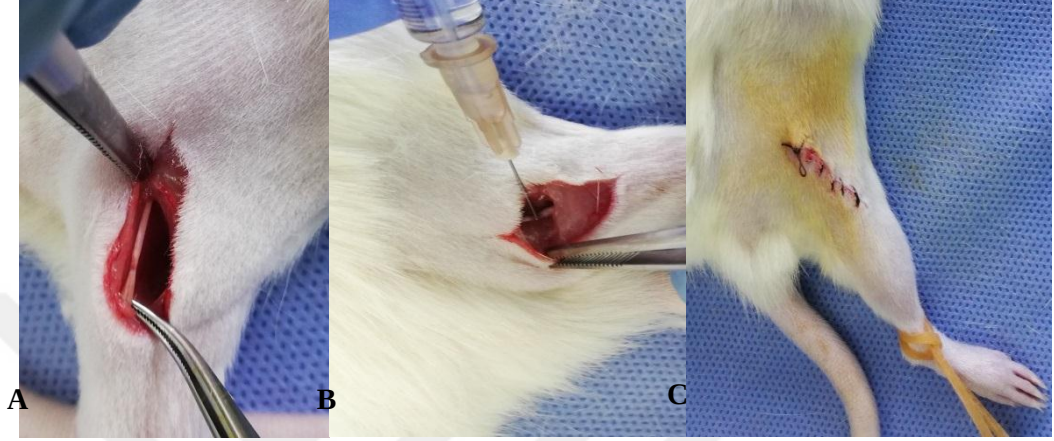
içme suyu ve pelet yemlerle serbestçe beslendi. Cerrahi ncesi sıçanlar ketamin (50 mg/kg) ve ksilazinin (5 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi altına alındı. Genel anestezi altına alınan sıçanların sağ uyluk mediyal bölgesindeki tüyler traş edildi. Sıçanlar dört ekstremitesinden lastik bantlarla, steril hale getirilen mantar panolar üzerine pron pozisyonda raptiyeler yardımı ile sabitlendi. Daha sonra povidone-iodine ile temizlik yapıldı. Sağ alt ekstremitede kalça eklemi izdüşümünü takip edecek şekilde 1,5 cm uzunluğunda oblik gluteal insizyon yapılarak, cilt kenarları ekarte edildikten sonra biceps femoris kasına ulaşıldı.



**Şekil 3.2:** Sıçanları tespit edilmesi ve sinir hasarının oluşturulması

Biceps femoris kası künt diseksiyonla açıldı ve kenarları ekarte edilerek siyatik sinire ulaşıldı. Daha sonra sinir ince uçlu bir diseksiyon makasıyla evre dokulardan serbestleştirildi. Tibial ve peroneal sinir dallanmalarının 1 cm proksimalinde ezilme hasarı oluşturuldu (77) (Şekil 3.2). Crush hasar oluşturacağımız cerrahi yöntemler literatürde çeşitlilik gösterdiği için 10 tane sıanla n çalışma yapıldı. n alışmalar sonucunda: safir marka S08-002-030 kodlu, 220 gr sabit basınçlı, atravmatik, arter vasküler bulldog klemp ile 90, 180 ve 300 saniye boyunca siyatik sinire künt bası oluşturuldu (78). Sinirin hasar oluşturulan bölgesinde sinir hasarı makroskobik olarak incelmiş ve beyazlaşmış şekilde gözlemlendi (Şekil 3.3A). Sinir zerine kök

hücre verdiğimiz gruplarda kök hücre DPBS içinde, 50 mikrolitre hacimde olacak şekilde Hamilton enjektörü ile lokal olarak uygulandı (Şekil 3.3B). Anatomiye uygun olacak şekilde insizyon 4.0 ipek ile kapatıldı (Şekil 3.3C). EPO uygulanacak gruplara literatürdeki (79-82) dozlar örnek alınarak intraperitoneal yolla 5000 U/kg dozunda rhEPO uygulandı.



**Şekil 3.3:** Sinir hasarının gösterilmesi

**A:** Hasarlı sinir, **B:** MKH uygulanması **C:** Kesinin anatomik olarak kapanması

Ön çalışmalarda farklı sürelerle hasar oluşturularak, hasardan 2 hafta sonra örnekler histopatolojik olarak incelenip hasarın olduğu minimum süre değerlendirilerek karar verildi. Bu süre 90 saniye olarak belirlendi. Sıçanlara 28 günlük takip süresince 0, 14 ve 28. günlerde yürütülerek siyatik fonksiyonel index testi ölçümleri yapıldı.



**Şekil 3.4:** SFİ ölçümü

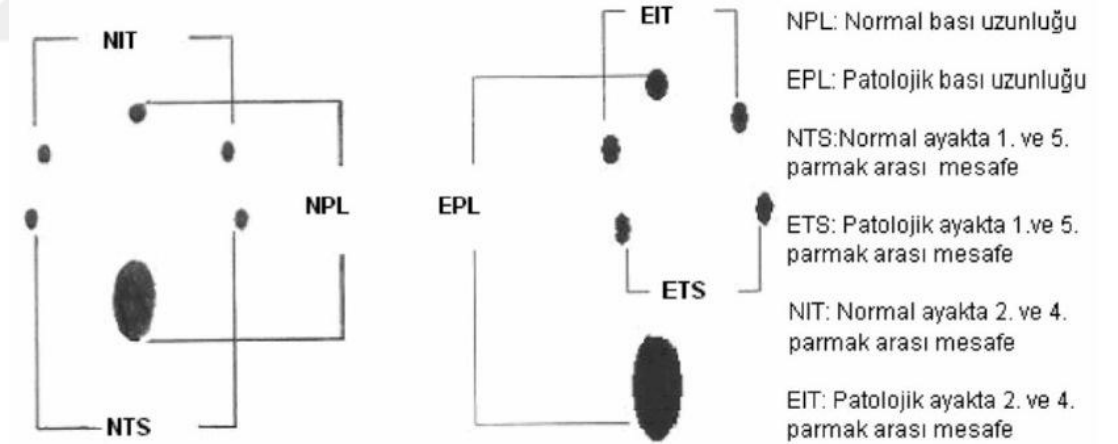
**A:** Yürüyüş platformu ve ayaklara mürekkep uygulaması, **B:** Ayak izlerinin ölçümü

### 3.4. SİYATİK FONKSİYONEL İNDEX TESTİ:

Motor fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesinde yürüme izi yürüyüş analizi kullanıldı. Sıçanların arka ayakları mürekkeple boyanarak, zemininin beyaz kağıtla kaplı olduğu 50 cm uzunluğunda, 8,2 cm genişliğinde, 12 cm derinliğinde bir koridorda serbestçe yürütmesine izin verildi (83). Yürüyüş pistinin tabandaki beyaz kağıda ayak izlerinin çıkması sağlandı. Her bir sıçan net bir şekilde ayak izi elde edilene kadar yürütüldü ve ölçümler iki kör gözlemci tarafından gerçekleştirildi (Şekil 3.4).

Başka çalışmalarda belirtilen kriterler göz önüne alınarak (14,84,85)

- PL (Print Length): Topuktan üçüncü ayak parmağına, baskı uzunluğuna olan mesafe
- TS (Toe Spread): Birinci ile beşinci ayak parmağı arasındaki mesafe, parmak yayılımı
- IT (Intermediate Toe Spread): İkinci ayak ile dördüncü ayak parmağı arasındaki mesafe, ara parmak yayılımı olarak değerlendirildi.



Şekil 3.5: SFİ ölçüm şeması (85)

Değerlendirme yapıldıktan sonra aşağıdaki formül kullanılarak hesaplama yapıldı.,

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

**Şekil 3.6:** Siyatik fonksiyonel index testi formülü (85)

**SFI:** Siyatik Fonksiyonel İndex, **E:** Deneysel, **N:** Normal

Sıçanların ayaklarının ölçümleri ile elde edilen değerler De Medinacelli tarafından geliştirilen ve daha sonra Bain ve ark. tarafından modifiye edilen formülle SFI hesaplandı (85).

Sıfır ile -100 arası elde edilen değerlerde, sıfır normal fonksiyonu gösterirken, -100 tam fonksiyon kaybına işaret etmektedir.

28. gün sıçanlara ketamine hydrochloride (50 mg/kg ip) ve %2 xylazine hydrochloride (5 mg/kg ip) ile anestezi altına alınarak, kalp fonksiyonu yapıldıktan sonra hayvanlar sakrifiye edildi. Daha sonra sıçanların önceki insizyon hattından kontrollü şekilde yapılan yeni bir insizyon ile siyatik sinir hasar bölgesi ortada kalacak şekilde 1 cm'lik sinir eksize edildi. Siyatik sinir örnekleri %4 paraformaldehitte solüsyonuna alınarak ve frozen için gerekli takip yöntemleri kullanılarak Cryomatrix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) içine gömüldü. Cryotom cihazı (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ile kesit alınana kadar -80 °C de saklandı.

### 3.5. HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLER

Dokulardan, cryotom cihazı kullanılarak 7 µm kalınlığında kesitler poly L-lysine kaplı özel lamlara alındı. Genel morfolojik görünüme oil red o (Sigma Aldrich, O0625-100G, USA) ile boyanarak akson sayısı ve akson çapı değerlendirildi. İmmunohistokimyasal markerlardan; nöronal iyileşmeyi sağlayan büyüme faktörlerinin miktarını değerlendirmek için rabbit polyclonal to NGF (ab6199, abcam, UK), nöronal filizlenmeyi gösterebilmek için NF-H antibody (NB300-135, Novus Biologicals, USA), apoptozu gösterebilmek için Cleaved Caspase-3 (Cell Signaling Technology, 9661S, USA) monoklonal antikorlar imalatçının talimatlarına uyularak lamlar üzerinde boyanarak incelendi. Boyanan örneklerin incelenmesinde

ve fotoğraflarının çekiminde, Olympus BX51 floresan mikroskobu (Olympus Corp. Tokyo, Japonya) ve DP71 görüntüleme donanımı kullanıldı.

### 3.5.1. Doku takibi yöntemi

1. PBS' de taze hazırlanmış ve soğutulmuş ph:7.4'e ayarlanmış %4 paraformaldehit ile (+4<sup>0</sup> C) 24 saat fiske edildi
2. %30'luk süktroz solüsyonunda 36-48 saat bekletildi. Dokuların yeterli süktroz doygunluğuna ulaşp ulaşmadığı dibe çökmeleri kontrol edilerek yapıldı.
3. Doku cryomatrix içerisine gömüldü ve sıvı azotta dondurularak -80 <sup>0</sup>C 'ye kaldırıldı.

### 3.5.2. PKH 26 işaretli kök hücrelerin gösterilmesi

Sadece PKH 26 işaretli hücreleri göstermek istediğimiz kök hücre grubu ve hasar grubundaki 2 sıçan siyatik sinirinin bir kısmını doku çıkartıldığı esnada paraformaldehit-sukroz takibini yapmayıp direkt olarak cryomatrix içerisine gömerek sıvı azotta dondurulan dokuları -80 <sup>0</sup>C 'ye kaldırıldı. Poly L-lysine kaplı özel lamalara alınan kesitler asetonda fikse edilip PBS ile yıkandı. DAPI içeren kapatma medyumunu ile dokuların çekirdek işaretlemleri (mavi) de yapılarak lamelle kapatıldı. İmmunfloresan mikroskopta işaretli hücreler gösterildi.

### 3.5.3. Frozen kesitte oil red o boyama yöntemi

**Tablo 3.1:** Oil red o boyama protokolü

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

\*Oil red o boyaması karanlık ortamda yapılmıştır.

### 3.5.4. Frozen kesitte immunofloresan boyama yöntemi

**Tablo 3.2:** İmmunofloresan boyama protokolü

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

Bütün immunofloresan boyama protokolleri aynı yöntemle yapılmış olup rabbit polyclonal to NGF için primer antikor dilüsyon oranı 1/300, NF-H antibody için primer antikor 1/1000 dilüsyonda, Cleaved Caspase-3 için primer antikor 1/200 dilüsyonda yapılmıştır. Sekonder antikor (gtxRb ıgG(H+L) Rhodamine, millipore) ise 1/200 dilüsyonda yapılmıştır.

### 3.6. HİSTOMORFOLOJİK ANALİZLER

İmmünohistokimyasal olarak: Pkh-26 ile işaretli kök hücreler mikroskopun rhodamine filtresinde dokuda incelendi. Böylece kök hücrelerin hasar yerine göç ettiğini tespit etmiş olduk.

Oil red o boyası ile genel histopatolojik değerlendirmenin yanı sıra, akson çap ölçümü ve akson sayımı İmage J Software programı kullanılarak yapıldı. Aksonların çap ölçümü her grubu 1000 adet akson temsil edecek şekilde grup içindeki sıçanlarda rastgele ve eşit sayıda olacak şekilde yapıldı. Akson sayısı ise her grup için rastgele seçilen 20 farklı alandan sayım yapılarak belirlendi (86). Bütün elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapıldı.

Dokular; NF-H, NGF ve kaspaz-3 antikorları ile indirekt immunohistokimyasal yöntem kullanılarak flüoresan olarak işaretlendi. NF-H, NGF sonuçlarını değerlendirmek için İmage J Software programı kullanılarak yoğunluk ölçümü yapıldı. Ölçümler her bir sıçan için rastgele seçilen 10 farklı alanda değerlendirildi.

NF-H ve NGF için yoğunluk ölçümü yapılırken Kaspaz-3 boyamasını değerlendirmek için ise immunreaktivite pozitif hücre sayımı yapıldı.

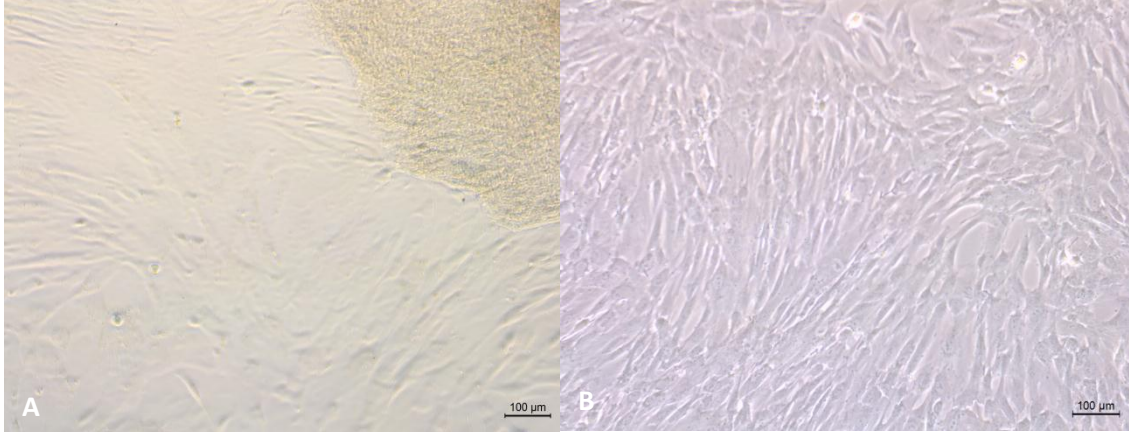
### **3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

İstatistiksel analizler SPSS (SPSS for Windows version 13) paket programı kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar normal dağılım gösteren SFİ ölçümleri hesaplanırken değişkenlerde Tek Yönlü Varyans Analizi, fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırmaları ise Tukey testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen diğer değişkenlerde gruplar arası karşılaştırmalar ise Kruskal-Wallis Analizi, fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırmaları ise ikili olarak Mann Whitney U testi ile yapıldı.  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. UMBİLİKAL KORDDAN MKH ELDESİ

Umblikal korddan izole edilen MKH'lerin primer kültürün yaklaşık 10. gününden itibaren çoğalmaya başladığı görülmüştür. Kültür kabına tutunmuş olan hücreler (Şekil 4.1) gösterilmiştir.

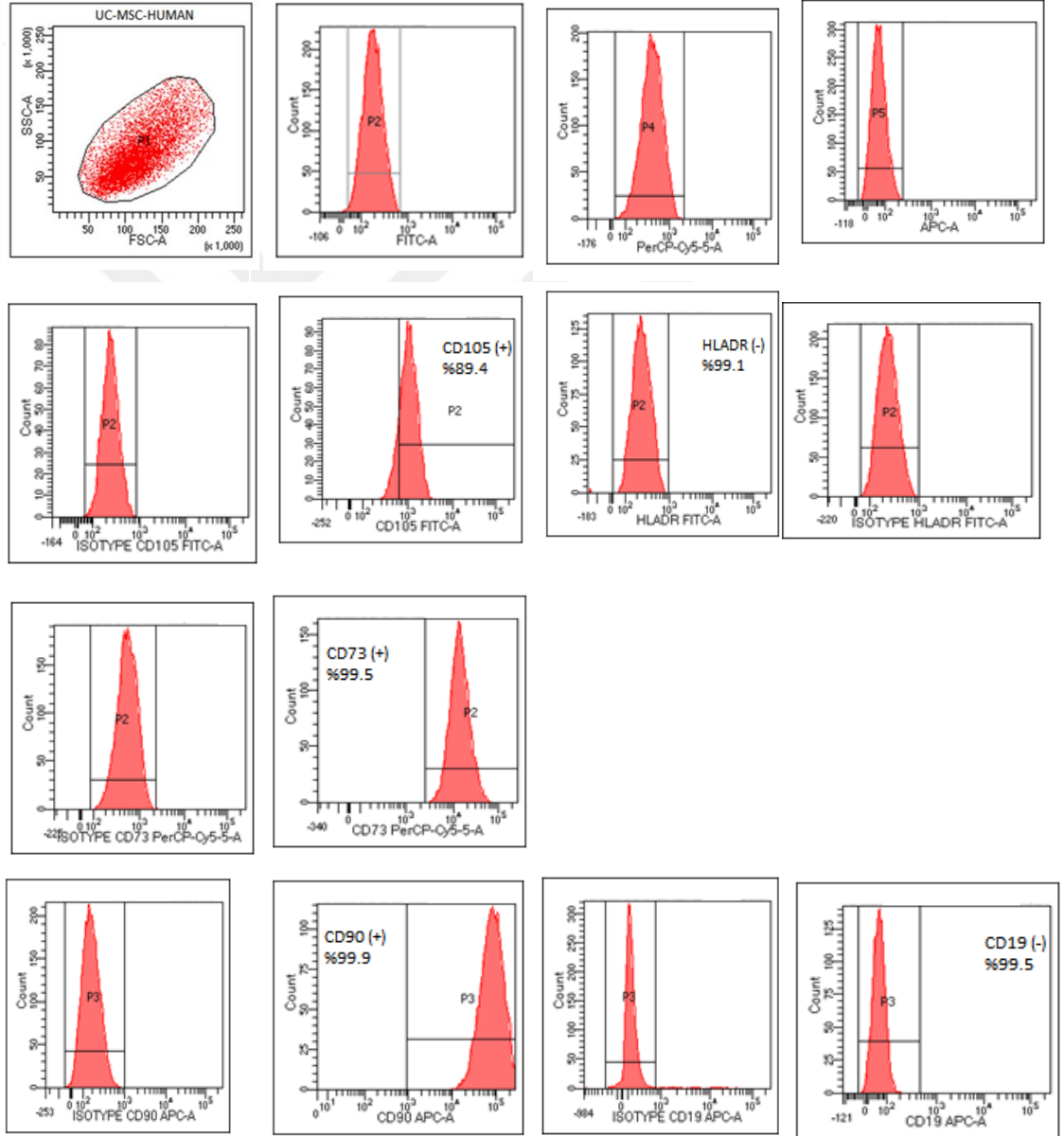


**Şekil 4.1:** MKH'lerin 10. gün invert mikroskop görüntüleri

**A-** Primer kültürün 10. gününde kültür kabına tutunarak çoğalan hücrelerin invert mikroskop görüntüsü, 10x. **B-** 3. pasajdaki MKH'lerin invert mikroskop görüntüsü, 10x.

#### 4.2. HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONLARINDA YÜZEY BELİRTEÇLERİNİN ANALİZİ

3. pasajdaki hücrelerin akım sitometri sonuçlarına göre pozitif yüzey belirteçlerinden CD 105'i % 89.4, CD 73'ü % 99.5 ve CD 90'ı % 99.9 oranında taşıdıkları görülmüştür. Negatif belirteç olan HLA-DR'yi % 0.9 ve CD 19'u % 0.5 oranında taşıdıkları görülmüştür (Şekil 4.2). İzole edilen hücrelerin MKH'lerde bulunması gereken pozitif belirteçleri oldukça yüksek oranda taşıdıkları, negatif belirteçleri ise taşımadıkları görülmüştür.

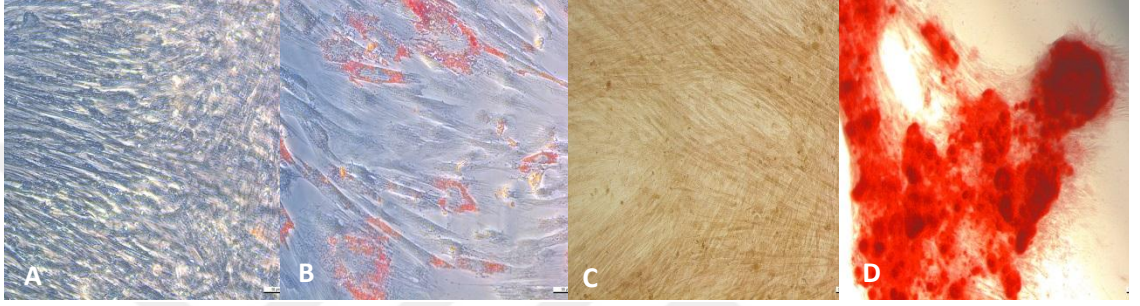


Şekil 4.2: MKH'lerin akım sitometri histogram grafikleri

MKH'lerin akım sitometri cihazında pozitif (CD 73, CD 90, CD 105) ve negatif yüzey belirteçlerine (CD19 ve HLA-DR) ait histogram grafikleri.

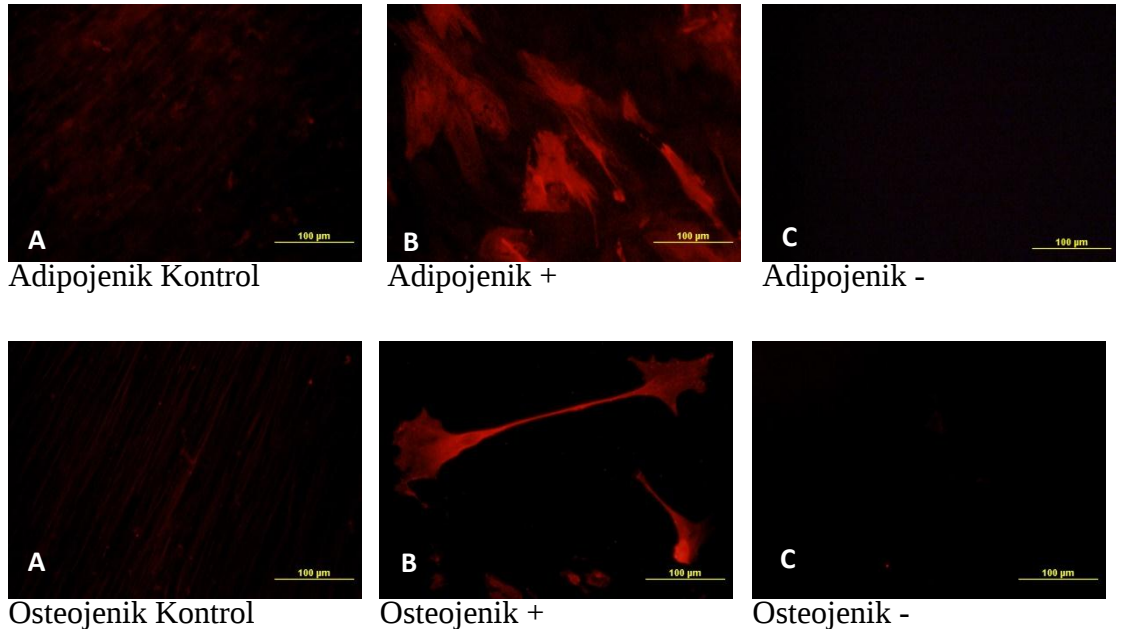
#### 4.3. ADİPOJENİK VE OSTEOJENİK DÖNÜŞÜM YETENEKLERİ

Üçüncü pasajdaki hücrelere 21 gün boyunca uygulanan farklılaşma besiyerleri ile hücrelerde adipojenik ve osteojenik dönüşümün gerçekleştiği, uygulama yapılmayan kontrol grubunda değişimin olmadığı gösterilmiştir. Adipojenik dönüşüm hücrelerde Oil O red boyama ile sitoplazmadaki yağ damlacıklarının kırmızı renge boyanması ile gösterilmiştir. Osteojenik dönüşümde ise Alizarin red boyama ile invert mikroskopta kalsiyum depositlerinin kırmızı renk almaları ile belirlenmiştir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3:** MKH'lerin 21. gün farklılaşmalarının mikroskopik görüntüleri

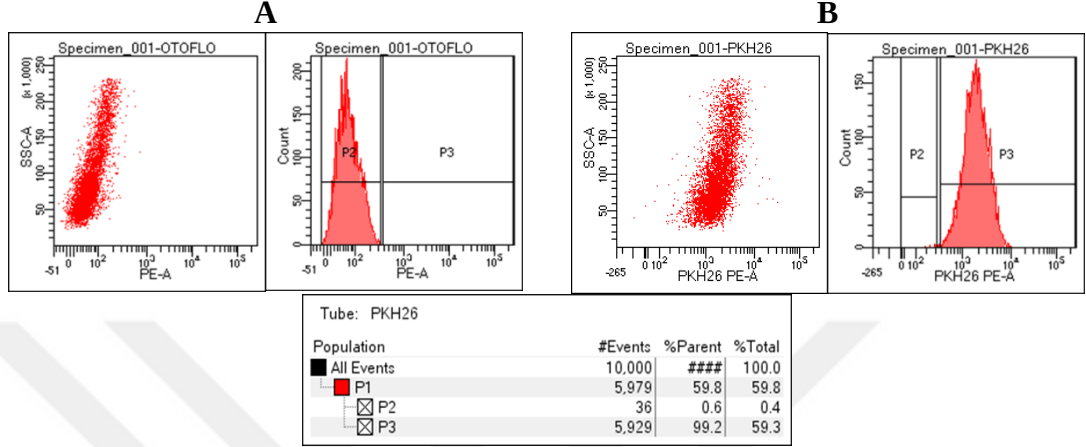
MKH'lere 21 gün boyunca farklılaşma besiyerleri uygulanarak adipojenik (A-Kontrol, B- Adipojenik dönüşüm 20x) ve osteojenik (C-Kontrol, D- Osteojenik dönüşüm 10x) dönüşümün gerçekleştiği gösterilmiştir. Adipojenik dönüşüm gerçekleşen hücrelerde (B) Oil O red boyama ile sitoplazmadaki yağ damlacıkları kırmızı renge boyanmıştır. Osteojenik dönüşümde (D) ise Alizarin red boyama ile kalsiyum depositlerinin kırmızı renk aldıkları görülmüştür, 50 µm.



**Şekil 4.4:** MKH'ların 21. gün farklılaşmalarının floresan görüntüleri

MKH'lere 21 gün boyunca farklılaşma besiyerleri uygulanarak adipojenik (A-Kontrol, B- Adipojenik +,C- Adipojenik - ;40x) ve osteojenik (A-Kontrol, B- Osteojenik+,C- Osteojenik-; 40x; bar çizgisi 100 µm.) dönüşümün gerçekleştiği gösterilmiştir.

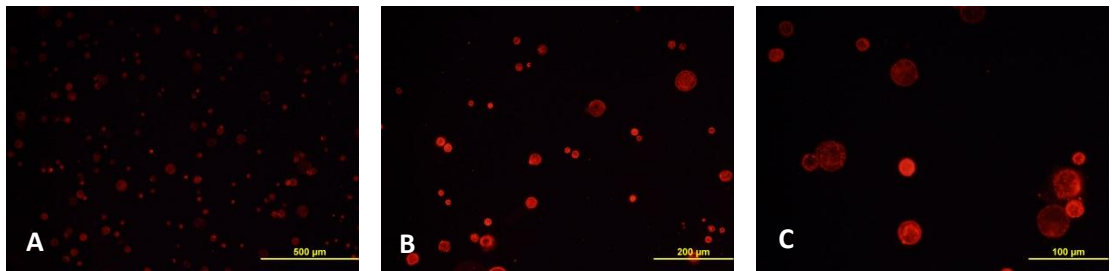
#### 4.4. HÜCRELERİN PKH26 İLE İŞARETLENMESİNİN AKIM SİTOMETRİSİNDE GÖSTERİLMESİ



**Şekil 4.5:** PKH 26 ile boyanan MKH'lerin akım sitometrisinde verdikleri ışıma

A) Boyanmamış hücreler ait B) Boyanmış hücrelere ait histogramlarıdır. PKH26 ile hücrelerin % 99.2 gibi çok büyük bir oranda boyanmış oldukları akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Boyanmayan hücrelere ait histogram sonucuna göre % 0.6 gibi çok küçük bir miktar ışıma mevcuttu.

Tripan mavisi eklenen hücrelerden thoma lamında 126 hücre sayılmış, bunlardan 4 tanesi ölü hücre olduğu için canlılık oranı % 96.9 olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda PKH26 ile boyalı hücrelerin floresan mikroskopunda da farklı büyütmelerde görüntüleri alınarak varlıkları gösterildi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6:** PKH26 ile boyalı hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü

A)10x B)20x C)40x

#### 4.5. SFİ TESTİ

Deneyden önceki gün (0.gün), postoperatif 14 ve 28. günlerde, hazırlanan bir düzenek yardımı ile bütün gruplardaki sıçanların yürüme analizi yapıldı. Elde edilen

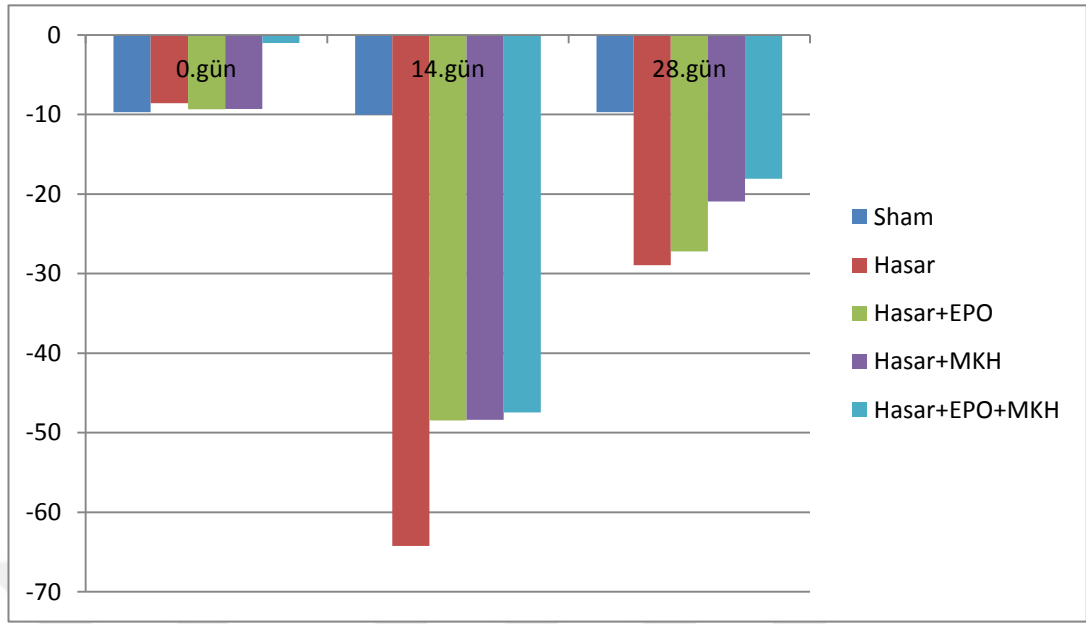
veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 0. gün yapılan yürüyüş testinde gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. Hasar oluşturulduktan sonraki 14. günde yapılan yürüyüş testinde ortalamaları açısından grup kategorileri incelendiğinde; Sham grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda SFİ değerlerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p<0.05$ ). Hasar+EPO+MKH grubuna ait SFİ değeri hasar grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış görüldü ( $p<0.05$ ). 14. güne ait tüm deney grupları karşılaştırıldığında, SFİ değerindeki artıştan dolayı iyileşmenin en iyi Hasar+EPO+MKH grubunda olduğu söylenebilir. 28. güne ait deney gruplarının sıçanlarına yapılan yürüyüş testinde ise Sham grubu ile diğer tüm gruplar kıyaslandığında; SFİ değerleri hala düşüktü dahası, H+EPO+MKH grubu ile Sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark kalmamıştı. Bu da bize MKH ve EPO'nun birlikte verildiği Hasar+EPO+MKH grubunda iyileşmenin diğer gruplara göre daha belirgin olduğu ve değerlerin neredeyse Sham ile aynı olacak kadar arttığını gösterdi (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1:** Siyatik fonksiyonel indeks testi istatistikleri

|         | Sham                      | Hasar                     | Hasar + EPO               | Hasar + MKH                | Hasar + EPO<br>+ MKH      | p     |
|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-------|
| 0. gün  | -9,718±1,44 <sup>a</sup>  | -8,601±1,46 <sup>a</sup>  | -9,359±1,97 <sup>a</sup>  | -9,315±1,56 <sup>a</sup>   | -1,0178±2,69 <sup>a</sup> | 0.464 |
| 14. gün | 10,020±4,33 <sup>a</sup>  | 64,211±18,16 <sup>b</sup> | 48,441±6,69 <sup>bc</sup> | 48,383±10,76 <sup>bc</sup> | 47,465±15,49 <sup>c</sup> | 0.001 |
| 28. gün | -9,712±2,26 <sup>ac</sup> | -28,943±5,07 <sup>b</sup> | -27,231±8,04 <sup>b</sup> | -20,921±8,33 <sup>bc</sup> | -18,073±9,24 <sup>c</sup> | 0.001 |

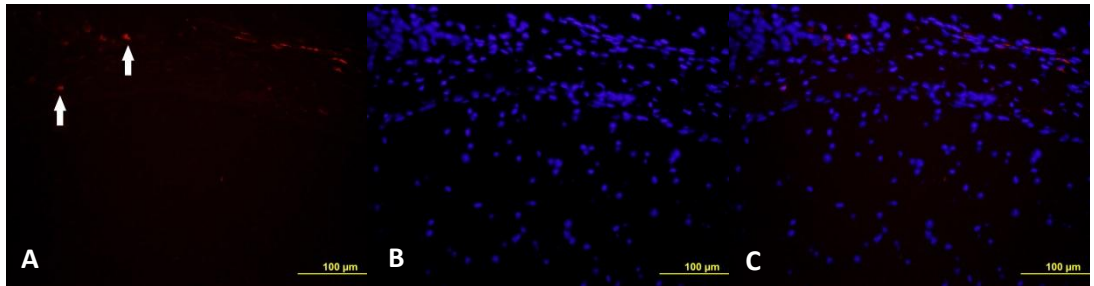
Veriler ortalama ± standart sapma ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir

**Şekil 4.7:** Siyatik fonksiyonel indeks testi istatistikleri grafiği



#### 4.6. PKH 26 İLE İŞARETLİ KÖK HÜCRELERİN GÖSTERİLMESİ

PKH 26 ile işaretlenmiş hücrelerin varlığını göstermek amacıyla kök hücre verdiğimiz gruplardan elde edilen preparatlarda floresan boyama yöntemini kullandık. Floresan mikroskopla incelendiğinde her alanda kırmızı refle veren birkaç adet kök hücreye rastalandı. Böylece, PKH 26 ile işaretli olan MKH'lerin hasar bölgesine göç ettiği gözlemlendi (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8:** PKH 26 işaretli kök hücreler

40x, Beyaz ok ile PKH26 işaretli kök hücreler gösterilmiştir.

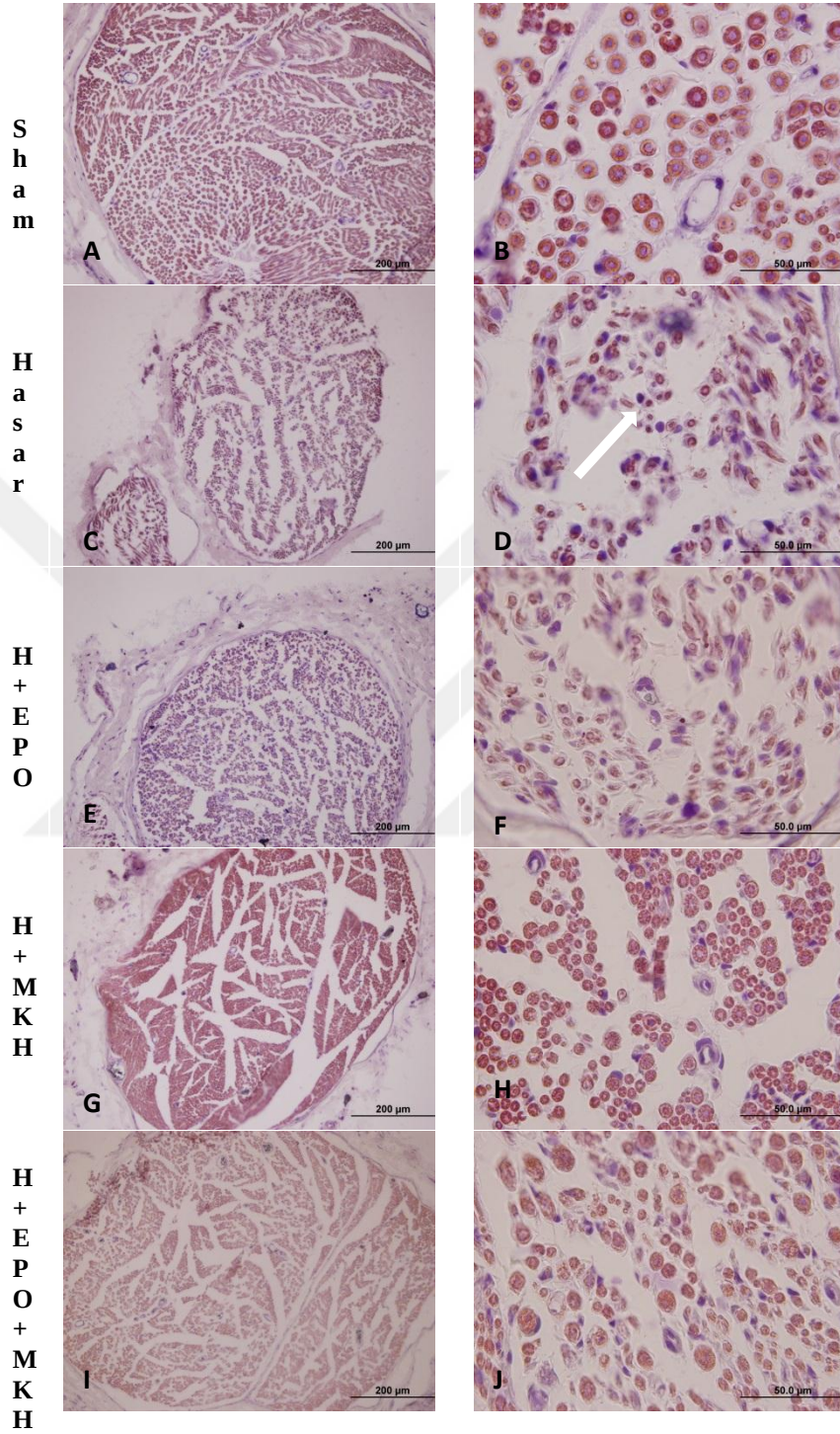
#### 4.7. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR

Deney gruplarına ait siyatik sinir kesitleri incelendiğinde yapısal değişiklikleri değerlendirilmek için, Erken HA ve arkadaşlarının oluşturdukları değerlendirme yöntemi kullanıldı (86). Oil red O boyama metodu uygulanan preparatlarda deney gruplarına ait siyatik sinirin genel histolojik özellikleri, akson sayıları ve çapları

değerlendirildi. Buna göre, Sham grubuna ait siyatik sinir kesitleri ışık mikroskobu altında incelendiğinde epinöryum, perinöryum ve sinir fasikülleri düzenli bir görünüm sergilemekteydi. Büyük büyütmede (x100) Sham grubuna ait aksonal organizasyonun düzenli ve homojen olduğu, akson şekillerinin enine kesitlerinde yuvarlak görünüme sahip olduğu ve aksonu çevreleyen miyelin kılıfın ise oil red o ile kırmızıya boyanmış olduğu düzgün yapıları ayırt edildi. Hasar oluşturulan gruba ait siyatik sinir kesitleri tüm diğer deney gruplarına göre en belirgin dejeneratif değişiklikleri göstermekteydi. Hasar grubunun sinir fasikülleri oldukça düzensizdi, fasiküllerin arasında ve içinde boşluklar gözlenmekteydi. Ayrıca oil red o ile boyanmayan hasarlı aksonlar oldukça belirgin olsa da, sinirlerde kanama alanları ve nekrotik alanlar izlenmedi (Şekil 4.9D). Tüm deney grupları histopatolojik özelliklerine göre karşılaştırıldığında, periferik sinirlerin fasikül ve perinöryumları hasar grubu hariç genel olarak tüm sıçanlarda korunmuş olarak izlenmekteydi. Histopatolojik olarak Sham grubuna en yakın olan grup Hasar+MKH grubuydu (Şekil 4.9).

Deney grupları histomorfometrik olarak değerlendirildiğinde, akson çaplarının ortalamaları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardı (Tablo 4.3). Sham grubuna ait siyatik sinir kesitlerindeki akson çapları karşılaştırıldığında Hasar, Hasar+MKH ve Hasar+EPO+MKH gruplarında akson çapının anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ( $p<0.05$ ). Ancak bu gruplara ait akson çapları hasar grubu ile kıyaslandığında akson çaplarında hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardı ( $p<0.05$ ). EPO uygulanan gruplarda akson çapının Hasar+MKH grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Deney grupları birim alana düşen akson sayısı yönünden karşılaştırıldığında hasar grubunda Sham'e göre akson sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş vardı ( $P<0.05$ ). Hasar+MKH, Hasar+EPO+MKH grubuna ait kesitlerde akson sayısı hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiş olup ( $p<0.05$ ), Hasar+MKH grubuna ait sinir kesitlerinde akson sayısı Hasar+EPO grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak artmıştı ( $p<0.05$ ). Özetle deney grupları akson sayısı bakımından değerlendirildiğinde, Hasar+MKH grubunda akson sayısı diğer deney gruplarına göre istatistiksel olarak en yüksek artış gösteren grup olmasına rağmen, akson çapı açısından değerlendirildiğinde Hasar+EPO+MKH

grubuna kıyasla akson çapları daha az iken Hasar gruplarına göre daha fazlaydı ( $p<0.05$ ).



20x

100x

**Şekil 4.9:** Grupların oil red o boyama ile görüntüleri

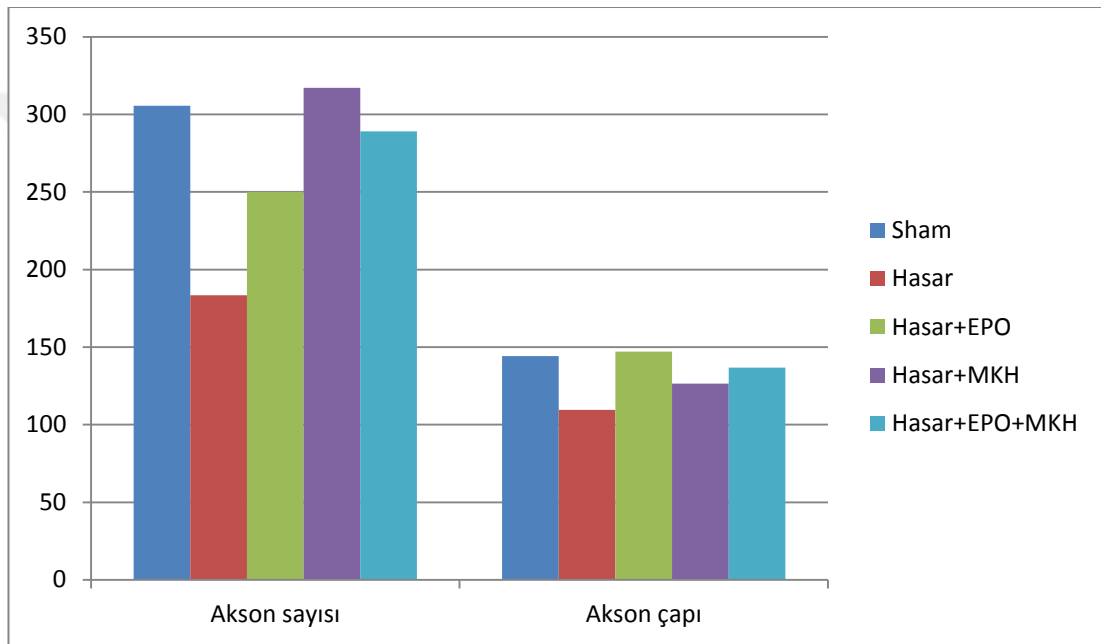
beyaz ok : dejenerasyon

**Tablo 4.2:** Oil red o ile boyanan siyatik sinirde akson çap ve sayısı istatistik tablosu

|                     | Sham                                    | Hasar                                  | Hasar+EPO                               | Hasar+MKH                               | Hsara+EPO+MKH                           | p     |
|---------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-------|
| <b>Akson Sayısı</b> | 305,50<br>(260,00-350,75) <sup>ac</sup> | 183,50<br>(131,75-245,75) <sup>b</sup> | 250,00<br>(215,75-279,75) <sup>ab</sup> | 317,00<br>(286,50-341,00) <sup>c</sup>  | 289,00<br>(258,25-351,75) <sup>ac</sup> | 0.001 |
| <b>Akson Çapı</b>   | 144,166<br>(132,22-154,41) <sup>a</sup> | 109,553<br>(96,80-123,80) <sup>b</sup> | 147,020<br>(134,51-159,15) <sup>a</sup> | 126,443<br>(117,44-136,70) <sup>c</sup> | 136,855<br>(129,03-147,16) <sup>d</sup> | 0.001 |

Veriler medyan (1.çeyrek-3.çeyrek) ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

**Tablo 4.3:** Akson çap ve sayı grafiği



#### 4.8. İMMUNOFLORESAN BULGULAR

Tüm deney gruplarına ait siyatik sinir kesitlerinde NF-H'nin immunreaktivite yoğunluğunu belirlemek için siyatik sinir kesitlerinde immunofloresan boyama metodu uyguladığımız preparatlar kullanıldı. Çalışmanın bu aşamasından elde edilen veriler doğrultusunda NF-H immunreaktivite yoğunluğunun hasar grubunda Sham grubuna göre anlamlı düzeyde azalma gösterdiği belirlendi ( $p<0.05$ ). Tedavi grupları içinde Hasar+MKH grubunda NF-H immunreaktivite yoğunluğunda Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edildi ( $p<0.05$ ) (Tablo 4.5).

Deney grupları NGF immunreaktivite yoğunluğu açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu gözlemlendi (Tablo 4.5).

NGF immunreaktivite yoğunluğunun en düşük olduğu grup Sham grubuydu. Hasar grubu ile tedavi uygulanan gruplardan alınan veriler istatistiksel olarak analiz edildiğinde, NGF immunreaktivite yoğunluğunun sadece Hasar+MKH grubunda anlamlı olarak azaldığı ve diğer tedavi gruplarına göre Sham'e en yakın NGF ekspresyonu gösteren grup olduğu belirlendi. Sadece MKH uyguladığımız Hasar+MKH grubunun NGF immunreaktivite yoğunluğunun Hasar+EPO ve Hasar+EPO+MKH gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu görüldü ( $p<0.05$ ).

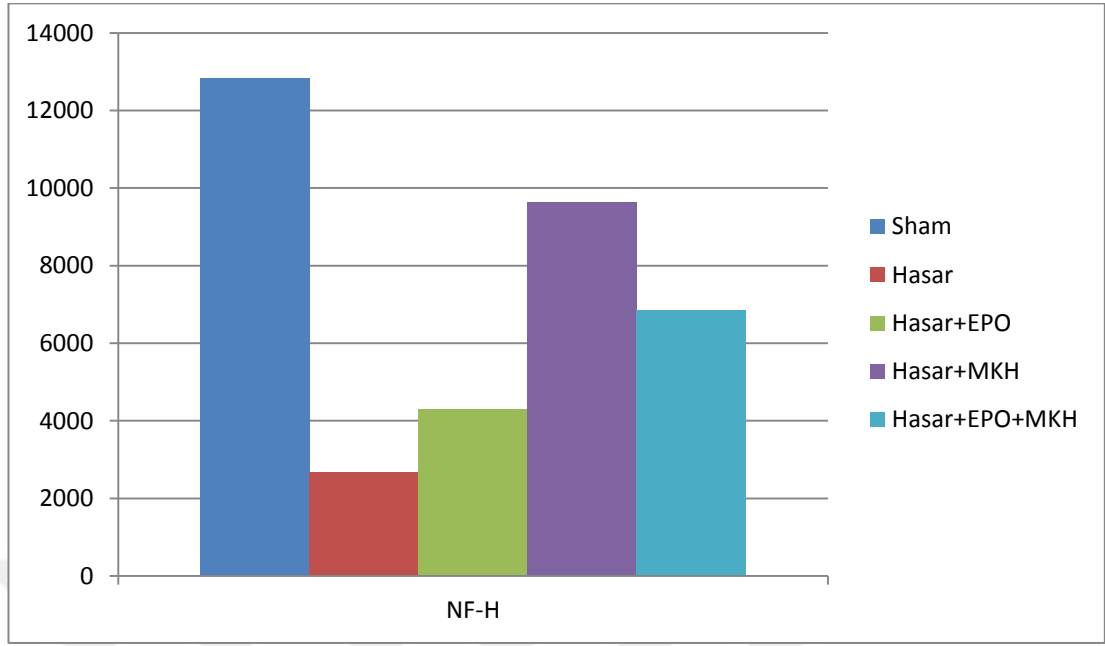
Siyatik sinirde apoptozu göstermek amaçlı yaptığımız kaspaz-3 immunofloresan boyaması sitoplazmalarda kırmızı refle vererek immunreaktivite işaretlenmesi yapıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $P>0.05$ ) (Tablo 4.5).

**Tablo 4.4:** İmmunreaktivite değerlendirme istatistikleri

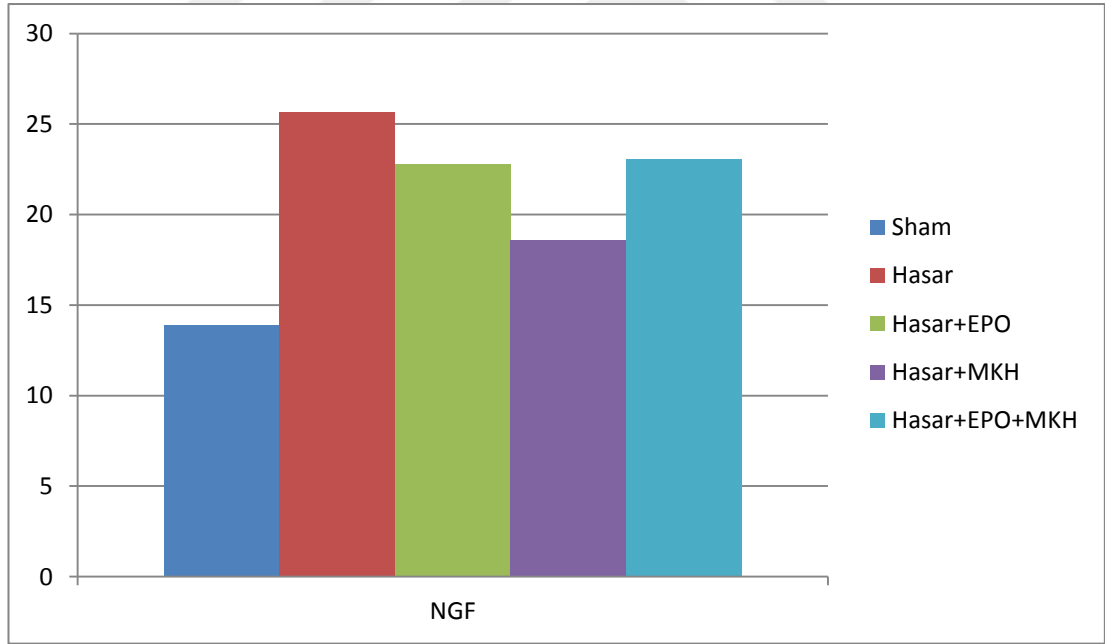
|                | Sham                                          | Hasar                                          | Hasar+EPO                                      | Hasar+MKH                                       | Hasar+EPO+MKH                                   | P     |
|----------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------|
| <b>NF</b>      | 12818,000<br>(9854-<br>16153,25) <sup>a</sup> | 2655,500<br>(1761,25-<br>4036,25) <sup>b</sup> | 4301,000<br>(2622,00-<br>6792,00) <sup>c</sup> | 9620,000<br>(6218,50-<br>13272,50) <sup>d</sup> | 6836,000<br>(4809,50-<br>10299,50) <sup>e</sup> | 0.001 |
| <b>NGF</b>     | 13,891<br>(10,77-<br>15,83) <sup>a</sup>      | 25,665<br>(20,67-<br>30,60) <sup>b</sup>       | 22,800<br>(18,37-<br>28,23) <sup>b</sup>       | 18,598<br>(14,82-<br>25,74) <sup>c</sup>        | 23,065<br>(15,72-31,19) <sup>b</sup>            | 0.001 |
| <b>Kaspaz3</b> | 0,0(0,0-<br>0,0) <sup>a</sup>                 | 0,0(0,0-<br>0,0) <sup>a</sup>                  | 0,0(0,0-0,0) <sup>a</sup>                      | 0,0(0,0-0,0) <sup>a</sup>                       | 0,0(0,0-0,0) <sup>a</sup>                       | 0.382 |

Veriler medyan (1.çeyrek-3.çeyrek) ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

**Şekil 4.10:** NF-H immunreaktivite değerlendirme grafikleri



**Şekil 4.11:** NGF immunreaktivite değerlendirme grafikleri



S  
h  
a  
m

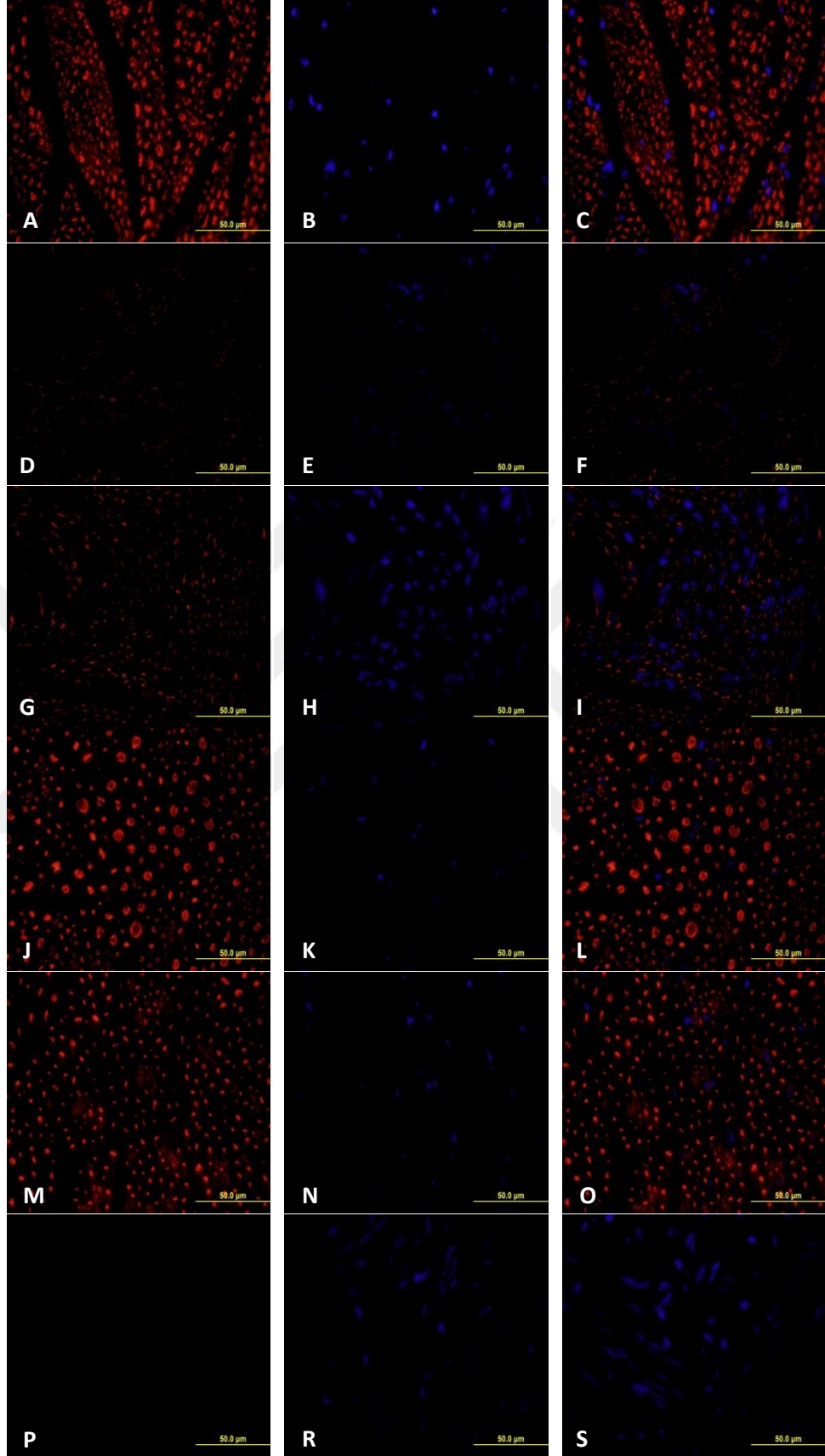
H  
a  
s  
a  
r

H  
+  
E  
P  
O

H  
+  
M  
K  
H

H  
+  
E  
P  
O  
+  
M  
K  
H

N  
e  
g  
a  
t  
i  
f



Şekil 4.12: NF-H boyama görüntüler

100x

S  
h  
a  
m

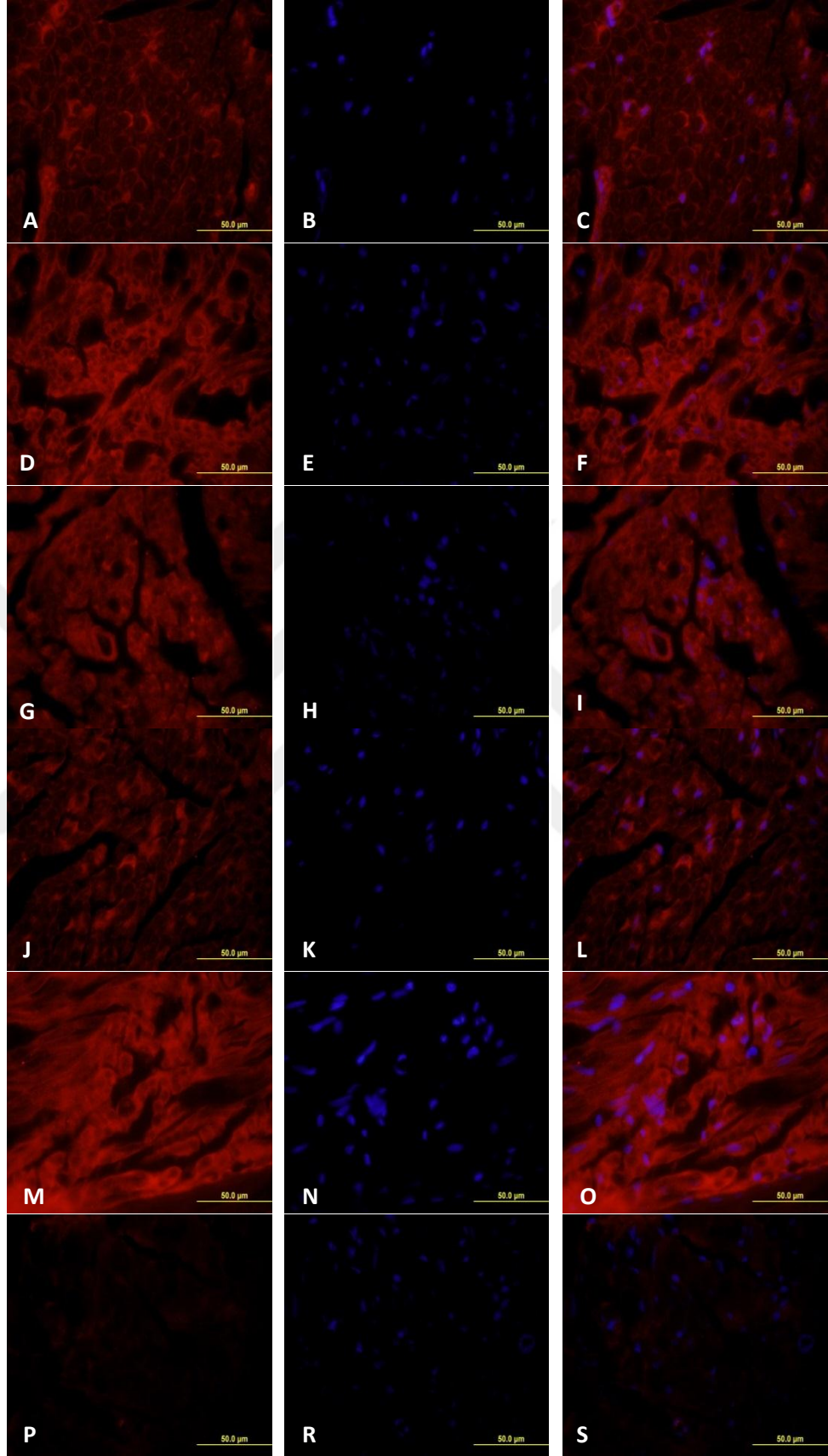
H  
a  
s  
a  
r

H  
+  
E  
P  
O

H  
+  
M  
K  
H

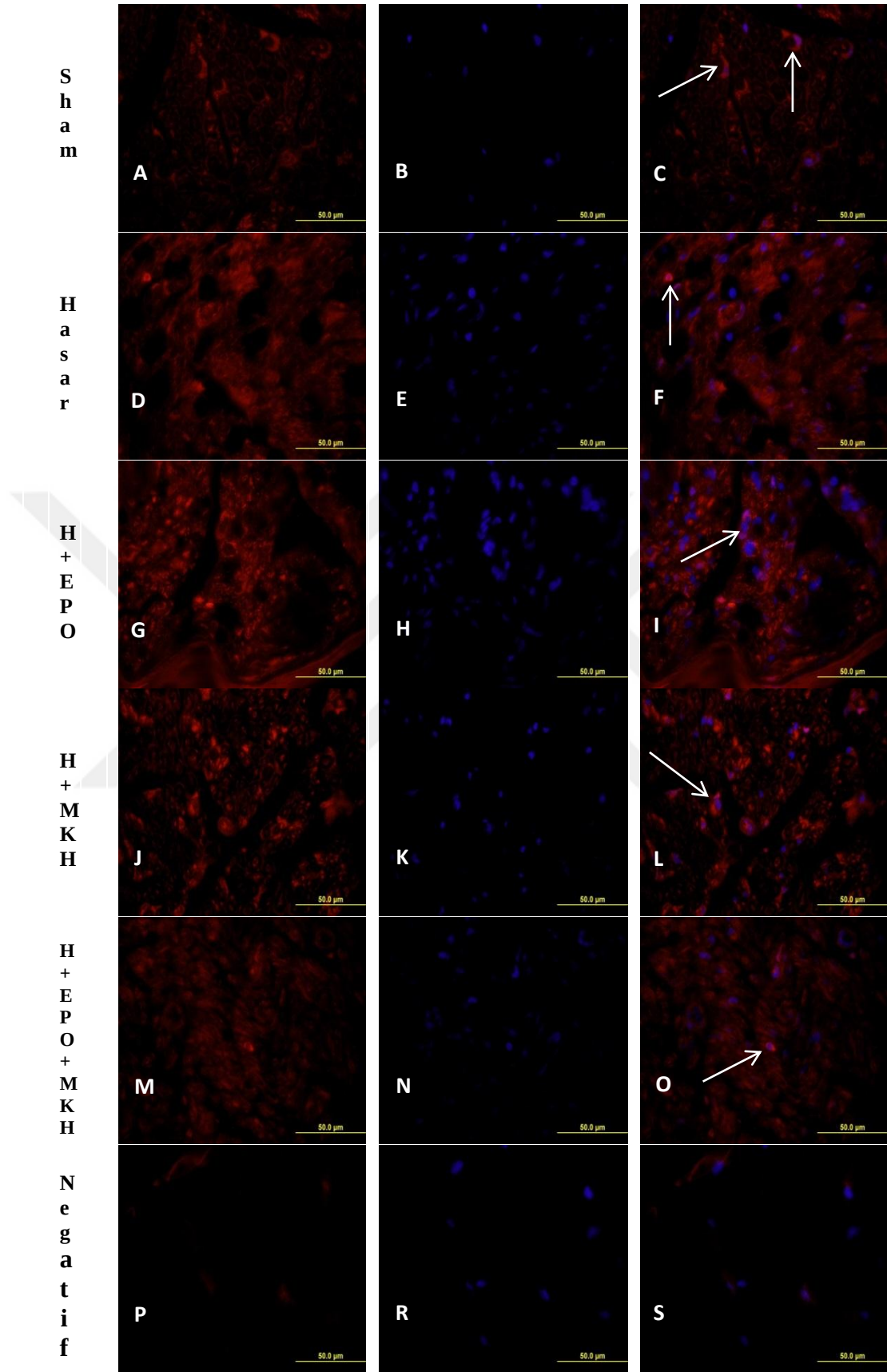
H  
+  
E  
P  
O  
+  
M  
K  
H

N  
e  
g  
a  
t  
i  
f



Şekil 4.13: NGF boyama görüntüleri

100X



**Şekil 4.14:** Kaspaz-3 boyama görüntüleri

İnce beyaz ok: sitoplazmada kaspaz 3 immunreaktivitesi, 100x

## 5. TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları ekonomik ve sosyal yaşamı önemli derecede etkileyen, güncel tedavi yöntemleriyle çoğu zaman tam bir tedavi sağlanamayan önemli bir sorundur. Sinir iyileşmesini desteklemek için farklı cerrahi onarım, ilaç, hormon ya da biyolojik ürünlerin kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır (3,4,14,23,77).

Vücuttaki diğer dokulardan farklı olarak, periferik sinir rejenerasyonu yavaştır ve yaralanma sonrası sinir onarımı yapılan hastaların yarısından azında motor veya duyu fonksiyonların geri kazanımı tam olmaktadır. Cerrahi onarımla sinirleri fasiküler düzeyde yeniden inşa etmek teknik olarak mümkün olsa da aksonal düzeyde mümkün değildir (3). Primer cerrahi onarımdaki bu eksiklikler sebebiyle cerrahiye ek olarak kök hücre implante edilmiş allogenic sinir greftleri veya venöz greftlere kök hücre ilave ederek yeni tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır (4, 87).

Kök hücrelerin kullanıldığı yöntemler literatürde çeşitlilik göstermektedir. Umbilikal kord (88), yağ dokusu (17), warton jölesi (7), amnion zarı (89) gibi kaynaklardan elde edilenler örnek olarak gösterilebilir. Farklı çalışmalarda veriliş yolları lokal veya sistemik olarak çeşitlilik göstermektedir. Lokal kök hücre çalışmalarında bazen chitosan kaplı tübüllerle (38), bazen matrijel içinde (90) bazen de bizim de yaptığımız gibi direk doku üzerine lokal olarak (17) DPBS solüsyonu içinde uygulanmıştır. Kök hücre haricinde eritropoetin (15,91,92), curcumin (93), NGF (94), hiperbarik oksijen tedavisi (8) gibi pek çok maddenin rejenerasyona katkısı

gösterilmiştir. Ancak bu çalışmalarda kullanılan yöntem ve materyallerin çoğu klinik uygulamalara henüz girememiştir. GKS-MKH'ler sahip oldukları immun baskılayıcı, apoptozu engelleyici ve tümör baskılayıcı özellikler bakımından, diğer MKH'lerden daha üstün olması sebebiyle tercih ettik (9). Warton jölesinden elde ettiğimiz kök hücreleri diğer kök hücrelere göre rejenerasyona daha fazla katkı sağladığı ve elde edilmesinin kolay olması sebebiyle tercih ettik. EPO'nun da apoptozu azaltma (15) ve kök hücre yönlü göçünü (13,14) artırdığına dair çalışmalar olduğu için kullandık.

Siyatik sinirde crush hasar modeli oluşturmak için kullanılan klemp ve süreler literatürde (78,95,96) çeşitlilik gösterdiği için ön çalışma ile kullanacağımız klempin oluşturacağı hasarın süresini 90 saniye olarak belirledik. Örneğin Marconi S. ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmalarında, 6-8 haftalık farelerin siyatik sinirinde crush hasar oluşturarak insan yağ dokusundan elde ettikleri MKH'lerin sinir rejenerasyonuna katkısını araştırmışlar. Jeweler forseps ile 30 sn sinir üzerine bası uygulayarak hasar oluşturdukları farelere hasardan 1 hafta sonra akım sitometri ile karakterize ettikleri  $2 \times 10^6$  MKH'yi kuyruk veninden enjekte ederken kontrol grubuna PBS enjekte etmişler (97). Siyatik sinirde crush hasar modeli oluşturmanın en önemli kısmı standardizasyonu sağlamaktır. Bu yüzden oluşturulan siyatik sinir hasar modelinde sabit basınç uygulayan bulldog klemp kullanmayı tercih ettik.

SFİ testi siyatik sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için sıklıkla kullanılan motor, duyu, proprioseptif fonksiyonun geri dönüşümünü ölçen önemli fizyolojik bir testtir. Ayrıca fonksiyonel geri dönüşü göstermek için iyi bir yöntemdir. SFİ ölçümlerinin en önemli dezavantajı, ölçümlerin araştırmacının hassasiyetine göre değişkenlik gösterip, yanlış ölçüm yapılma ihtimalinin yüksek olmasıdır (98). Bu dezavantajı önlemek adına sıçanlara yürüyüş yolunda en az 2 kez alıştırma yürüyüşü yapıldı ve ölçümler doğru olana kadar birkaç kez yürüyüş izi alındı. Martins ve ark. yaptığı çalışmada lif çapı, myelin kalınlığı ve akson çapı ile SFİ arasında, lif çapı ile iletim hızı arasında ve lif sayısı ile amplitüt arasında pozitif bir korelasyon olduğunu saptamışlardır (99). Bizim çalışmamızda da deney gruplarına ait siyatik sinir kesitlerinde birim alana düşen akson sayısı ve akson çapları hesaplandı. Çalışmamızda SFİ testinden elde edilen veriler ile uyumlu olarak EPO, MKH ve EPO+MKH uygulanan gruplarda hasar grubuna göre akson çaplarında anlamlı bir artış vardı. EPO verilen sıçanlarda ise akson çapı artışının Hasar+MKH 'ye göre daha fazla olmasına rağmen sonuçlar SFİ ile uyumlu değildi. Ancak EPO verilen

gruplarda sinir rejenerasyonun olduğu gözlenmesine rağmen sadece MKH'nin verildiği gruba göre iyileşmenin daha yavaş seyrettiğini gördük. EPO verilen gruplarda diğer tedavi gruplarına göre, hasarda morfolojik iyileşme olsa dahi fizyolojik iyileşmenin daha geriden geldiğini gördük.

Yine Marconi S. ve ark. 2012 yılındaki çalışmasında; hasardan sonraki 7, 14, 21, 28 ve 35. günlerde yürüyüş yolu analizi yaparak SFİ analizi yapmışlardır. 14 ve 21. günlerde SFİ kök hücre grubunda anlamlı bir gelişme göstermiş. 35. günde ise her iki grup da neredeyse tamamen normal motor fonksiyona geri döndüğünü göstermişlerdir. Ayrıca hasar sonrası 14. ve 21. günlerde GDNF düzeylerini ELISA yöntemiyle göstermişler ve MKH grubunda anlamlı düzeyde artış gözlenirken, BDNF doku seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığını göstermişlerdir (97). Biz de çalışmamızda, yürüyüş yolu analizini 0, 14 ve 28. günlerde gerçekleştirdik. Hasarlı grupta, Sham grubu ile kıyaslandığında SFİ değerlerinin anlamlı olarak azaldığını gördük. Buna rağmen, Hasar+EPO+MKH grubunun SFİ değeri hasar grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmıştı. Bu da bize 14. günde en iyi iyileşmenin Hasar+EPO+MKH grubunda olduğunu ve bu iyileşmenin hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdi. 28. günde yapılan yürüyüş testinde de Sham grubu ile diğer deney grupları kıyaslandığında tüm hasar oluşturulan gruplarda SFİ değerleri hala düşüktü. Hasar+EPO+MKH grubu Hasar grubuna göre anlamlı derecede daha yüksekti. Hatta Hasar+EPO+MKH grubunda gözlenen SFİ değerindeki bu artış Sham grubundan elde edilen değerlere oldukça yakındı. Bu da bize EPO+MKH birlikte verilen tedavi grubunda EPO+MKH birlikte kullanılması durumunda siyatik sinir hasarındaki iyileşmeyi hızlandırdığını gösterdi.

Nöral hücre iskeleti üç tür filamentten oluşur. Bunlar aktin mikrofilamentleri, mikrotüpler ve nörofilamentlerdir. Nörofilamentler başlıca ara filament türü olup; hafif (NF-L; 68 kDa), orta (NF-M; 160 kDa) ve ağır (NF-H; 200 kDa) olarak gruplandırılırlar. Charcot-Marie-Tooth, parkinson ve amyotrofik lateral skleroz (100) gibi birçok nörodejeneratif hastalıklarda bozuldukları gösterilmiştir. Fosforile edilmiş NF-H'nin ortaya çıkması, olgun nöronların bir belirteci olarak kabul edilir ve diğer alt birimlerin gelişiminden daha sonra ortaya çıkar ve fosforilasyon da sonradan oluşur (101). Ali Eren ve ark. siyatik sinir de tam kat kesi ile hasar oluşturarak yaptıkları çalışmalarında gruplar arası NF-H düzeylerini kıyaslamışlardır.

Elde ettikleri sonuçlara göre hasar grubunda diğer tedavi gruplarına göre NF-H düzeyleri anlamlı olarak daha düşük olduğunu belirtmişlerdir (87). Biz de çalışmamızda NF-H'nin dokulardaki immunreaktivite yoğunluklarını inceledik. Elde ettiğimiz verilere göre, hasar grubundaki NF-H immunreaktivite yoğunluğunun tüm gruplara göre anlamlı şekilde düştüğü belirlendi. En fazla NF-H immunreaktivite yoğunluğu Sham grubunda iken tedavi verilen gruplar Hasar+MKH grubundaki NF-H yoğunluğunun Sham grubuna en yakın olduğunu gördük. Ayrıca Hasar+EPO ve Hasar+EPO+MKH gruplarındaki yoğunluk da Hasar grubuna göre anlamlı şekilde artmıştı. Sonuçlarımız Ali Eren ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzerdi.

Polipeptit yapıda nörotrofik faktör olarak tanımlanan NGF; sinir hasarı sonrası makrofaj, Schwann hücreleri ve fibroblastlardan sentezlenir. Hücre ölümünü sempatik ve duyuşal nöronlarda geri döndürdüğü, aksonal tomurcukların büyüme yönünü etkilediği, miyelinize akson sayısında ve miyelin kalınlığını arttırdığı, nöral internal organizasyonun daha düzgün olmasını sağladığı ve sinir rejenerasyonunu hızlandırdığı saptanmıştır (102). Dias FJ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oluşturdukları crush hasardan 4 hafta sonra sıçanlardan elde ettikleri dokulardan gruplar arasında kıyaslama yapıldığında kontrol ve Sham gruplarında NGF düzeyini benzer ve en düşük düzeyde olduğunu göstermişler. Hasar grubu ile tedavi verdikleri gruplarda ise NGF düzeylerinin daha yüksek ve anlamlı olduğunu göstermişler (103). Biz de çalışmamızda, nörotrofik faktörlerden NGF'nin doku düzeyini immunofloresan boyama yöntemiyle gösterdik. Hasardan 28 gün sonra elde ettiğimiz siyatik sinir dokularındaki NGF immunoreaktivite yoğunluklarının sonuçları Dias Fj ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumluydu. Çalışmada, Sham grubunda en düşük NGF immunoreaktivite yoğunluğu belirlenirken, hasar grubunda ise NGF düzeyi en yüksekti. Hasar+MKH grubunda NGF düzeyi; Hasar, Hasar+EPO, Hasar+EPO+MKH gruplarına kıyasla anlamlı derecede düşüktü. EPO+MKH uygulanan tedavi grubundaki NGF düzeyi Sham grubuna en yakın değere sahipti. Hasar+MKH grubunda, hasara yanıt olarak salgılanan NGF düzeyinin; 4 hafta sonunda rejenerasyonu en iyi tamamlayan grup olduğu için en düşük olduğunu düşündük.

Kaspazlar; başlatıcı, efektör ve inflamatuvar olmak üzere 3 tiptedirler. Hücrede inaktif olup, proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. Sistein proteazlar olup aspartik asitten sonraki bağları kırarlar. 100 den fazla proteini keserek apoptoza neden olurlar. Kaspaz-3 efektör kaspazlar tipindedir (104). Travmatik hasarı takiben birkaç saat

içinde schwann hücrelerinde kaspaz-3 eksprese edilmesiyle apoptoz mekanizması gerçekleşir (105) ve bu wallerian dejenerasyon için iyi bir göstergedir (106). Naoki ve ark. da p38  $\alpha$  mutant ve doğal farelerle yaptığı crush hasar modelinde bizdeki gibi yaklaşık 250 g sabit basınç uygulayan anevrizma klembi kullanılmışlar. Biz çalışmamızda farklı olarak 1,5 dk hasar oluştururken Naoki ve ark. 3 dk hasar oluşturarak Schwann hücrelerinin eksprese ettiği kaspaz-3 immunreaktivitesini incelememişler. Sinir hasarından üç gün sonra, wt (vahşi tip) farelerde siyatik sinirlerde endonöryumun tüm alanında yoğun kaspaz-3 immunreaktivite yoğunluğu bulunmuşken sem farelerde (p38 $\alpha$  ( rejenerasyonda rolü olan gen bölgesi) mutant fare) nadiren bulunmuş (107). Kaspaz-3 ifadesinin Wallerian dejenerasyonunun tanımlanması için güvenilir bir araç olduğu düşünülmekte ve hasarın erken fazında apoptotik sürecin gerçekleştiği düşünülmektedir. Hasardan 2 hafta sonra enkazın kaldırıldığını 3. hafta da Schwann hücrelerinin proliferasyonuna geçiş sürecini başlattığı bilinmektedir (16) Biz çalışmamızı 4 hafta sonra sonlandırdığımız için apoptotik sürecin çoktan tamamlanmış olduğunu ve rejenerasyonun dahi tamamlanmak üzere olduğu için kaspaz-3 immunreaktivite yoğunluğunun oldukça düşük olduğunu gördük. Gruplararası kaspaz-3 hücre sayısının bu nedenden dolayı anlamlı olmadığını düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Umbilikal korddan elde ettiğimiz kök hücreleri akım sitometri ile yüzey belirteçlerinin CD 73, CD 90, CD 105 pozitifliği ve CD19 ve HLA-DR negatifliği ile doğruladık.
2. MKH'lerin 21 gün boyunca farklılaşma besiyerleri uygulanarak adipojenik ve osteojenik dönüşümün gerçekleştiği gösterildi.
3. Hasar oluşturulduktan sonraki 14. ve 28. günlerde yapılan yürüyüş testinde Sham'e en yakın olan, fonksiyonel düzelmenin en iyi olduğu grup Hasar+EPO+MKH olup sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı.
4. Floresan mikroskopta PKH 26 ile işaretlenmiş hücrelerin dokudaki varlığını gösterdik.
5. Oil red O boyama ile siyatik sinirin genel durumu, akson sayıları ve çapları değerlendirildi. Sham grubunda genel yapı normal histolojik görünüme uygundu. Akson sayıları, çapları ve genel histolojik görünüm açısından Sham grubuna en yakın olan tedavi grubu Hasar+MKH grubuydu. Akson çapı ölçümü yönünden incelendiğinde hasar grubuna göre tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış vardı. Akson sayısı açısından ise kök hücrenin verildiği gruplardaki sayının Hasar grubuna göre artışı anlamlıydı.
6. NF-H immunreaktivite yoğunluğu açısından; hasar grubu ile kıyaslama yapıldığında tedavi uygulanan gruplar arasından yoğunluk artışının en fazla olduğu grup Hasar+MKH grubu olması ile birlikte tüm tedavi gruplarındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı.

7. NGF immunreaktivite yoğunluğu açısından hasar grubu ile tedavi uygulanan gruplar kıyaslandığında ise Sham grubundaki gibi Hasar+MKH grubunda da; Hasar, Hasar+EPO ve Hasar+EPO+MKH gruplarına göre anlamlı olarak daha düşüktü.

Çalışmamızdan elde edilen verilere dayanarak, umbilikal kord kaynaklı MKH uygulaması periferik sinir rejenerasyonu üzerine olumlu etki etmektedir. rhEPO uygulaması da kök hücre kadar etkili olmamakla birlikte yine de rejenerasyona katkı sağlamaktadır. İkisini birlikte uyguladığımızda beklediğimiz sinerjik etkiyi histopatolojik olarak göremedik ve MKH'ın tek başına uygulandığı gruba ait sinir kesitlerinde histopatolojik sonuçlar daha olumluydu. Ancak fizyolojik test olan SFİ hesaplamasında ise kombine tedavi verilen gruptaki sonuçlar kök hücrenin tek başına verildiği gruba göre daha iyi olup, Sham'e en yakın değere sahipti.

28. günde kaspaz-3 boyaması ile hasardan sonra uzun bir süre geçtiği için apoptozu anlamlı olarak saptayamadık. Apoptozu değerlendirmek için gruplardan hasar oluşturulduğu andan itibaren farklı zaman noktalarında sonlandırılan aşamalı deneylerin yapılıp kıyaslanması ile daha verimli sonuçlar alınabilir.

Kök hücrelerin Schwann hücre ve benzerlerine dönüşüp dönüşmediğini göstermek için özel yöntemler kullanılarak ileri çalışmaların yapılması ile kök hücrelerin etkisinin daha objektif ölçülmesi sağlanabilir.

Kök hücre ve EPO'nun birlikte kullanımından beklediğimiz sinerjik etkiyi görememekle birlikte; kök hücre tedavilerinin tek başına ya da başka maddelerle kombine edilerek etkilerinin değerlendirilmesi ile sinir hasarı oluşan hastaların tedavisine ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil* 2008; 87, 381-385.
2. Scholz T, Sumarto A, Krichevsky A, Evans GR. Neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells for peripheral nerve regeneration in vivo. *Arch Surg* 2011;146, 666-674.
3. Grinsell D., Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed Res Int* 2014; 698256,1-13.
4. Hu J, Zhu Q-T, Liu X-L, Xu Y-b, Zhu J-K. 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.
5. Heine W, Conant K, Griffin J.W, and Hoke A. Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically degenerated peripheral nerves. *Exp Neurol* 2004; 189-231.
6. Chen C.-J, Ou Y.-C, Liao S.-L, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol* 2007; 204-443.
7. Gärtner A, Pereira T, Armada-da-Silva P.A.S, et al. Use of poly (DL-lactide-ε-caprolactone) membranes and mesenchymal stem cell from the Wharton's jelly of the umbilical cord for promoting nerve regeneration in axonotmesis,2012,84:355-365.
8. Haapaniemi T, Nylander G, Kanje M, Dahlin L. Hyperbaric oxygen treatment enhances regeneration of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol*.1998;149:433–8.
9. Can A. Kök Hücre-Biyolojisi,Türleri ve Tedavide Kullanımları,Akademisyen Tıp Kitapevi,2014.
10. Karahüseyinoğlu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem cells* 2007; 25:319-331.
11. Yang CC, Wang Y, Chen SC, Jan YM, Hsieh YL, Enhanced functional recovery from sciatic nerve crush injury through a combined treatment of cold-water swimming and mesenchymal stem cell transplantation, *Neurological Research* 2015,816-826.
12. Liu N, Tian J, Cheng J, & Zhang J. Effect of erythropoietin on the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the acute kidney injury microenvironment. *Experimental Cell Research* 2013; 319: 2019–2027.
13. Lin J. S, Chen Y. S, Chiang H. S & Ma M.C. Hypoxic preconditioning protects rat hearts against ischaemia-reperfusion injury: Role of erythropoietin on progenitor cell mobilization. *The Journal of Physiology* 2008; 586, 5757–5769.
14. Sundem L, Tseng KC, Haiyan Li H, et al. Erythropoietin Enhanced Recovery after Traumatic Nerve Injury: Myelination and Localized Effects October 2016; 41: 999–1010.

15. Michael B, Geary, Haryan I, Zingman A, et al. Erythropoietin accelerates functional recovery after moderate sciatic nerve crush injury. *Muscle Nerve* 2017; 56:143-151.
16. Ross MH, Pawlina W, çeviri Baykal B, *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*, Palme. Ankara, 2014; 6.
17. Kocacan M., Erdoğan, Sıçanlarda, Yağ dokusu kökenli kök hücre uygulamasının periferik sinir onarımına etkisi. Selçuk üni., Uzmanlık tezi, 2014.
18. Kierszenbaum L.A, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş*. M.D,PhD,Prof.Dr.Demir R, Palme Yayıncılık,Ankara,2006.
19. Thanos PK, Okajima S, Terzis JK. 1998. Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration. *J. Reconstr. Microsurg.* 14:423-436.
20. Lawrence H. *Cells and Tissue*, Gray's Anatomy. Edinburgh: Williams PL Churchill Livingstone. 1995.17-90 p.
21. Janquerira Luiz Carlos CJ. *Temel Histoloji*. Solakoğlu Seyhun AY, editor: Nobel Tıp Kitapevi. 2009.162 p.
22. Luse SA. Formation of myelin in the central nervous system of mice and rats, as studied with the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cy.* 1956.2:777-784.
23. Nebiloğlu S. Periferik Sinir Yaralanmalarında Kalsiyum Kanal Blokerleri ile Birlikte Sigara Dumanı Maruziyetinin Sinir iyileşmesi Üzerine Etkisinin Araştırılması. Konya. Uzmanlık tezi 2012.16 p.
24. Myers RR. Morphology of the peripheral nervous system and its relationship to neuropathic pain. *Anesthesia: Biologic Foundations*, Yaksh TL, Lynch III C, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ (eds), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998 . s: 487.
25. Abraham L. K. 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Ramazan D, editor. Ankara: Palme Yayıncılık.
26. Kline DG, Hudson AR. Vertebral artery compression. *J. Neurosurg.* 1995.83:759.
27. Hunt CG. Peripheral Nerve Biomechanics: Application to neuromobilization approaches. *Phys Ther* 2002.7:1:10.
28. Brushart TM. *Nerve Repair and Grafting*. Operative Hand Surgery NY. Churchill Livingstone. 1999.
29. langman medikal embriyoloji Sadler T.W. çev:Başaklar A.C. Palme yayıncılık 11.baskı s:299-301 .
30. Kaplan S, Odaci E, Unal B, Sahin B, Fornaro M. Chapter 2: Development of the peripheral nerve. *Int. Rev. of Neurobiol.* 2009. 87:9-26.
31. Asato F, Butler M, Blomberg H, Gordh T. Variation in sciatic nerve anatomy: implications for a rat model of neuropathic pain. *J Peripher Nerv Syst.* 2000;5:19-21.

32. Popesko P, Rajtova R, Horak J: A colour atlas of small laboratory animals volume 2, Rat, mouse, hamster. Wolfe 1998, s:306-440.
33. Sarigüney Y: 20 Periferik Sinir Yaralanmalarının Onarımında Trombositten Zengin Plazma'nın Sinir Rejenerasyonu Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara,2006,S: 42.
34. Seddon HJ. Three types of nerve injury. Brain 1943;66: 237-288. .
35. Snell RS, Organization of the nervous system. Clinical Neuroanatomy Boston, Little.
36. Ducker T.B, Klempe LG, Hayes GJ, The Metabolic Background of peripheral Nerve Surgery. J of Neurosurg, 1969;270: 30-31.
37. Grant GA, Klot M. Youmans neurological surgery. 2003, fifth edition p.3795-3797.
38. Özer H., Bozkurt G. Uzmanlık tezi, Hacettepe üni. Deneysel isyatik sinir yaralanmasında poli (3-hidroksibütirat) ve chitosan kaplı tübüler greftler ile birlikte mezenkimal kök hücre kullanımının aksonal rejenerasyona etkisi, 2013 Ankara .
39. Demircan N, Zileli M. Periferik Sinir Cerrahisi 2008; birinci baskı sf.102-103.
40. Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. Ann Plast Surg 1989;22:257-73.
41. Lundborg G. The nerve trunk. Nerve injury ve repair. Churchill Livingstone, New York,1998, s: 151.
42. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Ann. Rev. Cell Dev. Bi. 2001.17:435-462.
43. Luna J, Masamunt MC, Lawrance IC, Sans M. 2011. Mesenchymal cell proliferation and programmed cell death: key players in fibrogenesis and new targets for therapeutic intervention. Am. J. Physiol-Gastr. L. 300:G703-708.
44. Watt FM, Celso CL, Silva-Vargas V. 2006. Epidermal stem cells: an update. Curr. Opin. Genet. Dev. 16:518-524.
45. Potten CS,Wilson JW. The Development of Epithelial Stem Cell Concepts. Essentials of Stem Cell Biology. Lanza R (Ed.), San Diego, USA, Academic Press,2009,pp:17-27.
46. Türkiye Bilimler Akademisi. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Can A, editor. Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi. 2009.15-16 p.
47. De Coppi P, Bartsch G, Jr.et all. isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat biotechnol,2007,25:100-106.
48. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J. Embryol. Exp. Morph. 1966.16:381-390.

49. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970.3:393-403.
50. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*,1999, 284:143-147.
51. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991.9:641-650.
52. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (New York, NY)* 1997. 276:71-74.
53. Kaltz N, Ringe J, Holzwart C et al., Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. *Exp Cell Res*,2010, 316:2609-2617.
54. Balci D, Can A. Human umbilical cord stroma-derived stem cells from four different tissue subcompartments having distinct stemness properties retain their characteristics when isolated using explant cultures. *International Society for Stem Cell Research (I.*
55. Nanaev AK, Kohnen G, Milovanom AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*,1997,18:53-64.
56. Can A, Karahuseyinoglu ES. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*,2007, 25: 2886-2895.
57. Saruger R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*,2005, 23: 220-229.
58. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*,2007, 25: 1384-1392.
59. Bongso A, Fong CY, Gauthaman K. Taking stem cells to the clinic: Major challenges. *J Cell Biochem*,2008, 105: 1352-1360.
60. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM et al. Matrix cells from warton's jelly for neurons and glia. *Stem Cells*,2003, 21: 50-60.
61. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*,2006, 24: 781-792.
62. Ding DC, Shyu WC, Chiang MF et al. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. *Neurobiol Dis*,2007, 27: 339-353.
63. Lund RD, Wang S, Lu B et al. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells*,2007, 25: 602-611.

64. Can A, Balci D. Isolation culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*,2011, 698: 51-62.
65. Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica*. 1998;83:724-32.
66. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985;313:806-10.
67. Bahlmann FH, de Groot K, Haller H, Fliser D. Erythropoietin: is it more than correcting anaemia? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2004;19:20-2.
68. Savino R, Ciliberto G. A paradigm shift for erythropoietin: no longer a specialized growth factor, but rather an all-purpose tissue-protective agent. *Cell death and differentiation*. 2004;11 Suppl 1:S2-4.
69. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol*,2008, 141:14 –31.
70. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26:1269-74.
71. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005;105:4604-12.
72. Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, et al. Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci*. 2002;16:584-92.
73. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleitter CH, Bruck W, Ehrenregch H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol (Berl)*,2001, 101: 271-276.
74. Campana WM, Myers RR. Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci*,2003, 18: 1497–1506.
75. Keswani SC, Buldanlıoğlu U, Fischer A, et al. A novel endogenous erythropoietin mediated pathway prevents axonal degeneration. *Ann Neurol*,2004, 56: 815-826.
76. Okutan O, Solaroğlu İ, Beşkonaklı E, Taşkın Y. Recombinant human erythropoietin decreases myeloperoxidase and caspase-3 activity and improves early functional results after spinal cord injury in rats. *Journal of Clinical Neuroscience*,2007, 14: 364-8.
77. Noorafshan A, Omidi A, Karbalay-Doust S. Curcumin protects the dorsal root ganglion and sciatic nerve after crush in rat. *Pathol. Res. Pract*,2011, 207:577-582.
78. Akın O, Kutlay M, Demirel D, Kıbııcı K, Elbüken E. tavşan siyatik sinirinde ezilme travzması sonrasında akut dönemde oluşan histopatolojik değişiklikler üzerine hiperbarik oksijen tedavisinin etkileri, *AÜTD*,1997,29:500-506.

79. Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, et al. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:823–828. .
80. Elfar JC, Jacobson JA, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ. Erythropoietin accelerates functional recovery after peripheral nerve injury. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90:1644–1653.
81. Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Paediatr. Suppl.* 2002;91(438):36–42. .
82. El-Kordi A, Radyushkin K, Ehrenreich H. Erythropoietin improves operant conditioning and stability of cognitive performance in mice. *BMC Biol.* 2009;7:37.
83. Ozmen S, Ayhan S, Latifoglu O, Siemionow M. Stamp and paper method: a superior technique for the walking track analysis. *Plast. Reconstr.Surg.*2002,109:1760-1761.
84. Varejao AS, Cabrita AM, Meek MF, et al. Functional and Morphological Assessment of a Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury with a Non-Serrated Clamp. *Journal of neurotrauma* 2004; 21: 1652-1670.
85. 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.
86. Erken HA, Koc ER, Yazıcı H1, Yay A, Önder GÖ, Sarıcı SF. Selenium partially prevents cisplatin-induced neurotoxicity: A preliminary study *Neurotoxicology* 2014. 42:71-75.
87. Eren A, Atalar H, Seymen CM, et all. Sutureless approach with vein grafts and mesenchymal stem cells in primary nerve repair: Functional and immunohistological results, *wiley microsurgery*, 2018;38:780–789.
88. Gärtner A, Pereira T, Armada-da-Silva PAS, et all. Effects of umbilical cord tissue mesenchymal stem cells (UCX®) on rat sciatic nerve regeneration after neurotmesis injuries, *journal stem cells and regenerative medicine*, 2017, issn 0973-7154.
89. Pan HC, Yang DY, Chiu ,YT et all Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. Department of Medical Research, Taichung Veterans General Hospital, Taichung, R.O.C. (40705), 1 Ap, *J Clin Neurosci.* 2006,13:570-5.
90. Fernandes M, Valente SG, Sabongi RG et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res.* 2018 Jan;13:100-104.
91. Çelik M, Gökmen N, Erbayraktar S, Akhisaroğlu M, Konakcı S, Ulukuş C et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 2258–2263.

92. Sekiguchi Y, Kikuchi S, Myers, Campna WM. Erythropoietin inhibits spinal neuronal apoptosis and pain following nerve root crush. *Spine*.2003, 28:2577-84.
93. Caillaud M, Chantemargue B, Richard L, et all. Local low dose curcumin treatment improves functional recovery and remyelination in a rat model of sciatic nerve crush through inhibition of oxidative stress. *Neuropharmacology*. 2018 Sep 1;139:98-116.
94. Wood RL, Karlinsey KS, Thompson AD, Rigby MN, et all. Baseline effects of lysophosphatidylcholine and nerve growth factor in a rat model of sciatic nerve regeneration after crush injury. *Neural Regen Res*. 2018 May;13:846-853.
95. Mullerad M, Donohue JF, Li PS, Scardino PT and Mulhall JP. Functional Sequelae of Cavernous Nerve Injury in the Rat: Is There Model Dependency. *The Journal of Sexual Medicine* 2006;3:77-83.
96. Beer GM, Steurer J and Meyer VE. Standardizing Nerve Crushes with a Non-Serrated Clamp. *Journal of reconstructive of microsurgery* 2001;17:531-534. .
97. Silvia M, Giusy C, Ermanna T, et all. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Systemically Injected Promote Peripheral Nerve Regeneration in the Mouse Model of Sciatic Crush. *Tissue Engineering*;2012,18:1264-72.
98. Luis AL, Amado S, Geuna S, Rodrigues JM, et all. Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurosci Methods*. 2007;163:92–104.
99. Martins RS, Siqueira MG, da Silva CF, Plese JP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006;64:750–6.
100. Al-Chalabi A, Miller C.C. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays*. 2003 Apr;2:346-55.
101. Sanna MD, Ghelardini C, Galeotti N. Effect of amitriptyline treatment on neurofilament-H protein in an experimental model of depression. *Brain Research Bulletin* Volume 128, January 2017, Pages 1-6.
102. Zhuk ON, Kalyunov VN. Effect of nerve growth factor on the regeneration of fibers in the rat sciatic nerve. *Neurosci Behav Physiol*. 1997, 27, s. 541–4.
103. Dias FJ, Fazan VPS, Cury DP, de et al. Growth factors expression and ultrastructural morphology after application of low-level laser and natural latex protein on a sciatic nerve crush-type injury. *PLoS ONE*,2019,14: e0210211.
104. Coşkun G,Özgür H, Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması dergi park Arşiv 2011; 20: 145.
105. Stenberg L, Kanje M, Dolezal K, Dahlin LB: Expression of activating transcription factor 3 (ATF3) and caspase 3 in Schwann cells and axonal outgrowth after sciatic nerve repair in diabetic BB rats. *Neurosci Lett* 2012, 515:34–38.

106. Maeno I, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y: Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:9487–9492 .
107. Kato N, Matsumoto M, Kogawa M, et al. Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury in vivo. *Journal of Neuroinflammation* 2013, 10:1.

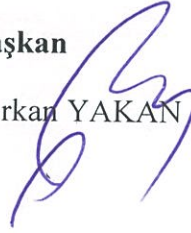


## TUTANAK

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Menekşe ÜLGER, 03/10/2019 tarihinde yapılan “Siyatik sinir hasarı oluşturulan sıçanlarda eritropoetinin ve umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin sinir rejenerasyonu üzerine etkisi” Tıpta Uzmanlık Tezi Değerlendirme Sınavında başarılı olmuştur. İş bu tutanak tarafımızca imza altına alınmıştır.

**Başkan**

Prof. Dr. Birkan YAKAN



**Üye**

Prof. Dr. Oya EVİRGİN



**Üye**

Doç. Dr. Jale SELLİ

