

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ADRENALİNLE UYARILAN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRE TRANSPLANTASYONUNUN, PERİFERİK
NÖROPATİ OLUŞTURULAN FARELERDE AĞRI
DAVRANIŞI VE HİSTOPATOLOJİK KARAKTERLER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Fatih BERKTAŞ

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Olcay KIROĞLU**

ADANA-2017

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ADRENALİNLE UYARILAN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRE TRANSPLANTASYONUNUN, PERİFERİK
NÖROPATİ OLUŞTURULAN FARELERDE AĞRI
DAVRANIŞI VE HİSTOPATOLOJİK KARAKTERLER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Fatih BERKTAŞ

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Olcay KIROĞLU**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
TYL-2016-7543 Nolu proje ile desteklenmiştir.**

ADANA-2017

KABUL VE ONAY

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tezli Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

“Adrenalinle Uyarılan Mezenkimal Kök Hücre Transplantasyonunun, Periferik Nöropati Oluşturulan Farelerde Ağrı Davranışı ve Histopatolojik Karakterler Üzerine Etkisi” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 21 / 12 / 2017

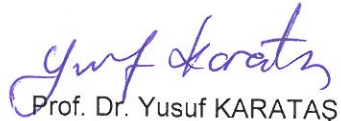
TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Prof. Dr. Fazilet AKSU
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Yusuf KARATAŞ
Çukurova Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT
Mersin Üniversitesi
Üye



Yrd.Doç. Dr. Olcay KIROĞLU
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof.Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Akademik eğitimimde tez danışmanım olarak çalışmanın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında büyük desteği ve yardımı olan Sayın Yrd.Doç. Dr.Olcay Kıroğlu'na teşekkür ederim.

Yaşam ve bilimsel tecrübelerinden çok değerler öğrendiğimiz, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr.Ergin ŞİNGİRİK'e ve Sayın Prof.Dr.Fazilet Aksu'ya, Çukurova Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda birbirinden değerli Öğretim Üyelerimize, eğitimim süresince mesleki tecrübe, deneyim ve bilgilerini benimle paylaştıkları için teşekkür ederim. Beraber çalışma fırsatı bulduğum ve tez aşamasında yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.Erkan Maytalman ve Yrd.Doç.Dr. Arash ALIZADEH YEGANI'ya, araştırmamın tüm aşamalarında desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Doktora öğrencisi Elif ÖZVEREN ADIBELLİ ve Arzu EMEKSİZ'e ve ayrıca emeği geçmiş tüm teknik ve idari personele yardımları ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışmadaki histopatolojik incelemeleri yapan Çukurova Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Yrd.Doç.Dr.Leman SENCAR'a ve Arş.Gör. Gülfidan ÇOŞKUN'a değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

Saygı ve sevgiyle...

Fatih BERKTAŞ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiv
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ağrı Tanımı.....	4
2.2. Ağrı.....	4
2.2.1. Süresine Göre.....	5
2.2.2. Nörofizyolojik Mekanizmalarına Göre.....	5
2.2.2.1. Nosisseptif Ağrı.....	5
2.2.2.2. Nöropatik Ağrı.....	5
2.2.2.2.1. Nöropatik Ağrı Çeşitleri.....	6
2.2.2.2.2. Nöropatik Ağrı Semptomları ve Klinik Özellikleri.....	6
2.2.2.2.3. Nöropatik Ağrıda Mekanizmalar.....	7
2.2.2.2.3.1. Nosisseptörlerin Sensitizasyonu.....	7
2.2.2.2.3.2. Afferent Nöronların Anormal Ektopik Uyarılabilirlikleri.....	8
2.2.2.2.3.3. Spinal Dorsal Kökte Pronosisseptif Kolaylaştırma.....	9
2.2.2.2.3.4. Spinal İnhibitör Örgüde Nosisepsiyonun Disinhibisyonu.....	10
2.2.2.2.3.5. Sempatik Olarak İdame Ettirilen Ağrı.....	10
2.2.2.2.3.6. Santral Reorganizasyon Süreçleri.....	11
2.2.2.2.4. Periferik Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu.....	11
2.2.2.2.5. Nöropatik Ağrı Tedavisi.....	12

2.3. Kök Hücreler	14
2.3.1. Kök Hücre Tipleri	16
2.3.1.1. Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücreler	16
2.3.1.1.1. Totipotent Kök Hücreler	16
2.3.1.1.2. Pluripotent Kök Hücreler	17
2.3.1.1.3. Multipotent Kök Hücreler	17
2.3.1.2. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücreler	17
2.3.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler	17
2.3.1.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	17
2.3.1.2.2.1. Hematopoetik Kök Hücreler	18
2.3.1.2.2.1.1. Kemik İliği Kök Hücreleri	19
2.3.1.2.2.1.2. Periferik Kan Kök Hücreleri	19
2.3.1.2.2.1.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri	19
2.3.1.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler	19
2.3.1.2.2.2.1. MKH'lerin Kullanım Alanları	21
2.3.1.2.2.2.2. MKH'lerin Tespit Edilmesinde Kullanılan Belirteçler	23
2.3.2. Nöronal Kök Hücreler	25
2.3.3. Nöronal Belirteçler	25
2.3.3.1. Nestin	25
2.3.3.2. Beta-III Tübülin	25
2.3.3.3. NGF (Nöronal Büyüme Faktörü)	26
2.4. Adrenerjik Reseptörler	26
2.4.1. Adrenerjik Reseptör Agonistleri	27
2.4.1.1. Adrenalin	29
2.4.2. Adrenerjik Reseptör Blokörleri	30
2.4.2.1. Alfa Adrenerjik Reseptör Blokörleri	30
2.4.2.1.1. Fentolamin	31
2.4.2.2. Beta Adrenerjik Reseptör Blokörleri	31
2.4.2.2.1. Propranolol	32
2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerde Reseptörler	33
2.5.1. Mezenkimal Kök Hücrelerde Adrenerjik Reseptörler	34

3. GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1. Deney Hayvanı ve Barındırma Koşulları	35
3.2. Fare MKH'lerin Elde Edilmesi.....	35
3.2.1. Fare Kemik İliğinden MKH Üretilmesi	35
3.2.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine (Dil; İnvitrogen, USA) ile İşaretlenmesi	36
3.2.1.2. Akan Hücre Ölçer ile MKH Analizi	37
3.2.1.3. MKH'lerin Farklılaştırılması	37
3.3. Adrenalin, Propranolol ve Fentolamin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	38
3.4. Agonist ve Antagonist ile Uyarılan MKH'lerde Nöronal Hücre Belirteç Ekspresyonlarının RT-qPCR ile Analizi.....	38
3.4.1. Hücrelerden RNA elde edilmesi	38
3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	39
3.4.3. RT-qPCR ile Amplifikasyon.....	40
3.4.4. İstatistik Analiz ve Fold Change Hesaplamaları	41
3.5. Deney Grupları ve Uygulama Sıraları.....	41
3.6. Cerrahi Operasyon	42
3.7. Cold Plate Testi	43
3.8. Rotarod Testi	44
3.9. Histopatolojik İnceleme	44
3.9.1. Işık Mikroskopi Yöntemleri	44
3.9.2. Elektron Mikroskopi Yöntemleri	45
3.9.3. Histomorfometri Yöntemleri.....	46
4. BULGULAR	47
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Dil ile İşaretlenmesi	47
4.2. MKH Örneklerinin Akan Hücre Ölçer ile Yüzey Belirteçleri Analiz Ölçümleri	47
4.3. MKH'lerin İn-Vitro Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşması	48
4.4. Cold Plate Latensi (CPL)	49
4.5. Rotarod Testi	53
4.6. Histopatolojik Bulgular	57
4.6.1. Işık Mikroskobik Bulgular	57

4.6.2. Soleus Kası Elektron Mikroskopik Bulguları	67
4.6.3. Siyatik Sinir Elektron Mikroskopik Bulguları	74
4.6.4. Akson Çapı Ölçümleri.....	81
4.6.5. Akson Sayısı Ölçümleri	82
4.7. Nöronal Belirteç Ölçümü	83
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	98
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	111



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Nöropatik ağrı tedavi algoritması (Namaka M. 2009).....	13
Şekil 2. Kas diseksiyonu ve siyatiksinirin ortaya çıkarılması.....	42
Şekil 3. Cold plate cihazı.....	43
Şekil 4. Rotarod Cihazı.....	44
Şekil 5. A. Sinir dokusu içerisine yerleşen Vybrant Dil ile işeretli MKH'ler. B. Soleus kas dokusu içerisine yerleşen Vybrant Dil ile işeretli MKH'ler. X40.....	47
Şekil 6. Akan Hücre ölçer . A. CD45 / CD34 yönünden negatif . B. CD105 / CD73 yönünden pozitif.....	48
Şekil 7. MKH'lerin mikroskopik incelemeleri. A: Normal MKH, B: Adipojenik farklılaşmış hücreler. C: Osteojenik farklılaşmış hücreler.....	48
Şekil 8. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının Cold Plate Latensileri; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05).+ : N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarından anlamlı olarak farklı (p<0.05).....	50
Şekil 9. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının Cold Plate Latensileri; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). +: N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarından anlamlı olarak farklı (p<0.05).....	51
Şekil 10. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının Cold Plate Latensileri; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^:Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). +: N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarından anlamlı olarak farklı (p<0.05).....	52
Şekil 11. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının Cold Plate Latensileri; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). +: N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarından anlamlı olarak farklı (p<0.05).....	53
Şekil 12. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının , Rotarod zamanı; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05).....	54
Şekil 13. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının , Rotarod zamanı; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05).....	55
Şekil 14. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının , Rotarod zamanı; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05).....	56

- Şekil 15.** Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının, Rotarod zamanı; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$).57
- Şekil 16.** Kontrol grubundan alınan çizgili kas dokusunun enine kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Poligonal şekilli kas hücrelerinin (Kh) periferal yerleşimli çok sayıda çekirdeğe (oklar) sahip oldukları izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 μ m.58
- Şekil 17.** Kontrol grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas liflerinin periferal yerleşimli çekirdekleri (oklar) tamamen normal yapıda izlenmektedir. Fasikülleri saran perimisyumda (P) bağ dokusu lifleri ve fibroblastların çekirdekleri (ok başları) ayırılmaktadır. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 μ m.58
- Şekil 18.** Sham grubundan alınan çizgili kas dokusunun enine kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Poligonal şekilli kas hücrelerinin (Kh) periferal yerleşimli çok sayıda çekirdeğe (oklar) sahip oldukları izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 μ m.59
- Şekil 19.** Sham grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas liflerinin periferal yerleşimli çekirdekleri (oklar) normal yapıda izlenmektedir. Normal görünümlü perimisyum (P) bağ dokusu lifleri ve fibroblastların çekirdekleri (ok başları) içermektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 μ m.60
- Şekil 20.** Nöropati grubundan alınan çizgili kas dokusunun enine kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas hücrelerinin (Kh) periferal yerleşimli çekirdekleri (oklar) ve onları saran perimisyum (P) görülmektedir. Kas dokusunda yoğun inflamatuvar reaksiyon (*) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 μ m.61
- Şekil 21.** Nöropati grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas liflerinin organizasyonunun bozulduğu görülmektedir. Periferal yerleşimli hücre çekirdeklerinin (oklar) çoğu alanda piknotik değişiklikler gösterdiği izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 μ m.62
- Şekil 22.** Nöropati + Mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun enine kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Periferal yerleşimli hücre çekirdeklerinin bazı alanlarda piknotik değişiklikler sergilediği görülmektedir. Kas dokusunda inflamatuvar hücre birikimi (*) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 μ m.63
- Şekil 23.** Nöropati + Mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas lifi organizasyonunda düzelme ile birlikte inflamatuvar hücre birikiminde azalma görülmektedir. Piknotik değişiklikler sergileyen periferal yerleşimli kas hücreleri çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 μ m.64
- Şekil 24.** Nöropati + Adrenalin ile uyarılmış mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas hücrelerinin (Kh) normal

- yapıdaki periferik yerleşimli çekirdekleri (oklar) görülmektedir. P, Perimisyum. Kh, Kas hücresi. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm.65
- Şekil 25.** Nöropati + Adrenalin + Propranol ile uyarılmış mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Piknotik değişiklikler sergileyen periferik yerleşimli çekirdeğe (oklar) sahip kas lifleri izlenmektedir. Bazı alanlarda inflamatuvar hücrelere (*) rastlanılmaktadır. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 µm.....66
- Şekil 26.** Nöropati + Adrenalin + Fentolamin ile uyarılmış mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Bazı alanlarda kas lifi organizasyonunda düzensizlikler görülmektedir. Piknotik değişiklikler sergileyen kas hücresi çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm.67
- Şekil 27.** Kontrol grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Hücre çekirdeğinin (Ç) normal kromatin düzenlenmesi izlenmektedir. Mitokondriyonların (m) kristalleri normal ince yapısını korumaktadır. Kasılma birimi olan sarkomerler iki Z bandı arasında izlenmektedir. Bar: 1 µm.68
- Şekil 28.** Sham grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Mitokondriyonlar (m) ve sarkoplazmik retikülüm (oklar) normal ince yapıdadır. Komşu iki Z bandı arasında sarkomerler izlenmektedir. Bar: 0,5 µm.69
- Şekil 29.** Nöropati grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Hücre çekirdeğinde (Ç) heterokromatin artışı dikkati çekmektedir. Mitokondriyon (m) kristallerinde harabiyet izlenmektedir. Bar: 0,5 µm.70
- Şekil 30.** Nöropati+MKH grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Sarkoplazmada lipid damlacıklarının varlığı (L) izlenmektedir. Mitokondriyonlar; m, sarkoplazmik retikülüm ise oklarla gösterilmiştir. Bar: 0,5 µm.71
- Şekil 31.** Nöropati+MKH+Adrenalin grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Sarkoplazmadaki mitokondriyonlar (m) krista ve membranları ile çoğu alanda normal ince yapıda izlenmektedir. Sarkoplazmik retikülüm normal olarak ok ile işaretli alanlarda görülmektedir. Bar: 0,5 µm.72
- Şekil 32.** Nöropati+MKH+Adrenalin+Propranolol grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Bazı mitokondriyonlarda (m) krista harabiyeti gibi dejeneratif değişiklikler görülmektedir. Sarkoplazmik retikülümde genişlemeler ok ile gösterilmiştir. Glikojen partikülleri ok başları ile ifade edilmiştir. Bar: 0,5 µm.73
- Şekil 33.** Nöropati+MKH+Adrenalin+Fentolamin grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Mitokondriyon kristalarında (m) dejeneratif değişiklikler varlığı dikkati çekmektedir. Glikojen partiküllerinde artış oklarla gösterilmiştir. Bar: 0,5 µm.74

- Şekil 34.** Kontrol grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (a) ve miyelinsiz (ma) sinir liflerinin tamamen normal ince yapıda oldukları izlenmektedir. Schwann hücresi (Sh) tarafından yapılan miyelin kılıf (mk) konsantrik lamellar yapıda miyelinli aksonların etrafında izlenmektedir. Kol; kollajen lifler. Bar: 1µm.75
- Şekil 35.** Sham grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinin (a) etrafındaki miyelin kılıf (mk) ve akson içerisindeki mitokondriyon (m), nörotübül ve nörofilamanlar (*) normal olarak izlenmektedir. Schwann hücresinin (Sh), çekirdeği (ç) ve sitoplazması ile normal yapısını koruduğu görülmektedir. miyelinsiz sinir lifleri (ma) izlenmektedir. Bar: 2 µm.....76
- Şekil 36.** Miyelinli sinir liflerinde (a) yoğun dejeneratif değişiklikler izlenmektedir. Miyelin kılıf (mk) lamellar yapısının harabiyete uğradığı görülmektedir. Bazı alanlarda miyelinli aksonların ince yapılarının tamamen bozulduğu (ok) ayırtedilmektedir. Schwann hücrelerinde (Sh) çekirdekte (ç) heterokromatin artışı izlenmektedir. Kol; kollajen lifler. Bar: 2 µm.77
- Şekil 37.** Miyelinli sinir liflerinde (a) miyelin kılıftan (mk) dejeneratif değişiklikler izlenmektedir. Miyelin kılıfın lamellar yapısının bozulmuş olduğu (oklar), miyelinin akson içerisine invajinasyonlar ve akson dışına evajinasyonlar yaptığı görülmektedir. Sinir liflerinin arasında fibroblast (f) ve kollajen lifler (kol) izlenmektedir. Bar: 2 µm.78
- Şekil 38.** Nöropati+MKH+Adrenalin grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir lifleri (a) ve miyelinsiz sinir lifleri (ma) izlenmektedir. Aksoplazmada mitokondriyonlar (m), nörotübül ve nörofilamanlar (*) normal yapıda görülmektedir. Akson etrafındaki miyelin kılıf (mk) normal lamellar yapısını korumaktadır. Schwann hücrelerinin (Sh) ince yapılarını korumuş olduğu ayırtedilmektedir. Bar: 1 µm.....79
- Şekil 39.** Nöropati+MKH+Adrenalin+Propranolol grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir lifleri (a) miyelin kılıftaki (mk) hafif değişiklikler dışında normal ince yapıda izlenmektedir. Schwann hücrelerinde (Sh) hiperkromatik çekirdek (ç) görülmektedir. aksoplazmada nörotübül ve nörofilamanlar (*) normal olarak izlenmektedir.80
- Şekil 40.** Nöropati+MKH+Adrenalin+Fentolamin grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (a) miyelin kılıfta (mk) invajinasyon, evajinasyon, lamellar yapıda bozulmalar (oklar) gibi dejeneratif değişiklikler izlenmektedir. Schwann hücrelerinin (Sh) çekirdeğinde (ç) heterokromatin artışı görülmektedir. Kol; kollajen lifler. Bar: 1 µm.81

- Şekil 41.** Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının akson çapı ve akson sayısı ölçümleri. A. Akson çapı ölçümlerinde; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^:Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). + : N. MKH grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). B. Akson sayısı ölçümlerinde; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). + : N. MKH grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05).....83
- Şekil 42.** MKH, MKH+A, MKH+A+P, MKH+A+F gruplarında Fold Change değerlendirilmesi; *** MKH grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001). +++ MKH + Adrenalin grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001). xxx MKH + Adrenalin+Propranolol grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001).....84
- Şekil 43.** MKH, MKH+A, MKH+A+P, MKH+A+F gruplarının Fold Change değerlendirilmesi; *** MKH – MKH+Adrenalinde anlamlı artış (p<0,001). +++ MKH Adrenalin – MKH Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma (p<0,001). xxx MKH Adrenalin+ Propranolol – MKH+Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma (p<0,001). *** MKH – MKH+ Adrenalin+Propranololde anlamlı artış (p<0,001).85
- Şekil 44.** MKH, MKH+A, MKH+A+P, MKH+A+F gruplarının Fold Change değerlendirilmesi; *** MKH – MKH+Adrenalinde anlamlı artış (p<0,001). ** MKH – MKH+ Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma (p<0,01). *** MKH – MKH+ Adrenalin+Propranololde anlamlı artış (p<0,001). +++ MKH+Adrenalin – MKH+ Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma (p<0,001). xxx MKH+Adrenalin+Propranolol – MKH+Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma (p<0,001).86

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1. Ağrı Sınıflaması.	4
Çizelge 2. cDNA sentezi için kullanılan solüsyon (İpsogen RT Kit) ve RNA miktarı tablosu.	40
Çizelge 3. Kullanılan miks primerleri ve gen kodları.....	40
Çizelge 4. RT-qPCR Amplifikasyon Döngüsü.....	41
Çizelge 5. Akson çapı ve akson sayısı karşılaştırmalı tablosu. Akson sayısı ve akson çapı ölçümlerinde; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^:Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). + : N. MKH grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05).	82

SİMGELER ve KISALTMALAR

BDNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CD antibody	: Cluster of Differentiation antikor
cDNA	: Komplementer DNA
CFSE	: Carboxyfluorescein diacetate succinimidylester
CFU-F	: Colony-forming unit-fibroblast
CGRP	: Kalsitonin gen ilişkili peptid
CNTF	: Silier Nörotrofik Faktör
CPL	: Cold plate latensi
CT	: Threshold cycle
DİL	: 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DRG	: Dorsal root ganglion
EKH	: Embriyo kök hücreleri
FBS	: Fetal bovin serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
G-CSF	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GABA	: Gama amino bütirik asit
GFP	: Yeşil floresan boya
GM-CSF	: Granülosit-Monosit Koloni Uyarıcı Faktör
Gs	: Stimülatör düzenleyici G-protein
GvHD	: Growth versus host hastalığı
HKG	: Housekeeping gen
HKH	: Hematopoetik kök hücre
IASP	: International Association for the Study of Pain
IL-6	: İnterleukin-6
ILGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IP3	: 1,4,5 inozitol trifosfat
ISCT	: Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
Kh	: Kas hücreleri
KOMT	: Katekol-O-metil transferaz

LPA	: Lizofosfatidik asit
LVESV	: Sol ventrikül sistol sonu hacmi
M-CSF	: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MAO	: Monoamin oksidaz
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein
Mk	: Miyelin kılıf
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MOPG	: 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol
MS	: Multiple Skleroz
NA	: Noradrenalin
NBF	: Nöronal Büyüme Faktör
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NMDA	: N metil D aspartat
NO	: Nitrik Oksit
OI	: Osteogenesis imperfecta
PBS	: Fosfat buffer saline
PEG	: Polietilen glikol
PG	: Prostaglandin
PSL	: Parsiyel sıkı ligasyon
RT-qPCR	: Kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SDFALFA-1	: Stromal Kaynaklı Faktör
SH	: Schwann hücreleri
SN	: Saniye
SP	: Substans P
SSRI	: Selektif serotonin geri alım inhibitörleri
SSS	: Santral sinir sistemi
TAD	: Trisiklik antidepresan
TIBDAM	: Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma Merkezi
TRP	: Transient reseptor potential
TRPV1	: Transient reseptor potential vanilloid 1
VMA	: vanilmandelik asit

ÖZET

Adrenalinle Uyarılan Mezenkimal Kök Hücre Transplantasyonunun, Periferik Nöropati Oluşturulan Farelerde Ağrı Davranışı ve Histopatolojik Karakterler Üzerine Etkisi

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) adrenerjik septörlerinin uyarılmasının, hücrelerin migrasyonunu ve proliferasyonunu etkilediği belirlenmiştir. Ancak periferik nöropati tablosunda adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleriyle MKH'lerin sinir dokusunun rejenerasyonunu ve nöronal belirteçlerini nasıl etkilediğini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda periferik nöropati oluşturulan farelerde, adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleri uygulanan MKH'lerin hasarlı sinir dokusundaki rejeneratif etkilerini ve nöronal belirteçlerin bu etkideki rolünü incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda farelerde parsiyel siyatik sinir ligasyonu ile periferik nöropati oluşturuldu. Adrenerjik reseptör agonisti adrenalin, β -adrenoseptör blokörü propranolol ve α -adrenoseptör blokörü fentolamin ile uyarılmış MKH ve uyarılmamış MKH'ler lezyonlu bölgeye intramüsküler uygulandı. MKH ve uyarılmış MKH uygulanan gruplara, uygulama sonrası dördüncü, altıncı, sekizinci ve onuncu haftalarda rotarod testi yapıldı ve nöropati grubuna göre motor fonksiyonlarında zamana bağlı olarak artış saptandı. Cold plate latensi testinde, MKH ve uyarılmış MKH uygulanan gruplarda nöropati grubuna göre zamana bağlı olarak soğuk allodini eşığının arttığı ancak α -adrenoseptör antagonisti uygulanan grupta bu artışın daha az olduğu ölçüldü. Deney hayvanlarından izole edilen siyatik sinir ve soleus kasının 10.hafta histopatolojik incelenmesinde; MKH ve uyarılmış MKH uygulanan gruplarda nöropati grubuna göre dokularda anlamlı düzelme tespit edildi. Ancak α -adrenoseptör antagonisti uygulanan grupta düzelmenin daha az olduğu belirlendi. Sinir lifi sayısı ve çapının ölçümünde uyarılmış MKH uygulanan gruplarda nöropati grubuna göre artış saptandı, α -adrenoseptör antagonisti uygulanan grupta bu artışın daha az olduğu tespit edildi. Uyarılmış MKH'lerde, MKH grubuna göre β -III Tübülün, Nöronal Büyüme Faktörü ve Nestin mRNA düzeylerinin arttığı, α -adrenoseptör antagonisti uygulanan grupta ise bu artışın daha az olduğu tespit edildi.

Bu çalışma, periferik nöropatide adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleri uygulanan MKH'lerin hasarlı sinir bölgesine yerleştiğini, proliferasyonu ve sinir dokusunun rejenerasyonunu sağladığını ortaya koymaktadır. Uyarılmış MKH'lerin bu etkisinin oluşmasında nöronal belirteçlerin ve α -adrenoseptörün rolü olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Periferik nöropati, mezenkimal kök hücre, adrenalin, propranolol, fentolamin, nöronal belirteç.

ABSTRACT

The Pain Behavior And Histopathological Effect Of Adrenaline-Induced Mesenchymal Stem Cell Transplantation On Mice With Peripheral Neuropathy

It has been determined that induction of mesenchymal stem cells (MSC) with adrenergic stimulation, affects cell migration and proliferation. However, there is no study examining how induced MSCs by adrenergic stimulation, affect the regeneration in nerve tissue and neuronal markers in peripheral neuropathy. We aimed to investigate the regenerative effects of induced MSCs by adrenergic stimulation- in damaged neural tissues and the effect of neuronal markers in peripheral neuropathy formed in mice.

Peripheral neuropathy was formed in our study by partial sciatic nerve ligation in mice. The adrenergic receptor agonist adrenaline, β -adrenoceptor blocker propranolol and α -adrenoceptor blocker phentolamine induced MSCs and MSCs were administered to the lesions. In groups with induced MSC and only MSC, rotarod test was performed on the fourth, sixth, eighth and tenth week and according to the neuropathy group, an increase in motor function was observed with time. In the cold plate latency test, compared with the neuropathy group it was measured that the increase in cold allodynia threshold was related to time in MSC and MSC-treated groups, however the increase was less in the α -adrenoceptor antagonist applied group. Histopathological examination of the sciatic nerve and soleus muscle isolated from experimental animals at 10th week shows significant improvement in tissues according to neuropathy group in MSC and induced MSC treated groups. However, it was determined that the α -adrenoceptor antagonist treatment group had less improvement. Number of nerve fibers and nerve diameter was found increased in stimulated MSC group compared to the neuropathy group. Also it was found that this increase was less in the α -adrenoceptor antagonist treated group. β -III tubulin, neuronal growth factor and nestin mRNA levels were increased in stimulated MSCs group compared to MSC group, whereas this increase was less in the α -adrenoceptor antagonist group.

This study demonstrates that adrenergic stimulation induced MSCs in peripheral neuropathy are located in the damaged nerve region, proliferate and regenerate nerve tissue. This results show that neuronal markers and α -adrenoceptors have a role in proliferative and regenerative affect of induced MSCs.

Key Words: Peripheric neuropathy, mesenchymal stem cell, adrenaline, propranolol, phentolamine, neuronal marker.

1. GİRİŞ

Periferik sinir hasarının oluşmasında düşme, araç ve spor kazaları gibi çeşitli travmalar rol oynamaktadır¹. Periferik sinir hasarı sonucu heterojen bir hastalık olan periferik nöropati gelişmekte ve ağrı, hissizlik, acıma, yanma bazen de paralizi gibi bulgularla seyretmektedir². Bu bulgular hastanın yaşam kalitesini belirgin şekilde bozmakta ve sosyal hayatını etkilemektedir³. Periferik nöropati ve nöropatik ağrı tedavisinde bu belirtileri hafifletmek veya düzeltmek için antidepresanlar, antikonvülzanlar, topikal analjezikler, NMDA reseptör antagonistleri, α_2 reseptör agonistleri gibi birçok ilaç grubu denenmiş fakat tedavide arzulanan başarı elde edilememiştir^{4,5}. Periferik nöropatide sinir dokusunda iyileşmeyi sağlamak için, lezyonlu sinir bölgesine sinir grefti, konnektif doku matriksi, nöronal büyüme hormonu gibi farklı uygulamalar yapılmış bunun sonucunda hasarlı bölgede rejenerasyon sağlanmasına rağmen, sinirler arasındaki bağlantılarla ileti hızı ve zamanında bir düzelme gösterilememiştir⁶. Şimdiye kadar yapılan uygulamalarla periferik nöropati ve bunun sonucu gelişen nöropatik ağrının tedavisinde istenen başarı elde edilememiş ve yeni arayışlara yönelinmiştir. Kök hücre tedavisi, birçok hastalığın iyileşmesinde umut olmuş ve bir çığır açmıştır. Parkinson, Amiyotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı gibi birçok nörodejeneratif hastalığın tedavisinde kök hücre uygulamalarının iyileştirici etkisi gösterilmiştir⁷.

Son yıllarda, mezenkimal kök hücrelere (MKH) taşıdığı özellikler dolayısıyla yoğun ilgi gösterilmekte ve birçok hastalık modelinde etkileri araştırılmaktadır. MKH'lerin çeşitli kaynaklardan elde edilmesi, adipoz doku, nöronal hücre, osteositler, konnektif doku, hepatositler gibi birçok hücre tipine dönüşmesi, teratojen olmaması, genetik stabilite göstermesi, immunmodülasyon sağlaması, anjiogenezisi geliştirmesi, hücre proliferasyonunu ve doku iyileşmesini sağlayan büyüme hormonlarının salınımını arttırması gibi birçok özelliği sonucu çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ve deneysel modellerde uygulanması tercih edilmektedir⁸⁻¹³.

Siyatik sinirin, kesilmesi, ezilmesi tam ve parsiyel sinir ligasyonu yapılmasıyla oluşturulan deneysel periferik nöropati modellerinde, MKH'lerin sinir dokusunda rejenerasyon yaptığı, sinir fonksiyonlarını ve nöropatik ağrıyı kısmen düzelttiği gösterilmiştir¹⁴⁻¹⁶. Periferik nöropati tablosunda MKH'ler, birçok sitokin ve büyüme

faktörlerini salgılayarak lokal immün sistemin baskılanmasına, skar dokuda fibrozisin azalmasına, apoptozisin inhibisyonuna, angiogenezis ve mitozun artmasına neden olarak iyileşmeyi sağlamaktadır¹⁷⁻¹⁹.

Adrenerjik uyarının MKH'lerin migrasyon ve proliferasyonunda etkisi olduğu bilinmektedir. Adrenerjik reseptör agonistlerinin, embriyonik kök hücre ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde adrenerjik reseptörleri ve özellikle β reseptörleri etkileyerek DNA sentezini artırdığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur^{20,21}. Adrenerjik reseptörlerin agonist ve antagonistlerle uyarılması sonucu α ve β -adrenoseptörlerin dansitesinin ve MKH proliferasyonun değiştiği gösterilmiştir²². Ayrıca oksidatif strese karşı mezenkimal kök hücreleri koruduğu da tespit edilmiştir²³. Adrenerjik uyarının kök hücrede nöronal belirteçlerin salınımını arttırdığı bilinmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada isoprenalinle β -adrenoseptörlerin uyarılması sonucu indüklenmiş pluripotent hücrelerden nestin ve nöron spesifik nükleer protein salınımının arttığı ve bunun sonucunda hücre proliferasyonun çoğaldığı tespit edilmiştir²⁴.

Adrenerjik reseptör agonistlerinin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri modüle ettiği, parakrin sitokinlerin salınımını etkilediği ve inflamasyonu düzenlediği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir²⁵. Adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerle MKH'lerin bu özelliklerinin doku hasarı üzerindeki etkisini araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Lipopolisakkarid uygulanarak akciğer hasarı oluşturulan farelere adrenalin ile uyarılmış MKH'lerin intratekal verilmesi sonucunda uyarılmış MKH'lerin hasarlı akciğer dokusuna lokalize ve proliferatif olarak inflamasyonu düzenleyip akciğer hasarını önlediği gösterilmiştir²⁵. Adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleriyle uyarılmış MKH'lerin nörodejeneratif hasarda etkisini araştıran çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız literatür araştırmamızda adrenerjik agonist ve antagonistlerle uyarılmış MKH'lerin periferik nöropatide hasarlı sinir bölgesine göçünü, proliferasyonunu, nöropatik ağrıdaki etkilerini ve bu süreçte nöronal belirteçlerin mRNA ekspresyonunu inceleyen çalışma tespit edilememiştir. Ayrıca uyarılmış MKH'lerin hasarlı sinir bölgesi ve onun uyardığı kas dokusundaki etkilerini histopatolojik olarak inceleyen bir çalışmada belirlenememiştir.

Bu çalışmada, farklı deney gruplarında siyatik sinir ligasyonu ile oluşturulan deneysel mononöropati modelinde, kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin (MKH) ve adrenalin, propranolol, fentolaminle uyarılan MKH'lerin cerrahi

uygulamadan bir gün sonra lezyonlu bölgeye intramüsküler uygulanması amaçlanmıştır. Adrenalin propranolol ve fentolaminle uyarılan MKH'lerin kontrol, nöropatik ve nöropati+MKH uygulanan gruplara göre motor fonksiyonlar ve allodini üzerindeki düzeltici etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Literatürde yeterli veri bulunmadığını düşündüğümüz histopatolojik yöntemlerle MKH'lerin siyatik sinir ve soleus kasındaki etkilerinin araştırılması da amaçlanmıştır. Ayrıca adrenerjik sistem agonist ve antagonistlerinin mezenkimal kök hücrelerin nöronal belirteçlere ait gen ekspresyonundaki etkisini araştırmak için RT-qPCR'la Beta-III Tübülin, Nöronal Büyüme Faktör (NGF) ve Nestin mRNA ifadelerindeki değişikliklerin ölçülmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamız, bilimsel olarak adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleri uygulanan mezenkimal kök hücrelerin periferik nöropati hastalığında doku iyileşmesi, ağrı ve nöronal büyüme faktörleri üzerine etkilerini aydınlatması açısından yarar sağlayacaktır. Periferik nöropati gibi tam iyileşmenin sağlanamadığı, hastalığa ait bulguları kontrol altına almak için çeşitli ilaçların yoğun kullanıldığı ve bu ilaçların ciddi yan etkilerinin görüldüğü bir durumda, MKH'lerin kullanıma bağlı iyileşme, hem hastalar hem de sağlık ekonomisi açısından önem kazanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağrı Tanımı

Latince “poena” (ceza, işkence) sözcüğünden köken alan ağrı terimi; “Uluslararası Ağrı Çalışmaları Birliği” (International Association for the Study of Pain, IASP) tarafından vücudun herhangi bölgesinde hissedilen, organik bir nedene bağlı olan veya olmayan, kişinin geçmişteki deneyimleri ile ilgili, duyuşsal, emosyonel, hoş olmayan bir duyuş deneyimi ve davranış şekli olarak tanımlanmıştır²⁶. Ağrının subjektif, emosyonel ve psikolojik yönlerinin olması nedeniyle, ağrılı uyarana karşı yanıt kişiden kişiye değişmektedir²⁷.

2.2. Ağrı

Süre, nörofizyolojik mekanizmalar, etyoloji ve yayılım bölgesi dikkate alınarak modern ağrı sınıflaması oluşturulmuştur (Çizelge 1.)²⁸.

Çizelge 1. Ağrı Sınıflaması.

I- Süresine Göre <ul style="list-style-type: none">a. Akutb. Kronik
II- Nörofizyolojik Mekanizmalarına Göre <ul style="list-style-type: none">a. Nöroseptif<ul style="list-style-type: none">- Somatik- Visseralb. Nöropatik<ul style="list-style-type: none">-Merkezi-Periferikc. Psikojenik
III- Etiyolojisine Göre <ul style="list-style-type: none">a. Kanser ağrısıb. Postherpetik nevralsic. Orak hücre anemisine bağlı ağrıd. Artrit ağrısı
IV- Bölgesel Ağrı <ul style="list-style-type: none">a. Baş ağrısıb. Yüz ağrısıc. Bel ağrısıd. Pelvik ağrı

2.2.1. Süresine Göre

- a) **Akut Ağrı:** Anlık bir şekilde doku hasarı ile başlayan, neden olan lezyon ile arasında yer, zaman ve şiddet açısından yakın ilişkinin olduğu, yara iyileşmesi süresince azalarak kaybolan bir ağrı şeklidir ve bir hastalığın semptomu olarak ortaya çıkar²⁷.
- b) **Kronik Ağrı:** İyileşmesi için beklenen süreden daha uzun süren ağrıya kronik ağrı denir. Kronik ağrı için süre genellikle üç ile altı ay olarak kabul edilir. Kronik ağrıda fizyolojik değişiklikler ile ağrı arasındaki ilişki zaman içerisinde azalır. Kronik ağrı durumunda; depresyon, anksiyete, sosyal ve ekonomik problemlerde eklenmekte ve hastanın değerlendirilmesi zorlaşmaktadır²⁷.

2.2.2. Nörofizyolojik Mekanizmalarına Göre

2.2.2.1. Nosiseptif Ağrı

Deri, kas, bağ dokusu ve iç organlarda yaygın olarak bulunan nosiseptörlerin uyarılması ile ya da doku hasarıyla ortaya çıkan ağrılara denir. Somatik ve visseral olarak ikiye ayrılır²⁶.

Somatik ağrı: Duyusal lifler ile taşınan, derin ve yüzeysel olarak ikiye ayrılan ağrı tipidir. Yüzeysel somatik ağrı cilt, cilt altı dokuları ve müköz membranlardan kaynaklanır. Çok iyi lokalize edilir ve keskin, batıcı, zonklayıcı veya yanıcı özelliktedir.

Visseral ağrı: İç organlardan kaynaklanan künt, yavaş yavaş artan, zor lokalize edilen tarzda bir ağrıdır. Başka bölgelere sempatik sistem üzerinden (yansıyan ağrı) geçiş yapabilir²⁶.

2.2.2.2. Nöropatik Ağrı

Nöropatik ağrı, IASP tarafından sinir sistemindeki birincil bir lezyonun ya da işlev bozukluğunun başlattığı ya da yol açtığı ağrı olarak tanımlanmıştır²⁹. Sinir sisteminde meydana gelen fonksiyon bozukluğu veya lezyon sonucu nöropatik ağrı gelişebilir. Sinir hasarından uzunca bir süre sonra ortaya çıkan bir ağrıdır. Nöropatik ağrı eksternal uyaran olmaksızın ve/veya normalde zararsız bir uyaran karşısında artmış spontan ağrı ile karakterizedir ve çoğunlukla direkt doku hasarı ile başlar^{26,27}.

Nöropatik ağrı hipersensitivite sonrasında uyarana bağlı olarak oluşabildiği gibi spontan bir ağrı gibi uyarandan bağımsızda ortaya çıkabilir. Nöropatik ağrıda sürekli bir nosiseptif uyarın bulunmamaktadır. Nosiseptif ağrıda, nöropatik ağrıdan farklı olarak, normal primer afferentlerin uyarılmasıyla ortaya çıkan, organizmayı tehdit eden tehlikeleri bildirerek onu korumaya çalışan bir uyarın sistem bulunmaktadır^{30,31}. Sorunu başlatan patolojik bir durumdur ve santral sinir sistemi (SSS)'nin çok çeşitli nedenlerle hasara uğraması nöropatik ağrıya yol açar (toksinler, infeksiyon, virüsler, metabolik hastalıklar, beslenme yetersizlikleri, iskemi, travma ve inme gibi)³². Çalışmalar nöropatik ağrının periferik ve SSS'de ağrı sinyallerinin iletiminde duyarlılığa sebep olan hücresel değişikliklerden kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Nöronların periferik ve SSS'de nosiseptif uyarılar nedeniyle yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirme yeteneği nöroplastisite olarak tanımlanır. Bu değişikliklerin, nöropatik ağrının semptomlarıyla ilişkili olduğu ortaya konmuştur³³.

2.2.2.2.1. Nöropatik Ağrı Çeşitleri

Periferik ya da SSS'deki primer bir hasarlanmaya bağlı olarak nöropatik ağrı gelişebilir. Hasarlanma bölgesine göre yapılan klinik sınıflandırmada; "santral nöropatik", "periferik nöropatik" veya ikisinin birleşimi "miks tip" şeklinde yapılabilir³⁴.

2.2.2.2.2. Nöropatik Ağrı Semptomları ve Klinik Özellikleri

Nöropatik ağrının klinik özellikleri ve semptomları çok çeşitli olabilir. Uyuşma ve his kaybı ile ilişkili semptomlar olabileceği gibi yanma, iğnelenme, elektrik çarpması, parestezi, dizestezi, allodini ve hiperaljezi gibi semptomlarda ortaya çıkabilir³⁵.

Allodini: Normalde ağrı hissi oluşturmayacak bir uyarana karşı ağrı oluşması demektir. Aβ liflerin santral sensitizasyonu, reorganizasyonu, inhibitör kontrollerin kaybı ve nosiseptörlerin periferik sensitizasyonu sorumlu tutulmaktadır.

Hiperaleji: Ağrılı bir uyarana karşı verilen abartılı bir yanıtıdır. Periferik duyarlılaşma sonucu ortaya çıkar. Fonksiyonel, yapısal, nörokimyasal ve moleküler değişiklikler sonucu; sinir, arka kök, arka kordon zedelenmeleri sonrasında oluşur.

Parestezi: Karıncalanma gibi ağrısız bir histir. Herhangi bir uyaran olmaksızın ektopik deşarj sonucu ortaya çıkar.

Dizestezi: Herhangi bir uyaran olmaksızın oluşan yanma gibi ağrılı histir. Santral duyarlılaşma sonucu ortaya çıkar. Vurucu-batıcı ağrı ise inhibitör kontrolün kaybı sebebiyle ortaya çıkar.

Hipoestezi veya Hiperestezi: Vücuda zararlı olmayan bir uyarının azalan veya artan şiddete algılanması.

Hiperpati: Aşırı ağrı yanıtı. Tekrarlanan uyarılara karşı eşiğin düşerek cevabın artması.

Spontan Ağrı: Bir uyaran olmadan oluşan zonklayıcı, yanıcı, keskin ağrıdır³⁴.

2.2.2.2.3. Nöropatik Ağrıda Mekanizmalar

Nöropatik ağrının 6 değişik mekanizmadan oluştuğu saptanmıştır. Bu mekanizmaların; periferik, santral ve otonom sinir sistemine ait birbirlerini tamamlayıcı özellikler taşıdığı gösterilmiştir.

Bu mekanizmalar;

1. Nosisseptörlerin sensitizasyonu
2. Etkilenen nöronların anormal ektopik eksitabilitesi
3. Spinal dorsal kökte nosisseptif kolaylaştırma
4. Spinal dorsal kökte pronosisseptif kolaylaştırma
5. Spinal inhibitör yolda nosisepsiyonun disinhibisyonu
6. Santral sinir sisteminin reorganizasyonu³⁶.

2.2.2.2.3.1. Nosisseptörlerin Sensitizasyonu

Nosisseptörler, spesifik miyelinsiz C liflerinin ve az myelinli A delta liflerinin uçlarında lokalize reseptörlerdir. Nosisseptörler substans P (SP), kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) ve bradikinin gibi birtakım endojen peptidler tarafından modüle edilirler ve ağrılı mekanik, termal, kimyasal uyarılarla aktive olurlar. Mekanik, stres ve basınçla aktive olan reseptörler var olduğu gibi 43-45°C üzeri sıcaklığı algılayan mekano-ısı duyarlı nosisseptörlerde mevcuttur³⁶.

Mikronörografik çalışmalarda, nosiseptörlerin sessiz nosiseptörler olarak tanımlanan ayrı bir reseptör grubunun olduğu ve bu sessiz nosiseptörlerin yüksek aktivasyon eşiklerinin olduğu gösterilmiştir. Bu reseptörlerin aktivasyon eşikleri birtakım maddelerce düşürüldüğünde ağırlı uyarınları membran depolarizasyonuna ve aksiyon potansiyeline dönüştürmektedir³⁶.

Nosiseptörler endojen ve eksojen maddelerle aktive edilebilirler. Endojen maddeler olarak; bradikinin, prostoglandinler (PG) ve araşidonik asitin diğler metabolik ürünleri gibi inflamatuvar mediatörleri, serotonin, noradrenalin (NA) gibi nörotransmitterler örnek verilebilir. Doku hasarlanması sonrasında salınan lizofosfatidik asit (LPA), G-proteine bağılı LPA reseptörleri aracılığıyla etki ederek nöropatik ağrıda rol alır³⁷. İnflamatuvar bileşenli nöropatik ağrı sendromlarında (KRAS gibi) periferik sinirin aksonal hasarlanması sonucu Wallerian dejenerasyon gelişir. Bu hasar sonrası akson ve myelin kılıf küçülür. İmmün sistemin diğler hücreleri nötrofiller ve T hücreleri ile makrofajlar infiltre olur. Proinflamatuvar sitokinler (interlökinler, tümör nekroz faktörü- α), inflamatuvar mediatörler (bradikinin, PG'ler) ve NGF'ler salınırlar. Bu değışiklikler hiperalezi ve allodini oluşumuna yardım ederler³⁸. Nosiseptörlerin sensitizasyonun bir diğler şekli nonspesifik katyon kanallarından olan transient reseptor potential (TRP) ailesi aracılığıylaadır. Bu ailenin baskın bir üyesi TRP vanilloid 1 (TRPV1) dir. Isı ve kapsaisinle aktive olurlar ve A-delta ve C liflerinde yüksek oranda eksprese edilirler. TRPV1 aktivasyonu yanıcı ağrıyı uyarır³⁹.

Nöropatik ağrıda hücre içindeki sinyal iletimi de bozulmuştur. Sinyal iletimi yollarında, ağrı davranışına neden olan yapısal ve fonksiyonel değışikliklerden ikincil haberciler (cAMP gibi), protein kinazlar ve nitrik oksit (NO) sorumludurlar. Bunların sonucu olarak yine TRPV1'in fonksiyonu potansiyalize olur³⁶.

2.2.2.2.3.2. Afferent Nöronların Anormal Ektopik Uyarılabilirlikleri

Afferent aksonun ana hücreden kesilme, kopma gibi nedenlerle ayrılması veya demiyelinizasyon sonucu fonksiyonel blok oluşması gibi nedenlerle anormal ektopik uyarılma olur. Parasteziler ve diesteziler myelinli A-beta liflerinin spontan elektrik deşarjları ile gerçekleşirler. Saplanıcı ve yanıcı tarzda ağrı az myelinli A-delta ve myelinsiz C liflerde bozulmuş eksitabiliteye bağılı olarak gerçekleşir. Oluşan bu semptomlar ise iki grup voltaj kapılı Na kanalları tarafından gerçekleştirilir. Voltaj

kapılı Na kanallarının 9 alt tipi olduğu ortaya konulmuştur. (Nav 1.1'den Nav 1.9 'a kadar). Nöronlarda yaralanma sonucu, voltaj duyarlı Na kanal proteinleri lezyon yerinde birikir, aksiyon potansiyeli eşiği düşer ve akson membranının elektriksel özelliklerinde, yeniden yapılanma (remodelling) oluşur⁴⁰.

Na kanal proteinleri dorsal root ganglion (DRG)'de sentez edilir ve aksondan anterograd aksoplasmik akımla taşınır. Ektopik deşarj yaralanan akson bölgesinde, DRG'de ve tomurcuklanma noktalarında oluşur ve bu bölgelerde termal, mekanik, kimyasal uyarılara artan duyarlılık nedeniyle bu tür uyarılarla deşarj başlar³⁴.

Karbamazepin, okskarbazepin, fenitoin ve lidokain gibi Na kanallarını inhibe etme özelliği bulunan ilaçların nöropatik ağrı tedavisinde etkili oldukları gösterilmiştir. Lamotrijin'nin HIV enfeksiyonu, inme ve diyabete bağlı gelişen nöropatik ağrıda faydalı olduğu gösterilmiştir. Trisiklik antidepresan (TAD) ilaçlarında Na kanalları üzerinde bloke edici etkileri vardır. Bu durum onların analjezik etkilerine katkıda bulunmaktadır. TAD'lar terapötik plazma konsantrasyonlarında Nav 1.7'yi inhibe ederken selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) terapötik dozlarında bunu gerçekleştiremezler. Bu nedenle SSRI ilaçlar nöropatik ağrı tedavisindeki etkileri azdır³⁶.

2.2.2.2.3.3. Spinal Dorsal Kökte Pronosiseptif Kolaylaştırma

Spinal glial hücrelerin nöropatik ağrıyı uyaran, sinir hasarı patojenezinde aktif rol aldığı gösterilmiştir. Periferik sinir hasarlanması sonrasında SSS'nin immün hücreleri ile spinal mikroglial hücreler istirahat halinden aktive hale geçerek bazı yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olmaktadır. Hasarlanan periferik sinir uçları ve etkilenen dorsal boynuz nöronları purinerjik reseptörler, kemokin ve kemokin reseptörleri yanısıra immün ilişkili moleküllerle de (lipopolisakkaritler, toll-like reseptörler) spinal mikroglia hücrelerine sinyal gönderir ve protein kinaz aktivasyonu gerçekleşir (p38 MAPK). Aktive olan mikroglialar diffüze olabilen mediatörler (proinflamatuvar sitokinler, kemokinler) salarak dorsal boynuz nöronlarında hipereksitabiliteyi uyarırlar³⁶.

2.2.2.2.3.4. Spinal İnhibitör Örgüde Nosisepsiyonun Disinhibisyonu

Nöropatik ağrı oluşumunda korteksten spinal korda inen inhibitör mekanizmaların kaybı önemlidir. İnlen inhibitör seratonerjik, nöradrenerjik ve dopaminerjik yollar ile nosiseptif iletimi ayarlayan ana merkezler;

- Somatosensoriyel korteks,
- Talamus,
- Hipotalamus,
- Orta beyinde periakuaduktal gri madde,
- Medullada raphe magnus çekirdeği,
- Spinal kord arka boynuzdaki ara bağlantılardır⁴¹.

Mesensefalonda periakuaduktal gri bölgeden başlayıp majör nörotransmitter olarak serotonin kullanan, beyin sapından medulla spinalise inen çok önemli iki tane inhibitör yol bulunur. Noradrenerjik nöronlar dorsolateral pontin tegmentum bölgesinde daha yoğun olarak bulunurken, seratonerjik nöronlar ise bu inen inhibitör yolda rostroventral medullada daha yoğun bulunur. Nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan antidepressanlar, seratonerjik ve noradrenerjik etkileri ile inen inhibitör yollara etkileri ile nöropatik ağrıyı dindirirler. Ayrıca, nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan opioid ilaçlar; periakuaduktal gri bölgedeki opioid reseptörlerini aktive ederek enkefalin salınımına sebep olur⁴¹.

İnhibitör etkiler spinal kordtaki inhibitör internöronlardan kaynaklanır ve bunlar gama amino bütirik asit (GABA) ve glisin gibi nörotransmitterler ile fonksiyon görürler. Bu inhibitör mekanizmaların bozulması veya kaybı ile dorsal boynuz nöronu afferent inputa cevap olarak abartılı şekilde ateşlenir ve hastada allodini ortaya çıkar⁴².

2.2.2.2.3.5. Sempatik Olarak İdame Ettirilen Ağrı

Sinir lezyonlarından sonra sağlam ve hasarlanmış nöronlarda alfa adrenoreseptörler oluşur ve bunlar sempatik terminallerden salgılanan NA'ya duyarlı hale gelir. Aynı olay DRG'de oluşur. Hasarlanmış nöronlar dolaşımdaki NA ve adrenaline duyarlı hale geldiğinden sempatik efferentlerle duysal afferentler arasında bir

bağlantı oluşur. Ayrıca NGF ile sempatik aksonlar DRG'de ana hücreler etrafında sepet benzeri yapılar oluşturarak depolarizasyona katkıda bulunurlar⁴³.

Akut herpes zoster, fantom ekstremité ağrısı, travmatik nöropatiler, pleksus hasarları gibi diğér nöropatik ağrı sendromlarında sempatik aktivitenin modülasyonu aracılığıyla ağrının seyri değıştirilebilmektedir³⁶.

2.2.2.2.3.6. Santral Reorganizasyon Süreçleri

Periferik sinir hasarı sonucu dorsal boynuz alanında bazı değışiklikler meydana gelir. Bu duruma, SSS'ne ulaşan fazla miktardaki sensoriyal uyarılar sebep olur. Bu değışiklikler sonucu hipereksitabl hale gelen nöronlar spontan aktivasyon potansiyeli oluştururlar ve bu oluşun anormal yüksek frekanslı aktivite ağrıya katkıda bulunur. Deneysel hayvan modellerinde, nöropatik ağrıda; N metil D aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonunun önemli bir role sahip olduğı gösterilmiştir. Bir NMDA reseptör antagonisti olan ketaminin intravenöz infüzyonunun kullanıldığı çalışmalarda, nöropatik ağrılı hastalarda ağrının şiddetinin azaltıldığı gösterilmiştir. Normal istirahat membran potansiyelinde NMDA reseptör kanalları, magnezyum ile bloke durumdadır. NMDA resptörünün uyarılmasıyla magnezyum blokajı ortadan kalkar ve kalsiyum hücre içine girmeye başlar. Kalsiyum iyonlarının hücre içine girmesi santral sensitizasyonun devam etmesini sağlar³⁰.

SSS'de nöronal plastisiteyi araştırmak üzere fonksiyonel beyin görüntüleme yöntemleri önemli bir araç olmuştur. Periferik ağrılı uyarıların santral nöronal plastisiteyi belirlediğini gösteren ratlarla yapılan çalışmalarda, parsiyal siyatik sinir hasarı sonrasında hızlıca lateral talamik yollarda reorganizasyon ve somatosensoryal değışiklikler olduğı gösterilmiştir. Bu nöroplastik değışiklikler terapötik girişimlerle geri döndürülebilir³⁶.

2.2.2.2.4. Periferik Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu

Periferik sinir hücresinde;

-Segmental demiyelinizasyon,

-Aksonal dejenerasyon ve alt tipi olan Wallerian dejenerasyondan bahsedilebilir⁴⁴.

Birinci derece yaralanmalarda sadece iletim hattında patolojik değişiklikler çok az olurken, ikinci derece yaralanmalarda yaralanma bölgesinde hafif histolojik değişiklikler oluşur ve yaralanma bölgesinin distalinde ise Wallerian dejenerasyonu oluşmaktadır. Bu dejenerasyonda primer histolojik değişiklikler; akson ve miyelin kılıfta oluşan yapısal bozukluklar olur. Ayrıca nöronda gözlenen nörotübül ve nörofilamanlar düzensiz hale gelir. Akson ve miyelin kılıfın birbirlerinden ayrılmaları, aksonda varikoz şişkinliklerin oluşması başlıca yapısal değişiklerdir. Miyelin kılıf dejenerasyonu oluştuktan sonra genellikle akson devamlılığı kaybolur ve impuls iletimi bozulur. Schwann hücreleri dejenerasyonda önemli bir yere sahiptir ve hasar sonrası 24 saat içinde aktif hale geçer. Schwann hücreleri dejenerasyon sonrası akson ve miyelin artıklarını makrofaj hücreler ile ortadan kaldırır⁴⁵. Schwann hücreleri periferik sinir hasarı sonrasında aksonal rejenerasyonun sağlanması için bazı faktörlerin sentezini ve salınımını organize ederler. Bu faktörler arasında Nöronal Büyüme Faktörü (Nerve Growth Factor; NGF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-Like Growth Factor; ILGF), Silier Nörotrofik Faktör (Ciliary Neurotrophic Factor; CNTF), Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (Brain Derived Neurotrophic Factor; BDNF), Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor; FGF) sayılabilir. Aynı zamanda bazı ekstrasellüler proteinleri (laminin, fibronektin) de sentezlerler⁴⁵.

2.2.2.2.5. Nöropatik Ağrı Tedavisi

Nöropatik ağrı tedavisinde kullanılan farmakoterapötik stratejiler deneysel kanıtlar ve bazı klinik çalışmalara dayandırılmıştır. Namaka M. ve ark.'nın nöropatik ağrı yönetimi konusundaki tüm makaleleri inceleyerek oluşturduğu bildiride nöropatik ağrı tedavisi dört basamaktan oluşmaktadır (Şekil 1)⁴⁶.

1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Klinisyenler			
<p>ANTİDEPRESANLAR (AD)</p> <p>SSRI TAD SNRI Diğerleri</p> <p>Paroksetin Amitriptilin Duloksetin Bupropion</p> <p>Fluoksetin Nortriptilin Venlafaksin Sertralın Desipramin</p>	<p>NARKOTİKLER</p> <p>Morfin Kodein Metadon Tramadol (XL)</p>		
<p>Amitriptilin Gabapentin Ve iki AD ile ve diğer iki AE</p> <p>Başarısızlık ile başarısızlık</p>	<p>Oksikodon Alfentanil Fentanil</p>	<p>Refrakter Tedavi</p> <p>Tizanidin Ketamin</p>	
<p>ANTİEPİLEPTİKLER (AE)</p> <p>Gabapentin Lanotirjin Karbamazepin Fenitoin</p> <p>Topiramet Pregabalin</p>	<p>Narkotikler İle</p> <p>başarısızlık</p>	<p>Baklofen Klonidin Dekstrometorfan Meksiletin Amantadin Lityum Karbonat Memantin</p>	
<p>Gabapentin ve diğer iki AE ile başarısızlık</p>			
<p>TOPİKAL ANTİNÖROPATİKLER</p> <p>Kapsaisin Ketamin Lidokain</p>		<p>Refrakter tedavi ile</p>	<p>Ağrı Servisiyle Konsültasyon</p>
	<p>ADJUVAN ANALJEZİKLER</p> <p>İbuprofen Naproksen Celekoksib Aspirin Asetaminofen Asetaminofen/tramadol Asetaminofen/kodein/kafein</p>	<p>Başarısızlık</p>	<p>Cerrahi Müdahale</p>
	<p>ADJUVAN ESRAROTU ÜRÜNLER</p> <p>Sativex Nabilone</p>		

Şekil 1. Nöropatik ağrı tedavi algoritması (Namaka M. 2009).

2.3. Kök Hücreler

Organizmayı meydana getiren hücreler çoğalma, büyüme ve bölünme özellikleri bakımından birbirlerinden farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar organizmada gerekli olan fonksiyonların düzgün şekilde yerine getirilebilmesini sağlar. Bunun için, çoğalma, olgunlaşma, göç etme ve farklılaşma özellikleri bir arada ve belirli bir düzen içerisinde olmalıdır. Organizmadaki kök hücreler, organ ve dokuların ihtiyacı olan hücrelerin üretilmesini ve bu üretimin devamlılığını sağlar⁴⁷.

“Kök hücre” terimi ilk olarak botanik ile ilgili eski eserlerde ortaya çıkmaktadır. Bitkinin gelişmekte olan kök meristeminin ucunda, bölünme hızı çok yüksek olan hücreleri tanımlamak için kullanılan “kök hücresi” kavramı günümüzde benzer davranış içinde olan hücreler içinde kullanılmaktadır⁴⁸.

Kök hücre düşüncesi ilk kez Alexander A. Maximow (1874-1928) tarafından kan hücrelerinin öncül hücrelerden çoğaldığını ileri sürmesiyle ortaya çıkmıştır⁴⁹. Süreyya Tahsin Aygün 1950’li yıllarda, hayvanlarda fetal greftler ve kordon kanı greftleri ile çeşitli hastalıkların tedavisinde araştırmalar yapmıştır⁵⁰.

İnsanda kemik iliği nakli 1950’li yıllarında başlamış olsada ilk başarılı allojeneik kemik iliği nakli 1968 yılında yapılmıştır. Embriyo kök hücreleri (EKH) üzerindeki ilk araştırma; farede gelişen teratokarsinomdan embriyo karsinoma hücrelerinin elde edilmesi girişimidir. 1972’de A.B.D.’de bir grup klinisyen tarafından yapılan çalışmada, kordon kanı kök hücrelerin lenfoblastik lösemisinin tedavisinde olumlu sonuçları gözlenmiştir⁵¹.

Günümüzde kök hücrelerin çok çeşitli alanlarda tedavi ve rejenerasyon amacıyla kullanıldığını gösteren birçok yayın bulunmaktadır. Özellikle malign hastalıklar başta olmak üzere miyokard enfarktüsü, diyabet, sinir hasarı gibi tam tedavisi mümkün olmayan hastalıkların tedavi edilmesini kapsamaktadır. Kök hücre tedavileri birçok hastalığa umut olabilecek bulgular içermekle beraber bazı hastalıklarda tedavi yöntemi olabilmesi için detaylı çalışmalara ve zamana ihtiyaç vardır⁵².

Friedenstein AJ ve ark. 1968 yılında fare kemik iliği stromasını başka bir dokuya nakletmiş ve burada stroma hücrelerinin yağ, kıkırdak, kemik ve retikulum hücrelerine dönüşebildiğini gösteren çalışmalar ile 1976 yılında radyasyona maruz bırakılmış, normal farelerin hematopoetik organlarındaki fibroblast hücre çalışmaları ile MKH çalışmalarının başlangıcı olmuştur⁵³. Böylece kemik iliğinde hematopoetik olmayan

öncü hücrelerin var olduğu anlaşılmış ve bu hücreler fibroblast kolonisi oluşturan birim “CFU-F” (Colony-Forming Unit-Fibroblast) etkinliğiyle ölçülerek fibroblastların öncüsü hücreler olarak tanımlanmıştır. 1999 yılında Pittenger MF ve ark. yaptıkları çalışmada, genel özellikleri plastik yüzeye yapışmaları ve in vitro olarak çoğaltılabilmeleri olan bu hücreleri in vitro ortamda adiposit, kondrosit ve osteoblasta farklılaştırmıştır⁵⁴. Bunların birçoğu özellikle growth versus host hastalığı (GvHD) başta olmak üzere kardiyak hasar, yanık, ortopedik hasar, diyabet, sinir hasarı gibi tedavisi zor veya mümkün olmayan hastalıkların tedavi edilmesi üzerine yapılan çalışmalardır⁵².

Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme (self-renewal) kapasitesine sahip, kendilerinden başka tipte hücrelere farklılaşabilen (differansiyasyon), hasarlı bir dokuya nakledildiklerinde işlevsel olarak rejenerasyon yapabilen hücreler olarak tanımlanabilmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler için bu tanımlama kısmen farklı olabilirken, kök hücrelerin genel olarak aşağıdaki özellikleri taşımaktadır.

- a) Kök hücreler uzun süre boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahiptir. Erişkin kök hücrelerine oranla embriyonik kök hücreler bu kapasiteye daha fazla sahiptir. Burada hücrelerin bölünme kapasitesini kromozomların ucunda yer alan ve her hücre bölünmesinde kısalan “telomer” adı verilen DNA zincirleri belirlemektedir⁵⁵.
- b) Kök hücreler özelleşmemiş hücrelerdir. Bu hücreler herhangi bir dokuya özgü hücre özelliği taşımazlar ve dokuya ait işlevsel nitelikleri yoktur. Ancak, özelleşmiş hücrelere dönüşmek üzere kaynak oluşturabilirler.
- c) Kök hücreler kendi kaynaklarından farklı özelleşmiş hücrelere de farklılaşabilirler. Kök hücrelerin bu özelliği “plastisite” olarak tanımlanmaktadır. Farklılaşmanın ilk örneği zigottan itibaren görülmektedir. Embriyonik kök hücrelerin her hücre tipine farklılaşma kapasitesi bulunmaktadır. İlerleyen dönemlerde bu özellik sınırlanmaktadır. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda ise, geriye farklılaşma (dedifferansiyasyon) ile özelleşmiş bir hücrenin özelleşmemiş embriyonik hücre benzeri bir nitelik kazanabileceği bildirilmiştir⁵⁶.

d) Kök hücreler hasarlı bir dokuya nakledildiklerinde burada çoğalarak dokuyu işlevsel olarak tamir edebilirler. Bazı kanser vakalarında tedavi amaçlı hastanın yok edilen kemik iliğinin kök hücre nakli ile tekrar oluşturması örnek olarak gösterilmektedir. Hasara uğramış dokuların (sinir, kas vb.) işlevsel olarak rejenerasyonlarında farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler kullanılmaktadır⁵⁷.

2.3.1. Kök Hücre Tipleri

Kök hücreler farklılaşma özelliklerine ve elde edildikleri kaynaklara göre iki farklı şekilde sınıflandırılabilirler.

Farklılaşma özelliklerine göre,

- Totipotent kök hücreler
- Pluripotent kök hücreler
- Multipotent kök hücreler

Elde edildikleri kaynaklara göre,

- Embriyonik kök hücreler
- Embriyonik olmayan kök hücreler
 - Erişkin kök hücreleri
 - Fetüs kök hücreleri
 - Kadavra kök hücreleri
 - Kordon kanı, plasenta kök hücreleri olarak sınıflandırılmaktadır⁵².

2.3.1.1. Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücreler

2.3.1.1.1. Totipotent Kök Hücreler

Embriyonik dönemin hemen başında bulunan zigot, tüm vücut hücrelerini ve organizmayı oluşturabilir. Bu şekilde tüm hücelere farklılaşabilme ve organizma oluşturma kapasitesine sahip hücreler “totipotent” hücre olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler fertilizasyonun ilk 5 gününde oluşan ilk 4-8 hücreyi kapsamaktadır ve invitro fertilizasyonda organizmayı oluşturmak için kullanılmaktadır⁵².

2.3.1.1.2. Pluripotent Kök Hücreler

Emrionik dönemin 5. gününden sonra oluşan blastosit içerisinde bulunan hücreler, endoderm, mezoderm ve ektoderm kökenli yüzlerce tip hücreye farklılaşabilirler fakat bir organizma oluşturamazlar. Bu özelliğe sahip hücreler “pluripotent” hücrelerdir⁵².

2.3.1.1.3. Multipotent Kök Hücreler

Embriyonik dönemin başında totipotent özellikte olan hücreler fetal dönemden itibaren özelleşmeye, doku ve organları hızla oluşturmaya başlarlar. Bu şekilde doku ve organlarda özelleşmiş olan kök hücrelere “multipotent” hücreler denmektedir. Multipotent hücrelerin geriye farklılaşma denen bir mekanizma ile daha ilkel hücrelere dönüşerek yer aldıkları doku hücrelerinden daha farklı hücrelere dönüşebildiğini gösteren çalışmalarda vardır⁵⁶.

2.3.1.2. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücreler

2.3.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Erken dönemdeki memeli embriyosundaki kök hücrelerden elde edilen ve invitro ortamda farklılaşmadan sınırsız çoğalabilme kapasitesine sahip hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler üzerinde 1970’li yıllarda yapılan çalışmada, farede gelişen teratokarsinomdan embriyo karsinoma hücrelerinin elde edilmesi bu alandaki ilk girişimdir. İlk kez 1981 yılında fareler üzerinde yapılan çalışmalarda 3-5 günlük fare blastosistleri iç hücre kitlesinden veya epiblasttan ayrıştırılan hücreler in vitro ortamda fare fibroblastları üzerinde çoğaltılarak EKH elde edilmiştir. 1998 yılında yapılan bir çalışmada; insan blastokistindeki iç hücre kitlesinden ayrıştırılan hücrelerin in vitro ortamda çoğaltılmasıyla insan EKH’i ortaya çıkarılmıştır⁵¹.

2.3.1.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Kordon kanı, plasenta, kadavra ve fetüs gibi kaynaklardan elde edilen kök hücrelerdir. Fakat günümüzde fetüs dışında hepsi erişkin kök hücreleri olarak adlandırılmaktadır. Erişkin kök hücreleri elde edildikleri organ veya dokuya göre adlandırılmaktadır. Kan üreten kemik iliği hücrelerinden elde edilirse “hematopoetik

kök hücre”, kemik iliği stromal hücrelerinden elde edilirse “kemik iliği stromal kök hücreleri” gibi tanımlanır. Kemik iliği stromal kök hücreleri aynı zamanda kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücreler olarak da adlandırılırlar ve başka mezoderm kökenli organ ve dokulardan da elde edilebilirler.

Erişkin kök hücrelerini,

1- Hematopoetik kök hücreler

- Kemik iliği kaynaklı
- Periferik kan kaynaklı
- Kordon kanı kaynaklı

2- Mezenkimal kök hücreler

3- Organ ve dokularda bulunan kök hücreler şeklinde de sınıflayabiliriz⁵².

2.3.1.2.2.1. Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoez yani organizmanın kan hücrelerini oluşturması, bütün kan hücre serilerine farklılaşma yeteneğindeki hematopoetik kök hücre (HKH)’nin gelişim, kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini kapsamaktadır. İlk defa 1988 yılında Weissman ve grubu farede HKH’ler tanımlanmıştır⁵¹. HKH’ler erişkin bir insanda kemik iliğinde bulunmaktadır. Erişkin kemik iliği dışında fetüs karaciğerinde, dalağında, göbek kordonunda ve plasentada bulunur. Periferik kanda çoğu zaman tespit edilemeyecek kadar azdır, fakat büyüme faktörü yardımıyla kemik iliği hematopoetik kök hücrelerinin periferik kana geçişi sağlanabilmektedir⁵².

Hematopoetik kök hücre nakilleri tedavi amaçlı yapılmaktadır. Bu nakillerde kaynak kişinin kendisi ise “otolog kök hücre nakli”, kaynak bir başkası ise “allojeneik kök hücre nakli” olarak adlandırılmaktadır. Otolog kök hücre nakli, kalıtsal kökenli bir hastalığın tedavisinde aynı genetik yapıya sahip olunacağından, bir yarar sağlamayacaktır. Bu durumda uygun bir vericiden yapılan allojeneik nakil (genetik mutasyon içermediğinden) sağlıklı hücre serilerini oluşturabilmede daha faydalı olacaktır. Hematopoetik kök hücrelerle ilgili çalışmalar daha çok kemik iliği, periferik kan ve kordon kanı üzerinde yapılmaktadır⁵².

2.3.1.2.2.1.1. Kemik İliği Kök Hücreleri

Dr. E. Donnall Thomas, 1957 yılında, akut lösemide ilk seri allojenik kemik iliği nakil çalışması yapmıştır. Bu çalışma lösemi ve kalıtsal hastalıkların tedavisi amacıyla kemik iliği kullanılması yönteminin başlangıcı sayılmaktadır⁵⁸.

Nakil amaçlı kemik iliği elde edilmesi, genel anestezi altında ve dikkat gerektiren invaziv bir işlemdir

2.3.1.2.2.1.2. Periferik Kan Kök Hücreleri

İnvaziv bir işlem gerektirmediğinden ve nakil için daha kolay hazırlandığından son yıllarda kemik iliğinin yerini almıştır. Aferez cihazı adı verilen bir cihazla poliklinik şartlarında yapılabilmekte ve anestezi ihtiyacı olmamaktadır. İlk başarılı periferik kan kök hücre nakli 1985 yılında gerçekleştirilmiştir ve ardından ilk olarak otolog kemik iliğinin ve daha sonra da allojenik kemik iliğinin yerini almıştır⁵⁹.

2.3.1.2.2.1.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri

Günümüzde kök hücre naklinde sıklıkla kullanılan kordon kanı, ilk defa 1988 yılında kullanılmıştır. Kordon kanındaki kök hücrelerin hematolojik malignitelerde ve kemoterapiden sonra kemik iliği yetmezliği olan hastalarda kullanılmaya başladığı görülmüştür⁵¹. İlk kordon kanı bankasını, Dr. David Haris tarafından 1992 yılında kordon kanının belirli koşullar altında toplanıp dondurularak saklanabileceğini ve gereken durumda çözülerek kullanılabileceğini göstermesinin ardından kurulmuştur⁶⁰.

2.3.1.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

“Mezenkim” terimi epiblastın farklılaşmasından başlayarak embriyonun gelişmesinde ve daha sonra fetüsün yaşamında önemli yer tutan, gevşek bağ dokusu yapısındaki dokulara verilen isimdir. İlk olarak 1976 yılında Friedenstein tarafından tanımlanmış mezenkimal kök hücreler, konnektif (bağ) dokunun temel hücreleridir⁵¹. Tüm dokularda destek hücre görevini üstlenen stromal hücrelerin kökenini oluştururlar. Önceleri, Koloni Oluşturan Birim-Fibroblast veya kemik iliği stromal fibroblastları olarak isimlendirirken günümüzde ISCT tarafından mezenkimal stromal hücre veya multipotent mezenkimal stromal hücre olarak tanımlanmaları önerilmektedir. MKH’ler konnektif dokuların yanı sıra endodermal ve ektodermal kökenli farklı dokulara

dönüşebilme yeteneklerinden dolayı birçok araştırmacı tarafından halen mezenkimal kök hücre olarak adlandırılmaktadırlar⁶¹. MKH'ler mezoderm kökenlidirler ve birçok dokudaki bağ ve destek hücrelerine (fibroblast, adiposit, tenosit, osteosit, kondrosit) dönüşebilme özelliğindedirler. Bunun dışında in-vivo ve in-vitro çalışmalarda uygun uyarılarla hematopoietik olmayan dokuların (karaciğer, kalp, beyin, böbrek, akciğer vb) parankim hücrelerine farklılaşabildikleri de gösterilmiştir^{62,63}. Klinik kullanımdaki yaygınlığı ve hakkında oldukça çok veri elde edilmiş olması sebebiyle MKH'lerin elde edildiği en önemli kaynak kemik iliğidir⁵¹. Bunun yanı sıra diğer doku ve organların stromalarından (yağ, tendon, snovyal membran, plasenta, amniyon materyali, karaciğer, umbilikal kord, diş) da elde edilebilmektedirler⁶⁴.

Mezenkimal kök hücrelerin, elde edildikleri dokudan bağımsız olarak plastik kültür yüzeylerine yapışarak büyümeleri/çoğalmaları, in vitro olarak en az üç seriye farklılaştırılmaları ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi birçok özellikleri vardır⁵¹. Periferik kanda osteojenik farklılaşma yeteneği olan non-hematopoetik ve MKH karakterinde hücreler olduğu gösterilmiştir. Özellikle ağır hasar olan durumlarda, kemik kırığı, multi organ yetmezliği gibi hallerde periferik kandan MKH izole edilebildiği gösterilmiştir⁶⁵.

MKH'lerin in vitro ortamda nöronal morfoloji kazanmaları, nöronal ve nörogial marker ekspresyon etmeleri sinir sistemi hasarında kullanımına olan ilgiyi arttırmaktadır. Erişkin MKH'ler in vitro ortamda gelişerek, kemik, kırık, tendon, kas ve yağ hücreleri oluşturmak üzere stimüle edilmektedirler. Birçok araştırmada bu hücrelerin mezoderm ve mezoderm olmayan hücre türlerine dönüşebildiği gösterilmiştir; endotel hücreleri, kardiyomyositler, hepatositler, nöron benzeri hücreler ve astrositler bunlardandır⁵¹. MKH'lerin transplantasyonu ile bu hücrelerin kendini yenileme ve multipotansiyel özelliklerinden yararlanabileceği düşünülmektedir. Kök hücrelerin aynı zamanda hasarlı hücreler ile yer değişimi, nöroproteksiyon veya endojen hücreler ile birlikte rejenerasyon oluşturabilmek için uygun bir mikroçevre oluşumu sağladığı bilinmektedir⁶⁶. Farklılaşmanın yanı sıra kök hücrelerin hasarlı nöronlara rejenerasyon sürecinde trofik destek sağlaması da başka bir olası mekanizmadır⁶⁷. MKH'ler birçok molekül sentezleme özelliğine sahip oldukları için dokularda destek hücresi olarak bulunurlar. Bunlar arasında; Granülosit-Monosit Koloni Uyarıcı Faktör (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor; GM-CSF), Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

(Macrophage Colony-Stimulating Factor; M-CSF), Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (Granulocyte-Colony Stimulating Factor; G-CSF) gibi büyüme faktörleri, reseptörleri, sitokin olarak bazı interlökinler (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12 v.b.), reseptörleri, adezyon molekülleri, ekstrasellüler matris proteinlerinden bazıları (fibronektin, laminin, kollegen) ve bazı kemokinler [Stromal Kaynaklı Faktör (Stromal Derived Factor ALFA-1; SDFALFA-1), Monosit Kemoatraktan Protein (Monocyte Chemoattractant Protein; MCP-1) vb.] sayılabilir⁶⁸. Kök hücre tedavisinin bazı durumlarda kayıp nöronların yerini almaktan çok nöronal koruma ve anti-inflamatuvar özellikleri göstererek tedaviye katkıda bulunduğu gösterilmiştir⁶⁹. MKH'lerin hasarlı dokunun iyileştirilmesinde etkili olabilmesi için öncelikle içinde buldukları kendi mikroçevrelerinden hasarlı dokuya hareketi ve göçü gereklidir. Bunu sağlayan uyarı ise hasarlı dokunun değişen mikroçevresidir. MKH'ler birkaç farklı mekanizma ile hasarlı dokunun tamirine katkıda bulunurlar.

Bu mekanizmalar;

- Farklılaşarak dokuya özgü fonksiyonel hücreye dönüşmesi,
- MKH-hasarlı hücre füzyonu sonucu doku hücresinin fonksiyonunu yeniden kazanması,
- Hasarlı dokuda hücre-hücre, hücre-ekstrasellüler matris ilişkileri ve solubl faktörlerin (büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler v.b.), parakrin faktörlerin ve enzimlerin salınması,
- Antiinflamatuvar, antiapoptotik, immünmodülatuar ve anjiogenik etki ile hasarın düzeltilmesine katkı sağlamasıdır⁷⁰.

2.3.1.2.2.2.1. MKH'lerin Kullanım Alanları

MKH'ler, birçok alanda klinik kullanım potansiyeline sahiptir.

- Kök hücre transplantasyonu
- İmmünomodülasyon
- Kemik dokularının tamiri
- Nörodejeneratif hastalıklar
- Kardiyak rejenerasyon

- Konjenital genetik hastalıklar
- Estetik cerrahi
- Crohn hastalığı
- Siroz
- Tip 2 diyabet bu alanlardan bazılarını oluşturmaktadır⁵¹.

MKH'lerin, granülositmakrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF), granülosit koloni stimulan faktör (G-CSF), İnterleukin-6 (IL-6) gibi sitokinleri sentezlemesi ve salgılama özelliğinden dolayı; hematopoetik kök hücre naklinde ek olarak MKH infüzyonu yapılmaktadır⁵².

2017 yılı itibarı ile Uluslararası Sağlık Örgütü tarafından desteklenen www.clinicaltrials.gov sitesinde kayıtlı 5991 kök hücre çalışması yapılmış ve bu çalışmaların 709'unun ise MKH'lerin etkinliğini göstermeye çalışmaktadır⁷¹.

MKH'lerin klinikte en fazla ve en etkili olarak kullanımı bu immünomodülatuar etkileri nedeniyle, allojenik kök hücre transplantasyonu sonrasında gelişen GvHD tedavisi için olmuştur⁶¹.

Progresif ve destrüktif seyir gösteren kronik inflamatuvar bir gastrointestinal sistem hastalığı olan Crohn hastalığı'nda oluşan fistül onarımında MKH uygulamasıyla ilgili faz I ve faz II klinik çalışmaları yürütülmektedir⁷².

Götherström ve ark. tarafından, kollajen sentezi bozukluğunun neden olduğu genetik bir hastalık olan Osteogenesis imperfecta (OI) tedavisinde MKH kullanımı üzerine prenatal ve postnatal klinik çalışmalar yapılmış ve MKH retransplantasyonunun güvenilir ve etkili olduğunu bildirilmiştir⁷³.

Mathiasen ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan randomize çift-kör ve plasebo-kontrollü bir çalışmada, iskemik kalp yetmezliği olan 30 ila 80 yaş aralığında bulunan 37 hastaya miyokard içine olog kemik iliği kaynaklı MKH, 18 hastaya ise plasebo verilmiştir. Birinci son nokta altı aylık takipte sol ventrikül sistol sonu hacmi (LVESV) değişikliği bilgisayarlı tomografi ile ölçülerek belirlenmiştir. Altıncı ayda MKH'li grupta LVESV değeri azalırken, plasebo grubunda artmıştır⁷⁴.

Estetik ve rekonstrüktif cerrahide yüzdeki kırışıklık ve çizgiler, akne yaraları ve çöküntüler, yanık izlerinin tedavisinde cilt hasarlarını düzeltmede, bölgesel yağ aldırma

ya da solid yağ dokusundan elde edilen MKH enjeksiyonunun ve otolog fibroblast hücrelerinin etki gösterdiği bildirilmiştir⁷⁵.

2014 yılında Llufrü ve ark. tarafından yapılan randomize, plasebo kontrollü faz II çalışmasında dokuz multiple skleroz (MS) hastasına MKH damar içi yolla verilmiştir. Hastalara verilen MKH'ler immünmodülatör özellikleri ile inflamatuvar parametrelerin düşürülmesini sağlamıştır⁷⁶.

MKH'lerin rejeneratif tıp alanında da geniş kullanım alanları bulunmaktadır. Ortapedide menisküs hasarı tamiri, osteoporoz tedavisi, kardiyojide myokard infarktüsü, nörolojide spinal kord yaralanmaları gibi birçok alanda kullanılmaktadır⁵². Omurilik rejenerasyonu ile ilgili deneysel çalışmalarda in vitro çoğaltımı sağlanan kemik iliği kaynaklı MKH kullanılmaktadır. Omurilik rejenerasyonunda MKH kullanımı ilk defa Parr ve ark. tarafından tanımlanmıştır⁷⁷. Park ve ark. tarafından spinal kord hasarı olan altı adet hastada hasarlı alana uygulanan kemik iliği hücre naklinden hemen sonra duyu almada iyileşmeler gözlemlenmiş ve 3-7 ay sonrasında da önemli derecede motor iyileşmeler gösterilmiştir⁷⁸.

Farelerde siyatik sinir bağlanması ile oluşturulan mononöropati modeli üzerine yapılan bir çalışmada, nöropatinin oluşmasından sonra farelerin soğuk plak uygulamasında soğuk allodini duyarlılıklarının azaldığını ve MKH infüzyonu ile sağlıklı kontrol grubu farelerine benzer şekilde düzelme olduğu gösterilmiştir⁷⁹. MKH infüzyonu yapılan başka bir çalışmada ise farelerin soleus kası üzerindeki aksiyon potansiyelinde düzelmeler olduğu gösterilmiştir⁸⁰.

2.3.1.2.2.2. MKH'lerin Tespit Edilmesinde Kullanılan Belirteçler

MKH'lerin tespiti için standart bir antikor kombinasyonu mevcut değildir. Bu hücrelerin hücre yüzey antijenlerine bakıldığında epitel, endotel ve kas hücrelerine benzer immünojenotipik özellikler taşıdıkları görülmektedir. MKH'ler üzerine yapılan hücre yüzey antijen çalışmaları daha çok kültürle elde edilen hücreler üzerinde yapılmıştır. Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin kriterlerine göre MKH'ler standart kültür ortamında en azından aşağıdaki 3 kriteri taşımalıdır. Cluster of Differentiation antikorları (CD antibody) ISCT tarafından MKH'lerin tanımlayıcı özellikleri olarak⁸¹.

- Standart kültür ortamında plastiğe yapışabilmeleri,
- Belirli yüzey antijenlerini (CD105, CD73, CD90) taşıırken bazı yüzey antijenlerini (CD45, CD34, CD14 veya CD11b/c, CD79, CD19, HLADR) taşıyamamaları,
- İn-vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmelerinin gösterilmesi önerilmektedir.

MKH'ler iğ şeklinde bir görünüme sahiptir, fibroblast benzeri hücre topluluklarıdır. Fibroblastlardan farklı olarak çekirdekleri asimetrik değil simetriktir⁸¹. HKH'lerin stromaya tutunması, salgıladıkları çeşitli faktörler ile hematopoietik öncül hücrenin işlevsel olgun hücreye farklılaşması, bu faktörlerin salınmasının engellenmesi ile diğer dokulara hareketin (mobilizasyonun) ve göçün (migrasyonun) sağlanması MKH'lerin işlevleri arasında sayılabilir⁸².

Hücrelerin in-vivo olarak tanımlanması için de hücre işaretleyicileri kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kalıcı olan yeşil floresan boya (GFP-Green Fluorescent Protein) geni ile transfekte hücreler kullanılmaktadır. Bunun dışında Carboxyfluorescein diacetate succinimidylester (CFSE), ve Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) gibi geçici floresan hücre işaretleyicileri kullanılmaktadır. Histopatolojik inceleme ile hücrelerin naklinden sonra alınan doku örneklerinde floresan yayan hücreler belirlenmektedir.

Moleküler yöntemlerle de hücrelerde, herhangi bir proteinin varlığı veya değişikliği tespit edilebilir. Revers transkriptaz PCR teknolojisi; DNA ya da komplementeri elde edilmiş RNA örneklerini kantitatif olarak tespit edebilen bir yöntemdir. Floresan işaretleme tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanıma girmesiyle geliştirilen PCR tekniği gen ekspresyon çalışmalarını arttırmıştır. DNA artışını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanılması, bu tekniği standart PCR yönteminden ayıran özelliğidir. Floresanın şiddetinin oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı ve artışla aynı anda kantitatif tespit edildiği bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla "kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu" veya RT-qPCR olarak da isimlendirilmektedir. İşlem;

- Örnek (doku, hücre) eldesi
- RNA izolasyonu
- DNAaz (enzim) işlemi
- Reverse (ters) transkripsiyon (komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi)
- Real-time PCR (Amplifikasyon)
- Veri analizi ve hesaplamaları aşamalarından oluşur.

Gen ekspresyonunun belirlenmesi, hücrelerdeki farklılaşma ve patolojik durumların belirlenmesinde çok önemlidir. Hücrelerin transkripsiyon aktivitesi çok yüksek duyarlılık içeren kantitatif revers transkriptaz PCR teknolojisi ile tespit edilebilmektedir⁸³.

2.3.2. Nöronal Kök Hücreler

Nöronal kök hücreler üzerinde yapılan çalışmalarla yetişkin insan santral sinir sisteminde nöronal kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin nöronal farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını ortaya konmuştur⁸⁴. Memeli erişkin beyinde ventriküler, subventriküler bölge ve hipokampüste bulunan bu hücrelerin üç ana hücre soyunu (oligodendrosit, astrosit ve nöron) üretebildikleri ve kendini yenileme kapasitelerinin olduğu gösterilmiştir⁸⁵.

2.3.3. Nöronal Belirteçler

2.3.3.1 Nestin

Nestin, sinir kökü / progenitör hücre belirteci olarak bilinen bir ara filament proteindir. Aksonun radyal büyümesiyle ilişkili olduğu çoğunlukla sinir hücrelerinde eksprese edilir⁸⁶.

2.3.3.2. Beta-III Tübülin

Sınıf III beta-tübülin izotipi (beta-III tübülin) yaygın olarak gelişimsel nörobiyoloji ve kök hücre araştırmasında nöronal bir belirteç olarak kabul edilmektedir⁸⁷. Beta tübülinler, heterodimerize olan ve mikrotübülleri oluşturmak için bir araya getirilen iki temel protein aileden (alfa ve beta tübülinlerden) oluşur. Bu

protein öncelikle nöronlarda eksprese edilir ve nörojenez ve akson rehberliği ve bakımı içerisinde yer alabilir⁸⁸.

2.3.3.3. NGF (Nöronal Büyüme Faktörü)

NGF bir protein kodlayan gendir. Nöronal büyüme faktörü sempatik ve duyu sinir sistemlerinin geliştirilmesi ve bakımı için önemlidir. NGF ile ilişkili hastalıklar arasında Nöropatik hastalıklar bulunmaktadır⁸⁹. NGF-beta ailesinin bir üyesidir ve homodimerize olan ve daha büyük bir komplekse salgılanan bir proteini kodlar. Bu proteinin sinir gelişimini uyarıcı aktivitesi vardır ve kompleks büyümenin düzenlenmesinde ve bazı nöronlarının farklılaşmasında rol alır⁹⁰. NGF, ilk ve en iyi tanımlanan sinir kökenli büyüme faktörüdür. NGF üretildiğinde, spesifik reseptörlerine bağlanarak sinir terminalleri tarafından alınır ve sinir hücre gövdesine retrograd aksonal transport yoluyla iletilir. NGF'nin rejenerasyondaki rolü, Schwann hücrelerine etki ederek göç etmelerini ve aksonal çıkıntılara yapışmalarını sağlamaktır. Ayrıca ortamda yeterli düzeyde NGF bulunmadığında makrofajlar tarafından gerçekleştirilen miyelin fagositozu da azalır ve rejenerasyon bu durumdan olumsuz yönde etkilenir⁹¹.

2.4. Adrenerjik Reseptörler

Reseptörler hücreler arasında belirli bir sinyal iletimini sağlayarak kasılma, gevşeme, salgı gibi biyolojik bir yanıtın oluşmasını gerçekleştirir. Reseptör molekülleri hücrenin farklı yerlerinde bulunabilirler⁹².

Adrenerjik reseptörler, otonom sinir sisteminde yer alan adrenerjik sistemin parçalarıdır ve 7 transmembranal segmentli, G proteinine kenetlenen reseptörlerdir. Adrenerjik sistemin başlıca nörotransmitterleri, periferde sempatik sistemin ikinci sıra nöronlarının nöroefektör kavşaklarındaki akson uçlarından salınan noradrenalin ve adrenal medulada kromafin hücrelerinde noradrenalinden sentezlenen adrenalindir. Bu iki nörotransmitter reseptörün üçüncü ve beşinci transmembranal kısmına bağlanır⁹³.

α ve β reseptörlerin agonist ve antagonistlere olan ilgileri dikkate alınarak alt tipleri belirlenmiştir. Buna göre;

- α - adreno reseptörler α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) ve α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) olarak,
- β - adreno reseptörler ise β_1 , β_2 , β_3 , β_4 olarak gruplandırılmıştır⁹³.

α -adrenoreseptörlerin fonksiyonları kenetlendikleri G-protein tipine (inhibe edici-Gi, stimüle edici-Gs vb.) göre farklılık gösterir. Kenetlenen reseptör, G protein alt tipine göre farklı hücrel yanıt ortaya çıkarır⁹⁴.

α_1 reseptörler düz kasların kasılmasında görev alan postsinaptik reseptörlerdir. Agonistin reseptöre bağlanmasıyla reaksiyon G-protein alt birimi ile başlatılır ve fosfolipaz C'nin aktivasyonu sonucunda 1,4,5 inozitol trifosfat (IP3) ve diasil gliserol açığa çıkar. IP3, Ca^{2+} salınımına neden olurken diasilgliserol, kinaz- C'yi aktive eder ve bu reseptörlerin uyarılmasıyla vasküler ve diğer düz kaslarda kasılma meydana gelir.

α_2 reseptörler ilk olarak presinaptik sinir uçlarında saptanmış, daha sonra adipoz dokuda, düz kaslarda ve trombositlerde de olduğu gösterilmiştir. α_2 reseptörlerin uyarılması noradrenalin salınımını inhibe eder. Adenilil siklaz inhibisyonu sonucu cAMP meydana gelmez.

β -adrenoreseptörler myokard, düz kas, karaciğer ve birçok doku hücresinde membrandaki adenilil siklaz ile kenetlenir. Bu kenetlenmeyi stimülatör düzenleyici G-protein (Gs) sağlar ve ardından cAMP ile aktive edilen protein kinaz-A ile bir dizi fosforilasyon reaksiyonu gerçekleşir. β_2 , β_3 reseptörler adenilil siklazla Gi üzerinden kenetlendikleri zaman bu reaksiyon enzim inhibisyonu ile sonuçlanır. β_1 reseptörlerin doğrudan kalp üzerinde hızının ve kasılma gücünün artırılması gibi etkileri bulunur. β_2 reseptörler bronş, damar, uterus, barsak ve diğer düz kasların gevşemesinde rol oynar. β_3 reseptörler bazal metabolizmanın hızlanmasına ve enerji tüketiminin artmasına neden olur. Ayrıca lipolizis, ileum ve kolonun gevşemesinde de rol oynar. Adrenerjik reseptörlerin β_4 alt tipi myokard ve sinoatriyal düğümde tespit edilmiştir ve adenilil siklazı stimüle ederek pozitif inotrop ve kronotrop etkiye aracılık ederler^{93,94}.

2.4.1. Adrenerjik Reseptör Agonistleri

Adrenerjik reseptörlerin doğal agonistleri katekolamin grubu içinde yer alan noradrenalin ve noradrenalinden sentezlenen adrenalindir. Noradrenalinin eliminasyonu membranda bulunan transportör aracılığıyla sinir ucu tarafından geri alınması ve enzimatik parçalanma ile olur. Enzimatik parçalanmada monoamin oksidaz (MAO) ve katekol-O-metil transferaz (KOMT) rol alır. MAO, noradrenalinin adrenerjik sinir uçlarında yıkılmasında, KOMT ise efektör hücrelerde, ekstraselüler sıvıda ve adrenal meduladan salınan katekolaminler ve ayrıca ilaç olarak verilen katekolaminlerin

yıkılmasından sorumludur. Doğal katekolaminlerin enzimatik parçalanması ile ortaya çıkan metabolit vanilmandelik asit (VMA) ya da 3-metoksi-4-hidroksifenilglükol (MOPG) dür. Bu metabolitler karaciğerde glükuronat ve eterik sülfat türevlerine dönüştürülerek idrarla atılırlar.

Dopamin en basit yapılı katekolamindir ve yüksek dozlarda β_1 reseptörler üzerine etki gösterir. Yüksek dozda adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin salınmasına neden olarak α reseptörlerin aktivasyonuna, dolayısıyla vazokonstriksiyona neden olur. Dopamin çoğunlukla miyokard infarktüsü ve kalp cerrahisi sırasında meydana gelen kardiyojenik şok ve farklı olarak septik şokun tedavisinde kullanılır. İzoproterenol ve doputamin sentetik olarak elde edilen ve katekolamin grubu içerisinde yer alan agonistlerdir. İzoproterenol, β -adrenerjik reseptörler üzerine etkili en güçlü semptomimetik ilaçtır. Selektif olmayan şekilde reseptörlerle kenetlenmesi sonucunda güçlü vazodilatasyon ve bronkodilatasyona neden olur. β_1 ve β_2 -AR'leri eşit şekilde güçlü aktive eder ve özellikle çizgili kas ve splanknik bölgenin damarlarında belirgin vazodilatör etki gösterir. Doputamin selektif olarak β_1 -AR'leri etkileyerek pozitif inotrop etkiye neden olur. Konjestif kalp yetmezliğinin ilerleyen dönemlerinde myokarda β reseptör yoğunluğu azaldığında α reseptörler üzerinden de inotrop etki gösterebilir, böylece etkisini koruyarak tolerans gelişmesine engel olur.

Katekolamin grubunda bulunmayan, α ve β -AR'lere kenetlenerek semptomimetik etki gösteren bazı amin yapılı bileşiklerde bulunmaktadır. Bu bileşiklerden alfa-mimetik ilaç olarak kullanılanlardan bir kısmı ve beta-mimetik olanların tamamı etkilerini efektör hücrelerin adrenerjik reseptörlerini doğrudan uyararak oluştururlar. Efedrin α ve β reseptörleri nonselektif şekilde uyaran bitkisel bir alkaloiddir. Dolaylı olarak noradrenalin salınımını arttırarak etki gösterir. Vazokonstriktör etkisiyle diyastolik ve özellikle sistolik kan basıncını yükseltir. Fenilefrin yapıca adrenaline, etki yönünden noradrenaline benzer ve α_1 -AR'leri güçlü bir şekilde doğrudan etkiler. Vazokonstriktör etkisiyle damar direncinin artırır ve dolayısıyla kan basıncını yükseltir. Refleks etkiyle kalpte bradikardiye neden olur. Hipotansif durumlarda kullanılmaktadır. Metaraminol, noradrenaline benzer bir etki ile doğrudan vazokonstriksiyon yaparak damar direncini artırır ve kan basıncının artmasını sağlar. Myokard kontraktilesinde artış sağlar ve kalp atış hacmini yükseltir. Özellikle myokard infarktüsü gibi akut hipotansif durumlarda kullanılmaktadır. Metoksamin

adrenerjik sinir ucuna girmeden doğrudan etki gösteren selektif bir α -agonisttir. Fenilefrine göre daha uzun etki gösterir. Santral sinir sistemini etkilememesi nedeniyle anesteziye bağlı hipotansiyonun tedavisinde kullanılmaktadır.

İmidazolin türevleri α -AR'leri (özellikle de α_2 alt tiplerini) etkileyen agonist türevleri lokal dekonjestan olarak kullanılmaktadır. Nafazolin, tetrahidrazolin, ksilometazolin, oksimetazolin ve indanozolin bu grup ilaçlardır.

İlaç olarak kullanılan β -AR agonistlerinin bir kısmı bronş, damar, uterus ve diğer dokularda bulunan β_2 reseptörleri selektif şekilde etkilerler. Klinik kullanımlarına göre bronkodilatörler, vazodilatörler, tokolitikler, kardioselektif stimülanlar olarak sınıflandırılırlar. Bir kısmı birden fazla etki gösterebilir. Akut astma nöbetlerinin giderilmesi için daha çok inhaler olmak üzere farklı farmakolojik şekiller kullanılmaktadır. Formoterol, inhalasyon ile verildiğinde dokuda yıkımının daha yavaş olmasına bağlı olarak salmeterol kadar uzun etki gösterebilmektedir. Uterus düz kasında β_2 reseptörleri selektif şekilde uyararak uterusun gevşemesini sağlayarak fetüsün yeterli olgunluktan önce doğumunu durdurmak (tokolitik) amacıyla ritodrin hidroklorür kullanılmaktadır. Salbutamol, terbutalin ve fenoterol bronkodilatör olarak kullanılmalarının yanında tokolitik olarak da kullanılabilirler⁹³.

2.4.1.1. Adrenalin

Vücutta adrenal medullada sentez edilir ve oradan salgılanarak hormon görevi yapar. Alfa-mimetik ve beta-mimetik etki gösteren ilaçların prototipidir. Barsak çeperinde ve karaciğerde bulunan KOMT, MAO ve konjüge edici enzimler tarafından çabuk inaktive edildiği için ağız yolundan kullanılmaz. Adrenalin güçlü bir şekilde, α_1 ve α_2 -adrenerjik reseptörleri ayırım yapmaksızın aşağı yukarı eşit derecede etkiler. Damar düz kaslarında α - adrenerjik reseptörlerin adrenalin tarafından aktivasyonu diğer düz kaslı yapıların çoğunda olduğu gibi eksitasyona neden olur ve damarlar büzülür. Aynı hücrelerdeki β_2 -AR'lerin aktivasyonu ise damar-dışı düz kaslarda olduğu gibi gevşemeye yol açar ve vazodilatasyon oluşur. Adrenalin, bir bölgedeki damar yatağında α - veya β_2 - reseptörlerin egemen olmasına göre bazı damar yataklarında vazokonstriksiyon, bazılarında ise vazodilatasyon yapar. Cilt ve mukozanın rengi soluklaşır. Böbrek damar yatağı adrenalin'in büzücü etkisine karşı oldukça duyarlıdır. Bunun sonucu böbrek kan akımı belirgin bir şekilde azalır ve glomerüler filtrasyon hızı

hafif derecede düşer. Yeterli dozda verildiğinde adrenalin insanda renal kan akımını yarı yarıya azaltabilir. Renin salgılanmasını artırır; bu etki jukstaglomerüler aparatındaki hücrelerin β - reseptörlerinin aktivasyonuna bağlıdır. Özellikle çizgili kasların damar yataklarında bol bulunan β_2 - reseptörler adrenalinin etkisine çok duyarlıdır. Diğer damar yataklarını etkilemeyecek kadar ufak dozda iv. verilen adrenalin çizgili kaslarda vazodilatasyon yapar, kan akımını artırır ve sistemik kan basıncını düşürür. Koroner, serebral ve mezenterik damar yataklarında da kan akımını artırır. Serebral damarların düz kaslarında α -adrenerjik reseptörler seyrek; bu nedenle katekolaminler beyinde ancak zayıf bir vazokonstriksiyon yaparlar. Ekstremitelerde, cilt kan akımının azalmasına karşın, çizgili kaslarda vazodilatasyon nedeniyle kan akımı artar. Adrenalin ve diğer α -adrenoseptör agonisti ilaçlar damar endotel hücrelerinden nitrik oksit (NO, endotel –kaynaklı gevşetici faktör) salgılanmasını artırır; bu olay sözkonusu ilaçların vazokonstriktör etkilerini kısmen frenleyebilir. NO salınması α_2 - adrenoseptörler aracılığı ile olmaktadır; endotel hücrelerinde her ne kadar β -adrenoseptörlerde bulunursa da β -agonistlerin NO salınmasını etkilemedikleri sanılmaktadır⁹⁵.

2.4.2. Adrenerjik Reseptör Blokörleri

Adrenerjik reseptör blokörleri, adrenerjik sinir uçları ile efektör hücreler arasındaki nöroefektör kavşaklarda impuls iletimini sinir uçlarında ve efektör hücrelerde AR'leri etkileyerek durdururlar. Adrenoseptör blokörü ilaçlar (labetalol haricinde), her iki adrenoseptör tipine etki edebilen semptomimetik ilaçlardan farklı olarak ya α ya da β reseptörleri etkiler.

2.4.2.1. Alfa Adrenerjik Reseptör Blokörleri

Alfa adrenoseptör blokörleri ilk bulunan sempatolitik ilaçlardır ve kardiyovasküler etkileri oldukça yüksektir. Bunlar arasında haloalkilamin türevlerinin blokaja bağlı olmayan etkileri diğerlerinden daha azdır. Ergot (çavdar mahmuzu) alkaloidleri, α -AR üzerine doza, koşullara ve etki yerine göre parsiyel agonist veya tam antagonist etki gösterirler. Bu karmaşık etki serotonerjik ve dopaminerjik reseptörler üzerinde de görülür. Genellikle damarlarda küçük dozlarda α -AR'leri bloke eder. Bu durumda parsiyel agonist etki gösterse de blokör etkinlik hakim duruma geçer ve vazodilatasyon yapar. Ergot alkaloidleri migren nöbetlerinde analjezik ilaçlara yanıt

vermeyen olgularda tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Uterus düz kaslarını büzerek oksitosik etki gösterirler. Damar ve uterus dışında kalan düz kaslar üzerine etkileri zayıftır. Prazosin selektif olarak α_1 -AR'leri bloke eder ve α_2 reseptörleri etkilemediğinden sempatik sinir uyarımı yapmaz ve noradrenalin salınımını arttırmaz. Farmakolojik etki ve yapı yönünden alfuzosin, doksazosin, indoramin, tamsulosin ve terazosin prazosine benzerler fakat yarılanma süreleri daha uzundur. Prazosin, indoramin ve doksazosin hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliğinde, diğerleri ise sadece selim prostat hipertrofinde prostatın üretraya baskısını azaltmak için kullanılırlar. Labetalol α ve β reseptörleri bloke edebilmektedir. Feokromositomada ortaya çıkan hipertansiyonun tedavisinde diğer blokörlerden daha iyi sonuç vermektedir. Timoksamin, vazospastik damar hastalıklarında, yohimbin ise erektil impotense karşı kullanılmaktadır. Yohimbin ayrıca bazı serotonin reseptörlerini de bloke eder⁹³.

2.4.2.1.1. Fentolamin

Fentolamin nonselektif alfa-adrenerjik antagonist etkinliği olan bir sentetik imidazolindir. Oral uygulamayla "kimyasal sempatektomi" üretebilen ve koruyabilen, uzun etkili, adrenerjik, alfa-reseptör bloke edici bir ajandır. Adrenerjik alfa-antagonistleri, hipertansiyon, vazospazm, periferik vasküler hastalık, şok ve feokromasitoma tedavisinde kullanılır. Ayrıca Raynaud Hastalığı'nın vazospazmı ve öksürük, klonidin çekilme sendromu, iktidarsızlık ve periferik vasküler hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır⁹⁶.

2.4.2.2. Beta Adrenerjik Reseptör Blokörleri

Bu grupta bulunan ilaçlar beta adrenerjik reseptörleri geri dönüşlü şekilde bloke ederek kompetitif antagonizma yaparlar. Kalpte beta adrenerjik reseptörlerin yoğunluğu nedeniyle etkileri bu organda daha belirgindir. Kalpte negatif inotrop, negatif kronotrop ve negatif dromotrop etki şeklinde inhibitör etkiler gösterirler. Damarlarda α -AR'lerin de varlığından dolayı β -AR blokörleri vazokonstriktör etki yaparlar. Klinik amaçlı kullanılan β -AR blokörleri β_1 ve β_2 -AR'lere karşı yüksek afinite göstermesine rağmen β_3 ve β_4 -AR için afiniteleri genellikle düşüktür. Beta-AR blokörü ilaçların bir kısmı reseptörlere selektif olarak bağlanmazlar. Bir kısmı ise β_1 -AR üzerine β_2 -AR'lere göre

daha yüksek afinite ile bağlanırlar. Bu ilaçlar genel olarak kardiy selektif ilaçlar olarak da adlandırılır.

Beta-AR blokörlerin bir kısmı lipofilik bir kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Hidrofilik olanların yarılanma ömürleri daha uzundur ve kan beyin bariyerini daha az geçebildiklerinden SSS ile ilgili yan etkileri daha azdır. Propranolol'un ilk prototipini oluşturduğu selektif olmayan (birinci kuşak) β -AR blokörlerinin örnekleri arasında nadolol, oksprenolol, pindolol, tertatolol, timolol, sotalol ve labetalol bulunmaktadır. Kardiyoselektif β -AR blokörleri β_1 'lere, β_2 -AR'lere göre daha yüksek afinite gösterirler. Atenolol, metaprolol, asebutolol, bisoprolol, nebivolol ve esmolol bu grupta yer alan ilaçlardır. Yukarıda sözü edilen β -AR blokörleri dışında ilave etkiler (hibrit) gösteren β -AR blokörleri mevcuttur. Bu grupta bulunan ilaçlar β -AR blokajı ile birlikte ek özellikler de gösterirler. Bu grupta bulunan seliprolol selektif β_1 -AR blokörü olmasının yanında parsiyel β_2 -AR agonisti ve α_2 -AR blokör etkisi gösterir. Etki olarak damar rezistansında artma yerine azalma yapar. Karvedilol, α_1 -AR blokörü ve hafif kalsiyum kanal blokörü özelliği gösterir. Tertatolol'un renal vazodilatör etkinliği vardır. Nebivolol damar endotelinde NO sentezini uyarır ve vazodilatör etkinlik gösterir⁹⁷.

2.4.2.2.1. Propranolol

Propranolol selektif olmayan blokörlerin ilk prototipini oluşturur. 1960'ların ortalarında stabil anjınının tedavisi için kullanılmaya başlanan bu ilaç günümüzde kullanımı yaygındır. Kalp-damar sisteminde etkisi, ilacın verilmeden önce kalp üzerinde varolan sempatoadrenal tonusun derecesi ile orantılıdır. Egzersiz ve heyecan gibi tonusun arttığı stres durumlarında propranolol'un kardiyak etkileri daha belirgin duruma geçer. Kalbin kontraktilesini ve atış hızını azaltarak negatif inotropik ve negatif kronotropik etki yapar. Bazı damarlarda β_2 -AR'lerin blokajı sonucunda α -AR'ler aracılığıyla oluşan vazokonstriksiyon güçlenir ve total damar rezistansı artar. Fakat propranolol kalp debisini azalttığından dolayı kan basıncı artmaz ve hafifçe düşer. Kan akımını azaltıcı etkisi beyin damarları haricinde bütün damar yataklarında görülür.

Propranolol bronş ve bronşiyollerde bulunan β_2 -AR'leri bloke ederek bronkokonstriksiyon yapar ve hava akışına karşı direnci artırır. Bu etki astım ve KOAH olanlarda solunum kapasitesini ciddi şekilde azaltarak krize neden olabilir. Propranolol β_2 -AR blokajı ile diyabetli hastalarda hipogliseminin belirtilerini örtebilir ve hastanın

hipoglisemi komasına girmesine neden olabilir. Ayrıca yağ dokusunda lipositlerde β_1 ve β_2 -AR'lerin blokajı sonucunda sempatoadrenal tonusa bağlı olarak oluşan lipolizi inhibe eder. Bu durum kanda trigliserit ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein artışına ve yüksek yoğunluklu lipoprotein azalmasına neden olur. Bu etki ateroskleroz eğilimini arttırıcı özelliktedir. Propranolol renin salgılanmasında ve SSS de etki göstermektedir. Sempatik sinir sistemi kontrolünde renin salgılayan jukstaklomerüler aparatta bulunan β -AR'lerin blokajıyla salgıdaki artış inhibe olur. Lipofilik olması nedeniyle SSS'ne kolayca girerek uyuşukluk, bellekte bulanıklık, dezoriyantasyon, uykusuzluk ve yorgunluk gibi belirtilere neden olabilir^{93,94}. Propranolol ile yapılan bir çalışmada, blokörün kanser hücrelerine karşı antiproliferatif ve apoptotik etkileri olduğunu işaret etmektedir⁹⁸.

2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerde Reseptörler

MKH'lerde reseptörlerin tespitinde; agonist ve antagonistler kullanılarak yapılan yöntemler ile belirteçlerle işaretlenerek veya moleküler yöntemlerle gösterilmiş birçok reseptörün varlığı ortaya çıkarılmıştır. Kemik iliği içerisinde veya rejeneratif amaçlı olarak dokularda yerleşmelerinde (homing) bu hücrelerde bulunan kemokin reseptörleri (CXCR) aktif görev yaparlar. Yüksek oranda eksprese edilen CXCR4 ile birlikte MKH'lerde diğer kemokin reseptörleri de (CXCR ve CCR ailesi) bulunmaktadır^{99,100}.

MKH'lerde birçok sitokin ve büyüme faktörü reseptörleri bulunmaktadır. IL-1R, IL-3R, IL-4R gibi sitokin reseptörleri ve G-SCFR, TNFIR, TNF β IR, TGF β IIR, EGFR gibi büyüme faktörü reseptörleri bu hücrelerde gösterilmiştir⁵². Bu hücreler kemik iliğinde hücre dışı matriksin oluşumunda çok önemli rolü olan hiyalüronik asit ve osteopontin gibi ligandların bağlandığı CD44 reseptörünü de oldukça güçlü eksprese ederler¹⁰⁰. Fare kemik iliği MKH'leri ile yapılan bir çalışmada kardiomyositlere farklılaşma sonrasında hücrelerin kolinerjik sistemin M₁ ve M₂ reseptörlerini eksprese ettiği bildirilmiştir¹⁰¹.

RT-PCR yöntemi ile yapılan bir çalışmada insan MKH'lerde kolinerjik M₂ reseptörlerine ait mRNA ekspresyonları ve nikotinik reseptörlerin α_3 , α_5 , α_7 alt birimlerinin ekspresyonları tespit edilmiştir¹⁰².

2.5.1. Mezenkimal Kök Hücrelerde Adrenerjik Reseptörler

Çoğunlukla hayvan kaynaklı sınırlı sayıda birkaç çalışmada, MKH'lerin adrenerjik reseptörleri ekspresse ettiği, adrenerjik reseptör agonist veya antagonistlerinin bu hücrelerinin farklılaşmasını etkilediği bildirilmiştir^{103,104,105}. Sınırlı sayıda olan bu çalışmalarda MKH'lerin klinik kullanım amacıyla uygulanan üretim aşamalarında adrenerjik reseptörlerin varlığı ve değişiklikleri hakkında bilgi bulunmamaktadır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanı ve Barındırma Koşulları

Çalışmalarda deney hayvanı olarak, Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TIBDAM) temin edilen, 8 haftalıktan büyük, 25-30 gram ağırlıklarında Swiss albino türü erkek fareler kullanıldı. Deneylerde kullanılan fareler her kafeste 10 tane olacak şekilde yerleştirilerek, standart laboratuvar koşullarında ve TIBDAM yönergesinde belirlenen etik kurallara uygun olarak barındırıldı. Deneylere başlanmadan önce Ç.Ü. Deney havanları etik kurulundan onay alındı. Ç.Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Davranış Farmakolojisi Laboratuvarı'nda, farelere uygulanan cerrahi girişimler aseptik koşullarda gerçekleştirildi. Bu fareler, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, ses yalıtımlı, sıcaklık ve nemi sabit tutulan laboratuvarında, istedikleri kadar yiyebilip içecekleri yem ve su sağlanarak barındırıldı.

3.2. Fare MKH'lerin Elde Edilmesi

Hücre kültürü hazırlama çalışmaları Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D.'nda ClassII biyogüvenlik kabini (Biobase, BBS-H1300 model, China) içerisinde steril şartlar altında yapıldı. Kültür ortamında hücrelerin çoğalmasını sağlamak amacıyla inkübasyon işlemleri 37 °C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübatör (Nüve, EN 400 model, Türkiye) içerisinde yapıldı. Hücreler 2. Pasajdan sonra 3. Pasajda gruplara ayrıldı ve bu pasaja ait hücrelere ilgili reseptör uyarım ve blokaj işlemleri uygulandı. Tripsinizasyon ile elde edilen bu hücrelerin belirli bir kısmı nöronal faktörlerin tespiti için kullanılırken, belirli kısmı ise gruplarına göre farelerin soleus kaslarına enjekte edildi. Ayrıca mezenkimal kök hücre tanımlaması için adipojenik ve osteojenik farklılaşma yapıldı.

3.2.1. Fare Kemik İliğinden MKH Üretilmesi

Bu amaçla üç adet fare sakrifiye edilerek femur ve tibia kemikleri çıkarıldı. Fare femur ve tibiasından alınan kemik iliği, ficoll kullanılarak 400 g hızda 30 dakika santrifüj edildi. Mononükleer hücreler alındıktan sonra yıkamak amacıyla bir defa %2 FBS (fetal bovin serum) içeren PBS (phosphat buffer saline) ile süspanse edilerek 400 g hızda 10 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası süpernatant atılarak hücreler 2

ml MKH kültürüne özgü besiyeri MesenCult™ Expansion Kit (Mouse) ile süspanse edildi. Hücre sayım kamarasında (Thoma lamı) hücre sayımı ve Trypan blue ile canlılık testi yapıldı. Bu aşamadan sonra her bir T25 flask içerisinde 1 milyon / ml hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Flaskların besiyeri içeriği 72 saatte bir değiştirilerek 14. günde tripsinizasyon ile birinci pasaja geçildi. Ortalama 7 gün sürecek ikinci pasajdan sonra, üçüncü pasajda tripsinizasyon öncesinde hücreler 1 µM adrenalin ile birlikte kültürde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Birinci ilaçlı grup olarak 1 µM adrenalinli grup oluşturuldu. İkinci ve üçüncü oluşturulacak gruplara ise adrenalin ile 1 µM propranolol ve 1 µM fentolamin ilave edilerek birlikte kültürde inkübasyona bırakıldı ve elde edilen hücreler $5 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$ dozunda enjeksiyonla farelere soleus kas içerisine uygulandı. MKH'ler, kontrol grubu, sham ve nöropati grubu dışında kalan diğer fare gruplarına (nöropati + MKH, nöropati + adrenalinle uyarılan MKH, nöropati + adrenalin + propranololla uyarılan MKH, nöropati + adrenalin + fentolaminle uyarılan MKH grubu) uygulandı. Lokal uygulama yapılacak grupta her bir fare için 100 µl izotonik solüsyon içerisinde 5×10^5 uyarılmış MKH olacak şekilde sağ bacak siyatik sinir etrafındaki kas dokusuna enjekte edildi.

3.2.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (Dil; İnvitrogen, USA) ile İşaretlenmesi

Bu çalışma transplantasyonda kullanılan hücrelerin verildikleri dokularda yerleşimlerinin tespiti amacıyla yapıldı. Bu amaçla üçüncü pasaj sonrasında tripsinizasyon ile elde edilen hücreler mililitrede 1×10^6 hücre olacak şekilde serum içermeyen medyum ile süspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonunun içerisine mililitre başına 5µl Vybrant Dil Cell-Labeling Solution (İnvitrogen, USA) eklendi ve hafifçe pipetaj ile karıştırıldı. 20 dakika 37 °C inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda yıkama amacıyla 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak serum fizyolojik eklendi ve tekrar süspansiyon haline getirildi. Bu yıkama işlemi iki defa daha yapılarak son aşamada süpernatant alındı ve 5 ml serum fizyolojik ile süspanse edildi. Hücre sayımı ve canlılık testleri tekrar yapılarak mililitrede 5×10^6 canlı hücre olacak şekilde süspansiyona serum fizyolojik eklendi. Her bir hayvan için 100 µl hacimde (toplam 500.000 hücre) süspansiyon enjeksiyonla hasarlı siyatik sinir çevresine verildi¹⁰⁶.

3.2.1.2. Akan Hücre Ölçer ile MKH Analizi

Transplantasyonda kullanılacak MKH'ler üçüncü pasajda tripsinizasyon ile elde edildi ve akan hücre ölçer Beckman Coulter, Cytoflex Cytometry cihazı (USA) ile MKH hücre yüzey belirteçleri açısından analiz edildi. Üçüncü pasajdan alınan toplam 1×10^6 hücre içeren süspansiyon PBS eklenerek bir kez 300g'de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre sayısı 5000 hücre/ μ l (toplam 200 μ l) olacak şekilde PBS ile resüspanse edildi. 12x75 mm'lik bir tüp alınarak içerisine farelere özgü CD105 PE (10 μ l), CD34 PE-Cy7 (10 μ l), CD73 Alexafluor (10 μ l) ve CD45 FITC (10 μ l) (Becton Dickinson, USA) monoklonal antikorlar ilave edildi. 12x75 mm'lik tüplere monoklonal antikorlar eklendikten sonra, üzerine PBS ile hücre sayısı 5000 Hücre/ μ l olarak ayarlanmış hücre süspansiyonundan 100 μ l ilave edildi. 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda tüp içerisine 1 ml izotonik sıvı ilave edildi. Tüp, cihaza yerleştirilerek toplam 1×10^5 hücre okutuldu ve antikorla işaretlenmiş hücreler tespit edildi. Bu işlem üretilen hücrelerin hematopoietik belirteçler açısından negatif, adezyon belirteçleri açısından pozitif olduğunu göstermek ve kullanılan hücrelerin mezenkimal hücre olduğunu teyit etmek amacıyla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.2.1.3. MKH'lerin Farklılaştırılması

Deneyler için MKH kültür örneğinden P3'te tripsinizasyonla elde edilen hücreler ile T25 flasklara 2×10^4 hücre/mL konsantrasyonda canlı hücre ile 5 ml hacimde ekim yapıldı. Kültürler standart proliferasyon besiyeri ile beslenerek, hücrelerin çoğalarak flask tabanlarını %80-90 oranda kaplaması beklendi. Bu aşamadan sonra kültürler iki hafta boyunca farklılaşma besi yerleri ile 3 günde bir beslendi.

Osteojenik farklılaşma için MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Kit (Mouse), (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) kullanıldı. Osteojenik farklılaşmış hücrelerde oluşan kalsiyum depozitleri Alizarin Red S (Sigma, USA) ile boyanarak daha görünür hale getirildi.

Adipojenik farklılaşma için MesenCult™ MSC Basal Medium (Mouse) ve MesenCult™ Adipogenic Stimulatory Supplement (Mouse) , (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) kullanıldı. Adipojenik farklılaşmanın mikroskopik olarak daha görünür olması için hücreler Oil Red O (Sigma, USA) boyası ile boyanarak, lipid

damlacıklarının kırmızı boyanması sağlandı. Bu çalışma hücrelerin farklılaşabilme özelliğini tespit etmek için planlandı.

3.3. Adrenalin, Propranolol ve Fentolamin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Agonist (adrenalin) ve antagonistler (propranolol ve fentolamin) 40 µM konsantrasyonda 10 ml stok olarak hazırlandı. Sterilizasyon için 0,2 µm selüloz asetat filtreden geçirildi. Uygulama için bu stoklar besiyeri ile dilüe edilerek 1 µM konsantrasyonda besiyeri elde edildi. Adrenalin, propranolol hidroklorid ve fentolamin hidroklorid (Sigma-Aldrich) stok olarak hazırlandı.

3.4. Agonist ve Antagonist ile Uyarılan MKH'lerde Nöronal Hücre Belirteç Ekspresyonlarının RT-qPCR ile Analizi

Hücrelerde bulunan nöronal hücre belirteçleri olan Nestin, NGF, Tubb3 mRNA ekspresyonlarında gruplar arasında değişiklikleri saptamak amacıyla özgül mRNA gen bölgesini temsil eden primerler kullanılarak RT-qPCR yapıldı. Bu amaçla aşağıdaki basamaklar uygulandı.

3.4.1. Hücrelerden RNA elde edilmesi

Hücrelerden RNA elde etmek amacıyla High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Germany) kullanıldı. Kültür ortamından alınan hücreler 300 g' de 5 dk santrifüj edildi ve üzerlerindeki süpernatant dökülerek, hücrelerin üzerine PBS eklendi. Saf olarak elde edilen hücrelerin üzerlerine 400 uL binding buffer eklendi. RNA izolasyonu için hücrelerin üzerlerine 200 uL soğuk PBS eklendi ve kısa bir santrifüj sonrasında süspansiyon filtreli tüplere aktarıldı. 8000 g' de 1 dk santrifüj sonunda filtrenin alt kısmındaki süpernatant dökülerek atıldı. Üzerine DNAaz karışımı (90uL DNAaz inkübasyon buffer + 10 uL DNAaz) eklendi. 15 dk oda ısısında bekletilen örneklerin üzerine üzerine 500 uL buffer AV1 eklendi. Tekrar 8000 g' de 1 dk santrifüj edildikten sonra filtrenin alt kısmındaki süpernatant döküldü ve örnekler üzerine 500 uL buffer AV2 eklendi. Üçüncü defa 8000 g' de 1 dk santrifüj edildi ve yine süpernatant döküldü. Üzerine 200 uL buffer AV2 eklendi. Son defa 8000 g' de 1 dk santrifüj edildi, filtrenin alt kısmındaki süpernatant döküldü. Bu aşamadan sonra 13000 g' de 1 dk boş olarak santrifüj edildi ve filtrenin alt kısmındaki süpernatant döküldü. Tüpler daha önceden

etiketlendirilmiş 1,5 mL eppendorflara konuldu, üzerlerine 50 ul elution buffer eklendi ve 1 dk bekletildi. 8000 g' de 1 dk santrifüj edildikten sonra eppendorf içerisinde RNA çöküntüsü kontrol edildi. RNA çöküntüsü varsa filtre atıldı. RNA Konsantrasyon ölçümü Nanodrop (Thermo Scientific, USA) cihazı ile yapıldı. Cihaza kör (blank) olarak elution buffer okutuldu. Ardından her örnek için ayrı ayrı ölçüm yapılarak konsantrasyon kaydedildi. Son işlem olarak tekrar kör okutularak cihaz kapatıldı. Elde edilen RNA örnekleri, konsantrasyonlarının ölçülmesinin ardından cDNA eldesi için kullanıldı.

3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA örneklerinin konsantrasyonları, cDNA sentezi için kullanılacak miktarlarının hesaplanması için kullanıldı. Kullanılacak miktarlar 1000 sayısının konsantrasyon oranına bölünmesi ile hesaplandı. Sonuç 10 ve üstü ise 10 µL örnek kullanıldı. Sonuç daha az ise miktar H₂O ile 10 µL'ye tamamlandı.

Elde edilen RNA örneklerinin cDNA'larını sentezlemek amacıyla İpsogen RT Kit CE (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı. Kit içeriği ve kullanımı aşağıda çizelge 2'de verilmiştir. Kit içeriği (RNase İnhibitör ve Reverse Transcriptase dışında) buz üzerinde çözüldü. Hafifçe vortekslenip kısaca santrifüj edildi. RNase İnhibitör ve Reverse Transcriptase, kullanılacağı zaman buz üzerine çıkartıldı. RNA örnekleri 65°C de 5 dakika inkübasyondan sonra hemen buz üzerine alındı. Miks RNA örnekleri 15 µl üzerine dağıtıldı ve H₂O ile toplam hacim 25 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan RNA örneklerinden aşağıdaki döngülere göre programlanan termal döngü (Palm Cycler, İndia) cihazında komplementer DNA elde edildi.

- Reverse transcription1 25°C, 10 dk
- Reverse transcription2 50°C, 60 dk
- İnaktivasyon 85°C, 5 dk
- Soğutma 4°C, 5 dk

İşlem bitiminde sentezlenen cDNA' lar - 20°C' de saklandı. Daha sonra cDNA'lar reseptör mRNA'larının ekspresyon değişimlerini göstermek amacıyla RT-qPCR ile amplifikasyonda kullanıldı.

Çizelge 2. cDNA sentezi için kullanılan solüsyon (İpsogen RT Kit) ve RNA miktarı tablosu.

Materyal	Miktar (μ l)
5X Buffer/ Tampon	5
dNTP	2
Random Primer	5,25
RNase İnhibitör	0,5
Reverse Transcriptase	1
DTT	1,25
Toplam	15
RNA	1 μ g

3.4.3. RT-qPCR ile Amplifikasyon

Nestin, NGF, Tubb3 mRNA ekspresyon analizleri için kullanılan primerlerin gen bölgelerinin uluslararası gen kodları aşağıda çizelge 3'de verilmiştir. Bu miks primerlerin her biri, araştırılması planlanan grupların elde edilen cDNA ları ile hazırlanarak çizelge 4'de verilen amplifikasyon döngüsüne göre Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) cihazında amplifiye edildi. Cihazda amplifiye cDNA ile döngülere göre doğru orantılı artan florokrom prob Sybr Green'in ifadeleri (CT) yazılım programı tarafından saptandı ve threshold olarak da yansıtıldı. Böylece görüntülenen ekspresyon oranları gerçek zamanlı olarak saptandı.

Çizelge 3. Kullanılan miks primerleri ve gen kodları.

Primer (Qiagen,Germany)		UniGene Kod
Nes	Nestin	Mm.331129
NGF	Nerve Growth Factor	Mm.1259
Tubb3	Beta Tubulin 3	Mm.40068
β-Actin (Housekeeping)	Actin, beta	Mm.391967

Çizelge 4. RT-qPCR Amplifikasyon Döngüsü.

Döngü sayısı	Süre	Sıcaklık	Döngü Nedeni
1	10 dakika	95 °C	Taq polimerazın sıcaklıkla aktivasyonu
40	15 saniye	95 °C	Saptanan florokrom prob Sybr Green
	30 saniye	60 °C	verilerinin toplanması

3.4.4. İstatistik Analiz ve Fold Change Hesaplamaları

Threshold cycle (CT) değerlerinin referans gen (housekeeping gen, HKG) β -Actine göre normalizasyonu ve fold change (katlı değişim) hesaplamaları için aşağıdaki formül örneğinden yararlanıldı. Çalışmamızda, buradan elde edilen CT değerleri, One Way ANOVA ve post - hoc test Bonferroni yöntemi ile istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistik analiz, kontrol dışında grupların kendi aralarında anlamlılık farklarını belirlemek için de kullanıldı.

$$\Delta CT(\text{kontrol}) = CT(\text{kontrol}) - CT(\text{HKG-kontrol})$$

$$\Delta CT(\text{deney grubu}) = CT(\text{deney grubu}) - CT(\text{HKG-deney grubu})$$

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT(\text{deney grubu}) - \Delta CT(\text{kontrol})$$

$$\text{Fold Change} = 2^{(-\Delta \Delta CT)}$$

3.5. Deney Grupları ve Uygulama Sıraları

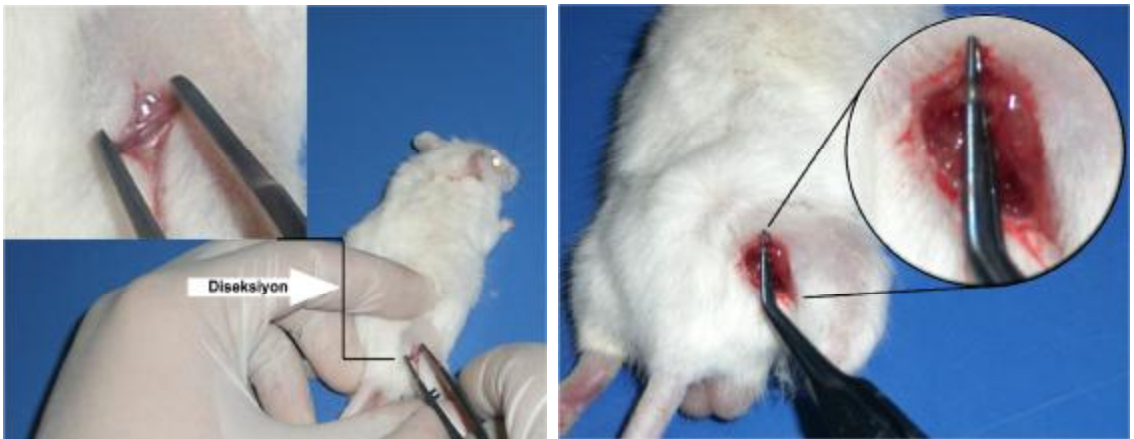
Deney Grupları: Fareler deney protokolüne göre 7 gruba ayrıldı.

- 1- Sağlıklı Kontrol (naive):** Hiçbir cerrahi işlem uygulanmamış ve ilaç almamış hayvanlar ve hiçbir manüplasyona maruz kalmamış grup.
- 2- Sham:** Siyatik sinir ligasyonu yapmadan cilt, ciltaltı kesi uygulanıp sütüre edilmiş grup.
- 3- Nöropati:** Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulmuş grup.
- 4- Nöropati + Mezenkimal Kök Hücre Grubu:** Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulmuş ve cerrahi işlemden 24 saat sonra lezyonlu siyatik sinir etrafında kas içine mezenkimal hücre transplantasyonu yapılmış grup.
- 5- Nöropati + Adrenalinle Uyarılmış Mezenkimal Kök Hücre Grubu:** Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulmuş ve cerrahi işlemden 24 saat sonra siyatik sinir etrafında kas içine, adrenalinle uyarılmış mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapılmış grup.

- 6- Nöropati + Adrenalin + Propranolol ile Uyarılmış Mezenkimal Kök Hücre Grubu:** Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulmuş ve cerrahi işlemden 24 saat sonra siyatik sinir etrafında kas içine, adrenalin+propranolol ile uyarılmış mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapılmış grup.
- 7- Nöropati + Adrenalin + Fentolamin ile Uyarılmış Mezenkimal Kök Hücre Grubu:** Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulmuş ve cerrahi işlemden 24 saat sonra siyatik sinir etrafında kas içine, adrenalin+fentolamin ile uyarılmış mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapılmış grup.

3.6. Cerrahi Operasyon

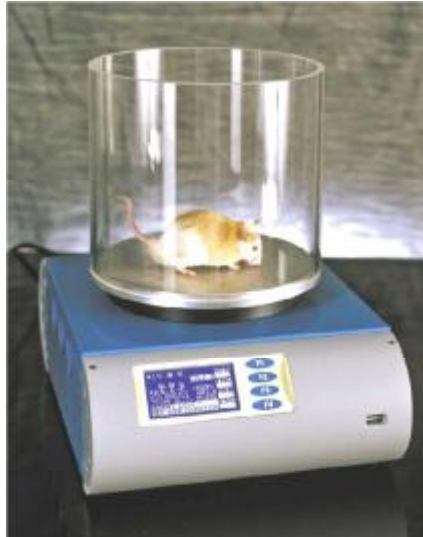
Farelerde nöropatik ağrı oluşturmak için siyatik sinir parsiyel sıkı ligasyonu (PSL) modeli kullanıldı. Siyatik sinir bağlama işlemi öncesinde anestezi için Ketamin (80 mg/kg) + Xylazine (10 mg/kg) intraperitoneal injeksiyon yapıldı. Anestezi altına alınan deney hayvanları aseptik şartlar altında fare sağ bacak siyatik sinirine ulaşabilmek için biceps femorise yaklaşık 1cm'lik (siyatik sinirin arka kısmının 1/2 ila 1/3 kısmı) bir kesi uygulanıp kas diseksiyonu yapıldıktan sonra siyatik sinir uyluk düzeyinde ortaya çıkarıldı (Şekil 2). Bu işlemden sonra siyatik sinir altındaki dokulardan temizlenip eğimli pens ile vücut dışına esnetilerek 8.0 emilmeyen iplik ile modele uygun düğüm atıldıktan sonra açılan kesi 4.0 ipek iplik ile kapatıldı¹⁰⁷.



Şekil 2. Kas diseksiyonu ve siyatiksinirin ortaya çıkarılması.

3.7. Cold Plate Testi

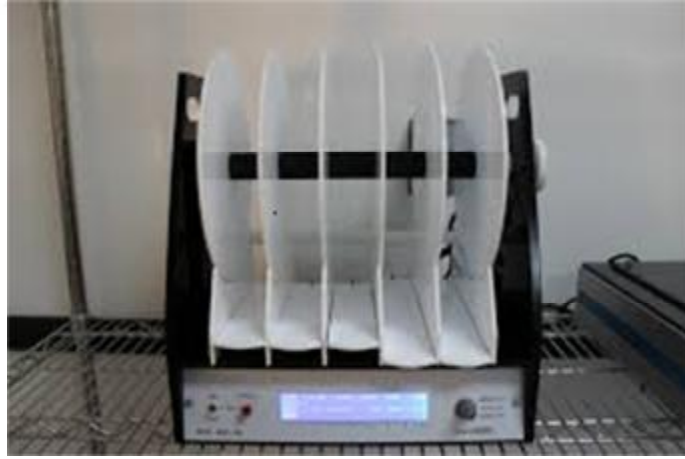
Allodini nöropatik ağrının en önemli bulgularındandır. Normalde ağrılı olmayan bir stimulusa karşı verilen ağrı yanıtı olarak tanımlayabileceğimiz allodiniyi değerlendirmek için termal veya mekanik uyarılar kullanılabilir. Bunlardan en fazla kullanılanı hayvana soğuk uyarın uygulanması sonucu hayvanın reaksiyonunu ölçmektir¹⁰⁸. Çalışmamızda farelerde oluşan mononöropatiye bağlı olarak oluşan kronik ağrıyı değerlendirmek için soğuk allodini testi, bunun için de cold plate cihazı kullanıldı (Ugo Basile, Cold Plate 35100, İtaly). Cold Plate cihazı, etrafı şeffaf silindir plastik camla deney hayvanının ortamdaki uzaklaşmasına izin vermeyecek şekilde düzenlenmiş ve +5 °C sıcaklıkta sabitlenebilen dairesel metal plakadan oluşmaktadır (Şekil 3). Cihaza bağlı pedal ile kontrol edilen otomatik zaman sayacı, plaka üzerine bırakılan deney hayvanının belirli davranışlarından birini sergileyene kadar geçen süreyi belirlemektedir. Gözlemsel olarak bu süreyi belirlemede kullanılan davranışlarından birisi mononöropati oluşturulmuş pençenin sallanması veya arka pençeleri üzerinde ayağa kalkmasıdır. Diğer bir hareket ise yine arka pençeleri üzerinde kalkıp silindir cama ön pençelerini dayayarak durmasıdır^{108,109}. Çalışmamızda, bahsedilen bu davranışlardan herhangi birini sergileyene kadar geçen süre saniye (sn) cinsinden belirtilmiş ve cold plate latensi olarak (CPL) tanımlanmıştır. Her fare bir uygulamada kullanıldı.



Şekil 3. Cold plate cihazı.

3.8. Rotarod Testi

Rotarod testi; performansı, direnme gücünü, denge ve koordineli hareketleri değerlendirmede kullanılan bir yöntemdir¹¹⁰. Test'in esası; sabit hızda dönen bir çubuk üzerinde, deney hayvanının düşmeden kalış süresinin ölçülmesidir. Test düzeneği kabaca 4 veya daha fazla bölmeyle birbirinden ayrılmış en az 5 cm çapında bir çubuk, bu çubuğun hızını ayarlayan elektrikle çalışan bir motor sistemi ve çubuğun altına yerleştirilmiş olan bir ızgaradan oluşmaktadır. Her bir disk dijital saate sahiptir. Bu saat; saat, dakika, saniye ve salise düzeyinde süreyi ölçebilmektedir. Dijital saat, deney hayvanı cihazdan düştüğü an, otomatik olarak duracak şekildedir. Disklerin hızı: 16, 20, 24, 28 ve 32 tur/dk olacak şekilde ayarlanabilir özelliindedir (Şekil 4). Çalışmamızda denekler dakikada, 32 tur/dk olacak şekilde dönen platformun üstüne yerleştirildi (Ugo Basile, Rotarod 7600, İtalya). Her hayvan için cut-off süresi 120 sn olarak belirlendi. Ölçüm sonucunda, platform üstünde dönen hayvanın spontan aktivitesindeki değişiklikler ve motor koordinasyon hareketleri, yapılan tüm ölçümlerin ortalaması alınarak değerlendirildi. Test süresince deneklerin dönen çubuk üzerinde kalış süresi aletin otomatik sayacı ile saniye hassasiyetiyle kaydedildi¹¹¹.



Şekil 4. Rotarod Cihazı

3.9. Histopalojik İnceleme

3.9.1. Işık Mikroskopi Yöntemleri

Siyatik sinir ve kas örnekleri, %10 luk formalin içerisinde alınarak oda ısısında 48-72 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra formalini uzaklaştırmak için su ile yıkanır ve

Leica Ototeknikon (Germany) otomatik doku takip cihazı ile ışık mikroskobik doku takipleri yapıldı. Parafin içerisinde gömülerek bloklandı. Daha sonra bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin ile boyandı.

3.9.2. Elektron Mikroskopi Yöntemleri

Siyatik sinir %5 lik gluteraldehit solüsyonuna alındı. 1 saat bekletildikten sonra dişçi mumuyla kaplı petri üzerinde 1 mm³ lük parçalara ayrıldı. Dokular gluteraldehit solüsyonunda 3 saat daha tespit edildi. Millonig fosfat tamponunda iki kere 10'ar dk yıkanarak %1 lik osmium tetraoksit solüsyonunda ikinci defa tespit edildi. Daha sonra dokular yine fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dk yıkanarak ve aşağıdaki sıraya göre dehidrate edildi.

- % 50 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 70 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 86 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 96 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika

- % 100 Etil alkolde 15 dakika (oda ısısı)
- Propilen oksitte 15 dakika (oda ısısı)
- Propilen oksitte 15 dakika (oda ısısı)

Propilen oksit + gömme materyali 30 dakika

Propilen oksit + gömme materyali 30 dakika

Daha sonra dokular gömme materyali (rezin) bulunan tüplere alındı ve bir gece rotatorda döndürüldü.

Gömme Materyali:

· Araldit	CY 212	20 ml
· Sertleştirici	HY 964	20 ml
· Hızlandırıcı	DY 064	0.6 ml
· Plastikleştirici – Dibütil Fitalat		1 ml

Ertesi gün doku parçaları 00 polietilen kapsüllere gömülerek ve 60° C etüvde 48 saat süre bekletildi. Etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı ve bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile 50 nm kalınlığında kesitler alınır. Kesitler bakır gridlere alınarak ve uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler, JEOL JEM 1400 transmisyon elektron mikroskobu (Japan) ile incelenerek ve dijital resimleri elde edildi.

Bütün bulgular Graphpad Prisma istatikselsel analiz yöntemiyle One-way Anova ve student-t test ile değerlendirildi.

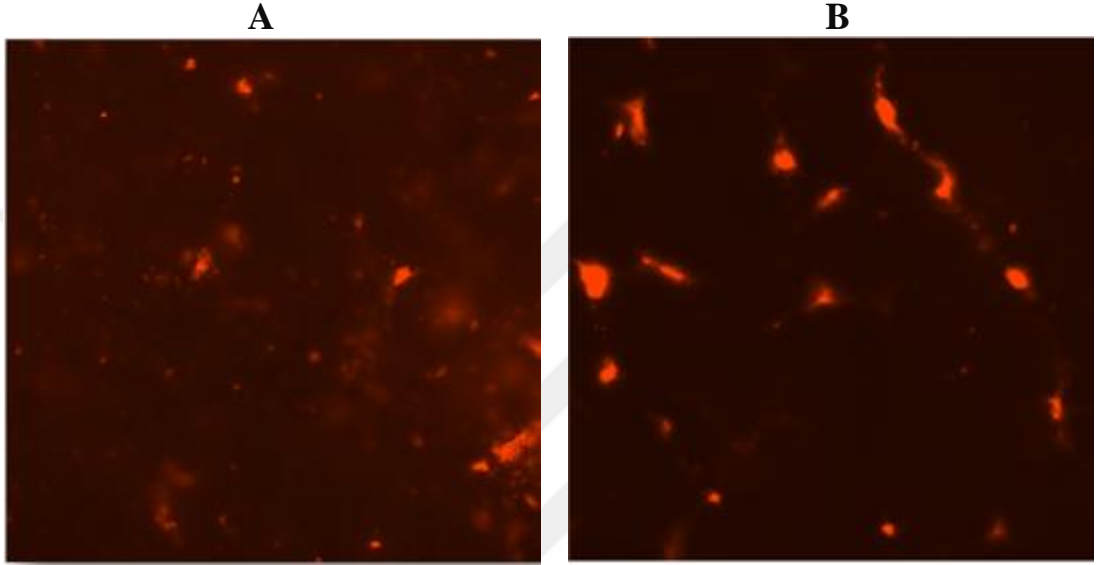
3.9.3. Histomorfometri Yöntemleri

Elektron mikroskobik doku takip yöntemi ile hazırlanan siyatik sinir doku bloklarından, ince kesitlerin hazırlanmasından önce, 1µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Kesitler toluidin mavisi ile boyandı ve Olympus BX53 (Tokyo-Japonya) ışık mikroskobunda incelendi. Mikroskoba bağlı Cell Sense Standard software analiz programı kullanılarak, ortalama miyelinli sinir liflerinin sayıları ve akson çapları ölçüldü.

4. BULGULAR

4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Dil ile İşaretlenmesi

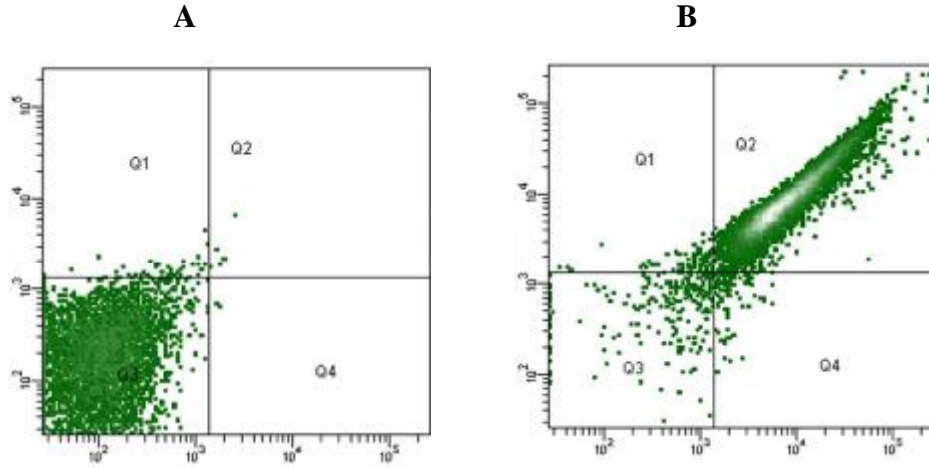
Soleus kasından doku kesitleri alınarak floresan mikroskopisi ile incelendi. Vybrant Dil ile boyalı MKH'lerin hasarlı doku içerisine yerleştiği gösterildi.



Şekil 5. A. Sinir dokusu içerisine yerleşen Vybrant Dil ile işaretli MKH'ler. B. Soleus kas dokusu içerisine yerleşen Vybrant Dil ile işaretli MKH'ler. X40

4.2. MKH Örneklerinin Akan Hücre Ölçer ile Yüzey Belirteçleri Analiz Ölçümleri

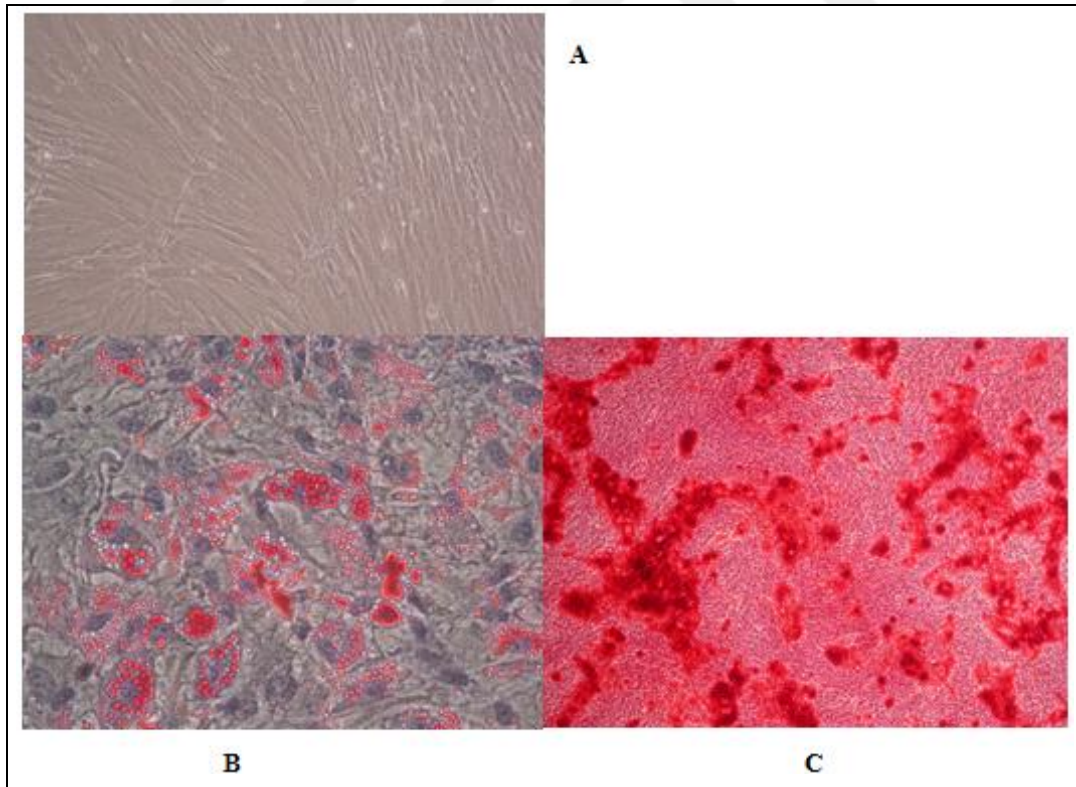
Çalışmada kullanılan örnekler üçüncü pasajda akan hücre ölçer ile MKH hücre yüzey belirteçleri açısından analiz edildi. Bu hücreler hematopoetik belirteçler olan CD34, CD45 yönünden negatif, MKH hücrelerinin tanımlanmasında kullanılan adezyon belirteçleri olan, CD73, CD105 yönünden pozitif olarak belirlendi (Şekil 6).



Şekil 6. Akan Hücre ölçer. **A.** CD45 / CD34 yönünden negatif. **B.** CD105 / CD73 yönünden pozitif.

4.3. MKH'lerin İn-Vitro Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşması

MKH'lerin mikroskopik incelemeleri sonucunda; normal MKH görüntüsü ile adipojenik (Oil Red O ile boyalı) ve osteojenik farklılaşma (Alizarin Red S ile boyalı) görüntüleri tespit edilmiştir (Şekil 7).



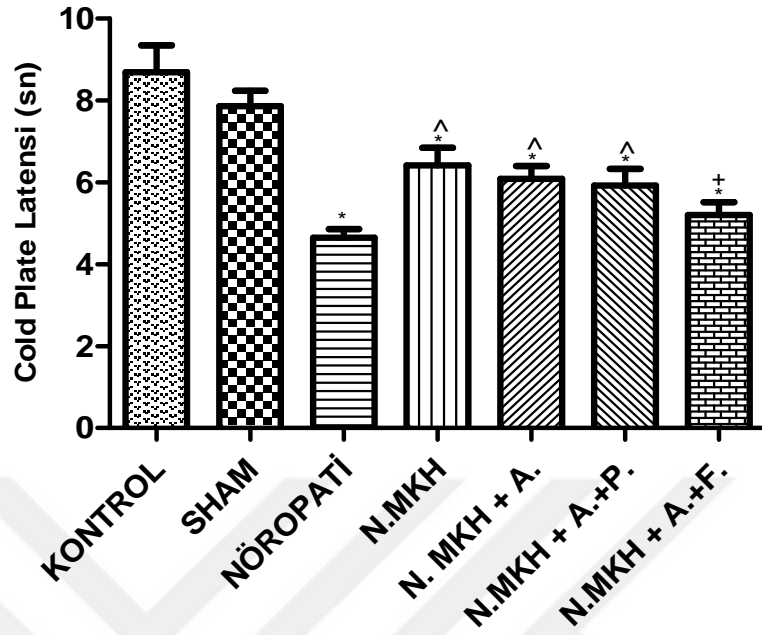
Şekil 7. MKH'lerin mikroskopik incelemeleri. **A:** Normal MKH, **B:** Adipojenik farklılaşmış hücreler. **C:** Osteojenik farklılaşmış hücreler.

4.4. Cold Plate Latensi (CPL)

Cerrahi operasyon ile siyatik sinir ligasyonu yapılan hayvanlar, dış görünüşleri ve kiloları açısından tüm deneyler boyunca takip edildi, gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (bulgular gösterilmedi). Grupların cold plate latensileri nöropati ve sham operasyonu yapıldıktan sonra 4, 6, 8 ve 10. haftalarda ölçüldü.

CPL testinin 4.hafta sonuçları; Kontrol grubunda (KG) $8,7\pm 2,05$, Sham grubunda $7,86\pm 1,18$, Nöropati grubunda (N) $4,65\pm 0,76$, Nöropati MKH (N.MKH) grubunda $6,42\pm 1,34$, Nöropati MKH + Adrenalin (N.MKH + A.) grubunda $6,09\pm 0,98$, Nöropati MKH + Adrenalin+ Propranolol (N.MKH + A.+P.) grubunda $5,93\pm 1,25$, Nöropati MKH + Adrenalin + Fentolamin (N.MKH +A.+F.) grubunda $4,75\pm 1,01$ olarak belirlendi. CPL değerlerinin kontrol ve sham grupları arasında anlamlı olarak fark bulunmaması, sham grubunda allodini oluşmadığını göstermektedir. Bu nedenle sonraki değerlendirmelerde karşılaştırma grubu olarak sadece kontrol grubu kullanılmıştır. Nöropati grubunda CPL değerlerinin, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı belirlendi. Bu bulgular deney gruplarındaki hayvanlarda cerrahi işlem sonrasında nöropati ve nöropatiye bağlı allodini geliştiğini ortaya koymaktadır. N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. uygulanan gruplarda CPL süresinin nöropati grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi. N.MKH +A.+F. grubu ise nöropati grubuyla karşılaştırıldığında CPL'nin değişimi anlamlı bulunmadı N.MKH + A.+F. grubunun CPL değerlerinin N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarına göre anlamlı olarak az olduğu tespit edildi (Şekil 8).

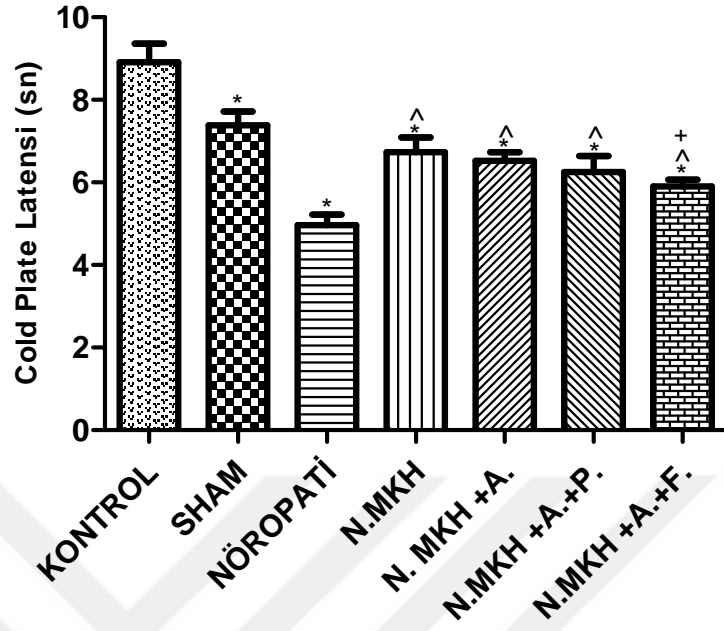
Cold Plate 4. Hafta



Şekil 8. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının Cold Plate Latensileri; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05).+ : N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarından anlamlı olarak farklı (p<0.05).

Tüm deney gruplarında 6.hafta CPL testiyle yapılan ölçüm sonuçları sırasıyla; Kontrol grubunda $8,91 \pm 1,42$, Sham grubunda $7,39 \pm 1,33$, Nöropati grubunda $4,97 \pm 0,78$, N.MKH grubunda $6,74 \pm 1,11$, N.MKH + A. grubunda $6,53 \pm 0,66$, N.MKH + A.+P. grubunda $6,25 \pm 1,25$, N.MKH + A.+F. grubunda $5,9 \pm 0,55$ olarak belirlendi. Kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda CPL'nin anlamlı bir düşüş gösterdiği gözlemlendi. N.MKH, N.MKH + A., N.MKH + A.+P. ve N.MKH + A.+F. gruplarında CPL değerlerinin nöropati grubuna göre anlamlı arttığı bulundu. N.MKH + A.+F. grubunun CPL değerlerinin N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarına göre anlamlı şekilde az olduğu tespit edildi (Şekil 9). Bu bulgu 6.hafta adrenalin+ fentolaminle indüklenmiş MKH'nin allodini üzerindeki etkisinin MKH'ye göre daha az olduğunu bize göstermektedir.

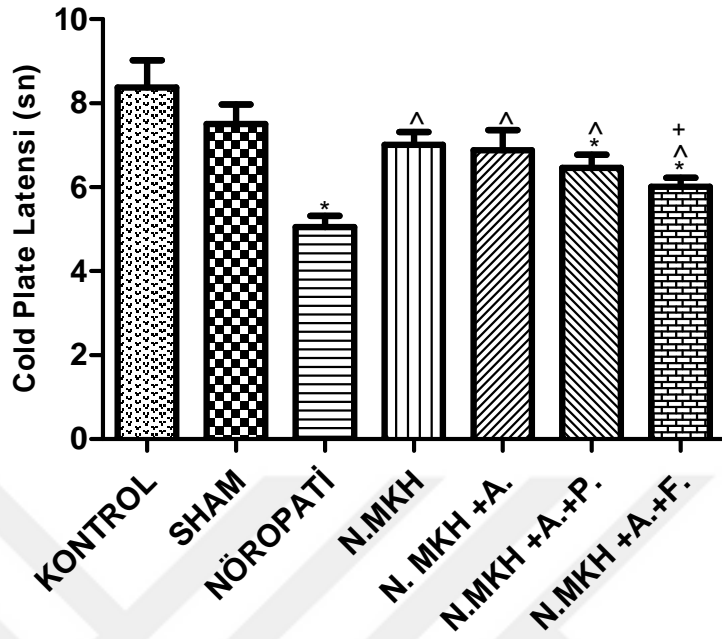
Cold Plate 6. Hafta



Şekil 9. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının Cold Plate Latensileri; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). +: N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarından anlamlı olarak farklı (p<0.05).

CPL testi 8.hafta sonuçlarına göre; Kontrol grubunda; $8,38 \pm 2,01$ iken, Sham grubunda $7,5 \pm 1,49$, Nöropati grubunda $5,05 \pm 0,85$, N.MKH grubunda $7,01 \pm 0,95$, N.MKH + A. grubunda $6,88 \pm 1,52$, N.MKH + A.+P. grubunda $6,46 \pm 0,97$, N.MKH + A.+F. grubunda $5,85 \pm 0,69$ olduğu belirlendi. Kontrol grubuna göre nöropati grubunda CPL'nin anlamlı bir azalma gösterdiği gözlemlendi. Nöropati grubuna göre; N.MKH, N.MKH + A., N.MKH +A.+P. ve N.MKH + A.+F. gruplarındaki CPL'de anlamlı artış bulundu. N.MKH + A.+F. grubunun CPL değerlerinin N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarına göre anlamlı şekilde az olduğu tespit edildi (Şekil 10). Bu bulgu 8.hafta adrenalin+ fentolaminle indüklenmiş MKH'nin allodini üzerindeki etkisinin MKH'ye göre daha az olduğunu bize göstermektedir.

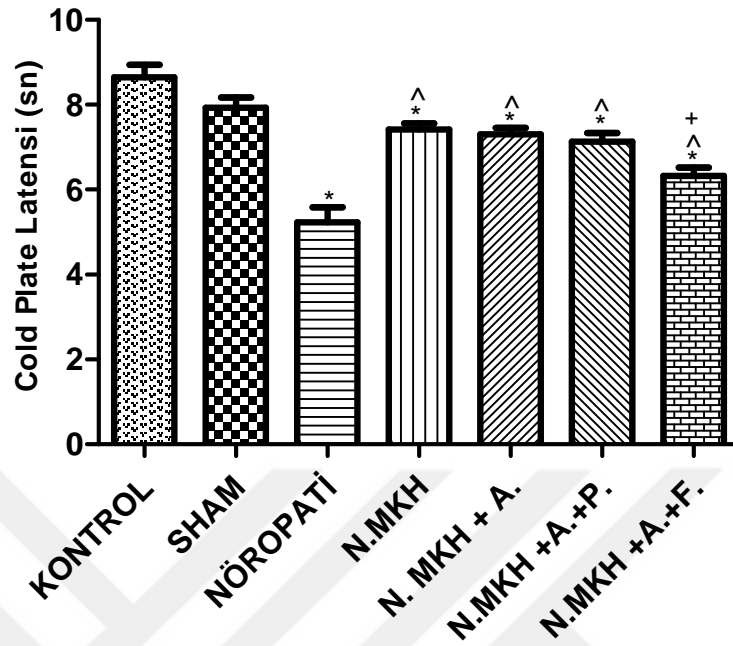
Cold Plate 8. Hafta



Şekil 10. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının Cold Plate Latensileri; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^:Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). +: N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarından anlamlı olarak farklı (p<0.05).

CPL testi 10.hafta sonuçlarına göre; Kontrol grubunda $8,65\pm 0,84$ iken, Sham grubunda $7,92\pm 0,69$, Nöropati grubunda $5,23\pm 1,14$, N.MKH grubunda; $7,42\pm 0,43$, N.MKH + A. grubunda $7,3\pm 0,49$, N.MKH +A.+P. grubunda $7,12\pm 0,59$, N.MKH +A.+F. grubunda $6,32\pm 0,59$ olduğu belirlendi. Kontrol grubuna göre, nöropati grubunda CPL ölçümünde anlamlı azalma tespit edildi. Nöropati grubuna göre; N.MKH, N.MKH + A., N.MKH +A.+P. ve N.MKH +A.+F. gruplarında CPL değerlerinde anlamlı artış bulundu. N.MKH + A.+F. grubunun CPL değerlerinin N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarına göre anlamlı şekilde az olduğu tespit edildi (Şekil 11). Bu bulgu 10.hafta adrenalin+ fentolaminle indüklenmiş MKH'nin allodini üzerindeki etkisinin MKH'ye göre daha az olduğunu bize göstermektedir.

Cold Plate 10. Hafta



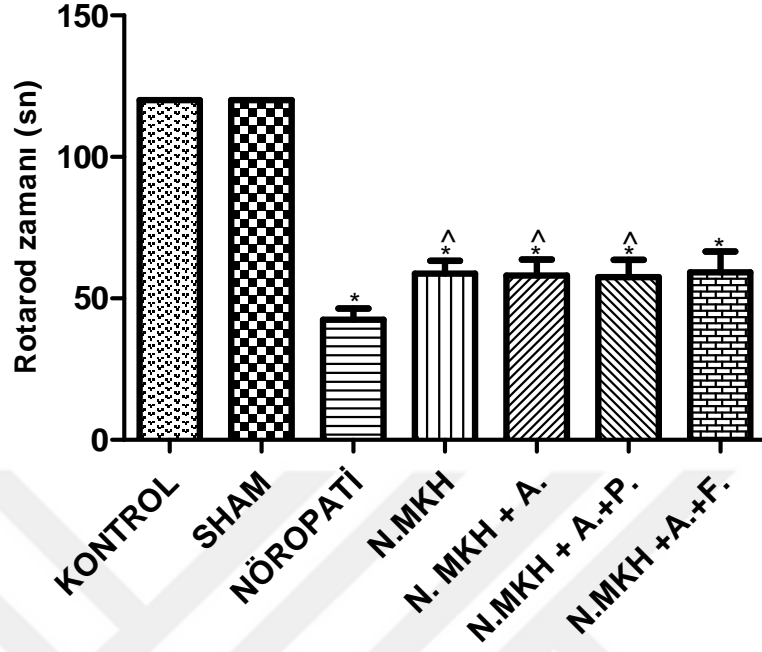
Şekil 11. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının Cold Plate Latensileri; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). +: N.MKH, N.MKH + A. ve N.MKH + A.+P. gruplarından anlamlı olarak farklı ($p<0.05$).

4.5. Rotarod Testi

Rotarod testi; sabit hızda dönen bir çubuk üzerinde, deney hayvanının düşmeden kalış süresinin ölçülmesi ve motor koordinasyon hareketlerinin değerlendirilmesi için yapıldı. Grupların rotarod testi, nöropati ve sham operasyonu yapıldıktan sonra 4, 6, 8 ve 10. haftalarda ölçüldü.

Rotarod Test'inde 4.haftada elde edilen sonuçlar sırasıyla; Kontrol ve Sham grubunda 120 sn iken, Nöropati grubunda $42,4\pm 12,6$ sn, N.MKH grubunda $58,8\pm 14,1$ sn, N.MKH + A. grubunda $58\pm 18,3$ sn, N.MKH + A.+P. grubunda $57,6\pm 19,2$ sn, N.MKH +A.+F. grubunda $59,2\pm 23,3$ sn olduğu belirlendi. Bulgular nöropati grubunun motor fonksiyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığını göstermektedir. N.MKH, N.MKH +A. ve N.MKH +A.+P. grupları, nöropati grubuyla karşılaştırıldığında motor fonksiyonların kısmi düzeldiği bulundu (Şekil 12).

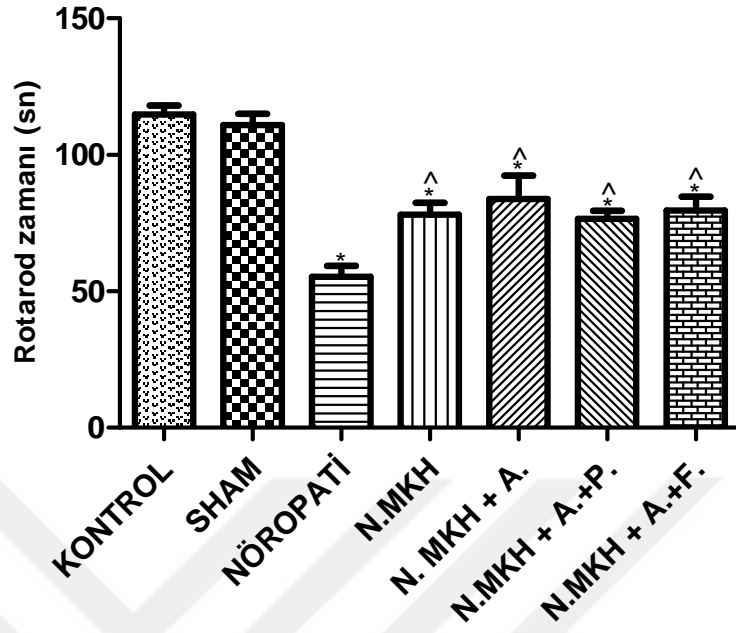
Rotarod 4.Hafta



Şekil 12. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının, Rotarod zamanı; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$).

Rotarod Testi'nde 6.haftada motor fonksiyonların sonuçları sırasıyla; Kontrol grubunda $114,8\pm 10,2$ sn, Sham grubunda $110,9\pm 13,1$ sn, Nöropati grubunda $55,3\pm 12,6$ sn, N.MKH grubunda $78,1\pm 13,5$ sn, N.MKH + A. grubunda $83,8\pm 27,1$ sn, N.MKH + A.+P. grubunda $76,5\pm 9,6$ sn, N.MKH + A.+F. grubunda $79,7\pm 15,7$ sn olarak tespit edildi. Nöropati grubunda motor fonksiyonların kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı şekilde azaldığı belirlendi. N.MKH, N.MKH + A., N.MKH + A.+P. ve N.MKH + A.+F. gruplarında ise nöropati grubuna göre motor fonksiyonların kısmi düzeldiği gösterildi (Şekil 13).

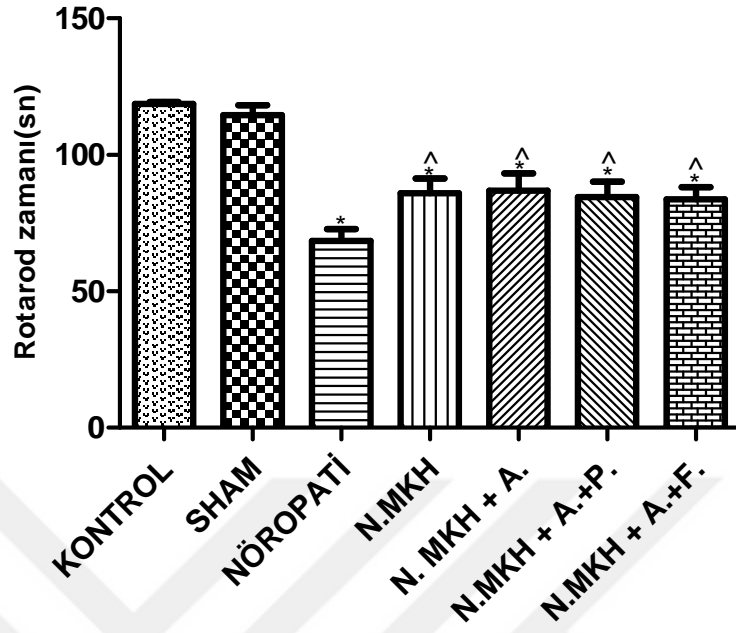
Rotarod 6.Hafta



Şekil 13. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının Rotarod zamanı; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$).

Rotarod Testi'nde 8.haftada motor fonksiyonların sonuçları sırasıyla; Kontrol grubunda $118,7\pm 2,4$ sn, Sham grubunda $114,5\pm 11,5$ sn, Nöropati grubunda $68,4\pm 13,8$ sn, N.MKH grubunda $85,9\pm 17,1$ sn, N.MKH + A. grubunda $86,9\pm 19,9$ sn, N.MKH + A.+P. grubunda $84,6\pm 17,7$ sn, N.MKH + A.+F. grubunda $83,7\pm 14,3$ sn olarak ölçüldü. Nöropati grubunun motor fonksiyonlarında, kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı bir azalma belirlendi. N.MKH, N.MKH + A., N.MKH + A.+P. ve N.MKH + A.+F. gruplarında motor fonksiyonların nöropati grubuna göre anlamlı şekilde arttığı bulundu (Şekil 14).

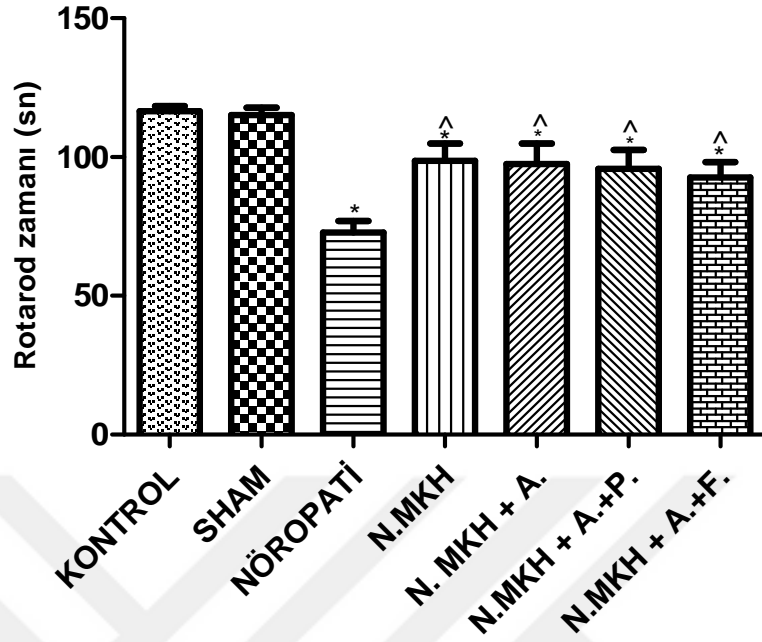
Rotarod 8.Hafta



Şekil 14. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının, Rotarod zamanı; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$).

Rotarod Testiyle 10.haftada motor fonksiyonların sonuçları sırasıyla; Kontrol grubunda $116,6\pm 5,7$ sn iken, Sham grubunda $115,2\pm 8,1$ sn, Nöropati grubunda $72,8\pm 13,2$ sn, N.MKH grubunda $98,7\pm 19,8$ sn, N.MKH + A. grubunda $97,6\pm 23,1$ sn, N.MKH + A.+P. grubunda $95,8\pm 21,3$ sn, N.MKH + A.+F. grubunda $92,7\pm 17,3$ sn olduğu belirlendi. Nöropati grubunda motor fonksiyon süresinin, kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı azaldığı tespit edildi. N.MKH, N.MKH + A., N.MKH + A.+P. ve N.MKH +A.+F. gruplarında motor fonksiyonların nöropati grubuna göre anlamlı arttığı bulundu (Şekil 15).

Rotarod 10.Hafta



Şekil 15. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının, Rotarod zamanı; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$).

4.6. Histopatolojik Bulgular

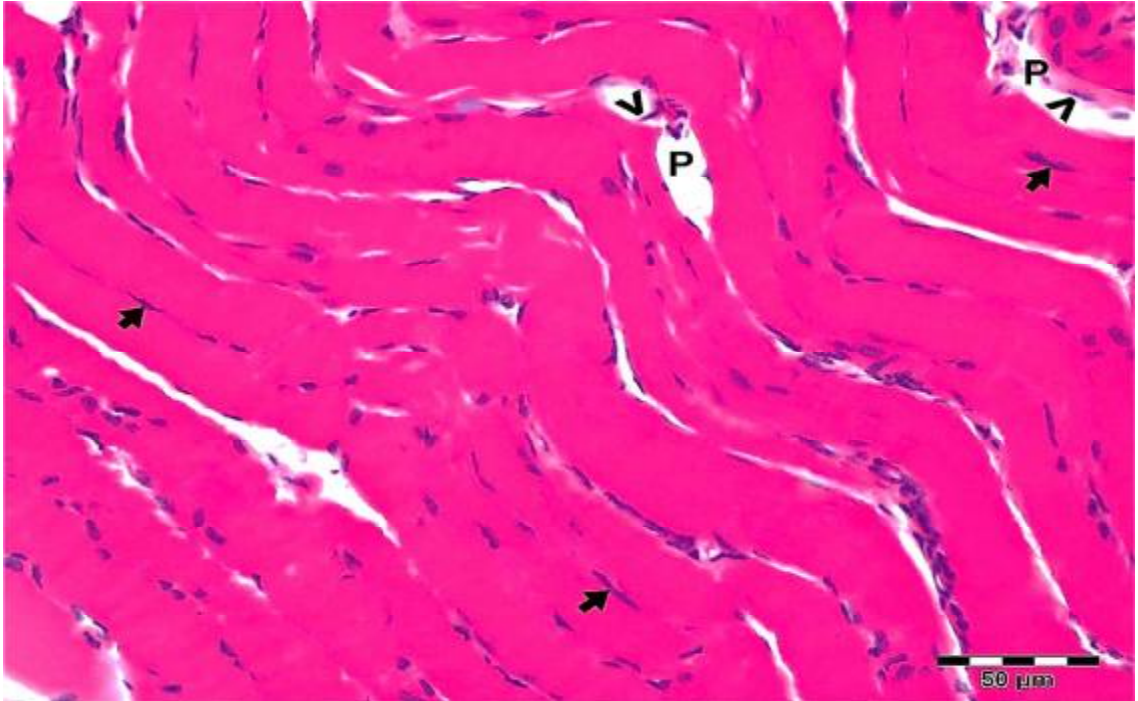
4.6.1. Işık Mikroskopik Bulgular

Grup 1: Kontrol Grubu

Hiçbir cerrahi işlem veya ilaç uygulamasına maruz bırakılmayıp normal laboratuvar koşullarında yaşatılan bu gruba ait kas dokusunun ışık mikroskopik olarak incelemesinde; periferik yerleşimli çok sayıda çekirdeğe sahip olan her bir kas lifinin, tamamen normal histolojik yapıda olduğu görüldü. Her bir kas lifini saran ince bağ dokusu yapısındaki endomisyumda küçük kan damarları, bağ dokusu hücreleri ve kas liflerine paralel seyreden sinir lifleri izlendi. Kas liflerinin biraraya gelmesiyle oluşan fasiküller daha kalın bir bağ dokusu olan perimisyum ile sarılıydı. Perimisyumda daha geniş kan damarları ve sinir lifleri bulunmaktaydı.



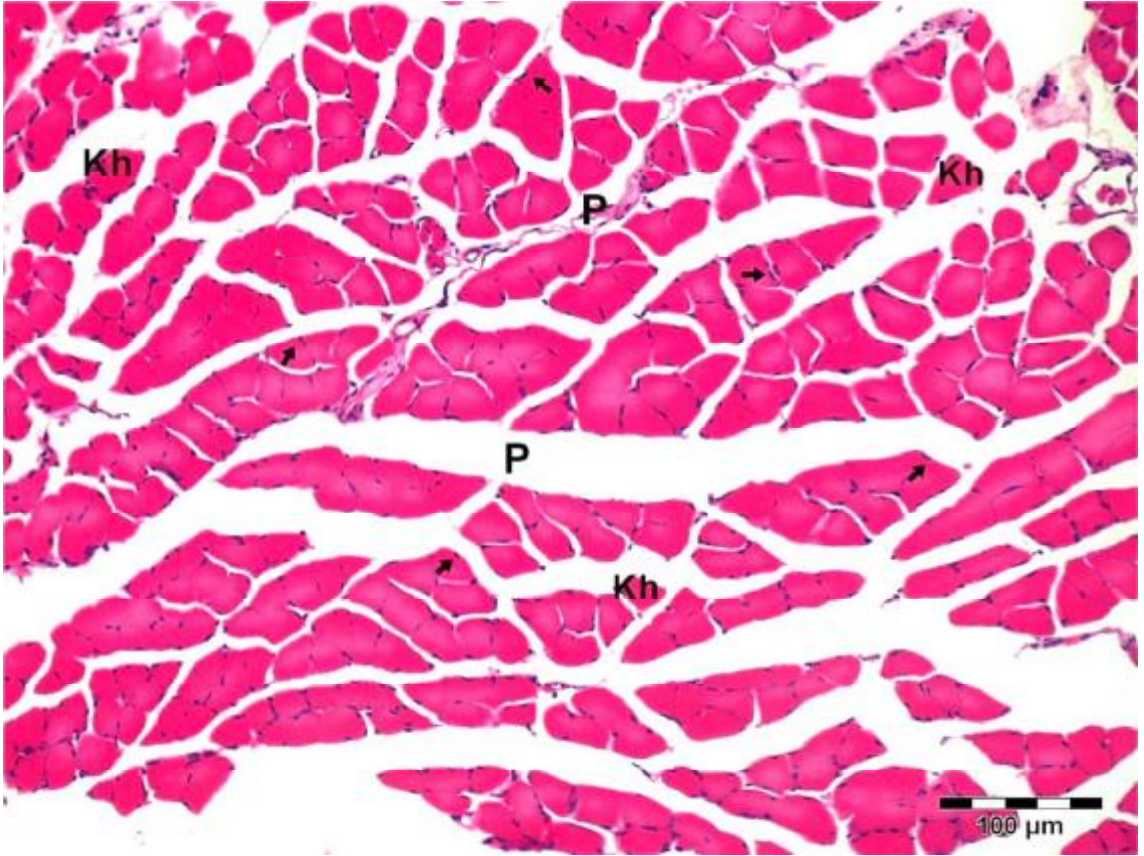
Şekil 16. Kontrol grubundan alınan çizgili kas dokusunun enine kesitinin ışık mikroskobik görüntüsü. Poligonall şekilli kas hücrelerinin (Kh) periferall yerleşimli çok sayıda çekirdeğe (oklar) sahip oldukları izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm.



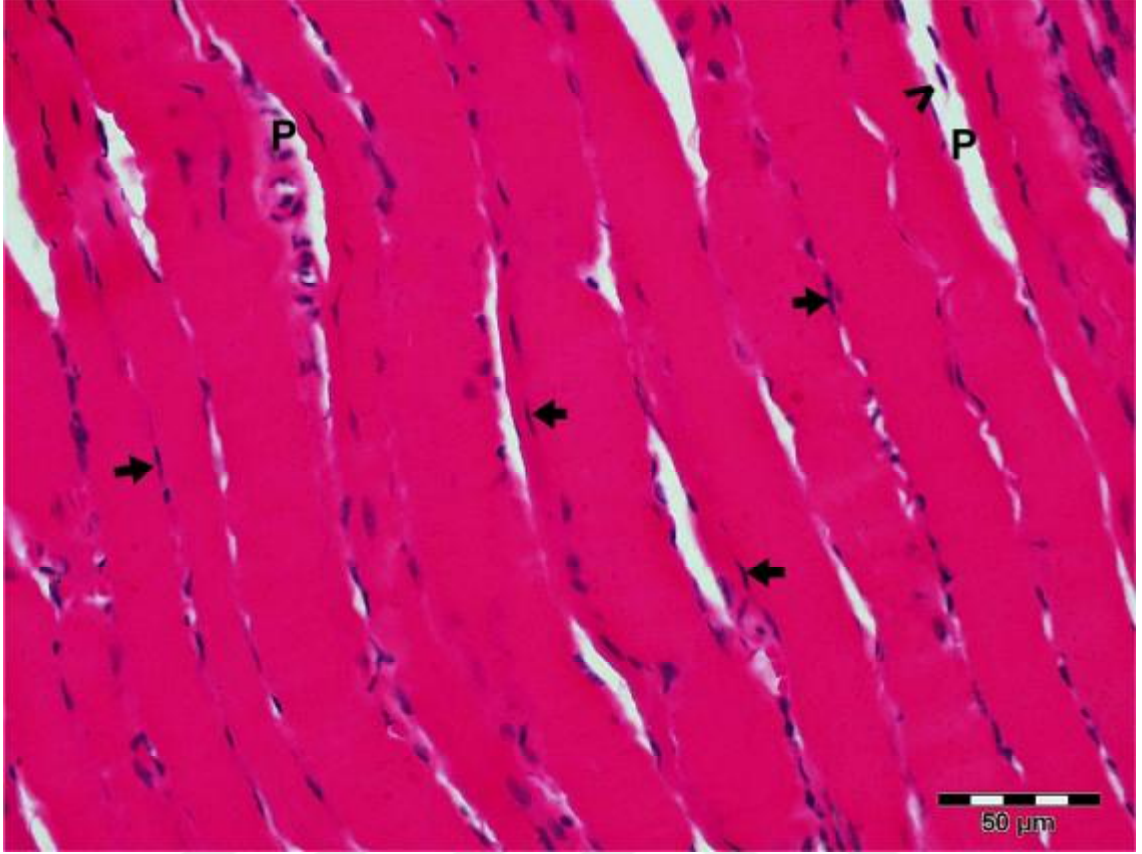
Şekil 17. Kontrol grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskobik görüntüsü. Kas liflerinin periferall yerleşimli çekirdekleri (oklar) tamamen normal yapıda izlenmektedir. Fasikülleri saran perimisyumda (P) bağ dokusu lifleri ve fibroblastların çekirdekleri (ok başları) ayrırtedilmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 µm.

Grup 2: Sham Grubu

Siyatik sinir ligasyonu yapmadan cilt, ciltaltı kesi uygulanıp suture edilen bu gruba ait kas dokularının ışık mikroskopik incelemesinde; kontrol grubuna benzer şekilde çok sayıda periferal çekirdeğe sahip normal görünümlü kas lifleri izlendi. Her bir kas lifini saran endomisyum ile kas fasiküllerini saran perimisyum normal görünümdeydi.



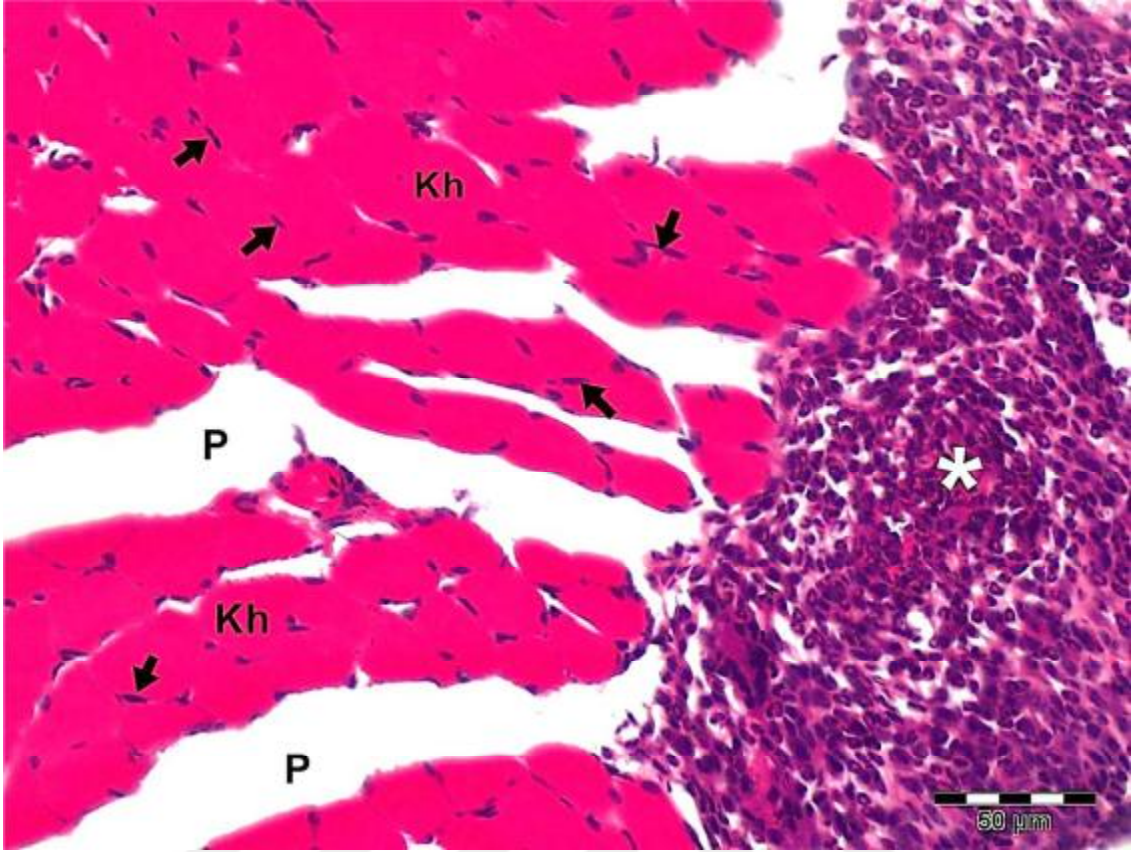
Şekil 18. Sham grubundan alınan çizgili kas dokusunun enine kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Poligonol şekilli kas hücrelerinin (Kh) periferal yerleşimli çok sayıda çekirdeğe (oklar) sahip oldukları izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm.



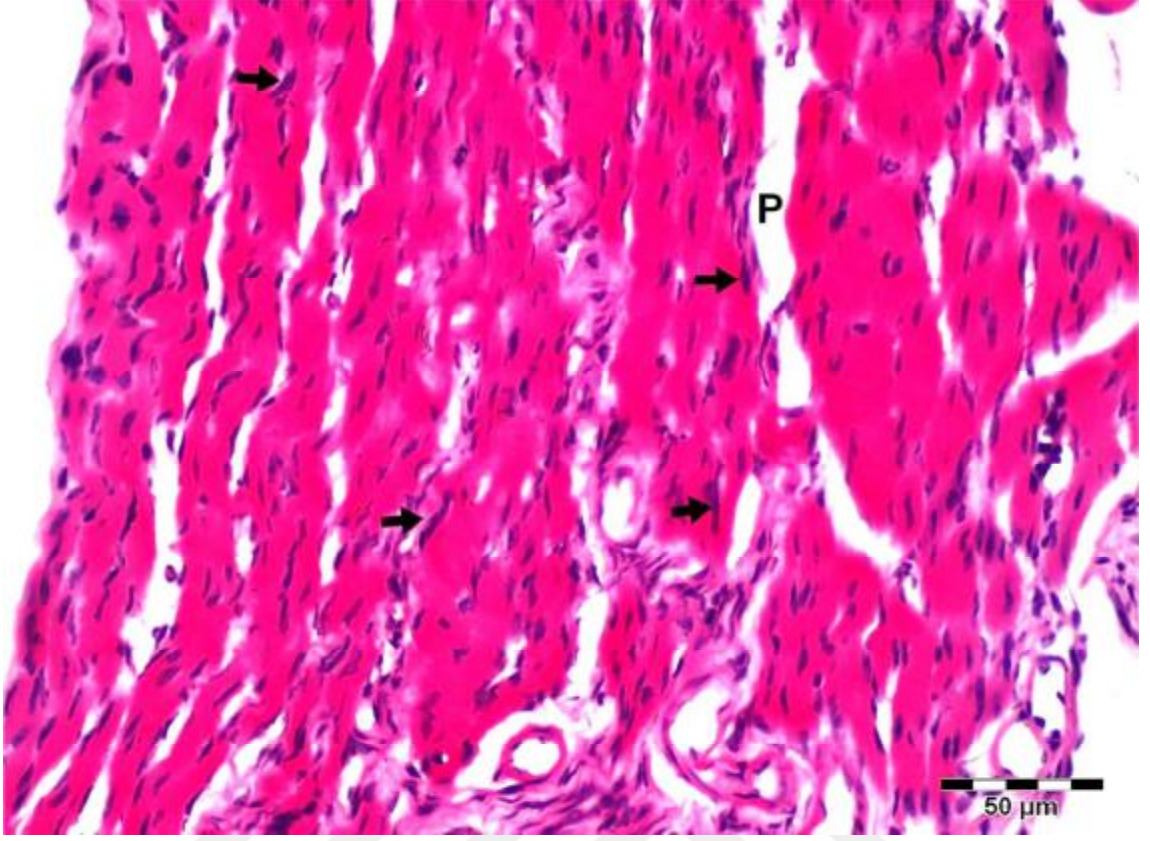
Şekil 19. Sham grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas liflerinin periferal yerleşimli çekirdekleri (oklar) normal yapıda izlenmektedir. Normal görünümlü perimisyum (P) bağ dokusu lifleri ve fibroblastların çekirdekleri (ok başları) içermektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 µm.

Grup 3: Nöropati Grubu

Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulan bu gruba ait deneklerin kas dokularının ışık mikroskopik incelemesinde; kas liflerinin periferal yerleşimli çekirdeklerinde piknotik değişikliklere rastlandı. Ferdi kas liflerinin ve fasiküllerin organizasyonlarında düzensizlikler ile birlikte inflamatuvar hücre birikimi dikkati çekti. Ayrıca fasikülleri çevreleyen perimisyumda bağ dokusu miktarının arttığı görüldü.



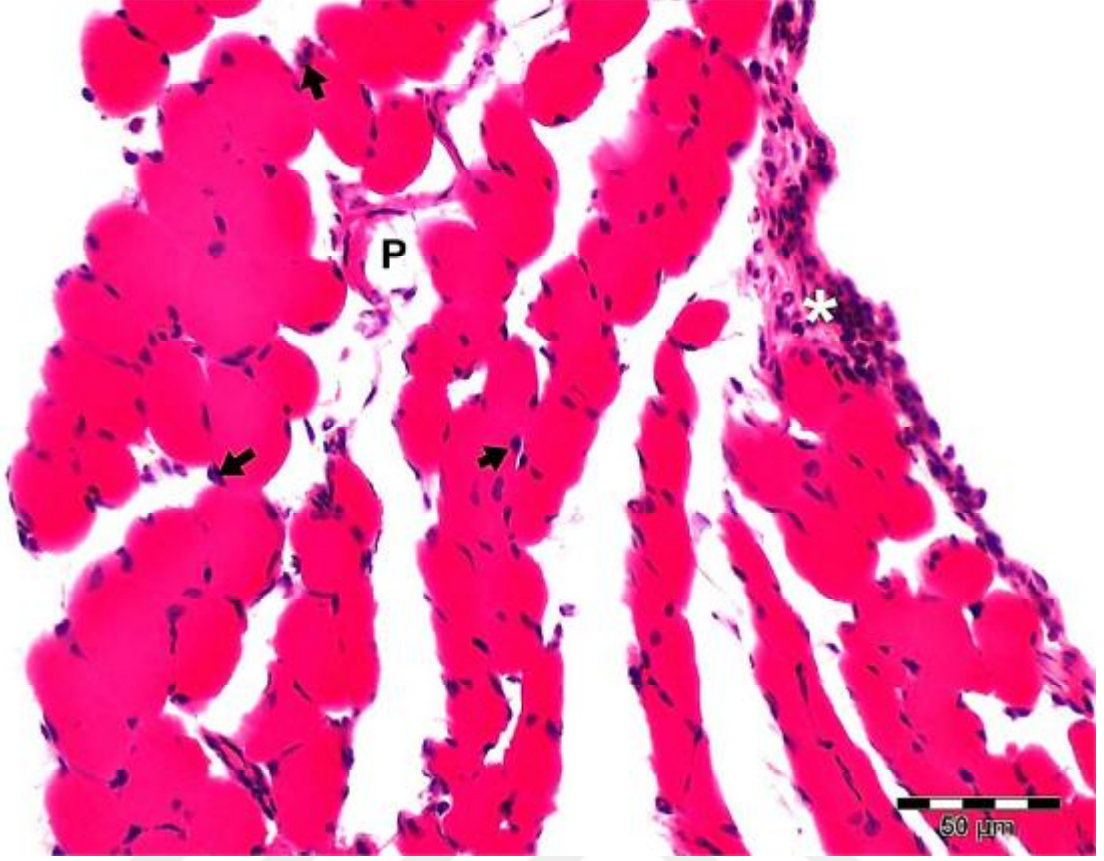
Şekil 20. Nöropati grubundan alınan çizgili kas dokusunun enine kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas hücrelerinin (Kh) periferal yerleşimli çekirdekleri (oklar) ve onları saran perimisyum (P) görülmektedir. Kas dokusunda yoğun inflamatuvar reaksiyon (*) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 μ m.



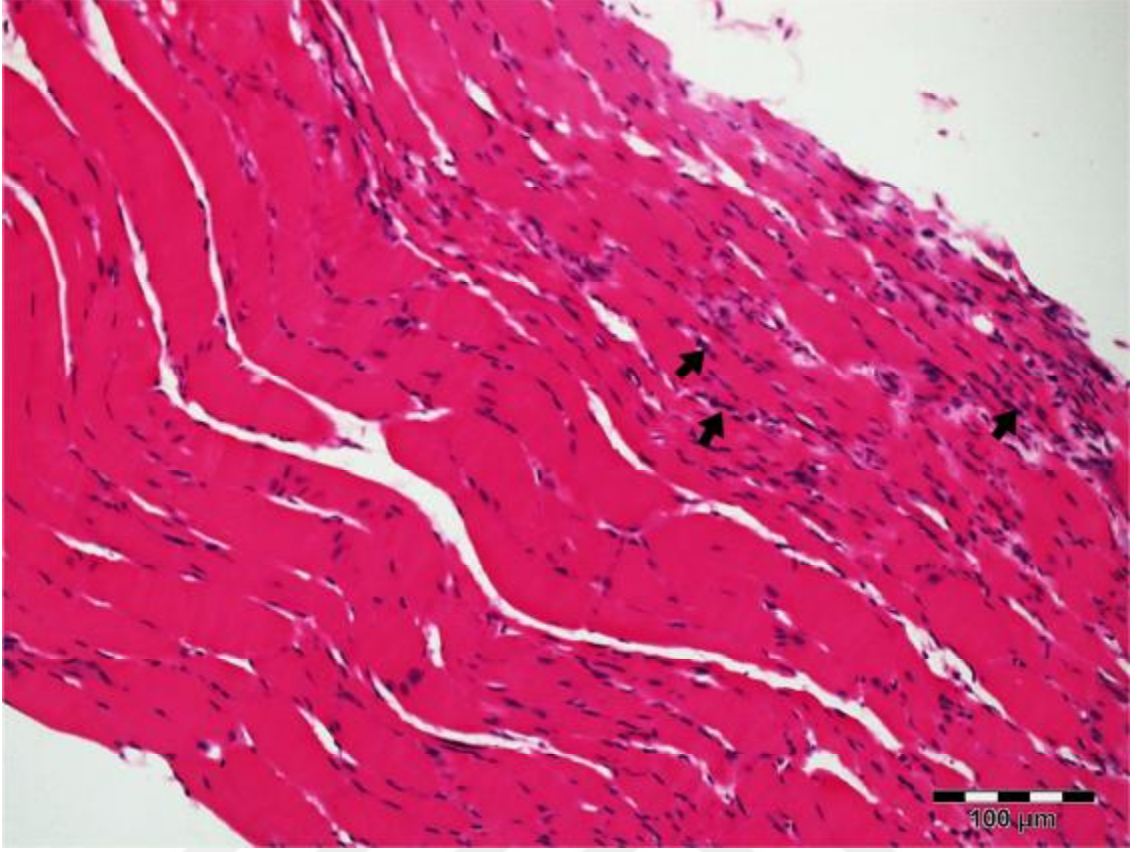
Şekil 21. Nöropati grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas liflerinin organizasyonunun bozulduğu görülmektedir. Periferal yerleşimli hücre çekirdeklerinin (oklar) çoğu alanda piknotik değişiklikler gösterdiği izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 µm.

Grup 4: Nöropati + MKH Grubu

Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulduktan sonra siyatik sinir etrafındaki soleus kası içine mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapılan bu grup deneklerin kas dokularının ışık mikroskopik incelemesinde; kas lifi organizasyonlarının birçok alanda düzensiz olduğu dikkati çekti. Kas hücrelerinin periferal yerleşimli çekirdeklerinde piknotik değişikliklerin devam ettiği görüldü. Kas dokusunda inflamatuvar hücre birikimi görülmekle birlikte sadece nöropati uygulanan gruba göre bu değişikliklerin nispeten azalmış olduğu izlendi.



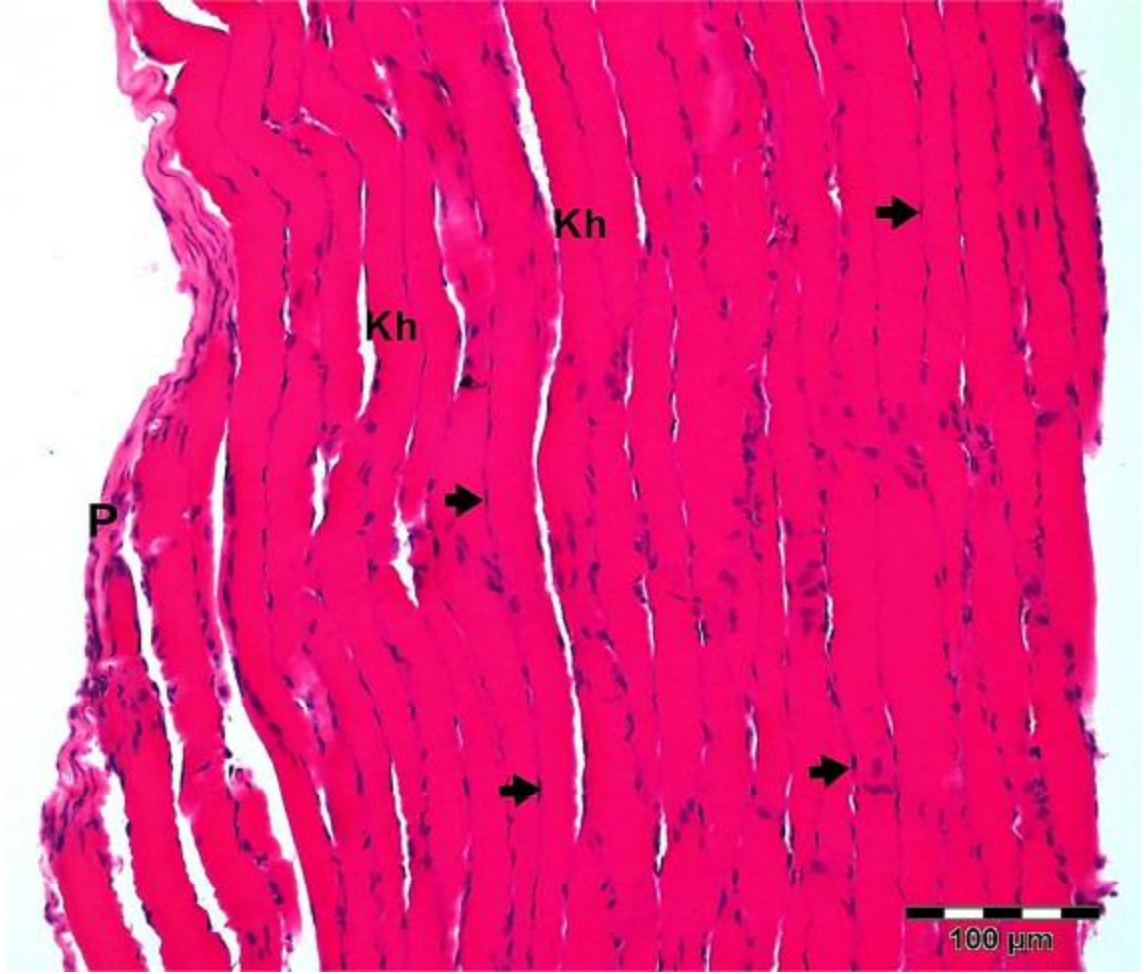
Şekil 22. Nöropati + Mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun enine kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Periferal yerleşimli hücre çekirdeklerinin bazı alanlarda piknotik değişiklikler sergilediği görülmektedir. Kas dokusunda inflamatuvar hücre birikimi (*) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 µm.



Şekil 23. Nöropati + Mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas lifi organizasyonunda düzelme ile birlikte inflamatuvar hücre birikiminde azalma görülmektedir. Piknotik değişiklikler sergileyen perifer yerleşimli kas hücreleri çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm.

Grup 5: Nöropati + Adrenalin ile Uyarılmış MKH Grubu

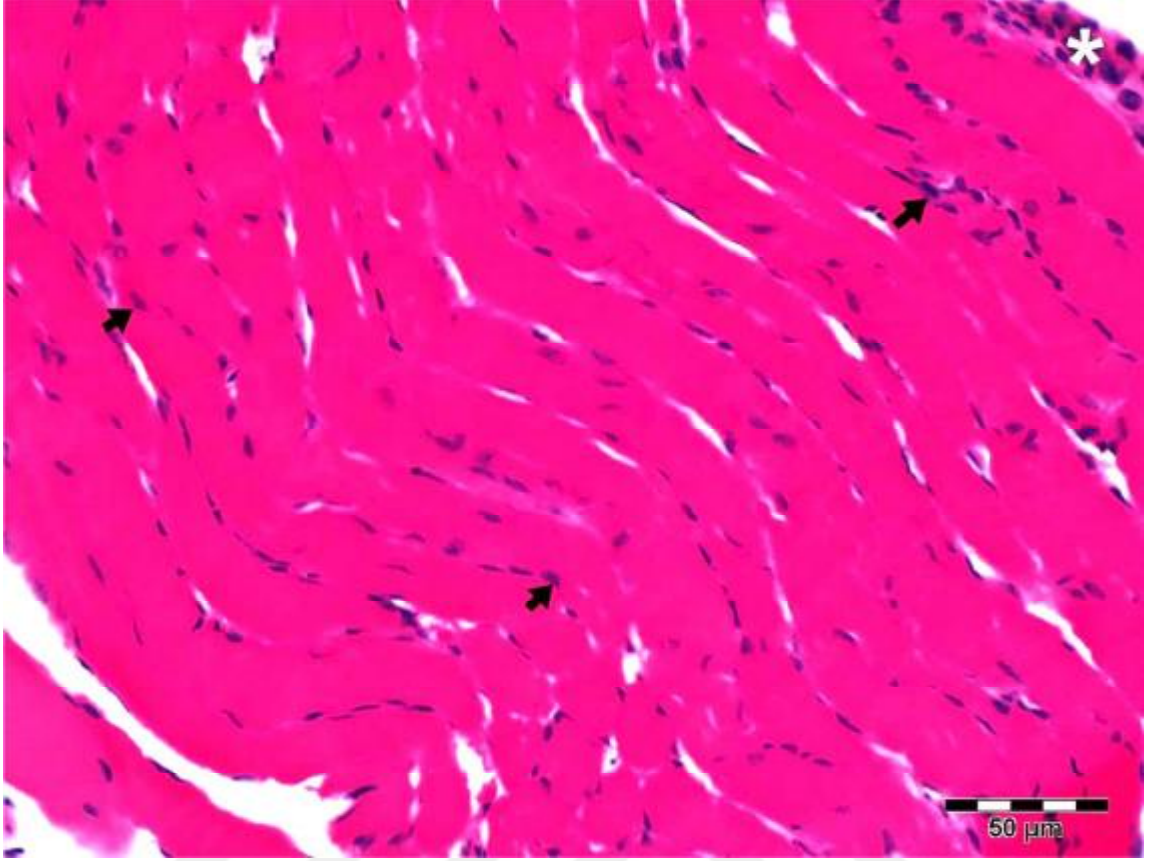
Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulduktan sonra siyatik sinir etrafındaki soleus kası içine adrenalin ile uyarılmış mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapılan bu gruptaki deneklerin soleus kası ışık mikroskopik incelemesinde; kas liflerinin organizasyonlarının düzenli olduğu ve kas hücrelerinin perifer yerleşimli çekirdeklerinde piknotik değişikliklerin belirgin olarak azalmış olduğu görüldü. Ayrıca nöropati ve mezenkimal kök hücre transplantasyonu uygulanan tüm gruplara oranla bu grupta kas dokusunda inflamatuvar hücre birikiminde ve inflamasyon değişikliklerinde belirgin bir azalmanın olduğu dikkati çekti.



Şekil 24. Nöropati + Adrenalin ile uyarılmış mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Kas hücrelerinin (Kh) normal yapıdaki periferal yerleşimli çekirdekleri (oklar) görülmektedir. P, Perimisyum. Kh, Kas hücresi. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 μ m.

Grup 6: Nöropati +Adrenalin +Propranolol ile Uyarılmış MKH Grubu

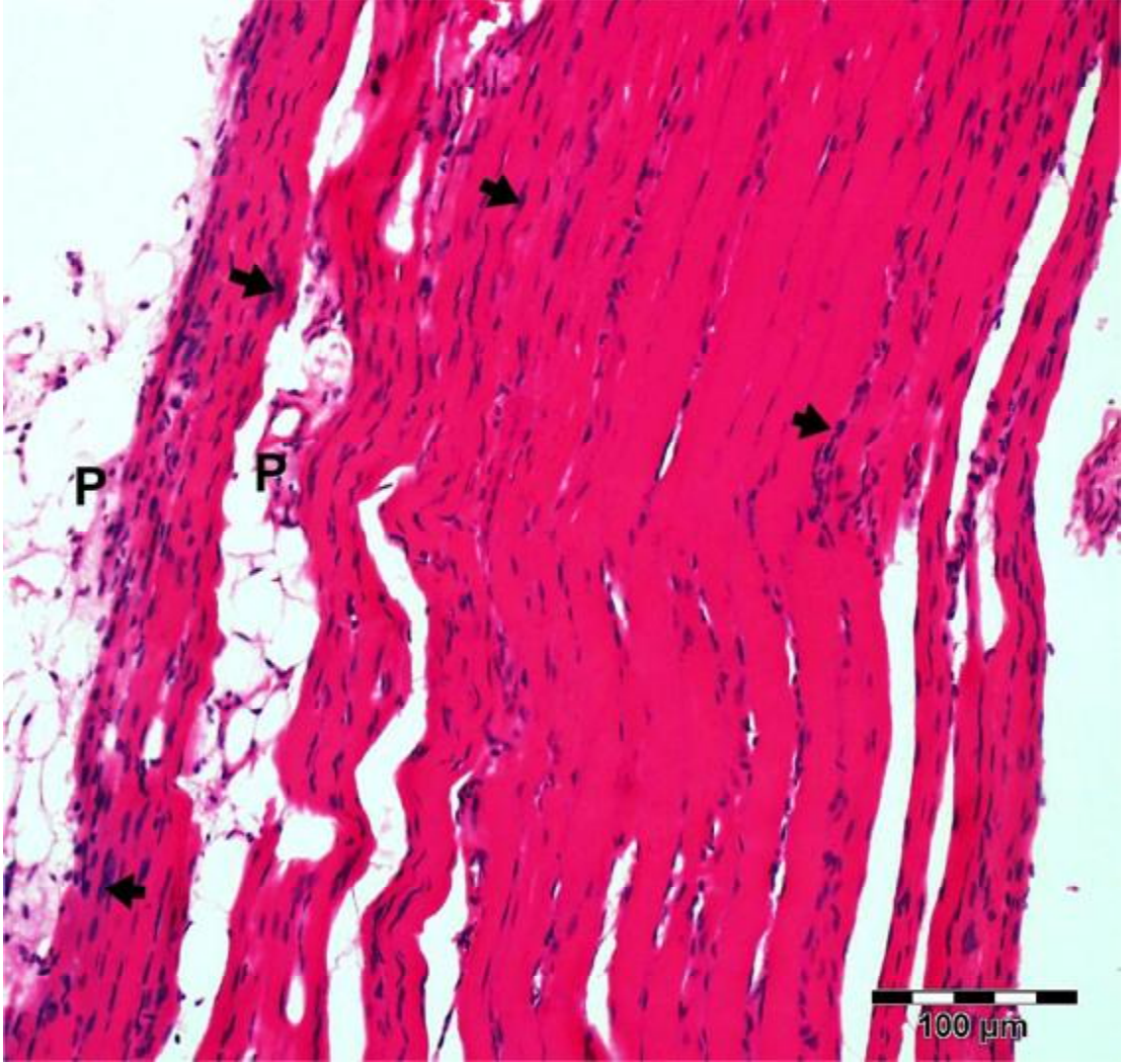
Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulduktan sonra siyatik sinir etrafındaki soleus kası içine adrenalin + propranolol ile uyarılmış mezenkimal hücre transplantasyonu yapılan bu grup deneklerin soleus kası ışık mikroskopik incelemesinde; kas liflerinin periferal yerleşimli çekirdeklerinde bazı alanlarda piknotik değişikliklerin varlığı dikkati çekti. Kas lifi organizasyonlarının bazı alanlarda düzensiz olduğu izlendi. Kas liflerinin biraraya gelmesiyle oluşan fasikülleri saran perimisyumda, bağ dokusu miktarının kontrol grubuna benzer nitelikte olduğu görüldü. Adrenalinle uyarılmış MKH grubuyla kıyaslandığında inflamatuvar değişikliklerin bu grupta daha fazla olduğu dikkati çekti.



Şekil 25. Nöropati + Adrenalin + Propranol ile uyarılmış mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Piknotik değişiklikler sergileyen periferik yerleşimli çekirdeğe (oklar) sahip kas lifleri izlenmektedir. Bazı alanlarda inflamatuvar hücelere (*) rastlanılmaktadır. Hematoksilen-Eozin. Bar: 50 µm.

Grup 7: Nöropati + Adrenalin + Fentolamin ile Uyarılmış MKH Grubu

Siyatik sinir ligasyonu ile nöropati oluşturulduktan sonra sinir etrafındaki soleus kası içine adrenalin + fentolamin ile uyarılmış mezenkimal hücre transplantasyonu yapılan bu grup deneklerin soleus kası ışık mikroskopik incelemesinde, N.MKH+ adrenalin, N.MKH+adrenalin+propranolol gruplarına oranla bu gruba ait dokularda, birçok alanda kas liflerinin periferik yerleşimli çekirdeklerinde piknotik değişikliklerin varlığı, kas lifi organizasyonlarında düzensizliklerin olduğu görüldü.



Şekil 26. Nöropati + Adrenalin + Fentolamin ile uyarılmış mezenkimal kök hücre grubundan alınan çizgili kas dokusunun boyuna kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü. Bazı alanlarda kas lifi organizasyonunda düzensizlikler görülmektedir. Piknotik değişiklikler sergileyen kas hücresi çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. P, Perimisyum. Hematoksilen-Eozin. Bar: 100 µm.

4.6.2. Soleus Kası Elektron Mikroskopik Bulguları

Grup 1: Kontrol grubu

Hiçbir deneysel işlem uygulanmamış normal kontrol grubuna ait kas dokularının elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesinde iskelet kası liflerinin dıştan sarkolemma ile sarılı oldukları görüldü. Sarkolemma'nın altında periferal yerleşimli çok sayıda hücre çekirdeği bulunmaktaydı. Bir veya iki adet çekirdekçik içeren çekirdeğin normal ince yapıda olduğu ayırt edildi. Sarkoplazmada miyofibrillerin aralarında çok sayıda düz endoplazmik retikülüm (sarkoplazmik retikülüm), mitokondriyonlar,

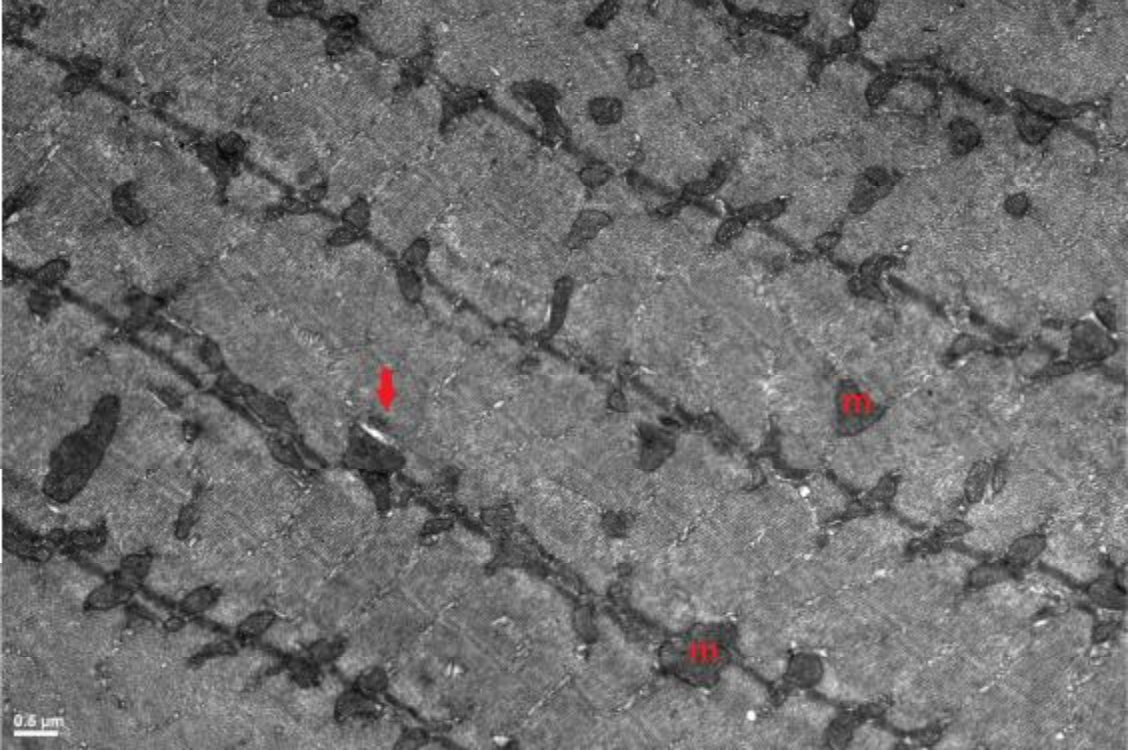
granüler endoplazmik retikülüm, lizozom ve serbest ribozomlar gözlemlendi. Sarkoplazmadaki bu organellerin normal ince yapıda oldukları ayırt edildi. Bunlara ek olarak sarkoplazma içerisinde glikojen partikülleri ve az sayıda lipid damlacıkları da yer almaktaydı. Miyofibrillerin longitudinal kesitlerde enine çizgilenmeler gösterdiği, bu enine çizgilenmelerin açık olan I bandı ve koyu olan A bandı şeklinde düzenlendiği görüldü. I bandının ortasında elektron dens transvers bir çizgi olan Z bandı izlendi. Koyu olan A bandının ortasında, daha az yoğun olan H bandı ve bu bandın da ortasında yerleşen M çizgisi gözlemlendi. Komşu iki Z bandı arasında çizgili kasın kasılma birimi olan sarkomerin normal yapıda olduğu görüldü. Kas hücrelerinin etrafında yer alan endomisyum içerisinde fibroblastlar ve kapiller damarların varlığı da gözlemlendi (Şekil 27).



Şekil 27. Kontrol grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Hücre çekirdeğinin (Ç) normal kromatin düzenlenmesi izlenmektedir. Mitokondriyonların (m) kristalleri normal ince yapısını korumaktadır. Kasılma birimi olan sarkomerler iki Z bandı arasında izlenmektedir. Bar: 1 µm.

Grup 2: Sham Grubu

Bu gruba ait kas dokularının elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesinde çizgili kas liflerinin periferal yerleşimli çekirdeklerinin normal kromatin düzenlemesiyle ince yapılarını korumuş oldukları izlendi. Sarkoplazmada mitokondriyonlar ve sarkoplazmik retikülömlar normal yapıda ayırt edildi. Miyofibril organizasyonlarının düzenli olduğu, miyofibrillerin aralarında glikojen partiküllerinin varlığı dikkati çekti (Şekil 28).

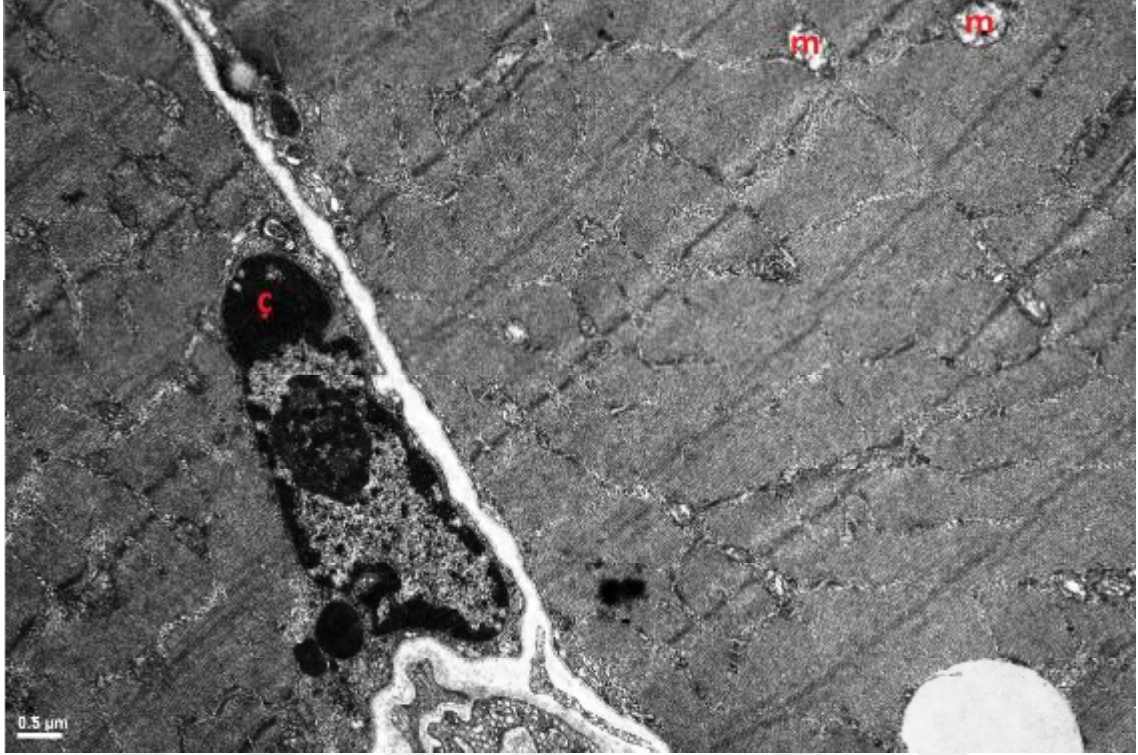


Şekil 28. Sham grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Mitokondriyonlar (m) ve sarkoplazmik retikülüm (oklar) normal ince yapıdadır. Komşu iki Z bandı arasında sarkomerler izlenmektedir. Bar: 0,5 µm.

Grup 3: Nöropati Grubu

Nöropati oluşturulduktan sonra hiçbir tedavi uygulanmayan bu gruba ait kas dokularının elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesinde çoğu alanda miyofibrillerin yapısal organizasyonlarının bozulmuş olduğu görüldü. Hücre çekirdeklerinde heterokromatin artışı ve piknotik değişiklikler dikkati çekti. Sarkoplazmada özellikle mitokondriyon kristalarında harabiyet, sarkoplazmik

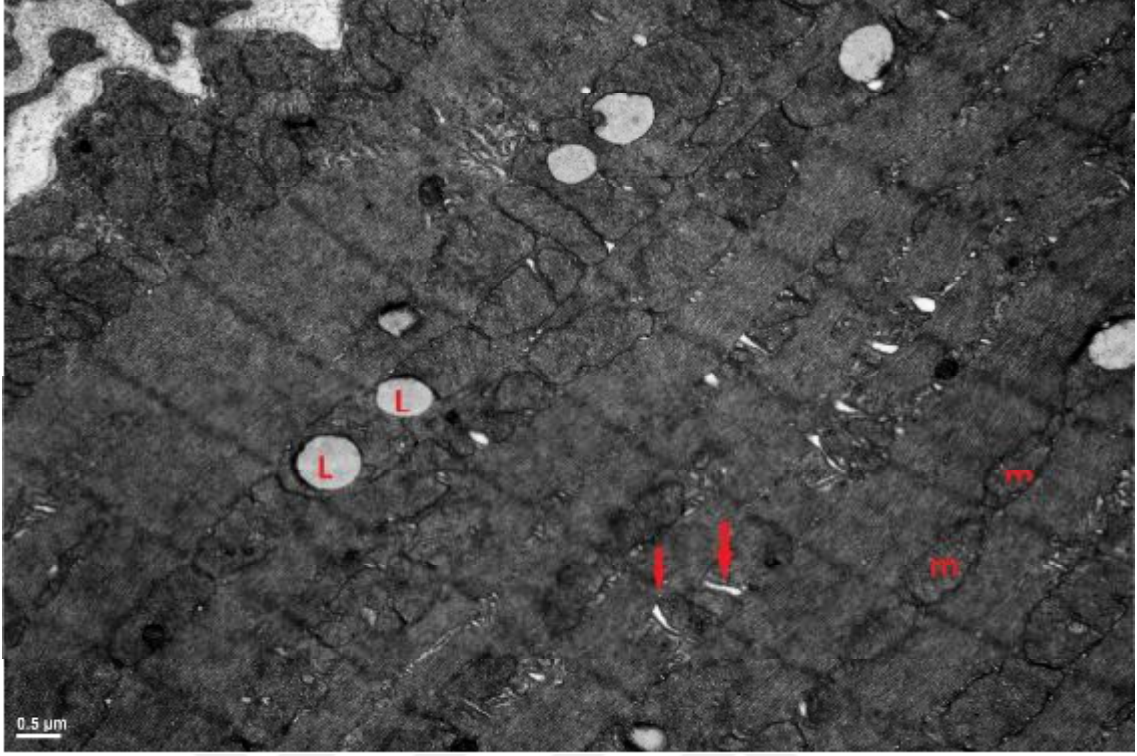
retikülümde genişlemeler gibi dejeneratif değişiklikler ayırt ediciydi. Mitokondriyonlara yakın yerleşimli olarak lipid damlacıklarında artış olduğu da dikkati çekti (Şekil 29).



Şekil 29. Nöropati grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Hücre çekirdeğinde (Ç) heterokromatin artışı dikkati çekmektedir. Mitokondriyon (m) kristalarında harabiyet izlenmektedir. Bar: 0,5 µm.

Grup 4: Nöropati + MKH Grubu

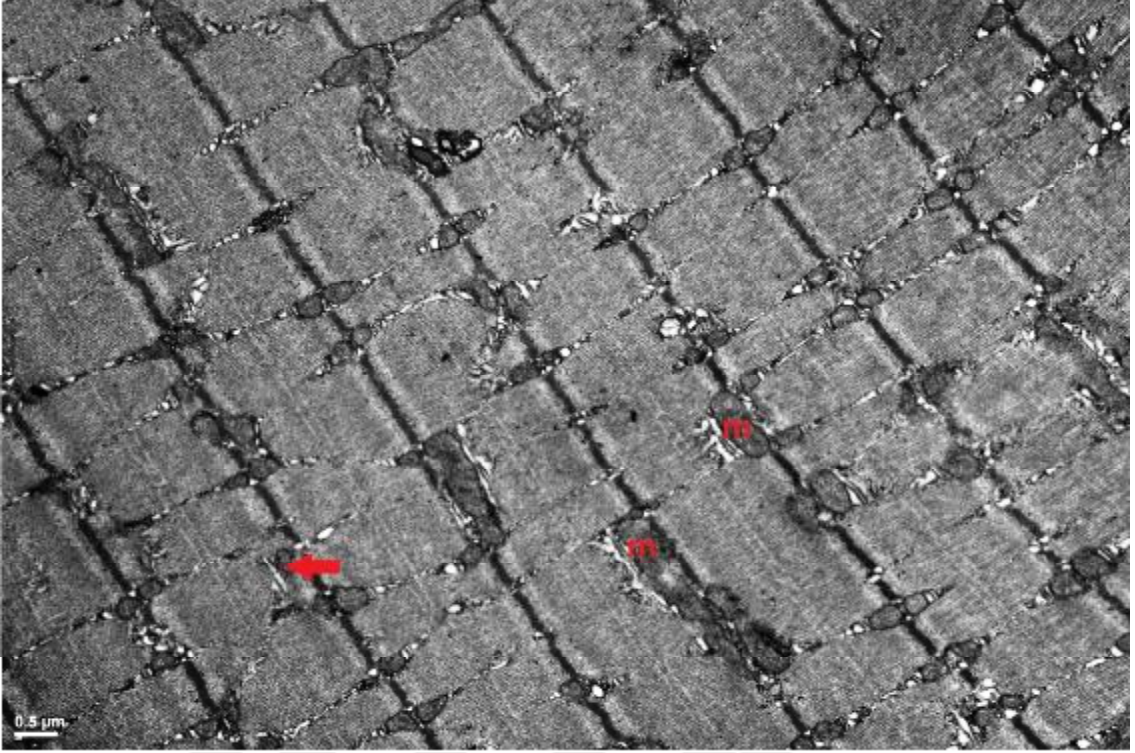
Nöropati oluşturulduktan sonra mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapılan bu gruba ait kas dokularının elektron mikroskopik olarak incelenmesinde nöropati uygulanan grupla karşılaştırıldığında daha hafif olmakla birlikte, bazı alanlarda kas liflerinde çekirdekte heterokromatin artışı ve sitoplazmik organellerde dejeneratif değişikliklerin varlığı izlendi. Miyofibril organizasyonunda bozulmalar bu grupta da ayırt edildi. Bununla birlikte, bu dejeneratif değişikliklerin sadece nöropati uygulanan gruba oranla nispeten azalmış olduğu gözlemlendi. Sarkoplazmada lipid damlacıklarındaki artış ilgi çekiciydi. Ayrıca kas liflerinde sarkoplazmik retikülümde genişlemeler sonucu vakuolizasyonun varlığına bu grupta da rastlandı (Şekil 30).



Şekil 30. Nöropati MKH grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Sarkoplazmada lipid damlacıklarının varlığı (L) izlenmektedir. Mitokondriyonlar; m, sarkoplazmik retikülüm ise oklarla gösterilmiştir. Bar: 0,5 µm.

Grup 5: Nöropati +Adrenalin ile Uyarılmış MKH Grubu

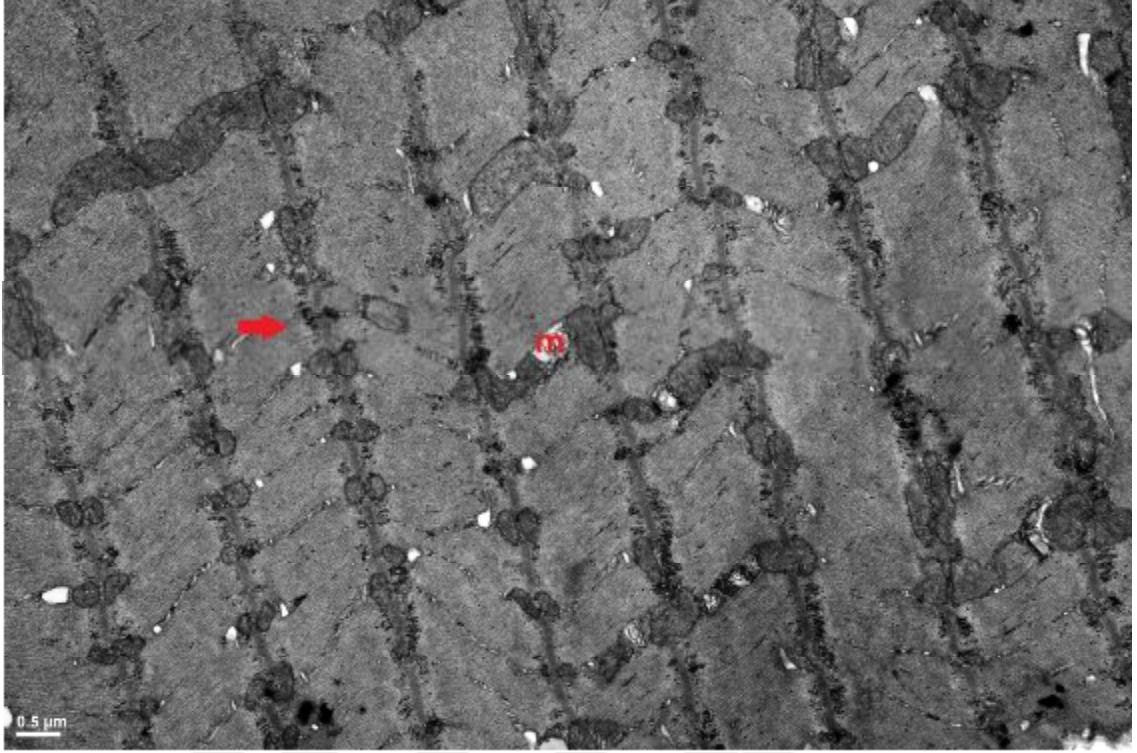
Nöropati oluşturulduktan sonra adrenalin ile uyarılmış mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapılan bu gruba ait kas dokularının elektron mikroskopik incelenmesinde bazı kas liflerinde, çekirdek ve sitoplazmik organelde fokal dejenerasyon belirtileri görülmekle birlikte, kas liflerinin ince yapı ve organizasyonlarının genellikle korunmuş olduğu dikkati çekti. Bazı mitokondriyonların kristalarında hafif değişiklikler, sarkoplazmik retikülümde genişlemeler izlenmekle birlikte bu değişiklikler tüm gruplara oranla azalmıştı. Miyofibrillerin organizasyonları tüm gruplara oranla bu grupta daha düzenli olarak izlendi (Şekil 31).



Şekil 31. Nöropati + MKH+Adrenalin grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Sarkoplazmadaki mitokondriyonlar (m) krista ve membranları ile çoğu alanda normal ince yapıda izlenmektedir. Sarkoplazmik retikülüm normal olarak ok ile işaretli alanlarda görülmektedir. Bar: 0,5 µm.

Grup 6: Nöropati + Adrenalin + Propranolol ile Uyarılmış MKH Grubu

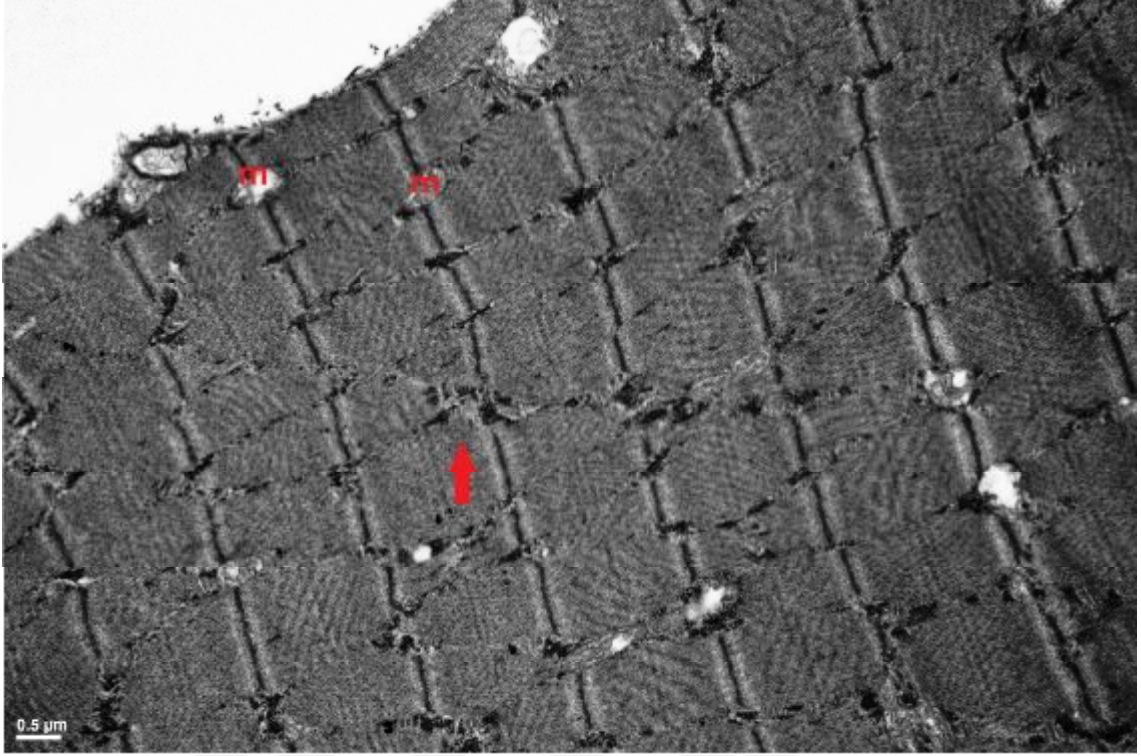
Bu gruba ait kas dokularının elektron mikroskopik olarak incelenmesinde kas liflerinin periferal kısımlarında yerleşen hücre çekirdeklerinde heterokromatin artışı ile birlikte bazı alanlarda piknotik değişikliklerin varlığı izlendi. Sarkoplazmada bazı mitokondriyonlarda krista harabiyeti, sarkoplazmik retikülümde vakuolizasyon gibi dejeneratif değişiklikler görülmekle birlikte çoğu alanlarda organellerin normal ince yapılarını korumuş olduğu görüldü. Bunun yanısıra sarkoplazmada glikojen pertiküllerinde artış ayırt ediciydi. Nöropati ve nöropati + MKH gruplarına oranla bu grupta miyofibrillerin genel organizasyonlarının daha iyi olduğu dikkati çaktı. (Şekil 32).



Şekil 32. Nöropati+ MKH+Adrenalin+Propranolol grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Bazı mitokondriyonlarda (m) krista harabiyeti gibi dejeneratif değişiklikler görülmektedir. Sarkoplazmik retikülümde genişlemeler ok ile gösterilmiştir. Bar: 0,5 µm.

Grup 7: Nöropati + Adrenalin + Fentolamin ile Uyarılmış MKH Grubu

Bu gruba ait kas dokularının elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesinde kas liflerinde çekirdeklerde piknotik değişiklikler, sarkoplazmada özellikle mitokondriyon kristalarında harabiyet, sarkoplazmik retikülümde vakuolizasyon propranolol grubuna oranla daha belirgindi. Miyofibrillerin yapısal organizasyonları bazı alanlarda bozulmuştu. Glikojen partiküllerinde artış dikkati çekmekteydi (Şekil 33).



Şekil 33. Nöropati+MKH+Adrenalin+Fentolamin grubuna ait kas dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Mitokondriyon kristalarında (m) dejeneratif değişiklikler varlığı dikkati çekmektedir. Glikojen partiküllerinde artış oklarla gösterilmiştir. Bar: 0, 5 μm .

4.6.3. Siyatik Sinir Elektron Mikroskopik Bulguları

Grup 1: Kontrol grubu

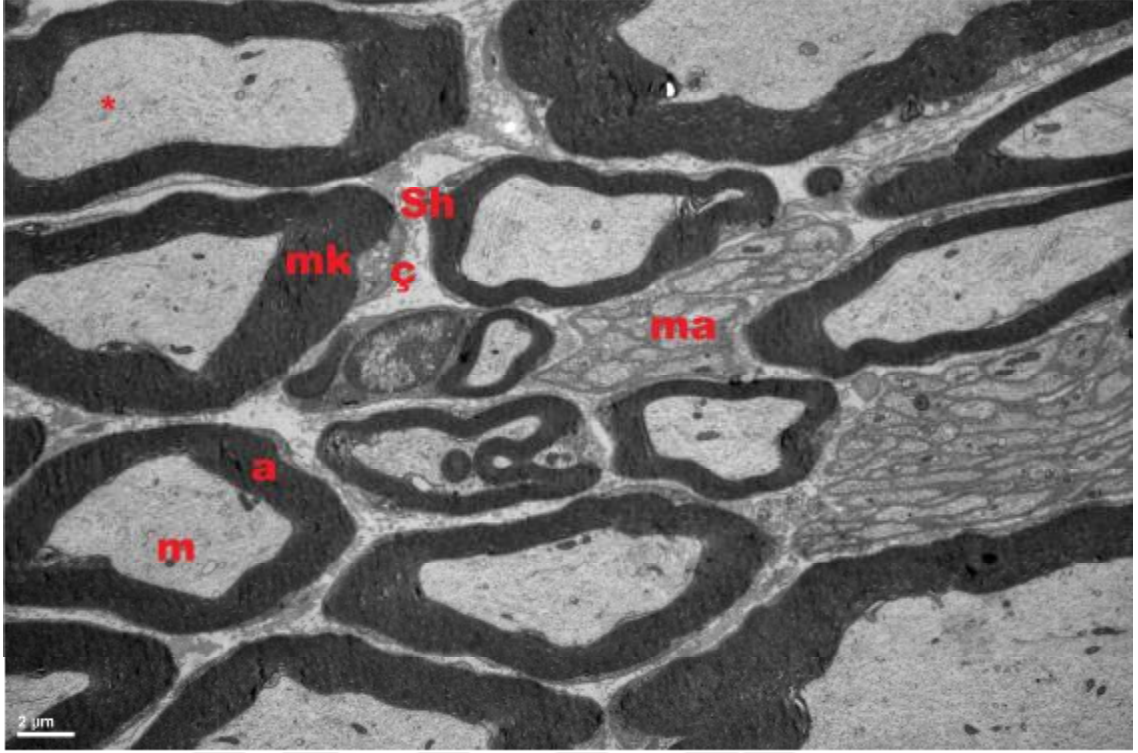
Hiçbir işlem uygulanmayıp tamamen sağlam kontrol grubuna ait siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik olarak incelenmesinde sinir fasiküllerinin miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinden oluştuğu, tüm sinir liflerinin Schwann hücreleri tarafından çevrelenmiş olduğu izlendi. Schwann hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmik organellerinin normal ince yapılarını koruduğu görüldü. Miyelinli ve miyelinsiz aksonlarda aksoplazmadaki mitokondriyon, nörofilaman ve nörotübüllerin normal yapıda olduğu dikkati çekti. Miyelinli aksonlarda miyelin kılıfın normal konsantrik lamellar yapısını korumuş olduğu izlendi (Şekil 34).



Şekil 34. Kontrol grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli (a) ve miyelinsiz (ma) sinir liflerinin tamamen normal ince yapıda oldukları izlenmektedir. Schwann hücresi (Sh) tarafından yapılan miyelin kılıf (mk) konsantrik lamellar yapıda miyelinli aksonların etrafında izlenmektedir. Kol; kollajen lifler. Bar: 1µm.

Grup 2: Sham Grubu

Sham grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik olarak incelenmesinde miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin Schwann hücreleri tarafından çevrelendikleri ve normal ince yapılarını korumuş oldukları izlendi. Schwann hücrelerinin hiperkromatik bir çekirdeğe sahip olduğu ve miyelinli aksonların etrafında miyelin kılıfı oluşturduğu görüldü. Aksoplazmada mitokondriyonlar, agranüler endoplazmik retikulum sisternaları, nörotübül ve nörofilamanların varlığı izlendi. Sinir liflerinin aralarında kollajen liflerden oluşan fibröz bağ dokusu da yer almaktaydı (Şekil 35).

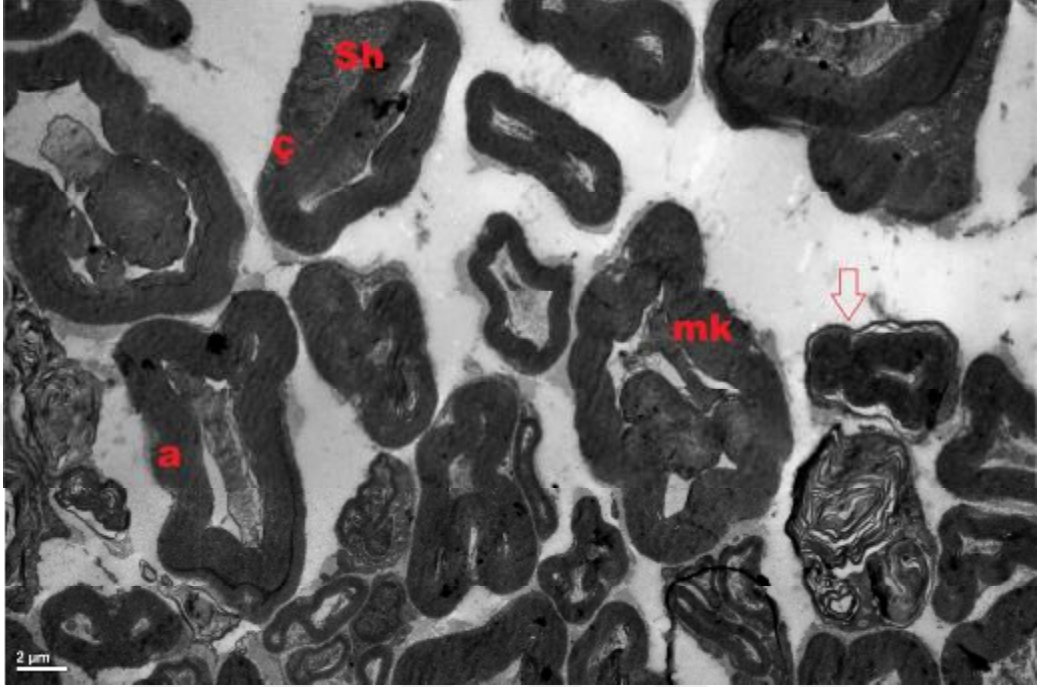


Şekil 35. Sham grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinin (a) etrafındaki miyelin kılıf (mk) ve akson içerisindeki mitokondriyon (m), nörotübül ve nörofilamanlar (*) normal olarak izlenmektedir. Schwann hücresinin (Sh), çekirdeği (ç) ve sitoplazması ile normal yapısını koruduğu görülmektedir. Miyelinsiz sinir lifleri (ma) izlenmektedir. Bar: 2 µm.

Grup 3: Nöropati Grubu

Nöropati oluşturulup hiçbir tedavi uygulanmayan gruba ait siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik incelenmesinde, birçok alanda özellikle miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfta önemli dejeneratif değişikliklerin meydana geldiği görüldü. Miyelin kılıfın lamellar yapısının bozulduğu, bazı alanlarda tamamen harabiyete uğradığı izlendi. Miyelin kılıfın çoğu alanda akson içerisine doğru invajine olduğu, bazı alanlarda ise akson dışına doğru evaginasyon gösterdiği ayırt edildi. Akson ile miyelin kılıf arasında vakuollerin meydana geldiği, birçok aksonda organellerde dejeneratif değişikliklerin olduğu dikkati çekti. Aksoplazmadaki nörotübül ve nörofilamanların dağılmış olduğu görüldü. Bazı sinir liflerinde ise akson etrafını saran Schwann hücrelerinde çekirdekte heterokromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyonun meydana geldiği dikkati çekti. Bunun dışında, sinir liflerinin aralarında aktif

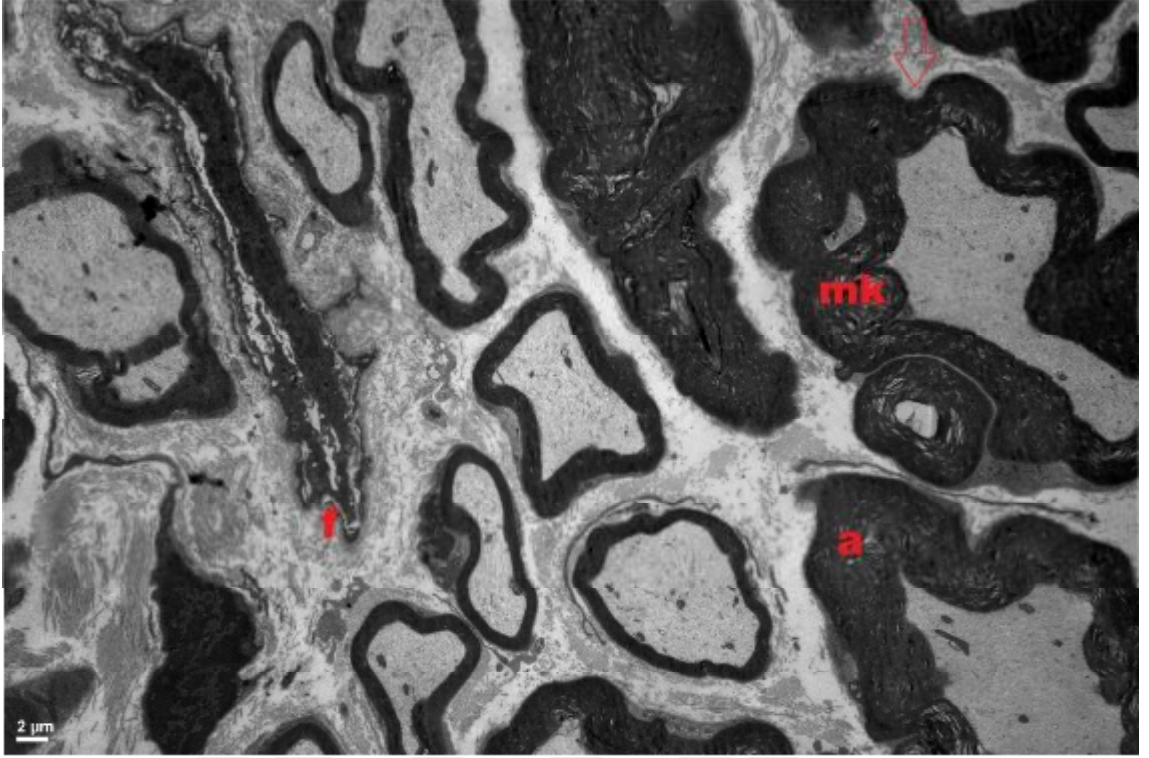
fibroblastların yanında, farklı yönlerde düzenlenmiş, kollajen liflerden zengin fibröz bağ dokusunun artışı da izlendi (Şekil 36).



Şekil 36. Miyelinli sinir liflerinde (a) yoğun dejeneratif değişiklikler izlenmektedir. Miyelin kılıf (mk) lamellar yapısının harabiyete uğradığı görülmektedir. Bazı alanlarda miyelinli aksonların ince yapılarının tamamen bozulduğu (ok) ayırt edilmektedir. Schwann hücrelerinde (Sh) çekirdekte (c) heterokromatin artışı izlenmektedir. Kol; kollajen lifler. Ba r: 2 µm.

Grup 4: Nöropati + MKH Grubu

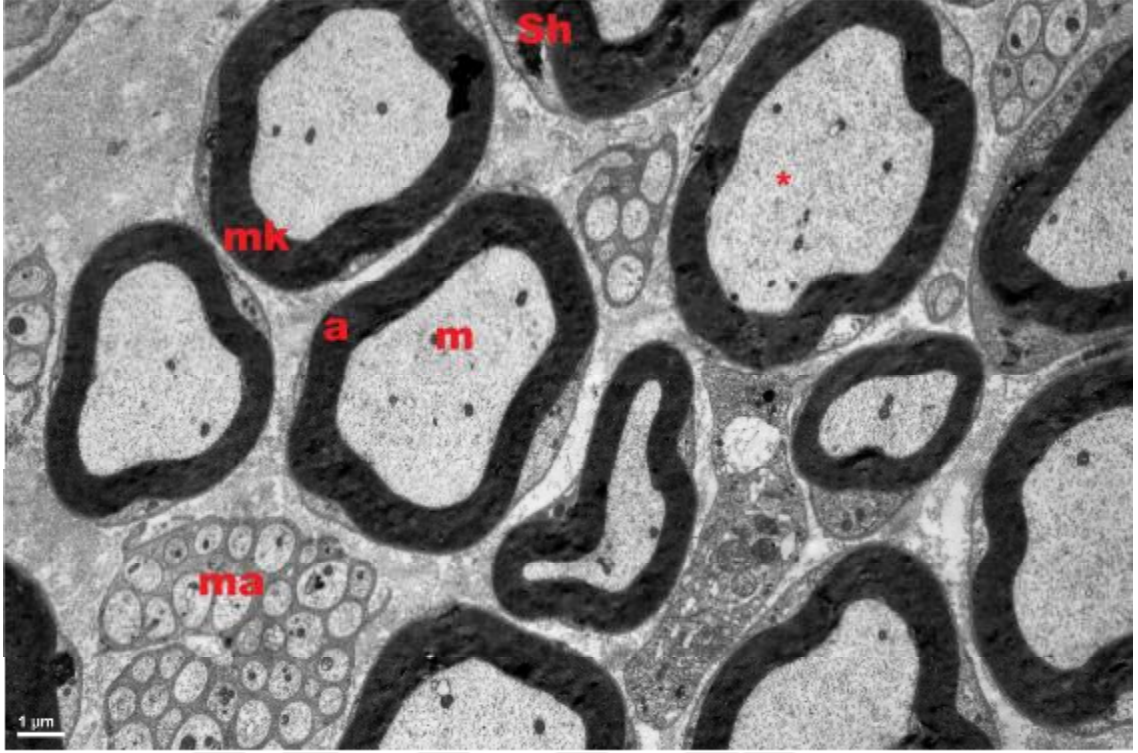
Nöropati oluşturulduktan sonra MKH transplantasyonu yapılan bu gruba ait siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik incelenmesinde çoğu alanda miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinde aksoplazmada organel harabiyetine rastlansada nöropati grubuna oranla aksoplazmadaki dejeneratif değişikliklerin nispeten azalmış olduğu görüldü. Miyelin kılıfta lamellar yapıda ayrılmalar, akson ve miyelin kılıf arasında büzüşmeler dikkat çekiciydi. Miyelin kılıfın birçok alanda akson içerisine doğru invajine olduğu izlendi. Aksonları çevreleyen Schwann hücrelerinde çekirdeğin oldukça hiperkromatik olduğu, bazı alanlarda sitoplazmalarda vakuollerin varlığı ayırt ediciydi (Şekil 37).



Şekil 37. Miyelinli sinir liflerinde (a) miyelin kılıftan (mk) dejeneratif değişiklikler izlenmektedir. Miyelin kılıfın lamellar yapısının bozulmuş olduğu (oklar), miyelinin akson içerisine invajinasyonlar ve akson dışına evaginasyonlar yaptığı görülmektedir. Sinir liflerinin arasında fibroblast (f) ve kollajen lifler (kol) izlenmektedir. Bar: 2 μ m.

Grup 5: Nöropati + Adrenalin ile Uyarılmış MKH Grubu

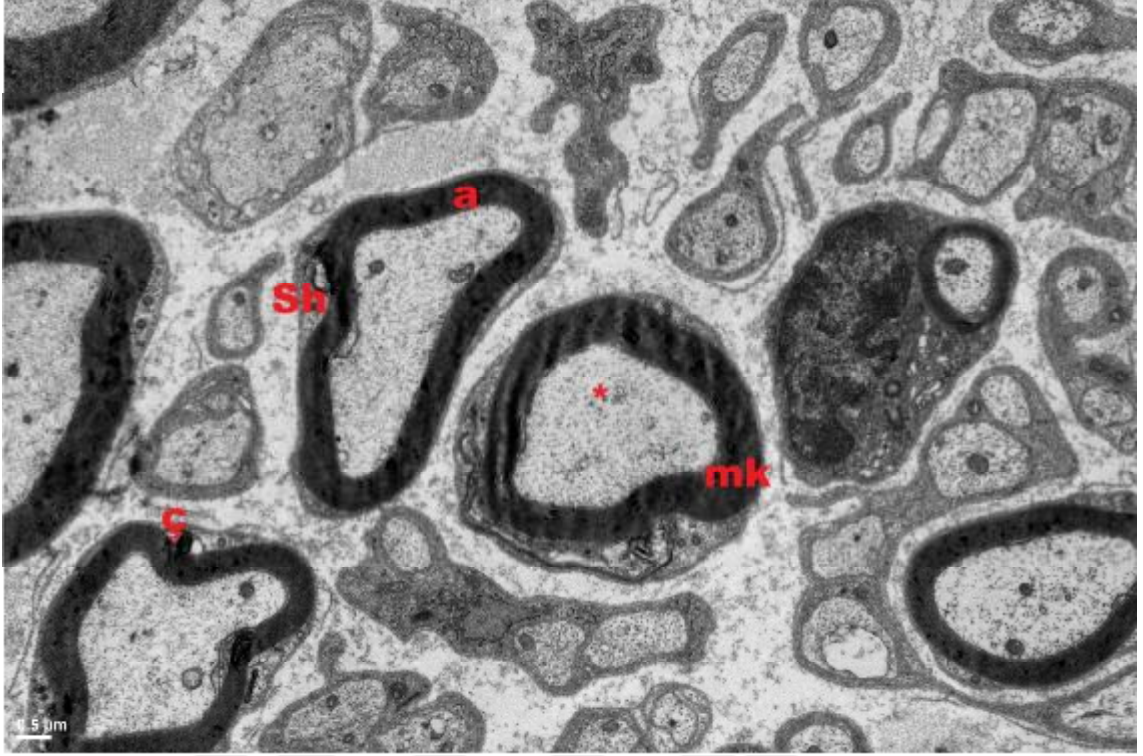
Nöropati oluşturulduktan sonra adrenalinle uyarılan MKH transplantasyonu yapılan gruba ait siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik olarak incelenmesinde bazı miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfta hafif dejeneratif değişiklikler izlenmekle birlikte birçok miyelinli sinir lifinde gerek miyelin kılıfların gerekse aksoplazmadaki mitokondriyon, nörotübül ve nörofilamanlar gibi organellerin normal yapılarının çoğu alanlarda korunmuş olduğu dikkati çekti. Schwann hücrelerinin miyelinli ve miyelinsiz aksonları sarmış oldukları izlendi. Schwann hücrelerinde bazı alanlarda çekirdekte heterokromatin artışı ve sitoplazmada vakuolizasyon gibi değişiklikler izlense de genel olarak bu hücrelerin normal ince yapılarını koruduğu görülmekteydi. Sinir liflerinin aralarında kollajen liflerin varlığı ayırtedilmekteydi (Şekil 38).



Şekil 38. Nöropati MKH+Adrenalin grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir lifleri (a) ve miyelinsiz sinir lifleri (ma) izlenmektedir. Aksoplazmada mitokondriyonlar (m), nörotübül ve nörofilamanlar (*) normal yapıda görülmektedir. Akson etrafındaki miyelin kılıf (mk) normal lamellar yapısını korumaktadır. Schwann hücrelerinin (Sh) ince yapılarını korumuş olduğu ayırtedilmektedir. Bar: 1 µm

Grup 6: Nöropati + Adrenalin+ Propranolol ile Uyarılmış MKH Grubu

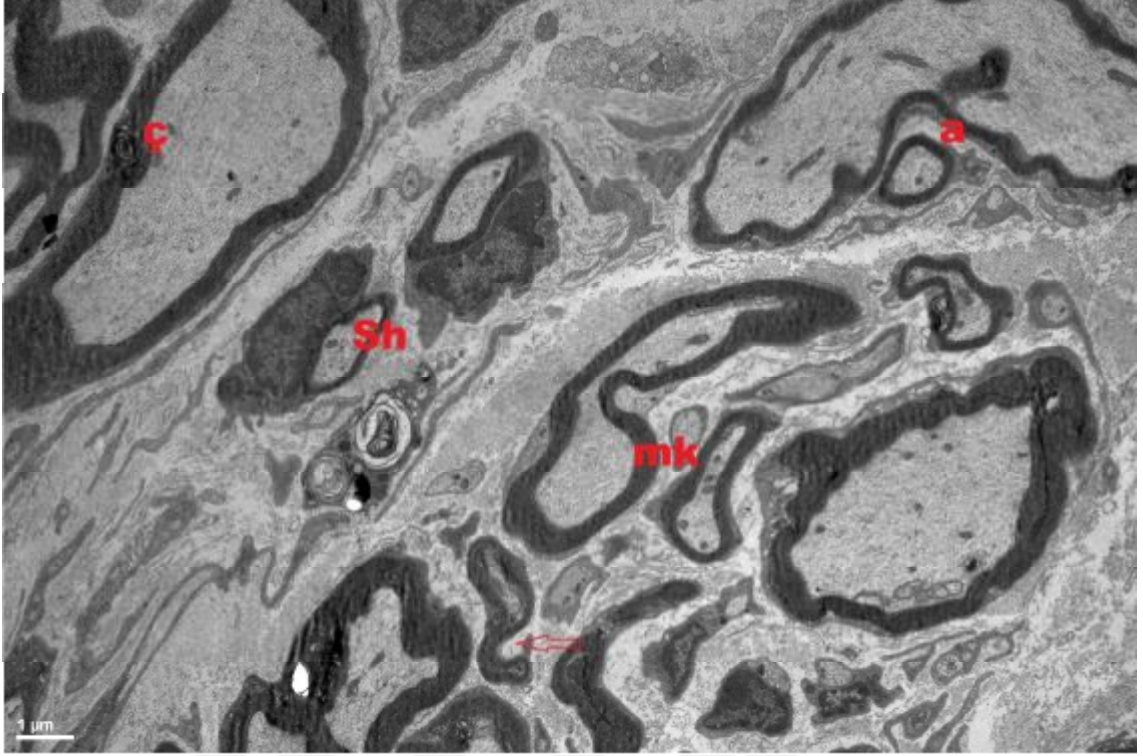
Nöropati oluşturulduktan sonra adrenalin+propranolol ile uyarılmış MKH transplantasyonu yapılan gruba ait siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik olarak incelenmesinde bazı alanlarda miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf lamellar organizasyonunda dejeneratif değişiklikler izlenmekle birlikte genel olarak sinir liflerinin normal ince yapılarını korumuş oldukları dikkati çekti. Aksoplazmada organellerde minimal değişikliklere rastlansada çoğu alanda aksonların normal yapılarını korudukları görüldü. Miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerini saran Schwann hücrelerinde çekirdekte heterokromatin artışı ile sitoplazmalarında vakuollerin varlığı izlendi. Bununla birlikte Schwann hücrelerinin de çoğu alanda normal ince yapıda oldukları ayırtedildi. Sinir liflerinin aralarında kollajen liflerin varlığı izlendi (Şekil 39).



Şekil 39. Nöropati MKH+Adrenalin+Propranolol grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir lifleri (a) miyelin kılıftaki (mk) hafif değişiklikler dışında normal ince yapıda izlenmektedir. Schwann hücrelerinde (Sh) hiperkromatik çekirdek (ç) görülmektedir. Aksoplazmada nörotübül ve nörofilamanlar (*) normal olarak izlenmektedir.

Grup 7: Nöropati + Adrenalin + Fentolamin ile Uyarılmış MKH Grubu

Nöropati oluşturulduktan sonra adrenalin+fentolamin ile uyarılmış MKH transplantasyonu yapılan gruba ait siyatik sinir dokularının elektron mikroskopik olarak incelenmesinde çoğu alanda miyelinli sinir liflerinde aksoplazmada nörotübül ve nörofilaman yapılarının düzensizleştiği, aksonu saran miyelin kılıfın konsantrik lamellar yapısında dejeneratif değişiklikler olduğu görüldü. Bazı alanlarda miyelin kılıf lamellerinin birbirinden ayrılmış olduğu izlendi. Miyelinli ve miyelinsiz aksonları saran Schwann hücrelerinin hiperkromatik çekirdeğe sahip oldukları, sitoplazmik organellerinin fokal dejeneratif değişiklikler dışında genellikle normal histolojik yapıda olduğu dikkati çekti (Şekil 40).



Şekil 40. Nöropati MKH+Adrenalin+Fentolamin grubuna ait siyatik sinir dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinde (a) miyelin kılıfta (mk) invajinasyon, evajinasyon, lamellar yapıda bozulmalar (oklar) gibi dejeneratif değişiklikler izlenmektedir. Schwann hücrelerinin (Sh) çekirdeğinde (ç) heterokromatin artışı görülmektedir. Kol; kollajen lifler. Bar: 1 µm.

4.6.4. Akson Çapı Ölçümleri

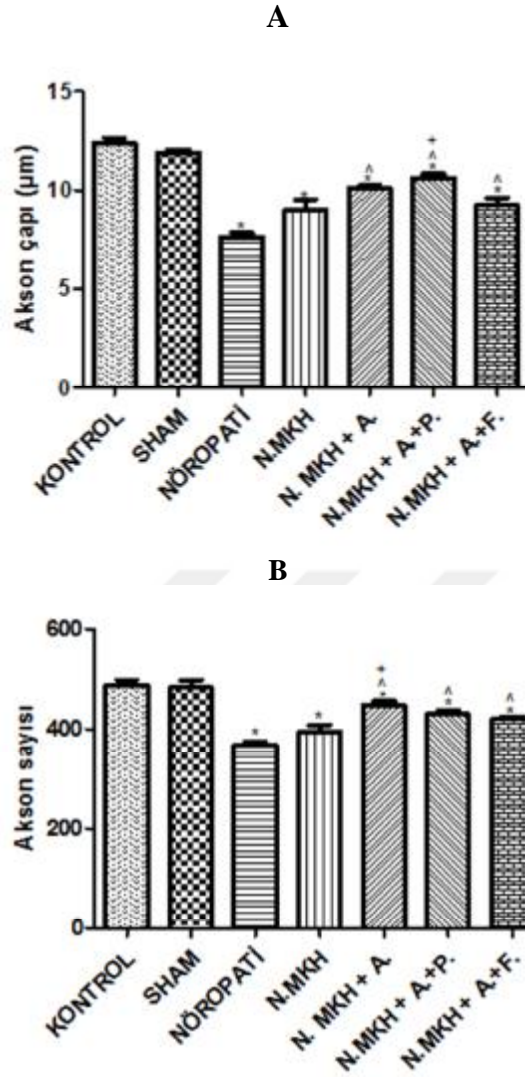
Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH + A., N.MKH + A.+P. ve N.MKH +A.+F. gruplarında miyelinli sinir liflerinin akson çapı ölçüm sonuçları sırasıyla; $12,37 \pm 0,46 \mu\text{m}$, $11,87 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $7,61 \pm 0,34 \mu\text{m}$, $8,99 \pm 0,92 \mu\text{m}$, $10,08 \pm 0,24 \mu\text{m}$, $10,63 \pm 0,33 \mu\text{m}$, $9,23 \pm 0,65 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Nöropati grubunun akson çapının kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. Nöropati grubuyla, N.MKH grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. Ancak N.MKH + A., N.MKH + A.+ P. ve N.MKH + A.+F. gruplarıyla, Nöropati grubu karşılaştırıldığında akson çaplarında anlamlı artış olduğu belirlendi. Ayrıca N.MKH + A.+P. grubundaki akson çapının N. MKH grubuna göre arttığı görüldü (Çizelge 5, Şekil 41.A).

4.6.5. Akson Sayısı Ölçümleri

Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH + A., N.MKH + A.+P. ve N.MKH + A.+F. gruplarında miyelinli sinir liflerinin akson sayısı ölçümleri sırasıyla; 486±30,8, 482,8±38,2, 367,5±20,4, 393,5±37,8, 447,1±22,5, 429,1±23,8 ve 419,3±14,2 olarak tespit edildi. Nöropati grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında akson sayısında anlamlı azalma olduğu ortaya kondu. Nöropati grubuyla, N.MKH grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. Ancak N.MKH + A., N.MKH + A.+P. ve N.MKH + A.+F. gruplarıyla, Nöropati grubu karşılaştırıldığında akson sayılarında anlamlı artış bulundu. Ayrıca N.MKH + A. grubundaki akson sayısının N. MKH grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (Çizelge 5, Şekil 41.B.).

Çizelge 5. Akson çapı ve akson sayısı karşılaştırmalı tablosu. Akson sayısı ve akson çapı ölçümlerinde; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05). + : N. MKH grubundan anlamlı olarak farklı (p<0.05).

Gruplar	Akson Sayısı	Akson Çapı (µm)
Kontrol	486	12,37
Sham	482,8	11,87
Nöropati	367,5*	7,6*
N.MKH	393,5*	8,99*
N.MKH + A.	447,1* ^{^+}	10,08* [^]
N.MKH + A.+P.	429,1* [^]	10,63* ^{^+}
N.MKH + A.+F.	419,3* [^]	9,23* [^]

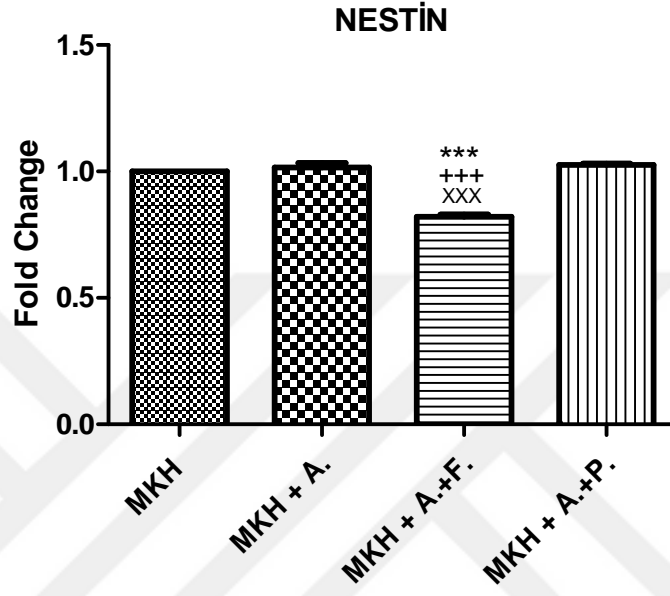


Şekil 41. Kontrol, Sham, Nöropati, N.MKH, N.MKH+A, N.MKH+A+P, N.MKH+A+F gruplarının akson çapı ve akson sayısı ölçümleri. **A.** Akson çapı ölçümlerinde; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). + : N. MKH grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). **B.** Akson sayısı ölçümlerinde; *: Kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). ^: Nöropati grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$). + : N. MKH grubundan anlamlı olarak farklı ($p<0.05$).

4.7. Nöronal Belirteç Ölçümü

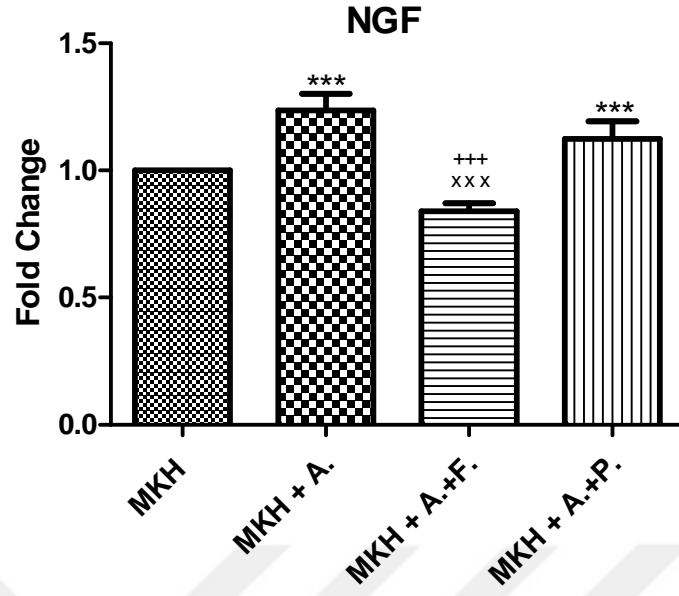
Hücrelerde bulunan nöronal hücre belirteçleri olan Nestin, NGF, Tubb3 mRNA ekspresyonlarında gruplar arasında değişiklikleri saptamak amacıyla özgül mRNA gen bölgesini temsil eden primerler kullanılarak RT-qPCR ölçümleri yapıldı ve fold change (katlı değişim) sonuçları değerlendirildi. Threshold cycle (CT) değerlerinin referans gen (housekeeping gen, HKG) β -Actine göre normalizasyonu ve fold change hesaplamaları yapıldı.

Nestin için yapılan çalışmada; MKH kontrol (MKH), MKH + Adrenalin (MKH +A.), MKH +Adrenalin+Fentolamin (MKH +A.+F.) ve MKH + Adrenalin+Propranolol (MKH + A.+P.) gruplarındaki fold change değerleri sırasıyla; 1, 1,02±0,03, 0,82±0,02, 1,03±0,01 olarak bulundu. MKH + A.+F. grubu fold change oranında MKH, MKH + A. ve MKH + A.+P. gruplarına göre anlamlı derecede bir azalma görüldü (Şekil 42).



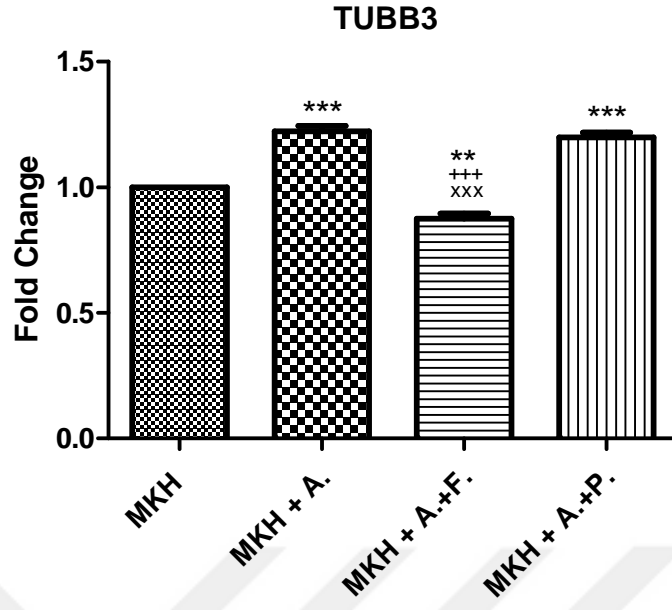
Şekil 42. MKH, MKH+A, MKH+A+P, MKH+A+F gruplarında Fold Change değerlendirilmesi; *** MKH grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001). +++ MKH+Adrenalin grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001). xxx MKH +Adrenalin+Propranolol grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001).

NGF için yapılan çalışmada; MKH, MKH + A., MKH + A.+F. ve MKH + A.+P. gruplarındaki fold change değerleri sırasıyla; 1, 1,23±0,13, 0,84±0,06, 1,12±0,14 olarak bulundu. NGF değerlerinde; MKH + A. grubunda, MKH grubuna göre anlamlı bir artış tespit edildi. Ancak MKH + A.+F. grubunda, MKH +A. ve MKH +A+P. gruplarına göre bu oranda anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 43).



Şekil 43. MKH, MKH+A, MKH+A+P, MKH+A+F gruplarının Fold Change değerlendirilmesi; *** MKH –MKH+Adrenalinde anlamlı artış ($p<0,001$). +++ MKH+Adrenalin – MKH +Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma ($p<0,001$). ^{xxx}MKH +Adrenalin+ Propranolol – MKH+Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma ($p<0,005$). ***MKH – MKH +Adrenalin+Propranololde anlamlı artış ($p<0,001$).

TUBB3 için yapılan çalışmada; MKH, MKH + A., MKH + A.+F. ve MKH + A.+P. gruplarındaki fold change değerleri sırasıyla; 1, $1,22\pm0,04$, $0,88\pm0,04$, $1,20\pm0,04$ olarak bulundu. TUBB3 değerlerinin; MKH + A. grubunda, MKH grubuna göre anlamlı arttığı tespit edildi. Ancak MKH + A.+F. grubunda MKH, MKH +A. ve MKH +A.+P. grubuna göre; anlamlı azalma görüldü (Şekil 44).



Şekil 44. MKH, MKH+A, MKH+A+P, MKH+A+F gruplarının Fold Change değerlendirilmesi; *** MKH – MKH+Adrenalinde anlamlı artış ($p<0,001$). ** MKH – MKH+Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma ($p<0,01$). *** MKH – MKH+Adrenalin+Propranololde anlamlı artış ($p<0,001$). +++ MKH+Adrenalin – MKH+Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma ($p<0,001$). xxx MKH + Adrenalin+Propranolol – MKH + Adrenalin+Fentolaminde anlamlı azalma ($p<0,001$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mezenkimal kök hücreler (MKH), farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetenekleri, migrasyon ve proliferasyon özellikleri nedeniyle çeşitli nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde araştırılmaktadır¹¹². MKH'lerin dejenerasyon gelişen dokulardaki etkileri, birçok sistemin kontrolü altında gerçekleşmekte ve bu sistemler MKH'lerin proliferasyon ve fonksiyonlarını etkileyebilmektedir. MKH'leri etkileyen sistemlerden biri kolinerjik sistemdir. Kolinerjik uyarılan MKH'de muskarinik reseptörlerin ekspresyonunun ve MKH proliferasyonunun arttığı gösterilmiştir¹¹³. Hoogduijn ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, kolinerjik uyarının hücre içi sinyal yollarını tetiklediği, hücre içi Ca²⁺ seviyesinin arttığı ve bunun sonucunda MKH'lerin proliferasyon ve migrasyonunun etkilendiği saptanmıştır^{114,115}. MKH'leri etkileyen bir diğer önemli sistemde, adrenerjik sistemdir²⁵. Adrenerjik sistemin MKH'ler üzerinde etkisini araştıran kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Adrenerjik sistemin agonist ve antagonistleriyle uyarılan MKH'lerin çeşitli sistemler üzerindeki tedavi edici etkisini inceleyen çalışma sayısı da çok azdır. Ayrıca periferik sinir hasarı sonucu gelişen nöropati ve nöropatik ağrı tablosunda adrenerjik uyarılan MKH'lerin ve bu hücrelerden ekspresse olan nöronal belirteçlerin etkisini araştıran bir çalışma ise bulunmamaktadır. Çalışmamızda farelerde parsiyel sinir ligasyonu modeliyle oluşturduğumuz periferik nöropati tablosunda, adrenerjik uyarılan MKH'leri uygulayarak, MKH'lerin hasarlı doku bölgesine migrasyonunu ve proliferasyonunu, soğuk allodini ve motor fonksiyon testleriyle değerlendirdik. Ayrıca adrenerjik uyarılan MKH'lerin hasarlı sinir ve kas dokusu üzerine rejeneratif etkisini, histopatolojik inceleme yaparak, sinir lifi sayısı ve çapını ölçerek tespit ettik. Adrenerjik uyarılan MKH'lerden salınan Nestin, Nöronal büyüme faktörü ve β -III Tübülün gibi nöronal belirteçlerin, MKH'lerin proliferasyonu, migrasyonu üzerindeki rolünü araştırdık.

Çalışmamızda, periferik sinir hasarı oluşturulan deney hayvanlarında adrenoseptör agonisti adrenalin (1 μ M), β -adrenoseptör antagonisti propranolol (1 μ M) ve α -adrenoseptör antagonisti fentolamin (1 μ M)'le uyarılmış mezenkimal kök hücrelerin uygulanması sonucu soğuk allodini eşiğinin yükseldiği ve motor fonksiyon sürelerinin zamana bağlı olarak arttığı tespit edildi. Soğuk allodini süresinin α -adrenoseptör blokajının yapıldığı grupta, nöropatili gruba göre arttığı (antiallodinik

etki), ancak adrenerjik sistem agonisti adrenalin ve β -adrenoseptör antagonisti propranolol ile MKH stimülasyonu yapılan gruplara göre daha düşük olduğunu gösterildi. Ex vivo olarak nestin, nöronal büyüme faktör ve β -III Tübülün gibi nöronal belirteçlerin mRNA ekspresyonlarının, α -adrenoseptör blokajının yapıldığı grup hariç, adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'li gruplarda, sadece MKH uygulanan gruptan fazla olduğu saptandı. Morfometrik incelemede, MKH ve adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'li gruplarda sinir akson sayısı ve çapının nöropati grubuna göre arttığı belirlendi. Histopatolojik incelemelerde, α -adrenoseptör antagonistiyle uyarılmış MKH'lerin uygulandığı grup hariç diğer tüm MKH uygulanan gruplarda sinir-kas dokusunda nöropatili gruba göre iyileşme ve inflamasyonda rol alan hücre sayısında azalma olduğunu saptandı. Sinir kas dokusunda görülen bu iyileşmenin adrenerjik sistem agonisti adrenalin ve β -adrenoseptör antagonisti propranolol ile uyarılmış MKH'lerin uygulandığı gruplarda daha fazla görüldüğü tespit edildi.

Çalışmamızda öncelikle fare kemik iliğinden elde ettiğimiz hücrelerin MKH olduğunu göstermek amacıyla bazı belirteçler kullandık. Mezenkimal kök hücre tanımlanmasında tespit edilen birçok belirteç bulunmaktadır. Bu tanımlamalarda MKH için genellikle CD105, CD166, CD54, CD90 ve CD73 gibi pozitif belirteçler kullanılırken, CD34, CD14 ve CD45 gibi hematopoetik belirteçler ise negatif olarak belirlenmektedir¹¹⁶. Bu çalışmada kemik iliğinden elde ettiğimiz MKH'lerin tanımlanması amacıyla, akan hücre ölçer ile adezyon belirteçleri olan CD73, CD105 ve hematopoetik hücre belirteçleri olan CD34, CD45'in analizleri yapıldı. Fare kemik iliğinden elde ettiğimiz MKH'lerde hematopoetik belirteçler olan CD34, CD45 negatif ve adezyon belirteçleri CD73, CD105 ise pozitif olarak saptandı. Çalışmalarda kullanılan hücrelerin MKH olduğunu tespit etmek için kullanılan bir başka kriter ise bu hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmasını belirlemektir. Yapılan çalışmalarda MKH'lerin adipojenik farklılaşmasını belirlemek için Oil Red-O boyası ve osteojenik farklılaşma için Alizarin Red-S boyası kullanılmaktadır^{116,117}. Çalışmamızda MKH'leri Oil Red-O boyası ve Alizarin Red-S boyası ile boyayarak, adipojenik ve osteojenik farklılaşmaların olduğunu gösterdik. Böylece MKH'lerin tanımlayıcı hücre belirteçleri açısından genel kabul gören kriterlere uygun özelliklere sahip olduğunu belirledik. MKH'lerin in-vivo olarak tanımlanması ve lezyonlu alana migrasyonunu tespit etmek

amacıyla birçok işaretleyici kullanılmaktadır. Siyatik sinir hasarı geliştirilen sıçanlarda PKH-26 ile işaretlenmiş MKH'lerin hasarlı sinir bölgesine ve dorsal kök ganglionlarına göç ettiği gösterilmiştir¹¹⁸. Bir başka çalışmada ise siyatik sinir ligasyonu yapılan farelere kontralateral hemisferde lateral serebral ventrikül içine Vybrant Dil (1,1'-diocadecyl-3,3,3',3' tetramethylindocarbocyanine perchlorate) boyasıyla işaretlenmiş MKH'ler enjekte edilmiştir. Sinir hasarının olduğu tarafta, ipsilateral hemisferde işaretli MKH'ler tespit edilmiş kontralateral hemisferde ise tespit edilememiştir, böylece MKH'lerin hasarlı doku bölgesinde yerleştiği gösterilmiştir¹¹⁹. Çalışmamızda parsiyel siyatik sinir ligasyonu yaparak periferik nöropati oluşturduğumuz farelere Vybrant Dil (1,1'-diocadecyl-3,3,3',3' tetramethylindocarbocyanine perchlorate) boyasıyla işaretlediğimiz MKH'leri uyguladık. Bu hücrelerin özellikle sinir liflerinin dejenere bölgesine ve daha az oranda da kas dokusu içine yerleştiğini tespit ettik. Elde ettiğimiz bu sonuç hasarlı sinir bölgesine yerleşen hücrelerin MKH'ler olduğunu göstermektedir.

Periferik sinir hasarı ve nöropatik ağrı tedavisinde MKH'nin etkisinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Hung-Chuan ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada siyatik sinir kesisi yapılarak periferik nöropati oluşturulan sıçanlarda, MKH uygulamasından 8 hafta sonra yapılan fonksiyonel ölçümler, elektrofizyolojik ve histopatolojik incelemelerle MKH'lerin hasarlı bölgede nöronal hücrelere dönüştüğü, proliferere olduğu ve sinir rejenerasyonunu arttırdığı gösterilmiştir¹²⁰. Bir başka çalışmada ise, siyatik sinir ligasyonu yapılan erkek CD-1 farelere human-mezenkimal kök hücre uygulaması yapıldıktan sonra 11.günden başlanıp, 90.güne kadar nosiseptif davranışlar (mekanik allodini ve termal hiperaljezi) ve motor fonksiyonlar değerlendirilmiş bunun sonucunda nöropatili gruba göre MKH uygulanan grupta allodini eşiğinin arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir düzelme olduğu tespit edilmiştir. MKH uygulanan grupla, nöropatili grup arasında motor fonksiyonların değerlendirilmesi sonucunda anlamlı bir fark tespit edilememiştir¹²¹. Yousefifard ve ark. spinal kord hasarı oluşturdukları sıçanlara, insan kemik iliğinden ve umbilikal korddan elde ettikleri MKH'leri, spinal kord içine uyguladıktan sonra motor fonksiyon, mekanik allodini, soğuk allodini, mekanik ve termal hiperaljeziyi değerlendirmişlerdir. MKH uygulanan grupta nöropati grubuna göre tüm testlerde anlamlı düzelme saptamışlardır. MKH'lerin bu rejeneratif etkisinde, sitokin düzeyinin azalması, büyüme faktörlerinin salınması ve angiogenezisin rolü olabileceği savunulmuştur¹²². Daha önce yaptığımız

çalışmada, fare kemik iliğinden elde edilen MKH'ler cerrahi işlemde 15 gün sonra parsiyel siyatik sinir ligasyonu yapılan hayvanlara uygulandı ve belirli aralıklarla 140 gün boyunca soğuk allodini ölçümlerinde zamana bağlı olarak allodini eşliğinin arttığı tespit edildi. Deneyin sonunda sinir-kas preparatlarında elektrofizyolojik ölçümler ve histopatolojik incelemelerde MKH uygulanan gruplarda nöropatili gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzelme olduğunu tespit edildi¹²³. Lokal ve sistemik MKH uygulamasının periferik nöropatideki etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırdığımız diğer çalışmamızda, fare kemik iliğinden elde edilen MKH'leri parsiyel siyatik sinir ligasyonu yapılan hayvanlara, cerrahi işlemde 24 saat sonra lokal ve sistemik uygulayarak 10 hafta boyunca aralıklı olarak soğuk allodini ölçümleri sonucu MKH uygulanan grupta nöropatili gruba göre allodini eşliğinin arttığı tespit edildi. Elektrofizyolojik ölçümler ve histopatolojik incelemelerde, MKH uygulanan gruplarda nöropati grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzelme saptandı. Sistemik uygulamada elde edilen sonuçların, lokal uygulamada elde edilenlere göre daha iyi olduğu ortaya kondu¹²⁴.

MKH'lerin periferik nöropati tablosunda uygulanması sonucu ortaya çıkan rejenerasyon ve nöropatik ağrıdaki düzelmede, MKH'lerin sahip olduğu birçok özelliğin rolü bulunmaktadır. MKH'lerin farklı hücelere dönüşebilme kabiliyeti, migrasyon ve proliferasyon yetenekleri, sinir dokusunun rejenerasyonunun ve fonksiyonlarının düzelmesini sağlayan ana özellikleridir. MKH'lerin çeşitli hücelere farklılaşma kabiliyeti olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir, MKH'lerin uygulandıkları yerden hasarlı sinir bölgesine giderek orada, Schwann ve astrosit gibi nöronal hücelere dönüşebildiği ve sinir rejenerasyonunu sağladığı gösterilmiştir^{125,126}. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, siyatik sinir kesisi yapılarak geliştirilen periferik nöropati modelinde immunohistokimyasal incelemede PKH-26 ile işaretlenmiş MKH'ler sinir hücrelerinin hasarlı sinir bölgesine göç ederek burada rejenerasyonu sağladığı, zamana bağlı olarak miyelinizasyonun ve rejenere nöronal lif sayısını artırdığı tespit edilmiştir¹¹⁸. Farklı bir çalışmada, sıçan siyatik sinir ligasyonu yapıldıktan sonra uygulanan MKH'lerin dorsal kök ganglionlarına yerleştiği tespit edilmiştir¹²⁷. Bu sonuçlar MKH'lerin hasarlı doku bölgesine göç ederek, doku ile uyumlu hücelere dönüşerek ve proliferasyon olarak, hasarlı dokunun iyileşmesini sağladığını göstermektedir.

MKH'lerin migrasyon, farklılaşma ve proliferasyon özelliklerinin oluşmasında birçok mekanizma rol oynamaktadır. MKH'lerde hücre içi ve dışı sinyal yollarının aktivasyonu bu hücrelerin farklılaşma, migrasyon ve proliferasyon yeteneklerini etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada MKH'lerde hücre içi sinyal yollarından MAP ve hücre dışı sinyal yolağı ERK aktivasyonunun, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasında rolü oldukları gösterilmiştir¹²⁸. Farklı bir çalışmada ise ekstraselüler sinyal-düzenleyen kinase-1 ve 2, MKH duyarlı protein fosfataz kalsineurin'ün aktivasyonu, MKH proliferasyonun arttığı belirlenmiştir¹²⁹. Cui ve ark. yaptığı çalışmada, intraserebral hemoraji oluşturulan deney hayvanlarında kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin uygulanması sonucu aksonal iyileşme ve nörolojik bulguların düzeltilmesinde ERK1/2 ve PI3K/Akt sinyal yollarının rolü olduğu saptanmıştır¹³⁰. Çalışmamızda MKH ve uyarılmış MKH'lerin uygulandığı gruplarda fonksiyonel testlerden ve histopatolojik incelemelerden elde edilen bulguların nöropatili gruba göre daha iyi olması, MKH'lerde hücre içi sinyal yollarının uyarılması, kinaz aktivitesinin artması kalsiyum iyon seviyesinin yükselmesi gibi mekanizmaların rol oynadığını bize düşündürmektedir. Adrenerjik sistem agonisti adrenalin ve β -adrenoseptör antagonisti propranolol ile uyarılmış MKH'lerin uygulandığı gruplarda bulguların, α -adrenoseptör antagonistiyle uyarılmış MKH'lerin uygulandığı gruplara göre daha iyi olması, α -adrenoseptör blokajı ile hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunun daha az, protein ekspresyonunun ve iyon konsantrasyonunun daha düşük olabileceğini düşündürmektedir.

MKH'lerin adrenerjik uyarılması sonucu bu hücrelerde DNA sentezi artmakta, reseptör ekspresyonları farklılaşmakta ve hücre içi yollar uyarılmakta, bu da hücrelerin proliferasyonunu arttırmaktadır. Li ve ark. β -adrenoseptörlerin agonisti olan isoproterenolun, fare kemik iliği MKH'lerinin osteojenik farklılaşması sırasında kalsiyum depozitlerinin artışına neden olduğunu ve farklılaşmış hücrelerde β_2 ve β_3 -adrenoseptörlere ait mRNA miktarlarında artışa sebep olduğunu tespit etmiştir. Bununla beraber hücrelerde cAMP konsantrasyonu ve protein kinaz A aktivitesinde de bir artış meydana geldiğini ve bu nedenle β_2 ve β_3 -adrenoseptörlerin cAMP/PKA yolu üzerinde osteogenezi arttırdığını belirtmişlerdir¹⁰⁴. Kim ve ark. adrenalin ile uyarılmış embriyonik kök hücrelerde DNA sentezinin arttığını ve non selektif α ve β adrenerjik antagonistlerle bu artışın bloklandığını göstermişlerdir²⁰. Benzer şekilde kemik iliğinden elde edilen MKH'lerde α_1 -adrenoseptörlerin norepinefrinle uyarılması sonucu DNA

sentezi artmış, non selektif α -adrenoseptör antagonisti fentolaminle bloklanmıştır. DNA sentezinin azalması hücre proliferasyonunun azalmasına yol açmaktadır²¹. Bosmann ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise, MKH'lerde adrenerjik reseptör agonistleri, özellikle β adrenerjik agonistlerin, akut akciğer hasarında tedavi edici ve inflamasyonu azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir¹³¹. Wong ve ark. propranololun MKH proliferasyonu üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğunu belirtmiştir. β adrenoseptör agonistlerinin MKH'lerde DNA sentezini artırdığı ve bu artışın fentolamin tarafından bloke edildiği gösterilmiştir¹³². Adrenerjik sistemin uyarılması sonucu MKH'lerde DNA sentezinin değişmesi, tıpkı MKH'lerde olduğu gibi hücrenin proliferasyonunu ve hasarlı dokunun rejenerasyonunu etkilemektedir, DNA sentezinin bloklanması hücre proliferasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda adrenerjik sistemin uyarılması sonucu ağrı eşiğinin yükselmesinde ve histopatolojik bulguların nöropati gruba göre daha iyi olmasında, α ve β - adrenoseptör uyarılmasına bağlı DNA sentezinin ve buna bağlı olarak hücre proliferasyonunun artışının rolü olduğu, α -adrenoseptör antagonistiyle uyarılmış MKH gruplarında adrenerjik agonist ve β -adrenoseptör antagonistle uyarılmış MKH gruplarına göre bu sentezin ve hücre proliferasyonunun daha az olduğu düşünülmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerde adrenerjik uyarıma bağlı olarak reseptör ekspresyonlarının değişmesi hücrenin proliferasyonu ve hücre içi mekanizmaların uyarılması açısından önem taşımaktadır. Pyotr ve ark. tarafından yapılan çalışmada noradrenalin ile uyarılmış MKH yüzeyinde genel olarak α_{1A} , α_{1B} , α_{2A} , α_{2B} , β_1 , β_2 ve β_3 adrenerjik reseptörlerin ekspresyonları artmışken, bu artışın özellikle α_{1A} için en fazla olduğu görülmüştür¹³³. Kotova ve ark. insan adipoz doku kaynaklı MKH'ler de α_{2A} , α_{1B} adrenoseptörlerin hücre içi Ca^{2+} düzeyinde değişikliklere neden olduğunu ve noradrenalin duyarlılığında α_{2A} adrenoseptörlerin α_{1B} reseptörlerine göre etkisinin daha fazla olabileceğini belirtmiştir¹³⁴. Hakuno ve ark. α_1 -adrenoseptörlerle birlikte β_1 ve β_2 -adrenoseptörleri eksprese ettiklerini RT-PCR ile tespit etmişlerdir. β -adrenoseptörler isoproterenol ile uyarıldıklarında cAMP konsantrasyonu artmış ve propranolol ile bloke edildiklerinde artışın inhibe olduğu gösterilmiştir¹³⁵. Maytalan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada adrenalin, propranolol ve fenoksibenzaminle uyarılan MKH'lerde hücrenin elde edildiği kaynağa ve pasaja bağlı olarak, α ve β -adrenoseptörlerin ekspresyonunun değiştiği, genel olarak α -adrenoseptörlerin blokajı ile β -adrenoseptör

ekspresyonun arttığı, β -adrenoseptör blokajı ile ise α -adrenoseptör ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Ayrıca adrenalin ve propranolol ile uyarılan hücrelerin proliferasyonunda artış gözlenirken, fenoksibenzamin ile uyarılan hücrelerin proliferasyonunda bazı pasajlarda azalış tespit edilmiştir²². Çalışmamızda adrenalin, propranolol ve fentolaminle uyarılan MKH'lerin uygulandığı gruplarda soğuk allodini ve motor fonksiyonlarda tespit edilen düzelme bulguları, uyarılmış MKH'lerin hasarlı doku bölgesine migrasyon ve proliferasyonunun rolü olabileceğini göstermektedir. Uyarılmış MKH'lerin bu etkisinde ise daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi DNA sentezinde ve hücre içi kalsiyum iyon girişinde yükselme, kinaz enzimlerinin aktivitesinin artma gibi mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir, bu konunun aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Çalışmamızda α -adrenoseptör antagonistiyle uyarılmış MKH'lerin uygulandığı gruptan elde edilen bulguların, adrenerjik sistem agonisti adrenalin ve β -adrenoseptör antagonisti propranolol ile uyarılmış MKH gruplarından elde edilen gruplara göre daha düşük olması, MKH içi mekanizmaların daha az gelişmesine ve buna bağlı olarak MKH proliferasyonunun daha az olmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Adrenerjik sistemin allodini fonksiyonu üzerinde rolü olduğu bilinmektedir. Periferik sinir hasarı sonucu hasarlı sinir bölgesinde, sinir liflerindeki sempatik filizlenmenin düzeyi pronosiseptif değişikliklere neden olmaktadır¹³⁶. Periferik sempatik sinir uçlarından noradrenalin salıverildiğinde, sağlıklı dokudaki allodinik etkisi çok azdır, ancak hasarlı veya inflamasyonun gözlemlendiği tablolarda ağrı üzerindeki etkisi belirgindir¹³⁷. Adrenerjik sistemde rol alan reseptörlerin allodinideki rolünü araştıran çalışmalarda α ve β -adrenoseptörlerin farklı fonksiyonları olduğu tespit edilmiştir. Yalcin ve ark. murinde oluşturdukları nöropatik ağrı modelinde klenbuterol, formoterol, metaproteronol ve prokaterol gibi β_2 agonistlerin kronik uygulanması sonucunda antiallodinik etkinin görüldüğünü, β_2 antagonist ICI 118,551 uygulananlarda bu etkinin oluşmadığını göstermişlerdir. Allodinide β_1 ve β_3 agonistlerinin ise uzun süreli uygulamalarda bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir¹³⁸. Yapılan bir çalışmada periferik sinir hasarı sonrası dorsal root gangliyonlarda α_{2A} adrenoseptör mRNA ekspresyonu artmış ve α_2 -adrenoseptör agonisti klonidinin nöropatik ağrıda analjezik etkinliği gösterilmiştir^{139,140}. Hajhashemi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da periferik sinir hasarı sonrası α_2 -adrenoseptörlerin ekspresyonunun arttığı ve nöropati

için kullanılan antinosiseptif etkili ilaçlarla α_2 -adrenoseptör antagonistinin birlikte uygulanması sonucunda ilacın antinosiseptif etkisinin azaldığı gösterilmiştir¹⁴¹. Kim ve ark. nöropatik sıçanlarda α -adrenoseptörlerin antagonisti fentolamin ve α_2 -adrenoseptörlerin antagonisti yohimbin ile yaptıkları araştırmada, fentolaminin allodiniyi azalttığını ancak yohimbinin etkilemediğini göstermişlerdir. α -adrenoseptörlere verilen yanıtta bu farklılığın, sıçanlarda soğuk allodini hassasiyetinin ve α -adrenoseptörlerin dansitesinin farklı olmasının rolünün olduğu belirtilmiştir¹⁴². Çalışmalardan elde edilen bulgular, α_2 -adrenoseptör agonistlerinin uygulanması ile ortaya çıkan etkinin, pek çok fizyopatolojik durumda ağrıyı azaltma ve α_1 -adrenoseptör agonistlerinin uygulanması sonucunda ağrı artma yönünde olduğunu göstermektedir¹⁴³. Çalışmamızda MKH ve adrenerjik agonisti ve α - ve β - adrenoseptör antagonistleri ile uyarılmış MKH'lerin uygulandığı gruplarda cold plate latensinin arttığı yani antiallodinik etkinin oluştuğunu tespit edildi. Ancak non selektif α -adrenoseptör antagonisti fentolaminle uyarılmış MKH uygulanan grupta antiallodinik etkinin, adrenerjik sistem agonisti adrenalin ve β -adrenoseptör antagonisti propranolol ile uyarılmış MKH gruplarına göre daha zayıf olduğu belirlendi. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, uyarılmış MKH'lerin antiallodinik etkisinin oluşmasında, hasarlı sinir dokusu bölgesinde MKH'lerin proliferasyonundaki artışın yanı sıra, nöronal filizlenmenin olduğu sinir ucundaki adrenoseptörlerin dansitesinin de rolü olduğunu düşündürmektedir. Deneylerden elde edilen bulgular, uyarılmış MKH'lerde α_2 -adrenoseptörlerin dansitesinin arttığını, antiallodinik etkinin oluşmasında α_2 -adrenoseptörlerin hakimiyeti olduğunu ve bu sebeple fentolaminle uyarılmış MKH grubunda antiallodinik etkinin azalmış olabileceğini düşündürmektedir.

İmmun sistem, fizyopatolojik ağrıların kontrolünde önemli rol oynamaktadır ve sempatik sistemin immün sistemin modülasyonunda önemli fonksiyonu olduğunda birçok çalışmada gösterilmiştir. Kota ve ark. beyin hasarı oluşturulmuş ratlarda propranolol ile uyarılmış MKH'lerin mikrogliya ve makrofaj hücre aktivasyonunu azalttığını ve kontrol gruplarına göre nöroenezisi artırdığını tespit etmişlerdir¹⁴⁴. Farklı bir çalışmada, MKH'lerin inflamasyonlu dokuda TNF- α , IL-1 β düzeylerinde azaltıcı ve IL-10 düzeylerinde artırıcı etkisinin olduğu, adrenalinle uyarılmış MKH'lerde sitokin düzeylerindeki bu değişimin daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Adrenalin ile uyarılmış MKH'ler hasarlı dokuda ödem ve hücrel bozulmalarda azalmaya neden olurken, pro-

inflatuvar sitokinleri dūřurerek inflamasyon miktarını azalttığı tespit edilmiřtir²⁵. İmmun sistemin modūlasyonunda ōzellikle β_2 , α_1 ve α_2 -adrenoseptōrler rol oynamaktadır, bu reseptōrlerin inhibisyonunun immun cevabın bozulmasına yol ağtığı bilinmektedir¹⁴⁵. Bu bulgular, çalışmamızda elde edilen sonuçlar ūzerinde immun sistemin etkisinin araştırılması gerekliliğini gōstermektedir. MKH'ler hasarlı dokuda apoptozisin inhibisyonuna, anjiogenezisin artmasına, mitozu uyararak hūcre proliferasyonunun artmasına ve doku hasarının daha çabuk iyileşmesine neden olmaktadır. MKH'lerin bu etkisi hasarlı dokuda direkt farklılaşmasından farklı bir etkidir¹⁴⁶.

Nōronal belirteçler olarak tanımladıđımız nōronal būyūme faktōrū, nestin, β -III Tūbūlin gibi bazı biyoaktif faktōrlerin varlıđı MKH'lerin nōronal hūcelere dōnūřūmūnū sađlamakta ve arttırmaktadır. Zang ve ark.'nın MKH'nin nōronal belirteçleri eksprese etme kapasitelerini arařtırdıkları bir çalıřmada nestin, β -III Tūbūlin ve nōronal būyūme faktōr ekspresyonlarının yūksek dūzeyde olduđunu gōstermiřlerdir¹⁴⁷. MKH'lerin elde edildiđi pasaja gōre bu salınım deđiřmektedir. MKH'lerin immatur formdayken nōronal belirteçleri daha fazla eksprese ettiđi, matur formda bu ekspresyonun azaldıđı ve būylece proliferasyonun deđiřebileceđi de gōsterilmiřtir¹⁴⁸. Farklılařmamıř MKH'lerde yapılan bir çalıřmada nōronal belirteçlerden nestin ve β -III Tūbūlin ekspresyonunun pasaja bađlı olarak deđiřtiđi belirlenmiřtir¹⁴⁹. Sıçanlarla yapılan bir çalıřmada, inme oluřturulan hayvanlara MKH uygulamasından sonra nōronal būyūme faktōrūnūn ve beyinden elde edilen būyūme faktōrūnūn lezyonlu būlgede apoptozisi engellediđi ve hūcrelerin hasarlı būlgeye gōūnū ve proliferasyonunu hızlandırdıđı tespit edilmiřtir¹⁵⁰. Tuttle ve ark. tarafından yapılan bir çalıřmada, NGF salınımında α -adrenoseptōrlerin etkinliđinin fazla olduđu gōsterilmiřtir. Fenilefrinin ($<1 \mu\text{M}$) dūřūk konsantrasyonda uygulanması sonucu α -adrenoseptōrlerin uyarıldıđı ve NGF salınımının arttıđı, fakat yūksek konsantrasyonda uygulandıđında ($10 \mu\text{M}$) β -adrenoseptōrlerin uyarıldıđı ve NGF salınımının azaldıđı tespit edilmiřtir. Propranolol uygulamasının β -adrenoseptōrlerin etkinliđini sonlandırdıđı ve NGF salınımında artıřa neden olduđu saptanmıřtır¹⁵¹. Bir diđer nōronal belirteç olan β -III Tūbūlin'in etkilerinin arařtırıldıđı bir çalıřmada, β -III Tūbūlin'in mikrotūbūllerin oluřumu için gerekli olduđu gōsterilmiřtir. β -III Tūbūlin ekspresyonundaki mutasyonun nōronal hūcrelerin morfolojisini ve fonksiyonunu

bozarak ciddi nöropatlere neden olabileceği saptanmıştır¹⁵². MKH'lerin nöronal hücrelere diferansiyasyonunda ve proliferasyonunda önemli bir rolü olan nestinle yapılan bir çalışmada, santral sinir sisteminde oluşturulan hasarda, nestin salınımı yüksek olan MKH'lerin hasarlı bölgedeki düzelmeyi daha iyi sağladığı tespit edilmiştir¹⁵³. Siyatik sinir hasarı oluşturulan sıçanlarda nestin ekspresyonu pozitif olan kök hücre uygulamalarında siyatik sinir rejenerasyonun arttığı görülmüştür¹⁵⁴.

Çalışmamızda adrenalin ve propranolol ile uyarılmış MKH uygulanan grupta nestin, nöronal büyüme faktörü ve β -III Tübülün düzeylerinin, MKH grubuna göre arttığı tespit edildi. Fakat fentolamin ile uyarılmış MKH uygulanan grupta nöronal belirteçlerin düzeyi MKH grubuna göre daha düşük bulundu. Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar düşük doz uygulanan adrenalinin nöronal belirteçlerin salınımını artırdığını, α -adrenoseptörlerin blokajının bu salınımın azalmasına neden olduğunu göstermektedir. Adrenerjik sistem agonisti adrenalin ve β -adrenoseptör antagonisti propranolol ile uyarılmış MKH'lerde nöronal belirteçlerin mRNA ekspresyonlarının artması sonucu, nöronal hücrelerin proliferasyonunun ve doku rejenerasyonunun arttığı düşünülmektedir.

Mezenkimal kök hücre çalışmalarında, hasarlı dokuya hücrelerin migrasyonu, proliferasyonu ve dokunun fonksiyonlarındaki düzelmeyi aydınlatmada histopatolojik incelemelerin rolü önem taşımaktadır. MKH uygulamaları sonucunda hasarlı sinir bölgesine yerleşen hücreler, burada Schwann hücrelerine dönüşmektedir. Schwann hücre sayısının artması sonucu sinir liflerinde bozulmuş miyelizasyon düzelmekte, sinir ucu filizlenmesi, bütünlüğü ve fonksiyonları artmaktadır. Sinir liflerinin sayısının, çapının ve myelinizasyonun düzelmesi sinaptik aralıkta iletinin artmasına ve efektör organda fonksiyonların ve morfolojinin iyileşmesine neden olmaktadır. Sinir liflerindeki bu iyileşmede sadece MKH'lerin hücre salınımı değil, büyüme faktörleri ve çevre dokudan salınan diğer biyoaktif faktörlerin de rolü bulunmaktadır^{155,156,157}. Çalışmamızda farelerden izole ettiğimiz sinir dokusunun morfometrik incelenmesi sonucu MKH ve uyarılmış MKH uygulanan gruplarda nöropati grubuna göre sinir lifi sayısı ve akson çapının arttığı saptanmıştır. Adrenoseptör agonisti adrenalin ile uyarılan grupta akson sayısının artması, sinir lifinin sayısının artmasında α ve β -adrenoseptörlerin rolü olduğunu, β -adrenoseptör antagonisti propranolol ile uyarılan grupta akson çapının artması, akson çapının belirlenmesinde α -adrenoseptörlerin rolü olabileceğini

düşündürmektedir. Çalışmamızda siyatik sinir ve solues kas dokularının ışık ve elektron mikroskopik incelenmesi sonucunda MKH ve uyarılmış MKH uygulanan gruplarda nöropati grubuna göre dokularda düzelmenin görülmesi, adreseptör agonisti adrenalın veya antagonisti propranolol ile uyarılan MKH'lerin uygulandığı gruplarda bu iyileşmenin daha fazla olması, α -adreseptör antagonisti fentolaminle uyarılan MKH'lerin uygulandığı gruplarda daha az olması, sinir hücrelerinin ve miyelin yapının gelişmesinde α -adreseptörlerin etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamız, periferik nöropati tablosunda adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleri uygulanan MKH uygulamasının tedavi edici potansiyelini gösteren ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz bulgular adrenerjik reseptör agonist ve antagonistleri uygulanan MKH'lerin hasarlı sinir bölgesine yerleşerek nöronal hücre proliferasyonunu artırdığını, bunun sonucunda sinir dokusunda rejenerasyonun olduğunu göstermektedir. Adrenalin veya propranolol ile uyarılan MKH'lerden, MKH'lere göre nöronal belirteçlerin mRNA ekspresyonunun daha fazla olması bu gruplarda doku rejenerasyonun MKH grubuna göre daha iyi olmasını sağlamıştır. Bu bulgu adrenalın veya propranolol ile uyarılan MKH'lerin, MKH'lere bir üstünlüğü olarak değerlendirilebilir. α -adreseptör antagonisti fentolaminle uyarılan MKH'ler de ise nöronal belirteçlerin daha az eksprese olması rejenerasyonun daha az gelişmesine neden olmuştur. Sinir rejenerasyonu sonucu adrenerjik agonisti ve α - ve β - adreseptör antagonistleri ile uyarılmış MKH'li gruplarda antiallodinik etki ve motor fonksiyonlarda kısmi iyileşme tespit edilmiştir. Bu bulgular adrenerjik reseptör agonistleriyle uyarılmış MKH'lerin periferik nöropati hastalığında tedavi amacıyla kullanılabileceğini düşündürmektedir. Adrenerjik reseptör agonistleriyle uyarılmış MKH'lerin tedavi amacıyla kullanılması periferik nöropati tablosunda kullanılan ilaç sayısında azalmaya bağlı olarak yan tesir görülme sıklığını da azaltabilir. Bulgularımız periferik nöropati gelişmiş hastalarda α -adreseptör antagonistlerinin kullanılmasının doğal MKH'lerin proliferatif ve rejeneratif etkilerini azaltabileceğini düşündürmektedir, dolayısıyla bu grup ilaçların kullanımına dikkat etmek gerekebilir. Ancak bu konudaki çalışmalar yetersizdir, örneğin adrenerjik uyarım yapılan MKH'lerin immun sistem ve diğer biyoaktif moleküller üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Bu konuda daha fazla çalışma yapılmasına gerek vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) hasarlı doku bölgesine migrasyonu ve proliferasyonu konusunda kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Adrenerjik agonist ve antagonistlerle uyarılmış mezenkimal kök hücrelerin periferik sinir hasarı üzerindeki etkisini çeşitli parametreleri inceleyerek açıklayan bir çalışma ise bulunmamaktadır.

Çalışmamızda farelerde tek taraflı parsiyel siyatik sinir ligasyonu yaparak periferik nöropati oluşturuldu. Periferik nöropati ve nöropatik ağrı geliştirilen hayvanların hasarlı doku bölgesine mezenkimal kök hücre ve adrenalin, propranolol veya fentolamin uygulanan mezenkimal kök hücre enjeksiyonu yapıldı. Deney gruplarımızda 4.,6.,8. ve 10.haftada cold plate latensi ve rotarod testiyle sırasıyla soğuk allodini ve motor fonksiyonlar incelendi. MKH ve uyarılmış MKH uygulanan deney gruplarında cold plate latensi süresinin nöropati grubuna göre uzadığı yani antiallodinik bir etki olduğu tespit edildi. Ancak α -adrenoseptör antagonistinin uygulandığı grupta bu etkinin adrenalin ve propranolol uygulanan gruba göre daha az olduğunu belirlendi. Bu sonuçlar nöropatik ağrının tedavisinde adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'lerin tedavide bir alternatif olabileceğini göstermektedir. Ayrıca adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'lerin antiallodinik etkisinde α -adrenoseptörlerin rolü olduğunu düşündürmektedir. Adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'lerin allodini üzerindeki etkisini daha iyi açıklayabilmek için nöropatinin taktıl allodini, mekanik hiperaljezi gibi belirtileri incelenip alınan sonuçlar karşılaştırılarak daha detaylı bulgulara ulaşılabilir.

MKH ve uyarılmış MKH uygulanan deney gruplarında nöropati grubuna göre motor fonksiyonların süresinin uzadığı tespit edildi. Bu sonuç, MKH ve uyarılmış MKH hücrelerinin hasarlı sinir bölgesine migrasyon ve proliferasyonunun gerçekleştiğini böylece hasarlı sinir dokusunda rejenerasyonun oluştuğunu, sinir fonksiyonlarının düzeldiğini telkin etmektedir.

Sinir ve kas dokusunun histopatolojik incelenmesi sonucu MKH ve uyarılmış MKH uygulanan deney gruplarında, nöropatili gruba göre sinir lifleri ve kas liflerinde, hem yapısal hem hücresel düzeyde iyileşme olduğu tespit edildi. Bu iyileşmenin α -

adrenoseptör antagonisti ile uyarılmış MKH uygulanan grupta en düşük düzeyde oluşması, adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'lerin rejeneratif etkisinde α -adrenoseptör rolünün daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Morfometrik incelemede, siyatik sinir liflerinin sayısı ve akson çapının ölçümü sonucunda, adrenerjik uyarılan MKH uygulanan gruplarda nöropati grubuna göre lif sayısı ve akson çapının daha fazla olduğu ölçüldü. Ancak MKH uygulanan grupla, nöropatili grup arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Bulgularımız adrenerjik agonist ve antagonistleri uygulanan MKH'li gruplarda, sinir liflerinin morfolojik iyileşmesinin daha iyi olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak adrenerjik agonist ve antagonistlerle uyarılan MKH'ler, periferik nöropatide allodini ve motor fonksiyonların kısmen düzelmesini sağlamakta, sinir ve kas dokusunda belirgin iyileşme yapmaktadırlar. Çalışmamızın sonuçları, bu hücrelerin rejeneratif ve fonksiyonel etkisinin oluşmasında, α -adrenoseptörlerin, β -adrenoseptörlere göre daha fazla rolü olduğunu düşündürmektedir.

Kök hücrelerin migrasyon ve proliferasyonunda büyüme hormonlarının önemli rolü olduğu bilinmektedir. MKH'lerin sinir liflerine migrasyonu, nöronal hücrelere farklılaşması ve proliferasyonunda Nestin, nöronal büyüme faktörü (NGF) ve β -III Tübülün gibi nöronal belirteçlerin önemli rolü bulunmaktadır. Çalışmamızda Nestin, NGF ve β -III Tübülün'in mRNA ekspresyonunun ölçümü sonucunda adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'lerde, MKH'lere göre düzeylerinin daha yüksek olduğu belirlendi, ancak α -adrenoseptör antagonisti kullanılan grupta bu düzeyin α ve β -adrenoseptör agonist ve β -adrenoseptör antagonistinin uygulandığı gruba göre daha düşük olduğu tespit edildi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bütün sonuçlar, adrenerjik uyarılmış MKH'lerin hasarlı sinir bölgesinde daha iyi proliferasyon olduğunu göstermekte ve bu etkide, nöronal belirteçlerin ve α -adrenoseptörlerin bir rolü olduğunu telkin etmektedir. Elde ettiğimiz sonuçları güçlendirebilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bir sonraki çalışmada adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'lerde, α ve β -adrenoseptörlerin alt tiplerinin rolünün araştırılması, hücre içi sinyal yollarının incelenmesi, sitokin düzeylerinin ölçülmesi ve bu hücrelerin angiogenesis ve apoptozisdeki etkisinin değerlendirilmesi yapılarak konunun daha detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamız periferik nöropati tablosunda adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'lerin etkisini gösteren ilk çalışma olması nedeniyle özgün bir çalışmadır. Adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'ler, periferik nöropati tedavisinde tek başına veya var olan tedavilere ek seçenek olabilir. Adrenerjik reseptör agonist ve antagonistlerinin uygulandığı MKH'lerin, hastanın yaşam kalitesinde artışa, kullanılacak ilaç çeşitliliğinde, miktarında ve ilaç kullanımı ile ortaya çıkan yan etkilerde azalmaya neden olabilir, klinikte alternatif bir tedavi seçeneği olarak yer alabilir.



KAYNAKLAR

1. **Jackson AB, Dijkers M, Devivo MJ, Poczatek RB.** A demographic profile of new traumatic spinal cord injuries: change and stability over 30 years. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, **2004**;85:1740–48.
2. **Woolf CJ, Mannion RJ.** Pain: neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet*, 1999;353:1959-64.
3. **Ciaramitaro P, Mondelli M, Logullo F, Grimaldi S, Battiston B, Sard A, Scarinzi C, Migliaretti G, Faccani G, Cocito D.** Italian Network for Traumatic Neuropathies. Traumatic peripheral nerve injuries: epidemiological findings, neuropathic pain and quality of life in 158 patients. *J Peripher Nerv Syst.* **2010**;15(2):120-7.
4. **Baron R.** Neuropathic pain: a clinical perspective. *Handb Exp Pharmacol.* **2009**;(194):3-30.
5. **Vranken H.J.** Mechanisms and treatment of neuropathic pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* **2009**;9:1-78.
6. **Ingolia N, Murray M.** *Axonal Regeneration in the Central Nervous System.* New York: Marcel Dekker, **2001**.
7. **Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A.** Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders—how to make it work. *Nature Med*, **2004**;10:42–50.
8. **Li Y, Guo L, Ahn HS, Kim MH, Kim SW.** Amniotic mesenchymal stem cells display neurovascular tropism and aid in the recovery of injured peripheral nerves. *J Cell Mol Med.* **2014**;18(6):1028-34.
9. **Sacerdote P, Niada S, Franchi S, Arrigoni E, Rossi A, Yenagi V, de Girolamo L, Panerai AE, Brini AT.** Systemic administration of human adipose-derived stem cells reverts nociceptive hypersensitivity in an experimental model of neuropathy. *Stem Cells Dev.*, **2013**;22(8):1252-63.
10. **Sacerdote P, Franchi S, Moretti S, Castelli M, Procacci P, Magnaghi V, Panerai E.A.** Cytokine Modulation is Necessary for Efficacious Treatment of Experimental Neuropathic Pain. *J Neuroimmune Pharmacol*, **2013**;8:202–211.
11. **Benowitz IL, Popovich G.** Inflammation and axon regeneration. *Current Opinion in Neurology*, **2011**;24:577–83.
12. **Siniscalco D, Giordano C, Galderisi U, Luongo L, Novellis V, Rossi F, Maione S.** Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice. *Front Integr Neurosci.*, **2011**;5:79.
13. **Tohill M, Terenghi G.** Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem.*, **2004**;40:17-24.
14. **Neuhuber B, Timothy Himes B, Shumsky JS, Gallo G, Fischer I.** Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Res.* **2005**;1035:73-85.
15. **Hosseini M, Yousefifard M, Aziznejad H, Nasirinezhad F.** The Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Allodynia and Hyperalgesia in Neuropathic Animals: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* **2015**;21(9):1537-44.

16. **Kiroğlu OE, Maytalman E, Yegani AA, Mete S, Şingirik E, Aksu F.** 11.Ulusal Sinir Bilim Kongresi. İzmir-Türkiye, 28 Nisan-1 Mayıs 2013: 27.
17. **Gu Y, Wang J, Ding F, Hu N, Wang Y, Gu X.** Neurotrophic actions of bone marrow stromal cells on primary culture of dorsal root ganglion tissues and neurons. *J Mol Neurosci.* **2010**;40(3):332-41.
18. **Huang P, Gebhart N, Richelson E, Brott TG, Meschia JF, Zubair AC.** Mechanism of mesenchymal stem cell-induced neuron recovery and anti-inflammation. *Cytotherapy.* **2014**;16(10):1336-44.
19. **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 Transplant.* **2016**;25(2):313-26.
20. **Kim MO, Na SI, Lee MY, et al.** Epinephrine increases DNA synthesis via ERK1/2s through cAMP, Ca(2+)/PKC, and PI3K/Ak signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem.* **2008**; 104:1407–20.
21. **Han J, Zou Z, Zhu C, Deng J, Wang J, Ran X.** DNA synthesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through alpha1-adrenergic receptors. *Arch Biochem Biophys.* **2009**; 490: 96–102.
22. **Maytalman E.** İn-Vitro Ortamda Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerde Adrenerjik Reseptörlerin Gösterilmesi ve Reseptör Blokajının Farklılaşmaya Etkisi. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2016.
23. **Takahata Y, Takarada T, Lemata M, et al.** Functional expression of beta2 adrenergic receptors responsible for protection against oxidative stress through promotion of glutathione synthesis after Nrf2 upregulation in undifferentiated mesenchymal C3H10T1/2 stem cells. *J Cell Physiol.,* **2009**;218: 268–75.
24. **Ishizuka T, Goshima H, Ozawa A, Watanabe Y.** β 1-adrenoceptor stimulation enhances the differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells. *Neurosci Lett.* **2012**;525(1):60-5..
25. **Wu X , Wang Z, Qian M, Wang L, Bai C , Wang X.** Adrenaline stimulates the proliferation and migration of mesenchymal stem cells towards the LPS-induced lung injury. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**; 1612-22.
26. **Erdine S.** Ağrı Mekanizmaları. Erdine S (editör). *Ağrı.* 2.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2002**:20-29.
27. **Önal SA.** Ağrı. Önal SA (editör). *Algoloji.* 1.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2004**:1-20
28. **Raj PP.** Ağrı taksonomisi. Erdine S (editör). *Ağrı.* 3.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; **2007**:19-25.
29. **Merskey H.** International association for the study of pain. Bogduk N editors. *IASP pain terminology Classification of chronic pain.* 2rd ed. IASP Press; **1994**.
30. **Hansson P, Lacerenza M, Marchettini P.** *Neuropathic pain: Pathophysiology and treatment.* Seattle: IASP pres, **2001**;1-18.
31. **Dworkin RH.** An overview of neuropathic pain: Syndromes, symptoms, signs and several mechanisms. *Pain,* **2002**;18:343-9.
32. **Yücel A, Çimen A.** Nöropatik Ağrı: Mekanizmalar, Tanı ve Tedavi. *Ağrı,* **2005**;17:5-13.

33. **Mao J, Price DD, Zhu J, Mayer DJ.** The inhibition of nitric oxide-activated poly (ADP-ribose) synthase attenuates transsynaptic alteration of spinal cord dorsal horn neurons and neuropathic pain in the rat. *Pain*, **1997**;72:355-66.
34. **Zimmermann M.** Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, **2001**;429:23-37.
35. **Karlı N.** Nöropatik Ağrı Semptomları. Tan E (editör). *Nöropatik Ağrı, Türk Nöroloji Derneği*. Ankara: Nobel Yayıncılık, **2009**: 87-90.
36. **Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C.** Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*, **2012**;22:81-91.
37. **Julius D, Basbaum AI.** Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **2001**;413:203-10.
38. **Sommer C, Kress M.** Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett.*, **2004**;361:184-7.
39. **Lumpkin EA, Caterina MJ.** Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, **2007**;445: 858-65.
40. **Wood JN, Boorman JP, Okuse K, Baker MD.** Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol.*, **2004**;61:55-71.
41. **Knabl J, Witschi R, Hosl K, Reinold H, Zeilhofer UB, Ahmadi S, et al.** Reversal of pathological pain through specific spinal GABA A receptor subtypes. *Nature*, **2008**;451:330-4.
42. **Attal N, Bouhassira D.** Mechanisms of pain in peripheral neuropathy. *Acta Neurol Scand.*, **1999**;73(1):12-24.
43. **Serra J.** Overview of neuropathic pain syndromes. *Acta Neurol Scand.* **1999**; 173:7-11.
44. **Öz Atalay F, Üstün H.** Periferik sinir sisteminde nöronal dejenerasyon, rejenerasyon ve nörodejeneratif hastalıklarda yeni tedavi modaliteleri. *Fiziksel Tıp*, **2004**;7(3):157-162.
45. **Avcı G, Akan M, Yıldırım S, Aköz T.** Nerve repair and grafting (review of the literature). *T Klin J Med Sci.*, **2002**;22:428-37.
46. **Namaka M, Leong C, Grossberndt A, Klowak M, Turcotte D, Esfahani F, et al.** A treatment algorithm for neuropathic pain: an update. *Consult Pharm.*, **2009**;24:885-902.
47. **İnan S, Özbilgin K.** Kök hücre biyolojisi. *Sağlıkta Birlik*, **2009**;1(5):11-23.
48. **Can A.** Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akamedisyen Tıp Kitapevi, **2014**:39
49. **Novik AA, Ionova TI, Gorodokin G, Smoljaninov A, Afanasyev BV.** The Maximow 1909 centenary: A reappraisal. *Cellular Therapy and Transplantation (CTT)*, **2009**;1(3):35-38.
50. **Şahin F, Saydam G, Omay SB.** Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *THOD*, **2005**;1(15):48-56.
51. **Can A.** Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akamedisyen Tıp Kitapevi, **2014**:223-465.
52. **Karaöz E, Ovalı E.** Kök hücreler. Trabzon:Derya Kitabevi, **2004**:1-157.

53. **Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP.** Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, **1968**;6(2):230-47.
54. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **1999**;284:143-7.
55. **Hoffman LM, Carpenter MK.** Human embryonic stem cell stability. *Stem Cell Rev.*, **2005**; 2:139-144.
56. **Can A.** Kök hücre Tanımları (Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar, Yürütücü: Kansu E.) *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, **2009**;20:15-22.
57. **Çetinkaya DU.** Mezenkimal kök hücrelerin klinikte kullanımı. (Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar, Yürütücü: Kansu E.) *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, **2009**;20:99-103.
58. **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.*, **1998**; 6;282(5391):1145-7.
59. **Kansu E, Çamurdanoğlu ZB.** Erişkin ve hematopoetik kök hücreler. (Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar, Yürütücü: Kansu E.) *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, **2009**;20:41-51.
60. Kök hücre ve kordon kanı. Erişim: (http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/29_04_2006_mehmet_ertem_11-30_12-00.pdf) Erişim Tarihi: 28/06/2017
61. **Çetinkaya DU.** Mezenkimal kök hücreler. Çiçek BF (editör). *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar*. 1. Baskı, Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi, **2009**;53-62.
62. **Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG.** Bone marrow stromal stem cells:nature, biology and potential applications. *Stem Cells*, **2001**;19(3):180-92.
63. **Can A.** Mezenkimal kök hücrenin kökeni ve gelişimi. I. Uluslar arası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, Samsun, Özet kitabı, **2010**;15-16.
64. **Karaöz E.** Stromal (Mezenkimal) kök hücreler. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Kocaeli, Kurs kitabı, **2010**;58-89.
65. **Ding DC, Shyu WC, Lin SZ.** MesenchymalStemCells, *Cell Transplantation.*, **2011**; 20: 5-14.
66. **Parr AM, Tator CH, Keating A.** Bone marrow derived mesenchymal stromal cells forthe repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplantation*, **2007**;40:609-19.
67. **Schwarz SC, Schwarz J.** Translation of stem cell therapy for neurological diseases. *Transl Res.*, **2010**;156(3):155-60.
68. **Minguell JJ, Erices A, Conget P.** Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, **2001**;226(6):507-20.
69. **Einstein O, Fainstein N, Vaknin I, Mizrachi-Kol R, Reihartz E, Grigoriadis N, Lavon I,Baniyash M, Lassman H, Ben-Hur T.** Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. *Ann Neurol*, **2007**;61: 209-18.
70. **Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE.** Mesenchymal Stromal Cells. *Ann N Y Acad Sci.*, **2009**;(1176):101-17.
71. MSC klinik uygulamaları. Erişim. (<http://www.clinicaltrials.gov>) Erişim tarihi: 25/07/2017

72. **Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al.** Expanded adiposederived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum*, **2009**;52:79-86.
73. **Götherström C, Westgren M, Shaw SW, Aström E, Biswas A, Byers PH, et al.** Pre- and postnatal transplantation of fetal mesenchymal stem cells in osteogenesis imperfecta: a two-center experience. *Stem Cells Transl Med*, **2014**;3:255-64.
74. **Mathiasen AB, Qayyum AA, Jørgensen E, Helqvist S, Fischer-Nielsen A, Kofoed KF, et al.** Bone marrowderived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *Eur Heart*, **2015**;36:1744-53.
75. **Weiss RA, Weiss MA, Beasley KL, et al.** Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial. *Dermatol Surg*, **2007**;33:263-68.
76. **Llufriu S, Sepúlveda M, Blanco Y, Marín P, Moreno B, Berenguer J, et al.** Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PLoS One*, **2014**;9:113936.
77. **Parr AM, Kulbatski I, Tator CH.** Transplantation of Adult Rat Spinal Cord Stem/Progenitor Cells for Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*, **2007**;24:835-45.
78. **Park HC, Shim YS, Ha Yoon, et al.** Treatment of Complete Spinal Cord Injury Patients by Autologous Bone Marrow Cell Transplantation and Administration of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor. *Tissue Engineering*, **2005**;11:913-22.
79. **Maytalman E, Mete S, Aksu F.** Bone marrow mesenchymal stem cells seem to be protective against cold allodynia in an experimental mononeuropathy model. 24th European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress. Paris-France, 3-7 September **2011**.
80. **Kıroğlu OE, Aksu F, Emre M, Maytalman E, Mete S, Şingirik E.** Deneysel mononöropati modelinde mezenkimal kök hücre enjeksiyonunun fare soleus kası üzerine rejeneratif etkisi. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Eskişehir-Türkiye 19-22 Ekim **2011**:238
81. **Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, **2006**;8(4):315-317.
82. **Wilson A, Trumpp A.** Bone- Marrow Hematopoietic Stem Cell Niches. *Nat Rev Immunol.*, **2006**;6(2):93-106.
83. **Günel T, Aydın K.** “Real-Time PCR” ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* **2009**;2(2):43-45.
84. **Hess DC, Borlongan CV.** Stem cell and neurological diseases. *Cell Prolif.*, **2008**;41 Suppl 1:94-114.
85. **Bongso A, Lee EH.** Stem cells: Their definition, classification and sources. *Stem Cells- From Bench to Bedside* World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd. 2005;1-13, http://www.worldscibooks.com/etextbook/5729/5729_chap1.pdf
86. Nestin. Erişim. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10763>) Erişim tarihi: 28/07/2017
87. **Katsetos CD, Frankfurter A, Christakos S, et al.** Differential localization of class III A-tubulin isotype and calbindin-D28k defines distinct neuronal types in the developing human cerebellar cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*, **1993**;52:655-66

88. Beta-III Tubulin. Erişim. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10381>) Erişim tarihi: 28/07/2017
89. NGF. Erişim. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NGF>) Erişim tarihi: 30/07/2017
90. NGF. Erişim. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4803>) Erişim tarihi: 30/07/2017
91. **Fine EG, Decosterd I, Papaloizos M, Zurn AD, Aebischer P.** GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur J Neurosci.*, **2002**;15(4):589-601.
92. **Onaran O, Kayaalp SO.** Reseptörler ve İlaç Reseptör İlişkisi. Ed: Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji* 1.cilt. 13.baskı, Ankara: Pelikan yayıncılık, **2012**;80-84
93. **Kayaalp SO, Ulus İH.** Otonom Sinir Sistemi, Nörotransmitterleri ve İlaçlar Hakkında Temel Bilgiler. Ed: Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji* 2.cilt. 13.baskı, Ankara: Pelikan yayıncılık, **2012**;953-1029
94. **Çakır N.** Adrenerjik reseptörler. *Türkiye Klinikleri.* **2005**;1(3); 93-96.
95. **Kayaalp SO, Ulus İH.** Sempatomimetik İlaçlar. Ed: Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji* 2.cilt. 13.baskı, Ankara: Pelikan yayıncılık, **2012**;1007-29
96. Phentolamine. Erişim. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phentolamine>) Erişim tarihi: 02/08/2017
97. **Gürdal H, Kayaalp SO.** Beta-Adrenerjik Reseptör Blokörleri. Ed: Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji* 1.cilt.13.baskı, Ankara: Pelikan yayıncılık, **2012**;477-90.
98. **Coelho M, Moz M, Correia G, Teixeira A, Medeiros R, Ribeiro L.** Antiproliferative effects of β -blockers on human colorectal cancer cells. *Oncol Rep.*, **2015**;33(5):2513-20.
99. **Hocking AM.** The Role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, **2015**;14(11):623-30.
100. **Docheva D, Haasters F, Schieker M.** Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors. *Current Rheumatology Reviews*, **2008**;4:155-60.
101. **Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S.** Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation*, **2002**;105(3):380-6.
102. **Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG.** Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, **2009**;18(1):103-12.
103. **Choi YJ, Lee JY, Lee SJ, Chung CP, Park YJ.** Alpha-adrenergic blocker mediated osteoblastic stem cell differentiation. *Biochem and Biophys Res Commun*, **2011**;416 (3-4):232–38.
104. **Li H, Fong C, Chen Y, Cai G, Yang M.** Beta2- and beta3-, but not beta1-adrenergic receptors are involved in osteogenesis of mouse mesenchymal stem cells via cAMP/PKA signaling. *Arch Biochem Biophys*, **2010**;496(2):77–83.
105. **Wong A, Hardy KL, Kitajewski AM, Shawber CJ, Kitajewski JK, Wu JK.** Propranolol Accelerates adipogenesis in Hemangioma Stem Cells and Causes Apoptosis of Hemangioma Endothelial Cells. *Plast Reconstr Surg.*, **2012**;130(5):1012-21.
106. **Li N, Yang H, Lu L, Duan C, Zhao C, Zhao H.** Comparison of the labeling efficiency of Brd U, Dil and FISH labeling techniques in bone marrow stromal cells. *Brain Res.* **2008**;1215:11-19

107. **Seltzer Z., Dubner R., Shir Y.** A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **1990**; 43:205-18.
108. **Allchorne JA , Süpürge CD , Woolf JC.** Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. *Mol Pain.*, **2005**; 1
109. **G. Ji, S. Zhou, M. Y. Kochukov, K. N. Westlund, S. M. Carlton.** Plasticity in Intact A δ - and CFibers Contributes to Cold Hypersensitivity in Neuropathic Rats. *Neuroscience*, **2007**;150(1):182–93.
110. **Kaur T, Pathak CM, Pandhi P, Khanduja KL.** Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain Cogn.*, **2008**; 67(1):25–30.
111. **Uzbay IT.** Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Araştırma Teknikleri. 1.Basım Ankara: Çizgi Tıp Yayınevi, **2004**;97-142.
112. **Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolte JA.** Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med.* **2010**;5(6): 933–46.
113. **Yeganı AA.** İn-Vitro Ortamda Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerde Muskarnik Reseptörlerin Gösterilmesi ve Reseptör Blokajının Farklılaşmaya Etkisi. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2016.
114. **Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG.** Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **2009** ;18(1):103-12.
115. **Tang JM, Yuan J, Li Q, Wang JN, Kong X, Zheng F, Zhang L, Chen L, Guo LY, Huang YH, Yang JY, Chen SY.** Acetylcholine induces mesenchymal stem cell migration via Ca²⁺/PKC/ERK1/2 signal pathway. *J Cell Biochem.* **2012**;113(8):2704-13.
116. **Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* **2006**;8(4): 315–17.
117. **Jin HJ., Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW.** Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**;14:17986-18001.
118. **Matthes SM, Reimers K, Janssen I, Liebsch C, Kocsis JD, Vogt PM, Radtke C.** Intravenous Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells to Enhance Peripheral Nerve Regeneration. *BioMed Research.* **2013**; 6.
119. **Siniscalco D, Giordano C, Galderisi U, Luongo L, Alessio N, Bernardo GD, de Novellis V, Rossi F, Maione S.** Intra-brain microinjection of human mesenchymal stem cells decreases allodynia in neuropathic mice. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**; 67:655–69.
120. **Pan HC, Yang DR, Chiu YT, Lai SZ, Wang YC, Chang MH, Cheng FC.** Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. *Journal of Clinical Neuroscience.* **2006**;13: 570–75.
121. **Siniscalco D¹, Giordano C, Galderisi U, Luongo L, de Novellis V, Rossi F, Maione S.** Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice. *Front Integr Neurosci.* **2011**;5:79.

122. Yousefifard M, Nasirinezhad F, Shardi Manaheji H, Janzadeh A, Hosseini M, Keshavarz M. Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model. *Stem Cell Res Ther.* **2016**;7:36.
123. Kiroğlu OE, Maytalman E, Yegani AA, Mete S, Şingirik E, Aksu F. 11.Ulusal Sinir Bilim Kongresi. İzmir-Türkiye, 28 Nisan-1 Mayıs 2013: 27.
124. Kiroğlu OE, Yegani AA, Maytalman E, Emre M, Aksu. 7th European Congress of Pharmacology İstanbul- TURKEY, June 26-30 2016: 96.
125. Ladak A, Olson J, Tredget EE, Gordon T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp Neurol.* **2011**;228(2):242-52.
126. Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2004**; 40:17–24.
127. Coronel MF, Musolino PL, Villar MJ. Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction. *Neuroscience Letters*, **2006**;5–9.
128. Rodríguez JP, Ríos S, Fernández M, Santibañez JF. Differential activation of ERK1,2 MAP kinase signaling pathway in mesenchymal stem cell from control and osteoporotic postmenopausal women. *J Cell Biochem.*, **2004**;92(4):745-54.
129. Riddle RC¹, Taylor AF, Genetos DC, Donahue HJ. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **2006**;3:776-84.
130. Cui J, Cui C, Cui Y, Li R, Sheng H, Jiang X, Tian Y, Wang K, Gao J. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation Increases GAP-43 Expression via ERK1/2 and PI3K/Akt Pathways in Intracerebral Hemorrhage. *Cell Physiol Biochem.*, **2017**;42(1):137-144.
131. Bosmann M, Grailer JJ, Ketong Zhu K, Matthay MA, Sarma JV, Zetoune FS, Peter A, Ward PA. Antiinflammatory effects of beta2 adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury. *Faseb J.*, **2012**; 26: 2137–44.
132. Wong A, Hardy KL, Kitajewski AM, Shawber CJ, Kitajewski JK, Wu JK. Propranolol Accelerates adipogenesis in Hemangioma Stem Cells and Causes Apoptosis of Hemangioma Endothelial Cells. *Plast Reconstr Surg.*, **2012**;130(5):1012-1021.
133. Tyurin-Kuzmin PA, Fadeeva JI, Kanareikina MA, Kalinina NI, Veronika Yu. Sysoeva VY, Dyikanov DT, Stambolsky DV, Tkachuk VA. Activation of β -adrenergic receptors is required for elevated α 1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells. *Sci Rep.* **2016**; 6: 32835.
134. Kotova PD, Sysoeva VY, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Kolesnikova AS, Tyurin- Kuzmin PA, Fadeeva JI, Tkachuk VA, Kolesnikov SS. Functionalexpression of adrenoreceptors inmesenchymal stromal cells derived from the human adiposetissue. *Biochim Biophys Acta.* **2014**;1843(9):1899-908.
135. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation.*, **2002**;105(3):380-86.
136. McLachlan EM, Jänig W, Devor M, Michaelis M. Peripheral nevre injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature*, **1993**;363:543–6.

137. **Pertovaara A.** The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. *Eur J Pharmacol.*, **2013**;716(1-3):2-7.
138. **Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demoulière N, Waltisperger E, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M.** Chronic treatment with agonists of β_2 -adrenergic receptors in neuropathic pain. *Experimental Neurology*, **2010**;221:115–21.
139. **Cho HJ, Kim DS, Lee NH, Kim JK, Lee KM, Han KS, Kang YN, Kim KJ.** Changes in the α_2 adrenergic receptor subtypes gene expression in rat dorsal root ganglion in an experimental model of neuropathic pain, *NeuroReport*, **1997**;8:3119– 122.
140. **Eisenach JC, DuPen S, Dubois M, Miguel R, Allin D.** Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain. The Epidural Clonidine Study Group. *Pain*, **1995**;61(3): 391–9.
141. **Hajhashemi V, Banafshe HR, Minaiyan M, Mesdaghinia A, Abed A.** Antinociceptive effects of venlafaxine in a rat model of peripheral neuropathy: Role of alpha2-adrenergic receptors. *Eur J Pharmacol.*, **2014**;738:230-6.
142. **Kim SK, Min BI, Kim JH, Hwang BG, Yoo GY, Park DS, Na HS.** Individual differences in the sensitivity of cold allodynia to phentolamine in neuropathic rats. *Eur J Pharmacol.* **2005**;523(1-3):64-6.
143. **Pertovaara, A.** *Adrenergic receptors.* In: Cairns, B.E. (Ed.), *Peripheral Receptor Targets for Analgesia. Novel Approaches to Pain Management.* Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2009:275–96.
144. **Kota DJ, Prabhakara KS, van Brummen AJ, Bedi S, Xue H, DiCarlo B, Cox CS Jr, Olson SD.** Propranolol and Mesenchymal Stromal Cells Combine to Treat Traumatic Brain Injury. *Stem Cells Transl Med.* **2016**;5(1):33-44.
145. **Nance DM, Sanders VM.** Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun.*, **2007**;21(6):736-45.
146. **Caplan AI, Dennis JE.** Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* **2006**;98(5):1076-84.
147. **Zhang HT, Liu ZL, Yao XQ, Yang ZJ, Xu RX.** Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Cytotherapy.* **2012**;14(10):1203-14.
148. **Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D.** Bone marrow–derived mesenchymal stem cells already express. *Differentiation*, **2004**;72:319–26.
149. **Foudah D, Redondo J, Caldara C, Carini F, Tredici G, Miloso M.** Expression of Neural Markers by Undifferentiated Rat Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2012**;820821:13.
150. **Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M.** Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology.* **2002**;59(4):514-23.
151. **Tuttle JB¹, Etheridge R, Creedon DJ.** Receptor-mediated stimulation and inhibition of nerve growth factor secretion by vascular smooth muscle. *Exp Cell Res.*, **1993**;208(2):350-61.
152. **Niwa S, Takahashi H, Hirokawa N.** β -Tubulin mutations that cause severe neuropathies disrupt axonal transport. *The EMBO Journal*, **2013**; 32:1352–64.
153. **Lindsay SL, Barnett SC.** Are nestin-positive mesenchymal stromal cells a better source of cells for CNS repair? *Neurochem Int.*, **2017**;106:101-7.

154. Amoh Y, Aki R, Hamada Y, Niiyama S, Eshima K, Kawahara K, Sato Y, Tani Y, Hoffman RM, Katsuoka KJ. Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury. *Dermatol.* **2012**;39(1):33-8.
155. Raisi A¹, Azizi S, Delirezh N, Heshmatian B, Farshid AA, Amini K. The mesenchymal stem cell-derived microvesicles enhance sciatic nerve regeneration in rat: a novel approach in peripheral nerve cell therapy. *J Trauma Acute Care Surg.* **2014**;76(4):991-7.
156. Pan HC¹, Yang DY, Chiu YT, Lai SZ, Wang YC, Chang MH, Cheng FC. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. *J Clin Neurosci.* **2006**;13(5):570-5.
157. Dadon-Nachum M, Sadan O, Srugo I, Melamed E, Offen D. Differentiated mesenchymal stem cells for sciatic nerve injury. *Stem Cell Rev.* **2011**;7(3):664-71.



ÖZGEÇMİŞ

Fatih Berktaş, 1981 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamlayan Fatih Berktaş, 1997 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Bölümü'nü kazandı ve 2002 yılında da mezun oldu. 2015 yılında, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başlayan Fatih Berktaş halen aynı Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.

