



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ



Sağlık Bilimleri Enstitüsü

PERİFERİK SİNİR HASARINDA OLFAKTÖR MUKOZAL MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Sahar Ebrahim Ebrahim ORİF

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir

2024

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

PERİFERİK SİNİR HASARINDA OLFAKTÖR
MUKOZAL MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Sahar Ebrahim Ebrahim ORİF

Danışman

Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

Kök Hücre Anabilim Dalı

Doktora Programı

İzmir

2024

TEZ ONAY SAYFASI

Kurum Adı : Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anabilim Dalı : Kök Hücre

Program : Doktora

Tez Konusu : Periferik Sinir Hasarında Olfaktör Mukozal Mezenkimal Kök Hücrelerinin Terapötik Etkinliğinin İncelenmesi

Danışman : Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

Tezi Hazırlayan : Sahar Ebrahim Ebrahim ORİF

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

	(Adı Soyadı)	(İmza)
Başkan	: Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL	
Üye	: Prof. Dr. Afif BERDELİ	
Üye	: Prof. Dr. Ayşegül UYSAL	
Üye	: Prof. Dr. N. Ülkü YAVAŞOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Meltem KURUŞ	
Üye	: Prof. Dr. Sevinç İNAN	

Doktora Tezinin Kabul Edildiği Tarih: 02.09.2024

Önsöz

Çocukluk hayalim mimar olmaktı ancak lisedeyken özel bir neden sebebiyle hedeflerim tamamen değişti. Tıp fakültesine gitmek ve nörobilim ve nörolojik sorunlara yönelik tedaviler alanında araştırmacı olmak istiyordum. Üniversitede anatomi ve embriyoloji öğretmeni olduğumda bu hedefimin bir kısmı gerçekleşmiş oldu. Araştırma ve öğrenme güdüsüyle devam ettiğim bu yolda başarısızlıklar, vazgeçişler ve korkular yaşamış olsam da bugün tezimin bitmiş olduğunu gördüğümde, yaşananların tüm güçlüklerle bedel olduğunu fark ettim. Bir doktora bursiyeri olarak, kendi yolumu çizebildiğim, uzak ülkelere seyahat edebilme cesaretini gösterebildiğim, birkaç dil öğrenebildiğim, daha fazla bilgi edinebildiğim, başka yerlerde iyi izlenimler bırakabildiğim, dünyanın her yerinden arkadaşlarım olduğu ve tamamen ilgilendiğim bir konuda doktora yapabildiğim için kendimle gurur duyuyorum.

Önümdeki uzun eğitim yolunda ileride yapmayı arzuladığım çalışmalarla hem ülkelerimize hem de uluslararası bilim camiasına kıymetli katkılar sunabilmeyi umuyorum. Dört yıllık zorlu sürecin sonunda şu an masamın üzerinde duran bu tez çalışmasının, içinde bugünlerimizi ve yarınlarımızı aydınlatma coşkusu taşıyan herkese ümit olmasını dilerim. Daha güzel yarınlara, bilime adanmış hayatlara, genç bilim insanlarına, sevdiklerime ve kendime en iyisini yapana kadar çalışma sözüyle. Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'nün maddi desteği ile hazırlanmıştır. Projenin takip numarası TS-GAP-2023-31851'dir. Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığına (YTB), kalbime çok yakın ülke, Türkiye'de ve en büyük üniversitelerden biri olan Ege Üniversitesinde 19EG016658 numaralı bursiyer olarak eğitim alma ve doktora derecemi tamamlama şansı verdikleri için çok teşekkür ederim.

İzmir, 02.09.2024

Sahar ORİF

Özet

Periferik Sinir Hasarında Olfaktör Mukozal Mezenkimal Kök Hücrelerinin Terapötik Etkinliğinin İncelenmesi

Olfaktörük mukozada lamina propriada yerleşen olfaktörük glia hücreleri (OEC), olfaktörük dokuya gelen koku duyusunun devamlılığını sağlamak için çevresel hasarlanmalara karşı yaşam boyu nörogenez sürecine devam ederler. Hem olfaktörük sinir aksonlarında hem de olfaktör bulbusta bulunan bu kök hücrelerin sadece olfaktörük nöronlara değil, aynı zamanda olfaktörük epitelin diğer hücrelerini de üretebildiği rapor edilmiştir. OEC'ler yüksek farklılaşma yetenekleri nedeniyle, mezenkimal kök hücrelere ait özelliklerin yanında rejeneratif tedavilerde kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Bu tez çalışmasında, OEC'ler ilk kez sıçanlarda femoral sinir yaralanmasında hücresel tedavi ajanı olarak kullanılarak terapötik ve rejenerasyon potansiyelleri araştırılmıştır.

OEC'ler hücre kültüründe çoğaltıldı. Deneysel femoral sinir hasarı oluşturulan Wistar albino sıçanlar 3 gruba ayrıldı; C grubu (kontrol-hiçbir cerrahi işlem yapılmadı), S grubu (deney kontrol-opere edildi), OEC (deney grubu- opere edildi, OEC nakli yapıldı). Operasyon sonrası 7. gün, 14.gün ve 21.gün deneklere grid walking test, foot print test, five toe spread test uygulanarak hayvan hareketlerinin düzenliliği ve nöral fonksiyonların tekrar kazanımı açısından değerlendirildi. Operasyondan 28 gün sonra tüm denekler anestezi altında sakrifiye edildi. Femoral sinir örnekleri, histopatolojik ve moleküler biyolojik testler için ayrıldı. Histopatolojik değerlendirme için alınan örnekler 0,2 M PBS tamponlu %2 glutaraldehit+%2 paraformadehit karışımına fikse olması için alındı. Moleküler biyolojik değerlendirecek örnekler SF ile yıkanıp -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi. Elektron mikroskopik takibe alınan örnekler epona gömüldü. 1 µm kalınlıkta alınan yarı-ince kesitlerden epon ve osmik asit kaldırıldı. Histokimyasal H&E ve Toluidin Blue boyamaları yapılırken immünohistokimyasal olarak anti- Glial fibriller asidik protein (GFAP), anti-p75 nöral büyüme faktörü (p75NGF), anti- Silya kaynaklı nörotrofik faktör (CNTF) ve anti-Nestin ile işaretlemeler yapıldı. Moleküler biyolojik yöntem olarak RT-qPCR analizinde Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (*BDNF*), Nörotropin 3 (*NT-3*), Nörotropin 4 (*NT-4*) ve Sinir büyüme faktörü (*NGF*) genleri deney gruplarına uygulanan hücrelerin hücre dışı boşluklarına lokalize olan proteinleri olarak analiz yapıldı. Tüm veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Five-Toe Spread testinde C grubunda normal ayak parmağı yayılımı göstermiştir, nakil yapılan (OEC) grupta ayak parmağı yayılması her hafta iyileşme gösterirken S grubu ayak parmağı yayılma parametrelerinde ise sürekli olarak bozukluklar görülmüştür. Grid walking testinde, ayak hata indeksi OEC grubunda S grubuna kıyasla zaman içinde belirgin bir şekilde azalırken, C grubu 3 farklı gündeki ölçümler aynı kalmıştır. Foot print testinde ise C grubunda anlamlı bir fark görülmezken, OEC grubunda femoral fonksiyon indeksinde zamanla daha yüksek değerlere sahip olan S grubuna kıyasla zamanla anlamlı bir iyileşme görülmüştür.

Histopatolojik değerlendirmede S grubunda perinöriumda kalınlaşma, endonöriumda artış, aksonal ödem, miyelinlerde silinme dejenerasyon, çeşitli konformasyon bozuklukları ve ayrışma görüldü. OEC grubunda perinöriumun C grubuna benzer olduğu, aksonal ödemin minimale düştüğü, miyelin halkalarda dejenerasyonun durduğu saptandı. Tüm gruplarda akson çapı, miyelin ve perinörium kalınlıkları ölçülüp istatistiksel olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak Nestin ekspresyonu sadece OEC grubunda görüldü. p75NGF ekspresyonunun en fazla OEC grubunda olduğu görüldü. GFAP boyamada en az GFAP pozitif hücrenin S grubunda olduğu görüldü. CNTF boyamada en yüksek ekspresyonun OEC grubunda olduğu görüldü. RT-PCR sonuçlarında OEC transplantasyon bölgesinde BDNF ve NGF gibi nörotrofik faktörlerin yanı sıra sadece NT-3 değil NT-4' de salgıladıkları görüldü.

Tüm bu faktörler aksonal rejenerasyonu hızlandırarak nöronların daha hızlı iyileşmesine yardımcı olabileceği düşünüldü. Femoral sinir yaralanmasından sonra OEC nakledildiği sıçanlarda, femoral sinir fonksiyonlarının yeniden kazanıldığını gösteren testlerin tüm parametrelerinde iyileşmenin olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, kısmi transekte femoral sinir yaralanmasında 0. günde akut ve lokal olarak yüksek doz OEC uygulamasının sinir rejenerasyonu üzerinde olumlu bir etkileri olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Olfaktör Mukozal Mezenkimal Kök Hücre, Femoral Periferik Sinir Hasarı, Cerrahi Olarak Oluşturulan Yapılar, Kök Hücre Tedavileri, İmmünohistokimya, RT-qPCR

Abstract

Investigation of Therapeutic Efficacy of Olfactory Mucosal Mesenchymal Stem Cells in Peripheral Nerve Injury

Olfactory ensheathing cells (OECs), glial cells located in the lamina propria of the olfactory mucosa, continue the process of neurogenesis throughout life to protect against environmental damage and ensure the continuity of olfactory sensation. It has been reported that these stem cells, found in both olfactory nerve axons and the olfactory bulb, can produce not only olfactory neurons but also other cells of the olfactory epithelium. Due to their high differentiation potential, OECs possess characteristics similar to mesenchymal stem cells and have potential applications in regenerative therapies. In this thesis study, the therapeutic and regenerative potentials of OECs were investigated for the first time by using them as a cellular therapy agent in a rat model of femoral nerve injury.

OECs were cultured in vitro. Wistar albino rats with experimental femoral nerve injury were divided into three groups: the C group (control, no surgical intervention), the S group (surgical control, surgery performed), and the OEC group (experimental group, surgery performed, and OEC transplantation conducted). On the 7th, 14th, and 21st days after the operation, the animals were subjected to grid walking tests, footprint tests, and five-toe spread tests to evaluate the regularity of their movements and the recovery of neural functions. On the 28th day post-operation, all subjects were sacrificed under anesthesia. Femoral nerve samples were collected for histopathological and molecular biological tests. The samples for histopathological evaluation were fixed in a mixture of 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.2 M PBS buffer. Samples for molecular biological evaluation were washed with saline and stored at -80°C in a deep freezer. Samples undergoing electron microscopic examination were embedded in epon. Semi-thin sections of 1 µm thickness were taken, and epon and osmium acid were removed. Histochemical staining with H&E and Toluidine Blue was performed, and immunohistochemical labeling with anti-GFAP, anti-p75NGF, anti-CNTF, and anti-Nestin was carried out. Molecular biological analysis was performed using RT-qPCR to analyze the BDNF, NT-3, NT-4, and NGF genes as proteins localized in the extracellular space of the cells applied to the experimental groups. All data were statistically evaluated.

In the Five-Toe Spread test, the C group showed normal toe spread, while the OEC group showed improvement in toe spread each week, and the S group consistently exhibited abnormalities in toe spread parameters. In the grid walking test, the foot error index in the OEC group significantly decreased over time compared to the S group, while the measurements in the C group remained the same on the three different days. In the footprint test, no significant difference was observed in the C group, whereas the OEC group showed a significant improvement in femoral function index over time compared to the S group, which had higher values.

Histopathological evaluation revealed thickening of the perineurium, increased endoneurium, axonal edema, degeneration of myelin, and various conformational abnormalities and separations in the S group. In the OEC group, the perineurium was found to be similar to that of the C group, axonal edema was minimized, and myelin degeneration had ceased. Axon diameter, myelin, and perineurium thickness were measured and statistically evaluated in all groups. Immunohistochemically, Nestin expression was observed only in the OEC group. p75NGF expression was highest in the OEC group, while the fewest GFAP-positive cells were observed in the S group. CNTF expression was highest in the OEC group. RT-PCR results showed that, in addition to neurotrophic factors such as BDNF and NGF, both NT-3 and NT-4 were secreted in the OEC transplantation area.

All these factors are thought to accelerate axonal regeneration and help neurons recover more quickly. It was observed that in rats transplanted with OECs after femoral nerve injury, there was improvement in all parameters of tests indicating the recovery of femoral nerve function.

In conclusion, it was observed that the acute and local application of high-dose OECs on day 0 in partially transected femoral nerve injuries had positive effects on nerve regeneration.

Keywords: Olfactory Mucosal Mesenchymal Stem Cells, Femoral Peripheral Nerve Injury, Surgically Created Structures, Stem Cell Therapies, Immunohistochemistry, RT-qPCR

İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Listesi	XI
Şekiller Listesi	XII
Kısaltmalar Listesi	XVI
1. Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	3
1.2. Araştırmanın Sorusu	3
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	4
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	4
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	4
1.6. Araştırmanın Amacı.....	5
2. Genel Bilgiler.....	6
2.1. Olfaktörük Glial Hücreler (Olfactory ensheathing cell- OEC).....	6
2.1.1. Embriyolojik Gelişim.....	6
2.1.2. OEC'lerin Bulunduğu Yerler	7
2.1.3. OEC'lerin Biyolojik Özellikleri	9
2.2. MSS/PSS bozukluklarında OEC nakillerinin kullanımının tarihsel yönleri.....	11
2.3. OEC'lerin farklılaşması ve hücre kaderi üzerindeki etkileri	12
2.4. PSS yaralanmaları ve hastalıklarında OEC uygulaması	14
2.5. Sıçanlarda femoral sinirin özellikleri.....	16

2.6. İnsanlarda femoral sinir disfonksiyonu.....	18
2.6.1. Femoral sinir kökeni ve yolu	18
2.6.2. Femoral sinir disfonksiyonu	18
3. Gereç ve Yöntem	22
3.1. Tez Çalışma Planı	22
3.2. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin (OEC) Hücre Kültürü	23
3.2.1. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin (OEC) Özellikleri ve Besiyerinin Hazırlanması.....	23
3.2.2. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin Çözdürülmesi	23
3.2.3. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin Pasajlanması, Sayımı.....	24
3.2.4. Tripan Mavisi ile Canlılık Kontrolü	25
3.2.5. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin Dondurulması	25
3.3. Deney Hayvanları	25
3.4. Deney Grupları.....	26
3.5. Ameliyat öncesi sensorimotor testleri eğitimi ve ameliyat sonrası uygulaması	27
3.5.1. Grid Walk Test.....	27
3.5.2. Five-toe spread test (Toe spreading).....	28
3.5.3. Foot Print Test (Walking track analysis)	29
3.6. Periferik sinir hasar kesi modeli oluşturulması.....	30
3.7. Periferik sinir onarımı için yetişkin olfaktör mukoza kılıf hücrelerinin in vivo uygulanması (hayvan modelinde femoral sinir transeksiyon yaralanması)	32
3.8. Hayvanların sakrifiye edilmesi ve örneklerin toplanması	34
3.9. H&E ve Toluidin Mavisi boyama ile histolojik veri eldesi	36
3.9.1. Fiksasyon	37
3.9.2. Dehidratasyon	37

3.9.3. Gömme.....	388
3.9.4. Kesit Alma	39
3.9.5. Toludin Mavisı Boyası.....	39
3.9.6. Epon ve OsO4 Uzaklaştırma.....	40
3.9.7. H&E Boyama:.....	40
3.10. OEC'ler için spesifik belirteçler kullanarak immünohistokimya yapılması	42
3.11. Perinöral Fibrosis kalınlığı lm.....	45
3.12. Mikroskopik Değerlendirme Yöntemi	45
3.13. RT-qPCR analizleri.....	455
3.13.1. RNA Ekstraksiyonu	46
3.13.2. cDNA Sentezi	47
3.13.3. RT-PCR.....	48
3.13.4. Göreceli Niceleme	50
3.13.5. İstatistiksel Analiz.....	50
3.14. İstatistiksel analiz.....	50
4. Bulgular.....	51
4.1. Kültüre edilmiş OEC'lerin Morfolojileri	51
4.2. OEC'lerin Akut Lokal Transplantasyonu Periferik Femoral Sinir Rejenerasyonunu Destekler.....	52
4.2.1. Sensorimotor testlerin bulguları, ameliyat ve transplantasyon sonrası.....	52
4.2.1.1. Five-Toe Spread Test.....	52
4.2.1.2. Grid Walking Test.....	56
4.2.1.3. Foot Print Test.....	58
4.2.2. Makroskopik ve Mikroskopik Bulgular.....	61

4.2.2.1. Makroskopik Bulgular.....	61
4.2.2.2. Histopatolojik Bulgular.....	62
4.2.2.2.1. Hematoksilen&Eosin ve Toluidin Blue Boyama.....	62
4.2.2.2.2. İmmünohistokimyasal Boyamalar.....	67
4.2.3. RT-qPCR Analizleri.....	72
5. Tartışma	77
6. Sonuç ve Öneriler	86
7. Kaynaklar	89
EK-1.....	111
EK-2.....	112
Teşekkür.....	113
Özgecmiş.....	115

Tablolar Listesi

Tablo 2.1: OEC'lerin diğer kök hücre tiplerine göre avantajları.....	10
Tablo 2.2: Nörojenez ve nöronal farklılaşmada rol nayan OEC'ler tarafından üretilen faktörler....	12
Tablo 2.3: PSS'lerde OEC'lerin kullanımına ilişkin klinik öncesi araştırmalar.....	14
Tablo 2.4: Toluidin Mavisi ile boyanmış ultra ince kesitler ile elde edilebilecek histopatolojik veriler.....	17
Tablo 3.1: Kullanılan primer antikorlar.	42
Tablo 4.1: 3 grup için TSFve ITSF'yi göstermektedir.	544
Tablo 4.2: Ameliyat sonrası 7., 14. ve 21. günlerde günlük toplam adım ortalamaları.....	566
Tablo 4.3: Ameliyat sonrası 7., 14. ve 21. günlerde Foot Fault Index (ayak hata indeksi).	577
Tablo 4.4: Ameliyat sonrası 7., 14. ve 21. günlerde Femoral Function Index (Femoral Fonksiyon İndeksi).....	59
Tablo 4.5: Akson çapı, miyelin kalınlığı ve perinörium kalınlığının ortalamaları (μm); C, S ve OEC gruplarında ($p<0,001$).....	65
Tablo 4.6. C, S ve OEC grupları arasındaki akson çapı, miyelin kalınlığı ve perinörium kalınlığı (μm) ortalamalarının anlamlılık değeri.	655
Tablo 4.7. OEC'ler kaynaklı nörotrofik faktörlerin ekspresyonunun qPCR kullanılarak kantitasyonu. C, S VE OEC gruplarında NT-3, NT-4, BDNF ve NGF nörotrofik faktörleri için mRNA ekspresyonu.	733

Şekiller Listesi

Şekil 2.1. OEC'lerin embriyonik gelişimi. Nöral krest hücreleri; periferik nöronlar, glia ve melanositler gibi diğer hücrelerin gelişimini sağlar. Enterik sinir sistemi nöronları ve glial hücreleri, göç eden enterik NK hücrelerinden gelişir. Uydu glia ve SK'ler, büyüyen periferik sinirlere ve gangliyonlara göç eden glial hücre öncüleri tarafından oluşturulur. SH öncüleri, hem miyelinli hem de miyelinsiz SH'ler üreterek olgunlaşmamış SK'ler haline gelir. Gelişmekte olan nazal plakodda, NK hücreleri ektodermal gelişen hücrelerle birleşerek olfaktörük epiteli oluşturur. Bu hücreler daha sonra olfaktörük duyu nöronlarını geliştirir (https://app.biorender.com aracılığıyla oluşturulmuştur).....	7
Şekil 2.2. OEC'lerin olfaktörük sistem içinde yerleşimi. Olfaktörük nöronlar, burun boşluğundan kribriiform plağa aksonlar gönderir ve glomerüllerdeki mitral hücrelere bağlanır. OEC'ler olfaktörük aksonları sarar, gelişimlerini teşvik eder ve onları bağlantılar oluşturmaya yönlendirir (https://app.biorender.com ve https://kleki.com aracılıklarla oluşturuldu).....	8
Şekil 2.3. Sinir sistemi hastalıklarında OEC transplantasyonunun tarihsel yönleri. a) OB-OEC'lerin başvuruları için zaman çizelgesi. b) OM-OEC'lerin başvuruları için zaman çizelgesi (PowerPoint aracılığıyla oluşturuldu).....	12
Şekil 3.1. Tez çalışmasında izlenen yol (https://app.biorender.com aracılığıyla oluşturuldu).....	22
Şekil 3.2. A) Olfaktörük glial kök hücrelerin çözündürülmesi B) Olfaktörük glial kök hücrelerin çözündürülmesinden 24 saat sonra flask yüzeyine hücrelerin tutunması mikroskop ile kontrol edilmesi.....	24
Şekil 3.3. Deneyde kullanılan Wistar Albino sıçanlar	26
Şekil 3.4. Grid walking test.....	28
Şekil 3.5. Five-toe spread test.	29
Şekil 3.6. Foot print test.....	30
Şekil 3.7. Çalışmada kullanılan anestezi maddeler.....	30
Şekil 3.8. Sol inguinal bölgede ciltte 3 cm'lik bir kesi yapılması	31
Şekil 3.9. Femoral sinirin çıkarılması ve 2-3 mm'lik parsiyel transeksiyon uygulaması.	31

Şekil 3.10. Femoral sinirin transekte edilen kısmı hemen uç uca 10/0 naylon epinöral suture ile ve 3/0 naylon ile cilt kapatılması.	32
Şekil 3.11. A) S grubuna salin enjeksiyonu, B) OEC grubuna kök hücrelerin lokal, akut nakledilmesi.	33
Şekil 3.12. A) insülin şırıngası, B) Hamilton şırıngası, C) OEC'lerin L15 ortamında süspansesi ve salin.....	33
Şekil 3.13. Yara dikilmesi ve hayvanların sıcak bir ortamda iyileşmesi	34
Şekil 3.14. Hayvanların sakrifiye edilmesi ve örneklerin toplanması	34
Şekil 3.15. Femoral sinir segmentleri alınması ve fiksatif solüsyonunda fiksasyonu.....	35
Şekil 3.16. RT-qPCR segmentleri falcon tüplerine konarak kuru buzda muhafaza edilmesi.....	36
Şekil 3.17. Laboratuvarlarda kullanılan teknik ekipmanlar ve fotoğrafçılık işlemi gerçekleştirilen mikroskopik görüntüleme sistemi.....	37
Şekil 3.18. Kullanılan primer antikorlar.....	43
Şekil 3.19. RT-qPCR analizinin aşamaları (https://app.biorender.com aracılığıyla oluşturuldu).	

455

Şekil 3.20. RNA Ekstraksiyonu.	477
Şekil 3.21. cDNA Sentezi.	488
Şekil 3.22. RT-PCR.	49
Şekil 4.1. OEC'lerin morfolojisinin faz-kontrast mikroskopunda incelenmesi. A) Besi ortamı ile kültürlenmiş hücreler, pasaj 5 (4X); B) Pasaj 6'daki hücreler (10X). Bu progenitör hücrelerin bazıları halihazırda nöral hücrelere farklılaşmış (ok) ara nöral bağlantılar oluşturmaya başlamışlardır, pasaj 6. (10X).....	511
Şekil 4.2. Ameliyat sonrası 7., 14., 21. günlerde A) kontrol, B) salin, C) OEC nakli yapılan grupların normal ve ameliyatsız ayak parmakları arasındaki açı.....	533
Şekil 4.3. Femoral sinir transeksiyonu sonrası 21. günde her bir hayvan grubunun normal (N, kırmızı sütun) ve opere edilmiş (O, mavi sütun) ayağının (A) TSF ve (B) ITSF tahmini marjinal	

ortalamaları. OEC grubunun opere edilen ayağının ortalamaları ITSF = 0.94 ve TSF = 1.70, S grubunun ortalamaları ITSF = 0.64 ve TSF = 1.20 ve C grubunun ortalamaları ITSF = 1.10 ve TSF = 2.10'dur. C, S ve OEC gruplarının ortalamaları arasındaki farklar anlamlıydı (P değeri < 0.000, Profil Plots grafik).....	55
Şekil 4.4. Ameliyat sonrası 7. (1), 14. (2), ve 21. (3) günlerde günlük toplam adım ortalamaları, Profile Plots Analizi.....	577
Şekil 4.5. Operasyon sonrası 7. (1), 14. (2), ve 21. (3) günlerde Foot Fault Index (ayak hata indeksi), Profile Plots analizi, p = 0.000.....	588
Şekil 4.6. OEC nakledilen femoral sinirler için Femoral Fonksiyon İndeksi analizi için bir pist boyunca yürüyen hayvanlardan elde edilen temsili ayak parmak izleri. A) kontrol, B) salin, B) OEC grupları, ameliyattan sonra 3. hafta.....	59
Şekil 4.7. OEC nakledilen femoral sinirler için Femoral Fonksiyon İndeksi analizi. 1) 7., 2) 14., 3) 21. ameliyat sonrası günlerde, Femoral Fonksiyon İndeksinde A) Bar Poly Plots grafiği, B) Line Poly Plots grafiği, OEC (yeşil) ve S gruplarında (kırmızı) anlamlı farklılık gösterirken, C (mavi) gruplarında anlamlı farklılık yoktur (ANOVA ve Post Hoc Test, P = 0.000).	600
Şekil 4.8. A) OEC ve B) S grubunda, ameliyattan 4 hafta sonra çıplak gözle cilt kesiği iyileşme aşaması.	611
Şekil 4.9. Hematoksilen&Eosin Boyama. A) Kontrol, B) S, ve C) OEC grupları (20X, 50 µm); 1) 40X, 20 µm; ve 2) 100X, 10 µm.....	633
Şekil 4.10. Toluidin Blue Boyama. A) Kontrol, B) S ve C) OEC grupları (20X, 50 µm); 1) 40X, 20 µm; ve 2) 100X, 10 µm.....	644
Şekil 4.11. Akson çapı hem C hem de OEC gruplarında en az olarak saptanmıştır. S grubunda ise kalınlaşma görülmüştür (p<0,001).....	666
Şekil 4.12. Miyelin kalınlığı C grubunda en az olarak saptanmıştır. S gurubunda ise bir kalınlaşma görüldü. OEC grubunda ise S grubuna kıyasla C grubuna görece daha yakın olduğu saptandı (p<0,001).....	666

Şekil 4.13. Perinörium kalınlığının C grubunda en az olduğu saptandı. S grubunda ise katastrofik bir kalınlaşma görüldü. OEC grubunda ise S grubuna kıyasla kontrol grubuna görece daha yakın olduğu saptandı ($p<0,001$).	677
Şekil 4.14. Anti- Nestin Boyama. A) Kontrol, B) S, ve C) OEC grupları (20X, 50 μ m); 1) 40X, 20 μ m.....	688
Şekil 4.15. Anti- p75NGF Boyama. A) Kontrol, B) S, ve C) OEC grupları (20X, 50 μ m); 1) 40X, 20 μ m.....	69
Şekil 4.16. Anti- GFAP Boyama. A) Kontrol, B) S, ve C) OEC grupları (20X, 50 μ m); 1) 40X, 20 μ m.....	700
Şekil 4.17. Yapılan tek yönlü varyans analizinde GFAP (+) hücre sayısı kontrol grubu için $94,6 \pm 3,64$, S grubu için $27,1 \pm 3,27$ ve OEC grubu için $47,8 \pm 4,78$ olarak saptanmıştır ($p<0,001$). Bonferroni testinde ise OEC grubu hem kontrol hemde S grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişim olduğu saptanmıştır ($p<0,001$).	711
Şekil 4.18. Anti- CNTF Boyama. A) Kontrol, B) S, ve C) OEC grupları (20X, 50 μ m); 1) 40X, 20 μ m.....	722
Şekil 4.19. OEC'ler kaynaklı nörotrofik faktör ekspresyonunun kantitasyonu. A) NT-4 ve B) NT-3 nörotrofik faktörler için mRNA ekspresyonu qPCR kullanılarak ölçülmüştür. Nörotrofik faktör ekspresyonu MACT'inkine (C) normalize edilmiştir.....	744
Şekil 4.20. OEC'ler kaynaklı nörotrofik faktör ekspresyonunun kantitasyonu. A) BDNF ve B) NGF nörotrofik faktörler için mRNA ekspresyonu qPCR kullanılarak ölçülmüştür. Nörotrofik faktör ekspresyonu MACT'inkine (C) normalize edilmiştir.....	755
Şekil 4.21. OEC kaynaklı NGF nörotrofik faktör ekspresyonunun kantitasyonu. Nörotrofik faktör NGF için mRNA ekspresyonu qPCR kullanılarak ölçülmüştür. Nörotrofik faktör ekspresyonu MACT'inkine normalize edilmiştir. OEC, S ve C gruplarının NGF ekspresyonu için rölatif kat değişiklikleri (ortalama + SD) sırasıyla $1,99 + -0,49$, $1,69 + -0,19$ ve $1,69 + 0,30$ idi. OEC grubu ile C/S gruplarının ortalama + SD değerleri arasındaki fark anlamlıydı ($P < 0.005$, Tukey's Multiple comparison test).	766

Kısaltmalar Listesi

AH	: Alzheimer hastalığı
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
B-FABP	: Yağ asiti bağlayıcı proteinler
bFbF	: Temel fibroblast büyüme faktörü
CNTF	: Silya kaynaklı nörotrofik faktör
Cx43	: Konneksin 43
FIM	: Fonksiyonel bağımsız ölçüm
GDNF	: Glia kaynaklı nörotrofik faktör
GFAP	: Glial fibriller asidik protein
HBH	: Horizontal bazal hücre
HH	: Huntington hastalığı
iGK-MKH	: İnsan göbek kordonu mezenkimal kök hücresi
KBB	: Kan beyin bariyeri
kDa	: Kilodalton
LP	: Lamina propria
LYZ	: Lizozom
MMP2	: Matriks metalloproteinaz 2

NCAM	: Nöronal hücre adezyon molekülü
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NK	: Nöral krest
NKH	: Nöronal kök hücreler
NT-3	: Nörotropin 3
NT-4	: Nörotropin 4
NT-5	: Nörotropin 5
NTN	: Nörturin
OB	: Olfaktörük bulbus
OB-OEC	: Olfaktörük bulbus- olfaktör hücresi
OEC-CM	: OEC- şartlandırılmış medyum
OEC	: Olfaktörük kök hücre
OE-MSC	: Olfaktörük ektomezenşimal kök hücre
OH	: Omurilik hasarı
OM-OEC	: Olfaktörük mukoza- olfaktör hücresi
OST	: Olfaktörük sinir tabakası
p75NGF	: p75 nöral büyüme faktörü
PCL	: Polikaprolakton
PH	: Parkinson hastalığı

PLGA : Poli laktik-ko-glikolik asit

PN-1 : Proteaz neksin-1

PSS : Periferik sinir sistemi

SH : Schwann hücresi

Shh : Sonic hedgehog proteini

SLT : Sinir lifi tabakası

SPARC : Asidik ve sisteinden zengin protein

SS : Siyatik sinir

ZO-1 : Zonula Okludens-1

1. Giriş

Glia hücreleri, merkezi sinir sisteminin (MSS) oluşumu, homeostazı ve patolojisinde önemli rolleri olduğu kanıtlarla desteklenmeye devam etmektedir (Barres, 2008; Lobsiger ve Cleveland, 2007). Aslında, glial hücreler damar sistemi ve kan-beyin bariyerini (KBB) kontrol eder, gelişim sırasında nöronal göçü yönlendirir, sinaps oluşumu ve plastisitesine yardımcı olur, nöroimmüniteyi değiştirir ve nöronal rejenerasyonu teşvik eder (Barres, 2008; Lobsiger ve Cleveland, 2007; X. Wang ve diğerleri, 2022). Yunanca "tutkal" anlamına gelen " $\gamma\lambda\alpha$ " kelimesinden türetilen glia, ilk olarak bu hücrelere beyin hücrelerini bir arada tutmakla görevli oldukları düşüncesiyle verilmiştir. Erişkin MSS'de üç primer glial hücre tipi tanımlanır: kemik iliğiden gelişen mikrogliya, nöral krest (NK) kökenli astrositler ve oligodendrositler (Graziadei ve Graziadei, 1979; Alan Mackay-Sim ve Kittel, 1991; Monti Graziadei ve Graziadei, 1979). Periferik sinir sisteminde (PSS), primer glia tipi ise Schwann hücreleridir (SH).

Olfaktörük glia hücreleri (OEC) adı verilen özel hücreler, sadece koku mukozasında bulunur ve olfaktörük sistemin büyümesi ve yenilenmesi için gereklidir. Aslında, sinir sisteminin diğer bölümlerinin çoğundan farklı olarak, olfaktörük nöronlar, yaşamları bunca yenilenebilecekleri belirgin bir nörojenik nişe sahiptir (Graziadei ve Graziadei, 1979; Monti Graziadei ve Graziadei, 1979). Olfaktörük nöroepitel, dış çevre ile doğrudan etkileşimi nedeniyle normal hücre döngüsü sırasında veya travmatik olfaktörük sinir hasarını takiben duyu nöronları oluşturmak gibi benzersiz bir yeteneğe sahiptir (Leung, Coulombe, & Reed, 2007; Schwob, 2002). Olfaktörük aksonlarını sarabilen ve olfaktörük nöronların reseptör dönüşümünü ve aksonal rejenerasyonu kolaylaştırabilen OEC'ler, artık yaygın olarak bu özellik ile ilişkilendirilmektedir (C. R. Chen, Kachramanoglou, Li, Andrews, & Choi, 2014; R. Doucette, 1990; Schwob ve diğerleri, 2017). Bir aksonu yalıtkan olarak çevreleyen ince süreçler geliştirerek, OEC'ler akson büyümesini teşvik edici işlevlerini yerine getirir ve yapısal destek sunarlar (Rieger, Deitmer, & Lohr, 2007; Ursavas, Darıcı ve Karaoz, 2021). Ayrıca, OEC'ler, olfaktörük epitelindeki kök hücrelerden yeni olfaktörük duyu nöronları üretildiğinde, olfaktörük nöroekseni bunca işlevsel bağlantılar oluşturur (Leung ve diğerleri, 2007; Roet ve Verhaagen, 2014).

OEC'lerin, NK'den farklanmış PSS gliaları ve nöral tüpten farklanmış MSS glialarının aksine, genellikle olfaktörük plakod kökenli olduğu bilinmektedir (Shields, Moore, Phelps, & Basbaum, 2010). Bununla birlikte, bir dizi araştırma, olfaktörük plakod ontogenetik olarak çeşitli hücrelerden

kaynaklandığını ve SH'ler gibi OEC'lerin NK'den farklandığını göstermektedir (Barraud ve diğerleri, 2010; Forni, Taylor-Burds, Melvin, Williams, & Wray, 2011; Katoh ve diğerleri, 2011). Bu hücreler, olfaktörük bulbus (OB) dış katmanlarında, iç ve dış sinir lifi katmanlarında ve koku mukozası (OM) lamina propriasında (LP) bulunabilmektedir (Yao ve diğerleri, 2018).

Astrositlerin ve SH'lerin birçok özelliği de OEC'ler de bulunmaktadır. Bu tip astrositler, S100 proteini ve GFAP ile birlikte nöral hücre adezyon molekülünün (PSA-NCAM) polisilyalize formu ve p75NGF gibi birkaç bilinen belirteç üretirler (Barton, St John, Clarke, Wright, & Ekberg, 2017; Pellitteri, Spatuzza, Stanzani, & Zaccaro, 2010). Ek olarak, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), glial kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), siliyer nörotrofik faktör (CNTF), nörotrofinler NT-4, Nörotropin 5 (NT-5), sinir büyüme faktörü (NGF), temel fibroblast büyüme faktörleri (bFGF) ve nöregulinler dâhil olmak üzere yüksek düzeyde büyüme faktörleri OEC'ler tarafından salgılanabilir. Bu büyüme faktörleri, nöronlar için destekleyici unsurlar olarak önemli rollere sahiptir (Boruch ve ark., 2001; Russo, Patanè, Russo, Stanzani ve Pellitteri, 2021; Stepanova ve ark., 2022; Ursavas ve diğerleri, 2021).

Nörolojik hastalıklar ilerledikten sonra, sinir rejenerasyonu ve doku onarımı için sınırlı bir kapasiteye sahiptirler bu da tipik olarak kalıcı hasarlar bırakabilir. Seçici ve ilerleyici nöron kaybı, nörolojik hastalıklar, özellikle nörodejeneratif hastalıklar olarak bilinen klinik bir durumun ayırt edici özelliğidir. Nörolojik hastalıklar, ilerleyici nöronal yapı veya işlev kaybına bağlı olarak bilişsel ve duyuşsal kaybın yanı sıra çeşitli derecelerde felçle sonuçlanır (Dutta ve ark., 2013). Beyin veya omurilikteki nöronların sayısında, yapısında veya işlevinde ilerleyici bir kayba neden olan nörolojik bozukluklar arasında amyotrofik lateral skleroz (ALS), Huntington hastalığı (HH), Parkinson hastalığı (PH) ve Alzheimer hastalığı (AH) bulunur (Alessandrini, Preynat-Seauve, De Bruin, & Pepper, 2019; Misra, Damotte ve Hollenbach, 2018). Öte yandan, periferik sinir yaralanmaları (PNI'ler) klinik uygulamada, esas olarak travma ve cerrahiden kaynaklanan yaygındır ve tipik olarak 1.000.000 kişi başına 13-23 kişiyi etkiler (Al-Temimi ve ark., 2017; Babaei-Ghazani, Eftekharsadat, Samadirad, Mamaghany, & Abdullahiyan, 2017; Balog ve ark., 2020; Dong ve diğerleri, 2021). Karmaşık rejenerasyon mekanizmaları, kötü prognoz ve yavaş iyileşme hızı PSY'nin ayırt edici özellikleridir (Badri ve diğerleri, 2017; H. Chen ve diğerleri, 2019; K. Xu ve diğerleri, 2021; L. Zhang ve diğerleri, 2021). Bu faktörler sıklıkla duyuşsal ve motor işlev bozukluğunun yanı sıra yaşam bu sakatlık ile sonuçlanır, bu da yalnızca hastaların yaşam kalitesini ciddi şekilde düşürmekle kalmaz, aynı zamanda sağlık hizmeti maliyetini de artırır

(Balakrishnan ve diğerkleri, 2021; Bojanic, To, Zhang, Mak ve Han, 2020; SH Chen ve diğerkleri, 2021; De la Rosa, Buzik ve Sakaguchi, 2018; Hussain ve diğerkleri, 2020). Yine de, çoğı hasta, yaralanma ve rejenerasyon mekanizmalarına ilişkin artan bilgi seviyemize rağmen tam fonksiyonel iyileşme elde edememektedir (M. Li, Zhang, & Zhang, 2018; Maugeri ve diğerkleri, 2021).

Bu çalışmada, sıçanlara femoral sinir parsiyel transeksiyonu uygulanmış ve akut olarak OEC transplantasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Periferik sinir hasarı sonrası hücresel tedavi uygulanan ve uygulanmayan sıçanlara 1 hafta sonra grid yürüme testi, beş parmak yayılma testi ve ayak yayılma testi gibi sensorimotor testler uygulanmıştır. Bu testler 4 hafta boyunca haftada 1 kez olacak biçimde yapıldı. Cerrahi girişimden sonraki 28. gün sıçanlar sakrifiye edilerek femoral sinir örnekleri disseke edildi. Femoral sinir dokusu örneklerinden elektron mikroskopik takip sonrasında 1 µm kesitler alınmış, kesitlerden epon ve osmik asit kaldırılıp H&E ve Toluidin mavisi ile histokimyasal boyamalar; CNTF, p75NGF, GFAP ve nestin olmak üzere dört belirteç ile immünohistokimyasal boyamalar yapılmıştır. Moleküler olarak, NT-3, NT-4, BDNF ve NGF olan dört genin dört primerinin ekspresyonunu inceleyerek RT-qPCR kullanarak rejenerasyon sürecinde OEC'lerin etkilerini araştırılmıştır.

1.1. Araştırmanın Problemi

Tez konusunun literatürdeki kayda değer ayırıcı özelliğı; Deneysel sıçan modelinde OEC'lerin hücresel tedavi ajanı olarak kullanımı sonrası femoral sinirin dejenerasyon ve rejenerasyon sürecini analiz edildiğı sinir hasarı ve rejenerasyonunun motor fonksiyonlar üzerindeki etkilerini araştıran ilk çalışma olmasıdır. Femoral sinir hasarı ve akut lokal transplantasyon sonrası OEC'lerin terapötik etkinliğı incelenmiştir.

Tez çalışmasındaki araştırmanın konusu femoral sinir hasarında OEC'lerin sinir rejenerasyonu sürecinde kullanılmasıdır. Araştırma konusu ele alınırken literatürde daha önce yapılan femoral sinir hasarında OEC'lerin etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Konu ile ilgili histopatolojik, motor fonksiyon ve moleküler biyolojik yeni veriler literatüre kazandırılacaktır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Tez araştırmasının sorusu femoral sinir hasarında OEC hücrelerinin etkinliğinin olup olmadığıdır. Araştırma konusu ele alınırken literatürde çok sayıda deneysel femoral sinir hasarı modelleri

olmadığı görüldü. Bu deneysel model uygulaması yapılan deneklere mezenşimal, kemik iliği ve kordon kanı kök hücrelerinin uygulandığı çalışmaların da olduğu saptandı. OEC hücre tedavisi periferik sinir hasarını nasıl etkiler? Histokimyasal, immunohistokimyasal, motor fonksiyon testleri ve moleküler biyolojik testlerle süreç ne düzeyde anlaşılabilir? OEC hücrelerinin femoral sinir hasarı üzerine etkisi var mıdır?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Femoral sinir L2, L3 ve L4 köklerinden lif alır retroperitoneal olarak pelvisi geçer ve inguinal ligamanın altından geçerek alt ekstremiteye ulaşır. İliakus, sartorius, pektineus ve kuadriseps femoris kaslarını innerve eder. Femoral sinirden ayrılan duysal dallar uyluğun ön iç kısmının, safen sinir ise bacağın iç kısmının duysunu sağlar. Femoral sinir iliopsoas, pelvik veya retroperitoneal hematoma, tümör veya travmaya bağlı olarak kompresyona uğrayabilir. Femoral nöropatiye diyabetiklerde sık olarak rastlanır. Nöropati dizde boşalmaya neden olan kuadriseps kas gücünde azalma ve uyluk önünde, baldır iç yüzünde duysal yakınmalar ile karakterizedir. Bazen inguinal bölge veya iliak fossada lokalize bir ağrı olabilir. Araştırmanın hipotezleri olarak; Femoral sinir hasarı üzerine OEC hücrelerinin pozitif etkisi vardır. Bunu OEC'lerin immunomodulator etkisi ile yapar. Bu hücreler nakil edildikleri doku içinde nişe uyum sağlar ve teratopik özellik gösterir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

OEC hücrelerinin immunomodulator etkileri kapsamında hasarlı femoral sinir dokusunda dejenrasyon ve rejenesyon sürecinde rol oynayacağı düşünülmektedir. Hücresel düzeyde OEC hücrelerinin sebep olduğu farklar motor fonksiyon testleri ve moleküler biyolojik yöntemlerle kıyaslamaya çalışılmıştır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Kullanılan deney hayvanlarının bireysel farklılık oranlarını istatistiksel olarak minimuma indireceğinden dolayı denek sayısını arttırarak deneyin tekrarlanması gereklidir. Çalışma gruplarında tedavi edici ajan olarak kullanılan OEC'lerin femoral sinir üzerindeki pozitif etki mekanizmasının biyokimyasal ve moleküler biyolojik olarak daha detaylı araştırmalarla değerlendirilmesi gereklidir.

1.6. Araştırmanın Amacı

Femoral kanala girmeden önce inguinal bölgede yüzeysel olarak yerleşen ve deri altına yakın konumda bulunan bazı periferik sinirler, trafik kazaları, kalp kateterizasyonu gibi cerrahi işlemler veya travmatik yaralanmalar sırasında kısmen veya tamamen zarar görme riski taşır. Olfaktörük glial hücre (OEC), benzersiz periferik makrogial özellikleri sayesinde periferik nöronları yeniden oluşturma yetenekleriyle hücresel terapötik ajan olarak büyük potansiyele sahiptir. Bu özellikleri, onları hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda tercih edilen hücreler haline getirirken, nöronal problemleri incelemek için bu kolayca izole edilebilen mezenkimal hücrelerin kullanımını optimize eden bir protokolün geliştirilmesi de amaçlanmaktadır.

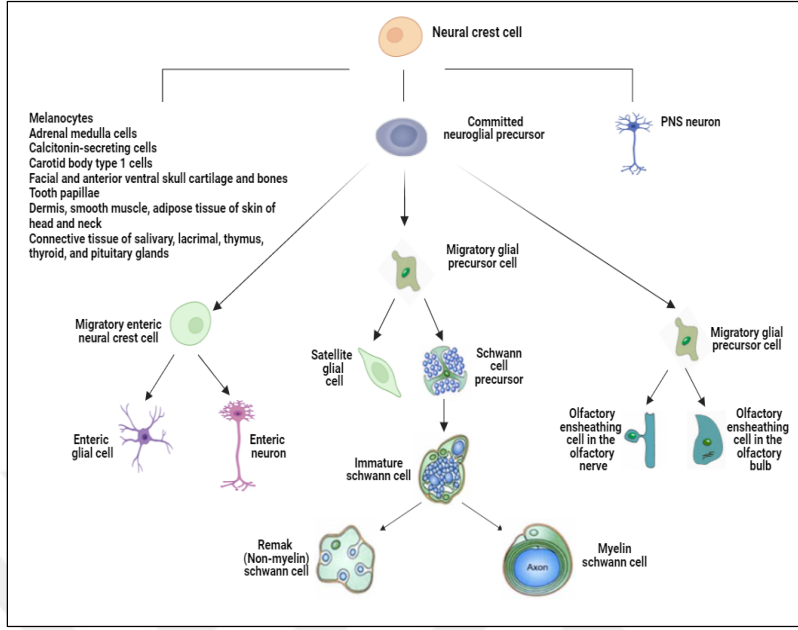
Femoral sinir hasarı sonrası OEC nakli yapılan bu deneysel sıçan modeli çalışmasının amacı, OEC'lerin sinir rejenerasyonu üzerindeki potansiyel etkilerini araştırmak ve bu hücrelerin femoral sinir iyileşmesinde sinir fonksiyonlarını, rejenerasyon sürecini ve genel iyileşme sonuçlarını nasıl etkilediğini değerlendirmektir. Ayrıca, OEC'lerin periferik sinir hasarı tedavisinde kullanılabilirliğini ve etkinliğini belirlenmesi hedeflenmektedir.

2. Genel Bilgiler

2.1. Olfaktörük Glial Hücreler (Olfaktörük kılıf hücreleri - Olfactory ensheathing cell - OEC)

2.1.1. Embriyolojik Gelişim

OEC'ler, omurgalı sinir sisteminde bulunan makroglial hücrelerin (radiyal glia) farklı bir sınıfıdır. Olfaktörük Schwann hücreleri olarak da bilinirler, çünkü olfaktörük nöronlarının miyelinsiz aksonlarını, SH'lerin miyelinsiz periferik nöronların aksonlarını sardığı biçimde sararlar. Hem olfaktörük sinirde hem de OB'nin olfaktörük sinir içindeki olfaktörük akson demetlerini çevrelerler. Birinci kraniyal sinirin (n.olfactorius) gelişimi ve OEC'lerin farklılaşması ile yakından ilişkilidir (Bd, Skihar, Kawaja, & Doucette, 2003). Bir zamanlar OEC'lerin embriyolojik kökeninin olfaktörük plakodlar olduğu düşünülüyordu (Couly ve Le Douarin, 1985). Bu çalışmalara göre, bu hücreler embriyonik ve fetal gelişim sırasında plakoddan telensefalik vezikülün rostral duvarına doğru hareket edip OB'nin sinir lifi tabakasının (SLT) gelişmesine yardımcı olduğu düşünülmekteydi (R. Doucette, 1989). Öte yandan, transgenik civciv ve fare modellerini kullanan bir dizi karmaşık hücre kaderi haritalama deneylerinde, OEC'lerin NK (nöral krest) kökenli olduğunu ortaya konulmuştur (Barraud ve diğerleri, 2010). Ayrıca, çeşitli moleküler yöntemler kullanarak, Delorme ve ark., insan burnunun, olfaktörük ektomezental kök hücreleri (OE-ESC) olarak adlandırdıkları, nöronal ve NK ile ilgili genleri ifade eden bir olfaktörük kök hücre nişi içerdiğini keşfettiler (Delorme ve diğerleri, 2010). OEC'lerin aslında NK'deki nöral progenitorlerden kaynaklandığı varsayılmaktadır (Barraud ve ark., 2010; Forni ve ark., 2011; Gómez ve ark., 2018) ve nöral tüpten (merkezi glia) veya NK'den (periferik glia) farklı olan diğer glial hücre tiplerinin aksine, erken gelişim boyunca olfaktörük plakodda OEC öncülleri olarak çoğalmaktadır (Pellitteri ve ark., 2010). Bu nedenle, olfaktörük plakodun aynı zamanda OEC popülasyonlarının kaynağı olduğu düşünülmektedir, çünkü OEC öncüllerinden farklı olan tüm olgun OEC'ler burada gelişmeye başlamaktadır (Pellitteri ve diğerleri, 2010; Wewetzer, Verdú, Angelov, & Navarro, 2002) (Şekil 2.1.).



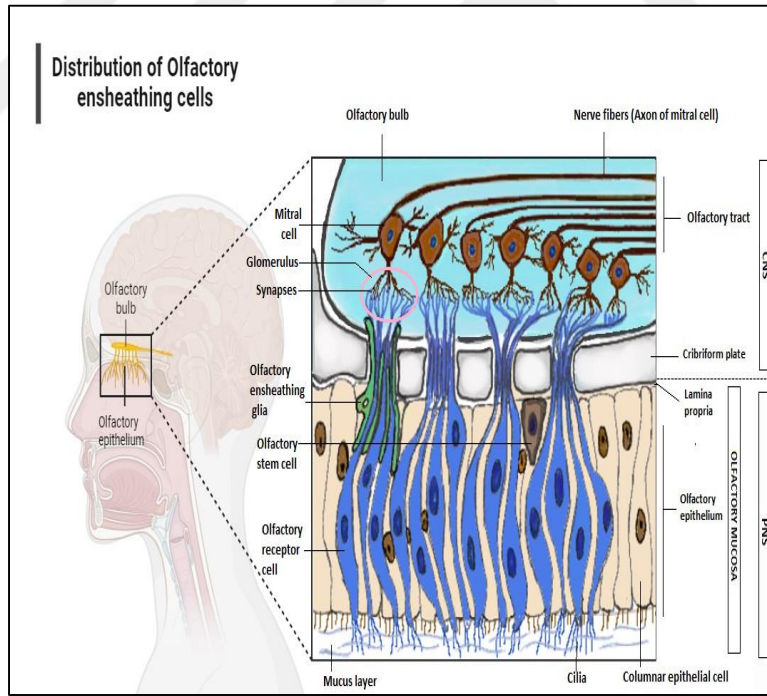
Şekil 2.1. OEC'lerin embriyonik gelişimi. Nöral krest hücreleri; periferik nöronlar, glia ve melanositler gibi diğer hücrelerin gelişimini sağlar. Enterik sinir sistemi nöronları ve glial hücreleri, göç eden enterik NK hücrelerinden gelişir. Uydu glia ve SK'ler, büyüyen periferik sinirlere ve gangliyonlara göç eden glial hücre öncüleri tarafından oluşturulur. SH öncüleri, hem miyelinli hem de miyelinsiz SH'ler üreterek olgunlaşmamış SK'ler haline gelir. Gelişmekte olan nazal plakodda, NK hücreleri ektodermal gelişen hücrelerle birleşerek olfaktörük epiteli oluşturur. Bu hücreler daha sonra olfaktörük duyu nöronlarını geliştirir (<https://app.biorender.com> aracılığıyla oluşturulmuştur).

2.1.2. OEC'lerin Bulunduğu Yerler

Olfaktörük sinir sisteminin gelişimi sırasında LP'deki epitel hücre kümesi, çoğunlukla horizontal bazal hücreler (HBH'ler) ve küresel bazal hücreler (GBK'ler) olarak adlandırılan iki farklı nöral öncül hücre tipinden oluşur (Leung ve diğerleri, 2007; Su ve He, 2010). Olfaktörük epiteldeki GBH'ler büyük olasılıkla nöronlara ve OEC'ler gibi nöronal olmayan hücrelere yol açan ana progenitor hücrelerdir. HBH'ler genel olarak nispeten pasif olmaya devam ediyor. Olfaktörük epitelin hem nöronal hem de glial hücre popülasyonu, HBH'ler kasıtlı olarak spesifik uyarılara yanıt olarak bölünmek ve GBH'leri rejenere ederek olfaktörük epiteli yeniden oluşturur. Farklılaşan OEC progenitorleri olfaktörük plakoddan ayrıldıktan sonra, aşamalı olarak telensefalik veziküller yönünde hareket eder (Leung ve diğerleri, 2007; Su ve He, 2010). Konumlarını belirten

farklılaşmış hücreler, OB'de olfaktörük sinir tabakasını (OST) oluşturmak için ön beyne nüfuz etmeden önce büyüyen olfaktörük sinir ile teması sürdürürler (R. Doucette, 1989; Torres-Paz, Tine ve Whitlock, 2021). Nazal boşlukta olfaktörük epitel, PSS'de olfaktörük sinirler ve MSS'de OB, olfaktörük sisteminin büyük çoğunluğunu oluşturur (**Şekil 2.2.**).

OEC'ler genel olarak OB'nin dış sinir tabakası ve olfaktörük sinir boyunca bulunduğu kabul edilmektedir (R. Doucette, 1990; Farbman, 1990). OEC'ler geliştikçe ve olgunlaştıkça olfaktörük sinirleri sarmak için LP'yi terk eder. Daha sonra OST'deki OB'ye ulaşmak için kribriform plağı geçerler. Bir lezyon oluştuğunda, OEC'ler yeni oluşan olfaktörük nöronların aksonlarını LP, OST ve glomerül tabakası aracılığıyla yönlendirir ve burada hedef hücrelerini yeniden sararlar (Blanchart, Martín-López, De Carlos, & López-Mascaraque, 2011). Sonuç olarak, olfaktörük nöronlara eşlik eden OEC'ler, olfaktörük aksonların kaynaklandıkları LP'den sonlandıkları OB'ye kadar çevreleyen sürekli bir kılıf yapısı oluşturmak için uç uca birleşirler.



Şekil 2.2. OEC'lerin olfaktörük sistem içinde yerleşimi. Olfaktörük nöronlar, burun boşluğundan kribriform plağa aksonlar gönderir ve glomerüllerdeki mitral hücrelere bağlanır. OEC'ler olfaktörük aksonları sarar, gelişimlerini teşvik eder ve onları bağlantılar oluşturmaya yönlendirir (<https://app.biorender.com> ve <https://kleki.com> aracılıklarıyla oluşturuldu).

2.1.3. OEC'lerin Biyolojik Özellikleri

OEC'ler, hem MSS akson rejenerasyonunu destekleme hem de rejenere aksonları remiyelinize etme kapasiteleri nedeniyle demiyelinizan hastalıkların tedavisi ve hasarlı omuriliğin iyileştirilmesi için olası terapötik ajanlar olarak ilgi çekmiştir. OEC'lerin diğer mezenkimal kök hücre tiplerine göre çeşitli avantajları olduğu düşünülmektedir (**Tablo 2.1.**). *İn vivo*, OEC'ler aksonal kalıntıları fagositoz edebilir ve *in vitro* olarak bakterileri fagositoz edebilirler (Lynnmaria Nazareth ve diğerleri, 2015). Antimikrobiyal enzim lizozomi (LYZ) eksprese eden olfaktörük gliaların, nöronların dış ortamla doğrudan temas halinde olduğu mukozada immün koruyucu önemli bir rol oynadığı varsayılmaktadır (Jiang ve diğerleri, 2022). OEC'ler *in vivo* olarak miyelinizan olmayan bir özellik gösterir ve küçük C liflerini korurlar (J. R. Doucette, 1984; R. Doucette, 1990; Raisman, 1985). Ek olarak, Barnett ve ark. (1993) ve Doucette ve Devon (1994, 1995) tarafından, nöron içermeyen hücre kültürlerinde miyelinsiz bir fenotip sergilerler (Barnett, Hutchins, & Noble, 1993; R. Doucette & Devon, 1994, 1995).

OEC'ler hem astrositler hem de SH'leri gibi işlev gördükleri bildirilmiştir (R. Doucette, 1990; R. Doucette ve Devon, 1995; Robin J.M. Franklin, 2002; Robin J M Franklin ve Barnett, 1997; Ramón-Cueto ve Avila, 1998; Ramón-Cueto ve Valverde, 1995). Ayrıca, hem astrositlere hem de SH'lere özgü fenotipik özelliklerin tuhaf bir kombinasyonunu sergilerler (R. Doucette, 1990, 1993; R. Doucette ve Devon, 1993). Örnek olarak, OB'nin glial sınırlandırıcı membranının gelişmesine yardımcı olurlar (Barber ve Lindsay, 1982; R. Doucette, 1990, 1993; Valverde ve Lopez-Maskara, 1991). Astrositler, memeli MSS'de bu rolü oynayan tek hücrelerdir (Peters, Palay, & Webster, 1991). *İn vitro* (Devon ve Doucette, 1995; Devon, Doucette, Debon, & Doucette, 1992) ve *in vivo* (R. J M Franklin, Gilson, Franceschini, & Barnett, 1996; Imaizumi, Lankford, Waxman, Greer, & Kocsis, 1998; Smith, Lakatos, Barnett, Jeffery, & Franklin, 2002), ayrıca sinir liflerinin etrafında PSS tipi bir miyelin kılıfı oluşturabilirler ve bu da SH'lere daha benzer bir fenotip göstermelerine neden olur.

Tablo 2.1 | OEC'lerin diğer kök hücre tiplerine göre avantajları

OEC'ler, PSS Schwann hücrelerine ve MSS astrositlerine benzer özelliklere sahip olduklarından, özellikle nörodejeneratif bozukluklar söz konusu olduğunda, diğer kök hücrelere göre çeşitli avantajlara sahiptir. Bu avantajlar arasında; neredeyse sonsuz kullanılabilirlik, standart üretim ve koruma, saflık, transplantasyon sonrası göç özellikleri ve OEC tümörlerinin nadirliğidir.

Neredeyse sonsuz kullanılabilirlik

Olfaktörük epitelde bulunan OEC'ler yaşam boyunca çoğalma yeteneğine sahiptir (R. Doucette, 1991) ve özel bir aparat yardımıyla ve pediatrik Blakesley veya kültürleme ve otolog transplantasyon amaçları için çukur forseps kullanılarak LP' de dahil olmak üzere OM'nin intranazal biyopsisinden kolayca elde edilebilirler (Holbrook, Rebeiz, & Schwob, 2016; Murtaza, Mohanty, Ekberg ve Aziz John, 2022). Bununla birlikte, diğer kök hücre tiplerinin kaynaklarına bağlı olarak toplanması daha zordur.

Standart Üretim ve Koruma

OEC üretimi, katı ve standartlaştırılmış iyi üretim uygulamaları standartlarına uyan ve dolayısıyla hücre çeşitliliğini azaltan tam olarak belirlenmiş koşullar altında gerçekleştirilebilir. OEC'lerin dondurularak saklanması hücrelerin işlevini etkilemez (Kohama ve ark., 2001; Minkelyte, Li, Li ve İbrahim, 2023; Smith ve diğerleri, 2002). Ayrıca, OEC'lerin bir ay bunca

Olfaktörük kök hücresinden elde edilen preparatların kullanılması, aşılama öncesi diğer hücre tiplerinin varlığını ortadan kaldırmak için spesifik yüzey belirteçlerine ve klinik öncesi karakterizasyona dayalı olarak hücre saflaştırmasını sağlar (Doi ve diğerleri, 2014; Lehn ve diğerleri, 2017). Ek olarak, greft tekrarlanabilirliğini artırır, istenmeyen hücre tiplerini ortadan kaldırır ve daha kesin hücre dozu dağıtımına izin verir (Parmar, Grealish ve Henschcliffe, 2020).

Transplantasyon sonrası göç özellikleri

OEC'lerin yaralı sinir sistemine nakledilmesi, nöron sağkalımının iyileşmesine, aksonal yeniden büyümeye, akson ekstansiyonuna ve hatta hedeflere projeksiyona yol açan uygun bir glial ortam sağlayabilir (Deng ve diğerleri, 2006; Alan Mackay-Sim ve Aziz John, 2011; Ziegler ve diğerleri, 2011). OEC'ler hasarlı omuriliğe nakledildiğinde, enjeksiyon bölgelerinden hem uzunlamasına hem de lateral olarak, glial skar tarafından engellenmeden hareket ettikleri kaydedilmiştir (Ramer ve diğerleri, 2004). Daha da önemlisi, OEC'ler gelişmekte olan aksonlara eşlik ederek MSS'de büyük mesafeler katedebilirler (Ramón-Cueto, Cordero, Santos-Benito, & Avila, 2000). OEC göç özellikleri, sinir liflerinin yenilenmesine ve hasarın ardından MSS bunca işlevsel bağlantıların yeniden kurulmasına yardımcı olabilir (Yang, He, & Hao, 2015).

dondurularak saklanması, bir hayvan modelinde fonksiyonel performansı iyileştirir (Minkelyte ve diğerleri, 2023). Bu, insanlarda bir allograft hücre tedavi stratejisinin uygulanabilirliğini teşvik eder ve önerir, çünkü depolanmış dondurularak saklanmış allojenik hücrelerin kullanılması, daha fazla hücrenin alınmasını ve bir araya getirilmesini sağlayarak tutarlı isteğe bağlı nakillerle sonuçlanacaktır (Minkelyte ve diğerleri, 2023).

Saflık

Nörodejeneratif bozukluklar için kök hücre bazlı tedavilerle ilgili en büyük endişe, tümörlere, teratomlara neden olabilen artık proliferatif hücrelerin transplantasyonu takiben nöral aşırı büyüme riskidir.

OEC tümörleri çok nadirdir

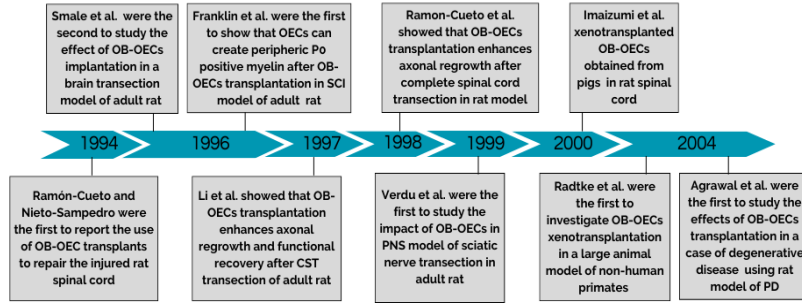
Nörodejeneratif bozukluklar için kök hücre bazlı tedavilerle ilgili en büyük endişe, transplantasyonu takiben tümörlere, teratomlara veya nöral aşırı büyümeye neden olabilen kalıntı proliferatif hücre popülasyonları riskidir (Parmar ve diğerleri, 2020). OEC tümörleri son derece nadirdir, ancak bunun spesifik nedenleri bilinmemektedir. Birkaç olası açıklama vardır: OEC'lerin doğuştan gelen hücresel ve moleküler özellikleri vardır: 1. tümör hücrelerinin gelişimini kısıtlamak veya önlemek; 2. Hücrelerin büyümesini ve göçünü sıkı bir şekilde kontrol edin; ve 3. inflamatuvar reaksiyonları azaltırken enkaz ve mikropların fagositozuna izin verir (Murtaza ve ark., 2019; Windus ve diğerleri, 2011, 2010).

2.2. MSS/PSS bozukluklarında OEC nakillerinin kullanımının tarihsel yönleri

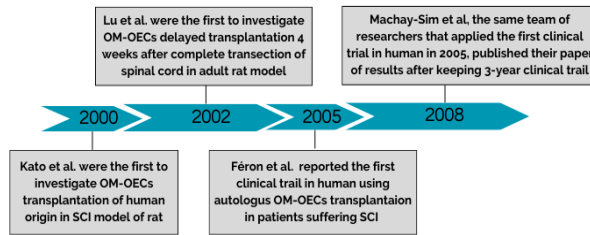
OEC'lerin *in vivo* transplantasyon etkileri üzerinde çalışan erken çalışmalar yaklaşık 30 yıl önce başlamıştır (**Şekil 2.3.**) ve 1994 yılında yapılan ilk çalışma, glia transplantasyonunu kılıfladıktan sonra, hasarlı dorsal kök aksonlarının yetişkin omuriliğine yeniden oluşabileceğini ve diğer MSS lezyonlarının, aksonal büyüme uyarıcıları olarak kılıflama hücrelerinin uygulanmasından fayda sağlayabileceğini göstermiştir (Ramón-Cueto ve Nieto-Sampedro, 1994).

Historical aspects of OECs applications in repairing the nervous system

a. OB-OECs transplantations



b. OM-OECs transplantations



Şekil 2.3. Sinir sistemi hastalıklarında OEC transplantasyonunun tarihsel yönleri. a) OB-OEC'lerin başvuruları için zaman çizelgesi. b) OM-OEC'lerin başvuruları için zaman çizelgesi (PowerPoint aracılığıyla oluşturuldu).

2.3. OEC'lerin farklılaşması ve hücre kaderi üzerindeki etkileri

OEC ile şartlandırılmış medyum (OEC-CM) nöral kök hücrelerin (NKH) gelişimini uyarır ve bu da OEC'lerin mikroçevredeki birçok koruyucu maddenin salınmasıyla nöroproteksiyonu düzenleme kapasitesini artırır (Duan ve diğerleri, 2011). Ek olarak, OEC'ler, BDNF ve NGF gibi faktörleri, nörturin (NTN), CNTF ve GDNF gibi küçük proteinleri salgılayarak nörojenezi, nöral farklılaşmayı ve yanıtı doğrudan etkiler (Cao ve diğerleri, 2007; Lipson, Widenfalk, Lindqvist, Ebendal, & Olson, 2003) ve laminin, fibronektin, matriks metalloproteinaz 2 (MMP2), sonic hedgehog proteini (Shh), salgılanan protein asidik ve sistein açısından zengin (SPARC) gibi daha ağır çözünür faktörler (Au ve ark., 2007; Higginson ve Barnett, 2011; X. Zhang ve diğerleri, 2006) (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2: Nörojenez ve nöronal farklılaşmada rol nayan OEC'ler tarafından üretilen faktörler.

Faktörler	Moleküler ağırlık	Fonksiyonlar	Referanslar
BDNF	26.7 kDa	SH göçünün desteklenmesinde rol oynar	(Cao ve ark., 2007)
CNTF	22.9 kDa	Nörogenezi destekler	(Sethi ve ark., 2014)
NGF	26.7 kDa	SH göçünün desteklenmesinde rol oynar	(Cao ve ark., 2007)
Fibronektin	440 kDa	Nöral progenitör hücre göçünü teşvik eder	(Kearns, Laywell, Kukekov, & Steindler, 2003)
Laminin	400 kDa	Nöral progenitör hücre farklılaşmasında rol oynar	(Wilkinson, Kobelt, & Leipzig, 2014)
Neurturin (NTN)	23.6 kDa	Nörogenezi destekler	(Sethi ve ark., 2014)
Matriks Metalloproteinaz 2 (MMP2)	67 kDa	Nöral hücre göçü için önemlidir	(L. Wang ve ark., 2006)
Sonic Hedgehog protein (Shh)	67 kDa	Nöronlarda sinir kök hücrelerinin farklılaşmasını indükler	(X. Zhang ve ark., 2006)

Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich (SPARC)	43 kDa	Nöral farklılaşmada ve nörit uzamasında rol oynar	(Au ve ark., 2007)
--	--------	---	--------------------

2.4. PSS yaralanmaları ve hastalıklarında OEC uygulaması

PSY'da rejenerasyon süreci bağışıklık hücreleri, SH'ler ve nöronlar dâhil olmak üzere birden fazla hücre tarafından düzenlenen dinamik bir süreçtir. *In vivo* araştırmalara göre, OEC transplantasyonu, tekrarlayan laringeal sinir yaralanması vakalarında laringeal kas fonksiyonunu verimli bir şekilde geliştirir ve akson rejenerasyonunu uyarır (Guerout ve ark., 2014). OEC'ler, *in vivo* araştırmalara göre, rejenere aksonal miyelin kılıfının Ranvier düğümlerini oluşturabilir, sinir iletim hızını artırabilir ve hasarlı siyatik sinirlere nakledildiğinde işlevi iyileştirebilir (Radtke ve diğerleri, 2009) (**Tablo 2.3.**).

Tablo 2.3: PSS'lerde OEC'lerin kullanımına ilişkin klinik öncesi araştırmalar.

Hücre kaynağı	Tip	Hastalık modeli	Hayvan	Terapötik etki	Referanslar
OM veya OB	<i>In vivo</i>	Rekürrent laringeal sinir hasarı	Sıçan	OEC'lerin nakli laringeal kas fonksiyonunu önemli ölçüde iyileştirebilir ve rekürren laringeal sinir hasarı vakalarında aksonal rejenerasyonu teşvik edebilir.	(Guerout ve ark., 2014)
OB	<i>In vivo</i>	Transekte edilmiş SS hasarı	Sıçan	Bir ayak izi çalışmasına göre, OEC'ler restore edilen sinire dayanabilmiş ve entegre olabilmıştır. OEC'ler, yenilenen aksonal miyelin kılıfını Ranvier düğümlerine	(Radtke ve ark., 2009)

				dönüştürerek ve SS iletim hızını artırarak sıçan işlevini iyileştirebilir.	
Allojenik neonatal sıçanlar	<i>In vivo</i>	Transekte edilmiş SS hasarı	Sıçan	OEC'leri taşıyan polikaprolakton (PCL) kateterlerinin naklinin ardından yaş kas ağırlığı, sinir yoğunluğu ve SS iletim hızında artışlar görülmüştür. Ek olarak, SS hasarının rejenerasyonu teşvik edilmiştir.	(J. . J. Y. Lee ve ark., 2021)
2-7 günlük neonatal sıçanlar	<i>In vivo</i>	Transekte edilmiş SS hasarı	Sıçan	OEC'ler nakledildikten sonra sinir eksenine bunca hareket etme kabiliyetine sahiptir. Bileşik kas aksiyon potansiyelinin genliği ve sinir iletim hızının her ikisi de OEC'lerle yüklü poli laktik-koglikolik asit (PLGA) kateterlerinin nakledilmesiyle artmıştır. Bununla birlikte, hasar modeli ameliyattan 12 hafta sonra siyatik sinir fonksiyon endeksinde bir iyileşme ile sonuçlanmamıştır.	(B. Li ve ark., 2010)
OB	<i>In vivo & in vitro</i>	Transekte edilmiş SS hasarı	Sıçan	GK-MKH'lerden elde edilen eksozomlar, OEC canlılığı ve çoğalmasının yanı sıra hasarlı SS'lerin motor ve duyuşal işlevini destekleyebilir. OEC ve eksozom birlikte nakli, sinir rejenerasyonunu ve fonksiyonel iyileşmeyi daha etkili	(Y. Zhang ve ark., 2020)

				bir şekilde destekleme potansiyeline sahiptir.	
Yenidoğan sıçanların OB'si	<i>In vivo</i>	Transekte edilmiş SS hasarı	Sıçan	SH'ler ve OEC'lerin birlikte nakli, tek başına OEC'lerin nakline kıyasla aksonal rejenerasyonu %28 oranında iyileştirebilmektedir. Siyatik sinir rejenerasyon süreci, önemli ölçüde rejenere olmuş gastroknemius kasının sinerjik etkisinden faydalanmaktadır.	(You ve ark., 2011)

2.5. Sıçanlarda femoral sinirin özellikleri

Arka bacağın etkilenmesi durumunda, femoral sinir periferik nöropatinin değerlendirilmesinde etkili bir yöntem sunar. Femoral akson sayımları, periferik nöropati ile motor nöron ölümü arasındaki ayrımı yapmak için ventral kök sayımlarıyla birlikte kullanılabilir. (Grohmann ve ark., 2001; Seburn, Nangle, Cox, Schimmel ve Burgess, 2006).

Anatomisi

Femoral sinir, sıçanlarda üçüncü ve dördüncü krsta, omurilik sinirinin köklerinden gelen sakrolomber pleksusun dalları üzerindedir (Kinnman, Aldskogius, Johansson, & Wiesenfeld-Hallin, 1992; Neri, de Amorim, Campos, Sanada, & Fazan, 2015). Kasıkta 2 cm uzunluğunda eğik bir kesi, iliak psoas kasını çevredeki kas dokusundan künt olarak ayırmak için kullanılabilir. Bundan sonra, Y şeklindeki gövdesi ve iki dala çatallanmasını gösteren femoral sinir görülebilir (Wei ve diğerleri, 2020). Proksimal trunkus olarak başlayan karışık bir daldır, daha sonra 2 dala ayrılır: biri esas olarak masküler dal adı verilen, uyluğun kuadriseps kaslarını innerve eden ve sonlanan motor, diğeri ise esas olarak duyuşal daldır. Sonuncusu, yüzeysel olarak kasın medial bölgesine doğru giden büyük safen veni takip eder ve femoral sinirin devamı olarak daha uzakta safen siniri oluşturmak için bir araya gelen iki küçük fasikülden oluşur. Yüzeysel sirkumfleks iliak arter ve veni takiben, kuadriseps dalı nihayetinde karın kasları ve kuadriseps kasını (vastus

lateralis, vastus intermedius, vastus medialis ve rectus femoris'ten oluşur) innerve etmek için bölünür (Pena ve Barón, 1988; Wei ve diğerleri, 2020).

Histolojisi

Sinirin proksimal bölümü, üç veya dört fasiküler gruptan oluşan, az sayıda epinöral lif dokusu ve onu çevreleyen ince bir bağ dokusu (perinörium) tabakası olan bir gövdeye sahiptir. Bu fasiküler yapılardan birisinin çapı diğerlerinden daha büyüktür (423 - 413 μm). Sonuncusu, kuadriseps kası yönünde dallanan sinirin bir parçasıdır. Çapı 289 - 255 μm arasında değişir ve aynı özellikleri gösteren iki bitişik fasikülden oluşmuştur. Çok sayıda küçük kapiller damarlar endonöral vaskülarizasyonu sağlamaktadır. Fasikülün daha kalın kısımlarında daha büyük damarlar ve arterler bulunmaktadır. En kalın miyelinik lif grupları (ortalama çap, 15 -18 μm) enine kesildiğinde toplam sayının %60'ını oluşturmaktadır. Orantılı olarak daha hassas dallar vardır, çünkü onları oluşturan miyelinik lifler tipik olarak ana gövdedekilerden daha küçüktür. Kas kütesine girdiğinde, kuadriseps kasına yönelen sinir, farklı çaplarda dört veya beş fasiküle ayrılır (Pena ve Barón, 1988).

Tablo 2.4: Toluidin Mavisi ile boyanmış ultra ince kesitler ile elde edilebilecek histopatolojik veriler.

Toluidin Mavisi ile boyanmış kesitlerden

1. Aksonlar sayılabilir.
2. Akson çapları, miyelin kalınlığı ve G oranlarının (iç çapın aksoplazmaya karşılık geldiği ve dış çapın miyelini içerdiği) dağılımını da ölçülebilir.
3. Akson çaplarının analizi, büyük çaplı, hızlı motor aksonlar gibi eksik bir sınıfı tanımlayabilir veya genel aksonal atrofiyi ortaya çıkarabilir.
4. Demiyelinizan veya hipomiyelinizan bir nöropati, miyelin kalınlığı ve katmanları ölçülerek gösterilebilir.

5. G-oranı, akson ve miyelinli SH'si arasındaki anormal karşılıklı sinyalleşmeyi gösterebilir veya ince miyelini veya tersine ince aksonları vurgulayabilir, çünkü tipik olarak akson çapı ile miyelin kalınlığı arasında korelasyon vardır.

6. Soğan benzeri (demyelinizan/ mimiyelelinizan yapılanma gösterir), Schmidt-Lanterman insizyonu (anormal miyelin paketlenmesini gösterir), miyelinli SH'leri gibi diğer periferik sinir patolojileri ile çalışmak için sinir uzunluğu, çoklu aksonların sarılmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca ve bu kesitlerde rejenere akson demetleri görülebilir (Grohmann ve ark., 2001; Seburn ve diğerleri, 2006).

2.6. İnsanlarda femoral sinir disfonksiyonu

2.6.1. Femoral sinir kökeni ve yolu

Pelviste yer alan femoral sinir, alt ekstremitelere motor (hareket) ve duyuşal işlevler sağlayan iki ana sinirden biri olarak bacağın ön kısmından aşağı doğru uzanır. Siyatik sinir (SS), bacağın arkasına fonksiyon sağlarken, femoral sinir bacağın ön kısmını innerve eder. Femoral sinir, lomber pleksusun L2 ila L4 sinir köklerinden çıkar, üst uyluk ile kasık arasında yer alan içi boş, kama şeklindeki femoral üçgene girer. Bu üçgen lenfatik damarlar, femoral ven, femoral arter ve femoral sinirin geçişidir. Alt ekstremitelere kan sağlayan oldukça büyük bir kan damarı olan femoral arterin yakınından geçer ve kasık bağının altından ön ve arka bölüm olmak üzere iki sinire ayrılır (Bowley ve Doughty, 2019; Refai, Black ve Tadi, 2023). Adduktor kanalında, bir tüneli andıran küçük bir uyluk açıklığı, arka bölüm safen sinirine dönüşür. Alt bacak, ayak bileği, ayak ve diz safen siniri tarafından algılanır. Femoral sinir, bacakları ve dizleri bükmemize ve düzeltmemize ve kalçanın bükülmesine yardımcı olmak için uyluk ve kalça fleksörleri olan psoas major ve iliacus kaslarını destekler. Kalça, uyluğun ön kısmı, diz ve bacağı dokunma, ağrı ve sıcaklık duyuları sağlar (Refai ve diğerleri, 2023).

2.6.2. Femoral sinir disfonksiyonu

Tanımlama

Femoral sinir disfonksiyonu, femoral sinir hasarının bir sonucu olarak bacakların belirli bölgelerini hareket ettirememesi veya hissedememesi durumudur (Ross, Bendok ve McClendon, 2017).

Mononöropati, femoral sinir gibi tek bir sinirin yaralanması ile tanımlanır. Tek bir sinir lokal olarak hasar gördüğünde, tipik olarak mononöropati ile gösterilir. Tam vücut bozuklukları aynı anda tek bir sinirde soliter sinir hasarına da neden olabilir (örn., mononeuritis multiplex) (Clinchot ve Craig, 2020).

Epidemiyoloji

Femoral sinir disfonksiyonunun en büyük nedenlerinden birisi periferik nöropatidir. Periferik nöropati insanlar yaşlandıkça daha yaygın olmasına rağmen, tanısına ilişkin tıbbi veriler hala eksiktir ve yetersiz teşhis edilmektedir. Bu nedenle, hiçbir epidemiyolojik çalışma, durumun prevalansını dünya çapında doğru bir şekilde belirlenememiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda periferik nöropati prevalans oranları literatür kaynağına göre önemli ölçüde farklılık göstermektedir, çünkü şu anda erişilebilir olan veri kaynakları tüm popülasyona odaklanmamaktadır. Bununla birlikte, tahminler periferik nöropatinin küresel prevalansını %2 ile %7 arasında göstermektedir. Ek olarak, gelişmekte olan ülkelerle karşılaştırıldığında, periferik nöropati batı ülkelerinde daha yaygındır (Callaghan, Price ve Feldman, 2015; Hanewinkel, van Oijen, İkrım ve van Doorn, 2016).

Femoral sinir disfonksiyonunun bazı tipik nedenleri

1. Kaza durumlarında olduğu gibi travma (doğrudan yaralanma), ameliyatlardan kaynaklanan komplikasyonlar (kalça protezi, histerektomi ve diğer sezaryen ameliyatları gibi) (Refai ve ark., 2023; S. D. Waldman, 2014).
2. Sinire uygulanan kalıcı veya uzun süreli baskı (örn., uyluktaki lateral femoral kutanöz sinir üzerindeki baskının neden olduğu ağrılı bir sinir sıkışması sendromu olan Meralgia paresthetica durumunda) ve bazen obezite veya hamilelik (Grossman, Ducey, Nadler ve Levy, 2001; Guidon ve Massey, 2012). Ayrıca, yaklaşık %2'lik bir insidansa sahip olan femoral nöropati, böbrek transplantasyonunun iliak fossada transplant cerrahisinin ipsilateralinde gelişen yaygın bir yan etkisidir, çünkü sinir sıkışması genellikle ameliyat sırasında, ekartörler uzun süre kullanıldığında meydana gelir (Aminoff, 2021).
3. Çevredeki anatomik özellikler veya hastalıkla ilişkili yapılar (örn. tümörler, kistler, hematomlar veya anormal kan damarları) tarafından sinirin sıkıştırılması, gerilmesi veya sıkışması. Bu

nedenler, şişmiş dokular siniri daralttığında ortaya çıkan ve sinir sıkışması olarak da bilinen "sinir sıkışması" olarak adlandırılan bir durumla sonuçlanır (Refai ve ark., 2023).

4. Kırık kalça kemiği, kırık bacak veya fıtıklaşmış disk (Alexander, Weisbrod ve Varacallo, 2024; S. H. Lee, Lee, Woo ve Kwon, 2013).

5. Kasıktaki femoral artere yerleştirilen bir kateter (femoral arter kateterizasyon prosedürleri) (El-Ghanem ve ark., 2017).

6. Bacaklar ve uyluk bükülmüş ve döndürülmüş haldeyken (litotomi pozisyonu) cerrahi veya tanısal bir prosedür sırasında karın veya pelviste iç kanama meydana gelebilir. Ek olarak, vajinal doğum femoral nöropatlere neden olabilir. Hastalar genellikle bacağın dizden ve uyluğun kalçadan bükülmesini içeren dorsal litotomi pozisyonuna yerleştirilir. Femoral sinir bu duruşta inguinal ligamente karşı sıkışır ve bu da sinirin kan akışını tehlikeye atar. Doğumdan sonra hasta ayağa kalkmaya çalışır ancak yere yığılır çünkü femoral sinir artık kuadriseps femoris kasını innerve etmez ve işlevsiz hale getirir (Black ve ark., 2023).

7. Periferik nöropatiye, diabetes mellitus neden olabilir. Diyabetik lumbosakral radikülopleksus nöropatisi, en yaygın varyasyonlardan birini tanımlamak için kullanılan bir isimdir. Bu durumda, hasta femoral nöropatiye benzer semptomlar gösterir, ancak bunun gerçek bir femoral nöropati olmadığını düşündüren ek belirtiler ve semptomlar vardır. Vajinal doğuma benzer şekilde, geri kalan semptomlar femoral nöropati tanısıyla uyumlu değildir (Bhanushali & Muley, 2008; Glenn & Jabari, 2020; Llewelyn & Llewelyn, 2019; Younger, 2011).

8. Ağır veya çok sıkı bel kemerleri (Grossman ve ark., 2001).

9. İliakus veya psoas kaslarının yakınındaki enfeksiyonlar, herhangi bir enfeksiyon kitle etkisi yaralanmasına neden olabilir. Bu kasların femoral sinire yakınlığı, genişleyen bir apse veya hematoma siniri sıkıştırmaya başlayabileceği anlamına gelir. Bunun sonucunda sinirde hasar oluşabilir ve muhtemelen femoral sinirin motor veya duyu innervasyonu bozulabilir (Lorei & Hershman, 1993).

10. Radyoterapi sonrası radyasyon sonrası nöropati (Gikas ve ark., 2008).

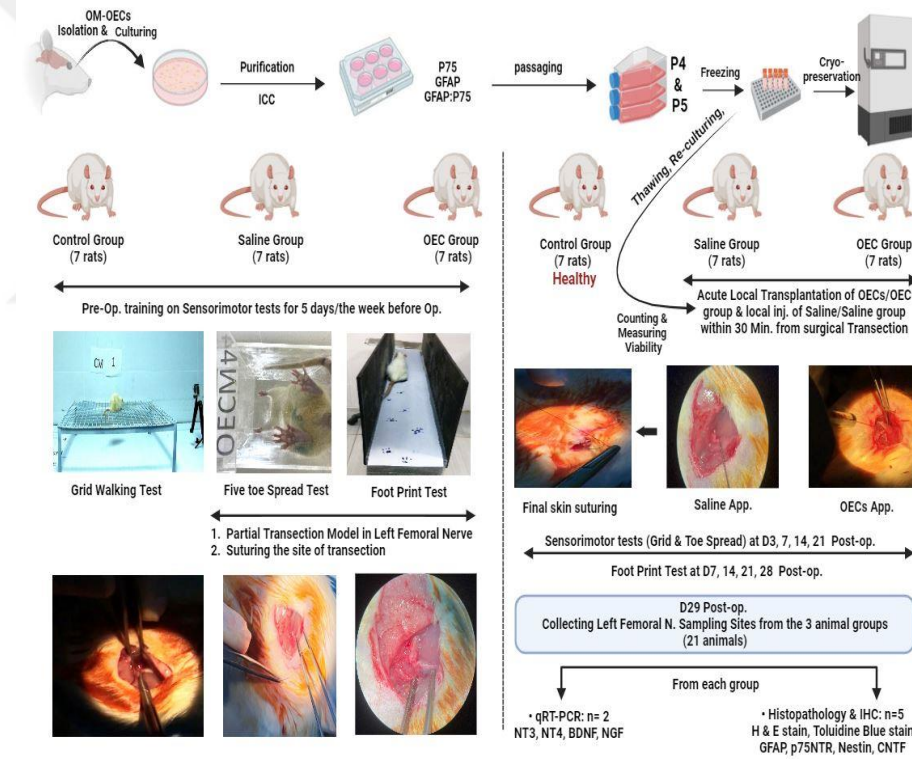
Femoral sinir disfonksiyonunun bazı olası semptomları

- Sırt ve kalçadan kaynaklanan ve bacaklara yayılan radiküler ağrı, sıklıkla femoral sinir yaralanmasının göstergesidir.
- Bacak, diz veya uyluk hissinde ağrı, karıncalanma, yanma veya his azalması gibi değişiklikler.
- Bacakta, dizde, ayak bileğinde veya ayakta zayıflık, özellikle ikincisi olmak üzere basamak çıkma ve inmede sorunlara neden olur ve dizin büküldüğünü veya yol verdiğini hissettirir.
- Bacak, ayak bileği veya dizin uzatılmasında güçlük.
- Bacak kaslarının kaybı (Refai ve ark., 2023).

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Tez Çalışma Planı

Deneyssel çalışmalar, Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (HAYMER), Ege Üniversitesi Kordon Kanı Hücre-Doku Uygulama Araştırma Merkezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı ve Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2022-081 sayılı kararı (EK-1) onaylanarak projelendirildi (BAP-31851) (EK-2). Çalışmada izlenen yol aşağıdaki gibidir (Şekil 3.1.);



Şekil 3.1. Tez çalışmasında izlenen yol (<https://app.biorender.com> aracılığıyla oluşturuldu).

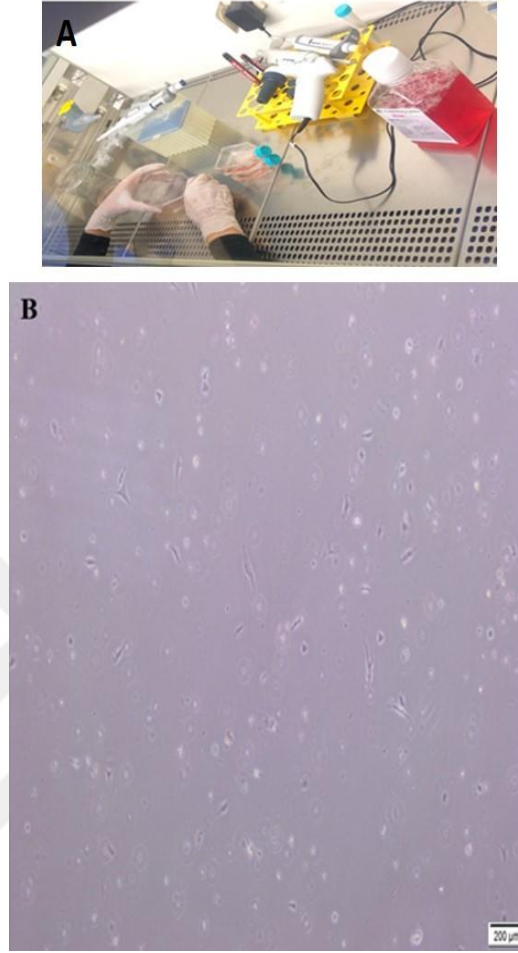
3.2. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin (OEC) Hücre Kültürü

3.2.1. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin (OEC) Özellikleri ve Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan Olfaktör Mukozal Mezenkimal Kök Hücreleri, 215M888 no'lu proje ile desteklenen Olfaktör Mukozal Mezenkimal Kök Hücrelerin Nöral Farklılaşmasında Peptit Jellerin Etkisinin *In Vitro* İncelenmesi başlıklı tez çalışmasından temin edilmiş olup şu anda pasaj 4'e ulaşmış olan hücreler kullanılmıştır. Burada kullanılan Olfaktörük mukoza kökenli kök hücreler (OEC), 4 adet genç Wistar Albino sıçandan temin edilmiştir. Bu evrede kullanılan sıçanların cinsiyeti önemli değildir. Kök hücre izolasyonu yapılacağından dolayı genç sıçanlar (4-5 hafta) tercih edilmiştir. Olfaktörük mukoza olfaktör hücrelerin (OM-OEC) sağlıklı bir şekilde çoğalabilmesi için gerekli olan besi ortamının hazırlanması için DMEM/F12 hücre besiyeri içerisine %10 FBS (Fetal Sığır Serumı), %1 Penisilin-Streptomisin ilave edilmiş olup +4°C saklanmıştır.

3.2.2. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin Çözdürülmesi

Hücre açma işlemi öncesi, hücre kültürü 45 dakika UV açılmış olan laminar akımlı kabin steril hale getirilerek kullanılan her bir malzeme %70 alkolden geçirilerek kabine alınmıştır. OEC'ler 37°C'deki sıcak su banyosunda içerisindeki DMSO'nun hasar vermesini engelleyebilmek için hızlı bir şekilde steril distile su içerisindeki sıcak su banyosunda çözdürülmüştür. Çözünen hücreler tamamlanmış besiyeri içeren falkon tüp içerisine alınarak 4°C'de 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda süpernatant atılmıştır ve pellet üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek hafifçe pipetaj yapılmıştır. Pipetaj ile hücrelerin homojen olarak dağılması sağlanmıştır ve sayımı yapılan hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak T-25 flaska aktarılmış olup içerisine 5 mL hücre besiyeri (DMEM/F12 hücre besiyeri içerisine %10 FBS (Fetal Sığır Serumı), %1 Penisilin-Streptomisin ilave edildi) konmuştur. Flasklara ekilen hücreler, 37°C'deki %5 CO₂ içeren inkübatöre inkübasyona bırakılmıştır. Ekim işleminden sonra flask yüzeyine hücrelerin tutunması mikroskop ile kontrol edilerek tutunan ve büyüyen hücrelerin besiyeri değiştirilmiştir. Sonuç olarak, %80-90 yoğunluğa ulaşan hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 3.2.**).



Şekil 3.2. A) Olfaktörük glial kök hücrelerin çözöürölmesi **B)** Olfaktörük glial kök hücrelerin çözöürölmesinden 24 saat sonra flask yüzeyine hücrelerin tutunması mikroskop ile kontrol edilmesi.

3.2.3. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin Pasajlanması, Sayımı

Flasklara ekimi yapılan hücreler her gün kontrol edilerek besiyerleri değıştirilmiştir. Hücrelerin %80-%90 konfluent gerçekteştğı aşamada pasajı yapılmıştır. Pasaj işlemi öncesinde hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırılma işlemi sonrası hücre yüzeyi PBS ile yıkanarak hücre atıklarının ve besiyerinin iyice uzaklaştırılması sağlanmıştır. Flask yüzeyine yapışık halde bulunan hücreler Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmıştır ve enzimin etki etmesi amacıyla hücreler 37°C'lik inkübatörde 3-5 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığının anlaşılması için mikroskopta kontrol edilmiştir. Yüzeyden ayrılmış halde olan hücrelerin üzerindeki tripsinin etkisini inaktive etmek için üzerine eklenen tripsin miktarının

en az 2 katı kadar tamamlanmış besiyeri eklenmiştir ardından 15 ml'lik falkon tüpe aktarılıp 4°C 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılırken, pellet üzerine tamamlanmış besiyeri ilave edilerek pipetaj yapılmıştır. Homojen şekilde dağıtılarak çözünmesi sağlanan hücreler sayılarak T-75 flasklara aktarılmıştır. Hücrelerin çoğalması için flasklar 37°C'de %5'lik CO₂ içeren inkübatöre bırakılmıştır.

3.2.4. Tripan Mavisi ile Canlılık Kontrolü

Canlı ve ölü hücre sayısının belirlenmesi için tripan mavisi kullanılmıştır. Pasaj işleminde santrifüj ile elde edilen hücre pelleti besiyeri ile çözüldükten sonra içerisinden 10 µl hücre süspansiyonu alınmıştır ve 10 µl tripan mavisi ile bir mikrosantrifüj tüpü içerisinde karıştırılmıştır. Elde edilen 20 µl hücre-ba karışımının 10 µl'si alınarak Thoma lamına aktarılmış olup ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapılmıştır. Thoma lamında yer alan 16 küçük karenin 4 farklı bölgesindeki canlı hücreler sayıldıktan sonra ortalaması alınmıştır. Mikroskopta canlı hücreler renksiz ve parlak şekilde gözlemlenirken cansız hücreler mavi şekilde gözlemlenmiştir. Thoma lamında sayılan 4 farklı bölgedeki karelerde yer alan hücrelerin ortalamasını temsil etmektedir. DF ifadesi ise; dilüsyon faktörünü temsil etmektedir. Toplam hacim ise; hücre pelletinin ne kadar ml besiyerinde çözüldüğünü ifade etmektedir. Ölü hücrelerin hücre zarı bariyeri geçirip bariyeri, canlı hücreler bariyeri mikroskopta parlak şekilde görüntülenmiş olup sayılmıştır.

3.2.5. Olfaktörük Glial Kök Hücrelerin Dondurulması

OEC'lerin bir bölümü deneylerde kullanılmak için pasajlanarak çoğaltılırken bir bölümü başka çalışmalarda kullanılmak üzere dondurulmuştur. OEC'lerin dondurulmasında % 95 FBS ve % 5 DMSO kullanılmıştır. Tripsin ilave edilerek kaldırılan hücrelerin santrifüj edilmesi ile elde edilen hücre pelleti 106/ml hücre olacak şekilde sayılmıştır ve % 95 FBS + % 5 DMSO içeren dondurma solüsyonu içerisinde çözündürülerek kriyotüplere kulmuştur. Ardından kriyotüpler 4°C'de (30 dakika), -20°C'de (1 saat) ve -80°C'de gece bu inkübasyona bırakılmıştır.

3.3. Deney Hayvanları

Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 14-16 haftalık 21 adet Wistar Albino sıçan (Şekil 3.2.) deney süresince (5-6 hafta) 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışıklandırması olan, ısı (22±2°C) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış

odalarda yaşatıldı. Deneye başlanmadan önce hayvanlar bu şartlara adapte edildi ve standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile ad libidum beslendi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Deneyde kullanılan Wistar Albino sıçanlar.

3.4. Deney Grupları

Grup 1. Kontrol grubu (C)

Tüm iç, dış ve çevresel parametreleri ve faktörleri standart seviyelerde tutan 7 adet Albino Wistar türü erişkin (14-16 hafta) sağlıklı sıçan.

Grup 2. Salin grubu (S)

Kontrol grubu ile aynı koşullara sahip 7 adet Albino Wistar türü erişkin (14-16 hafta) sağlıklı sıçanda kısmi femoral sinir yaralanması modeli oluşturuldu. Bu gruba, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hayvanların hareketlerindeki ve duyu reaksiyonlarındaki değişikliklerin derecesini değerlendirerek ve kaydederek vakaların takibini sürdürülerek femoral sinir yaralanma bölgesine sadece lokal olarak salin enjekte edildi. Tanısal davranışsal/sensorimotor testler deney grubuyla aynı şekilde gerçekleştirildi.

Grup 3. Deney grubu (OEC)

Kontrol grubu ile aynı koşullara sahip 7 adet Albino Wistar türü erişkin (14-16 hafta) sağlıklı sıçanda kısmi femoral sinir yaralanmasını modeli oluşturuldu. Bu gruba, kontrol grubuna kıyasla hayvanların hareketlerindeki ve duyu reaksiyonlarındaki değişikliklerin derecesini değerlendirilip

kaydedildi. Bazı tanı yöntemlerini kullanarak vakaların takibi yapılarak sinir yaralanma bölgesine OEC'ler lokal olarak enjekte edildi. Davranışsal/sensorimotor testlerin nitel ve nicel sonuçları ile sinir hasarı durumunda olası tedavi olarak OEC'lerin terapötik etkinliği hakkında veriler elde edildi.

3.5. Ameliyat öncesi sensorimotor testleri eğitimi ve ameliyat sonrası uygulaması

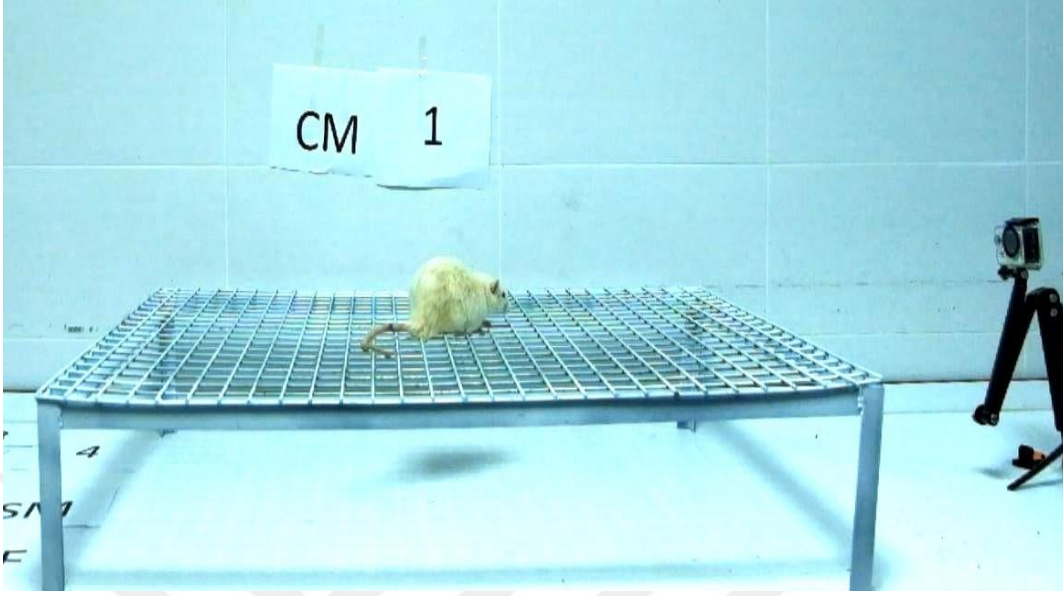
Transplantasyondan sonra hücre etkinliğinin değerlendirmek için 3 sensorimotor test seçilmiştir. Bu testler aşağıdaki gibidir:

1. Izgara yürüme testi (Grid walking test)
2. Beş ayak parmağı yayılma testi (Five toe spread test)
3. Ayak izi testi (Foot print test)

Adaptasyon için, hayvanlar cerrahi ve hücre taraması aşamasından bir hafta önce 5 gün boyunca bu testlere alıştırmıştır.

3.5.1. Grid Walk Test

Grid Walk Test (GWT), duysal motor koordinasyonun hassas bir ölçümüdür (Zalewska ve ark., 2018). Bu test için aparat, iki uzun duvarı birbirine bağlayan bir üst ızgaradan oluşur. Izgaranın sıçanlar için açıklığı yaklaşık 2-3 cm'dir. Bir kamera ızgara aparatının yanına, ızgaradan daha yüksek bir seviyeye yerleştirilmiş, diğer bir kamera ise aparatın önündeki bir sehpanın üzerine yerleştirilmiştir. Izgara üzerindeki davranışlar kaydedilmiş ve daha sonra analiz edilmiştir. Hayvanlar, yaralanmadan sonraki 1,3,7 ve 14. günlerde değerlendirilmelidir (P. Li ve ark., 2019; López-Valdés ve ark., 2014) (**Şekil 3.4.**). Test için, hayvanlar 3 dakika boyunca ağ üzerinde tutulurken, her bir uzuv için “ayak hatası” sayısı ve toplam adımları kaydedilir. Normal farelerde ayak kusuru testinin ortalama değeri 20 kat civarındadır. Bir ayak hatası indeksi [(kontralateral hatalar - ipsilateral hatalar)/toplam adım] hesaplanır. 0 asimetri olmadığını temsil eder; pozitif bir puan, artan kontralateral ayak kusurlarını gösterir ve bozulmuş kontralateral motor fonksiyon anlamına gelir (Soman, Anju, Jayanarayanan, Antony, & Paulose, 2013; Zalewska ve ark., 2018).



Şekil 3.4. Grid walking test.

3.5.2. Five-toe spread test (Toe spreading)

Ayak parmağı yayılmasının tespiti için sıçanlar şeffaf bir taban plakası üzerinde akrilik cam kaplara (20 × 12 × 9 cm) yerleştirilir, ardından hayvanların taban yüzeyini fotoğraflamak için plakanın altına bir kamera yerleştirilir (Bervar, 2000). Ayak parmağı yayılma faktörleri (TSF'ler), birinci ve beşinci ayak parmakları arasındaki (1-5, ayak parmağı açıklığı) ve ikinci ve dördüncü ayak parmakları (2-4, orta parmak açıklığı) arasındaki mesafe ölçülerek belirlenir (**Şekil 3.5.**).

$$TSF = (OTS - NTS)/NTS$$

$$ITSF = (OITS - NITS)/NITS$$

Kısaltmalar: OTS = Çalıştırılan taraf Toe Spread; NTS = Çalıştırılmayan yan ayak yayma; ITSF = Orta Toe Yayılma Faktörü; OITS = Çalıştırılan taraf Ara Burun Açıklığı; NITS = Çalıştırılmayan taraf Ara Burun Açıklığı.



Şekil 3.5. Five-toe spread test.

3.5.3. Foot Print Test (Walking track analysis)

Beyaz kâğıtla kaplı ve karanlık bir sığınağa yönlendirilen kapalı bir yürüyüş yolu (10 cm genişlik x 10 cm yükseklik x 70 cm uzunluk) kullanılır. Arka ayakların plantar yüzeylerine siyah mürekkep (suda çözünür) sürülür ve hayvanın koridordan barınağa doğru yürümesine izin verilir (Şekil 3.6.). Hayvanlar, sinir transeksiyonu ve onarım ameliyatından 3-5 gün önce uygulama denemeleri ile şartlandırıldı. Yürüme yolu analizi, sinir onarımından iki hafta sonra başladı ve iki haftalık aralıklarla devam etti. Ayak izi özelliklerini kullanarak arka bacak motor fonksiyonunu değerlendirmek için geleneksel bir ölçü olan femoral fonksiyon indeksi (FFI) ile hesaplandı. Ayak izleri deneysel (E, sol) ve normal (N, sağ) taraftan toplanır. Baskılar aşağıdaki parametreler için ölçüldü: ayak izleri arasındaki mesafe (TOF), tüm plantar uzunluğu (PL); birinci parmağın beşinci ayak parmağına olan mesafe, parmak açıklığı (TS); ikinci ve dördüncü ayak parmakları arasındaki mesafe ve ara parmak açıklığı (IT). FFI aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

- $(ETOF - NTOF) / NTOF + (NPL - EPL) / EPL + (ETS - NTS) / NTS + (EIT - NIT) / NIT \times 220 / 4$
- Bu formülden hesaplanan indeksler, sıfır ile eksi 100 arasında bir puan arasında değişiyordu. Sıfır, normal işlevi ve -100 femoral sinirin tam transeksiyonunu tanımlar (de Medinaceli, Freed, & Wyatt, 1982).



Şekil 3.6. Foot print test.

3.6. Periferal sinir hasar kesi modeli oluşturulması

Deney hayvanları 3 gruba ayrıldı: Wistar cinsi erişkin (250-350 g) sıçanların deney hayvanı olarak kullanıldığı çalışmada her grupta 7 adet olmak üzere, toplam 21 adet sıçan kullanılması planlandı. Ameliyat sonrası gözlem süresi 4 hafta sürdü.

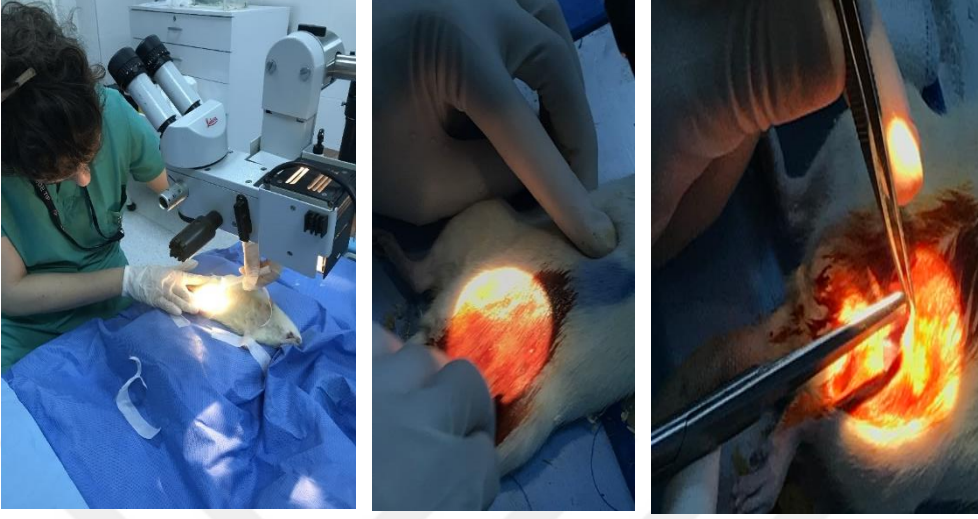
Cerrahi İşlemler:

1. Hayvanlara intraperitoneal uygulama ve ketamin-ksilazin ile bayıltıldı. ketamin %5,90 mg/kg (Alfamine â, Ege Vet, Alfasan International B.V., Hollanda) ve ksilazin %2,5 mg/kg (Alfazyne â, Ege Vet, Alfasan International B.V., Hollanda) (**Şekil 3.7.**) anestezi uygulandı.



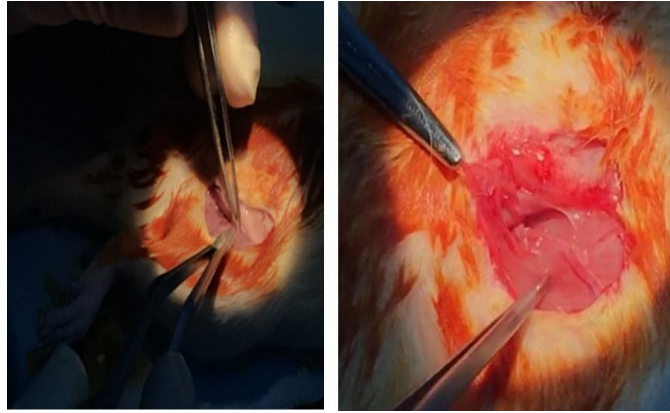
Şekil 3.7. Çalışmada kullanılan anestezik maddeler.

2. Sol inguinal bölgede, inguinal ligamentten başlayıp distale doğru ilerleyerek femoral damarların bulunduğu bölge boyunca ciltte 3 cm'lik bir kesi yapıldı (**Şekil 3.8.**).



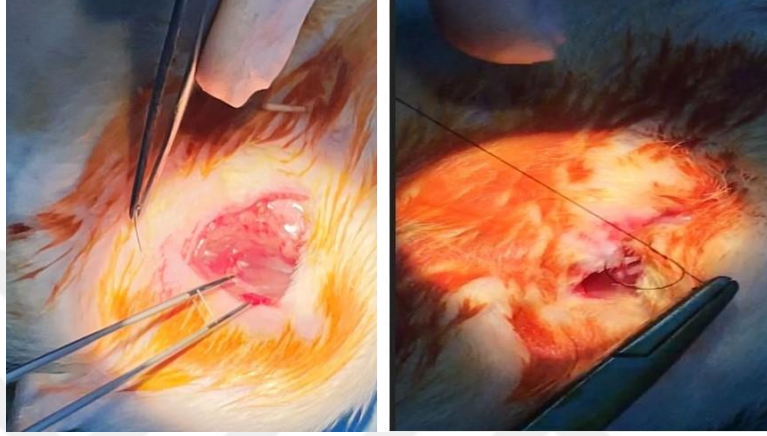
Şekil 3.8. Sol inguinal bölgede ciltte 3 cm'lik bir kesi yapılması.

3. Cerrahi hazırlığı takiben sol femoral sinir kasık kanalına girmeden hemen önce sinir üzerinden fasya yansıtılarak sol femoral sinir operasyon mikroskobu altında ortaya çıkarıldı ve ardından 2-3 mm'lik parsiyel transeksiyon uygulandı. Sinir dokusunda traksiyon yaralanmalarını önlemek amacıyla, çalışırken sinirin kırık ucunu nazikçe kavramak için steril mikro forsepsler kullanıldı (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Femoral sinirin çıkarılması ve 2-3 mm'lik parsiyel transeksiyon uygulaması.

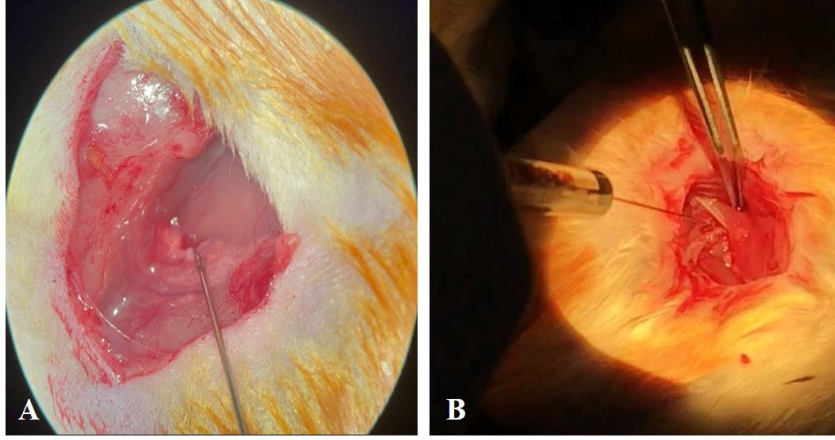
4. Femoral sinirin kısmi transeksiyonundan sonra, femoral sinirin transekte edilen kısmı hemen uç uca 10/0 naylon epinöral suture ile sutureler yapıldı ve 3/0 naylon ile cilt kapatıldı (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Femoral sinirin transekte edilen kısmı hemen uç uca 10/0 naylon epinöral suture ile ve 3/0 naylon ile cilt kapatılması.

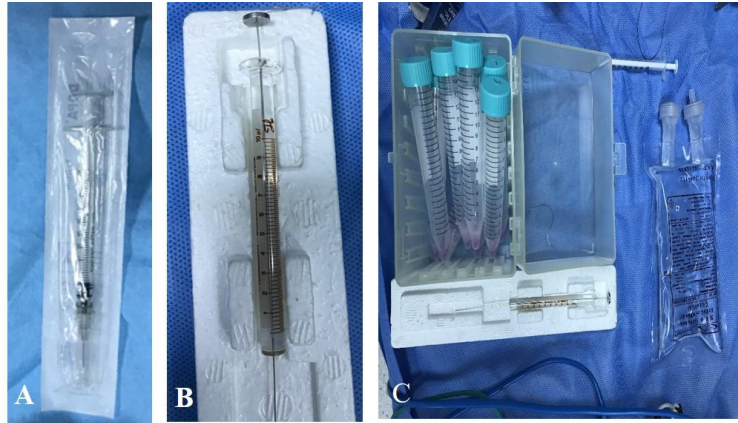
3.7. Periferik sinir onarımı için yetişkin olfaktör mukoza kılıf hücrelerinin *in vivo* uygulanması (hayvan modelinde femoral sinir transeksiyon yaralanması)

- Transplantasyon için dondurulan OEC'ler yeniden çözündürüldü (3.2.2. numaralı adımda belirtildiği gibi).
- Tripan mavisi ile OEC'lerin Canlılık ve Sayımı Kontrolü (3.2.4. numaralı adımda belirtildiği gibi).
- Hem salin (S) hem de deney (OEC) grubu, operasyondan 30 dakika sonra ve deri kapatılmadan önce, salin ile (S, n = 7) veya OEC (OEC, n = 7) ile lokal, akut olarak nakledildi (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. A) S grubuna salin enjeksiyonu, B) OEC grubuna kök hücrelerin lokal, akut nakledilmesi.

- Transplantasyon için hücreler, 150.000 hücre/ μ l'de DMEM/F12 ortamında süspanse edildi ve ameliyat süresince buzda muhafaza edildi. 10 μ l'lik bir Hamilton şırıngasına (Hamilton #701, Hamilton Co, Reno, NV, ABD) bağlanmış bir cam iğne (100 μ m iç çap, Eppendorf, Hamburg, Almanya) kullanılarak, karşılık gelen hücre süspanسیونundan (OEC grubu) 3 μ l (DMEM/F12) sıçan başına toplam 450.000 hücre olacak şekilde veya salinden (S grubu) 3 μ l insülin şırıngası ile yaralı bölgenin merkezine rostral ve kaudale 2 mm mesafede lokal olarak enjekte edildi (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. A) insülin şırıngası, B) Hamilton şırıngası, C) OEC'lerin L15 ortamında süspansesi ve salin.

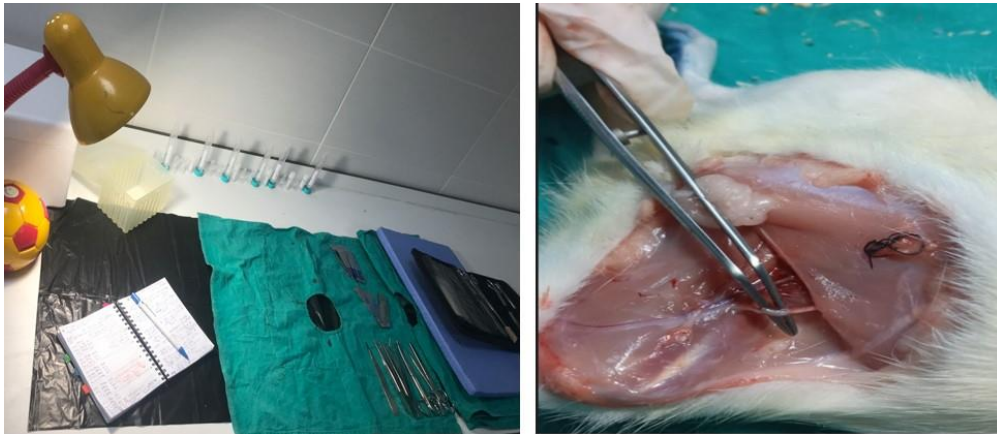
- Enjeksiyonlar 1 µl/dakika perfüzyon hızında yapıldı ve sıvı geri akışını önlemek için iğnenin ucu, her enjeksiyondan sonra 3 dakika doku içinde tutuldu.
- Yara dikildi ve hayvanların sıcak bir ortamda iyileşmesine izin verildi (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. Yara dikilmesi ve hayvanların sıcak bir ortamda iyileşmesi.

3.8. Hayvanların sakrifiye edilmesi ve örneklerin toplanması

Cerrahi sonrası süre, 3 sensorimotor test, her testte daha önce belirtildiği gibi 28 gün boyunca uygulanmıştır. Ameliyat sonrası 29. günde 3 gruptaki tüm hayvanlar sakrifiye edildi ve femoral sinir doku örnekleri disseke edildi (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. Hayvanların sakrifiye edilmesi ve örneklerin toplanması.

- **Histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler:**

Her grupta kalan sıçanlar (n = 5) derin anestezi altında dekapite edildi ve yaralanma merkezinin 1 cm rostral ve 1 cm kaudalinden (toplam uzunluk 2 cm) femoral sinir segmentleri alındı ve 1-2 mm'lik örnekler halinde kesildikten sonra ultra ince kesitler için (0.1 M) PBS tamponlu %2'lik glutaraldehit ve %2'lik paraformaldehit solüsyonunda fikse edildi (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. Femoral sinir segmentleri alınması ve fiksatif solüsyonunda fikse edilmesi.

- **RT-qPCR:**

Hayvanlar derin anestezi sonrası dekapite edildi ve opere edilen gruplardan (n = 2) yaralanma merkezinin 1 cm rostral ve 1 cm kaudalinden femoral sinir segmentleri (toplam uzunluk 2 cm) alındı ve doğrudan küçük falcon tüplerine konarak kuru buzda muhafaza edildikten sonra RT-qPCR prosedürlerine başlayana kadar -80 °C 'de kriyoprezervasyona alındı.

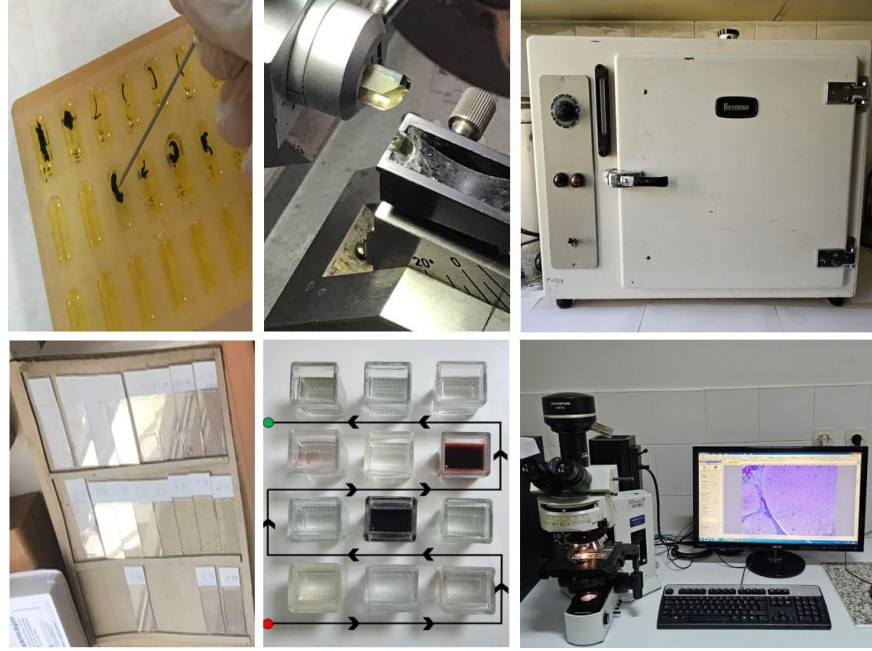
Kontrol grubundan (n = 2) femoral sinir segmentleri yaralı hayvanlarla aynı seviyede elde edilmiştir (Şekil 3.16.).



Şekil 3.16. RT-qPCR segmentleri falcon tüplerine konarak kuru buzda muhafaza edilmesi.

3.9. H&E ve Toluidin Mavisi boyama ile histolojik veri eldesi

Uygulanan hücrelerin etkinliğinin gruplara göre farklılığını mikroskopik olarak incelemek için rutin doku takibi yerine elektron mikroskop takibi yapıp, epon uzaklaştırılması ile histokimyasal boyamalar yapıldı. Bu teknikle, rutin doku takibi sırasında kullanılan alkollerin, periferik sinir üzerindeki kılıflara vereceği hasarı önlemeyi planlandı. Doku takibi ve boyama sırasında kullanılan protokoller aşağıda belirtilmiştir (Şekil 3.17.).



Şekil 3.17. Laboratuarda kullanılan teknik ekipmanlar ve fotoğraflama işlemi gerçekleştirilen mikroskopik görüntüleme sistemi.

3.9.1. Fiksasyon

Deney sona erdikten sonra anestezi altında (0.1 M) PBS tamponlu %2'lik glutaraldehit ve %2'lik paraformaldehit solüsyonu kullanılarak intrakardiyak perfüzyon yöntemi uygulandı. Disseke edilen femoral sinirler aynı tamponda 24 saat bekletildi. Mikrodiseksiyon işlemi sonrası küçültülen femoral sinirler 1 gece tamponda bekletildi. Ertesi gün elektron mikroskopik takip işlemine geçildi. PBS tamponunda bulunan elektron mikroskopik parçalar temiz tüpe aktarıldı. Post fiksasyon için tüplere 1'e 1 oranında + PBS tamponlu osmium tetroksit (OsO_4) eklenip (1-1,5 saat) fikse olması sağlanmıştır.

Parçalar PBS tamponu ile → 3x5 dakika yıkanıp dehidratasyon işlemine geçildi.

3.9.2. Dehidratasyon

- % 50 Alkol
- 15 dakika
- % 50 Alkol
- 15 dakika

- % 70 Alkol
- 25 dakika
- % 95 Alkol
- 25 dakika
- % 100 Alkol
- 30 dakika
- % 100 Alkol
- 15 dakika serilerden geçirildi

Parçaların dehidrasyonu sağlanmıştır.

- 1:1 oranında % 100 Alkol-Propilenoksit
- 30 dakika
- Saf propilenoksit
- 30 dakika
- Saf propilenoksit (30 dakika) bekletilir, temiz tüplere alınır
- 2:1 oranında propilenoksit + Epon karışımına konur
- 60 dakika
- 1:2 oranında propilenoksit + Epon karışımına konur
- 60 dakika
- DMP-30'suz Epon karışımına alınarak
- 1 gece (parçaların dibe çökene kadar) buzdolabında +4°C de bekletildi.

3.9.3. Gömme

- %1.5-2 oranında DMP-30 içeren epon içerisinde
- BEEM 036 piramidal kapsüllere gömüldü
- 37oC etüvde
- 24 saat
- Etüv ısısı 45°C ye yükseltildi
- 24 saat
- Etüv ısısı 60°C ye yükseltildi
- 24 saat

- DMP-30'suz Epon karışımına alınarak
- 1 gece
- Etüvden alınan parçaların tamamen sertleşmesi dolayısıyla kesite hazırlanması için
- Oda ısısında 10 gün beklemeleri gerekmektedir

3.9.4. Kesit Alma

- Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotom aracılığı ile yarı ince kesitler alındı. Toluidin blue balı kesit görüntülere göre femoral sinirin alanı belirlenerek ve 1 µm kesitler alındı.
- 0,2 M Fosfat Tamponu Hazırlanışı: 35,61 g disodyum monohidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (255793, Sigma, ABD) distile su ile 1 L' ye tamamlanarak A solüsyonu oluşturulur. 27,6 g sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (71643, Sigma, ABD) distile su ile 1 L tamamlanarak B solüsyonu oluşturulacaktır. 40,5 ml A ve 9,5 ml B solüsyonu karıştırılarak 50 ml 0,2 M fosfat tamponu oluşturularak pH 7,4' e ayarlandı.
- **Epon Hazırlanması:** A solüsyonu için 62 ml Epon 812, 100 ml DDSA ile karıştırılır. B solüsyonu için 100 ml epon 812, 89 ml MNA ile karıştırılır. DMP 30' lu epon karışımı için % 1,5 oranında DMP-30 ve 1:1 oranında A ve B solüsyonu karıştırıldı (SPI-Pon 812 Embedding Kit, SPI-CHEM, ABD).
- **Yarı İnce Epon Kesit Alma**

Ultramikrotom (Nr.313864, Reichert, AUS) aracılığı ile epon femoral bloklarından 1 µm yarı ince kesitler polilizinli lamalar üzerine alındı. Kesitler tüm gruplardaki femoral sinirlerin kas içi dallanma öncesindeki distal kısma yakın bölgelerinden alındı.

3.9.5. Toludin Mavisi Boyası

1 µm' lik epon kesitler 60°C' ye ısıtılmış toludin mavisi solüsyonuna 2 dakika daldırıldı. Ardından sırasıyla çeşme suyu ve distile su içerisinde 10 dakika yıkanarak kurutuldu. Kesitler entallen ile kapatıldıktan sonra Olympus DP72 dijital kamera takılı Olympus BX51 mikroskopta görüntülendi.

Toludin Mavisi Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması: 1g toludin mavisi (198161 Sigma-Aldrich, ABD) ve 2 g sodyum borat (221732, Sigma-Aldrich, ABD) 100 ml distile su içinde

çözülür. Toludin mavisi karıştırılarak çözüldükten sonra filtre kâğıdı (Whatman™ 10334985 Grade 0905, Sigma, ABD) ile süzülür.

3.9.6. Epon ve OsO4 Uzaklaştırma

Epon femoral sinir kesitlerin hem H&E hem histokimyasal banabilmesi için eponun kesitlerden uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla aşağıdaki protokol kullanıldı.

- Sodyum hidroksit (NaOH) (106462, Merck, ABD) ile durulmuş % 100 etil alkol 1 gün boyunca +4°C’ de dinlendirildi.
- 1 gün boyunca filtre kâğıdı ile süzüldü.
- Epon kesitler +4°C’ de 1 gün boyunca NAOH ile durulmuş etanol içerisinde bırakıldı (Epon uzaklaştırma basamağı).
- Ardından 3 kez 30’ ar dakika % 100 etil alkolde yıkandı.
- % 95 ve 80’ lik etil alkol serilerinde 2 dakika bekletildikten sonra 5 dakika distile suda yıkanarak hidrasyon sağlanmıştır.
- OsO4’ in uzaklaştırılması amacı ile kesitler karanlık ortamda 2 saat % 1 sodyum metaperiyodat içinde bekletildi.
- Epon tabakasının kalkması mikroskop ile incelenerek, OsO4’ in uzaklaştırılması ise Hematoksilen&eosin Boyama ile onaylandı.
- Kesitler PBS içine alınarak H&E ve immünohistokimya boyamalar için bekletildi.

% 1 Sodyum Metaperiyodat Solüsyonunun Hazırlanması: 1 g sodyum metaperiyodat (106597, Merck, ABD) 100 ml distile su içerisinde çözülür.

3.9.7. H&E Boyama:

- Boyama tekniği: Preparatlar aşağıdaki boyama basamaklarından geçirildi.

- | | |
|---|-----------|
| 1. Ksilol I | 10 dakika |
| 2. Ksilol II | 10 dakika |
| 3. Ksilol III | 10 dakika |
| 4. İyice dışarıda kuruduktan sonra alkole geçirilir | |

5. % 100 Alkol I	2 dakika
6. % 100 Alkol II	2 dakika
7. % 95 Alkol	2 dakika
8. % 80 Alkol	2 dakika (veya daha uzun süre)
9. Distile su	5 dakika (preparatlar iyice süzülür)
10. Hematoksilen	2,5 dakika (boya her kullanışta süzülür)
11. Akar su	5 dakika
12. Asit alkol	Pembe renk olana kadar
13. Akar suda	Daldır çıkar
14. Amonyaklı su	Mor renk olana kadar
15. Akar su	Daldır çıkar
16. Distile su	5 dakika (preparatlar kurutulur)
17. Eozin	2,5 dakika
18. % 95 Alkol	2,5 dakika
19. % 100 Alkol I	2,5 dakika
20. % 100 Alkol II	2 dakika
21. Dışarıda iyice kurut	
22. Ksilol I	10 dakika
23. Ksilol II	10 dakika
24. Ksilol III	10 dakika

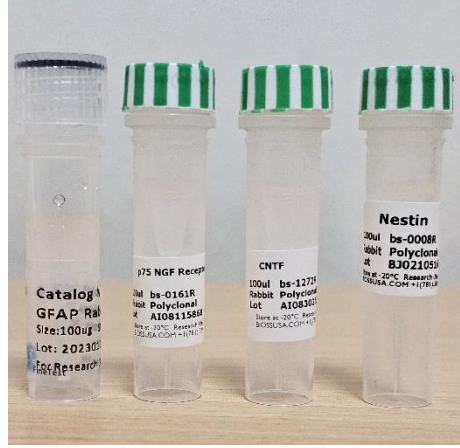
- Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatılır.

3.10. OEC'ler için spesifik belirteçler kullanarak immünohistokimya yapılması

- Bu boyama prosedürü dokuda ifade edilen spesifik proteinlerin işaretlenmesi için kullanılmaktadır. Polilizinli lamlara 1 µm kalınlığında alınan kesitler ksilolde bekletildi.
- Ksilolden çıkartılıp kurutuldu ve Avidin-Biyotin-Peroksidaz tekniği ile indirek immünohistokimyasal yöntem uygulandı. GFAP, p75NGF ve uygulamadan sonra ekspresyonlarının belirlenmesi için Nestin, ayrıca transplantasyondan sonra CNTF ekspresyonu için boyama yapıldı (**Tablo 3.1.**; **Şekil 3.18.**).

Tablo 3.1: Kullanılan primer antikorlar.

Antikor	Marka/ Katalog No	Klonalite	Seyreltme oranları
Rabbit Anti-GFAP	FineTest/ FNab03427	Poliklonal	1/200
Rabbit Anti-p75NGF	Bioss/ bs-0161R	Poliklonal	1/200
Rabbit Anti-CNTF	Bioss/ bs-1272R	Poliklonal	1/200
Rabbit Anti-Nestin	Bioss/ bs-0008R	Poliklonal	1/200



Şekil 3.18. Kullanılan primer antikorlar.

- **İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü**

- | | |
|---|----------|
| 1. %100 Alkol | 2 dakika |
| 2. %100 Alkol | 2 dakika |
| 3. %95 Alkol | 2 dakika |
| 4. %80 Alkol | 2 dakika |
| Distile Su | 3 dakika |
| 5. Sodyum sitrat solüsyonu 90°C mikrodalga içerisinde | |
| 6. Soğuk su banyosu preparatlar soğuyana kadar | |
| 7. Distile su | 5 dakika |
| 8. %1'lik Triton X solüsyonu | 5 dakika |
| 9. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) | 0 dakika |
| 10. Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) | 2 dakika |
- (Bu işlem 3 kez tekrar edilir)

11. Dokuların çevresi pap pen yardımı ile sınırlandırılır
 12. Serum bloking solüsyonu 30 dakika
 13. Primer Antibody 1 : 200 dilüsyonda (GFAP, p75NGF, Nestin ve CNTF) +4°C’de Gece bu bekletilir
 14. Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) 2 dakika
(Bu işlem 3 kez tekrar edilir)
 15. HRP 0 dakika
 16. Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) 2 dakika
(Bu işlem 3 kez tekrar edilir)
 17. DAB Gözle takip
 18. Distile Su 3 dakika
 19. Mayer’s Hematoksilen 1 dakika
 20. Çeşme Suyu Çalkalama İşlemi
 21. Distile Su 1-2 kez daldırıp çıkarma
 22. %95 Alkol 1-2 kez daldırıp çıkarma
 23. %100 Alkol 1-2 kez daldırıp çıkarma
 24. %100 Alkol 1-2 kez daldırıp çıkarma
- Yukarıdaki işlem basamaklarının uygulanmasından sonra ise preparatlar şeffaflandırılmak için 30 dakika boyunca ksilol ile muamele edildi. Ksilol sonrasında ise preparatlar entellan ile kapatılarak görüntülemeye hazır hale getirildi.

3.11. Perinöral Fibrosis kalınlığı ölçümü

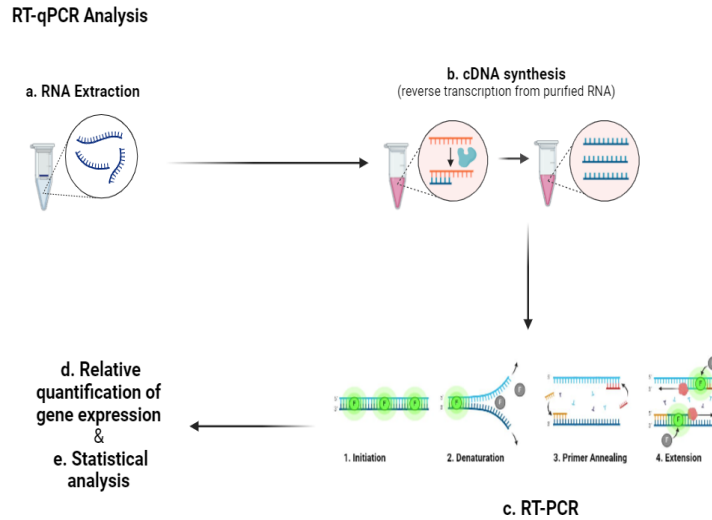
Epinöral yapının Image-Pro Express 4.5 (Media Cybernetics, inc. USA) programı kullanılarak mikron cinsinden kalınlığı ölçülüp elde edilen datalar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.12. Mikroskopik Değerlendirme Yöntemi

- Histolojik bir değerlendirme için ışık mikroskobuna (Olympus BX-51) entegre renkli dijital kamera (Olympus DP72) bulunan binoküler bir ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüler kullanıldı ve histopatolojik değerlendirme bağımsız iki histolog tarafından grupların içerikleri bilinmeden x10, x20 ve x40'lük büyütmelemlerde değerlendirildi.
- Her grupta kesitlerin histokimyasal boyalar olan H&E, Toludin Mavisi ve immünohistokimyasal boyamalar sonrası değerlendirilmesi sistematik randomize seçilmiş dijitalize görüntülerde immünoekspresyon dağılımı ve immünoreaktif yoğunluğu H-skoruna göre 0' dan 3+'e kadar bir skala üzerinde gerçekleştirildi. Buna göre hiç boyama olmadığında 0 değeri alırken, zayıf immünoreaktivitede 1+, orta derecede immüno reaktivite varlığında 2+ ve güçlü (artmış) boyama varlığında 3+ olarak değerlendirildi.

3.13. RT-qPCR analizleri

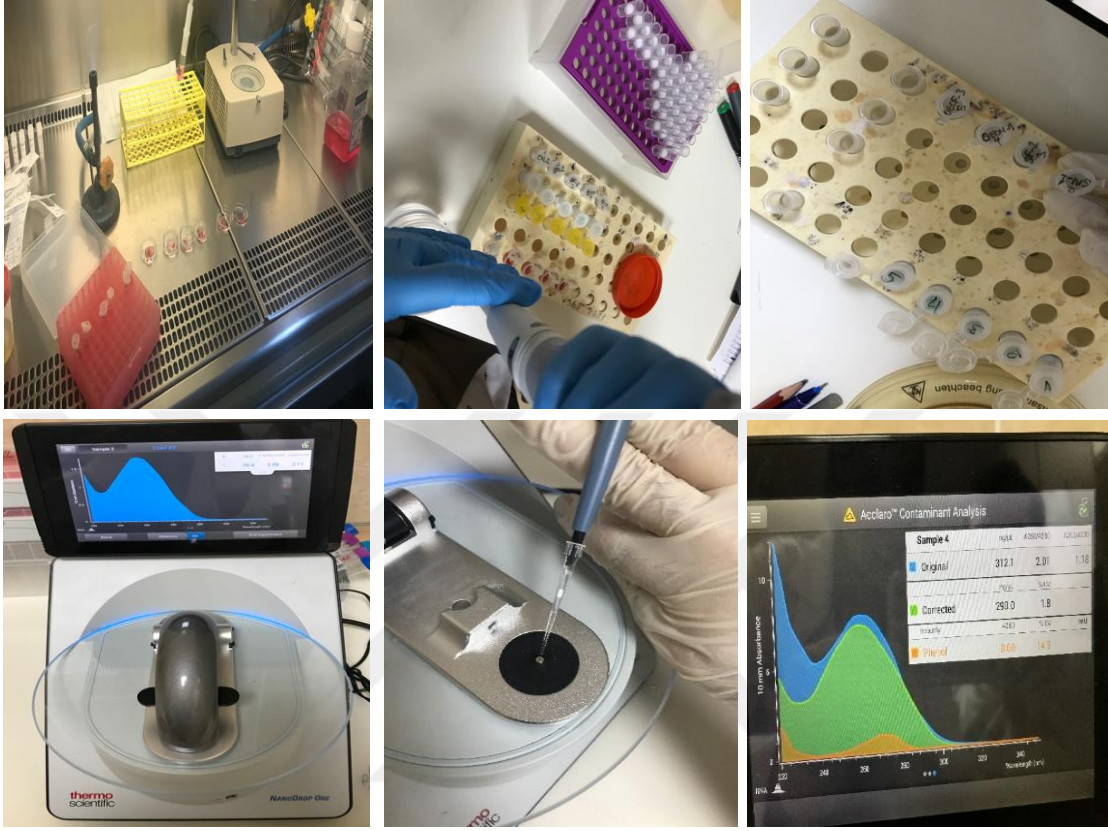
RT-qPCR aşamaları aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi gerçekleştirildi (Şekil 3.19.).



Şekil 3.19. RT-qPCR analizinin aşamaları (<https://app.biorender.com> aracılığıyla oluşturuldu).

3.13.1. RNA Ekstraksiyonu

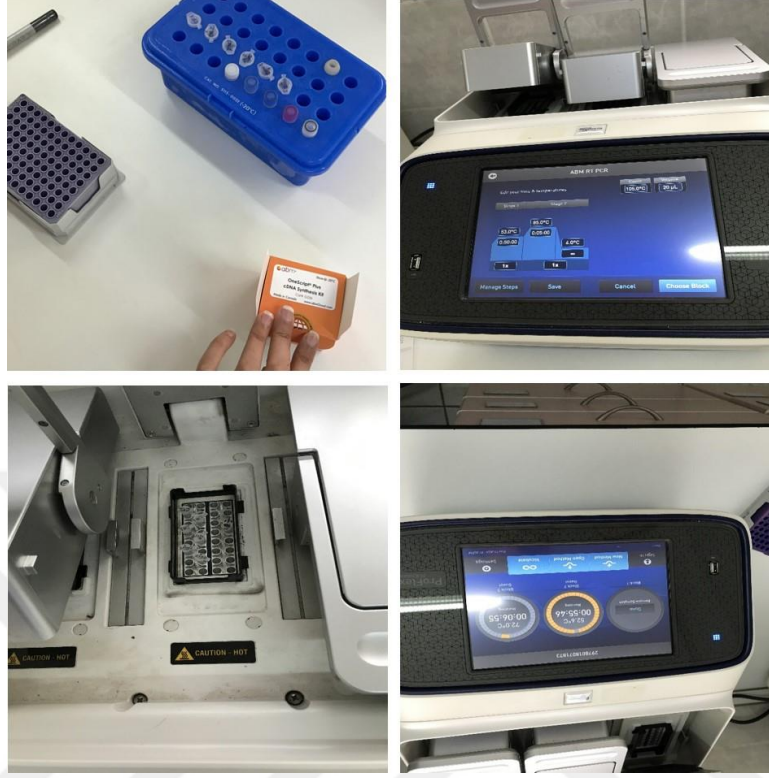
- Total RNA, GeneAll® Hybrid-R™ RNA izolasyon kiti kullanılarak her gruptan 2 hayvan (n=6) olmak üzere sıçanların femoral sinir segmentlerinden üreticinin protokolü izlenerek izole edilmiştir.
- Örnekler Trizol içinde muhafaza edilmiş ve 0,2 ml kloroform eklenmiştir. Karışım 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalanmış ve ardından 2 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 4°C'de 15 dakika boyunca 12.000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Üst sulu faz tutuldu ve az miktarda DNA ve diğer kirleticileri ortadan kaldırmak için bir EzPure™ Filtresine aktarıldı. Filtreleme, oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 g'de santrifüjleme ile gerçekleştirilmiştir.
- Toplama tüpüne, Tampon RB1 hacminin iki katı eklenmiştir. Bu karışımın 700 µl'ye kadar olan kısmı W Tipi Kolona (mini) aktarılmış ve oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 g'de santrifüjlenmiştir. Bu adım kalan örneklerle tekrarlanmıştır.
- Ardından, mini kolona 500 µl RBW tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 sn boyunca ≥ 10.000 g'de tekrar santrifüj edilmiş, ardından 500 µl RNW tamponu eklenmiş ve aynı hız ve sıcaklıkta bir tur daha santrifüj edilmiştir. Kalan yıkama tamponunu uzaklaştırmak için ≥ 10.000 g'de 1 dakika boyunca son bir santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Mini kolon yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve mini kolondaki membranın merkezine 50 µl Nükleaz içermeyen su eklenmiş, ardından oda sıcaklığında 1 dakika boyunca ≥ 10.000 g'de santrifüj edilmiştir. RNA konsantrasyonu ve saflığı bir Nanodrop 2000 (Thermofisher) kullanılarak değerlendirilmiş ve 260/280 nm absorbans oranının 1,8'den büyük olması sağlanmıştır (Şekil 3.20.).



Şekil 3.20. RNA Ekstraksiyonu.

3.13.2. cDNA Sentezi

- Tamamlayıcı DNA (cDNA) OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti kullanılarak sentezlenmiştir.
- Reaksiyon karışımı 4 µl 5X RT Tamponu, 1 µl dNTP, 1 µl primer, reaksiyon başına 1 µg toplam RNA, 1 µl OneScript® Plus RTaz ve toplam 20 µl hacme kadar Nükleaz içermeyen su içeriyordu.
- Primer olarak rastgele hekzamerler kullanılmıştır. Sentez reaksiyonu, karışımın 55°C'de 15 dakika inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.21.).



Şekil 3.21. cDNA Sentezi.

3.13.3. RT-PCR

- Sıçan NT-3, NT-4, BDNF ve NGF için spesifik primerler, yayınlanan gen dizilerine dayalı olarak Primer3 yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır (NT-3: Genbank NM 001270870; NT-4: Genbank NM 13184; BDNF: Genbank NM 012513.4; NGF: Genbank NM).
- NT-3 primerleri için diziler 5'-GATCCAGGCGGATATCTTGA-3' (sense) ve 5'-AATCATCGGCTGGAATTCTG-3' (antisense) idi ve NT-4 primerleri için 5'-CTCCATCTTCAGGTGTGCAA-3' (sense) ve 5'-CACTCAGGAGCCAGAAAAGG-3' (antisense) idi.
- BDNF primerleri için diziler 5' AGTATTAGCGAGTGGGTC 3' (üst) ve 5' GTTCCAGTGCCTTTGTC 3' (alt) ve NGF primerleri içindi, 5'-TGC ATA GCG TAA TGT CCA TGT TG-3' (sense) ve 5'-CTG TGT CAA GGG AAT GCT GAA -3' (antisense) idi.
- Mact geni için kullanılan primerler 5'-CGTGACATTAAAGAGAAGCTGTGC-3' (sense) ve 5'-TAGTTTCATGGATGCCACAGGAT-3' (antisense) olup 205-bp'lik bir parçayı çoğaltmaktadır (Genbank NM 031144).

- PCR koşulları 94°C'de 10 dakika boyunca bir başlangıç denatürasyonunu ve ardından 15 saniye boyunca 94°C ve 1 dakika boyunca 60°C'lik 45 döngüyü içeriyordu. Her PCR reaksiyonu 1 µl cDNA (100 ng/well), 10 µl BlasTaq™ 2X qPCR Mastermix ve 0,5 µl ileri ve geri primer (10 µM) içeriyordu.
- Ana karışımda kontaminant bulunmadığını doğrulamak için şablonsuz kontrol kullanılmıştır. mact geni, mRNA kantifikasyonu için endojen bir referans olarak hizmet etmek üzere aynı koşullar altında paralel olarak çoğaltılmıştır. Hem hedef hem de referans genler için gerçek zamanlı PCR'ler Cobas LightCycler 480 (Applied Biosystems) kullanılarak aynı reaksiyon düzeneğinde gerçekleştirilmiştir.
- Floresan sinyal taban çizgisi ve eşik ayarları her dedektör (NT-3, NT-4, mact) için manuel olarak ayarlanmış ve her numune için bir eşik döngüsü (Ct) elde edilmiştir. Gerçekleştirilen döngü sayısı üzerinden tespit edilen floresanı görüntülemek için bir amplifikasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.22.).



Şekil 3.22. RT-PCR.

3.13.4. Göreceli Nicelleme

- Gen ifadesinin göreceli kantifikasyonu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ΔCt değeri, referans genin ortalama Ct değerinin hedef genin ortalama Ct değerinden çıkarılmasıyla her mRNA için hesaplanmıştır ($\Delta Ct = Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{referans gen}}$).
- **Tüm örnekler bir kalibratör örneğinin ΔCt değerine normalize edilmiştir ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{target}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}}$), normal sıçanlar kalibratör olarak kullanılmıştır.** Gen ifadesindeki kat değişimi kalibratöre göre belirlenmiş ve endojen referans genine normalize edilmiştir.
- Sonuçlar, her bir deney hayvanından alınan her bir doku için üç kopya belirlemenin ortalaması ($\pm SEM$) olarak ifade edilmiştir.

3.13.5. İstatistiksel Analiz

- Veriler, kalibratör numune (normal sıçanlar) ile deney grupları (tedavi edilen ve edilmeyen sıçanlar) arasındaki NGF mRNA seviyelerini karşılaştırmak için bağımsız numuneler için Tukeys çoklu karşılaştırma testi kullanılarak analiz edilmiştir.
- Tüm karşılaştırmalar için istatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

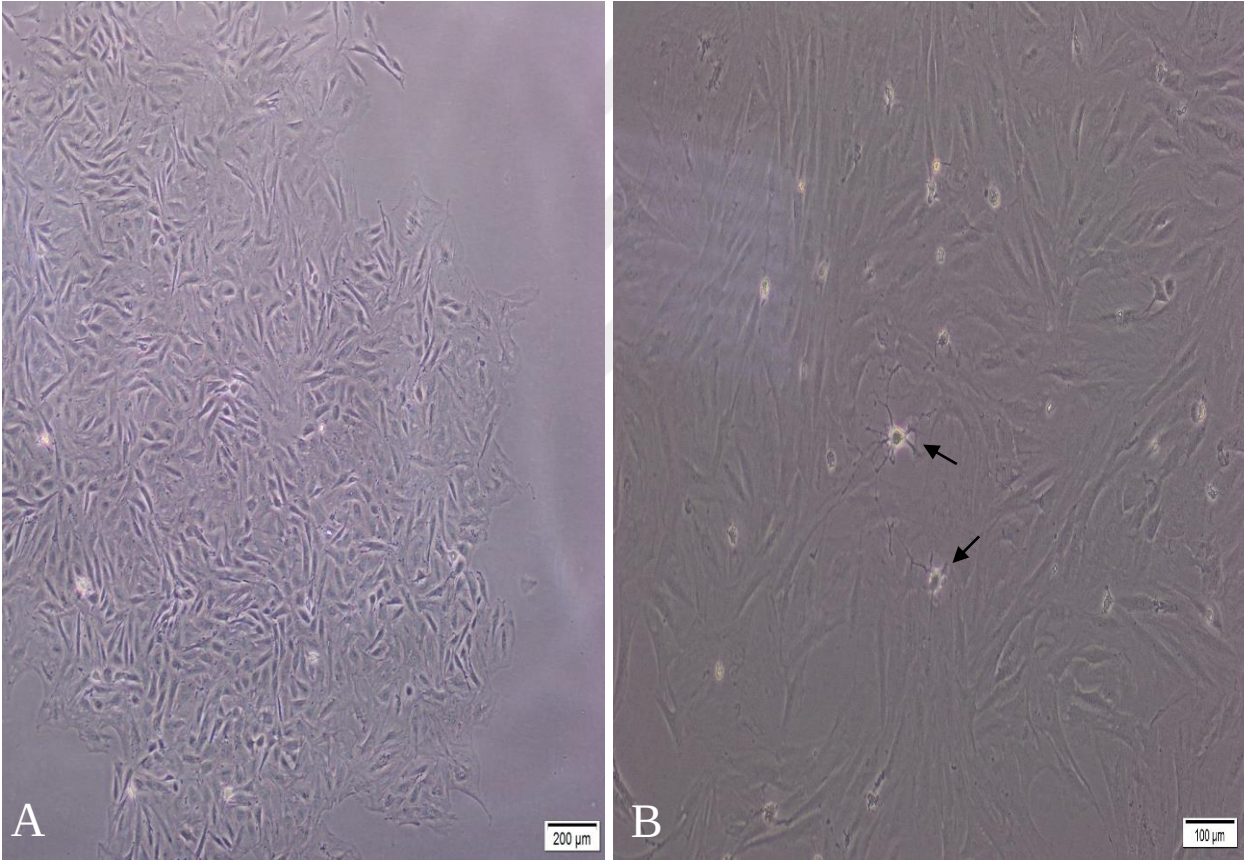
3.14. İstatistiksel analiz

Bu araştırmadan elde edilen verileri analiz etmek için SPSS programının (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) 29. sürümü kullanılmıştır. Kök hücre transplantasyonundan sonra tedavi, salin, ve kontrol grupları arasındaki farkı hem sensorimotor testlerin hem de histolojik ve immünohistokimyasal analizlerin sonuçları kullanılarak analiz edildi. Varyansların Homojenliği Testi, iki veya daha fazla grubun varyanslarının farklı olup olmadığını test eder. ANOVA, üç veya daha fazla ilişkisiz gruptan elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkları belirlemek için kullanılmıştır. İki yönlü değişkenleri karşılaştırmak için post-hoc Wilcoxon testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edilmiştir. Değişkenlerden elde edilen değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4. Bulgular

4.1. Kültüre edilmiş OEC'lerin Morfolojileri

OEC'lerin yüzeye yapışma özellikleri nedeniyle, besleyici ortamda kültürlendikten sonra kültür kabına yapışan hücreler OEC olarak tanımlanmıştır. Çalışmalarda OEC'ler 5-6. pasajlarında kullanılmıştır. 5. pasajda, hücreler hala mezenkimal kök hücrelerin tipik iğ şekline sahiptir. Pasaj 6'da, progenitör hücrelerin bazıları hâlihazırda nöral hücrelere farklanıp ara nöral bağlantılar oluşturmaya başladığı görülmüştür (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. OEC'lerin morfolojisinin faz-kontrast mikroskopunda incelenmesi. A) Besi ortamı ile kültürlenmiş hücreler, pasaj 5 (4X); B) Pasaj 6'daki hücreler (10X). Bu progenitör hücrelerin bazıları hâlihazırda nöral hücrelere farklanıp (ok) ara nöral bağlantılar oluşturmaya başlamışlardır, pasaj 6. (10X).

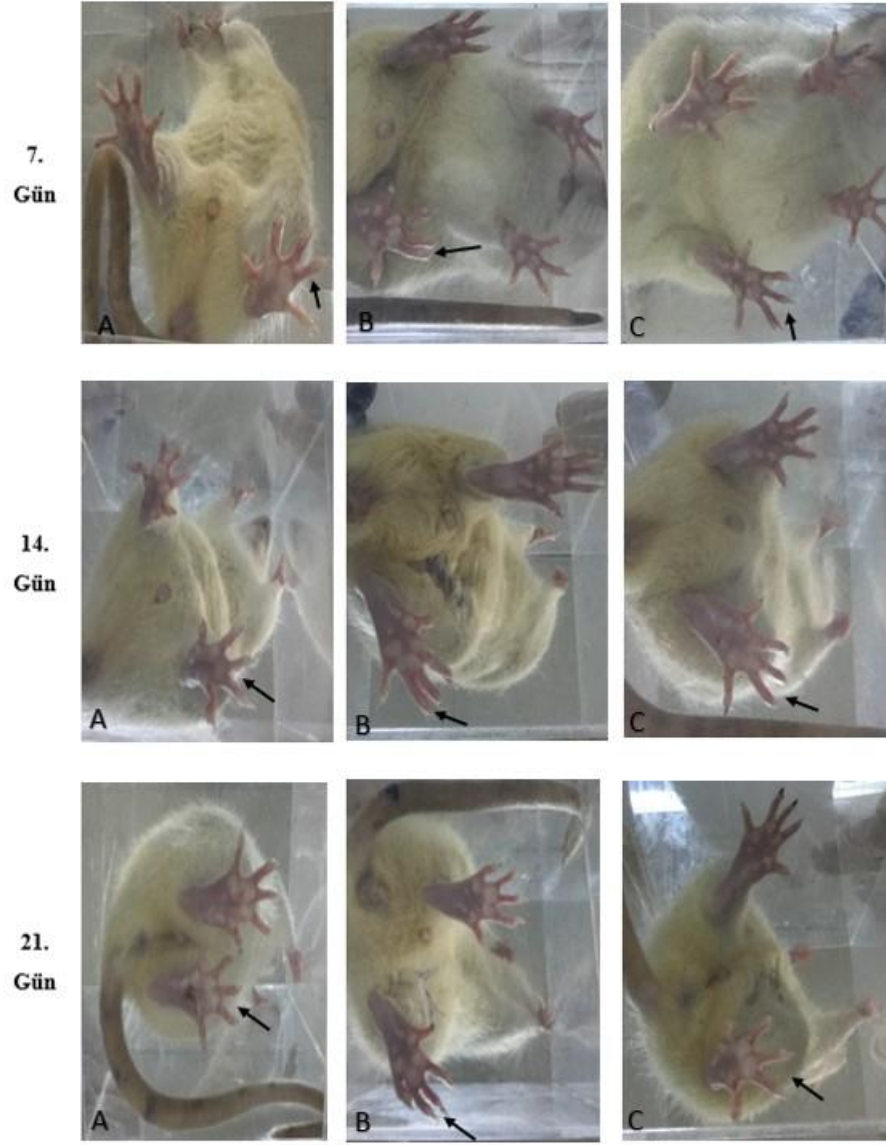
4.2. OEC'lerin Akut Lokal Transplantasyonu Periferik Femoral Sinir Regenerasyonunu Destekler

4.2.1. Sensorimotor testlerin bulguları, ameliyat ve transplantasyon sonrası

Kısmi makas transeksiyonundan sonra femoral sinirler mikrosütüre edilmiş ve hem proksimal hem de distal sinir segmentlerine salin (salin grubu, n=7) ya da OEC içeren DMEM/F12 (OEC grubu, n=7) enjekte edilmiştir (bkz. Deneysel protokoller). Bir hafta sonra sensorimotor testler başlamış ve sıçanlar her 7 günde bir rutin olarak muayene edilmiştir (transplantasyon sonrası 7., 14. ve 21. günler).

4.2.1.1. Five-Toe Spread Test

Ayak parmağı yayılımı, hayvanların sol (ameliyat edilen) ve sağ (ameliyat edilmeyen) patilerinin TSF ve ITSF'si ölçülerek analiz edilmiştir. Ameliyattan sonra, gözlem ve test dönemi boyunca sağlıklı kontrol (C) grubu normal ayak parmağı yayılımı göstermiştir, nakil yapılan (OEC) grupta ayak parmağı yayılması her hafta önemli ölçüde iyileşirken, salin (S) grubu ayak parmağı yayılma parametrelerinde ise sürekli olarak bozukluklar göstermiştir (**Şekil 4.2.**). **Tablo 4.1.** Her 3 grup için TSF ve ITSF'yi göstermektedir. OEC grubu için elde edilen ayak parmağı yayılması (ITSF = - 0.2, TSF = - 0.1) S grubuna kıyasla (ITSF = - 0.5, TSF = - 0.4) daha iyi sonuçlar gösterirken, C grubu testin uygulandığı her hafta neredeyse standart parametrelerde kalmıştır (ITSF = 0.1, TSF = 0.1). Femoral sinir transeksiyonu sonrası 21. günde her bir hayvan grubunun normal ve opere taraftaki ayağının TSF ve ITSF tahmini marjinal ortalamaların ilerleyen grafikler ölçülmüştür. OEC grubunun opere edilmiş ayakta hem ITSF hem de TSF'de, S grubuna kıyasla, kontrol grubunun değerine yakın olan daha iyi değerlere sahip olduğunu, normal ayaklar ise 3 grupta neredeyse eşit değerlere sahip olduğunu göstermektedir. Beş parmak yayılma ölçümlerinde OEC grubu için görülen bu artış, OEC grubunun zaman içinde femoral sinir fonksiyonunu geri kazandığını göstermektedir (**Şekil 4.3.**).

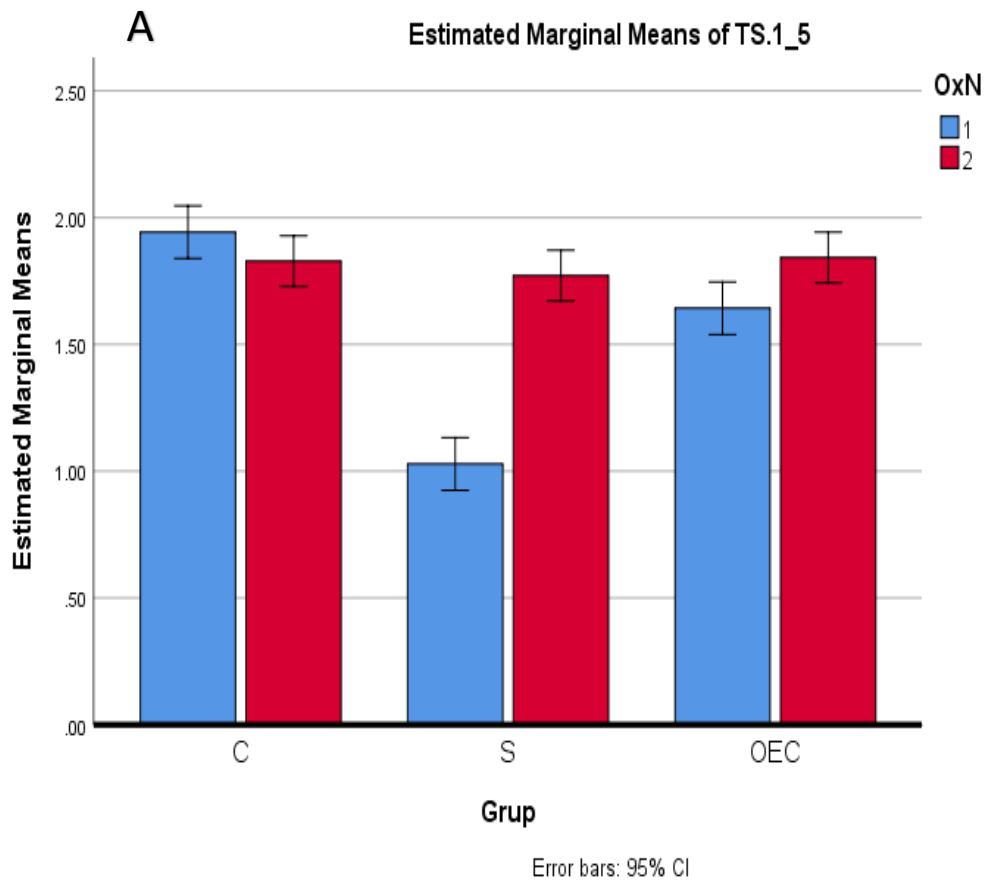


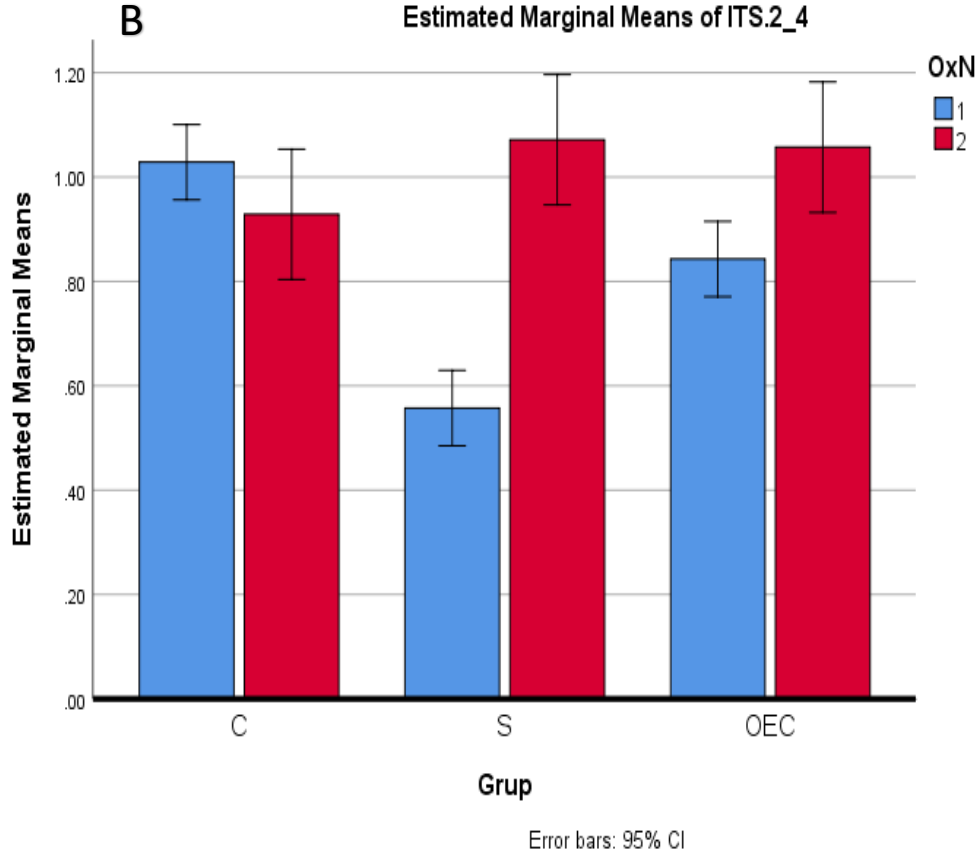
Şekil 4.2. Ameliyat sonrası 7., 14., 21. günlerde **A)** kontrol, **B)** salin, **C)** OEC nakli yapılan grupların normal ve ameliyatlı ayak parmakları arasındaki açığı.

Tablo 4.1: 3 grup için TSFve ITSF'yi göstermektedir.

Parametre	OEC	S	C
TSF	-0.1 ± 0.03	-0.4 ± 0.03	0.1 ± 0.03
ITSF	$-0.2^* \pm 0.05$	$-0.5^* \pm 0.05$	$0.1^* \pm 0.05$

*. Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.





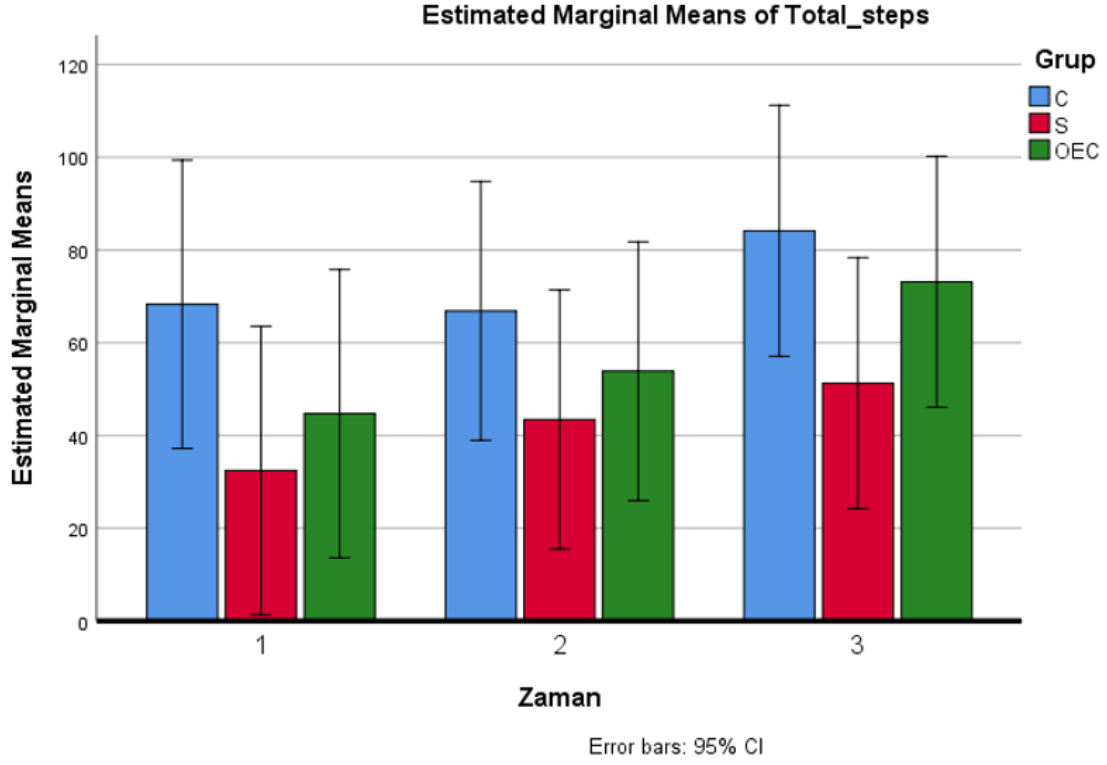
Şekil 4.3. Femoral sinir transeksiyonu sonrası 21. günde her bir hayvan grubunun normal (N, kırmızı sütun) ve opere edilmiş (O, mavi sütun) ayağının (A) TSF ve (B) ITSF tahmini marjinal ortalamaları. OEC grubunun opere edilen ayağının ortalamaları ITSF = 0.94 ve TSF = 1.70, S grubunun ortalamaları ITSF = 0.64 ve TSF = 1.20 ve C grubunun ortalamaları ITSF = 1.10 ve TSF = 2.10'dur. C, S ve OEC gruplarının ortalamaları arasındaki farklar anlamlıydı (P değeri < 0.000, Profil Plots grafik).

4.2.1.2. Grid Walking Test

Ameliyat sonrası 7., 14. ve 21. günlerde günlük toplam adım ortalamaları tüm gruplarda zaman içinde artmış, OEC grubunda S grubuna kıyasla belirgin bir artış gözlenmiştir (**Tablo 4.2.; Şekil 4.4.**). Izgara yürüme testindeki, yürüme hata süreleri (ayak hata indeksi) OEC grubunda S grubuna kıyasla zaman içinde belirgin bir şekilde azalırken, kontrol grubu 3 farklı günde ölçümlerde çoğunlukla aynı kalmıştır (**Tablo 4.3.; Şekil 4.5.**). Bu sonuçlar, femoral sinir yaralanması ve onarımından 21 gün sonra ızgara yürüme testinde ızgara yürüme hata sürelerinde anlamlı farklılıklar olduğu için, Izgara Yürüme Testinin akut sinir yaralanması aşamasında anlamlı olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2: Ameliyat sonrası 7., 14. ve 21. günlerde günlük toplam adım ortalamaları.

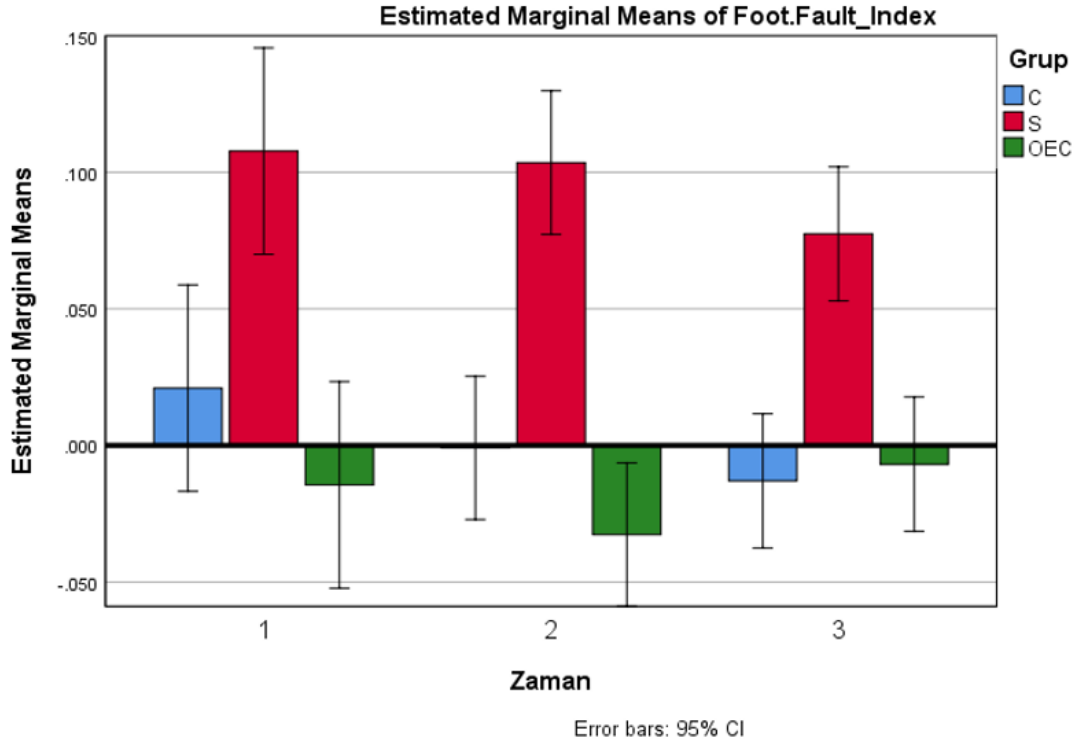
Grup Toplam adım ortalamaları	C	S	OEC
7. Gün	68.29	32.43	44.71
14. Gün	66.86	43.43	53.86
21. Gün	84.14	51.29	73.14



Şekil 4.4. Ameliyat sonrası 7. (1), 14. (2), ve 21. (3) günlerde günlük toplam adım ortalamaları, Profile Plots Analizi.

Tablo 4.3: Ameliyat sonrası 7., 14. ve 21. günlerde Foot Fault Index (ayak hata indeksi).

Grup Ayak Hata İndeksi	C	S	OEC
7. Gün	0.02099	0.10776	-0.01445
14. Gün	-0.00086	0.10354	-0.03264
21. Gün	-0.01298	0.07747	-0.00685



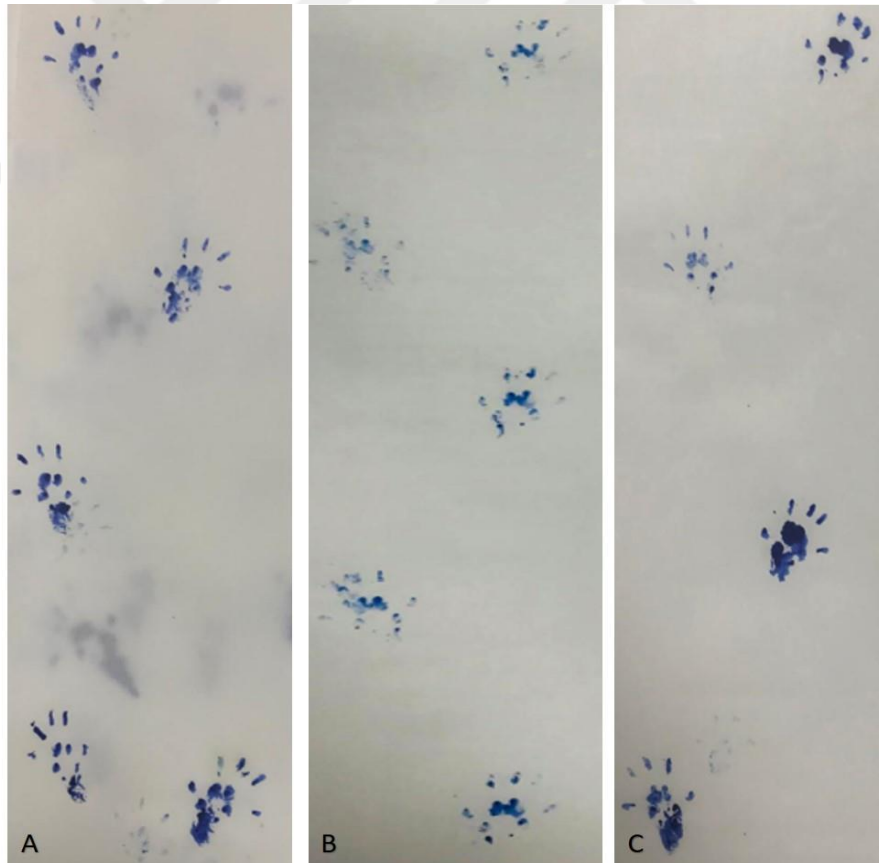
Şekil 4.5. Operasyon sonrası 7. (1), 14. (2), ve 21. (3) günlerde Foot Fault Index (ayak hata indeksi), Profile Plots analizi, $p = 0.000$.

4.2.1.3. Foot Print Test

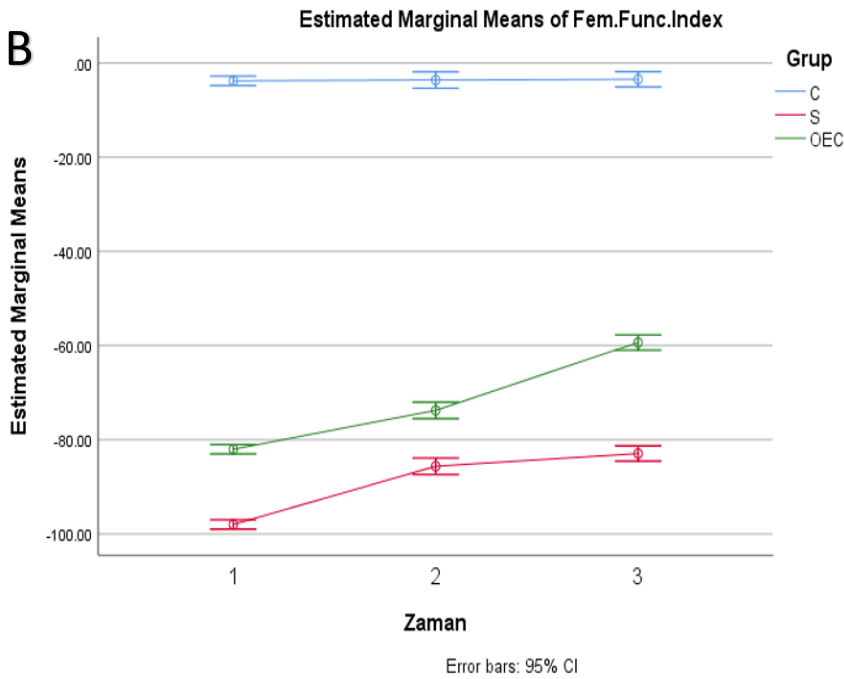
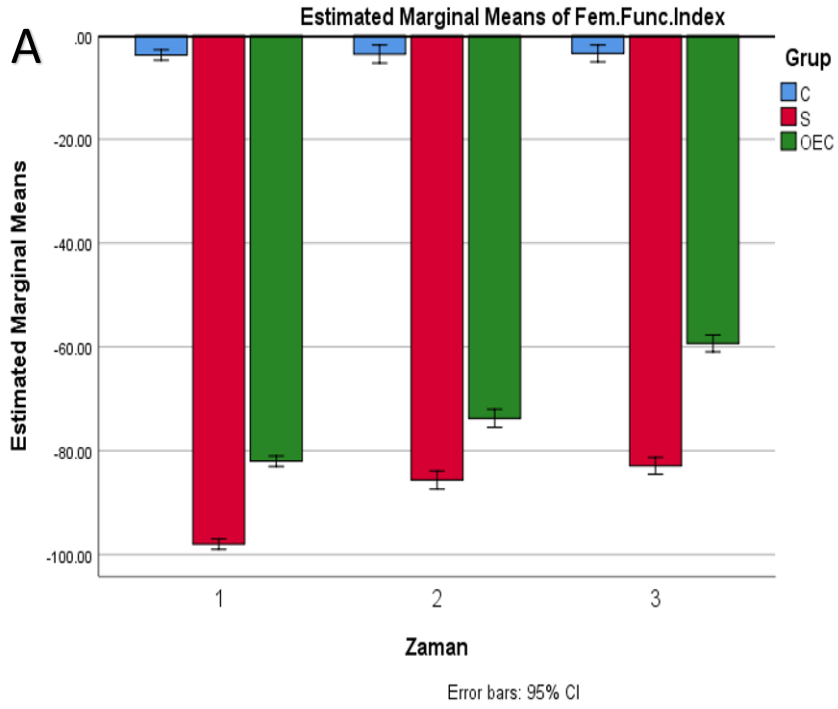
Sıçanlarda yürüme yeteneği, ameliyattan sonraki 4 hafta boyunca Foot Print (ayak izi) analizi ile değerlendirilmiştir. Aynı ayak tarafındaki adımlar arasındaki mesafe gibi faktörler (3.4.3.'te belirtildiği gibi) ölçülmüş ve her hayvan grubundaki ayak izlerinin izleri de fark edilmiştir. Aynı ayak adımları ve ayak izleri arasındaki yürüme mesafeleri de, OEC grubunun daha kısa ayak adımları ve soluk ayak izleri olan S grubuna kıyasla net ayak izleri olan C grubuna daha yakın olması nedeniyle anlamlıydı (**Şekil 4.6.**). Sağlıklı kontrol grubu olarak, femoral sinir transeksiyonundan sonraki 7., 14. ve 21. günlerde C grubunda anlamlı bir fark görülmezken, OEC'de, femoral fonksiyon indeksinde zamanla daha yüksek değerlere sahip olan S grubuna kıyasla femoral fonksiyon indeksinde zamanla anlamlı bir iyileşme görülmüştür, bu da femoral fonksiyonda zayıf bir restorasyon anlamına gelmektedir (**Tablo 4.4.; Şekil 4.7.**). Bu sonuçlar OEC grubunda S grubuna kıyasla anlamlı derecede iyi bir fonksiyon olduğunu göstermiştir ($p = 0.000$).

Tablo 4.4: Ameliyat sonrası 7., 14. ve 21. günlerde Femoral Function Index (Femoral Fonksiyon İndeksi).

Grup Femoral Fonksiyon indeksi	C	S	OEC
7. Gün	-3.7677	-98.0083	-82.0239
14. Gün	-3.5983	-85.6492	-73.7702
21. Gün	-3.4461	-82.9313	-59.3548



Şekil 4.6. OEC nakledilen femoral sinirler için Femoral Fonksiyon İndeksi analizi için bir pist boyunca yürüyen hayvanlardan elde edilen temsili ayak parmak izleri. A) kontrol, B) salin, B) OEC grupları, ameliyattan sonra 3. hafta.



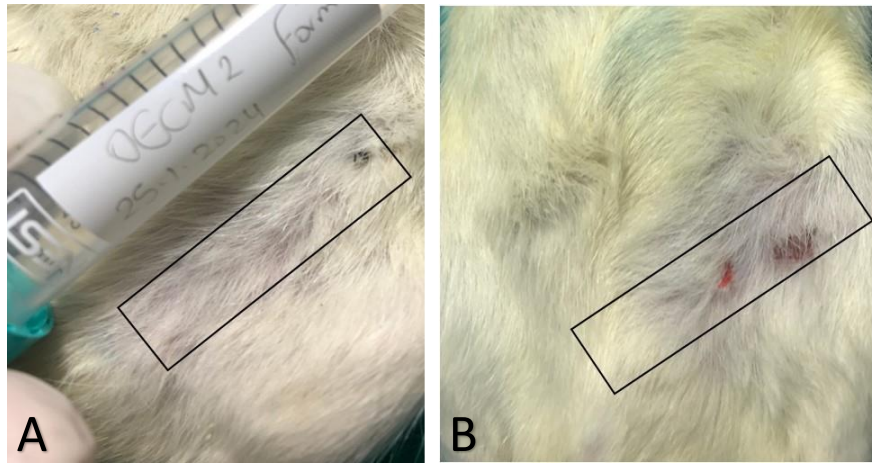
Şekil 4.7. OEC nakledilen femoral sinirler için Femoral Fonksiyon İndeksi analizi. 1) 7., 2) 14., 3) 21. ameliyat sonrası günlerde, Femoral Fonksiyon İndeksinde A) Bar Poly Plots grafiği, B) Line Poly Plots grafiği, OEC (yeşil) ve S gruplarında (kırmızı) anlamlı farklılık gösterirken, C (mavi) gruplarında anlamlı farklılık yoktur (ANOVA ve Post Hoc Test, $P = 0.000$).

4.2.2. Makroskopik ve Mikroskopik Bulgular

4.2.2.1. Makroskopik Bulgular

Hayvanlar

- Hayvanların yaralanma anındaki ortalama ağırlıkları ($271,7 \pm 2,4$ g) gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($F = 1,115$; DF (Degrees of Freedom) = 4,16; $P = 0,384$). Ötenazi uygulandığında, yalnızca salin grubunda ($255,2 \pm 5,3$ g) önemli ölçüde farklı ağırlık ($F = 3,348$; $DF = 4,16$; $P = 0,036$), kontrol ve OEC gruplarıyla ($284,7 \pm 3,3$ g) karşılaştırıldığında, $288,3 \pm 3,7$ g olan orijinal yaralanma öncesi ağırlıklarını neredeyse geri kazanmışlardır.
- Anesteziden sonra ve femoral sinir örneklerinin toplanması için sol inguinal bölgedeki ameliyat yerinde hayvan diseksiyonuna başlamadan önce, yüzeysel olarak, OEC grubundaki deri kesiğinin ameliyattan sonraki son 4 hafta boyunca, S grubunun hala iyileşme aşamasında olan deri bölgesine kıyasla neredeyse tamamen iyileştiği görüldü. Bu da bize OEC grubunda nakledilen OEC'lerin bu hayvanlarda iyileşme sürecini hızlandırmaya yardımcı olan etkinliği hakkında bilgi vermektedir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. A) OEC ve B) S grubunda, ameliyattan 4 hafta sonra çıplak gözle cilt kesiği iyileşme aşaması.

4.2.2.2. Histopatolojik Bulgular

4.2.2.2.1. Hematoksilen&Eosin ve Toluidin Blue Boyama

- **Kontrol (C) grubu**

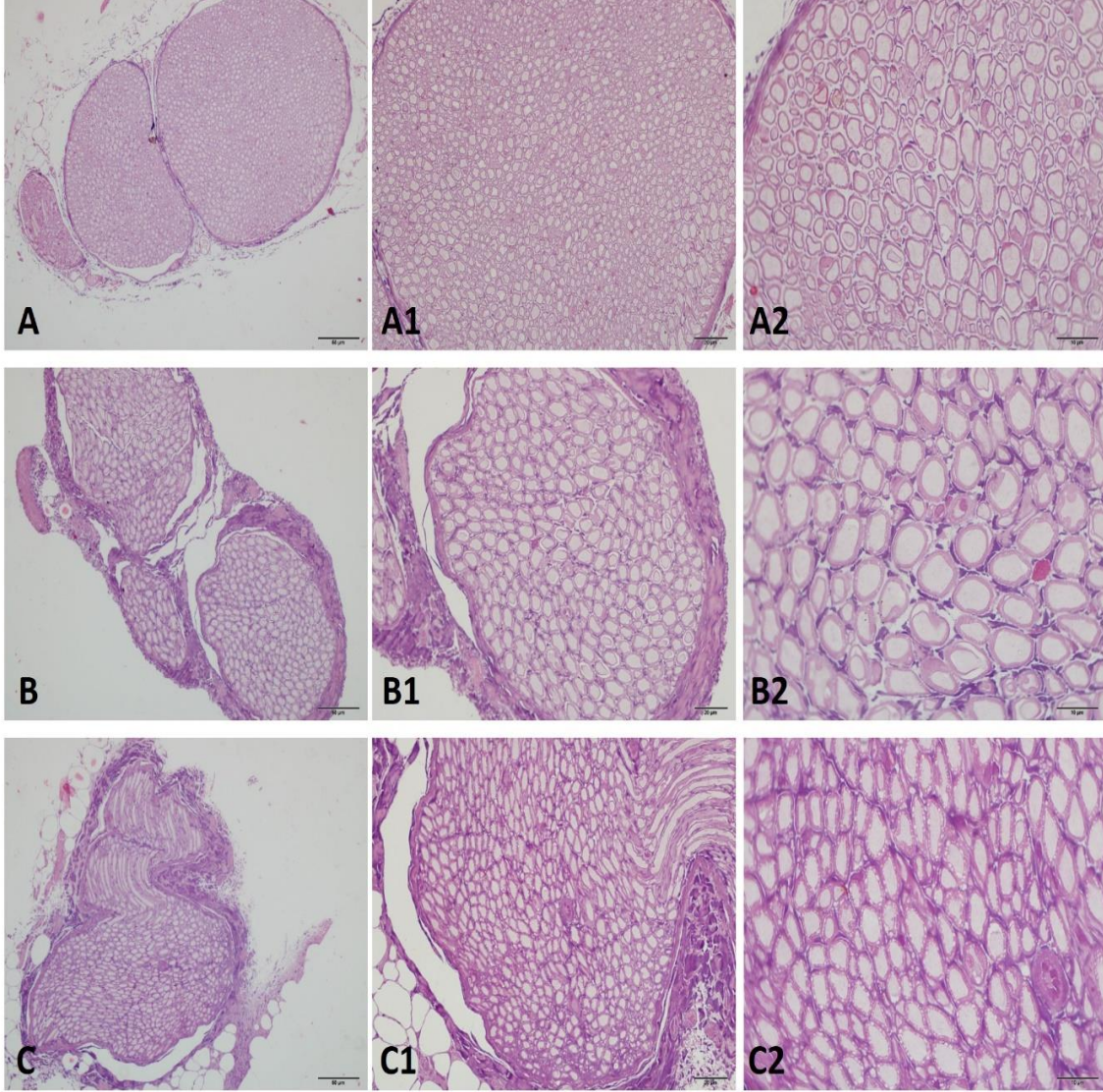
Perinöryum, endonöryum yapıları normal histolojik yapıdadır. Orta, küçük ve büyük miyelinli aksonlar normal figürasyonda saptandı (**Şekil 4.12.** ve **Şekil 4.13.**). Tüm gruplar içinde büyük, küçük ve orta çaplı miyelinli aksonların bu grupta en çok sayıda olduğu saptandı (**Tablo 4.5.;** **Tablo 4.6.** ve **Şekil 4.11.**). SH'leri ve miyelin yapısı normal histolojik yapıda izlendi. Kapiller damarların normal ve yapı konfigürasyonda olduğu saptandı (**Şekil 4.9.** ve **Şekil 4.10.**).

- **Deney (S) grubu**

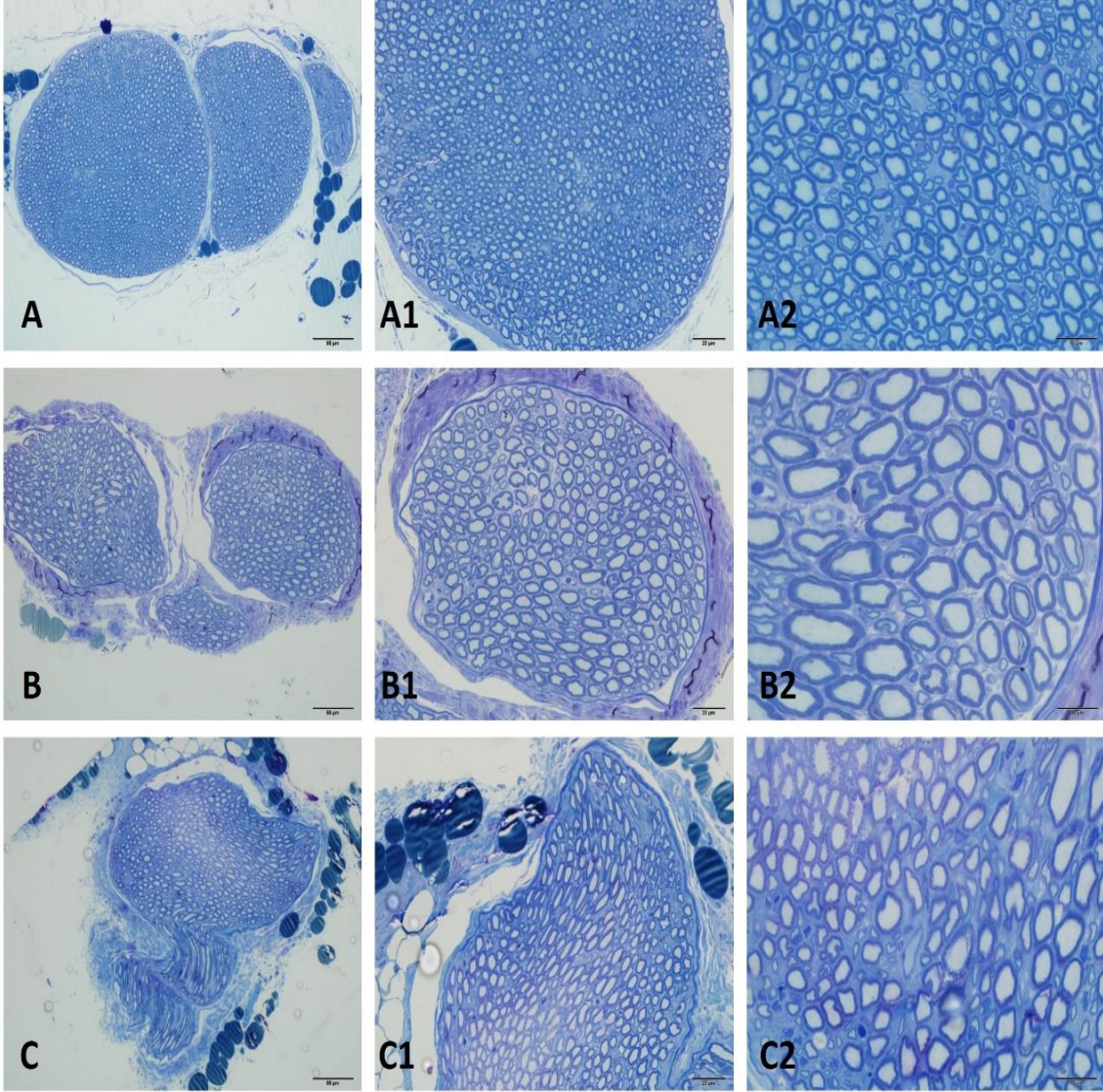
Perinörium yapısında kontrol grubuna kıyasla fark edilir bir kalınlaşma olduğu görüldü (**Şekil 4.13.**). Endonöriumda artış saptandı. Artan endonörium yapısı içinde fibroblast ve mast hücrelerinin yerleştiği görüldü. Küçük ve orta çaplı aksonların sayılarında azalma saptandı (**Tablo 4.5.;** **Tablo 4.6.** ve **Şekil 4.11.**). Aksoplazma içinde ödem kaynaklı olduğu düşünülen artışın varlığı görüldü. En yüksek büyütme olan 100X büyütmede bu fasiküler yapı içerisindeki akson ve miyelinli halkalar incelendiğinde dejenerasyon, çeşitli konformasyon bozuklukları ve ayrışma görüldü. Miyelin halkalarda ayrışma diğer gruplardaki dokulara göre en fazla olan grup olduğu saptandı (**Şekil 4.12.**). Kapiller damarların yer yer silindiği ve mevcut damar çapların kontrol grubuna kıyasla daraldığı görüldü (**Şekil 4.9.** ve **Şekil 4.10.**).

- **Tedavi (OEC) grubu**

Perinörium yapısının C grubuna benzer olduğu görüldü (**Şekil 4.13.**). Endonöriumdaki bağ dokusunun düşük düzeyde arttığı deney grubundan daha çok kontrol grubuna yakın olduğu saptandı. Endonörium yapısı içinde fibroblast ve mast hücrelerinin çok az sayıda olduğu görüldü. Küçük ve orta çaplı aksonlarının sayılarında görece daha düşük seviyede azalma görüldü (**Tablo 4.5.;** **Tablo 4.6.** ve **Şekil 4.11.**). Aksoplazmada ödemin minimal düzeyde olduğu saptandı. En yüksek büyütme olan 1 büyütmede bu fasiküler yapı içerisindeki akson ve miyelinli halkalar incelendiğinde dejenerasyon, çeşitli konformasyon bozuklukları ve ayrışma var olduğu fakat bunun kısıtlı olduğu görüldü (**Şekil 4.12.**). Kapiller damarların normal ve yapı konfigürasyonda olduğu saptandı (**Şekil 4.9.** ve **Şekil 4.10.**).



Şekil 4.9. Hematoksilen&Eosin Boyama. A) Kontrol, B) S ve C) OEC grupları (20X, 50 µm); 1) 40X, 20 µm; ve 2) 100X, 10 µm.



Şekil 4.10. Toluidin Blue Boyama. A) Kontrol, B) S ve C) OEC grupları (20X, 50 µm); 1) 40X, 20 µm ve 2) 100X, 10 µm.

Tablo 4.5. Akson çapı, miyelin kalınlığı ve perinörium kalınlığının ortalamaları (µm); C, S ve OEC gruplarında (p<0,001).

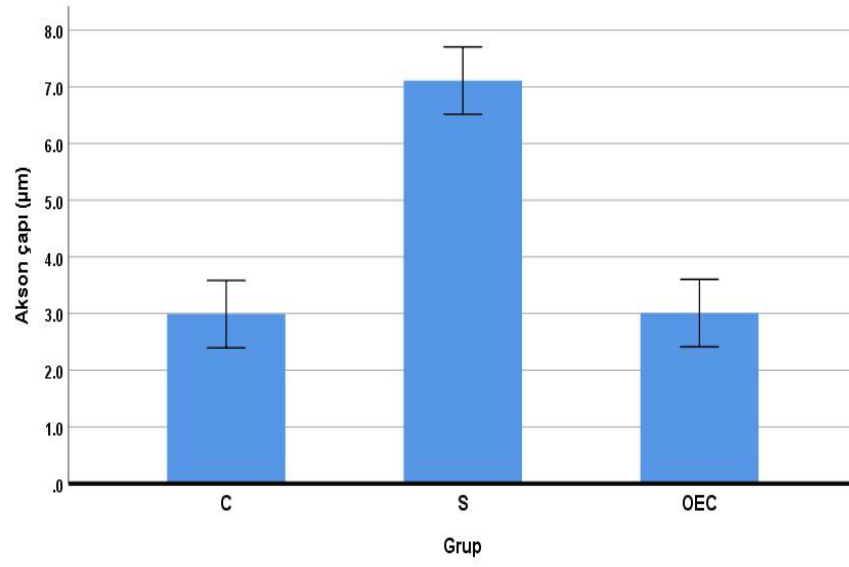
	Grup			p*
	C	S	OEC	
Akson çapı (µm)	2,99 ± 0,393	7,11 ± 1,131	3,01 ± 0,500	<0,001
Miyelin Kalınlığı (µm)	0,729 ± 0,1241	1,335 ± 0,1493	0,939 ± 0,0572	<0,001
Perinörium kalınlığı (µm)	3,53 ± 0,961	21,20 ± 1,188	13,09 ± 1,781	<0,001

*: Tek Yönlü Varyans Analizi

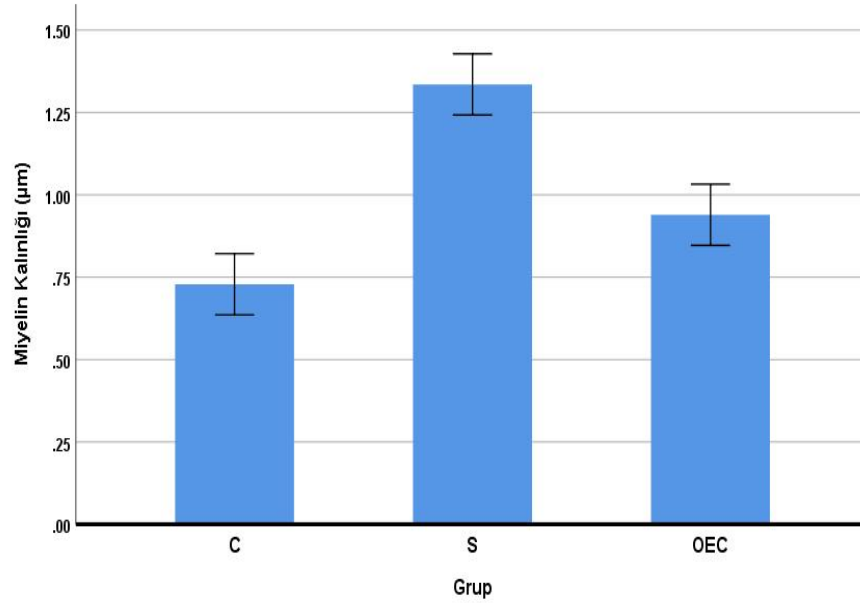
Bonferroni Testi

Tablo 4.6. C, S ve OEC grupları arasındaki akson çapı, miyelin kalınlığı ve perinörium kalınlığı (µm) ortalamalarının anlamlılık değeri.

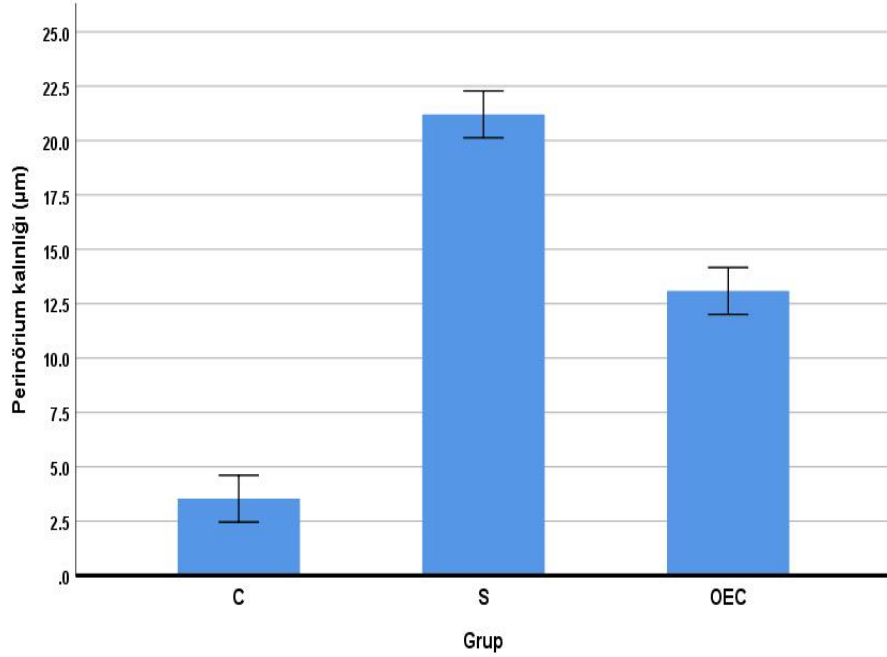
Akson çapı (µm)	S	<0,001	
Miyelin Kalınlığı (µm)		<0,001	
Perinörium kalınlığı (µm)		<0,001	
Akson çapı (µm)	OEC	1,000	<0,001
Miyelin Kalınlığı (µm)		<0,001	<0,001
Perinörium kalınlığı (µm)		<0,001	<0,001
	Grup	C	S



Şekil 4.11. Akson çapı hem C hem de OEC gruplarında en az olarak saptanmıştır. S grubunda ise kalınlaşma görülmüştür ($p<0,001$).



Şekil 4.12. Miyelin kalınlığı C grubunda en az olarak saptanmıştır. S grubunda ise bir kalınlaşma görüldü. OEC grubunda ise S grubuna kıyasla C grubuna görece daha yakın olduğu saptandı ($p<0,001$).

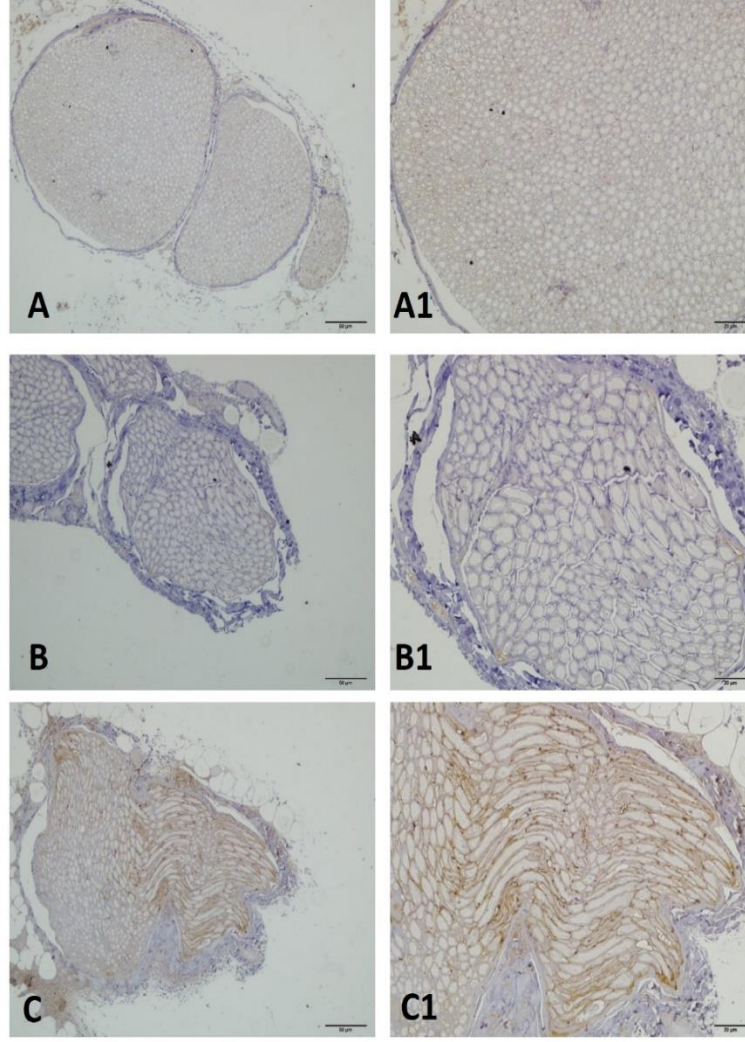


Şekil 4.13. Perinörium kalınlığının C grubunda en az olduğu saptandı. S grubunda ise katastrofik bir kalınlaşma görüldü. OEC grubunda ise S grubuna kıyasla kontrol grubuna görece daha yakın olduğu saptandı ($p<0,001$).

4.2.2.2.2. İmmünohistokimyasal Boyamalar

1. Anti- Nestin Boyama

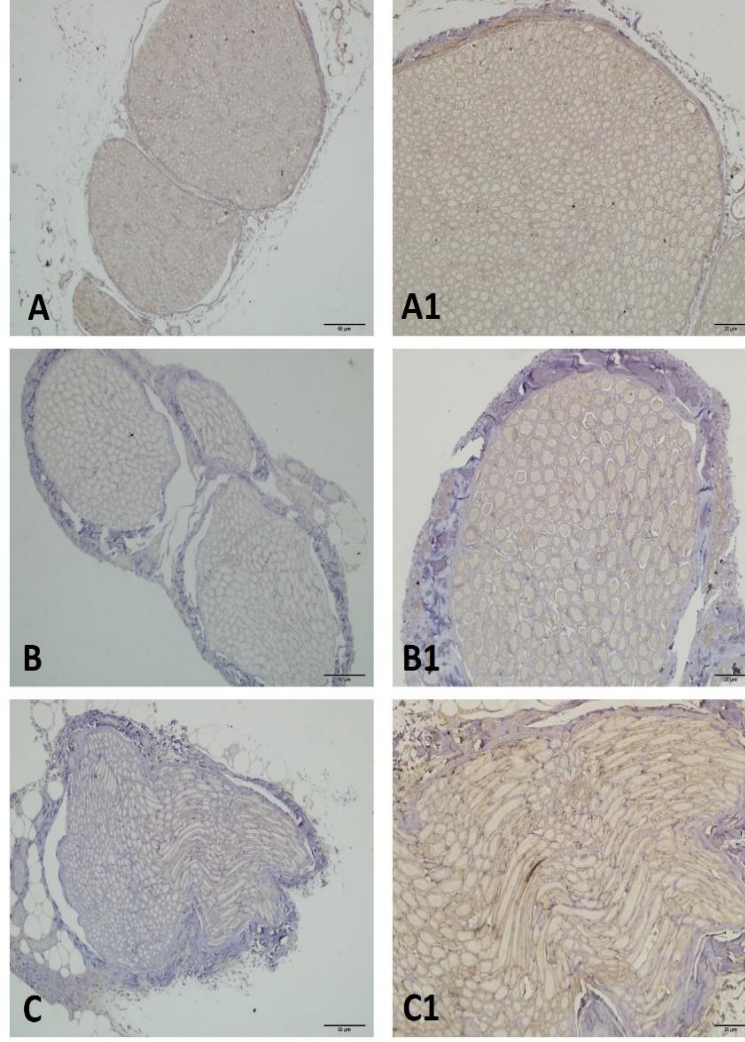
Kontrol ve deney grubunda Nestin immünreaktivitesi görülmemiştir. Fakat tedavi grubunda pozitif Nestin ekspresyonu gösteren hücre gövdeleri ve uzantıların varlığı saptandı. Bu da tedavi amaçlı femoral sinire injekte edilen OEC'lerin varlığına bağlandı. Kesitin sirküler geçen kısımlarında noktasal olarak görülen boyanmanın, uzunlamasına geçen kısımlarda miyelin halkalara eşlik eder nitelikte ve endonörium boyunca uzandıkları saptandı (**Şekil 4.14.**).



Şekil 4.14. Anti- Nestin Boyama. A) Kontrol, B) S ve C) OEC grupları (20X, 50 µm); 1) 40X, 20 µm.

2. Anti- p75NGF Boyama

p75NGF, bir yüzey glikoproteinidir ve tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve sinir dokusu ve diğer dokularda hücre proliferasyonu ve sağ kalımında rol oynar. p75NGF, çeşitli nörotrofinler için bir reseptördür ve apoptoz, hücre sağ kalımı, hücre döngüsü düzenlemesi, hücre göçü ve invazyonu ve progenitör farklılaşması ile ilgili çeşitli sinyal iletim yollarını uyarmaktadır. Yapılan immünohistokimyasal boyamada tüm gruplarda p75NGF ekspresyonu saptanmıştır. En yüksek ekspresyon tedavi grubunda görülürken kontrol ve deney grubunda belirgin bir değişim saptanmamıştır (Şekil 4.15.).

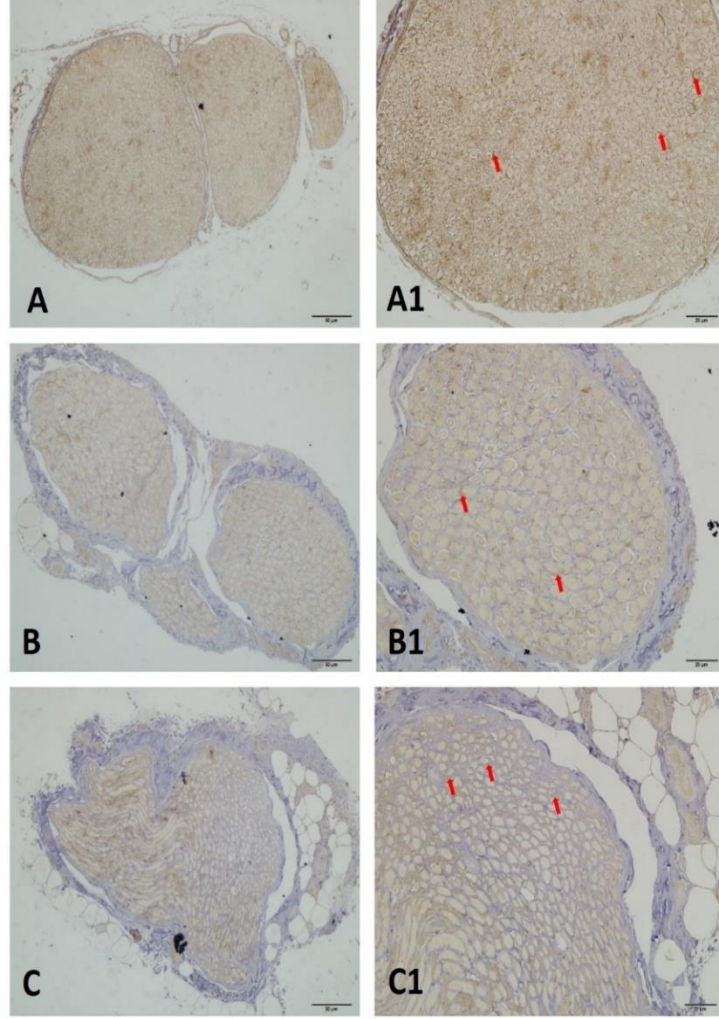


Şekil 4.15. Anti- p75NGF Boyama. A) Kontrol, B) S ve C) OEC grupları (20X, 50 μ m); 1) 40X, 20 μ m.

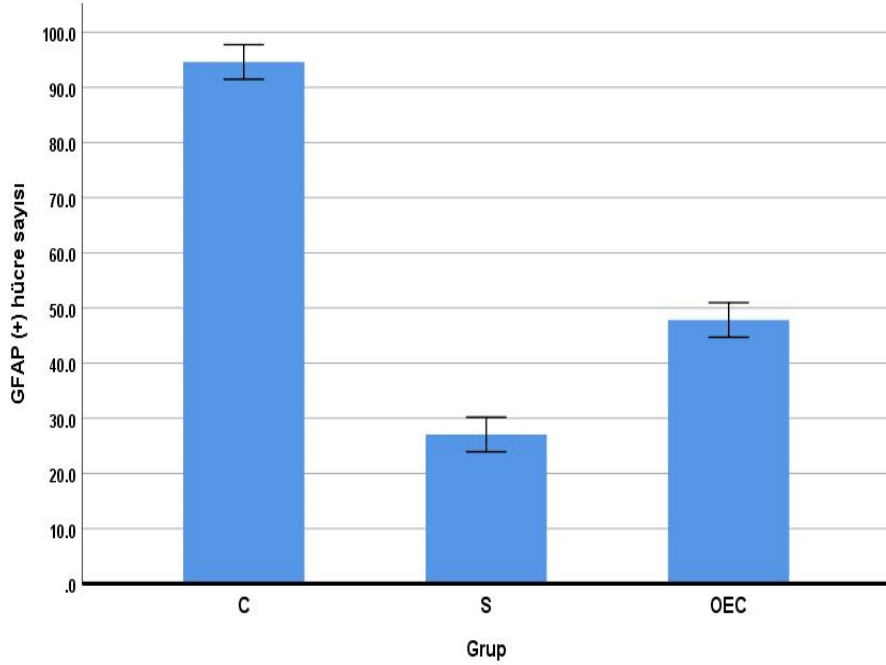
3. Anti- GFAP Boyama

Kontrol grubunda femoral sinire ait fasiküllerin santral ve periferik bölgede benzer GFAP immünreaktivitesi gözlenmektedir. Deney grubunda özellikle periferik bölgede miyelin halkalara rastlanmıştır. Yer yer santral bölgede düşük immünreaktivitede miyelin halkalarda reaksiyon saptanmıştır. Miyelinli halkalara eşlik eden SH'lerinin sitoplazmik kısımlarında hipertrofik görünüm özellikle orta ve küçük miyelin halkalarda yoğunlaştığı görüldü. Tedavi grubunda hipertrofik SH'lerin sayısında genel olarak azalma saptanmıştır. Genel olarak kontrol grubuna

benzer bir femoral sinir GFAP boyamasına yakın bir profil sergilediği görülmektedir (Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.).



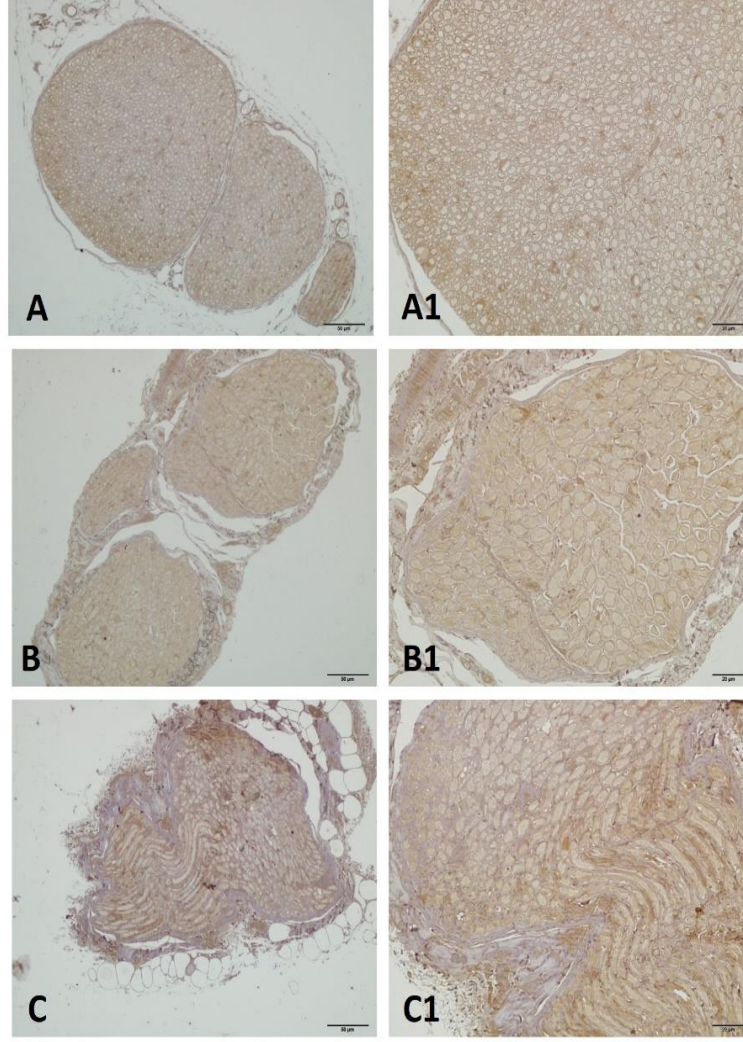
Şekil 4.16. Anti- GFAP Boyama. A) Kontrol, B) S ve C) OEC grupları (20X, 50 μ m); 1) 40X, 20 μ m.



Şekil 4.17. Yapılan tek yönlü varyans analizinde GFAP (+) hücre sayısı kontrol grubu için $94,6 \pm 3,64$, S grubu için $27,1 \pm 3,27$ ve OEC grubu için $47,8 \pm 4,78$ olarak saptanmıştır ($p < 0,001$). Bonferroni testinde ise OEC grubu hem kontrol hemde S grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişim olduğu saptanmıştır ($p < 0,001$).

4. Anti- CNTF Boyama

CNTF çeşitli nöronal hücre tipleri için bir hayatta kalma faktörüdür. CNTF, lökemi inhibitör faktörü (LIF), interlökin-6 (IL-6), IL-11, kardiyotrofin 1 (CT-1), kardiyotrofin benzeri sitokin (CLC), interlökin-27 (IL-27) ve onkostatın M (OSM) dâhil olmak üzere interlökin (IL)-6 tipi sitokin ailesinin bir üyesidir (**Şekil 4.18.**).



Şekil 4.18. Anti- CNTF Boyama. A) Kontrol, B) S ve C) OEC grupları (20X, 50 µm); 1) 40X, 20 µm.

Tüm deney gruplarında CNTF ekspresyonu saptanmıştır. En yüksek ekspresyon tedavi grubunda görülürken kontrol ve deney grubunda belirgin bir değişim saptanmamıştır.

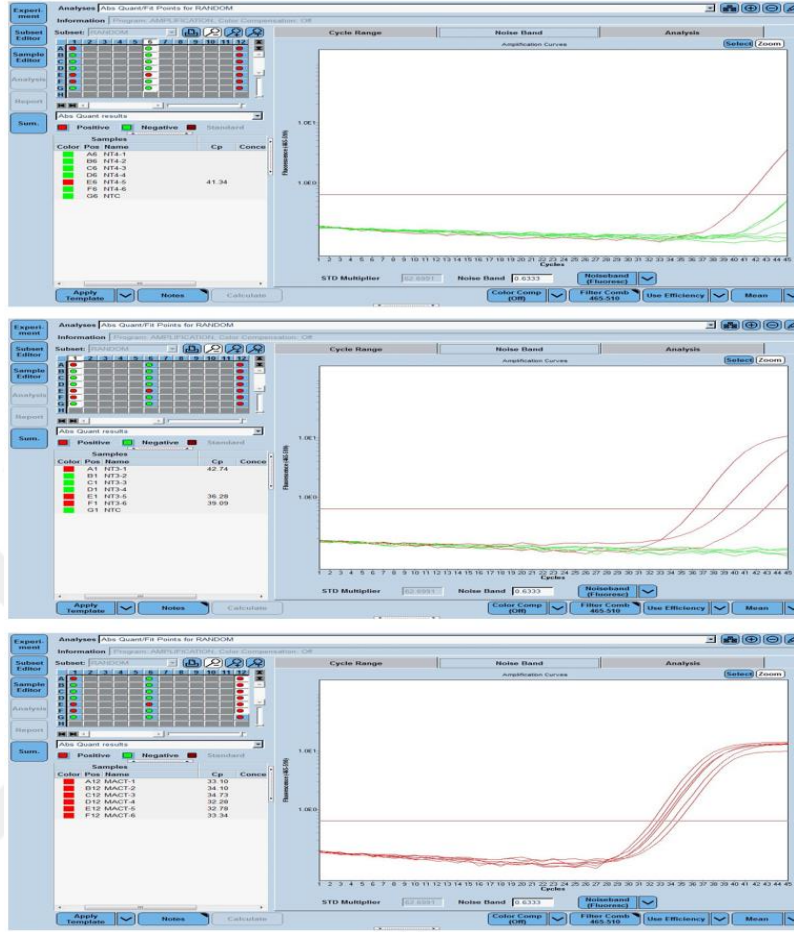
4.2.3. RT-qPCR Analizleri

OEC transplantasyonunun periferik sinirlerin rejenerasyonunu teşvik ettiği potansiyel mekanizmaları aydınlatmak için, OEC kaynaklı nörotrofik faktörlerin ekspresyonunun qPCR kullanılarak NT-3, NT-4, BDNF ve NGF ekspresyon ve kantitasyon seviyeleri ölçüldü. NT-3, NT-4, BDNF için mRNA ekspresyonu sadece OEC grubunda görülebilirken, C ve S gruplarında negatif ekspresyona sahiptir (**Tablo 4.7.**, **Şekil 4.19.** ve **Şekil 4.20.**). Öte yandan, NGF için mRNA

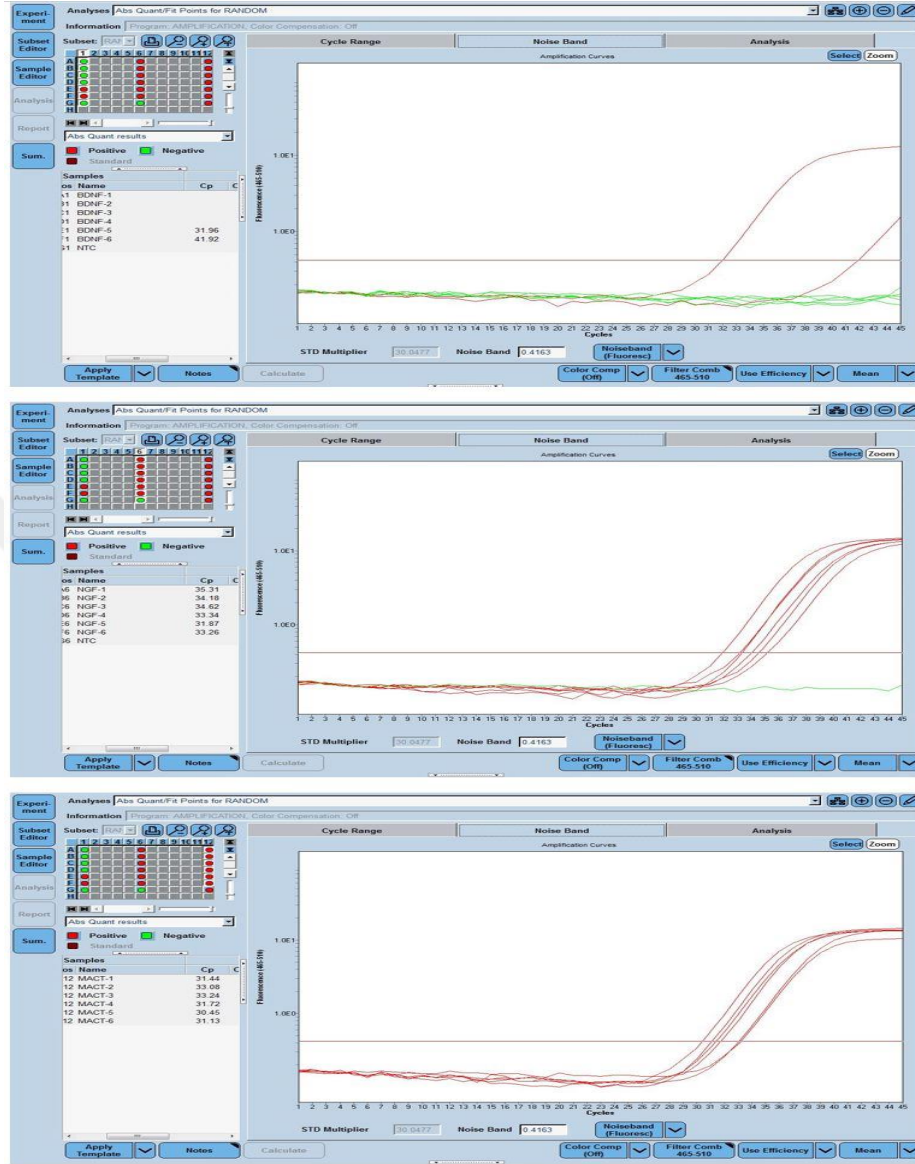
ekspresyonu 3 grupta görülebilir; OEC, S ve C grupları, OEC grubunda ekspresyonunda C ve S gruplarından daha fazla göreceli bir artış vardır (**Tablo 4.7.**, **Şekil 4.20.** ve **Şekil 4.21.**).

Tablo 4.7. OEC'ler kaynaklı nörotrofik faktörlerin ekspresyonunun qPCR kullanılarak kantitasyonu. C, S VE OEC gruplarında NT-3, NT-4, BDNF ve NGF nörotrofik faktörleri için mRNA ekspresyonu.

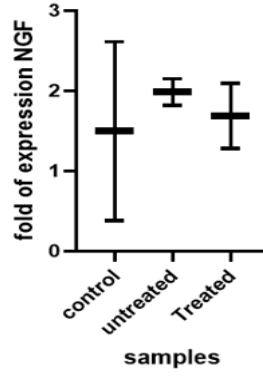
Nörotrofik Faktör				
Grup	NT-3	NT-4	BDNF	NGF
C	–	–	–	+
S	–	–	–	+
OEC	+	+	+	+



Şekil 4.19. OEC'ler kaynaklı nörotrofik faktör ekspresyonunun kantitasyonu. A) NT-4 ve B) NT-3 nörotrofik faktörler için mRNA ekspresyonu qPCR kullanılarak ölçülmüştür. Nörotrofik faktör ekspresyonu MACT'inkine (C) normalize edilmiştir.



Şekil 4.20. OEC'ler kaynaklı nörotrofik faktör ekspresyonunun kantitasyonu. A) BDNF ve B) NGF nörotrofik faktörler için mRNA ekspresyonu qPCR kullanılarak ölçülmüştür. Nörotrofik faktör ekspresyonu MACT'ınkine (C) normalize edilmiştir.



Şekil 4.21. OEC kaynaklı NGF nörotrofik faktör ekspresyonunun kantitasyonu. Nörotrofik faktör NGF için mRNA ekspresyonu qPCR kullanılarak ölçülmüştür. Nörotrofik faktör ekspresyonu MACT'inkine normalize edilmiştir. OEC, S ve C gruplarının NGF ekspresyonu için rölatif kat değişiklikleri (ortalama + SD) sırasıyla 1,99 + -0,49, 1,69 + -0,19 ve 1,69 + 0,30 idi. OEC grubu ile C/S gruplarının ortalama + SD değerleri arasındaki fark anlamlıydı ($P < 0.005$, Tukey's Multiple comparison test).

5. Tartışma

Periferik sinir rejenerasyonu, immün hücreler, Schwann hücreleri (SH) ve nöronlar ile kimyasallar arasındaki etkileşimler tarafından düzenlenir. PNS ve MSS'nin her ikisinin de doğuştan gelen sınırlı bir rejenerasyon eksikliğine sahip olduğu bilinmektedir; tek fark, PSS hasarı sonrası, rejeneratif aksonlar oluşturabilen büyüme fenotipik değişiklikleri sergilediği bilinen nöronlardır. Bu süreç, makrofajların ve SH'lerin miyelinizasyonun yanı sıra fagositoz, temizleme ve büyüme faktörleri ile kemokinleri üretimi ile meydana gelir (L. P. Zhang ve ark., 2023; W. jun Zhang, Wu ve Liu, 2023). Aksonal dejenerasyon, sinir inflamasyonu ve demiyelinizasyon PSY'nin iyileşmesi ve rejenerasyonunun önündeki başlıca engellerdir. Sonuç olarak, PSY iyileşmesine yardımcı olan aksonlar, öncelikle konakçı hasarının distal ucundaki aksonlarla yeni bir sinir bağlantısı oluşturarak yeni bir sinir ağı oluşturmak için rejenerasyonu yönlendirir. Sinir hasarını iyileştirmek amacıyla, bu patolojik süreçleri değiştirmek ve olumlu bir şekilde ilerlemek için pratik yöntemleri araştırmak ve tanımlamak gerekir. Mikrocerrahi tekniklerdeki ilerlemelere ve sinir rejenerasyonu konusundaki artan bilgimize rağmen PSY'nin onarımı hala bazı zorluklarla karşı karşıyadır (Kubiak ve ark., 2020). Giderek daha fazla araştırma, prosedürün PSY'yi etkili bir şekilde iyileştirebileceğini gösterdiğinden, insanlar hücre nakli tedavisinin geniş kapsamlı uygulamaları ve potansiyelini araştırmaya teşvik edilmektedir. Önceki raporlar, çeşitli multipotent kök hücre türlerinin transekte edilmiş periferik sinirlere topikal enjeksiyonunu tanımlamıştır. Periferik sinir rejenerasyonu için topikal bir hücre tedavisi formunda kök hücre progenitörlerinden ve kemik iliği stromal hücrelerinden farklı nörall krest hücrelerinin kullanımıdır (Chatzistamatiou ve ark., 2014; C. J. Chen ve ark., 2007; Dezawa, Takahashi, Esaki, Takano ve Sawada, 2001). Bununla birlikte, hayvan modellerinde elde edilen sonuçlar farklı derecelerde başarı göstermiştir ve farklı hücre kaynaklarını elde etmek kolay olmayabilir.

Prenatal olgunlaşmamış OEC'ler, erken embriyonik gelişim sırasında olfaktörük plakodu telensefalik vezikülden ayıran mezenşime girdikten sonra NCAM ve L1 hücre adezyon moleküllerini eksprese eder (Miragall, Kadmon, & Schachner, 1989). Bu, OEC'lerin, olfaktörük epitelinden gelişmekte olan OB'a, aksonların büyümesi için yapışkan bir yüzey olarak işlev görmesine yardımcı olurlar (R. Doucette, 1993). Ek olarak, bu OEC'ler beyin-yag asidi bağlayıcı proteini (B-FABP) (Kurtz ve diğerleri, 1994), diazepam bağlanma inhibitörünü (Yanase, Shimizu, Yamada, & Iwanaga, 2002) ve p75NGF'yi (Gong ve diğerleri, 1994) eksprese etmeye başlar.

OEC'ler doğum sonrası, GFAP ve konneksin 43 (Cx43) eksprese etmektedir (sıçan ve fareler); bununla birlikte, OEC'ler herhangi bir yaştaki farelerde *in vivo* olarak Cx26 veya Cx32 eksprese etmezler (Miragall, Hwang, Traub, Hertzberg, & Dermietzel, 1992). Astrositler ayrıca Cx43'ü de eksprese ettiğinden, boşluk bağlantılarının SLT'deki OEC'ler ve astrositler arasında bir iletişim yöntemi olması mümkündür. Ek olarak, OEC'ler PSS'ye özgü miyelin proteini Po1 (Kolatsi-Joannou ve diğerleri, 2001) ve proteolipid proteinin MSS'ye özgü izoformu olan DM-20'yi (Griffiths, Dickinson, & Montague, 1995) eksprese eder. OEC'ler ayrıca L-serin üretiminde yer alan önemli bir enzim olan 3-fosfoglisarat dehidrojenazı da eksprese eder (Yamasaki ve diğerleri, 2001). Proteaz neksin-1 (PN-1) aynı şekilde OB'nin sinir lifleri tabakasındaki OEC'ler ve astrositler tarafından eksprese edilir, ancak MSS'nin diğer kısımlarındaki astrositler tarafından eksprese edilmez (Reinhard, Meier, Halfter, Rovelli ve Monard, 1988; Scotti, Hoffmann, & Nitsch, 1994). OEC'lerin çoğunda p75NGF down regüle edilir (Gong ve diğerleri, 1994). Bununla birlikte, bazı OEC'ler, özellikle OB'nin glial sınırlayıcı membranlarını oluşturmaya yardımcı olanlarda plazma membranlarının bazal lamina ile uyumlu kısımları bunca p75NGF'yi eksprese etmeye devam eder (Vickland, Westrum, Kott, Patterson, & Bothwell, 1991). Ayrıca, doğum sonrası gelişimin erken aşamalarında, OEC'ler, MSS'de olmayan, sıkı bağlantı proteini zonula occludens-1 (ZO-1) nöral proteini üretmeye başlar (Miragall, Krause, De Vries, & Dermietzel, 1994).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda GFAP, p75NGF gibi OEC ile ilişkili belirteçler immünokimyasal olarak gösterilmiştir.

Hem MSS ve hem de PSS'nin bir parçası olan OB'un en dış tabakası ve olfaktörük mukozanın lamina propriasında bulunan OEC'ler her iki sinir sistemindeki bozukluklarını tedavisinde kullanma olasılığındadır. OEC'ler *in vitro* olarak başarıyla büyütülebilir, bu da doku onarımı ve sinir rejenerasyonunda araştırmalar için zemin sağlar (Guerout ve ark., 2014). OB ve mukozadan kaynaklanan OEC'lerin daha belirgin özelliklere sahip olduğunu, heterojenlik sergilediği ve sinir hasarının iyileşmesinde farklı şekillerde işlev gördüğünü belirtmek önemlidir (Guérout ve diğerleri, 2010; Liu ve diğerleri, 2023). OM'den üretilen OEC'ler rejenerasyon için sınırlı kapasiteye sahiptir, ancak hücre dışı matriks üretimi ve inflamatuvar yanıtı kontrol edebilirler. Bununla birlikte, odaklanmış aksonal rejenerasyona neden olarak, OB'den üretilen OEC'ler fonksiyonel iyileşmeye yardımcı olabilir (Paviot ve diğerleri, 2011). OB'den kaynaklanan OEC'ler, sinir rejenerasyonu, akson rejenerasyonu ve ekstansiyonu, sinir impuls iletimi ve aksonal hasar

yanıtı için gerekli olan farklı şekilde ifade edilen genlere ve proteinlere sahiptir. OM'den üretilen OEC'ler, esas olarak hücre motilitesi, sitokin bağlanması, savunma yanıtı, inflamatuvar yanıt ve yara iyileşmesinin pozitif düzenlenmesinde rol nayan farklı şekilde eksprese edilen genlere ve proteinlere sahiptir (Lan ve diğerleri, 2022). Tüm bunlar, çeşitli bölgelerden kaynaklanan OEC'lerin işlevsel olarak nasıl farklılaştığını göstermektedir. OEC'ler, ister akut ister kronik olsun, MSS yaralanmalarını iyileştirme potansiyelleri açısından son zamanlarda incelenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi, OEC'lerin yönetiminde çok önemli olabileceği görülmektedir (García-Alías ve diğerleri, 2004; Rubèn López-Vales, Forés, Verdú, & Navarro, 2006; Rubén López-Vales, García-Alías, Forés, Navarro, & Verdú, 2004; Ramón-Cueto ve diğerleri, 2000). Tipik olarak, MSS mikro çevresi üzerinde önemli bir olumsuz etkiye sahiptir, bu da hücre ölümünü artırmanın yanı sıra inflamasyon ve hipoksi gibi bir dizi süreçle sonuçlanabilir (Rossignol, Schwab, Schwartz, & Fehlings, 2007). OEC'ler, hasarlı nöronları onarma yeteneklerinde avantajlı kılan bir dizi niteliğe sahiptir. Hasardan sonra ortaya çıkan inflamatuvar reaksiyonu azaltma yeteneğine sahiptirler, bu da glial skar oluşumunu azaltır ve anjiyogenezi teşvik eder. Ayrıca, akson rejenerasyonunu, plastisiteyi ve remiyelinizasyonu teşvik ederler (Andrews ve Stelzner, 2007; Gómez ve ark., 2018; Ramer ve diğerleri, 2004). OEC'ler ayrıca yerleşik hücre popülasyonlarıyla, özellikle meningeal ve astrosit hücreleriyle, ya skar oluşuktan sonra ya da glial skar gelişimi sırasında etkileşime girebilir (Franssen, Roet, de Bree, & Verhaagen, 2009; Y. Li, Li, & Raisman, 2005). Böylece, OEC'ler astrositik reaktiviteyi azaltabilir ve penetran glial dokuya ek olarak hücre dışı matriks proteazlar oluşturabilir. Tüm bunlar göz önüne alındığında, bu nitelikler glial skarların gelişimini ve ardından gelen tüm kısıtlamaları azaltabilir, bu da aksonal rejenerasyonu ve hasar köprülemesini ciddi şekilde kısıtlar (Pastrana ve diğerleri, 2006). OEC transplante edildiği hayvan modellerinde akson rejenerasyonunu ve yayılmasını teşvik etmede umut vaat etmektedir (García-Alías ve diğerleri, 2004; Rubèn López-Vales ve diğerleri, 2006; Lu ve diğerleri, 2002). Özellikle OEC transplantasyonu, OH'sından kaynaklı nöropatik ağrıyı azaltır ve sensorimotor ve otonomik sinir rejenerasyonunu artırır. OEC'lerin sentezlediği çok sayıda nörotrofik faktör, hasarlı aksonların yenilenmesine elverişli bir ortamın yaratılmasını sağlar (Gómez ve ark., 2018). Ramon-Cueto ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, omurilikleri hasarlanan ve daha sonra OEC nakli yapılan yetişkin sıçanlar hem yapısal hem de fonksiyonel olarak iyileşme göstermiştir. Nakil sonrası fareler, ameliyattan sonraki üç ila yedi ay arasında duyuşsal reflekslerde ve lokomotor becerilerde iyileşmeler göstermiştir (Ramón-Cueto ve diğerleri, 2000). Ayrıca nakil sonrası

iyileşmeleri göstermek için elektrofizyolojik deneyler de yapılmış, bu da OEC nakledilen farelerin sadece aksiyon potansiyellerinin veya uyarılmış potansiyellerin geri kazanımını göstermekle kalmayıp, aynı zamanda işlevsel olarak da geri kazanıldığını göstermiştir (Imaizumi ve diğerleri, 2000; Toft, Scott, Barnett ve Riddell, 2007). OEC transplantasyonu ile ilgili insan klinik çalışmaları da dünya çapında çok sayıda ülkede yapılmıştır. OEC transplantasyonunun tamamlanmış klinik çalışmalarla güvenli ve etkili olduğu gösterilmiştir; Bununla birlikte, hasta iyileşmesi bazen biraz çeşitlidir. Transplantasyon prosedürleri, hücre saflığı ve işleyen ve ana hücre bankaları oluşturmadaki zorluklar dâhil olmak üzere çok sayıda faktör bu değişkenliğe bağlanabilir. Toplam 1.266 hasta, fonksiyonel bağımsız ölçüm (FIM) skorunu yükseltmek için çeşitli hücre bazlı tedavileri inceleyen 44 nitelikli çalışma yapılmıştır. Bunlar arasında, OEC transplantasyonu, altı ayda FIM skorunu düşürerek hastalık prognozunu iyileştirmede umut vaat etmektedir (X. Xu ve ark., 2022). PSY'da rejenerasyon süreci bağışıklık hücreleri, SH'ler ve nöronlar dâhil olmak üzere birden fazla hücre tarafından düzenlenen dinamik bir süreçtir. *In vivo* araştırmalara göre, OEC transplantasyonu, tekrarlayan laringeal sinir yaralanması vakalarında laringeal kas fonksiyonunu verimli bir şekilde geliştirir ve akson rejenerasyonunu uyarır (Guerout ve ark., 2014). OEC'ler, *in vivo* araştırmalara göre, rejenere aksonal miyelin kılıfının Ranvier düğümlerini oluşturur, sinir iletim hızını artırır ve hasarlı SS'e nakledildiğinde işlevi iyileştirebilir (Radtke ve diğerleri, 2009).

OEC'ler, düşük immünojenisitetleri nedeniyle sinir rejenerasyonunu teşvik etmek için potansiyel olarak klinik açıdan yararlı bir hücre tedavisi türüdür. OEC'ler hem olfaktör bulbusta hem de olfaktörük mukozada mevcut olduğundan, güçleri ve erişilebilirlikleri onları bir hücre bankası için ideal bir kaynak haline getirmektedir. Aslında, OEC'lerin sıçanlarda kesilmiş periferik sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerini araştıran çalışmamızda sinir rejenerasyonu için 450.000 kadar az OEC'ye ihtiyaç olduğunu gösterildi, bu da onları diğer MSC formlarından nispeten daha etkili kılmaktadır. Bu nedenle, OEC'ler yalnızca periferik sinir rejenerasyonunu ve iyileşmesini teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda allograft sağkalımını sağlayan immünomodülatör etkilere de sahiptir, ayrıca tümörleri çok nadirdir (Murtaza ve ark., 2019; Windus ve ark., 2011, 2010). OEC'ler topikal olarak uygulandığında, hücreleri etkilenen bölgeye lokal olarak ileterek uzun süreli terapötik etkilere bile sahip olabilirler. Uzunların veya yüzlerin benzer şekilde değiştirilmesine yönelik mevcut yaklaşımda iki sorun devam etmektedir: allograft reddi ve vaskülarize kompozit tüm transplantasyonda sinir rejenerasyonu. Örneğin, reddetme sorununu

özmenin yanı sıra, nakledilen bir uzvun kullanılabilir olması için işlevsel bir iyileşmenin sağlanması gerekir. Bu nedenle, nakledilen uzuvların işlevinin artırılması periferik sinir iyileşmesine bağlıdır. OEC tedavilerinin yerel olarak uygulanması, işlevsel allotransplante uzuvda periferik sinir rejenerasyonunun uyarılması için umut vaat edebilir.

Bu tez çalışmasında, miks (sensorimotor) bir periferik sinir olan femoral sinirde transeksiyon işlemi sonrası OEC'lerin transplantasyonunu inceleyen ilk çalışmadır. Femoral sinir, lomber pleksustan köken alan ve insanda alt ekstremitayı veya hayvanlarda arka ekstremitayı innerve etmek için aşağı inen ikinci en büyük sinirdir. Bu çalışma, OEC tedavisi femoral siniri hasarlanan ve dikişle hemen onarılan sıçanlarda iyi rejenere olmuş periferik sinirin korunması ve güçlendirilmesi üzerinde önemli immünomodülatör ve rejeneratif etkileri olabileceğini göstermiştir. OEC grubu beş parmak yayılma mesafesinin işlevsel olarak korunduğunu gösterirken, S grubunda bu durum gözlenmemiştir. Ayrıca, femoral fonksiyonlar OEC grubunda S grubuna kıyasla çok daha iyi biçimde geri dönmüştür. OEC grubunda lokalize ya da sistemik yan etki görülmemiştir. Ameliyat sonrası 4. haftada, hücre nakledilen sıçanlarda yaralanma bölgesinde gözle görülür, agresif veya aşırı miktarda iltihap hücresi bulunmamıştır. Ayrıca, S grubunun derisinde yara iyileşmesi gecikmiş ve kötü bir iyileşme gösteren kesik bölgesine sahip olduğu görüldü. OEC nakledilen grupta ise operasyon bölgesinin iyileştiği bir skar dokusu yada enfeksiyon benzeri bir bulgu göstermediği saptandı.

Bazı ilaçlar terapötik amaçla kullanıldığında hastalıkların seyrini yavaşlatabilmesine rağmen, nörolojik hastalıkları tedavi etmek için yeni ilaçlara ve tedavilere acil ihtiyaç mevcuttur. Hekimler, hastalar ve aileleri, şu anda neredeyse tedavi edilemez olan nörolojik bozuklukları tedavi etmek için etkili ilaçların geliştirilmesini beklemektedirler. Yeni ilaçların geliştirilme süreci zor ve maliyetlidir. Bu nedenle, beyin fonksiyonlarını eski haline getirmek ve semptomları hafifletmek için potansiyel terapötik yaklaşımları belirlemek ve araştırmak zorunludur (LP Zhang, Liao, Liu, Luo, & Zhang, 2023). Alternatif olarak, nörodejeneratif hastalıkların (Lo Furno, Mannino, & Giuffrida, 2018) ve MSS travmalarının (Golchin, Shams, Kangari, Azari, & Hosseinzadeh, 2020; Mannino, Cristaldi ve diğerleri, 2021; Mannino, Russo ve diğerleri, 2021), hasarlı hücrelerin, dokuların ve organların restorasyonu, yeniden büyümesi veya değiştirilmesine odaklanan hücre bazlı tedavilerin kullanımı popüler bir konu haline gelmiştir. Ayrıca, OEC greftleri gibi hücre bazlı yöntemlerin OH modellerinde iyileştirici etkileri literatüre girmiştir. Ayrıca akson rejenerasyonu ve remiyelinizasyonu, nöroprotektif mekanizmalara ek olarak gösterilmiştir, bu da duyuusal ve

lokomotor işlevlerde kayda değer bir iyileşme olarak sonuçlanmıştır (Lu, Féron, Mackay-Sim, & Waite, 2002; Menezes ve ark., 2014; Pearse ve diğerleri, 2007). Nörolojik hastalıkların tedavisinde nöroproteksiyon, immünolojik modülasyon, akson rejenerasyonu, sinir hasarları mikroçevrenin güçlendirilmesi ve salgılanan biyoaktif faktörleri de içeren miyelin rejenerasyonu OEC'lerin fonksiyonel mekanizmaları arasındadır. Sonuç olarak, OEC'lerin fonksiyonel iyileşmeyi kolaylaştırma mekanizmasını anlamının yanı sıra bu tedavilerin kullanımını ve sinir hasarından kaynaklanan hastalıkların etkili modellemesini belirlemek çok önemlidir (LP Zhang ve diğerleri, 2023). Bu nedenle OEC transplantasyonu, enkaz temizleme aktivitesi, büyümeyi teşvik edici faktör üretimi ve anti-nöroinflamasyonu içeren özel nitelikleri nedeniyle sinir sistemi yaralanmaları ve bozuklukları için olası bir tedavi yaklaşımı olarak önerilmektedir.

Bu çalışmada sıçanlarda femoral sinirde parsiyel transeksiyon sinir modeli uygulanmıştır akut olarak OEC transplantasyonu yapılmıştır.

Literatürde transekte edilmiş SS modelinde OEC'lerin nakledildiği ve ameliyattan bir ay sonra gelişmiş motor fonksiyonların geri geldiğini gösteren tek bir yayın mevcuttur (de Medinaceli et al., 1982). Bu tez çalışmasında Five-Toe Spread testinde C grubunda normal ayak parmağı yayılımı göstermiştir, nakil yapılan (OEC) grupta ayak parmağı yayılması her hafta iyileşme gösterirken S grubu ayak parmağı yayılma parametrelerinde ise sürekli olarak bozukluklar görülmüştür. Grid walking testinde, ayak hata indeksi OEC grubunda S grubuna kıyasla zaman içinde belirgin bir şekilde azalırken, C grubu 3 farklı gündeki ölçümler aynı kalmıştır. Foot print testinde ise C grubunda anlamlı bir fark görülmezken, OEC grubunda femoral fonksiyon indeksinde zamanla daha yüksek değerlere sahip olan S grubuna kıyasla zamanla anlamlı bir iyileşme görülmüştür. Femoral Fonksiyon İndeksi lokomotor fonksiyonun restorasyonunu değerlendirmek için kullanılır. Transplantasyondan dört hafta sonra, OEC grubunun femoral fonksiyon indeksi mevcut çalışmada S grubununkinden daha yüksek olarak ölçüldü.

Literatürde femoral siniri hasarında histopatolojik değerlendirilmenin yapıldığı az sayıda literatür mevcuttur bunlardan bir tanesi 2020 yılına aittir (Wei ve ark., 2020). Bu tez çalışması kapsamında yapılan histopatolojik değerlendirmede S grubunda perinöriumda kalınlaşma, endonöriumda artış, aksonal ödem, miyelinlerde silinme dejenerasyon, çeşitli konformasyon bozuklukları ve ayrışma görüldü. OEC grubunda perinöriumun C grubuna benzer olduğu, aksonal ödemin minimale düştüğü, miyelin halkalarda dejenerasyonun durduğu saptandı. Tüm gruplarda akson çapı, miyelin

ve perinörium kalınlıkları ölçölüp istatistiksel olarak değerdendirildi. İmmünohistokimyasal olarak Nestin ekspresyonu sadece OEC grubunda görüldü. p75NGF ekspresyonunun en fazla OEC grubunda olduğu görüldü. GFAP boyamada en az GFAP pozitif hücrenin S grubunda olduğu görüldü. CNTF boyamada en yüksek ekspresyonun OEC grubunda olduğu görüldü.

OEC'ler, daha önce biyolojik özellikleri altında tartışıldığı gibi, nörotrofik faktörlerin salgılanması, nöronal koruma, inflamatuvar yanıtın inhibisyonu ve aksonal rejenerasyonu arttırması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla sinir rejenerasyonunu teşvik eder (Delarue ve Guérout, 2022; Yang ve ark., 2015). Köprüleme işlevi oluşturmak ve sinir hasarının her iki ucuna ulaşmak için OEC'ler hasarlı ortam üzerinden yeni aksonların oluşumunu yönlendirebilir. Dahası, nakledilen OEC'ler glial skarın içinden geçip nüfuz edebilir (Radtke & Kocsis, 2012; Radtke, Wewetzer, Reimers, & Vogt, 2011). OEC'lerin NGF, BDNF ve CNTF gibi büyüme faktörleri sağladığı (Wewetzer, Grothe ve Claus, 2001) ve bu trofik molekülleri çevreleriyle iletişim kurmak için kullandıkları bilinmektedir (Boruch ve ark., 2001). Boruch ve arkadaşları (2001) kültüre edilen OEC'lerin ve ortamlarının NT-4, NT-5 ve nöroregulinleri ifade ettiğini gözlemlemiştir. Ancak, OEC'lerde NT-3 ve CNTF'nin ne *in vivo* ne de *in vitro* ekspresyonu görülmemiştir. OEC'ler ve salgıladıkları maddeler beyin plastisitesini ve fonksiyonel onarımı desteklemektedir (Boruch ve ark., 2001). Ardından, Lipson ve arkadaşları (2003) NGF, BDNF, GDNF ve CNTF mRNA'sının sıçan OEC'leri tarafından ifade edildiğini, NT-3 ve NT-4 mRNA'sının ise ifade edilmediğini ortaya koymuştur (Lipson ve ark., 2003). Ancak bir başka çalışma yenidoğan farelerdeki OEC'lerin NGF, BDNF, NT-3 mRNA'sını ifade edebildiğini ancak NT-4'ü ifade edemediğini göstermiştir (ZHAO ve ark., 2008). Daha yeni bir çalışmada, OEC'leri sıçan NT-3 geni ile transfekte etmek için retroviral bir yöntem kullanılarak OH üzerinde modifiye edilmiş sıçan NT-3 genine sahip OEC'lerin nakledilmesinin potansiyel terapötik faydası araştırılmıştır (Yu-Hai ve ark., 2010). Bu çalışmada, olfaktör ensheathing glia hücrelerinin (OEC) nöral hücreler için en iyi nöroprotektanlardan biri olan BDNF'yi eksprese ettiği kanıtlanmıştır. Ayrıca, sıçanların nakledilen OEC'ler CNTF, sadece NT-4 değil aynı zamanda NT-3 ekspresyonu da göstermiştir. Sonuç olarak, aksonal rejenerasyon hızlandırılabilir ve BDNF, NGF, NT-3 ve NT-4 gibi nörotrofik faktörlerin salınmasıyla tetiklenebilir, bu da daha hızlı nöron iyileşmesine yardımcı olabilir. OEC ile nakil yapılmayan grup karşılaştırıldığında, NT-3, NT-4 ve BDNF nörotrofik faktörleri için pozitif ve yüksek düzeyde mRNA ekspresyonu gözlenmiştir. Bu büyüme faktörleri sınıfının kemoatraktan bir mekanizma aracılığıyla yeni aksonların ve sinapsların büyümesini ve farklılaşmasını teşvik

ettiği gösterilmiştir (Zhu, Sun ve Liu, 2012). Beyin hücrelerini etkiler ve hayatta kalmalarına yardımcı olurlar. OEC'lerin, bu büyüme faktörlerinin ekspresyonundaki kayda değer artış nedeniyle periferik sinir rejenerasyonunu desteklemek için özellikle uygun olması mümkündür. Bu tezde, transekte edilmiş sıçan femoral sinirlerine nakledildikten dört hafta sonra, topikal olarak uygulanan OEC'ler iyi sinir rejenerasyon özellikleri göstermiştir. OEC grubu, transekte edilen femoral sinirde daha fazla fonksiyonel iyileşme ve NT-3, NT-4 ve BDNF için mRNA'nın pozitif ekspresyonunu gösterirken; bunun aksine, S grubu aynı genler için mRNA'nın negatif ekspresyonunun belirtilerini göstermiştir. OEC grubunda oldukça yüksek düzeyde mRNA nörotrofik faktör ekspresyonu ile sonuçlansa bile, diğer S ve C gruplarında gerçekten etkisini gösteren mRNA'nın protein düzeylerine çevrilmemesi bunun nedeni olabilir. Ayrıca, OEC'nin nörotrofik faktör ekspresyonu dışındaki çeşitli ek değişkenler de periferik sinirlerin klinik iyileşmesi üzerinde etkili olabilir.

OEC'ler depolanabilir (biyobanka) ve burun mukozasının koku alma bölgesinden kolayca çıkarılabilir. Hücre canlılığının korunması ve hücre tedavisi için bir hücre bankası oluşturulması büyük ölçüde immünojenisite seviyelerine bağlıdır. OEC'lerin immünomodülatör etki gösterdiği ve yaralanma bölgesine göç edebildikleri gösterilmiştir (Weng ve ark., 2019). Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, beyin nakli sırasında OEC'lerin immünomodülatör nitelikleri incelenmiştir. Khankan ve arkadaşları, omurilik transeksiyonu ve OEC ile tedavi edilen greftleme bölgesinde iki hafta sonra, belirgin şekilde azalmış mikroglial aktivasyon sergilediğini keşfetmiştir (Khankan ve ark., 2016). Bu çalışmada, OEC'lerin femoral sinirin transekte edilmiş hasarlı alans göç ettiği kanıtlanmıştır ve bu durum GFAP, pNTR ve Nestin ekspresyonları ile gösterilmiştir.

Belirli durumlarda, akut sinir hasarı, hastanın kendi hücrelerinin otolog nakil için çıkarılması ve işlenmesi ile kurtarılabilir. OEC'ler düşük immünojeniteleri nedeniyle bir kişiden diğerine de aktarılabilir; sonuç olarak bir hücre bankası oluşturulabilir ve gerektiğinde kullanılabilir. Bu, klinik uygulama için daha basit bir yaklaşım olabilir ve OEC'nin kolay erişilebilir bir allojenik hücre bankası olarak kullanılabilmesini sağlayabilecektir. OEC hücre tedavisi için kolayca kullanılacak bir allojenik hücre bankası oluşturulup ve klinik uygulama için saklanabilme potansiyeli mevcuttur. Ayrıca, OEC'lerin periferik sinirlerin rejenerasyonuna yardımcı olabilecek Schwann benzeri hücrelere dönüşebildiği gösterilmiştir (Ramon-Cueto ve Avila, 1998).

Bu tez çalışmasında, OEC transplantasyonunun sinir fonksiyonunu geliştirdiğini ve femoral sinir rejenerasyonunu teşvik ettiğini gösterilmiştir. Ayrıca, OEC transplantasyonu ile iyileşen PSY mekanizmasının NT-3, NT-4, BDNF ve NGF ekspresyonunu yukarı yönlü düzenleyeceği öngörülmüştür. OEC transplantasyonu, klinik çalışmalarda kullanılması sonucunda daha iyi terapötik sonuçlara ve gelişmiş PSY için yeni tedavi protokollerin oluşturulmasına yol açabileceği düşünülmektedir.

6. Sonuç ve Öneriler

- 1- Femoral sinir hasarlanmanın en büyük nedenlerinden olan periferik nöropatinin küresel prevalansını %2 ile %7 arasında değişmektedir. Yaşlanan toplumlarda periferik nöropatiye, trafik kazaları ve pek çok sebep nedeniyle prevalans artışı olağan görünmektedir. Femoral sinir özelinde yapılan bu çalışmanın diğer periferik sinirlerde de yapılması gerektiği düşünülmektedir.
2. Bu deneysel çalışmada femoral sinir hasarı yapılmış ve olfaktörük glia hücreleri (OEC), hücre sel tedavi ajanı olarak hasarlı bölgeye enjekte edilmiştir. Yapılan literatür taramasında bu uygulamanın olduğu başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.
3. Yapılan literatür taramasında ızgara yürüme testi (Grid walking test), ayak parmağı yayılma testi (Five toe spread test) ve ayak izi testinin (Foot print test) yapıldığı başka bir deneysel çalışmaya rastlanmamıştır.
4. Ayak parmağı yayılımı testinde OEC grubunun opere edilmiş ayakta hem ITSF hem de TSF'de, S grubuna kıyasla, C grubunun değerine yakın olan daha iyi değerlere sahip olduğunu, OEC grubu için görülen bu artış OEC grubunun zaman içinde femoral sinir fonksiyonunun geri kazanılması olarak değerlendirilmiştir.
5. Izgara yürüme testinde, yürüme hata süreleri (ayak hata indeksi) OEC grubunda S grubuna kıyasla zaman içinde belirgin bir şekilde azalırken, C grubunda 3 farklı gündeki ölçümlerde çoğunlukla aynı kalmıştır. Bu sonuçlar, femoral sinir yaralanması ve onarımından 21 gün sonra ızgara yürüme testinde, hata sürelerinde anlamlı farklılıklar olduğu için, ızgara yürüme testinin akut sinir yaralanma aşamasında anlamlı olarak bulunmuştur.
6. Foot print testinde C grubunda, femoral sinir transeksiyonundan sonraki 7., 14. ve 21. günlerde anlamlı bir fark görülmezken, OEC'de, femoral fonksiyon indeksinde zamanla daha yüksek değerlere sahip olan S grubuna kıyasla femoral fonksiyon indeksinde zamanla anlamlı bir iyileşme görülmüştür, bu da femoral fonksiyonda zayıf bir restorasyon olduğunu şeklinde yorumlanmıştır.
7. Hayvanların operasyon anındaki ortalama ağırlıkları ($271,7 \pm 2,4$ g) gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($F = 1,115$; $DF = 4,16$; $P = 0,384$). Ötenazi uygulandığında, yalnızca salin grubunda ($255,2 \pm 5,3$ g) önemli ölçüde farklı ağırlık ($F = 3.348$; $DF = 4,16$; $P = 0.036$),

kontrol ve OEC gruplarıyla (284.7 ± 3.3 g) karşılaştırıldığında, 288.3 ± 3.7 g olan orijinal yaralanma öncesi ağırlıklarını neredeyse geri kazanmışlardır.

8. H&E ve Toluidin mavisi boyamalarında deney gruplarında perinöriumda kalınlaşma, endonöriumda artış olduğu saptandı. Küçük ve orta çaplı akson sayılarında azalma olduğu görüldü. Aksoplazmada ödem, miyelin halkalarda dejenerasyon, konformasyon bozuklukları saptandı. Tedavi grubunda ise perinörium yapısının incelendiği, endonöriumda artış olmadığı görüldü. Küçük ve orta çaplı aksonlarının sayılarında görece daha düşük seviyede azalma saptandı. Aksoplazmada ödemin minimal düzeyde olduğu saptandı. Dejenerasyon, çeşitli konformasyon bozuklukları ve ayrışma var olduğu fakat bunun kısıtlı olduğu görüldü.

9. Deney gruplarında akson çapı, miyelin kalınlığı ve perinörium kalınlığı ölçümleri yapılmıştır. Miyelin kalınlığının en fazla S grubunda olduğu görülmüştür. OEC grubunda ise C grubuna görece daha yakın olduğu saptandı ($p<0,001$). Akson çapı hem C hem de OEC gruplarında en az olarak saptandı. S grubunda ise daha kalın olarak ölçüldü ($p<0,001$). Perinörium kalınlığı C grubunda en az olarak saptanmıştır. S grubunda ise katastrofik bir kalınlaşma görüldü. OEC grubunda ise S grubuna kıyasla C grubuna görece daha yakın olduğu saptandı ($p<0,001$).

10. Anti- nestin boyamada kontrol ve deney grubunda immünreaktivite görülmemiştir. Tedavi grubunda Nestin pozitif ekspresyonu gösteren hücre gövdeleri ve uzantıların varlığı saptandı. Bu da tedavi amaçlı femoral sinire injekte edilen OEC'lerin varlığına bağlandı.

11. Anti- p75NGF immünohistokimyasal boyamada tüm gruplarda p75NGF ekspresyonu saptanmıştır. En yüksek ekspresyon tedavi grubunda görülürken kontrol ve deney grubunda belirgin bir değişim saptanmamıştır.

12. GFAP (+) hücre sayısı kontrol grubu için $94,6 \pm 3,64$, S grubu için $27,1 \pm 3,27$ ve OEC grubu için $47,8 \pm 4,78$ olarak saptanmıştır ($p<0,001$). Bonferroni testinde ise OEC grubu hem kontrol hem de S grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişim olduğu saptanmıştır ($p<0,001$).

13. Anti- CNTF immünohistokimyasal boyamada tüm gruplarda CNTF ekspresyonu saptanmıştır. En yüksek ekspresyon tedavi grubunda görülürken kontrol ve deney grubunda belirgin bir değişim saptanmamıştır.

14. OEC kaynaklı nörotrofik faktörlerin ekspresyonunun qPCR kullanılarak NT-3, NT-4, BDNF ve NGF ekspresyon ve kantitasyon seviyeleri ölçüldüğünde; NT-3, NT-4, BDNF için mRNA ekspresyonu sadece OEC grubunda görüldü. C ve S gruplarında ise negatif ekspresyona sahip olduğu görüldü. Öte yandan, NGF için mRNA ekspresyonu tüm deney gruplarında görüldü fakat OEC grubunda mRNA ekspresyonu diğer iki gruptan görece daha yüksek seviyede saptanmıştır.

15. Hücresel tedavi edici ajan olarak OEC kullanımının femoral sinir üzerindeki pozitif etkileri çalışmamızda gösterilmiştir. Konunun daha da derinleştirilmesi açısından biyokimyasal ve moleküler biyolojik farklı parametrelerin irdelenme ihtiyacı mevcuttur. Ayrıca detaylı hücre kültürü ve deneysel hayvan modelleri çalışmaları sonrası insan çalışmalarına geçilmesi periferik sinir hasarlarına bağlı insanların iyileştirilmesinde bir umut ışığı oluşturabileceği düşünülmektedir.

7. Kaynaklar

- Agrawal, A. K., Shukla, S., Chaturvedi, R. K., Seth, K., Srivastava, N., Ahmad, A., & Seth, P. K. (2004). Olfactory ensheathing cell transplantation restores functional deficits in rat model of Parkinson's disease: A cotransplantation approach with fetal ventral mesencephalic cells. *Neurobiology of Disease*, 16(3), 516–526. doi:10.1016/j.nbd.2004.04.014
- Al-Temimi, M. H., Chandrasekaran, B., Phelan, M. J., Pigazzi, A., Mills, S. D., Stamos, M. J., & Carmichael, J. C. (2017). Incidence, Risk Factors, and Trends of Motor Peripheral Nerve Injury After Colorectal Surgery: Analysis of the National Surgical Quality Improvement Program Database. *Diseases of the Colon and Rectum*, 60(3), 318–325. doi:10.1097/DCR.0000000000000744
- Alessandrini, M., Preynat-Seauve, O., De Bruin, K., & Pepper, M. S. (2019). Stem cell therapy for neurological disorders. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, 109(8b), S71–S78. doi:10.7196/SAMJ.2019.V109I8B.14009
- Alexander, C. E., Weisbrod, L. J., & Varacallo, M. (2024). Lumbosacral Radiculopathy. *StatPearls*, 1–8.
- Aminoff, M. J. (2021). Neurologic Dysfunction and Kidney Disease. *Aminoff's Neurology and General Medicine*, 251–271. doi:10.1016/B978-0-12-819306-8.00016-2
- Andrews, M. R., & Stelzner, D. J. (2007). Evaluation of olfactory ensheathing and schwann cells after implantation into a dorsal injury of adult rat spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, 24(11), 1773–1792. doi:10.1089/NEU.2007.0353
- Au, E., Richter, M. W., Vincent, A. J., Tetzlaff, W., Aebbersold, R., Sage, E. H., & Roskams, A. J. (2007). SPARC from Olfactory Ensheathing Cells Stimulates Schwann Cells to Promote Neurite Outgrowth and Enhances Spinal Cord Repair. *The Journal of Neuroscience*, 27(27), 7208. doi:10.1523/JNEUROSCI.0509-07.2007
- Babaei-Ghazani, A., Eftekharsadat, B., Samadirad, B., Mamaghany, V., & Abdollahian, S. (2017). Traumatic lower extremity and lumbosacral peripheral nerve injuries in adults: Electrodiagnostic studies and patients symptoms. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 52, 89–92. doi:10.1016/J.JFLM.2017.08.010

- Badri, O., Shahabi, P., Abdolalizadeh, J., Alipour, M. R., Veladi, H., Farhoudi, M., & Zak, M. S. (2017). Combination therapy using evening primrose oil and electrical stimulation to improve nerve function following a crush injury of sciatic nerve in male rats. *Neural Regeneration Research*, 12(3), 458. doi:10.4103/1673-5374.202927
- Balakrishnan, A., Belfiore, L., Chu, T. H., Fleming, T., Midha, R., Biernaskie, J., & Schuurmans, C. (2021). Insights Into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair From Studies of Development and Injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. doi:10.3389/FNMOL.2020.608442
- Balog, B. M., Askew, T., Lin, D. L., Kuang, M., Hanzlicek, B., & Damaser, M. S. (2020). The pudendal nerve motor branch regenerates via a brain derived neurotrophic factor mediated mechanism. *Experimental Neurology*, 334. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2020.113438
- Barber, P. C., & Lindsay, R. M. (1982). Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience*, 7(12), 3077–3090. doi:10.1016/0306-4522(82)90231-7
- Barnett, S. C., Hutchins, A. M., & Noble, M. (1993). Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb. *Developmental Biology*, 155(2), 337–350. doi:10.1006/DBIO.1993.1033
- Barraud, P., Seferiadis, A. A., Tyson, L. D., Zwart, M. F., Szabo-Rogers, H. L., Ruhrberg, C., ... Baker, C. V. H. (2010). Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 21040–21045. doi:10.1073/pnas.1012248107
- Barres, B. A. (2008). The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron*, 60(3), 430–440. doi:10.1016/J.NEURON.2008.10.013
- Barton, M. J., St John, J., Clarke, M., Wright, A., & Ekberg, J. (2017). The glia response after peripheral nerve injury: A comparison between Schwann cells and olfactory ensheathing cells and their uses for neural regenerative therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2). doi:10.3390/ijms18020287
- Bervar, M. (2000). Video analysis of standing — an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *Journal of Neuroscience Methods*,

102(2), 109–116. doi:10.1016/S0165-0270(00)00281-8

- Bhanushali, M., & Muley, S. (2008). Diabetic and non-diabetic lumbosacral radiculoplexus neuropathy. *Neurology India*, 56(4), 420–425. doi:10.4103/0028-3886.44814
- Blanchart, A., Martín-López, E., De Carlos, J. A., & López-Mascaraque, L. (2011). Peripheral contributions to olfactory bulb cell populations (migrations towards the olfactory bulb). *Glia*, 59(2), 278–292. doi:10.1002/GLIA.21100
- Bojanic, C., To, K., Zhang, B., Mak, C., & Khan, W. S. (2020). Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in peripheral nerve regeneration. *World Journal of Stem Cells*, 12(4), 288. doi:10.4252/WJSC.V12.I4.288
- Boruch, A. V., Conners, J. J., Pipitone, M., Deadwyler, G., Storer, P. D., Devries, G. H., & Jones, K. J. (2001). Neurotrophic and Migratory Properties of an Olfactory Ensheathing Cell Line. doi:10.1002/1098-1136
- Bowley, M. P., & Doughty, C. T. (2019). Entrapment Neuropathies of the Lower Extremity. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 371–382. doi:https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.013
- Boyd, J. G., Skihar, V., Kawaja, M., & Doucette, R. (2003). Olfactory ensheathing cells: Historical perspective and therapeutic potential. *Anatomical Record - Part B New Anatomist*, 271(1), 49–60. doi:10.1002/ar.b.10011
- Callaghan, B. C., Price, R. S., & Feldman, E. L. (2015). Diagnostic and Therapeutic Advances: Distal Symmetric Polyneuropathy. *JAMA*, 314(20), 2172. doi:10.1001/JAMA.2015.13611
- Cao, L., Zhu, Y. L., Su, Z., Lv, B., Huang, Z., Mu, L., & He, C. (2007). Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor. *Glia*, 55(9), 897–904. doi:10.1002/GLIA.20511
- Chatzistamatiou, T. K., Papassavas, A. C., Michalopoulos, E., Gamaloutsos, C., Mallis, P., Gontika, I., ... Stavropoulos-Giokas, C. (2014). Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*, 54(12), 3108–3120. doi:10.1111/TRF.12743

- Chen, C. J., Ou, Y. C., Liao, S. L., Chen, W. Y., Chen, S. Y., Wu, C. W., ... Hsu, S. H. (2007). Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Experimental Neurology*, 204(1), 443–453. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2006.12.004
- Chen, C. R., Kachramanoglou, C., Li, D., Andrews, P., & Choi, D. (2014). Anatomy and Cellular Constituents of the Human Olfactory Mucosa: A Review. *Journal of Neurological Surgery, Part B: Skull Base*, 75(5), 293–300. doi:10.1055/s-0033-1361837
- Chen, H., Tan, Q., Xie, C., Li, C., Chen, Y., Deng, Y., ... Sharma, H. (2019). Application of olfactory ensheathing cells in clinical treatment of spinal cord injury: meta-analysis and prospect. *Journal of Neurorestoratology*, 7(2), 70–81. doi:10.26599/jnr.2019.9040008
- Chen, S. H., Wu, C. C., Lin, S. C., Tseng, W. L., Huang, T. C., Yadav, A., ... Hsueh, Y. Y. (2021). Investigation of Neuropathology after Nerve Release in Chronic Constriction Injury of Rat Sciatic Nerve. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). doi:10.3390/IJMS22094746
- Clinchot, D. M., & Craig, E. J. (2020). Femoral Neuropathy. *Essentials of Physical Medicine and Rehabilitation: Musculoskeletal Disorders, Pain, and Rehabilitation*, 303–306. doi:10.1016/B978-0-323-54947-9.00054-7
- Couly, G. F., & Le Douarin, N. M. (1985). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Developmental Biology*, 110(2), 422–439. doi:10.1016/0012-1606(85)90101-0
- De la Rosa, M. B., Kozik, E. M., & Sakaguchi, D. S. (2018). Adult Stem Cell-Based Strategies for Peripheral Nerve Regeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1119, 41–71. doi:10.1007/5584_2018_254
- de Medinaceli, L., Freed, W. J., & Wyatt, R. J. (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Experimental Neurology*, 77(3), 634–643. doi:10.1016/0014-4886(82)90234-5
- Delarue, Q., & Guérout, N. (2022). Transplantation of Olfactory Ensheathing Cells: Properties and Therapeutic Effects after Transplantation into the Lesioned Nervous System. *Neuroglia*, 3(1), 1–22. doi:10.3390/neuroglia3010001

- Delorme, B., Nivet, E., Gaillard, J., Häupl, T., Ringe, J., Devèze, A., ... Féron, F. (2010). The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells and Development*, 19(6), 853–866. doi:10.1089/SCD.2009.0267
- Deng, C., Gorrie, C., Hayward, I., Elston, B., Venn, M., Mackay-Sim, A., & Waite, P. (2006). Survival and migration of human and rat olfactory ensheathing cells in intact and injured spinal cord. *Journal of Neuroscience Research*, 83(7), 1201–1212. doi:10.1002/JNR.20817
- Devon, R., & Doucette, R. (1995). Olfactory ensheathing cells do not require l-ascorbic acid in vitro to assemble a basal lamina or to myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Research*, 688(1–2), 223–229. doi:10.1016/0006-8993(95)00562-5
- Devon, R., Doucette, R., Debon, R., & Doucette, R. (1992). Olfactory ensheathing cells myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Research*, 589(1), 175–179. doi:10.1016/0006-8993(92)91182-E
- Dezawa, M., Takahashi, I., Esaki, M., Takano, M., & Sawada, H. (2001). Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *The European Journal of Neuroscience*, 14(11), 1771–1776. doi:10.1046/J.0953-816X.2001.01814.X
- Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., ... Takahashi, J. (2014). Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports*, 2(3), 337–350. doi:10.1016/J.STEMCR.2014.01.013
- Dong, S., Feng, S., Chen, Y., Chen, M., Yang, Y., Zhang, J., ... Wo, Y. (2021). Nerve Suture Combined With ADSCs Injection Under Real-Time and Dynamic NIR-II Fluorescence Imaging in Peripheral Nerve Regeneration in vivo. *Frontiers in Chemistry*, 9. doi:10.3389/FCHEM.2021.676928
- Doucette, J. R. (1984). The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *The Anatomical Record*, 210(2), 385–391. doi:10.1002/AR.1092100214
- Doucette, R. (1989). Development of the nerve fiber layer in the olfactory bulb of mouse embryos. *Journal of Comparative Neurology*, 285(4), 514–527. doi:10.1002/CNE.902850407

- Doucette, R. (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia*, 3(6), 433–449. doi:10.1002/GLIA.440030602
- Doucette, R. (1991). PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *The Journal of Comparative Neurology*, 312(3), 451–466. doi:10.1002/CNE.903120311
- Doucette, R. (1993). Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microscopy Research and Technique*, 24(2), 113–130. doi:10.1002/JEMT.1070240204
- Doucette, R., & Devon, R. (1993). Olfactory Ensheathing Cells: Factors Influencing the Phenotype of These Glial Cells. *Biology and Pathology of Astrocyte-Neuron Interactions*, 117–124. doi:10.1007/978-1-4757-9486-1_10
- Doucette, R., & Devon, R. (1994). Media that support the growth and differentiation of oligodendrocytes do not induce olfactory ensheathing cells to express a myelinating phenotype. *Glia*, 10(4), 296–310. doi:10.1002/GLIA.440100408
- Doucette, R., & Devon, R. (1995). Elevated intracellular levels of cAMP induce olfactory ensheathing cells to express GAL-C and GFAP but not MBP. *Glia*, 13(2), 130–140. doi:10.1002/GLIA.440130206
- Duan, D., Rong, M., Zeng, Y., Teng, X., Zhao, Z., Liu, B., ... Lu, M. (2011). Electrophysiological characterization of NSCs after differentiation induced by OEC conditioned medium. *Acta Neurochirurgica*, 153(10), 2085–2090. doi:10.1007/S00701-011-0955-Z
- Dutta, S., Singh, G., Sreejith, S., Mamidi, M. K., Husin, J. M., Datta, I., ... Das, A. K. (2013). Cell therapy: the final frontier for treatment of neurological diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(1), 5–11. doi:10.1111/CNS.12027
- El-Ghanem, M., Malik, A. A., Azzam, A., Yacoub, H. A., Qureshi, A. I., & Souayah, N. (2017). Occurrence of Femoral Nerve Injury among Patients Undergoing Transfemoral Percutaneous Catheterization Procedures in the United States. *Journal of Vascular and Interventional Neurology*, 9(4), 54.
- Farbman, A. I. (1990). Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends in Neurosciences*, 13(9), 362–365. doi:10.1016/0166-2236(90)90017-5

- Féron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Urquhart, S., ... Mackay-Sim, A. (2005). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain : A Journal of Neurology*, 128(Pt 12), 2951–2960. doi:10.1093/BRAIN/AWH657
- Forni, P. E., Taylor-Burds, C., Melvin, V. S., Williams, T., & Wray, S. (2011). Neural Crest and Ectodermal Cells Intermix in the Nasal Placode to Give Rise to GnRH-1 Neurons, Sensory Neurons, and Olfactory Ensheathing Cells. *The Journal of Neuroscience*, 31(18), 6915. doi:10.1523/JNEUROSCI.6087-10.2011
- Franklin, R J M, Gilson, J. M., Franceschini, I. A., & Barnett, S. C. (1996). Schwann Cell-Like Myelination Following Transplantation of an Olfactory Bulb-Ensheathing Cell Line Into Areas of Demyelination in the Adult CNS. *GLIA*, 17, 217–224. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199607)17:3
- Franklin, Robin J.M. (2002). Remyelination of the demyelinated CNS: the case for and against transplantation of central, peripheral and olfactory glia. *Brain Research Bulletin*, 57(6), 827–832. doi:10.1016/S0361-9230(01)00765-1
- Franklin, Robin J M, & Barnett, S. C. (1997). Do Olfactory Glia Have Advantages Over Schwann Cells for CNS Repair? *J. Neurosci. Res*, 50, 665–672. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19971201)50:5
- Franssen, E. H. P., Roet, K. C. D., de Bree, F. M., & Verhaagen, J. (2009). Olfactory ensheathing glia and Schwann cells exhibit a distinct interaction behavior with meningeal cells. *Journal of Neuroscience Research*, 87(7), 1556–1564. doi:10.1002/JNR.21979
- García-Álías, G., López-Vales, R., Forés, J., Navarro, X., Verdú, E., García- Álias, G., ... Verdú, E. (2004). Acute Transplantation of Olfactory Ensheathing Cells or Schwann Cells Promotes Recovery after Spinal Cord Injury in the Rat. *Journal of Neuroscience Research*, 75(5), 632–641. doi:10.1002/jnr.20029
- Gikas, P. D., Hanna, S. A., Aston, W., Kalson, N. S., Tirabosco, R., Saifuddin, A., & Cannon, S. R. (2008). Post-radiation sciatic neuropathy: a case report and review of the literature. *World Journal of Surgical Oncology*, 6, 130. doi:10.1186/1477-7819-6-130
- Glenn, M. D., & Jabari, D. (2020). Diabetic Lumbosacral Radiculoplexus Neuropathy (Diabetic Amyotrophy). *Neurologic Clinics*, 38(3), 553–564. doi:10.1016/J.NCL.2020.03.010

- Golchin, A., Shams, F., Kangari, P., Azari, A., & Hosseinzadeh, S. (2020). Regenerative Medicine: Injectable Cell-Based Therapeutics and Approved Products. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1237, 75–95. doi:10.1007/5584_2019_412
- Gómez, R. M., Sánchez, M. Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G. E., Sierra, J., & Moreno-Flores, M. T. (2018). Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*, 66(7), 1267–1301. doi:10.1002/GLIA.23282
- Gong, Q., Bailey, M. S., Pixley, S. K., Ennis, M., Liu, W., & Shipley, M. T. (1994). Localization and regulation of low affinity nerve growth factor receptor expression in the rat olfactory system during development and regeneration. *The Journal of Comparative Neurology*, 344(3), 336–348. doi:10.1002/CNE.903440303
- Graziadei, P. P. C., & Graziadei, G. A. M. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *Journal of Neurocytology*, 8(1), 1–18. doi:10.1007/BF01206454
- Griffiths, I. R., Dickinson, P., & Montague, P. (1995). Expression of the proteolipid protein gene in glial cells of the post-natal peripheral nervous system of rodents. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 21(2), 97–110. doi:10.1111/J.1365-2990.1995.TB01035.X
- Grohmann, K., Schuelke, M., Diers, A., Hoffmann, K., Lucke, B., Adams, C., ... Hübner, C. (2001). Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nature Genetics*, 29(1), 75–77. doi:10.1038/NG703
- Grossman, M. G., Ducey, S. A., Nadler, S. S., & Levy, A. S. (2001). Meralgia paresthetica: diagnosis and treatment. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 9(5), 336–344. doi:10.5435/00124635-200109000-00007
- Guérout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O., & Marie, J. P. (2010). Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia*, 58(13), 1570–1580. doi:10.1002/glia.21030
- Guerout, N., Paviot, A., Bon-Mardion, N., Honoré, A., OBongo, R., Duclos, C., & Marie, J. P. (2014). Transplantation of olfactory ensheathing cells to evaluate functional recovery after

- peripheral nerve injury. *Journal of Visualized Experiments*, (84), 1–7. doi:10.3791/50590
- Guidon, A. C., & Massey, E. W. (2012). Neuromuscular Disorders in Pregnancy. *Neurologic Clinics*, 30(3), 889–911. doi:10.1016/J.NCL.2012.04.002
- Hanewinkel, R., van Oijen, M., Ikram, M. A., & van Doorn, P. A. (2016). The epidemiology and risk factors of chronic polyneuropathy. *European Journal of Epidemiology*, 31(1), 5. doi:10.1007/S10654-015-0094-6
- Higginson, J. R., & Barnett, S. C. (2011). The culture of olfactory ensheathing cells (OECs)-a distinct glial cell type. *Experimental Neurology*, 229(1), 2–9. doi:10.1016/j.expneurol.2010.08.020
- Holbrook, E. H., Rebeiz, L., & Schwob, J. E. (2016). Office-based olfactory mucosa biopsies. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 6(6), 646–653. doi:10.1002/ALR.21711
- Hussain, G., Wang, J., Rasul, A., Anwar, H., Qasim, M., Zafar, S., ... Sun, T. (2020). Current status of therapeutic approaches against peripheral nerve injuries: A detailed story from injury to recovery. *International Journal of Biological Sciences*, 16(1), 116–134. doi:10.7150/ijbs.35653
- Imaizumi, T., Lankford, K. L., Burton, W. V., Fodor, W. L., & Kocsis, J. D. (2000). Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. *Nature Biotechnology*, 18(9), 949–953. doi:10.1038/79432
- Imaizumi, T., Lankford, K. L., Waxman, S. G., Greer, C. A., & Kocsis, J. D. (1998). Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(16), 6176–6185. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-16-06176.1998
- Jiang, Y., Guo, J., Tang, X., Wang, X., Hao, D., & Yang, H. (2022). The Immunological Roles of Olfactory Ensheathing Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Frontiers in Immunology*, 13(May), 1–14. doi:10.3389/fimmu.2022.881162
- Kato, T., Honmou, O., Uede, T., Hashi, K., & Kocsis, J. D. (2000). Transplantation of Human Olfactory Ensheathing Cells Elicits Remyelination of Demyelinated Rat Spinal Cord. *Glia*, 30(3), 209. doi:10.1002/(sici)1098-1136(200005)30:3<209::aid-glia1>3.0.co;2-8

- Katoh, H., Shibata, S., Fukuda, K., Sato, M., Satoh, E., Nagoshi, N., ... Okano, H. (2011). The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. *Molecular Brain*, 4(1), 34. doi:10.1186/1756-6606-4-34
- Kearns, S. M., Laywell, E. D., Kukekov, V. K., & Steindler, D. A. (2003). Extracellular matrix effects on neurosphere cell motility. *Experimental Neurology*, 182(1), 240–244. doi:10.1016/S0014-4886(03)00124-9
- Khankan, R. R., Griffis, X. K. G., Haggerty-skeans, J. R., Zhong, H., Roy, R. R., Edgerton, V. R., & Phelps, P. E. (2016). Olfactory Ensheathing Cell Transplantation after a Complete Spinal Cord Transection Mediates Neuroprotective and Immunomodulatory Mechanisms to Facilitate Regeneration. *The Journal of Neuroscience*, 36(23), 6269–6286. doi:10.1523/JNEUROSCI.0085-16.2016
- Kinnman, E., Aldskogius, H., Johansson, O., & Wiesenfeld-Hallin, Z. (1992). Collateral reinnervation and expansive regenerative reinnervation by sensory axons into ‘foreign’ denervated skin: an immunohistochemical study in the rat. *Experimental Brain Research*, 91(1), 61–72. doi:10.1007/BF00230013
- Kohama, I., Lankford, K. L., Preiningerova, J., White, F. A., Vollmer, T. L., & Kocsis, J. D. (2001). Transplantation of Cryopreserved Adult Human Schwann Cells Enhances Axonal Conduction in Demyelinated Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*, 21(3), 944. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-03-00944.2001
- Kolatsi-Joannou, M., Li, X. Z., Suda, T., Yuan, H. T., Woolf, A. S., Lee Meng-Jen, ... Mirsky Rhona. (2001). In early development of the rat mRNA for the major myelin protein P(0) is expressed in nonsensory areas of the embryonic inner ear, notochord, enteric nervous system, and olfactory ensheathing cells. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 222(1), 40–51. doi:10.1002/DVDY.1165
- Kubiak, C. A., Grochmal, J., Kung, T. A., Cederna, P. S., Midha, R., & Kemp, S. W. P. (2020). Stem-cell-based therapies to enhance peripheral nerve regeneration. *Muscle & Nerve*, 61(4), 449–459. doi:10.1002/MUS.26760
- Kurtz, A., Zimmer, A., Schnütgen, F., Brüning, G., Spener, F., & Müller, T. (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and

- glial cell development. *Development (Cambridge, England)*, 120(9), 2637–2649. doi:10.1242/DEV.120.9.2637
- Lan, Y. X., Yang, P., Zeng, Z., Yadav, N., Zhang, L. J., Wang, L. Bin, & Xia, H. C. (2022). Gene and protein expression profiles of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb versus olfactory mucosa. *Neural Regeneration Research*, 17(2), 440–449. doi:10.4103/1673-5374.317986
- Lee, J. . J. Y., Kim, Y. . Y. H., Kim, B. Y. B. ., Jang, D. . D. H. D. ., Choi, S. W. S. ., Joen, S. . S. H., ... Lee, S. U. S. . (2021). Peripheral Nerve Regeneration Using a Nerve Conduit with Olfactory Ensheathing Cells in a Rat Model. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 18(3), 453–465. doi:10.1007/s13770-020-00326-9
- Lee, S. H., Lee, T. J., Woo, M. S., & Kwon, D. G. (2013). Femoral Nerve Palsy with Patella Fracture. *Knee Surgery & Related Research*, 25(4), 230. doi:10.5792/KSRR.2013.25.4.230
- Lehnen, D., Barral, S., Cardoso, T., Grealish, S., Heuer, A., Smiyakin, A., ... Knöbel, S. (2017). IAP-Based Cell Sorting Results in Homogeneous Transplantable Dopaminergic Precursor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 9(4), 1207–1220. doi:10.1016/J.STEMCR.2017.08.016
- Leung, C. T., Coulombe, P. A., & Reed, R. R. (2007). Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nature Neuroscience*, 10(6), 720–726. doi:10.1038/NN1882
- Li, B., Jiao, S., Xu, C., You, H., & Chen, J. (2010). PLGA conduit seeded with olfactory ensheathing cells for bridging sciatic nerve defect of rats. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH A* |, 94A(3), 769–780. doi:10.1002/jbm.a.32727
- Li, M., Zhang, P., & Zhang, D. (2018). PVDF piezoelectric neural conduit incorporated pre-differentiated adipose-derived stem cells may accelerate the repair of peripheral nerve injury. *Medical Hypotheses*, 114, 55–57. doi:10.1016/J.MEHY.2018.02.027
- Li, P., Tang, T., Liu, T., Zhou, J., Cui, H., He, Z., ... Wang, Y. (2019). Systematic Analysis of tRNA-Derived Small RNAs Reveals Novel Potential Therapeutic Targets of Traditional Chinese Medicine (Buyang-Huanwu-Decoction) on Intracerebral Hemorrhage. *International Journal of Biological Sciences*, 15(4), 895. doi:10.7150/IJBS.29744

- Li, Y., Field, P. M., & Raisman, G. (1997). Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5334), 2000–2002. doi:10.1126/SCIENCE.277.5334.2000
- Li, Y., Li, D., & Raisman, G. (2005). Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the ‘pathway hypothesis’. *Journal of Neurocytology*, 34(3–5), 343–351. doi:10.1007/S11068-005-8361-1
- Lipson, A. C., Widenfalk, J., Lindqvist, E., Ebendal, T., & Olson, L. (2003). Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Experimental Neurology*, 180(2), 167–171. doi:10.1016/S0014-4886(02)00058-4
- Liu, J. P., Wang, J. L., Hu, B. E., Zou, F. L., Wu, C. L., Shen, J., & Zhang, W. J. (2023). Olfactory ensheathing cells and neuropathic pain. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. doi:10.3389/FCELL.2023.1147242
- Llewelyn, D., & Llewelyn, J. G. (2019). Diabetic amyotrophy: a painful radiculoplexus neuropathy. *Practical Neurology*, 19(2), 164–167. doi:10.1136/PRACTNEUROL-2018-002105
- Lo Furno, D., Mannino, G., & Giuffrida, R. (2018). Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 3982–3999. doi:10.1002/JCP.26192
- Lobsiger, C. S., & Cleveland, D. W. (2007). Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1355–1360. doi:10.1038/NN1988
- López-Valdés, H. E., Clarkson, A. N., Ao, Y., Charles, A. C., Carmichael, S. T., Sofroniew, M. V., & Brennan, K. C. (2014). Memantine enhances recovery from stroke. *Stroke*, 45(7), 2093–2100. doi:10.1161/STROKEAHA.113.004476
- López-Vales, Rubèn, Forés, J., Verdú, E., & Navarro, X. (2006). Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord. *Neurobiology of Disease*, 21(1), 57–68. doi:10.1016/J.NBD.2005.06.011
- López-Vales, Rubén, García-Alías, G., Forés, J., Navarro, X., & Verdú, E. (2004). Increased expression of cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor in lesioned spinal

- cord by transplanted olfactory ensheathing cells. *Journal of Neurotrauma*, 21(8), 1031–1043. doi:10.1089/0897715041651105
- Lorei, M. P., & Hershman, E. B. (1993). Peripheral nerve injuries in athletes. Treatment and prevention. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 16(2), 130–147. doi:10.2165/00007256-199316020-00005
- Lu, J., Féron, F., Mackay-Sim, A., & Waite, P. M. E. (2002). Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain*, 125(1), 14–21. doi:10.1093/brain/awf014
- Mackay-Sim, A., Féron, F., Cochrane, J., Bassingthwaite, L., Bayliss, C., Davies, W., ... Geraghty, T. (2008). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. *Brain : A Journal of Neurology*, 131(Pt 9), 2376–2386. doi:10.1093/BRAIN/AWN173
- Mackay-Sim, Alan, & Kittel, P. (1991). Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(4), 979–984. doi:10.1523/JNEUROSCI.11-04-00979.1991
- Mackay-Sim, Alan, & St John, J. A. (2011). Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries. *Experimental Neurology*, 229(1), 174–180. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2010.08.025
- Mannino, G., Cristaldi, M., Giurdanella, G., Perrotta, R. E., Furno, D. Lo, Giuffrida, R., & Rusciano, D. (2021). ARPE-19 conditioned medium promotes neural differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 13(11), 1783–1796. doi:10.4252/WJSC.V13.I11.1783
- Mannino, G., Russo, C., Longo, A., Anfuso, C. D., Lupo, G., Furno, D. Lo, ... Giurdanella, G. (2021). Potential therapeutic applications of mesenchymal stem cells for the treatment of eye diseases. *World Journal of Stem Cells*, 13(6), 632–644. doi:10.4252/WJSC.V13.I6.632
- Maugeri, G., D'Agata, V., Trovato, B., Roggio, F., Castorina, A., Vecchio, M., ... Musumeci, G. (2021). The role of exercise on peripheral nerve regeneration: from animal model to clinical application. *Heliyon*, 7(11). doi:10.1016/J.HELİYON.2021.E08281
- Menezes, K., Nascimento, M. A., Gonçalves, J. P., Cruz, A. S., Lopes, D. V., Curzio, B., ...

- Coelho-Sampaio, T. (2014). Human mesenchymal cells from adipose tissue deposit laminin and promote regeneration of injured spinal cord in rats. *PloS One*, 9(5). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0096020
- Minkelyte, K., Li, D., Li, Y., & Ibrahim, A. (2023). Transplantation of Cryopreserved Olfactory Ensheathing Cells Restores Loss of Functions in an Experimental Model. *Cell Transplantation*, 32. doi:10.1177/09636897231199319
- Miragall, F., Hwang, T. -K, Traub, O., Hertzberg, E. L., & Dermietzel, R. (1992). Expression of connexins in the developing olfactory system of the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 325(3), 359–378. doi:10.1002/CNE.903250304
- Miragall, F., Kadmon, G., & Schachner, M. (1989). Expression of L1 and N-CAM cell adhesion molecules during development of the mouse olfactory system. *Developmental Biology*, 135(2), 272–286. doi:10.1016/0012-1606(89)90179-6
- Miragall, F., Krause, D., De Vries, U., & Dermietzel, R. (1994). Expression of the tight junction protein ZO-1 in the olfactory system: presence of ZO-1 on olfactory sensory neurons and glial cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 341(4), 433–448. doi:10.1002/CNE.903410402
- Misra, M. K., Damotte, V., & Hollenbach, J. A. (2018). The immunogenetics of neurological disease. *Immunology*, 153(4), 399. doi:10.1111/IMM.12869
- Monti Graziadei, G. A., & Graziadei, P. P. C. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *Journal of Neurocytology*, 8(2), 197–213. doi:10.1007/BF01175561
- Murtaza, M., Chacko, A., Delbaz, A., Reshamwala, R., Rayfield, A., McMonagle, B., ... Ekberg, J. A. K. (2019). Why are olfactory ensheathing cell tumors so rare? *Cancer Cell International*, 19(1), 1–16. doi:10.1186/s12935-019-0989-5
- Murtaza, M., Mohanty, L., Ekberg, J. A. K., & St John, J. A. (2022). Designing Olfactory Ensheathing Cell Transplantation Therapies: Influence of Cell Microenvironment. *Cell Transplantation*, 31. doi:10.1177/09636897221125685
- Nazareth, L., Lineburg, K. E., Chuah, M. I., Tello Velasquez, J., Chehrehasa, F., St John, J. A., & Ekberg, J. A. K. (2015). Olfactory ensheathing cells are the main phagocytic cells that remove

- axon debris during early development of the olfactory system. *The Journal of Comparative Neurology*, 523(3), 479–494. doi:10.1002/CNE.23694
- Neri, L. O., de Amorim, M. M., Campos, S. A. R., Sanada, L. S., & Fazan, V. P. S. (2015). Hind Limb Sensory Innervation in Rats: Comparison between Sural and Saphenous Nerve Morphometry. *International Journal of Morphology*, 33(2), 743–750. doi:10.4067/s0717-95022015000200052
- Parmar, M., Grealish, S., & Henchcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 21(2), 103–115. doi:10.1038/S41583-019-0257-7
- Pastrana, E., Moreno-Flores, M. T., Gurzov, E. N., Avila, J., Wandosell, F., & Diaz-Nido, J. (2006). Genes Associated with Adult Axon Regeneration Promoted by Olfactory Ensheathing Cells: A New Role for Matrix Metalloproteinase 2. *The Journal of Neuroscience*, 26(20), 5347. doi:10.1523/JNEUROSCI.1111-06.2006
- Paviot, A., Guérout, N., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Jean, L., Boyer, O., & Marie, J. P. (2011). Efficiency of laryngeal motor nerve repair is greater with bulbar than with mucosal olfactory ensheathing cells, 41(3), 688–694.
- Pearse, D. D., Sanchez, A. R., Pereira, F. C., Andrade, C. M., Puzis, R., Pressman, Y., ... Bunge, M. B. (2007). Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia*, 55(9), 976–1000. doi:10.1002/GLIA.20490
- Pellitteri, R., Spatuzza, M., Stanzani, S., & Zaccheo, D. (2010). Biomarkers expression in rat olfactory ensheathing cells. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 2(1), 289–298. doi:10.2741/S64
- Pena, M. C., & Barón, J. (1988). Femoral Nerve and Rectus Femoris Muscle of the Rat: A Study in Anatomy, Histology, and Histoenzymes. *Annals of Plastic Surgery*, 20(6).
- Peters, A., Palay, S. L., & Webster, H. deF. (1991). The Fine Structure of the Nervous System: neurons and their supporting cells, xviii, 494.
- Radtke, C., Aizer, A. A., Agulian, S. K., Lankford, K. L., Vogt, P. M., & Kocsis, J. D. (2009). Transplantation of olfactory ensheathing cells enhances peripheral nerve regeneration after microsurgical nerve repair. *Brain Research*, 1254, 10–17.

doi:10.1016/J.BRAINRES.2008.11.036

- Radtke, C., Akiyama, Y., Brokaw, J., Lankford, K. L., Wewetzer, K., Fodor, W. L., & Kocsis, J. D. (2004). Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(2), 335. doi:10.1096/FJ.03-0214FJE
- Radtke, C., & Kocsis, J. D. (2012). Peripheral nerve injuries and transplantation of olfactory ensheathing cells for axonal regeneration and remyelination: Fact or fiction? *International Journal of Molecular Sciences*, 13(10), 12911–12924. doi:10.3390/ijms131012911
- Radtke, C., Wewetzer, K., Reimers, K., & Vogt, P. M. (2011). Transplantation of olfactory ensheathing cells as adjunct cell therapy for peripheral nerve injury. *Cell Transplantation*, 20(2), 145–152. doi:10.3727/096368910X522081
- Raisman, G. (1985). Specialized neuroglial arrangement may explain the capacity of vomeronasal axons to reinnervate central neurons. *Neuroscience*, 14(1), 237–254. doi:10.1016/0306-4522(85)90176-9
- Ramer, L. M., Au, E., Richter, M. W., Liu, J., Tetzlaff, W., & Roskams, A. J. (2004). Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *The Journal of Comparative Neurology*, 473(1), 1–15. doi:10.1002/CNE.20049
- Ramón-Cueto, A., & Avila, J. (1998). Olfactory ensheathing glia: Properties and function. *Brain Research Bulletin*, 46(3), 175–187. doi:10.1016/S0361-9230(97)00463-2
- Ramón-Cueto, A., Cordero, M. I., Santos-Benito, F. F., & Avila, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*, 25(2), 425–435. doi:10.1016/S0896-6273(00)80905-8
- Ramón-Cueto, A., & Nieto-Sampedro, M. (1994). Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Experimental Neurology*, 127(2), 232–244. doi:10.1006/EXNR.1994.1099
- Ramón-Cueto, A., & Valverde, F. (1995). Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia*, 14(3), 163–173. doi:10.1002/GLIA.440140302

- Refai, N. A., Black, A. C., & Tadi, P. (2023). Anatomy, Bony Pelvis and Lower Limb: Thigh Femoral Nerve. *StatPearls*.
- Reinhard, E., Meier, R., Halfter, W., Rovelli, G., & Monard, D. (1988). Detection of glia-derived nexin in the olfactory system of the rat. *Neuron*, 1(5), 387–394. doi:10.1016/0896-6273(88)90188-2
- Rieger, A., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2007). Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia*, 55(4), 352–359. doi:10.1002/GLIA.20460
- Roet, K. C. D., & Verhaagen, J. (2014). Understanding the neural repair-promoting properties of olfactory ensheathing cells. *Experimental Neurology*, 261, 594–609. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2014.05.007
- Ross, J. S., Bendok, B. R., & McClendon, J. T. A.-T. T.-. (2017). Imaging in spine surgery. Philadelphia, PA: Elsevier. doi:LK - <https://worldcat.org/title/988396111>
- Rossignol, S., Schwab, M., Schwartz, M., & Fehlings, M. G. (2007). Spinal cord injury: time to move? *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(44), 11782–11792. doi:10.1523/JNEUROSCI.3444-07.2007
- Russo, C., Patanè, M., Russo, A., Stanzani, S., & Pellitteri, R. (2021). Effects of Ghrelin on Olfactory Ensheathing Cell Viability and Neural Marker Expression. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 71(5), 963–971. doi:10.1007/S12031-020-01716-3
- Schwob, J. E. (2002). Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *The Anatomical Record*, 269(1), 33–49. doi:10.1002/AR.10047
- Schwob, J. E., Jang, W., Holbrook, E. H., Lin, B., Herrick, D. B., Peterson, J. N., & Hewitt Coleman, J. (2017). Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *The Journal of Comparative Neurology*, 525(4), 1034–1054. doi:10.1002/CNE.24105
- Scotti, A. L., Hoffmann, M. C., & Nitsch, C. (1994). The neurite growth promoting protease nexin 1 in glial cells of the olfactory bulb of the gerbil: an ultrastructural study. *Cell and Tissue Research*, 278(2), 409–413. doi:10.1007/BF00414183

- Seburn, K. L., Nangle, L. A., Cox, G. A., Schimmel, P., & Burgess, R. W. (2006). An active dominant mutation of glycyl-tRNA synthetase causes neuropathy in a Charcot-Marie-Tooth 2D mouse model. *Neuron*, 51(6), 715–726. doi:10.1016/J.NEURON.2006.08.027
- Sethi, R., Sethi, R., Redmond, A., & Lavik, E. (2014). Olfactory ensheathing cells promote differentiation of neural stem cells and robust neurite extension. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(6), 772–785. doi:10.1007/S12015-014-9539-7
- Shields, S. D., Moore, K. D., Phelps, P. E., & Basbaum, A. I. (2010). Olfactory ensheathing glia express aquaporin 1. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(21), 4329–4341. doi:10.1002/CNE.22459
- Smale, K. A., Doucette, R., & Kawaja, M. D. (1996). Implantation of olfactory ensheathing cells in the adult rat brain following fimbria-fornix transection. *Experimental Neurology*, 137(2), 225–233. doi:10.1006/EXNR.1996.0021
- Smith, P. M., Lakatos, A., Barnett, S. C., Jeffery, N. D., & Franklin, R. J. M. (2002). Cryopreserved cells isolated from the adult canine olfactory bulb are capable of extensive remyelination following transplantation into the adult rat CNS. *Experimental Neurology*, 176(2), 402–406. doi:10.1006/exnr.2002.7936
- Soman, S., Anju, T. R., Jayanarayanan, S., Antony, S., & Paulose, C. S. (2013). Impaired motor learning attributed to altered AMPA receptor function in the cerebellum of rats with temporal lobe epilepsy: ameliorating effects of *Withania somnifera* and withanolide A. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 27(3), 484–491. doi:10.1016/J.YEBEH.2013.01.007
- Stepanova, O. V., Voronova, A. D., Chadin, A. V., Fursa, G. A., Karsuntseva, E. K., Valikhov, M. P., ... Chekhonin, V. P. (2022). Neurotrophin-3 Enhances the Effectiveness of Cell Therapy in Chronic Spinal Cord Injuries. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 173(1), 114–118. doi:10.1007/S10517-022-05504-4
- Su, Z., & He, C. (2010). Olfactory ensheathing cells: Biology in neural development and regeneration. *Progress in Neurobiology*, 92(4), 517–532. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.08.008
- Toft, A., Scott, D. T., Barnett, S. C., & Riddell, J. S. (2007). Electrophysiological evidence that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury. *Brain : A Journal of*

- Neurology*, 130(Pt 4), 970–984. doi:10.1093/BRAIN/AWM040
- Torres-Paz, J., Tine, E. M., & Whitlock, K. E. (2021). Dissecting the neural divide: a continuous neurectoderm gives rise to the olfactory placode and bulb. *The International Journal of Developmental Biology*, 65(4-5-6), 275–287. doi:10.1387/IJDB.200097KW
- Ursavas, S., Darici, H., & Karaoz, E. (2021). Olfactory ensheathing cells: Unique glial cells promising for treatments of spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*, 99(6), 1579–1597. doi:10.1002/jnr.24817
- Valverde, F., & Lopez-Mascaraque, L. (1991). Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *Journal of Comparative Neurology*, 307(4), 658–674. doi:10.1002/CNE.903070411
- Verdú, E., Navarro, X., Gudiño-Cabrera, G., Rodríguez, F. J., Ceballos, D., Valero, A., & Nieto-Sampedro, M. (1999). Olfactory bulb ensheathing cells enhance peripheral nerve regeneration. *Neuroreport*, 10(5), 1097–1101. doi:10.1097/00001756-199904060-00035
- Vickland, H., Westrum, L. E., Kott, J. N., Patterson, S. L., & Bothwell, M. A. (1991). Nerve growth factor receptor expression in the young and adult rat olfactory system. *Brain Research*, 565(2), 269–279. doi:10.1016/0006-8993(91)91659-O
- Waldman, S. D. (2014). Chapter 93 - Femoral Neuropathy. In S. D. B. T.-A. of U. P. S. (Third E. Waldman (Ed.) (pp. 271–272). Philadelphia: W.B. Saunders. doi:https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0999-1.00093-9
- Wang, L., Zheng, G. Z., Rui, L. Z., Gregg, S. R., Hozeska-Solgot, A., LeTourneau, Y., ... Chopp, M. (2006). Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 Secreted by Erythropoietin-Activated Endothelial Cells Promote Neural Progenitor Cell Migration. *The Journal of Neuroscience*, 26(22), 5996. doi:10.1523/JNEUROSCI.5380-05.2006
- Wang, X., Jiang, C., Zhang, Y., Chen, Z., Fan, H., Zhang, Y., ... Hao, D. (2022). The promoting effects of activated olfactory ensheathing cells on angiogenesis after spinal cord injury through the PI3K/Akt pathway. *Cell and Bioscience*, 12(1), 1–18. doi:10.1186/S13578-022-00765-Y/FIGURES/6
- Wei, S., Hu, Q., Cheng, X., Ma, J., Liang, X., Peng, J., ... Wang, Y. (2020). Differences in the Structure and Protein Expression of Femoral Nerve Branches in Rats. *Frontiers in*

- Neuroanatomy*, 14(April), 1–10. doi:10.3389/fnana.2020.00016
- Weng, S. J., Chen, C. F. F., Huang, Y. S., Chiu, C. H., Wu, S. C., Lin, C. Y., ... Ma, K. H. (2019). Olfactory ensheathing cells improve the survival of porcine neural xenografts in a Parkinsonian rat model. *Xenotransplantation*, 27(2), 1–11.
- Wewetzer, K., Grothe, C., & Claus, P. (2001). In vitro expression and regulation of ciliary neurotrophic factor and its α receptor subunit in neonatal rat olfactory ensheathing cells. *Neuroscience Letters*, 306(3), 165–168. doi:10.1016/S0304-3940(01)01891-2
- Wewetzer, K., Verdú, E., Angelov, D. N., & Navarro, X. (2002). Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: Two of a kind? *Cell and Tissue Research*, 309(3), 337–345. doi:10.1007/S00441-002-0607-Y/METRICS
- Wilkinson, A. E., Kobelt, L. J., & Leipzig, N. D. (2014). Immobilized ECM molecules and the effects of concentration and surface type on the control of NSC differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 102(10), n/a-n/a. doi:10.1002/JBMA.35001
- Windus, L. C. E., Chehrehasa, F., Lineburg, K. E., Claxton, C., MacKay-Sim, A., Key, B., & St John, J. A. (2011). Stimulation of olfactory ensheathing cell motility enhances olfactory axon growth. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68(19), 3233–3247. doi:10.1007/S00018-011-0630-9
- Windus, L. C. E., Lineburg, K. E., Scott, S. E., Claxton, C., MacKay-Sim, A., Key, B., & St John, J. A. (2010). Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 67(10), 1735–1750. doi:10.1007/S00018-010-0280-3
- Xu, K., Liu, X., Li, X., Yin, J., Wei, P., Qian, J., & Sun, J. (2021). Effect of Electrical and Electromechanical Stimulation on PC12 Cell Proliferation and Axon Outgrowth. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi:10.3389/FBIOE.2021.757906
- Xu, X., Liang, Z., Lin, Y., Rao, J., Lin, F., Yang, Z., ... Chen, C. (2022). Comparing the Efficacy and Safety of Cell Transplantation for Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Bayesian Network Meta-Analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16. doi:10.3389/FNCEL.2022.860131
- Yamasaki, M., Yamada, K., Furuya, S., Mitoma, J., Hirabayashi, Y., & Watanabe, M. (2001). 3-

- Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), 7691–7704. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-19-07691.2001
- Yanase, H., Shimizu, H., Yamada, K., & Iwanaga, T. (2002). Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein. *Archives of Histology and Cytology*, 65(1), 27–36. doi:10.1679/AOHC.65.27
- Yang, H., He, B. R., & Hao, D. J. (2015). Biological Roles of Olfactory Ensheathing Cells in Facilitating Neural Regeneration: A Systematic Review. *Molecular Neurobiology*, 51(1), 168–179. doi:10.1007/s12035-014-8664-2
- Yao, R., Murtaza, M., Velasquez, J. T., Todorovic, M., Rayfield, A., Ekberg, J., ... St John, J. (2018). Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury: Sniffing Out the Issues. *Cell Transplantation*, 27(6), 879–889. doi:10.1177/0963689718779353
- You, H., Wei, L., Liu, Y., Oudega, M., Jiao, S. S., Feng, S. N., ... Li, B. C. (2011). Olfactory ensheathing cells enhance Schwann cell-mediated anatomical and functional repair after sciatic nerve injury in adult rats. *Experimental Neurology*, 229(1), 158–167. doi:10.1016/j.expneurol.2010.08.034
- Younger, D. S. (2011). Diabetic lumbosacral radiculoplexus neuropathy: a postmortem studied patient and review of the literature. *Journal of Neurology*, 258(7), 1364. doi:10.1007/S00415-011-5938-8
- Yu-Hai, M., Zhang, Y., Cao, L., Su, J. C., Wang, Z. W., Xu, A. B., & Zhang, S. C. (2010). Effect of neurotrophin-3 genetically modified olfactory ensheathing cells transplantation on spinal cord injury. *Cell Transplantation*, 19(2), 167–177. doi:10.3727/096368910X492634/ASSET/IMAGES/LARGE/10.3727_096368910X492634-FIG10.JPEG
- Zalewska, K., Pietrogrande, G., Ong, L. K., Abdolhoseini, M., Kluge, M., Johnson, S. J., ... Nilsson, M. (2018). Sustained administration of corticosterone at stress-like levels after stroke suppressed glial reactivity at sites of thalamic secondary neurodegeneration. *Brain, Behavior*,

- and Immunity*, 69, 210–222. doi:10.1016/J.BBI.2017.11.014
- Zhang, L. P., Liao, J. X., Liu, Y. Y., Luo, H. L., & Zhang, W. J. (2023). Potential therapeutic effect of olfactory ensheathing cells in neurological diseases: neurodegenerative diseases and peripheral nerve injuries. *Frontiers in Immunology*, 14(October).
- Zhang, L., Zhuang, X., Kotitalo, P., Keller, T., Krzyczmonik, A., Haaparanta-Solin, M., ... Xia, H. (2021). Intravenous transplantation of olfactory ensheathing cells reduces neuroinflammation after spinal cord injury via interleukin-1 receptor antagonist. *Theranostics*, 11(3), 1147. doi:10.7150/THNO.52197
- Zhang, W. jun, Wu, C. lei, & Liu, J. peng. (2023). Schwann cells as a target cell for the treatment of cancer pain. *Glia*, 71(10), 2309–2322. doi:10.1002/GLIA.24391
- Zhang, X., Klueber, K. M., Guo, Z., Cai, J., Lu, C., Winstead, W. I., ... Roisen, F. J. (2006). Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. *Brain Research*, 1073–1074(1), 109–119. doi:10.1016/J.BRAINRES.2005.12.059
- Zhang, Y., Wang, W. T., Gong, C. R., Li, C., & Shi, M. (2020). Combination of olfactory ensheathing cells and human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes promotes sciatic nerve regeneration. *Neural Regeneration Research*, 15(10), 1903–1911. doi:10.4103/1673-5374.280330
- Zhao, N., Liu, J., Gao, H., Cen, J., Pang, J., Wang, Y., & Feng, Z. (2008). Isolation, purification and biological characterization of olfactory ensheathing cells in neonate mice. *Basic & Clinical Medicine*, 28(5), 477.
- Zhu, G., Sun, C., & Liu, W. (2012). Effects of neurotrophin-3 on the differentiation of neural stem cells into neurons and oligodendrocytes. *Neural Regeneration Research*, 7(19), 1483. doi:10.3969/J.ISSN.1673-5374.2012.19.006
- Ziegler, M. D., Hsu, D., Takeoka, A., Zhong, H., Ramón-Cueto, A., Phelps, P. E., ... Edgerton, V. R. (2011). Further evidence of olfactory ensheathing glia facilitating axonal regeneration after a complete spinal cord transection. *Experimental Neurology*, 229(1), 109. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2011.01.007

EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	
SAYI: 2022-081 KONU: Onay	26.07.2023
Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda "PERİFERİK SİNİR HASARINDA OLFAKTÖR MUKOZAL MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ" isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.	
Yürütücü:	Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL EÜTF Histoloji ve Embriyoloji AD Arş. Gör. Sahar Ebrahim Ebrahim ORIF EÜ Sağlık Bilimleri Enst. Kök Hücre AD Doç. Dr. Hüseyin BİÇEROĞLU EÜTF Beyin ve Sinir Cerrahisi AD Arş. Gör. Dr. Kubilay Doğan KILIÇ EÜTF Histoloji ve Embriyoloji AD Arş. Gör. Dr. Özde ŞENOL Beyin ve Sinir Cerrahisi AD Arş. Gör. Derya ERIŞİK, EÜ Sağlık Bilimleri Enst. Histoloji ve Embriyoloji AD
Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.	
(KATILMADI) Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU (E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)	
(KATILMADI) Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU	Prof. Dr. Aytaç ONAL
Prof. Dr. Hüseyin TEZEL	Prof. Dr. Figen KIRKPINAR
(KATILMADI) Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN	(KATILMADI) Prof. Dr. Uğur KAYA
Prof. Dr. Okan BİLGE	Doç. Dr. Murat Celal SÖZBİLEN
Dr. Öğr. Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI	Uzm. Vet. Heh. F. Emrah ŞOYLU
(KATILMADI) Özcan NALBANTOĞLU	Melek Merve AYŞAROĞLU

T.C. Ege Üniversitesi REKTÖRLÜĞÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü	
Konu: Yürürlüğe giren proje öneriniz	04.12.2023
Sayın Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL, Aşağıda bilgileri özetlenen proje önerinize yönelik değerlendirme süreci tamamlanmış ve BAP Komisyonu tarafından desteklenmesi uygun görülen projeniz, proje sözleşmesinin Rektörlük Makamı tarafından onaylanmasıyla yürürlüğe girmiş bulunmaktadır. Tebrik eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim. Saygılarımla, Koordinatör Doç. Dr. İskender INCE	
Proje Bilgileri	
Proje no	31851
Proje adı	Periferik Sinir Hasarında Olfaktör Mukozal Mezenkimal Kök Hücrelerinin Terapötik Etkinliğinin İncelenmesi
Proje türü	Genel Araştırma Projesi
Proje grubu	Tıp Sağlık
Proje süresi	24 ay
Başlangıç tarihi	21.11.2023
Proje bütçesi	₺136.317,00
Proje yürütücüsü	Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL
Araştırmacılar	Araş. Gör. Derya ERIŞİK, Araş. Gör. Kubilay Doğan KILIÇ, Araş. Gör. Özde ŞENOL AKBULUT, Doç. Dr. Hüseyin BİÇEROĞLU, Doktora Öğrencisi Sahar Ebrahim Ebrahim ORIF

Teşekkür

Beni büyüten, seven, koruyan ve hep destek veren annem Omaima Ahmed KHAİRY ve rahmetli babam Ebrahim Ebrahim ORİF, ağabeyim Ahmed ORİF, kardeşim Mohammed ORİF, Kuzenlerim Ebrahim ORİF, Mohammed HAMDY, Hussein HAMDY, Asmaa ORİF'e;

Tezim boyunca kıymetli bilgi ve birikimleri ile bana yol gösteren, yardımını esirgemeyen, gerçek bir bilim insanı ve her durumda destek veren değerli danışmanım Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e;

Çalışmanın hücre kültürü kısmında destek veren Araş. Gör. Derya Erişik'a; Femoral sinir hasarlanması modelinin oluşturulmasında kıymetli vakitleri veren Ege Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Ana Bilim Dalından Doç.Dr. Hüseyin BİÇEROĞLU, Dr. Özde Şenol AKBULUT ve Dr. Bilal Bahadır AKBULUT'a;

Sensoriyomotor testlerin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalından Dr. Fulya TUZCU Ve Dr. Ramazan GÖKMEN'e, tez çalışmasının RT-PCR kısmında Tıbbi Genetik Ana bilim Dalı başkanı Prof.Dr. Haluk AKIN, Prof.Dr. Emin KARACA, PCR analizlerimi büyük bir sabırla yapan değerli Dr. Levent PARALI ve statistik yapan Doç. Dr. Timur KOSE'ye;

Ege Üniversitesi Kordon Kanı, Hücre-Doku UAM çalışanları Doç. Dr. Eylem Arslan, Uzm. Biyo. Şebnem YILDIRIM KÜREKÇİ, Uzm. Kimyager GÜLÇE ÖZMEN, Gülşah USTA, Tolga FIRAT ve Nihal EROĞLU'na;

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalından arkadaşlarım Uzm. Dr. Canberk TOMRUK, Dr. Kubilay Doğan KILIÇ, Uzm. Biyo. Cansın ŞİRİN TOMRUK, Uzm. Biyo. Ebru EROĞLU ve tüm histolojik ve immünohistokimyasal analiz dönemlerinde bana yardım eden Erdinç YILMAZ'a;

Sensoriyomotor testlerin materyallerinin destekçileri Alper Cüneyt TENLİ ve Yalçın DÖNMEZ beylere;

TEŞEKKÜR EDERİM....

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'nün maddi desteği ile hazırlanmıştır. Projenin takip numarası TS-GAP-2023-31851'dir. Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığına (YTB), kalbime çok yakın ülke, Türkiye'de ve en büyük

üniversitelerden biri olan Ege Üniversitesinde 19EG016658 numaralı bursiyer olarak eğitim alma ve doktora derecemi tamamlama şansı verdikleri için çok teşekkür ederim.



Özgeçmiş

Curriculum Vitae_Sahar Ebrahim Ebrahim Ebrahim Orif

Address: Mansoura, Dakahlia, Egypt

Phone: +90 5555555515

Email: sahar.rahman@mansoura.edu.eg sahar.rahman@mansoura.edu.eg

OrcID: <https://orcid.org/0000-0002-4159-0196>

ResearcherID: <http://www.researcherid.com/rid/N-6654-2018>

Researchgate: <https://www.researchgate.net/profile/Sahar-Orif>

Postal address: Mansoura University, Mansoura, Egypt

Postal code: 35516

EDUCATION

B.S. of Veterinary Medicine

May, 2014

- School: Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt.
- Grade: Very Good with Honors
- seventh 7% of the group (7th out of 500 students)

Master's degree

March, 2018

- Thesis Title: Ultrastructure of the Olfactory Region in Dogs
- School: Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt.
- Grade: Excellence with Honors

RESEARCH EXPERIENCE

Research Assistant (September 2021-Present)

- Department of Stem Cells, Graduate School of Health Sciences, Ege University, Izmir, Turkey.
- Application and Research Center of Cord Blood Cell-Tissue, Faculty of Medicine, Ege University, Izmir, Turkey.
- Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Ege University, Izmir, Turkey.

Research Assistant (October 2019-September 2020)

- Takahashi Lab., Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, Tsukuba University, Ibaraki, Japan.

Research Assistant (February 2015-Present)

- Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt.
- Collect, maintain and statistically evaluate data for ongoing studies including anatomical and embryological studies.
- Participate in the research group and present research output where appropriate.
- Evaluate methods and techniques used and results obtained by other researchers and to relate such evaluations appropriately to their own work.
- Generate research output and contribute to the generation of independent and original ideas, as appropriate.
- Collection, analysis, validation and verification of numeric data.

TEACHING EXPERIENCE

Teaching Assistant of general & comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Med., Mansoura University (February 2015-Present)

- Practical Anatomy and Embryology course (2 years/4 semesters).
- Lecture on and demonstrate the applied and comparative anatomy of different animals.
- Assist students in everyday laboratory routines.
- Check equipment prior to classes and ensure that all requirements are in place.
- Prepare laboratories for practices.
- Ensure that safe working practice is adhered to by staff and students during classes.
- Trouble-shoot and respond to problems which may occur during practical classes.

Teaching Assistant in “Faculty of Dentistry, Mansoura Uni.” Anatomy & Embryology of Head and Neck (February 2017- May 2019)

Teaching Assistant in “Specialized Food Safety & Human Health Program” (September 2017-Present)

Teaching Assistant in “Specialized Pet Animals Program” (September 2018-Present)

ACADEMIC & ADMINSTRATIVE POSITIONS

Demonstrator of Anatomy and Embryology (February 2015-April 2018)

Department of Anatomy and Embryology.

Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt.

Assistant lecturer of Anatomy and Embryology (May 2018-Date)

Department of Anatomy and Embryology.

Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, Mansoura, Egypt.

SCINTIFIC RESEARCHES & ARTICLES

- Ultrastructure of the olfactory region in dogs (Canis Familliaris) in relation to Histochemistry & Immuno-histochemistry. Published in Mansoura Veterinary Medical paper, 2018, 19.

GRANTS & SCHOLARSHPS

- Winning the competitive fellowship from YTB for a full PhD scholarship at Ege University (August, 2019).

- Winning the competitive fellowship from (EJEP Call 4: Human Resource Development Project-2019/2020) for a PhD Joint Supervision Mission at Tsukuba University under supervision of Prof. Dr. Satoru Takahashi MD, PhD (June 9, 2019)

- Winning the competitive grant (the only winner) presented from the Electron Microscopy Unit, Mansoura University for master degree under the research grants number MUEMG1 and with fund of 10.000 LE (December 1, 2015)

WORKSHOPS, COURSES & SYMPOSIUMS

- The International Symposium on “Cancer and Stem Cell” organized by Ege University, Faculty of Medicine (December 2, 2023)
- Zesty Webinar: Emerging Technologies: Partnering for Accessibility, Discoverability and Sustainable Future (November 21, 2023)
- NanoString Technologies Webinar: Scientist to Scientist: Use of Spatial Biology in Translational research (February 21, 2023)

- NanoString Technologies Webinar: Spatial Proteomics Highlights the Effect of Spaceflight on the Mouse Brain (February 14, 2023)
- NanoString Technologies Webinar: High plex in situ profiling of mouse brain sections with the CosMx Spatial Molecular Imager (January 26, 2023)
- NanoString Technologies 2022 Spatial Biology World Tour- Turkey Roadshow (October 25, 2022)
- NanoString Technologies Webinar: The Spatial Landscape of Progression and Immunoediting in Primary Melanoma at Single-Cell Resolution (August 24, 2022)
- NanoString Technologies Webinar: Spatial Profiling Links Genetic Diversity to Immune Infiltration in Glioblastoma (August 22, 2022)
- First International Symposium of Ege University Graduate School of Health Sciences | Update on Cancer Basics (June 8, 2022)
- "The Science of Stem Cells" an online non-credit course authorized by American Museum of Natural History and offered through Coursera (May 30, 2022)
- "International Symposium of Cellular Therapies and Regenerative Medicine: From Lab Bench to Clinic", Online Meeting, IZMIR-TURKEY (May 21-22, 2021)
- "International Symposium of Cellular Therapies and Cancer: From Lab Bench to Clinic", Online Meeting, IZMIR-TURKEY (May 19-20, 2021)
- The online module entitled "Taking your Class room Online TYCO" within the DAAD Kairo Akademie (June 3, 2020)
- Workshop on "Lecturer Preparation" in Mansoura University (July 13-18, 2019)
- The Module entitled "Self-Management" within the DAAD Kairo Akademie (July 13, 2019)
- The Module entitled "Scientific Thinking and Argumentation Skills for Problem Solving" within the DAAD Kairo Akademie (June 27, 2019)
- The Module entitled "Proposal Writing for Master & PhD Candidates" within the DAAD Kairo Akademie (June 26, 2019)
- Training course on "Conference Organization" (May 26-27, 2019)
- Workshop on "Inventory Management System from Purchasing to Waste Disposal in Biomedical Laboratories in Mansoura University" (May 5-7, 2019)
- The Science's Day of Mansoura University in Central Library of the University (April 8, 2019)

- First International Symposium at Faculty of veterinary Medicine during the Erasmus Week in Mansoura University "Veterinary Medicine & Health", (March 19-20, 2019)
- Workshop on "Philosophy of Sciences" held at Faculty of Sciences, Mansoura University (March 4, 2019)
- Training course on “Scientific research web engines and classification methods of universities” (March 3-4, 2019)
- Workshop on “Skills of Statistical Analysis for Researches and Scientific Theses” (February 12, 2019)
- The Third Egyptian Bioinformatics Workshop held at Nile University (December 23, 2018)
- 5th BioKMT Research network “Biological sciences from bench to market” held at Academy of Scientific Research & Technology (ASRT), Cairo, Egypt (December 22, 2018)
- Workshop of Elsevier - EKB Tour (22/10 - 11/12) 2018, at Mansoura University, Egypt (November 6, 2018)
- Training course on "Managing & Indexing The References Electronically" (October 28-29, 2018)
- Course 1 "Grammar and Punctuation” of Academic English: Writing Specialization (5 Courses) by University of California, Irvine on Coursera (September 19, 2018)
- Workshop on “Writing for A Grant” (Center of Excellence in Molecular & Cellular Medicine, Faculty of Medicine-Suez Canal University, Egypt) (August 29, 2018)
- Training course on “How to Write a Scientific Article” (August 12-13, 2018)
- Training course on "Managing Crises & Disasters" (May 6-7 , 2018)
- Workshop on “How to join European Funded Projects” (April 22, 2018)
- Workshop under title of “Fund-raising for Research via Writing Effective Research Proposal” (April 15, 2018)
- MEMBS Molecular Biology Day - Egypt (1) held in National Cancer Institute (March 28, 2018)
- Workshop on Bio-risk Management (March 15, 2017)
- The state of the art and the challenges of the diagnosis of brucellosis (October 26, 2016)
- Biosafety and Biosecurity Measures of Trans-boundary Zoonotic Diseases (August 22, 2016)
- Training Course on "Use of Technology in Teaching" (July 17-18, 2016)

- Workshop on Strategic planning (May 31, 2016)
- Training course on “The Ethics of Scientific Research” (May 29-30, 2016)
- Training course on “Use of Databases”) May 23, 2016)
- Training course on “Quality Standards in the Education Process” (January 24-26, 2016)
- Training course on “University Code of Ethics” (November 24-25, 2015)
- Training course on “Managing Time and Meetings” (September 8-9, 2015)
- Training course for using SPSS (August, 2015)
- Training course for using End Note (August, 2015)
- Workshop on The Newton-Mosharafa Grants between UK & Egypt (June 16, 2015)
- Training course on “Effective Presentation Skills” (May 24-25, 2015)
- Training course on "plagiarism" (March , 2015)
- Agitations control, Self-Confidence and Self-Expression (Egyptian Fiky Scholarship for Human Development/Canady Center) (October, 2010)

SEMINARS & CONFERENCES

- Seminar II “Parkinson’s Disease & Cells Therapy” Ege University, Graduate School of Health Sciences, Stem Cells Department (January 6, 2022)
- Seminar I “Alzheimer's Disease & Stem Cells Therapy” Ege University, Graduate School of Health Sciences, Stem Cells Department (May 21, 2021)
- Internationalization of Higher Education Conference of Mansoura University (March 18-20, 2019)
- Tenth International Scientific Conference of Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University (October 3-6, 2018)
- First International Congress of Food Safety and Hygiene “Food Safety & Human Health” (April 16, 2018)
- Ninth International Scientific Conference of Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University (December 7-10, 2016)

LANGUAGE SKILLS

- Excellent command of spoken and written Arabic and English.
- Turkish Language: C1 level

- French: B2 level

MEMBERSHIPS

- Member, Egyptian Veterinary Syndicate (September 2014- Date)
- Member of the Executive Team of the CIQAP Project for Quality Assurance and Qualification in faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University (February 2015- Date)

CONTRIBUTIONS TO COMMUNITY SERVICES

- Project Member & Speaker: “Career Journey from Life Sciences to Basic Sciences_23.12.2023” Ege University, Faculty of Medicine (December 09-24, 2023)
- Project Member: “4 October, World Animal Day” Visiting Ege University Disabled Children Rehabilitation and Education Park, and Visiting Our Animal Friends at Ege University Application and Research Central Garden (October 4, 2022)
- Project Member: The Environment Week “The Green Campus of Blue EGE” at Ege University, Faculty of Medicine (June 9, 2022)
- Participated in seminars and public lectures organized by Mansoura University to increase environmental awareness and methods of prevention of diseases and epidemics (February 2015- Present).
- Participated in social activities and services carried by concerned teams at Mansoura University (February 2015- Present).