



**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA REKÜRREN LARENGEAL**  
**SİNİRDE EZİLME HASARI SONRASI KÖK HÜCRE**  
**UYGULANMASININ SİNİR REJENERASYONUNA**  
**ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ubeydullah Hikmet YURDAKUL**

**KAYSERİ – 2019**



**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA REKÜRREN LARENGEAL  
SİNİRDE EZİLME HASARI SONRASI KÖK HÜCRE  
UYGULANMASININ SİNİR REJENERASYONUNA  
ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Ubeydullah Hikmet YURDAKUL**

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Alperen VURAL**

**KAYSERİ – 2019**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca, geniş mesleki bilgi ve tecrübesinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Yaşar Ünlü'ye, Prof. Dr. Mustafa Erkan'a, Prof. Dr. İbrahim Ketenci'ye, Prof. Dr. Mehmet Akif Somdaş'a, Prof. Dr. Sedat Çağlı'ya, Prof. Dr. İmdat Yüce'ye,

Tez sürecindeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Ali Bayram'a,

İhtisasım boyunca tecrübe ve bilgisiyle her zaman bana destek olmuş sahip oldukları fikirleri ile beni aydınlatan saygıdeğer ağabeylerim Dr. Öğr. Üyesi Mehmet İlhan Şahin ve Dr. Öğr. Üyesi Kerem Kökoğlu'na,

Tezimin oluşumunun ilk gününden bitimine kadar tüm aşamalarında bilgisini ve yardımını esirgemeyen; bilgisi, becerisi ve çalışma prensiplerinin yanında şahsiyet olarak da örnek aldığım değerli ağabeyim ve tez hocam Dr. Öğr. Üyesi Alperen Vural'a,

Tez çalışmama yardımlarından dolayı, kök hücre temini ve uygulanmasında yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin Gönen'e, elektrofizyolojik çalışmaları birlikte yürüttüğüm değerli ağabeyim Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih Yetkin'e, histolojik çalışmalarda yardımını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Arzu Yay ve Arş. Gör. Dr. Gözde Özge Önder'e, sinir hasarı uyguladığımız cihazın tasarımını sağlayan makine mühendisi Dr. Öğr. Üyesi Şaban Murat Ünlü'ye, istatistik konusunda yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Meltem Ünlüsavuran'a,

Asistanlık döneminin heyecanını, stresini ve güzelliklerini birlikte yaşadığımız tüm asistan arkadaşlarıma ve beraber çalışma fırsatı bulduğum tüm hastane personeline Bulduğum konuma gelmemde büyük emeği olan, hayata dair çok şey öğrendiğim kıymetli anneme, babama ve kardeşlerime,

Varlığıyla bana huzur veren ve en zor koşullarda bile desteğini esirgemeyen değerli eşim Büşra Yurdakul ve doğduğundan beri neşemiz olan biricik kızımız Deniz Yurdakul'a,

Sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Ubeydullah Hikmet Yurdakul

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
TABLO LİSTESİ .....	iv
ŞEKİL LİSTESİ .....	v
RESİMLER LİSTESİ .....	vi
KISALTMA LİSTESİ .....	vii
ÖZET .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. PERİFERİK SİNİR .....	3
2.1.1. Periferik sinir anatomisi .....	3
2.1.2. Periferik sinir fizyolojisi .....	5
2.1.3. Periferik sinir hasarı .....	6
2.1.4. Sinir dejenerasyonu .....	9
2.1.4.1. Proksimal segmentte meydana gelen değişiklikler .....	9
2.1.4.2. Distal segmentte meydana gelen değişiklikler .....	10
2.1.5. Sinir rejenerasyonu .....	10
2.1.5.1. Proksimal segmentte meydana gelen değişiklikler .....	11
2.1.5.2. Distal segmentte meydana gelen değişiklikler .....	12
2.2. KÖK HÜCRE .....	14
2.2.1. Kök hücre tanımı ve özellikleri .....	14
2.2.2. Kök hücre türleri .....	16
2.2.2.1. Erişkin kök hücreler .....	17
2.2.2.2. Mezenkimal kök hücreler .....	18
2.2.2.3. Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler .....	19

2.2.3. Yağ doku kökenli kök hücrelerin doku onarımına etkisi .....	19
2.3. SIÇANLARDA LARİNKS ANATOMİSİ .....	20
2.4. REKÜRREN LARENGEAL SİNİR ANATOMİSİ .....	21
2.5. LARENGEAL EMG .....	22
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>24</b>
3.1. DENEY GRUPLARININ BELİRLENMESİ .....	24
3.2. YAĞ DOKUSU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ .....	25
3.3. SENSÖRLÜ KLEMP TASARIMI .....	26
3.4. VOKAL KORD MUAYENESİ.....	26
3.5. EMG.....	27
3.6. CERRAHİ İŞLEMLERİN YAPILMASI.....	29
3.6. HİSTOLOJİK İNCELEME.....	31
3.6.1. Larengeal sinir frozen kesitlerin hazırlanması .....	31
3.6.2. İmmunohistokimyasal uygulama.....	32
3.7. İSTATİKSEL ANALİZ .....	32
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>33</b>
4.1. VOKAL KORD MUAYENE BULGULARI .....	33
4.2. EMG BULGULARI.....	35
4.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI .....	39
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>52</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>53</b>
<b>TEZ ONAY SAYFASI.....</b>	<b>64</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Seddon ve Sunderland Sınıflaması.....	7
<b>Tablo 2.</b> Vokal kord hareket skalası .....	27
<b>Tablo 3.</b> Frozen kesitlerde Oil Red O boyama metodu .....	31
<b>Tablo 4.</b> Hasar sonrası 2. ayda vokal kord hareketi.....	35
<b>Tablo 5.</b> MÜP amplitüdünün zamana göre değişimi .....	37
<b>Tablo 6.</b> MÜP amplitüdlерinin p değeri tablosu .....	37



## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	Myelinli sinir lifi a. Işık mikroskopisi, b. Elektron mikroskopisi şematik görünümü.....	4
<b>Şekil 2.</b>	Periferik sinirin kesitsel anatomisi.....	5
<b>Şekil 3.</b>	Aksiyon potansiyeli oluşumu.....	6
<b>Şekil 4.</b>	Periferik sinir zararlanma modelleri .....	8
<b>Şekil 5.</b>	Asimetrik hücre bölünmesi .....	15
<b>Şekil 6.</b>	Totipotent, Pluripotent ve Multipotent hücreler .....	17
<b>Şekil 7.</b>	Rekürren larengeal sinirin seyri .....	22
<b>Şekil 8.</b>	MÜP amplitüdünün zamana göre değişimi.....	38
<b>Şekil 9.</b>	Grupların 2. aydaki MÜP amplitüdlерinin karşılaştırılması .....	38
<b>Şekil 10.</b>	Akson sayımı .....	42
<b>Şekil 11.</b>	Akson çapı .....	42
<b>Şekil 12.</b>	S100 immunoreaktivite yoğunluğu .....	44

## RESİMLER LİSTESİ

<b>Resim 1.</b>	Sensörlü klemp sistemi.....	26
<b>Resim 2.</b>	Endoskopik larenks muayenesi .....	27
<b>Resim 3.</b>	EMG cihazı.....	28
<b>Resim 4.</b>	A. EMG elektrodu B. Larengeal EMG'nin yapılışı.....	28
<b>Resim 5.</b>	A. Sıçanların operasyona hazırlanması, B. Cilt, cilaltı dokuların kesilmesi, C. Strep kasların geçilmesi, D. Kök hücre uygulanması, E. RLS (beyaz ok), prolen sütür ile işaretlenmesi, F. Cilt ve cilt altı dokuların uygun olarak kapatılması. ....	30
<b>Resim 6.</b>	Hasar öncesi normal kord hareketi ve hasar sonrası sol vokal kord paralizisi .....	34
<b>Resim 7.</b>	Uyurken spontan solunum esnasındaki normal EMG.....	35
<b>Resim 8.</b>	Hasar sonrası hemen bakılan EMG. ....	36
<b>Resim 9.</b>	Hasar sonrası 2. Ayda yapılan EMG. ....	36
<b>Resim 10A.</b>	Kontrol grubuna ait bir sinir kesiti .....	37
<b>Resim 10B.</b>	Kontrol grubuna ait sinir kesitinde aksonal dejenerasyon (ok) ve myelinli sinir liflerinin kaybı (daire) .....	37
<b>Resim 10C.</b>	Çalışma grubuna ait bir sinir kesiti.....	38
<b>Resim 10D.</b>	Schwann hücresi ile çevrili ince miyelinli sinir lifleri (ok).....	38
<b>Resim 11.1.</b>	Kontrol grubuna ait bir sinir lifinin S100 ile boyanması.....	43
<b>Resim 11.2.</b>	Çalışma grubuna ait bir sinir lifinin S100 ile boyanması .....	43

## KISALTMA LİSTESİ

<b>ark.</b>	: Arkadaşları
<b>ATDMSC</b>	: Adipose tissue derived mesenchymal stem cells
<b>bFGF</b>	: Basic fibroblast growth factor
<b>EGF</b>	: Epidermal growth factor, EGF
<b>EMG</b>	: Elektromyografi
<b>HGF</b>	: Hepatocyte growth factor
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	: İnterleukin-1 $\beta$
<b>ISCT</b>	:Uluslararası hücresel tedavi derneği
<b>iPSCs</b>	: İnduced pluripotent stem cells
<b>İTA</b>	: İnförior tiroid arter
<b>iv</b>	: İntravenöz
<b>LEMG</b>	: Larengeal elektromyografi
<b>MKH</b>	: Mezenkimal kök hücreler
<b>MMP-8</b>	: Matriks metalloproteinaz-8
<b>MÜP</b>	: Motor ünite potansiyel
<b>NGF</b>	: Nerve growth factor
<b>PBS</b>	: Phosphate-buffered saline
<b>PCL</b>	: Polycaprolactone
<b>PDGF</b>	: Platelet-derived growth factor
<b>RLS</b>	: Rekürren larengeal sinir
<b>SH</b>	: Schwann hücreleri
<b>SPSS</b>	: Statistical Package for the Social Sciences
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming growth factor- $\beta$
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	: Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>YDKMKH</b>	: Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre

## ÖZET

**Amaç:** Vokal kord paralizisi sonrası lokal olarak uygulanan yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerinin rekürren larengeal sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel düzelme üzerine etkisini incelemektir.

**Materyal ve metod:** Bu kontrollü prospektif çalışmada 22 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar kök hücre uygulanmayan grup (kontrol grubu) ve kök hücre uygulanan grup (çalışma grubu) olarak iki gruba ayrıldı. Sıçanların sol rekürren larengeal sinirleri (RLS) disseke edilerek, sinire bu çalışma için geliştirilmiş basınç sensörlü bir cihazla 1 dk boyunca basınç uygulanarak her hayvanda standard bir ezilme hasarı oluşturuldu. Çalışma grubundaki sıçanlara izole edilen ve hücre karakteri flow sitometri ile yapılan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler (YDKMKH) lokal olarak uygulandı. Her sıçanın vokal kordları cerrahi işlem öncesi, hasar sonrası hemen ve hasardan sonra 2. ayda muayene edildi. Yine her sıçanın larengeal elektromyografisi (LEMG) cerrahi işlem öncesi, hasar sonrası hemen ve hasardan sonra 2. ayda motor ünite potansiyel (MÜP) amplitüdüleri açısından değerlendirildi. Hasar sonrası 2. ayda larengeal sinir biyopsisi alınarak sıçanlar sakrifiye edildi. Sinir biyopsisinde histolojik olarak akson sayısı, akson çapı ve s100 ekspresyonuna bakıldı.

**Bulgular:** Hasar sonrası 2. ayda yapılan vokal kord muayenesinde kord hareketlerinde iki grupta da tamamen düzelme görüldü. Çalışma grubundaki MÜP amplitüd ölçümünün zamana göre değişimi anlamlı olarak bulundu ( $p<0.001$ ). Kontrol grubundaki MÜP amplitüd ölçümünün zamana göre değişimi de anlamlı olarak bulundu ( $p=0.001$ ). Çalışma ve kontrol gruplarının hasar sonrası 2. ayda yapılan EMG'lerinde saptanan MÜP amplitüdüleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.262$ ).

Akson sayımı açısından karşılaştırılma yapıldığında çalışma grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı fark gözlenmedi ( $p=0.313$ ). Akson çapı açısından karşılaştırma yapıldığında kontrol grubunda çalışma grubuna göre anlamlı farklılık gözlemlendi ( $p<0.001$ ). S100 immunoreaktivite yoğunluğu açısından çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0.128$ ).

**Sonuç:** Vokal kord paralizisi sonrası lokal olarak uygulanan yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerinin sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel düzelme üzerine etkisi incelenen bu çalışmada kök hücre verilen grupta verilmeyen gruba göre anlamlı farklılık izlenmedi.

**Anahtar Kelimeler:** Rekürren Larengeal Sinir, Sinir Rejenerasyonu, Yağ Dokusu Kökenli Mezenkimal Kök Hücre, Vokal Kord Paralizisi



## ABSTRACT

**Aim:** The aim of this study is to evaluate the effect of locally injected adipose tissue derived mesenchymal stem cells on nerve regeneration and functional recovery after vocal fold paralysis.

**Materials and methods:** Twenty two Sprague-Dawley male rats were used in this prospective controlled study. Rats were divided into two groups as control (no intervention after crush injury) and study (application of locally injected stem cells after crush injury). Rat's left recurrent laryngeal nerves were dissected and crushed with a newly developed device with pressure gauge for one minute in order to apply a standardized crush injury. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ATDMSC) were applied locally to left RLN's of each rat in the study group. Each rat's vocal fold motion was examined before, immediately after and two months after crush injury. Each rat was evaluated with laryngeal electromyography in terms of motor unit potential amplitudes before, immediately after and two months after crush injury. Two months after the injury, the crushed segment of the laryngeal nerves were excised for histologic evaluation in terms of axon numbers, axon diameters and S100 expression and then the rats were sacrificed.

**Results:** Vocal cord examinations performed two months after the injury showed complete recovery in both groups. The change in MUP amplitude measurements over time was significant in the study group ( $p < 0.001$ ). The change in MUP amplitude measurement over time was also significant in the control group ( $p = 0.001$ ). There was no statistically significant difference between the MUP amplitudes of the study and control groups at 2 months after injury ( $p = 0.262$ ).

When the axon counts were compared, no significant difference was observed between the study and control groups ( $p = 0.313$ ). When the axon diameters were compared, a significant difference was observed in the control group compared to the study group ( $p < 0.001$ ). There was no significant difference in S100 immunoreactivity intensity between the two groups ( $p = 0.128$ ).

**Conclusion:** The effect of locally injected adipose tissue derived mesenchymal stem cells on nerve regeneration and functional recovery after vocal cord paralysis was not observed in this study.

**Key Words:** Adipose-derived mesenchymal stem cells, nerve regeneration, recurrent laryngeal nerve, vocal fold paralysis,



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanlarda RLS bir çok nedenle paralize olabilir, bunlar içerisinde baş boyun bölgesi cerrahileri, özellikle de tiroid cerrahisi önemli yer tutar. Unilateral RLS hasarı aynı tarafta vokal kord paralizisine ve sağlam taraftaki krikotiroid kasın kontraksiyonu nedeni ile oluşan adduksiyona bağlı olarak vokal kordun paramedian pozisyonda kalmasına neden olur. Böylece ses kısıklığı ve boğuk ses oluşur. Sinir larinksin alt kısmının duyusunu sağladığı ve rima glottis tam kapanmadığı için aspirasyon meydana gelir (1). Bilateral RLS hasarında ise her iki vokal kord paramedian pozisyonundadır. En belirgin semptom havayolu obstrüksiyonudur. Vokal kordların fonatuar pozisyona yakın konumları nedeniyle normale yakın ses mevcuttur.

Larengeal nöroanatomiyi anlamadaki avantajlarımıza ve rekürren larengeal sinir hasarı hakkında yazılmış onlarca literatüre rağmen, vokal kord paralizisin tedavisindeki temel dayanak noktaları 20. ve 21. yüzyılda neredeyse aynı kalmıştır. Bilateral vokal kord paralizisi tedavisinde geçici ve uzun süreli olmak üzere tedavi yöntemleri mevcuttur. Geçici, yani geri dönüşümlü tedaviler; trakeotomi, larengeal botoks enjeksiyonu ve endo-ekstralarengeal sütür lateralizasyonudur. Uzun süreli cerrahi tedaviler ise transvers kordotomi, endoskopik total veya parsiyel aritenoidektomi ve larengeal uyarıcılarıdır.

Unilateral vokal kord paralizisinde zamanla teknik gelişmeler olsa da Isshiki tarafından tanımlanan medializasyon tiroplastisi (2) ve Bruening tarafından tanımlanan enjeksiyon laringoplastisi (3) tek cerrahi seçenekler olmuşlardır. Bu tedaviler fizyolojik larengeal hareketi düzeltmekten ziyade glottik gapı kapatmaya yönelik tedavilerdir. Ancak bazı

larengeal reinnervasyon teknikleri tanımlanmıştır. Bunlar uç-uca anastomoz, sinir ucunun direk implantasyonu veya larengeal kas sistemi içine sinir-kas pedikülü ve ansa servikalis-RLS reinnervasyonudur ki bu tedavilerin sonuçları istenilen seviyede değildir. Bu yüzden RLS rejenerasyonunu ve dinamik düzelmeyi sağlayabilecek metodlar üzerinde düşünölmeye başlanmıştır. Bazı araştırmalar nörotropik faktörler üzerine olmuştur. Yakın zamanda üzerinde çalışılan bu faktörlerden bazıları insülin benzeri büyüme faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve androjen terapisi (4-6).

YDKMKH multipl mezenkimal fenotiplere dönüşebilme ve çoğalabilme özelliklerine sahip hücrelerdir. Bu hücreler nörotrofik faktör ve sitokinler gibi önemli bioaktif bileşkenleri salgırlar ki bunlar da nöral korumayı, neovaskülarizasyonu ve aksonal filizlenmeyi sağlar(7).

Hayvan modelleri ve insan deneme çalışmaları göstermiştir ki inme ve spinal kord hasarı sonrası uygulanan mezenkimal kök hücreler güvenlidir ve fonksiyonel iyileşme sağlayabilir (8, 9). Ayrıca intravenöz mezenkimal kök hücre terapisi periferik sinir rejenerasyonu artırabilir (10).

Bu çalışmanın amacı vokal kord paralizisi sonrası lokal olarak uygulanan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel düzelme üzerine etkisini incelemektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. PERİFERİK SİNİR**

#### **2.1.1. Periferik sinir anatomisi**

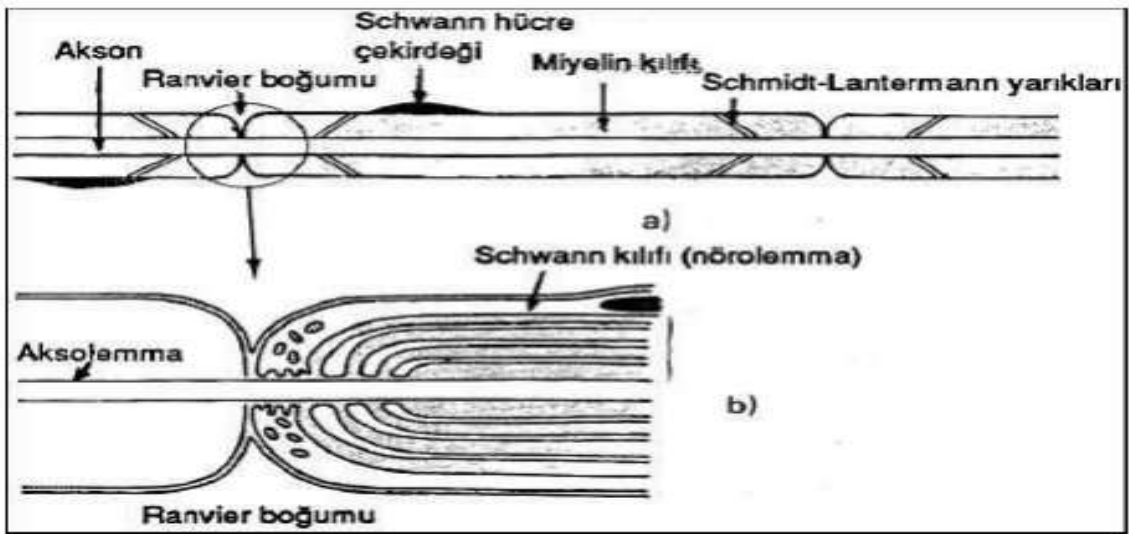
Embriyolojik olarak periferik sinirler “ektoderm” tabakasından gelişir. Nöral krest hücreleri gestasyonun üçüncü ve dördüncü haftalarında nöroektodermi oluştururlar ve bu yapı mezoderme doğru göç eder. Burada Schwann hücrelerine (SH), dorsal kök gangliyonlarına ve diğer nöroblastik hücrelere dönüşürler. Spinal kordun gelişme süresinde, bazal plaktaki motor nöron aksonları mezodermal tabakadan gelişen kas dokusu içine dağılırlar. Dorsal kök gangliyonlarından da perifere doğru dağılma başlar. Fetal yaşamın yaklaşık 16. haftasında SH’leri bu dağılan aksonların myelinizasyonuna başlarlar. Bazı motor nöronlarda ise bu myelinizasyon doğum sonrası birinci yıla kadar uzayabilir (11).

Periferik sinir dokusu, sinir lifleri ve çevre destek dokudan oluşur. Periferik sinir sisteminin temel hücresel yapıları ise nöronlar ve SH’dir. Nöron, bir hücre gövdesi ve hedef organa ulaşan aksonal uzantıdan oluşur. Nöronlar fonksiyonel rollerine göre motor nöronlar, duyuşal nöronlar ve inter nöronlar olmak üzere 3’e ayrılır (12).

Motor nöronun hücresel gövdesi spinal kordun ön boynuzunda lokalize iken, duyuşal nöronlar arka kök ganglionunda bulunurlar. SH, periferik sinir sisteminde aksonal çıkıntıları sararlar (12). Miyelinli ve miyelinsiz olmak üzere, 2 tip sinir lifi vardır. Küçük çaplı aksonlar, genelde miyelinsiz lifleri oluştururlar. Miyelinsiz sinirlerin

insanlarda 0.5-3.5 µm arasında kalınlığa sahip olduğu, bu sinirlerde iletim hızının 0.5-2 m/sn arasında değiştiği tespit edilmiştir (13). Miyelinli bir akson, aynı boyuttaki miyelinsiz bir aksone nazaran daha hızlı sinir akımı iletir. Periferik sinir lifleri, yapı ve fonksiyonlarına göre başka bir sınıflamada ise A, B, C olmak üzere 3 gruba ayrılır. A ve B lifleri miyelinli kalın liflerdir. A lifleri 2.5-22 µm çapları arasında, B lifleri ise ortalama 3 µm çapındadır. C lifleri ise 0.2-1.6 µm arasında çapa sahip olup miyelinli değildir. A liflerinde iletim en hızlı olup saniyede 100 metreye ulaşabilmektedir. B lifleri miyelinli olmasına rağmen iletim hızı, A liflerine göre çok daha yavaştır ve genelde 3-5 m/sn aralığındadır. A liflerine daha çok somatik afferent ve efferent yollarda rastlanırken, B liflerine pregangliyonik otonomik yollarda rastlanır. C liflerinde ileti en yavaş olup bu tip lifler genelde somatik afferent ve otonomik postganglionik efferent yollarda bulunur (13).

Miyelinli lifler somatik sinir sisteminde yer alırlar. SH sadece bir tek aksonu sarar ve onun miyelininden sorumludur. SH periferik sinir sisteminin özel uydu hücreleridir. Komşu SH arasında aksolomma bir aralık oluşturur buralara ise Ranvier boğumu denir. Kollateral dallanma yapan aksonlar Ranvier boğumlarından ayrılmaktadır. Miyelin tabakası konsantrik dizimli tabakalar şeklindedir ve lameller arasındaki genişleme yerleri miyelin kılıfındaki Schmidt-Lanterman yarıkları olarak adlandırılır. Bu yarıklar ve Ranvier boğumları, merkezi sinir sisteminin miyelinli sinirlerinde bulunmazlar (Şekil 1) .



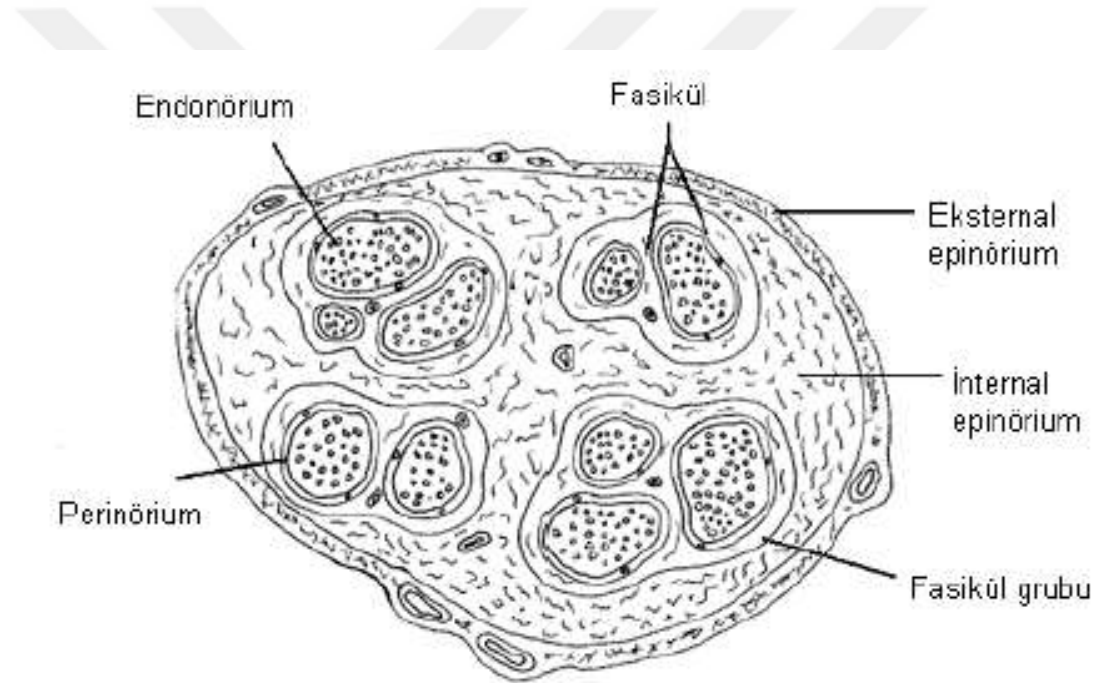
**Şekil 1.** Myelinli sinir lifi a. Işık mikroskobisi, b. Elektron mikroskobisi şematik görünümü

Periferik sinirler, bağdokusu, yapısı ve lokalizasyona da bağlı olarak epinörium, perinörium ve endonörium olmak üzere 3 tabakadan oluşur (Şekil 2).

**Epinörium:** İnternal epinörium sinirleri ve fasikülleri sarar. Vasküler yapılar bu tabakadan girerler. İnternal epinörium dış ortamla endonörium arasında bariyeri oluşturur. Ayrıca epinöriumda fibroblastlar bulunur, bu hücreler inflamasyona cevap verir (14).

**Perinörium:** Her fasikülü çevreler. Kan-sinir difüzyon bariyeri oluşturur (14).

**Endonörium:** Her bir sinir lifinin bazal membranını çevreleyen bir bağ dokusudur. Endonöral tüpün oluşumuna katılır (15).

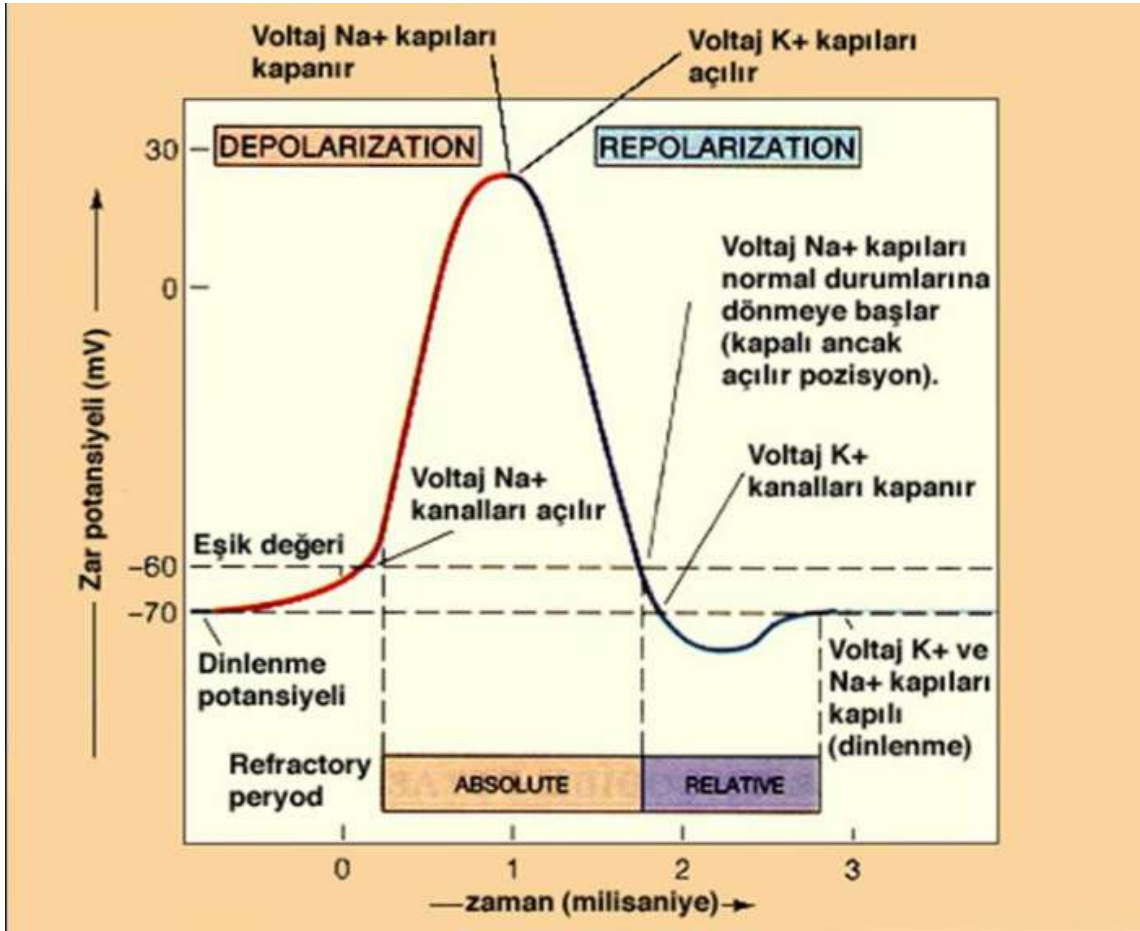


Şekil 2. Periferik sinirin kesitsel anatomisi

### 2.1.2. Periferik sinir fizyolojisi

Periferik sinir sisteminde iletim; oluşan aksiyon potansiyelinin sinir gövdesi ve akson boyunca taşınmasıdır. Her hücrede olduğu gibi nöronlarda da hücre içi ile dışı arasında elektriksel potansiyel farkı vardır. Bu fark, hücre zarının iyon geçirgen yapısında olmasından ve hücre içi ile dışı arasındaki iyon konsantrasyonu farkından kaynaklanmaktadır. Bu konsantrasyon farklılıkları hücre içinin dışına göre -60 ile -80 mv arasında polarizasyon oluşmasını sağlar. İstirahatte bu polarize durum sistemin

denge halinde kalması ile korunur. Bu durumda sodyum kanalları kapalı, potasyum kanalları ise açıktır. Nöronun uyarılması istirahat potansiyelini bozar ve depolarizasyon oluşur. Kanalların açılması ile birlikte hücre içine sodyum geçişi olur ve hücre içi ile dışı arasındaki potansiyel fark azalarak eşik değere ulaşılır. Aksiyon potansiyeli için gereken eşik değeri  $-59$  mV'tur (Şekil 3). Bu eşik değeri aşamayan uyarılar aksiyon potansiyeli oluşturamaz iken; eşğin üstüne çıkan uyarılar ise şiddeti ne olursa olsun aynı aksiyon potansiyelini oluştururlar. Bu duruma "hep ya da hiç kuralı" denir (16).



Şekil 3. Aksiyon potansiyeli oluşumu

### 2.1.3. Periferik sinir hasarı

Sinir hasarının sınıflandırılması 1947 yılında Seddon ve 1951 yılında Sunderland tarafından yapılmıştır (17)(Tablo 1).

**Tablo 1.**Seddon ve Sunderland Sınıflaması

Seddon Sınıflaması	Sunderland	Patoloji	Prognoz
Nörapaksi	Birinci derece	Miyelin zararı	Haftalar, aylar içinde mükemmel düzelme
Aksonotmezis		Akson kaybı Değişik derecede bağ doku hasarı	Destek dokuların bütünlüğünün korunmasına ve kasa olan mesafeye bağlı olarak iyiden kötüye değişebilen prognoz
	İkinci derece	Akson kaybı Endonöral tüpler sağlam Perinöryum sağlam Epinöryum sağlam	Kasa olan mesafeye bağlı olarak iyi prognoz
	Üçüncü derece	Akson kaybı Endonöral tüpler hasarlı Perinöryum sağlam Epinöryum sağlam	Kötü prognoz Aksonlar hatalı yöne gidebilir Cerrahi gerekebilir
	Dördüncü derece	Akson kaybı Endonöral tüpler hasarlı Perinöryum hasarlı Epinöryum sağlam	Kötü prognoz Aksonlar hatalı yöne gidebilir Cerrahi sıklıkla gerekir
Nörotmezis	Beşinci derece	Akson kaybı Endonöral tüpler ağır hasarlı Perinöryum ağır hasarlı Epinöryum ağır hasarlı	Spontan iyilik olmaz Cerrahi gereklidir Cerrahiden sonra prognoz belirlenir

Periferik sinir hücresinin üç tip zararlanma modeli söz konusudur (Şekil 4).

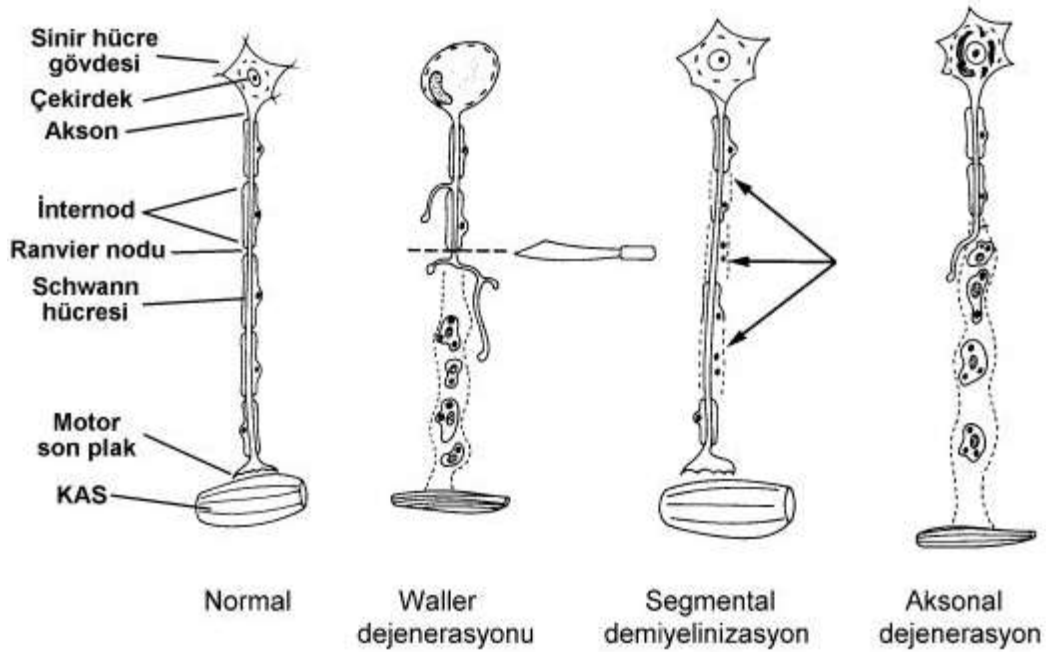
Wallerian dejenerasyon: Sinirin aksonunun herhangi bir yerinde herhangi bir nedenle (travma, infarktüs, uzamış veya şiddetli baskı gibi) hasarlanması ve bütünlüğünün bozulması sonucunda oluşan yaralanmadır. Aksonun kesintiye uğradığı yerin distalinde akson ve ardından çevresindeki miyelin kılıf dejenerasyona uğrar, makrofajlar tarafından fagosite edilir. Aksonun hasar yerinin proksimalinde kalan kısmı ve periferik sinir hücre gövdesi sağlam kalır.

### Aksonal dejenerasyon:

Periferik sinir hücre gövdesinin veya aksonunun hasarı söz konusudur. Nedeni çoğunlukla metabolik veya toksiktir. Rahatsızlık periferik sinir hücre gövdesini doğrudan etkileyen bir nedenle (poliomyelit gibi) olabileceği gibi aksonun bütününe etkileyen bir nedenle (Vincristine isimli sitostatik ilacın aksonal transportu engellemesi sonucu olduğu gibi) de olabilir. Periferik sinir hücresi canlılığını yitirdiyse artık geri dönüş yoktur. Eğer neden, aksonun bütünlüğü bozulmadan ortadan kaldırılırsa akson haftalar - aylar içinde fonksiyonuna kavuşabilir. Eğer aksonun bütünlüğü bozulduysa, Wallerian dejenerasyonunda olduğu gibi yavaş bir rejenerasyon süreci izler. Prognozu en kötü olan zararlanma tipidir.

### Segmental demiyelinizasyon:

Miyelinli sinir liflerinde, periferik sinir aksonunda bir hasar olmaksızın etrafındaki Schwann hücresinde ve/veya miyelin kılıfında hasar söz konusudur. Demiyelinizasyon, herediter nöropatilerde olduğu gibi tüm sinir boyunca olabilir veya edinsel demiyelinizan durumlarda (Guillain-Barré Sendromu veya Kronik inflamatuvar demiyelinizan polinöropati gibi) belirli bir sinir segmentinde söz konusu olabilir. Miyelin, yenilenebilir bir yapıdır. Bu nedenle, nedeni ortadan kalktığında, demiyelinizasyon tümüyle geri dönüşü olan bir süreçtir.



**Şekil 4.** Periferik sinir zararlanma modelleri

#### **2.1.4. Sinir dejenerasyonu**

Periferik sinir liflerinin dejenerasyonu ve rejenerasyonu ile alakalı moleküler mekanizmalar hala tam bilinmemektedir. Sinir yaralanması ve onarımından sonra fizyolojik sonuçları etkileyen faktörler; yaralanmanın başlangıçtaki şiddeti, meydana gelen dejeneratif değişiklikler, hasar sonrası sağlam kalan sinir hücrelerinin sayısı, aksonal büyümenin hızı ve kalitesi, rejenere olan aksonların uygun şekilde organize olmaları, distal organların mevcut durumudur. Hasar distalindeki tüm miyelinli veya miyelinsiz liflerde akson distalinden hedef organa kadar, Wallerian dejenerasyon meydana gelir (18). Periferik sinirde meydana gelen herhangi bir hasarda, yaralanmanın şiddetine göre, aksonal devamlılığın bozulduğu yerin proksimalinde; korunmuş son internoda kadar daha sınırlı bir dejenerasyon meydana gelir. Kural olarak, aksondaki hasar hücre gövdesine ne kadar yakın ise, hücre gövdesinde o kadar önemli değişiklikler meydana gelir (19). Nöronda yani hücre gövdesinde santral kromatolisis ve nükleus çapında artma gözlemlenir. Bu nöronun rejenerasyon için gerekli yapısal proteinleri üretmesi için yaptığı bir hazırlıktır.

##### **2.1.4.1. Proksimal segmentte meydana gelen değişiklikler**

Aksonda hasar sonrası hücre gövdesinde gelişen değişikliklere retrograd dejenerasyon adı verilir. Hasara bağlı olarak, nöron hücre gövdesinde ve sinir lifi proksimalinde meydana gelen değişiklikler, yaralanmanın şiddetine ve yaralanan bölgenin hücre gövdesinin yakınlığına bağlıdır. Travmaya bağlı sinir hücresi perikaryonu tam olarak dejenere olursa, proksimal segmentin tamamı Wallerian dejenerasyona uğrar. Yaralanan bölgenin yakınındaki proksimal segment boyunca, SH'nde yapısal değişiklikler ile akson ve miyelin kılıf çapında azalma meydana gelir. Yaralanmayı takiben proksimal segmentte, akson çaplarının azalmasıyla beraber sinir iletim hızı da buna bağlı düşer. Aksonal yaralanmayı takip eden ilk 6 saat içinde sinir hücresinde metabolik değişiklikler meydana gelmeye başlar. Nükleus perifere göç eder ve sitoplazma yapısında değişiklikler fark edilir. Hücrenin kendisi, çekirdek ve çekirdekçik büyür. Hücrenin periferine Nissl granüllerinin göçü olur, endoplazmik retikulum pürtüklü bir yapıya döner ve daha sonra parçalanıp yayılır. Bu değişikliklerin tümüne birden 'kromatoliz' denir.

Yaralanmadan sonra aksonal yapısal komponentlerin üretilmesi için salgılanacak olan nörotransmitterler hücrenin metabolik fonksiyonunca sağlanır. Bu süreç artmış RNA, protein komponentleri, lipidler, glikoz 6-fosfat dehidrojenaz ve hidrolitik enzimlerce sağlanır (20, 21). Bu değişikliklerin hedefi kaybolan aksoplazmik hacmi düzeltmektir.

#### **2.1.4.2. Distal segmentte meydana gelen değişiklikler**

Yaralanma sonrası distal kesimde meydana gelen değişikliklere Wallerian dejenerasyon adı verilir ve yaralanma distalinde kalan aksonun tamamını etkiler. 1850 yılında Waller isimli araştırmacı kurbağa hipoglossal sinirinde, sinirin kesilmesi sonrasında distal segmentte oluşan değişiklikleri gözlemlemiş ve bu dejeneratif sürece “Wallerian Dejenerasyon” ismini vermiştir. Akson ne kadar distalde kesintiye uğrarsa Wallerian dejenerasyonu o kadar erken gelişir. Wallerian dejenerasyon ile akson ve miyelin yıkımı sağlanırken, rejenere olan aksonun büyümesi için uygun ortam oluşturulur. Ortada oluşan içi boş tüp yapısına endonöral tüp adı verilir. Sinir yaralanmasını takiben, mast hücreleri fagositleri stimüle ederler. Yaralanmadan 48 ile 96 saat sonra aksonal devamlılık kaybolur ve impuls iletiminin devamı olanaksız hale gelir. Bu hücreler yaralanmadan sonra ilk 2 hafta içinde çoğalırlar, makrofaj göçünü kolaylaştıran ve kapiller permeabiliteyi arttıran histamin ve serotonin salgırlar. Akson dejenerasyonunda miyelin kılıfı ayrılır, parçaların ve yıkım ürünleri ile birlikte makrofajların salgısı, distal kısımdaki SH’ni proliferere olmaları için stimüle eder. SH, Wallerian dejenerasyonda kilit rol oynar. Yaralanmadan sonraki 24 saat içerisinde aktive olurlar. SH, rejenere olan aksonlar için rehber olmalarının yanı sıra, nöron sağ kalımına ve aksonal büyümeye destek olur.

#### **2.1.5. Sinir rejenerasyonu**

SH rejenerasyonun en önemli hücresidir. SH yokluğu durumunda akson büyümesi ya başarısız olur ya da çok azalır. Fibroblastlar ve basal lamina kendi başlarına yeterli değildir. Gerek inflamatuvar sürece olan katkıları, gerekse de başta NGF (nerve growth factor) olmak üzere nörotropik faktörlerin salınımı ve düzenlenmesindeki görevleri son derece önemlidir. Dejenere olmuş aksonların yerinde boş endonöral tüp oluşur. Myelinli aksonlar birkaç gün içinde terminal tomurcuk ve kollateraller oluşturarak endonöral tüp

boyunca ilerler. Büyüme konileri bir yanda SH ile diğer yanda ise bazal lamina ile temas halindedir. Bu tomurcuklanmanın adına “rejenerasyon ünitesi” adı verilir. İkinci basamak ise kompartmanlaşmadır. Sinir hasarı sonrasında hasarın en az 3,5 cm proksimalinde endonöral fibroblastlar ve SH çevresel olarak uzarlar ve rejenerasyon ünitelerini çevreleyerek kompartman halini alırlar. Bu mekanizma sinir tomurcuğunun aralarına girerek rejenerasyon yolu boyunca devam eder.

### **2.1.5.1. Proksimal segmentte meydana gelen değişiklikler**

Periferik sinirin rejenerasyon kapasitesini, ilk kez Cajal isimli araştırmacı 1928 yılında kedilerin omuriliklerinde yaptığı çalışmalarda ortaya koymuştur. Aksonotomi sonrası proksimal kesimde tomurcuğun oluştuğunu ve bunların distal kesime uzanarak rejenerasyonu sağladığını saptamıştır. Cajal ayrıca rejenerasyon olan aksonların, diğer dokulardan ziyade distal sinir segmentine doğru bir büyüme patterni (nörotropizm) gösterdiklerini de ortaya koymuştur (22, 23).

Aksonal yaralanma seviyesinin proksimalinde; bir ya da iki internodal segment boyunca akson dejenere olur ve endonöral tüp içi boş silindir şeklinde kalır. 24 saatlik bir latent period sonrası, proksimal kesik uçta terminal ve kollateral aksonal tomurcuklanmalar meydana gelir. Her proksimal güdükten distale doğru uzanan, birkaç terminal ve kollateral tomurcuk oluşur. Anterograd ilerleyen bu büyümede, kollateral tomurcuklar kesi proksimalindeki aksonun sağlam olduğu Ranvier düğümlerinden köken alır. Terminal tomurcuklar zedelenen aksonun proksimal ucundan çıkar ve tüp boyunca bazal lamina içinde distale doğru uzanır. Hasarlanmış sinirde akson ucundan tomurcuklanma ilk 6 saat içinde başlamasına karşın, bu ilk tomurcuklar genelde rezorbe olur. İnternal sitoskeletal yapıları olan kalıcı tomurcuklar, genelde ilk 24 saatin sonunda belirlemeye başlarlar. Terminal tomurcuklar, kalan aksonların uç kısmından çıkarlar. Bir miyelinize aksondan çıkan ve endonöral tüp içinde ilerleyen her bir tomurcuğa, “rejenerasyon ünitesi” denir. İkinci basamak ise kompartmanlaşmadır. Sinir hasarı sonrasında hasarın en az 3,5 cm proksimalinde endonöral fibroblastlar ve SH çevresel olarak uzarlar ve rejenerasyon ünitelerini çevreleyerek kompartman halini alırlar. Onarımı takip eden haftalar içerisinde, rejenerasyon ünitesi içindeki ortalama akson sayısında azalma meydana gelir. Rejenerasyon ilerledikçe, içlerinden bir tanesi matur hale gelir ve miyelinize olur bu sırada diğer aksonlar kaybolur (24). Her bir tomurcuğun

ucundaki kısma ise ‘büyüme konisi’ adı verilir. Büyüme konisi, düz endoplazmik retikulum, mikrotübül, mikrofilaman, mitokondri, lizozom ve diğer veziküler yapılardan zengindir. Aktin filamanları ve myozin içerir. Bu yapılar, büyüme konisinin filapoid çıkıntılar yaparak hareketli olmasını sağlar. Büyüme konisinin, SH bazal laminasında bulunan fibronektin ve laminine affinitesi vardır ve aksonal tomurcukların büyüme yönünü belirleyen faktörlerden biri de bu affinitedir (24, 25). Büyüme konilerinin sonuçta ne olacağı Büngner bantlarına ulaşip ulaşmamaları ile ilgilidir, eğer düzgün temas olmaz ise büyüme konisi bağ dokusu içerisinde büyümeye başlar ve burada kaybolur. Tek bir endonöral tüpe ise birden çok büyüme konisi ve buna bağlı akson uçları girebilir. Akson endonöral tüpe ulaşamaz ise apoptoz görülür.

Rejenerasyon sürecinde, akson çapları artmakla beraber, yaralanmadan önceki normal boyutlarına ulaşamazlar. Rejenerasyon sonucu endonöral tüp içinde gelişen aksonal sürgün orijinal akson çapının ancak % 80’ine ulaşabilir ve iletim hızı da orijinal aksondaki seviyeye ulaşamaz (19).

#### **2.1.5.2. Distal segmentte meydana gelen değişiklikler**

Distalde hasarın seviyesi ne olursa olsun, tüm distal aksondan hedef-organa kadar, Wallerian dejenerasyon meydana gelir. Sonuçta tüm distal akson resorbe olurken endonöral tüpler SH ve makrofajlarla dolar. Wallerian dejenerasyon sırasında plöripotent SH bir yandan endonöral bağ dokusu kılıfının içindeki bazal laminada proliferer olurken, diğer yandan kalan miyelin ve akson debrisini ortadan kaldırır. Prolifere olan SH longitudinal sırada sıkıca biraraya gelerek bir sütun oluşturacak şekilde dizilir ve SH çevreleyen bazal lamina Büngner bantlarını da çevrelemeye devam eder. Bu oluşan ortam rejenerasyon için en uygun ortamı sağlar ve bu bantların içine girebilen rejenere aksonlar en sağlıklı rejenerasyonu gerçekleştirir. Distal sinir lifindeki bağ dokusunun bütünlüğü intakt bir aksona bağlı olduğundan, sinir rejenerasyonu gerçekleşmediği takdirde distal endonöral tüpte geri dönüşümsüz daralma ve fonksiyon kaybı meydana gelir. Bu yüzden rejenere olacak aksonun nihai çapı azalmış olur. Bazal lamina tip IV kollajen, heparinsülfat, proteoglikan, laminin, nidojen ve entaktinden oluşur. Özellikle bazal tabakadaki lamininin büyüme merkezinin hızını ve yönünü etkilediği bilinmektedir (24, 26). Tomurcuklar proksimal sinir güdüğünden distale doğru ilerlerler. Akson tomurcukları distal güdüğe ulaşınca tomurcuklar Büngner

bantlarının içinde ilerlemeye devam ederler. Bu hareketlenme sinir iyileşmesinin başarısını etkileyen en önemli olaydır. Bazı tomurcuklar bağ doku içerisine doğru uzanabilirler ki, bu durum nöroma oluşumu ile sonuçlanır. Tomurcuklar Büngner bantlarını takip ederek, perifere doğru uzanıp hedef organlarını bulurlar. Başlangıçta proksimal segmentteki tomurcuklanan akson sayısı, distal segmentteki mevcut akson sayısından daha fazladır, ancak zaman içerisinde periferik bağlantıyı yapamayan tomurcuklar dejenere olur ve akson sayıları eşitlenir (18, 26). Tomurcuklar fasiküller arasında geçiş yapabilirler. Fakat bir akson distaldeki kendi fasikülüne ulaşsa bile, bu aksonun kendi hedef organına ulaşabileceği anlamına gelmez. Akson herhangi bir hedef organa ulaştıkça maturasyon işlemi başlar. Maturasyon proksimalden distale doğru gerçekleşir. Çap artışı miyelinizasyon izler. Fakat rejenere olmuş bir matür aksonun nihai çapı bile normalden azdır ve miyelin kılıfı daha incedir. Rejenere olan aksonlar; Schwann hücresine ulaştıkları zaman, miyelinizasyonu başlatan sinyal oluşur. Miyelogenenezin nöronal regülasyonu, aksonun plazma membranı ve SH arasındaki etkileşimden kaynaklanır. Akson hedef organa ulaştığı zaman, çapı ve maturitesi artar (8). Tüm sinir kesilerinde rejenerasyon yavaştır ve tam değildir. Rejenere olan akson günde ortalama 0.25 mm hızla skar dokusunda ilerler. Akson tomurcukları distal endonöral tüpe ulaştıkça büyüme değişik etmenlere bağımlı olarak günde 1-2 mm hızla devam eder. Bu yüzden özellikle proksimal sinir kesilerinde rejenerasyon tamamlanıncaya kadar ciddi kas atrofileri meydana gelir. Akson rejenerasyon hızı, yaralanmanın düzeyi ve şiddetiyle ilgilidir. Proksimalden distale doğru ilerledikçe rejenerasyon hızı azalmaktadır. Rejenerasyon hızı, hasar alanının sinir hücre gövdesine uzaklığı ile ters orantılıdır (24). Hayvan deneylerinde distal segmentin rejenerasyon hızının nörotomezis tipi yaralanma sonrası 2.0–3.5 mm/gün, aksonotomezis tipi yaralanma sonrası 3.0–4.5 mm/gün olduğu saptanmıştır. Yetişkin insanlarda ise ortalama aksonal rejenerasyon hızı günde 1–2 mm'dir (24). Distal sinir segmentinin vasküler ağı da yaralanmaya cevap olarak, önce vazokonstrükte olur, daha sonra vazodilate olur, ama en başarılı aksonal rejenerasyondan sonra bile orijinal kan akımının ancak %60-80'ine ulaşabilir (27).

## 2.2. KÖK HÜCRE

### 2.2.1. Kök hücre tanımı ve özellikleri

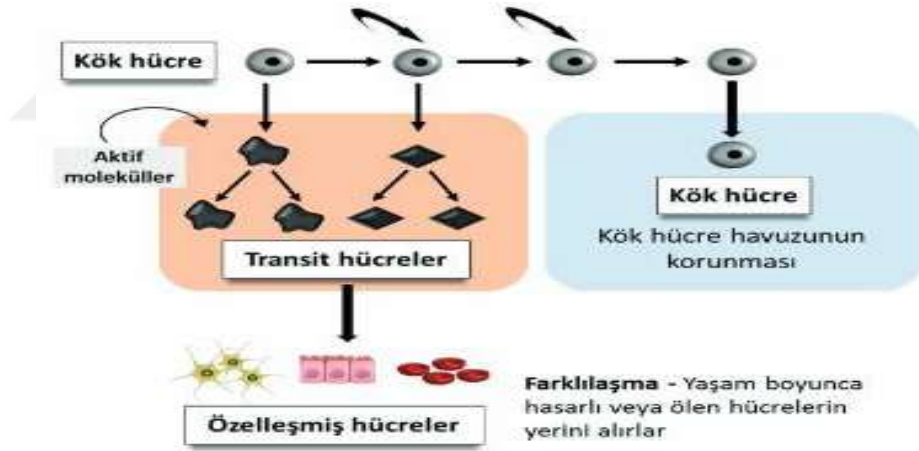
Farklı hücre tiplerine dönüşme potansiyeli (diferansiyasyon), kendi kendini yenileme (self-renewal) gücü ve canlı kaldıkça yaşamlarını sürdürme özelliğine sahip olan hücrelere kök hücre denmektedir.

Bu hücreleri tanımlayan ortak özellikler aşağıdaki gibidir.

- i) Dokularda az miktarda bulunurlar,
- ii) Yaşam boyunca bölünme oranları bellidir ve bölündükçe sayılarını korurlar,
- iii) Bölündüğü zaman ortaya çıkan iki yavru hücrenin en az bir tanesi kök hücre olarak mevcut kök hücre havuzuna katılır,
- iv) Çok kez bölünerek geçici (transit) hücreleri oluştururlar ki, bu hücreler kısa süre içinde bir differansiyasyon göstererek dokuya özgü farklılaşmış hücreleri oluşturur.
- v) Genellikle bölünme hızları yavaştır; ancak doku travması sonrasında hızlı bölünme etkinliği kazanırlar. Eğer travma ve doku kaybı çok şiddetliyse, kendi hücre havuzlarının yenilenmesi için doğal bölünme hızlarını artırırlar,
- vi) Dokuların en uzun ve en kalıcı yaşayan hücreleridir, organizmanın yaşamı boyunca varlıklarını korurlar, ancak yaşla birlikte miktarları azalır,
- vii) Büyüme faktörlerine ve sinyal moleküllerine karşı oldukça duyarlıdırlar ve cevapları hızlıdır; TGF, Notch, Wnt ve Jak/ Stat gibi sinyal yollarını etkin bir biçimde kullanırlar,
- viii) Kök hücrelerin çoğu hücre siklusunun G0 evresinde sessiz olarak bulunurlar. Embriyonik kök hücreler veya yetişkindeki çoğalan kök hücreler gibi bir grup hücre ise bu süreci çok hızlı geçerek hücre döngüsünü hızlı bir şekilde tamamlar,
- ix) Diğer hücrelere oranla farklı kromatin sarmalına sahiptirler. DNA metilazlar veya histon deasetilazların transkripsiyon baskılayıcıları tarafından veya Groucho ailesi proteinleri tarafından özgün DNA düzenlenişi kök hücrelere özgün DNA özelliği kazandırır,

- x) Tüm kök hücreler strese karşı dirençlidir. Çoklu ilaç direnci taşıyıcıları, özgün protein katlanma mekanizmaları, ubiquitin ve detoksifikasyon sistemleriyle bu özelliği kazanırlar.

Kök hücreler, özelleşmeden çoğalmakta, gerektiğinde organ ve dokulara özgü öncü hücrelere dönüşebilmektedir. Bölünme esnasında bir taraftan öncü hücreye farklılaşacak olan hücre üretilirken diğer yandan da kök hücre havuzu için kendi yedeğini almaktadırlar. Sonuç olarak bölünme sonrası iki farklı fenotipte hücre ortaya çıkar; hücrelerden birisi kök hücrenin yedeği niteliğinde kalırken; diğeri bir sonraki aşama için farklılaşır. Bu tür bölünme ‘‘asimetrik hücre bölünmesi’’ olarak adlandırılır. Hücrenin kaderi iç ve dış faktörlerle çizilir. Bunlar; asimetrik hücre bölünmesi, mikro çevre, hücre-hücre temasları, adezyon molekülleri, hücreler arası bağlantı kompleksleri, ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri ve sinyal yolları aracılığıyla belirlenip sürdürülür. Hücre kaderindeki en önemli faktör asimetrik hücre bölünmesidir (28).(Şekil 5)



**Şekil 5.** Asimetrik hücre bölünmesi

Embriyonun gelişimi, dokunun onarımı ve hacim olarak büyüebilmesi için gerekli olan yeni hücreler için simetrik bölünme de gereklidir. Bu durumda kök hücreler öncü hücrelere dönüşürler ve çok sayıda bölünme kapasitesine sahiptirler(29, 30).

Farklılaşma işlevsel olarak olgun bir hücre olma yolunda geçirilen hücredeki sitoplazmik farklılıklar, asimetrik hücre bölünmesi, hücre dışı matriks proteinleri, kararlanma aşamaları, morfogenerler, histon ve gen metilasyonları, hücreler arası bağlantı kompleksleri, epigenetik kontrol, sinyal yollarının kombine etkisiyle gerçekleşen

karmaşık olaylar bütünüdür. Farklılaşma, blastokist aşamasındaki hücre kitlesinin trofoblast mı yoksa iç hücre kitlesi mi olacağına kararlanmasıyla başlar,16-32 Blastomerli evrede ise iç hücre kitlesindeki hücrelerin epiblast mı, hipoblast mı olacağına karar verilir. İlk kararlanmada niş ve sitoplazmik özgün proteinlerin kutuplaşma bölgeleri ve asimetric hücre bölünmesi etkilidir. İkinci kararlanmada ise transkripsiyon faktörleri etkilidir. Hücre epiblast olarak ileride üç germ yaprağını, hipoblast olarak vitellüs kesesini ve trofoblast olarak plasentaya ait kısımları oluşturabilme yetisine sahip olur (31).

En önemli mekanizma epigenetik kontroldür. Gametler haricindeki her hücre aynı genoma sahiptir. Bu yüzden bu hücreleri ayıran etken gen ifadesidir. Kök hücre, öncül hücre ya da özelleşmiş hücre mi olacağı buna bağlıdır. Burada DNA ve histon metilasyon mekanizması önemlidir. Farklılaşmış hücrelerde heterokromotin, farklılaşmamış hücrelerde ökromotin alanlar mevcuttur. Farklılaşmayla birlikte pluripotensiyi sağlayan genlerin ifadesi azalır. Bu olay DNA metilasyonu ile gerçekleşir. Oct-4 ve Sox-2 gibi bir grup gen, DNA metiltransferazlar tarafından metillenir, promotor bölgeleri bağlanır ve ifade silinir (31, 32).

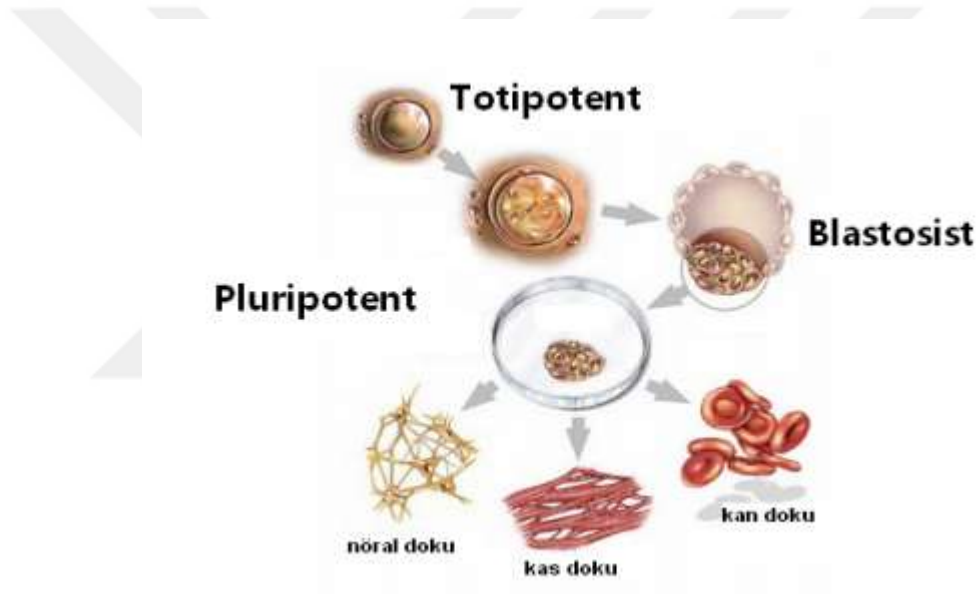
Farklılaşma, ileriye ve geriye farklılaşma olarak ele alındığında plastisite söz konusu olur. Bir hücrenin farklılaşma yolunda ileri gitmesi olağandır. Farklılaşmaya başladığı noktaya kısmen veya tamamen geri dönmesi ise "geriye farklılaşma" olarak adlandırılır ki, günümüzde deneysel olarak elde edilmiş uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPK) (induced- Pluripotent Stem Cells; iPSCs), geriye farklılaşmanın en tipik örneklerden birisidir (33).

### **2.2.2. Kök hücre türleri**

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre ikiye ayrılırlar; embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler. Embriyonik kök hücreler, blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerdir. Embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler ise; erişkin kök hücreler, fetüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler, göbek kordonu ve plasenta kök hücreleridir.

Bölünme ve farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler totipotent, pluripotent ve multipotent olarak adlandırılır. Zigot totipotent özelliktedir. Yani bir organizmayı

oluşturabilecek tüm genleri barındırmaktadır. Döllenen 16 blastomerli döneme kadar bu totipotent özellik korunur ve bu evreden sonra sınırsız farklılaşma yeteneği sınırlanır. 16 blastomerli aşamadaki embriyoda iç hücre kitlesi belirlenmeye başlar. Üç embriyonik tabakayı (ektoderm, endoderm, mezoderm) şekillendirecek hücrelerin öncüleridirler. Bu hücreler pluripotent özelliktedirler, bir canlıyı oluşturamaz ancak ektoderm, endoderm ve mezodermden oluşan yapıları oluşturabilirler. Embriyonun daha ileri aşamalarında ve erişkin organizmada kemik iliğinden, yağ dokudan elde edilen kök hücreler, erişkin kök hücreler sınırlı bir bölünme ve farklılaşma gösterirler. Elde edildikleri organa ve dokuya dönüşme eğilimindedir. Multipotent kök hücreler olarak adlandırılırlar (Şekil 6).



**Şekil 6.** Totipotent, Pluripotent ve Multipotent hücreler

### 2.2.2.1. Erişkin kök hücreler

Yetişkinlerde farklılaşmış dokularda farklılaşmamış halde bulunan, multipotent hücrelerdir. İhtiyaç halinde farklılaşarak doku ve organların yenilenmelerini sağlamaktadırlar. En güzel örneği kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerdir. Perifer kanda, ovaryum epitelinde, testiste, iskelet kasında, diş pulpasında, miyokardiyum içinde, karaciğerde, gastrointestinal sistemde, akciğerde, meme dokusunda, deride, beyinde, gözde limbus bölgesinde, medulla spinaliste ve tükürük bezinde yapılan çalışmalarla bu hücrelerin varlığı gösterilmiştir(34).

Yetişkin kök hücrelerini tanımlamak için; farklılaşarak oluşturdukları hücre tiplerini saptamak, izole edilip kültür yapılarak bir başka canlıya aktarılması ve kaynaklandığı hücreleri yeniden oluşturup oluşturmadıklarının kontrol edilmesi, izole edilip kültür ortamına yeni faktörler ekleyerek hangi hücelere farklılaştıklarının gözlenmesi gerekir.

#### **2.2.2.2. Mezenkimal kök hücreler**

Erişkin kök hücresi tipidir. Bağ dokunun ana hücreleridir. Birçok dokudan elde edilebilirler. Kemik, kas, nöron, yağ, kıkırdak gibi hücelere farklılaşabilirler (35).

Bu hücreler elde edildikleri dokularda sayıca çok azdır. Bu yüzden kültür ortamında sayıları çoğaltılmaktadır. İlk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından fetal buzağı serumu kullanılarak kemik iliği kültüründe morfolojik yapıları fibroblastlara benzeyen ve adhezyon gösteren hücre kolonilerinin yağ ve kemik hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermiştir (36). 1999'da Pittenger ve ark. (36) bu hücreleri in vitro ortamda adiposit, kondrosit ve osteoblasta farklılaştırmıştır. Birden fazla hücre tipine differansiasyonu ve in vitro çoğalabilmeleri nedeniyle bu hücreler mezenkimal kök hücreler (MKH) olarak adlandırılmıştır (37).

MKH; mezoderm tabakasından orjin almakla birlikte nöral krista kaynaklı mezenkim dokudan da gelişebilirler. Kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonu, kordon kanı, karaciğer, beyin, diş pulpası, deri ve fetal dokularda bulunan farklılaşmamış, çoğalma kapasitesi yüksek, kendini farklılaşmadan yenileyebilme özelliğine sahip, mezodermal farklılaşma yetisi çok fazla olan kök hücrelerdir (38, 39). Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, kas gibi farklı hücre tiplerine dönüşebilmekle birlikte ürettikleri bir çok büyüme faktörü ve sitokinler nedeni ile immün baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline de sahiptir (38). 2008 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT)'nin fikir birliğiyle MKH olarak sınıflandırmak için;

- a. Hücrelerin kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilmeleri,
- b. Yüzeylerinde CD105 (SH2), CD73 (SH3/4)ve CD90 gibi hematopoetik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederlerken, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79veya CD19 ve HLA-DR (insan lökositantijeni-DR) gibi tipik hematopoetik belirteçleri eksprese etmemeleri,
- c. In vitro ortamda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri gerekmektedir (40).

### **2.2.2.3. Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler**

Yağ dokunun damarca zengin stromal bölgesinden elde edilirler. Subkütanöz ve omental yağ içeren beyaz yağ dokusunun her türünde adipoz kök hücrelerine rastlanabilir. Yağ dokusu kaynaklı MKH'ler fibroblast benzeri morfoloji ve normal diploid karyotip içerirler. Uzun süreli kültüre dayanıklıdır ve in vitro kolay çoğalırlar. Dondurma çözme işlemi yapılması rağmen multipotensi özelliklerini kaybetmezler. Adiposit, osteoblast, kondrosit serisi dışında hepatosit, iskelet, kalp ve düz kas, endotel, hematopoetik, nöral ve epitel hücrelere farklılaştığı da gösterilmiştir (41). YDKMKH'ler için pozitif belirteçler; CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD140b, CD146, CD166 ve HLA I olarak; negatif belirteçler ise CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79a, CD133 ve CD144 olarak bilinmektedir (42).

YDKMKH düşük immünojenitesi, yüksek modülatör ve immünsüpresif özelliklere sahip olduğu için klinikte kullanılmaktadır. Bununla birlikte belli bazı hastalıkların tedavisi için klinik çalışmalar halen devam etmektedir (43).

### **2.2.3. Yağ doku kökenli kök hücrelerin doku onarımına etkisi**

Kök hücrelerin doku onarımına katkıları özellikle doku yaralanmasının var olduğu durumlarda ortaya çıkar. Normalde sağlıklı doku içerisinde işlevsel olmayan şekilde bulunan kök hücreler, yaralanma sonrası endokrin ve parakrin çağrılar (selektin, kemokin, integrin etkileşimleriyle) sonucu çevre dokulardan ve kemik iliğinden yaralanmış dokuya migrasyon yaparlar (44). Kök hücreler, aldıkları sinyal mekanizmaların etkisi ile ortamdaki progenitor hücreleri çoğalma ve farklılaşmaya stimüle ederler. Ayrıca anti-inflamatuar ve immunmodulatuar etki gösterirler ve matriksin yeniden şekillenmesine destek olurlar (45-49). Kök hücrelerin, transfer edildikleri ortamlarda bulunan hücre türlerinin yüzey işaretçilerini sunabildikleri immünolojik boyama yöntemleri ve revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmiştir. Fakat temelde etkilerini ortam hücrelerine dönüşerek mi veya parakrin fonksiyonlarıyla mı yaptıkları konusu halen tartışmalıdır (50-56).

Doku hasarının ilk gününde ortama, yaralanmış dokulardan ve aktive olan plateletlerden; temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor, bFGF),

trombosit kökenli büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF), epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF), dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) ve tümör nekrozis faktör  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) salınır. Yoshimura ve ark. (57), yağ dokusunda iskemi ve reperfüzyon yaralanmasıyla ilgili yaptıkları deneysel çalışmada; yaralanmanın 1. gününde ortama salınan bFGF faktöre ve iskemiye cevap olarak, YDKMKH'lerin, çoğalmakla kalmayıp aynı zamanda kuvvetli damarlanma stimülanı ve fibrogenezis inhibitörü olan hepatosit büyüme faktörü (hepatocyte growth factor, HGF) salgıladıklarını tespit etmişlerdir. Ortamdaki apoptotik endotel hücrelerinden salınan EGF' ün de kök hücrelerin antiapoptotik cevabını arttırdığı gösterilmiştir (58). YDKMKH'lerin ortamdaki büyüme faktörleri ve stimülanlara cevap olarak hem adipositlere hem de vasküler endoteliyal hücrelere dönüştüğü düşünölmekle birlikte (59-61), vasküler endotel hücrelerine dönüşüm deneysel çalışmalarda gösterilmiş fakat in vivo çalışmalarda nadiren tespit edilmiştir (62, 63). Ayrıca, kök hücrelerin yaralanmış ortama infiltre olan lökositlerden salınan pro-inflamatuar sitokinlerin (interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  ve nitrik oksit sentetaz salınımını azaltıp, anti-inflamatuar sitokinlerin (IL- 1beta, IL-10, bFGF, TGF-  $\beta$  ve antipitotik gen Bcl-2) salınımını arttırdığı da gözlenmiştir (64, 65). Bu mediatörlerden özellikle TGF- $\beta$  mezenkimal kök hücrelerin doku hasarı üzerindeki etkilerinin yönetilmesinde önemli rol oynar ve çevre yağ dokuda sessiz pozisyonda bulunan veya kemik iliğinden orijin alan diğer kök hücreleri aktive ederek ortama çağırır. Yaralanmanın 2-4. (inflamatuar faz) günlerinde yağ dokusu içinde yerleşmiş mast hücreleri ve trombositler de diğer hücreler gibi TNF alfa, VEGF, PDGF, TGF-B salgılayarak iyileşmeye katkıda bulunur (66). Yaralanmanın 5-7. günlerinde (proliferasyon fazı) ise VEGF, HGF, IL-8 ve matriks metalloproteinaz-8'in (MMP-8) yara sıvısında arttığı gösterilmiştir (67).

### **2.3. SIÇANLARDA LARİNKS ANATOMİSİ**

Sıçan larinksi de insan larinksinde olduğu gibi hyoid kemik, epiglot, tiroid kıkırdak, krikoid kıkırdak ve aritenoid kıkırdak gibi yapılara sahiptir. Esasında sıçan larinksi erkek larinksi ile benzerdir. Erkeklerde aritenoid kıkırdaklar krikoid kıkırdağın üstünde yer alırken, sıçanlarda ise krikoid kıkırdağın anterior yüzünde yerleşmişlerdir. Eğer bir

insan larinks diagramını 90 derece boyunca çevirirsek ve hyoid kemik ile tiroid kıkırdak arasındaki açıklığı kapatırsak kaba taslak bir sıçan larinksi elde etmiş oluruz.

Sıçandaki larengeal kasların en önemli görevi aspirasyonu engellemektir. Bunu da iki yol ile sağlarlar. Birincisi aryepiglottik foldların birbirine yaklaşması ve aritenoid kıkırdakların epiglot tabanına doğru yükselmesidir. Bu mekanizma tiroaritenoid kas ile olmaktadır. İkinci mekanizma ise lateral, transvers ve oblik krikoaritenoid kasın kontraksiyonu ile vokal kordların addükte olmasıdır. Krikotiroid kas hariç sıçan larinksinin tüm kasları nervus vagusun dalı olan rekürren larengeal sinir tarafından innerve olur. Krikotiroid kas ise süperior larengeal sinirin external larengeal dalı ile innerve edilir.

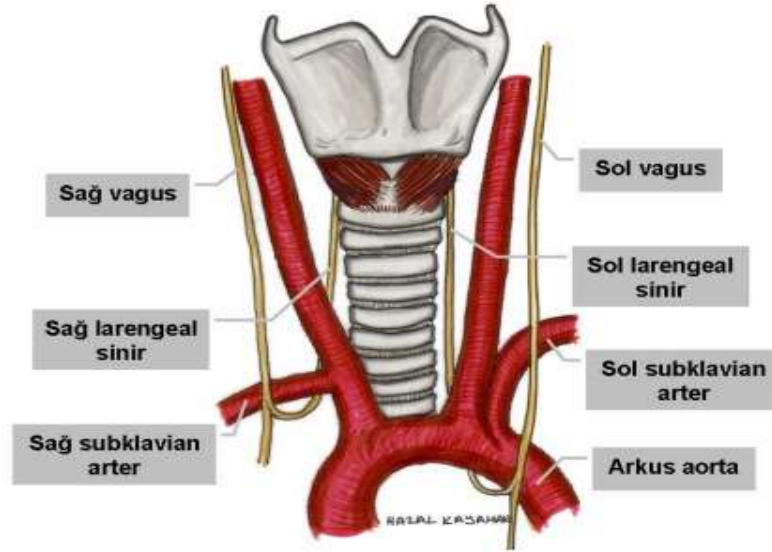
#### **2.4. REKÜRREN LARENGEAL SİNİR ANATOMİSİ**

RLS, krikotiroid kas dışında tüm intrensek kasların motor inervasyonundan ve vokal kord alt seviyesinin duysal inervasyonundan sorumludur.

Sağ ve sol olmak üzere iki ayrı RLS bulunur.

**Sol RLS:** Sol vagal sinir, sol subklavian arter ventralinde seyrederek üst mediastene ilerler. Aortik ark üst tarafında kalır. Sol RLS, sol vagal sinirden ligamentum arteriosum altında, aorto-pulmoner pencere seviyesinde dallanır. Trakea-özefageal olukta larinkse doğru ilerler. Trakeoözefageal olukta daha korunaklı bir seyir gösterir. Sol RLS uzunluğu (43 cm) sağdan (32 cm) daha fazla olduğu için sol rekürren laringeal sinir daha çok hasar görmektedir.

**Sağ RLS:** Mediastende sağ vagus siniri sağ subklavian arteri ventral olarak çaprazlar ve ardından trakea sağ tarafında medial ve dorsal olarak ilerler. Sağ RLS sağ subklavian arter kaudalinde vagal sinirden dallanır. Sağ RLS, sağ subklavian arter dorsalinden geçerek trakea-özefageal olukta kranial-medial yönde ilerler. Krikoid kartilaj seviyesinde, inferior tiroid arterin laringeal dalıyla beraber, inferior konstriktör kasın alt sınırının ardından geçer ve krikotiroid eklem posteriorundan larinkse girer. Sağ RLS trakeaözefageal oluğun anteriorundadır ve tiroidin alt kutbuna yaklaştıkça trakeanın lateraline doğru döner, yani sol RLS'ye göre daha yüzeeldir (Şekil 7).



**Şekil 7.** Rekürren larengeal sinirin seyri

Rekürren larengeal sinir nadiren servikal bölgede direkt olarak vagustan ayrılır ve ‘non-rekürren’ larengeal sinir adını alır. Bu anomali sağda %0.6, solda %0.04 oranında görülür. Non-rekürren larengeal sinirin üç tipi mevcuttur. Tip 1: Süperior tiroid damarlarla yakın seyreder. Tip 2 (Tip 2A): İnférieur tiroid artere paralel ve arterin süperiorunda transvers seyreder. Tip 3 (Tip 2B): İnférieur tiroid artere paralel, inferior tiroid arter dalları arasından veya altından transvers seyreder (68). Bu anomali embriyonel hayatta gelişen vasküler anomaliler sonucu ortaya çıkar. Sağ ‘non-rekürren’ larengeal sinirle beraber görülen anomaliler aberran subklavian arter varlığı ve innominate arter yokluğudur. Sol ‘non-rekürren’ larengeal sinire eşlikeden anomaliler situs inversus ve sağ yerleşimli arkus aortadır (69). Aynı tarafta rekürren ve ‘nonrekürren’ larengeal sinirin birlikte olduğu vakalar bildirilmiştir; bu olgularda vasküler anomali saptanmamıştır (70).

## 2.5. LARENGEAL EMG

Larengeal elektromyografi (LEMg), larinksin muskuler ve sinir sisteminin bütünlüğünü değerlendiren bir testtir. Bu test vokal kord hareket bozukluğu olan kişilerde uygulanır. LEMg'nin amacı bu hareket bozukluklarının ayırıcı tanısında ve tanı koymada klinisyene yardımcı olmaktır. LEMg, klinikte iğne elektrod ile yapılmaktadır. Larinkste 4 çift kas grubu vardır: tiroaritenoid, lateral krikoaritenoid, posterior krikoaritenoid ve krikotiroid kaslardır. İnteraritenoid kas ise larinksin arka-orta kısmında yerleşir ve çift

değildir. Krikotiroid kas superior larengeal sinirden innerve olur diğerkaslar ise RLS'den innerve olurlar. Bu yüzden bu kasları test ederken sinir ve kas bütünlüğünü de test etmiş oluruz. Genellikle her iki tarafta tiroaritenoid, posterior krikoaritenoid ve krikotiroid kaslar test edilir.

Klinisyen LEMG sonuçlarını LEMG'nin 4 ana karakteristik sinyali olan insertiyonal aktivite, spontan aktivite, rekrütment ve dalga morfolojisine göre değerlendirir (71). LEMG'nin sonucu tek başına spesifik hastalık tanısını koymada yetersizdir. LEMG motor ünite, kaslar, sinir ve nöromuskuler bileşke hakkında genel bilgi edinmemizi sağlar.



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiş olup; (Proje no: 7298) projeye başlamadan önce, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 15/02/2017 tarih ve 17/012 no'lu onayı alınmıştır. Araştırma, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Nöroloji Anabilim Dalı, Histoloji Anabilim Dalı imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyleer yürütülürken, Avrupa Konseyi'nin önerdiği standartlara (European Convention For the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS 123)) uyulmuştur.

Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezinden temin edilen, 12-16 haftalık ve ortalama ağırlığı 250 gram olan 22 adet erkek Sprague Dawley cinsi sıçan kullanılmıştır. Araştırma sürecinde sıçanlar, 21-22 C çevre sıcaklığı, 12/12 saat aydınlık/karanlık siklusunun sağlandığı, bağıl nem oranı (%55-65) ve havalandırılması kontrol edilen semiklimatize bir odada barındırılmıştır. Su içimi ve hazır pellet sıçan yemi verilerek beslenmeleri serbest bırakılmıştır (ad libitum).

#### **3.1. DENEY GRUPLARININ BELİRLENMESİ**

Deneyleer hayvanları, çalışmanın başında çalışma grubunda 14, kontrol grubunda 8 adet sıçan olacak şekilde 2 gruba ayrılmıştır:

Çalışma Grubu: Sol rekürren sinirde ezilme hasarı oluşturduktan sonra yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre verilmiş sıçanlar.

Kontrol Grubu: Sol rekürren sinirde ezilme hasarı oluşturduktan sonra herhangi bir müdahale yapılmayan sıçanlar.

### **3.2. YAĞ DOKUSU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ**

Rastgele seçilen iki adet erkek sıçanın periton çevresinden yaklaşık olarak 1x1 cm<sup>3</sup> adipoz doku toplandı. Toplanan adipoz doku taşıma solüsyonu içerisinde Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kök Hücre AR-GE laboratuvarına taşındı. Getirilen doku, %1 penisilin- streptomisin solüsyonu içeren phosphate-buffered saline (PBS) (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) içinde üç defa yıkandı. Ardından doku parçaları PBS (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) içinde 2.5 mg/ml kollojenaz tip 2 (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany) ile 37 °C ‘de 30 dakika enzimatik parçalamaya tabii tutuldu.

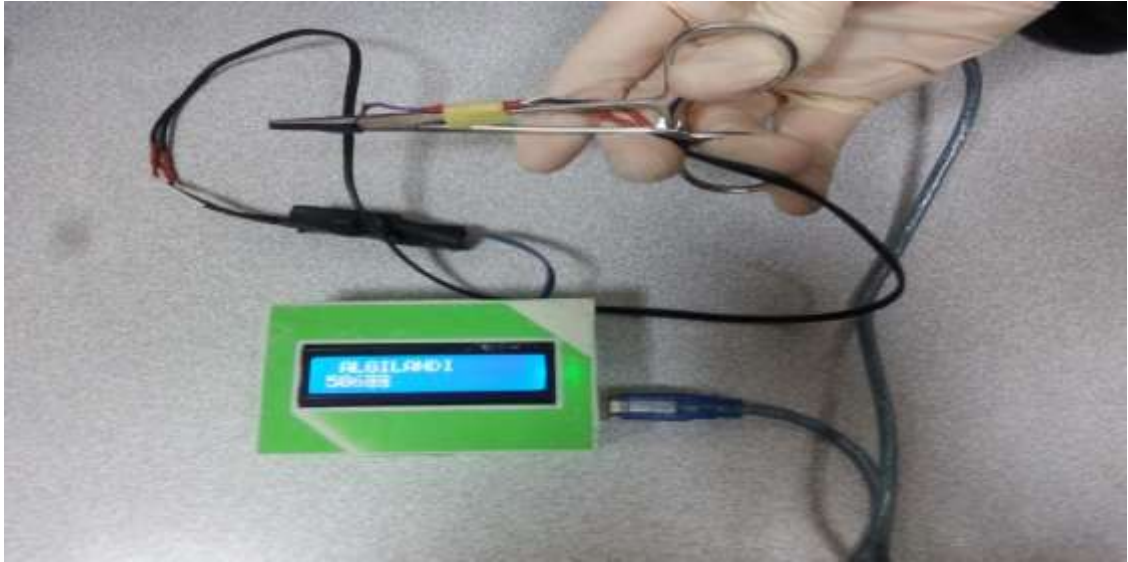
Bu işlem sonunda elde edilen tek hücre süspansiyonu, 70 µm ‘lik hücre filtresinden (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) geçirildi. Bu yöntemle debris ve parçalanmayan adipoz doku ayrıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 25 cm<sup>2</sup>‘lik kültür flasklarına ekildi. Kültür için kullanılan besiyerinin içeriğinde %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren düşük glikozlu DMEM (L-DMEM medium (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) ve %1 penisilin streptomisin solüsyonu ve %1 glutamin (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) bulunmaktadır. Hücreler 37°C’de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildiler. İlk olarak üç gün sonra ve ardından haftada iki defa besiyeri değiştirilerek idame edildi. Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre (YDMKH)’ ler kültür kabına yapışma özelliğine göre izole edildiler. % 70-80 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında primer hücre kültürünün %0.025 trypsin-EDTA ile ayrışması sağlandı. Hücreler PBS (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) ile yıkandıktan sonra pasajlama işlemi gerçekleştirilerek 1:4 oranında alt kültürlerle geçildi. Bu çalışmada 3. pasaj sayısındaki YDMKH’ler kullanıldı.

Farklılaştırılmamış YDMKH’lerin fenotipik özelliklerini göstermek için akım sitometri yapıldı. 3. pasaj sonu hücreler toplandı ve santrifüj edildi. Ardından 106 hücre/mL olacak şekilde PBS ile resüspansiyonu yapıldı. YDMKH’lerin immün

fenotiplendirilmesi için CD11b/c, CD29, CD44, CD45, CD73, CD90 (BD Biosciences) kullanıldı. Akım sitometri Navios (BeckmanCoulter, USA) cihazında gerçekleştirildi. Veriler KALUZA software (Beckman Coulter, USA) kullanılarak değerlendirildi. % 50'den fazla boyanma pozitif olarak değerlendirildi.

### 3.3. SENSÖRLÜ KLEMP TASARIMI

RLS ezilme hasarında, standartizasyonu sağlamak için Erciyes Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü ile ortak çalışılarak sinir hasar cihazı tasarlandı. Dişsiz mini forsepsin ağız kısmına yerleştirilen karbon plaklar arasındaki elektrik geçirgenliğinin orantılı olarak artması ve bunun monitörize edilmesi prensibiyle çalışan, basınç sensörlü klemp (Resim 1) kullanıldı. Cihaz öncelikle farklı yumuşaklıktaki cisimlerde (kablo ve pamuk) test edilerek standartizasyonu ve kalibrasyonu sağlandı.

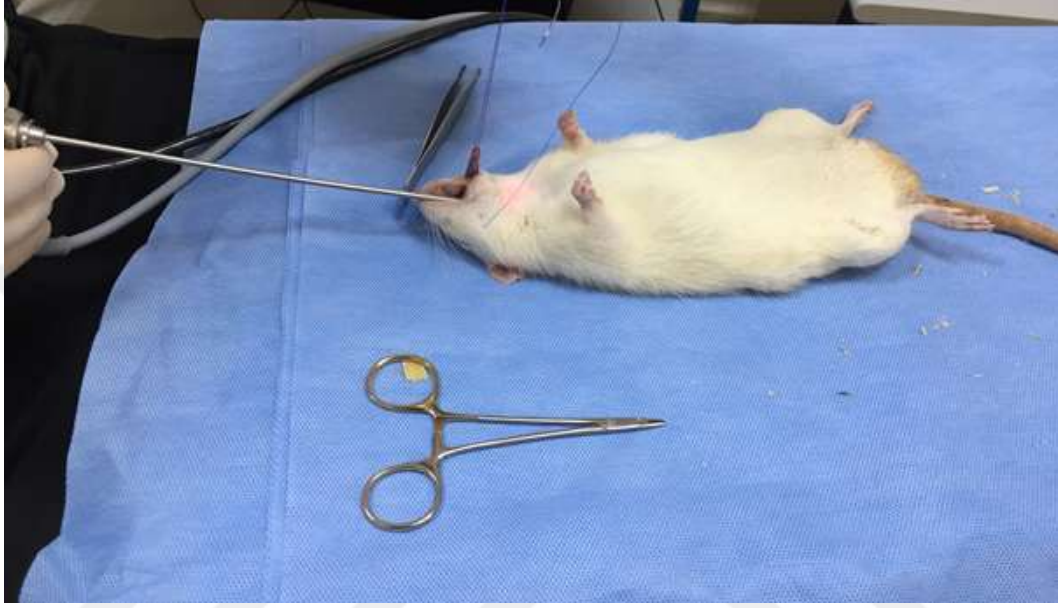


**Resim 1.** Sensörlü klemp sistemi

### 3.4. VOKAL KORD MUAYENESİ

Sıçanlara 50 mg/kg Ketamin HCl (Ketalar® 500 mg/10 ml, Pfizer) ve 10 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun® %2, 25 mg/ml, Bayer) ile genel anestezi yapıldı. Genel anestezi sonrası tüm ratların vokal kord muayenesi 0 derece 2.7 mm çaplı endoskop (Karl Storz, Tutlingen, Almanya) ile deneğin dili 4/0 vicryl ile suturasyon ile ekarte edilerek yapıldı (Resim 2).

Cerrahi müdahale öncesi her bir sıçanın vokal kord muayenesi video ile kayıt altına alındı. Cerrahi işlem sonrası yine endoskopik muayene ile sol vokal kordda paralizisi olduğu tüm sıçanlarda gözlemlendi. 2 ay sonra tüm sıçanların tekrar larenks muayenesi yapılarak video kayıt altına alındı ve referans alınan vokal kord hareket skalasına göre değerlendirme yapıldı (72) (Tablo 2).



**Resim 2.** Endoskopik larenks muayenesi

**Tablo 2.** Vokal kord hareket skalası (72)

SKOR	VOKAL KORD HAREKETİ
0	vokal kord hareketi yok
1	hafif vokal kord hareketi
2	vokal kordda <%50 abduksiyon
3	vokal kordda >%50 abduksiyon, tam düzenli olmayan vokal kord hareketi
4	vokal kord hareketi normal

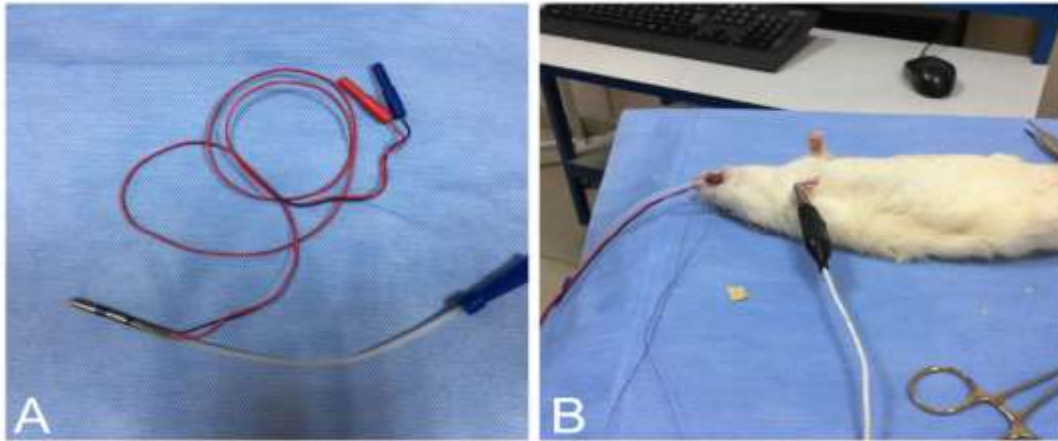
### 3.5. EMG

Tüm elektrofizyolojik ölçümler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı EMG Laboratuvar'ında yapıldı. Sıçanların EMG kayıtları, Cadwell® (Sierra® Summit™, ABD) cihazı (Resim 3) kullanılarak kaydedildi. Değerlendirmeler, bir

nöroloji uzmanı tarafından kör şekilde yapıldı. Tüm sıçanlar anestezi altında spontan uyku halindeki respiratuar siklusta değerlendirildi. Genel anestezi ve ilk vokal kord muayenesi sonrası 8 FR mavi nelaton sondanın ön kesimine larengeal emg elektrodu (Neurovision™ Dragonfly® Laryngeal Surface Electrodes) sarılarak 0 derece 2.7 mm çaplı endoskop (Karl Storz, Tutlingen, Almanya) eşliğinde vokal kordlar yüzey elektroduna temas edecek şekilde yerleştirildi. Hayvanın sağ eline toprak klips elektrodu bağlandı. Ekran süpürme hızı 10 ms/division, ekran duyarlılığı 100 mv olarak ayarlandı ve EMG kaydı alındı (Resim 4). Cerrahi işlemden hemen sonra ve hasar sonrası 2. ayda da EMG kayıtları alındı. Kontrol ve çalışma grupları hasar öncesi, hasar sonrası hemen ve hasar sonrası 2. ayda EMG kayıtları açısından önce kendi grupları içerisinde değerlendirildi. Sonrasında da çalışma ve kontrol gruplarındaki hasar sonrası 2. ayda yapılan EMG kayıtları karşılaştırıldı. EMG'ler MÜP amplitüdü açısından karşılaştırıldı.



**Resim 3.** EMG cihazı

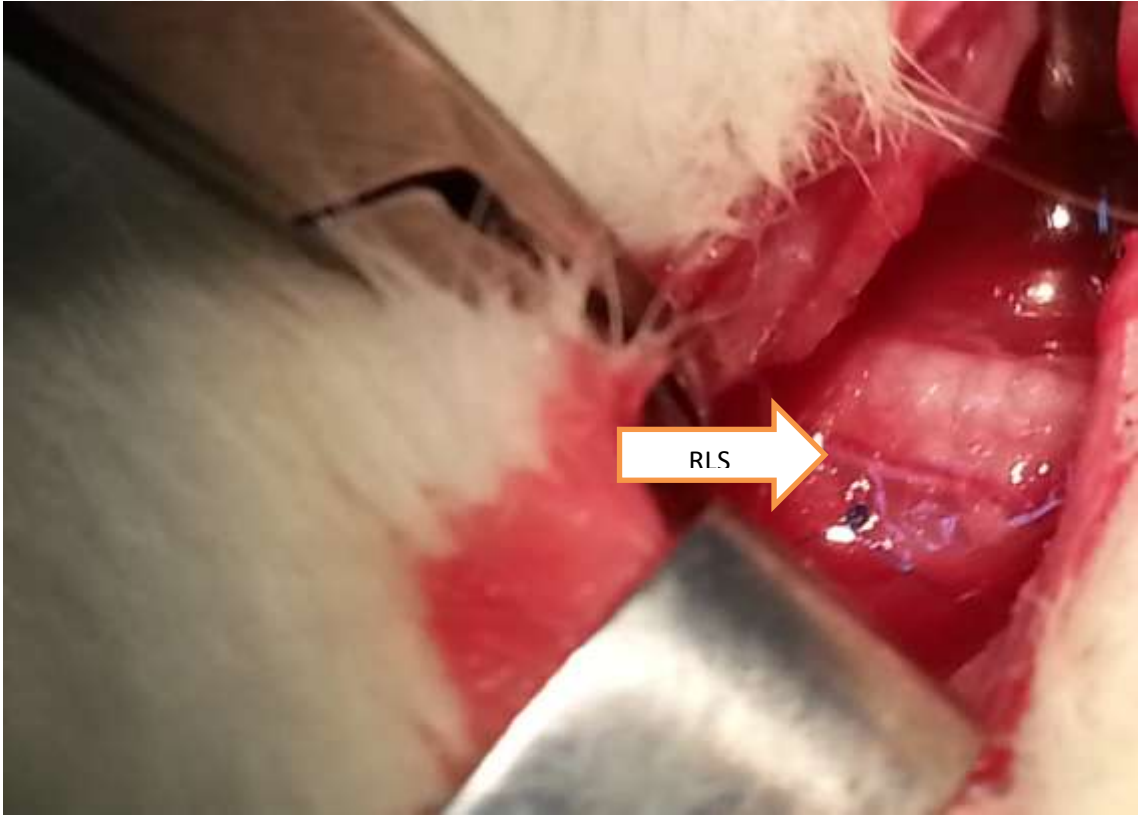
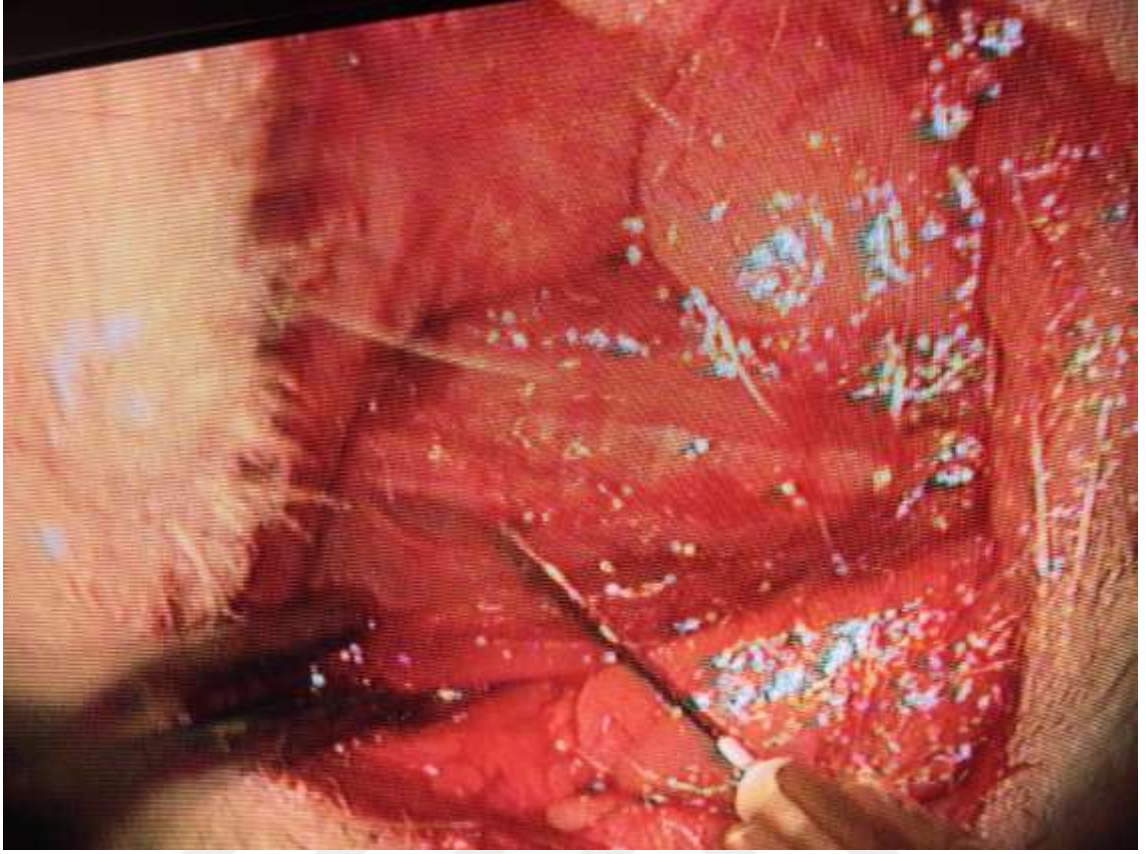


**Resim 4.** A. EMG elektrodu B. Larengeal EMG'nin yapılışı

### 3.6. CERRAHİ İŞLEMLERİN YAPILMASI

Genel anestezi yapıldıktan sonra sıçanların boyun bölgesi traş edildi ve %10'luk Polivinilpirolidon iyot solüsyonu (Batticon, Adeka, Samsun, Türkiye) ile sterilize edildi. Hayvan supin pozisyona getirilerek ameliyat masasında sabitlendi. Steril şartlar altında yaklaşık 2 cm genişliğinde boyuna horizontal insizyon yapıldı. Strep kaslar ve submandibuler bez ekarte edildikten sonra trakeaya ulaşıldı. Mikroskop (Carl Zeiss OPMI Visu 200 S8, Almanya) altında sol rekürren larengeal sinir trakeaözofageal olukta identifiye edildi. Yedinci trakeal halka seviyesinde sabit bir ezilme hasarı oluşturmak için tarafımızca geliştirilen basınç sensörlü özel düzenek ile 1 dk süre ile ezilme hasarı oluşturuldu. Kök hücre uygulanacak gruptaki sıçanlara hasar sonrası sinir etrafına 0.2 cc kök hücre enjekte edildi. Kök hücre verilmeyecek olan sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Siniri daha sonra kolay bulabilmek için sinirin hemen yanına prolen suture ile işaret konuldu. Kas ve cilt 4/0 vicryl ile suture edilerek suture bölgesine yara koruyucu sprey sıkıldı (Resim 5).





**Resim 5.** Sıçanların cerrahi işlem için hazırlanması, hasar sonrası lokal kök hücre enjeksiyonu, rekürren larengeal sinirin(ok) prolen sütün ile işaretlenmesi

### 3.6. HİSTOLOJİK İNCELEME

Hasar sonrası 2. ayda her bir sıçanda larengeal sinir disseksiyonu yapılarak prolen sutur ile işaretlenmiş sinir bulundu ve hasarlanan segmenti içeren sinir biyopsisi alındı. Sonrasında sıçanlar intraperitoneal yüksek doz Ketamin HCl (Ketalar® 500 mg/10 ml, Pfizer) ile sakrifiye edildi. Alınan sinir biyopsisinde histolojik olarak akson sayısına, akson çapına ve s100 immunreaktivite yoğunluğuna bakıldı.

#### 3.6.1. Larengeal sinir frozen kesitlerin hazırlanması

Dekapitasyon işleminden sonra larengeal sinir dokuları frozen kesit için hazırlandı. Bunun için her bir sıçandan alınan larengeal sinir %4'lük paraformaldehit içinde tespit edildikten sonra sıvı nitrojende hızlı bir şekilde dondurularak bloklandı ve frozen kesitler alınmaya kadar -80°C'de muhafaza edildi. Sıçanlara ait olan larengeal sinirlerden 10 µm kalınlığında kesitler alındı ve myelinli sinir liflerini göstermek için Oil red O boyama metodu uygulandı (Tablo 3).

**Tablo 3.** Frozen kesitlerde Oil Red O boyama metodu

Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Kurutma	10 dk
2	Aseton (-20°C)	10 dk
3	Distile su	10 dk
4	%70 etanol	1 sn
5	Oil Red O	20 dk
6	%70 etanol	1 sn
7	Distile su	10 dk
8	Hematoksilen	5 dk
9	Distile su	10 dk
10	Kapatma	

### **3.6.2. İmmunohistokimyasal uygulama**

Kontrol ve çalışma grubu sıçanlarına ait larengeal sinir dokularında S-100 ekspresyonunu belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immuno histokimyasal boyama metodu uygulandı. Bunun için -80°C’de muhafaza edilen frozen kesit örnekleri kullanıldı. Oda ısısına getirilen kesitler distile su ile 2 defa 2’şer dakika yıkandıktan sonra antijen geri kazanımı için %10’luk sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600 W’de 5 dakika kaynatıldı ve 10 dakika aynı tampon solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 12 dakika %3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile muamele edildi. Bundan sonraki aşamalar için Large Volume Detection System (Thermo Scientific, TP-125-HL) boyama kiti kullanıldı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 5 dakika Ultra V block uygulandı. Hemen ardından kesitlere S-100 primer antikorunu uygulanarak 1 gece +4°C’de bekletildi ve ertesi sabah 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, primer antikor yerine PBS kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler biotinli-sekonder antikor ile 10 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra streptavidin peroksidaz ile 10 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immünreaktiviteyi görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) özelliği gösteren kitteki peroksidaz substrat ile 1-5 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika distile su ile yıkandı. Gill hematoksilen ile zıt boyanan kesitler birkaç kez distile su ile yıkandı. Son olarak artan alkol serileri ile suyu uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler kapatma solüsyonu (Entellan®,Merck) ile kapatılarak Olympus BX51 (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) mikroskobunda incelendi.

### **3.7. İSTATİKSEL ANALİZ**

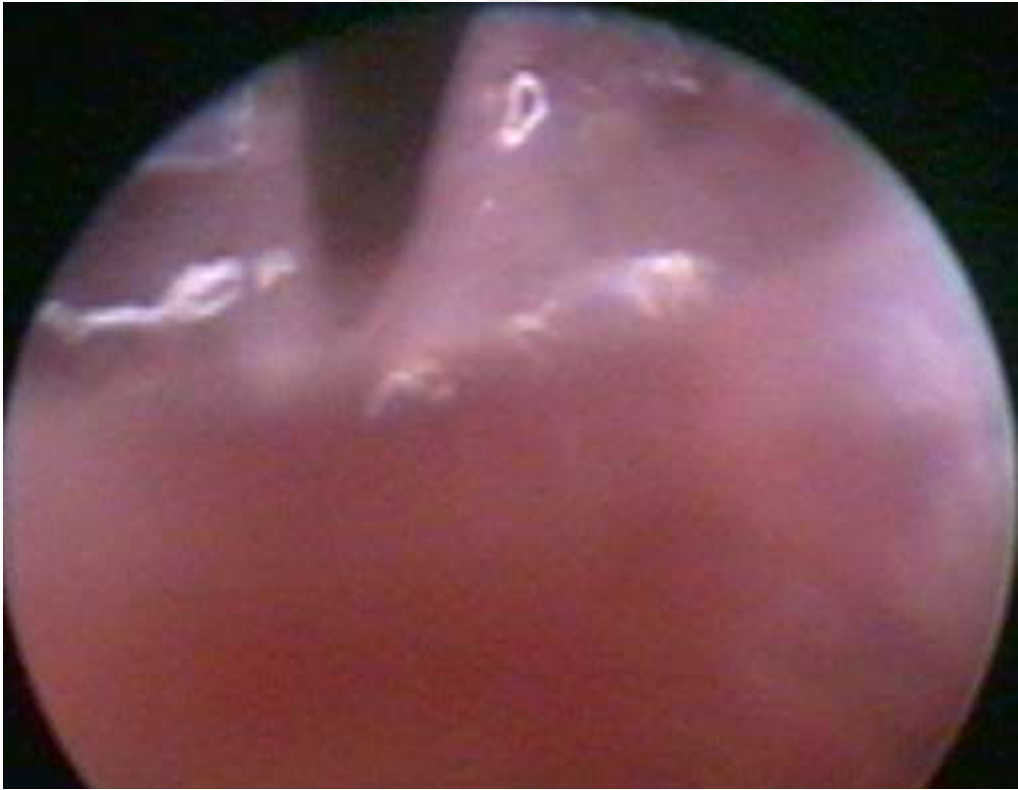
Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi, Q-Q ve histogram grafiği ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda t testi ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenler arası ilişkilendirmelerde ki-kare analizi kullanıldı. Ölçümlerin zamana göre değişimini test etmek için tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanıldı. Verilerin analizi SPSS 22.0 software (IBMAanalytics, Armonk, New York, USA) ve TURCOSA (Turcosa Analitik Ltd. Co. Turkey, www.turcosa.com.tr) programı ile değerlendirildi.  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

## **4. BULGULAR**

Çalışmaya kontrol grubunda 8 çalışma grubunda ise 14 sıçan ile başlanılmasına rağmen, kontrol grubundan 3 çalışma grubundan ise 6 rat ölüm nedeni ile çalışma dışı kaldı. Bu nedenle çalışma 13 sıçan ile tamamlanabildi. Ölümlerin 4'ünün anestezi sonrası ve 5'inin ise LEMG sonrasında meydana geldiği izlendi.

### **4.1. VOKAL KORD MUAYENE BULGULARI**

Cerrahi müdahale öncesi çalışmaya katılan tüm sıçanların endoskopik muayene ile vokal kord hareketlerinin normal olduğu izlendi. Sol RLS hasarı sonrası yine tüm sıçanlarda sol vokal kord paralizisi endoskopik olarak gözlemlendi (Resim 6).



**Resim 6.** Hasar öncesi normal kord hareketi ve hasar sonrası sol vokal kord paralizisi

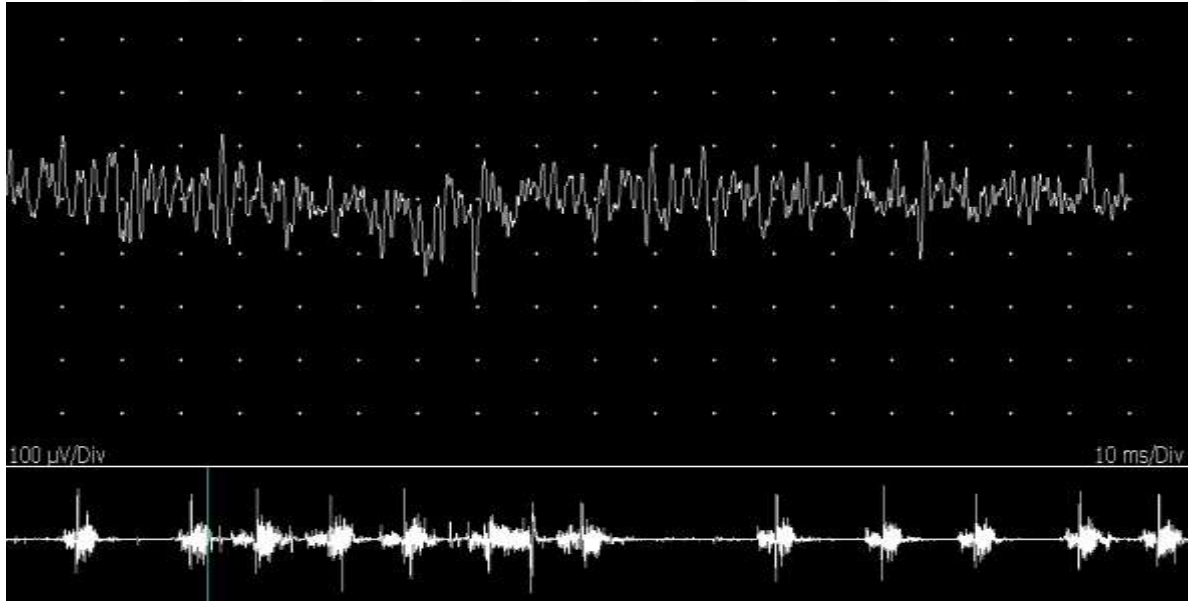
Hasar oluşturulduktan 2 ay sonra kök hücre verilen ile verilmeyen grup vokal kord hareket skalasına (72) göre karşılaştırıldı. Kontrol grubundaki 5 sıçanın, çalışma grubundaki 8 sıçanın normal vokal kord hareketine sahip olduğu izlendi. Tüm sıçanların vokal kord hareketlerinin normal olduğu görüldü ve skalaya göre 4 olarak puanlandı (Tablo 4).

**Tablo 4.** Hasar sonrası 2. ayda vokal kord hareketi

Değişken	Grup	
	Normal Vokal Kord Hareketi	Kontrol n(%)
	5/5 (%100)	8/8 (%100)

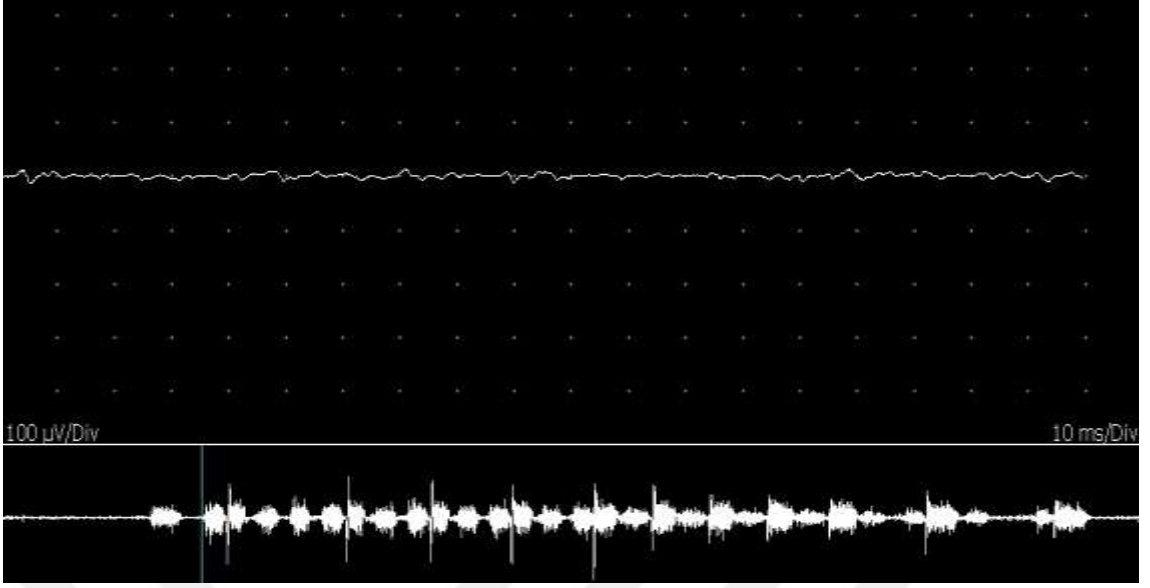
#### 4.2. EMG BULGULARI

Tüm sıçanların hasar öncesi MÜP amplitüdü ölçüldü. Hasar öncesi tüm sıçanlarda MÜP amplitüdünün normal olduğu izlendi (Resim 7).



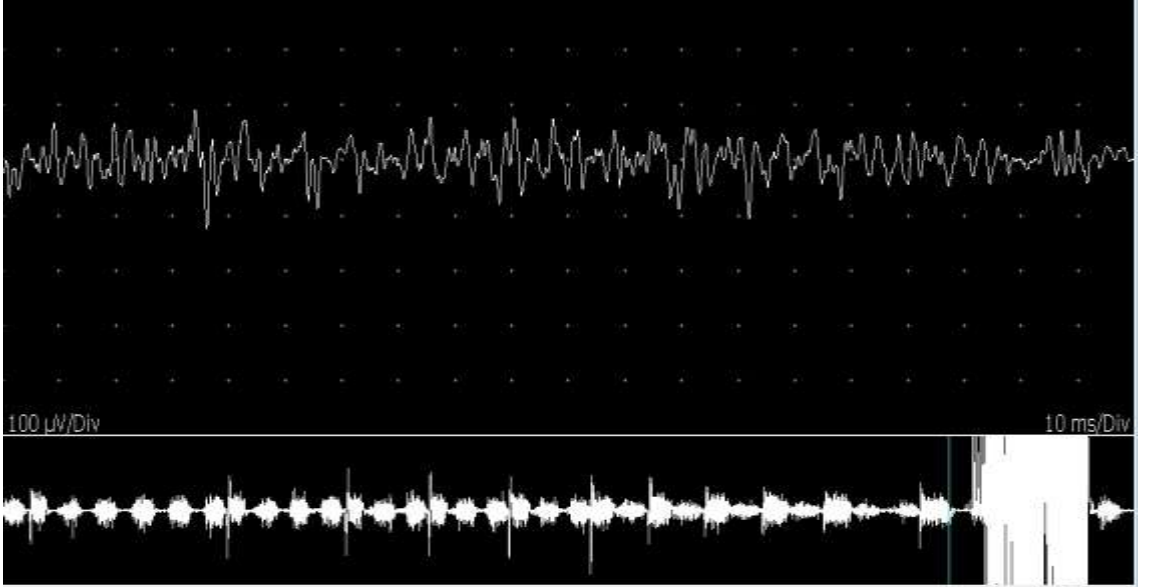
**Resim 7.** Uyurken spontan solunum esnasındaki normal EMG. Multipl motor ünitelerin aksiyon potansiyelinin normal MÜP amplitüdü izlenmektedir.

Ezilme hasarı sonrası yine tüm sıçanların MÜP amplitüdüne ve katılım paternine bakıldı. Tüm sıçanlarda MÜP amplitüdünde belirgin düşme izlendi (Resim 8).



**Resim 8.** Hasar sonrası hemen bakılan EMG. MÜP amplitüdünde belirgin düşme görülmektedir.

Hasar sonrası 2. ayda yine tüm sıçanların MÜP amplitüdüne bakıldı. Hem kontrol grubunda hem de çalışma grubunda MÜP amplitüdünün normal ile benzer özellikte oldukları izlendi (Resim 9).



**Resim 9.** Hasar sonrası 2. Ayda yapılan EMG. MÜP amplitüdü normal izlenmektedir.

Çalışma grubundaki MÜP amplitüd ölçümünün zamana göre değişimi anlamlı bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Kontrol grubundaki MÜP amplitüd ölçümünün zamana göre değişimi de anlamlı olarak bulunmuştur ( $p=0.001$ )(Tablo 5)(Şekil 8).

**Tablo 5.** MÜP amplitüdünün zamana göre değişimi

	<b>Hasar Öncesi</b>	<b>Hasar Sonrası Hemen</b>	<b>Hasar Sonrası 2. Ay</b>	<b>p Değeri</b>
<b>Çalışma</b>	310±130.80 <sup>a</sup>	46 ± 5.16 <sup>b</sup>	175 ± 92.05 <sup>c</sup>	< 0.001
<b>Kontrol</b>	116 ± 47.74 <sup>a</sup>	36 ± 8.94 <sup>b</sup>	136 ± 41.59 <sup>a</sup>	0.001

Veriler ortalama ±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan benzer harfler ölçümler arası benzerliği, farklı harfler ölçümler arası farklılığı göstermektedir.

Çalışma grubundaki sıçanların hasar öncesi yapılan EMG sinde saptanan MÜP amplitüdüleri ile hasar sonrası hemen yapılan EMG ‘sinde saptanan MÜP amplitüdüleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p<0.001). Hasar sonrası hemen yapılan EMG ‘sinde saptanan MÜP amplitüdüleri ile hasar sonrası 2. ayda yapılan EMG ‘sinde saptanan MÜP amplitüdüleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.004). Hasar öncesi yapılan EMG sinde saptanan MÜP amplitüdüleri ile hasar sonrası 2. ayda yapılan EMG ‘sinde saptanan MÜP amplitüdüleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.033).

Kontrol grubundaki sıçanların hasar öncesi yapılan EMG sinde saptanan MÜP amplitüdüleri ile hasar sonrası hemen yapılan EMG ‘sinde saptanan MÜP amplitüdüleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.033). Hasar sonrası hemen yapılan EMG ‘sinde saptanan MÜP amplitüdüleri ile hasar sonrası 2. ayda yapılan EMG ‘sinde saptanan MÜP amplitüdüleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.009). Hasar öncesi yapılan EMG sinde saptanan MÜP amplitüdüleri ile hasar sonrası 2. ayda yapılan EMG ‘sinde saptanan MÜP amplitüdüleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p=0.661).

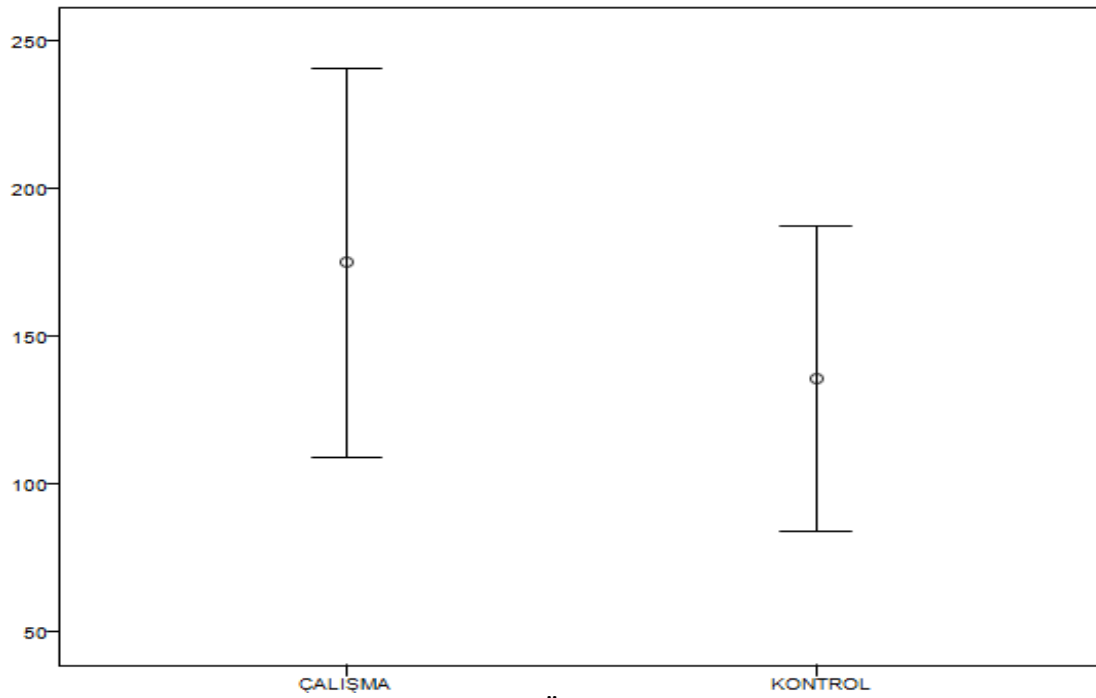
**Tablo 6.** MÜP amplitüdülerinin p değeri tablosu

			p değeri
<b>Çalışma grubu</b>	<b>Hasar Öncesi</b>	<b>Hasar Sonrası Hemen</b>	<0.001
		<b>Hasar Sonrası 2. Ay</b>	0.033
	<b>Hasar Sonrası Hemen</b>	<b>Hasar Sonrası 2. Ay</b>	0.004
<b>Kontrol grubu</b>	<b>Hasar Öncesi</b>	<b>Hasar Sonrası Hemen</b>	0.033
		<b>Hasar Sonrası 2. Ay</b>	0.009
	<b>Hasar Sonrası Hemen</b>	<b>Hasar Sonrası 2. Ay</b>	0.661

Çalışma ve kontrol gruplarının 2. ayda yapılan EMG'lerinde saptanan MÜP amplitüdü karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0.262$ )(Şekil 9).



Şekil 8. MÜP amplitüdünün zamana göre değişimi



Şekil 9. Grupların 2. aydaki MÜP amplitüdlerinin karşılaştırılması

### 4.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Herbir sıçana ait Oil Red O ile boyanan larengeal sinirin enine kesitlerinde, ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) kullanılarak 100X büyütmede olacak şekilde rastgele 2 farklı alandan fotoğraf alındı. Larengeal sinir kesitlerinde, 100X büyütmede alınan fotoğraflardan miyelinli sinir liflerinin sayısı ve çapı Image J software programı kullanılarak hesaplandı.

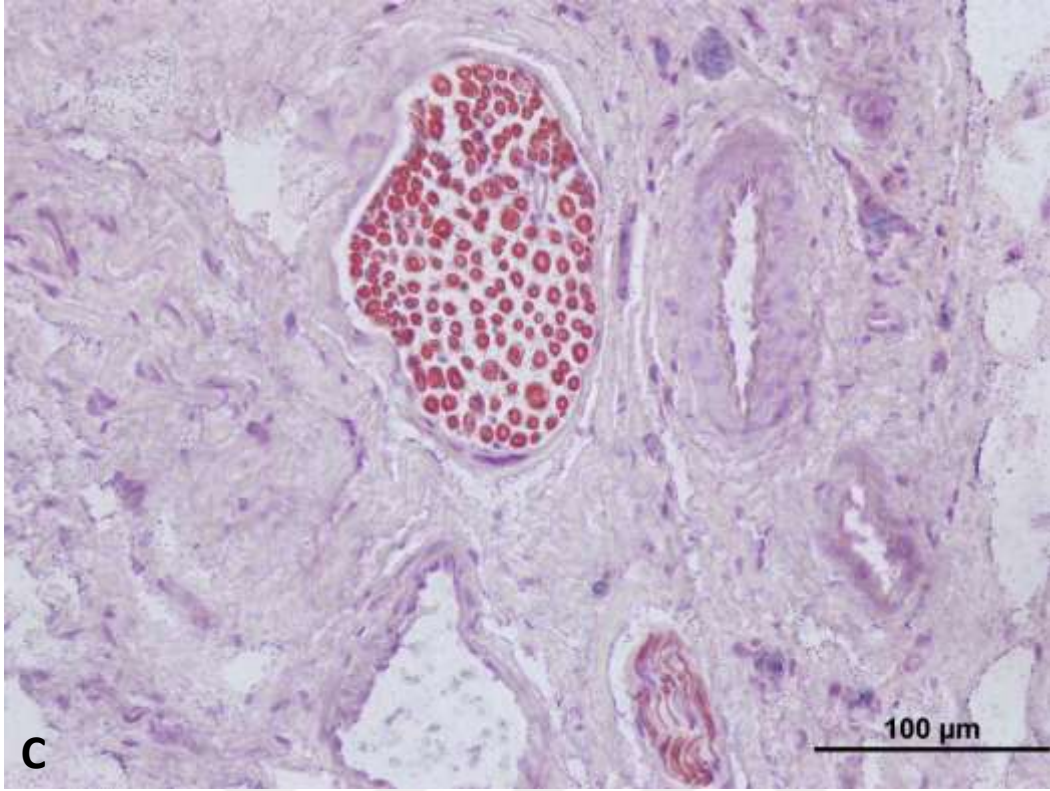
Myelinli sinir liflerini göstermek için uygulanan oil red o ile boyanmış kesitler incelendiğinde, kontrol grubuna ait tüm sıçan sinir kesitlerinde (Resim 10A, 10B) aksonal dejenerasyon, miyelinli sinir liflerinin kaybı gibi önemli histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. MKH uygulanan çalışma grubu deney hayvanlarının tümüne ait sinir kesitlerinde, kontrol grubuna benzer ancak daha az şiddetli histopatolojik bulgular yer aldı (Resim 10C, 10D). Bu grupta; erken aksonal rejenerasyon ve remiyelinizasyonun karakteristik özelliği olan SH ile çevrili ince miyelinli sinir lifleri dikkati çekti. YDKMKH uygulanan bu gruptaki sıçanların hepsinde MKH'lerin demiyelinizasyonda belirgin bir düşüşe neden olduğu görüldü. Hem kontrol hem de çalışma grubunda miyelinli sinir lifi kaybı vardı. Bu değerlendirmeler yapılırken tüm hayvanlardan alınan sinir kesitleri değerlendirildi.



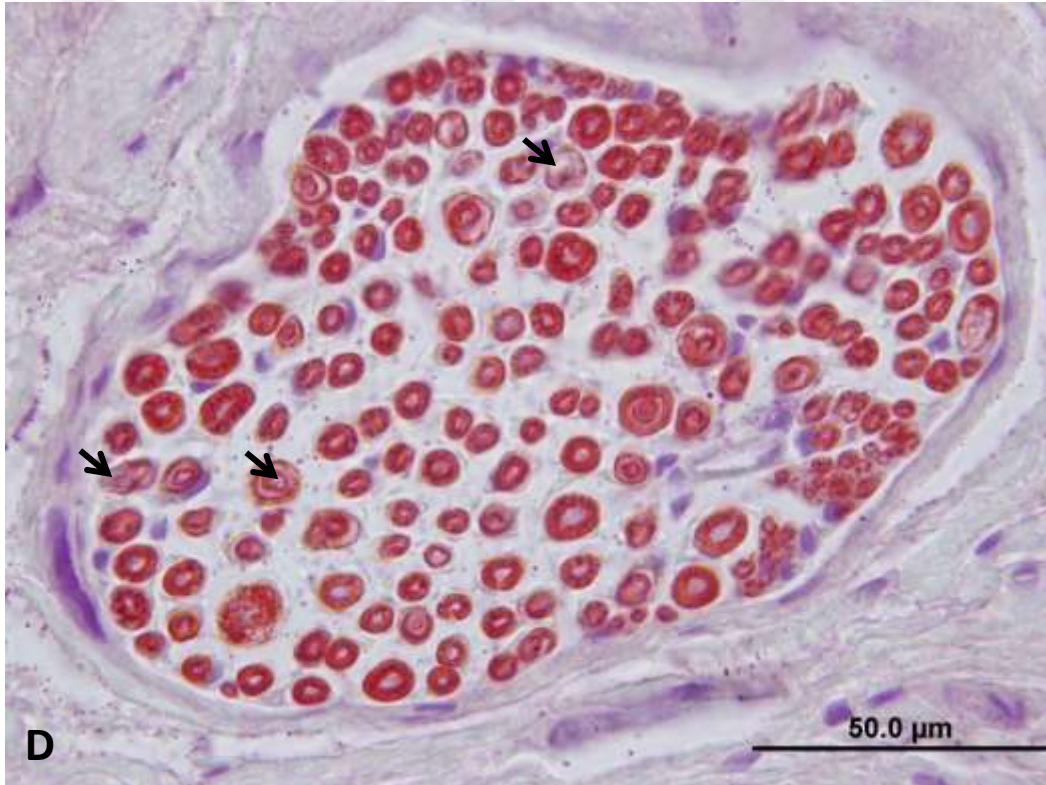
**Resim 10A.** Kontrol grubuna ait bir sinir kesiti



**Resim 10B.** Kontrol grubuna ait sinir kesitinde aksonal dejenerasyon (ok) ve myelinli sinir liflerinin kaybı (daire)

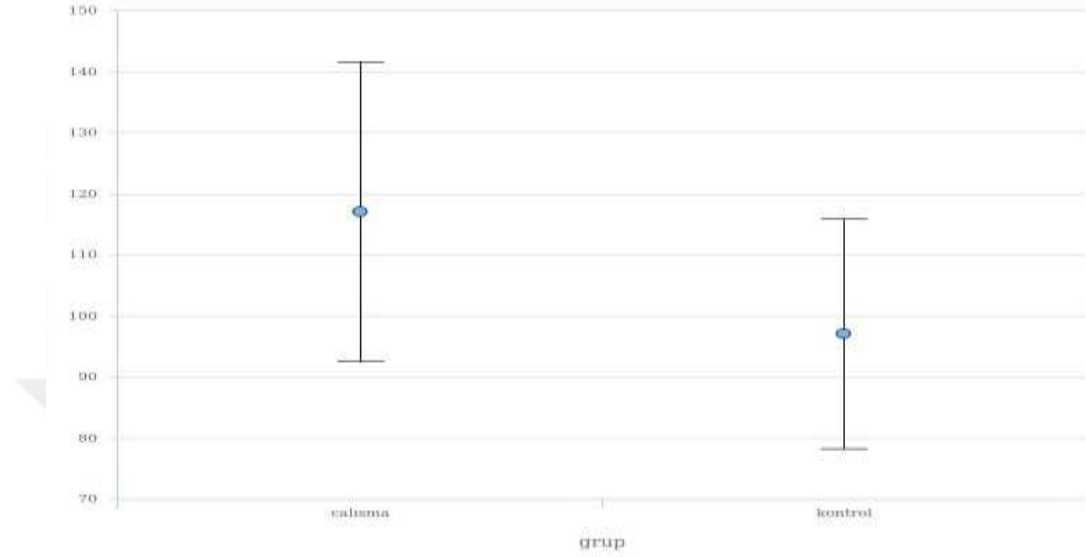


**Resim 10C.** Çalışma grubuna ait bir sinir kesiti

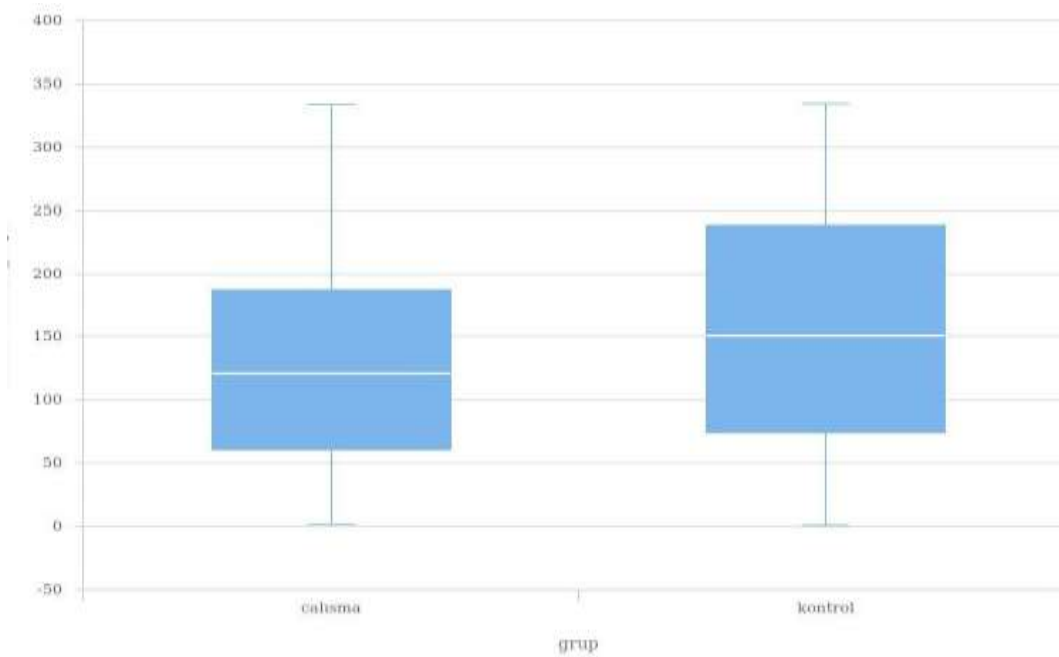


**Resim 10D.** Schwann hücresi ile çevrili ince miyelinli sinir lifleri(ok)

Akson sayımı açısından karşılaştırılma yapıldığında çalışma grubu (ortalama:  $117 \pm 28.09$ ) ve kontrol grubu (ortalama:  $97 \pm 16.64$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ( $p=0.313$ )(Şekil 10).

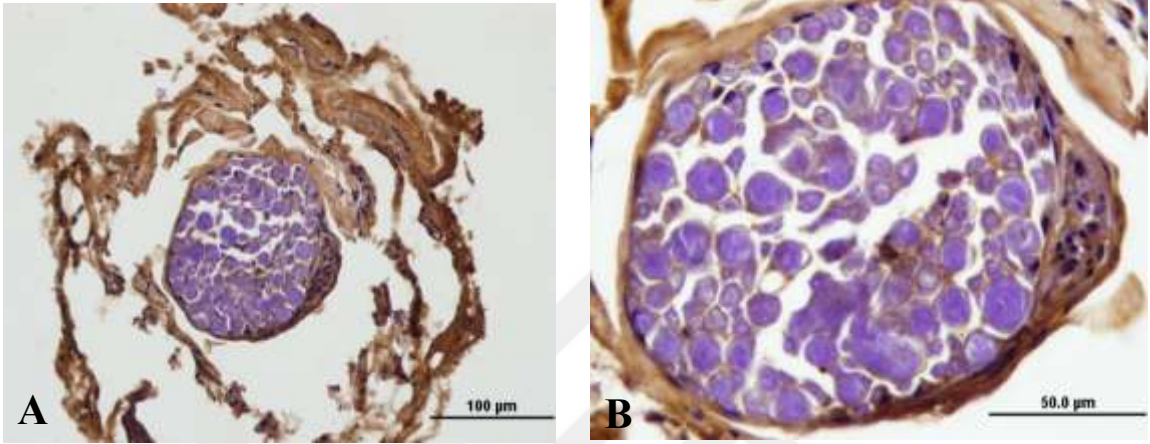


**Şekil 10.** Akson sayımı (Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir.) Akson çapı açısından karşılaştırma yapıldığında kontrol grubunda (ortanca: 150 (1-334)) çalışma grubuna (ortanca: 120.5 (2-333)) göre anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p<0.001$ ) (Şekil 11).

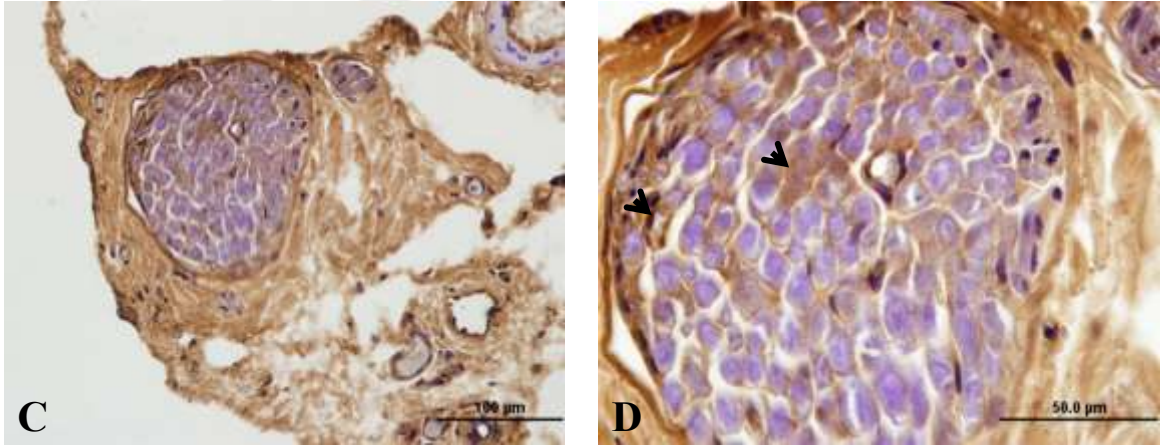


**Şekil 11.** Akson çapı (Veriler ortanca (minimum-maximum) olarak ifade edilmiştir.)

Larengal sinir lifleri, spesifik bir marker olan S100 immün boyama ile görselleştirildi (Resim 11). İmmünohistokimya boyama metodu ile boyanan sinir kesitlerinde S-100 immünreaktivite yoğunluğunun hesaplanması için Image J software programı kullanıldı. Bunun için her bir dokuya ait 100X büyütmede alınan ışık mikroskopik fotoğraflar kullanıldı.

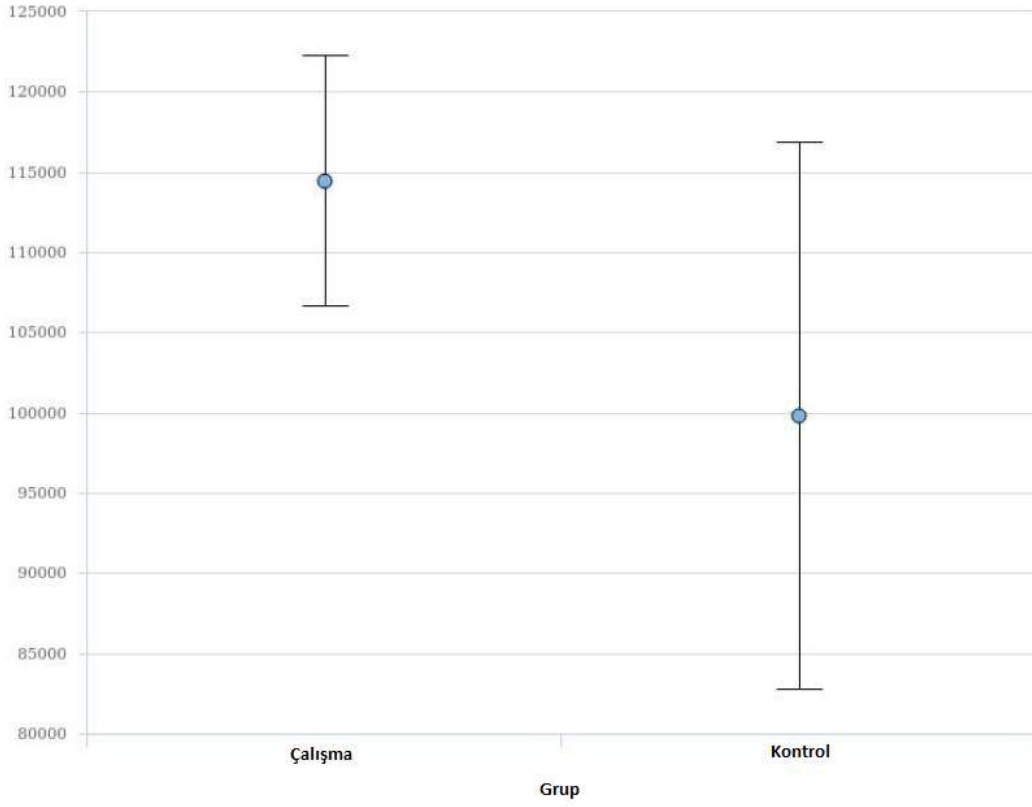


**Resim 11.1.** Kontrol grubuna ait bir sinir lifinin S100 ile boyanması



**Resim 11.2.** Çalışma grubuna ait bir sinir lifinin S100 ile boyanması

S100 immunoreaktivite yoğunluğu açısından çalışma grubunda (ortalama:  $114421 \pm 8921.72$ ) kontrol grubuna (ortalama:  $99793 \pm 15064.65$ ) göre anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p=0.128$ )(Şekil 13).



**Şekil 12.** S100 immunoreaktivite yoğunluğu (Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir.)

## 5. TARTIŞMA

RLS hasarı, yaşam kalitesini etkileyen, önemli sosyal problemlere yol açan ve tedavi maliyeti yüksek bir problemdir. Kalıcı unilateral RLS hasarı tiroidektomilerin, açık kalp ameliyatlarının ve karotis endarterektomilerin yaklaşık olarak %2'sinde görülür. Bu oran kafa tabanı ve torasik cerrahilerde daha fazladır (73). Tiroidektomi sonrası hastalarda % 30-87 arasında subjektif ses şikayetleri görülür. Geleneksel olarak ifade edilen RLS hasarı oranı %3-5'dir, ancak gerçek insidansı %10'a yakındır (74, 75).

Güncel tedavi metodları, yardımcı olmakla birlikte hastaların semptomlarının tamamen giderilmesinde yetersiz kalabilmektedir. RLS hasarı tedavisinde amaçlanan, hastanın hasar öncesi sahip olduğu dinamik sesinin, nefesinin ve yutmasının restorasyonudur. Bu nedenle bir çok araştırmada, nörotropik faktörlerin, kök hücrelerin ve öngörülen farklı tedavi metodlarının reinnervasyon ve vokal kord hareketleri üzerine etkisine odaklanılmıştır. (76-78)

Birkaç araştırmada da sıçanlarda RLS hasarı sonrası doğal seyir incelenmiştir (72, 79).

Hasar sonrası doğal iyileşme hakkında edinilen bilgilerin az olması sebebi ile uygulanan nörotropik faktörler, kök hücreler ve antibodyler gibi deneysel tedavi metodlarının etkisi hakkında kesin sonuçlara varmak zordur.

Günümüzde halen periferik sinir kayıpları onarımında en iyi sonucu elde edebilmek için deneysel hayvan çalışmaları hızla devam etmektedir. Bu tip deneysel hayvan

çalışmalarında sıçanlar sıkça kullanılmaktadır. Literatürde sıçanların yerine tavşan kullanılan sinir çalışmaları da vardır (80). Ancak sıçanların üretilmesi, barındırılması ve bakımı daha kolay ve ekonomiktir. Sıçanlar barınma için daha az yer işgal ettiklerinden çok sayıda deney hayvanı gereken çalışmalarda avantajlıdırlar. Sıçanların anestezisi ve cerrahi manipülasyonları daha kolaydır. İşte bu gerekçelerden dolayı biz çalışmamızda deney hayvanı olarak Sprague-Dawley türü sıçanları kullanmayı tercih ettik. Sıçanlarda yapılan periferik sinir hasar çalışmalarında genel olarak siyatik sinir veya fasyal sinir kullanılmaktadır. Literatürde, diğer periferik sinir hasarları ve kök hücrenin etkisi ile ilgili birçok çalışma mevcut iken, RLS ile ilgili deneysel çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada kulak-burun-boğaz cerrahisinde risk altında bir sinir olduğundan ve literatürde RLS hasarı sonrası kök hücre uygulaması ile ilgili sadece 3 makale (77, 78, 81) olduğundan RLS üzerinde çalışıldı. Voss ve ark. (83) tavşanlarda injeksiyon laringoplasti ile mikronize edilmiş aselüler dermis, YDKMKH ve kondrosit tedavisi sonrası peptid identifikasyonunu incelemişlerdir. Lerner ve ark. (78) yaptığı çalışmada ise bizim çalışmamızdan farklı olarak kök hücreler i.v. verilmiş olup, LEMG yapılmamıştır.

Günümüzde klinik denemelerde farklı hastalıkların tedavisinde ana terapötik ajan olan MKH'ler kullanılmaktadır. U.S. National Library of Medicine 2019 Ekim verilerine göre 31'i farklı sinirlerin rejenerasyonu ile ilgili olan 787 MKH klinik çalışması bulunmaktadır (82). Bu çalışmaların çoğu kas-iskelet sistemi hastalıkları, immun sistem hastalıkları, merkezi sinir sistemi hastalıkları ve sindirim sistemi hastalıkları ile ilgilidir. Bir çok çalışma göstermiştir ki; kök hücreler, periferik sinir hasarı sonrası sinir rejenerasyonunu artırabilir (83, 84). Bu çalışmada yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre kullanılması tercih edildi. En çok kullanılan MKH kaynakları; kemik iliği, adipoz doku ve kordon kanı olmakla birlikte daha çok kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı olduğu görülmektedir. Kordon kanı, kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'nin koloni oluşturma kapasitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada en yüksek kapasite adipoz kaynaklı MKH'ler, onu takiben kemik iliği ve en düşük kapasite ise kordon kanı MKH'lerinde bulunmuştur (38). İzolasyon başarılarına bakılan çalışmada ise kemik iliği ve yağ kaynaklı olanlar %100'e yakınken, kordon kanı MKH'lerinde maksimum %30-38 oranlarda olduğu gösterilmiştir (38, 85). Kordon kanı MKH'lerinin elde edilme yöntemi daha az invazivdir. Yağ doku ve kemik iliği MKH ile benzer fenotip,

antiapoptotik özellik ve morfolojileri paylaşmalarına rağmen izolasyon verimliliği daha az olduğu için kullanımları sınırlıdır (38, 39, 85). Kemik iliği ve yağ dokusu kaynaklı MKH'ler benzer morfoloji ve immün fenotiplere sahip olmalarına rağmen, yağ dokusu daha yüksek oranda MKH içerir. Fakat kemik iliği kaynaklı olan MKH'ler daha uzun süredir çalışıldığı için klinik güvenilirliği ve uygulamasına ait çalışmalar daha fazladır (38, 86, 87).

Kök hücrelerin hasarlı bölgeye nasıl ulaştığı ya da endokrin ve parakrin etki mi gösterdiği konusu halen tartışmalıdır. Birçok deneysel hayvan çalışmasında ve klinik çalışmada kök hücreler intravenöz (i.v.) olarak verilmiştir (88, 89). Kök hücreler iv olarak verildiğinde akciğerde ilk geçiş etkisine uğrayarak akciğerde hapis kalırlar (90). Kök hücreler iv olarak verildiğinde akciğerde hapis kalsalar bile şaşırtıcı fonksiyonel iyileşmeler gözlemlendiği belirtilmiştir (91). Bunun yanında Lee ve ark. (92) yaptıkları deneysel çalışmada iv uygulanan MKH'lerin farelerde mikroemboliye sebep olarak miyokard enfarktüsünü kolaylaştırdığını göstermişlerdir. Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada lokal olarak verilecek kök hücrelerin lezyon alanında bulunacağı düşünülerek iyileşmenin daha iyi olabileceği düşünüldü.

Aksonların rejenerasyon hızı türlere bağlı olarak değişir. Kemirgenlerde 2-3.5 mm/gün iken insanlarda bu hız 1-2 mm/gündür. Tomasello ve ark. (93) sıçan siyatik siniri ile yaptığı çalışmada, periferik sinir travmasında fonksiyonel iyileşmenin 20. günde tam olduğunu, Erbayraktar ve ark. (94) ise fonksiyonel iyileşmenin 3-4 haftada oluştuğunu bildirmişlerdir. Sıçan siyatik sinirinde yapılan başka bir çalışmada ise rejenerasyon sinirdeki sayısal morfolojik değerlerin 8 haftada normale döndüğünü bildirilmiştir (95). Bu çalışmada hasar sonrası denekler 8 hafta süre ile takip edildi.

Periferik sinirler birçok metod ile hasarlanabilirler. Sinir tam veya kısmi olarak kesilebilir, sinire termal hasar verilebilir veya ezilme hasarı oluşturabilir. Kesilme hasarı oluşturulduğunda siniri uç uca getirmenin mikrodikiş kullanılsa bile tüm deneklerde homojen olarak yapılamayacağı ve bunun da standartizasyonu olumsuz etkileyeceği düşünüldü ve mevcut çalışmada hasar modeli olarak ezilme hasarı tercih edildi. Ezilme hasarında, parestezi ve ağrıdan, total paraliziye kadar değişkenlik gösteren çeşitli klinik semptomlar ortaya çıkabilir. Bu da travmanın büyüklüğüne ve süresine bağlıdır (96). Literatürde periferik sinir travma modeli oluşturmak için forseps, klip, hemostaz

forcepsi ve anevrizma klipi kullanılmıştır (97-101). Ancak bu çalışmalarda standart ve ölçülebilir bir ezilme hasarı tam olarak oluşturulamamıştır. Bu problemi çözmek için bir kaç yazar standart ezilme hasarı oluşturmak için alet geliştirmeye çalışmışlardır (96, 102, 103). Nissan ve ark. (104) tarafından yapılan bir çalışmada dijital voltaj okuyan alete bağlı tırtıklı hemostatik forsepsin basısını ölçebilmişlerdir. Rydevic ve Lundborg (96) ezilme hasarı için çember geliştirmişler ve sıçan siyatik sinirinde kullanmışlardır. Chen ve ark. (90) geliştirdikleri bir alette ise sıçan siyatik sinirinde 5 ile 150 Newton arasında oluşturulan ezilme hasarında aksonotmezis olduğu gözlenmiştir. 1 Newton'luk basınç uygulandığında ise nöropraksi gözlenmiştir. Bridge ve ark. (105) sıçan posterior tibial sinirde jewelers veya hemostat forsepsi ile bir veya iki kez ve 15 sn ile 60 sn arasında değişecek şekilde çeşitli varyasyonlar ile 6 tip ezilme hasarı yaparak incelemişler ve sonuç olarak tüm bu varyasyonlarda aksonotmezis gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, kendi geliştirdiğimiz basınç sensörlü klemp yardımı ile aksonotmezis veya Sunderland tip II hasar oluşturuldu. RLS yedinci trakeal halka seviyesinde daha görünür ve yüzeysel olduğu için birkaç çalışmada da yapıldığı üzere ezilme hasarı bu seviyede oluşturuldu. Ancak ortalama 250 gr Sprague-Dawley cinsi sıçan için yedinci trakeal seviyeden larenkse kadar sinirin seyri ortalama 2 cm kadardır. Bu yüzden sinirin rejenerasyon hızı 1 mm/gün olarak düşünülürse 2-3 haftada tam düzelme olacağı beklenebilir. Gelecek çalışmalarda bu yüzden daha proksimal kesimde ezilme hasarı oluşturmak denenebilir.

Çalışmamızda hasarın klinik etkisini incelemek için vokal kord hareketleri tetkik ve takip edildi. Hasar öncesi tüm ratların normal vokal kord hareketlerine sahip olduğu, ezilme hasarı sonrası aynı tarafta vokal kord paralizisi olduğu endoskopik olarak kaydedildi. Hasar oluşturulduktan 2 ay sonra ise vokal kordların son durumu yine endoskopik olarak incelendi ve vokal kord hareket skalasına göre değerlendirildi. Literatürde vokal kord hareket skalası için birkaç adet örnek mevcuttu. Lerner ve ark. (78) yaptığı çalışmada vokal kord hareketini 0'dan 3 e kadar 0:vokal kord hareketi yok 1:kısıtlanmış vokal kord hareketi 2:neredeyse normal vokal kord hareketi 3:normal kord hareketi olarak sınıflandırmışlardır. Bu çalışmada ise uygulanabilirliği ve verileri rasyonel olarak değerlendirebilmek için Tessema ve ark. (72) tariflediği vokal kord hareket skalası örnek alınmıştır.

Bu çalışmada kök hücre verilen ile verilmeyen gruptaki tüm sıçanlar hasardan 2 ay sonra incelendiğinde normal vokal kord hareketlerine döndükleri görülmüştür. Li ve ark. (77) yaptığı çalışmada, sıçanların %80'inin vokal kord hareketlerinin hasar sonrası 6. haftada normale döndüğü belirtilmiştir. Lerner ve ark. (78) yaptığı çalışmada ise, hasar sonrası 2. haftada tamamen düzelme gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada ise hasar sonrası 4. haftada %50 6. haftada ise %100 düzelme olduğu görülmüştür (106). Bizim çalışmamızda ise hasar sonrası 8. haftada tüm sıçanlarda düzelme görüldü.

Travma oluşturulan periferik sinir dokusunda remiyelinizasyonun göstergesi miyelin çapının ince olması ve miyelin yapısında olan değişikliklerdir (107). Akson çapında meydana gelen değişikliğin Schwann hücre çoğalmasını tetiklediği ve miyelin kalınlığını değiştirdiği bildirilmiştir (107). Akson çapına göre anormal ince miyelin kalınlığı remiyelinizasyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir (108). Çalışmamızda akson sayısında kontrol ve çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Akson çapı değerlendirildiğinde ise akson çapının kontrol grubunda çalışma grubuna göre anlamlı olarak fazla olduğu görüldü. Bunun nedeni ise yapılan hasara bağlı dejenerasyon sebebiyle akson çaplarında ortaya çıkan genişleme olabilir.

Çalışmamızda aksonlar S100 ile immunfloresan olarak işaretlenmiştir. Güncel çalışmalar rejenere sinir liflerinin S100 ekspresyonu yaptığını göstermişlerdir. S100 özellikle myelinli sinir lifleri tarafından eksprese olur. Li ve ark. (77) yaptığı bir çalışmada rekürren larengeal sinirde ezilme hasarı sonrası diferansiye schwann hücre benzeri YDKMKH ile sadece YDKMKH karşılaştırılmış ve diferansiye schwann hücre benzeri YDKMKH de S100 ekspresyonu görülürken sadece YDKMKH'de neredeyse hiç görülmemiştir.

Choi ve ark. yaptığı bir çalışmada (109) ise tavşan larengeal sinirinde kesi sonrası delikli olmayan silikon tüp ile asimetric delikli polycaprolactone(PCL)/Pluronic F127 sinir rehber kanalı ile onarım yapılmış ve silikon tüp ile onarım yapılan grupta S100 ekspresyonu görülmez iken diğer grupta S100 ekspresyonu görülmüştür.

Belirtilen çalışmaların metodolojileri çalışmamızdan farklı olduğu için bu çalışmalarla karşılaştırmak doğru olmamakla birlikte bizim çalışmamızda S100 ekspresyonu açısından kontrol ve çalışma grubu arasında farklılık saptanmadı. Bunun sebebi

hasardan 2 ay sonra değerlendirme yapılmış olması olabilir. Kök hücrelerin endojen Schwann hücrelerin proliferasyonunu arttırma ve Schwann hücrelerine farklılaşma özellikleri bulunmaktadır. Bu yüzden henüz aksonal ve sinirin morfolojik iyileşme düzeyleri daha düşük olduğu erken dönemde yapılacak araştırmalar ile kök hücrelerin bahsedilen etkileri ve S-100 işaretlenme düzeyleri kök hücre eklenen grupta daha anlamlı olarak yüksek bulunabilirdi. Daha sonraki araştırmalarla bu durum değerlendirilebilir.

Geleneksel olarak deney hayvanlarında LEMG orta hat servikal insizyon ile posterior krikoarytenoid kas veya adduktör kaslara ulaşılarak yapılmıştır. Inagi ve ark. (110) özel bir laringoskop ve cerrahi platform geliştirerek transoral yoldan sıçan larinksinin emg kaydını almışlar ve vokal kord hareketlerini ölçebilmişlerdir. Tessema ve ark. (79) ise özel bir epiglot retraktörü geliştirmişlerdir. Böylece larenks endoskopik olarak daha net görülmüş ve transoral yoldan endoskop eşliğinde bipolar elektrod ile LEMG yapılmıştır. Bu çalışmada literatürde daha önce ratlarda hiç kullanılmamış olan kendi geliştirdiğimiz bir metod ile LEMG yapıldı. Bu çalışmadaki metodun diğer metodlara göre avantajı diğerlerine göre daha az invaziv olması ve iğne elektrod yönteminde uyarılacak doğru kasları bulmanın güç olması ve tecrübe gerektirmesidir. Scott ve ark. yaptığı bir çalışmada köpeklerde hasar öncesi ve hasar sonrası hem endotrakeal hem de iğne elektrod ile LEMG yapılarak karşılaştırma yapılmıştır. Bu çalışmada hasarlı sinirde düşük amplitüdü uyarılmış cevapları saptamada iğne elektrodun yüzeysel elektroda göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Ancak yüzeysel elektrod ile yapılan EMG lerde de iğne elektroda göre daha tutarlı dalga morfolojisi ve amplitüdü görülmüştür (111). İğne elektrod ile oluşacak travmaya bağlı kanama, endoskopik muayenede görüş alanını da bozma ihtimali taşır. Mevcut çalışmada invaziv olmaması, etkinliğinin daha önce gösterilmiş olması ve endoskopik muayene de yapılacak olmasından dolayı yüzeysel elektrod tercih edildi. Amaç, kontrollü ezilme hasarı oluşturulan bir hayvan modelinde güvenilir EMG sinyalleri elde etmek ve zamana göre bu sinyallerin değişimini incelemektir. Fonksiyonel iyileşme vokal kord hareketlerine bakılarak gözlemlendi. Kantitatif EMG ölçümleri nöroaksonal iyileşmeyi kesin göstermemesine rağmen verilerimizde gözlenen bazı özellikler (hasar sonrası MÜP amplitüdün düşüp hasar sonrası 2. ayda yüksek olması gibi) aksonal iyileşmeyi gösteren özellikler ile uyumludur. Ancak çalışma ve kontrol gruplarının hasar öncesi ölçülen MÜP

amplitüdlerinin birbirinden farklı olması yaptığımız EMG ölçümünün kısıtlılıklarındandır. Hayvan çalışmalarında insanlarda görülen her tür sinir hasarı birebir oluşturulamamasına rağmen hayvan modelimizde uygulanan metod ile araştırmacılar elektrofizyolojik değişiklikleri takip edebilirler. Dahası gelecek çalışmalarda RLS hasarı sonrası larengeal reinnervasyon amaçlı tedavilerde akut kronik faza kadar takip amaçlı bu model kullanılabilir. Çalışmamızda uyguladığımız LEMG sırasında beş sıçanda ölüm meydana gelmesi bu modelin kısıtlılıklarından sayılabilir. Böyle bir metodun ilk denemesi sebebi ile yeterli tücrebeye sahip olunmaması, anestezi yönetiminin yeterli olmaması ve laringospazm gibi anestezi komplikasyonların deneklerin ölümüne sebep olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmada çalışma ve kontrol gruplarının her ikisinde de MÜP amplitüd ölçümünün zamana göre değişimi anlamlı bulunmuştur. Amplitüdü her iki grupta da hasar öncesi yüksek, hasar sonrası belirgin düşük ve hasar sonrası 2. ayda ise tekrar yükselmiş olarak bulunmuştur.

Çalışmada kullanılan LEMG modeli klinik ve literatür ile uyumlu ve başarılı çıktığından iyi bir model olarak düşünülebilir. Ancak fibrilasyon, denervasyon ve rejenerasyon potansiyellerinin yüzeysel elektrotta saptanamaması bu modelin kısıtlılığıdır. Çalışmanın bir diğer kısıtlılığı olarak; vokal kord muayenesi ve LEMG, hasar sonrası fonksiyonel düzelmeyi ve elektrofizyolojik değişiklikleri takip etmek amacı ile aralıklı olarak yapılamamış olması sayılabilir. Bu durumun nedeni ise anestezi ve sık EMG' nin yol açabileceği mortaliteden kaçınmaktır. Böyle bir ölçüm yapılsaydı kantitatif olarak rejenerasyonun ve klinik düzelmelerin takibinin daha iyi ölçülebileceği muhtemeldir.

Çalışmamızın pozitif yönleri literatürdeki diğer araştırmalardan farklı olarak kök hücrelerin lokal olarak verilmesi, tarafımızca geliştirilen hasarı optimize eden cihaz kullanılması ve iğne elektrod yerine larengeal yüzey elektrodu kullanılması olarak sayılabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda basınç sensörüne sahip bir klemp yardımıyla RLS'e standart bası uygulanarak, bu periferik sinirde hasar oluşturuldu. Uyguladığımız ezilme hasarı ile aksonotmezis veya Sunderland tip II hasar meydana geldi. Bu hasar modelinin diğer periferik sinir hasarlarında da uygulanabileceği düşünüldü.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre oluşturulan aksonotmezis en geç 2 ayda kendiliğinden iyileşmektedir. Ancak bu çalışmada ölçümler 2 ay gibi uzun bir sürede yapıldığından daha kısa sürede veya aralıklı olarak yapılacak incelemeler ile iyileşme sürecinin daha detaylı analizi yapılabilir.

RLS hasarı sonrası lokal olarak uygulanan YDKMKH'nin kök hücre verilmeyen gruba göre fonksiyonel iyileşmeyi ve sinir rejenerasyonunu arttırdığına yönelik bir bulgu saptanmadı. Ancak bu çalışmadan edindiğimiz bilgilerle, anlamlı istatistiksel verilerin yetersizliği sebebi ile kesin sonuçlar çıkarılamaz. Periferik sinir hasarında özellikle RLS ve fasiyal sinir gibi problemlili ve anormal reinnervasyona eğilimli sinirlerde kök hücre uygulamasının sinir rejenerasyonuna katkısı ile ilgili yapabilecek daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Mutlu A T, Berkiten G, Kumral T L, Uyar Y. Tiroid Cerrahisinin Laringeal Komplikasyonları. Okmeydanı Tıp Dergisi, 2012; 28(Ek sayı 1): 10-19, doi: 10.5222/otd.suppl.2012.010.
2. Isshiki N, Kojima H, Taira T, Shoji K. Recent modifications in thyroplasty type I. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1989;98(10):777-9.
3. Brunings W. Uber eine neue Behandlungsmethode der Rekurrenslamung. Verhandl Ver Deutsch Laryngol. 1911;18:93-8.
4. Brown TJ, Pittman AL, Monaco GN, et al. Androgen treatment and recovery of function following recurrent laryngeal nerve injury in the rat. Restorative neurology and neuroscience. 2013;31(2): 169-76.
5. Sakowski SA, Heavener SB, Lunn JS, et al. Neuroprotection using gene therapy to induce vascular endothelial growth factor-A expression. Gene therapy. 2009;16(11):1292-1299.
6. Shiotani A, O'Malley Jr BW, Coleman ME, Alila HW, Flint PW. Reinnervation of motor endplates and increased muscle fiber size after human insulin-like growth factor I gene transfer into the paralyzed larynx. Human gene therapy. 1998;9(14):2039-47.
7. Caplan Al, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. Journal of cellular biochemistry. 2006;98(5): 1076-84.
8. Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. Brain research. 2010;1343:226-35.
9. Onda T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2008;28(2):329-40.
10. Matthes SM, Reimers K, Janssen I, et al. Intravenous transplantation of mesenchymal stromal cells to enhance peripheral nerve regeneration. BioMed research international. 2013 ;2013:573169.

11. Sadler T. Embryonic period (third to eighth week). Langman's Medical Embryology 6th ed Baltimore: Williams and Wilkins. 1990:61-84.
12. Çınar Ö. Ratlarda oluşturulan siyatik sinir travma modelinde ketorolak trometamin'in etkileri: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008:8-9.
13. Terzis J, Smith K. Repair and grafting of the peripheral nerve. Plastic Surgery Philadelphia: WB Saunders. 1990:630-97.
14. Avcı G, Akan M, Yıldırım S, Aköz T. Sinir onarımı ve greftleme (Literatürün gözden geçirilmesi). Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. 2002;22(4):428-37.
15. Hunt GC. Peripheral nerve biomechanics: application to neuromobilization approaches. Physical therapy reviews. 2002;7(2):111-21.
16. Kocacan M. Sıçanlarda, yağ dokusu kökenli kök hücre uygulamasının periferik sinir onarımına etkisi: Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2014:14-15.
17. Seddon H, Medawar P, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. J Physiol 1943; 102(2): 191-215.
18. Burnett MG, Zager ELJNf. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. Neurosurgical focus, 2004; 16(5): 1-7.
19. Snell RS. Clinical neuroanatomy for medical students: Little Brown & Company; 1997.
20. Ducker TB, Kempe LG, Hayes GJJJon. The metabolic background for peripheral nerve surgery. JNeurosurg, 1969;30(3part1):270-80.
21. Lieberman A. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. International review of neurobiology. Vol. 14. Academic Press, 1971. p. 49-124.
22. Lundborg GJTJohs. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. J Hand Surg Am, 2000;25(3):391-414.
23. Brushart TJGsohs. Nerve repair and grafting. Green's operative hand surgery, 1999;2:1384-403.

24. Terzi s J, Smith KJPs. Repair and grafting of the peripheral nerve. *Plastic surgery* 1990;3:630-98.
25. Maggi SP, Lowe JB 3rd, Mackinnon SE: Pathophysiology of nerve injury. *Clin Plast Surg.* 2003 Apr;30(2): 109-26.
26. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand.* 1987;58(2): 145-69.
27. Brandt K, Mackinnon SJG, surgery Ssp. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. *Grabb and Smith's plastic surgery,* 1997:88.
28. Tekeli, Senem, et al. "Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları." *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi,* 1.2 (2016): 72-83.
29. Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol.* 2008;25(2):57-9.
30. Sağsöz H, Ketani MA. Kök hücreler. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2008(2):29-33.
31. Rossant J. Stem cells and early lineage development. *Cell.* 2008;132(4):527-31.
32. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental biology.* 2002;241(1):172-82.
33. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell.* 2006;126(4):663-76.
34. Özen A, Gül Sancak İ. Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2014;61:79-84.
35. Andrades JA, Claros S, Jimenez-Palomo P. et al. Skeletal regeneration by mesenchymal stem cells: What else? *Regenerative Medicine and Tissue Engineering-Cells and Biomaterials: IntechOpen;* 2011.

36. Friedenstein AJ, Gorskaja J, Kulagina N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*. 1976;4(5):267-74.
37. Cells IS. *Scientific Progress And Future Research Directions*, National Institutes of Health. University Press of the Pacific; 2001.
38. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*. 2006;24(5): 1294-301.
39. Hu L, Hu J, Zhao J, Liu J, et al. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int*, 2013;2013.
40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
41. Bogdanova A, Berzins U, Brûvere R, Eivazova G, Kozlovskā T, editors. Adipose-derived stem cells cultured in autologous serum maintain the characteristics of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B Natural, Exact, and Applied Sciences*; 2010: Versita. p. 106-113.
42. Lanza R, Gearhart J, Hogan B, et al. *Essentials of stem cell biology*: Elsevier; 2005.
43. Harasymiak-Krzyzanowska I, Niedojadło A, Karwat J, et al. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. *Cellular & molecular biology letters*. 2013;18(4):479.
44. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br. J. Haematol*. 2007;137(6):491-502.
45. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 2007;213(2):341-7.

46. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends in immunology*. 2007;28(5):219-26.
47. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem cells*. 2007;25(11):2896-902.
48. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*. 2007;25(11):2739-49.
49. Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy. *Current opinion in oncology*. 2007;19(6):650-655.
50. Dai W. D., Hale S. L., Martin, B. J., Kuang, J. O. & Kloner, R. A. (2005, February). Improvement of left ventricular function by intramuscular allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in postinfarcted rat myocardium may be transient. *J Am Coll Cardiol* Vol. 45, No. 3, pp. 227A-227A.
51. Li GR, Deng XL, Sun Fi, Chung SS, Tse HF, Lau CP. Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow. *Stem Cells*. 2006;24(6):1519-28.
52. Pijnappels DA, Schalij MJ, van Tuyn J, et al. Progressive increase in conduction velocity across human mesenchymal stem cells is mediated by enhanced electrical coupling. *Cardiovascular research*. 2006;72(2):282-91.
53. Noiseux N, Gnechi M, Lopez-Illasaca M, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*, 2006;14(6):840-50.
54. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005;289(1):F31-F42.
55. Yu S, Tanabe T, Dezawa M, Ishikawa H, Yoshimura N. Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006;344(4): 1071-9.

56. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *NatMed*, 2005;11(4):367.
57. Suga H, Eto H, Shigeura T, et al. IFATS collection: fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through ac-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem cells*. 2009;27(1):238-49.
58. Soulez M, Sirois I, Brassard N, et al. Epidermal growth factor and perlecan fragments produced by apoptotic endothelial cells co-ordinately activate ERK1/2-dependent antiapoptotic pathways in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(4):810-20.
59. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng Part B Rev*, 2006;12(12):3375-82.
60. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat C, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004; 110(3):349-55.
61. Moon MH, Kim SY, Kim YJ, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2006; 17(5-6):279-90.
62. Kondo K, Shintani S, Shibata R, et al. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(1):61-6.
63. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005;25(12):2542-7.
64. Cui L, Yin S, Liu W, Li N, Zhang W, Cao Y. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng Part B Rev*, 2007;13(6):1185-95.

65. Niemeyer P, Vohrer J, Schmal H, Kasten P, Fellenberg J, Suedkamp N, et al. Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. *Cytotherapy*. 2008;10(8):784-95.
66. Chaldakov GN, Tonchev AB, Tuncel N, Atanassova P, Aloe L. Adipose tissue and mast cells. *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*: Springer; 2007. p. 151-8.
67. Yoshimura K, Eto H, Kato H, Doi K, Suga H. Adipose stem cells: from liposuction to adipose tissue engineering. *Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine*: Springer; 2011. p. 67-81.
68. Toniato A, Mazzarotto R, Piotto A, Bernante P, Pagetta C, Pelizzo MR. Identification of the nonrecurrent laryngeal nerve during thyroid surgery: 20-year experience. *World journal of surgery*. 2004;28(7):659-61.
69. Avisse C, Marcus C, Delattre J, et al. Right nonrecurrent inferior laryngeal nerve and arteria lusoria: the diagnostic and therapeutic implications of an anatomic anomaly. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 1998;20(3):227-32.
70. Sanders G, Uyeda RY, Karlan MS. Nonrecurrent inferior laryngeal nerves and their association with a recurrent branch. *Am J Surg*, 1983; 146(4):501-3.
71. Sittel C, Stennert E, Thumfart WF, Dapunt U, Eckel HE. Prognostic value of laryngeal electromyography in vocal fold paralysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001; 127(2): 155-60.
72. Tessema B, Roark RM, Pitman MJ, Weissbrod P, Sharma S, Schaefer SD. Observations of recurrent laryngeal nerve injury and recovery using a rat model. *The Laryngoscope*. 2009; 119(8): 1644-51.
73. Myssiorek D. Recurrent laryngeal nerve paralysis: anatomy and etiology. *Otolaryngol Clin North Am*, 2004;37(1):25-44, v.
74. Jeannon JP, Orabi A, Bruch G, Abdalsalam H, Simo R. Diagnosis of recurrent laryngeal nerve palsy after thyroidectomy: a systematic review. *Int J Clin Pract Suppl* 2009;63(4):624-9.

75. Francis DO, Pearce EC, Ni S, Garrett CG, Penson DF. Epidemiology of vocal fold paralyse after total thyroidectomy for well-differentiated thyroid cancer in a Medicare population. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2014;150(4):548-57.
76. Rubin A, Mobley B, Hogikyan N, et al. Delivery of an adenoviral vector to the crushed recurrent laryngeal nerve. *The Laryngoscope*. 2003;113(6):985-9.
77. Li Y, Xu W, Cheng L-y. Adipose-derived mesenchymal stem cells accelerate nerve regeneration and functional recovery in a rat model of recurrent laryngeal nerve injury. *Neural regeneration research*. 2017; 12(9): 1544.
78. Lerner MZ, Matsushita T, Lankford KL, Radtke C, Kocsis JD, Young NO. Intravenous mesenchymal stem cell therapy after recurrent laryngeal nerve injury: a preliminary study. *The Laryngoscope*. 2014;124(11):2555-60.
79. Tessema B, Pitman MJ, Roark RM, Berzofsky C, Sharma S, Schaefer SD. Evaluation of functional recovery of recurrent laryngeal nerve using transoral laryngeal bipolar electromyography: a rat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2008;117(8):604-8.
80. Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen NP, Hansson HA, Larsson K. Reorganization and orientation of regenerating nerve fibres, perineurium, and epineurium in preformed mesothelial tubes-an experimental study on the sciatic nerve of rats. *J Neurosci*, 1981;6(3):265-81.
81. Voss S, San-Marina S, Oldenburg MS, Ekbohm D, Madden BJ, Charlesworth MC, et al. Histone Variants as Stem Cell Biomarkers for Long-Term Injection Medialization Laryngoplasty. *The Laryngoscope*. 2018;128(12):E402-E8.
82. U.S. National Library of Medicine (NIH). <https://clinicaltrials.gov> [8 ekim 2019]
83. di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2010;63(9):1544-52.
84. Abbas OL, Borman H, Uysal ÇA, ve ark. Adipose-derived stem cells enhance axonal regeneration through cross-facial nerve grafting in a rat model of facial paralysis. *Plastic and reconstructive surgery*. 2016;138(2):387-96.

85. Rebelatto C, Aguiar A, Moretao M, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008;233(7):901-13.
86. Harel A. Cryopreservation and cell banking for autologous mesenchymal stem cell-based therapies. *Cell Tissue Bank*, 2013;2013(5):1-7.
87. Harris D. Stem cell banking for regenerative and personalized medicine. *Biomedicines*. 2014;2(1):50-79.
88. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007;21(8): 1733.
89. Wu J, Sun Z, Sun H-S, et al. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell transplantation*. 2007; 16(10):993-1005.
90. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem cells and development*. 2009;18(5):683-92.
91. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein M, Robbins R, Pelletier M, editors. *Stem cell transplantation: the lung barrier*. Transplantation proceedings; 2007: Elsevier.
92. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*. 2009;5(1):54-63.
93. Tomasello F, Brines M, Sfacteria A, Grasso G. A new computed-assisted technique for experimental sciatic nerve function analysis. *Med Sci Monit*, 2004;10(1):BR1-BR3.
94. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(11):6741-6.

95. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, et al. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*, 2004;21(11): 1652-70.
96. Rydevik B, Lundborg G. Permeability of intraneural microvessels and perineurium following acute, graded experimental nerve compression. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 1977; 11(3): 179-87.
97. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*, 2000;96(2):89-96.
98. Hare G, Evans P, Mackinnon S, et al. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plastic and reconstructive surgery*. 1992;89(2):251-8.
99. Baptista AF, de Souza Gomes JR, Oliveira JT, et al. A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse—adaptation of the sciatic static index. *J Neurosci Methods*, 2007;161(2):259-64.
100. van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, Mel ders PJ, Gispen WH. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1997;78(1):70-7.
101. Malushte TS, Kerns JM, Huang CC, Shott S, Safanda J, Gonzalez M. Assessment of recovery following a novel partial nerve lesion in a rat model. *Muscle & Nerve*: 2004;30(5):609-17.
102. Sarikcioglu L, Özkan O. Instrumentation Note: Yasargil-Phynox Aneurysm Clip: A simple and reliable device for making a peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 2003;113(4):455-64.
103. Chen L-E, Seaber AV, Urbaniak JR. The influence of magnitude and duration of crush load on functional recovery of the peripheral nerve. *J Reconstr Microsurg*, 1993;9(04):299-306.
104. Nissan M, Rochkind S, Ringel M. Strain-gauged haemostatic forceps for clinical and experimental use. *Med Biol Eng Comput*, 1988;26(4):448-50.

105. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, et al. Nerve crush injuries—a model for axonotmesis. *Exp Neurol Suppl*, 1994;127(2):284-90.
106. Monaco GN, Brown TJ, Burgette RC, et al. Electrical stimulation and testosterone enhance recovery from recurrent laryngeal nerve crush. *Restor Neurol Neurosci*, 2015;33(4):571-8.
107. Gupta R, Rowshan K, Chao T, Mozaffar T, Steward O. Chronic nerve compression induces local demyelination and remyelination in a rat model of carpal tunnel syndrome. *Exp Neurol Suppl*, 2004;187(2):500-8.
108. Iwashita Y, Blakemore WF. Areas of demyelination do not attract significant numbers of Schwann cells transplanted into normal white matter. *Glia*. 2000;31(3):232-40.
109. Choi J-S, Oh SH, An H-Y, Kim Y-M, Lee JH, Lim J-Y. Functional regeneration of recurrent laryngeal nerve injury during thyroid surgery using an asymmetrically porous nerve guide conduit in an animal model. *Thyroid*. 2014;24(1):52-9.
110. Inagi K, Ford CN, Rodriguez AA, Heisey DM. Transoral Electromyographic Recordings in Botulinum Toxin—Injected Rat Larynges. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1997;106(11):956-64.
111. Scott AR, Chong PST, Hartnick CJ, Randolph GW. Spontaneous and evoked laryngeal electromyography of the thyroarytenoid muscles: a canine model for intraoperative recurrent laryngeal nerve monitoring. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2010;119(1):54-63.

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

**Dr. Ubeydullah Hikmet YURDAKUL'a ait "Sıçanlarda Rekürren Larengeal Sinirde Ezilme Hasarı Sonrası Kök Hücre Uygulanmasının Sinir Rejenerasyonuna Etkisi " adlı çalışma, jürimiz tarafından Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.**

31/12/2019

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Alperen VURAL

Üye : Prof. Dr. İbrahim KETENCİ

Üye : Doç. Dr. Ali BAYRAM