

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇAN SİYATİK SİNİR ZEDELENMESİNDE FARKLI
ZAMANLARDA MEZANKİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMA
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dr. C. Teoman KARAHASANOĞLU

**Samsun
Ocak-2012**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇAN SİYATİK SİNİR ZEDELENMESİNDE FARKLI
ZAMANLARDA MEZANKİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMA
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dr. C. Teoman KARAHASANOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Gülsen ÖKTEN

**Samsun
Ocak-2012**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Erdal Karaöz, Kocaeli Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gülsen Ökten, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Hasan Bağcı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Cengiz Çokluk, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Sezgin Güneş, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tezin Adı : Sıçan Siyatik Sinir Zedelenmesinde Farklı
Zamanlarda Mezenkimal Kök Hücre
Uygulama Etkilerinin Karşılaştırılması
Tezi Teslim Eden :Dr. C. Teoman KARAHASANOĞLU
Tez Savunma Sınav Tarihi: 27/01/2012
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gülsen ÖKTEN

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Süleyman Kaplan
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi ve tez aşamasında bilgi, tecrübe ve yardımlarını her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım Prof. Dr. Gülsen Ökten başta olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Eğitimimiz süresi boyunca, berabercedayanışma içerisinde çalıştığımız ve unutulmaz günler geçirdiğimiz başta sevgili arkadaşım Hamit Özyürek olmak üzere Akın ve Zeynep'e,

Tez çalışması döneminde birlikte çalıştığımız Yıldırım Beyazıt Eğt. ve Araşt. Hastanesi Genetik Tanı Merkezi'nden Dr. Ferda Alpaslan Pınarlı'ya, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Kerametdin Aydın'a, Veteriner Fakültesi'nden Prof. Dr. Tolga Güvenç'e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Sezgin Güneş'e, Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Feride Duru'ya, Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Leman Tomak'a,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarı teknisyeni Mustafa Düz başta olmak üzere Pınar, Aslı, Tayfun ve Moleküler Genetik Laboratuvarlarının tüm teknisyen ve çalışanlarına,

Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinin çalışanlarına teşekkür ederim.

PYO.TIP.1904.09.035 proje numaralı tezimizin proje kuruluşu olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı'na, tezimizi destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Tezleri Destekleme Programına, Proje Yönetim Ofisine ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim anneme ve babama,

Doktora eğitimim sırasında koşulsuz olarak destek olan sevgili eşime,

Biricik kızıma,

İlk göz ağrım oğluma,

teşekkür eder sevgilerimi sunarım...

ÖZET

SIÇAN SİYATİK SİNİR ZEDELLENMESİNDE FARKLI ZAMANLARDA MEZANKİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMA ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. C. Teoman KARAHASANOĞLU, Doktora Tezi

Günümüzde ülkemizde ve dünyada ciddi sağlık problemlerinden birisi de periferik sinir yaralanmalarıdır. Bu yaralanmalar sinirde gerilme, ezilme ve kesilme nedeniyle meydana gelmektedir.

Periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde kullanılan yöntemlerden birisi de mezenkimal kök hücre (MKH) uygulamasıdır. Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, kas, tendon ve astrosit gibi hücrelere farklılaşabilen aynı zamanda kendini yenileme potansiyeline sahip non-hematopoietik hücrelerdir.

Sinir rejenerasyonunda; oluşan yaralanmanın şiddeti, skar dokusunun büyüklüğü ve aksonun yaralı bölgeye ulaşmasından önce geçen süre gibi bir çok faktör etkilidir. Biz MKH uygulama zamanının iyileşme üzerindeki etkilerini araştırdığımız bu çalışmada dört grup sıçan kullandık. Siyatik sinirleri zedelendikten sonra sıçanlar dört gruba ayrıldı. I. grup sıçanlara zedelenmeden hemen sonra sadece doku yapıştırıcı uyguladık. Erkek sıçanlardan elde ettiğimiz MKH'leri II. gruba zedelenmeden hemen sonra, III. gruba zedelenmeden sonra üçüncü gün, IV. ve son gruba da zedelenmeden yedi gün sonra doku yapıştırıcısı ile beraber uyguladık. Yürüme testlerinde I. grup ile II. grup arasında Siyatik Fonksiyon İndeksi (Sciatic Functional Index; SFI) ölçümleri açısından anlamlı düzeyde fark tespit edildi. Diğer gruplar arasındaki farklar anlamlı değildi. Histolojik ve immünohistokimyasal boyamalar sonucunda ise II. grup ile diğer gruplar arasında anlamlı fark görüldü.

Elde ettiğimiz veriler ışığında MKH'nin periferik sinir yaralanmalarında uygulanma zamanlarının tedavi üzerinde etkili olabileceği sonucuna varıldı. Sinir zedelenmesi ile MKH uygulanması arasında geçen sürenin sinir rejenerasyonu üzerinde etkili olduğu sonucu ile bizim ve yapılacak diğer çalışmaların insan çalışmalarına öncülük edebileceği düşünüldü. MKH'nin periferik sinir rejenerasyonu üzerine farklı zamanlarda uygulanmasının etkilerinin ve sonuçlarının değerlendirilebilmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ondokuz Mayıs üniversitesi Samsun, Ocak-2012

ABSTRACT

THE COMPARISON OF THE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELL APPLIED IN DIFFERENT TIMES ON RAT'S SCIATIC NERVE INJURY

C. Teoman KARAHASANOĞLU, Doctoral Thesis

Presently, one of the serious health problems in our country and in the world is peripheral nerve injuries. These injuries occur because of distention, crush and cut on nerves.

One of the methods used in the treatment of peripheral nerve injuries is the application of mesenchymal stem cell (MSC). Mesenchymal stem cells are non-hematopoietic cells that can differentiate into cells such as bone, cartilage, muscle, tendon, and astrocyte and have the potential to regenerate themselves at the same time.

A lots of factors such as the severity of the injury, the size of the scar tissue, and the time passed before arrival of the axon to the injured area are effective on nerve regeneration. In this study, we searched the effect of application time of MSCs on healing of nerve in experimental model. After the sciatic nerves of rats were injured, rats were divided into four groups. We just applied fibrin glue to the rats after the injury in group I. In group II, the MSCs with fibrin glue were just applied to the rats after the injury. The MSCs with fibrin glue were applied to the rats at the 3rd and 7th day after the injury in group III and IV, respectively.

We found a significant difference in the measurements of Sciatic Functional Index (SFI) between the first and the second groups with walking track analyses. However, significant difference was not detected among the other groups. There was significant difference between the second and the other groups in the result of histological and immunohistochemical stainings.

In the light of our results, we concluded that there may be a correlation between application time of MSCs and healing of peripheral nerve injuries. Our and additional studies can pioneer to the human studies in future. More detailed studies are needed to evaluate the effect and results of the application of MSC on peripheral nerve injury in different times.

Ondokuz Mayıs University, Samsun, January-2012

SİMGELER VE KISALTMALAR

AEC	: 3-Amino-9-Etilkarbazol
BDNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
BMP	: Kemik Morfojenik Proteini-4
CFU-F	: Koloni Oluşturan Birim-Fibroblast
CNTF	: Silier Nörotrofik faktör
DMEM-LG	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EB	: Embryoid Cisim
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
ERKH	: Erişkin Kök Hücre
FBS	: Fetal Bovin Serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FISH	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
G-CSF	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GFAP	: Glial Fibrilar Asidik Protein
GFP	: Yeşil Floresan Protein
GM-CSF	: Granülosit-Monosit Koloni Uyarıcı Faktör
GVHH	: Graft Versus Host Hastalığı
H&E	: Hematoksilen ve Eozin
HKH	: Hematopoietik Kök Hücre
HSL	: Hormona Duyarlı Lipaz
IBMX	: İzobutil Metil Ksantin
ICM	: İç Hücre Kitlesi
ILGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
ITS	: 2. ve 4. Parmaklar arası Mesafe
IVF-ET	: İn-Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi
iEKH	: İnsan Embriyonik Kök Hücreleri
JAK	: Janus Kinaz
KİMKH	: Kemik İliği Stromasından Köken Alan MKH
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktör

MAPC	: Multipotent Erişkin Öncül Hücre
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1
M-CSF	: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MIAMI	: Erişkin Kemik İliği Kaynaklı İndüklenebilir Multilineage Hücreler
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
NF-200	: Nöroflament 200
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NK	: Doğal Öldürücü
OD	:Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PL	: Topuk Parmakucu Bası Mesafesi
PPAR	: Peroksizom Proliferasyonunu Aktifleştiren Reseptör
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
SABC	: Strepto Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks Tekniği
SDF α -1	: Stromal Kaynaklı Faktör α -1
SFI	: Siyatik Fonksiyon İndeksi
SHH	: Sonic Hedgehog
SPSS	: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi
SRY	: Cinsiyet Belirleyen Bölge
SSEA	: Stage-Spesifik Embriyonik Antijen
STAT	: Sinyal İletimi ve Transkripsiyon Aktivatörü
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
TS	: 1. ve 5. Parmaklar arası Mesafe

İÇİNDEKİLER

Özet	iv
Abstract	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
İçindekiler	viii
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.A. Kök Hücrenin Tanımı	3
II.B. Kök Hücrelerin Elde Edilme Kaynakları ve Çeşitleri	13
II.B.1. Embriyonik Kök Hücre	15
II.B.2 Embriyonik Olmayan Kök Hücre	19
II.B.2.a. Erişkin Kök Hücreler	19
II.B.2.b. Hematopoietik Kök Hücreler	19
II.B.2.c. Karaciğer Kök Hücreleri	21
II.B.2.d. Adiposit Kök Hücreleri	21
II.B.2.e. Kıkırdak ve Kemik Kök Hücreleri	21
II.B.2.f. Sindirim Sistemi Epitel Kök Hücreleri	21
II.B.2.g. Epidermal Kök Hücreler	22
II.B.2.h. Kardiyomiyosit Kök Hücreler	22
II.B.2.i. Mezenkimal Kök Hücreler	22
II.B.2.j. Nöronal Kök Hücreler	29
II.C. Periferik Sinir Sistemi	30
II.C.1.Periferik Sinir Anatomisi	30
II.C.2.Periferik Sinir Yaralanmaları ve Derecelendirilmeleri	31
II.C.3.Periferik Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu	32
II.C.4.Periferik Sinir Yaralanmaları ve Mezenkimal Kök Hücre	34
III. GEREÇ ve YÖNTEM	36
III.A. Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	36
III.A.1. Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Cihazlar	37
III.A.2. Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan	

Kimyasal maddeler	37
III.A.3. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar	37
III.A.4. Hücre ve Doku kültürü Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal maddeler	38
III.A.5. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Çalışma Solüsyonları	38
III.B. Akım Sitometri İle MKH'lerin Tanımlanması	38
III.B.1. Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar	39
III.B.2. Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
III.B.3. Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Çalışma Solüsyonları	40
III.C. Yürüme Koridorunun Oluşturulması ve Yürüme Testi	40
III.C.1. Yürüme Testi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	40
III.D. Sıçan Siyatik Sinirlerinde Hasar Oluşturulması	41
III.E. Araştırma Gruplarının Oluşturulması ve Özellikleri	42
III.F. Mezenkimal Kök Hücrelerin Zedelenmiş Siyatik Sinire Transplantasyonu	42
III.F.1. Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Cihazlar	43
III.F.2. Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
III.F.3. Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Çalışma Solüsyonları	43
III.G. Siyatik Sinirden DNA İzolasyonu	43
III.H. <i>SRY</i> Geninin belirlenmesi	45
III.H.1. DNA'ların ve Primerlerin OD Ölçümlerinin Yapılması	45
III.H.2. <i>SRY</i> Gösterimi İçin PCR Çalışması	45
III.H.3. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar	46
III.H.4. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler	47
III.H.5. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Çalışma	

Solüsyonları	47
III.I. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Boyama	47
III.I.1. Histopatolojik İnceleme İçin Doku Kesitlerinin Hazırlanması	47
III.I.2. İmmünohistokimyasal İnceleme İçin Doku Kesitlerinin Hazırlanması	48
III.I.3. Veteriner Fakültesi Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	49
III.I.4. Veteriner Fakültesi Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları	49
III.J. İncelenen Parametreler	49
III.J.1. Yürüme Testi	49
III.J.2. Histolojik Boyama	51
III.J.3. İmmünohistokimyasal Boyama	51
III.J.4. DNA İzolasyonu ve <i>SRY</i> Geninin Gösterilmesi	51
III.J.5. İstatistik Yöntemi	52
IV. BULGULAR	53
IV.A. Grupların Değerlendirilmesi	63
IV.B. Grupların Karşılaştırılması	74
V. TARTIŞMA	76
VI. SONUÇ ve ÖNERİLER	81
VII. KAYNAKLAR	82
VIII. EKLER	101
IX.ÖZGEÇMİŞ	102

I.GİRİŞ

Günümüzde tedavi ile düzeltilemeyen birçok hastalıkta tedaviyi olumsuz etkileyen önemli sebep yaşam için gerekli olan bazı hücrelerde, dokularda ve organlardaki geri dönüşümü olmayan hasarlanmalardır. Bu hastalıkların kesin tedavisi hasarlanmış olan hücrenin, dokunun ya da organların biyolojik fonksiyonlarını yenilemek veya düzeltmek ile sağlanabilir. Bu amaca ulaşabilmek için hasarlanarak fonksiyonunu kaybetmiş doku veya organa kaybettiği fonksiyonlarını tekrar yapabilmesini sağlayacak, özellikleri iyi belirlenmiş, yeterli sayı ve kalitede hücrelerin nakledilmesi gerekir (Bayık, 2004; Karaöz ve Ovalı, 2004).

Kök hücre araştırmaları günümüzün bilim ve teknoloji gündeminin en önemli konularından birini oluşturmaktadır. Doku ve organları yenilemedeki üstün potansiyeli sayesinde hücre-doku ve organ harabiyeti veya fonksiyon kaybı sonucunda oluşan pek çok hastalığın tedavisinde tıp dünyasında büyük beklentiler doğurmaktadır. Kök hücre araştırmaları istenildiği doğrultuda gelişirse bazı hastalıkların hücre düzeyinde tedavileri yapılabileceği gibi hücre ve organların nakli için de yeni bir kaynak oluşturulabilecektir. Böylece kendini yenileme ve onarma kapasitesi olmayan hücre ve dokuların kaybına bağlı gelişen hastalıklar tedavi edilebilecektir(Beksaç ve ark., 2005).

Erişkin kök hücre tiplerinden biri olan mezenkimal kök hücreler (MKH) başta hematopoitik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik potansiyeli olması nedeniyle gittikçe artan bir ilgi ile takip edilmektedir(Karaöz ve Ovalı, 2004).

Mezenkimal kök hücreler başta kemik, yağ, tendon, kıkırdak, stroma gibi doku kökenli hücreler olmak üzere sinir, kalp, karaciğer, pankreas gibi değişik birçok farklı doku hücresine de farklılaşabilirler.Mezenkimal kök hücreler çözünür faktörler sentezleyerek doku ve organ yenilenmesine katkıda bulunurlar. İn-vitro ortamda kök hücre özelliklerini kaybetmeden kolayca çoğaltılabilmeleri, hematopoezi destekleyerek kemik iliği kök hücre grefti reddini önlemeleri, immünosupresyon özellikleri nedeniyleGraft Versus Host Hastalığı(GVHH)'nı engellemeleri nedeniyle hücresel tedavi ve birçok klinik alanda uygulama potansiyeline sahiptirler (Kılıç ve ark., 2006; Uçkan, 2009).

Periferik sinir yaralanmaları, sinirde gerilme, ezilme ve kesilme nedeniyle meydana gelir. Yaralanmayla beraber sinirin distal ve proksimalinde önemli histolojik değişiklikler ortaya çıkar. Yaralanma sonrası ilk 6 saat içerisinde nöronun

perikaryonunda (gövdesi) çekirdek perifere doğru göç eder. Yaralı bölgenin distalinde ise aksonal yapının tamamen bozulması ile karakterize olan Wallerian dejenerasyonu meydana gelir(Quan, 1999).

Hücresel cevapların büyüklüğündeki değişkenlik sinir ve onu saran dokulardaki travmanın şiddetiyle paralel bir ilişki içerisinde. Sinir rejenerasyonu, oluşan yaralanmanın şiddeti, skar dokusunun büyüklüğü ve aksonun yaralı bölgeye ulaşmasından önce geçen süre gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterir (Quan, 1999; Burnett ve Zager, 2004).

Periferik sinirler, nöronlar ve Schwann hücrelerinden meydana gelirler. Schwann hücreleri periferik sinir rejenerasyonunu destekler. Moleküler yollar ve onların fizyolojik rollerinin anlaşılmasındaki son gelişmeler nörotrofik faktörlerin sinir sistemi rejenerasyonu ve onarımında önemli rol oynadığını göstermektedir. MKH'ler nörotrofik faktörlerin sekresyonunu artırma özelliklerinden dolayı sinir harabiyetinde farklı tedavi seçenekleri olabilirler. MKH'ler sinir hasarının düzeltilmesinde artırıcı etkiye sahiptirler. Bu etkilerini nörotrofik faktörlerin salınımını arttırmalarının yanı sıra Schwann hücre etkileşimleri yolu ile de sağlayabilirler(Pan ve ark., 2006; Shimizu ve ark., 2007; Pan ve ark., 2007; Wang ve ark., 2009; Cheng ve ark., 2010).

Biz de çalışmamızda sıyatik sinir zedelenmesinde MKH'lerini yerel olarak farklı zamanlarda uygulanmasının sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılmasını hedefledik.

II. GENEL BİLGİLER

II.A. Kök Hücrenin Tanımı:

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. Organ ve dokuların ihtiyacı olan hücrelerin üretilmesini ve bu üretimin sürekliliğinin olmasını organizmada kök hücreler sağlar (Minguell ve ark., 2001; İnan ve Özbilgin, 2009).

Kök hücreler uzun süre farklılaşmadan bölünebilen, kendisini yenileme kapasitesine sahip, gerektiğinde başka hücre tiplerine dönüşebilen ve hasarlı dokuya transplante edildiklerinde o dokunun işlevselliğini kazanabilen hücrelerdir. Doku ve organlardaki olgun hücrelerin bölünmesi sonucu yine bu hücrelerin benzerleri oluşurken kök hücreler aldıkları sinyallere göre farklı hücelere farklılaşabilirler (Can ve Karahüseyinoğlu, 2009).

Laboratuvarda hücre çalışmaları 1968 yılında Edwards ve arkadaşları tarafından insan ovumunun İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi (IVF-ET) ile başlamış, 1981 yılında Evans ve Kaufman'ın fare embriyonik kök hücrelerini elde etmeleriyle hız kazanmıştır. Thomson ve arkadaşlarının bağışlanmış embriyolardan ilk insan embriyo kök hücre serilerini elde etmesi ise bu alanda çığır açmıştır (Edwards ve ark., 1969; Evans ve Kaufman, 1981; Thomson ve ark., 1998; Çetiner, 2006; İnan ve Özbilgin, 2009).

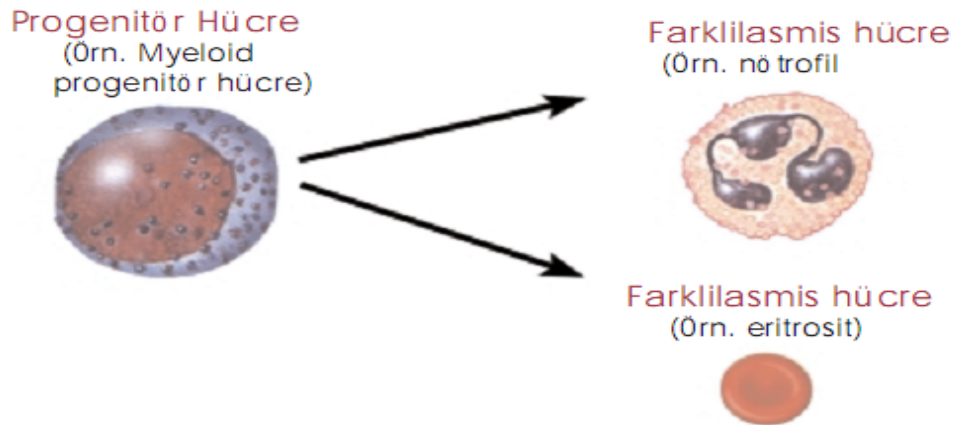
Bir hücrenin kök hücre olarak tanımlanabilmesi için belirli kriterlere sahip olması gerekir. Bu kriterlerin saptanabilmesi için 2001 yılında "Doku Kök Hücreleri Çalışma Grubu" tarafından bir toplantı yapılmıştır. Bu toplantıda mevcut tanımlamalar ve özellikler gözden geçirilerek tanımlama ve kriterler için ortak karar alınmıştır (Verfaillie ve ark., 2002; Karaöz ve Ovalı, 2004; Karaöz, 2010a). Bu tanımlamaya göre kök hücreler:

1. Fonksiyonel olarak özelleşmemiştir.
2. Potansiyel olarak heterojendir.
3. Uygun bir mikroçevre (niche)'ye yerleşebilir.
4. Çoğalabilme özellikleri vardır.

5. Çok sayıda farklılaşmış yeni hücre oluşturabilir.
6. Uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptir.
7. Hasarlı dokuyu fonksiyonel olarak tekrar oluşturabilir.
8. İn vivo olarak doku hasarı yokken bile farklılaşmış kuşaklara katkı sağlayabilir.
9. Bu özelliklerini esnek ve geri dönüşümlü olarak kullanır.

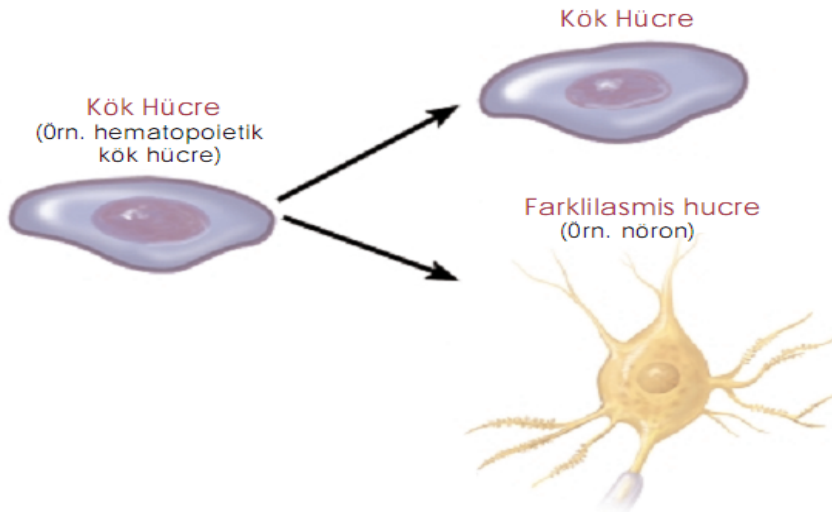
Kök hücreler buldukları dokudaki fonksiyonel hücreler gibi görev yapamazlar. Ancak ihtiyaç durumunda kendileri çoğalamayan bu hücrelere (kan, kalp, kas, sinir vb.) dönüşerek kaynaklık edebilme özelliklerine sahiptirler. Bütün kök hücrelerin diğer işlevsel doku hücrelerinden farklı olarak çok sayıda bölünebilme, çoğalabilme ve kendini yedekleyebilme yeteneği vardır. Bu özelliklerini durdurup sessiz hale geldiklerinde **potansiyel kök hücre** olarak adlandırılırlar. Bu potansiyel kök hücreler tekrar döngüye girerek çoğalabilme özelliklerini geri kazandıklarında **gerçek kök hücre** olarak isimlendirilirler. Kök hücreler sahip oldukları bu özellikler ile buldukları dokulardaki sayılarını belli bir oranda tutup gerekli olduğu hallerde çoğalarak doku veya organın ihtiyacı olan hücreleri oluşturabilirler (Loeffler ve Roeder, 2002; Karaöz ve Ovalı, 2004; Bayık, 2009; Karaöz, 2010a).

Kendini yenileme ve çoğaltabilme özelliğine sahip olmayan ve sadece tanımlı bir veya iki hücreye dönüşebilme özelliğinde olan hücrelere ise öncül (prekürsör, progenitör) hücre denilir. Bu hücrelerin kök hücrelerden farkı bir kez bölündükten sonra kaynak hücre özelliklerinin sadece sınırlı bir kısmını gösterebilmeleridir (Loeffler ve Roeder, 2002; Karaöz ve Ovalı, 2004; Bayık, 2009; Karaöz, 2010a) (Şekil 1).



Şekil 1: Projenitör hücreden farklılaşmış hücrelerin oluşması (The National Institutes of Health resource for Stem Cell Research'den uyarlanarak, 2001)

Kök hücreler kendilerini yedekleyebilmelerini asimetrik bölünme ile sağlarlar. Asimetrik bölünme kök hücre özelliğinin devamlılığının sağlanmasında önemlidir. Asimetrik bölünmede kök hücrenin bölünerek meydana getirdiği iki kardeş hücreden bir tanesi kök hücre olarak kalıp kendi özelliklerini sürdürmeye devam ederken, diğer kardeş hücre hızla dokuya ait olan öncül hücreye ve buradan da farklılaşarak işlevsel hücreye dönüşür (Öktem ve Altay, 2009) (Şekil 2).

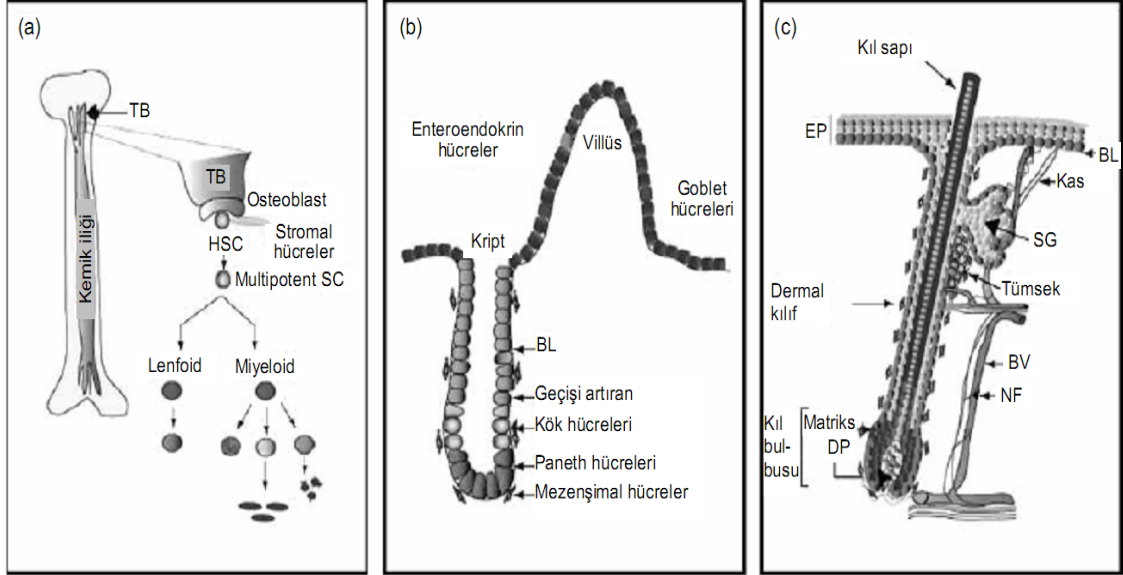


Şekil 2: Asimetrik bölünmeyle kendini yenileme ve farklılaşmış hücre eldesi (The National Institutes of Health resource for stem cell research'den uyarlanarak, 2001)

Kök hücrelerin farklılaşıp yaşamlarını devam ettirdikleri mikroçevre ya da yatak anlamına gelen sınırlı fizyolojik çevreye “niche”(niş) denir. Günümüzde mikroçevrenin sadece kök hücrelere değil ortamdaki diğer hücrelere de yataklık ettiği ve kök hücrelerin farklılaşmasını da içeren bir çok iletim sinyallerini içeren komplike bir yapı olduğu bilinmektedir (Can, 2007; Karaöz, 2009). Mikroçevreler kök hücrelerin korunmasının yanı sıra doku homeostazını ve onarımını sağlamak için gerekli olan kök hücre aktivitesini düzenlemeye yardımcı olan moleküler sinyallerin üretiminde de rol alırlar (De Bari ve ark., 2006).

Memelilerdeki kök hücre mikroçevreleri çeşitlidir (Şekil 3). Mikroçevre hücreleri ile fiziksel etkileşimler, kök hücre mitozu sırasındaki bölünme düzlemi ve

mikroçevrelerde aktif olan yollar (Wnt, Notch), kök hücrenin simetrik ve asimetric bölünme arasındaki dengeyi ve bunun sonuçlarını kontrol altında tutar. Bu olaylardaki eksiklik veya fazlalık doku onarımında yetersizlik veya tümör ile sonuçlanabilir (De Bari ve ark., 2006).



Şekil 3:a. Kemik iliğindeki hematopoietik kök hücre (HSC) mikroçevreleri. Trabeküler kemik (TB) b. İnce barsakkök hücre mikroçevresi. Bazal lamina (BL) c. Deride, kıl follikülü Mikroçevresi. Yağ bezleri (SG), derma papilla (DP) sinir lifleri (NF) epidermis (EP) kan damarları (BV) (De Bari ve ark.'dan, 2006)

Kök hücrelerinin de çoğalma ve bölünebilme kapasiteleri sınırsız değildir. Organizmadaki hücrelerin bölünme kapasitelerini belirleyen faktörlerin başında doğrusal kromozomların ucunda bulunan ve “telomer” olarak adlandırılan kısa DNA tekrar dizileri ve birlikte buldukları protein yapılar gelir. Telomerler;

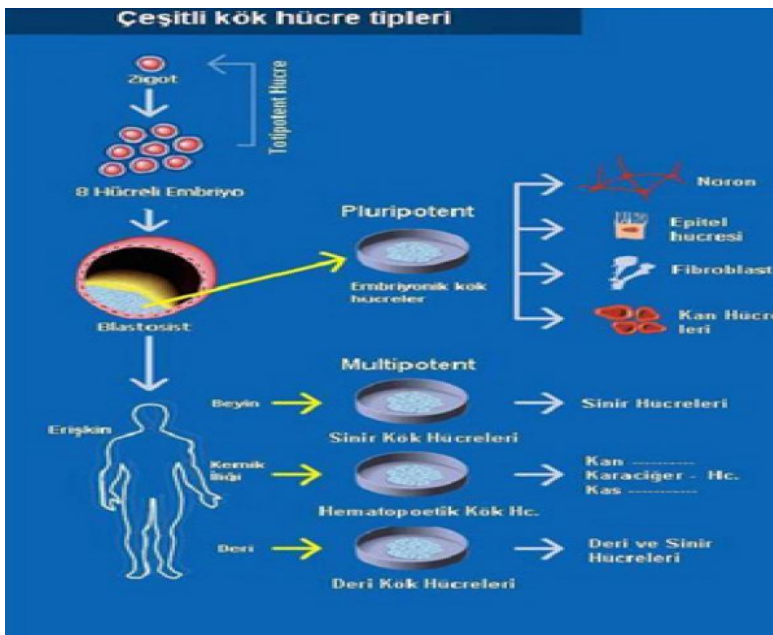
1. Normal bir yaşam döngüsü içerisinde gerekli olan hücresel fonksiyonların yerine getirilebilmesi için yeterince bölünebilmeyi sağlarken
2. Aynı zamanda kontrolsüz şekilde aşırı hücre çoğalmasını ve tümör oluşumunu engellemek için gerekli olan seçici baskıyı oluştururlar.

Bu iki oluşum arasındaki dengeyi sağlamak için telomerin sahip olduğu asgari uzunluğu korumaya yetecek seviyede tutulması gerekmektedir (Karaöz, 2010a).

Kök hücreler fonksiyon olarak özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilirler. Bu olaya farklılaşma (**diferansiyasyon**) denir. Kök hücreler birden fazla hücre tipine

farklılaşabilirler. Farklılaşabilme yeteneklerinin derecelerine ve kök hücrelerin özelliklerine göre; totipotent, pluripotent ve multipotent olarak adlandırılırlar (Karaöz ve Ovalı, 2004; Bongso ve lee, 2005; Can, 2009; Karaöz, 2010a) (Şekil 4).

Totipotent kök hücreler: Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir. Bu kök hücreler embriyo, embriyo dışı membranlar ile embriyo sonrası tüm doku ve organları oluşturabilecek kapasitededirler. Tek totipotent kök hücre tam bir birey oluşturabilir. Bu hücreler, erken embriyonik dönemdeki ilk sekiz hücredir ve blastomer olarak adlandırılırlar (Tablo 1).



Şekil 4:Çeşitli kök hücre tipleri (Karaöz ve Ovalı'dan, 2004)

Pluripotent kök hücreler: Erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde blastomerler blastokist adı verilen iç boşluklu mikroskobik hücre topluluklarına dönüşmeye başlarlar. Blastokist üç ana yapıdan meydana gelir. İlki dış tabakayı oluşturarak blastokisti çevreleyen **trofoblast** olarak adlandırılan hücrelerdir. İkincisi trofoblastların iç kısmında kalan **blastosöl** olarak adlandırılan boşluk ve son olarak da **embriyoblast** olarak adlandırılan İç Hücre Kitlesi (İnner Cell Mass; ICM)'dir. İşte bu iç hücre kitlesinden oluşan hücreler vücudun endoderm, ektoderm ve mezoderm denilen üç embriyonik tabakasından köken alan yaklaşık 270 farklı tür hücreye dönüşebilecek kapasitededir. Bu özelliğe sahip olan kök hücreler pluripotent kök hücre olarak adlandırılırlar. Pluripotent kök hücreler gebeliğin devamını sağlayan hücrelere

kaynaklık edebildikleri halde tek başlarına yeni bir birey meydana getiremezler (Tablo 1).

Multipotent kök hücreler: Gelişimin ilerlediği fetal dönemde daha özel görevlere sahip erişkin kök hücreler oluşur. Bu hücreler sadece içinde buldukları dokunun hücre tiplerini oluşturabilirler. Böyle kök hücreler multipotent kök hücre olarak adlandırılırlar. Kemik iliğinde bulunan kırmızı ve beyaz hücrelere kaynaklık eden Hematopoietik Kök Hücreler (HKH) ile fibroblastlara, osteoblastlara, tenositlere kaynaklık eden Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) bu gruba örnek olarak verilebilir (Kansu, 2005; Bongso ve Lee, 2005; Can, 2009; Karaöz, 2010a) (Tablo 1).

Tablo 1: Kökenlerine, farklanma etkinliklerine veya farklanma yönlerine göre kök hücre türleri
Embriyonik kök hücreler (EKH), Yetişkin kök hücreler (YKH) (Can'dan, 2009)

İsim	Hücre Tipi (Yerleşim)	Farklanma Etkinliği	Farklanma Yönü
EKH	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve embriyon dışı tabakalar
EKH	Blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyon gövdesi (tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri
EKH	Ekloderm, endoderm ve mezoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
YKH	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Hücrenin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre (örn. hematopoetik kök hücre)
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi (örn. kas dokusundaki uydu hücreler)

Son yıllardaki çalışmalara kadar kök hücrelerin sadece içinde buldukları dokuya ait fonksiyonel hücreleri oluşturabildiği sanılırdı. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda kök hücrelerin sadece buldukları dokudaki hücrelere değil uygun ortam ve uyarılar ile başka doku hücrelerine de dönüşebildikleri gösterilmiştir. İşte kök hücrelerin uygun mikroçevre ortamlarında farklı hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine dönüşüm (**plastisite**) adı verilir. Kök hücrelerin bu dönüşüm yeteneğini gerçekleştirebilmeleri için ya değişik dokularda bulunan kök hücrelerin başka dokulardabulunan kök hücreler ile aynı özelliklere sahip multipotent hücre olmaları ya da daha sonraki dönemlerde kullanılabilmesi için yedekte tutulmaları gerekir. Bir

diğer yol ise gereksinim duyulduğunda farklı görevler yapabilecek in-vivo programlanma yeteneğinde olmalarıdır (Avcu, 2006; Bayık, 2009).

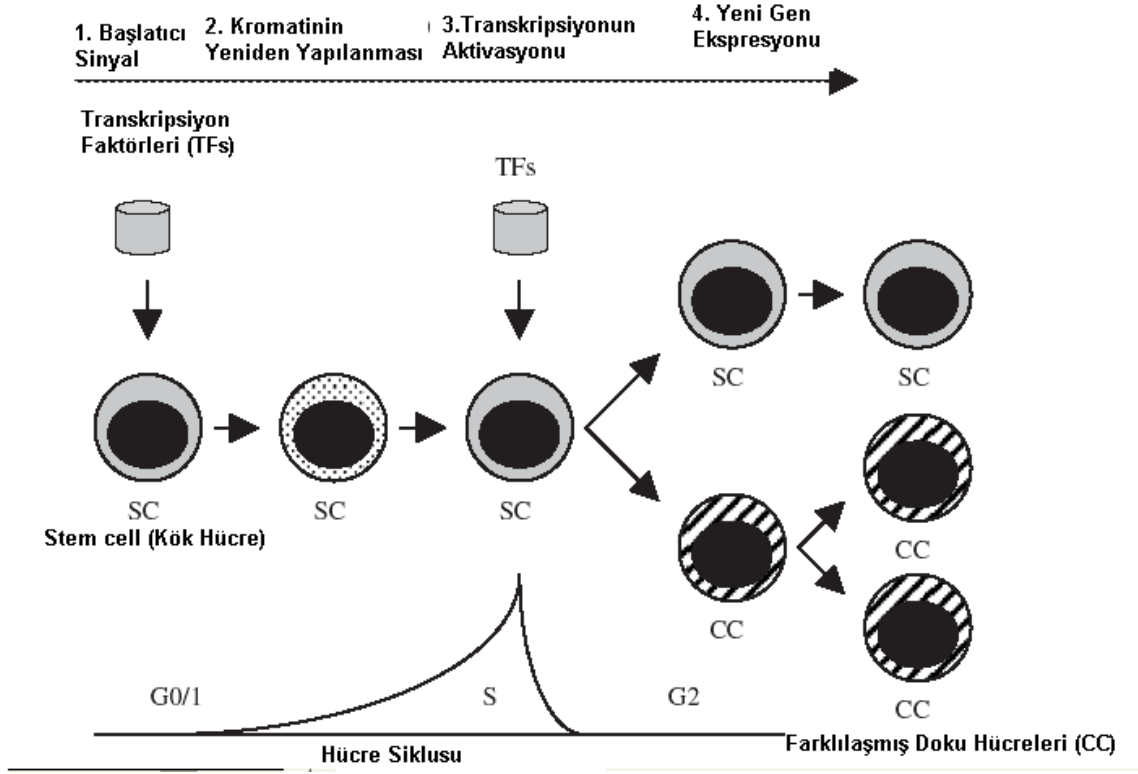
Kök hücrelerin plastisiteyi gerçekleştirebildiğini söyleyebilmek için,

- Hücrelerin tanımlanmalarını sağlayan hücre belirteçlerinin değişmiş olan hücrenin kökeni hakkında bilgi verebilmesi,
- Farklılaşan hücrenin farklılaştığı doku hücrelerinin fenotipik ve morfolojik özelliklerini gösterebilmesi,
- Dönüştüğü dokunun işlevsel olarak tüm görevlerini yerine getirebilmesi gerekmektedir(Wurmsen ve Gage, 2002; Verfaillie ve ark., 2002; Karaöz ve Ovalı, 2004; Bayık, 2004; Avcu, 2006; Kansu, 2007).

Kök hücrenin temel biyolojisini anlamak için, kendini yenileme (**self-renewal**), çoğalma (**proliferasyon**) ve farklılaşma (**diferansiyasyon**) fonksiyonlarını açıklayan mekanizmaların anlaşılması gerekmektedir. Bu mekanizmaların basamakları şöyledir(Quesenberry ve ark., 2002; Güneş, 2005; Bongso ve Lee, 2005) (Şekil 5):

- **Başlatıcı sinyal:** Yazılım(transkripsiyon) faktörlerinin farklılaşmayı başlatması için gerekli olan sitokin, kemokin veya adezyon reseptörlerinin eksternal olarak uyarı oluşturması,
- **Kromatinin yeniden yapılanması** (remodelling): Kök hücre çekirdek kromatininde transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle yeniden yapılanmanın oluşturulması,
- **Transkripsiyon aktivasyonu** (uyarılma): Kök hücre çekirdek DNA'sına daha fazla transkripsiyon faktörlerinin bağlanması,
- **Yeni gen ekspresyonu** (ifadelenme): Kök hücrenin DNA'sındaki bu değişiklikler sonucunda yeni gen veya genlerin ekspresyonu ile kök hücreden ilgili dokuya özgü yeni hücre oluşması.

Bu olayların tamamı hücre döngüsü içerisinde farklı zamanlarda gerçekleşmektedir. Kök hücrenin farklılaşmasının sağlanabilmesi ancak bu döngünün değişik fazlarına etki eden adezyon reseptörleri ve sitokinler gibi faktörlerin etkisi ile gerçekleşir.



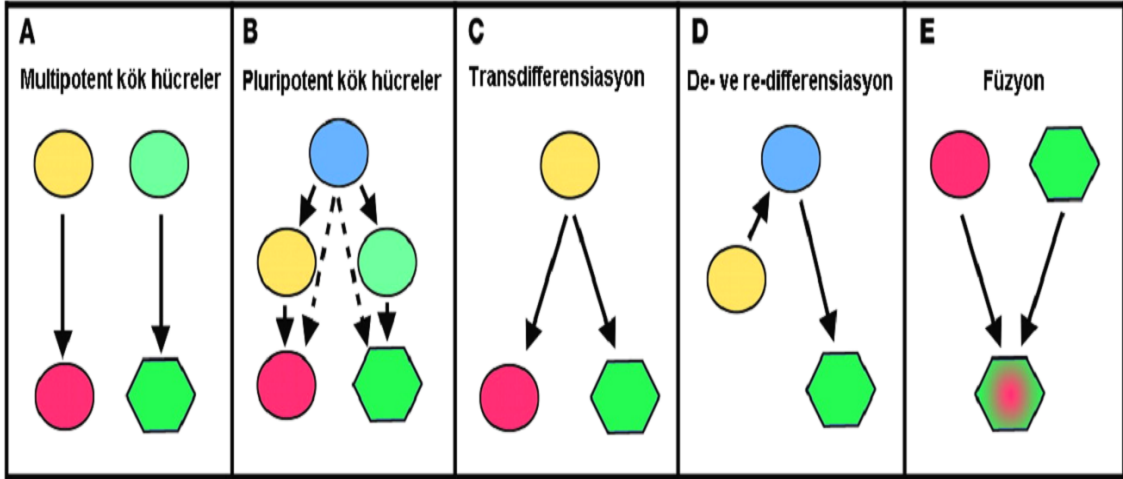
Şekil 5: Kök hücre farklılaşmasını açıklayan teori (Güneş'ten, 2005)

Kök hücrelerin plastisite yeteneğini açıklayan mekanizmalar ise şöyle sıralanabilir (Şekil 6):

- 1) Yetişkinlerdeki çoğu dokuda (beyin, kemik iliği, göz, akciğer, burun, pankreas, deri vb.) potansiyel kök hücreler vardır. Bu kök hücreler farklı özelliklere sahip olabilirler. Hasarlanma ve zedelenme gibi gereklilik hallerinde doku ve organın işlevsel hücrelerine farklılaşırlar. Buna örnek olarak HKH verilebilir (Bayık, 2004; Ural, 2006a)
- 2) Doku ve organlarda hem pluripotent hem de multipotent kök hücreler vardır. Bu kök hücreler farklı bir doku veya organa ait kök hücre fenotipini kazanabilir ve bazı durumlarda mezoderm, ektoderm ve endoderm hücreleri birbirine değişebilir. Gelişimini tamamlamış bir doku veya organdaki hücrelerin çoğu belirli bir görev için farklılaşmış ve fenotipik özellikler olarak benzer fonksiyonel hücrelerdir. Bu hücrelere olan gereksinim artınca ya mitojenlerin salınımıyla hücre bölünmesi uyarılır (karaciğer hücreleri, damar endotel hücreleri, iskelet kası hücreleri) ya da kök hücrelerden gelen yeni nesil hücreler

bu işlevsel hücrelerin (kan hücreleri) yerini alır. Bu mekanizmaya örnek olarak olarak da birçok farklı doku hücresine dönüşebilen Multipotent Erişkin Öncül Hücre (Multipotent Adult Progenitor Cell; MAPC) verilebilir (Pınarlı, 2009; Karaöz, 2010b).

- 3) **Transdiferansiyasyon**, farklılaşmış bir hücrenin farklı bir dokuya ait başka bir hücrenin fenotipini kazanmasıdır. Örnek olarak normal gelişim sırasında yemek borusundaki düz kaslardan iskelet kaslarının oluşumu verilebilir. **Transdeterminasyon** ise bir kök hücrenin farklı bir dokuya ait kök hücreye dönüşümüdür. Hücrelerin gelişimsel sınırlılıklarından bağımsız olarak önceki fenotiplerine dönüşmesi geri yönde farklılaşma(**dediferansiyasyon**) olarak tanımlanırken bu önceki ilkel formdaki hücrenin uygun çevresel şartlar, humoral ve hücrel sinyallerle ileri yönde tekrar farklılaşmasına da **rediferansiyasyon** denilir. Bu tanımlamalara örnek olarak semenderlerde bir ekstremitenin kesilmesi sonucunda o bölgedeki kas hücrelerinin önce dediferansiyasyon olarak ilkel öncül hücre haline gelmesi ve sonra bu durumdan rediferansiyasyon ile kesilen ekstremitenin kemik, kıkırdak, kas ve deri dokusunu oluşturması verilebilir (Loeffler ve Roeder, 2002; Güneş, 2005; Karaöz, 2010b).
- 4) Kök hücre plastisitesini açıklamaya çalışan bir başka kavram ise **hücre füzyonu** (kaynaşma) dur. Verici hücrelerin, alıcı hücreler ile füzyona uğraması sonucu her iki hücrenin özelliklerine sahip olan tetraploid (4n) hücreler oluşur. Hücre füzyonu sadece tetraploidiyi kaldırabilecek hücrelerde (kas, hepatosit, kardiyomyosit, purkinje hücreleri vb.) oluşabilir. Hücre füzyonu hem in vitro hem de in vivo olarak çalışmalarla gösterilmiştir (Wurmser ve Gage, 2002; Alvarez-Dolado ve ark., 2003; Verfaillie, 2009)



Şekil 6: Kök hücre plastisitesini açıklayan hipotezler (Karaöz'den, 2010b)

Yapılan çalışmalarda, kullanılan kök hücrelerin plastisitesinin kanıtlanabilmesi için değişik yöntemler ve yaklaşımlar kullanılmıştır. Kullanılan bu yöntemlere bakacak olursak in-vitro ve in-vivo olarak iki alt başlık halinde topladıklarını görürüz (Kotton ve ark., 2001; Jiang ve ark., 2002; Karaöz, 2009; 2010b).

1) İn-vitro yöntemler:

- Kültüre koşullarının düzenlenmesine yönelik,
- Genomu değiştirmeye yönelik (genetik modifikasyonlar),
- Farklı hücre ve dokular ile yapılan ko-kültürlere yönelik.

2) İn-vivo yöntemler:

- Genotipik farklılığı olan bireyler (XX, XY) arasındaki doku ve organ nakilleri sonrasında verici genotipinin (Y+) alıcı doku ya da organda laboratuvar işlemleri [Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR), Floresan İn Situ Hibridizasyon(Fluorescence In Situ Hybridization; FISH)]ile gösterilmesi,
- Yine genotipik farklılığı olan bireyler (XX, XY) arasındaki kordon kanı, periferik kan ve kemik iliği nakilleri sonrasında verici genotipinin (Y+) alıcının değişik doku ya da organlarında kimerik olarak gösterilmesi,
- İn-vitro olarak hücre işaretleyicilerle [Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein; GFP)] işaretlenen kök hücrelerin ilgili doku ya da organa nakillerinden sonra nakledilen dokuya dönüşümün gösterilmesi,

- GFP veya LacZ genini ekspres eden erişkin kök hücrelerin hasarlı ya da sağlıklı alıcılara nakli sonrasında nakledilen dokularda takip edilmesi
- Erişkin kök hücrelerin (kemik iliği kök hücre) mobilizasyonu yapılarak kaynaklandığı dokudan farklı dokulara dönüşümünün kimerizm ile beraber gösterilmesi,
- Değişik hücre işaretleyicileri (GFP, LacZ) ile işaretlenen kök hücrelerin, alıcı doku veya organdaki son durumlarının izlenmesi,
- Farklı türler arasındaki (insandan hayvana) nakiller sonrası, verici hücreye ait antijenik yapıların alıcının dokularında gösterilmesi,
- Anne dokularında genotip uyumsuz fetal hücrelerin gösterilmesidir.

II. B. Kök Hücrelerin Elde Edilme Kaynakları ve Çeşitleri

Kök hücrelerin elde edilmesi için kullanılan iki temel kaynak vardır. Bunlar (Verfaillie ve ark., 2002; Karaöz ve Ovalı, 2004; Bongso ve Lee, 2005; İnan ve Özbilgin, 2009) (Şekil 7):

- Gelişimin erken dönemlerinde blastokistin ICM'den elde edilen **Embriyonik Kök Hücreler (EKH)** ve
- Doğum sonrası dönemlerde elde edilen **embriyonik olmayankök hücrelerdir.**

1) Embriyonik kök hücre kaynakları:

- IVFamacıyla elde edilen ve kullanılmayan embriyolar,
- EKH elde edebilmek amacıyla oluşturulmuş embriyolar,
- Düşük materyalinden elde edilen fetal doku.

2) Embriyonik olmayan kök hücre kaynakları:

- Aseksüel üreme (parteogenez) ile elde edilen partenot hücreleri,
- Plasenta ve göbek kordonu kök hücreleri,
- Fetus kök hücreleri,
- Dokulara özgü kök hücreler (erişkin kök hücre).

A. Germ hücrelerinden kaynaklı kök hücreler,

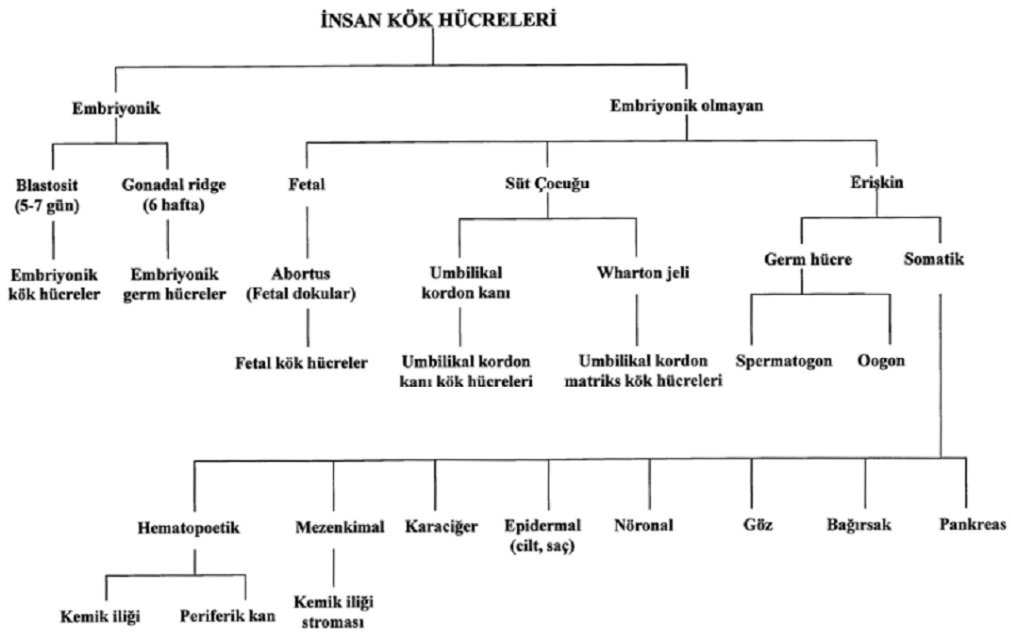
a. Oogonial kök hücre,

b. Spermatogonial kök hücre.

B. Somatik hücrelerden kaynaklı kök hücreler,

- a. Mezenkimal kök hücre,
 - Kemik iliği stromasından köken alan MKH (KİMKH),
 - Kemik iliği dışındaki organ ve dokuların stromasından köken alan MKH.
- b. Hematopietik kök hücre,
 - Kemik iliğinden köken alan HKH,
 - Kordon kanından köken alan HKH,
 - Periferik kandan köken alan HKH.
- c. Epidermal kök hücre,
- d. Karaciğer kök hücreleri,
- e. Adiposit (yağ dokusu) kök hücreleri,
- f. Kardiomyosit (kalp kası) kök hücreleri,
- g. Nöronal kök hücreler,
- h. Göz kök hücreleri,
- i. Bağırsak kök hücreleri,
- j. Pankreas kök hücreleri,
- k. Diğer doku kök hücreleri.

- Kadavra kaynaklı kök hücrelerdir.

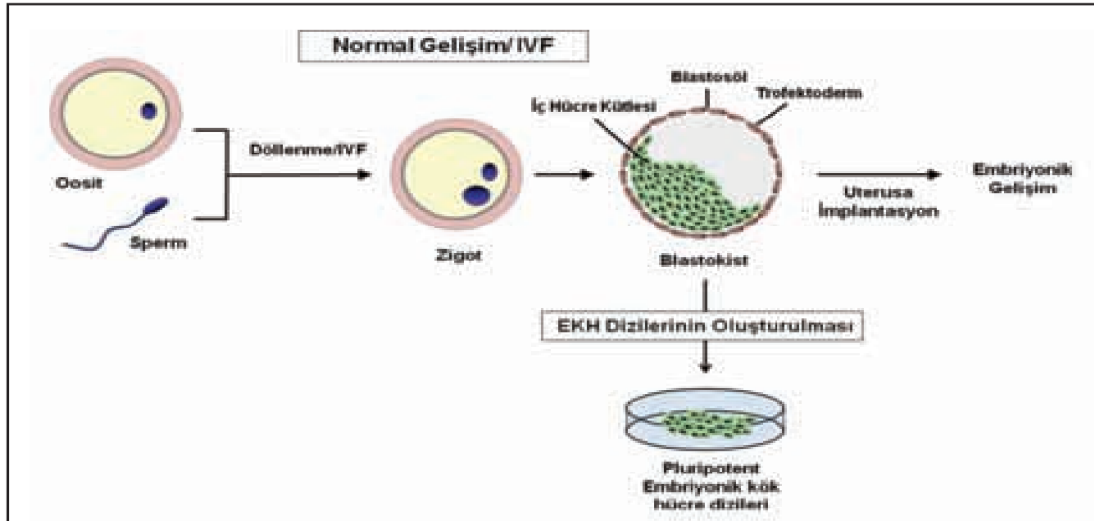


Şekil 7: İnsan kök hücre kaynakları (Bongso ve Lee'den, 2005)

II. B. 1. Embriyonik Kök Hücre

Embriyonik kök hücreler erken embriyonik gelişimin blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesinden elde edilirler. EKH araştırmalarının başlangıcını teratoma ve teratokarsinoma çalışmaları oluşturur. Bu tümörlerden elde edilen kendini yenileme özelliği bulunan hücrelerin bağışıklık sistemi baskılanmış deney hayvanlarında tüm dokuları oluşturabildiği ve in-vitro olarak da çoğaltılabildikleri görülmüştür (Martin ve Ewans, 1975). Daha sonraki çalışmalarda fare blastokistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerin tanımlanmasıyla EKH çalışmaları hızlanmıştır (Evans ve Kaufman, 1981; Martin, 1981). 1998 yılında ise potansiyel olarak sınırsız şekilde çoğalabilen, istenilen her hücre tipine dönüşebilen İnsan Embriyonik Kök Hücreleri (iEKH) Thomson ve arkadaşları tarafından elde edilmişlerdir. Elde edilen EKH'ler in-vitro ortamda kararlı bir şekilde ve uygun şartlar altında yüksek oranlarda ve hızla her üç germ tabakasındaki hücre tiplerine farklılaşabilmişlerdir (Thomson ve ark., 1998; Elçin, 2009) (Şekil 8).

Thomson ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmaya göre iEKH'ler mutlaka gömülme öncesi (preimplantasyon) dönemdeki embriyodan alınmalı, farklılaşmadan uzun süreli çoğalabilmeli ve uzun kültür sürelerinde bile üç germ yaprağına farklılaşabilme yeteneklerini kaybetmemelidirler.

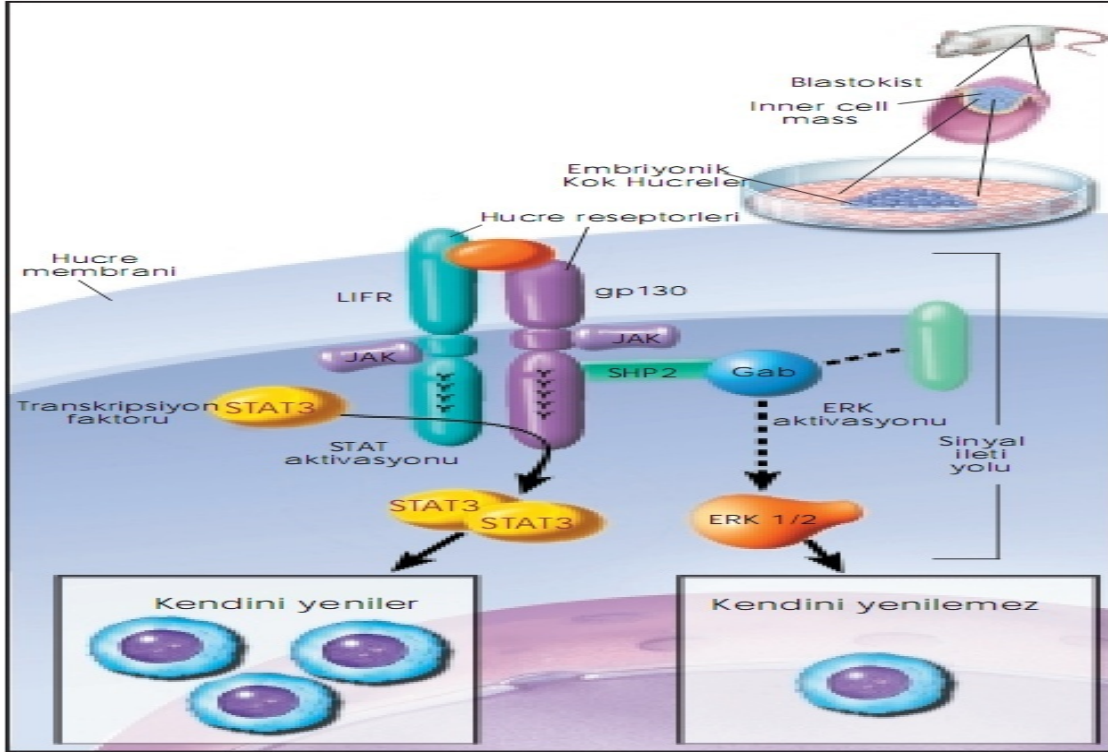


Şekil 8: iEKH dizilerinin elde edilmesi (Elçin'den 2009)

iEKH birçok hücre tipini oluşturabilir. Bunlar arasında kardiyomiyositler, epitelyum hücreleri, hematopoietik hücreler ve sinir hücreleri sayılabilir. Ama çoğu hücre tipine farklılaşma henüz gösterilememiştir. Farklılaşmış hücrelerin fonksiyonel olduğu ise çok az çalışmada kanıtlanabilmiştir (Smith, 2001; Verfaillie ve ark., 2002).

iEKH'lerin somatik hücrelere oranla çekirdek/stoplazma oranı daha yüksektir ve bu hücrelerde birden fazla çekirdekçik bulunabilir. iEKH'leri özel kültür ortamlarında ve uygun şartlarda farklılaşmadan uzun süre çoğalabilirler. Farklılaşmayı engelleyen şartlar ortadan kalktığında ise hızla organizmayı oluşturan tüm hücre tiplerine farklılaşmaya başlarlar(Smith, 2001).

EKH'lerin kendilerini yenileyebilmeleri ve farklılaşmadan çoğalabilmeleri temel moleküler programlar ve sinyal yolları ile kontrol edilir. İnsan iç hücre kütesinden farklı olarak fare iç hücre kütesi embriyon dışı endoderm, mezoderm ve amniyona da kaynaklık eder. Fare EKH'lerinin bulunduğu ortama Lösemi İnhibitör Faktör (Leukemia Inhibitory Factor; LIF) veya bununla ilişkili sitokinler eklendiğinde farklılaşmadan çoğalabilirler. LIF fare EKH'lerinin yüzeyindeki LIF reseptör ve gp 130 kompleksine bağlandığında Janus'a Bağlı Tirozin Kinazı (Janus kinase;JAK) aktifleştirir. Bundan sonra Sinyal İletimi ve Transkripsiyon Aktivatörü(Signal Transducer and Activator of Transcription;STAT) fosforile olur. Bu yolağın aktive olması fare EKH'lerinin çekirdeğini etkileyerek farklılaşmadan çoğalmalarını sağlar (Smith, 2001; Cheung ve ark., 2003; O'Shea, 2004; Karaöz, 2006; Vatansever, 2009; Fındıklı, 2009) (Şekil 9).



Şekil 9:Jak/STAT3 aktivasyon yolu ve RAS-Raf, MEK ve ERK yolu üzerinden farklılaşmanın veproliferasyonun kontrolü[The National Institutes of Health resource for stem cell research(<http://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter4.asp>.)'den, 2001]

Farklılaşmanın sağlanması ise ortamda LIF'in olmaması ile RAS/MEK/ERK yolağı üzerinden gerçekleşir (Smith, 2001; Cheung ve ark., 2003; O'Shea, 2004; Karaöz, 2006; Vatansever, 2009; Fındıklı, 2009) (Şekil 9).

Tüm EKH'lerin ortak bazı özellikleri vardır. Bunlar (Baharvand, 2004; Türkşen, 2006; Karaöz, 2006):

- Kökenleri iç hücre külesidir.
- Telomeraz aktivasyonları oldukça yüksektir. Bu sayede sınırsızca (pasajlar boyunca) ölmeden ve farklılaşmadan çoğalabilirler.
- Pasajlamalar (alt kültür) süresince kromozomal stabiliteye sahiptirler.
- Tek germ hücresinden çoğalma (klonalite) özellikleri vardır.
- Eksternal olarak LIF verilmesi farklılaşmanın engellenmesini sağlar.
- Kendilerini yenileme (self renewal) kapasiteleri fazladır.
- Her üç germ yaprağına da dönüşebilme yetenekleri vardır.
- İn vitro olarak uygun şartlar sağlandığında somatik hücelere dönüştürülebilirler.

- İn vitro farklılaştırma yapılmadan kullanıldıklarında teratom oluşumuna yol açarlar.
- Pluripotentliğin belirteçleri olan Stage-Spesifik Embriyonik Antijen-3(Stage Specific Embryonic Antigen-3; SSEA-3), Stage-Spesifik Embriyonik Antijen-4(Stage Specific Embryonic Antigen-4; SSEA-4), TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog, Sox-2, Rex-1, FGF-4 ekspresyonlarını sağlarlar.
- Hücre döngüsünde G1 kontrol noktası yoktur ve ömrünün çoğunu S safhasında geçirirler.

Embryoid cisim (EB) oluşturmak EKH'lerin farklılaşmasını sağlayan yöntemlerden birisidir. Bunun sağlanabilmesi için LIF eklenmemiş kültür ortamı veya kültür ortamının besleyici tabakadan uzaklaştırılması gereklidir. Oluşan EB'ler küre şeklindedirler ve üç germ tabakasından da hücre içerirler. EKH'lerin pluripotent olduğunun gösterilmesinin en iyi yolu organizmaya verildiğinde bu hücrelerin çeşitli dokulara dönüşebildiğinin gösterilmesidir. Ahlaki ve yasal nedenlerden dolayı bu işlemin insanlar üzerinde uygulanması mümkün değildir. EKH'ler immün yetersiz bir fareye verildiğinde, her üç germ tabakasını da oluşturan teratomlar gözlenmiştir. (Thomson ve ark., 1998; Ural, 2006b).

EKH'ler ile ilgili olarak yapılan bu araştırmalar ışığında günümüzde ve ileriye yönelik olarak elde edilen bazı çıkarımlar vardır. Bunlar arasında (Petersen ve Terada, 2001; Daley ve ark., 2003; Baharvand, 2004; Karaöz ve Ovalı, 2004; Bongso ve Lee, 2005):

- İnsan gelişimi sırasında meydana gelen olaylara ait bilgilerin açıklanabilmesi,
- Kısırlık ve konjenital defektlerin saptanmasında yardımcı olması,
- Gen tedavisi ve gen mühendisliğinde kök hücre avantajlarından yararlanılması,
- Kanser hücreleri ile kök hücreler arasındaki benzerlikler nedeni ile kanser mekanizmasının anlaşılmasında katkı sağlayarak ileride kansere yönelik tedavi protokollerinin oluşturulmasına yardımcı olması,
- Hücre kaynaklı tedavide faydalanılmak üzere doku ve hücrelerin elde edilmesine olanak sağlaması (omurilik zedelenmesi, kalp krizi, Parkinson vb.),
- İstenilen hücre ve dokuların kolay elde edilebilmesi ile bu doku ve hücrelere ait hastalıklara karşı yeni ilaç ve tedavi araştırmalarının kolaylıkla yapılabilmesine izin vermesi sayılabilir.

Bütün bu gelişmelerin ve beklentilerin yerine getirilebilmesi için EKH ile bağlantılı bazı sorunların çözülmesi gerekmektedir. Bu sorunlar arasında; istenilen hücre türünü yeterli sayı ve kalitede elde edebilmek için kültür şartlarının standart hale getirilememiş olması, bağışıklık reddi problemine karşı stratejilerin hala tam sonuçlanamamış olması, bu hücrelerin teratom yapıcı etkilerinin çözülememesi ve tedavilerde istenilmeyen durumlarla karşılaşıldığında uygulamaya son verilmesi sayılabilir (Karaöz ve Ovalı, 2004; Türkşen, 2006).

II.B.2 Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

II.B.2.a. Erişkin Kök Hücreler

Somatik kök hücre olarak da adlandırılan Erişkin Kök Hücre (ERKH)'ler erişkin dokularda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. ERKH'ler gereksinim durumunda bulunduğu dokulardaki öncü hücelere ve farklılaşmış fonksiyonel hücelere dönüşebilme potansiyeline sahip multipotent kök hücrelerdir. EKH'lere nazaran gelişimin daha sonraki dönemlerinde görülürler ve kendilerini yenileyebilme kapasiteleri de daha sınırlıdır. Alıcı immün sistemine uyum gösterirler ve teratokarsinom oluşturmazlar. ERKH'ler laboratuarlarda uygun ortam ve sinyaller ile farklı hücre tiplerine dönüşebilirler (Karaöz ve Ovalı, 2004; Caplan, 2009; İnan ve Özbilgin, 2009).

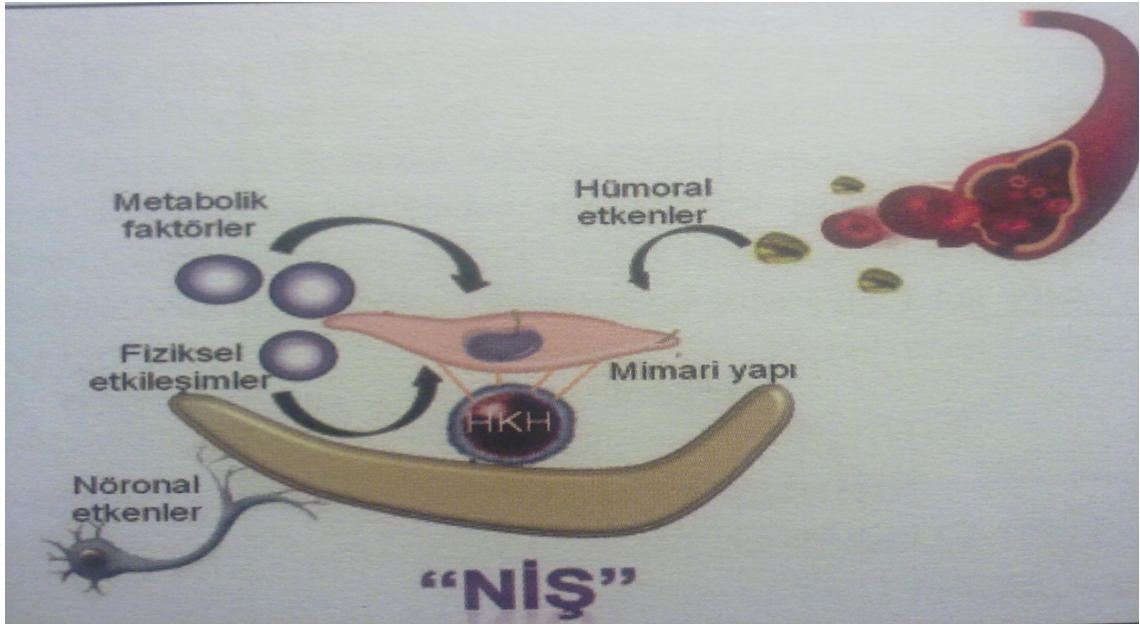
ERKH'lerin fizyolojik asıl işlevi biyolojik, moleküler ve genetik özellikleri ile doku homeostasisini ve hasarlanmalardan sonra doku rejenerasyonunu sağlamaktır. Organizma olgunlaşırken dokulardaki kök ve öncül hücrelerin sayısı da giderek azalır. Bu yüzden ilerleyen yaşla birlikte vücudun kendini onarabilme kapasitesi gittikçe düşer. Organizmada dokuların yenilenmesi (**rejenerasyon**) ve tamir edilmesi (**reparasyon**) iki yolla sağlanır. İlk yol, doku bünyesinde bulunan özelleşmiş hücrelerin çoğalmasını (proliferasyon) uyarmaktır. Karaciğer, endotel hücreleri ve iskelet kasları bu gruba örnek olarak gösterilebilir. İkinci yol ise, dokularda bulunan kök hücrelerin özelleşmiş doku hücrelerine farklılaşmasıdır. Bu hücelere en iyi örnek HKH'lerdir (Can ve Karahüseyinoğlu, 2009; Çamurdanoğlu ve Kansu, 2009).

II.B.2.b. Hematopoietik Kök Hücreler

HKH erişkinlerden elde edilebilen az sayıdaki kök hücrelerdendir. Kan kök hücrelerinin gereksinim durumunda kendini yenilemesi, çoğalması ve periferik kan

hücrelerine dönüşmesi işlemine hematopoez denir. HKH'ler embriyogenezde mezodermden köken alır ve embriyo kemik iliği, karaciğeri gibi bölgelerde bulunur. HKH'ler kemik iliğinde mezenkimal kökenli kök hücreler ile beraber bulunurlar. Erişkinlerde ise öncelikle kemik iliği olmak üzere kordon kanından ve periferik kandan elde edilebilirler. Kemik iliğinden elde edilen kök hücreler multipotentdirler ve farklı birçok hücre tipine farklılaşabilirler (Karaöz ve Ovalı, 2004; Kansu, 2007; Zovein ve ark, 2008; Çamurdanoğlu ve Kansu, 2009; Ünal, 2009).

Kemik iliğinde yerleşik olarak bulunan HKH'ler sorumluluklarını yaşam süresince devam ettirirler. HKH'lerin tüm fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri içerisinde buldukları HKH mikroçevresi tarafından sağlanır. Parankim ve stromadan oluşan kemik iliğinde HKH'lerin farklı fonksiyonlarını düzenleyen iki çeşit mikroçevre vardır (Şekil 10).



Şekil 10: HKH'lerin fonksiyonlarını düzenleyen mikroçevredeki farklı etkileşimler (Çamurdanoğlu ve Kansu'dan, 2009)

Kemik iliği stroma hücreleri hücreler arası sinyallerle HKH'lerin kendilerini yenileme ve farklılaşmasını düzenlerler. Bu hücreler arasında osteoblastlar, endosteal mikroçevreyi oluştururken endotel hücreleri ise vasküler mikroçevreyi oluştururlar. Endosteal mikroçevre kemik yüzeyinde lokalize iken vasküler mikroçevre kemik iliği

sinüzitleri bölgesindedir. Kök hücre mikroçevre etkileşimleri HKH'lerin sessiz kalması, kendini yenilemesi ve farklılaşması arasında bir denge sağlar (Can, 2007; Caplan, 2009; Ural, 2010).

II.B.2.c. Karaciğer Kök Hücreleri

Karaciğer vücudun diğer organlarından farklı olarak, %55-65 oranına ulaşan doku kayıplarında bile rejenere olarak hayatın devamına olanak tanır. Bu rejenerasyonda değişik mekanizmalar ve farklı kök hücreler rol oynar (Tanaka ve ark., 2011).

II.B.2.d. Adiposit Kök Hücreleri

Adiposit kök hücreleri yağ dokusundan elde edilen fibroblast benzeri hücrelerdir. İn-vitro koşullarda adipojenik (yağ), kondrojenik (kıkırdak), osteojenik (kemik) ve myojenik (kas) hücrelere dönüşebilirler. Doku mühendisliğinde ve farklı rejeneratif tedavide kullanılırlar (Yamada ve ark., 2007; İnan ve Özbilgin, 2009).

II.B.2.e. Kıkırdak ve Kemik Kök Hücreleri

Kemik dokusunda oluşan defektlerde kemikte bulunan osteoprogenitör hücrelerin katkısı yeterince açıklanamamıştır. Kemik stromasında yer alan MKH'ler şartlar uygun olduğunda kemik ve kıkırdak hücrelerine dönüşebilirler. Kıkırdak hasarlanmalarında kıkırdak kök hücrelerinin sayılarının az ve rejenerasyona katılımlarının sınırlı olması nedeniyle diğer çevre doku kök hücrelerinin de bu onarım işleminde yer aldığı sanılmaktadır (Kömürcü ve Özkan, 2006).

II.B.2.f. Sindirim Sistemi Epitel Kök Hücreleri

Sindirim sistemi epitel hücre yenilenmesi bağ dokusu ile epitel arasındaki etkileşim ile sağlanır. Bu etkileşimde ve kontrolde kök hücrelerin etrafındaki mikroçevrenin etkisi büyüktür. Yenilenme işleminde yer alan sinyal yolları; Wnt/T-Hücre Faktörü- β -Katenin (TCF/- β -katenin), Notch, Sonic Hedgehog (SHH) ve Kemik Morfogenetik Protein (Bone morphogenetic protein; BMP)'dir (İnan ve Özbilgin, 2009).

II.B.2.g. Epidermal Kök Hücreler

Erişkin derisindeki kıl follikülleri epidermis tabakasında bulunur. Kıl folliküllerinin her birinde kök hücreler bulunur. Bu kök hücreler multipotentdirler. Kendini yenileme özellikleri sayesinde hayat boyunca dökülen deri hücrelerinin yerine yeni deri hücre yapımında, yara iyileşmesinde, her kıl döngüsünde ve follikül rejenerasyonunda önemli rol oynarlar(İnan ve Özbilgin, 2009).

II.B.2.h. Kardiyomiyosit (kalp kası) Kök Hücreler

Myokardın hasarlanması (myokard infarktüsü, iskemik kalp hastalıkları vb.) durumunda kardiyak progenitör hücreler rejenerasyonu sağlarlar. MKH'ler, HKH'ler ve kahverengi yağ dokusundaki kök hücreler kardiyomiyositlere farklılaşabilirler (Beltrami ve ark., 2003).

II.B.2.i. Mezenkimal Kök Hücreler

MKH'ler konnektif (bağ) dokunun temel hücreleridir. İlk olarak 1976 yılında Friedenstein tarafından tanımlanmışlardır (Friedenstein ve ark., 1976). Tüm dokularda destek hücre görevini üstlenen stromal hücrelerin kökenini oluştururlar. Önceleri, **Koloni Oluşturan Birim-Fibroblast** (Colony Forming Units-Fibroblast; CFU-F) veya **kemik iliği stromal fibroblastları** olarak isimlendirirken günümüzde Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society for Cellular Therapy; 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 adlandırılmaktadırlar (Karaöz ve Ovalı, 2004; Ural, 2009; Çetinkaya, 2009a; Karaöz, 2010c; Can, 2010).

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 uyaranlarla hematopoietik olmayan dokuların (karaciğer, kalp, beyin, böbrek, akciğer vb) parankim hücrelerine farklılaşabildikleri de gösterilmiştir (Kopen ve ark., 1999; Bianco ve ark., 2001; Minguell ve ark., 2001; Kotton ve ark., 2001; Jiang ve ark., 2002; Verfaillie ve ark.,

2002; Preston ve ark., 2003; Muraglia ve ark., 2003; Karaöz ve Ovalı, 2004; Can, 2010).

MKH'lerin elde edildiği en önemli kaynak kemik iliğidir. Bunun yanı sıra diğer doku ve organların stromalarından (yağ, tendon, snovyal membran, plasenta, amniyon materyali, karaciğer, umbilikal kord, diş) da elde edilebilmektedirler (Karaöz ve Ovalı, 2004; Ovalı, 2008a; 2008b; Karaöz, 2010c).

Kök hücreler için ana kaynak olan kemik iliğinde MKH'lerin yanı sıra mezoderm kökenli hematopoitik ve endotel hücreleri de bulunmaktadır. Kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücreye karşılık 2-100 arasında değişen oranlarda MKH bulunmaktadır (Koç ve Lazarus, 2001; Chamberlain ve ark., 2007; Çetinkaya, 2009a; Karaöz, 2010c).

ISCT tarafından MKH'lerin tanımlayıcı özellikleri olarak (Dominici ve ark., 2006; Yılmaz, 2008):

- Standart kültür ortamında plastiğe yapışabilmeleri,
- Belirli yüzey antijenlerini (CD105, CD73, CD90) taşıırken bazı yüzey antijenlerini (CD45, CD34, CD14 veya CD11b/c, CD79, CD19, HLA-DR) taşımamaları (Tablo 2),
- İn-vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmelerinin gösterilmesi önerilmektedir.

MKH'ler görünüm olarak iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre topluluklarıdır. Fibroblastlardan farklı olarak çekirdekleri asimetrik değil simetrikdir (Dominici ve ark., 2006; Yılmaz, 2008).

MKH'lerin fonksiyonları arasında, HKH'lerin stromaya tutunması, salgıladıkları çeşitli faktörler ile hematopoitik öncül hücrenin işlevsel olgun hücreye farklılaşması, bu faktörlerin salınmasının engellenmesi ile Go fazında kalarak kök hücre havuzunu oluşturması ve diğer dokulara hareketin (mobilizasyonun) ve göçün (migrasyonun) sağlanması sayılabilir (Wilson ve Trumpp, 2006; Uçkan, 2007).

MKH'ler antijenik olarak kendilerine has bir belirteç taşımazlar. Fenotipleri ile ilgili çalışmalar daha çok kültür ortamlarında çoğaltılmış hücreler üzerinde araştırılmıştır. Bu hücreler hematopoitik hücre belirteçleri (CD45, CD34, CD14, CD11b/c) ve ko-stimülatör molekülleri (CD80, CD86, CD40) eksprese etmezler. MKH'ler için pozitif olan belirteçler ise; CD44 (HCAM-1), CD105 (SH2-endoglin),

CD106 (VCAM-1), CD73 (SH3/4), Stro-1 (fibroblast yüzey belirteci), CD71 (transferin reseptör) ve CD90 (thy-1)'dir (Karaöz ve Ovalı, 2004; Yılmaz, 2008; Ovalı, 2008b; Çetinkaya, 2009a)(Tablo 2).

Tablo 2:MKH'lerin antijenik özellikleri ve taşıdıkları adezyon molekülleri (Yılmaz'dan, 2008)

<i>Antijen</i>	<i>CD numarası</i>	<i>Ekspresyon</i>	<i>Adezyon molekülü</i>	<i>CD numarası</i>	<i>Ekspresyon</i>
Hematopoietik kök hücre belirteci	CD34	Negatif	ALCAM	CD166	Pozitif
Leukocyte common antigen	CD45	Negatif	ICAM-1	CD54	Pozitif
LPS reseptör	CD14	Negatif	ICAM-2	CD102	Pozitif
T lenfosit belirteci	CD3	Negatif	E-Selektin	CD62E	Negatif
B lenfosit belirteci	CD19	Negatif	P-Selektin	CD62P	Negatif
HLA-DR		Negatif	L-Selektin	CD62L	Pozitif
Lewis X	CD15	Negatif	VCAM	CD106	Pozitif
T6	CD1a	Negatif	Hyaluronate Reseptör	CD44	Pozitif
Endoglin (SH2)	CD105	Pozitif	NCAM	CD56	Pozitif
5' terminal nükleotidaz (SH3)	CD73	Pozitif	LFA-3	CD58	Pozitif
SH4	CD73	Pozitif	LFA-1 α	CD11a	Negatif
Thy-1	CD90	Pozitif	LFA-1 β	CD18	Negatif
Büyüme faktörü ve sitokin reseptörleri			Cadherin 5	CD144	Negatif
Interleukin-1 reseptör	CD121	Pozitif	PECAM-1	CD31	Negatif
Interleukin-2 reseptör	CD25	Negatif	VLA- α 1	CD49a	Pozitif
Interleukin-3 reseptör	CD123	Pozitif	VLA- α 2	CD49b	Pozitif
Interleukin-4 reseptör	CD124	Pozitif	VLA- α 3	CD49c	Pozitif
Interleukin-6 reseptör	CD126	Pozitif	VLA- α 4	CD49d	Negatif
Interleukin-7 reseptör	CD127	Pozitif	VLA- β	CD29	Pozitif
Interferon γ reseptör	CDw119	Pozitif	Beta 4 integrin	CD104	Pozitif
Tümör nekroz faktör alfa reseptör	CD120	Pozitif			
Fibroblast büyüme faktör reseptör		Pozitif			
Platelet kaynaklı büyüme faktör reseptör	CD140a	Pozitif			
Transferrin reseptörü	CD71	Pozitif			

ALCAM	: Activated leukocyte cell adhesion molecule
ICAM	: Intercellular adhesion molecule
VCAM	: Vascular cell adhesion molecule
VLA	: Very late antigen
LFA	: Lymphocyte function-associated antigen-1
PECAM	: Platelet endothelial cell adhesion molecule

MKH'ler birçok dokuda destek hücresi olarak bulunurlar. Bu özellikleri çerçevesinde birçok molekül sentezlerler. Bunlar arasında; Granülosit-Monosit Koloni Uyarıcı Faktör(Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor; GM-CSF), Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (Macrophage Colony-Stimulating Factor; M-CSF), GranülositKoloniUyarıcı 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, IL-14 v.b.), reseptörleri, adezyon molekülleri, ekstrasellüler matriks proteinlerinden bazıları (fibronektin, laminin, kollegen) ve bazı kemokinler [Stromal Kaynaklı Faktör (Stromal Derived Factor α -1; SDF α -1), Monosit Kemoatraktan Protein (Monocyte Chemoattractant Protein;MCP-1) vb.] sayılabilir (Minguell ve ark., 2001;Yılmaz, 2008; Çetinkaya, 2009a)(Tablo 2).

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. Hasarlı dokudan salınan SDF α -1, MCP-1 gibi solubl faktörler ve kompleman C3 bu olayda önemli fonksiyona sahiptir. MKH'ler birkaç farklı mekanizma ile hasarlı dokunun tamirine katkıda bulunurlar. Bu mekanizmalar (Çetinkaya; 2009a; Bernardo ve ark., 2009):

- Farklılaşarak dokuya özgü fonksiyonel hücreye dönüşmesi,
- MKH-hasarlı hücre füzyonu sonucu doku hücresinin fonksiyonunu yeniden kazanması,
- Hasarlı dokuda hücre-hücre, hücre-ekstrasellüler matriks 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 sağlamasıdır.

MKH kültürlerinde 2002 yılında yapılan bir çalışmada, MKH'lerden farklı olarak sadece mezenkimal hücre serilerine değil aynı zamanda her üç germ hücrelerine de dönüşebilen **Multipotent Erişkin Progenitör Hücreler** (Multipotent Adult Progenitor Cell; MAPC) olarak tanımlanan hücreler tespit edildi. Multipotent olan bu hücrelerin blastokist içine enjekte edildiğinde kimerik farenin tüm somatik dokularına fonksiyonel olarak katkıda buldukları, hasarsız dokulara verildiğinde dirençli ve

erken bir yerleşme yeteneğine sahip oldukları ve in-vitro olarak üç germ yaprağına ait hücrelere dönüşebildiği gösterildi. Her üç germ yaprağına dönüşebilme yetenekleri ile EKH'lere benzeyen MAPC'ler, EKH'lerin bazı belirteçlerini de taşımaktadırlar. MAPC'leri EKH'lerden ayıran en büyük farklılık ise bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde damar içi verilmesi sonrasında tümör gözlenmemiş olmasıdır (Jiang ve ark., 2002; Serafini ve Verfaillie, 2006).

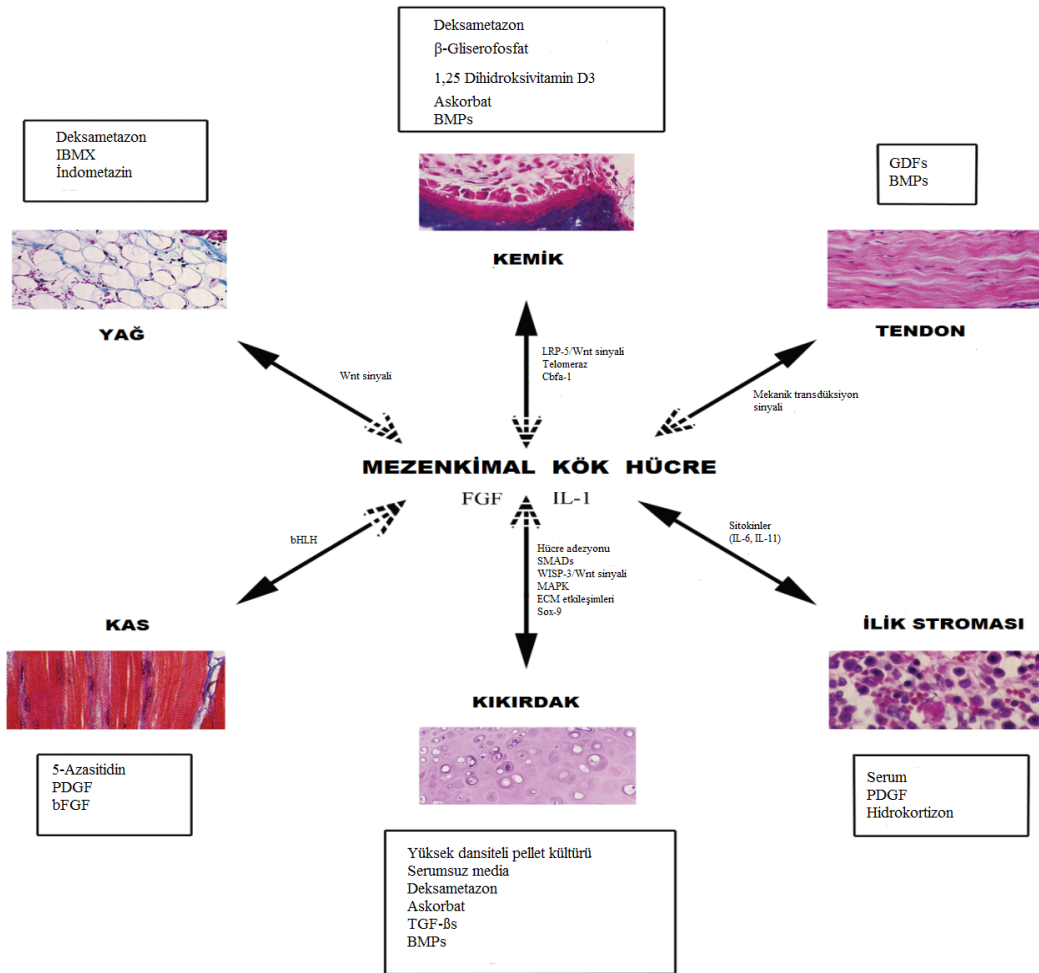
İnsan pluripotent mezenkimal hücrelerin yeni keşfedilen bir sınıfı da MAPC'leri andıran **Erişkin Kemik İliği Kaynaklı İndüklenebilir Multilineage Hücreler** (Marrow-Isolated Adult MultilineageInducible; MIAMI)'dir. Daha yüksek yoğunlukta Fetal Bovin Serum (FBS) ve daha düşük yoğunlukta oksijen içeren kültürlerde elde edilmiştir. Bu hücrelerin MKH'lerden farkları ise ikiye katlanma sürelerinin kısa olması ve EKH'ler gibi oct-4 ve rex-1 genlerini içermesidir (Jiang ve ark., 2002; Serafini ve Verfaillie, 2006).

MKH'lerin farklı uyaranlar kullanılarak in-vivo olarak çeşitli hücre tiplerine farklılaşabildiği ve elde edilen hücrelerin fonksiyonel olduğunun gösterildiği çalışmalar vardır (Galmiche ve ark., 1993; Kotton ve ark., 2001; Minguell ve ark., 2001; Loeffler ve Roeder, 2002; Jiang ve ark., 2002; Caplan, 2009; Zovein ve ark., 2008).

MKH'lerin adiposit, osteoblast ve kondroblast farklılaşmalarında belirleyici olan sinyal yolları vardır. Askorbik asit, β -gliserofosfat ve deksametazon desteğiyle MKH'ler osteoblastlara dönüşür (Baksh ve ark., 2004). BMP'nin osteoblast dönüşümüne etkisi ise yoğunluğuna bağlıdır. Osteojenik farklılaşmanın inhibitörü olan Wnt sinyali kemik iliği kaynaklı MKH'lerde etkili iken diğer şartlarda bu inhibitör etkisini göstermez. Wnt inhibitörü olan Dickkopf-1 (Dkk-1)'de osteojenik farklılaşmayı inhibe ederek MKH çoğalmasını artırmaktadır (Tuan ve ark., 2003; Can ve Karahüseyinoğlu, 2009) (Şekil 11).

MKH'lerin kondrojenik farklılaşması ortamda Transforme Edici Büyüme Faktörü (Transforming growth factor; TGF)'nin bulunması ile karakterizedir. TGF, kinaz 1, p38, protein kinaz A, protein kinaz C ve jun kinaz gibi çeşitli protein kinazları uyararak Wnt ekspresyonunu artırır. Uyarılmış Wnt ekspresyonu N-cadherin sentezinin artışına neden olur. N-cadherin kondrojenik için gereklidir (Tuli ve ark., 2003; Can ve Karahüseyinoğlu, 2009) (Şekil 11).

MKH'nin deksametazon, İzobutil Metil Ksantin (IBMX) ve indometasin ile kültüre edilmesiyle adipojenik farklılaşma sağlanır. Fosfodiesteraz inhibitörü olan IBMX cAMP'nin 5'AMP'ye dönüşümünü engelleyerek protein kinaz A'nın artışı sağlar. Protein kinaz A'nın artışı, Hormona Duyarlı Lipaz (Hormone-Sensitive Lipase; HSL)'ın düzenleyici molekülü olan perilipini artırarak HSL'nin artışı sağlar. HSL de trigliseridleri gliserole ve serbest yağ asitlerine çevirir. Adipogenez için Wnt sinyali baskılanmalıdır. Adipogenezde rol alan Peroksizom Proliferasyonu Aktive Eden Reseptör- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ;PPAR)'nın ligandı olan indometasin, PPAR üzerinden Wnt/ β katenin molekülünün parçalanmasını artırarak adipogenez uyarır. MKH'nin kemik ya da yağ hücrelerine farklılaşmasında Wnt/ β katenin etkin bir rol oynar (Liu ve Farmer, 2004; Can ve Karahüseyinoğlu, 2009) (Şekil 11).



Şekil 11:MKH ve uygun modülatörler ile doku mühendisliğinde kullanımı (Tuan ve ark.'dan düzenlenerek, 2003)

MKH'lerin immünojenitesi düşüktür ve immünsupresif özelliktedirler. MKH'lerin yüzeyinde HLA-DR ve ko-stimülatör molekül ekspresyonlarının olmaması immün reaksiyon olarak in-vivo kullanımda doku grubu uyumu gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır. MKH'ler özellikle T lenfosit cevabını ve allojenik reaksiyonları baskılayarak immün yeniden düzenlemeye katkıda bulunurlar. MKH'ler Doğal Öldürücü (Natural Killer; NK) lenfositler ile T lenfositlerinin doğal immün cevabına karşı etkisizdirler. Solubl faktörler aracılığı ile uyarılmış B hücre proliferasyonunu baskırlar. HLA-G ekspresyonunun olması da yine immünsupresyon etkisinde önemlidir (Corcione ve ark., 2006; Avcu, 2008; Çetinkaya, 2009a; Karaöz, 2010d).

MKH'lerin immünmodulator etkili faktörlerinin yanı sıra antifibrotik, anjiyojenik ve antiapoptotik özellikleri de bulunmaktadır. MKH'lerin sahip oldukları bu özellikler bu hücrelerin hasarın düzeltilmesindeki etkilerini açıklamaktadır (Çetinkaya, 2009a).

MKH'lerin göç ve hareket yetileri oldukça fazladır. Hasarlı dokularda biyoaktif maddeler ve çözünür maddeler salgırlar ve onarım yapabilirler. Hasarlı hücre ile füzyon yapabilme yeteneğindedirler. Dayanıklılıkları ve hızlı çoğalabilmeleri ile gen tedavilerinde kullanılabilirler. Bu özellikler MKH'leri klinik çalışmalar için diğer kök hücrelere göre üstün kılmaktadır (Uçkan, 2007; Caplan, 2009; Çetinkaya, 2009b; Karaöz, 2010c).

Tüm bu üstün ve avantajlı özelliklerinin yanında MKH'lerin bazı yetersizlikleri ve zayıf noktaları da vardır. Sayı olarak yetersizliklerinin giderilmesi için kültür ortamında uzun süreli manipulasyonlar ile üretilmelerinin gerekmesi bunlardan bir tanesidir. Kültür ortamından olumsuz etkilenme riskinin bulunması (hücre yaşlanması, bulaş,onkojenik dönüşüm), verildikleri dokularda canlılıklarının devamlılığını sağlamak için tekrarlayan dozlar gerekmesi, veriliş zamanı ve yeri ile ilgili konularda hala tam netlik kazanılamamış olunması ise MKH'lerin diğer zayıf yönleridir (Uçkan, 2007; Caplan, 2009; Çetinkaya, 2009a; 2009b).

Tedavi sürecinde MKH'lerin rejenerasyon, doku onarımı potansiyelleri, göç ve immünsupresyon özellikleri bu hücrelerin tedavideki etkinliğini artırmaktadır (Türköz, 2008).MKH'lerin klinikte kullanımı ile ilgili yapılmış birçok çalışma vardır:

- Hematolojik hastalıklarda; HKH'lerin kemik iliğine yerleşimlerini artırmaları ve sitokinler salgılayarak HKH'lerin çoğalmalarını ve farklılaşmalarını sağlamaları asıl etki yollarıdır (Le Blanc ve Ringden, 2007).
- Graft Versus Host hastalığında MKH kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar vardır (Le Blanc ve ark., 2008).
- Kas-iskelet sistemi hastalıklarında:
 - Osteoblastik aktivitede ve kemik iyileşmesine olan katkılarının gösterildiği (Shirley ve ark., 2005),
 - Kartilaj tamir ve rejenerasyonunda kullanılan MKH'ler ile ilgili (Mizuta ve ark., 2004; Tatebe ve ark., 2005),
 - Osteogenezis imperfektada (Horwitz ve ark., 2002)
 yapılan çalışmalar vardır.
- Gastroenterolojik hastalıklarda da MKH kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Kantarcıoğlu ve Bağcı, 2008).
- Nörolojik hastalıkların tedavisi için MKH kullanımının denendiği birçok hastalık vardır. Bunlar arasında:
 - Sinir rejenerasyonu ve travmatik spinal kord yaralanmaları (Park ve ark., 2005; Bareyre, 2008),
 - Parkinson (Şahin ve Kırık, 2009),
 - Alzheimer (Oliveira ve Hodges, 2005),
 - Multiple Sklerozis (Altıntaş ve Benbir, 2006)
 gösterilebilir.
- Çocuklarda görülen genetik hastalıklardan lökodistrofiler ve lipozomal depo hastalıkları sayılabilir (Hess ve Borlongan, 2008).
- Kalp hastalıklarında özellikle Akut Myokard Enfarktüsünde (AMI) yapılmış çalışmalarda fonksiyonel kardiyomiyositlere dönüşüm gösterilmiştir (Akar, 2009).

II.B.2.j. Nöronal Kök Hücreler

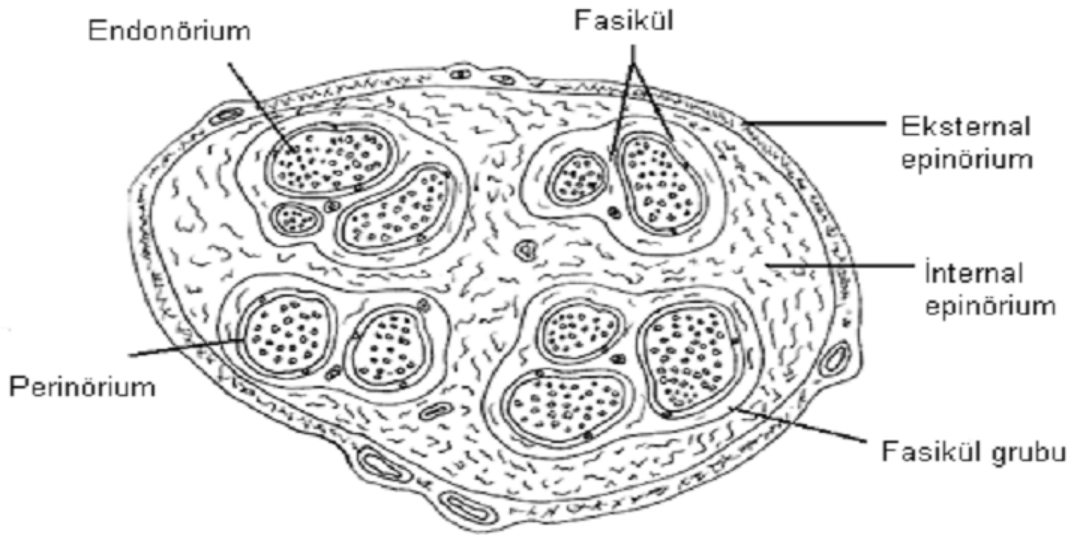
On yıl öncesine kadar sinir hücrelerinin yenilenme kapasitesinin olmadığına inanılıyordu. Son on yıl içerisinde yapılan çalışmalarla yetişkin insan santral sinir sisteminde nöronal kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin nöronal farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını ortaya koymuştur (Hess ve Borlongan, 2008). Memeli

erişkin beyninde ventriküler, subventriküler bölge ve hipokampüste bulunan bu hücrelerin üç ana hücre soyunu (oligodendrosit, astrosit ve nöron) üretebildikleri ve kendini yenileme kapasitelerinin olduğu gösterilmiştir (Gage ve ark., 1995; Temple ve Alvarez-Buylla, 1999; Bongso ve Lee, 2005)

II. C. Periferik Sinir Sistemi

II. C. 1. Periferik Sinir Anatomisi

Periferik sinirlerin fibröz bağ dokusu yapısı dışarıdan içeriye doğru olmak üzere epinörium, perinörium ve endonörium'dur. Vasküler yapıların sinire giriş tabakası olan **epinöryumda** bulunan fibroblastlar inflamasyona cevap verirler. İç ve dış epinöryum olarak ikiye ayrılan bu tabaka dış etkenlere karşı destek ve hareket yeteneğinin artırılmasında görev alır. Fasikülleri saran **perinöryum** kollojen ve elastin lifler içerir. Sinir iyonik çevresinin devamlılığını korur. Perinöryumun iç tarafında bulunan, aksonları saran **endonöryum** ise kollajenöz yapıdadır ve elastin lifler içermez. Endonöryum tarafından sarılmış olan ve cerrahi olarak müdahale edilebilen en küçük sinir birimine fasikül denir. Üç ila altı fasikülün bir araya gelmesi ile oluşan yapı fasikül gruplarıdır (Akbay, 2005; Tirelioğlu, 2005) (Şekil 12).



Şekil 12: Periferik sinir anatomisi (Tirelioğlu'ndan, 2005)

Nöral krestten gelişen Schwann hücreleri Periferik Sinir Sisteminin (PSS) destekleyici hücreleridir. Schwann hücrelerinin asıl görevleri miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerini desteklemektir (Sencar, 2007).

PSS’de miyelin kılıf, Schwann hücre membranının akson etrafını birçok kez sarması ile oluşur. Aksonlar hücre stoplazmasına gömülü haldedir. Akson boyunca miyelin kılıfyaklaşık her 1mm de bir kesintiye uğrar. Kesintiye uğrayan bölümlerde akson etrafında Schwann hücre katlantısı bulunmaz Bu bölgelere **ranvier boğumları** denir. İki ranvier nodu arasındaki miyelin kılıfla kaplı bölgeye de **internodal segment** denilmektedir. Schwann hücresinin tek nöronun aksonunu sarması ile miyelinli nöronlar oluşurken Schwann hücresinin birkaç nöronun aksonunu aynı anda sarması ile miyelinsiz nöronlar oluşur. Ayrıca periferik sinir sistemindeki yaralanma, hasarlanma veya kesilme sonrası meydana gelen artıkları ve yıkıntıları temizleyerek aksonların yeniden büyümesine rehberlik ederler (Burnett ve Zager, 2004; Makwana ve Raivich, 2005).

II. C. 2. Periferik Sinir Yaralanmaları ve Derecelendirilmeleri

Periferik sinirlerin yaralanma etiyolojilerinde travmatik, termal, kimyasal, konjenital ve patolojik etkenler sayılabilir. Periferik sinir yaralanma etiyolojileri ile ilgili yapılan çalışmalarda trafik kazaları, kesici alet yaraları, iatrojenik nedenler gibi birçok neden sayılabilir. Yaralanmaya en çok maruz kalan periferik sinirler ise siyatik, radial, median, peroneal ve ulnar sinirlerdir (Bulut ve ark., 2003; Topuz ve ark., 2011) (Tablo 3).

Tablo 3: Periferik sinir lezyon etiyolojisi ve dağılımı (Topuz ve ark.’dan, 2011)

Etiyoloji	Sayı	%	Sinir lezyonu	Sayı	%
Kesici alet yaralanması	12	48	Siyatik sinir	8	32
Düşme	4	16	Peroneal sinir	8	32
Enjeksiyon yaralanması	2	8	Median	3	12
Trafik kazası	2	8	Ulnar	2	8
Kemik fraktürü	3	12	Radial	2	8
Ateşli silah yaralanması	2	8	Aksesuar	1	4
			Brakial pleksus	1	4

Sinir yaralanmalarını sınıflandırılması ilk olarak Seddon tarafından nöropraksi, aksonotmesis ve nörotmesis olarak yapılmıştır (Seddon, 1942). Bu sınıflamayı Sunderland birden beşe kadar derecelendirerek açıklamıştır. Sunderland’in birinci ve ikinci grupları Seddon’un sınıflaması ile aynı özelliklere sahipken üçüncü grupta

endonöral tüp dışındaki yapılar sağlamdır. Dördüncü grupta endonöral tüp ve perinörium hasarlı iken epinörium sağlamdır. Sağlam epinörium sinirin devamlılığını sağlamaya çalışır. Beşinci grup ise nörotmezise eşdeğerdir (Sunderland, 1951). Yaralanma derecesi tedavi planlanmasında yol göstericidir. Dördüncü ve beşinci derece yaralanmaların tedavisi cerrahi olmadan yapılamazken birinci, ikinci ve üçüncü derece yaralanmalarda cerrahi yapılmadan da geri dönüşüm sağlanılabilir.(Avcı ve ark., 2002;Aytaç, 2005) (Tablo 4).

Tablo 4: Periferik sinir yaralanmalarında sınıflandırma (Avcı ve ark.,'dan, 2002)

SEDDON	SUNDERLAND	
Nöropraksia	1.derece yaralanma	Segmental demiyelinizasyon, lokalize iletim bloğu
Aksonotmezis	2.derece yaralanma	Aksonal yaralanma, distalde Wallerian dejenerasyon
	3. derece yaralanma	Wallerian dejenerasyon endonöriumda fibrozis ile birlikte
	4. derece yaralanma	İntakt olan tek yapı eksternal epinöriumdur.
Nörotmezis	5. derece yaralama	Sinir tamamen ayrılmıştır.
	6.derece yaralanma	Tüm yaralanmaların kombinasyonudur.

II. C. 3.Periferik Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu

Periferik sinir hücresinde segmental demiyelinizasyon, aksonal dejenerasyon ve alt tipi olan Wallerian dejenerasyondan bahsedilebilir (Öz Atalay ve Üstün, 2004).

Yalnızca iletim bloğunun olduğu birinci derece yaralanmalarda patolojik değişiklikler ya hiç yoktur ya da çok hafiftir.İkinci derece yaralanmalarda yaralanma bölgesinde veya bu bölgenin proksimalinde hafif histolojik değişiklikler oluşurken yaralanma bölgesinin distalinde ise **Wallerian dejenerasyonu** meydana gelmektedir. Walleriandejenerasyonunda primer histolojik değişiklik akson ve miyelin kılıfta oluşan yapısal bozukluklardır. Dejenerasyon sonucu nöronda gözlenen nörotübül ve nörofilamanların düzensiz hale gelmesi, akson ve miyelin kılıfın birbirlerinden ayrılmaları, aksonda varikoz şişkinliklerin oluşması başlıca yapısal değişikliklerdir. Miyelin kılıf dejenerasyonu özellikle 36-48 saat içinde belirgin hale gelir.

Yaralanmadan sonra 48-96 saatte genellikle akson devamlılığı kaybolur ve impuls iletimi bozulur.

Wallerian dejenerasyonunda Schwann hücrelerinin anahtar rol oynadıkları kabul edilmektedir. Bu hücreler yaralanmadan sonra 24 saat içinde aktif hale geçer. Çekirdek ve sitoplazmik büyüme gösteren hücreler hızla bölünerek dejenerasyon ve tamir yoluna yardım edecek bir çok molekülü eksprese ederler. Schwann hücreleri dejenerasyon sonrası akson ve miyelin artıklarını ortadan kaldırır. Periferik kandan göç eden makrofajlar ile Schwann hücreleri fagositoz yaparak yaralanma bölgesini 1 haftadan birkaç aya ulaşan bir sürede temizlerler (Evans, 2001; Avcı ve ark., 2002; Öz Atalay ve Üstün, 2004; Tirelioğlu, 2005; Balık, 2008; Radtke ve Vogt, 2009).

Oluşacak aksonlara yol gösterici olarak Schwann hücreleri tarafından meydana getirilen rehber yollara **Bünger Bandları** denilir. Bu bandlar sinir yaralanmasından sonra akson büyümesi için Schwann hücrelerinin nöronları destekleyici etkilerinin önemli bir göstergesidir. Schwann hücreleri periferik sinir hasarı sonrasında aksonal rejenerasyonun sağlanması için bazı faktörlerin sentezini ve salınımını organize ederler. Bu faktörler arasında Sinir 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 sentezlerler (Avcı ve ark., 2002; Tirelioğlu, 2005; Klimaschewski, 2009) (Tablo 5).

Tablo 5: Nörotrofik faktörler (Avcı ve ark.,'dan düzenlenerek, 2002)

Nörotropinler	Sinir Büyüme Faktörü (Nerve Growth Factor; NGF) Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (Brain Derived Neurotrophic Factor; BDNF) Nörotrofin 3/4/5/6
Nöropoetik Sitokinler	İnterlökin-6 (Interleukin-6; IL-6) Silier Nörotrofik Faktör (Ciliary Neurotrophic Factor; CNTF)
Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor; FGF)	Asidik Bazık
Diğerleri	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-Like Growth Factor; IGF) Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor; EGF) Lökemi İnhibe Edici Faktör (Leukemia-Inhibiting Factor; LIF) Glial Kaynaklı Nörotrofik Faktör (Glial-derived neurotrophic factor; GDNF) Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet-derived growth factor; PDGF)

Hasarlanmadan sonraki ilk 6 saat içerisinde aksonun proksimal ucundan distale doğru 50-100 kadar filizlenme şeklinde kollateral uzanmaya başlar. Bu şekilde başlayan rejenerasyonun başlangıç noktası sinirin proksimal kısmındaki en distalde yer alan ranvier boğumudur. Sinirin distal bölümünde bulunan Schwann hücresi ve bazal laminası akson rejenerasyonu için temel gerekliliktir. Bu gerekliliğin nedeni distal uçtan serbestlenen nörotrofik faktörler ve Schwann hücrelerinin göçüdür. Filizlenen yeni aksonlardan periferik bağlantıyı sağlayabilenler olgunlaşırlar. Bağlantı sağlayamayanlar ise rezorbe olmaktadır. Akson rejenerasyon hızı kemirgenlerde 2-3,5mm/gün iken insanlarda sadece 1-2 mm/gündür (Avcı ve ark., 2002; Tirelioğlu, 2005; Balık, 2008).

II. C. 4.Periferik Sinir Yaralanmaları ve Mezenkimal Kök Hücre

MKH'lerin nöron, astrosit, oligodendrosit, mikroglia ve Schwann hücresi benzeri gibi nöral kökenli hücelere in-vitro olarak dönüşebildiklerini gösteren çalışmalar vardır (Woodbury ve ark., 2000; Munoz-Elias ve ark., 2003; Wislet-Gendebien ve ark., 2005; Chen ve ark., 2006; Wang ve ark., 2009).

İn-vitro çalışmalar dışında, MKH'lerin in-vivo olarak da kullanıldıklarında hasarlı alanlarda nöral fenotipik değişikliklere sebep oldukları gösterilmiştir (Kopen ve ark., 1999; Kocsis ve ark., 2002; Coyne ve ark., 2006; Wang ve ark., 2009).

Hasarlanmış doku ve organlarda kullanılacak olan kök hücreler etkilerini fonksiyonel hücreye farklılaşarak hasarlı bölgelerde yeni dokular yaratmaktan çok trofik katkılar sağlayarak ve endojen kök hücreleri uyararak doku iyileşmesini ve miyelin onarımını hızlandırarak yaparlar (Chen ve ark., 2003; Deda, 2008; Bareyre, 2008; Matsuse ve ark., 2010).

Periferik sinir sistemi rejenerasyonu genellikle aktive edilmiş Schwann hücreleri tarafından meydana getirilen seri işlemler sonucu oluşur. Sinir proksimalinden tomurcuklanan aksonlara yol gösteren Schwann hücreleri endojen tamirde de etkilidir. Böylece proksimal sinir kökündeki aksonlar distal kök boyunca Schwann hücre bandına yakın temas ile büyür. Tüm bu işlemler sonucunda sinir rejenerasyonu indüklenebilir ve yeniden innerve edilen Schwann hücreleri akson ilişkili fenotipe dönüşebilir (Agius ve Cochard, 1998; Chen ve ark., 2007; Shimizu ve ark., 2007; Matsuse ve ark., 2010).

Çalışmalar in-vitro farklılaştırılmış KİMKH'nin siyatik sinirlerin ucuna transplantasyonunun sinir lif rejenerasyonunu destekleyebildiğini göstermiştir (Dezawa ve ark., 2001).

MKH'ler nöral hücre yaşamını ve nörogenezisi olumlu olarak etkileyen birçok sitokin ve büyüme faktörlerini üretir (Kopen ve ark., 1999; Kocsis ve ark., 2002; Coyne ve ark., 2006). Bunlara ek olarak aynı zamanda MKH'ler Schwann hücrelerini indirekt olarak etkileyerek de hasarın onarımına katkıda bulunur. MKH'ler, Schwann hücre jenerasyonunu artırarak Schwann hücre aracılı nörotropik fonksiyonları desteklerler. Kullanılan MKH'ler aksonal rejenerasyonu artırarak periferik sinir iyileşmesine katkıda bulunurlar. Bu katkıyı onarım hattının hem distal hem de proksimalinde sağlarlar (Wang ve ark., 2009; Matsuse ve ark., 2010; Çifci ve ark., 2010).

MKH'ler in-vitro farklılaştırılıp (Schwann hücre benzeri hücreler) transplante edilebildiği gibi farklılaştırılmadan da hasarlı dokuya verilebilirler. Her iki durumda da sinir rejenerasyonunu uyarabilmişlerdir (Tohill ve ark., 2004; Keilhoff ve ark., 2006a).

Kemik iliği kaynaklı kök hücreler ile yapılan çalışmaların ışığında bu hücrelerin etki mekanizmalarını aşağıdaki gibi sıralayabiliriz (Ryan ve ark., 2005; Ohori ve ark., 2006; Deda, 2008):

- Transplantasyonu yapılan bu kök hücreler miyelin oluşturan hücrelere dönüşebilmektedirler.
- Bu hücreler nöronlara dönüşmekten daha çok aksonal rejenerasyona etki eden ekstrasellüler matriksde düzenlemeler oluşturabilmektedirler.
- En önemlisi mekanizma ise bu hücreler nöral ağ ve iletişim sistemini yeniden organize edebilme yeteneğine sahip ve dokuda var olan endojen kök hücreleri tamir için uyarabilmektedirler.
- Ayrıca bu kök hücreler birçok sitokini sentezleyebilmekte ve bu etkileri ile nöronal progenitor hücrelerin farklılaşmalarına ve yaşamlarını idame ettirmelerine olanak sağlamaktadırlar.

Biz de tezimizde siyatik sinir hasarında farklı zamanlarda MKH uygulanması ile iyileşme arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemeye çalıştık. Bulacağımız sonuçlarla bir terapötik pencere varlığının tespit edilmesi ilerideki insan çalışmalarına ışık tutabilecektir.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde gerçekleştirildi.

Hayvan çalışmalarımız Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde, hücre kültürü çalışmaları Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doku Kültürü Laboratuvarında, akım sitometri çalışmaları Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarında, moleküler genetik analiz çalışmaları Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında, patolojik incelemeler Veterinerlik Fakültesi Patoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmamızda kemik iliği vericisi olarak ikisi ön çalışmada kullanılan yirmi adet erkek sıçan ve çalışma planında bulunan dört grup için sekizer adet dişi olmak üzere toplamda 52 tane 150-200 gram arasında “Sprague Dawley” cinsi sıçan kullanıldı.

Tez çalışmalarına başlamadan önce Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurul Başkanlığı'nın Hadyek/14 numaralı yazısı ile izin alındı.

III.A. Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Kemik iliği vericisi olarak kullanılan erkek deney hayvanlarından eter inhalasyonu ile anestezi altında her bir hayvandan 8-10 ml olmak üzere eksternal intrakardiyak yol ile kan alındı. Bu kanlardan daha sonra 4000 devir/dakika (rpm)'da 10 dakika santrifüj edilerek otolog serum elde edildi. Eter inhalasyonuna devam edilerek öldürülen deney hayvanlarının femur, tibia ve humeruslarının medüller kavitelerinden yıkama yöntemi kullanılarak kemik iliği alındı. Bu işlem sırasında önceden heparinle yıkanmış Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose (DMEM-LG) çekilmiş insülin enjektörleri kullanıldı. Her kemik için 1ml toplamda ise hayvan başına 8-12 ml DMEM-LG kullanıldı. DMEM-LG içerisindeki kemik iliği materyali laboratuvarda tüp içerisindeki Ficoll solüsyonunun üzerine damla damla olarak 1:1 oranında olacak şekilde konuldu. Oluşan solüsyon Mononükleer Hücreleri (MNH) ayırmak amacı ile dansite gradiyent yöntemi kullanılarak 900 devir/dakika'da 30 dakika santrifüj edildi (Şahin, 2006; Pınarlı, 2009).

İnterfazdan toplanan mononükleer hücrelerden 3ml'si akım sitometri çalışması için Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarına götürüldü.

Geride kalan kısım 3ml'lik daha önceden 200 ml/L FBS, 100 U/ml penisilin, 100 U/ml streptomisin ve 20 ml/L L-glutamin eklenerek hazırlanmış olan DMEM-LG besiyeri içinde 25 cm²lik (T25) hücre kültür kaplarına 10⁶/mlyoğunluğunda yayılarak ekildi. Hücreler 37⁰C ve 50 ml/L CO₂ içeren % 95 nem oranına sahip CO₂inkübatöründe inkübe edildi. İlk üç gün besiyerleri hergün sonrasında ise miktarı 5 ml'ye çıkarılarak üç günde bir değiştirildi. İnvirt mikroskopta hücrelerin kültür kabının %75'ini kapladığının görüldüğü 14. günde hücreler pasajlandı. Pasaj işlemi için kültür kaplarına içerisindeki besiyerini aldıktan sonra 1,5 ml Tripsin-EDTA-C konuldu. 2-3 dakikalık elle perküsyon sonrasında 37⁰C'lik inkübatörde 3-5 dakika arası tutuldu ve tekrar elle iki dakika kadar perküte edilen hücrelerin mikroskopta yapıştıkları plastik yüzeyden kalktıkları görüldü. Hücreler bu şekilde toplam üç kez pasajlandı. Pasajlanan 12 kültür kabından tripsin-EDTA-C ile kaldırılan hücreler süspansiyon haline getirilip akım sitometri çalışması için Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarına götürüldü.

Pasajlanarak çoğaltılan diğer hücre kültürleri yine aynı yöntem kullanılarak tripsin-EDTA-C ile kaldırıldı. %10 Dimetil Sulfoksit (DMSO) ve %20 FBS içeren DMEM-LG'den 1,5ml eklenerek 2ml'lik kriyotüplerde daha sonra deneyde kullanılmak üzere -80⁰C' ye kaldırıldı.

III.A.1.Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Cihazlar

- Mikrocerrahide kullanılan cerrahi araçlar ve gereçler

III.A.2.Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Kimyasal maddeler

- Eter (Merck, Almanya)

III.A.3. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj (Heraeus, Almanya)
- Hücre Kültür Kabini (Nuaire, Almanya)
- CO₂İnkübatörü (Hera-cell, Almanya)

- Invert Mikroskop (Zeiss-Axiovert 100, Almanya)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)

III.A.4. Hücre ve Doku kültürü Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal maddeler

- Ficoll solüsyonu (1.077 g/ml) (Merck, Almanya)
- DMEM-LG (Biological Industry, Israil)
- Penisilin (Sigma-Aldrich, ABD)
- Streptomisin (Sigma-Aldrich, ABD)
- Fetal bovin serum (FBS) (Hyclone, ABD)
- L-Glutamin (Sigma-Aldrich, ABD)
- Tripsin-EDTA C (Sigma-Aldrich, ABD)
- DMSO (Sigma-Aldrich, ABD)

III.A.5. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Çalışma Solüsyonları

- **MKH besiyeri:** 1000 ml besiyeri için;
 - 200 ml FBS
 - 20 ml L-glutamin
 - 5 ml penisilin
 - 5 ml streptomisin
 - 770 ml DMEM-LG
- **-80 °C kriyotüp saklama besi yeri:** 10 ml besiyeri için;
 - 7 ml DMEM-LG
 - 2 ml FCS
 - 1 ml DMSO

III.B. Akım Sitometri ile MKH'lerin Tanımlanması

İnterfazda toplanan mononükleer hücrelerden oluşan ekim yapılmadan önce alınmış 3 ml'lik örneğin kullanımında her hücre dizini için 6 tüp kullanıldı. Tüplerin üzerleri sırasıyla yüzey belirteçlerinin adları ve kontrol grubu (yüzey belirteçsiz) olarak yazıldı. Sonra her tüpe hücre yoğunluğu 1×10^6 olacak şekilde getirilen hücre süspansiyonundan 100'er µl konuldu. Birden beşe kadar olan tüplere yüzey belirteçleri

sırası ile 10'ar µl eklendi. Altıncı tüpe belirteç konulmadı. Tüpler vortekslendi. 4⁰C'de karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildikten sonra üzerine daha önceden hazırlanmış olan yıkama solüsyonundan 1 ml eklendi ve 1400 devir/dakikada 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan hücre çökeltisine tekrar 0,5 ml yıkama solüsyonu eklenerek akım sitometri cihazında tanımlandı. Bu işlemde HKH ve MKH hücre belirteçleri (CD11b/c, CD44, CD45, CD90, CD106)'nin kullanımı sonucunda CD11b/c [%98,6 (+)], CD44 [% 0,4 (□)], CD45 [%99,7 (+)], CD90 [% 11,2 (□)] ve CD106 [%14,1 (□)] olduğu gösterildi.

Aynı işlemler, pasajlanan kültür kabından tripsin-EDTA-C ile kaldırılarak toplanan hücrelerden oluşan örneklerle de tekrarlandı. Aynı belirteçlerin kullanımı sonucunda CD11b/c [%1,3 (□)], CD44 [%99,5 (+)], CD45 [% 0,7 (□)], CD90 [% 80,8 (+)] ve CD106 [% 63,6 (+)]olarak tanımlandı.

III.B.1.Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar

- FACSCalibur TM (Becton Dickinson and Company)
- Cell Quest Software (Becton Dickinson and Company, immünsitometri sistemi, Mac OS X10.3.6/7R28)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)

III.B.2.Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

- CD11b/c [Integrin α_M - α_X chains/OX-42, R-Phycoerythrin (R-PE)] (BD Pharmingen, ABD)
- CD44 [Hyaluronate Receptor Cell Adhesion Molecule/H-CAM, (FITC)] (BD Pharmingen, ABD)
- CD45 [Leukocyte Common Antigen/Ly-5 (LCA), (FITC)] (BD Pharmingen, ABD)
- CD90 [Thy-1, Flurescein Isothiocyanate (FITC)] (BD Pharmingen, ABD)
- CD106 [Vascular Cell Adhesion Molecule-1/VCAM-1, (R-PE)] (BD Pharmingen, ABD)

III.B.3.Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Çalışma Solüsyonları

- **Yıkama Solüsyonu:** 100 ml için;
 - 0.1 ml Na azid
 - 99.9 ml Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline; PBS)

III.C. Yürüme Koridorunun Oluşturulması ve Yürüme Testi

Yürüme koridoru düzeneğinin hazırlanması için dört tane 10x100 cm ebatlarında şeffaf cam ortalarında yürüme koridoru olacak şekilde silikonla birbirlerine yapıştırıldı. Oluşan koridorun sonuna kartondan karanlık oda yapıldı. Bu düzeneğin 2 metre kadar karşısına video kamera yerleştirildi. Her sıçan için yürüme koridoru tabanına emici kağıtlar yerleştirildi. İlk yürüme testi sıçanlar deneye başlamadan birinci gün yapıldı. Arka ayakları mürekkepli stampaya bastırılan hayvanlar yürüme koridorunun açık tarafından bırakılıp kapalı odaya gitmeleri beklendi. Kuyruk hareketlerinden ve ürinasyondan kaynaklanan iz bozulmalarında yürüme tekrar edildi. Örnek video çekimleri yapıldı. Yürüme testi tüm hayvanlara deneyin üçüncü günü, yedincigünü ve yirmi sekizinci günü tekrarlandı (Şekil 13).

III.C.1. Yürüme Testi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

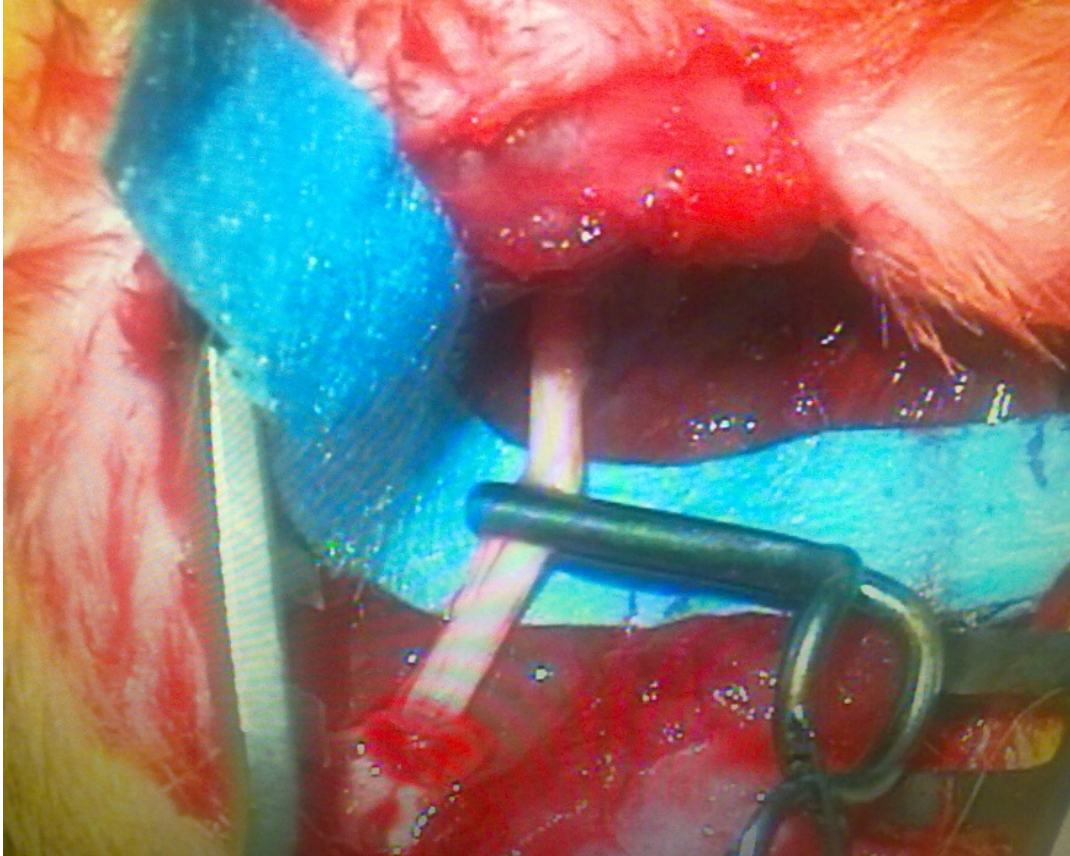
- Yürüme koridoru
- Emici kağıtlar
- Stampa ve mürekkep
- Video kamera (JVC)



Şekil 13: Oluşturulan yürüme koridorunda SFI ölçümü için sıçanların yürütülmesi

III.D. Sıçan Siyatik Sinirlerinde Hasar oluşturulması

32 tane dişi hayvan sırasıyla 50 mg/kgketamin [Ketasol (İnterhas)] ve 10 mg/kg ksilazin [Alfazyne %2 (Ege-Vet)]intraperitoneal uygulanarak anestezi altına alındı. Sağ uyluk b6lgeleri tıraş edildi. Yüzükoyun yatırılarak tespit edilen hayvanların femoral ve gluteal kaslarının arasından longitudinal insizyonlacilt, ciltaltı, kas dokuları geçilerek siyatik sinire ulaşıldı ve sinir çevre dokulardan serbestleştirildi. Siyatik sinir internal obturator kanaldan 10 mm uzaklıkta anevrizma klibi (Aesculap, Yaşargil standart anevrizma klibi, 1.5 g/mm²basınçlı) ile 20 dakika süresince sıkıştırıldı (Pan ve ark., 2006; 2007; 2009). 20 dakika sonra klemp çıkarıldı ve hasarlanan bölgenin 1 mm kadar proksimaline epinöriumdan 9/0 cerrahi iplikle işaret konuldu. Daha sonra hayvanlar dört gruba ayrıldı (şekil 14).



şekil 14: Sıçan siyatik sinirinin anevrizma klibi ile 20 dk boyunca sıkıştırılarak zedelenme yaratılması

III.E. Araştırma Gruplarının Oluşturulması ve özellikleri

Sıçanlardört gruba ayrıldı (n=8):

- **1.Grup:** Zedelenmeden hemen sonra sadece 100 µl fibrin glue [Beriplast-P Combi Set (Farma-Tek İlaç)] yerel olarak transplante edildi.
- **2.Grup:** Zedelenmeden hemen sonra 100 µl fibrin glue [Beriplast-P Combi Set (Farma-Tek İlaç)] içinde, 50 µl MKH (3×10^5 hücre/ml) yerel olarak transplante edildi.
- **3.Grup:** Zedelenmeden üç gün sonra (3. gün) 100 µl fibrin glue [Beriplast-P Combi Set (Farma-Tek İlaç)] içinde, 50 µl MKH (3×10^5 hücre/ml) yerel olarak transplante edildi.
- **4.Grup:** Zedelenmeden yedi gün sonra 100 µl fibrin glue [Beriplast-P Combi Set (Farma-Tek İlaç)] içinde, 50 µl MKH (3×10^5 hücre/ml) yerel olarak transplante edildi.

III.F. Mezenkimal Kök Hücrelerin Zedelenmiş Siyatik Sinire Transplantasyonu

Zedelenmiş siyatik sinir bölgesine I. grup sıçanlarda sadece Doku Yapıştırıcı (DY) olarak Beriplast-P Combi Set (Farma-Tek İlaç) hayvan başına 100µl yerel olarak uygulandı. Daha sonra zedeli bölge cerrahi kumaş olarak kullanılan Surgicel ile sarıldı. Tüm dokular usulüne uygun olarak 7/0 iplikle cilt ise 4/0 iplikle kapatıldı (Pan ve ark., 2006; 2007; 2009). II. grup sıçanlarda zedelenmeden hemen sonra zedeli bölgeye 50 µl 3×10^5 hücre/ml yoğunluktaki MKH, 100 µl Beriplast-P Combi Set ile beraber uygulandı. Sonrasında zedeli alan Surgicel ile sarıldı. Tüm dokular usulüne uygun olarak 7/0 iplikle cilt ise 4/0 iplikle kapatıldı (Pan ve ark., 2006; 2007). II. grup sıçanlara yapılan işlemlerin aynısı zedelenmeden üç gün sonra III. grup sıçanlara yapıldı. IV. grup sıçanlara ise aynı işlemler zedelenmenin oluşturulmasından yedi gün sonra uygulandı. Tüm gruplarda sütür yaralarının üzerine antibakteriyel olarak oksitetrasiklin HCl [(Neo-Caf (İntervet)]sprey şeklinde yerel uygulandı.

28. günde tüm gruplardaki hayvanlar eter inhalasyonu ile anesteziye alındı. İnsizyon skarlarının üzerinden girilerek siyatik sinire ulaşıldı. Siyatik sinir proksimalde epinörium üzerinden 9/0 cerrahi iplikle işaretlenmiş bölgeden toplamda 1,5-2 cm uzunlukta olacak şekilde çıkartıldı. Hayvanlar bu işlemde sonra yüksek eter inhalasyonu ile öldürüldü. Çıkarılan sinir dokularının ¼ lük kısmı Veterinerlik Fakültesi

Patoloji Laboratuvarına gönderilmek üzere 10 ml'lik önceden etiketlenmiş tüplerde %10 tamponlu formaldehit içerisinde tespit edildi. Geri kalan kısmı ise yine önceden etiketlenmiş tüplerde DMEM-LG içerisinde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarına götürülmek üzere 4 °C'de beklemeye alındı.

III.F.1.Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Cihazlar

- Mikrocerrahide kullanılan cerrahi araçlar
- Biomikroskop [(cerrahi mikroskop) (Zeiss, Almanya)]
- 9/0, 7/0, 4/0 cerrahi iplikler (Medex A.Ş., Doğan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş.)
- Anevrizma klibi (Aesculap, Yaşargil anevrizma klibi, 1.5 g/mm²basınçlı)
- Surgicel
- Video kamera (JVC)

III.F.2.Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Ketazol (İnterhas)
- Alfazyne %2 (Ege-Vet)
- Beriplast-P Combi Set (Farma-Tek İlaç)
- Neo-Caf (İntervet)
- Eter (Merck, Almanya)

III.F.3.Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Çalışma Solüsyonları

- DMEM-LG (Biological Industry, İsrail)
- Formaldehit (Merck, Almanya)

III.G. Siyatik Sinirden DNA İzolasyonu

Sinir dokusundan DNA elde etmek için doku DNA kiti olarak Purelink Genomic DNA mini Kit (İnvitrogen) kullanıldı. İzolasyona başlamadan ön hazırlık olarak kit içerisindeki **genomik yıkama tamponu I**'e 15 ml ve **genomik yıkama tamponuII**'ye ise 17,5 ml etanol absolu ekledik. Absolu alkol oda ısısında muhafaza edildi. DNA'nın izole edilebilmesi için aşağıdaki işlemler sırası ile uygulandı.

1. +4 °C DMEM-LG içinde bekleyen siyatik sinir dokularını pastör pipeti ile Eppendorf tüpüne alındılar.
2. Dokuların üzerine tüp başına 180 µl “**genomik parçalama tamponu**” konuldu.
3. Kısa süreli vorteks uygulandı.
4. Her tüpe 20 µl “**proteinaz K**” eklendi.
5. Dokular 55 °C lik su banyosuna yatırıldılar.
6. Her yarım saatte bir kısa vorteks uygulandı.
7. Dokular 3 saat 20 dakika sonra banyodan alındılar.
8. Maksimum hızda (15.000 rpm) 3 dk. süresince santrifüj edildiler.
9. Süpernatantı alınarak başka Eppendorf tüpüne konuldular. Kalan pelet kısmı atıldı.
10. Tüplere 20 µl “**RNA’az**” solüsyonu eklendi.
11. Kısa vorteks uygulandı.
12. Oda ısısında 2 dk. inkübe edildiler.
13. Üzerlerine 200 µl “**genomik lizis / bağlanma tamponu**” eklendi.
14. İyice vortekslendiler.
15. Üzerlerine 200 µl “**absolu alkol**” eklendi (Kit içerisinde yok).
16. 5 sn süresince iyice vorteks uygulandı.
17. Örnekler “**çevirme kolon**” ların (tüp) içerisine boşaltıldılar.
18. 8200 rpm (10.000 g) de 1 dk. süresince oda ısısında santrifüj edildiler.
19. Çevirme kolonların filtreli üst bölümü alınarak “**toplama tüp**” lerin içine koyuldular.
20. Bunun üzerine “**genomik yıkama tamponu I**” den 500 µl koyuldu.
21. 8200 rpm (10.000 g) de 1 dk. süresince oda ısısında tekrar santrifüj edildiler.
22. Filtreli bölüm yeni temiz “**toplama tüp**” lerin içine alındılar.
23. Üzerlerine “**genomik yıkama tamponu II**” den 500 µl koyuldu.
24. Maksimum hızda (16.000 rpm) 3 dk. süresince oda ısısında santrifüj edildiler.
25. Filtreli bölüm alınarak 1,5 ml’lik Eppendorf tüplerine yerleştirildiler.
26. 50 µl (25-200 µl arası olabilir) “**genomik elüsyon tamponu**” eklendi.
27. Maksimum hızda (16.000 rpm) 1 dk. süresince oda ısısında santrifüj edildiler.
28. Üzerlerine tekrar 20 µl “**genomik elüsyon tamponu**” eklendi.
29. Maksimum hızda (16.000 rpm) 2 dk. süresince oda ısısında santrifüj edildiler.

30. Eppendorf tüpte elde edilen pürifiye DNA daha sonra Cinsiyet Belirleyen Bölge(Sex-Determining Region Y;*SRY*) geninin saptanmasında kullanılmak üzere -20 °C ye kaldırıldı.

III.H. *SRY* Geninin Belirlenmesi

III.H.1. DNA'ların ve Primerlerin OD Ölçümlerinin Yapılması

PCR'da kullanılacak olan primerlerin ve siyatik sinirden elde edilmiş olan DNA'ların Optik Yoğunluk (Optical Density;OD) ölçümleri spektrofotometre cihazı ile yapıldı. DNA'lar için yoğunluk hesaplamasında;

- Yoğunluk= OD₂₆₀ x 100 (seyreltme faktörü) x 50 (çift zincir DNA) formülü kullanıldı.

Primerlerin yoğunluk hesaplamasında ise;

- Yoğunluk = OD₂₆₀ x 100 (seyreltme faktörü) x 33 (tek zincir DNA) formülü uygulandı.

III.H.2. *SRY* Gösterimi İçin PCR Çalışması

Deneyde kullanılan dişi sıçanların zedelene siyatik sinirlerinde Y kromozomunun üzerinde bulunan *SRY* geninin gösterilmesi için PCR çalışması yapıldı. Dokulardaki DNA'nın varlığını değerlendirebilmek için internal kontrol olarak *β-aktin* geni kullanıldı. Hem *SRY* hem de *β-aktin* geninin PCR çalışmaları için gerekli olan primer dizileri saptandı.

SRY primeri olarak;

- sense 5'-CAGAGATCAGCAAGCATCTGG-3'
- antisense 5'TCTGGTTCTTGGAGGACTGG-3'

β-aktin primeri olarak;

- sense 5'AGAGAAGCTGTGCTATGTTG3'
- anti-sense 5'-GTA CTCCTGCTTGCTGATCC-3' kullanıldı (Ise ve ark., 2004).

PCR için kullanılacak olan 25µl'lik toplam hacim içinde bulunan maddeler ve oranları şu şekilde oranlandı:

- Reaksiyon buffer → 1x
- MgCl₂ → 3 mM

- dNTP miks → 200 µM
- *SRY* primeri → 0,2 µM
- *β-aktin* primeri → 0,15 µM
- Genomik DNA → 200 ng
- *Taq polimeraz* → 1,5 ünite

PCR çalışma programı olarak ise, 95°C'de 5 dakika başlangıç denetürasyonu, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 57°C'de 30 saniye bağlanma (annealing) ve 72°C'de 60 saniye uzama (elongasyon) olmak üzere 37 döngü olarak uygulandı.

% 2'lik agaroz jel elde etmek için; 100 ml 1 X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA)'den alınarak üzerine 2 gr. agar eklendi. Karıştırıldıktan sonra 30'ar saniyede bir karıştırılarak kaynayanaya kadar ısıtıldı. Berraklaşınca mikrodalgadan alınarak soğumaya bırakıldı. 75 °C'de 100 µl etidyum bromür eklenerek çalkalandı ve sete dökülerek soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra 4 °C'ye kaldırıldı.

Elde edilen PCR materyali %2'lik agaroz jelde brom fenol mavisi ile boyanarak 25 dakika boyunca elektroforezde 135 voltta yürütüldü. Her çalışmaya pozitif örnek olarak sağlam erkek fare DNA'sı ve negatif kontrol olarak steril sukullanıldı. *SRY* negatif ve amplifikasyon olmayan örnekler dörder kez çalışıldılar (Ise ve ark., 2004).

III.H.3. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar

- Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya; Capp, Danimarka)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Mikrosanrifüj (Hettich, Almanya)
- Spektrofotometre cihazı (Pharmacia Biotech Gene Quant II)
- Spektrofotometre küvetleri
- Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)
- Hassas terazi (Mettler AJ 100, Almanya)
- Mikrodalga (Arçelik, Türkiye)
- Yatay elektroforez sistemi (Scie-Plas, İngiltere)
- Elektroforez güç kaynağı (Wealtec, Tayvan)
- UV transillumunator (Uvitec-BTX-26-M, İngiltere)

- UV görüntü analiz sistemi (Biolab-UVIPhoto MW, İngiltere)

III.H.4. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Absolu alkol (Sigma-Aldrich)
- Genomic DNA mini Kit (Purelink, İnvitrogen)
- 10 X PCR buffer (Gen Tag)
- *SRY* primeri (İnvitrogen)
- β -aktin primeri (İnvitrogen)
- Magnezyum klorür (Gen Tag)
- Deoksiribonükleosid trifosfatlar (dNTPs, Fermentas)
- Taq DNA polimeraz enzimi (Gen Tag)
- Tris (Merck)
- Borik asit (Sigma)
- EDTA, sodyum tuzu (Merck)
- Nü mikropor (Prona)
- Etidyum bromür (Sigma)
- Bromo fenol blue
- Marker DNA (Gene Ruler 100bp DNA Ladder, Fermentas)

III.H.5. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Çalışma Solüsyonları

- 0,5 M EDTA
- 1 M Tris
- 10 x TBE
- 1 xTBE
- Etidyum Bromür solüsyonu

III.I. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Boyama

III.I.1. Histopatolojik inceleme için doku kesitlerinin hazırlanması

Örnekler %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edilip 24 saat sonra trimlendi ve postfiksasyonları yapıldı. Doku örnekleri bir gün boyunca musluk suyu altında yıkandıktan sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı.

Mikrotom (Leica RM2125RT) ile 3-5 µm kalınlığında alınan kesitler, rutin histopatolojik muayene için hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı. Sonuçların değerlendirilmesi Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu yardımıyla yapıldı ve Nikon DS Camera Head DS-5M ile mikroskobik fotoğrafları çekildi.

III.I.2. İmmünohistokimyasal inceleme için doku kesitlerinin hazırlanması

Parafinde hazırlanan doku bloklarından alınan kesitlere Streptoavidin Biotin Peroksidaz Kompleks Tekniği (Streptavidin Biotin Peroxidase Complex; SABC) uygulandı. Primer antikorlar, üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce yapılan ön çalışmalarla belirlenen oranlarda PBS (pH 7,4) ile sulandırıldı. İmmünohistokimyasal boyamalarda SABC teknik için alınan hazır kit (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) kullanıldı ve tüm uygulamalar önerilen standart işleme göre yapıldı. Primer antikorların üretici firmalarının önerileri doğrultusunda pozitif kontroller ile negatif kontrol olarak PBS (pH 7,4) kullanıldı. Buna göre kesitler, aseton-3-etoksipropilamin(Merck, 100 ml aseton, 2 ml 3-etoksipropilamin) ile kaplanmış lamlara alındı. 30 dakika 58 °C'lik etüvde kurutuldu. Kesitler ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Formalinin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için kesitler, sitrat tamponlu solüsyonda mikrodalga fırında 600 vatta 20 dakika kaynatıldı. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂'te 7 dakika bekletildi ve protein bloke edici serumda 10 dakika tutuldu. Daha sonra primer antikorlar ile oda ısısında bir saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 30 dakika bekletildikten sonra Streptavidin peroksidaz enzimi (Histostain-Plus Kits, California, USA) ile 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumu ile inkübasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 2 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Son olarak kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD) kromojeni ile mikroskop altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle boyandı. Gill's hematoksilin ile karşıt boyamaları yapıldı. Su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immumount) ile kesitler kapatıldı ve ışık mikroskobunda üç farklı kişi tarafından incelendi.

III.I.3. Veteriner Fakültesi Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Mikrotom (Leica RM2125RT)
- Işık mikroskobu (Nikon Eclipse E600W)
- Fotoğraf Makinesi (Nikon DS Camera Head DS-5M)

III.I.4. Veteriner Fakültesi Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları

- Zymed, Histostain Plus Kit(California, USA)
- GFAP (Chemicon)
- NF-200 (Chemicon)
- S-100 (Chemicon)
- Hematoksilen Eozin
- 3-etoksipropilamin(Merck)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline; PBS) (Sigma Aldrich)
- Streptavidin peroksidaz enzimi (Histostain-Plus Kits, California, USA)
- 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD)
- Su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immumount)

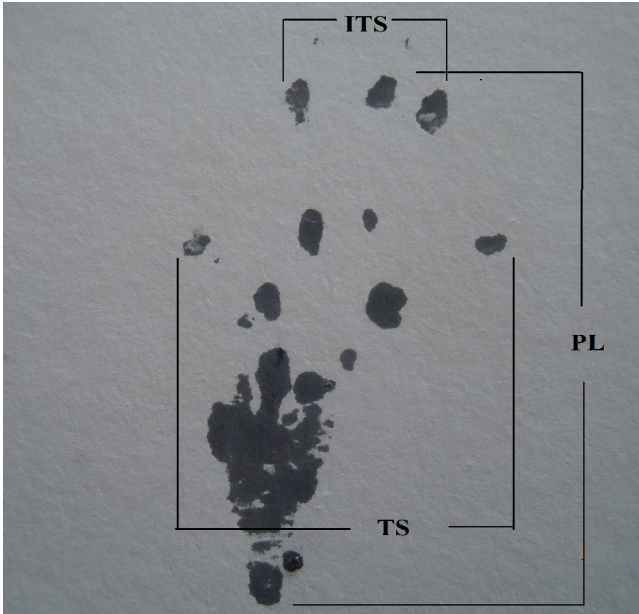
III.J. İncelenen Parametreler

III.J.1. Yürüme Testi

Deneysel sinir iyileşmesini ölçerken uygun değerlendirme metotlarının seçimi çok önemlidir. Periferik sinir rejenerasyonunun değerlendirilmesinde elektrofizyolojik, morfolojik ve histolojik çalışmalar fonksiyonel düzelme hakkında yeterince bilgi veremeyebilir. 1982 yılında Medinaceli ve arkadaşları tarafından tanımlanan Siyatik Fonksiyonel İndeks (Sciatic Functional Index; SFI), sinir rejenerasyonunun fonksiyonel analizi için kullanılan güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (de Medinaceli, 1982; Tetik ve ark., 2000). Yürüyüş izi analizinin kullanımı siyatik sinirin fonksiyonel durumunu değerlendiren, ayak izinin ölçümüne dayanan non-invaziv bir yöntemdir. Yürüme eylemi koordineli fonksiyon gerektirdiğinden fonksiyonel sonuç değerlendirme durumunda SFI, akson büyüklüğü, basit elektrofizyoloji ve histomorfometri kullanımından daha iyi sonuçlar verebilir (Varejão ve ark., 2001).

Yürüme testi yapılmasındaki amaç sıçan arka ayak parmakları arasındaki mesafelerin ölçülerek SFI için veriler elde etmek ve fonksiyonel düzelmenin derecesini saptamaktır. Siyatik fonksiyonel indeks ölçümleri için veriler klasik yöntemle sağlanan ayak izlerinden elde edildi. Ayak izleri;

- Bası Uzunluğu (Print length; **PL**): Topuktan parmak ucuna kadar olan mesafe,
- Ayak Parmakları Yayılımı (Toe Spread; **TS**): 1. ve 5. parmaklar arası mesafe,
- Orta Ayak Parmakları Yayılımı (Intermediary Toe Spread; **ITS**): 2. ve 4. parmaklar arası mesafeler ölçülerek elde edildi (Şekil 15).



Şekil 15: Siyatik sinir zedelenmesinde ayak izi verileri. (**ITS**: 2. ve 4. parmaklar arası mesafe, **PL**: Topuktan parmak ucuna kadar olan mesafe, **TS**: 1. ve 5. parmaklar arası mesafe)

Elde edilen veriler daha sonraları birçok araştırmacı tarafından revize edilen SFI formülünde kullanıldı. Bu formül şöyledir (Varejão ve ark., 2001; Shimizu ve ark., 2007; Pan ve ark., 2009; Erbilici ve ark., 2010):

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

Formüldeki “E” deneydeki alınan ölçüyü, “N” ise normal ölçüyü ifade etmektedir. Formül sonucu tam kesilerde -100 'e yaklaşırken normal sinirde ise -3 ± 4 'e yaklaşmaktadır (Chen ve ark., 2006; Pan ve ark., 2009; Matsuse ve ark, 2010).

III.J.2. Histolojik Boyama

Etiketlenmiş tüplerde %10 tamponlu formaldehit içerisinde Veterinerlik Fakültesi Patoloji Laboratuvarına getirilen örnekler parafin bloklar halinde hazırlandı. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen ve Eozin (H&E) ile boyandı. Işık mikroskopunda değerlendirildi.

H&E ile boyanan materyaller vakuol yönünden değerlendirildi. Siyatik sinir zedelenmelerinde histolojik boyamalar sonucunda vakuollerin sayısı ve hacim olarak artmış olması sinir harabiyetinin artmış olduğunu gösterirken azalmış vakuol sayısı ve hacmi ise rejenerasyonun lehinedir (Pan ve ark., 2007; 2009).

III.J.3. İmmünohistokimyasal Boyama

Etiketlenmiş tüplerde %10 tamponlu formaldehit içerisinde Veterinerlik Fakültesi Patoloji Laboratuvarına getirilen örnekler uygun protokol yöntemleri ile hazırlandıktan sonra Glial Fibrillar Asidik Protein (Glial Fibrillary Acidic Protein; GFAP), Nöroflament-200 (NF-200) ve S-100 ile boyandı. Işık mikroskopunda değerlendirildi.

Periferik sinir zedelenmelerinde immünohistokimyasal boyamalarla zedelenmenin olduğu alanda glial, aksonal ve Schwann hücre varlığının kanıtlanması için kullanılan S-100, GFAP ve NF-200 antikorları vardır. Bu antikorlardan Schwann hücre markırları olarak kullanılan S-100'ün ekspresyonu Schwann hücre ve Schwann benzeri hücre varlığını gösterir. NF-200 ekspresyonu aksonal, GFAP ekspresyonu ise astrosit pozitif ve Schwann hücreleri işaret ederler (Dezawa ve ark., 2001; Murakami ve ark., 2003; Tohill ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2004; Radtke ve ark., 2009; di Summa ve ark., 2010).

III.J.4. DNA İzolasyonu ve *SRY* Geninin Gösterilmesi

Sıçan siyatik sinir dokusundan DNA elde etmek için doku DNA kiti olarak Purelink Genomic DNA mini Kit (İnvitrogen) kullanıldı. Deneyde kullanılan dişi sıçanların zedelenen siyatik sinirlerinde Y kromozomunun üzerinde bulunan ve cinsiyetin belirlenmesini sağlayan *SRY* geninin gösterilmesi için PCR çalışması yapıldı. Bu işlem sonucunda 288 baz çifti uzunluğunda olan *SRY* ve 488 baz çifti uzunluğunda olan β -*aktin* geninin PCR'da çoğaltılmış ürünleri elde edildi. PCR çalışma programı

olarak ise, 95°C'de 5 dakika başlangıç denetürasyonu, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 57°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama olmak üzere 37 döngü olarak uygulandı.

III.J.5. İstatistik Yöntemi

Verilerin değerlendirilmesinde Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi (Statistical Package for Social Sciences; SPSS) 18.0 programı kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama (\pm), standart sapma ve sayı (%) şeklinde gösterildi. Sayı ile gösterilen verilerin değerlendirilmesinde Pearson Ki-kare ve Fisher Exact testleri kullanıldı. Ölçümlerde elde edilen verilerin ikili karşılaştırılmasında normal dağılıma sahip olanlar için Student T Testi ve olmayanlar için Mann Whitney U Testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ olması kabul edildi.

IV. BULGULAR

Deneyde, erkek sıçan kemik iliklerinden elde edilen ve -80°C 'ye kaldırılarak bekletilen MKH'ler kullanıldı(Şekil 16).

Deney süresince 0, 3, 7 ve 28. günde yürüme testleri uygulanarak SFI için veriler elde edildi. Deney sonunda öldürülen hayvanlardan alınan siyatik sinirlerden PCR ile *SRY* belirlendi (Şekil 17).

I. grup için SFI ve *SRY* bulguları Tablo 6'da, histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama bulguları ise Tablo 7'de verildi.

II. grup için SFI ve *SRY* bulguları Tablo 8'de, histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama bulguları ise Tablo 9'da verildi.

III. grup için SFI ve *SRY* bulguları Tablo 10'da, histopatolojik ve immünohistokimyasal bulguları ise Tablo 11'de verildi.

IV. grup için SFI ve *SRY* bulguları Tablo 12'de, histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama bulguları ise Tablo 13'de verildi.

Tüm gruplar için SFI için aritmetik ortalama (AO), standart sapma (SS) değerleri ve *SRY* bulgularının değerlendirilmesi Tablo 14'de, histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama bulgularının değerlendirilmesi ise Tablo 15'de verildi.

Grup I-IV hayvanların H&E, NF-200, S-100, GFAP boyama ve *SRY* inceleme açısından "p" değerleri yönünden karşılaştırılması Tablo 16'da verilirken bu dört grubun SFI açısından 0., 3., 7. ve 28. gündeki ölçümlerinin karşılaştırılması ise Tablo 17'de verildi.

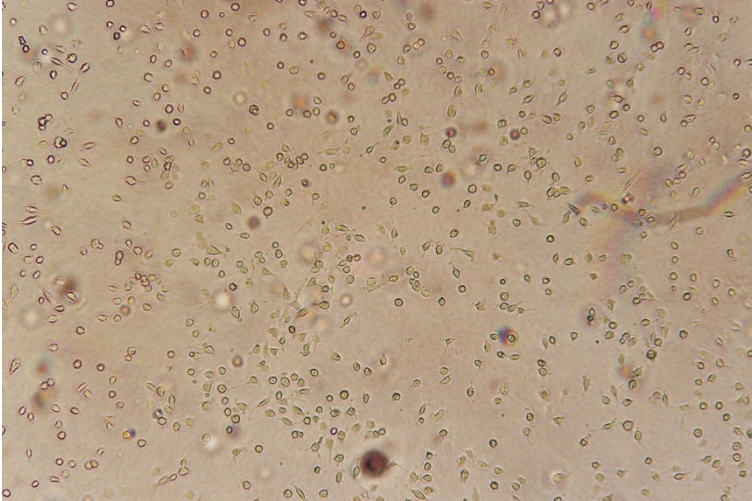
SRY gen tespit çalışmaları istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı oranda farklı bulundu ($p < 0,05$). *SRY* gen tespiti çalışmalarında II., III. ve IV. grup ile I. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). II., III. ve IV. gruplar arasında ise anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Toplam dört grupta SFI için zaman etkileşimini incelemek üzere tekrarlı ölçümlerde varyans analizi yapıldı. Bu zamanlardaki ölçümler için I. grup ile II. grup arasında 28. gün yapılan SFI testinde anlamlı fark bulundu ($p = 0,016$).

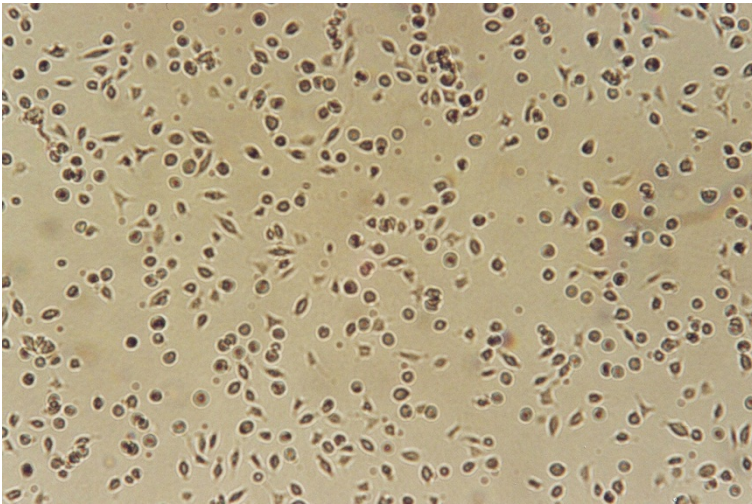
H&E ve immünohistokimyasal boyamalardan NF-200 ve GFAP boyama özellikleri yönünden I. grup ile II. grup arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). S-100 boyama özellikleri açısından bu iki grup arasında anlamlı fark bulunamadı ($p < 0,05$).



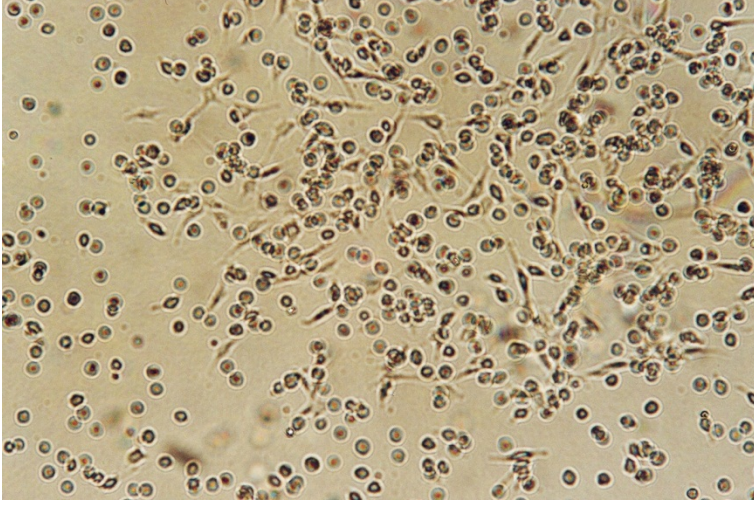
Şekil 16a: Kemik iliğinden alınan mononükleer hücrelerin ayrıştırılıp ekildikten sonraki 1. gün invert mikroskop görüntüsü (Orijinal büyütme: X48)



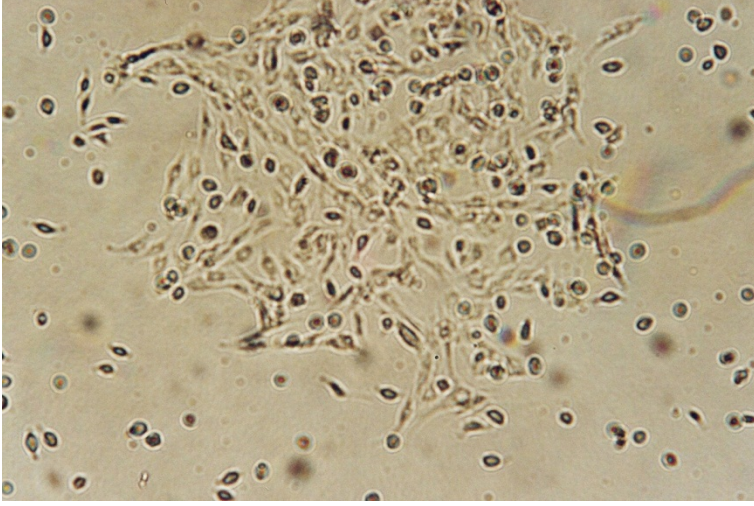
Şekil 16b: Kemik iliğinden alınan mononükleer hücrelerin ayrıştırılıp ekildikten sonraki 3. gün invert mikroskop görüntüsü (Orijinal büyütme: X200)



Şekil 16c: Kemik iliğinden alınan mononükleer hücrelerin ayrıştırılıp ekildikten sonraki 4. gün invert mikroskop görüntüsü (Orijinal büyütme: X200)



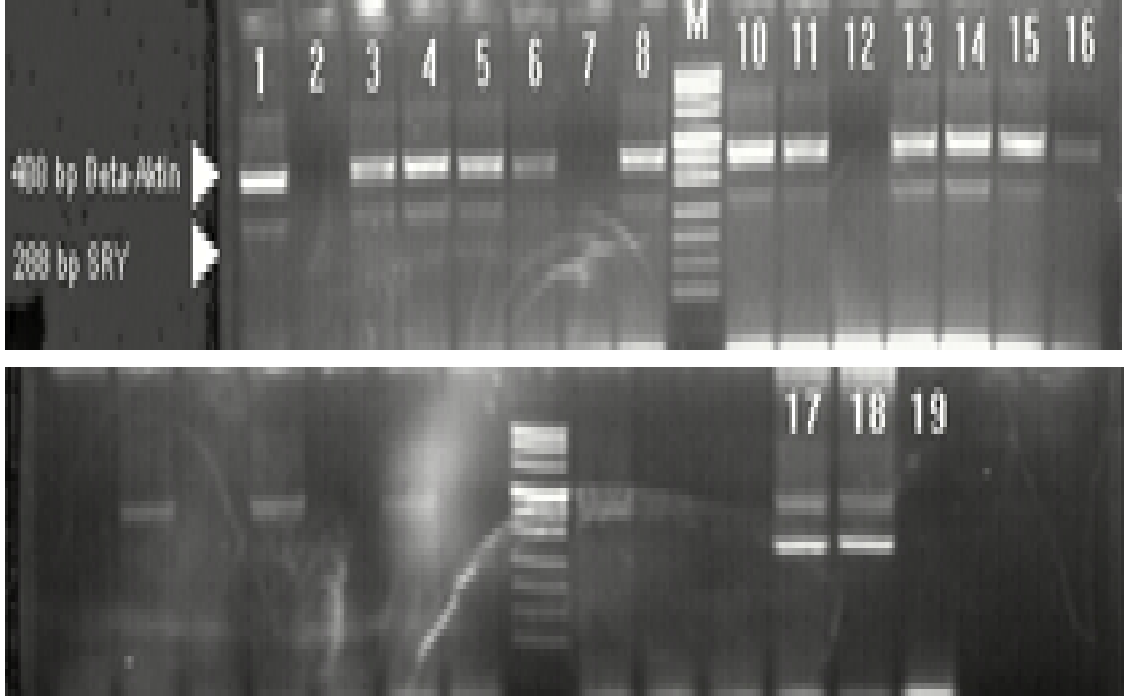
Şekil 16d:Kemik iliğinden alınan mononükleer hücrelerin ayrıştırılıp ekildikten sonraki 7. gün invert mikroskop görüntüsü (Orijinal büyütme: X200)



Şekil 16e:Kemik iliğinden alınan mononükleer hücrelerin ayrıştırılıp ekildikten sonraki 9. gün invert mikroskop görüntüsü (Fibroblastların koloni oluşturmaya başlaması) (Orijinal büyütme: X200)



Şekil 16f:Kemik iliğinden alınan mononükleer hücrelerin ayrıştırılıp ekildikten sonraki 13. gün invert mikroskop görüntüsü (CF-U odaklarının oluşması) (Orijinal büyütme: X48)



Şekil 17: 1, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 ile numaralandırılan kuyucuklardaki SRY (+) örnekler, 17 ve 18 ile numaralandırılan kuyucuklarda pozitif kontroller ve 19 ile numaralandırılan kuyucukta negatif kontrol.

Tablo 6: I. grup için SFI ve SRY bulguları

Grup no	Sıçan no	SFI 0.gün	SFI 3.gün	SFI 7.gün	SFI 28.gün	SRY
I	1	-6,3	-41,5	-36,7	-29,5	(—)
I	2	-7,2	-53,1	-51,5	-44,8	(—)
I	3	-6,0	-61,4	-57,0	-44,7	(—)
I	4	-7,2	-47,7	-38,3	-28,2	(—)
I	5	-8,9	-56,7	-56,7	-55,0	(—)
I	6	-6,1	-59,7	-58,9	-52,0	(—)
I	7	-5,9	-59,6	-51,6	-41,8	(—)
I	8	-4,7	-60,5	-55,8	-41,8	(—)

Tablo 7: I. grup için histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama bulguları

Grup no	Sıçan no	H&E Boyama	NF-200	GFAP	S-100	SRY
I	1	(++)	(++)	(++)	(+++)	(—)
I	2	(+++)	(+)	(+)	(+++)	(—)
I	3	(+++)	(++)	(+)	(++)	(—)
I	4	(++)	(+++)	(+)	(++)	(—)
I	5	(+++)	(++)	(+)	(+++)	(—)
I	6	(+++)	(+)	(+)	(+)	(—)
I	7	(+++)	(+)	(++)	(+++)	(—)
I	8	(+++)	(++)	(++)	(++)	(—)

Tablo 8: II. grup için SFI ve SRY bulguları

Grup no	Sıçan no	SFI 0.gün	SFI 3.gün	SFI 7.gün	SFI 28.gün	SRY
II	1	-7,0	-48,7	-41,6	-26,8	(+)
II	2	-7,9	-60,1	-51,6	-41,2	(+)
II	3	-8,0	-47,4	-45,8	-37,7	(+)
II	4	-7,9	-55,5	-46,5	-27,2	(+)
II	5	-7,13	-50,76	-44,66	-34,19	(+)
II	6	-8,8	-54,7	-46,9	-34,0	(+)
II	7	-3,6	-51,2	-41,6	-19,2	(+)
II	8	-8,0	-47,6	-41,2	-24,0	(+)

Tablo 9: II. grup için histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama bulguları

Grup no	Sıçan no	H&E Boyama	NF-200	GFAP	S-100	SRY
II	1	(+)	(+++)	(++)	(+++)	(+)
II	2	(+)	(+++)	(+++)	(+++)	(+)
II	3	(+)	(++)	(++)	(+++)	(+)
II	4	(++)	(+++)	(++)	(+++)	(+)
II	5	(+)	(+++)	(++)	(++)	(+)
II	6	(+)	(+++)	(++)	(+++)	(+)
II	7	(+)	(+++)	(++)	(+++)	(+)
II	8	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+)

Tablo 10: III. grup için SFI ve SRY bulguları

Grup no	Sıçan no	SFI 0.gün	SFI 3.gün	SFI 7.gün	SFI 28.gün	SRY
III	1	-4,4	-57,7	-55,1	-30,4	(+)
III	2	-1,1	-51,4	-48,9	-32,8	(+)
III	3	-7,8	-51,8	-50,1	-25,0	(+)
III	4	-7,9	-52,3	-25,9	-23,2	(+)
III	5	-9,6	-54,8	-56,4	-35,6	(+)
III	6	-5,6	-56,0	-42,7	-36,1	(+)
III	7	-8,8	-52,9	-55,2	-49,0	(+)
III	8	-9,5	-51,7	-50,2	-41,8	(+)

Tablo 11: III. grup için histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama bulguları

Grup No	Sıçan no	H&E Boyama	NF-200	GFAP	S-100	SRY
III	1	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)
III	2	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+)
III	3	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)
III	4	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)
III	5	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(+)
III	6	(++)	(++)	(+)	(++)	(+)
III	7	(++)	(+++)	(+)	(+++)	(+)
III	8	(++)	(++)	(+)	(+++)	(+)

Tablo 12: IV. grup için SFI ve SRY bulguları

Grup no	Sıçan no	SFI 0.gün	SFI 3.gün	SFI 7.gün	SFI 28.gün	SRY
IV	1	-7,0	-52,6	-45,8	-35,0	(+)
IV	2	-7,1	-56,8	-50,6	-33,7	(+)
IV	3	-9,5	-56,9	-55,3	-49,1	(+)
IV	4	-7,9	-54,8	-47,5	-28,6	(+)
IV	5	-7,1	-58,4	-50,8	-45,6	(—)
IV	6	-7,9	-53,6	-42,6	-33,3	(+)
IV	7	-5,4	-59,9	-50,2	-35,9	(+)
IV	8	-6,2	-63,7	-55,1	-39,6	(+)

Tablo 13: IV. grup için histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama bulguları

Grup no	Sıçan no	H&E Boyama	NF-200	GFAP	S-100	SRY
IV	1	(++)	(+++)	(+)	(+++)	(+)
IV	2	(++)	(+++)	(+)	(+++)	(+)
IV	3	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)
IV	4	(+++)	(+)	(+)	(++)	(+)
IV	5	(++)	(++)	(++)	(+++)	(—)
IV	6	(++)	(++)	(+)	(++)	(+)
IV	7	(+++)	(++)	(+)	(++)	(+)
IV	8	(++)	(+)	(++)	(+++)	(+)

Tablo 14: Tüm gruplar için SFI, aritmetik ortalamaları (AO) ve standartsapmaları (SS)

	Grup I (DY) 0. gün uygulama	Grup II (MKH+DY) 0.gün uygulama	Grup III (MKH+DY) 3. gün uygulama	Grup IV (MKH+DY) 7.gün uygulama
	AO ± SS	AO ± SS	AO ± SS	AO ± SS
SFI 0.gün	-6,57±1,24	-7,32±1,59	-6,88±2,95	-7,30±1,21
SFI 3.gün	-55,08±7,13	-52,04±4,46	-53,61±2,33	-56,75±3,78
SFI 7.gün	-50,85±8,62	-45,02±3,53	-48,11±9,99	-49,78±4,35
SFI 28.gün	-42,29±9,49	-30,56±7,43	-34,27±8,47	-37,64±6,80

Tablo 15: Tüm grupların H&E, NF-200, GFAP, S-100 boyama ve *SRY* varlığı yönünden karşılaştırılması

	Grup I (DY) 0. gün uygulama (n=8) (%)	Grup II (MKH+DY) 0.gün uygulama (n=8) (%)	Grup III (MKH+DY) 3. gün uygulama (n=8) (%)	Grup IV (MKH+DY) 7.gün uygulama (n=8) (%)
H&E				
(+++)	6 (% 75,0)	0 (% 0)	2 (% 25,0)	2 (% 25,0)
(++)	2 (% 25,0)	2 (% 25,0)	5 (% 62,5)	6 (% 75,0)
(+)	0 (% 0)	6 (% 75,0)	1 (% 12,5)	0 (% 0)
NF-200				
(+++)	1 (% 12,5)	6 (% 75,0)	3 (% 37,5)	2 (% 25,0)
(++)	4 (% 50,0)	2 (% 25,0)	4 (% 50,0)	4 (% 50,0)
(+)	3 (% 37,5)	0 (% 0)	1 (% 12,5)	2 (% 25,0)
GFAP				
(+++)	0 (% 0)	1 (% 12,5)	0 (% 0)	0 (% 0)
(++)	3 (% 37,5)	7 (% 87,5)	4 (% 50,0)	2 (% 25,0)
(+)	5 (% 62,5)	0 (% 0)	4 (% 50,0)	6 (% 75,0)
S-100				
(+++)	4 (% 50,0)	7 (% 87,5)	3 (% 37,5)	4 (% 50,0)
(++)	3 (% 37,5)	1 (% 12,5)	5 (% 62,5)	3 (% 37,5)
(+)	1 (% 12,5)	0 (% 0)	0 (% 0)	1 (% 12,5)
SRY				
(+)	0 (% 0)	8 (% 100)	8 (% 100)	7 (% 87,5)
(□)	8 (% 100)	0 (% 0)	0 (% 0)	1 (% 12,5)

Tablo 16: Grup I-IV hayvanların H&E, NF-200, S-100, GFAP boyama ve SRY açısından karşılaştırılması

	H&E	NF-200	S-100	GFAP	SRY
Grup I-II	P<0,01	p <0,05	p>0,05	P<0,05	P<0,01
Grup I-III	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	P<0,01
Grup I-IV	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	P<0,05
Grup II-III	P<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Grup II-IV	P<0,01	p>0,05	p>0,05	P<0,01	p>0,05
Grup III-IV	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Tablo 17: Grup I-IV hayvanların 0., 3., 7. ve 28. gündeki SFI ölçümleri açısından karşılaştırılması

	SFI 0	SFI 3	SFI 7	SFI 28
Grup I-II	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	P<0,05
Grup I-III	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Grup I-IV	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Grup II-III	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Grup II-IV	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Grup III-IV	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Grup I : Doku yapıştırıcısı 0. gün transplantasyon

Grup II : Doku yapıştırıcısı + MKH 0. gün transplantasyon

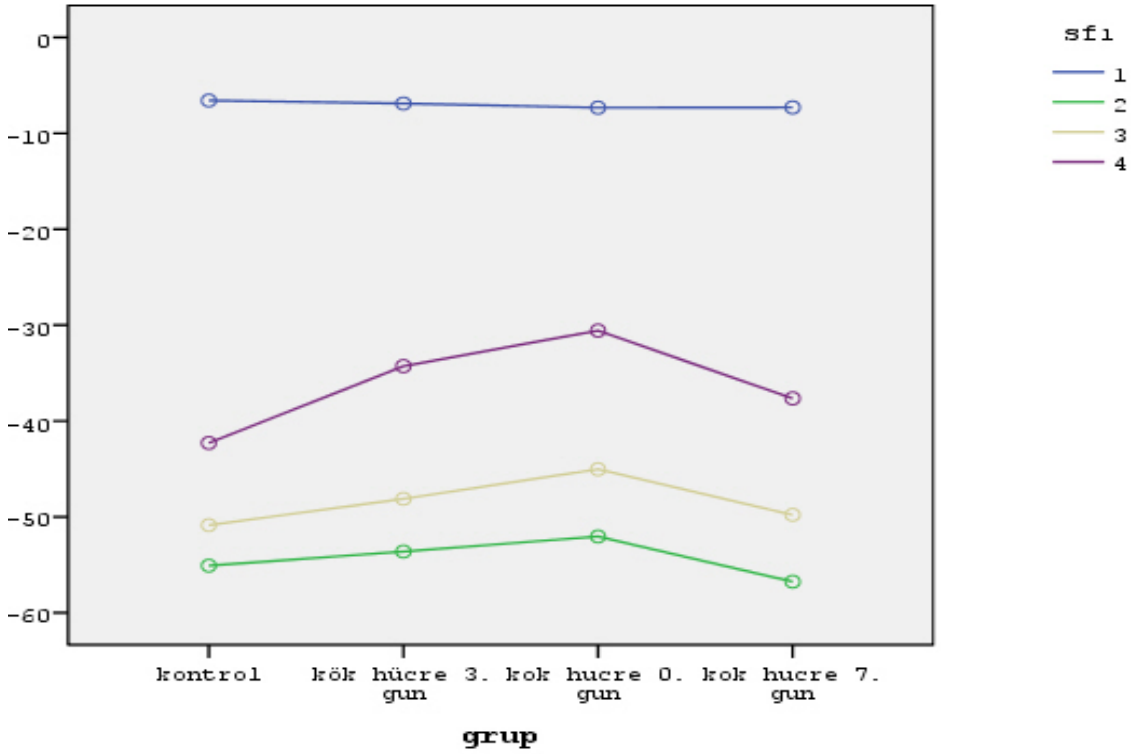
Grup III : Doku yapıştırıcısı + MKH 3. gün transplantasyon

Grup IV : Doku yapıştırıcısı + MKH 7. gün transplantasyon

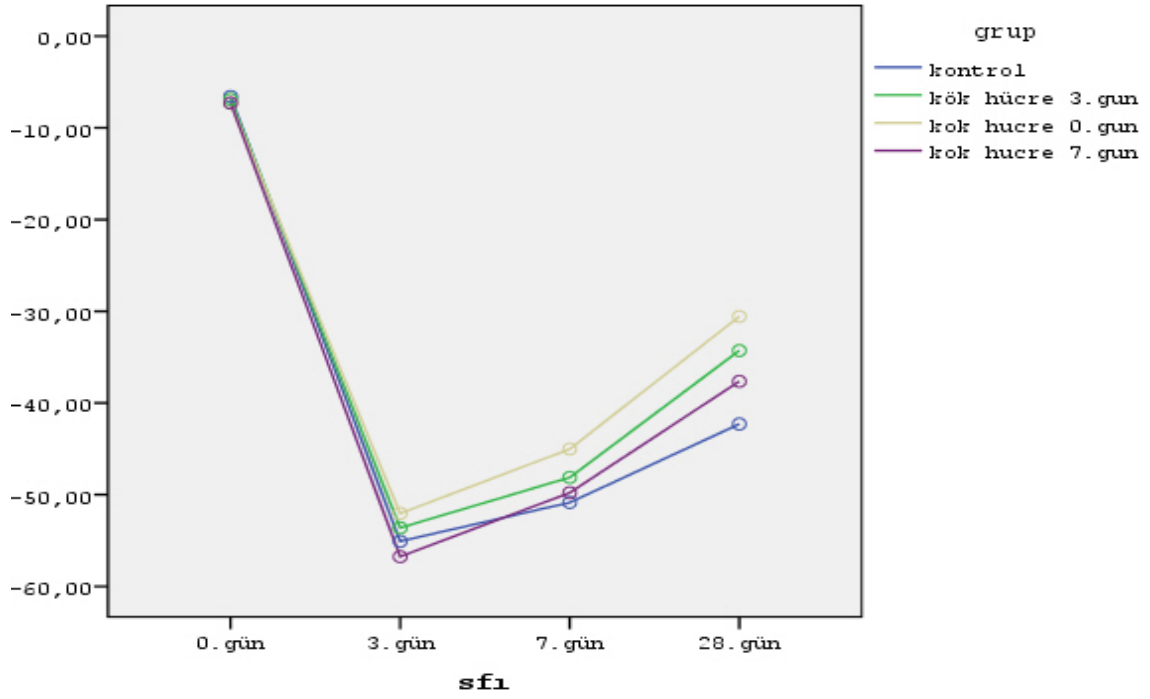
IV.A. Grupların Değerlendirilmesi

1. Siyatik Fonksiyon İndeksi değerlendirilmesi sonucunda;

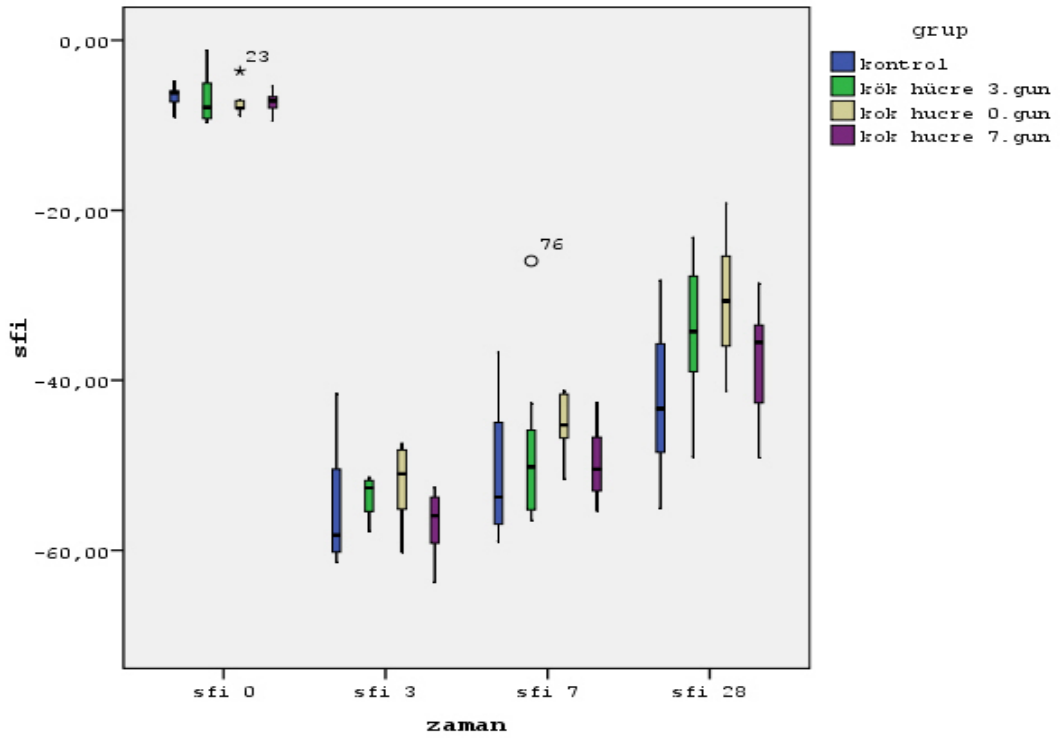
- SFI 0. gün değerlendirilmesinde; grup I'de ortalama değer olarak (-6,57) ölçülürken, grup II'de (-7,32), grup III'de (-6,88) ve grup IV'de ise (-7,30) olarak ölçüldü.
- SFI 3. gün değerlendirilmesinde; grup I'de ortalama değer olarak (-55,08) ölçüldü, grup II'de (-52,04), grup III'de (-53,61) ve grup IV'de ise (-56,75) olarak ölçüldü.
- SFI 7. gün değerlendirilmesinde; grup I'de ortalama değer olarak (-50,85) ölçüldü, grup II'de (-45,02), grup III'de (-48,11) ve grup IV'de ise (-49,78) olarak ölçüldü.
- SFI 28. gün değerlendirilmesinde; grup I'de ortalama değer olarak (-42,29) ölçüldü, grup II'de (-30,56), grup III'de (-34,27) ve grup IV'de ise (-37,64) olarak ölçüldü.
- Tüm SFI verileri Şekil 18, Şekil 19 ve Şekil 20'de gösterildi. Örnek ayak izleri Şekil 21'de gösterildi.



Şekil 18: Tüm grupların SFI ölçüm sonuçlarına göre karşılaştırılması



Şekil 19: Tüm SFI verilerinin günlere ve gruplara göre değişimi



Şekil 20: SFI ölçüm oranlarının günlerine göre grupların dağılımı



Şekil 21a: SFI ölçümü için kullanılan ilk gün alınan normal sıçan ayak izi



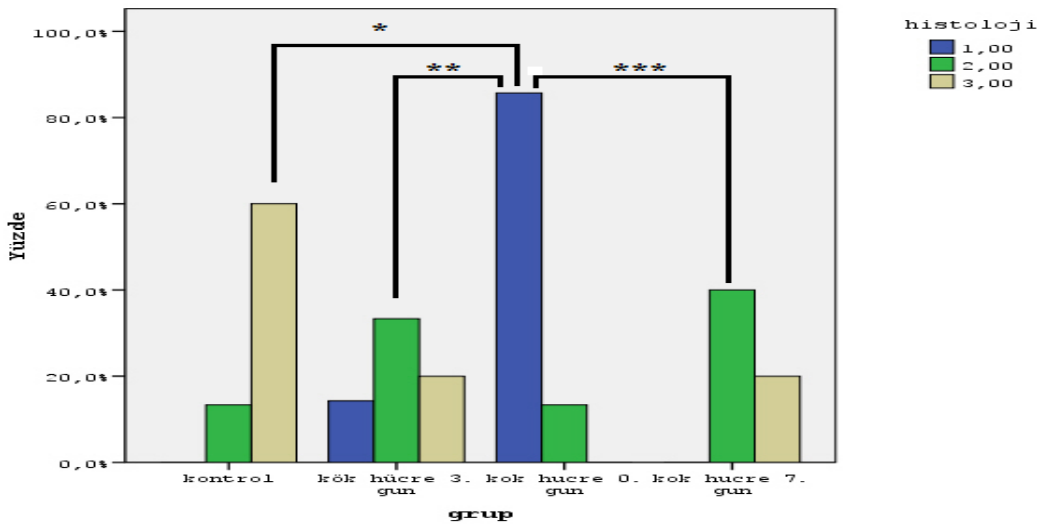
Şekil 21b: SFI ölçümü için kullanılan 7. gün alınan zedelenmiş siyatik sinirli sıçan ayak izi



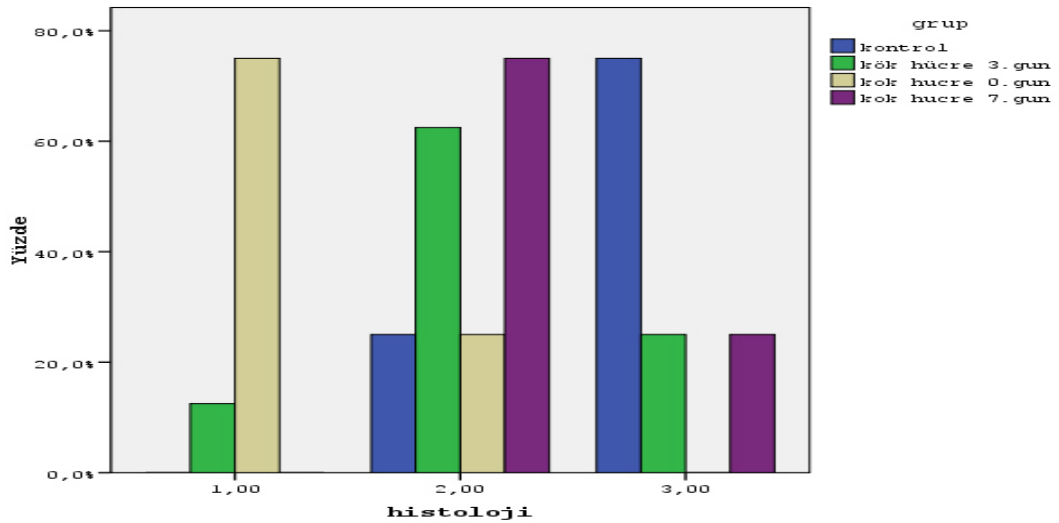
Şekil 21c: SFI ölçümü için kullanılan 28. gün alınan zedelenmiş siyatik sinirli sıçan ayak izi

2. H&E boyaması ile vakuolizasyon ve sinir dejenerasyonunun değerlendirilmesinde (Şekil 24);

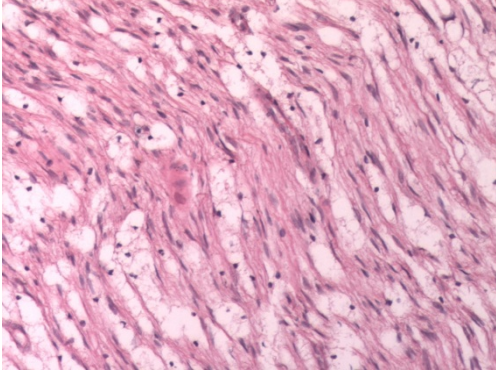
- (+++) vakuolizasyon, grup I'de % 75 iken grup II'de % 0, grup III'de % 25 ve grup IV'de % 25 bulundu.
- (++) vakuolizasyon, grup I'de % 25 iken grup II'de % 25, grup III'de % 62,5 ve grup IV'de % 75 bulundu.
- (+) vakuolizasyon, grup I'de % 0 iken grup II'de % 75, grup III'de % 12,5 ve grup IV'de % 0 bulundu (Şekil 22 ve Şekil 23).



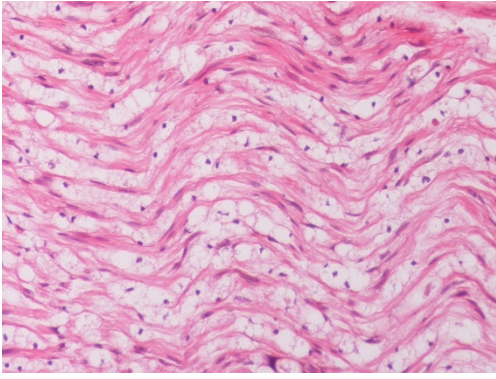
Şekil 22: H&E boyamanın gruplara göre değerlendirilmesi. (*: $p<0,01$, **: $p<0,05$, ***: $p<0,01$)



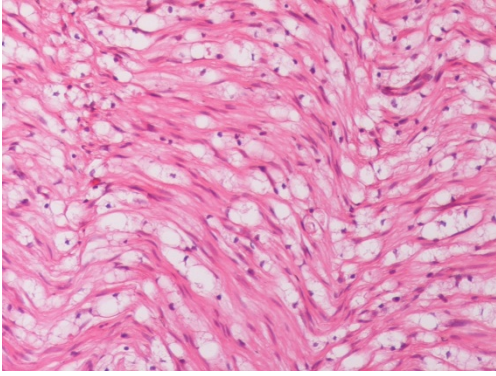
Şekil 23: Tüm gruplarda H&E boyamanın derecelerine göre karşılaştırılması



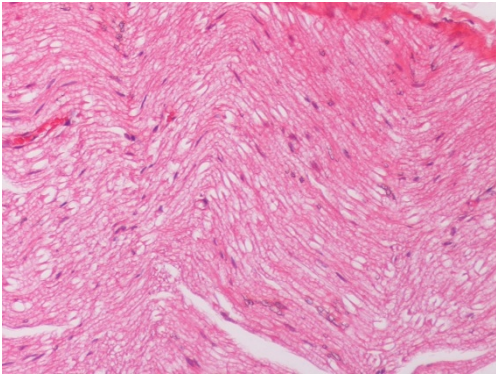
Şekil 24a: MKH uygulanmamış gruptaki H&E ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



Şekil 24b: 3. gün MKH uygulanmış gruptaki H&E ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



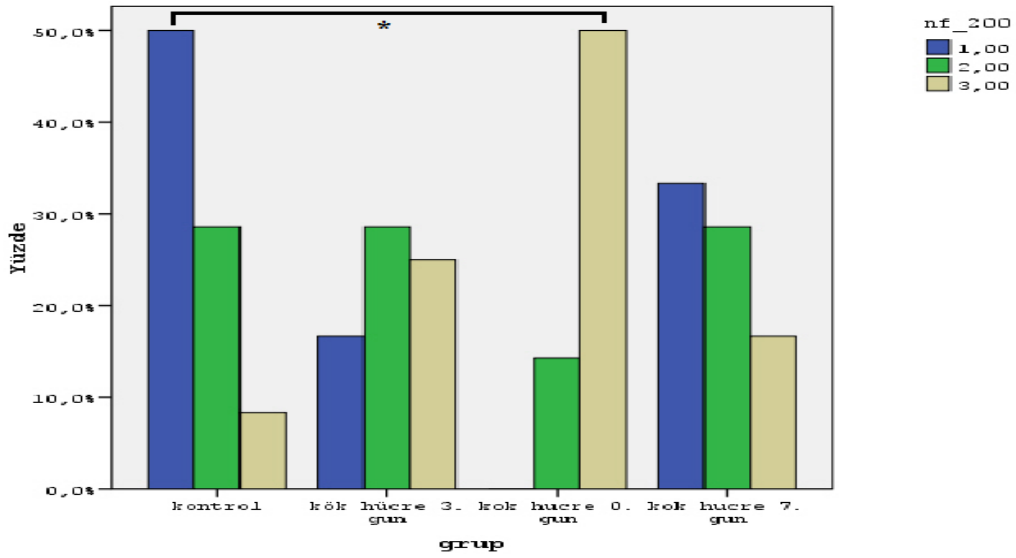
Şekil 24c: 7. gün MKH uygulanmış gruptaki H&E ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



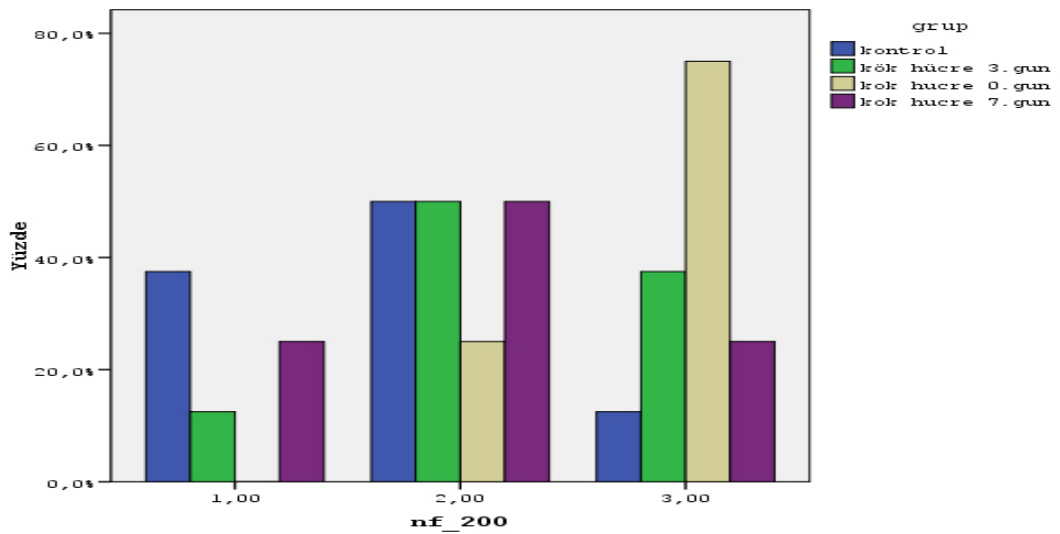
Şekil 24d: 0. gün MKH uygulanmış gruptaki H&E ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)

3. NF-200 boyama ile sinir dokusunun değerlendirilmesinde (Şekil 27);

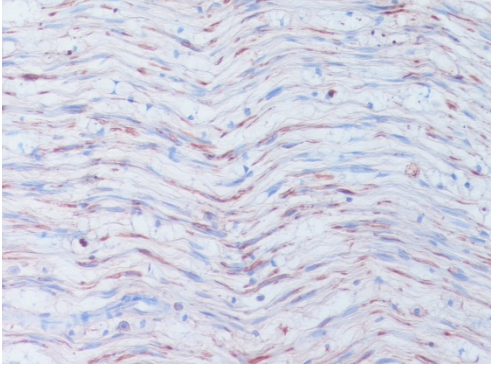
- (+++) boyanma, grup I'de % 12,5 iken grup II'de % 75, grup III'de % 37,5 ve grup IV'de % 25 bulundu.
- (++) boyanma, grup I'de % 50 iken grup II'de % 25, grup III'de % 50 ve grup IV'de % 50 bulundu.
- (+) boyanma, grup I'de % 37,5 iken grup II'de % 0, grup III'de % 12,5 ve grup IV'de % 25 bulundu (Şekil 25 ve Şekil 26).



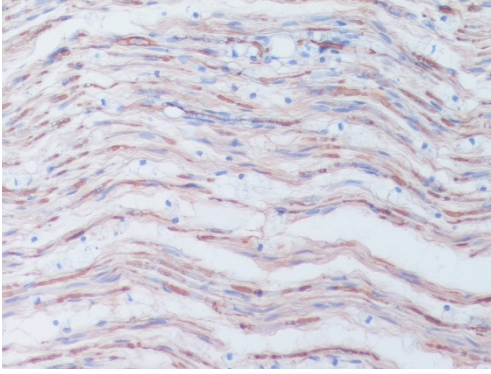
Şekil 25: NF-200 boyamanın gruplara göre değerlendirilmesi. (*: p<0,05)



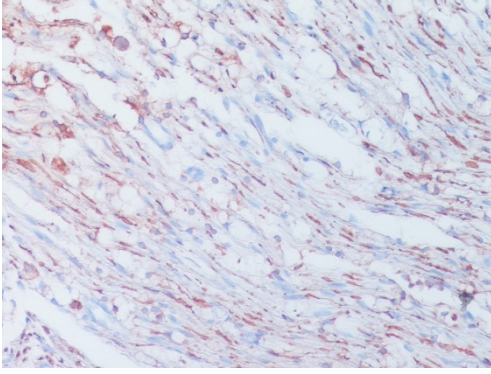
Şekil 26: Tüm gruplarda NF-200 boyamanın derecelerine göre karşılaştırılması



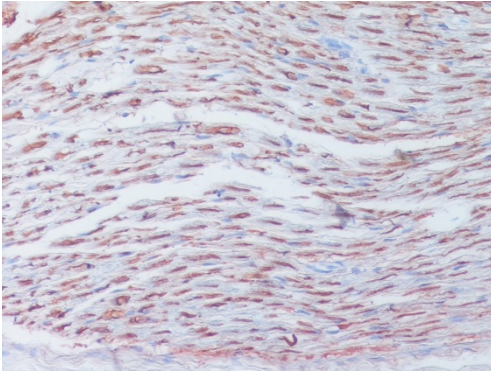
Şekil 27a: MKH uygulanmamış gruptaki NF-200 ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



Şekil 27b: 3. gün MKH uygulanmış gruptaki NF-200 ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



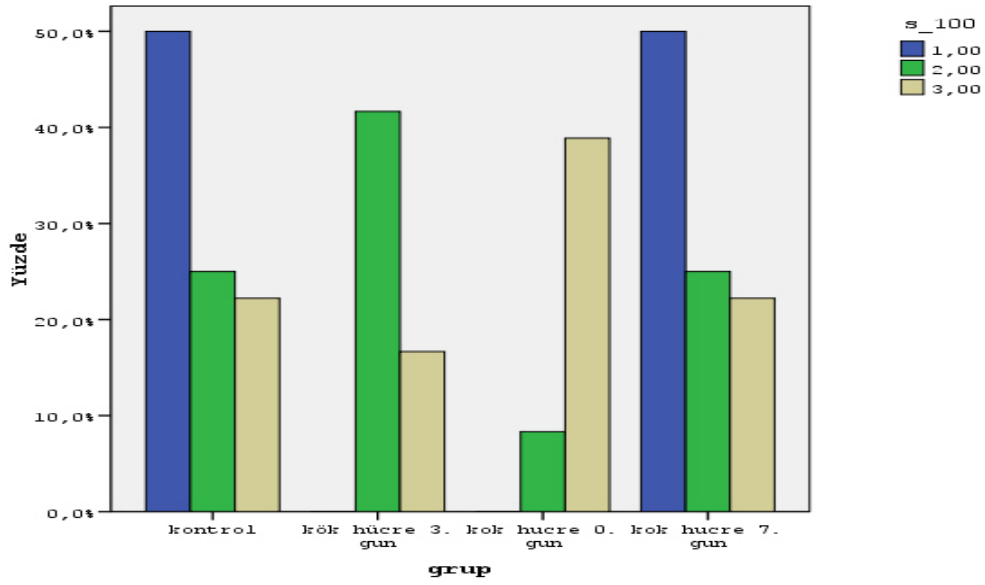
Şekil 27c: 7. gün MKH uygulanmış gruptaki NF-200 ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



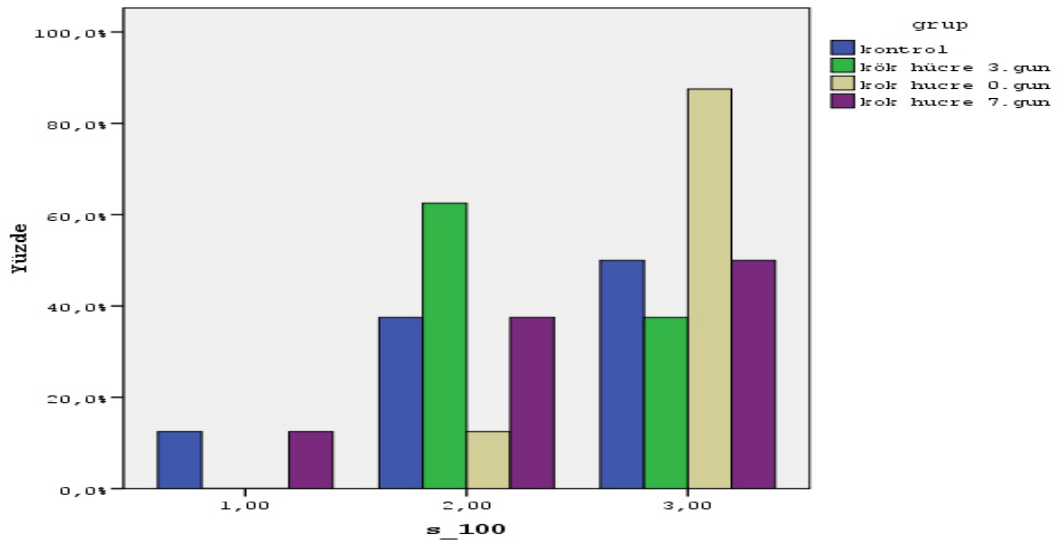
Şekil 27d: 0. gün MKH uygulanmış gruptaki NF-200 ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)

4. S-100 boyama ile sinir dokusunun değerlendirilmesinde (Şekil 30);

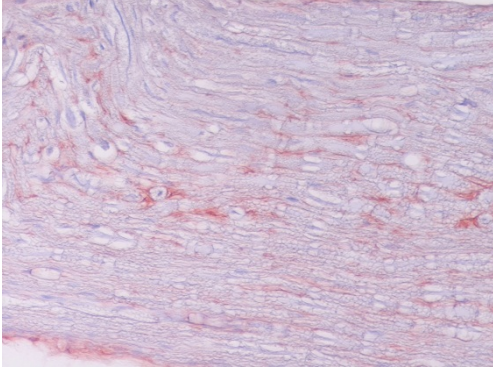
- (+++) boyanma, grup I'de % 50 iken grup II'de % 87,5, grup III'de % 37,5 ve grup IV'de % 50 bulundu.
- (++) boyanma, grup I'de % 37,5 iken grup II'de % 12,5, grup III'de % 62,5 ve grup IV'de % 37,5 bulundu.
- (+) boyanma, grup I'de % 12,5 iken grup II'de % 0, grup III'de % 0 ve grup IV'de % 12,5 bulundu (Şekil 28 ve Şekil 29).



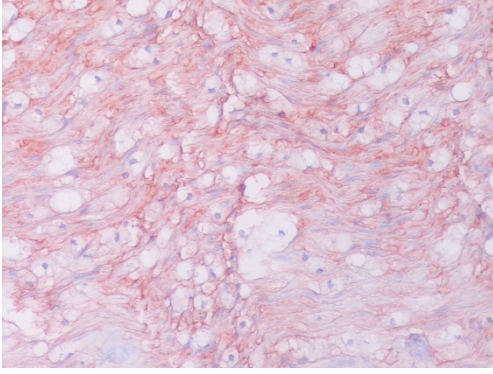
Şekil 28:S-100 boyamının gruplara göre değerlendirilmesi



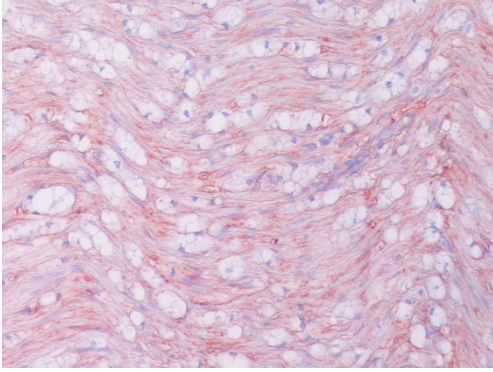
Şekil 29: Tüm gruplarda S-100 boyamının derecelerine göre karşılaştırılması



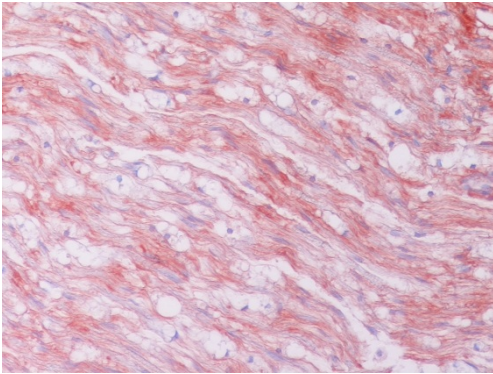
Şekil 30a:MKH uygulanmamış gruptaki S-100 ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



Şekil 30b:3. gün MKH uygulanmış gruptaki S-100 ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



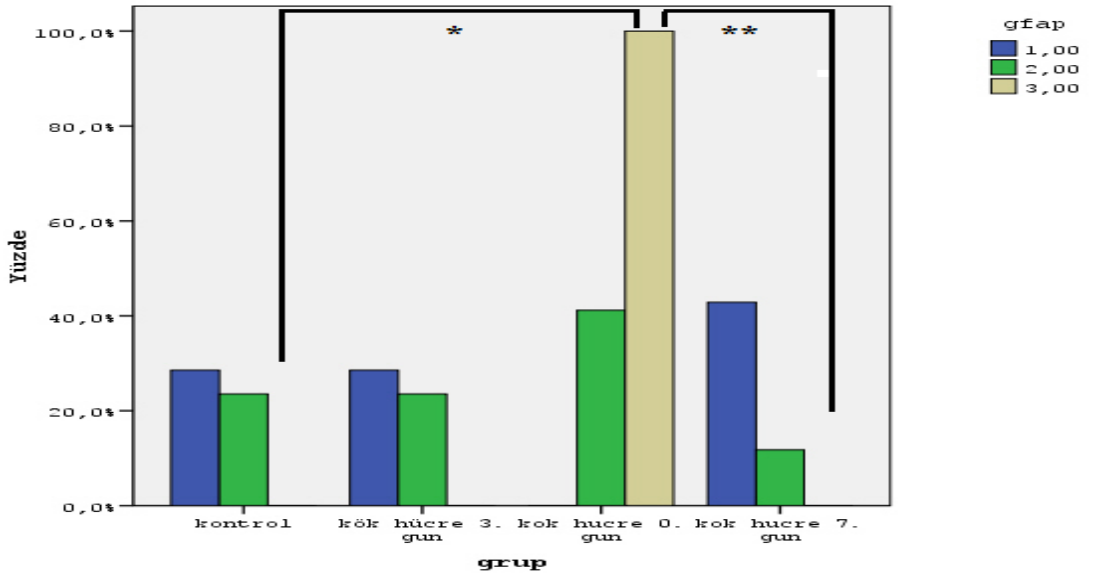
Şekil 30c:7. gün MKH uygulanmış gruptaki S-100 ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



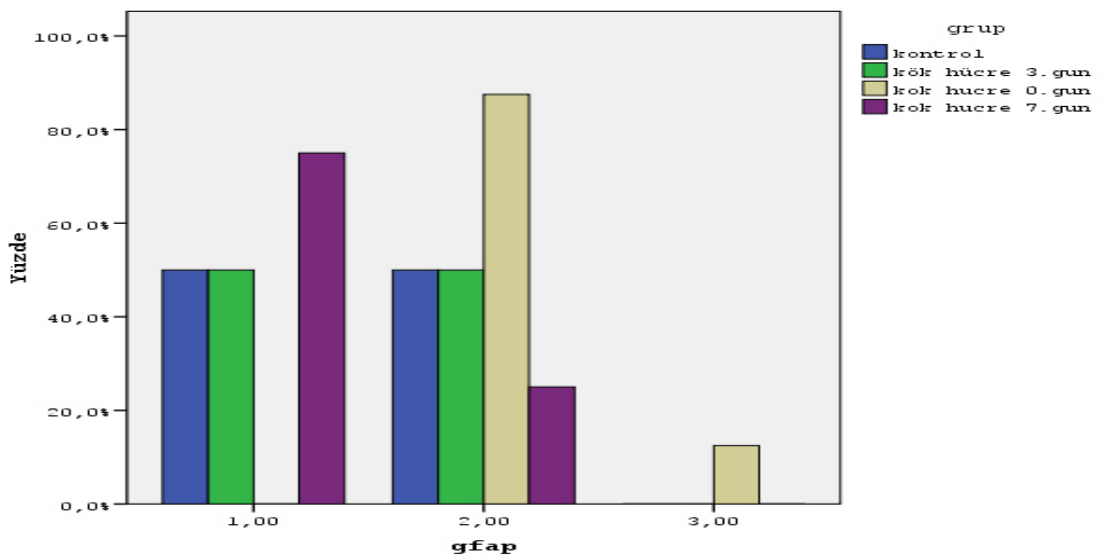
Şekil 30d:0. gün MKH uygulanmış gruptaki S-100 ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)

5. GFAP boyama ile sinir dokusunun değerlendirilmesinde (Şekil 33);

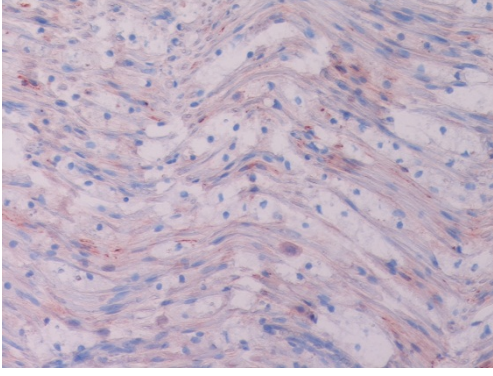
- (+++) boyanma, grup I'de % 0 iken grup II'de % 12,5, grup III'de % 0 ve grup IV'de % 0 bulundu.
- (++) boyanma, grup I'de % 50 iken grup II'de % 87,5, grup III'de % 50 ve grup IV'de % 25 bulundu.
- (+) boyanma, grup I'de % 50 iken grup II'de % 0, grup III'de % 50 ve grup IV'de % 75 bulundu (Şekil 31 ve Şekil 32).



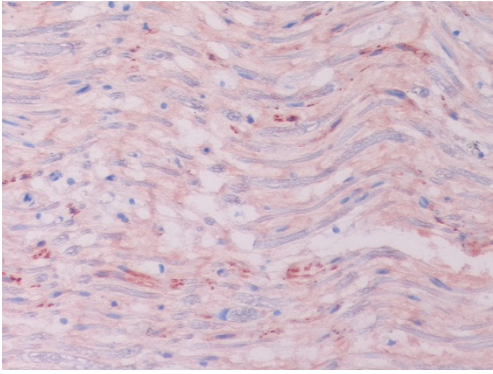
Şekil 31:GFAP boyamanın gruplara göre değerlendirilmesi.(*: p<0,05, **: p<0,01)



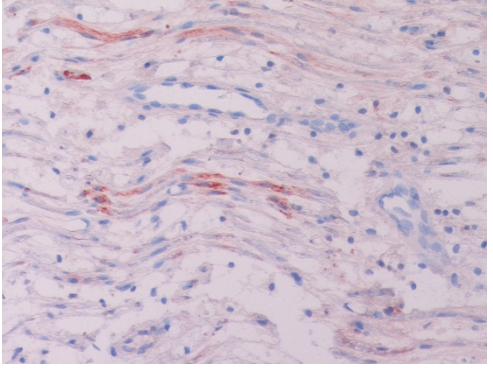
Şekil 32: Tüm gruplarda GFAP boyamanın derecelerine göre karşılaştırılması



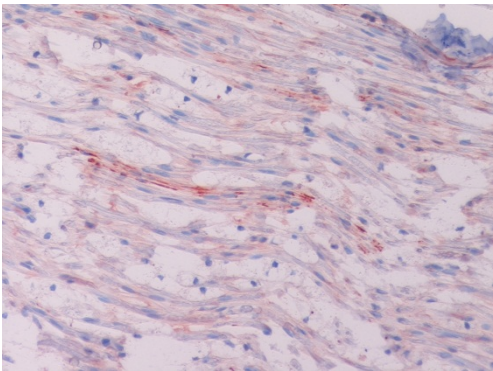
Şekil 33a:MKH uygulanmamış gruptaki GFAP ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



Şekil 33b:3. gün MKH uygulanmış gruptaki GFAP ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



Şekil 33c:7. gün MKH uygulanmış gruptaki GFAP ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)



Şekil 33d:0. gün MKH uygulanmış gruptaki GFAP ile boyama sonucu sinir dokusunun görünümü
(Orijinal büyütme: X180)

6. PCR çalışması ile alıcı dişi hayvanların siyatik sinir dokularında Y kromozomunda yer alan *SRY* gen varlığının tespit edilmesi sonucunda;
- (+) *SRY*, grup I'de % 0, grup II'de % 100, grup III'de % 100 ve grup IV'de % 87,5 olarak bulundu.

IV.B. Grupların Karşılaştırılması

Grupların birbirleri ile karşılaştırılmaları sonucunda aşağıdaki sonuçlara ulaşıldı.

1. I. grup (DY, 0. gün transplantasyon) ile II. grup (MKH+DY, 0. gün transplantasyon) arasındaki SFI'nın 28. gün ölçümü olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,016$). H&E ($p < 0,002$), NF-200 ($p < 0,027$) ve GFAP ($p < 0,022$) boyama özellikleri yönünden anlamlı fark bulundu. S-100 boyama özellikleri açısından bu iki grup arasındaki fark anlamlı değildi ($p > 0,05$). *SRY* açısından da bu iki grup arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,008$).
2. I. grup (DY, 0. gün transplantasyon) ile III. grup (MKH+DY, 3. gün transplantasyon) arasında SFI ölçümleri, NF-200, S-100, GFAP ve H&E boyama açısından bulunan fark anlamlı değildi ($p > 0,05$). *SRY* açısından bu iki grup arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,008$).
3. I. grup (DY, 0. gün transplantasyon) ile IV. grup (MKH+DY, 7. gün transplantasyon) arasında SFI ölçümleri, NF-200, S-100, GFAP ve H&E boyama açısından bulunan fark anlamlı değildi ($p > 0,05$). *SRY* açısından bu iki grup arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,016$).
4. II. grup (MKH+DY, 0. gün transplantasyon) ile III. grup (MKH+DY, 3. gün transplantasyon) arasında SFI ölçümleri, NF-200, S-100, GFAP ve H&E boyama açısından anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$). *SRY* açısından da bu iki grup arasındaki fark anlamlı değildi ($p > 0,05$).
5. II. grup (MKH+DY, 0. gün transplantasyon) ile IV. grup (MKH+DY, 7. gün transplantasyon) arasında SFI ölçümleri, NF-200, S-100 ve H&E boyama açısından bulunan fark anlamlı değildi ($p > 0,05$). GFAP boyama açısından anlamlı fark bulundu ($p < 0,008$). *SRY* açısından da bu iki grup arasındaki fark anlamlı değildi ($p > 0,05$).

6. III. grup (MKH+DY, 3. gün transplantasyon) ile IV. grup (MKH+DY, 7. gün transplantasyon) arasında SFI ölçümleri, NF-200, S-100, GFAP ve H&E boyama açısından bulunan fark anlamlı değildi ($p>0,05$). *SRY* açısından da bu iki grup arasındaki fark anlamlı değildi ($p>0,05$).

V. TARTIŞMA

Sinirdeki gerilme, ezilme, kesilme gibi nedenlerle meydana gelen periferik sinir yaralanmalarında sinirde birçok histolojik değişiklikler ortaya çıkar. Bu değişikliklerin içerisinde yaralı bölgenin distalinde meydana gelen ve aksonal yapının tamamen bozulması ile karakterize olan Wallerian Dejenerasyonu sayılabilir (Quan, 1999).

Periferik sinir dejenerasyonlarında rejenere olan aksonlara yol gösterici olarak fibrin ve fibrinojenden yapılan tüpler kullanılmaktadır. Fibrin ve fibrinojenin optimal kombinasyonunun değerlendirildiği hücre çalışmalarında doku yapıştırıcılarının (fibrin glue) mezankimal kök hücreler için iyi bir matriks olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Bensaid ve ark., 2003; Kalbermatten ve ark., 2009). Biz de çalışmamızda matriks etkisi için MKH ile birlikte doku yapıştırıcısı kullandık.

Periferik sinirlerde meydana gelen dejenerasyonun tedavi edilebilmesi için cerrahi girişimlerin (Aytaç, 2005; Çifci ve ark., 2010) yanında biyolojik olmayan (silikon tüp gibi) materyaller kullanılarak (Chen ve ark., 2006; Bozkurt ve ark., 2009) ve yapay sinirlerin geliştirilmesi amacıyla nöronal progenitör hücrelerin (Murakami ve ark., 2003) ya da in vitro olarak Schwann hücre özelliğine diferansiye edilmiş hücrelerin kullanılması ile yapılan çalışmalar mevcuttur (Keilhoff ve ark., 2006b; Shimizu ve ark., 2007). Bu çalışmalarda periferik sinir olarak çalışılması kolay olan siyatik sinir seçilmiştir.

SFI'da istatistiksel bir farklılığın tespit edilebilmesi için de siyatik sinir hasarlanmasının en az 20 dakika yapılması gerekmektedir (Pan ve ark., 2007). Çalışmamızda bu veriler ışığında 20 dakikalık siyatik sinir hasarı gerçekleştirdik.

Son yıllarda ise sinirlerde meydana gelen bu dejenerasyonun düzeltilebilmesi için diğer tedavi seçeneklerine ek olarak MKH'ler de kullanılmaya başlanmıştır. Sinir rejenerasyonunda etkili olan, nöral hücre yaşamını ve nörogenezisi olumlu olarak etkileyen birçok sitokin ve büyüme faktörleri vardır (Terenghi, 1999). Bu faktörler MKH'ler tarafından da üretilirler (Kopen ve ark., 1999; Coyne ve ark., 2006; Pan ve ark., 2007). MKH'ler aynı zamanda sinir rejenerasyonuna katkıda bulunan Schwan hücrelerini indirekt olarak etkileyerek ve aksonal rejenerasyonu artırarak periferik sinir iyileşmesine katkıda bulunurlar (Pan ve ark., 2007; Wang ve ark., 2009; Matsuse ve ark., 2010). Biz çalışmamızı sıçan kemik iliği kaynaklı MKH'ler kullanılarak gerçekleştirdik.

Pan ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada kök hücreleri hasarlı sinir dokusu üzerine epineryumu bozmadan 3×10^5 hücre/ml yoğunlukta yerleştirmişlerdir. Verilen kök hücrelerin sinir dokusuna dahil olmadıklarını bulmuşlardır. Elde ettikleri iyileşme sonuçlarını nörotropik faktörlerin sekresyonunun sinir rejenerasyonunu arttıran olası bir mekanizma ile olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda uyguladığımız doz da 3×10^5 hücre/ml yoğunluğundadır. Bizim iyileşme sonuçlarımız da bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Literatürde siyatik sinir rejenerasyonunun fonksiyonel analizi için yürüme testleri ve SFI formülü kullanılmıştır (de Medinaceli, 1982; Tetik ve ark., 2000). Pan ve arkadaşlarının 2009 yılındaki çalışmalarında sadece placebo uygulanan grubun SFI değerlendirme sonuçları dördüncü haftanın sonunda (-45)'e kadar düzelme olarak bulunmuştur (Pan ve ark., 2009). Biz de çalışmamızda güvenilir ve tekrarlanabilir olan SFI yöntemi kullanarak kontrol grubumuzdaki iyileşme oranlarını (-42)'ye kadar düzelme olarak tespit ettik. Yine aynı çalışmada amniyotik sıvıdan elde edilen MKH'ler 1×10^6 hücre/ml yoğunluğunda uygulanmış ve dördüncü hafta SFI sonuçları (-23) olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda MKH'in zedelenmeden hemen sonra uygulandığı grupta SFI sonuçları dördüncü hafta sonunda (-30) olarak bu çalışmadaki değerlere yakın tespit edilmiştir. Aradaki iyileşme farkının kullanılan MKH'lerin yoğunluk dozlarına bağlı olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda 0. gün yürüme sonuçları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Üçüncü gün yapılan SFI ölçümlerinde I. grup ile II. grup arasında anlamlı fark olmaması sinir rejenerasyonunun ilk üç gün içerisinde fonksiyonel düzelme sağlayacak boyutta olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Bu değerlendirme tüm grupların üçüncü gün SFI sonuçları için de yapılabilir.

Yedinci gün SFI ölçümlerinde tüm gruplar arasında bulunan fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak gruplar arasında farklı iyileşme sonuçları gözlemlendi. II. grup ile IV. grup arasındaki iyileşme farkı bulundu. Bu durum zedelenmeden sonra yedi günlük bir zaman içerisinde sinir rejenerasyonunda MKH uygulanmasının uygulanmaması ile karşılaştırıldığında sinir rejenerasyonuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. I. grup ile II. grup arasında da belirgin iyileşme sonuçlarının olmasını sinir rejenerasyonunun ilk 7 gün içerisinde artarak devam ettiği şeklinde açıklayabiliriz.

İlk 7 günlük sürede MKH uygulanmayan I. grup ile IV. grup arasındaki SFI iyileşme sonuçları birbirine yakın bulundu. Bu sonuçların III. grubun iyileşme sonuçlarından farklı olması sinir zedelenmesinden 72 saat sonra MKH uygulanmasının hiç uygulanmamasına göre rejenerasyonda etkili olduğunu düşündürmektedir.

Periferik sinir dejenerasyonunun gösterilmesinde literatürde H&E boyama yöntemi kullanılmaktadır. Siyatik sinir zedelenmelerinde histolojik boyamalar sonucunda vakuollerin sayı ve hacim olarak artmış olması sinir harabiyetinin artmış olduğunu gösterirken azalmış vakuol sayısı ve hacmi ise rejenerasyonun lehinedir (Pan ve ark., 2007; 2009).

Literatürde siyatik sinir rejenerasyonunun değerlendirilmesinde değişik immünohistokimyasal boyamalar kullanılmıştır. Zedelenmenin olduğu alanda glial, aksonal ve Schwann hücre varlığının kanıtlanması için kullanılan S-100, GFAP ve NF-200 antikorları vardır. (Murakami ve ark., 2003; Tohill ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2004; Radtke ve ark., 2009; di Summa ve ark., 2010). Biz de çalışmamızda Schwann hücre ve Schwann benzeri hücre varlığını gösteren S-100, aksonal aktivasyonu gösteren NF-200 ile birlikte astrosit pozitif ve Schwann hücre varlığını gösteren GFAP antikorlarını kullandık.

Yirmi sekizinci gün yapılan SFI ölçümlerinde I. grup ile III. grup arasında istatistiksel ilişkinin bulunmamasına rağmen hem SFI hemde histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama sonuçlarının farklı olması zedelenmeden üç gün sonra da olsa MKH uygulamasının uygulanmamasına göre fonksiyonel düzelmede etkili olabileceğini düşündürdü.

Yirmi sekizinci gün yapılan SFI ölçümlerinde I. grup ile IV. grup arasında anlamlı fark belirlenememekle birlikte SFI iyileşme sonuçlarının ve histopatolojik, immünohistokimyasal boyama sonuçlarının farklı olması zedelenmeden 7 gün sonra bile MKH uygulanmasının etkili olabileceğini düşündürdü.

Yirmi sekizinci gün yapılan SFI ölçümlerinde I. grup ile II. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulundu. Yine bu iki grup arasında H&E boyama açısından immünohistokimyasal boyamalardan NF-200 boyama ve GFAP boyama için de anlamlı fark bulundu. Bu sonuçlar bizlere MKH'lerin, aksonal rejenerasyonu artırıp fonksiyonel düzelmede periferik sinir iyileşmesine katkıda bulunduğu yönünde fikir vermektedir. Literatürde MKH'lerin bu etkiyi, sinir rejenerasyonunda ve nörogeneziste

olumlu etkileri olan birçok sitokin ve büyüme faktörlerini üreterek ve sinir rejenerasyonuna katkıda bulunan Schwann hücrelerini aktive ederek gösterdiği bildirilmiştir (Kopen ve ark., 1999; Coyne ve ark., 2006; Pan ve ark., 2007; Wang ve ark., 2009; Matsuse ve ark., 2010). MKH'lerin Schwann hücrelerini aktive ederek ve sitokin ve büyüme faktörlerinin etkisi ile rejenerasyona katkıda bulunmalarının yanısıra Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bu hücrelerin fonksiyonel Schwann hücrelerine dönüşerek de bu etkiyi artırdıkları bulunmuştur (Zhang ve ark., 2004).

Yirmi sekizinci gün yapılan SFI ölçümlerinde II. grup ile IV. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile iyileşme sonuçları farklı olarak bulundu. GFAP boyama açısından ve H&E boyama yönünden bu iki grup arasında anlamlı fark tespit edilmesi zedelenmeden hemen sonra uygulanan MKH'nin yedi günlük bir farkla MKH uygulanmasına göre sinir rejenerasyonuna daha fazla katkıda bulunduğu yönünde algılanabilir.

Yirmi sekizinci gün yapılan SFI ölçümlerinde III. grup ile IV. grup arasında iyileşme sonuçları istatistiksel olarak anlamlı değildi. H&E boyama ve NF-200, S-100, GFAP boyamalar açısından da bulunan fark anlamlı değildi. Bu sonuçlar zedelenmeden sonraki üçüncü gün MKH uygulanması ile yedincigün uygulanması arasında hücrel ve fonksiyonel düzeyde saptanabilecek fark olmadığı şeklinde değerlendirilebilir.

Yirmi sekizinci gün yapılan SFI ölçümlerinde ve NF-200, S-100, GFAP boyamalar açısından II. grup ile III. grup arasındaki fark anlamlı değildi. Ancak H&E boyama yönünden istatistiksel olarak bulunan anlamlı fark MKH uygulama zamanının sinir zedelenmesinden hemen sonra olmasının zedelenmeden üç gün sonra olmasına nazaran sinir rejenerasyonunda daha fazla iyileşmeye sebep olduğu şeklinde değerlendirilebilir. Tespit edilen bu farkın SFI ile desteklenememesi hücrel olarak görülen düzelmelerin fonksiyonel düzeye yansıtacak boyutta olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Bu da siyatik sinir zedelenmesinde zedelenmeden sonra MKH uygulaması için bir terapotik pencerenin olduğunu göstermektedir.

Dördüncü haftadaki H&E boyanmanın II. grup ile III. ve IV. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olması ise fonksiyonel iyileşme için hücrel düzelmelerde bir eşik olduğu ve bu eşik üzerinde de fonksiyonel etkinin artmadığını düşündürmektedir.

Verici kök hücrelerinin alıcı dokularında gösterilebilmesi ve takip edilebilmesinin yöntemlerinden bir tanesi de erkek sıçanlardan (Y+) alınan MKH'lerin dişi sıçan (X) dokularında PCR yöntemi kullanılarak *SRY* geninin varlığı ile gösterilmesidir. PCR yöntemi ile 1/10.000 oranındaki erkek hücresi erkek-dişi hücre karışımlarından elde edilebilir (Ise ve ark., 2004).

Bizim çalışmamızda dişi sıçan siyatik sinirlerindeki erkek sıçanlara ait MKH'leri gösterebilmek için daha önceki yöntemlerden (Ise ve ark., 2004) revize edilerek PCR yapıldı. IV. grubun beşinci hayvanı hariç MKH nakli yapılan tüm dişi hayvan (II., III. ve IV. grup) siyatik sinirlerinden *SRY* genine ve internal kontrolü olan *β -aktin* genine ait PCR çıktıları elde edildi. Bu hayvana ait olan yirmi sekizinci gündeki SFI değerinin kendi grubuna ait olan ortalama değerlerden istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha az olması bu hayvana yapılan MKH naklinin başarısız olduğu sonucunu doğurdu.

Yirmi sekiz günlük takibin sonucunda SFI yönünden elde edilen bulgular ve histopatolojik, immünohistokimyasal boyama sonuçları eşliğinde MKH uygulanma zamanının zedelenmeden sonra ne kadar erken olursa rejenerasyon seviyesinin de o oranda fazla olacağı sonucuna varılabilir.

Histopatolojik düzeyde saptanılan iyileşme düzeyinin fonksiyonel düzeyde tespit edilememesi hücresel iyileşmenin fonksiyonel olarak görülebilmesi için daha fazla zamana gereksinim olduğu şeklinde de yorumlanabilir.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz bu çalışmanın siyatik sinir zedelenmesi üzerine yapılmış olan diğer çalışmalardan farkı MKH'lerin sinir dokusuna farklı zamanlarda (0., 3. ve 7. gün) uygulanmış olmasıdır (Chen ve ark., 2007; Pan ve ark., 2007).

SFI, histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre zedelenmeden hemen sonra MKH verilen grupta sinir rejenerasyonu en fazla iken MKH verilmeyen grupta en az seviyede bulundu.

Grupların kendi aralarında fonksiyonel değerlendirme testi, histopatoloji ve immünohistokimyasal boyama ile kıyaslanmaları sonucunda 0. gün MKH uygulanmasının MKH uygulanmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde sinir rejenerasyonunu artırdığı bulundu. Yine bu bulgulara dayanarak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı halde MKH uygulanma zamanı ve sinir rejenerasyonu arasında korelasyon olduğu sonucuna varıldı.

MKH transplantasyonunun sinir rejenerasyonuna etkilerinin araştırılacağı farklı zaman gruplarının oluşturulması, bu gruplardan elde edilen sonuçların farklı ve detaylı moleküler biyolojik ve laboratuvar ölçümleri ile değerlendirilmesi konunun derinlemesine anlaşılmasında faydalı olacaktır.

Bu konuda daha sonra yapılacak çalışmalarda grupların hayvan sayıları çoğaltılarak yürüme testlerine paralel olarak histopatolojik ve immünohistokimyasal boyamalar yapılması fonksiyonel değerlendirmenin hücrel olarak da desteklenmesine olanak sağlayabilir. Değerlendirme aşamasında elektrofizyolojik çalışmalar yapılarak sinir rejenerasyon değerlendirilmesi yapılabilir. Yine rejenerasyon seviyesini tespitte akson sayımı ve akson çapı ölçümü yapılabilir. Akson sayımı ve çap ölçümü ile sinir rejenerasyon düzeyi saptanabilir. Çalışma sonunda kantitatif PCR ile BDNF, NGF, CNTF çalışılması sinir değerlendirilmesinde etkin olan faktörlerin objektif olarak saptanılmasına olanak sağlayabilir. Çalışmanın süresinin uzatılması ise, sinirdeki hücrel düzeydeki iyileşmenin fonksiyonel düzelmeye etkisinin araştırılmasında daha aydınlatıcı bilgiler verebilir.

Bu konunun aydınlatılması için yapılacak olan hayvan deneyleri gelecekte insanlar üzerinde yapılacak olan araştırmaların planlanmasında ve düzenlenmesinde etkin rol oynayabilecektir.

VII. KAYNAKLAR

- Agius E, Cochard P. Comparison of neurite outgrowth induced by intact and injured sciatic nerves: a confocal and functional analysis. *J Neurosci.* 1998;18(1):328-338.
- Akar AR. Kardiyovasküler hastalıklarda kök hücre uygulamaları. Çiçek Bil F, Editör, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 1. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2009;77-85.
- Akbay A. Periferik sinirin mikroanatomi ve sinir kesilerinde uygulanan cerrahi teknikler. *Turk Neurosurg.*2005;15(3):198-201.
- Altıntaş A, Benbir G. Multipl skleroz'da kök Hücre tedavisi: Deneyimler, sorular ve sorunlar. *Türk Nöroloji Dergisi.* 2006;12(5):325-336.
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 2003;425(6961):968-973.
- Avcı G, Akan M, Yıldırım S, Aköz T. Nerve repair and grafting (review of the literature). *T Klin J Med Sci.* 2002;(22):428-437.
- Avcu F. Kök hücre biyolojisi. II. Ulusal Kök Hücre Kongresi, Trabzon, Özet kitabı, 2006;45-48.
- Avcu F. Mezenkimal kök hücrelerin immünregulatuvar fonksiyonları. *Türk Hematoloji Derneği Mezenkimal Kök Hücre Kursu (teorik), İzmir, Kurs kitabı,* 2008;14-16.
- Aytaç S. Periferik sinir cerrahisi sonrası oluşan yapışıklık ve skar dokusu oluşumuna oksidize rejenere selüloz ve oksidize rejenere selüloz-heparin

kombinasyonunun etkisi.Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bursa, Uzmanlık Tezi, 2005;2-5.

Baharvand H. Differentiation of embryonic stem cells into neurons and insulin-secreting cells. I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi, İstanbul, Özet kitabı, 2004;64–74.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004;8(3):301-316.

Balık O. Periferik sinir onarımlarında ters uç-yan sinir greftlerinin uç-uca sinir greftleri ile karşılaştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, Uzmanlık Tezi, 2008;7-16.

Bareyre FM. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. J Neurol Sci. 2008;265(1-2):63-72.

Bayık M. Kök hücre: Biyolojisi ve klinik kullanımı. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kursu XII, Antalya, İleri kurs kitabı, 2009;157-171.

Bayık M. Kök hücre: Yaşamın kaynağı. I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi, İstanbul, Özet kitabı, 2004;13–23.

Beksaç M, Çörtoğlu S, Kansu E, Öztürk M. Kök hücre araştırmalarında güncel kavramlar. İkinci Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi Raporları, 2005;5-6.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell. 2003;114(6):763-776.

- Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*. 2003(14):2497-2502.
- Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;(1176):101-17.
- 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.
- 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
- Bozkurt M, Kapı E, K lahçı Y. Periferik sinir onarımlarında kondüit uygulamaları, temel ve güncel yaklaşımlar: Literatürün gözden geçirilmesi. *Turk Plast Surg* 2009;17(2):74-83.
- Bulut G, Aksu S, Türk B r   . Travmatik periferik sinir lezyonlarında etyoloji. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 2003;14(2):98-100.
- Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004;16(5):E1.
- Can A, Karahüseyinoğlu S. Erişkin kök hücrelerin farklanmasındaki hücresel ve moleküler mekanizmalar. *Sağlıkta Birikim*, 2009;1(5):57-65.
- Can A. “Niche” concept and the hematopoietic stem cell niches. *Turk J Hematol* 2007;(24):95-101.
- Can A. Kök hücre tanımları.  i ek Bil F, Editör, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 1. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2009;15-22.

- Can A. Mezenkimal kök hücrenin kökeni ve gelişimi. I. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, Samsun, Özet kitabı, 2010;15-16.
- Caplan A. Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. *J Pathol.* 2009;217(2):318-24.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25(11):2739-49.
- Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol.* 2007;204(1):443-53.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, Lu M, Zhu Z, Chopp M. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res.* 2003;92(6):692-699.
- Chen X, Wang XD, Chen G, Lin WW, Yao J, Gu XS. Study of in-vivo differentiation of rat bone marrow stromal cells into Schwann cell-like cells. *Microsurgery.* 2006;26(2):111-115.
- Cheng FC, Tai MH, Sheu ML, Chen CJ, Yang DY, Su HL, Ho SP, Lai SZ, Pan HC. Enhancement of regeneration with glia cell line-derived neurotrophic factor-transduced human amniotic fluid mesenchymal stem cells after sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg.* 2010;112(4):868-879.
- Cheung LP, Leung HY, Bongso A. Effect of supplementation of leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor on murine embryonic development in vitro, implantation and outcome of offspring. *Fertil Steril.* 2003;80 Suppl 2:727-735.

- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-72.
- Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response transfer donor labels to host neurons glia. *Stem Cells*. 2006;24(11):2483-2492.
- Çamurdanoğlu BZ, Kansu E. Erişkin ve hematopoietik kök hücreler. Çiçek Bil F, Editör, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 1. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2009;41-52.
- Çetiner M. Hücresel tedaviler tarihi ve Süreyya Tahsin Aygün. II. Ulusal Kök Hücre Kongresi, Trabzon, Özet kitabı, 2006;29–33.
- Çetinkaya DU. Mezenkimal kök hücreler. Çiçek Bil F, Editör, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 1. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2009a;53-62.
- Çetinkaya DU. Mezenkimal kök hücrelerin klinikte kullanımı. Çiçek Bil F, Editör, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 1. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2009b;99-104.
- Çifci M, Demir A, Demirtaş Y, Ayas B. Kültüre kemik iliği kök hücrelerinin uç-ıçe onarılmış periferik sinir rejenerasyonundaki etkisi. *Turk Plast Surg* 2010;18(1):15-18.
- Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003;398-418.
- De Bari C, Pringle S, Pitzalis C, Dell'Accio F. Kök hücre nişi: Tıpta yeni bir hedef. *Current Opinion in Orthopaedics Turkish Edition*. 2006;1(4):189-197.

- Deda H. Nörolojik Hastalıklarda Kök Hücre Tedavileri. *Sinir Sistemi Cerrahisi Derg* 2008;1(3):142-152.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982;77(3):634-643.
- Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci*. 2001;14(11):1771-1776.
- di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(9):1544-52.
- 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.
- Elçin YM. Embriyonik kök hücreler. Çiçek Bil F, Editör, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 1. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2009;23-28.
- Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*. 1969;221(5181):632-635.
- Erbilici A, Ünlu E, Şirin YS, Besaltı Ö, Cakıcı A. The effects of Ga-As (904 nm) laser irradiation on injured sciatic nerves of rats. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. 2010;1(3):23-27.
- Evans GRD. Peripheral nerve injury: Review and approach to tissueengineered constructs. *Anat Rec*. 2001;263(4):396-404.

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse Embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
- Fındıklı N. İnsan Embriyonik Kök Hücresi. Erişkin kök hücrelerin farklılaşmasındaki hücrel ve moleküler mekanizmalar. *Sağlıkta Birikim*, 2009;1(5):45-56.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-274.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(25):11879-11883.
- Galmiche MC, Koteliansky VE, Brière J, Hervé P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 1993;82(1):66-76.
- Güneş AM. Kök hücre plastisitesi ve tıptaki kullanım alanları. *Güncel Pediatri*. 2005;3(1):36-42.
- Hess DC, Borlongan CV. Stem cell and neurological diseases. *Cell Prolif*. 2008;41 Suppl 1:94-114.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(13):8932-8937.

- Ise H, Nikaido T, Negishi N, Sugihara N, Suzuki F, Akaike T, Ikeda U. Effective hepatocyte transplantation using rat hepatocytes with low asialoglycoprotein receptor expression. *Am J Pathol.* 2004;165(2):501-510.
- İnan S, Özbilgin K. Kök hücre biyolojisi. *Sağlıkta Birikim.* 2009;1(5):11-23.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult bone marrow. *Nature.* 2002;418(6893):41-49.
- Kalbermatten DF, Pettersson J, Kingham PJ, Pierer G, Wiberg M, Terenghi G. New fibrin conduit for peripheral nerve repair. *J Reconstr Microsurg.* 2009;(1):27-33.
- Kansu E. Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2005;36:191-197.
- Kansu E. Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. IV. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Bursa, Konuşma metinleri, 2007;1-7.
- Kantarcıoğlu M, Bağcı S. Gastroenterolojik hastalıklarda mezankimal kök hücre kullanımı. *Türk Hematoloji Derneği Mezenkimal Kök Hücre Kursu (teorik), İzmir, Kurs kitabı, 2008;24-25.*
- Karaöz E. Embriyonik kök hücre: Temel prensipler ve mevcut deneysel yaklaşımlar. II. *Ulusal Kök Hücre Kongresi, Trabzon, Özet kitabı, 2006;69-76.*
- Karaöz E. Erişkin kök hücre plastisitesi sanılanlar ve gerçekler. *Sağlıkta Birikim.* 2009;1(5):81-142.

- Karaöz E. Kök hücre biyolojisi I. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Kocaeli, Kurs kitabı, 2010a;2-10.
- Karaöz E. Kök hücre biyolojisi II ve plastisitesi. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Kocaeli, Kurs kitabı, 2010b;35-36.
- Karaöz E. Stromal (Mezenkimal) kök hücreler. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Kocaeli, Kurs kitabı, 2010c;58-89.
- Karaöz E. Mezenkimal kök hücre ve immunosupresyon. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Kocaeli, Kurs kitabı, 2010d;90-94.
- Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler. 1. Baskı, Trabzon, Derya Kitabevi. 2004
- Keilhoff G, Goihl A, Langnäse K, Fansa H, Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(1):11-24.
- Keilhoff G, Stang F, Goihl A, Wolf G, Fansa H. Transdifferentiated mesenchymal stem cells as alternative therapy in supporting nerve regeneration and myelination. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(7-8):1235-1252.
- Kılıç E, Tezcaner A, Uçkan D. Kalıtsal hastalıklarda mezenkimal kök hücre. II. Ulusal Kök Hücre Kongresi, Trabzon, Özet kitabı, 2006;171-172.
- Klimaschewski L. Intrinsic neuronal mechanisms of axonal regeneration by adult sensory neurons. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Bodrum, Özet kitabı. 2009;27.
- Kocsis JD, Akiyama Y, Lankford KL, Radtke C. Cell transplantation of peripheral-myelin-forming cells to repair the injured spinal cord. *J Rehabil Res Dev.* 2002;39(2):287-98.

- Koç O, Lazarus HM. Mesenchymal Stem Cells: Heading into The Clinic. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(3):235-239.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;14;96(19):10711-10716.
- Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development.* 2001;128(24):5181-5188.
- Kömürcü M, Özkan H. Mezenkimal kök hücre ve ortopedide kullanımı. *TOTBİD Dergisi.* 2006;5(3-4):130-139.
- Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.* 2007;262(5):509-525.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O; Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371(9624):1579-1586.
- Liu J, Farmer SR. Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. *J Biol Chem.* 2004;279(43):45020-45027.

- Loeffler M, Roeder I. Tissue stem cells: Definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models—a conceptual approach. *Cells Tissues Organs*. 2002;171(1):8-26.
- Makwana M, Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J*. 2005;272(11):2628-2638.
- Martin GR. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(12):7634-7638.
- Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(4):1441-1445.
- Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, Fujiyoshi Y, Heike T, Nakahata T, Akutsu H, Umezawa A, Harigae H, Kira J, Dezawa M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(9):973-85.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(6):507-520.
- Mizuta H, Kudo S, Nakamura E, Otsuka Y, Takagi K, Hiraki Y. Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(7):586-596.
- Muñoz-Eliás G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, neuronal differentiation: stem cell precursor functions. *Stem Cells*. 2003;21(4):437-448.

- Muraglia A, Corsi A, Riminucci M, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Bianco P, Quarto R. Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 14):2949-2955.
- Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res.* 2003;974(1-2):17-24.
- Ohori Y, Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Yamamoto N, Nakamura K, Nakafuku M. Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *J Neurosci.* 2006;26(46):11948-60.
- Oliveira AA, Jr. Hodges HM. Alzheimer's disease and neural transplantation as prospective cell therapy. *Curr Alzheimer Res.* 2005;2(1):79-95.
- O'Shea KS. Self-renewal vs differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 2004;71(6):1755-1765.
- Ovalı E. Mezenkimal kök hücre kaynakları ve üretimi. *Türk Hematoloji Derneği Mezenkimal Kök Hücre Kursu (teorik), İzmir, Kurs kitabı, 2008a;7-10.*
- Ovalı E. Mezenkimal kök hücrelerle laboratuardan kliniğe. *V.Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Antalya, Konuşma metinleri, 2008b;73-77.*
- Öktem G, Altay AB. Erkek genital sisteminde kök hücre ve kök hücrenin kaynakları. *Türk Üroloji Dergisi - Turkish Journal of Urology* 2009;35(3):219-233.

- Öz Atalay F, Üstün H. Periferik sinir sisteminde nöronal dejenerasyon, rejenerasyon ve nörodejeneratif hastalıklarda yeni tedavi modaliteleri. *Fiziksel Tıp* 2004;7(3):157-162.
- Pan HC, Chen CJ, Cheng FC, Ho SP, Liu MJ, Hwang SM, Chang MH, Wang YC. Combination of G-CSF administration and human amniotic fluid mesenchymal stem cell transplantation promotes peripheral nerve regeneration. *Neurochem Res.* 2009;34(3):518-527.
- Pan HC, Cheng FC, Chen CJ, Lai SZ, Lee CW, Yang DY, Chang MH, Ho SP. Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci.* 2007;14(11):1089-1098.
- Pan HC, 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):570-575.
- Park HC, Shim YS, Ha Y, Yoon SH, Park SR, Choi BH, Park HS. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Tissue Eng.* 2005;11(5-6):913-922.
- Petersen BE, Terada N. Stem cells: a journey into a new frontier. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(8):1773-1780.
- Pınarlı F. Sıçan kemik iliği mezenkimal kök Hücrelerin insan amnion membranı ile kornea yanık tedavisinde kullanımı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Doktora Tezi, 2009;1-32.
- Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulson R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol.* 2003;56(2):86-96.

- Quan D, Bird S. Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nerve injuries. *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal*. 1999;12:45–51.
- Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF. The chiaroscuro stem cell: A unified stem cell theory. *Blood*. 2002;100(13):4266-4271.
- Radtke C, Schmitz B, Spies M, Kocsis JD, Vogt PM. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27(8):817-823.
- Radtke C, Vogt PM. Peripheral Nerve Regeneration: A current perspective. *Eplasty*. 2009;9:434-442.
- Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogenic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005;2:8.
- Seddon HJ. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J*. 1942;29;2(4260):237-239.
- Sencar L. Deneysel siyatik sinir yaralanmasında betametazon ve sinir büyüme faktörünün sinir rejenerasyonuna ultrastrüktürel etkileri. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, Yüksek Lisans Tezi, 2007;3-11.
- Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: State of the art. *Semin Reprod Med*. 2006;24(5):379-388.
- Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(4):915-920.
- Shirley D, Marsh D, Jordan G, McQuaid S, Li G. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J Orthop Res*. 2005;23(5):1013-1021.

- Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:435-462.
- Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain.* 1951;74(4):491-516.
- Şahin F. Mezenkimal Kök Hücre Üretiminde Sorunlar ve Çözümleri. II. Ulusal Kök Hücre Kongresi, Trabzon, Özet kitabı, 2006;55–59.
- Şahin G, Kırık D. Parkinson hastalığında hücre tedavisinin bilimsel temelleri ve güncel uygulamalar. Çiçek Bil F, Editör, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 1. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2009;87–92.
- Tanaka M, Itoh T, Tanimizu N, Miyajima A. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J Biochem.* 2011;149(3):231-239.
- Tatebe M, Nakamura R, Kagami H, Okada K, Ueda M. Differentiation of transplanted mesenchymal stem cells in a large osteochondral defect in rabbit. *Cytherapy.* 2005;7(6):520-530.
- Temple S, Alvarez-Buylla A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9(1):135-141.
- Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194 (Pt 1):1-14.
- Tetik C, Erol B, Abukoğlu C, Ünsal M. Sıçan siyatik sinir modelinde fonksiyonel değerlendirme yöntemlerinin yeni bir sistemle karşılaştırılması. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2000;34:523-527.
- The National Institutes of Health resource for stem cell research. *Stem Cell Information.* <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter4.asp> 2011.

- 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;282(5391):1145-1147.
- Tirelioğlu S. Motor sinir defektlerinin onarımında duyuşal sinir köprüşü kullanımı, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bursa, Uzmanlık Tezi, 2005;2-10.
- Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2004;362(3):200-203.
- Topuz AK, Eroğlu A, Atabey C, Göçmen S, Kutlay M, Demircan MN. (2011). Periferik sinir yaralanmalarında geç dönem cerrahi tedavi sonuçlarımız. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 2011;21(1):8-13.
- Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):32-45.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves Ncadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem*. 2003;278(42):41227-41236.
- Türköz GS. Hematolojik hastalıklarda mezenkimal kök hücre. *Türk Hematoloji Derneği Mezenkimal Kök Hücre Kursu (teorik)*, İzmir, Kurs kitabı, 2008;17-20.
- Türkşen K. İnsan embriyonik kök hücreleri izolasyon, idame ve farklılaşma (diferansiyasyon). *Türk Hematoloji Derneği 9. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, Konuşma metinleri*, 2006;9-15.

- Uçkan ÇD. Mezenkimal Kök Hücreler: Nerede? Ne Zaman? 4. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Bursa, Konuşma metinleri, 2007;8-14.
- Uçkan D. Mezenkimal kök hücrelerin klinikte kullanımı. Çiçek Bil F, Editör, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 1. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2009;99.
- Ural AU. Hematopoietik kök hücre. II. Ulusal Kök Hücre Kongresi, Trabzon, Özet kitabı, 2006a;49-54.
- Ural AU. Kök hücreler. TOTBİD Dergisi, 2006b;5(3-4):140-145.
- Ural AU. Mezenkimal kök hücreler. I. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, Nevşehir, Kongre kitabı, 2009;22-30.
- Ural AU. Osteoblastlar ve hematopoietik yuva. XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, Kongre kitabı, 2010;54-55.
- Ünal A. Hematopoietik kök hücre. I. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, Nevşehir, Kongre kitabı, 2009;15-21.
- Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. J Neurosci Methods. 2001;108(1):1-9.
- Vatansever HS. Embriyonik Kök Hücreler. Sağlıkta Birikim. 2009;1(5):25-44.
- Verfaillie CM, Pera MF, Landsdorp PM. Stem cells: Hype and reality. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2002;369-391.
- Verfaillie C. Pluripotent stem cells. Transfus Clin Biol. 2009;16(2):65-69.

- Wang J, Ding F, Gu Y, Liu J, Gu X. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. *Brain Res.* 2009;1262:7-15.
- Wilson A, Trumpp A. Bone- Marrow Hematopoietic Stem Cell Niches. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(2):93-106.
- Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin- positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells.* 2005;23(3):392-402.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;61(4):364-370.
- Wurmser AE, Gage FH. Stem cells: Cell fusion causes confusion. *Nature.* 2002;416(6880):485-487.
- Yamada Y, Yokoyama S, Wang XD, Fukuda N, Takakura N. Cardiac stem cells in brown adipose tissue express CD133 and induce bone marrow non-hematopoietic cells to differentiate into cardiomyocytes. *Stem Cells.* 2007;25(5):1326-1333.
- Yılmaz M. Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması ve fenotipik özellikleri. *Türk Hematoloji Derneği Mezenkimal Kök Hücre Kursu (teorik), İzmir, Kurs kitabı,* 2008;11-13.
- Zhang P, He X, Liu K, Zhao F, Fu Z, Zhang D, Zhang Q, Jiang B. Bone marrow stromal cells differentiated into functional Schwann cells in injured rats sciatic nerve. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2004;32(4):509-518.
- Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, Turlo KA, Yang Y, Becker MS, Zanetta L, Dejana E, Gasson JC, Tallquist MD, Iruela-Arispe ML. Fate tracing reveals

the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*.
2008;3(6):625-636.

VIII. EKLER

VIII. A. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Raporu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : HADYEK/14
Konu : Araştırma projeniz hk.

02/03/2009

Prof. Dr. Gülsen ÖKTEN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

2009/12 numaralı “Sıçan sıyatik Sinir Zedelenmesinde Farklı Zamanlarda Mezenşimal Kök Hücre Uygulama Etkilerinin Karşılaştırılması.” konu başlıklı Projeniz; Hayvan Etik Kurulu’nun 02.03.2009 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılar ait olmak kaydıyla 6 aylık Rapor verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.


Prof. Dr. Feriŕat KOLBAKIR
Hayvan Etik Kurulu Baŕkanı .V

IX. ÖZGEÇMİŞ

17.06.1969 tarihinde Rize’de doğdu.

- İlkokulu, Rize Kurtuluş İlkokulunda
- Ortaokulu, Rize Merkez Ortaokulunda okudu.
- 1986 yılında Rize Lisesinden mezun oldu.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp fakültesini 1994 yılında bitirdi.

- 1994-1995 yılları arasında Samsun Mehmet Aydın Devlet Hastanesi Acil servisinde çalıştı.
- 1995-1996 yıllarında askerliğini Muş’ta yaptı.
- 1996-1998 yıllarında Çayırkent Sağlık Ocağında çalıştı.
- 1998-2003 yılları arasında Samsun Mehmet Aydın Devlet Hastanesi Acil servisinde çalıştı.
- 2003 aralık-2004 nisan tarihleri arasında Almanya’da Bremen Diako Hastanesi Cerrahi Bölümünde “Misafir hekim” olarak çalıştı.
- 2004-2011 yılları arasında Samsun Mehmet Aydın Devlet Hastanesi Acil servisinde çalıştı.
- 2011 yılı temmuz ayından itibaren Özel Atasam Hastanesi Acil Servisinde çalışmaktadır.

Evli, biri kız biri erkek iki çocuğu vardır. Orta derecede Almanca bilmektedir.

