

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
CERRAHİ ANABİLİM DALI



RATLARDA PERİFERAL SİNİR HASAR VE
RUPTURLARINDA SİNİR REJENERASYONU
ÜZERİNE KÖK HÜCRE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
DOKTORA TEZİ
Sema Dilan KAYAPINAR
2022

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Ali Said DURMUŞ
Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Cengiz HAN

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr.Emine ÜNSALDI

Prof. Dr.Caner Feyzi DEMİR

Prof. Dr. Ali HAYAT

Prof. Dr. Mehmet Cengiz HAN

Doç. Dr. Cafer Tayer İŞLER



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Sema Dilan KAYAPINAR

Tarih

İmza

Prof. Dr. Mehmet Cengiz HAN

Cerrahi Anabilim Dalı

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Beni yetiştirip bu günlere getiren, tez çalışmam boyunca maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen, süreci benim için kolaylaştıran ve her daim yanımda olan babam Mehmet KAYAPINAR, annem Elif KAYAPINAR ve ağabeyim Samet KAYAPINAR'a ve bu süreç boyunca her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Mehmet Cengiz HAN'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. Sinir Sistemi	5
3.2. Sinir Sistemi Anatomisi	5
3.2.1. Merkezi Sinir Sistemi.....	6
3.2.1.1. Medulla Spinalis (Omurilik)......	7
3.2.2. Periferik Sinir Sistemi	7
3.2.2.1. Kafa Sinirleri (Nervi Craniales)	7
3.2.2.2. Omurilik Sinirleri -Spinal sinirler (Nervus spinalis).....	8
3.2.2.2.1. Plexus Cervicalis (Boyun Sinir Ağı)	9
3.2.2.2.2. Plexus Brachialis (Kol Sinir Ağı)	9
3.2.2.2.3. Plexus Lumbalis (Lumbal Sinir Ağı).....	9
3.2.2.2.4. Sacralis (Sakrum Sinir Ağı).....	9
3.2.3. Otonom Sinir Sistemi (Visseral – Vegetatif sinir sistemi).....	10
3.3. Sinir Sistemi Morfolojisi	10
3.4. Periferik Sinir Yaralanmaları	11

3.5. Periferik Sinir Yaralanmalarında Tedavi Yaklaşımı	13
3.6. Kök Hücre Tanımı ve Özellikleri	15
3.6.1. Kök Hücre Tipleri	16
3.6.2. Kök Hücrelerin Kullanıldıkları Alanlar	19
3.6.3. Kök Hücrelerin Doku Onarımı Üzerine Etkisi.....	20
4. MATERYAL - METHOD	23
4.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi	23
4.2. Hazırlık Aşaması	23
4.3. Kemik iliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	24
4.4. Sıçan Kemik İliği MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü	25
4.5. Transfer İçin Hücrelerin Hazırlanması.....	26
4.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Karakterizasyonu	28
4.6.1. RNA İzolasyonu	28
4.6.2. cDNA sentezi	28
4.6.3. Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu	29
4.7. Deneyin Gerçekleştirilmesi ve Takibi.....	30
4.8. Postoperatif Bakım	33
4.9. Değerlendirme Yöntemleri.....	33
4.9.1. Kavrama Testinin Uygulanması.....	33
4.9.2. Adım İzi Testinin Uygulanması Ve Siyatik Fonksiyon İndeksinin Ölçülmesi	35
4.9.3. Sıcak levha (Hot Plate) Testinin Uygulanması	38
4.9.4. Elektromiyografi Ölçümlerinin Yapılması.....	39
4.9.4.1. Siyatik Sinir Motor İletim Çalışması.....	40
4.9.5. Histopatolojik Yöntem	43

5. BULGULAR	47
5.1. Klinik Değerlendirme Bulguları.....	47
5.2. Kavrama Testi Bulguları	49
5.3. Adım İzi Testi Bulguları	51
5.4. Hot Plate Testi Bulguları.....	53
5.5. Elektromyografi Test Bulguları	55
5.6. Histopatolojik Bulgular	58
5.7. İmmunohistokimyasal Bulgular	67
6. TARTIŞMA	77
7. KAYNAKÇA	88
8. ÖZGEÇMİŞ.....	95

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Grupların şematize edilmesi.....	24
Tablo 2.	Sıçan spesifik primer dizileri.....	29
Tablo 3.	Histopatolojik skrolama yöntemi (hematoksilen-eozin, Masson' un üçlü boyama yöntemi ve luxol fast blue)	45
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan primer antikolar	45
Tablo 5.	İmmunohistokimyasal skrolama yöntemi.	46
Tablo 7.	Kavrama Testi İstatiksel Verileri	50
Tablo 8.	Adım izi testi istatiksel verileri	52
Tablo 9.	Hot-Plate Testi istatiksel verileri.....	54
Tablo 10.	8. Haftada Çekilen EMG grafiği	56
Tablo 11.	EMG istatiksel değerlendirme bulguları	56
Tablo 12.	Histopatolojik istatistiksel değerlendirme sonuçları	59
Tablo 13.	İmmunohistokimya skrolama değerleri.....	68

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Sinir sisteminin bölümleri	6
Şekil 2.	Medulla Spinalis.....	6
Şekil 3.	Spinal Sinirler.....	8
Şekil 4.	Nöron yapısı	11
Şekil 5.	Akson Dejenerasyonu (Wallerien Dejenerasyon)	13
Şekil 6.	Aksonal rejenerasyon süreci.....	14
Şekil 7.	Kök hücrenin bölünme ve farklılaşması. A: kök hücre; B: öncü hücre; C: farklılaşmış hücre; 1: simetrik kök hücre bölünmesi; 2: asimetrik kök hücre bölünmesi; 3: öncü bölünme; 4: son farklılaşma (18,19).....	16
Şekil 8.	Kök hücre türleri ve farklılaşma özellikleri.	17
Şekil 9.	Kemik İliği Kök Hücrelerinin Falkon Tüpe Aktarılması	26
Şekil 10.	İzole Edilen Kök Hücrelerin Çıkarılması.....	27
Şekil 11.	Tedavi Amaçlı Hazırlanmış Kök Hücreler.....	27
Şekil 12.	Operasyon Sahasının Açılması Sinirin Ortaya Çıkarılması	31
Şekil 13.	Tam kat kesi oluşturulan Siyatik Sinir	32
Şekil 14.	Hemostatik Pens İle Sıkılarak Hasar Oluşturulan Siyatik Sinir.....	32
Şekil 15.	Siyatik Sinire Kök hücre uygulanması.....	33
Şekil 16.	Kavrama testinin uygulanışı.....	34
Şekil 17.	Adım İzi Düzenegi	35
Şekil 18.	Ratlara Adım İzi Düzeneginin Uygulanışı.....	36
Şekil 19.	Ratlardan Alınan Adım İzi	36
Şekil 20.	Hot plate cihazı.....	38
Şekil 21.	Hot plate Testinin Ratlarda Uygulanışı.....	39
Şekil 22.	EMG Cihazı.....	40
Şekil 23.	Ratların Siyatik Sinir Motor İletim uygulanmasında Uyarım ve Kayıt Noktaları; A- proksimal uyarım noktası, B- distal uyarım noktası, C- kayıt noktası	41
Şekil 24.	Uyarım Elektrotlarının Uygulanış Yerleri.....	42
Şekil 25.	Uyarımın Verilmesi ve Kayıt	42

Şekil 26.	8. Haftada hasar oluşturulmuş kök hücre grubuna kavrama testi uygulanan deneğimiz.....	49
Şekil 27.	Ratların tümünde topuk ve parmak ucu arasındaki mesafe – bası uzunluğu, birinci ve beşinci parmaklar arası mesafe-adım genişliği, ikinci ve dördüncü parmaklar arası mesafe- adım ortası genişlik ölçüldü.	52
Şekil 28.	Tüm Ratlarda Hot Plate Testini Uygulanışı	54
Şekil 29.	Kontrol hasar grubunda normal sinir bölgesi (n), hasarlı bölge (h) ve hasarlı bölgede görülen aksonal dejenerasyonun vakuoler görüntüsü, Waller dejenerasyonu (oklar), HxE, 10X.....	60
Şekil 30.	Kontrol hasar grubunda hasarlı bölgede görülen şiddetli aksonal dejenerasyonun vakuoler görüntüsü, Waller dejenerasyonu (oklar), HxE, 20X.....	60
Şekil 31.	Kontrol hasar grubunda normal sinir bölgesinde sayıları artmış damarlar (oklar), HxE, 10X.....	61
Şekil 32.	Kontrol hasar grubunda normal sinir bölgesi (n), hasarlı bölge (h) ve hasarlı bölgede görülen bağ doku formasyonu (oklar), Masson’ un üçlü boyaması, 10X.....	61
Şekil 33.	Kök hücre hasar grubunda normal sinir bölgesi (n), hasarlı bölge (h) ve hasarlı bölgede görülen aksonal dejenerasyonun vakuoler görüntüsü, Waller dejenerasyonu (oklar), HxE, 10X.....	62
Şekil 34.	Kök hücre hasar grubunda hasarlı bölgede görülen şiddetli aksonal dejenerasyonun vakuoler görüntüsü, Waller dejenerasyonu (oklar), HxE, 20X.....	62
Şekil 35.	Kök hücre hasar grubunda hasarlı bölgenin sinir kılıfında görülen mononükleer hücre infiltrasyonları (oklar), HxE, 20X.	63
Şekil 36.	Kök hücre hasar grubunda normal sinir bölgesi (n), hasarlı bölge (h) ve hasarlı bölgede görülen bağ doku formasyonu (oklar), Masson’ un üçlü boyaması, 10X.....	63
Şekil 37.	Kontrol hasar grubunda (KH) ve kök hücre hasar grubunda (KHH), sinir kılıfında, benzer görünümde miyelin pozitifliği (oklar), Luxol fast blue boyaması, 10X.....	64

Şekil 38.	Kontrol ruptur grubunda, ruptur bölgesinde görülen şiddetli aksonal dejenerasyon (oklar) ve bağ doku formasyonu (asteriksler), HxE, 10X.....	64
Şekil 39.	Kontrol ruptur grubunda, ruptur bölgesinde görülen aksonal dejenerasyon (okbaşları) bağ doku formasyonu (asterik) ve hafif şiddette mononükleer hücre infiltrasyonu (ok), HxE, 20X.	65
Şekil 40.	Kök hücre ruptur grubunda, normal sinir bölgesi (n), ruptur bölgesi (r) ve proliferasyon bölgesi (p), HxE, 4X.	65
Şekil 41.	Kök hücre ruptur grubunda, ruptur sonrası gelişen şiddetli proliferasyon, sinirde şiddetli kalınlaşma, HxE, 4X.	66
Şekil 42.	Kontrol ruptur (KR) ve kök hücre ruptur grubunda (KHR) ruptur bölgelerinin görünümü, KHR grubunda aksonal dejenerasyon (oklar), KH grubuna kıyasla daha az, bağ doku formasyonu (asteriksler) ise daha fazla, HxE, 10X.	66
Şekil 43.	Kontrol ruptur (KR) ve kök hücre ruptur grubunda (KHR) ruptur bölgelerinin görünümü, KHR grubunda bağ doku formasyonu (oklar), KR grubuna kıyasla daha fazla, Masson' un üçlü boyaması, 10X.....	67
Şekil 44.	Kontrol ruptur grubunda (KR) ve kök hücre ruptur grubunda (KHR), sinir kılıfında, azalmış ve benzer görünümde miyelin negatifliği (oklar), Luxol fast blue boyaması, 10X.	67
Şekil 45.	Kontrol hasar grubunda, hasar bölgesinde (h), normal sinir bölgesine (n) göre azalmış MBP pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 10X.....	69
Şekil 46.	Kontrol hasar grubunda, hasar bölgesinde (H), normal sinir bölgesine (N) göre azalmış MBP pozitifliği (kırmızı boyalı alanlar), immunperoksidaz boyama, 10X.....	70
Şekil 47.	Kök hücre hasar grubunda, hasar bölgesinde (h), normal sinir bölgesine (n) göre azalmış MBP pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.....	70
Şekil 48.	Ruptur grubunda, ruptur bölgesinde (R), normal sinir bölgesine (N) göre ileri derecede azalmış MBP pozitifliği (kırmızı boyalı alanlar), immunperoksidaz boyama, 10X.....	71

Şekil 49.	Kök hücre ruptur grubunda, ruptur bölgesinde (R), normal sinir bölgesine (N) göre ileri derecede azalmış MBP pozitifliği (kırmızı boyalı alanlar), immunperoksidaz boyama, 10X.	71
Şekil 50.	Kontrol hasar grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (oklar) immunperoksidaz boyama, 20X.....	72
Şekil 51.	Kontrol hasar grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (okbaşları) ve CD68 pozitif Schwann hücreleri (oklar), immunperoksidaz boyama, 40X.	72
Şekil 52.	Kök hücre hasar grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (okbaşları) ve CD68 pozitif Schwann hücreleri (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.....	73
Şekil 53.	Kontrol ruptur grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (okbaşları) ve CD68 pozitif Schwann hücreleri (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.....	73
Şekil 54.	Kök hücre ruptur grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (okbaşları) ve çok sayıda CD68 pozitif Schwann hücresi (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.	74
Şekil 55.	Kontrol ruptur grubunda cerrahi sütür çevresine yoğunlaşmış S100 pozitif mikrogliya hücreleri, immunperoksidaz boyama, 20X.	74
Şekil 56.	Kontrol hasar grubunda damarlarda NGF pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 40X.....	75
Şekil 57.	Kök hücre hasar grubunda damarlarda NGF pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 40X.....	75
Şekil 58.	Kontrol ruptur grubunda damarlarda NGF pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.....	76
Şekil 59.	Kök hücre ruptur grubunda, damarlarda NGF pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.....	76

KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AEC	: 3 amino-9-etilcarbazole
AKH	: Adipoz doku kök hücreleri
ASY	: Ateşli silah yaralanması
BUF	: Baskı Uzunluk Faktörü
CMAP	: Birleşik kas aksiyon potansiyali
CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
CV	: İleti hızı-conduction velocity
DEPC	: Dietilpirokarbonatlı
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Media, (besi yeri)
EIT	: Atolojik ayakta ikinci ve dördüncü parmak arası mesafe
EKH	: Embriyonik kök hücre
EMG	: Elektromiyografi
EPL	: Patolojik bası uzunluğu
ETS	: Patolojik ayakta birinci ve beşinci. parmak arası mesafe
HKH	: Hematopoietik kök hücreler
IM	: Intramusküler
IV	: Intravenöz
KH	: Kök hücreler
LP	: Lomber ponksiyon
MKH	: Mezenkimal kök hücreler

MNCV	: Motor sinir ileti hızı- motor nerve conduction velocity
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MU	: Motor ünit
N.	: Nervus
NIT	: Normal ayakta ikinci ve dördüncü parmak arası mesafe
NKH	: Nöral kök hücreler
NPL	: Normal bası uzunluğu
NTS	: Normal ayakta birinci ve beşinci parmak arası mesafe
OAF	: Orta Parmak Ayrıklık Faktörü
PAF	: Parmak Ayrıklık Faktörü
PBS	: Phosphate Buffered Saline
Rpm	: Revolutions per Minute
SFI	: Siyatik Fonksiyon İndeksi
SSS	: Santral sinir sistemi

1. ÖZET

Kök hücre tedavisi cerrahi ve medikal olarak tedavi edilemeyen perifer sinir yaralanmalarında potensiyel bir tedavi yöntemidir. Bu çalışmada siyatik sinir hasar ve rupturlarında kök hücrenin iyileşme üzerine etkilerini deneysel rat modelinde araştırılması amaçlandı.

Çalışmada yaklaşık 250 gr ağırlığında, yaşları 2 aylık olan 56 adet winstar albino dişi rat kullanıldı. Ratlar, her bir grupta 14 adet rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Ratlar genel anesteziye alındı. Sol arka bacak dorsalinde gluteal kasların hemen üzerinden 2 cm uzunluğunda bir ensizyon oluşturuldu. Gluteal kaslar küt olarak ayrılacak ve siyatik sinire ulaşıldı. 1. ve 2. Grupta hemostatik pens yardımıyla siyatik sinir 1 dk boyunca sıkılarak hasar oluşturuldu, 3. ve 4. ise siyatik sinirde tam katlı ruptur oluşturuldu. Kesilen siyatik sinir epineuriumu karşı karşıya sütür edildikten sonra 1. ve 3. Grup ratlara epineurium içerisine subparaneural $2,5 \times 10^5$ kök hücre enjekte edildi. Yaralar basit ayrı sütür ile kapatıldı. Postoperatif olarak ratlar günlük gözlemleri yapıldı. Bunun yanında on beş günlük aralıklarla 8 hafta boyunca kavrama testi, adım izi testleri uygulandı. Son hafta hot plate testi ve EMG testi yapıldı.

Kök hücre uygulanan grupların kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunurken, tüm grup içerisinde postoperatif yapılan testlerde hasar oluşturulmuş kök hücre grubunun diğer gruplardan, istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi.

Postoperatif 8 hafta sonunda sonra ötenazi edilen ratların lezyonlu sinir dokuları histopatolojik değerlendirmede kök hücre uygulanan grupların kontrol

gruplarına anlamlı farklılıklar görüldü. Sonuç olarak periferik sinir hasarlarının onarımında, kemik kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulaması (yapılan motor fonksiyon ve histolojik değerlendirmeye göre) olumlu etki göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Siyatik Sinir, Dejenerasyon, Kök Hücre, Rat



2. ABSTRACT

Stem cell therapy is a potential treatment method for peripheral nerve injuries that cannot be treated surgically or medically.

In this study was aimed to investigate the effects of stem cells on healing in sciatic nerve damage and ruptures in an experimental rat model.

In the study, 56 winstar albino female rats, weighing approximately 250gr and aged 2 months, were used. Rats were randomly divided into 4 groups with 14 rats in each group. Rats were placed under general anesthesia. A 2 cm long incision was made just above the gluteal muscles in the dorsal left hind leg. The gluteal muscles will be divided bluntly and the sciatic nerve has been reached. In the 1st and 2nd groups, damage was created by squeezing the sciatic nerve for 1 minute with the help of hemostatic forceps, and a full-fold rupture was created in the sciatic nerve in the 3rd and 4th. After suturing the epineurium of the cut sciatic nerve, subparaneural 2.5×10^5 stem cells were injected into the epineurium of the 1st and 3rd group rats. The wounds were closed with simple separate sutures. Daily observations of the rats were made postoperatively. In addition, grasping test and step-track tests were applied for 8 weeks at 15-day intervals. Hot plate test and EMG test were performed in the last week.

While there were statistically significant differences in the stem cell applied groups compared to the control groups, it was determined that the damaged stem cell group in the postoperative tests showed a statistically significant difference from the other groups.

In the histopathological evaluation of the lesioned nerve tissues of the rats, which were euthanized after 8 weeks postoperatively, significant differences were observed between the stem cell applied groups and the control groups.

As a result, bone-derived mesenchymal stem cell application has a positive effect on peripheral nerve repair (according to motor function and histological evaluation).

Keywords: Sciatic Nerve, Stem Cell, Degeneration, Rat



3. GİRİŞ

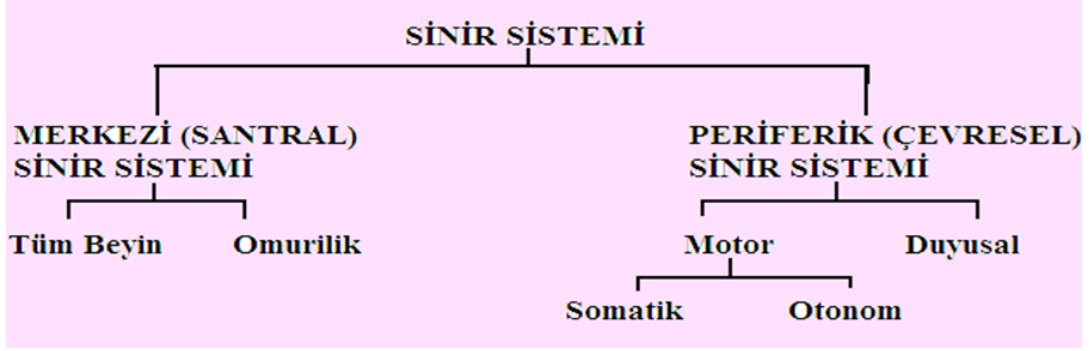
3.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, vücut sinir lifleri ve sinir hücrelerinden oluşan karışık bir sistemdir. Sinir sistemi sayesinde, çeşitli duyu organlarından gelen bilgiler, taşınır, kaydedilir ve uygun cevaplar meydana getirir(1-3). Sinir sistemi vücut içi mekanizmaların (örneğin hormonların salgılanması) kontrolünü yapar. Yürümek gibi temel hareketlerin istemli kontrolünü sağlar. Ayrıca hafıza ve öğrenme için gerekli tecrübelerin oluşturulmasını sağlamaktadır (4,5). Sistem duyuuları algılama uyarılabilme, iletebilme, ve uyarılara cevap verme özelliğine sahiptir (5-7).

3.2. Sinir Sistemi Anatomisi

Sinir sistemi nöron (neuron) adı verilen sinir hücrelerinden oluşur. Bir sinir hücresinde perikaryon (gövde), perikaryona bağlı uzantılar bulunur. Bu uzantılar sinir lifi ya da neurit olarak adlandırılır. Uzun ve kısa olmak üzere iki çeşit uzantı bulunur, bunlardan kısa olanı dendrit olarak adlandırılır. Çevre dokulardan gelen uyarılar dendrit aracılığıyla ile sinir hücrelerine taşınırlar. Uzantılardan uzun olanı ise akson olarak adlandırılır. Akson ise sinir hücrelerinden çevre dokulara ileti götürür. Dendrit sayısı bir ya da daha fazladır, akson tektir (8,9).

Sinir sistemi; merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki bölümdür (Şekil 1) (8,9).

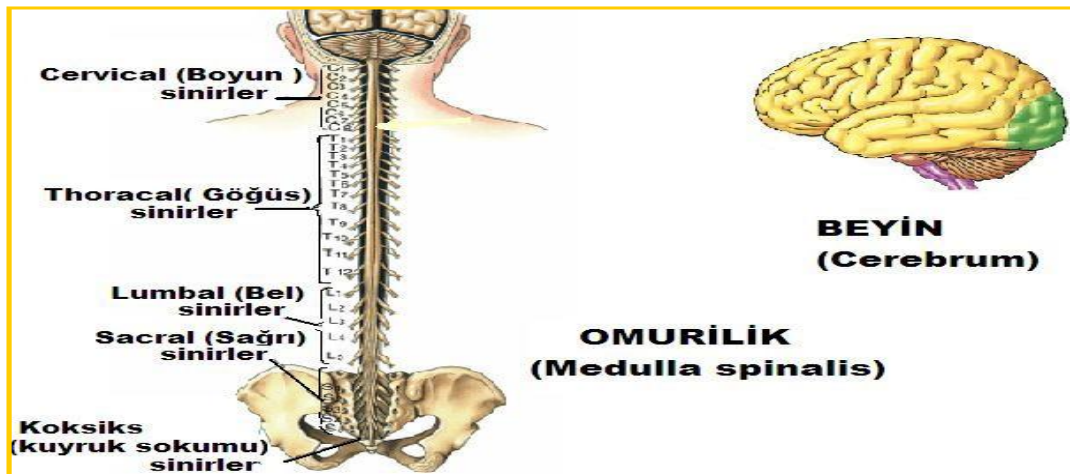


Şekil 1. Sinir sisteminin bölümleri

3.2.1. Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sistemi, diğer adıyla santral sinir sistemi olarak isimlendirilir. Merkezi sinir sisteminin yapısını beyin ve omurilik (medulla spinalis) oluşturmaktadır. MSS'nin yapısında substantia alba (beyaz cevher), substantia grisea (gri cevher) bulunmaktadır. Sinir hücrelerinin gövdeleri gri katmanda; uzantıları da beyaz katmanda bulunur (8-10).

Kafatası kemik sistemi içerisinde, beyin, bulunur. Columna vertebralisin (omurga) içinde ise medulla spinalis bulunur ve boyundan başlar, kuyruk sokumunda biter (Şeki 2)(8-10).



Şekil 2. Medulla Spinalis

3.2.1.1. Medulla Spinalis (Omurilik)

Medulla spinalis, merkezi sinir sisteminin önemli bir parçasıdır. Omuriliğin sinir hücrelerinden oluşan silindirik oluşuma sahiptir (8-10).

Ön boynuz ve arka boynuz olarak adlandırılan, medulla sipinalisin gri madde yapısının arka tarafında iki çıkıntısı vardır. Duyu ve motor sinirleri ön ve arka boynuzlardan giriş çıkış yaparlar. Nervus spinalis, sol ve sağ olmak üzere 31 çiftten oluşur (8-10).

3.2.2. Periferik Sinir Sistemi

Periferik sinir sistemi, 12 çift kranial (kafa) ve 31 çift spinal (omurilik) sinirden meydana gelmiştir. Perifer sinirler, merkezi sinir sistemi ile duyu organları, organlar, bezler ve kaslar arasındaki iletişimi sağlamakla görevlidir. Sensitif ve motor sinirlerden oluşurlar. Sensitif – duyu sinirleri organlardan merkezi sinir sistemine mesaj getirir, motor – çalıştırıcı sinirler ise merkezi sinir sisteminden organlara emir iletirler (6, 7,10).

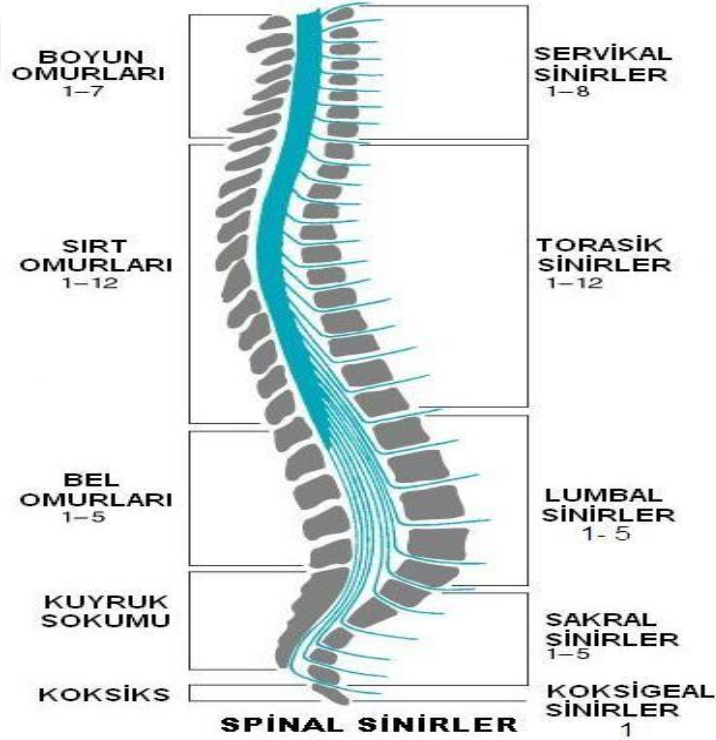
3.2.2.1. Kafa Sinirleri (Nervi Craniales)

Beyinden çıkan kranial sinirler, kafatası tabanındaki deliklerden geçip baş ve boyuna dağılırlar. Kranial sinirler 12 çift sinirden oluşur. Kranial sinirlerden, göğüs ve karın organlarına kadar ilerliyen, X. kafa çifti olan N. vagusdur. Kafa sinir çiftlerinde numaralandırılma beyne bağlantı sırasına göre önden arkaya doğrudur. Numaralar spesifiktir ve değişmez. Adlandırmalar ise şu şekildedir: I. Nervus olfactorius, II. Nervus opticus, III. Nervus oculomotorius, IV. Nervus trochlearis, V. Nervus trigeminus, VI. Nervus abducens, VII. Nervus Facialis, VIII. Nervus

vestibulo cochlearis, XI. Nervus glossopharyngeus, X. Nervus vagus, XI. Nervus accessorius, XII. Nervus hypoglossus (8,9)

3.2.2.2. Omurilik Sinirleri -Spinal sinirler (Nervus spinalis)

MSS'nin medulla spinalis kısmından 31 çift sinir çıkar. Bu sinirler omurilikten çıkan radiks anterior (ön kök) ve radiks posterior (arka kökün) omurlar arası delikler seviyesinde, birleşmesiyle oluşurlar. Ön köklerden motor sinirler arka köklerden duyu sinirleri çıkar. Omurlar arası deliklerden çıktıktan sonra her spinal sinir ön ve arka iki dala bölünür. Spinal sinirlerin arka dalları vücudun kaslarına motor dallar, sırt derisine ise duyu dallar verir. Ön dalları birbirleriyle birleşerek sinir ağını (plexus) oluştururlar (Şekil 3)(10-12).



Şekil 3. Spinal Sinirler

3.2.2.2.1. Plexus Cervicalis (Boyun Sinir Ağı)

Cervical sinirlerinin ilk dört tanesinin ön kollarının birleşmesinden Plexus cervicalis oluşur. Plexustan cervicalisten çıkan sinir diyaфраğma ve boyuna motor kollar verir. N. Phrenicus, diyaфраğmayı kontrol eden en önemli sinirdir (10-12).

3.2.2.2.2. Plexus Brachialis (Kol Sinir Ağı)

Plexus brachialis, 1. göğüs spinal sinirinin ön dalından ayrılan sinir ile 5-8. boyun sinirlerinin ön dalları sinirlerinin birleşmesiyle oluşur. Üst ekstremitedeki kaslar ile elde bulunan kasları inerve eden sinirdir. N. ulnaris, N. radialis, N. axillaris önemli sinirlerdir (10-12).

3.2.2.2.3. Plexus Lumbalis (Lumbal Sinir Ağı)

İlk dört lumbal sinirin ön dallarının birleşmesinden Plexus lumbalis meydana gelir. Motor ve duyu sinirler çıkar. Deri, karın kasları, kasık, kalça bölgesi, genital organlar ve uyluğa dallar verir. En kalın siniri N. Femoralis'dir (10-12).

3.2.2.2.4. Sacralis (Sakrum Sinir Ağı)

Sakrum sinir ağı, beşinci lumbal sinir ile ilk üç sakrum sinirin ön dallarının birleşmesinden meydana gelir. Buradan çıkan sinirler pelvis arka yan duvarlara ve alt ekstremitelere yayılır. N. ischiadicus (siyatik sinir) önemli siniridir. Siyatik sinir, vücutta en kalın ve en uzun sinirdir ve plexus sacralisin oluşumuna katılan bütün sinirlerden lifler alır. Bu sinir uyluğun 1/3 alt kısmında popliteaya varmadan önce iki kola ayrılır. N. ischiadicus ekstremit ve ayağın bütün kaslarına motor, ekstremitenin dış yan ve arka, ayağın duyu innervasyonunu yapar (10-12).

3.2.3. Otonom Sinir Sistemi (Visseral – Vegetatif sinir sistemi)

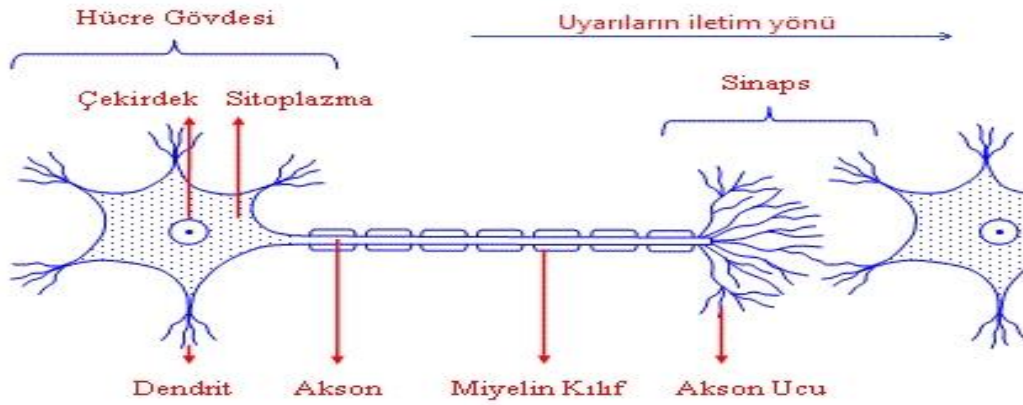
Otonom sinir sistemi; sindirim, solunum, metabolizma, sekresyon gibi önemli vucut fonksiyonlarının düzenlenmesi ve yürütülmesini sağlar. Bu görevleri istem dışı yapar (8-11).

Vegetatif sinir sistemi, beyin ile medulla spinalis kökenlidir. Bu sinir sistemine ait motor görevli sinirler, organları uyarı öncesi bir gangliona gelir ve sinaps oluştururlar. Sinapsdan öncesi nörona, preganglioner nöron; sinapsdan sonrası nörona ise postganglioner nöron adı verilir (8-11).

Bu sinir sistemi, parasempatik sinir sistemi ve sempatik sinir sistemi olarak ikiye ayrılır. Parasempatik sinir sistemi ve sempatik sinir sistemi, aynı organda birbirini kontrol edici zıt, karşıt oluştururlar. Yani sempatik sistem kalpte taşikardi oluştururken; parasempatik sistem ise bradikardi şeklinde etki gösterir (8-11).

3.3. Sinir Sistemi Morfolojisi

Periferal sinir sistemi kranial ve spinal sinirleri ve uzantılarını içeren sinir sistemidir. Sinir sisteminin temel olarak sinir hücreleri ve uzantılarından yani nöronlardan oluşur. Nöron yapısını hücre gövdesi, akson, dendritik bölge ve teledendron adlı yapılar oluşturur (Şekil 4) (13).



Şekil 4. Nöron yapısı

Hücrelerin birbirine bağlanmasını dendritler sağlar. Çok sayıda ve kısıdırlar. Dendritler dış ve iç çevreden uyarıları getiren afferent çıkıntılardır. İmpulsun ayrıldığı son sinir kısmı olan teledendronlar, sinaps olarak da isimlendirilir. Aksonlar sinir gövdesinden gelen iletileri sinir hücresinin dallarına ileten lif şeklindeki uzantılardır. Aksonlar silindirik yapıdadırlar, içerisinde yer alan aksoplazmanın yapısında, protein, hücre iskeletini oluşturan mikrotübül ve nöroflamanlar, sekretorik veziküller ve mitokondriyumlar vardır. Aksoplazma aksolemma adı verilen plazma membranı ile akson boyunca sarılıdır. Miyelinli aksonların çevresinde schwann hücreleri longitudinal çok katlı dizilim göstererek miyelin kılıfı oluştururlar(13).

3.4. Periferel Sinir Yaralanmaları

Perifer sinirlerin yaralanmaları, ezilme, sinirde gerilme ya da kesilmeye bağlı oluşabilir. Yaralanma sonrası sinirin proksimal ve distal bölümlerinde önemli patolojik değişiklikler meydana gelir. Hücresel düzeyde akson hasarı sonrası sinirin proksimal ve distal uçlarında, schwann hücrelerinde ve inflamatuvar hücre miktarında meydana gelen değişimler nörotrofik ve nörotropik mediatörler

vasıtasıyla oluşur. Distal uç kısımda kalmış olan aksonda ana hücre ile irtibatı kesildikten sonra "Wallerian" dejenerasyon ortaya çıkar (14).

Periferik sinir yaralanmalarını takiben iyileşme için geçen zaman çok uzun olur ve fonksiyonda kayıplarına yol açar (14).

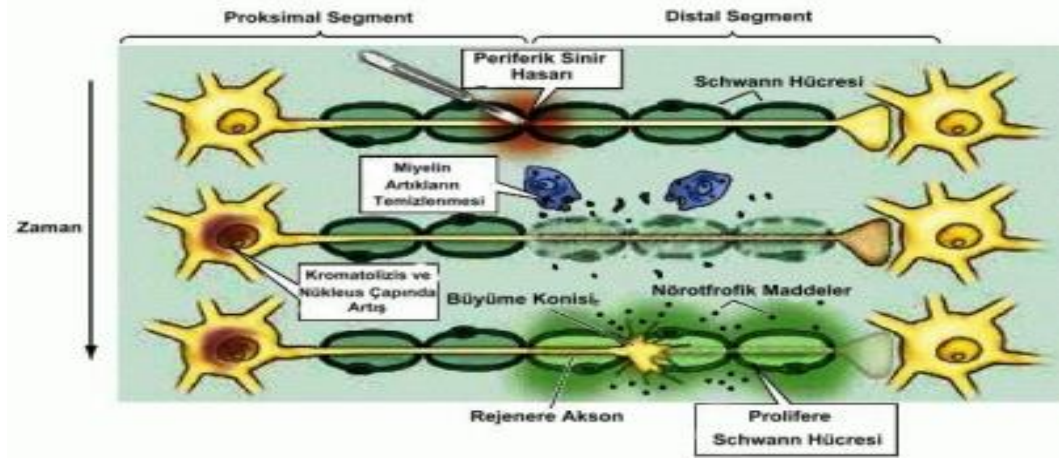
İnsan vücudunda en uzun yer alan ve kesitsel alanı en çok olan sinir, siyatik siniridir. Siyatik sinirde oluşan lezyonların en sık nedenini travmalar oluşturmakla birlikte kalça bölgesinde; intramusküler enjeksiyonlar, kontüzyonlar, pelvis kırıkları, sinir sıkışması, uyluk bölgesinde ise; ateşli silah yaralanmaları, femur kırığı, kontüzyonlar, delici travma ve komplikasyonlar (iyatrojenik) sonu oluşan yaralanmalar en sık nedenleri oluşturmaktadır(14).

Şiddetine göre periferik sinirlerde şekillenen yaralanmalar, üç grup altında toplanır(13).

Nöropraksi: aksonal bütünlük bozulmaksızın sinirin geçici olarak fonksiyonunu yapamamasıdır(13).

Aksonotmezis: konnektif doku içindeki aksonun bütünlüğünün bozulmasıdır. Bu tip yaralanmalarda konnektif doku bütünlüğü bozulmadığı için, akson tüp içerisinde rejenere olur(13).

Nöretmezis: Periferik sinir bütünlüğünün tam olarak bozulmasıdır. Bu durumda sinir uçları şirurjikal olarak karşı karşıya getirilmezse iyileşme olmaz (Şekil 5)(13).

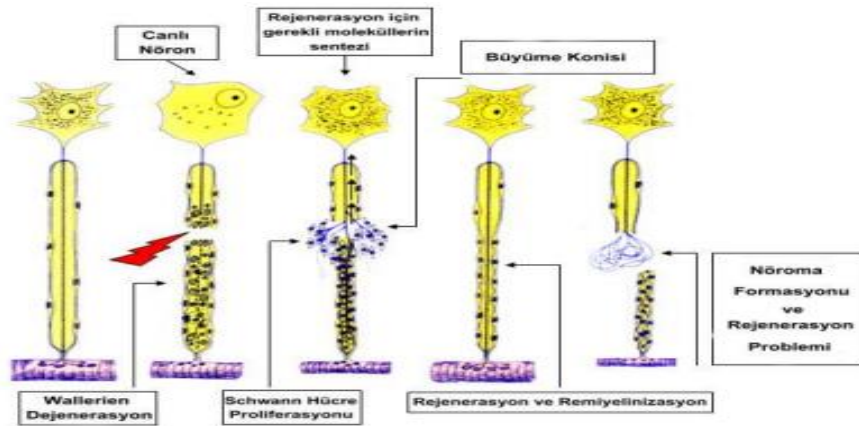


Şekil 5. Akson Dejenerasyonu (Wallerien Dejenerasyonu)

3.5. Periferik Sinir Yaralanmalarında Tedavi Yaklaşımı

Periferik sinir tedavisinde proksimal ve distal kesilen uç arasındaki normal anatomik yapının geri kazandırılması amacıyla çeşitli kimyasal ve fiziksel metodlar kullanılmış, çok sayıda araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Yaygınlaşan mikrocerrahi uygulamaları, teknolojinin gelişimi, cerrahi mikroskop kullanımıyla, epinöral veya perinöral sutur ile anatomik olarak sinir uçları karşılıklı gelecek şekilde ve gerilimsiz olarak dikilebilmektedir. Histolojikpatolojik ve immünohistokimyasal metodların ilerlemesinde periferik sinir yaralanmalarında, sinir tedavisinin başarı şansını artırmaktadır. Böyle olmasına rağmen, halen sinir yaralanmasını takiben sinir iyileşmesi, fonksiyonel ve duyuşsal olarak normal anatomik düzeye getirecek bir tedavi şekli ortaya çıkarılamamıştır. Yaralanma sebebinden ayrı olarak, sinir dokusunda onarımın yetersiz olması ya da sinirin uygunsuz iyileşmesi, çoğunlukla fonksiyon kayıplarına ve kronik ağrılara yol açmaktadır. Bu sinir yaralanmalarında tedavinin ana hedefi, sinir bütünlüğünün yeniden sağlanarak impuls iletiminin geri kazanılmasıdır. Kısacası kaybolmuş duyu ve motor fonksiyonların onarımını gerçekleştirmektir. Sinirde hasarı oluşmuş hasta tedavisinde, iyi bir şekilde

fonksiyonun geri kazanılması, kesilen uçlar mikrocerrahi teknik ile doğru fasiküler diziliminin yapıldığı, sinirin gerilimsiz olarak karşı karşıya getirilerek gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte birçok faktör sinir rejenerasyonunun etkilemektedir ve dolayısıyla fonksiyonun geri kazanılması tam olamamaktadır. Daha iyi ve başarılı sonuçlara, hassas mikrocerrahi metodlar kullanılarak ulaşılacağı düşünülmektedir. Sinir tedavisinde ileri tekniklerin gelişmesi, sinir iyileşme biyokimyasının ve mekanizmasının detaylarını ortaya koyacak araştırmalar ile gerçekleşebilecektir. Sinirin tedavi zamanı, yaralanma şekli, yara durumu ve sinirin vasküler durumuna ilgilidir. Kesici bir aletle oluşan sinir kesilerinde, ezilme şeklindeki yaralanmalarda, temiz yaralarda ve sinir kan sirkülasyonunun iyi olduğu şartlarda, sinirin primer tedavisi fonksiyonun geri kazanılması için en iyi seçimdir. Son senelerde periferik sinir yaralanmalarında steroidler, , tiroid hormonları, non-steroidler, büyüme hormonu, , eritropoetin, sinir büyüme faktörleri, ACTH (adrenokortikotropik hormon) ve insülin benzeyen peptidler gibi değişik farmakolojik ajanların sinir iyileşmesini hızlandırdığına dair çok sayıda araştırma yapılmıştır (14).



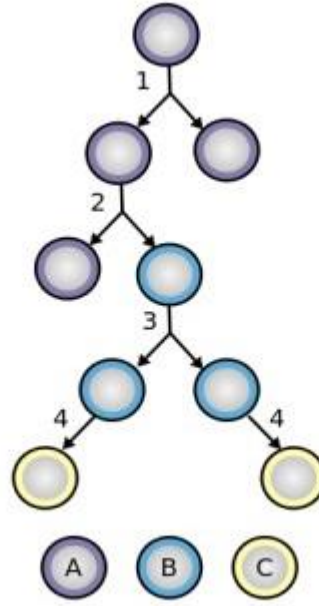
Şekil 6. Aksonal rejenerasyon süreci

3.6. Kök Hücre Tanımı ve Özellikleri

Kök hücreler (KH) henüz farklılaşmamış yapıdaki hücrelerdir. Sürekli yenilenebilme ve farklı hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahiptir(15-17).

Hücrenin kök hücre olarak tanımlanabilmesi için gerekli 5 ölçü bulunur.

1.Kök hücre uzun zaman bölünebilir ve kendini yenileme potansiyeline sahiptir. 2. Özelleşmemiş hücre halindedirler ve özelleşmiş hücrelere dönüşmek üzere kaynak oluştururlar. 3. Birden fazla hücre tipine dönüşebilirler. Bu durum farklılaşma(differentiation) olarak adlandırılır. 4. Kök hücreler transfer sonrası kaynak dokuyu işlevsel bir şekilde yeniden çoğaltabilirler. 5.İn vivo ortamda doku hasarının bulunmadığı hallerde dahi farklılaşmamış kuşaklara katkı bunlunabilirler (15). Bunun yanında kök hücreler dokularda az miktarda bulunurlar. Yaşam boyu belirli oranlarda bölünerek sayılarını korurlar. Kök hücrelerin bölünmesi sonucu oluşan iki hücreden biri ya da her ikisinde kök hücre olarak kalır ve mevcut kök hücre havuzuna dahil olur. Tekrarlayan bölünmeler sonucu transit (geçici) hücreleri meydana getirirler. Geçici hücreler farklılaşarak kısa zamanda dokuya özgü farklılaşmış hücrelere dönüşürler. Kök hücrelerin bölünme hızı genellikle yavaştır. Fakat doku yaralanması olduğu durumlarda yoğun olarak bölünme özelliği gösterirler. Yaralanma ve doku kaybının çok şiddetli olduğu durumlarda kendi havuzlarındaki kök hücre sayısını koruyabilmek için doğal bölünme hızlarını arttırmırlar. Yaşam boyunca organizmadaki varlıklarını sürdürürler ancak yaşın ilerlemesiyle birlikte sayıları gittikçe azalır (Şekil 7) (18).



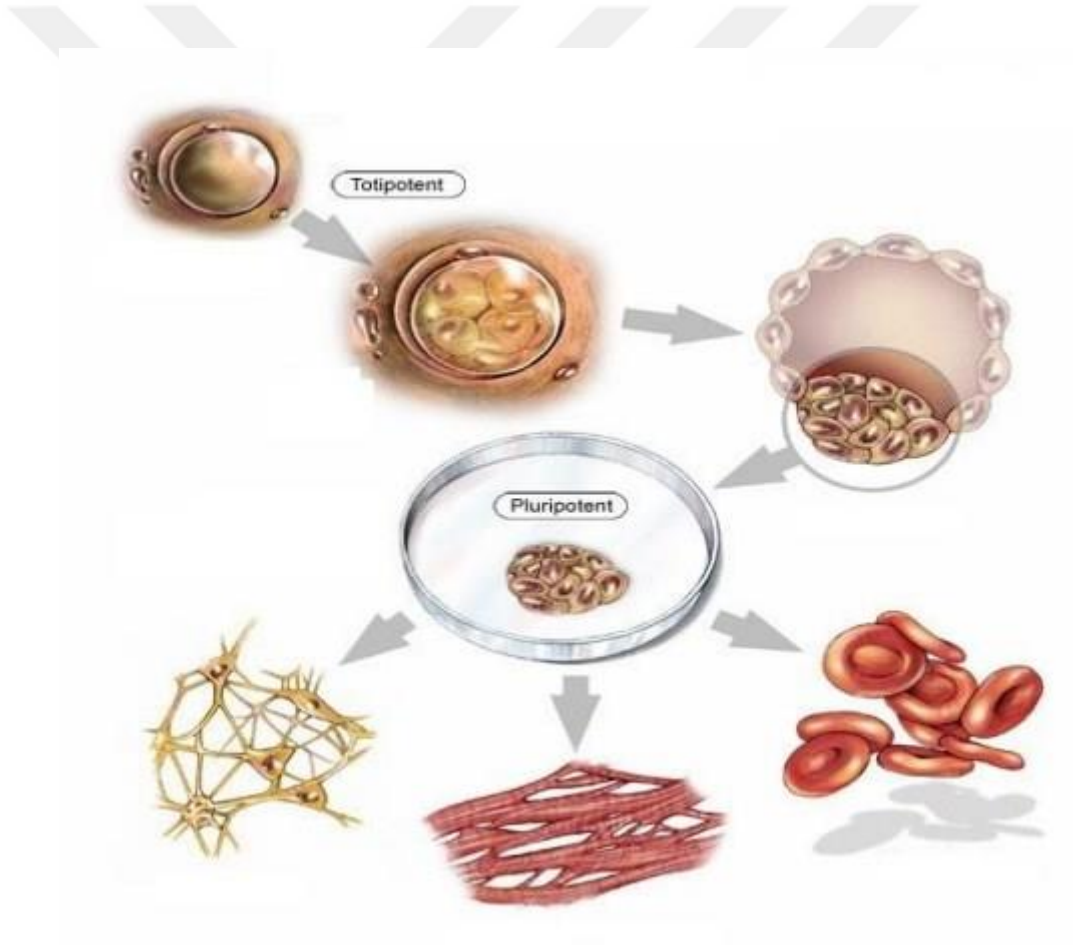
Şekil 7. Kök hücrenin bölünme ve farklılaşması. A: kök hücre; B: öncü hücre; C: farklılaşmış hücre; 1: simetrik kök hücre bölünmesi; 2: asimetrik kök hücre bölünmesi; 3: öncü bölünme; 4: son farklılaşma (18,19).

3.6.1. Kök Hücre Tipleri

Kök hücreler (KH) hemen hemen her dokuda bulunan hücrelerdir. Özellikle doku yenilenmelerinde rol oynarlar (20).

Elde edildikleri kaynağa göre kök hücreler, embriyonal (fetal) ve erişkin (postnatal) kök hücreler olarak sınıflandırılırlar (16,21). Embriyonik kök hücreler embriyodan köken alırlar. Dokuları tümünü oluşturabilirler (22,23). Erişkin kök hücreler ise periferik kan, kemik iliği, amniyotik sıvı, göbek kordon kanı, plasenta membranı, diş pulpası, nazal mukoza, iç kulak, santral sinir sistemi, sindirim kanalı, deri epidermisi, iskelet kası, retina, kornea, kalp, pankreas, karaciğer, yağ dokusu ve akciğer gibi çeşitli dokulardan izole edilebilirler (16).

Kök hücreler (KH), bölünme ve farklılaşma kabiliyetlerine göre, 3 türdür: totipotent, pluripotent ve multipotent şeklindedir (24). Memelilerde yaşam zigot olarak isimlendirilen tek hücreden başlamaktadır. Bu totipotent'dir ve yetişkin bir organizmanın şekillenmesi için gerekli olan tüm genleri taşır. Kök hücreler fetüste dönemde, göbek kordonu kanında ve yetişkinlerde vücudun özellikle kemik iliği ile yağ dokusunda bulunur. Embriyonik kök hücre (EKH)'lere göre gelişmenin daha sonraki aşamalarında görülen bu hücreler oluştukları döneme kıyasla giderek daha kısıtlı bir bölünme ve dönüşme kabiliyeti sergilerler (24,25).



Şekil 8. Kök hücre türleri ve farklılaşma özellikleri.

Yetişkin kök hücreler, multipotent KH olarak isimlendirilir ve daha fazla alındıkları doku ve organa dönüşme eğilimleri vardır. Yetişkinlerde her organ ve dokuda aynı miktarda ve potansiyelde kök hücelere rastlanmayabılır. mesela, beyinde az miktarda bulunduklarından dolayı, beyin hasarları, kemik ya da doku gibi organların yenilenmesi şeklinde olmaz. Kalıcıdır hasar. Son yıllarda, yetişkin dokulardan izole edilen kök hücrelerin diğer doku ve organlara dönüşmesi yönünde araştırmalar yapılmaktadır (26).

Embriyonik kök hücreler 3 embriyonik hücre tabakasına dönüşme yeteneğindedirler. 3 germ tabakası bir yetişkinde 220'den daha çok hücre şeklini meydana getirir. Bazı dönüşmüş pluripotent hücreler yetişkinlerde multipotent hücreler şeklinde bulunabilirler. Yalnız bu hücrelerin dönüşme kabiliyetleri kısıtlıdır. Sınırsız kendilerini yenileyebilen ve plastisite kabiliyetleri sebebiyle onarıcı tıbbın üzerinde durduğu EKH çalışmalarıdır (27).

Yetişkin kök hücreler, yetişkinlerde farklılaşmış dokularda bulunan ve ölen ya da hasar gören hücreleri yenileme özelliği bulunan, farklılaşmamış hücrelerdir (28). Kas, sinir, göz, kemik iliği, deri ve karaciğer gibi dokularda mevcuttur. Kendilerini yenileyebilme ve bölünebilme özelliklerine sahiptirler. Multipotenttirler. Özel şartlar altında yetişkin kök hücreler başka dokulara ait hücre türlerine farklılaşabilir, buna çapraz farklılaşma denir (24,25,29). Kordon kanı kaynaklı KH'ler doğum bitmeden önce veya doğum sonrası plasenta ayrılmasını takiben göbek kordon veninden alınır (30).

HKH (Hematopoietik kök hücreler) bütün kan hücrelerinin öncülüğünü oluştururlar. HKH'leri uzun dönem ve kısa dönem onarım yeteneklerine göre

oligopotent, multipotent ya da unipotent'dir (31). Hematopoietik kök hücreler yetişkinlerin, göğüs, kaburga, kalça, uyluk ve kemik iliğinde mevcuttur. Hücreler pelvis kemiğinden enjektör ile direkt olarak alınabileceği gibi, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) benzeri bir sitokin uygulamasını takiben kandan elde edilebilirler (24, 25,31).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) çok fazla hücre şekline dönüşme kabiliyeti bulunan multipotent kök hücrelerdir. İn vivo ve invitro kondrositlere, adipositlere, kas hücrelerine, osteoblastlara, nöronal hücrelere dönüşebildikleri kanıtlanmıştır (32). Mezenkimal kök hücreler kasta, kemik iliği ve göbek kordonunda bulunan Wharton peltesi'nde mevcuttur (30). MKH multipotensi kapasiteleri ve yenilenme özellikleri çok fazladır (33-35).

3.6.2. Kök Hücrelerin Kullanıldıkları Alanlar

Kök hücrelerin farklı hücrelere dönüşme potansiyeli, birçok hastalığın tedavisinde kök hücre arayışına neden olmaktadır (20). Modern tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı, hücre, doku ya da organların işlevlerini kaybettiği durumlarda kök hücre sayesinde rejeneratif tıp (yerine koyma) veya reparatif tıp'a (tamir etmek) başvurulur.(36)

Kök hücrelerin bazı hastalıklar üzerinde tedavi edici etkisi hayvan deneyleri sonucunda kabul görmüştür. İlk olarak 1950'li yıllarda, işlem öncesinde farelerden alınan dalak ve kemik iliği hücreleri, fareler ışına maruz bırakıldıktan sonra infüze edilerek hayatta kalımı sağladıkları gösterilmiştir. Böylece kök hücre naklinin temelleri atılmıştır (37,38).

İnsanlarda ise kök hücre tedavisi ilk olarak 1950’lerde kanser, aplastik anemi ve immünyetmezlik duumlarının tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde ise bir çok hastalığın tedavisinde kök hücreler kullanılmaktadır(38).

3.6.3. Kök Hücrelerin Doku Onarımı Üzerine Etkisi

On yıl öncesine kadar, nöral kök hücreler (NKH) kendilerini yenileyemedikleri düşünülüyordu. Son yıllarda yapılan araştırmalar insan beyninde nöral kök hücrelerin varolduğu ve fetüs beyninin ve sinir sisteminin oluşmasını sağlayan kök hücrelere benzediği saptandı (39,40). Sinir sistemi hastalıklarının tedavileri için, NKH keşfi, ciddi bir adım olarak düşünülmektedir. Laboratuvar koşullarında kök hücreler’den sinir hücreleri izole edilebilmektedir (41).

Omurilik hasarlarının tedavisi için ruptur olan sinirlerin etrafındaki epineurium kılıfın tamiri edilmesi gerekir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde, araştırmacılar kök hücre uygulamasıyla bu sinirleri tedavi etmişlerdir (39, 41,42). Ayrıca KH uygulamaları Alzheimer ve Parkinson gibi sinir sisteminde oluşan hastalıklar için de umut vericidir (32, 40,41). Adipoz doku (yağ doku) kök hücreleri (AKH), liposuction yöntemiyle, yağ dokusundan izole edilmektedir. Çoğu özelliğiyle kemik iliğindeki MKH’lere benzerler (43,44). İnsan adipoz kök hücrelerinin, kas, yağ, kıkırdak, kemik hücrelerine, dönüşebildiği laboratuvar ortamında ispatlanmıştır. Yapılacak çalışmalarınla nöronlara farklılaşabilmeleri de olasıdır (44, 45).

Mezenkimal kök hücreler başta olmak üzere nöral ve kardiyak kök hücrelerle süren ve sonuçlanmış birçok klinik ve araştırma çalışması vardır. Kalp-damar hastalıkları, ortopedi, plastik cerrahi, otoimmün hastalıklar, sinir-kas/ sinir

hasarı hastalıklar ve bazı metabolik hastalıklarda kök hücre çalışmaları devam etmektedir (41,46-48).

KH uygulamaları duraklamış doku iyileşmesine destekleyici katkılar temin ederek, miyelin iyileşmesinin meydana getirilmesini sağlayarak ve dahası endojen KH'leri uyararak hasarın tamirini gerçekleştirmektedir. Son yapılan çalışmalar SSS'de endojen kök hücre mevcudiyetini göstermiştir (39,40). Tedavi amaçlı KH uygulamaları bu hücreleri aktif hale getirip nörolojik ve dolayısıyla fonksiyonel iyileşmeyi sağlayabileceği fikri yaygınlaşmaktadır (41). Önceleri canlıların SSS'de rejenerasyon kabiliyetinin bulunmadığı düşünülüyordu (41). Şartlar uygun olduğunda, astrosit, nöron ya da oligodendrosit şeklinde farklılaşabilen multipotent nöronal kök hücrelerin mevcudiyetinin ispatlanması ile bu fikir başka bir yön kazanmıştır (25). Son araştırmalarda bilgiler ise endojen nöronal kök hücrelerin santral sinir sisteminde bulunduğu ve travma, dejenerasyon, iskemi şeklinde durumlar olduğunda aktif hale geldikleridir. Endojen nöronal KH'lerin yetersiz kaldıklarında hastalıkların değişmediği durumlarda ve KH'lerin verilmesinin tedavi için uygun olduğu yönündedir (29,49). Cerrahi olarak hasarlı alana verilmesi, damar içi (IV), lomber punksiyon (LP), , kas içi (IM) olarak ya da kombine olarak verilmesinin mümkün olduğu yönünde araştırmalar vardır (50-52).

Bazı araştırmacılar KH'lerin hipoksik iskemik ensefalopatide (HIE), bazıları ise kemik iliğinden alınan kök hücrelerin glioma da damar içi (IV) uygulandığında iyileştirici olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar araştırmalarında, KH tedavisinde, IV uygulamanın minimal invaziv olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmalarında IV uygulanan KH'lerin bir çok kısmının sistemik dolaşımda durmasına karşın, SSS'ne göç ettiklerini ortaya koymuşlardır (53,54). Başka bir

Çalışmada kas içi (IM) şeklinde verilen insan yağ dokusu kökenli MKH uygulamasının, siyatik sinir hasarı oluşturulan ratlarda periferik sinir rejenerasyonundan iyi sonuç aldıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmaların rehberliğinde SSS hastalığı sonucu oluşan ekstremitelerde atrofi ya da spastisite oluşan hastalarda IM KH uygulamasında iyi etki oluşturabileceği sonucuna varılmıştır (44).

Veterinerlik alanında, kemik iliği veya yağ dokusundan minimal manipölasyon yoluyla izole edilen MKH, atlarda ve köpeklerde tendo, ligament yaralanmaları ve eklem hastalıklarının tedavisi için uygulanmıştır (55). Bununla birlikte, veteriner alanında kök hücre tedavisi ile ilgili yeni çalışmalar gereklidir (56). Veteriner sahada kök hücre çalışmalarının yok denecek kadar az olması ve sinir tedavileri üzerine çalışmaların az olması merak uyandırmıştır. Özellikle travmalar sonucu sinir hasar ve rupturları oluşan hayvanlarda yaşam kalitesinin düştüğü ve hayvan refahını olumsuz yönde etkilendiği görölmüştür. Cerrahi ve medikal olarak tedavi edilemeyen perifer sinir hasarlarında, veteriner tıpta da potansiyel bir tedavi yöntemi olan kök hücre tedavisinin yaygınlaştırılmasına, bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutmasına ve hayvan refahına katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

4. MATERYAL - METHOD

Bu çalışma, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 25/11/2020 tarih ve 2020/14 sayılı oturumunda görüşülmüş ve uygun olduğuna dair etik onayı almıştır.

4.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Araştırmada hayvan materyali olarak 2 aylık, 250 gr canlı ağırlıkta toplam 56 adet dişi Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar 2 aylık dönemde olgunluğa eriştiğinden, 2 aylık ratlar tercih edilmiştir. Deney hayvanları ünitesinde dişi ratların daha kolay ve istenilen sayıda bulunması dişi rat tercih nedeni olmuştur. Rat tercih nedeni; anestezi, bakım, deneysel uygulama, post operatif takip kolaylığının yanı sıra, insanların ve ratların yaklaşık %90'dan fazla ortak geninin bulunmasıdır. Bu durum, insan genlerinin faktörlere nasıl tepki vereceğinin ortaya konabilmesi için çok iyi bir çalışma sahası oluşturmaktadır. Genetiğin ötesinde, rat biyolojik sistemi (organlar gibi) insan sistemine oldukça benzer olduğundan bu tür tercih edilmiştir.

Çalışma bir aylık hazırlık ve kök hücrelerin izolasyonu, iki aylık operasyon, klinik takip ve testlerin uygulanması aşamaları olmak üzere toplamda üç aylık bir süreyi kapsamaktadır.

4.2. Hazırlık Aşaması

Bir aylık hazırlık aşamasında kök hücre ve histopatoloji için kimyasallar temin edildi, ratlar alındı, ratların beslenme, ışığa ve ortama uyumu sağlandı.

Ratlar rastgele ve her bir grupta 14 adet rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Grupların şematize edilmesi

Gruplar	Sinir hasarı	Tam katruptur	Kök hücre uygulanan	Kök hücre uygulanmayan
1.grup	x		x	
2.grup (kontrol)	x			x
3.grup		x	x	
4.grup (kontrol)		x		x

Hayvanlarda allojen kök hücre kullanılacağı için gelişebilecek reaksiyonlara karşı immün baskılayıcı kullanıldı (57). İlaç tüm gruplara preopratif bir aylık dönemde operatif girişim öncesi 14 gün süreyle uygulandı. İlaç olarak prednizolon kullanıldı. Günlük doz olarak 20 mg/kg olacak şekilde uygulama yapıldı.

4.3. Kemik iliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Mezenkimal kök hücre elde edilmesi için donör olarak 180-200 gram ağırlığındaki 15 adet 7 haftalık “Wistar Albino” cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar ketamin (Alfamine, 10mg/ml) ve Ksilazin (Alfazyne, 20mg/ml) uygulaması ile anestezi altında sakrifiye edildi. %70’lik alkol ile ön ve arka ayakları sterilize edildikten sonra steril makas / bisturi ile sıçanların femurları çıkartıldı. Çıkarılan femurlar yumuşak dokularından temizlenip kemiklerin serbest hale gelmesi sağlanarak 40 ml %1 Penisilin-Streptomycin Solusyonuna (Biological Industries,

Cat No: 03-031-1B, Germany) içeren PBS solüsyonuna barındıran 50ml'lik falkon tüplerin içine konuldu. Kök hücre kültür laboratuvarına transfer edildi.

4.4. Sıçan Kemik İliği MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre kültürü için düşük glukoz DMEM DMEM (Low Glucose, Cat No: L0064-500, Biowest, France), %10 Fetal bovine serum (Cat No: 040M3398, SIGMA, USA) ve %1 (Biological Industries, Cat No: 03-031-1B, Germany) antibiyotik içeren besiyeri hazırlandı. Her kemik için 2ml, toplamda ise sıçan başına 8 ml besiyeri 30G şırıngaya çekildi. Kemikler öncelikle %70'lik etanolde 5dk bekletildi. Femur orta kısmından tutularak makas yardımı ile kemiklerin her iki uç kısımları kesildi ve böylece kanal açık hale getirildi. Uçları kesilen kemikler 50 ml'lik falkon tüpe dik olacak şekilde bir pens yardımı ile tutularak enjektör iğneleri dışa bakan açık uçtan kemiklerin kanalından içeriye doğru sokuldu ve medium içeriği kanaldan içeri doğru akıtılarak kemik iliği kök hücrelerinin falkon tüpe aktarılması sağlandı. Kemik iliği içeriği bulunan falkon tüpü 5-10 sn çalkalandı ve sonrasında 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine besiyeri ilave edilerek tekrar 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve pellet üzerine tekrar 13 ml tam besi yeri eklenerek pipetaj yapıldı, T75 flakslara dağıtıldı. CO₂ inkubatörüne kaldırılan hücrelerin üç günde bir mediumu değiştirildi ve mikroskopta kontrol edildi. İnkübasyonun ilk günleri boyunca MKH'ler kültür flasklarına yapışarak fibroblast benzeri iğsi morfoloji gösterdi. Kültürün 3. veya 4. gününden sonra hücreler küçük koloniler halinde proliferasyon olarak büyümeye başladılar ve 6 ile 8. günler arasında bu koloniler değişik boyutlara ulaşarak sayıları arttı. Büyümeyle beraber yan yana olan koloniler birbirleri ile birleşerek 12. ve 15. günler arasında tek tabaka olarak

kültür flasksının tabanını doldurdular. Bu noktada hücreler % 0.25 tripsin-EDTA ile ayrıştırıldı ve 1: 3 oranında pasajlandı. Hücreler üçüncü pasajın sonunda sayım yapıldıktan sonra tedavi amaçlı olarak hayvanlara verildi (Şekil. 9) (58).



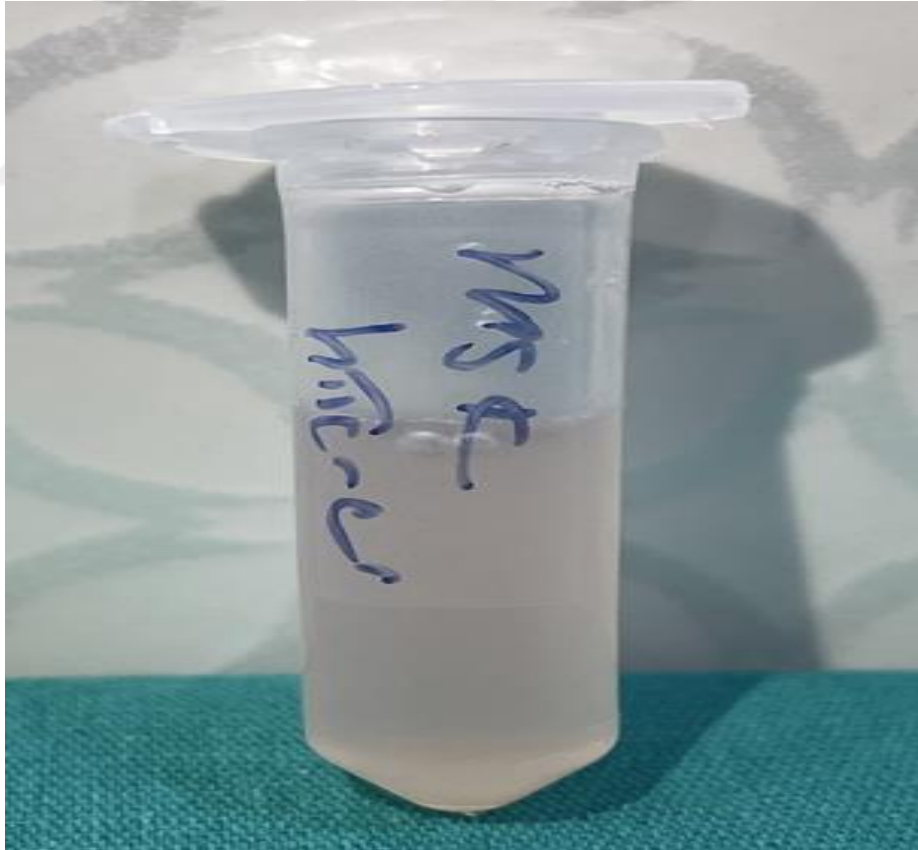
Şekil 9. Kemik İliği Kök Hücrelerinin Falcon Tüpe Aktarılması

4.5. Transfer İçin Hücrelerin Hazırlanması

Kültür edilen hücreler tripsin ile muamele edildikten sonra Flasklerden ayrılarak 1250 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Dipte kalan hücre pelleti üzerine 5ml Hank balanced Salt Solüsyon eklendi ve 1250 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve hücre pelleti üzerine 1ml PBS eklendi. Hücre sayımı Biorad marka Cell counting (TC20 Automated Cell Counter, Biorad, California, USA) cihazında gerçekleştirildi. Hücre sayımı sonrası canlı hücre sayısı üzerinden hesaplamalar yapıldı. Hücre pelleti 100µl’de 1×10^6 canlı hücre olacak şekilde PBS ile seyreltildi (Şekil 10),(Şekil.11) (58,59)



Şekil. 10. İzole Edilen Kök Hücrelerin Çıkarılması



Şekil. 11. Tedavi Amaçlı Hazırlanmış Kök Hücreler

4.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Karakterizasyonu

4.6.1. RNA İzolasyonu

Tripsinazyon sonrası elde edilen hücre pelleti ependorf tüplere konularak üzerlerine 500 µl Tri Reagent eklendi. Solüsyon birkaç enjektörden geçirilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve üzerine 100 µl kloroform eklenip yaklaşık 15 sn vortekslendi. Tüpler oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildi. 12.000 x g'de 2-4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra 3 faza ayrılan sıvının en üst fazı başka tüpe alındı. 250 µl izopropil alkol eklendi. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. 12.000 x g'de 2-4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımlar atıldı. Pellet üzerine 500 µl % 75'lik etanol eklendi ve alt üst edildi. 7500 x g'de 2-4°C'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atılarak etanol işlemi tekrarlandı. Süpernatant atıldıktan sonra tüpler bir müddet oda sıcaklığında bekletilerek etanolün uçması sağlandı. Kuruyan RNA pelletlerinin üzerine dietilpirokarbonatlı (DEPC) su eklendi ve pipetaj yapıldı. İzole edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.

4.6.2. cDNA sentezi

qRT-PCR'ı için kullanılacak cDNA'lar toplam 10 µl hacimde hazırlandı. Sentez için 5µl RNA örneği, 1 µl 5×RT random primer, 1 µl 10×RT buffer, 0,4 µl 25×dNTP mix, 2,1 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 0,5 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı A.B.T.™ cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity, Ankara, Türkiye). Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 27°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve en son sıcaklık 4°C olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

4.6.3. Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile amplifiye edildi. Tablo 2'de belirtilen genlerin ekspresyon düzeyleri ve pozitiflikleri incelendi. Analizler için Koçak ve arkadaşlarının protokolü kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 2: Sıçan spesifik primer dizileri

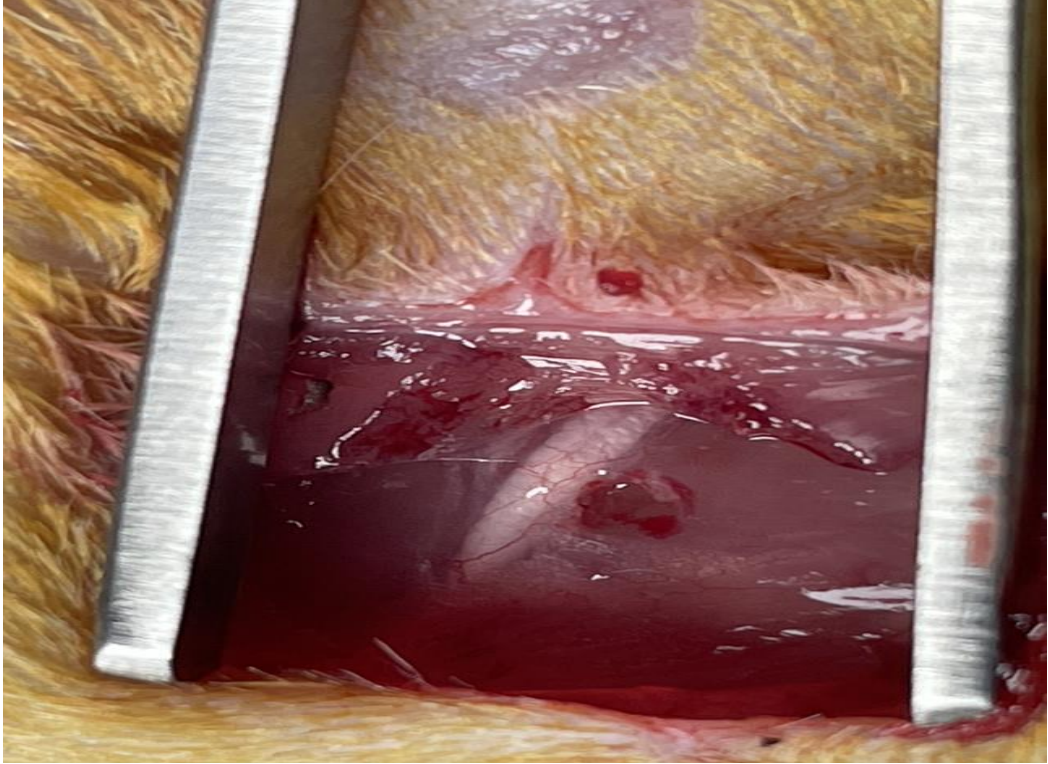
Gen adı		Primer dizileri	Ürün büyüklüğü
CD11b*a	Forward	GCTGGGAGATGTGAATGGAG	113
	Reverse	TGATGCTGGCTACTGATGCT	
CD29**a	Forward	ACTTCAGACTTCCGCATTGG	190
	Reverse	GCTGCTGACCAACAAGTTCA	
CD34**b	Forward	TGCTCTGCTCCTTGAATCT	281
	Reverse	CCTGTGGGACTCCAAC	
CD45**a	Forward	ATGTTATTGGGAGGGTGCAA	175
	Reverse	AAAATGTAACGCGCTTCAGG	
CD71\$	Forward	ATGGTTCGTACAGCAGCAGA	182
	Reverse	CGAGCAGAATACAGCCATTG	
CD73*a	Forward	GAACTTGGGAGGGAGGAGAG	282
	Reverse	CATTGGCAGGAAGAGAGGAG	
CD90**b	Forward	CCAGTCATCAGCATCACTCT	374
	Reverse	AGCTTGTCTCTGATCACATT	
CD105*a	Forward	CGGGAGGTGTTTCTGGTCT	331
	Reverse	GTGTCTGGGTTCGTGGTTG	
CD166*a	Forward	CTTTGTTCTGGGAGTGGCTG	303
	Reverse	GGTGTGCGGTATGTGTTTG	
GAPDH*a	Forward	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	207
	Reverse	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	

Real Time-PCR üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Plate kuyucuklarına cDNA örneklerinden 1 µl koyuldu. Her bir örnek için 5µl Eva Green Master Mix, 3 µl nükleaz içermeyen su ve her birinden 0,5 µl olmak üzere ileri ve geri primerler eklendi. Plate'deki cDNA örneklerinin üzerine hazırlanan karışımdan 9 µl pipet ile bırakılarak plate'in üzeri optik filmle kapatıldı. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla mini plate spin cihazında 1 dakika santrifügasyon işlemine tabi tutuldu. Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada β -actin kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50°C'de 2 dakika, 95°C'de 10 dakika, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı.

4.7. Deneyin Gerçekleştirilmesi ve Takibi

Deneyin gerçekleştirilmesi için ilk önce ratlar genel anesteziye alındı. Ratların anestezisinde, premedikasyon için Xylazine hydrochloride 6 mg/kg dozunda (Rompun, Bayer 23,32 mg/ml) kas içi enjekte edildi. Premedikasyondan 10 dakika sonra Ketamin hydrochlorur 90 mg/kg (Ketalar, Parke-Davis, 50 mg/ml) kas içi yapıldı. Deneklerde sol arka bacak sakrumdan itibaren genu eklemine kadar kılları kesildikten sonra %10 povidon iodine solisyonu ile bölgenin antiseptisi sağlandı. Bunu takiben articulatio coxa'nın 0.5 cm caudo dorsalinde siyatik sinirin dallara ayrılmadan önceki bölümü üzerinde deri 2 cm uzunluğunda ensize edildi. Gluteal kaslar küt olarak ayrıldı ve böylece siyatik sinire ulaşıldı. 1. ve 2. grupta siyatik sinir (Sinir hasarı ve sinir hasarı kontrol grubunda) hemostatik clemb yardımıyla 3.kademede 1 dakika boyunca sıkılarak sinir hasarı oluşturuldu. 3. ve 4. grupta (Sinir rupturu ve Sinir rupturu kontrol gruplarında) ise mikro makas yardımı ile tam kat siyatik sinir rupturu oluşturuldu.

Tam kat rupture oluşturulan siyatik sinir epineuriumu 10/0 suture materyali kullanılarak iki adet basit ayrı suture ile karşı karşıya suture edildi. Daha sonra 1. ve 3. Grup ratlara epineurium kılıf içerisine subparaneural olarak 1 ml’lik insulin enjektoru ile 0,05 ml içerisinde $2,5 \times 10^5$ adet koku hucre enjekte işlemi gerçekleştirildi (Kızılay 2018). Koku hucre uygulaması operasyon sırasında lokal olarak tek doz uygulandı ve sonrasında tekrar doz yapılmadı. Sinir kılıfı dışarısına sızan bir miktar koku hucre lokal olarak bırakıldı. Yara bölgesi 2/0 suture materyali kullanılarak 2 adet basit ayrı suture ile kapatıldı (şekil 12-14).



şekil 12. Operasyon Sahasının Açılması Sinirin Ortaya ıkarılması



Şekil 13. Tam kat kesi oluşturulan Siyatik Sinir



Şekil 14. Hemostatik Pens İle Sıkılarak Hasar Oluşturulan Siyatik Sinir.



Şekil 15. Siyatik Sinire Kök hücre uygulanması

4.8. Postoperatif Bakım

Postoperatif dönem içerisinde günlük klinik gözlem ve yara bakımları düzenli olarak yapıldı, iyileşme süresi göz önüne alınarak iki haftalık periyodlarla tüm ratlarda motor fonksiyonlarının değerlendirilmesi için, kavrama testi, adım izi testi ve hot plate testi uygulandı (60).

4.9. Değerlendirme Yöntemleri

4.9.1. Kavrama Testinin Uygulanması

Kavrama gücünün değerlendirilmesi için, sıçanlar ameliyattan 8 hafta sonraya kadar kavrama testi ile iki haftada bir değerlendirildi. Bu yöntem, parmak fleksör fonksiyonunun basit bir ızgara aracılığıyla değerlendirildi. Kavrama gücü esas olarak uzun parmak fleksör kaslarının aracılık ettiği distal falanksların uyguladığı fleksiyon kuvvetine bağlıdır. Sıçanlarda, uzun parmak fleksörleri

ağırlıklı olarak median sinir tarafından innerve edilir. Bu nedenle, bu sinirin işlevi, kavrama kuvveti yalnızca uzun parmak fleksör kasları tarafından uygulandığında, örneğin, bilek ve dirsek fleksör kaslarının eliminasyonu sırasında kolaylıkla değerlendirilebilir. Ratlar, kavrama ızgarasına kuyruklarından tutularak yavaşça indirildi. Hayvanlar daha sonra kavramalarını kaybedene kadar yavaşça yukarı kaldırıldı. Yalnızca dirsek fleksiyonu olmayan, dirsek fleksör kaslarının kullanımı gibi denemeler geçerli kabul edildi. Her rat için dört geçerli deneme kaydedildi ve her deneme için 0 (yok), 1(hafif), 2 (orta) ve 3 (güçlü) şeklinde kuvvetler kaydedildi. Ortalama kavrama kuvveti daha sonra dört denemenin gruplar arası istatistiksel olarak hesaplandı (Şekil 16) (61)



Şekil 16. Kavrama testinin uygulanışı

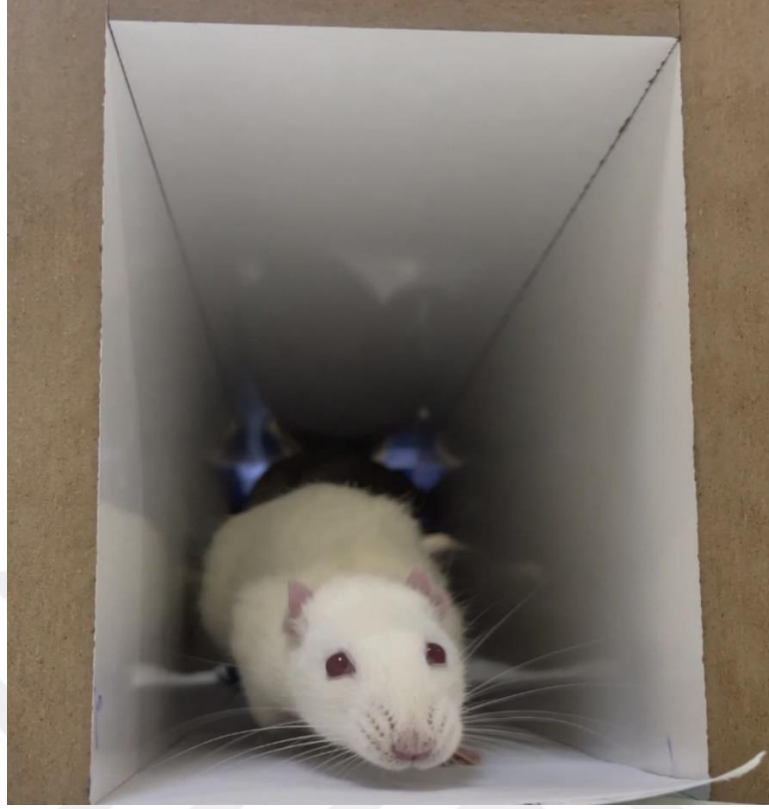
4.9.2. Adım İzi Testinin Uygulanması Ve Siyatik Fonksiyon İndeksinin Ölçülmesi

Deneklerin kağıt üzerinde düz bir şekilde ilerlemelerini sağlamak amacıyla 50 cm uzunlukta ve 10 cm genişlikte ve kenarları 15 cm yükseklikte ahşap bir düzenek kuruldu (Şekil 17).

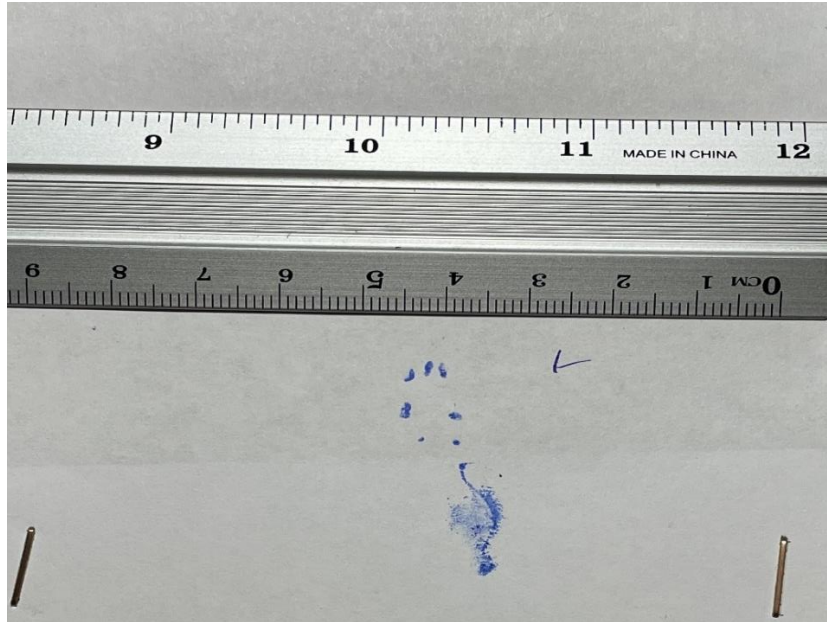


Şekil 17. Adım İzi Düzenegi

Düzenek içersine aynı ölçülerde kesilmiş beyaz dosya kağıtları yerleştirildi. Denekler ıstampaya bastırılarak ayaklarının mürekkeple boyanması sağlandı. Ayakları boyanan ratlar düzenek içiresine bırakılıp yürütülerek adım izleri alındı (Şekil 18,19).



Şekil 18. Ratlara Adım İzi Düzneğinin Uygulanışı



Şekil 19. Ratlardan Alınan Adım İzi

Preoperatif dönemde kontrol ölçümü ve post operatif dönem boyunca iki haftalık aralıklarla gözlem ölçümleri yapıldı. Preoperatif ve post operatif dönemde alınan adım izlerinde bası uzunluğu (topuk-parmak ucu arasındaki mesafe), adım genişliği (beşinci ve birinci parmaklar arası mesafe) ve adım ortası genişliği (dördüncü ve ikinci parmaklar arası mesafe) izleri milimetrik cetvel yardımıyla ölçüldü. Yapılan ölçümde normal bası uzunluğu(NPL), patolojik bası uzunluğu(EPL), normal ayakta birinci ve beşinci parmak arası mesafe(NTS), patolojik ayakta birinci ve beşinci parmak arası mesafe(ETS), normal ayakta ikinci ve dördüncü parmak arası mesafe(NIT), ve patolojik ayakta ikinci ve dördüncü parmak arası mesafe (EIT) ayrı ayrı ölçülüp değerler kayıt edildi.

-Baskı Uzunluk Faktörü (BUF): $(EPL - NPL) / NPL$

-Parmak Ayıklık Faktörü (PAF): $(ETS - NTS) / NTS$

-Orta Parmak Ayıklık Faktörü (OAF): $(EIT - NIT) / NIT$

SFI: $-38,3 \times BUF + 109,5 \times PAF + 13,3 \times OAF - 8,8$

Sonrasında ölçüm değerleri De Medinacelli tarafından geliştirilen ve sonrasında Bain ve arkadaşları tarafından düzenlenen formüle yerleştirilerek Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFI) hesaplandı. Sıfır ile -100 arasında elde edilen değerlerde, sıfır normal fonksiyonu gösterirken, -100 tam fonksiyon kaybını göstermektedir (18). Elde edilen SFI değerleri gruplar arasında fark oluşturup oluşturmadığı istatistiksel olarak incelendi.

4.9.3. Sıcak levha (Hot Plate) Testinin Uygulanması

Postoperatif iki aylık dönem sonunda duyu fonksiyonları için hayvanlar hot plate testine tabi tutuldular. Bu test deneklerin termal nosiseptif eşik üzerindeki etkilerini değerlendirmek için yapıldı. Sıçanlar 52.58C'lik sıcak plaka düzeneği üzerine yerleştirildi. Arka patiyi yalamaya ya da zıplamaya tepki gecikmeleri kaydedildi. Bir yanıtın olmaması durumunda, doku yaralanmasını önlemek için hayvanlar sıcak plakadan 60 s'de çıkarıldı ve yanıt olarak 60 s'lik bir gecikme belirlendi (Şekil 20, 21), (62).



Şekil 20. Hot plate cihazı



Şekil 21. Hot plate Testinin Ratlarda Uygulanışı

4.9.4. Elektromiyografi Ölçümlerinin Yapılması

Vücutta bulunan kas ve sinirlerin elektriksel metod yoluyla izlenmesine EMG adı verilir. Doğrusal elektrik akımı, hayvana huzursuzluk vermeyecek bir şiddette ayarlanmaktadır. Sonra akım verilerek sinirlerin elektrik iletme yetenekleri ve kasların bu deşarjla oluşturduğu potansiyel ölçülmektedir (Şekil 22).

Postoperatif dönem sonun da kas ve sinirlerinin elektriksel sinyallerini toplamak ve motor sinir iletimini saptamak için, ratlar anestezi edildikten sonra, Elektromiyografi (NEMG) ölçümleri yapıldı. Sağlam bacağın NEMG değerleri referans olarak alınıp, kıyaslanıp kayıtlar tutuldu.



Şekil 22. EMG Cihazı

4.9.4.1. Siyatik Sinir Motor İletim Çalışması

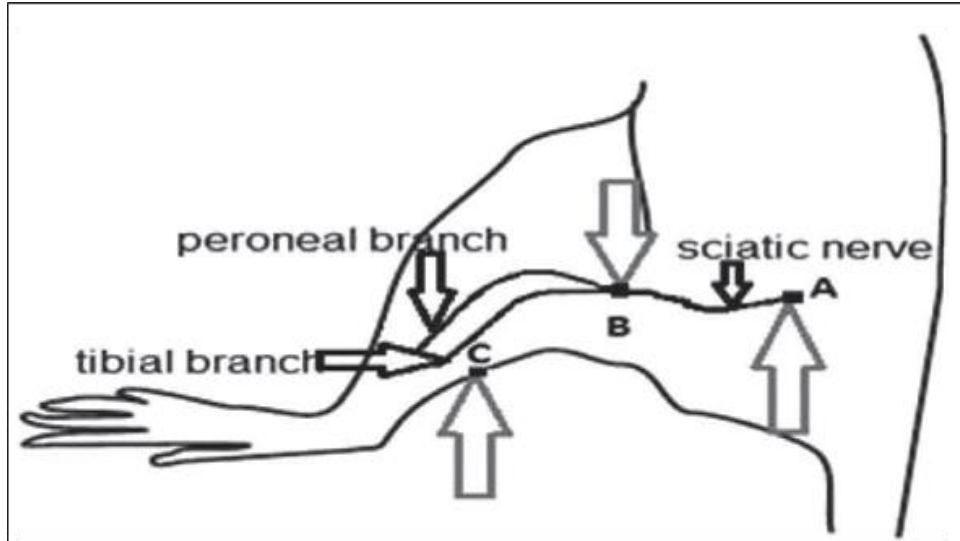
Electrophysiological incelemeler EMG (Dantec Keypoint, filter 3Hz - 5 KHz, sweep duration 20 msn) cihazı ile yapıldı.

Siyatik sinir motor iletim incelemesi için ratın yaralı/ameliyat edilmiş bacağında gastrocnemius kasına ince iğne kayıt elektrotları yerleştirildi (Şekil 23). Biceps femoristen gelen yanlış pozitif sinyallerle karışık komşu kaslardan da kayıt alınabileceği için kayıt elektrodunun doğru yerleştirilmesi gastrocnemius kası için çok önemlidir.

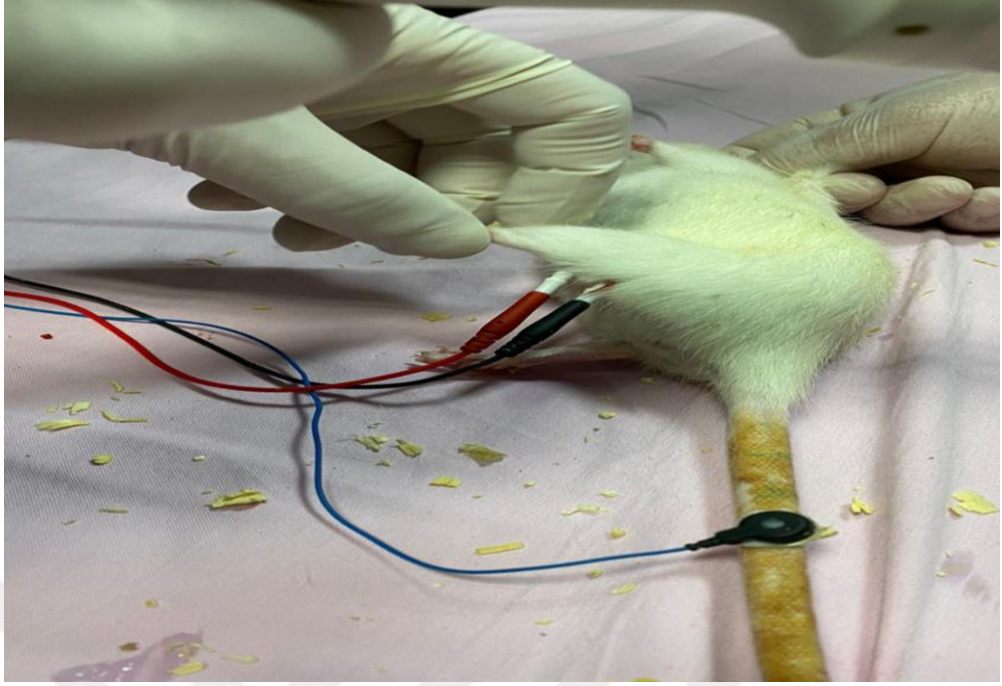
Ortak referans (toprak elektrotu) kuyruğa yerleştirildi. Stimülasyonu 1 Hz frekanslı ve 0,2 m/s süreli uyarılar verildi. Bu uyarı supramaksimal yoğunluğa kadar kademeli olarak artırıldı. Siyatik sinir, proksimal olarak omurgadan ve 30

mm distalden uyarıldı. İncelemenin başlangıcında supramaksimal stimölasyonu sağlamak için stimölasyon 2-15 mA aralığında artırıldı. Stimölasyon 5/sn hızında gerçekleştirildi ve yanıt kaydedilmeden önce averajlamak için 5 kez tekrarlandı. Averajlama, ek ortalama alma ile ilişkili gürültü azaltma ve dalga biçimindeki titreşimle ilgili bozulmalar ve averajlama ile ilişkili CMAP özelliklerindeki değışiklikler için azaltılmış zamansal çözünürlük sorunları için uygun bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

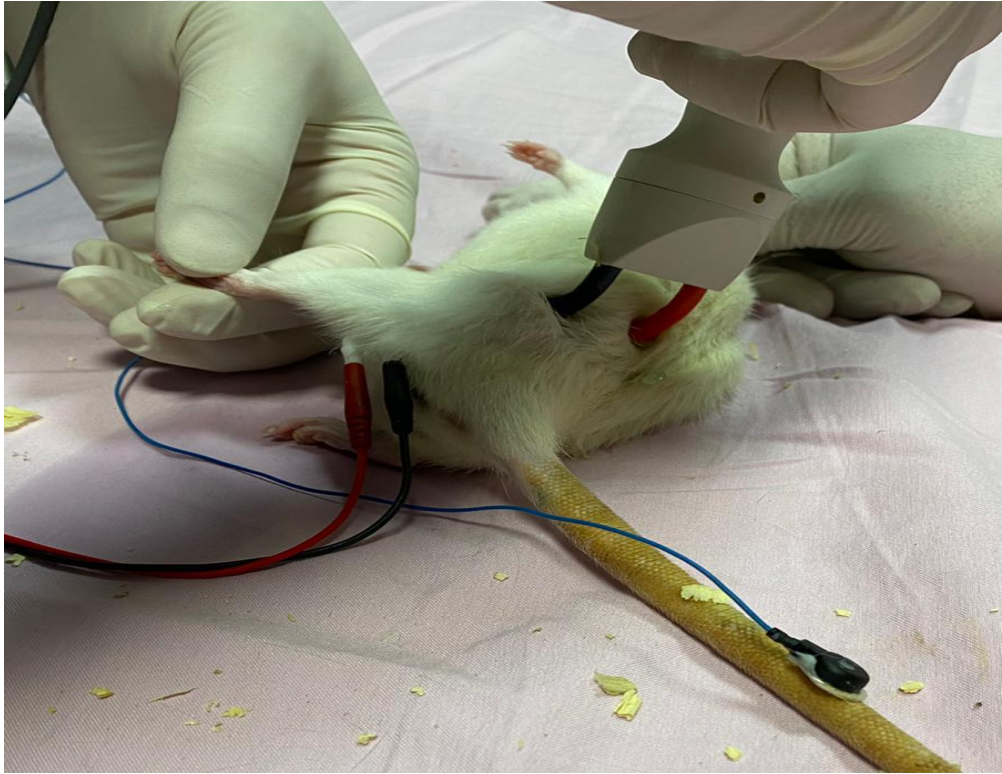
Uyaran ile taban çizgisinden aksiyon potansiyelinin ilk sapmasının başlangıcı arasındaki gecikme olarak tanımlanan CMAP gecikmeleri, supramaksimal uyarı yoğunluklarında ölçöldükten sonra sıçanların arka bacakları düzleştirildi ve uyarıcı aktif elektrotlar arasındaki mesafeler bir mezura ile en yakın milimetreye kadar tespit edildi. Bu değerler daha sonra bireysel motor sinir ileti hızlarını hesaplamak için kullanıldı.



Şekil 23. Ratların Siyatik Sinir Motor İletim uygulanmasında Uyarım ve Kayıt Noktaları; A- proksimal uyarım noktası, B- distal uyarım noktası, C- kayıt noktası



Şekil 24. Uyarım Elektrotlarının Uygulanış Yerleri



Şekil 25. Uyarının Verilmesi ve Kayıt

Siyatik sinire stimölasyon sağlayarak ve sıçanlarda gastroknemius kasından CMAP'leri kaydederek siyatik sinir rejenerasyonunun değerlendirilmesi, özellikle kayıt için monopolar iğne elektrotları kullanılıyorsa, dikkatle tedavi edilmelidir.

4.9.5. Histopatolojik Yöntem

Ötenazi işleminde sonrasında alınan sinir örnekleri %10' luk tamponlu formalin solüsyonunda 2 gün tespit edildi. Daha sonra, ayrı doku takip kasetlerine (Isolab GmbH, Wertheim, Almanya) konuldu. Yaklaşık iki saat akan çeşme suyu altında yıkandıktan sonra otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1020, Wetzlar, Almanya) alkol, ksilen ve parafin serilerinden geçirilip doku bloklama cihazında (Leica EG 1150 H, Wetzlar, Almanya) parafin ile bloklandı. Parafin bloklardan rotary mikrotom (Leica RM2125, Wetzlar, Almanya) ile 3-5 mikron kalınlığında seri kesitler pozitif şarjlı lamlara (Thermo Fischer Scientific, Superfrost, Massachusetts, A.B.D.) alındı. Hazırlanan kesitler otomatik doku boyama makinasında (Leica Autostainer XL, Wetzlar, Almanya) hematoksilin-eozin boyama yöntemiyle boyandı. Alınan kesitlere ayrıca Masson' un üçlü boyama yöntemi (Bio Optica, Milano, İtalya) ve Luxol Fast Blue (Bio Optica, Milano, İtalya) boyama yöntemleri, hazır kitlerin içerisinde bulunan standart yöntemlere göre uygulandı. Hazırlanan preparatlarda, tablo-9 da verilen parametreler semikantitatif olarak değerlendirildi. İnceleme; kameralı (Olympus DP72, Tokyo, Japonya) ve görüntüleme analiz sistemli (CellSens Standart) trinoküler ışık mikroskopunda (Olympus BX43, Tokyo, Japonya) yapıldı. İmmunohistokimyasal olarak sinir dokularında; Myelin Basic Protein (MBP), CD68, S100 ve Neuronal Growth Factor (NGF) ekspresyonları incelendi (Tablo 4). Yöntem olarak Avidin-Biotin-Peroksidaz metodu kullanıldı (63). Parafin bloklardan alınan 3-5 mikron

kalınlığındaki kesitler, ksilen ile deparafinize edildikten sonra dereceli alkol serileri içerisinde geçirilerek dehidre edildi. Antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması için sodyum sitrat tampon solüsyonu içerisinde 20 dk. mikrodalga fırında yüksek derecede inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yıkayıp endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için metanol ile hazırlanan %3 hidrojen peroksit içerisinde 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Nonspesifik bağlanmaları engellemek için UV Block Solution (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) içerisinde 5 dakika bekletildi. Ardından kesitler 1/100 oranında dilüe edilen primer antikorlar ile 1 gece, +4 C° de inkübe edildi. Tekrar PBS’de yıkanan kesitlere biotinle konjuge sekonder antikor (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) damlatılarak 20 dk bekletildi. Ardından dokular PBS ile yıkandı ve streptavidin peroksidaz (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) ile 20 dk. inkübe edildi. Renk ortaya çıkarıcı substrat olarak AEC (3 amino-9-etilkarbazole) kullanıldı. Bu solüsyon kesitler üstüne uygulandıktan sonra renk değişikliği oluşmaya başladığı anda reaksiyon distile su ile yıkamak suretiyle durdurularak, Gill’s Hematoksilen ile 2 dk. karşı boyama boyandıktan sonra musluk suyunda yıkanarak immun-mount ile kaplandı ve ışık mikroskopunda uygun büyütmede incelenip değerlendirildi. Değerlendirme yapılırken Tablo 5’de ki skorum (64) ile bir histoskor oluşturuldu.

Tablo 3. Histopatolojik skrlama yöntemi (hematoksilen-eozin, Masson’ un üçlü boyama yöntemi ve luxol fast blue)

Siyatik Sinir Semikantitatif Histopatolojik Skrlama Yöntemi (*)		
Sinirin Rejenerasyon Derecesi ve Kriterler	Puanlama	
Tamir bölgesinin her iki tarafındaki aksonal devamlılık	Devamlılık zayıf, organize olmayan aksonal proliferasyon	1
	Orta	2
	İyileşme bölgesinde tam devamlılık	3
Fibroblast veya kollajen mevcudiyeti (Masson)	Yoğun	1
	Orta	2
	Normal	3
Myelin Kılıf (Luxol Fast Blue)	Yok ya da zayıf	1
	Vakuoler ve zayıf	2
	Sirküler ve homojen	3
İnflamatuvar hücre sayısı	≥10	1
	1-9	2
	Yok	3
Kapiller yapı	≥6	1
	3-6	2
	1-3	3
*(65)		

Tablo 4. Çalışmada kullanılan primer antikorlar

Antikor/Klon	Antikor Türü	Konak	Kullanılan Dilüsyon	Üretici Firma
MBP	Monoklonal	Fare	1/100	Bioss
CD68	Poliklonal	Tavşan	1/100	Affinity
S100	Poliklonal	Tavşan	1/100	Santa Cruz
NGF	Monoklonal	Fare	1/100	Elabscience

Tablo 5. İmmunohistokimyasal skorlama yöntemi.

Histoskor=İmmunreaktivitenin Yaygınlığı x İmmunreaktivitenin Şiddeti(64).

<i>İmmunreaktivitenin Yaygınlığı</i>	<i>İmmunreaktivitenin Şiddeti</i>
0,1: %25' ten küçük	0: Yok
0,4: %26-50 arası	0,5: Çok Az
0,6: %51-75 arası	1: Az
0,9: %76-100 arası	2: Orta
	3: Şiddetli

İstatiksel değerlendirmelerde grup karşılaştırmaları için non-parametrik Kruskal-Wallis varyans analizi, ikili karşılaştırmalar içinde Mann whitney U testi kullanıldı. Tüm analizler için SPSS (versiyon 22) programı kullanılacak P<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Periferik sinirler, omurilik ön boynuzdaki motor nöronların, dorsal gangliyonlardaki duysal nöronların ve sempatik gangliyonlardaki sempatik nöronların destek bağ doku ile çevrili aksonal uzantılarından oluşur. Sonlandıkları hedef organa göre motor, duyu ya da otonomik fonksiyonları olan yapılardır. Periferik sinirler oldukça uzun olan seyirleri nedeniyle değişik bölgelerde travmaya maruz kalırlar. Kök hücre tedavisi; cerrahi ve medikal olarak tedavi edilemeyen perifer sinir yaralanmalarında potansiyel bir tedavi yöntemidir. Tüm hayvanlar ameliyattan sonra iyileşti. Gözlem süresi boyunca hiçbir uzuv otomutilasyonu veya kontraktür vakası olmamıştır.

5.1. Klinik Değerlendirme Bulguları

Postoperatif dönemde birinci haftadan itibaren yapılan klinik takipte **Ruptur kök hücre grubunda** yaralar hızlı bir şekilde iyileşirken bölge kaslarında daha iyi gelişme görüldü. Tüm bacağın motorik fonksiyonları birinci haftada kısmen olurken, 8. haftada tamamen kazanıldığı görüldü. Parmaklar ilk haftalarda bitişik ve kullanılamazken, 7. Haftadan itibaren bazı hayvanlarda kısmende olsa aralarının açıldığı ancak parmak fonksiyonun az olduğu saptandı.

Ruptur kontrol grubunda yaralar normal yara iyileşme sürecinde iyileşirken, bir hayvanda yara hafif açıldı ancak normal süreçte iyileşti. Yara iyileşme sonrası bu grupta bölge kasları zayıf hatta atrofik kaldı. İlk haftalarda tüm bacakta, motorik fonksiyon görülmedi. Hayvanlar tarsal eklem ile destek sağlamaya çalışırken 6. haftadan itibaren bu fonksiyon kısmen kazanıldı. Ayrıca uzun süre bacağı kullanamamaya bağlı olarak birkaç hayvanda yara oluştuğu görüldü. 8. hafta

sonunda yaraları tamamen iyileşmiş, bacak kısmen kullanılır ve parmak fonksiyonları oluşmadı. Parmaklar bitişik pozisyonda idi.

Hasar kök hücre grubunda yaralar tamamen normal iyileşme sürecinde kapandı. Bu grupta bölge kasları kontrol grubuna göre daha iyi gelişti. Tüm bacak motorik fonksiyonları birinci haftadan itibaren iyiydi. Parmak fonksiyonları ise ilk üç hafta görülmezken, dördüncü haftadan itibaren parmak aralarının açıldığı, kısmen kullanıldığı görüldü. 8. haftadan itibaren ise tamamen kullanıldığı tespit edildi.

Hasar kontrol grubunda yaralar diğer gruplar gibi yara iyileşme süreci içerisinde kapandı. Bacak motorik fonksiyonlar postoperatif 6. haftaya kadar kısmen kullanıldı. 8. haftaya kadar bu fonksiyon tamamen kazanıldı. Parmak fonksiyonları 6. haftaya kadar kullanılamadı. 6.haftadan 7. haftaya kadar parmak aralarının yavaş yavaş açıldığı, parmaklar kısmen kullanıldı. 8.haftada tamamen kullanıldığı görüldü. Ayrıca bölge kasları hasar kök hücre grubuna göre zayıftı (Tablo 6).

Tablo 6. Postoperatif Haftalık Klinik Takip

	Ruptur kök			Ruptur kontrol			Hasar kök			Hasar kontrol		
Hafta	Y	BF	PF	Y	BF	PF	Y	BF	PF	Y	BF	PF
1.	+	+/-	-	+	-	-	+	+	-	+	+/-	-
2.	+	+/-	-	+	-	-	+	+	-	+	+/-	-
3.	+	+/-	-	+	-	-	+	+	-	+	+/-	-
4.	+	+	-	+	-	-	+	+	+/-	+	+/-	-
5.	+	+	-	+	-	-	+	+	+/-	+	+/-	-
6.	+	+	-	+	-/+	-	+	+	+/-	+	+/-	+/-
7.	+	+	-/+	+	-/+	-	+	+	+/-	+	+	+/-
8.	+	+	-/+	+	-/+	-	+	+	+	+	+	+

Yara iyileşme (Y), Bacak fonksiyonu (BF), Parmak fonksiyonu (PF): iyi (+), kısmen (+/-), kötü (-)

5.2. Kavrama Testi Bulguları

Kavrama gücünün değerlendirilmesi için, ratlar ameliyattan 8 hafta sonraya kadar kavrama testi ile iki haftada bir değerlendirildi. Bu yöntem, parmak fleksör fonksiyonunun basit bir ızgara aracılığıyla değerlendirildi. Kavrama gücü değerlendirmesi 56 hayvanın tümünde yapıldı. Ratlar, kavrama ızgarasına kuyruklarından tutularak yavaşça indirildi. Hayvanlar daha sonra kavramalarını kaybedene kadar yavaşça yukarı kaldırıldı. Yalnızca dirsek fleksiyonu olmayan, dirsek fleksör kaslarının kullanımı gibi denemeler geçerli kabul edildi (Şekil 26).



Şekil 26. 8. Haftada hasar oluşturulmuş kök hücre grubuna kavrama testi uygulanan deneğimiz

Kavrama ve bırakma gücüne göre için 0 (yok), 1(hafif), 2 (orta) ve 3 (güçlü) şeklinde kuvvetler kaydedildi. Ortalama kavrama kuvveti daha sonra dört denemenin gruplar arası istatistiksel olarak hesaplandı (Tablo 7).

Tablo 7. Kavrama Testi İstatiksel Verileri

		Zaman				P-değeri
Grup		Hafta 2	Hafta 4	Hafta 6	Hafta 8	
Ruptur	Kontrol	0.33±0.13 ^b	0.93±0.07 ^{c*}	0.33±0.19 ^c	0.40±0.13 ^c	0.012
	Kök hücre	2.00±0.26 ^a	2.21±0.21 ^b	1.79±0.11 ^b	2.50±0.20 ^b	0.226
Hasar	Kontrol	1.60±0.16 ^a	2.27±0.15 ^b	2.20±0.18 ^b	2.07±0.12 ^b	0.410
	Kök hücre	2.33±0.25 ^a	3.00±0.00 ^a	3.00±0.00 ^a	3.00±0.00 ^a	0.115
P-değeri		0.000	0.000	0.000	0.000	

-Aynı sütunda farklı küçük harf (a,b,c) taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir.

*:Hafta 2, 6 ve 8'e göre önemlidir.

İstatistiki Analiz Yöntemi:

Tüm analizler SPSS (Versiyon 22.0) istatistik programında yapıldı. Değerler ortalama ± ortalamaların standart hatası (SEM) olarak verildi. Gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için Bonferroni düzeltmeli tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi testi kullanıldı. P<0.01 değeri önemli olarak kabul edildi.

2. hafta değerleri karşılaştırıldığında; ruptur uygulanan ratlarda kontrole göre kök hücre verilen hayvanların kavrama testi sonuçları anlamlı bir şekilde daha iyiydi (P<0.001). Buna karşın hasar uygulanan ratlarda kök hücre uygulaması anlamlı bir etki oluşturmadi. Ruptur oluşturulan kontrol grubu hayvanların hasar oluşturulan kontrol gurubuna göre kavrama testi sonuçları anlamlı bir şekilde daha kötü idi (P<0.001).

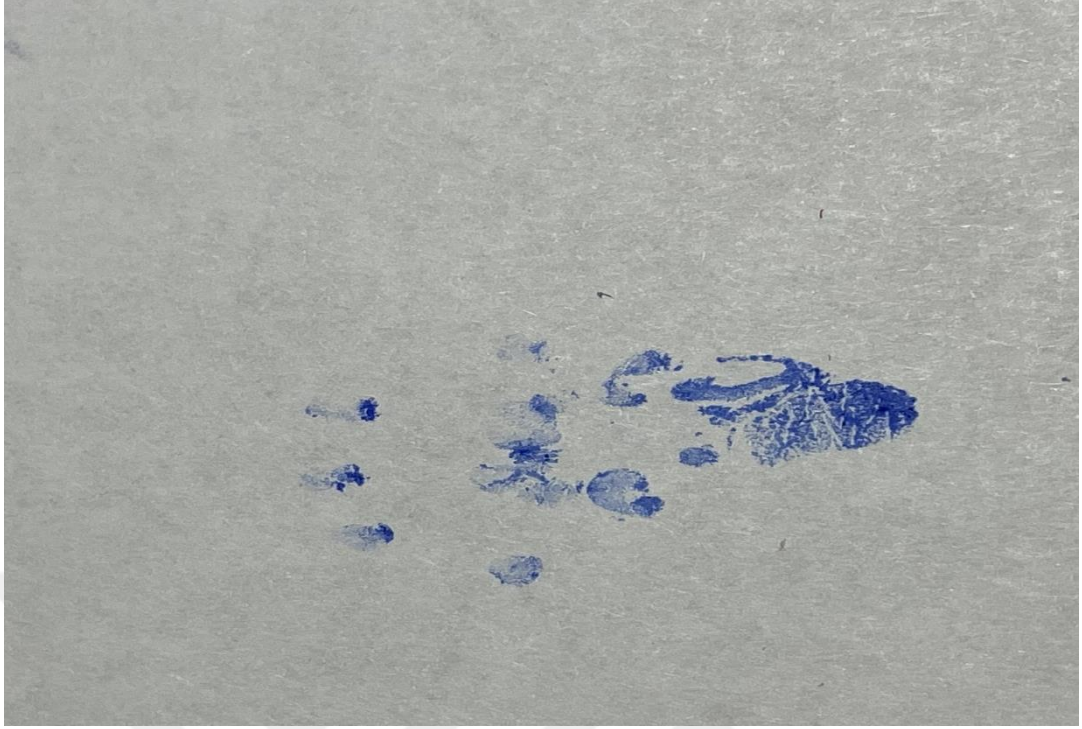
4, 6 ve 8. hafta değerleri karşılaştırıldığında; ruptur ve hasar oluşturulan ratlarda kontrole göre kök hücre verilen hayvanların kavrama testi sonuçları anlamlı bir şekilde daha iyiydi ($P<0.001$). Ruptur oluşturulan kontrol grubu hayvanların hasar oluşturulan kontrol gurubuna göre kavrama testi sonuçları anlamlı bir şekilde daha kötü idi ($P<0.001$). Hasar oluşturulan kök hücre grubu hayvanların ruptur oluşturulan kök hücre gurubuna göre kavrama testi sonuçları anlamlı bir şekilde daha iyiydi ($P<0.001$).

Gruplar genel olarak değerlendirildiğinde hasar uygulanan kök hücre grubunun kavrama testi sonuçları diğer gruplara göre daha iyi olduğu görüldü.

Aynı grup içerisinde zamanlar karşılaştırıldığında; ruptur oluşturulan kontrol grubu hayvanlarda haftalar arasında genel anlamda önemli bir iyileşme gözlenmemesine rağmen 4. haftada diğer haftalara göre istatistiki bir fark tespit edildi ($P<0.05$).

5.3. Adım İzi Testi Bulguları

Postoperatif 2. Haftadan 8. Haftaya kadar 15 günlük aralıklarla hazırlanan düzenek yardımıyla bütün gruplardaki ratlar yürüme testine tabi tutuldu. Uygulanan yürüme testine göre ayak izleri kullanılarak, topuk ve parmak ucu arasındaki mesafe – bası uzunluğu, birinci ve beşinci parmaklar arası mesafe-adım genişliği, ikinci ve dördüncü parmaklar arası mesafe- adım ortası genişlik milimetrik cetvel yardımıyla ölçüldü (şekil 27). 2. hafta dışındaki diğer 4,6,8. haftalarda hasar oluşturulan kontrol ve kök hücre grubu hayvanların adım izi testi değerleri ruptur oluşturulan kontrol ve kök hücre gruplarına göre önemli bir şekilde farklı idi ($P<0.001$) (Tablo 8).



Şekil 27. Ratların tümünde topuk ve parmak ucu arasındaki mesafe – bası uzunluğu, birinci ve beşinci parmaklar arası mesafe-adım genişliği, ikinci ve dördüncü parmaklar arası mesafe- adım ortası genişlik ölçüldü.

Tablo 8. Adım izi testi istatistiksel verileri

Grup		Zaman				P-değeri
		Hafta 2	Hafta 4	Hafta 6	Hafta 8	
Ruptur	Kontrol	-87.16±4.81	-91.43±2.57 ^a	-83.43±4.43 ^a	-87.11±2.34 ^a	0.268
	Kök hücre	-80.65±2.39	-84.71±2.60 ^a	-86.38±4.03 ^a	-79.54±4.26 ^a	0.320
Hasar	Kontrol	-73.99±2.75	-14.37±4.28 ^{c*}	-13.07±4.03 ^{b*}	-15.99±4.36 ^{b*}	0.000
	Kök hücre	-82.62±7.03	-28.57±4.13 ^{b*}	-24.52±4.07 ^{b*}	-26.81±3.41 ^{b*}	0.000
P-değeri		0.259	0.000	0.000	0.000	

-Aynı sütunda farklı küçük harf (a,b,c) taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir.

*:Hafta 2'e göre istatistiki olarak farklıdır.

İstatistiki Analiz Yöntemi:

Tüm analizler SPSS (Versiyon 22.0) istatistik programında yapıldı. Değerler ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası (SEM) olarak verildi. Gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için Bonferroni düzeltmeli tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi testi kullanıldı. $P<0.01$ değeri önemli olarak kabul edildi.

Ruptur oluşturulan hayvanlarda kontrol ve kök hücre grupları arasında haftalara göre adım izi testinde anlamlı farklılık tespit edilmedi. Öte yandan ruptur oluşturulan kontrol ve kök hücre gruplarında haftalar arasında da adım izi değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Hasar oluşturulan ratlardaki 8 haftalık adım izi testi sonuçları incelendiğinde; hem kontrol hem de kök hücre gruplarında Hafta 4, 6 ve 8'deki değerler Hafta 2'e göre anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($P<0.001$).

Hafta 4 değerleri karşılaştırıldığında; hasar oluşturulan ratlarda kontrole göre kök hücre verilen hayvanların adım izi testi sonuçları anlamlı bir şekilde daha iyiydi ($P<0.001$). Hafta 2'nin dışındaki diğer haftalarda hasar oluşturulan kontrol ve kök hücre grubu hayvanların adım izi testi değerleri ruptur oluşturulan kontrol ve kök hücre gruplarına göre önemli bir şekilde farklı idi ($P<0.001$).

5.4. Hot Plate Testi Bulguları

Sekizinci haftada duyu fonksiyonları için hayvanlar sıcak plaka testine tabi tutuldular (Şekil 28). Bu test deneklerin termal nosiseptif eşik üzerindeki etkilerini değerlendirmek için yapıldı (Tablo 9).



Şekil 28. Tüm Ratlarda Hot Plate Testini Uygulanışı

Tablo 9. Hot-Plate Testi istatistiksel verileri

Grup				
Ruptur		Hasar		P-
Kontrol	Kök Hücre	Kontrol	Kök Hücre	değeri
52.95±2.34 ^a	31.44±3.97 ^b	18.46±1.02 ^c	20.49±2.30 ^c	0.000

-Aynı sütunda farklı küçük harf (a,b,c) taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir.

İstatistiki Analiz Yöntemi

Tüm analizler SPSS (Versiyon 22.0) istatistik programında yapıldı. Değerler ortalama ± ortalamaların standart hatası (SEM) olarak verildi. Hot-plate testi bakımından gruplar arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için tek yönlü

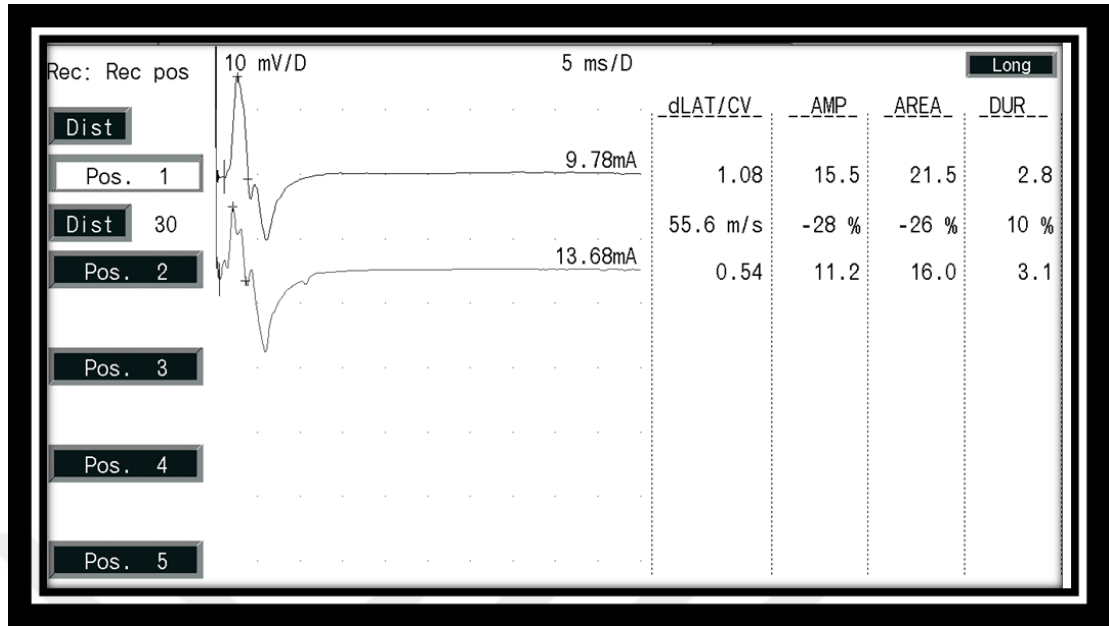
varyans analizi (ANOVA) testi ve ikili karşılaştırmalar için de post-hoc Tukey-HSD testi kullanıldı. $P<0.01$ değeri önemli olarak kabul edildi.

Ruptur uygulanan ratlarda kontrole göre kök hücre verilen hayvanların hot-plate testine verdikleri yanıt anlamlı bir şekilde daha erken zamanda şekillendi ($P<0.01$). Buna karşın hasar uygulanan ratlarda kök hücre uygulaması anlamlı bir etki oluşturmadi. Ruptur oluşturulan kontrol grubu hayvanların hasar oluşturulan kontrol gurubuna göre hot-plate testi yanıtı önemli bir şekilde daha geç zamanda şekillendi ($P<0.01$). Öte yandan rupturlu hayvanlara göre hasar oluşturulan hayvanlara kök hücre uygulaması hot-plate testi yanıtında önemli bir fark meydana getirdi ($P<0.01$). Kontrol ve kök hücre uygulaması göz ardı edildiğinde ruptur ve hasar oluşturulan hayvanlar arasındaki farklar da önemli idi ($P<0.01$).

5.5. Elektromyografi Test Bulguları

Sekizinci haftada Ratlarda siyatik sinir hasar ve ruptur gibi yaralanmasında kök hücre uygulamasının olası nöroprotektif etkileri, EMG sinir iletim incelemeleri yapıldı. Kök hücre uygulamasının MNCV'ler üzerindeki etkileri araştırıldı ve gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı. Bu nedenle, MNCV'leri artırarak gösterildiği gibi, kök hücre uygulamasının periferik sinir ezilme yaralanmasında iyileşme yönünde etkisi olduğu görülmektedir (Tablo 10,11).

Tablo 10. 8. Haftada Çekilen EMG grafiği



Tüm Ratların dLAT/CV, AMP, AREA ve DUR görüntüleri alındı. İstatiksel olarak hesaplandı.

Tablo 11. EMG istatistiksel değerlendirme bulguları

		Ölçümler			
Grup		dLAT/CV	AMP	AREA	DUR
Ruptur	Kontrol	1.06±0.06 ^a	15.39±1.33	22.86±2.34	3.10±0.35
	Kök hücre	0.91±0.06 ^{ab}	17.02±1.68	26.47±2.96	2.97±0.12
Hasar	Kontrol	0.77±0.04 ^{bc}	14.97±2.32	22.81±3.41	3.51±0.36
	Kök hücre	0.70±0.05 ^c	19.18±1.34	26.38±2.52	2.66±0.22
P-değeri		0.000	0.279	0.681	0.204

-Aynı sütunda farklı küçük harf (a, b, c) taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir.

İstatistiki Analiz Yöntemi:

Tüm analizler SPSS (Versiyon 22.0) istatistik programında yapıldı. Değerler ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası (SEM) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için non-parametrik Kruskal-Wallis varyans analizi ve ikili karşılaştırmalar için de non-parametrik Mann-Whitney-U testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri önemli olarak kabul edildi.

Hasar kontrol ve kök hücre ve ruptur kontrol ve kök hücre BKAp ve latans değerleri açısından karşılaştırıldığında, CMAP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardı ($p < 0,001$) (Tablo 11). Gecikme değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardı (p)

Kök hücreden sonra CMAP amplitüdü, $p = 0.000$ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı.

Kök hücre sonrası CMAP ölçümleri hasar kontrol ve kök hücre arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı ($p = 0.0$)

Kök hücre sonrası CMAP ölçümlerine göre ruptüre edilmiş kontrol ve kök hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardı ($p = 0.0$).

Hasar kontrol ve ruptur kök hücre grupları CMAP ölçümleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p = 0.0$).

Hasar kontrol ve ruptur kontrol grupları ile hasar kök hücre arasında kök hücre uygulanan ve Latans değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p = 0.0 - p = 0.0$)

Hasar kök hücre grubunda CMAP değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p < 0,001$). Hasar kök hücre ve ruptur kök hücre gruplarının CMAP değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p = 0. - p = 0.$).

Bu çalışmada, sıçan siyatik sinir hasar ve ruptur yaralanmasında kök hücre uygulamasının olası nöroprotektif etkileri, EMG sinir iletim incelemeleri sonucunda, çalışma bulguları; siyatik sinir hasar ve ruptur yaralanması rat modelinde erken dönemde kök hücre uygulamasının sinir rejenerasyonu üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğunu ve motor fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığını göstermektedir.

5.6. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemede, deney gruplarının tamamında, gerek hasar gerekse ruptur oluşturulan gruplarda sinirlerde dejeneratif, yangısal ve proliferatif bulgular dikkati çekti. Kontrol hasar grubunda, hasar bölgesinde aksonal ilerlemenin vakuoler bir dejenerasyon (Waller dejenerasyonu) ile değişen derecelerde bozulduğu, kapillar damar sayısının arttığı, hafif derecede mononükleer infiltrasyonların ve hafif şiddette bir fibrozisin olduğu görüldü. Sinir kılıfı ve çevre dokularda ise yangının, sinir dokusuna göre çok daha fazla miktarda olduğu dikkati çekti. Bu grubun kök hücre tedavisi uygulanan grubunda da benzer bulgulara rastlanıldı ve kayda değer bir farka rastlanılmadı. Kontrol ruptur grubundaki bulguların, kontrol hasar ve bu grubun kök hücre tedavi grubuna göre çok daha şiddetli olduğu görüldü. En önemli bulgu olarak, ruptur bölgesinin normal sinir dokusuna göre yaklaşık iki kat kalınlaşması, bu bölgenin şiddetli bir bağ doku

formasyonu yanıtı göstermiş olması kaydedildi ve Masson'un üçlü boyama yöntemi ile ortaya konuldu. Bağ doku ile dolan ruptur bölgesinin her iki uç kısımlarımda daha fazla olmak üzere yoğun aksonal vakuoler dejeneratif değişikliklere rastlanıldı. Bu grubun kök hücre tedavisi uygulanan grubunda en dikkat çekici bulgular olarak, aksonal dejenerasyonun daha hafif seyretmesi ve bağ doku formasyonunun daha şiddetli olması kaydedildi.

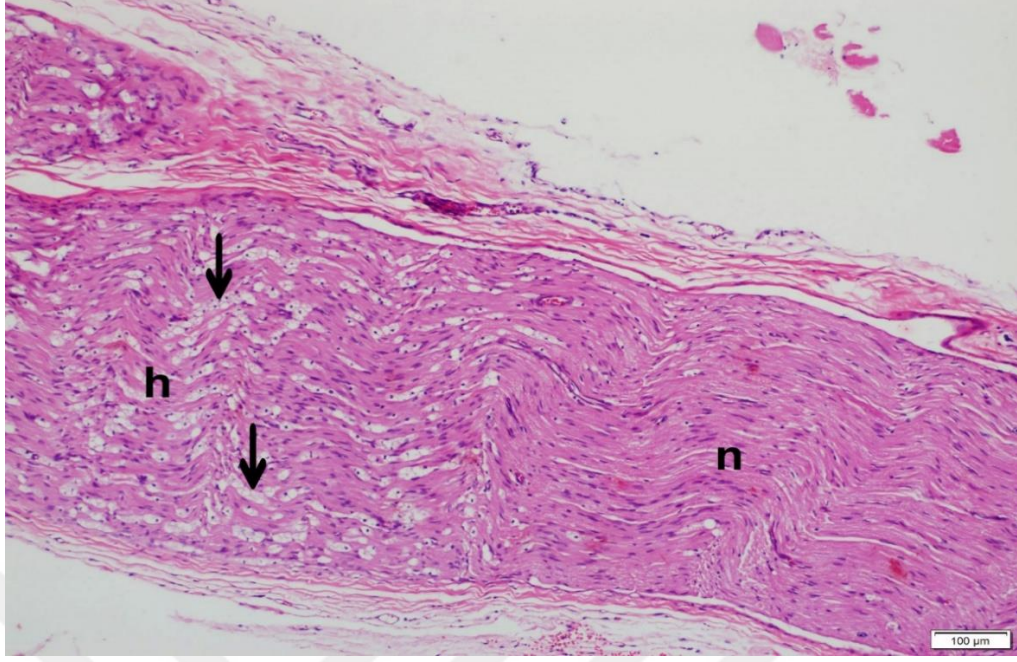
Tablo 12. Histopatolojik istatistiksel değerlendirme sonuçları

		Ölçümler				
Grup		Aksonal devamlılık	Fibroblast veya kollajen mevcudiyeti	Myelin kılıf	Yangı	Kapiller yapı
Ruptur	Kontrol	1.71±0.18	1.43±0.20 ^a	1.57±0.20 ^a	1.43±0.20 ^a	1.71±0.18 ^a
	Kök hücre	2.00±0.22	1.29±0.18 ^a	1.57±0.20 ^a	2.00±0.00 ^b	2.43±0.20 ^b
Hasar	Kontrol	2.14±0.14	2.86±0.14 ^b	2.29±0.18 ^b	1.86±0.26 ^{ab}	1.86±0.26 ^{ab}
	Kök hücre	2.14±0.14	2.29±0.18 ^c	2.14±0.14 ^b	2.43±0.20 ^b	1.43±0.20 ^a
P-değeri		0.277	0.000	0.026	0.020	0.036

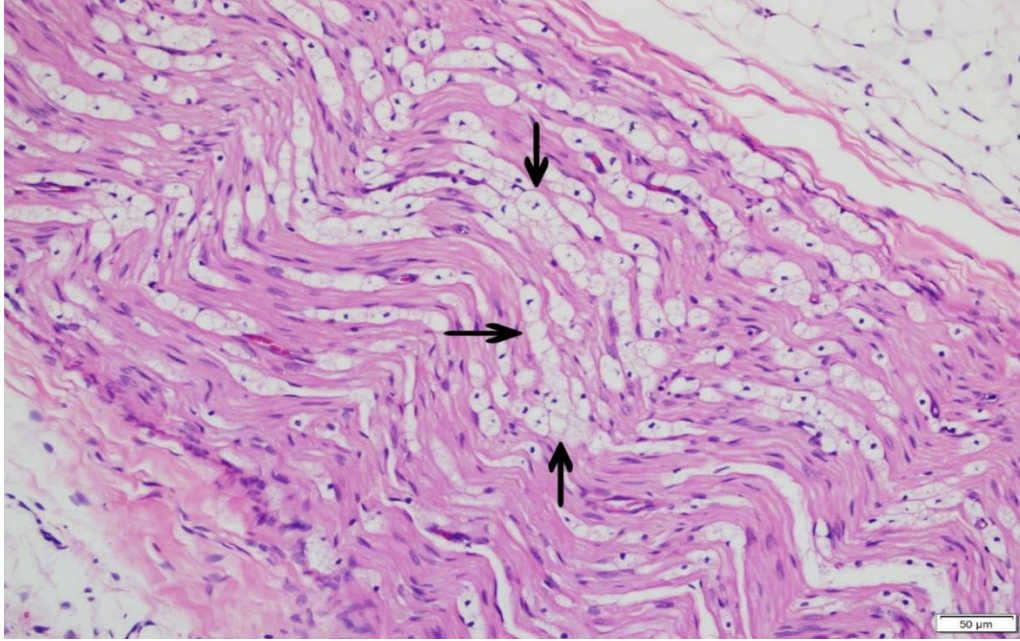
-Aynı sütunda farklı küçük harf (a, b, c) taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir.

İstatistiki Analiz Yöntemi:

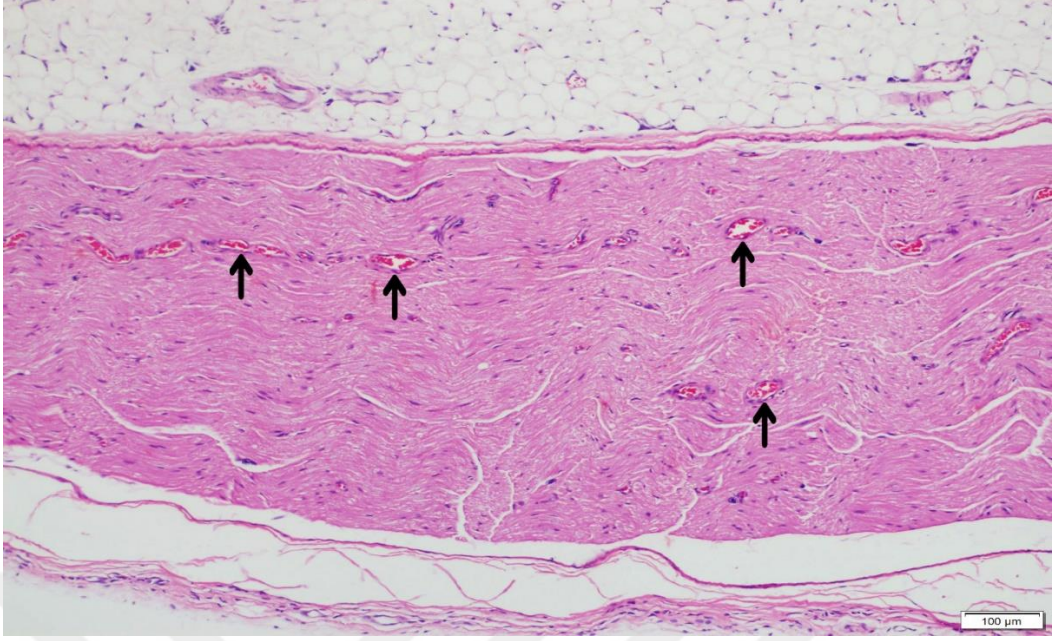
Tüm analizler SPSS (Versiyon 22.0) istatistik programında yapıldı. Değerler ortalama ± ortalamaların standart hatası (SEM) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için non-parametrik Kruskal-Wallis varyans analizi ve ikili karşılaştırmalar için de non-parametrik Mann-Whitney-U testi kullanıldı. P<0.05 değeri önemli olarak kabul edildi.



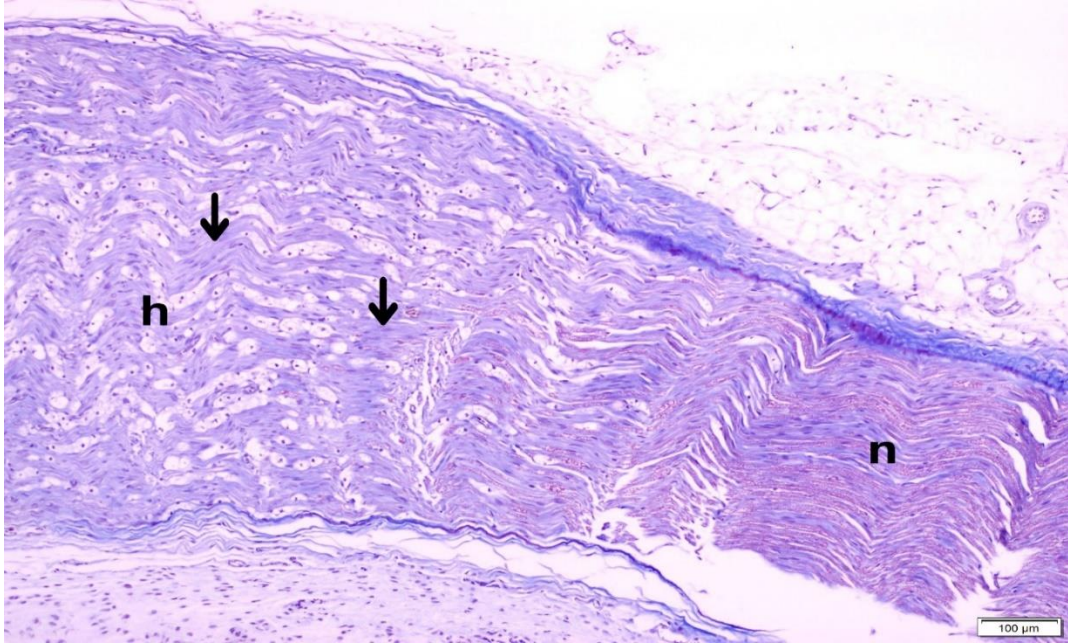
Şekil 29. Kontrol hasar grubunda normal sinir bölgesi (n), hasarlı bölge (h) ve hasarlı bölgede görülen aksonal dejenerasyonun vakuoler görüntüsü, Waller dejenerasyonu (oklar), HxE, 10X.



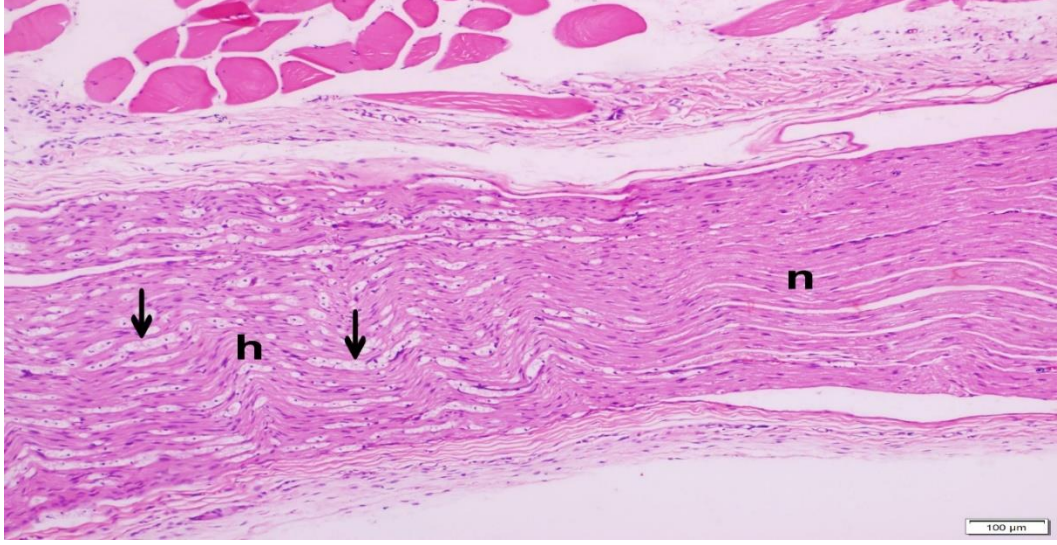
Şekil 30. Kontrol hasar grubunda hasarlı bölgede görülen şiddetli aksonal dejenerasyonun vakuoler görüntüsü, Waller dejenerasyonu (oklar), HxE, 20X.



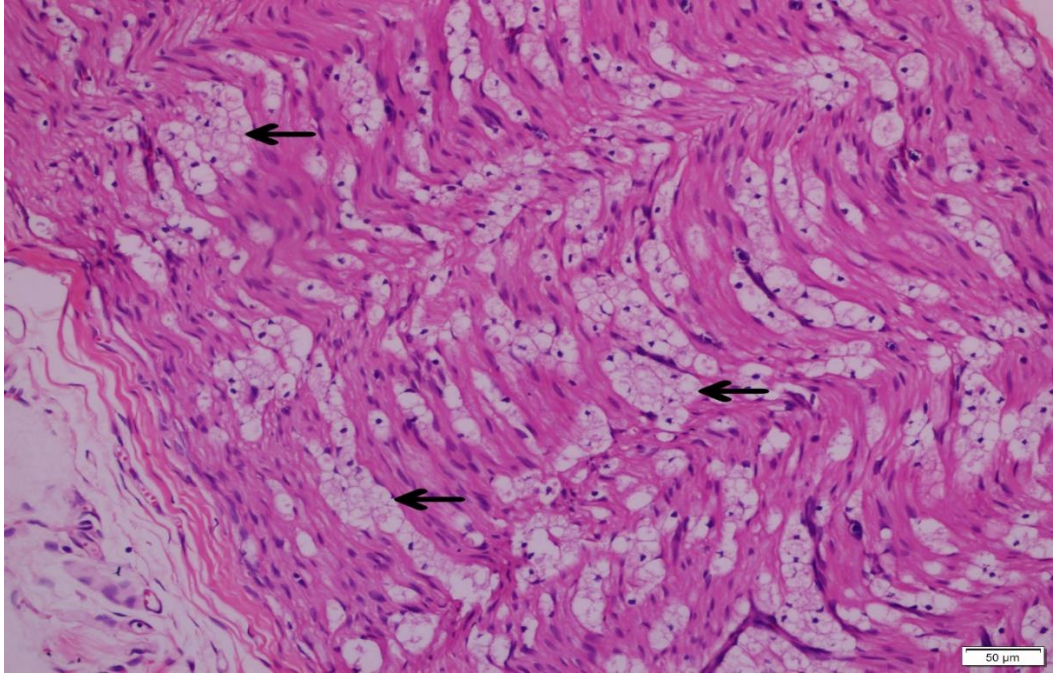
Şekil 31. Kontrol hasar grubunda normal sinir bölgesinde sayıları artmış damarlar (oklar), HxE, 10X.



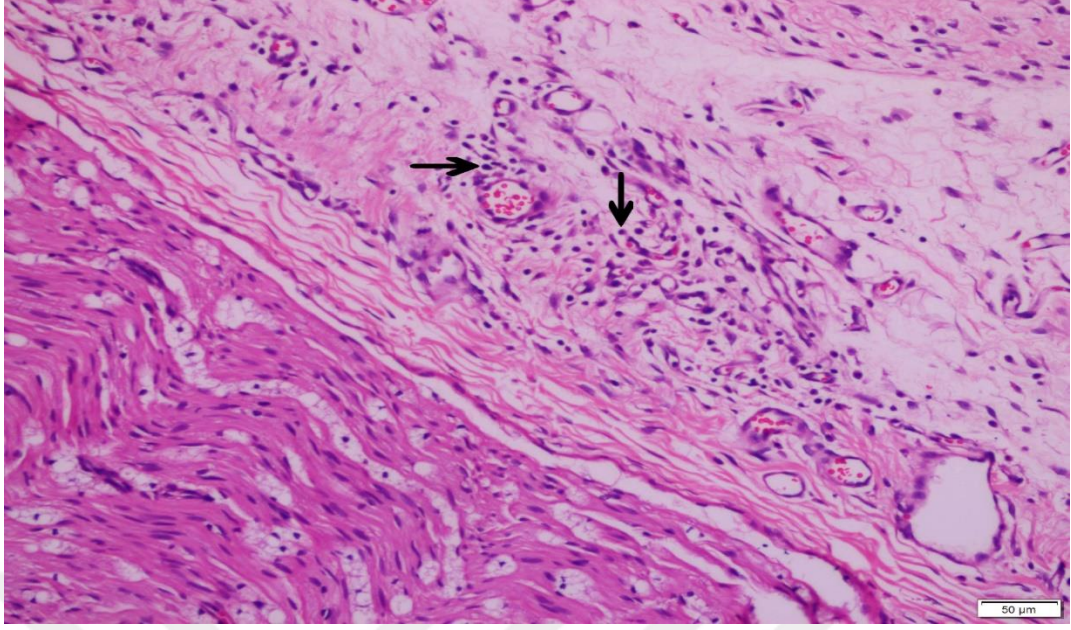
Şekil 32. Kontrol hasar grubunda normal sinir bölgesi (n), hasarlı bölge (h) ve hasarlı bölgede görülen bağ doku formasyonu (oklar), Masson' un üçlü boyaması, 10X.



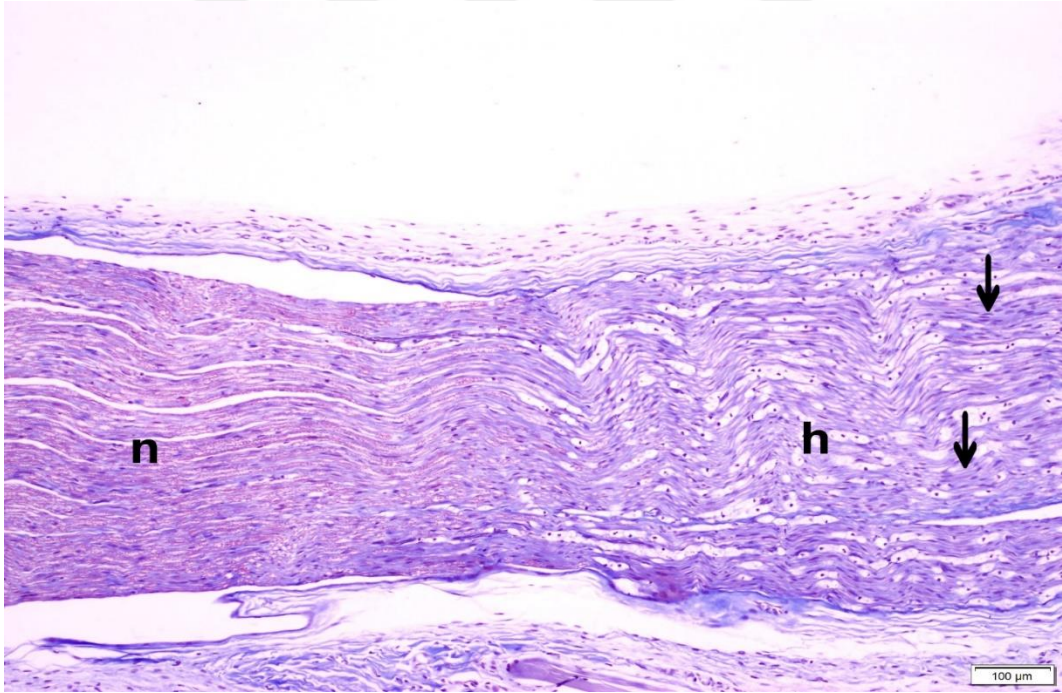
Şekil 33. Kök hücre hasar grubunda normal sinir bölgesi (n), hasarlı bölge (h) ve hasarlı bölgede görülen aksonal dejenerasyonun vakuoler görüntüsü, Waller dejenerasyonu (oklar), Hx&E, 10X.



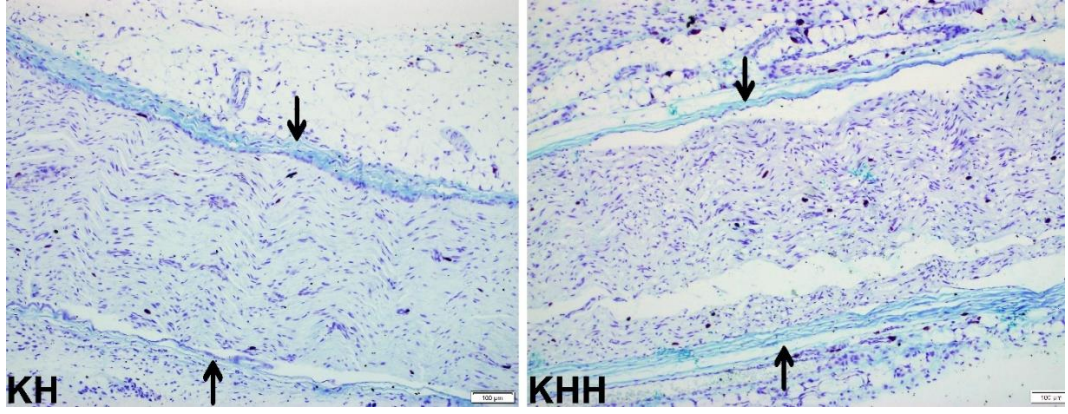
Şekil 34. Kök hücre hasar grubunda hasarlı bölgede görülen şiddetli aksonal dejenerasyonun vakuoler görüntüsü, Waller dejenerasyonu (oklar), Hx&E, 20X.



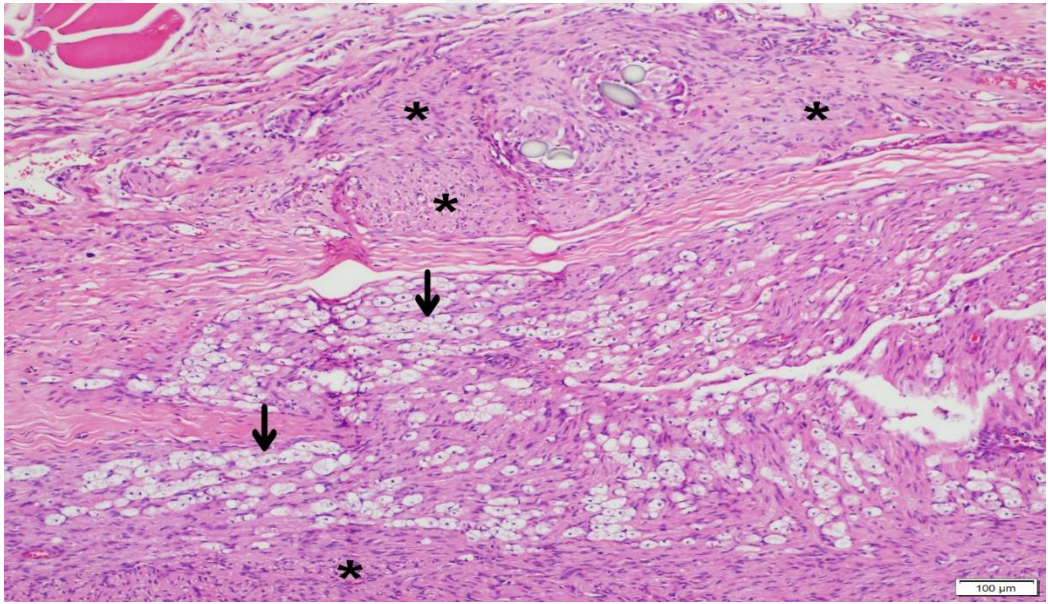
Şekil 35. Kök hücre hasar grubunda hasarlı bölgenin sinir kılıfında görülen mononükleer hücre infiltrasyonları (oklar), HxE, 20X.



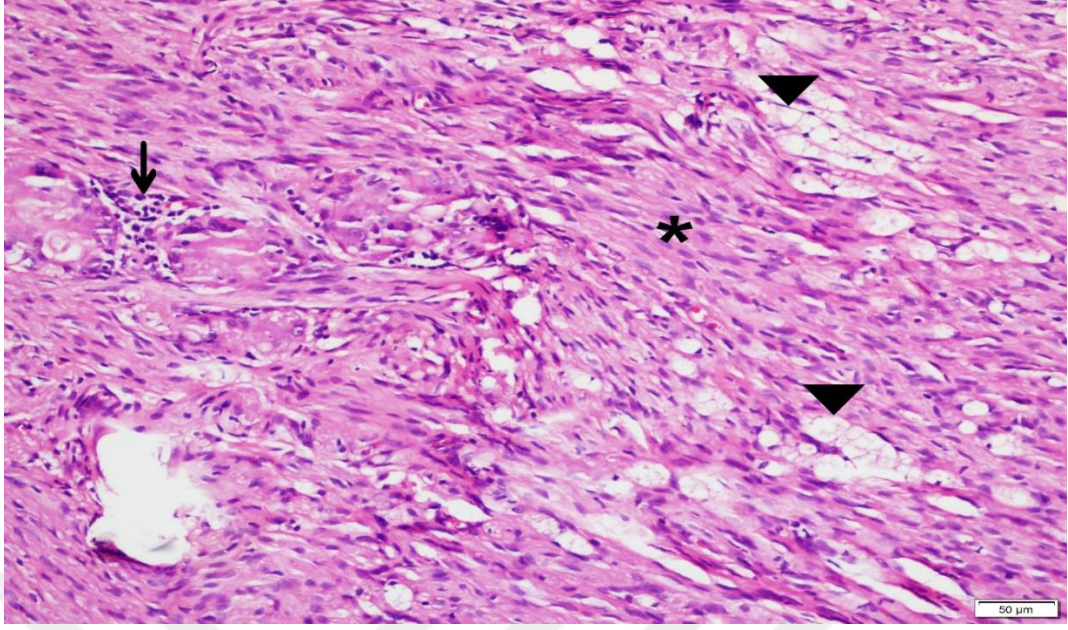
Şekil 36. Kök hücre hasar grubunda normal sinir bölgesi (n), hasarlı bölge (h) ve hasarlı bölgede görülen bağ doku formasyonu (oklar), Masson' un üçlü boyaması, 10X.



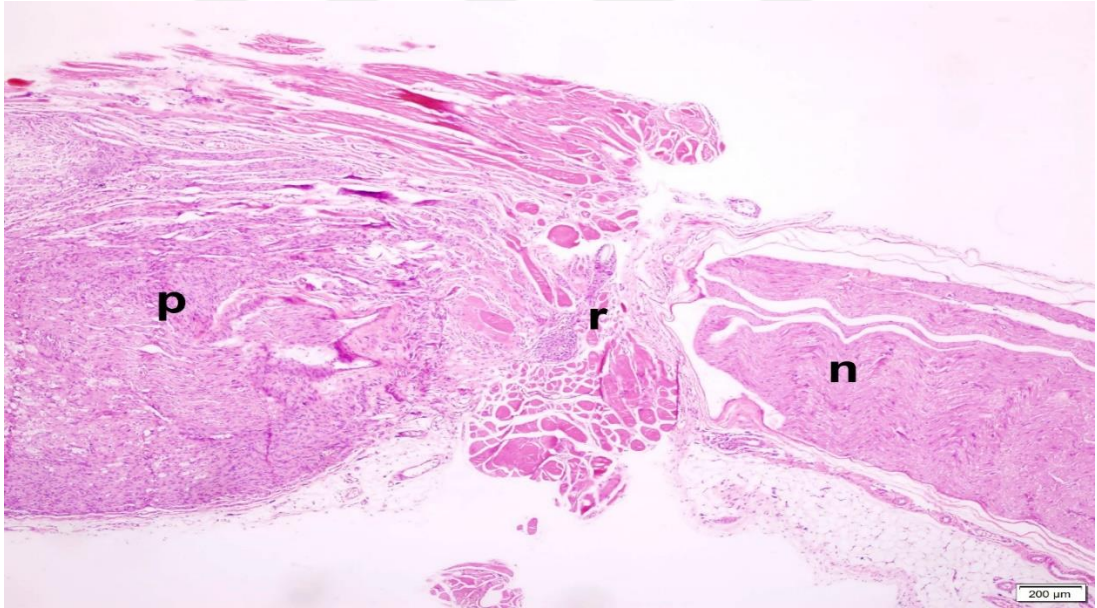
Şekil 37. Kontrol hasar grubunda (KH) ve kök hücre hasar grubunda (KHH), sinir kılıfında, benzer görünümde miyelin pozitifliği (oklar), Luxol fast blue boyaması, 10X.



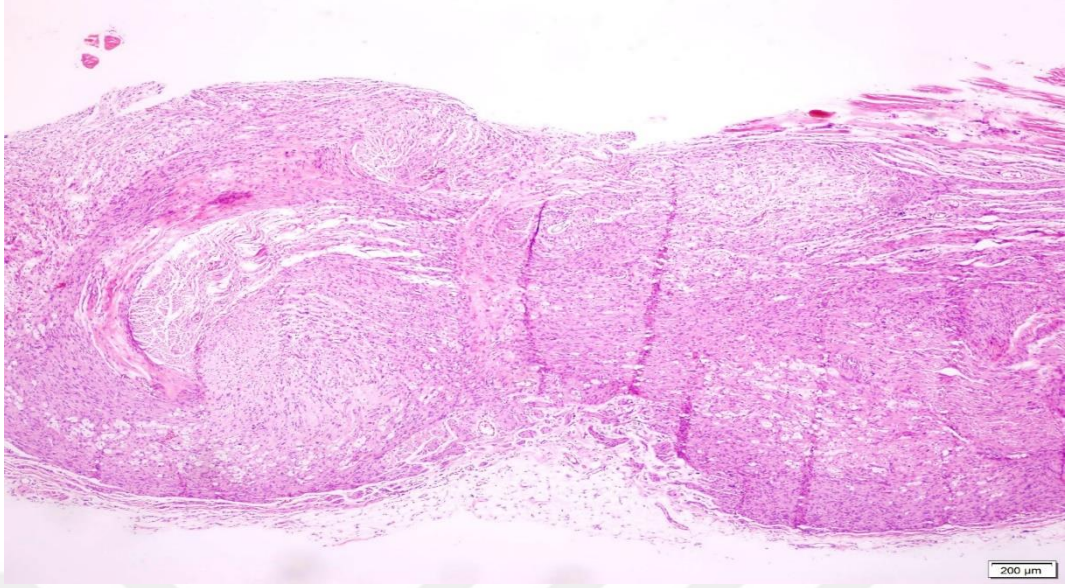
Şekil 38. Kontrol ruptur grubunda, ruptur bölgesinde görülen şiddetli aksonal dejenerasyon (oklar) ve bağ doku formasyonu (asteriksler), Hx E, 10X.



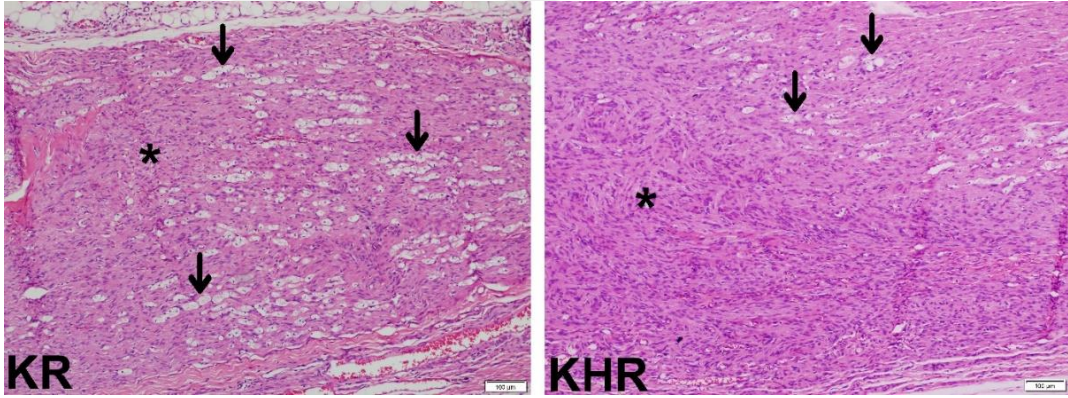
Şekil 39. Kontrol ruptur grubunda, ruptur bölgesinde görülen aksonal dejenerasyon (okbaşları) bağ doku formasyonu (asterik) ve hafif şiddette mononükleer hücre infiltrasyonu (ok), HxE, 20X.



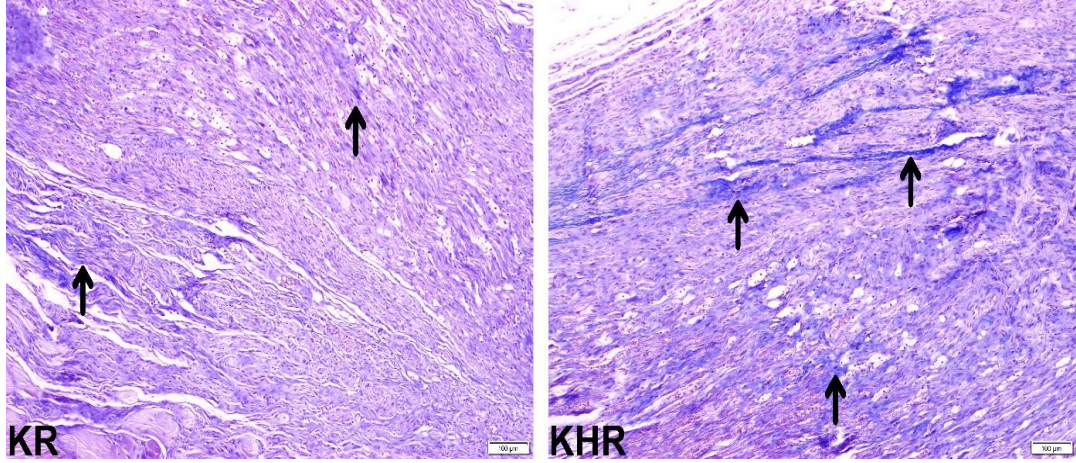
Şekil 40. Kök hücre ruptur grubunda, normal sinir bölgesi (n), ruptur bölgesi (r) ve proliferasyon bölgesi (p), HxE, 4X.



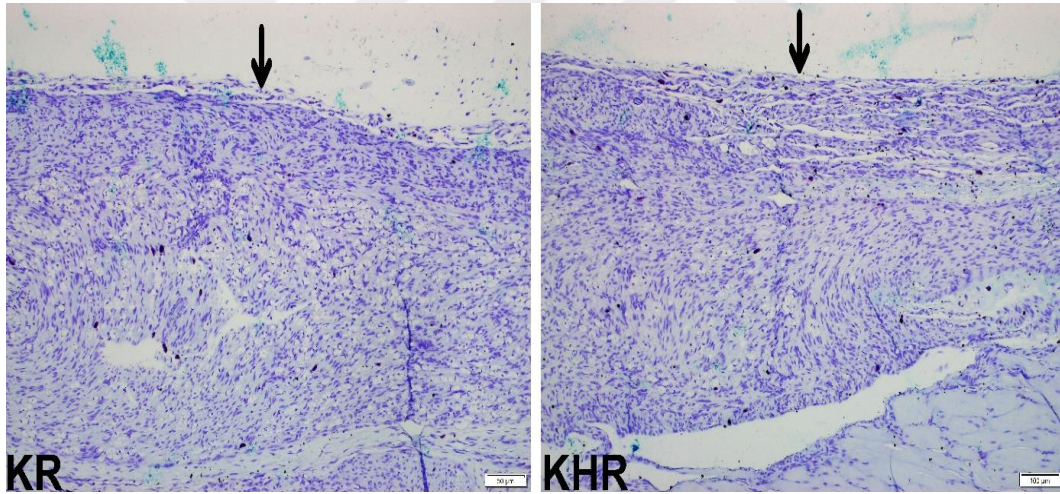
Şekil 41. Kök hücre ruptur grubunda, ruptur sonrası gelişen şiddetli proliferasyon, sinirde şiddetli kalınlaşma, HxE, 4X.



Şekil 42. Kontrol ruptur (KR) ve kök hücre ruptur grubunda (KHR) ruptur bölgelerinin görünümü, KHR grubunda aksonal dejenerasyon (oklar), KH grubuna kıyasla daha az, bağ doku formasyonu (asteriksler) ise daha fazla, HxE, 10X.



Şekil 43. Kontrol ruptur (KR) ve kök hücre ruptur grubunda (KHR) ruptur bölgelerinin görünümü, KHR grubunda bağ doku formasyonu (oklar), KR grubuna kıyasla daha fazla, Masson' un üçlü boyaması, 10X.



Şekil 44. Kontrol ruptur grubunda (KR) ve kök hücre ruptur grubunda (KHR), sinir kılıfında, azalmış ve benzer görünümde miyelin negatifliği (oklar), Luxol fast blue boyaması, 10X.

5.7. İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal değerlendirmeden elde edilen histoskorlar tablo 13' te verilmiştir. MBP antikoru ile yapılan boyamalarda hasar ya da ruptur oluşturulmayan sinir bölgelerinde sinir liflerinin ilerleyişine paralel şekilde,

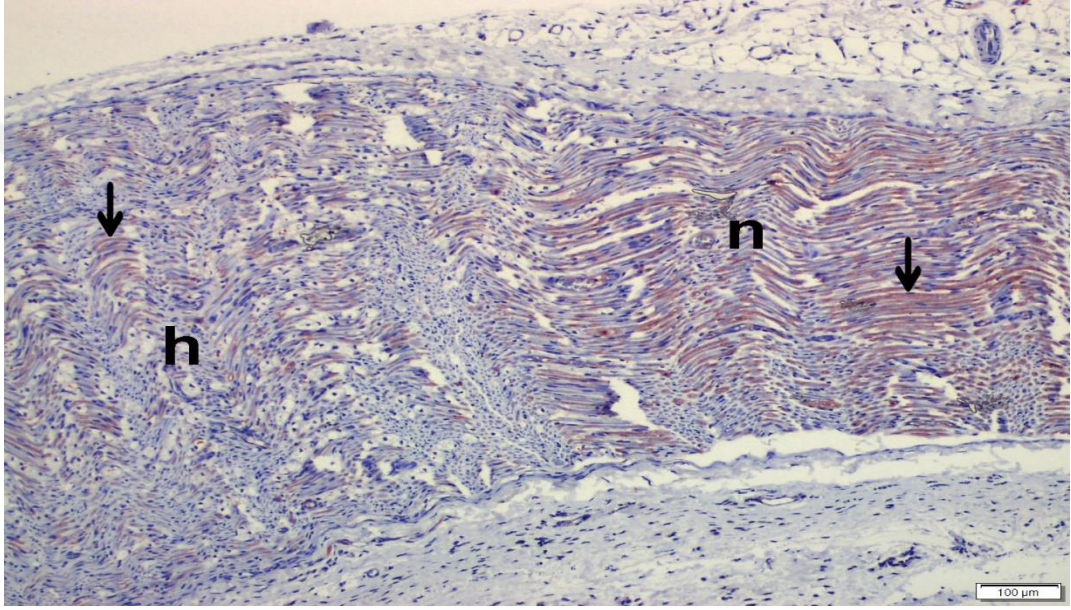
intrastoplazmik olarak yoğun ve şiddetli pozitifliklere rastlandı. Ruptur ve hasar bölgelerinde ise MBP ekspresyonunun hem yoğunluğunun hem de şiddetinin ciddi şekilde azaldığı görüldü. Ruptur gruplarında bu azalmanın daha şiddetli olduğu görüldü. Kök hücre tedavi gruplarında ise kontrol gruplarına göre kayda değer bir farklılığa rastlanmadı. CD68 antikoru ile yapılan boyamalarda, hasar ve ruptur bölgelerinde, 10' luk büyütmedeki bir alanda yaklaşık 10-15 civarı makrofajda, 20-25 civarı ise Schwann hücresinde intrastoplazmik pozitifliklere rastlanıldı. Makrofaj pozitifliklerinin oldukça şiddetli olduğu görülürken, Schwann hücrelerinde daha az şiddette bir boyanma dikkati çekti. Hasarsız ve ruptursuz sinir bölgelerinde pozitifliklere tek-tük rastlandı. Her iki kontrol grubunun, kök hücre tedavisi gruplarında dikkat çekici bir bulgu olarak Schwann hücresi pozitifliğinin çok daha fazla olduğu görüldü. S100 boyamalarında pozitifliklerin özellikle cerrahi sütür çevresinde çoğalan mikrogliya hücrelerinde olduğu görüldü. Diğer bölgelerde ise yine mikrogliyalarda tek-tük pozitifliklere rastlandı. NGF boyamalarında, pozitifliklerin tüm gruplarda benzer, oldukça seyrek ve damar içlerinde yoğunlaştığı görüldü.

Tablo 13. İmmunohistokimya skorlama değerleri

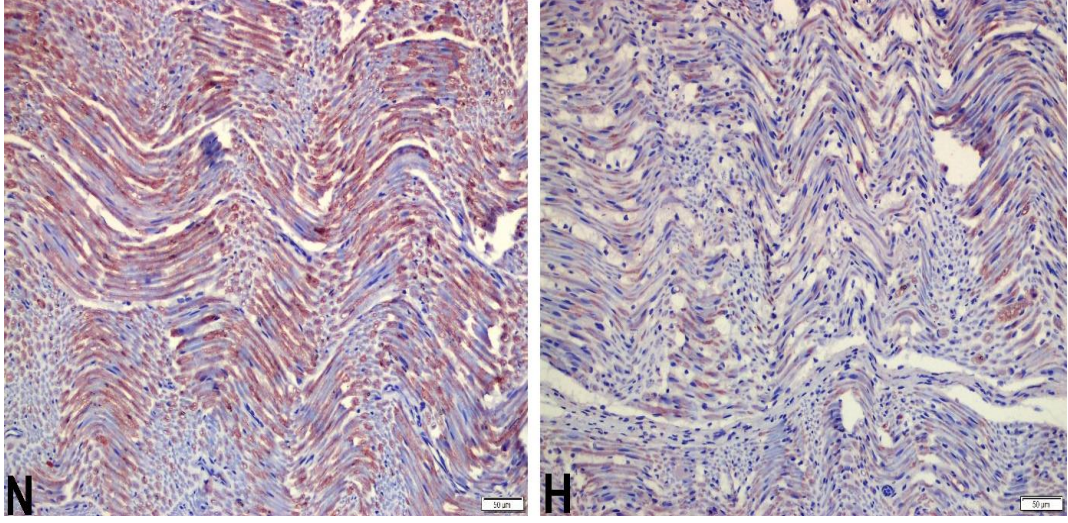
		Ölçümler			
Grup		MBP	CD-68	S-100	NGF
Ruptur	Kontrol	0.529±0.129	0.843±0.265	0.211±0.014	0.071±0.018
	Kök hücre	0.443±0.102	1.029±0.081	0.200±0.000	0.086±0.014
Hasar	Kontrol	0.543±0.121	0.829±0.228	0.186±0.034	0.071±0.018
	Kök hücre	0.686±0.132	1.171±0.127	0.171±0.029	0.086±0.014
P-değeri		0.715	0.448	0.587	0.845

İstatistiki Analiz Yöntemi:

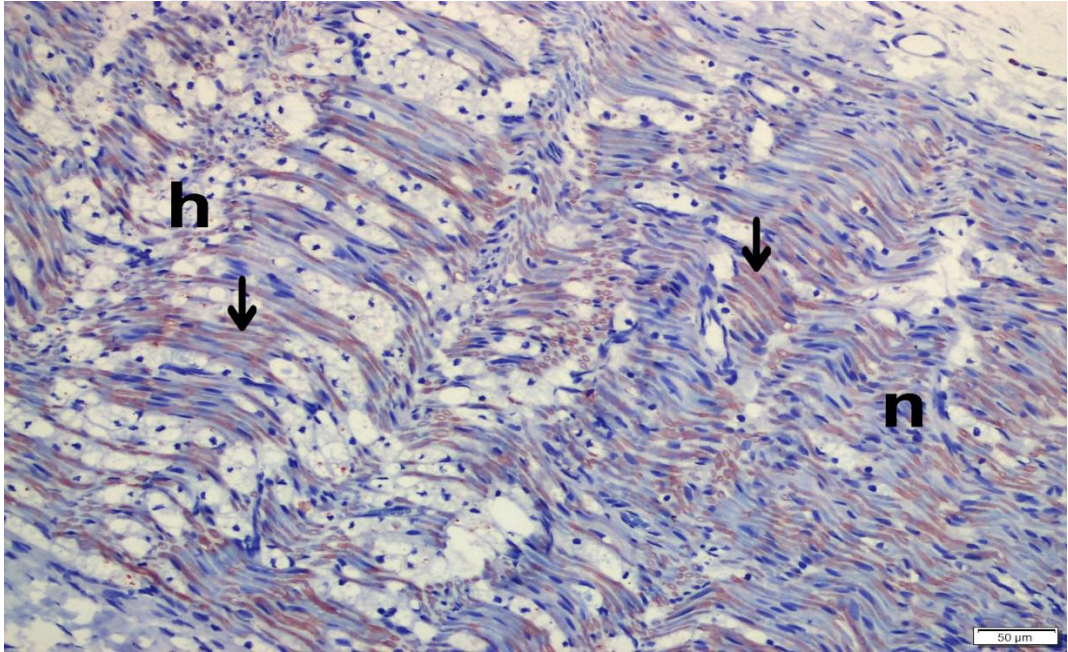
Tüm analizler SPSS (Versiyon 22.0) istatistik programında yapıldı. Değerler ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası (SEM) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için non-parametrik Kruskal-Wallis varyans analizi ve ikili karşılaştırmalar için de non-parametrik Mann-Whitney-U testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri önemli olarak kabul edildi.



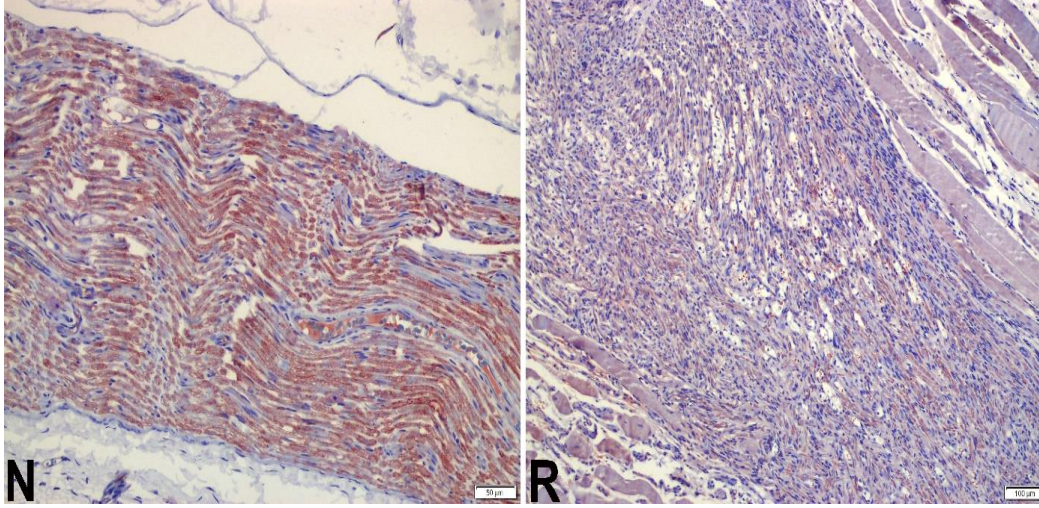
Şekil 45. Kontrol hasar grubunda, hasar bölgesinde (h), normal sinir bölgesine (n) göre azalmış MBP pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 10X.



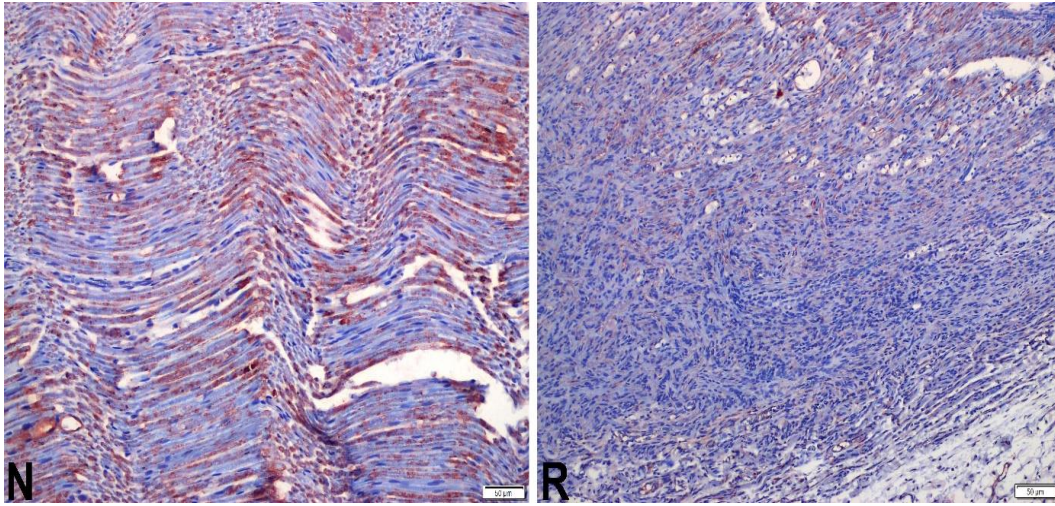
Şekil 46. Kontrol hasar grubunda, hasar bölgesinde (H), normal sinir bölgesine (N) göre azalmış MBP pozitifliği (kırmızı boyalı alanlar), immunperoksidaz boyama, 10X.



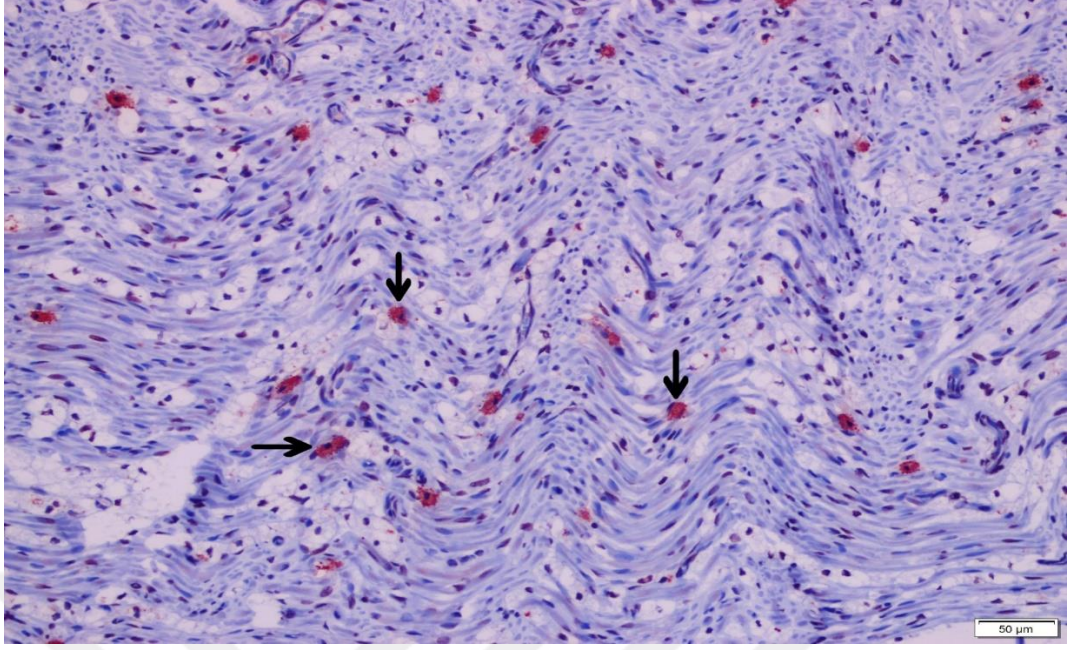
Şekil 47. Kök hücre hasar grubunda, hasar bölgesinde (h), normal sinir bölgesine (n) göre azalmış MBP pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.



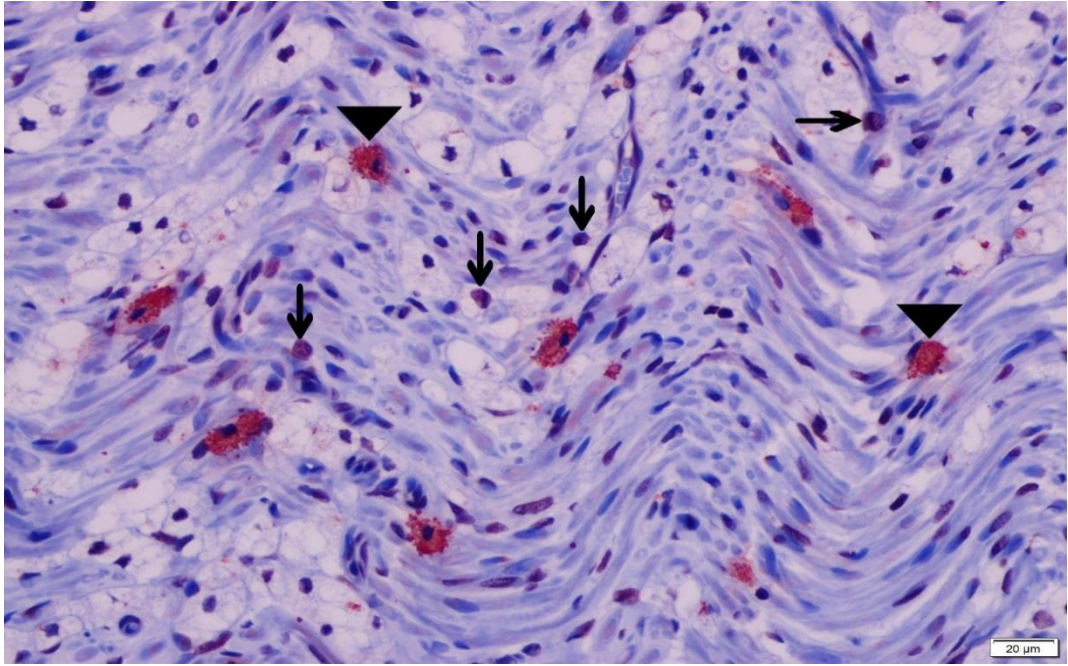
Şekil 48. Ruptur grubunda, ruptur bölgesinde (R), normal sinir bölgesine (N) göre ileri derecede azalmış MBP pozitifliği (kırmızı boyalı alanlar), immunperoksidaz boyama, 10X.



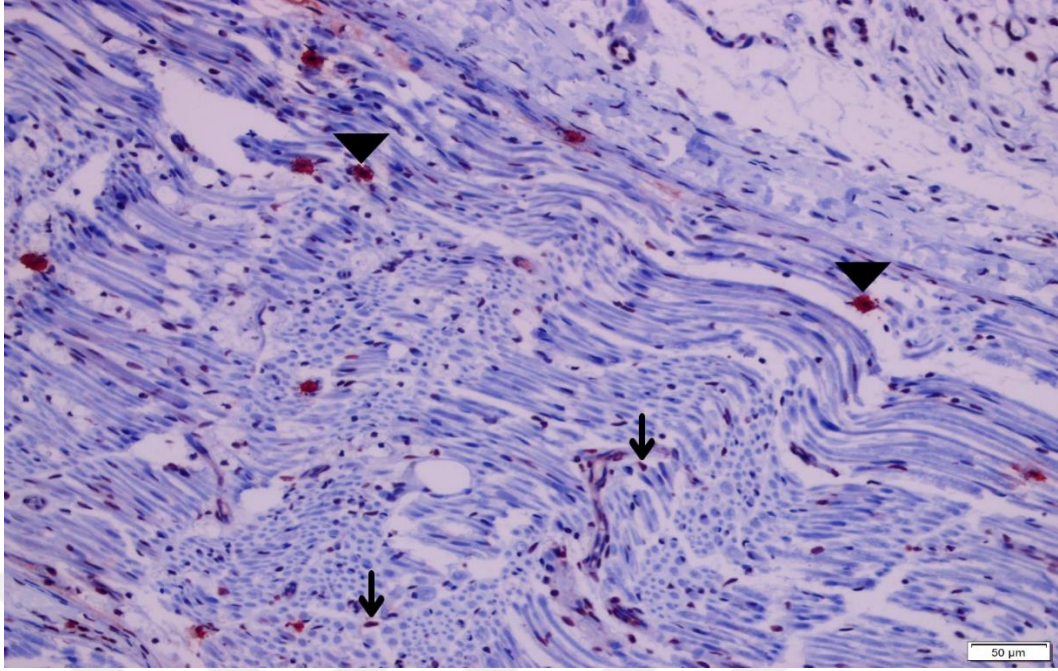
Şekil 49. Kök hücre ruptur grubunda, ruptur bölgesinde (R), normal sinir bölgesine (N) göre ileri derecede azalmış MBP pozitifliği (kırmızı boyalı alanlar), immunperoksidaz boyama, 10X.



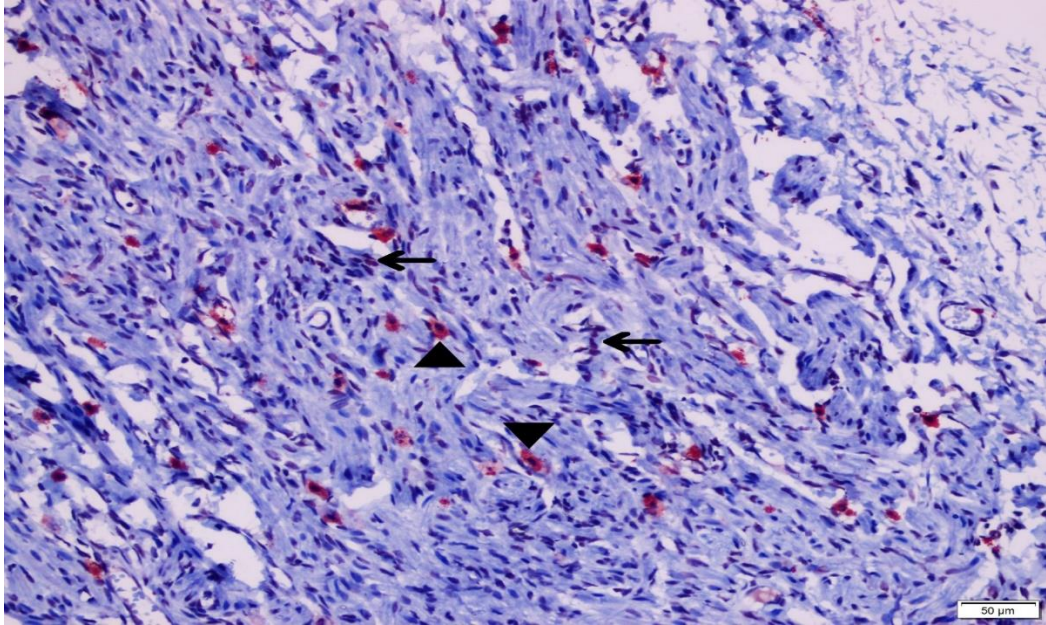
Şekil 50. Kontrol hasar grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (oklar) immunperoksidaz boyama, 20X.



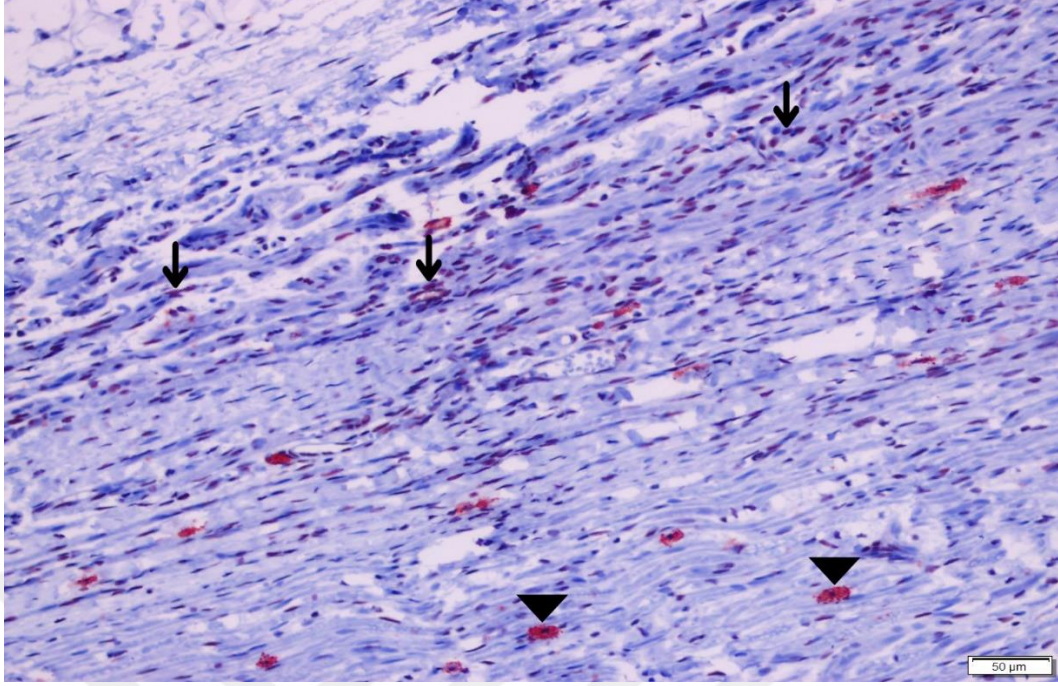
Şekil 51. Kontrol hasar grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (okbaşıları) ve CD68 pozitif Schwann hücreleri (oklar), immunperoksidaz boyama, 40X.



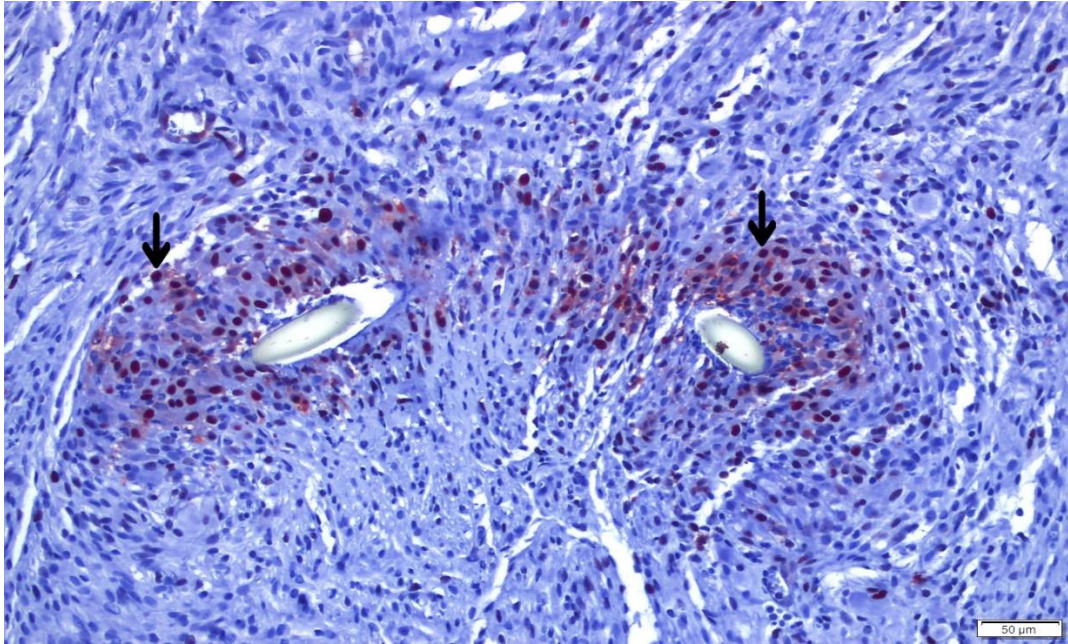
Şekil 52. Kök hücre hasar grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (okbaşları) ve CD68 pozitif Schwann hücreleri (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.



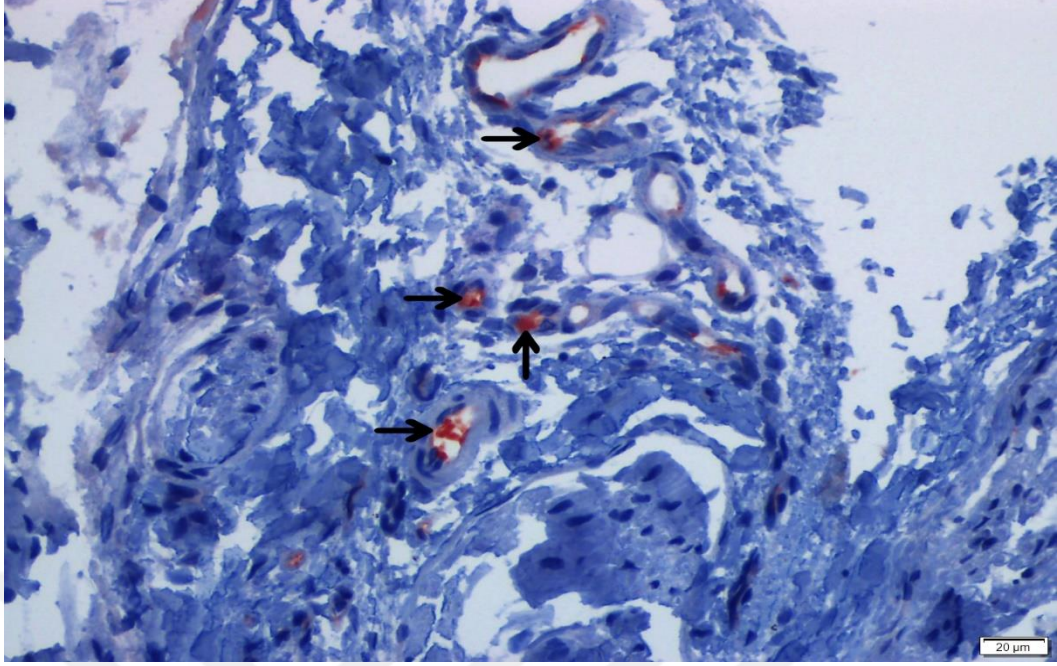
Şekil 53. Kontrol ruptur grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (okbaşları) ve CD68 pozitif Schwann hücreleri (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.



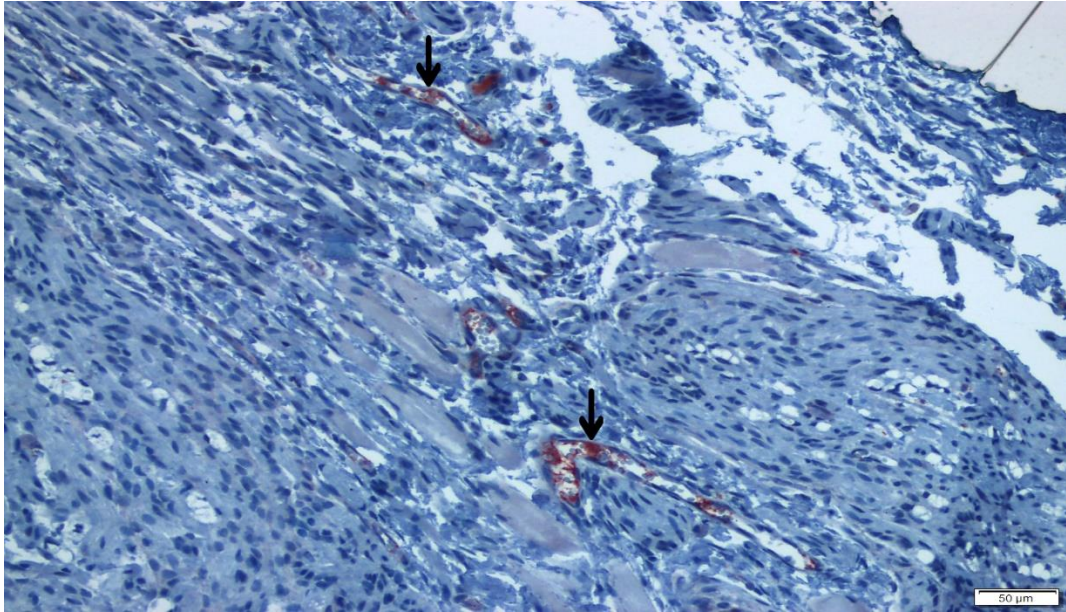
Şekil 54. Kök hücre ruptur grubunda, CD68 pozitif makrofajlar (okbaşıları) ve çok sayıda CD68 pozitif Schwann hücresi (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.



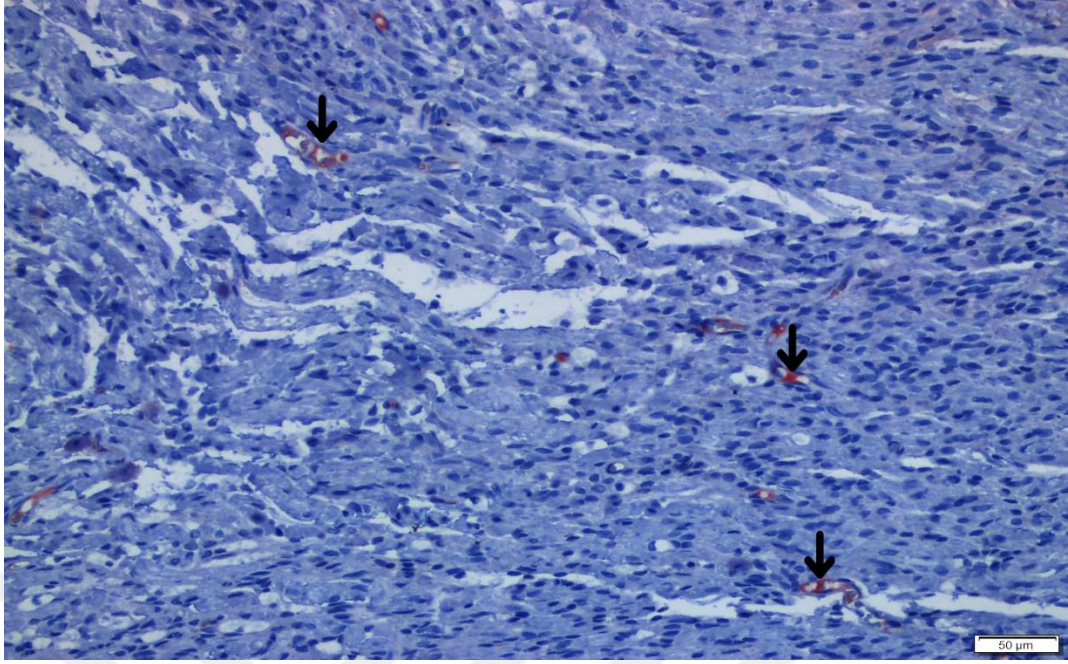
Şekil 55. Kontrol ruptur grubunda cerrahi sütür çevresine yoğunlaşmış S100 pozitif mikrogliya hücreleri, immunperoksidaz boyama, 20X.



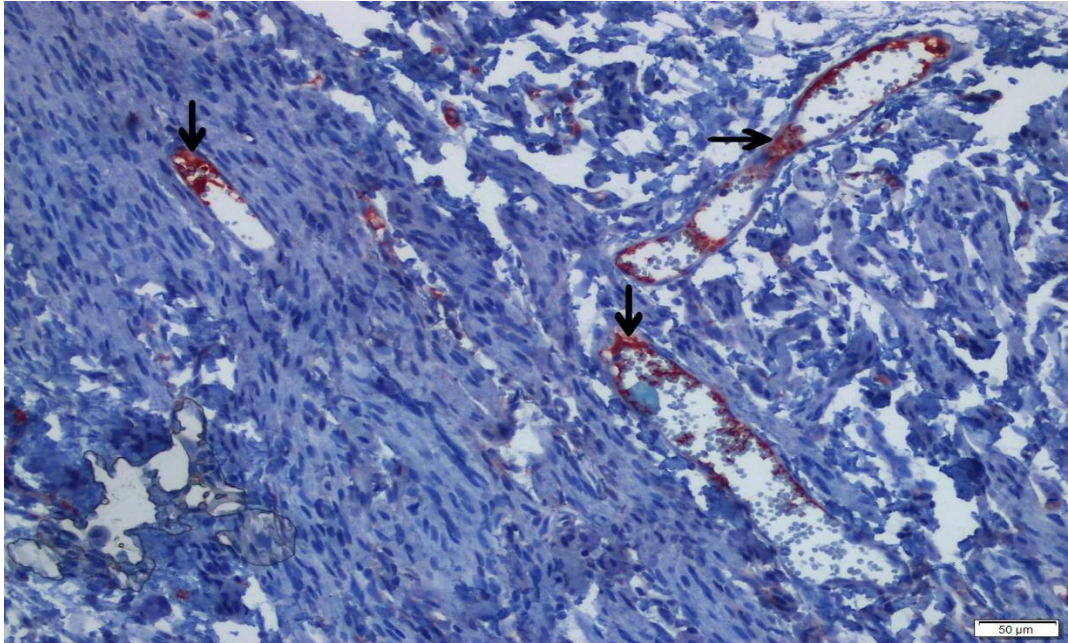
Şekil 56. Kontrol hasar grubunda damarlarda NGF pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 40X.



Şekil 57. Kök hücre hasar grubunda damarlarda NGF pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 40X.



Şekil 58. Kontrol ruptur grubunda damarlarda NGF pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.



Şekil 59. Kök hücre ruptur grubunda, damarlarda NGF pozitifliği (oklar), immunperoksidaz boyama, 20X.

6. TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları, özellikle siyatik sinir hasar ve rupturları hayvan refahını önemli derecede düşüren, savunma problemlerine yol açan, uzun bir tedavi süreci ve tedavi maliyeti olan bir sorundur. Veteriner Hekimlik alanında medikal ve cerrahi olarak yapılan tedavi metodları ile beklenen düzeyde sinir iyileşmesi sağlanamamaktadır.

Travmatik sinir lezyonları, Avrupa ve ABD'de her yıl birkaç yüz bin hastayı etkilemektedir (66). En şiddetli vakaların yaygın nedenleri arasında motorlu taşıt, ev içi, iş ve spor kazaları yer alır (67). Periferik sinir yaralanmalarının (PNI) sonuçları herkesin bildiği gibi yaşamı değiştirir ve sıklıkla yıkıcıdır, bu da etkilenen uzuvda çeşitli derecelerde sensorimotor bozuklukla sonuçlanır (68).

Periferik sinir yaralanmaları esas olarak travma, tümör ve iyatrojenik lezyonlarla ilişkilidir ve bu yaralanmalar nörolojik defisitlere ve fonksiyonel yetersizliğe yol açar. Gelişmiş ülkelerde periferik sinir yaralanmaları insidansının her yıl 100.000 kişide yaklaşık 18 olduğu tahmin edilirken, gelişmekte olan ülkelerde nispeten daha yüksektir (69).

Ülkemizde de özellikle yüksekte düşme ve trafik kazaları gibi travmalar sonucu sinir hasar ve rupturları oluşan hayvanlarda yaşam kalitesinin düştüğü, hayvan refahını olumsuz yönde etkilendiği ve bir çok hayvanın sensorimotorik fonksiyon kayıpları olduğu görülmektedir.

Travma oluşumunu takiben genellikle kötü ve değişken sonuçlu periferik sinir lezyonlarının oluşması, yaralana sinirin rekonstrüksiyonu ve fonksiyonunu yeniden kazanması için alternatif tedavi yöntemleri arayışını teşvik etmiştir (70,71)

Sunulan çalışmada hasarlı ve tam kat ruptur oluşturulmuş siyatik sinirde rekonstrüksiyon ve fonksiyonunun yeniden kazanması için kemik iliği kök hücreleri lokal olarak kullanılmış ve kayda değer sonuçlar alınmıştır.

Periferik sinir onarımının sonucunu tahmin etme girişiminde, sinir hasarının tipi, yeri ve kapsamı dahil olmak üzere; ameliyatın zamanlaması; onarım türü; fasiküllerin uygun hizalanması; cerrahi teknik; ve hasta komorbiditeleri gibi birçok faktör dikkate alınmalıdır (72)

Perifer sinir yaralanmasını takiben iyileşme zamanı ve sonuçların olumlu olması önem arz etmektedir. İyileşmeleri çok uzun bir zaman alan sinir hasarları eklemlerde sertlikler ve kaslarda atrofiler gibi komplikasyonlara yol açabilmektedirler. Yetersiz iyileşmeler ise ekstremiteler’de fonksiyon kaybıyla sonuçlanabilmektedir. Hızlı ve çok iyi bir periferik sinir onarımının olması için son yıllarda bir çok biomateryal, sinir tedavisinde kullanılmaktadır. Bu materyallerin bir çoğu yüksek maliyetli materyallerden oluşmaktadır. Ayrıca enfeksiyon, alerjik reaksiyon gibi istenmeyen yan etkiler bu materyaller tarafından oluşturulabilmektedir. (73).

Travma oluşumunu takiben genellikle kötü ve değişken sonuçlu periferik sinir lezyonlarının oluşması, yaralanan sinirin rekonstrüksiyonu ve fonksiyonunu yeniden kazanması için alternatif tedavi yöntemleri arayışını teşvik etmiştir (70,71)

Sunulan çalışmada hasarlı ve tam kat ruptur oluşturulmuş siyatik sinirde rekonstrüksiyon ve fonksiyonunun yeniden kazanması için kemik iliği kök hücreleri lokal olarak kullanılmış ve kayda değer sonuçlar alınmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle kök hücreler ile progenitör hücrelerin yetişkin insan SSS’de onarıcı nöroplastisite potansiyeline sahip oldukları bilinmektedir (74)

Günümüz modern tıbbının yeni metodlarla radikal olarak iyileştiremediği hastalıkların tedavilerini hasar gören hücre, doku veya organların biyolojik işlevlerini yerine getirmek için rejeneratif tıp ya da onarmak ile mümkün olduğu bildirilmektedir (31)

Bu aşamanın en önemli biyolojik ögesi ise kök hücreler (KH)’dir ve hücrel tedavi metodlarıdır. Geleneksel tıpla tedavisi olmayan, sağırılık, kas erimesi, körlük gibi patolojilerin KH, gen mühendisliği veya doku-organ mühendisliği ile tedavi edilebileceği öngörülmektedir (41,48,75)

Yapılan çalışmalar, periferik sinir yaralanmasını takiben kök hücrelerin sistemik olarak uygulanmasının etkili olabileceğini, düzenli sistemik dozlama yoluyla rejeneratif desteği sürdürmenin mümkün olduğunu, ayrıca nöromusküler kavşak düzeyinde uygulandığında da kök hücrelerin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Sinir rejenerasyonu ve yeniden innervasyonu uzun süreli ve dinamik bir süreçtir. Bu sürecin hızını ve bütünlüğünü iyileştirmeye yönelik her türlü girişim, eşit derecede kalıcı ve göçebe olmalıdır. Biyokimyasal araçların onarım bölgesine lokal olarak verilmesi yaygın bir yaklaşım olduğu bildirilmektedir (76-78)

Bryson JB ve ark (2014), hücre temelli terapi ve optogenetiğin bir birleşimi, merkezi kontrolü kaybedenlerde motor işlevi geri kazandırarak da umut vaat ettiğini. Fare siyatik sinirine aşılandığında, aksonlar arka bacak kaslarını yeniden innerve ettiğini bildirmişlerdir (79).

Sunulan çalışmada, sinir hasar ve rupturlarında epineurium içerisine tek doz lokal olarak kemik iliği mezenkimal kök hücre uygulandı. Uygulama sonrası postoperatif dönemde yapılan testler sinir fonksiyonlarında umut verici sonuçlar kaydedildi.

Sinir onarımında temel olarak, kök hücre tedavilerinin ilk önemli noktası; hangi çeşit nörolojik hastalıklarda hangi hücrelerin kullanılması gerektiğidir (32).

MKH'ler bir çok hücre tipine dönüşme kabiliyetine sahip multipotent kök hücrelerdir. İn vitro ve in vivo'da kondrositlere, kas hücrelerine, osteoblastlara, nöronal hücrelere, adipositlere dönüşebildikleri saptanmıştır (32). Mezenkimal kök hücreler kas, kemik iliği ve göbek kordonunda bulunan Wharton peltesi'nde mevcuttur (30). Mezenkimal kök hücrelerin yenilenme ve multipotens yetenekleri çok yüksek hücrelerdir (33-35).

Sunulan çalışmada da kendilerini yenileme kapasiteleri oldukça yüksek ve nöronal hücrelere farklılaşabilen MKH kök hücreler tercih edildi. Sir G. Ve ark (2016)'nın bildirdiği, MKH'lerin bulundukları yerlere paralel olarak, ratların femur ve tibia kemik İliği tercih edildi (30). MKH'lerin laboratuvar koşullarında izolasyonu ve Kültürü yapıldı.

Tam kesi modeli uygulanmış periferik sinirlerde kök hücre kullanılarak, sinir rejenerasyonunu araştıran çalışmaların olmasına rağmen, klip sıkıştırma

yöntemiyle oluşturulan periferik sinir hasarlarında veya periferik sinir yaralanmalarını başka modellerinde kök hücre nadiren kullanılmıştır (67,80).

Sunulan çalışmada ratlarda hem tam kesi modeli oluşturuldu, hemde klip sıkıştırma yöntemi uygulandı. Her iki yöntemde kök hücrenin sinir rejenerasyonu incelendi.

Yapılan bir çalışmada, İnsan göbek kordonu kanından türetilen mezenkimal kök hücreler 1×10^6 , siyatik sinirin ezilerek yaralanmış segmentine enjekte edilmiş ve insan göbek kordonu kanından türetilen mezenkimal kök hücrelerin, ezilme ile yaralanmış siyatik sinirlerin fonksiyonel iyileşmesini desteklediğini bildirmektedirler (81)

Başka bir çalışmada kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (5×10^6 , yaklaşık 0.1 mL), iskemi/reperfüzyon hasarı olan sıçanların omuriliğine transplantasyondan sonra nöronlara farklılaştığı, 1 ve 24 saat sonra tekrar retro-orbital enjeksiyonla intravenöz olarak enjekte edildiği bildirilmiştir (82)

Sunulan çalışmada iki hasar ve iki tam kat ruptur oluşturulan 4 grubun birer grup ratlarına epineurium kılıf içerisine subparaneural olarak 1 ml'lik insulin enjektörü ile 0,05 ml içerisinde $2,5 \times 10^5$ adet kök hücre enjekte işlemi gerçekleştirildi. Kök hücre uygulaması operasyon sırasında lokal olarak tek doz uygulandı ve sonrasında tekrar doz yapılmadı. Postoperatif takip, kavramatesti, yürüme testi, hot plate ve emg testleri sonucunda kök hücre uygulanan gruplarda iyileşmenin iyi olduğu görüldü.

Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri içeren bir silikon tüpün sıçan siyatik sinir boşluğuna transplantasyonu, sıçanın yürüme davranışını iyileştirir, kas atrofisini azaltır ve akson rejenerasyonunu uyardığını bildirmişlerdir (83).

Yapılan çalışmada hasar ve tam kesi oluşturulan ratlara mezenkimal kök hücre uygulanmış gruplarda, kontrol gruplarına göre kavrama, parmak izi ve sıcak zemin testleri ile emg sonuçları daha iyi olduğu, kas atrofilerinin kontrol gruplarında görülürken kök hücre gruplarında kasların geliştiği görüldü.

Yapılan bir çalışmada: ratlarda altı mm hasar oluşturulmuş; ratlara; pcl kondüit uygulanan grub, pcl kondüit ve kök hücre uygulanan, otogreft tedavi uygulanan, tedavi uygulanamayan grup olmak üzere 4 grub oluşturulmuştur. oniki hafta sonra, SFI, histomorfolojik olarak da; H&E boyamayla şekillenmekte olan sinir kalınlıkları değerlendirilmesi yapılmıştır. Şekillenen sinirin kalınlığı ve gastrocnemius kası kitlesi değerlerine göre: sinir gelişiminin otogreft grubunda en iyi, kök hücre eklenen grupta ise eklenmeyen gruba göre daha iyi olduğu saptanmıştır. SFI'nin 12. hafta sonunda yapılan değerlendirmesinde ise anlamlı bir fark saptanamadığını bildirmiştir (84).

Sunulan çalışmada: sadece mezenkimal kök hücre etkinliğine bakılmış, başka başka bir yöntemle karşılaştırılmamıştır. Ratların siyatik sinirinde hasar oluşturulan kontrol grub, hasar oluşturulan kök hücre uygulanan grub ve ruptur oluşturulup, sutur uygulana grub ve ruptur oluşturulup, sutur uygulandıktan sonra kök hücre uygulanan grup olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. SFI değerlerinde hasar ve ruptur oluşturulan gruplarda kök hücre uygulanan grupların kendi kontrol gruplarına göre, Santiago ve ark, (2009) yaptığı çalışmada SFI değerlerinde anlamlı

bir fark bulamamalarının aksine, bu çalışmamızda anlamlı bir fark bulunmuştur(84). Masson'un üçlü boyama yöntemi ile kontrol ruptur grubundaki bulguların, kontrol hasar ve kök hücre tedavi grubuna göre çok daha şiddetli olduğu görüldü. En önemli bulgu olarak, ruptur bölgesinin normal sinir dokusuna göre yaklaşık iki kat kalınlaşması, bu bölgenin şiddetli bir bağ doku formasyonu yanıtı göstermiş olduğu şeklinde düşünüldü.

Yapılan bir çalışmada fonksiyonel değerlendirmede ratların iyileşme sonuçları olumlu sonuç verselerde, istatistiksel olarak önemli farklar ortaya koymamaktadır. Histomorfolojik değerlendirmede sonuçların ise kök hücre uygulanan gruplarda anlamlı farklılıklar ortaya çıktığı bildirilmiştir (85).

Sunulan çalışmada, kök hücre uygulanan gruplarda yapılan fonksiyonel testler ve istatistik sonuçlarının uyumlu olduğu ortaya koyulmuştur. Histopatolojik iyileşme sonuçları kök hücre uygulanan gruplarda anlamlı düzeyde olsada, fonksiyonel iyileşme daha bariz olmuştur.

Yapılan bir çalışmada kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, nöronlarla birlikte kültürlendiğinde Schwann benzeri hücelere farklılaşabilir ve nörit büyümesini hızlandırabildiği bildirilmiştir (86)

Çalışmamızda da kök hücre uygulanan ruptur grubunda proliferatif değişikliklerin ön planda olduğu görüldü. Özellikle Schwann hücre aktivasyonunda, sayılarında ve bu hücrelerin CD68 ekspresyonunda artış tespit edildi. Bu durum, ölü hücrelerin, makrofajlar ve mikrogliyalara ek olarak CD68 pozitivitesi gösteren Schwann hücreleri tarafından da fagosit edildiğinin bir göstergesi olarak düşünülmekte ve iyileşmeye katkı sağladığı düşünülmektedir.

Yang et al.(2011)yaptıkları bir çalışmada, ipek fibronin bazlı bir sinir kanalına destek hücreleri olarak kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin verilmesinin, Schwann hücre markörü S100'ün ekspresyonunu arttırdığını, beyin kaynaklı nörotrofik faktör, siliyer nörotrofik faktör ve temel fibroblast büyümesi dahil olmak üzere birçok büyüme faktörünün salgılanmasını arttırdığını göstermişler ve siyatik sinir yaralanması olan ratların histolojik ve fonksiyonel iyileşmesini desteklediğini bildirmişlerdir (87).

Sunulan çalışmada Schwann hücrelerinin S100 ekspresyonlarında gruplar arası bir farklılığa rastlanmamakla beraber CD68 pozitifliklerinin kök hücre ruptur grubunda arttığı görüldü. Schwann hücre aktivasyonunu gösteren bu durumun hem doku artıklarının temizlenmesi hem de yeni miyelin sentezine olanak sağladığı düşünülmektedir. S100 ekspresyonun hücre çoğalmasının ancak belirli aşamalarında arttığı göz önünde bulundurulduğunda, bu çalışmadaki gruplar arası benzerliğin normal karşılanması gerekmektedir.

Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin periferik sinir rejenerasyonu üzerindeki destekleyici etkileri karmaşık olabilir ve sadece onların Schwann benzeri hücrelere farklılaşmasına bağlı olmayabilir (88).

Çalışmamızda Schwann hücre proliferasyonuna ek olarak, CD68 pozitif makrofaj ve bağ doku hücreleri proliferasyonlarına rastlanmıştır. Bu hücrelerinde doku onarımında görev alan büyüme faktörleri salgıladıkları bilinmektedir (89,90).

Chen ve ark.(2007) yaptıkları bir çalışmada farelerin femur ve tibia'larından elde edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin, Schwann benzeri hücreler yerine fibroblast şeklindeki hücrelere dönüştüğünü bulmuşlardır (83).

Sunulan çalışmada da, özellikle kök hücre ruptur grubunda, kök hücrelerin Schwann hücrelerine ve bağ doku hücrelerine transforme oldukları görüldü.

Han ve ark. (2016) yaptığı bir çalışmada diyabetik nöropatili sıçanlarda periferik sinir iyileşmesinin, BM-MSD uygulamasının doğrudan angiogenezi arttırdığı, nörotrofik etkilere sahip olduğu ve sinirdeki miyelinizasyonu geri kazandırdığını bildirilmişlerdir (91).

Çalışmamızda da hem hasar hem ruptur gruplarında damar sayısının arttığı görüldü. Ancak kök hücre tedavi gruplarında ki damar artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Yapılan bir çalışmada ratlarda; 10 mm boşluklu siyatik sinir hasarı oluşturulmuş ve sinir hasarına fibrin kondüit ile eşliğinde kemik iliği ya da yağ dokusu kökenli kök hücreler ile tedavi uygulanmıştır. Anti-S-100 ve anti-PGP 9,5 ile yapılan değerlendirme sonucunda aksonal ve Schwann hücre organizasyonunda, yağ dokusu ve kemik dokusu kaynaklı kök hücrelerin benzer olumlu etkiler oluşturduğu bildirilmiştir (92).

Sunulan çalışmada, kemik dokusu kaynaklı kök hücre kullanılmış, operasyon sonrası sekiz haftalık bir süre sonunda yapılan değerlendirme yapılmıştır. Kök hücre uygulanan gruplarda, kontrol gruplarına göre aksonal dejenerasyon, kıyasla daha az, bağ doku formasyonu ise daha fazla görülmüştür.

Kök hücre tedavisinin, ruptur oluşturulan sinirlerde hasar oluşturulan sinirlere göre daha iyi sonuçlar verdiği bu çalışmada da görüldü (93).

Sunulan çalışmada; histopatolojik incelemelerde kök hücre uygulanan ruptur gruplarında aksonal dejenerasyon kontrol grubuna göre daha az olarak görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kök hücre tedavisinin ruptura bağlı

aksonel dejenerasyonun anlamlı bir şekilde azaldığının bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Kök hücre uygulanan grupta schwann hücre aktivasyonunun CD 68 pozitifliğini artması (93) sunulan çalışma ile uyumlu olduğu görüldü. Schwann hücrelerinin pozitif boyanmasının artmış olması sinir gelişimi ve nörorejenerasyon olduğunu göstermektedir.

Sinir iletim incelemeleri, hayvan deneylerinde periferik sinir rejenerasyonu için değerli bir nicel değerlendirmeleri olarak bilinmektedir (94). Birkaç çalışmada, çeşitli farmakolojik ajanların ezilme yaralanması modeli üzerindeki etkileri araştırılmıştır (95,96)

Bu çalışmada da kök hücre uygulamasının sinir iletim hızı (CV)'ler üzerindeki etkileri araştırıldı ve gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı. Bu nedenle, MNCV'leri artırarak gösterildiği gibi, kök hücre uygulamasının periferik sinir ezilme yaralanmasında iyileşme yönünde etkisi olduğunu düşünüyoruz. Öte yandan, kök hücre uygulanan grupların sinir iletim hızı (MNCV)'lerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenemedi. Bu nedenle, erken uygulama periyodu için bir sıçan sıyatik sinir ezilme yaralanması modelinde kök hücre uygulamasının elektrofizyolojik iyileşme üzerinde bağlı bir etkisinin fonksiyonel iyileşme ile korelasyonu için ayrıca değerlendirmelerin yapılacağı daha geniş gruplarda daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Aktif motor unit (MU)'ların sayısı ve aktif MU'ların ateşleme hızı arttırıldığında, yüzey EMG'ye katkıda bulunan motor ünite aksiyon potansiyellerinin (MUAP'ler) sayısındaki değişiklik nedeniyle sistemin dinamiklerinde bir değişiklik olacağı iyi bilinmektedir (97).

Bu durumda, sEMG sinyalinin spektral enerji dağılımı ve geometrisi değişebilmektedir. Literatürde EMG sinyallerinin değerlerinin değişebileceği bildirilmiştir (98).

Çalışmamızdaki farklılıkların nedeni bu olabilir. Siyatik siniri iyileştirirken kök hücre uygulamasından sonra sEMG sinyaline katkıda bulunan MUAP'lerin sayısı artar; bu nedenle, sinyal daha kaotik hale geliyor ve karmaşıklık artıyor olabilir.

Bu çalışmada, sıçan siyatik sinir hasar ve ruptur yaralanmasında kök hücre uygulamasının olası nöroprotektif etkileri, EMG sinir iletim incelemeleri ile araştırıldı. Bu çalışmanın bulguları, siyatik sinir hasar ve ruptur yaralanması sıçan modelinde erken dönemde kök hücre uygulamasının sinir rejenerasyonu üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğunu ve motor fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığını göstermektedir.

Sonuç olarak; kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre tedavisinin periferik sinir tedavisinde (motor fonksiyonları ve histopatolojik değerlendirmeye göre) olumlu etki göstermektedir. Son yıllarda beşeri tıpta sinir rejenerasyonunda potansiyel bir tedavi yöntemi olarak görülen kök hücre uygulamaları, Veteriner Hekimlik sahasında perifer sinir yaralanmalarında, kök hücre çalışmalarıyla, periferik sinir hasarlarının onarımında yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Çalışmamızın kök hücre tedavi konusunda yapılacak yeni çalışmalara kaynak oluşturacağı katindeyiz.

7. KAYNAKÇA

1. Hatiboğlu M. Tahir, Anatomi ve Fizyoloji, Şahin Matbaası, Ankara, 2001.
2. Kandemir V, Anatomi, Türk Sağlık Eğitim Vakfı Yayınları, Ankara, 2005.
3. Kocatürk U, Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü, Nobel Yayınevi, Ankara, 1989.
4. Ortuğ G, Anatomi, -Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 1991.
5. Ozan H, Anatomi, Nobel Yayınevi, Ankara, 2004.
6. Özden M, Anatomi Ve Fizyoloji, Feryal Matbaası, Ankara, 2003.
7. Rende L, Kuzu S, Şankazan Ş, Anatomi Fizyoloji, Semih Ofset, Ankara, 2006.
8. Dursun N, Anatomi III, Medisan Yayınevi, Ankara, 2008.
9. Süzen LB, İnsan Anatomisine Giriş, Akademi Yayınevi, İstanbul, 2006.
10. Vannını V, Dıanzanı U, De Rosa E, Anatomi Atlası, Birol Yayınevi, İstanbul, 1992.
11. Yıldırım M, Resimli İnsan Anatomisi, Nobel Yayınevi, İstanbul, 2002.
12. Solomon EP, İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş, Çev. L.Bikem SÜZEN, Birol Yayınevi, İstanbul, 2002.
13. Akın F, Beşaltı Ö, Veteriner Nöroşirurji, Barışcan Matbaası, Ankara, 2000
14. Sütçü M. Periferik Sinir Kesisinde Farklı Onarım Zamanlarında Melatonin Sinir İyileşmesine Olan Etkisinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, 2010
15. Ural AU. Kök hücreler. TOTBİD Dergisi, 2006;5: 3-4.
16. Atalayın Ç, Ergücü Z, Tezel H. Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 2012;29.2: 115-120.
17. RAO MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. Stem cells and development, 2004;13.5: 452-455.
18. Kocacan M. Sıçanlarda, Yağ Dokusu Kökenli Kök Hücre Uygulamasının Periferik Sinir Onarımına Etkisi. Uzmanlık Tezi. , Konya: Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Ve Emriyoloji Anabilim Dalı, 2014
19. Kök Hücre http://tr.wikipedia.org/wiki/Kök_hücre 20.03.2022
20. Özge G, Güngör R, Sobacı G ve ark. Tavşanlarda tapetoretinal dejenerasyon modelinde intravitreal uygulanan kemik iliği mezenkimal kök hücre aracılı gen tedavisi için canlı ve cansız ortamda kanıt: yeşil flöresan protein (yfp). T.Oft.Gaz, 2008;38,320-329.
21. Fortier LA. Stem Cells: Classifications, controversies and clinical applications. Vet Surg 2005;34: 452-455.
22. Maria OM, Khosravi R, Mezey E, Tran SD. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. Oral Dis 2007;13: 11-16.
23. Özel BH, Ozan E, Dabak DÖ. Embriyonik Kök Hücreler. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2008; 28:333-341.

24. Tekeli S, Arısu NE, Gökçe B, Sır G, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil Y: Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, 2016;1(2):72-83.
25. Şahin F, Saydam G, Omay Sb. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. Türk hematoloji-onkoloji dergisi, 2005;1.15: 48-56.
26. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nature protocols, 2007;2.12: 3081-3089.
27. Goldman SA. Stem and progenitor cell-based therapy of the central nervous system: Hopes, hype, and wishful thinking. Stem Cell, 2016;18: 174-188.
28. Çavuşoğlu T, Yılmaz Ö, Uyanıkgil Y, Ateş U, Aktaş EÖ, Baka M. Türkiye’de kök hücre çalışmaları; etik ve hukuki açıdan güncel durum. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Ethics, Law and History-Special Topics, 2017;3: 95-102.
29. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. Nature, 2006;441: 1094.
30. Sir G, Tekeli S, Kürekçi ŞY, Naghavi EA, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil Y. Kordon kanı kök hücreleri ve klinik kullanımı. FNG&Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi,2016;1(2):53-58.
31. Adaş G, Koç B. Cerrahide mezenkimal kök hücre uygulamaları. Türkiye Klinikleri Journal of Hematology Special Topics,2014;7: 86-91.
32. Kıroğlu OE, Aksu F. Nörodejeneratif hastalıklarda mezenkimal kök hücre uygulamaları. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi,2015;24: 41-55.
33. Aras Y, Sabancı PA, Kabataş S, Duruksu G, Subası C, Erguven M, Karaoz E. The effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation during the acute and subacute phases following spinal cord injury. Turk Neurosurg 1: 1-13;2016
34. Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS Jr. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. J Neurosurg,2009;110:1189- 1197.
35. Helm GA, Gazit Z. Future uses of mesenchymal stem cells in spine surgery. Neurosurg Focus,2005;19:1-5.
36. Akyuva Y, Diren F, Bulduk EB, Saraç ME, Kabataş S. Nöroşirürji’de kök hücre uygulamaları ve kök hücre tedavisindeki yenilikler. Türk Nöroşir Derg, 2018;28.3:366-371.
37. Smith FO, Reaman GH, Racadio JM (eds). Hematopoietic Cell Transplantation in Children with Cancer. London: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014
38. Kepenekli Kadayıfçı E. Kök Hücre Nakli Sonrası İmmün Düzeltme Ne Zaman Olur?. Çocuk Enfeksiyon Dergisi, 2019;13.3: 127-132.
39. Kim SU, De Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. J Neurosci Res, 2009;87: 2183-2200.
40. Rosser AE, Zietlow R, Dunnett SB. Stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. Türkiye Klinikleri Journal of Neurology, 2008;3: 29-36.

41. Kabataş S, Teng YD. Potential roles of the neural stem cell in the restoration of the injured spinal cord: Review of the literature. *Turk Neurosurg*,2010;20:103-110.
42. Ma YH, Zeng X, Qiu XC, Wei QS, Che MT, Ding Y, Rong LM. Perineurium-like sheath derived from long-term surviving mesenchymal stem cells confers nerve protection to the injured spinal cord. *Biomaterials*,2018;160: 37-55.
43. Hoogendoorn RJW, Lu ZF, Kroeze RJ, Bank RA, Wuisman PI, Helder MN. Adipose stem cells for intervertebral disc regeneration: Current status and concepts for the future. *J Cell and Mol Medi*,2008;12: 2205-2216.
44. Marconi S, Castiglione G, Turano E, Bissolotti G, Angiari S, Farinazzo A, Bonetti B. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Engineering*,2012;18: 1264-1272.
45. Kang K, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Han H. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: A case study. *Cytotherapy*,2005;7: 368-373.
46. Armstrong RJ, Tyers P, Jain M, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA. Transplantation of expanded neural precursor cells from the developing pig ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res*,2003;151:204-217.
47. Comella K, Parlo M, Daly R, Depasquale V, Edgerton E, Mallory P, Drake WP. Safety analysis of autologous stem cell therapy in a variety of degenerative diseases and injuries using the stromal vascular fraction. *J Clin Med Res*,2017;9: 935.
48. Einstein O, Ben-Hur T. The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases. *Arch of Neuro*,2008;65:452-456.
49. Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Goussev A, Zhang L, Chopp M. Activated neural stem cells contribute to strokeinduced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cer Blood F&M*,2004;24(4):441-448.
50. Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS Jr. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg*,2009;110:1189- 1197.
51. Lamanna JJ, Miller JH, Riley JP, Hurtig CV, Boulis NM. Cellular therapeutics delivery to the spinal cord: Technical considerations for clinical application. *Therap Delivery*,2013;4:1397- 1410.
52. Moviglia GA, Vina RF, Brizuela JA, Saslavsky J, Vrsalovic F, Varela G, Martinez G. Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytotherapy*,2006;8: 202-209.
53. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Andreeff M. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*,2005;65: 3307-3318.

54. Pendharkar AV, Chua JY, Andres RH, Wang N, Gaeta X, Wang H, Gambhir SS. Biodistribution of neural stem cells after intravascular therapy for hypoxic–ischemia. *Stroke*,2010;41: 2064- 2070.
55. Dehghan MM, Eslaminejad MB, Motallebizadeh N, et al. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells with platelet-rich plasma accelerate distraction osteogenesis in a canine model. *Cell Journal (Yakhteh)*,2015;17.2: 243
56. Koch TG, Berg LC, Betts DH. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *The Canadian veterinary journal*,2008;49.10:1009.
57. Hajkova M, Hermankova, B, Javorkova E, Bohacova P, Zajicova A, Holan V, Krulova M. Mesenchymal stem cells attenuate the adverse effects of immunosuppressive drugs on distinct T cell subpopulations. *Stem Cell Reviews and Reports*,2017;13(1), 104-115.
58. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*,2009;132:533-46.
59. Kocak H, Tokcaer-Keskin Z, Insal B, Gursel I, Akcalı KC. Administration Of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Tlr Expression During Liver Regeneration. *Trakya University Journal Of Natural Sciences*,2019;20:1-10.
60. BEK N. Periferik Sinir Yaralanmalarında Rehabilitasyon. *Türk Nöroşirürji Dergisi*,2005;15,3,257-264.
61. Bertelli JA, Mira JC. Grip test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J. Neurosci. Methods*,1995;58 , 151–155.
62. Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T. Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in rat formalin test and in the rat hot plate test. *British journal of Pharmacology*,2002;137,179-176.
63. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *American journal of clinical pathology*, 1981;75(6), 816-821.
64. Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, et al. Pak-1 Expression Increases with Progression of Colorectal Carcinomas to Metastasis. *Clin Can Res*,2004;10: 3448-3456.
65. Klopfleisch, R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology-a systematic review. *BMC veterinary research*, 2013;9(1), 1-15.
66. Tremp M, Schwabedissen MMZ, Kappos EA, et al. The regeneration potential after human and autologous stem cell transplantation in a rat sciatic nerve injury model can be monitored by MRI. *Cell Transplantation*, 2015;24(2), 203-211.
67. Matthes SM, Reimers K, Janssen I, et al. Intravenous transplantation of mesenchymal stromal cells to enhance peripheral nerve regeneration. *BioMed research international*, 2013.

68. Moattari M, Kouchesfehiani HM, Kaka G, Sadraie SH, Naghdi M. Evaluation of nerve growth factor (NGF) treated mesenchymal stem cells for recovery in neurotmesis model of peripheral nerve injury. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*,2018;46(6), 898-904.
69. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. İnsan blastokistlerinden elde edilen embriyonik kök hücre dizileri. *Bilim*,1998;282,1145-1147.
70. Weber RV, Mackinnon SE. Bridging the neural gap. *Clin. Plast Surg*,2005;32:605–616
71. Johnson EO, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. *Injury*, 2008, 39,3: 30-36.
72. De Albornoz PM, Delgado PJ, Forriol F, Maffulli N. Non-surgical treatments for peripheral nerve damage. *Br. Med. Boğa*,2011;100,73–100.
73. Noble J, Munro CA, Prasad VS, et al. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma*,1998; 45:116-22
74. Goldman SA, Windrem MS. Cell replacement therapy in neurological disease. *Phil Trans R Soc B*,2006;361:1463-1475.
75. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotech*,2006;24:150-154.
76. Dadon-Nachum M, Sadan O, Srugo I, et al. "Differentiated mesenchymal stem cells for sciatic nerve injury." *Stem Cell Reviews and Reports* 7.3,2011;664-671.
77. Craff MN, Zeballos JL, Johnson TS, et al. "Embryonic stem cell–derived motor neurons preserve muscle after peripheral nerve injury." *Plastic and reconstructive surgery* 119.1,2007;235-245.
78. Kubo T, Randolph MA, Gröger A, Winograd JM. Embryonic stem cell–derived motor neurons form neuromuscular junctions in vitro and enhance motor functional recovery in vivo. *Plastic and Reconstructive Surgery* 123.2S,2009;139S-148S.
79. Bryson JB, Machado CB, Crossley M, et al. Optical control of muscle function by transplantation of stem cell–derived motor neurons in mice." *Science* 344.6179,2014;94-97.
80. Sarıkcıoğlu L, Özkan O. Instrumentation Note: Yasargil-Phynox Aneurysm Clip: A Simple And Reliable Device For Making A Peripheral Nerve Injury. *International journal of neuroscience*,2003;113.4: 455-464.
81. Sung MA, Jung HJ, Lee JW, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote regeneration of crush-injured rat sciatic nerves. *Neural Regeneration Research*, 2012;7.26: 2018.
82. Yin F, Guo L, Meng CY, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells exerts anti-apoptotic effects in adult rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Brain research*, 2014;1561: 1-10.
83. Chen CJ, Ou YC, Liao SL, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Experimental neurology*,2007;204.1: 443-453.

84. Santiago LY, Clavijo-Alvarez J, Brayfield C, Rubin JP, Marra KG. Delivery of adipose-derived precursor cells for peripheral nerve repair. *Cell transplantation*, 2009;18.2:145-158.
85. Carriel V, Garrido-Gómez J, Hernández-Cortés P, et al. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of neural engineering*, 2013;10.2: 026022.
86. Caddick J, Kingham PJ, Gardiner NJ, Wiberg M, Terenghi G, et al. Phenotypic and functional characteristics of mesenchymal stem cells differentiated along a Schwann cell lineage. *Glia*, 2006;54.8: 840-849.
87. Yang Y, Yuan X, Ding F, et al. Repair of rat sciatic nerve gap by a silk fibroin-based scaffold added with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 2011; 17.17-18: 2231-2244.
88. Jones S, Eisenberg HM, Jia X. Advances and future applications of augmented peripheral nerve regeneration. *International journal of molecular sciences*, 2016;17(9), 1494.
89. Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science*, 1991;254.5035: 1146-1153.
90. Domouzoglou EM, Naka KK, Vlahos AP, et al. Fibroblast growth factors in cardiovascular disease: The emerging role of FGF21. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2015;309.6: H1029-H1038.
91. Han JW, Choi D, Lee MY, Huh YH, Yoon YS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetic neuropathy by direct modulation of both angiogenesis and myelination in peripheral nerves. *Cell transplantation*, 2016;25.2: 313-326.
92. D'I Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2010;63.9: 1544-1552.
93. Kaiserling E, Xiao JC, Ruck P, Horny HP. Aberrant expression of macrophage-associated antigens (CD68 and Ki-M1P) by Schwann cells in reactive and neoplastic neural tissue. Light-and electron-microscopic findings. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 1993;6.4: 463-468.
94. Wang Y, Wang H, Mi D, Gu X, Hu W. Periodical assessment of electrophysiological recovery following sciatic nerve crush via surface stimulation in rats. *Neurological Sciences*, 2015;36.3: 449-456.
95. Leal-Cardoso JH, Matos-Brito BG, Lopes-Junior JEG, et al. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2004;37: 1193-1198.
96. Lin H, Wang H, Chen D, Gu Y. A dose-effect relationship of Ginkgo biloba extract to nerve regeneration in a rat model. *Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery*, 2007;27.8: 673-677.

97. Talebinejad M, Chan AD, Miri A, Dansereau RM. Fractal analysis of surface electromyography signals: a novel power spectrum-based method. *Journal of electromyography and kinesiology*, 2009;19.5: 840-850.
98. Padmanabhan P, Puthusserypady S. Nonlinear analysis of EMG signals-a chaotic approach. In: *The 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. IEEE, 2004. p. 608-611.

