

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK(TIP) DOKTORA PROGRAMI

ELEKTRİKSEL STİMÜLASYON VE SCHWANN-BENZERİ
HÜCRELERİN PERİFERİK SİNİR HASARINA ETKİLERİ

MAHMUT ALP KILIÇ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-17066 proje numarası ve Yükseköğretim Kurulu Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ÖYP 14004 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

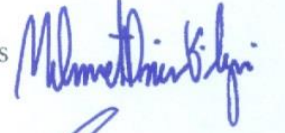
KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Biyofizik Programı çerçevesinde Mahmut Alp KILIÇ tarafından hazırlanan “ELEKTRİKSEL STİMÜLASYON VE SCHWANN-BENZERİ HÜCRELERİN PERİFERİK SİNİR HASARINA ETKİLERİ” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/08/2020

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN

Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Gökhan CESUR

Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Murat PEHLİVAN

Ege Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Birsen AYDEMİR

Sakarya Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Gör. Özlem BOZKURT GİRİT

Aydın Adnan Menderes,
Üniversitesi



ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN'e,

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY'e,

İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Gamze TANRIVERDİ'ye

Adnan Menderes Üniversitesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına,

Anabilim Dalımızdan çalışma arkadaşlarım Araş.Gör. Ergün Cem KÖKEN, Araş.Gör. Didem BAKAY İLHAN bütün öğretim üyelerine, tüm çalışanlarına ve arkadaşlarıma.

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği Bilimsel Araştırmalar Projesi aracılığıyla sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne, Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline ve bugünlere ulaşmamda katkıda bulunan herkese,

Yaşantımın her döneminde destekleriyle yanımda olan aileme,

Teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-------------------------------------|
| KABUL VE ONAY SAYFASI | Error! Bookmark not defined. |
| TEŞEKKÜR..... | i |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ..... | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vii |
| RESİMLER DİZİNİ | ix |
| TABLolar DİZİNİ..... | x |
| ÖZET | xii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Sinir Sistemi..... | 4 |
| 2.2. Sinir Sistemini Oluşturan Hücre Tipler | 5 |
| 2.2.1. Nöronlar | 5 |
| 2.2.2. Nöroglial Hücreler | 8 |
| 2.3. Periferik Sinir Sistemi..... | 11 |
| 2.3.1. Periferik Sinir Demetlerinin Anatomik Yapısı | 11 |
| 2.3.2. Periferik Sinir Yaralanmaları | 13 |
| 2.3.3. Periferik Sinirde Rejenerasyon | 14 |
| 2.3.4. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması | 16 |
| 2.4. Periferik Sinir Yaralanmalarının Tedavisi | 18 |
| 2.5. Periferik Sinir Tedavisinde Biyofiziksel Metotların Kullanılması | 19 |
| 2.5.1. Ultrases | 19 |
| 2.5.2. Lazer | 20 |
| 2.5.3. Elektromanyetik Alanlar | 21 |
| 2.5.4. Elektrik Akımı | 21 |
| 2.6. Kök Hücreler..... | 23 |
| 2.6.1. Embriyonik Kök Hücreler | 23 |
| 2.6.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre | 24 |
| 2.6.3. Mezenkimal Kök Hücreler..... | 25 |
| 2.7. Schwann-Benzeri Hücreler | 26 |
| 2.8. Hücre Transplantasyonu | 28 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.1. Gereç..... | 30 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasallar | 30 |
| 3.1.2. Kullanılan Cihazlar | 31 |
| 3.2. Yöntem..... | 32 |
| 3.2.1. Hücre Kültürü | 32 |
| 3.3.1. In vivo Uygulamalar | 39 |
| 3.4. Histolojik İnceleme..... | 46 |
| 3.5. İstatistiksel Analiz..... | 47 |
| 4. BULGULAR..... | 48 |
| 4.1. Hücre Kültürü | 48 |
| 4.1.1. Adipoz Kök Hücrelerin Akış Sitometri Metodu ile Tayini | 48 |
| 4.1.2. Schwann Benzeri Hücrelerin RT-PCR Metodu ile Tayini | 49 |
| 4.1.3. Proliferasyon | 49 |
| 4.1.4. Morfolojik İnceleme | 51 |
| 4.2. Hayvan Deneyleri | 52 |
| 4.2.1. Sürekli Nöroma Modeli | 52 |
| 4.2.2. Siyatik Sinire Hücre Ekimi | 53 |
| 4.2.3. Siyatik Fonksiyon İndeksi | 55 |
| 4.2.4. Islak Kas Ağırlığı..... | 58 |
| 4.2.5. Elektrofizyolojik Ölçümler | 59 |
| 4.3. Miyelin Kalınlığı ve Akson Yarıçapı..... | 61 |
| 5. TARTIŞMA | 66 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER | 74 |
| KAYNAKLAR | 75 |
| EKLER | 85 |
| ÖZGEÇMİŞ | 86 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------------|---|
| DMSO | :Dimetil Sülfoksit |
| DRG | :Dorsal Kök Ganglia |
| EKH | : Embriyonik Kök Hücre |
| FGF | :Fibroblast Growth Factor |
| FSK | :Forsokolin |
| GDNF | :Glial Hücre Kaynaklı Nörotrofik Faktör |
| GFAP | :Glial Fibriler Asidik Protein |
| GGF | :Glial Büyüme Faktörü |
| HBSS | :Hank's Balanced Salt Solution |
| ISCT | :International Society for Cell & Gene Therapy |
| İPKH | :İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre |
| MKH | :Mezenkimal Kök Hücre |
| MSS | :Merkezi Sinir Sistemi |
| NGF | :Sinir Büyüme Faktörü |
| P3HB | :Poly(3-hydroxybutyrate) |
| P75 | :Düşük Afiniteli Sinir Büyüme Faktörü Reseptörü |
| PDGF | :Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü |
| PHBV | :Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) |
| PLA | :Poly(L-Lactide) |
| PLLA | :Poly (l-lactic acid) |

| | |
|---------------|--|
| PSS | :Periferik Sinir Sistemi |
| RT-PCR | :Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |
| SVF | :Stromal Vasküler Fraksiyon |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Sinir sistemi yapısının şematik gösterimi. | 4 |
| Şekil 2. Nöronal iletimin şematik görünümü. Hyperphysics (2020)..... | 6 |
| Şekil 3. Nöron iletiminde depolarirasyon-repolarizasyon döngüsü. Hyperphysics (2020) | 6 |
| Şekil 4. Sinir iletimine miyelin kılıfın etkisi. | 7 |
| Şekil 5. Sinir demetinin görünümü. (Ilfeld ve ark, 2016) | 12 |
| Şekil 6. Wallerian Dejenerasyon. Hyperphysics (2020) | 15 |
| Şekil 7. Sunderland Sınıflandırmasına göre periferik sinir hasarı..... | 17 |
| Şekil 8. Mezenkimal kök hücreler (Steel ve ark, 2016) | 26 |
| Şekil 9. Farklılaşma protokolünün şematik gösterimi..... | 34 |
| Şekil 10. Örneklere ait nanodrop okumları, u1; adipoz 1, u2;adipoz 2, d1;schwann benzeri 1, d2; schwann benzeri | 36 |
| Şekil 11. cDNA sentezinde kullanılan termal cycler programı..... | 38 |
| Şekil 12. Deneylede kullanılan RT-PCR programı..... | 39 |
| Şekil 13. Siyatik fonksiyon indeksi uygulamasında parmak aralıklarının belirlenmesi ve hesaplamada kullanılan formül (Monte-Raso ve ark, 2008). | 45 |
| Şekil 14. Akış sitometri metodu ile incelenen hücre yüzey işaretçilerinin popülasyon yüzdeleri. | 48 |
| Şekil 15. Schwann-benzeri hücrelerde s100, NGF ve P75 genlerine kat değişim değerleri.* işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05). | 49 |
| Şekil 16. MTT absorbans değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması. .* işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05)..... | 50 |
| Şekil 17. Hürelere ait en/boy oranları ve yarıçap değerlerinin grafiksel görünümü. .* işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05). | 52 |
| Şekil 18.Haftalık siyatik fonksiyon indeks skoları. Skorun 0'a yaklaşması iyileşmeyi gösterir. | 56 |
| Şekil 19. Islak kas ağırlıklarının gruplar arasındaki görünümü. * işareti H vs S ve H vs S+E , + işareti H+E vs S+E grupları arasında istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05). | 58 |

| | |
|--|----|
| Şekil 20. Gruplara ait aksiyon potansiyeli kayıtlarından örnekler. (a)kontrol, (b) hasar, (c) hasar + elektrik, (d) adipoz kök hücre, (e) adipoz kök hücre + elektrik, (f) schwann benzeri hücre, (g) shcwann benzeri hücre + elektrik. (3mV ve 50 ms çözünürlük) | 59 |
| Şekil 21. Siyatik sinir ileti hızı (sol) proksimal/distal latans oranları (sağ) * işareti H ile , α ise işareti H+E grupları arasında istatistik anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). | 60 |
| Şekil 22. Gruplar arasında akson yarıçapı (sol) ve miyelin kılıf kalınlığının karşılaştırması (sağ) * işareti H ile , α ise işareti H+E, β ise A grupları arasında istatistik anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0,05$). | 63 |

RESİMLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Resim 1. Adipoz kök hücre izolasyonunda mekanik ve kimyasal parçalama işlemleri. | 32 |
| Resim 2. Doku homejenatının filtre edilmesinin ardından stromal vasküler fraksiyonun eldesi. | 33 |
| Resim 3. Nöroma modelinin oluşturulması. Sinir 0,5 N kuvvetle gerildi (sol) ardından malleus pensi ile iki noktadan hasarlandı. | 42 |
| Resim 4. Elektriksel stimülasyon uygulaması. | 43 |
| Resim 5. Siyatik sinire hücre enjeksiyonu..... | 44 |
| Resim 6. Schwann-benzeri hücreler (sol), adipoz kök hücleri (sağ)..... | 51 |
| Resim 7. Sürekli nöroma modelinin oluşturulması, (a) siyatik sinir 0,5 N şiddetinde kuvvet ile gerildi, (b) malleus pensi ile siyatik sinir iki farklı bölgeden sıkıştırıldı, (c) iki farklı bölgede sinir hasarı görsel olarak tespit edildikten sonra deneyler için gerekli işlemlere devam edildi. | 53 |
| Resim 8. PKH26 boyalı adipoz kök hücrelerin enjeksiyon bölgesinde tutunumları (1. Gün).53 | |
| Resim 9. PKH26 boyalı adipoz kök hücrelerin (sol) ve schwann benzeri hücrelerin (sağ) enjeksiyon bölgesindeki görünümleri (1. Hafta) | 54 |
| Resim 10. Gruplara ait Toludine mavisi ile boyalı siyatik sinir örnekleri (a) kontrol, (b) hasar, (c) elektriksel stimülasyon, (d) adipoz kök hücre gruplarına aittir. Kırmızı oklar miyelin kılıfları gösterirken, * işareti miyelin kılıfı oluşturan veya serbest haldeki schwann hücre çekirdeklerini göstermektedir. | 64 |
| Resim 11. Gruplara ait Toludine mavisi ile boyalı siyatik sinir örnekleri (e) adipoz + elektrik, (f) schwann-benzeri hücre, (g) schwann-benzeri hücre + elektrik gruplarına aittir. Kırmızı oklar miyelin kılıfları gösterirken, * işareti miyelin kılıfı oluşturan veya serbest haldeki schwann hücre çekirdeklerini göstermektedir. | 65 |

TABLolar DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Nöroglial hücrelerin işlevleri ve lokasyonları. | 8 |
| Tablo 2. Sinir yaralanmalarının Sunderland ve Seddon'a göre sınıflandırılmaları. | 17 |
| Tablo 3. Kök hücrelerde bulunması ve bulunmaması gereken yüzey işaretçileri | 25 |
| Tablo 4. Schwann hücrelerinin farklı aşmalarında eksprese edilen genler | 27 |
| Tablo 5. Deneylerde kullanılan kimyasalların listesi. | 30 |
| Tablo 6. Deneylerde kullanılan cihazların listesi. | 31 |
| Tablo 7. cDNA sentezi öncesi alınan örnek miktarlar ve reaksiyon karışımı. | 37 |
| Tablo 8. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon karışımı. | 37 |
| Tablo 9. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri. | 38 |
| Tablo 10. Her bir kuyuda kullanılan reaksiyon karışımının içeriği | 39 |
| Tablo 11. Schwann-benzeri kök hücrelerde tespit edilen s100, NGF ve P75 fold-change değerleri. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. * işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$). | 49 |
| Tablo 12. Hücre popülasyonlarının sahip belirlenen günlerde sahip oldukları absorbans değerleri. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. * işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$). | 50 |
| Tablo 13. Morfolojik incelemelere ait değerlerine ait aritmetik ortalama, ortalamanın standart hatası. En/boy oranı (sol) ve tripsinize hücre yarıçapı (sağ). Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. * işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$). | 51 |
| Tablo 14. Sürekli nöroma modeline ait CMAP ve sinir ileti hızı değerlerinin sağlıklı sinir ile karşılaştırılması. | 52 |
| Tablo 15. 1. Haftanın sonunda ekilen hücreler tarafından yayılan floresans yoğunluğu | 54 |
| Tablo 16. Gruplara ait haftalık siyatik fonksiyon indeks skoları | 57 |
| Tablo 17. Deney gruplarına ait ıslak kas ağırlıklarına ait aritmetik ortalama, ortalamanın standart hatası | 58 |
| Tablo 18. Deney gruplarına ait sinir ileti hızlarının (m/sn) aritmetik ortalama, ortalamanın standart hataları. (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$). | 60 |

Tablo 19. Deney gruplarına ait CMAP verilerinin P/D oranlarına ait aritmetik ortalama, ortalamanın standart hatası.61

ÖZET

ELEKTRİKSEL STİMÜLASYON VE SCHWANN-BENZERİ HÜCRELERİN PERİFERİK SİNİR HASARINA ETKİLERİ

Kılıç M.A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Schwann-benzeri hücreler, *in vitro* ortamda kök hücrelerin farklılaştırılması ile elde edilen, morfolojik ve genetik açıdan gerçek schwann hücrelerine ait özellikleri sınırlı olarak gösteren hücrelerdir. Gerçek schwann hücrelerinin *in vitro* ortamda düşük proliferasyon göstermesi ve elde edilmesinin önündeki etik problemler sebebiyle terapötik amaçla kullanılmak üzere üretilmektedirler.

Çalışmamızda 20 Hz frekansında düşük şiddetli elektrik akımı ve schwann-benzeri hücrelerin periferik sinir hasarı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla 6'şar wistar-albino sıçandan oluşan 7 deney grubu kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında sıçan adipoz dokusundan elde edilen kök hücrelere farklılaştırma protokolü uygulanarak schwann-benzeri fenotip kazanmaları sağlanmıştır. Elde edilen hücre fenotipi *in vitro* ortamda yapılan morfolojik inceleme ve RT-PCR analizleri ile teyit edilmiştir. Ardından sham grubu dışında bütün sıçanlarda siyatik sinir hasarı oluşturularak sırayla sinir hasarı, elektriksel stimülasyon, adipoz kök hücre, adipoz kök hücre + elektriksel stimülasyon, schwann-benzeri hücre ve schwann-benzeri hücre + elektriksel stimülasyon uygulamaları yapılmıştır. Hayvan deneylerin başlamasının ardından 6 haftalık periyotta yapılan uygulamaların sinir hasarı üzerindeki olası olumlu etkileri haftalık siyatik fonksiyon indeksi (SFI) ve deney sonunda sinir ileti hızı, bileşik kas aksiyon potansiyeli, ıslak kas ağırlığı ve histolojik olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre tek başına elektriksel stimülasyon sinir ileti hızında sınırlı bir artış sağlamış olsa da adipoz kök hücre veya schwann benzeri kök hücrelerin ekimiyle daha başarılı olduğu bulunmuştur. Adipoz kök hücre ekimi ve elektriksel stimülasyonun kombine olarak kullanılmasıyla tek başına elektriksel stimülasyona oranla bir artış sağlanmış olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak aynı protkolde schwann benzeri hücrelerin kullanılmasıyla beraber sinir ileti hızlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Özellikle elektriksel stimülasyon ile birlikte sinir ileti hızında bulunan artış

yüksek derecede anlamlıdır. Yapılan histolojik incelemelerde ise schwann benzeri hücre ekimi ve elektriksel stimülasyonun kombine olarak kullanılması en kalın miyelin kılıf ve ortamala akson yarıçapı elde edilmesini sağlamıştır. Bu sonuçlara göre sinir iyileşmesinde hücre terapisi uygulamasının elektriksel stimülasyonun iyileşme kapasitesini arttırabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Schwann benzeri hücre, adipoz kök hücre, elektriksel stimülasyon, sinir hasarı.

ABSTRACT

EFFECTS OF ELECTRICAL STIMULATION AND SCHWANN-LIKE CELLS ON PERIPHERAL NERVE INJURY

Kılıç M.A. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute Biophysics Program, Doctoral Thesis, Aydın, 2020.

Schwann-like cells are cells that are obtained by differentiation of stem cells in vitro, showing limited morphologically and genetically genuine schwann cells. They are produced to be used for therapeutic purposes due to the low proliferation of real schwann cells in vitro and the ethical problems in their recovery.

In our study, the effects of low-intensity electric current at a frequency of 20 Hz and schwann-like cells on peripheral nerve damage were examined. For this purpose, 7 experimental groups consisting of 6 wistar-albino rats were used. In the first stage of the study, stem cells obtained from rat adipose tissue were provided with a schwann-like phenotype by applying differentiation protocol. The cell phenotype obtained was confirmed by in vitro morphological examination and RT-PCR analysis. Subsequently, sciatic nerve damage was created in all rats except the sham group, and nerve damage, electrical stimulation, adipose stem cell, adipose stem cell + electrical stimulation, schwann-like cell and schwann-like cell + electrical stimulation were performed sequentially. Possible positive effects of applications on nerve damage over a 6-week period after the initiation of animal experiments were evaluated weekly sciatic function index (SFI) and nerve conduction velocity, compound muscle action potential, wet muscle weight and histologically at the end of the experiment.

According to the results, although electrical stimulation alone provided a limited increase in nerve conduction velocity, it was found that it was more successful with the cultivation of adipose stem cells or schwann-like stem cells. Although an increase was achieved with the combined use of adipose stem cell transplantation and electrical stimulation compared to electrical stimulation alone, it was not statistically significant. However, the increase in nerve conduction velocities was found to be statistically significant with the use of schwann-like cells in the same protocol. Especially, the increase in nerve conduction velocity

with electrical stimulation is highly significant. In histological examinations, the combination of schwann-like cell cultivation and electrical stimulation provided the thickest myelin sheath and axon radius to the medium. According to these results, it has been shown that the application of cell therapy in nerve healing can increase the healing capacity of electrical stimulation.

Key Words: Schwann-like cells, adipose stem cells, electrical stimulation, nerve injury

1. GİRİŞ

Canlılarda çeşitli dokuların veya hücrelerin sahip olduğu elektriksel aktivite vücutta süregelen biyolojik fonksiyonların önemli bir parçasıdır. Günümüzde endojenik manyetik alanların veya elektriksel potansiyellerin canlı hücreler üzerinde aktif iyon transportunu etkileyebileceğini, intraselüler veya ekstraselüler hücre membranlarının geçirgenliğini değiştirebileceği bilinmektedir (Hille, 2001). İlk defa Foulds ve Barker (1983) tarafından insan vücudunun farklı bölgelerinde elektriksel aktivitenin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Epidermis tabakasını oluşturan bütün canlı hücrelerin membran potansiyellerinin toplamından oluşan transepitelyal potansiyelin yaralanma sonrasında bölgesel olarak düştüğü, iyileşme sürecinde ortaya çıkan iyon akımlarının hücreleri yara bölgesine doğru göç etmeye teşvik ettiği gösterilmiştir.

Dışarıdan uygulanan elektriksel stimülasyonun yara iyileşmesini olumlu yönde etkileyebileceğini rapor eden çalışmalar mevcuttur (Isseroff ve Dahle, 2012; Thakral ve ark, 2013). Benzer şekilde düşük frekanslı elektriksel stimülasyonun *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda nöral hücrelerin nörit uzama hızını arttırabildiği gösterilmiştir (Alexander ve ark, 2006; Greenebaum, 2015; Kumar ve ark, 2016; Purdy ve ark, 2015; Wood ve Willits, 2006). Elektriksel stimülasyonun, periferik sinir yaralanmalarında aksonu hasarlanan motor nöronların gövdesinde BDNF ve trkA ekspresyonlarını artırdığı rapor edilmiştir (Al-Majed ve ark, 2000). Gordon ve arkadaşları tarafından karpal tünel hastaları üzerinde yapılan çalışmada ameliyat sırasında ulnar sinire uygulanan 1 saatlik elektriksel stimülasyonun hastalarda aksonal rejenerasyonu hızlandırdığı ve sonuç olarak hedef kaslarda innervasyonun daha iyi olduğu tespit edilmiştir (Gordon ve ark, 2010).

Schwann hücreleri, sinirsel iletimdeki görevlerinin yanı sıra periferik sinir sisteminin sağlığı ve bakımından sorumlu glial hücrelerdir. Sinir hasarının oluşmasından itibaren, biyokimyasal sinyaller aracılığı ile çağırdıkları makrofajların hasarlı aksonları fagosite etmelerini sağlarlar. Böylece hasarlı aksonlar ortadan kaldırılırken rejenere olacak yeni akson uçları için uygun bir ortam sağlanmış olur (Armati ve Mathey, 2013). Schwann hücrelerinin yokluğunda hasar sonrası akson rejenerasyonunun tamamen durduğu ve iyileşmenin olmadığı

bilinmektedir (Dezawa ve ark, 1997; K R Jessen ve Mirsky, 2016a). Bu sebeple sinir yaralanmalarında kendiliğinden iyileşmenin mümkün olmadığı durumlarda schwann hücrelerinin terapötik kullanımı mantıklıdır. Ancak bu uygulamanın pratikte bir takım zorlukları mevcuttur. Schwann hücrelerinin izolasyonu için sağlıklı sinir liflerinin sakrifiye edilmesi gerekir, bu tıbben kabul edilemez. Ayrıca *in vitro* ortamda çoğalma hızları oldukça düşüktür. Sinir yaralanmalarında tedavinin ne kadar hızlı yapıldığı iyileşmenin ne ölçüde başarılı olacağını belirleyen en önemli faktörler arasındadır (E. Wang ve ark., 2017). Araştırmalar gerçek schwann hücreleri ile karşılaşılan bu problemleri, kök hücre uygulamaları yardımı ile aşmaya çalışmaktadır.

Mezenkimal kök hücreler, buldukları ortamda rejenerasyon/onarımdan sorumlu somatik erişkin hücrelerdir. Normal koşullarda vücutta belirli nişlerde (kemik iliği, periferik kan, merkezi sinir sistemi, diş, yağ dokusu vb) uyku halindedirler. Standart *in vitro* kültür ortamlarında mezenkimal kök hücreler fibroblast benzeri morfolojiye sahip, koloniler kurabilen ve kemik, kıkırdak, yağ ve nöral dokulara farklılaşabilen, plastik-adherent özellik gösterirler. Her bir mezenkimal kök hücre grubu intrinstik veya ekstrinstik sinyallerin etkisi altında belirli bir hücre türüne doğru farklılaşma gösterir. Sınırsız bölünme kapasiteleri, kendilerini yenileyebilmeleri ve farklılaşma potansiyelleri onları doku iyileşmesi ve rejeneratif uygulamaların en önemli araçlarından birisi haline getirmektedir. Kök hücreler kişiden elde edilme yerleri ve yöntemleri açısından üç gruba ayrılabilir. Bunlar sırasıyla mezenkimal kök hücreler (MKH), embriyonik kök hücreler (EKH), ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerdir (İPKH). (Horwitz ve ark, 2005).

Hücre kültür ortamında mezenkimal kök hücrelerin büyüme faktörlerinin bulunduğu kokteyller yardımı ile farklı hücre tiplerine dönüşmeleri mümkündür. Yapılan çalışmalarda farklı nişlerden elde edilen kök hücrelerin belirli hücre soylarına doğru farklılaşma potansiyelleri değişiklik göstermektedir. Örneğin, kemik iliği, adipoz, umbilikal kord, plasenta gibi farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin osteojenik, kondrojenik veya nörojenik farklılaşma sonrası spesifik hedef dokuya ait spesifik işaretçi miktarlarının farklı seviyelerde olduğu rapor edilmiştir (Al-nbaheen ve ark, 2013; Choudhery ve ark, 2013; El-Badawy ve ark, 2016; Heo ve ark, 2015).

Yaklaşık 20 yıldır kök hücrelerden schwann-benzeri hücreler üretilmektedir (Dezawa ve ark, 2001). Araştırmalar elde edilen schwann-benzeri hücrelerin tam olarak erişkin schwann hücre özelliği göstermese de NGF, BDNF, GDNF gibi nöral soya ait büyüme faktörleri

açısından zengin olduğunu ve *in vivo* denemeler de sinir hasarı tedavisinde Schwann-benzeri hücrelerin farklılaşmamış kök hücrelerden daha başarılı olduklarını göstermektedir (Fan ve ark, 2011; Fan ve ark, 2014a; Gao ve ark, 2014). Literatür incelendiğinde schwann-benzeri hücrelerin adipoz, kemik iliği veya dış kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden *in vitro* ortamda etkili şekilde elde edilebildiği ve bu schwann-benzeri hücrelerin periferik sinirleri destekleyebildiğini bildirilmiştir (Brohlin ve ark, 2009; Fu ve ark, 2016; Martens ve ark, 2014).

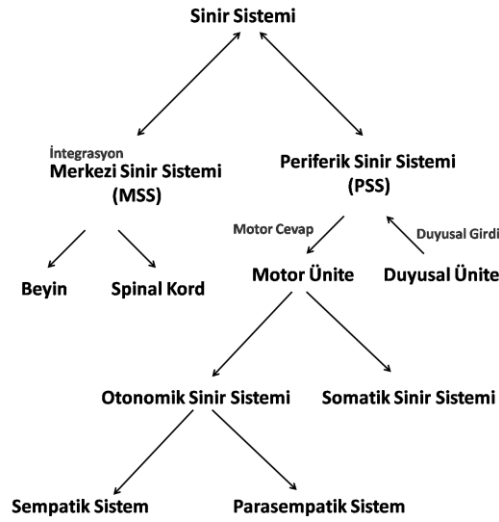
Kök hücre veya schwann-benzeri hücre terapisi ve elektrik stimülasyonunun sinir rejenerasyonu üzerindeki olumlu etkileri ayrı ayrı gösterilmiştir (Al-Majed ve ark, 2000; Fan ve ark, 2011; Gao ve ark, 2014a; Gordon ve ark, 2010). Literatür incelendiğinde elektrik akımı ve hücre terapilerinin kombine olarak kullandığı çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Du ve arkadaşları (2018) siyatik sinir kesi modelinde nöral krest kök hücreler ekili sinir kılavuzları ile elektriksel stimülasyonu birlikte uygulandığında histolojik olarak daha iyi sinir iyileşmesi ve yüksek ıslak kas ağırlığı rapor etmişti.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda sinir iyileşmesinde etkinliği ayrı ayrı gösterilmiş olan ancak hiç birlikte kullanılmamış olan elektriksel stimülasyon ve schwann-benzeri hücrelerin etkinliğinin birlikte ne ölçüde başarılı olabileceği araştırılmıştır. Çalışmamızda wistar-albino sıçan siyatik sinirlerinde nöroma hasar modeli oluşturuldu. Hasar modeli oluşturulan hayvanlarda 1 saat 20 Hz, 3V şiddetinde elektriksel stimülasyon, adipoz kök hücre ve schwann-benzeri hücrelerin etkileri ayrı ayrı ve birlikte uygulayarak incelendi. 6 haftalık iyileşme sürecinde deneklere ait haftalık siyatik fonksiyon indeksi (SFI) ölçüldü. Deney sonunda sinir iletim hızı, bileşik kas aksiyon potansiyeli, ıslak kas ağırlıkları ve sinir dokuları histolojik olarak değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, duyuşal ve motor fonksiyonlarının yanı sıra bilişsel süreçler de dahil olmak üzere geniş bir çalışma alanına sahip yüksek derece kompleks bir yapıdır. Kısaca duyuşal organlar aracılığı ile tespit edilen çevresel ve içsel değışikliklere ait verileri impulşlar halinde beyne ulaştırarak integrasyonundan ve uygun cevapların üretilmesinden sorumludur.



Şekil 1. Sinir sistemi yapısının şematik gösterimi.

Omurgalılarda beyin ve spinal kord merkezi sinir sistemini (MSS) oluştururken bunlar dışında kalan sinirler periferik sinir sistemini (PSS) oluşturmaktadır. PSS çevrede duyuşal organlarla toplanan bilgiyi spinal kord üzerinden beyne doğru taşıyan duyuşal lifler ve beynin oluşturduğu cevabı motor veya efektör organlara taşıyan motor liflerden meydana gelmektedir. Motor lifler kendi içerisinde istemli hareketi sağlayan somatik ve istem dışı hareketi yöneten otonomik lifler olmak üzere ikiye ayrılır. Otonomik lifler ise kendi içlerinde zıt çalışan sempatik ve parasempatik liflere ayrılır (Şekil 1.) (Guyton ve Hall, 2011; Waugh ve Grant, 2014).

Sinir sisteminin fonksiyonları maddeler halinde yazılacak olursa;

1. Vücutta meydana gelen bütün süreçlerin integrasyonu.

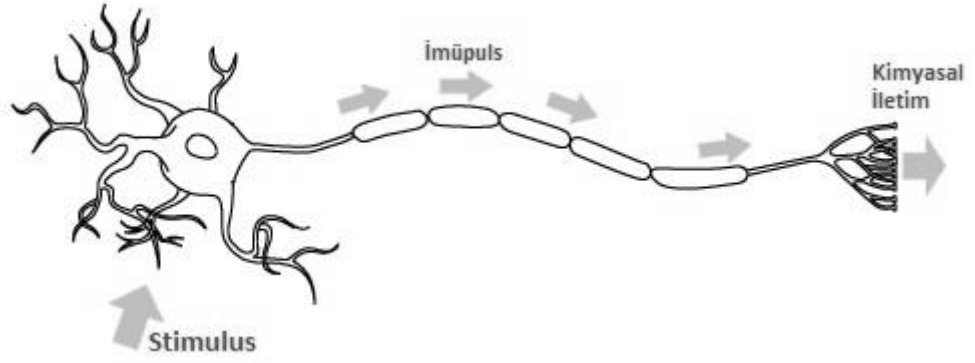
2. İstemli hareketin ve reflekslerin koordinesi.
3. İstemsiz hareketin ve reflekslerin koordinesi.
4. Uyarılara karşı cevap oluşturma.
5. Bilinç, düşünce, duygular, kişilik ve zihnin oluşumundan sorumludur.

2.2. Sinir Sistemini Oluşturan Hücre Tipler

2.2.1. Nöronlar

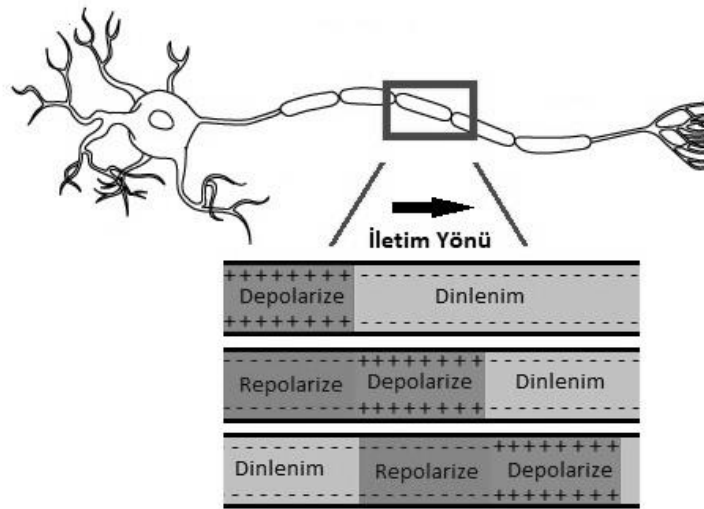
Sinir sisteminin en temel fonksiyonel hücreleridir. Nöronlar, duyuşsal organlar aracılığı ile alınan bilginin elektriksel sinyaller halinde MSS' ye taşınması, MSS tarafından oluşturulan cevabın efektör organlara taşınması ve beyindeki bütün bilişsel süreçten de sorumludurlar. Nöronlar bölünerek çoğalamazlar, fonksiyonlarını yerine getirebilmek için yüksek miktarda oksijen ve glikoza ihtiyaç duyarlar. Vücuttaki birçoğ hücre tipinden farklı olarak ATP sentezini sadece glikoz aracılığıyla yapabilirler.

Yapısal olarak incelendiğinde nükleus ve diğer önemli hücreşel organların büyük çoğunluğunun hücre gövdesinde (soma) toplandığı görölür. Hücre gövdesinden dışarı doğru uzanan, dentrit adı verilen birden fazla protoplazmik uzantıya sahiptir. Akson, hücre gövdesinden tek bir fiber formunda, dentritlere oranla çoğ daha uzun ve kalın olan membran uzantısıdır, bu yapı sinir iletimde elektriksel uyarının uzak mesafelere taşınmasından sorumludur. Aksonların uzunlukları ait oldukları sinir hücreşinin işlevine bağlı olarak birkaç santimetre veya 1 metreden daha uzun olabilmektedir.



Şekil 2. Nöronal iletimin şematik görünümü. Hyperphysics (2020)

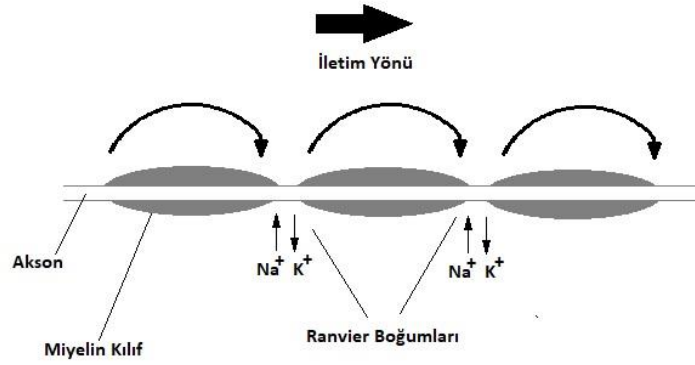
Nöron hücreleri sinir sisteminde aksiyon potansiyeli olarak isimlendirilen elektriksel impulsları üreten ve vücudun farklı bölgelerine iletebilen tek hücre tipidir. Bu impulslar endojenik veya eksojenik bir uyarana cevap olarak oluşurlar. Dinlenme durumunda hücre membranı boyunca intraselüler ve ekstraselüler ortamlarda iyon dağılımı polarizasyona sebep olacak şekildedir. İntraselüler ortamda potasyum (K^+) iyon konsantrasyonu yüksekken, ekstraselüler ortamda sodyum (Na^+) iyon konsantrasyonu yüksektir. Her iki iyon konsantrasyon gradyentleri gereği az olduğu ortama geçmek ister. Hücre uygun şekilde stimüle edildiğinde membranın bu iyonlara geçirgenliği artar ve sodyum kanallarının açılmasıyla bu iyon hücre içerisine girmeye başlayarak depolarizasyonu ve aksiyon potansiyelini başlatır.



Şekil 3. Nöron iletiminde depolarizasyon-repolarizasyon döngüsü. Hyperphysics (2020)

Aksiyon potansiyeli iletimi tek yönlü olarak gerçekleşir, depolarizasyonun ardından açılan potasyum kanalları vasıtasıyla potasyum iyonları hücre dışına doğru çıkar membran

potansiyeli dinlenme potansiyeli seviyesine düşer. Bu süreç refraktör periyod olarak isimlendirilir, hücre membranının refraktör dönemde olan bölgesinin tekrar stimüle edilmesi mümkün değildir. Hücre NA-K pompasının yardımı ile iyon konsantrasyonunu tekrar eski durumuna getirerek repolarize olur ve tekrar uyarılmaya hazır hale gelir. Miyelinli nöron aksonlarında miyelin kılıfın yalıtkan özelliği sayesinde iyon hareketi akson boyunca “ranvier boğumları” ismi verilen miyelinsiz bölgelerde gerçekleşir. Aksiyon potansiyelinin miyelin kılıf boyunca bir sonraki Ranvier boğumuna kadar ilerler ve bu noktada depolarizasyona sebep olur. İmpulsun bu şekilde iletimine “saltatorik akım” ismi verilir.



Şekil 4. Sinir iletimine miyelin kılıfın etkisi.

Nöronal iletimde, sinyaller akson gövdesi boyunca elektriksel olarak ilerlerken akson uçlarında kimyasal veya elektriksel olarak hedef hücreye ulaştırılır. Bir aksonun bir başka hücrenin dentriti veya hedef organ ile bir araya geldiği bölgeye sinaps ismi verilir. Sinapslar elektriksel sinapslar ve kimyasal sinapslar olmak üzere ikiye ayrılır.

Elektriksel Sinapslar; presinaptik ve postsinaptik hücreler arası mesafenin çok yakın olduğu ve hücre membranları arasında boşluk kavşaklarının (gap junction) mevcut olduğu sinaps çeşididir. Presinaptik hücrenin uyarılmasıyla başlayan iyon akımı direkt olarak bu boşluk kavşakları üzerinden postsinaptik hücreye geçiş yapar. Elektriksel sinapslar çok sayıda nöronun elektriksel aktivitesinin senkronizasyonunda rol oynarlar (Pereda, 2014).

Kimyasal Sinapslar; genellikle akson ve dentritlerin bulunduğu sinapslar örnek olarak verilebilir. Bu bölgelerdeki boşluk elektriksel sinapslara oranla daha geniştir ve “sinaptik boşluk” olarak da isimlendirilir. Presinaptik terminal membranında veziküllerde çeşitli nörotransmitter moleküller hazır bir şekilde bekler. Uyarının presinaptik nöron tarafından alınmasıyla birlikte hücre içerisine giren Ca^{+} iyonları, bu veziküllerin membran ile kaynaşarak nörotransmitterlerin sinaptik boşluğa salınmasını sağlarlar. Postsinaptik nöronda

bulunan uyumlu reseptörlere bağlanarak ligand bağımlı voltaj kanallarının açılması sağlanır ve böylece post sinaptik uyarı oluşturulur (Pereda, 2014)..

2.2.2. Nörogliyal Hücreler

Nörogliyal (glial) hücreler sinir sistemi dokularında nöronlar dışında bulunan diğer önemli hücre grubudur. Geçmişte sadece sinir sisteminin destek hücreleri olarak düşünülse de günümüzde bu rollerinin yanı sıra nöronal iletimde de doğrudan önemli görevler alabildikleri gösterilmiştir. Memelilerde tanımlanmış 6 farklı tipte glial hücre bulunmaktadır, bunlardan 4'ü MSS'de, 2'si ise PSS'de bulunur.

Tablo 1. Nörogliyal hücrelerin işlevleri ve lokasyonları.

| Hücre | Lokasyon | İşlevi |
|--------------------|---------------------------------|--|
| Oligodentritler | MSS | Miyelin üretimi, elektriksel yalıtımın sağlanması. |
| Astrofitler | MSS | Yapısal ve metabolik destek, nöron iyileşmesine katılım. |
| Ependimal Hücreler | MSS, Spinal kanal, Ventriküller | Serobrospinal sıvının üretimi, dağıtımı. |
| Mikroglia | MSS | İmmun yanıt ve savunma. |
| Schwann Hücreleri | PSS | Miyelin üretimi, elektriksel yalıtımın sağlanması. |
| Uydu Hücreleri | PSS, DKG | Nöronlara yapısal ve metabolik destek. |

Astrofitler: MSS'de en yaygın olan glial hücre tipidir, tüm hücrelerin yaklaşık olarak %20-40'ını oluşturur. Mikroskop altında incelendiğinde yıldız (astro) formunda gözüktüklerinden bu ismi almışlardır. Astrosit hücre gövdelerinden çıkan birden fazla nörit MSS'de bulunan nöronlar, sinapslar, diğer glial hücreler veya çevre bağ doku ile temas halindedir. Beyin fizyolojisinde özellikle su ve iyon homeostazisini sağlarlar. Kan beyin bariyerinin yapısında ve bakımında bulunmanın yanı sıra gerekli durumlarda nöronlara mitokondri transfer ederek nöronal metabolizmanın hızlanmasına katkıda bulunurlar. Yapısında yüksek miktarda K^+ kanalı bulundurlar ve nöronlar aksiyon potansiyeli ateşlediğinde ekstraselüler ortama K^+ iyonu salarlar. (Grist ve Grist, 2012; Jäkel ve Dimou, 2017; Kim ve ark, 2019).

Oligodentritler: MSS'de aksonların miyelinizasyonundan sorumlu glial hücrelerdir. Bir oligodentritin sahip olduğu nöritler birden fazla farklı aksonunun miyelinizasyonundan sorumlu olabilir. Özellikle miyelinize ettikleri aksonlara sağladıkları hücre iskelet bileşenleri ve trofik faktörler ile yarıçaplarının büyümesine katkıda bulunurlar. Oligodentritler nöronal

aktiviteye bağı olarak aksiyon potansiyeli iletimini desteklerler. Nöronlarla fonksiyonel sinapslar kurabilmektedirler ancak aldıkları impulsları devam ettirme veya kendi aksiyon potansiyellerini oluşturma yetenekleri bulunmamaktadır. Ölümleri ile birlikte bağı buldukları aksonlarda global demiyelinizasyon sonucu aksonal defektler görülür (Bradl ve Lassmann, 2010; Gaudet ve Fonken, 2018; Jäkel ve Dimou, 2017).

Mikroglialar. MSS'nin yerleşik immün hücrelerelerdir, periferik makrofajlar veya monositlere özgü birçok yüzey işaretçisini eksprese ederler (CD11b, CD45, CD68, CX3CR1 vb.). MSS parankimasındaki en yaygın hücre tiplerinden birisidir. Toplam hücre miktarının %5 ile %10'nunu oluştururlar. Yaralanma, enfeksiyon veya nörodejeneratif bir hastalık sonrası beyin homeostazisinin bozulmasıyla dinlenme durumundan çıkarak aktif duruma geçerler. Sahip oldukları fagositoz özelliğiyle hasarlı doku debrisini temizlerler. Mikroglial nöritler sürekli olarak sinapslarla etkileşim halindedir, sinaps bağlantılarını bozup tekrar düzenleyerek MSS'de sinaptik aktiviteyi yönlendirebilirler.

Embriyonik gelişim sürecinde trofik faktörlerle nöronal hayatta kalma, aksonal büyümeyi desteklerler. Oligodentrik öncül hücrelerinin hayatta kalmalarına ve miyelinizasyonda yardımcı olurlar. Endotelyal hücreleri yöneterek beynin vaskülüzasyonunda görev alır (Gaudet ve Fonken, 2018; Jäkel ve Dimou, 2017).

Ependimal Hücreler: Ependimal hücreler spinal kanalda serobrospinal sıvıyı sentezleyen başlıca epitel hücre grubudur. Oluşturduğu ependima katmanı yapısı gereği madde geçişini sıkı bir şekilde kontrol ederek kan-serebrum bariyeri olarak iş görür. Katmanı oluşturan hücreler arasında bulunan boşluk kavşaklarının yanı sıra yapısında bir dizi moleküler kanal sınıfı da (iyon kanalları, aquaporinler vs) taşırlar. Bu kanallar ve kavşak bağlantılarıyla intraselüler iletişimin yanı sıra serobrospinal sıvının iyon homeostazisini, hacminin kontrolünü düzenler. Serebral boşluğa bakan yüzeylerinde apikal silia kümeleri bulunur, bu yapılar kanal içersinde serobrospinal sıvının hareketi yönünde koordineli şekilde salınımlar yaparlar. Bu hareketlerle serobrospinal sıvıda moleküler difüzyonu hızlandırdığı düşünülmektedir. (Del Bigio, 2010; Wolburg ve ark, 2015)

Uydu Hücreleri: Periferik sinir sisteminde, duyuusal ve otonomik gangliada nöronların hücre gövdelerini kaplamaktadırlar. Nöron gövdesinde ne kadar fazla uydu hücresi toplanırsa hücre gövdesinin o oranda büyüme gösterdiği bilinmektedir. Bu, uydu hücrelerinin tıpkı merkezi sistemdeki astrosit hücreleri gibi nöronları metabolik olarak desteklediklerini göstermektedir. Embriyonik dönemde duyuusal nöronların morfolojik gelişimini denetlediği düşünülmektedir.

Bağlı buldukları nöronlarda aksonal hasar meydana geldiğinde bir dizi morfolojik ve fizyolojik değişim meydana gelir, proliferasyonu ve çeşitli büyüme faktörlerine ait gen ekspresyonları (NGF, P75, GFAP, GDNF) artar. Hasar sonucu nöronun ölmesi halinde merkezi sistemdeki astrositler gibi hücre debrisinin fagositozunu gerçekleştirir. (Hanani, 2005)

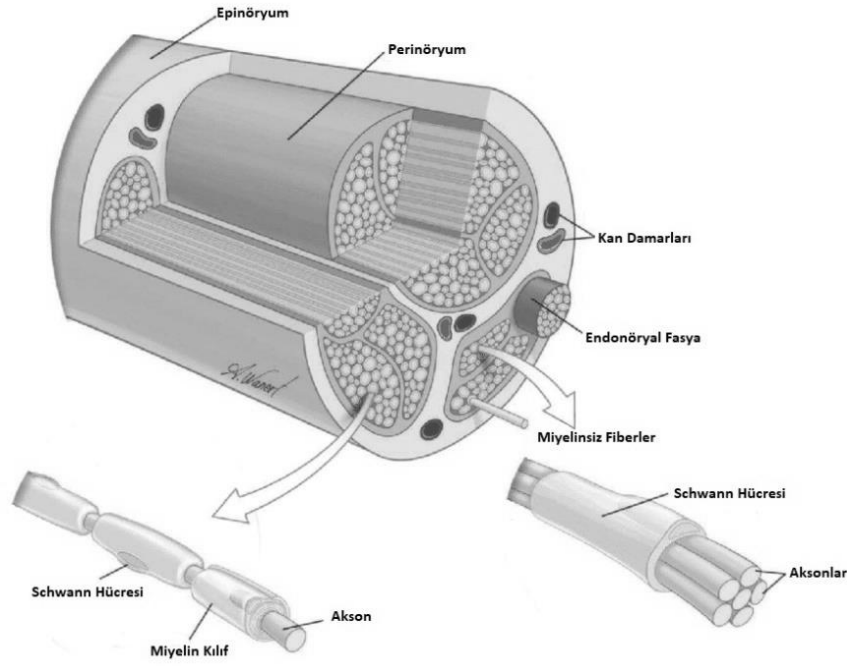
Schwann Hücreleri: Erken postnatal süreçte ortaya çıkan immatür schwann hücrelerinin gelişim sürecinde çevrelerindeki bazal lamina ve aksonlarla kurdukları ilişkiye bağlı olarak genellikle miyelinli ve miyelinsiz schwann hücreleri olmak üzere farklı fenotipe farklılaşırlar. Miyelinsiz schwann hücre fenotipi küçük yarıçaplı duyuşal aksonlar ve otonomik sinir sistemine ait aksonlar tarafından yaratılırken, miyelinli schwann hücre fenotipi ise büyük yarıçaplı duyuşal veya motor nöron aksonlarla etkileşim sonucu ortaya çıkar. Miyelinli schwann hücreleri miyelinsizlere oranlara 2-3 kat daha uzun ve büyüktürler. Miyelin kılıf hücre membranının bir uzantısı şeklinde olup akson gövdesini birkaç kez çevreleyerek dış ortandan yalıtır. Her iki schwann hücre tipi kontak halinde buldukları aksonlara metabolik ve trofik destek verse de yalnızca aksonlara elektriksel izolasyon sağlayan miyelinli schwann hücreleri sinir ileti hızının arttırılmasına katkı sağlarlar. Yapısal ve fonksiyonel olarak farkları olmasına rağmen her iki fenotip uygun koşullarda birbirine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Bu dönüşüm hücrenin etkileşime girdiği akson tarafından kontrol edilir. Miyelinsiz schwann hücresi büyük yarıçaplı bir aksonla bir araya gelirse miyelinli fenotipe dönüşürken tersi olarak miyelinli hücreler küçük yarıçaplı aksonlarla etkileşime geçtiğinde miyelinsiz hücreye dönüşür (Kristjan R. Jessen ve Mirsky, 2019a, 2019b). Sinirde hasar meydana gelmesiyle birlikte ortaya çıkan çevresel sinyaller eşliğinde miyelinli veya miyelinsiz schwann hücreleri farklılaşarak 3. tip fenotip olan tamir schwann hücrelerine dönüşürler. Hasar sonrası aksonal dejenerasyonla birlikte kaybolan aksonal kontak ile süreç başlar. Miyelin otofajisi ile birlikte tamir schwann hücrelerinin salgıladığı sitokinler makrofajların bölgeye toplanmasını ve hücrel debrisin fagositozunu indükler. Schwann hücreleri aksonal uzamayı ve dallanmayı destekleyen trofik faktörleri salgılamamanın yanı sıra aksonal tomurcukları distal ve proksimal uçlar arasında fiziksel olarak bir araya gelmesini sağlayan bungner bantları isimli kılavuz yapıları oluştururlar. (Armati ve Mathey, 2013). Deneyler schwann hücrelerinin fonksiyonlarının engellemesi ile akson rejenerasyonunun tamamen durduğunu ve iyileşmenin olmadığını göstermektedir. Aksonal rejenerasyonun tamamlanmasının ardından tamir fenotipindeki schwann hücreleri tekrar aksonal sinyallere bağlı olarak miyelinli veya miyelinsiz fenotiplere farklılaşırlar (Dezawa ve ark, 1997; Jessen ve Mirsky, 2016b).

2.3. Periferik Sinir Sistemi

PSS'nin en önemli görevi merkezi sinir sistemi ile periferde bulunan motor ve duyu yapıları arasındaki iletişimin sağlanmasıdır. Bu amaçla vücudun hemen hemen bütün dokularına ulaşan sinir demetleri innerve ettikleri yapıya bağlı olarak farklı oranlarda motor, duyu ya da otonomik nöronlara ait lifler barındırırlar. Motor lifler, merkezi sinir sisteminde bulunan dentritlerden aldıkları sinyalleri vücuda doğru taşıırken, duyu lifler ise özelleşmiş uyarılabilir sensör hücrelerden topladıkları bilgileri periferden merkezi sinir sistemine doğru taşırlar. Her türlü duyu, refleks, mekanik hareket vb. yaşamsal faaliyetler periferik sinir sistemi aracılığı ile merkezi sinir sistemi tarafından kontrol edilir ve yönetilir

2.3.1. Periferik Sinir Demetlerinin Anatomik Yapısı

Periferik sinir demetinin en içteki akson liflerini gevşek bir şekilde kapsayarak birincil fasyayı meydana getiren intrafasiküler bağ dokuya "endonöryum" denir. Kollajen açısından zengin olan bu yapıda bulunan fontana bantları bu katmana dalgalı bir görünüm kazandırırken, gerilime karşı yüksek bir direnç göstermesini sağlar. Kollajen liflerin spiral şeklinde bağlanmaları sayesinde sinir demetinin normal boyundan %20 daha fazla esnemesi mümkündür. Endonöryum miyelinsiz liflerde bir birine kaynamış tek katman halinde hemen aksonun üzerinde yer alırken, miyelinli liflerde iki katlı olarak görülür. İlk katman schwann hücrelerinin hemen üzerinde olup ranvier boğumlarına kadar giderek bu bölgede schwann hücrelerinin membranı ile bütünleşirken ikinci katman schwann hücrelerini dıştan sarar. Endonöryal tüp olarak da isimlendirilen bu yapının içerisinde MSS'de bulunan serebrospinal sıvıya yakın özellikte olan endonöryal sıvı bulunur. Endonöryal sıvının tüp içerisinde sağladığı pozitif basınçla sinir liflerine mekanik destek verilirken, schwann hücrelerinin ve aksonların metabolik ihtiyaçlarını ve implus iletimi için uygun iyonik ortam sağlanır.



Şekil 5. Sinir demetinin görünümü. (Ilfeld ve ark, 2016)

Birden fazla birincil fasyayı dıştan kaplayarak ikincil fasyayı oluşturan tabaka perinöryumdur. Mikroskopik görüntüsü incelendiğinde yassılaştırmış silindirik formunda olup boyuna ve lamelli kollajenler açısından zengin katmanlardan meydana geldiği görülür. Bu katmanların sayısı sinir demetinin büyüklüğüne göre birkaç kattan başlayıp 10'un üzerine çıkabilmektedir. Perinöral hücreler sık bir şekilde yerleşmiş ve birbirlerine sıkı bağlantılar (tight junction) ile bağlanmışlardır. Yoğun yapısı sayesinde endonöryal tüplere difüzyonla yabancı maddelerin serbestçe girmesini engelleyen bir bariyer görevi görür. Katmanlı yapısı ve kollajen içeriğinin yüksekliği sayesinde 300 mmHg basınca kadar dayanabilir. Yüksek mekanik direnci sebebiyle sinir demeti gerilim stresine mağruz kaldığında kopması beklenen en son doku katmanıdır.

Sinir demetinin en dış katmanı olan epinöryumun iki önemli fonksiyonel görevi vardır ilk olarak sinir demetinin ikincil fasyaları arasına girerek bunları birbirlerinden ayırır, ikinci olarak ise periferik sinir demetlerini en dıştan kaplayarak yüzey tabakayı oluşturur. Sinir köklerinden dural kesenin bir uzantısı olarak periferik sinir demetlerinin yüzeyini kaplar. Dış katmanında yüksek miktarda boyuna yerleşmiş kollajen fiberi, yağ hücresi ve fibroblastlar bulunmaktadır. İçe doğru ise kollajen ve elastik fiberlerin dalgalı bir şekilde yerleşim gösterdiği görülür. Çevre bağ doku ile gevşek bir ilişkisi vardır, bu sayede periferik sinirlerin mobilitesine olanak sağlar. Eklemlerde sinir demetlerinin geçtiği bölgelerde kalınlaşır böylece

mekanik direncin artmasını sağlar. Sinir dallara ayrıldıkça veya damarlar girdikçe sinirlerin mobilitesi azalır.

Periferik sinirlerin kan ihtiyacı anastomoz yapan damarlar aracılığıyla sağlanır. Sinir demetlerinde boyuna iki büyük arteriyel damar ve bir küçük damar anastomozlar ile birbirine bağlıdır. Bir arter sinirde yüzeysel olarak bulunurken ikincisi inter fasiküler epinöriumun içerisinde yer alır. Boyuna olan küçük damarlar ise endonörium ve perinöriumun arasında yer alır. Bu damarlar sürekli dallanırlar ve anastomozlar yaparak büyük sistemle beraber bağlı bir yapı oluştururlar.

2.3.2. Periferik Sinir Yaralanmaları

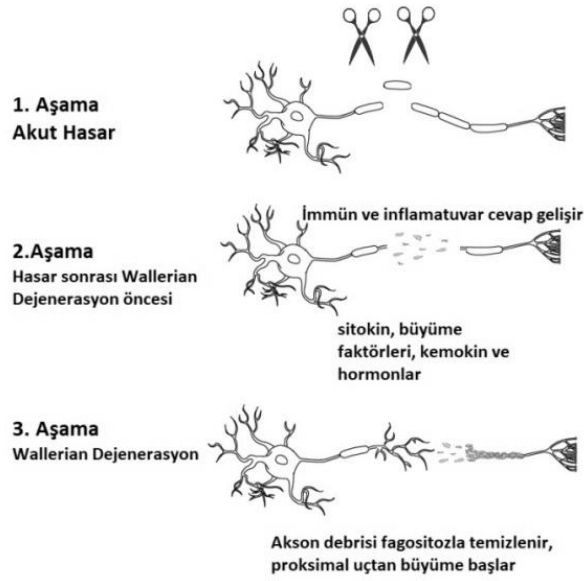
Periferik sinir yaralanmaları sonucu ortaya çıkan problemler genellikle ekstremitelerde görülmekte olup, hasar sonucu duyuşsal ya da motor organlara ait fonksiyonel bozukluklar gözlemlenmektedir. En sık olarak penetretif, künt travma ve akut kompresyon yaralanmalarına rastlanır. Hasarın büyüklüğü, yaralanmanın şiddetine ve etkilenen sinir demetinin innerve ettiği duyuşsal organ veya motor ünite büyüklüğüne göre değişiklik gösterir. PSS yaralanmalarında hasarın oluşum ve rejenerasyon mekanizmaları iyi anlaşılmiş süreçler olmasına rağmen mevcut tedavi metotlarında ciddi yaralanmalarda kaybedilen motor ve/veya duyuşsal fonksiyonun geri kazanımı sınırlıdır. Sonuç olarak motor fonksiyon, duyuşsal fonksiyon veya her ikisinin birden tamamen ya da kısmen kaybı meydana gelmektedir. Yıllık periferik sinir hasarı insidansı dünya genelinde %2-3 arasında değişmekte olup büyük ölçüde motorlu taşıt kazaları, kesici alet yaralanmaları, uzun kemik kırıkları ve spor yaralanmalarında ortaya çıkmaktadır. Yaralanmanın özellikle alt veya üst ekstremitelerde meydana gelmesi durumunda hastanın sosyal hayatı ve ekonomik özgürlüğünün kısıtlamasının yanı sıra ortaya çıkan tedavi ve rehabilitasyon masrafları sağlık sistemi üzerinde büyük bir yük oluşturmaktadır (Taylor ve Rice, 2008; Wang ve ark, 2017). Amerika’da yapılan retrospektif çalışmaya göre 16 milyonluk hasta grubunun 220,593’ünde ekstremitte travması teşhis edilmiş olup insidansı %1,4 olarak bulunmuştur. Bu hasta grubunun %83’nün 55 yaş altında erkek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın yapıldığı dönemde son 90 gün içerisinde gelen sinir travmalarında %1,9 ile sinir ezilme yaralanmaları en yüksek insidansa sahiptir (Taylor ve Rice, 2008).

2.3.3. Periferik Sinirde Rejenerasyon

Yaralanma sonrası aksonal bütünlüğün bozulma derecesi, iyileşme sürecinin ve iyileşme sonrası ekstremitelerdeki duysal ve/veya fonksiyonel geri kazanımın ne kadar başarılı olacağını belirler. Periferik sinir yaralanmaları sonucu ortaya çıkan patofizyolojik süreç hasar bölgesinin farklı noktalarında çeşitli morfolojik ve metabolik değişiklikler ile sonuçlanır. Hasarın proksimal, distal segmentleri ve son organlardaki değişiklikler şu şekilde meydana gelmektedir.

Kesi veya kopma sonrası proksimal güdük ucundaki aksonal bütünlüğün bozulması sonucunda iletimin bozulmasından başlayan süreç nöronların ölümüne kadar gidebilir. Bu durumu belirleyen en önemli faktör hasarın nöron gövdesine olan uzaklığıdır, hasar bölgesi gövdeye yaklaştıkça nöron kaybı riski atmaktadır. Sonuç olarak dorsal kök ganglia hücresi veya spinal kord anterior boynuzdaki motor nöronların kaybı kalıcı hasar anlamına gelmektedir. Aksonal bütünlüğün bozulması ile hücrede kromatolizis meydana gelir. endoplazmik retikulum ve ribozomlar kaybolurken hücre gövdesi ve nükleus şişer. Hücrenin gen ekspresyon odağı nörotransmitter üretiminden uzaklaşırken aksonal büyümeyi destekleyen faktörler öne çıkar. GAP-43, aktin ekspresyon seviyeleri artarken aksonal bakımda kullanılan nörofilament sentezi yavaşlar. Hücrenin hasar stersine karşı direncini arttıran HSP27 ekspresyonu artış gösterir.

Hasarın hemen ardından endonöral tüpler boşalır ve birkaç saat içinde proksimal segmentten distal segmente yönelecek olan yeni akson uçları için tomurcuklanmalar başlar. Distal güdük uca ulaşmak için uzanan bu tomurcuklar proksimal ve distal hasar bölgeleri arasındaki kritik alanı geçmelidirler Bu süreçte schwann hücrelerine ait nöritler, oluşmaya başlayan bu yeni akson tomurcuklarının distal güdük uca yönlendiren fiziksel köprü rolünü görürler. Aksonal rejenerasyonun hızı bu nöritlerin uzama hızına göre belirlenmektedir. Rejenerasyon sürecinde distale doğru uzanan aksonların miyelin kılıfları bulunmaz rejenerasyonun ilerleyen aşamalarında oluşmaya başlarlar.



Şekil 6. Wallerian Dejenerasyon. Hyperphysics (2020)

Sinirin kesilmesinden hemen ardından distal segmentin güdük ucunda “wallerian dejenerasyon” süreci başlar Birkaç saat içerisinde akson membranının kesik uçları mühürlenir, aksonal yıkılım ilk birkaç gün içerisinde başlar. Miyelin kılıfın dağılmasıyla schwann hücreleri proliferere olmaya başlarlar. Aksonal teması kaybeden schwann hücreleri aksonal uzamayı destekleyen nörotropik faktörlerin (NGF, BDNF, NT-3, NT4/5 ve NT-6, GGF) sentezine başlar. Aksonal mikrotübüllerde ve nörofilamentlerde proteolizise bağlı olarak granüler disintegrasyon gerçekleşir. Bu olay yaralanma sonrası aksonlara hızla giren Na^+ ve Ca^+ iyonları tarafından başlatılır. Hasarı takip eden 3-6 haftalık süreçte schwann hücreleri ve makrofajlar sinir demetini oluşturan hücresel debrisini temizlerler. Debrisinin ardından schwann hücreleri büngner bantları olarak isimlendirilen kolonlar şeklinde kendilerini organize ederler.

Rejenere olan aksonların distal segmentte laminin ve fibronektin gibi nörit büyütücü faktörler ile desteklenir. Distal segmentte aksonal tomurcuklar schwann hücre kolonlarına doğru büyüyebileceği gibi sinirin bağ dokusuna doğru rastgele de büyüyebilir. Schwann hücre kolonları proksimal uçtan gelen aksonal tomurcuklar tarafından doldurulur. Yeterli sayıda aksonun zamanla bir araya gelmesiyle distal hedeflere doğru büyürler. Hedef organdan da salgılanan büyüme faktörlerinin desteğiyle aksonlar olgunlaşır ve hedefle sinaptik bağlantılar kurar. Hedef organa ulaşamayan dallar sönümlenir ve kaybolur. Yeni sinir demetinin organizasyonu birkaç ay sonra görülmeye başlar siniri meydana getiren sinir demetleri kompartlanmaya başlar, her demetin kendi mini fasyası oluşmaya başlar.

2.3.4. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması

2.3.4.1. Seddon Sınıflandırması

Periferik sinir yaralanmalarının sistematik sınıflandırılmaları ilk defa 1942 yılında Herbert Seddon tarafından yapılmıştır. Seddon'a göre sinir yaralanmaları 3 tipte incelenebilir;

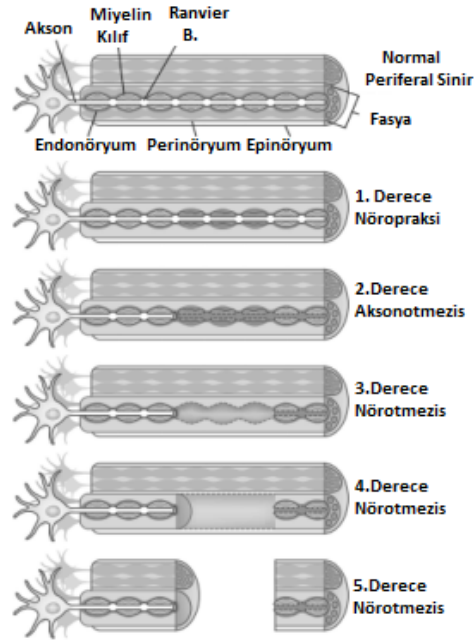
Nörotmezis: Sinir demetinin tamamen kesilmesini ifade eder, hasar bölgesinin güdük ucunda nöroma adı verilen skar doku oluşumu ve sinirin innerve ettiği motor ve/veya duyuşsal organlarda tam fonksiyon kaybı ile sonuçlanır. Cerrahi müdahale olmaksızın iyileşme beklenmez, distal güdük uçtan itibaren wallerian dejenerasyon başlar. Cerrahi müdahale sonrası motor fonksiyon iyileşmesi duyuşsal fonksiyonlara göre daha iyidir.

Aksonotmezis: Sinir demetinin mekanik olarak ezilmesi sonucu sinir liflerinin koptuğu ancak bağ dokunun bütünlüğünün bozulmadığı durumları tanımlar. Bu tür yaralanmalarda bağ dokunun korunmuş olması iyileşme için en önemli faktördür iyileşme hızı nörotmezise göre oldukça yüksektir. Birkaç hafta ile ay arasında iyileşme görülür.

Nöropraksi: Sinir iletiminde yaralanma ya da bası gibi durumlarda ileti bloğu oluşması durumudur. Sinir bloğuna sebep olan etmenin ortadan kaldırılmasıyla kısa süre içerisinde iyileşmesi beklenir.

2.3.4.2. Sunderland Sınıflandırması

Sunderland sınıflaması sinir hasarını 5 grupta toplar. Birince derece yaralanma Seddon sınıflamasındaki nöropraksiye eşittir. İkinci derece yaralanma Seddon sınıflamasındaki aksonotmeze eşittir. Üçüncü derece yaralanmada endonöryumda hasar vardır, ancak epinöryum ve perinöryum sağlamdır.



Şekil 7. Sunderland Sınıflandırmasına göre periferik sinir hasarı.

Kendiliğinden iyileşme mümkündür, kimi durumlarda cerrahi girişim gerekebilir. Dördüncü derece yaralanmada sadece epinöryum sağlam kalmıştır, cerrahi girişim gerekir. Beşinci derece yaralanmada sinire ait tüm katmanlar kopmuştur ve cerrahi girişim şarttır.

Tablo 2. Sinir yaralanmalarının Sunderland ve Seddon'a göre sınıflandırılmaları.

| Seddon | Sunderland | Patofizyolojik Özellikler |
|--------------|------------|--|
| Nöropraksi | Tip 1 | Lokal miyelin hasarı, genellikle kompresyon yaralanması sonucu. |
| Aksonotmezis | Tip 2 | Akson devamlılığının bozulması, endonöryum, perinöryum ve epinöryum bütün. |
| | Tip 3 | Akson ve endonöryum devamlılığının bozulması, perinöryum ve epinöryum bütün. |
| | Tip 4 | Akson, endonöryum ve perinöryum devamlılığının bozulması, epinöryum bütün |
| Nörotmezis | Tip 5 | Sinir demetinin bütün olarak kesilmesi. |

2.4. Periferel Sinir Yaralanmalarının Tedavisi

Cerrahi müdahalenin şart olduğu ciddi yaralanmalarda hasta için mümkün olan en iyi fonksiyonel iyileşmenin eldeki mevcut araçlar ile gerçekleştirilmesi gereklidir. Sinir rekonstrüksiyonunda en ideal yaklaşım kesik sinirin güdük uçlarının gerilimsiz olarak birbirlerine dikilmesiyle olmaktadır. Ancak kimi durumlarda sinir yaralanmasının öyküsüne bağılı olarak güdük uçların arasında gerilimsiz dikilmeye olanak vermeyecek büyüklükte (<3cm) boşluk meydana gelebilmektedir. Bu durumda tedavi için ilk yaklaşım sinir otograftı, allograftı veya sinir kılavuzu uygulamasıdır. (Li ve ark, 2014; Miranda ve Torres, 2016).

Otograft uygulamaları uzun süredir sinir boşluklarının tedavisinde kullanılmaktadır ve günümüzde altın standart olarak kabul edilmektedir. Otograftların en önemli avantajları:

- İmmünolojik açıdan doğaldır.
- Uygun nitelikte ve miktarda nörotropik faktörlere sahiptir.
- Aksonal rejenerasyonu destekleyecek schwann hücrelerine sahiptir.

Ancak bu operasyonun gerçekleştirilebilmesi için vücudun bir başka bölgesinden, tercihen sural ya da duyuşal sinirlerin dönor olarak kullanılması gerekmektedir. Bu uygulama dönor bölgede belirli ölçüde his ya da fonksiyon kaybı ile sonuçlanmaktadır. Otograft uygulamasının alternatifi ise allograft uygulamasıdır. Tıpkı otograft uygulamasında olduğu gibi kadvradan alınan sural, ulnar, medial/lateral, antebraşial, safenöz veya kutanöz femoral sinirler allograft uygulaması için kullanılabilir. Ancak allograftların kullanımında en önemli problem immün sistemin vereceği tepkidir, kimi durumlarda immünsüpresyona rağmen alıcı tarafından dokunun reddedilmesi ile sonuçlanabilmektedir. Ayrıca alınacak dönor sinif lifinin boyutunun tedavi bölgesinde herhangi gerilim oluşturmayacak kadar uzun olması ve tedavi edilecek sinir lifine yakın yarıçapta olması gerekliliği her durumda allograft veya otograft uygulamasının kullanılmasını kısıtlayan diğer faktörlerdir. (Miranda ve Torres, 2016). Kısaca yüksek insidansa sahip ve ekonomik külfeti yüksek bir problem olan sinir kesiklerinde otograft ve allograft yöntemleri büyük ölçüde sınırlıdır. Sinir kesiklerinde otograft ya da allograft uygulamasının mümkün olmadığı büyük yaralanmalarda biyomedikal olarak geliştirilmiş sinir kılavuzlarının kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Sinir kılavuzları, kesi sonucu ortaya çıkan proksimal ve distal akson uçlarını gerilim olmaksızın fiziksel olarak birleştirerek, aksonal rejenerasyonunu yönlendirmeyi ve desteklemeyi amaçlayan biyoyumlu malzemelerdir. Genellikle biyolojik polimerler, polyester, P3HB, PHBV, PLA, PLLA,

kollajen, jelatin, fibronektin, ipek, keratin, polisakkaritler vb. birçok farklı malzemeden üretilmektedirler. Çalışmalar sinir kılavuzlarının tek başlarına kullanıldıklarında sinir rejenerasyonunu belirli bir ölçüde desteklediğini ancak otograft uygulamasına oranla iyileşmenin daha az olduğunu göstermektedir. Bu sebeple sinir kılavuzu uygulamalarında çeşitli nörotropik faktörler, büyüme faktörleri, Schwann veya kök hücreler ile iyileştirme kapasitesinin artırılması üzerinde çalışılmaktadır (Houschyar ve ark, 2016; Panagopoulos ve ark, 2017; Tamaki ve ark, 2016).

2.5. Periferik Sinir Tedavisinde Biyofiziksel Metotların Kullanılması

2.5.1. Ultrases

Düşük şiddetli pulslu ultrases dalgaları (LIPUS) 1-2.5 MHz frekansları aralığında 0.1-1.5 W/cm² şiddetindeki ultrases dalgalarını tanımlar. İlk olarak 1983 yılında Duarte ve arkadaşları 1 Mhz frekansında, 50 mW/cm² şiddetinde LIPUS uygulamasıyla kemik kırıklarında rejenerasyon hızının artırılabilceğini göstermiştir. Sonraları yapılan benzeri çalışmalarda kemik dokusu dışında kırıkta ve yumuşak doku yaralanmalarında farklı şiddetlerde veya frekanslardaki LIPUS uygulamasının başarılı bir şekilde rejenerasyon hızının artırılabilceği gösterilmiştir (Draper, 2016; Loyola-Sánchez ve ark, 2012; Yamaguchi ve ark, 2016). Bu çalışmalar sonucu elde edilen bilgilerin ışığında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 1994 yılında kemik yaralanmalarında LIPUS terapisinin iyileştirici etkisini onaylayarak bu amaçla üretilen cihazlara izin verdi.

Günümüzde özellikle ortopedi alanında kullanılan LIPUS uygulamasının sinir hasarı üzerinde olumlu etkileri olabileceğini rapor eden çalışmalar mevcuttur ve klinik deneyler devam etmektedir (Bergmeister ve ark, 2018). Hücre kültürü ortamında schwann hücrelerine LIPUS uygulandığında sinir rejenerasyonunda önemli bir yer tutan bir dizi nörotrofik faktöre (FGF, NGF, BDNF, ve GDNF) ait gen ekspresyon düzeyinin, hücre proliferasyonun ve canlılığının anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (Ren ve ark, 2018). Deneysel sinir kesi modelinde otograft uygulamasını takip eden 12 haftalık iyileşme sürecinde farklı şiddetlerde LIPUS uygulamasının (250 mW/cm², 500 mW/cm² ve 750 mW/cm²) sinir rejenerasyonu

üzerindeki etkileri incelendiğinde en iyi iyileşme 250 mW/cm^2 şiddetinde tespit edilmiştir ve, şiddet arttıkça iyileştirici etkinin azaldığı gözlemlenmiştir (Jiang ve ark, 2016). Yapılan benzeri bir çalışmada ise kemik kırıklarında FDA tarafından önerilen LIPUS şiddetinin (30 mW/cm^2) sinir rejenerasyonun desteklenemediği tespit edilmiştir (Daeschler, Harhaus, Bergmeister, ve ark, 2018). Aynı grup tarafından yapılan 10 farklı çalışmaya ait meta analizde ise sinir yaralanmalarında aksonal rejenerasyon hızının artışı, miyelin kılıf kalınlığının artışı sinir ileti hızı artışı gibi yararlı etkilerin yaklaşık $250\text{-}500 \text{ mW/cm}^2$ şiddetleri aralığında görüldüğü. FDA tarafından önerilen cihazların bu güç aralığında çalışmadığı için sinir rejenerasyonu için daha yüksek güçte çalışan LIPUS jenatörlerinin kullanılmasını gerektiğine dikkat çekilmiştir (Daeschler, Harhaus, Schoenle, ve ark, 2018).

2.5.2. Lazer

Fotomodülasyon terapileri klinik pratikte kullanılan diğer termal ışık kaynağı uygulamalarından farklıdır. Kızılötesi lazer veya LED ışığı doku tarafından kolaylıkla absorbe edilen ve en yüksek penetrasyon gösteren dalga boyudur. Etkime mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte mevcut kanıtlar fotonların mitokondrial solunum zincirindeki kriptokrom c oksidaz tarafından absorbe edilmesiyle başladığı yönündedir. Artan kriptokrom c oksidaz aktivitesi ATP sentezini hızlandırır ve hasarlı bölgelerdeki bu ATP artışının bölgesel metabolizma artışına sebep olduğu düşünülmektedir. Benzeri şekilde reaktif oksijen türevlerinde fotonları absorbe ederek mitokondrial DNA replikasyonu, erken cevap genleri ve büyüme faktörlerine ait gen ekspresyonlarında, hücre proliferasyonunda artış rapor edilmiştir. Böylece dokularda fotoelektrik, fotoenerjetik ve fotokimyasal reaksiyonlar aracılığıyla biyostimülasyon yapabildiği gösterilmiştir. (Morries ve ark, 2015; Rosso ve ark, 2018).

Siyatik sinir ezilme hasarında 808 nm dalga boyunda farklı şiddetlerde ($3, 8$ ve 15 J/cm^2) düşük seviyeli lazer terapisi (DSLTL) uygulamasının etkisi incelendiğinde sinir dokusunun iyileşmesiyle paralel olarak motor fonksiyon, bileşik kas aksiyon potansiyeli ve miyelin kalınlığının arttığı görülmüş. Aynı dokularda yapılan western blot analizlerinde ise rejenerasyonda arttığı bilinen GAP-43 seviyesinde artış tespit edilmiş (C. Z. Wang ve ark, 2014). Sinir kılavuz uygulamasında da günlük 660 nm dalga boyunda DSLTL'nin cerrahi müdahaleden 10 gün sonra elektrofizyolojik parametrelerde, motor fonksiyonun geri

kazanımında ve histolojik parametrelerde iyileşme hızını arttırdığı görülmüştür (Shen ve ark, 2013). Benzeri çalışmada LED ışığı uygulamasıyla sinir kılavuzu içerisindeki antioksidan seviyelerinin DSLT grubunda 1 hafta boyunca düşüş görülmemiş (Ishiguro ve ark, 2010).

2.5.3. Elektromanyetik Alanlar

Elektromanyetik alanlar elektriksel yüklerin varlığında ortaya çıkan ve bütün yüklü veya polarize parçacıklarla ilişkiye girebilen fiziksel kuvvetlerdir. Taşıdıkları enerji frekanslarına veya dalga boylarına bağlıdır ve madde ile nasıl etkileşeceğini belirler (Goodman ve ark, 1995). Canlı hücreler elektrik, manyetik veya elektromanyetik alanlara maruz kaldıklarında hücre içerisinde ve çevresindeki serbest yüklerin dağılımı değişir. Değişen bu yük dağılımına bağlı olarak iyon kanallarından geçen iyon akımlarını manipüle ederek hücresel düzeyde etkilediği düşünülmektedir. Tıpkı bu hipotezde olduğu gibi ELF frekansında elektromanyetik alanların kök hücre göçünü desteklediği görülmektedir (Zhang ve ark, 2018). Benzeri şekilde ELF frekansında schwann hücrelerinin *in vitro* ortamda proliferasyonları ve hücre göçü aktivitesi arttırılmıştır.(Colciago ve ark, 2015).

Sıçanlarda siyatik sinir ezilme hasar modelinde pulslu ELF uygulamasının olumlu etkileri biyokimyasal, elektrofizyolojik ve morfolojik olarak birden fazla çalışmada gösterilmiştir. (Mert ve ark, 2006). Ayrıca sinir rejenerasyonunun hızlandırılmasının yanı sıra dorsal kök ganglia hücrelerinin hayatta kalmalarını desteklediğine dair bulgularda mevcuttur (Suszyński ve ark, 2014).

2.5.4. Elektrik Akımı

Sinir dokusu, fonksiyonu ve yapısı gereği elektriksel iletimle ilişkili olduğundan dışarıdan gelen elektriksel stimülasyonla kolaylıkla uyarılabilmektedir. Literatür incelendiğinde stimülasyonda kullanılan elektrik akımının özelliklerine (AC, DC veya pulslu akım), elektrotların yerleştirilme yeri ve hasar tipine (kesilme veya ezilme) bağlı olarak farklı

sonuçlar elde edilmiştir (Y. S. Chen, 2011). Sinir kesii  veya ezilme yaralanmalarında elektrik akımı uygulamasının aksonal büyümeyi ve *in vitro* ortamda sinir hücrelerinde nörit uzamasını hızlandırdığı grlmştir. Sinir dokusunda rejenerasyon sürecinde rol oynayan GAP-43, BDNF, aktin ve tbilin ekspresyonlarında artış tespit edilmiştir (Al-Majed ve ark, 2000, 2004; Geremia ve ark, 2007). Sinir güdük ucunda oluşan rejenerasyon konusunda aktin ve tbilin ekspresyonundaki artış sinir rejenerasyon hızıyla koreledir (Brushart ve ark, 2002). Nöron gövdesi incelendiğinde c-AMP ve PKA aktivitesinde de artış grlmştir (Gordon ve ark, 2009). alışmalar elektrik akımı stimülasyonunda genellikle 100 Hz ve altı frekanslarda daha büyük başarı elde edildiğini göstermektedir (Willand ve ark, 2016). İki farklı frekans rejiminin (4 Hz veya 100 Hz) sinir ezilme yaralanmalarında iyileşme hızına etkilerinin birbirinin tersi olabileceği grlmştir. Hasar sonrası uygulanan 4 Hz frekansındaki elektrik stimülasyonu iyileşmeyi desteklerken aynı sürede 100 Hz frekansının ise iyileşmeyi yavaşlatmaktadır (Cavalcante Miranda De Assis ve ark, 2014).

Özellikle düşük frekanslarda başarının daha belirgin olması insanlarda ve hayvanlarda motor nöronlara ait ateşleme frekansının 20 Hz civarında olmasına bağlanmaktadır. 20 Hz frekansında günlük 1 saat olmak üzere 2 hafta gerçekleştirilen elektrik stimülasyonu ile sinir kesi yaralanmasında duyuşal ve motor nöron fiberlerinde rejenerasyon hızını arttırabildiğini gösterilmiştir. Aynı şekilde farklı sürelerde elektriksel stimülasyon motor nöron fiberlerinin iyileşmesini hızlandırır da sadece 1 saatlik stimülasyonun duyuşal liflerin reinervasyonunda daha etkili olduğu grlmştir (Al-Majed ve ark, 2000).

İnsanlarda yapılan pilot çalışmada karpal tünel sendromu hastalarında dekomprasyon müdahalesi sonrasında açık bırakılan median sinire 1 saat 20 Hz frekansında elektrik stimülasyonu uygulanmış. Uygulama ardından 1 sene boyunca yapılan takiplerde elektromiyografi sonuçlarına göre, kısa süreli elektriksel stimülasyon 6 ay içerisinde tam kas innervasyonunu mümkün kılarken stimülasyon yapılmayan hastalar 1 yıl sonrasında bile kayda değer bir gelişme göstermemiştir (Gordon ve ark, 2008). Sürekli uygulama amacıyla deri altına yerleştirilen implant elektroların sinir ezilme ve kesik hasarlarındaki etkileri daha önceki çalışmalara benzer şekilde olumlu olarak tespit edilmiştir (MacEwan ve ark, 2019).

2.6. Kök Hücreler

Kök hücreler vücutta bulunan özelleşmemiş hücre grubudur, ihtiyaç halinde farklılaşarak yeni fonksiyonlar kazanabilmektedirler. Embriyonik gelişim sürecinde bütün doku ve organların temelini oluştururken, yetişkin vücudunda doku tamiri ve homeostazisin korunmasında rol oynarlar. Başlıca ortak özellikleri;

1- Neredeyse sınırsız bölünme ve kendilerini yenileme kapasitesine sahiptirler. Bölünme sonucunda kendisinin bir kopyası ve belirli bir soya yönelmiş progenitör hücreler ortaya çıkartabilirler.

2-Farklılaşmamışlardır, herhangi bir dokuya özgü yapı ya da fonksiyon göstermezler.

3-Farklılaşarak belirli fonksiyona ait hücre gruplarına dönüşürler. Farklılaşma süreci hücrenin maruz kaldığı intristik ve ekstristik sinyaller tarafından tetiklenir (Zakrzewski ve ark, 2019).

Farklılaşma potansiyellerine göre;

Sahip oldukları özellikler sayesinde kök hücreler tıp alanında kendilerine büyük bir uygulama alanı bulmuşlardır. Gelişimsel hastalıkların ve doğum defektlerin oluşum mekanizmalarının anlaşılmasında, kanser gelişimi, tedavisi ve *in vitro* modellerinin geliştirilmesinde, ilaç tedavi uygulamaları ve toksikoloji çalışmalarında ve rejeneratif tıpta yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Mahla, 2016; Sutton ve Bonfield, 2014).

2.6.1. Embriyonik Kök Hücreler

Fertilizasyonun ardından implantasyon öncesi embriyonik blastosistlerin iç hücrelerinden elde edilen sınırsız bölünme, yenilenme kapasitesine sahip, vücudu oluşturan bütün hücre soylarına dönüşme potansiyeli olan hücrelerdir. Sahip oldukları bu potansiyel ile sınırsız bir şekilde farklı hücre tiplerine farklılaştırılarak ihtiyaç duyulduğunda doku transplantasyonu veya dejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmaları mümkündür (Mahla, 2016).

Ancak EKH'in tıpta kullanımı ile ilgili iki önemli problem bulunmaktadır;

1-EKH izolasyonu embriyoların ölmesi sonuçlanabilir. Birçok ülkede embriyolar implamantasyondan sonra yasal olarak insan kabul edilir. Bu sebeple uzun süre üzerinde çalışılması sıkı bir şekilde denetlenmiştir. Yakın zamanda bu problemi aşabilmek için embriyoya zarar vermeden kök hücre izole edilebilmiştir (De Wert ve Mummery, 2003).

2-EKH transpalantasyonu sonrasında hücrelerin alıcı immün sistemi tarafından reddedilmesi riski vardır. Bunu önüne geçebilmek için immün sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımı gereklidir. Ancak bu uygulama uzun vadede hastalarda enfeksiyon, kanser ve diyabet gibi ikincil rahatsızlıkların gelişme riskini arttırmaktadır (Herberts ve ark, 2011) .

2.6.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

İndüklenmiş pluriopotent kök hücreler (İPKH) ilk olarak 2006 yılında fare somatik hücrelerinin Oct3, Sox2, KLF4 ve c-myc faktörleri ile yeniden programlanmasıyla elde edilmiştir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Bu hücreler tıpkı EKH gibi pluripotent özellikte olup 3 temel germ tabakasına ait hücre soylarına farklılaşma özelliği gösterirler. Fonksiyonel olarak EKH ile aynı özellikleri taşımaları sayesinde rejeneratif tıp alanında EKH yerine kullanılmaktadırlar. Somatik hücrelerden elde edilebilmeleri, embriyolar ile karşılaşılan etik problemlerin aşılmasını sağlarken, otolog olarak uygulanabilmeleri sayesinde hastaların immün sistemi baskılayan ilaçları kullanmasına gerek kalmaz. İlk klinik denemelerinde maküler dejenerasyon hastalarında herhangi bir yan etki göstermeden tedavinin başarılı bir şekilde yapılabileceği gösterilmiştir (Bragança ve ark, 2019).

Öte yandan her ne kadar umut vaat eden bir teknik olsa da klinik uygulama için üretimleri yüksek maliyet gerektirir. Üretilen kök hücrelerin uzun dönem saklanması ve pasajlar arasında ortaya çıkabilen de novo mutasyonların çok sıkı bir şekilde takip edilmesi gereklidir. Yeniden programlama sonucu elde edilen İPKH'lerin verimliliği %1 oranındadır. Tedavi için yeterli sayıda nitelikli hücre üretilmesi zaman alırken maliyeti artar. (Bragança ve ark, 2019)

Tablo 3. Kök hücrelerde bulunması ve bulunmaması gereken yüzey işaretçileri

| Pozitif | Negatif |
|--|--|
| CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD123, CD124, CD126, CD127, CD71, CD140a, CD331, CD334, CD58, CD54, CD102, CD50, CD62L, CD166, CD56, CD44, CD106, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD49f, CD29, CD61, CD104, CD9, CD33, CD53, CD73, CD90, CD105, CD146, CD147, CD157, CD271, Stro-1, SUS2, Notch1, W8-B2 | CD62E, CD62P, CD66b, CD144, CD31, CD49d, CD51, CD11a, CD18, CD11b, CD11c, CD1a, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD38, CD40, CD45, CD74, CD80, CD83, CD86, CD117, CD133, Sca-1, CD13, CD25 |

2.6.3. Mezenkimal Kök Hücreler

International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) tanımına göre bir hücre popülasyonunun mezenkimal kök hücreler (MKH) olarak tanımlanabilmesi için hücrelerin;

- 1- In vitro ortamda adherent özellik göstermelidirler.
- 2- Uygun koşullar ve mikro çevre sağlandığında *in vitro* ortamda osteoblast, adiposit ve kondroblast hücrelerine farklılaşma yeteneği olmalıdır.
- 3- Belirli yüzey işaretçilerinin varlığı ve yokluğu gösterilmelidir (Tablo 3.).

Her doku tipi kendisine has multipotent MKH barındırabilir. MKH'in bir kısmı perivasküler boşlukta, mikrovasküler sistemde epitelyum stabilizasyonu ile ilgilenirken diğerleri nonperivasküler hücre popülasyonu içerisinde uyku halindedir. Doku hasarına bağlı olarak ortaya çıkan inflamasyon faktörleri (INFgamma, TNF alfa vs.) ile karşılaştıklarında immünoregülatör fenotipe bürünürler. Anti inflamatuvar faktörlere ait (PD-L1, PGE2 vs) gen ekspresyonlarını arttırarak inflamasyonu söndürmeyi ve immün hücre proliferasyonunu baskılamaya çalışır. Kısaca salgıladıkları büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığıyla doku inflamasyonunu kontrol altında tutarak homeostazisin tekrar sağlanmasını mümkün kılarlar.



Şekil 8. Mezenkimal kök hücreler (Steel ve ark, 2016)

Hücre kültürü ortamında adherent olarak hızlı bir şekilde çoğaltılabilirler, kriyoprezervasyona karşı dayanıklıdır. MKH genel olarak düşük miktarda immünogenetik aktivite gösterirler böylece allojenik transplantasyonları kısmen daha kolaydır. Rejeneratif ve immün sistem düzenleyici özellikleri MKH'in terapötik amaçlı olarak kullanılmasına olanak vermektedir.

2.7. Schwann-Benzeri Hücreler

Schwann hücreleri, PSS'de aksonların bakım ve onarımdan sorumlu glial hücre grubudur. Aksonal hasarın ardından schwann hücre fonksiyonunun baskılanmasıyla akson rejenerasyonunun tamamen durduğu ve iyileşmenin olmadığı gösterilmiştir (Dezawa ve ark, 1997; Jessen ve Mirsky, 2016). Bu çalışmalar schwann hücrelerinin, sinir hasarı tedavisinde hayati öneme sahip olduğunu, başarılı bir rejenerasyon için bu hücrelerin mutlaka olması gerektiğini göstermektedir.

Tablo 4. Schwann hücrelerinin farklı aşmalarında eksprese edilen genler

| Schwann Hücre Evresi | İşaretçi |
|---|---|
| Öncü Schwann Hücresi | Sox 10, GAP43, Oct6, Sox2, MPZ |
| Gelişmemiş Schwann Hücresi Pro-miyelin Schwann Hücresi | Sox10, S100, GAP43,P75, NCAM, Sox2, Oct6, MPZ |
| Miyelinli Schwann Hücresi | Sox10, S100, Krox20, Oct6 |
| Miyelinsiz Schwann Hücresi | Sox10, S100, Krox20, Oct6, MBP, MPZ |
| Miyelinsiz Schwann Hücresi | Sox10, S100, GAP43, P75, NCAM, OCT6 |

Ancak, schwann hücrelerinin terapötik olarak kullanımı şu sebeplerden dolayı kısıtlıdır;

(1) Schwann hücrelerinin izolasyonu için sağlıklı bir sinir demetinin feda edilmesi gerekir, tıbben kabul edilebilir bir uygulama değildir.

(2) Schwann hücreleri diğer somatik hücrelere oranla *in vitro* ortamda düşük proliferasyon ve canlılık göstermektedir.

Periferik sinir yaralanmalarında tedaviye erken başlamanın iyileşmenin başarısı üzerinde büyük önemi olduğu vurgulanmaktadır. Otolog hücrelere ulaşmanın etik ve pratik zorluğu göz önünde bulundurulduğunda alternatiflerin önemi ortaya çıkmaktadır. Schwann hücrelerine alternatif olarak Dezawa ve ark (2001) tarafından geliştirilen protokol, mezenkimal kök hücrelerden Schwann-benzeri hücre fenotipinin üretilmesini mümkün kılmaktadır (Dezawa ve ark, 2001). Uygun koşullar altında belirli büyüme faktörlerinin kullanılmasıyla (basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor-AA, neuregulin-1 and forskolin) 18 günlük farklılaştırma protokolünün ardından mezenkimal kök hücreleri schwann hücrelerine benzer bir morfoloji ve gen ifadesi kazanabilmektedirler. Bu hücreler mikroskop altında incelendiğinde tıpkı schwann hücreleri gibi dipolar ve fuziform bir morfoloji gösterdikleri gibi schwann hücrelerine has GFAP, P75NTR ve s100 gibi spesifik işaretçilere ait gen ve protein ekspresyonu göstermektedirler (Piovesana ve ark, 2019; Xiao ve Wang, 2015). Çalışmalar adipoz, kemik iliği, diş kökü, hemotopoetik amniyotik sıvı, mezenkimal kök hücrelerin aynı protokolle schwann-benzeri hücreye farklılaşabildiğini

göstermektedir. Schwann benzeri hücrelerin tıpkı gerçek schwann hücreleri gibi aksonal rejenerasyonu destekleyen eksozomlar salgıladığı gösterilmiştir. Bu eksozomların içeriği incelendiğinde taşıdıkları mRNA ve miRNAların aksonal iyileşmeyi destekleyici faktörlerin ekspresyonunda rol oynadığı görülmüştür. Bunlardan örneğin GAP-43'ün nöral kon uçlarında kılavuz görevi gördüğü, ekspresyon seviyesinin artmasının nörit tomurcuklanmasını stimüle ettiği bilinmektedir. (Ching ve ark, 2018)

In vivo denemeler sinir hasarı tedavisinde Schwann-benzeri hücrelerin, farklılaşmamış kök hücrelerden daha başarılı olduğunu bildirmektedir (Fan ve ark, 2011; Gao ve ark, 2014). Bu özellikleri schwann-benzeri hücreleri gerçek schwann hücrelerinin kullanılmadığı terapötik sinir rejenerasyon çalışmalarında önemli bir alternatif olmasını sağlamıştır. Fakat gerek schwann hücrelerinin gerek kök hücre ya da schwann-benzeri hücrelerin sinir kılavuzları ile hasar bölgesine verilmeleri otograft uygulaması kadar başarılı bir tedavi sağlamamaktadır (L. Fan ve ark, 2014b).

2.8. Hücre Transplantasyonu

Mezenkimal kök hücrelerin terapötik kullanımında hücre transplantasyon metotları lokal ve sistematik olmak üzere ikiye ayrılabilir. Lokal transplantasyon, terapötik etkinin görülmesi istenen dokuya olabildiğince yakın veya direkt içerisine hücre enjeksiyonunu ile tanımlanırken, sistemik transplantasyonda ise arter veya venlerden enjekte edilen hücrelerin dolaşım sistemi aracılığıyla hedef dokuya ulaşmalarını beklenir. Her iki metodun kendi içinde avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Kean ve ark, 2013).

Lokal enjeksiyonda kök hücrelerin inflamasyonun olduğu lezyon bölgesine kısa sürede göç ettikleri tespit edilmiştir (Park ve ark, 2009). Bu metotta ekimde kullanılacak hücre sayısı ve hacim önemli ölçüde düşük olabilir. Ancak en önemli dezavantajı enjeksiyon işleminin hedef dokuya zarar vermesi ve ekilen hücrelerin zarar yüksek basınca maruz kalmalarıdır. Sistemik enjeksiyonda ise hücreler arterler veya venler aracılığıyla dolaşım sistemine enjekte edilmesiyle hedef dokuda invaziv işleme gerek kalmaz ve tüm vücuda yayılmaları sağlanır. Ancak özellikle bu şekilde verilen hücrelerin büyük çoğunluğu enjeksiyon sonrası akciğerlerde tutularak dolaşımdan uzaklaştığı, kimi durumlarda emboliye sebep olabildikleri

de rapor edilmiştir (Fischer ve ark, 2009). Sistemik dağılım ve tutulum yüksek olduğundan terapötik kullanımda hücre sayısı $1-5 \times 10^6$ aralığında değişiklik göstermektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 5. Deneyleerde kullanılan kimyasalların listesi.

| Kimyasal Türü, Markası | Çalışmada Kullanım Amacı |
|---|--------------------------------|
| Total Rna Purification Plus Kit 100 Preps Norgen Biotek | RNA izolasyonu |
| Trascript First Strand cDNA Synthesis Kit For mRna 50 Reactions | RNA örneklerinden cDNA sentezi |
| 2x Real-Time PCR Master Mix 500 Reactions Norgen Biotek | RT-PCR reaksiyonu |
| Forskolin 50 Mg, Sigma | Hücre farklılaşması |
| Recombinant Human FGF-Basic Peprotech 250 Ug, Peprotech | Hücre farklılaşması |
| Recombinant Human PDGF-AA Peprotech 50 Ug, Peprotech | Hücre farklılaşması |
| Recombinant Human Heregulinbeta-1 Peprotech 500 Ug, Peprotech | Hücre farklılaşması |
| Retinoic Acid, Sigma | Hücre farklılaşması |
| 2-Mercaptoethanol, Sigma | Hücre farklılaşması |
| Rat Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit, R&D Systems | Hücre farklılaşmasının tespiti |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium - Low Glucose, With 1000 Mg/L Glucose, and Sodium Bicarbonate, Sigma | Hücre Kültürü |
| Hanks Balanced Salt Solution, Modified, with Sodium Bicarbonate, without Phenol Red, Sigma | Hücre Kültürü |
| .25% Trypsin-Edta Solution, Sigma | Hücre Kültürü |
| L-Glutamine Solution, Sigma | Hücre Kültürü |

| | |
|---|------------------|
| Penicillin -Streptomycin Solution Stabilized, Sigma | Hücre Kültürü |
| Red Blood Cell Lysis Buffer, Merck | Hücre izolasyonu |
| Collagenase 1gr, Sigma | Hücre izolasyonu |

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 6. Deneyleerde kullanılan cihazların listesi.

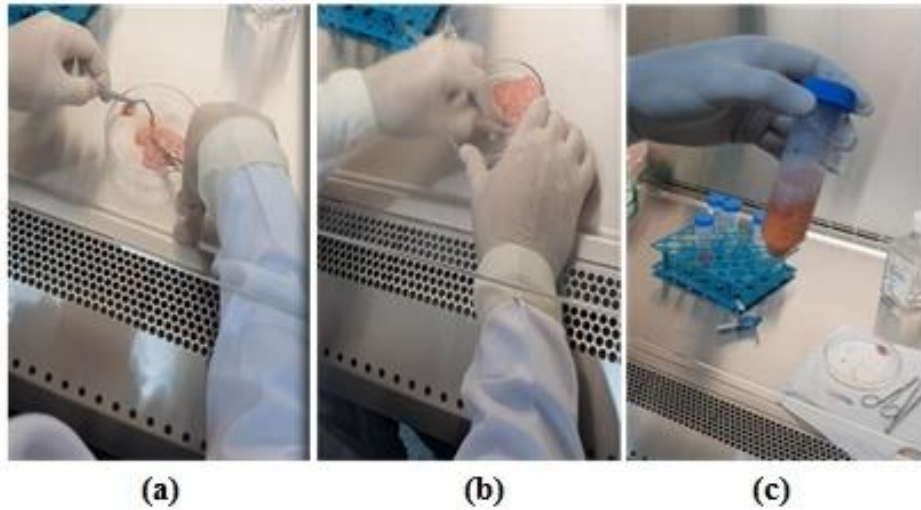
| Ekipman Türü, Markası | Çalışmada Kullanım Amacı |
|-------------------------|---|
| -80 °C derin dondurucu, | Örneklerin saklanması ve dondurulması |
| İnvert Mikroskop , | Hücre kültür flasklarının gözlemlenmesi |
| Soğutmalı Santrifüj , | Hücre kültür pasajlama, PCR örneklerinin hazırlanması |
| Steril Kabin, | Hücrelerin çoğaltılması ve uygulamalar için steril ortam sağlanması |
| Karbondioksik İnkübatör | Hücrelerin çoğaltılması ve uygulamalar için steril ortam sağlanması |
| Platereader | Hücre canlılığı testi |
| Termal Cyclor | cDNA sentezi |
| Real Time PCR | Gen ekspresyon analizi |
| Nanodrop | RNA miktarı ve saflığının tespiti. |
| Işık Mikroskopu | Olympus BX61 |
| Stimülatör | Agistim Duo Sedatelec |

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Adipoz Kök Hücre İzolasyonu

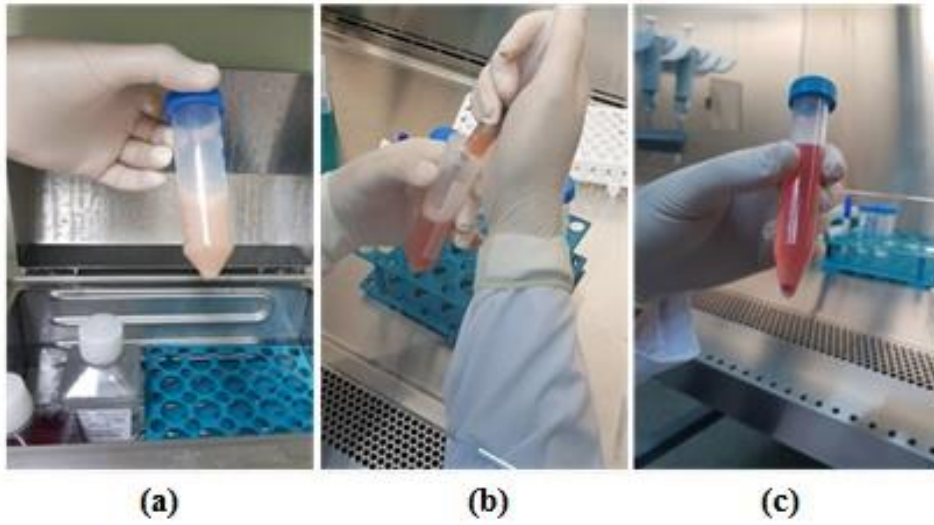
Hayvan deneyleri, Yerel Etik kurul onayı (64583101/2017/087) alındıktan sonra Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Adipoz kök hücrelerin kaynağı olarak 1 adet 8-10 haftalık erkek wistar-albino sıçan kullanıldı. Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen wistar-albino sıçanı uygun dozda ketamin+xylozine kokteyli (100 mg/kg ketamine + 12.5 mg/kg xylozine) ile anestezi uygulandı. Ardından steril koşullar altında inguinal, retroperitoneal, gonadal bölgelerden toplanan adipoz doku HBSS çözeltisi konularak buz üzerinde hücre izolasyonunun yapılacağı laboratuvara taşındı. Yağ dokusu öncelikle makas ve jilet yardımı ile mümkün olduğunca küçük parçalara bölündü (Resim 1. (a) ve (b)), ardından içerisinde 40 mg kollajenaz çözünmüş 20ml HBSS çözeltisine içeren tüplere alındı (Resim 1. (c)).



Resim 1. Adipoz kök hücre izolasyonunda mekanik ve kimyasal parçalama işlemleri.

Tüpler 37°C'de su banyosunda 45 dakika çalkalanarak inkübe edilirken her 10 dakikada bir örnekler ters yüz edilerek homojenizasyon hızlandırıldı (Resim 2. (a)). İşlem sonunda elde edilen homojenat 100µm filtreden geçirilerek çözünmemiş doku parçalarının uzaklaştırılması sağlandı. Kollajenaz enziminin reaksiyonunu durdurmak için homojenata eş

hacimde hücre kültür ortamı eklendi. Karışım 1000rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilerek adipositler, lipidler, hücre kültür ortamı ve kalan hücre debrisinin fraksiyonlara ayrılması sağlandı. Elde edilen fraksiyonlardan öncelikle üsteki sarı renkli lipid tabakası, ardından kalan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı bu sırada pelletin dağılmamasına özen gösterildi (Resim 2. (b)). Pellet, eritrosit lizis tamponu ile 1 dakika muamele edilerek eritrositlerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Reaksiyon 20 ml hücre kültür ortamı eklenerek durduruldu ve ardından 1000 rpm hızında +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Tekrar süpernatant aspire edildi, altta kalan pellet adipoz kök hücreleri içeren stromal vasküler fraksiyon (SVF) kültüre edildi (Resim 2. (c)).



Resim 2. Doku homejenatının filtre edilmesinin ardından stromal vasküler fraksiyonun eldesi.

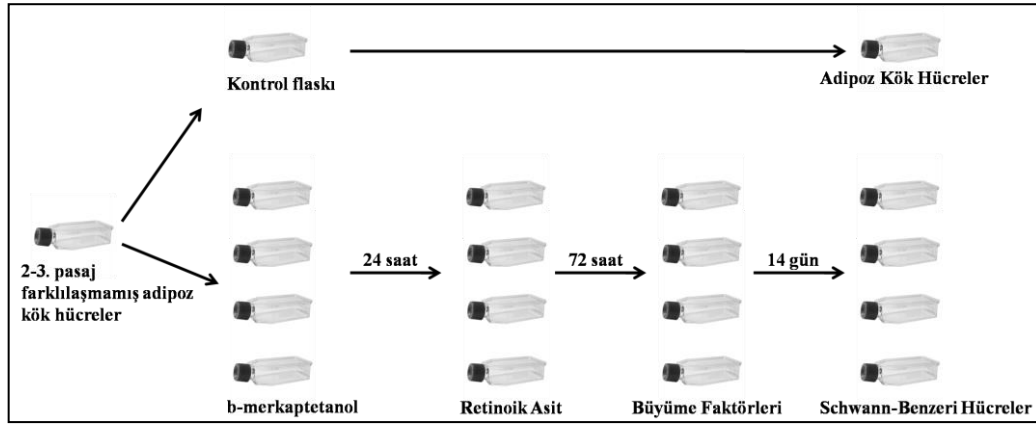
T75 flaklarda 37°C'de %5 CO₂ kültür ortamında haftada 3 defa hücre kültür ortamı (α -MEM + %5 L-glutamine + %5 Penicillin-Streptomycin + %10 FBS) değiştirilerek tutuldu ve hücre yoğunluğu %80'e ulaştıkça pasajlandı (Araña ve ark, 2013).

3.2.1.2. Adipoz Kök Hücrelerin Akış Sitometresi Metodu ile Tayini

Adipoz kök hücrelerin yüzey işaretçi tayinleri SVF'nun en az iki kere pasajlanmasından sonra, 2. pasajlarda CD29, CD44, CD45, CD11b, CD106 yüzey işaretçileri ile yapıldı. Hücre fenotiplemesi, dokudan izolasyonun yapılmasının ardından, 100 μ l akış sitometri tamponunda resüspanse edilerek her 1x10⁶ hücreye 10 μ l antikor olacak şekilde karıştırıldı. Karışım 10 dakika boyunca 4°C'de karanlıkta inkübe edildi. Ardından hücreler 1ml akış sitometri tamponu ile yıkanarak bağlanmayan antikorlar ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkama ardından 300g hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen hücre pelleti akış sitometri ile analiz edildi (Fu ve ark, 2016)

3.2.1.3. Schwann-Benzeri Hücre Eldesi

Schwann-benzeri fenotip eldesi için bütün kök hücre gruplarına Dezawa protokolü uygulandı (Dezawa ve ark, 2001). T75 hücre kültürü flaskında hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında hücreler 5'e bölünerek yeni T75 hücre kültür flasklarına ekildi (Şekil 9). Farklılaştırma protokolü süresince 1 flask kontrol olarak kullanılıp farklılaştırma işlemine kalan 4 flask üzerinden devam edildi.



Şekil 9. Farklılaştırma protokolünün şematik gösterimi.

Farklılaştırılacak hücre flaskları 24 saat 1mM β -merkaptetanol içeren hücre medyumunu ile inkübe edildi. Bu sürenin ardından hücrelere 35ng/ml konsantrasyonunda all-trans-retinoic acid içeren hücre kültür ortamı eklendi ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saatlik inkübasyonun ardından 5 ng/mL trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), 10 ng/mL temel fibroblast büyüme faktörü (FGF), 14 mM forskolin (Sigma-Aldrich), ve 192 ng/mL glial büyüme faktörü (GGF-2) içeren schwann-benzeri farklılaştırma medyumunu eklendi. Hücreler 14 gün boyunca bu medyum ile inkübe edildikten sonra elde edilen hücrelerin schwann hücre işaretçi düzeyleri kontrol flaskında ki hücreler ile karşılaştırılarak RT-PCR metodu ile tespit edildi (Faroni ve ark, 2016).

3.2.1.4. Proliferasyon

Adipoz kök hücreler ve schwann-benzeri hücrelerin proliferasyon hızlarındaki farklılığın gösterilebilmesi için 3. veya 4. pasajdaki hücreler %80 yoğunluğa ulaşana kadar T75 flasklarında 37°C %5 CO₂ kültür ortamında çoğaltıldı. Tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler kuyu başına 1x10⁴ hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre plaklarına ekildi (Şekil 10). Plakalardaki hücrelerin proliferasyon düzeyleri 1, 5, 9, 13, 17 ve 21. günlerde

kolorimetrik yöntem ile incelendi. Kısaca, adipoz hücre ve schwann-hücre plaklarından uygun sütunlardan hücre kültür ortamı kaldırıldı ve hücreler HBSS ile iki kere yıkandı. Kuyu başına 330µl MTT çözeltisi (0,5 mg/mL) eklendi, 37°C' de 4 saat inkübe edildikten sonra MTT çözeltisi kaldırıldı ve kuyu başına 330µl DMSO eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübasyonun ardından her bir kuyudan alınan örnekler 96'lık hücre kültür kabında 3 adet kuyuya 100 ul olacak şekilde dağıtıldı, böylece her bir örnekten 3 adet okuma alındı. Okumalar 590nm absorbansta gerçekleştirildi.

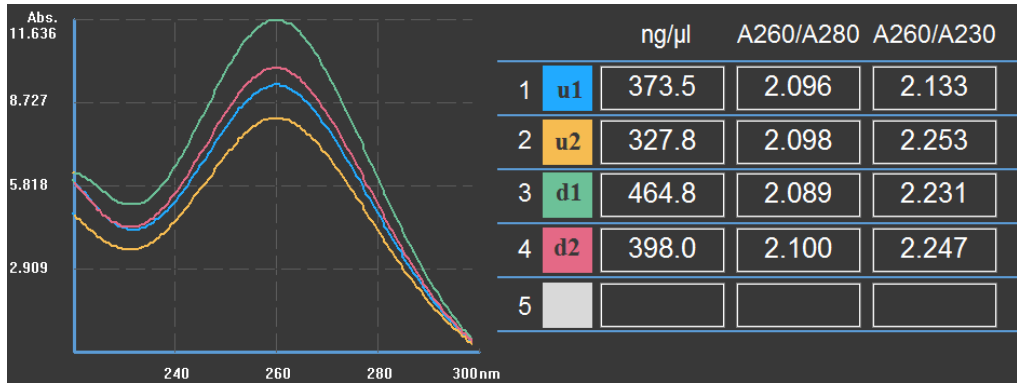
3.2.1.5. Morfolojik İnceleme

Farklılaşmanın ardından schwann benzeri hücrelerin geçirdiği morfolojik değişikliklerde mikroskopik olarak incelemeye ve işlemin başarısını teyit etmek için kullanılır. Mezenkimal kök hücreler hücre kültür ortamında daha yayvan, çok kutuplu ve geniş bir alan kaplarken schwann benzeri farklılaşma sonrasında hücrelerin ince ve çift kutuplu forma kavuşmaları beklenir. Adipoz kök hücreler ve schwann-benzeri hücreler 6'lı hücre plaklarına kuyu başına 50×10^5 hücre olacak şekilde ekildiler. Ertesi gün PKH26 boyasıyla boyanan hücreler ışık mikroskobu altında görüntülendiler. Her grup için rastgele çekilen 5'er fotoğrafta toplamda 50'şer hücre seçildi. Hücrelerin en-boy oranlarının tayini için Image-J programı ile hücre çekirdeği merkez kabul edilerek hücrenin en geniş ve en dar bölgelerinin uzunlukları birbirlerine oranlandı. Yarıçap tayini için ise hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra tripan mavisini ile muamele edilir ve ışık mikroskobu altında her iki gruptan rastgele çekilen 5'er fotoğraftan toplamda 50'şer hücrenin yarıçapı Image-J programı ile ölçüldü. Tripan mavisini ile boyanan ölü hücreler bu işlemlerde dikkate alınmadı.

3.2.1.5. Real-Time PCR

Schwann hücre işaretçilerine ait gen ekspresyonu analizi için Total RNA Purification Plus Kit (NORGEN-Total RNA Purification Plus Kit) izolasyonu kiti ile üreticinin protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Gen ekspresyon analizi için adipoz kök hücreler ve schwann benzeri hücreler 6'lık hücre kültür kabında 2'şer kuyuya, kuyu başına 1×10^5 hücre olacak şekilde uygun hücre kültür ortamı ile ekildi ve hücrelerin kuyularda tam doluluk oranına ulaşması için 3 gün beklendi. İzolasyon öncesi hücre kültür ortamı aspire edildikten sonra ölü hücrelerin ve metabolitlerin uzaklaştırılması için kuyular soğuk HBSS ile yıkandı. HBSS'in uzaklaştırılmasının ardından kit protokolüne uygun bir şekilde kuyu başına

350µl RL tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika boyunca çalkalayarak hücre lizatlarının homejenizasyonu sağlandı. Elde edilen hücre lizatları kitten çıkan gDNA Removal Column'lara alınarak 14000g hızında 1 dakika santrifüj edilerek genomik DNA'nın uzaklaşması sağlandı. Tüplerde kalan örneklerin her bir 100µl'si için 60µl %100'lük etanol eklendi ve elde edilen karışım RNA Purification Column'lara alındı. Kolonlar 3500g hızında 1 dakika santrifüj edildi ve RNA örneklerinin kolon membranına bağlanması sağlandı, işlem sonunda tüpün altında biriken karışım atıldı. Ardından kolon başına 400µl Wash solution A eklenerek 1 dakika 3500g hızda santrifüj edildi ve tüpte biriken sıvı atıldı. Bu işlem 2'defa daha tekrarlandı ve ardından kolonlar kurumaları için 2 dakika 14000g hızında santrifüj edildi. Kuruma işlemi ardından kolon başına 50ul Elution Solution A eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika membranların solüsyonu emmesi beklendi. Ardından kolonlar santrifüjde önce 200g hızında 2 dakika ardından 14000g hızında 1 dakika santrifüj edildi tüpte elde edilen örnekler Nanodrop cihazında okunarak RNA düzeyleri belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10. Örneklere ait nanodrop okumları, u1; adipoz 1, u2;adipoz 2, d1;schwann benzeri 1, d2; schwann benzeri

Kit protokolüne uygun olarak örnekler öncelikle 1900 ng olacak şekilde pipetlenerek hacimleri uygun miktar nükleaz içermeyen su ile toplam 8µl'ye tamamlandı. Tablo 7'de gösterildiği şekilde her örnek için toplamda 8µl'lik karışım elde edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

cDNA Sentezi: Örneklerden cDNA sentezi OneScript® cDNA Synthesis Kit (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit) kullanıldı.

Tablo 7. cDNA sentezi öncesi alınan örnek miktarlar ve reaksiyon karşımı.

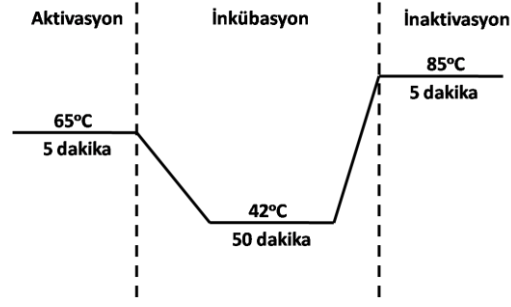
| Örnek | RNA Kons (ng/µl) | Örnek Hacmi (1900ng) | Su (µl) | AccuRT Reaction Mix (4x) | Toplam (µl) |
|----------------------|------------------|----------------------|---------|--------------------------|-------------|
| u1 (adipoz) | 373,5 | 5,08 | 0,92 | 2 | 8 |
| u2 (adipoz) | 327,8 | 5,79 | 0,21 | 2 | 8 |
| d1 (schwann benzeri) | 464,8 | 4,08 | 1,92 | 2 | 8 |
| d2 (schwann benzeri) | 398 | 4,77 | 1,23 | 2 | 8 |

Süre sonunda her bir örneğe 2 µl AccuRT Reaction Stopper (5X) eklenerek toplam hacim 10µl olarak elde edildi (Tablo 8). Ardından her bir örnek reaksiyon karşımı 20µl olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 8. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon karşımı.

| Örnek | Hacim (µl) | Oligo (µl) | dNTP (µl) | 5x RT Buffer(µl) | RnaseOFF (µl) | OneScript Rtase(µl) | Su (µl) | Toplam (µl) |
|----------------------|------------|------------|-----------|------------------|---------------|---------------------|---------|-------------|
| u1 (adipoz) | 10 | 1 | 1 | 4 | 0,5 | 1 | 2,5 | 20 |
| u2 (adipoz) | 10 | 1 | 1 | 4 | 0,5 | 1 | 2,5 | 20 |
| d1 (schwann benzeri) | 10 | 1 | 1 | 4 | 0,5 | 1 | 2,5 | 20 |
| d2 (schwann benzeri) | 10 | 1 | 1 | 4 | 0,5 | 1 | 2,5 | 20 |

Ardından örnekler şekil 11'de belirtilen programa uygun olarak muamele edildi. Son ürünler üzerine 100ul nükleaz içermeyen su eklenerek çalışma konsantrasyonu elde edildi.



Şekil 11. cDNA sentezinde kullanılan termal cycler programı.

Farklı nişlerden elde kök hücrelerin schwann benzeri fenotip kazandırıldıktan sonra gerçek schwann hücrelerine ait bazı gen ifadelerinde benzer profil gösterdikleri bilinmektedir (Orbay ve ark, 2015; Sun ve ark, 2018; Wei ve ark, 2010). Çalışmamızda sıçanlardan elde edilen adipoz kök hücrelere schwann benzeri farklılaştırma protokolü uygulandıktan sonra işlemin başarılı olup olmadığını anlamak için schwann hücrelerinde bulunan P75, s100 ve bir büyüme faktörü olan NGF düzeyleri RT-PCR metodu ile incelendi. Bu incelemede 18s housekeeping gen olarak kullanıldı, çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primerler Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri.

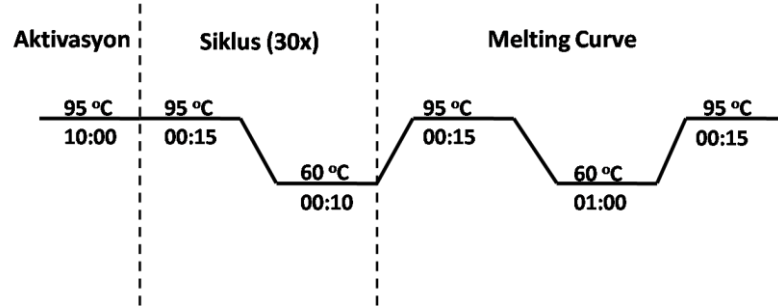
| Gen | Foward | Reverse |
|------|-------------------------|-----------------------|
| p75 | AGGGATGGCGTGACTTTC | GTTGGCTTCAGGCTTATGC |
| NGF | TGCATAGCGTAATGTCCATGTTG | CTGTGTCAAGGGAATGCTGAA |
| s100 | TGCCCTCAGTTTGTGCAGAATA | CCAACGCAAGGAACTCTTCGA |
| 18s | GCAATTATTCCCATGAACG | GGCCTCACTAAACCATCCAA |

RT-PCR işlemlerinde BrightGreen 2X qPCR MasterMix-Low ROX isimli hazır reaksiyon karışımı kullanıldı. Her bir örnek için kitin önerdiği şekilde 10µl’lik reaksiyon karışımları aşağıdaki protokole uygun olarak hazırlandı (Tablo 10).

Tablo 10. Her bir kuyuda kullanılan reaksiyon karışımının içeriği

| Bileşen | Miktar (ul) |
|-------------------------------|-------------|
| BrightGreen 2X qPCR MasterMix | 5 |
| Primer Mix | 0,2 |
| Template DNA | 0,5 |
| Nükleaz İçermeyen Su | 4,3 |
| Toplam | 10 |

Her bir örneğe ait genler tripliket olarak çalışıldı ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunuldu.



Şekil 12. Deneylerde kullanılan RT-PCR programı.

3.3.1. In vivo Uygulamalar

Hayvan deneyleri, Yerel Etik kurul onayı (64583101/2017/087) alındıktan sonra Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deneylerde yaklaşık 250g (\pm 30 gr) olan Wistar Albino cinsi 42 adet sıçan, denek olarak kullanıldı. Tüm çalışma grupları standart ışık (12 saat günışığı/12 saat karanlık, $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, %45- 65 nem) ve ısı koşullarında tutuldu. Hayvanların *ad libitum* beslenme koşulları sağlandı.

Kontrol Grupları

a)Sham Kontrol – K grubu (n=6): Sağlıklı hayvanlardan oluşturuldu siyatik sinir açılıp deney gruplarında olduğu gibi boş 4µl hacminde hücre medyumu + matrigel karışımı sinire enjekte edilip, 6-0 sütür ile işaret düğümü atıldı. Kapatma işleminin öncesinde sinire 4µl hacimlik bolus enjeksiyon (matrigel + hücre kültür ortamı) gerçekleştirildi. Elektriksel stimülasyon uygulanmadı. Elektriksel stimülasyon uygulanmadı.

b)Sinir Hasarı Uygulaması – H grubu (n=6): Bu gruptaki deneklerde sol bacak siyatik siniri açıldıktan sonra altından dinamometre kancası geçirilerek 50g şiddetinde çekme kuvveti ayarlandı. Daha sonra gergin haldeki siyatik sinir yaklaşık 1 mm mesafeyle 2 farklı noktadan malleus pensi yardımı ile sıkılarak sinir liflerinin kopması sağlandı. Hasar bölgesinin daha sonra takip edilebilmesi için bölgenin yaklaşık 0,5 cm ötesine epinöryum üzerinde 6-0 sentetik sütür ile tek düğümlük işaret dikişi atıldı. Kapatma işleminin öncesinde hasar bölgesinin 0,5 cm kadar distaline 4µl hacimlik bolus enjeksiyon (matrigel + hücre kültür ortamı) gerçekleştirildi. Elektriksel stimülasyon uygulanmadı.

Deney Grupları

c)Sinir Hasarı + Schwann Benzeri Hücreler – S grubu (n=6): Bu gruptaki deneklerde sol bacak siyatik siniri açıldıktan sonra altından dinamometre kancası geçirilerek 50g şiddetinde çekme kuvveti ayarlandı. Daha sonra gergin haldeki siyatik sinir yaklaşık 1 mm mesafeyle 2 farklı noktadan malleus pensi yardımı ile sıkılarak sinir liflerinin kopması sağlandı. Hasar bölgesinin daha sonra takip edilebilmesi için bölgenin yaklaşık 0,5 cm ötesine epinöryum üzerinde 6-0 sentetik sütür ile tek düğümlük işaret dikişi atıldı. Kapatma işleminin öncesinde hasar bölgesinin distaline 4µl hacim içerisinde yaklaşık 8×10^5 Schwann-benzeri hücrenin ekimi gerçekleştirildi. Elektriksel stimülasyon uygulanmadı.

d)Sinir Hasarı + Adipoz Kök Hücreler – A grubu (n=6): Bu gruptaki deneklerde sol bacak siyatik siniri açıldıktan sonra altından dinamometre kancası geçirilerek 50g şiddetinde çekme kuvveti ayarlandı. Daha sonra gergin haldeki siyatik sinir yaklaşık 1 mm mesafeyle 2 farklı noktadan malleus pensi yardımı ile sıkılarak sinir liflerinin kopması sağlandı. Hasar

bölgesinin daha sonra takip edilebilmesi için bölgenin yaklaşık 0,5 cm ötesine epinöryum üzerinde 6-0 sentetik sütür ile tek düğümlük işaret dikişi atıldı. Kapatma işleminin öncesinde hasar bölgesinin distaline 4µl hacim içerisinde yaklaşık 8×10^5 adipoz kök hücrenin ekimi gerçekleştirildi. Elektriksel stimülasyon uygulanmadı.

e) Sinir Hasarı + Elektriksel Stimülasyon – H+E grubu (n=6): Bu gruptaki deneklerde sol bacak siyatik siniri açıldıktan sonra altından dinamometre kancası geçirilerek 50g şiddetinde çekme kuvveti ayarlandı. Daha sonra gergin haldeki siyatik sinir yaklaşık 1 mm mesafeyle 2 farklı noktadan malleus pensi yardımı ile sıkılarak sinir liflerinin kopması sağlandı. Hasar bölgesinin daha sonra takip edilebilmesi için bölgenin yaklaşık 0,5 cm ötesine epinöryum üzerinde 6-0 sentetik sütür ile tek düğümlük işaret dikişi atıldı ardından 60 dakika boyunca hasar bölgesinin proksimal ucundan 20 Hz 3V şiddetinde elektrik akımı uygulandı. Stimülasyon boyunca operasyon bölgesinin serum fizyolojik uygulaması ile kuruması engellendi. 1 saatlik elektriksel stimülasyonun ardından operasyon bölgesi kapatıldı. Kapatma işleminin öncesinde hasar bölgesinin 0,5 cm kadar distaline 4µl hacimlik bolus enjeksiyon (matrigel + hücre kültür ortamı) gerçekleştirildi.

f) Sinir Hasarı + Schwann Benzeri Hücreler + Elektriksel Stimülasyon – S+E grubu (n=6): Bu gruptaki deneklerde sol bacak siyatik siniri açıldıktan sonra altından dinamometre kancası geçirilerek 50g şiddetinde çekme kuvveti ayarlandı. Daha sonra gergin haldeki siyatik sinir yaklaşık 1 mm mesafeyle 2 farklı noktadan malleus pensi yardımı ile sıkılarak sinir liflerinin kopması sağlandı. Hasar bölgesinin daha sonra takip edilebilmesi için bölgenin yaklaşık 0,5 cm ötesine epinöryum üzerinde 6-0 sentetik sütür ile tek düğümlük işaret dikişi atıldı ardından 60 dakika boyunca hasar bölgesinin proksimal ucundan 20 Hz 3V şiddetinde elektrik akımı uygulandı. Stimülasyon boyunca operasyon bölgesinin serum fizyolojik uygulaması ile kuruması engellendi. 1 saatlik elektriksel stimülasyonun ardından kapatma işlemi öncesinde hasar bölgesinin distaline 4µl hacim içerisinde yaklaşık 8×10^5 schwann-benzeri hücrenin ekimi gerçekleştirildi.

g) Sinir Hasarı + Adipoz Kök Hücreler + Elektriksel Stimülasyon – S+A grubu (n=6): Bu gruptaki deneklerde sol bacak siyatik siniri açıldıktan sonra altından dinamometre kancası geçirilerek 50g şiddetinde çekme kuvveti ayarlandı. Daha sonra gergin haldeki siyatik sinir yaklaşık 1 mm mesafeyle 2 farklı noktadan malleus pensi yardımı ile sıkılarak sinir liflerinin kopması sağlandı. Hasar bölgesinin daha sonra takip edilebilmesi için bölgenin yaklaşık 0,5 cm ötesine epinöryum üzerinde 6-0 sentetik sütür ile tek düğümlük işaret dikişi atıldı ardından

60 dakika boyunca hasar bölgesinin proksimal ucundan 20 Hz 3 V şiddetinde elektrik akımı uygulandı. Stimülasyon boyunca operasyon bölgesinin serum fizyolojik uygulaması ile kuruması engellendi. 1 saatlik elektriksel stimülasyonun ardından kapatma işlemi öncesinde hasar bölgesinin distaline 4µl hacim içerisinde yaklaşık 8×10^5 adipoz kök hücrenin ekimi gerçekleştirildi.

3.3.1.1. Hasar Modelinin Oluşturulması

Sürekli nöroma hasarının oluşturulması için Alant ve ark. tarafından geliştirilen travmatik nöroma sinir hasar modeli uygulandı (Alant ve ark, 2012). Wistar-albino sıçanları 4:1 oranında %10'luk ketamin ve %2'lik xylazine (0.13 ml/ 100 gr) karışımı ile intraperitoneal enjeksiyon ile anestezi yapıldı. Operasyon bölgesindeki tüylerin traşlanması ve %20'lik iodin etil alkol çözeltisi ile disinfekte edilmelerinin ardından biceps femoris kası, femur ve diz eklemi posterior sınırı boyunca diseksiyon ile açıldı ve kenarları ekarte edilerek siyatik sinir ortaya çıkartıldı. Açığa çıkan siyatik sinirin altından dinamometre kancası geçirilerek 0,5 N şiddetinde çekme kuvvetine ayarlandı. Daha sonra gergin haldeki siyatik sinir yaklaşık 1-2 mm mesafeye 2 farklı noktadan malleus pensi yardımı ile sıkılarak sinir liflerinin kopması sağlandı. Hasar bölgesinin daha sonra takip edilebilmesi için bölgenin yaklaşık 0,5 cm ötesine perinöryum üzerinde 6-0 sentetik sütür ile tek düğümlük işaret dikişi atıldı.



Resim 3. Nöroma modelinin oluşturulması. Sinir 0,5 N kuvvetle gerildi (sol) ardından malleus pensi ile iki noktadan hasarlandı.

3.3.1.2. Elektriksel Stimülasyon

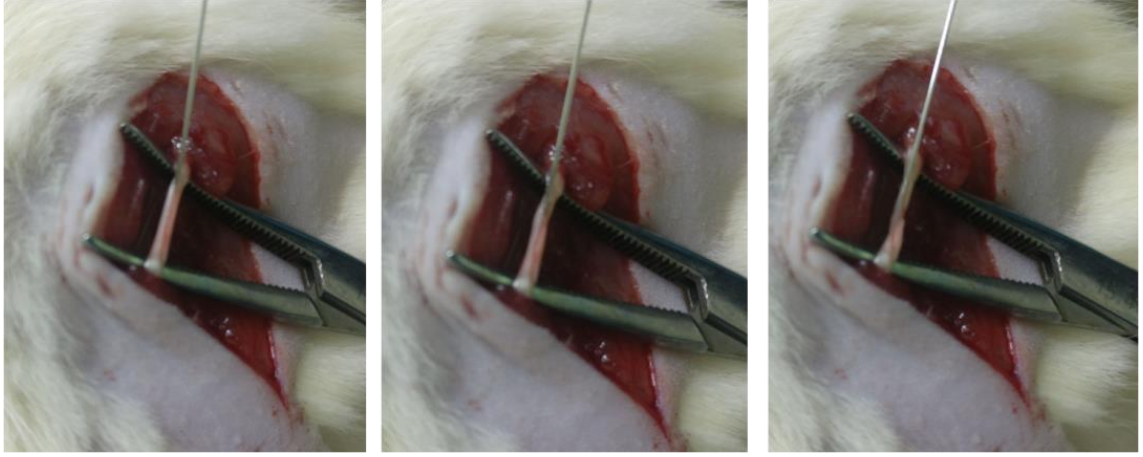
Elektriksel stimülasyon gruplarında ise Shapira ve arkadaşları tarafından kullanılan stimülasyon protokolü uygulandı (Shapira ve ark, 2019). Stimülatör cihaza bağlanan el yapımı Ag-AgCl kanca elektrotlar hasarlı sinir bölgesini araya alacak şekilde yerleştirildi. Agistim Duo Elektro-Akupunktur cihazının çıkışlarından 3 V şiddetinde 20 Hz şiddetine ayarlandı ve 1 saat boyunca aynı anda 3 hayvana uygulandı. Stimülasyon boyunca siyatik sinir serum fizyolojik ile muamele edilerek kuruması engellendi. Stimülasyonun ardından kaslar ve fasiya tabakaları 4/0 numara aboserbe edilebilen dikişler ile kapatıldı. Son olarak deri sütur ile kapatıldı.



Resim 4. Elektriksel stimülasyon uygulaması.

3.3.1.3. Siyatik Sinire Hücre Ekimi

Hücre ekimi için gruplara uygun olarak adipoz kök hücre veya schwann benzeri hücreler çalışma günü %0,25'lik Tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırıldıktan sonra santrifüj edilerek sayıldı. Sayım işleminin ardından hücreler hacmen 1:1 hücre medyumu ile sulandırılmış matrijel karışımında $12,5 \times 10^5$ hücre/ μ l olacak şekilde tekrar süspansedildi. Elde edilen hücre-matrijel karışımları ekim işlemi yapılana kadar $+4C^{\circ}$ 'de muhafaza edildi.



Resim 5. Siyatik sinire hücre enjeksiyonu.

Anestezi altında açığa çıkartılan siyatik sinir eğik ağızlı klemp yardımı ile hafifçe gerilerek enjeksiyona hazır hale getirildi. Hücre karışımından 5×10^5 hücre olacak şekilde (4 μ l) buz aküsü üzerinde soğutulmuş 27G Hamilton enjektörüne çekildi. Enjektör ucu yaklaşık 0.5 cm kadar sinire paralel olarak dikkatlice yerleştirildi ve hücre karşımı yavaşça enjekte edildi. Bu işlem sırasında epinöryum tabakasının bütünlüğünün bozulmamasına özen gösterildi. Enjektisyonun tamamlanmasının ardından matrijelin donması için 180 saniye boyunca enjektör ucu içeride tutuldu. Bu süre sonunca yavaşça çekildi, ameliyat bölgesi sütür ile kapatıldı. Elektriksel stimülasyon gruplarında hücre ekim işlemi 1 saatlik stimülasyon süresinin sonunda yapıldı. Sham kontrol grubunda ve sinir hasarı gruplarında deneklere aynı hacimde hücre içermeyen matrijel+hücre kültür ortamı karışımı enjekte edildi.

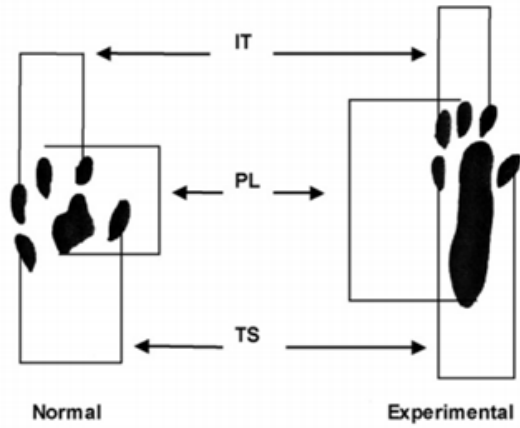
3.3.1.4. Siyatik Fonksiyon İndeksi

Deneklerde fonksiyonel iyileşmenin takibi için siyatik fonksiyon indeks takibi hasar modelinin oluşturulmasından sonra 2. hafta itibariyle başlayarak haftada 1 defa olmak üzere 6. haftaya kadar düzenli bir şekilde yapıldı.

Wistar-albino sıçanlarına ait arka ayak baskıları önceden hazırlanmış kağıt şeritler üzerinde %1'lik bromfenol mavisi aseton çözeltisi ile boyanarak yürütülmeleri ile elde edildi. Ayakların boyanmasının ardından deneklerin şeritler üzerinde yürümeleri sağlanarak her ayağa ait 3'er ayak izi oluşması sağlandı. Ayak izlerini içeren şeritlerin kurumasının ardından

yüksek çözünürlüklü tarayıcı yardımı ile görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı. Elde edilen bu görüntüler üzerinden siyatik fonksiyon analizi aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

Her deneğe ait veriler kendi içersinde değerlendirilerek, deneklerin zaman içindeki iyileşme düzeylerinin tespiti amaçlanmaktadır. Normal (N) ve deney grubu (E) hayvanlarına ait ayak baskı boyu (PL veya en uzun parmak ve topuk arası mesafe), parmak açıklığı (TS veya 1. ve 5. parmaklar arasındaki enine mesafe) ve orta parmak açıklığı (IT veya 2. ve 4. parmaklar arasında ki enine mesafe). Her parametreye ait şematik gösterim aşağıda verilmiştir. Uygun yazılımın kullanımı ile ölçüm değerleri otomatik olarak hesaplandı. Hesaplama için kullanılacak formül de aşağıda verilmiştir.



$$SFI = -38.3 \times \frac{EPL-NPL}{NPL} + 109.5 \times \frac{ETS-NTS}{NTS} + 13.3 \times \frac{EIT-NIT}{NIT} - 8.8$$

Şekil 13. Siyatik fonksiyon indeksi uygulamasında parmak aralıklarının belirlenmesi ve hesaplamada kullanılan formül (Monte-Raso ve ark, 2008).

3.3.1.5. Bileşik Kas Aksiyon Potansiyeli , Sinir İleti Hızının Tayini ve Islak Kas Ağırlığı

Deneklerde sürekli nöroma modelinin gerçekleştirilmesinin ardından 6 haftalık iyileşme sürecinin sonunda elektrofizyolojik ölçümler ile sinir ileti hızları hesaplandı. Bu ölçümlerde denekler 100mg/kg ketamin ve 12,5mg/kg ksilazin ile intraperitoneal olarak anestezi altında gerçekleştirildi. Yaklaşık 3 cm büyüklüğünde bir kesi ile siyatik sinir ortaya çıkartıldı. Sinir hasar bölgesinin ortaya alınmasının ardından Biopac MP100 sistemine bağlanan aralarında 1,1 cm sabit uzaklık bulunan *in vivo* elektrotlar ile supramaksimal şiddete (7mV şiddetinde 1ms) süreyle uyarı verildi 2 ve 4. Parmakların arasına subdermal olarak yerleştirilen iğne elektrodlar yardımıyla birleşik aksiyon kas potansiyeli kayıt edildi. Elde edilen kas aksiyon potansiyelleri AcqKnowledge Software isimli yazılım aracılığı ile

incelenerek distal latans ve proksimal latans değerleri ölçüldü. Bu değerler kullanılarak sinir ileti hızları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Δ Latans: Proksimal Latans – Distal Latans (s)

Δ Mefase: Proksimal Mesafe – Distal Mesafe (m): 1,1 cm

Sinir İletim Hızı: Δ Mesafe / Δ Latans (m/ s)

Bileşik kas aksiyon potansiyelleri her bir denek için Proksimal Genlik/Distal Genlik olacak şekilde oranlandı ve istatistiksel olarak incelendi. Elektrofizyolojik ölçümlerin ardından gastrokimijs kası izole edildi ve gazlı bezle kurulandıktan sonra kas kütesinin ölçümü atropiyi ve kas geri kazanımını gruplar arasında tespit etmek için hassas terazi ile ölçüldü.

3.4. Histolojik İnceleme

Çalışmanın histolojik doku takibi, kesitlerin alınması ve fotoğraflama işlemleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D. Elektron Mikroskopi Laboratuvarında, aynı Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi olan Doç. Dr. Gamze TANRIVERDİ gözetiminde yapılmıştır. Milloning Tampon çözeltisi ile seyreltilmiş, %4'lük Glutaraldehit içerisinde ulaştırılan doku örnekleri 1 gece boyunca +4 °C'de bekletilerek fikse olmaları sağlandı. Ertesi gün doku örnekleri her biri 1mm³ büyüklüğünde olacak şekilde ikinci kez küçültüldü. Yine milloning tampon çözeltisi ile seyreltilmiş, %1'lik Osmium tetroksit (OsO₄) ile ikinci fiksasyonun ardından yükselen alkol serilerinden geçirilerek araldit içerisine gömüldü. Yaklaşık olarak 200 mikrometre kalınlığında ve ultramikrotom yardımı ile alınan kesitler Toluidin mavisi ile boyandı ve ısıtıcılı plaka üzerinde kurumaya bırakıldı. Suyu giderilen kesitler Toluen ile kapatıldı ve Olympus BX61 model araştırma mikroskobu ile incelenip Olympus DP71 kamera yardımı ile fotoğraflandı. Her denekten alınan 5 kesitten rastgele 1 tanesi seçildi ve bu kesitten ise rastgele 5 aksona ait miyelin kılıf kalınlığı ve akson çapı Olympus CellSens Standart programı kullanılarak ölçüldü. Böylece her bir grup için toplamda 30 adet aksona ait veri toplandı ve değerlendirildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

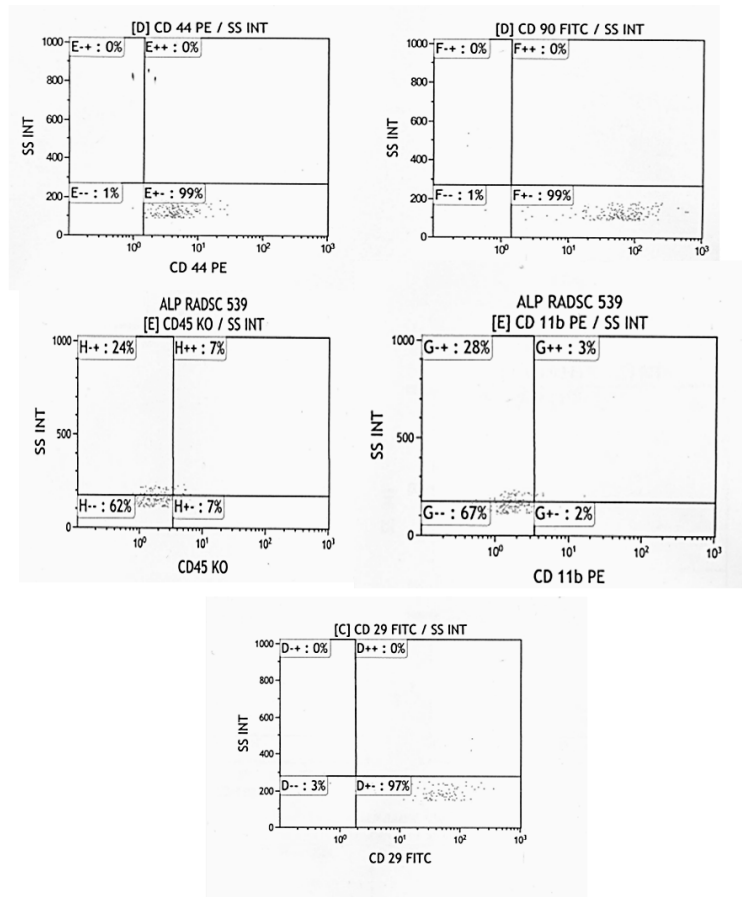
Elde edilen tüm veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verildi. Çalışmamızın istatistiksel analizleri Graphpad Prism version 8.4.2. sürümü kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarında iki grup arası karşılaştırmalar Student t testi ile yapıldı. Hayvan deneylerinde değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları tespit edildikten sonra istatistiksel değerlendirme için tek yönlü varsans analizi ve artçı test olarak Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi kullanılarak gruplar birbirleriyle karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılık *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$ şeklinde ifade edildi. Bu karşılaştırılma sonrasında istatistiksel anlamlılık derecesi gösterilirken hasar grubuna göre olan istatistiksel anlamlılık * işareti ile hasar + elektrik stimülasyonu grubuna göre olan istatistiksel anlamlılık α , adipoz kök hücre grubuna göre olan istatistiksel anlamlılık ise β işareti ile gösterilmiştir

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü

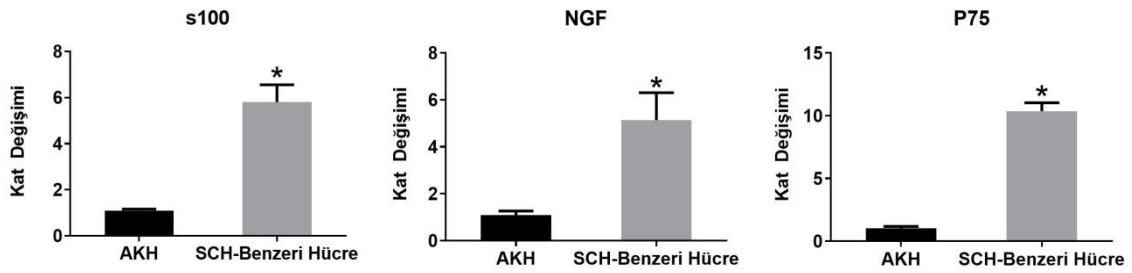
4.1.1. Adipoz Kök Hücrelerin Akış Sitometri Metodu ile Tayini

Adipoz kök hücrelerin tespit edilmesi için CD44, CD90, CD45, CD11b ve CD29 yüzey antijenlerinin oranları incelendi. Sonuç olarak hücrelerimizde kök hücre işaretçileri olan %99 CD44 (+), %99 CD90 (+) ve %97 CD29(+) pozitif bulunurken hematopoetik kök hücre işaretçisi %88 CD45(-) ve kemik iliği kök hücre işaretçisi %95 CD11b(-) negatif olarak bulundu (Şekil 14).



Şekil 14. Akış sitometri metodu ile incelenen hücre yüzey işaretçilerinin popülasyon yüzdeleri.

4.1.2. Schwann Benzeri Hücrelerin RT-PCR Metodu ile Tayini



Şekil 15. Schwann-benzeri hücrelerde s100, NGF ve P75 genlerine kat değişim değerleri.* işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Adipoz kök hücreler (AKH) ile karşılaştırıldığında elde ettiğimiz schwann-benzeri hücre (SCH-Benzeri Hücre) popülasyonunda schwann hücre işaretçisi s100' ait kat değişimi $5,808 \pm 0,7461$ ($p < 0,05$) ve p75'e ait kat değişimi $10,36 \pm 0,6672$ ($p < 0,05$) ve NGF'e ait kat değişimi $5,138 \pm 1,163$ ($p < 0,05$) olarak bulundu. Deneylerde 18s housekeeping gen olarak kullanıldı (Tablo 11 ve Şekil 15).

Tablo 11. Schwann-benzeri kök hücrelerde tespit edilen s100, NGF ve P75 fold-change değerleri. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. * işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

| Gen | AKH Ortalama±SEM | SCH-Benzeri Hücre Ortalama±SEM |
|-------------|---------------------|--------------------------------------|
| S100 | 1,09±0,067 | 5,80±0,746* |
| NGF | 1,08±0,181 | 5,138±1,16* |
| P75 | 1,03±0,138 | 10,36±0,667* |

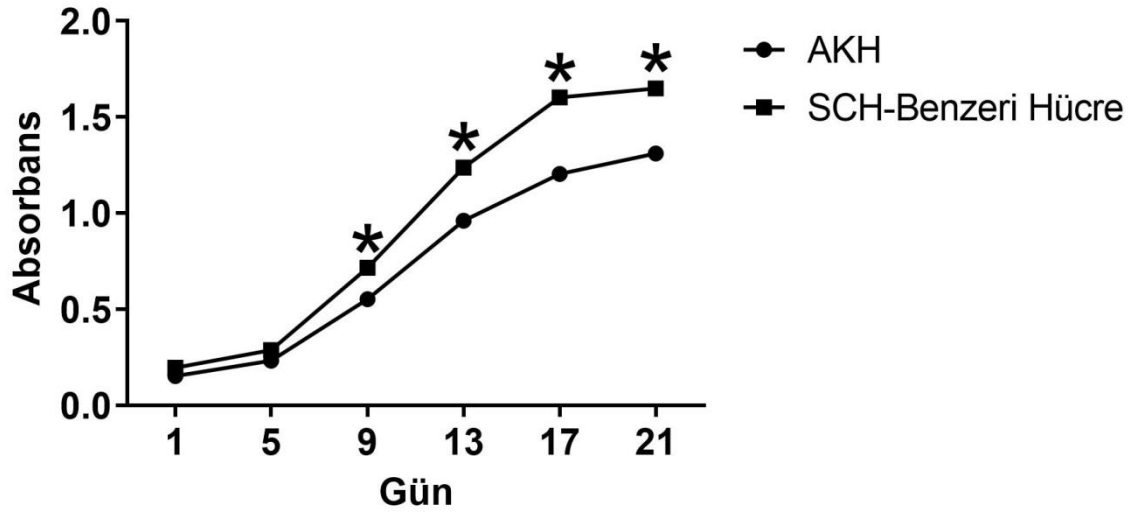
4.1.3. Proliferasyon

Çalışmamızda adipoz kök hücrelerin ve onlardan elde edilen schwann benzeri hücrelerin proliferasyon hızları 21. gün boyunca 4 günlük aralıklarla MTT testi ile incelendi. Sonuç olarak 9. günden itibaren schwann benzeri hücrelerin proliferasyon hızının anlamlı bir şekilde artış gösterdiği gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 12).

Tablo 12. Hücre popülasyonlarının sahip belirlenen günlerde sahip oldukları absorbans değerleri. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. * işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

| Gün | AKH | SCH-Benzeri Hücre |
|-----|--------------|-------------------|
| 1 | 0,15±0,002 | 0,19±0,002 |
| 5 | 0,23±0,003 | 0,28±0,003 |
| 9 | 0,55±0,008* | 0,71±0,021 |
| 13 | 0,96±0,015* | 1,23±0,008 |
| 17 | 1,20±0,009* | 1,60±0,013 |
| 21 | 1,31±0,0150* | 1,64±0,013 |

9. günden itibaren istatistiksel fark gösteren proliferasyon hızları gruplarda 17. günde plato evresine yaklaşmıştır (Şekil 16).



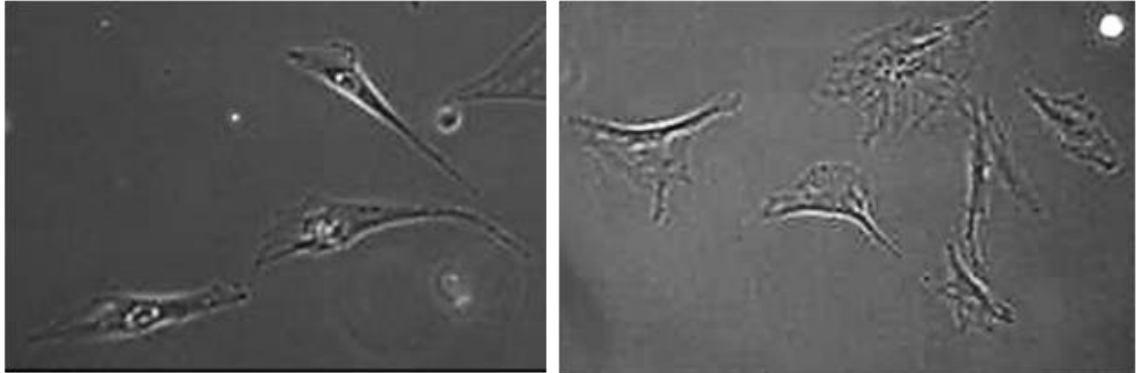
Şekil 16. MTT absorbans değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması. * işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

4.1.4. Morfolojik İnceleme

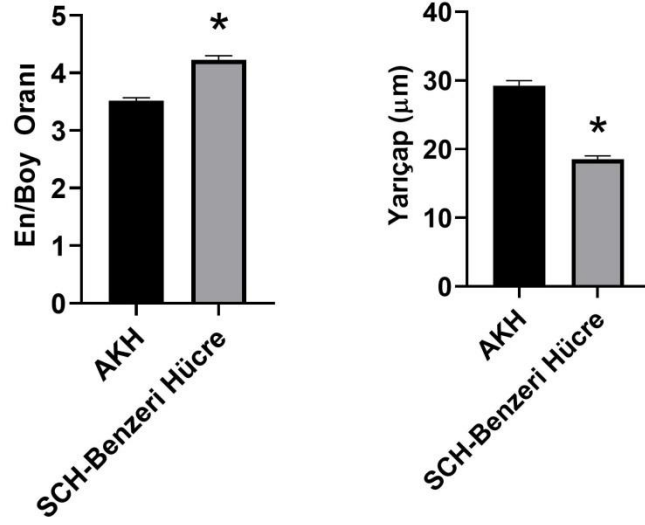
Tablo 13. Morfolojik incelemelere ait değerlerine ait aritmetik ortalama, ortalamanın standart hatası. En/boy oranı (sol) ve tripsinize hücre yarıçapı (sağ). Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. * işareti AKH vs SCH-Benzeri hücrelerine göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

| | En/Boy Oranları | | Hücre Yarıçapları (μm) | | |
|----------|-----------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|--------|
| | APK | SCH Benzeri Hücre | APK | SCH Benzeri Hücre | |
| Minumum | 3,08 | 3,61 | Minumum | 19,41 | 12,37 |
| Maksimum | 4,05 | 4,92 | Maksimum | 43,98 | 28,52 |
| Ortalama | 3,51 | 4,22* | Ortalama | 29,26 | 18,51* |
| SEM | 0,05 | 0,07 | SEM | 0,73 | 0,48 |

Flasklara tutunan hücrelerde hücre çekirdeği merkez alınarak en geniş ve en dar sitoplazmik uzantılarının boyları oranlandığında adipoz kök hücrelere ait oranlar $3,513 \pm 0,05721$ ve schwann benzeri hücreler için $4,228 \pm 0,07214$ ($p < 0,05$) olarak tespit edildi. Tripsinizasyon ardından hücrelerin yarıçapları karşılaştırıldığında ise adipoz kök hücrelerin yarıçapları $29,26 \pm 0,73 \mu\text{m}$ ve schwann-benzeri hücrelerin yarıçapı $18,51 \pm 0,48 \mu\text{m}$ olarak tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 13 ve Şekil 17).



Resim 6. Schwann-benzeri hücreler (sol), adipoz kök hücreleri (sağ)



Şekil 17. Hücelere ait en/boy oranları ve yarıçap değerlerinin grafiksel görünümü. * işaretleri AKH vs SCH-Benzeri hücelere göre istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

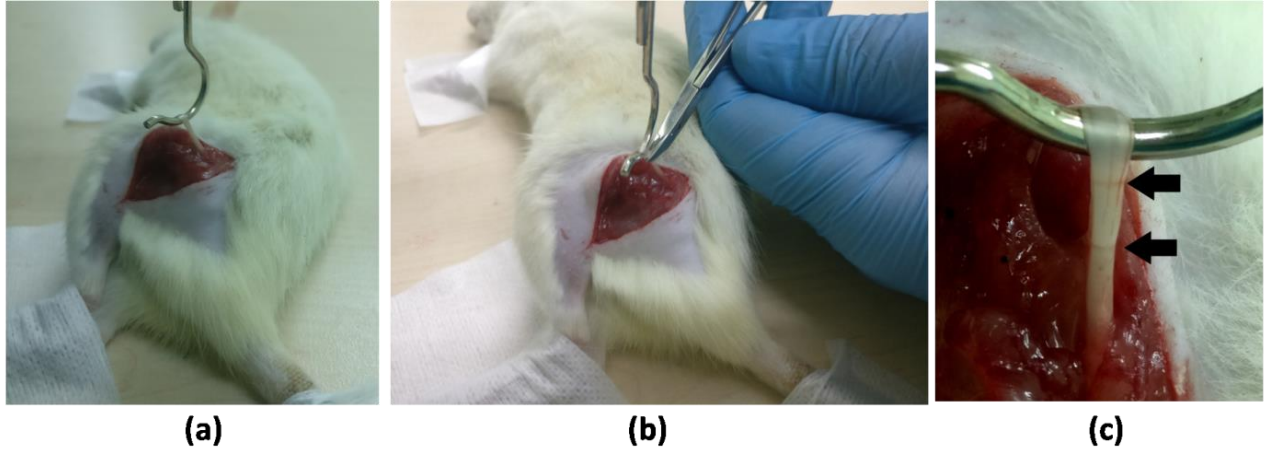
4.2. Hayvan Deneyleleri

4.2.1. Sürekli Nöroma Modeli

Sol siyatik sinirin 50N şiddetinde gerilip malleus pensi ile iki farklı noktadan sıkılmasının ardından ameliyat bölgesi suture ile kapatıldıktan 1 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edildi (Resim 7). 3 farklı hayvandan alınan elektrofizyoloji ölçümleri karşılaştırıldı sağlıklı sağ tarafa ait sinir ileti hızı ve CMAP değeri ile karşılaştırıldı. 1 haftanın sonunda hasar modelinin oluşturulduğu sağ tarafta CMAP $0,5 \pm 0,13$ ve ileti hızı $12,32 \pm 0,45$ olarak bulundu (Tablo 14).

Tablo 14. Sürekli nöroma modeline ait CMAP ve sinir ileti hızı değerlerinin sağlıklı sinir ile karşılaştırılması

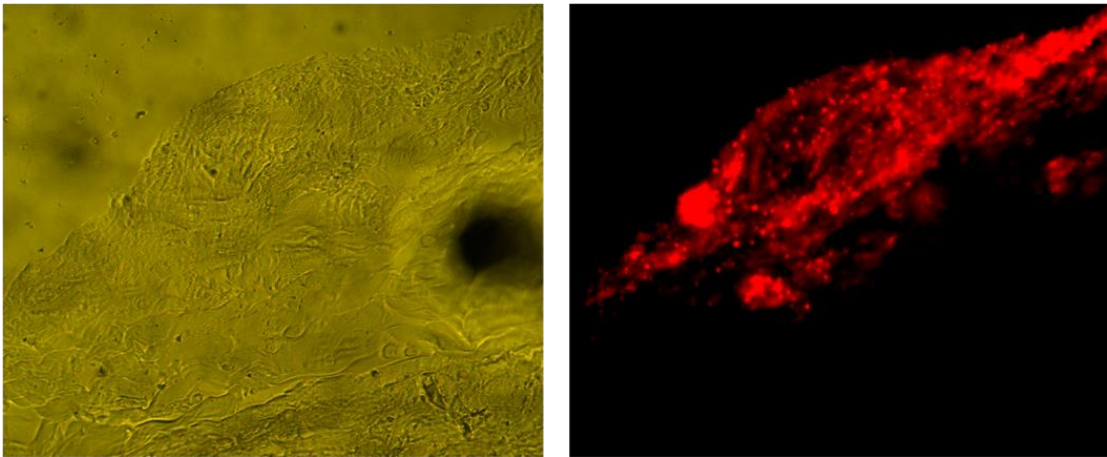
| | Genlik (mV) | Sinir İleti Hızı (m/sn) |
|-----|-----------------|-------------------------|
| Sağ | $0,5 \pm 0,13$ | $12,32 \pm 0,45$ |
| Sol | $3,96 \pm 0,22$ | $62,31 \pm 0,21$ |



Resim 7. Sürekli nöroma modelinin oluşturulması, (a) siyatik sinir 0,5 N şiddetinde kuvvet ile gerildi, (b) malleus pensi ile siyatik sinir iki farklı bölgeden sıkıştırıldı, (c) iki farklı bölgede sinir hasarı görsel olarak tespit edildikten sonra deneyler için gerekli işlemlere devam edildi.

4.2.2 Siyatik Sinire Hücre Ekimi

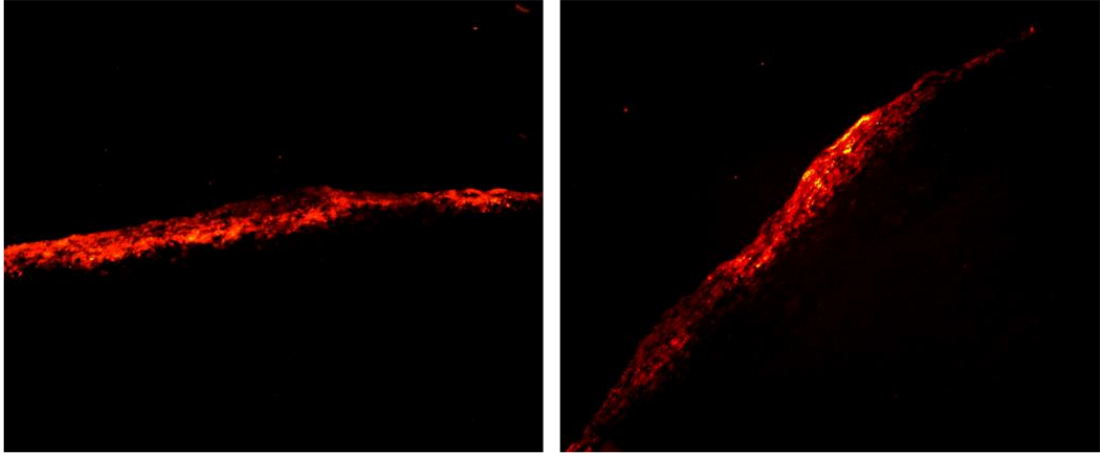
Hücre ekim işleminin ardından bölgede tutulumun tayin edilebilmesi için PKH26 floresans boyası ile boyanmış adipoz kök hücreler ve schwann benzeri hücrelerin ekimi yapıldıktan 1 hafta sonra hücrelerin enjeksiyon bölgesindeki varlıkları mikroskopik olarak incelendi.



Resim 8. PKH26 boyalı adipoz kök hücrelerin enjeksiyon bölgesinde tutunumları (1. Gün)

İlk olarak yapılan ön çalışmada PKH26 (λ_{ex} 551nm; λ_{em} 567nm) boyalı adipoz kök hücre 12.500 hücre/ μ l olacak şekilde dilüe edildikten sonra 4 μ l hacimde (yaklaşık 50×10^3 hücre) siyatik sinire enjekte edildi. Hücrelerin tutulumu 1 gün sonra alınan siyatik sinir

dokusunun soğutmalı mikrotomda kesitleri alındıktan sonra floresans mikroskopisi ile incelendi (Resim 9).



Resim 9. PKH26 boyalı adipoz kök hücrelerin (sol) ve schwann benzeri hücrelerin (sağ) enjeksiyon bölgesindeki görünüşleri (1. Hafta)

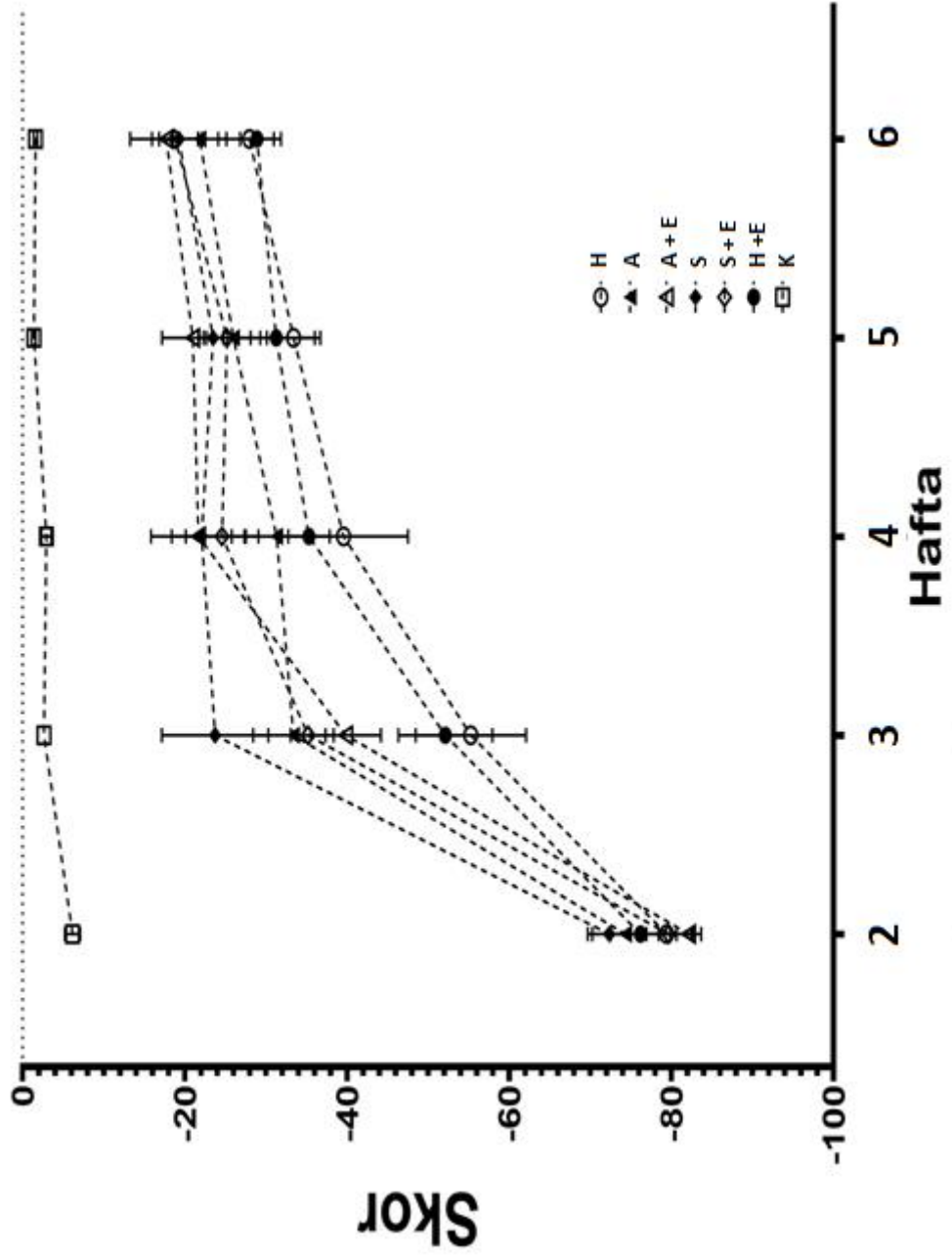
Tablo 15. 1. Haftanın sonunda ekilen hücreler tarafından yayılan floresans yoğunluğu

| | Birleşik Yoğunluk | Alan | Arka Plan | Düzeltilmiş Floresans Yoğunluğu |
|------------------------------|-------------------|---------|-----------|---------------------------------|
| Schwann-Benzeri Hücre | 96681741 | 5041312 | 16,39 | 14054637,32 |
| Adipoz Kök Hücre | 71993646 | 5041312 | 11,27 | 15142770,58 |

Ön denemelerde başarılı bir şekilde görüntü alınmasının ardından bir önceki protokole uygun bir şekilde hazırlanan adipoz kök hücreler ve schwann benzeri hücreler hücre 12.500 hücre/ μ l olacak şekilde dilüe edildikten sonra 4 μ l hacimde (yaklaşık 50×10^3 hücre) siyatik sinire enjekte edildi. Enjeksiyonun ardından 1 hafta sonunda hücrelerin bölgede tutulumlarının devam ettiği görüldü (Resim 9). Boyalı hücrelerin floresans ışımaya şiddetleri hesaplanarak karşılaştırıldığında ışımaya şiddetleri arasında büyük bir fark tespit edilmedi (Tablo 15).

4.2.3. Siyatik Fonksiyon İndeksi

2. haftadan itibaren alınan siyatik fonksiyon indeks skorlarına göre takip süresi boyunca hasar grubuna ait skor tüm gruplardan küçük olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak deneylerin özellikle 3. Haftasından itibaren hücre ekimi yapılan bütün grupların SFI skorları ile hasar ve hasar + elektrik gruplarının SFI skorları arasında birer grup haline geldiği ve deneyin sonuna kadar gittiği görülmektedir.



Şekil 18. Haftalık siyatik fonksiyon indeks skoları. Skorun 0'a yaklaşması iyileşmeyi gösterir.

Tablo 16. Gruplara ait haftalık siyatik fonksiyon indeks skoları

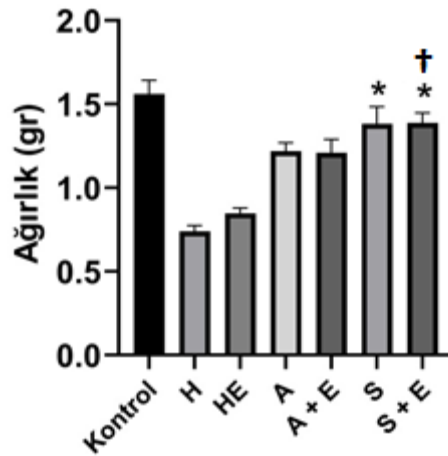
| Hafta | K | | H | | H +E | | A | | A +E | | S | | S + E | |
|-------|-------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|-------|--------|------|--------|------|
| | Ort. | SEM | Ort. | SEM | Ort. | SEM | Ort. | SEM | Ort. | SEM | Ort. | SEM | Ort. | SEM |
| 2 | -6,20 | 0,94 | -79,40 | 3,23 | -76,20 | 3,66 | -74,32 | 4,08 | -82,1 | -1,50 | -72,35 | 2,66 | -79,68 | 2,76 |
| 3 | -2,60 | 0,67 | -55,30 | 6,8 | -52,10 | 5,79 | -33,4 | 4,95 | -39,9 | 4,33 | -23,73 | 6,56 | -35,20 | 2,14 |
| 4 | -2,90 | 0,61 | -39,60 | 7,95 | -35,30 | 2,54 | -31,3 | 3,97 | -21,7 | 5,84 | -22,08 | 3,70 | -24,59 | 4,48 |
| 5 | -1,40 | 0,25 | -33,40 | 3,29 | -31,30 | 4,75 | -26,00 | 3,32 | -21,00 | 3,78 | -23,48 | 1,80 | -25,19 | 2,91 |
| 6 | -1,60 | 0,23 | -28,00 | 3,87 | -28,90 | 2,00 | -21,80 | 3,28 | -17,70 | 4,44 | -19,25 | 2,42 | -18,77 | 2,82 |

4.2.4. Islak Kas Ağırlığı

6 haftalık iyileşme süresinin sonunda sakrifiye edilen hayvanlardan elde edilen gastrokinemius kaslarının ıslak ağırlıkları karşılaştırıldı. Tedavi görmeyen hasar grubunda şiddetli kas atrofisi olduğu gözlemlendi. Diğer gruplarda ise hasar grubuna oranla kas hacminde gözle görülür bir artış tespit edildi. Kaslara ait ıslak ağırlıklar hassas terazi ile ölçüldü (Tablo 17).

Tablo 17. Deney gruplarına ait ıslak kas ağırlıklarına ait aritmetik ortalama, ortalamanın standart hatası

| | Kontrol | H | H + E | A | A + E | S | S + E |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------------------|
| Minumum | 1,311 | 0,6362 | 0,7637 | 1,019 | 1,011 | 1,172 | 1,239 |
| Maksimum | 1,812 | 0,8375 | 0,9695 | 1,398 | 1,586 | 1,862 | 1,563 |
| Ortalama | 1,560 | 0,7385 | 0,8482 | 1,220 | 1,209 | 1,383* | 1,387* [†] |
| Ortalamanın Stardart Hatası (SEM) | 0,08127 | 0,03581 | 0,03166 | 0,04957 | 0,08067 | 0,1004 | 0,06108 |

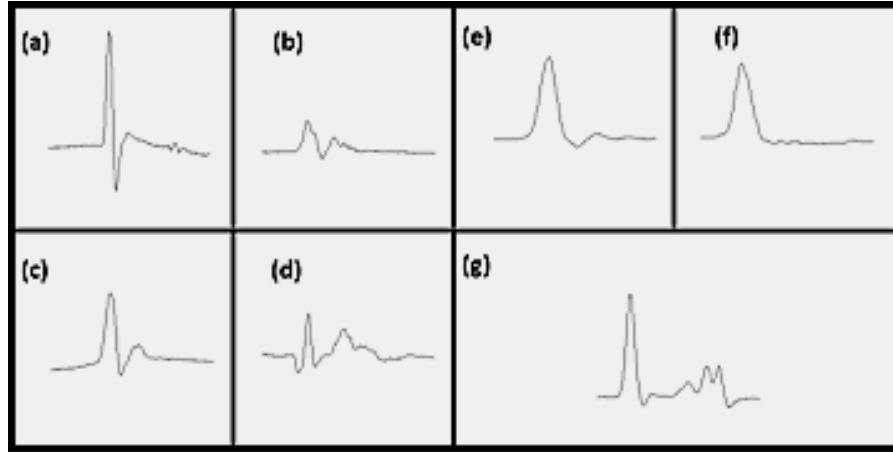


Şekil 19. Islak kas ağırlıklarının gruplar arasındaki görünümü. * işareti H vs S ve H vs S+E , † işareti H+E vs S+E grupları arasında istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Gruplar çoklu karşılaştırma testleri ile değerlendirildiğinde H vs S grupları, H vs S + E grupları ve H+E vs S+E grupları arası ($p<0,05$) olarak tespit edildi (Şekil 19). Diğer tedavi gruplarında da H grubuna oranda bir artış sağlanmış olsa da istatistiksel anlam bulunamadı.

4.2.5. Elektrofizyolojik Ölçümler

Tüm deney gruplarındaki deneklere ait sinir ileti hızı ölçümleri deney sonunda gerçekleştirilmiştir. Şekil 20’de her bir deney grubundan elde edilen aksiyon potansiyeli grafiklerinden örnekler sunulmuştur.



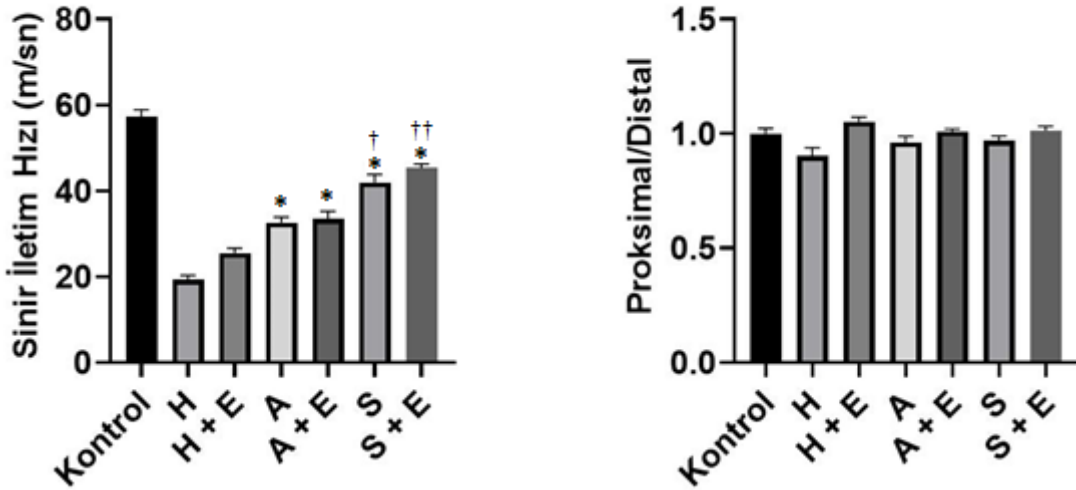
Şekil 20. Gruplara ait aksiyon potansiyeli kayıtlarından örnekler. (a)kontrol, (b) hasar, (c) hasar + elektrik, (d) adipoz kök hücre, (e) adipoz kök hücre + elektrik, (f) schwann benzeri hücre, (g) schwann benzeri hücre + elektrik. (3mV ve 50 ms çözünürlük)

Elde edilen sonuçlara göre, oluşturulan siyatik sinir hasar modelinde elektriksel stimülasyon ortalama sinir ileti hızında bir artış göstermiş olsa da bulunan bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak adipoz kök hücre ekimiyle sinir iletim hızında anlamlı bir artışa sebep olmuştur (Tablo 15, $p<0,05$). Adipoz kök hücre ekimi önce uygulanan elektriksel stimüasyondaki artışın istatistiksel anlamlılığı ise daha yüksek olarak bulunmuştur ($p<0,01$). Adipoz kök hücre ekimi ile adipoz + elektriksel stimülasyon uygulaması arasında ise az bir fark olmasına karşın bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 18. D deney gruplarına ait sinir ileti hızlarının (m/sn) aritmetik ortalama, ortalamanın standart hataları. (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$)

| | Kontrol | H | H + E | A | A + E | S | S + E |
|-----------------------|---------|-------|-------|--------|--------|---------|---------|
| Minumum | 47,83 | 11,11 | 18,64 | 24,44 | 24,44 | 27,50 | 40,74 |
| Maksimum | 68,75 | 26,83 | 35,48 | 40,74 | 47,83 | 50,00 | 50,00 |
| Ortalama | 57,33 | 19,26 | 25,48 | 32,66* | 33,41* | 41,95*† | 45,28*† |
| Standart Sapma | 6,64 | 4,54 | 4,95 | 5,29 | 7,67 | 7,30 | 4,26 |

Schwann benzeri hücre gruplarında genel olarak iletim hızı artmış olarak bulunmuş olsa da adipoz gruplarına oranla bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 21. Siyatik sinir ileti hızı (sol) proksimal/distal latans oranları (sağ) * işareti H ile , † ise işareti H+E grupları arasında istatistik anlamlılığı ifade etmektedir (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Schwann benzeri hücrelerin ekimiyle sinir ileti hızındaki artış hasar grubuna oranla yüksek derecede istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,0001$) olarak bulundu. Adipoz hücrelerde olduğu gibi schwann benzeri hücre ekiminden önce uygulanan elektriksel stimülasyonun neden olduğu artış hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olup ($p < 0,0001$). Elektriksel stimülasyon ile sinir ileti hızında küçük bir artış gözlemlenmiş olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. CMAP değerlerinin P/D oranları karşılaştırdığında bütün

gruplarda be değer H grubuna oranla yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel anlamlılık taşımamaktadır.

Tablo 19. Deney gruplarına ait CMAP verilerinin P/D oranlarınına ait aritmetik ortalama, ortalamann standart hatası.

| | Kontrol | H | H + E | A | A + E | S | S + E |
|-----------------------|----------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|
| Minumum | 0,87 | 0,60 | 0,91 | 0,64 | 0,93 | 0,81 | 0,89 |
| Maksimum | 1,23 | 1,19 | 1,28 | 1,05 | 1,10 | 1,05 | 1,22 |
| Ortalama | 1,00 | 0,90 | 1,05 | 0,96 | 1,01 | 0,97 | 1,01 |
| Standart Sapma | 0,09 | 0,15 | 0,08 | 0,11 | 0,04 | 0,07 | 0,08 |

4.3. Miyelin Kalınlığı ve Akson Yarıçapı

Olympus CellSens Standart programı ile yapılan ölçümlerde gruplar genel olarak incelendiğinde kontrol grubunda sinir demetinin aksonal organizasyonunun homojen ve düzenli olduğu görüldü, toluidin boyaması ile aksonları çevreleyen miyelin kılıflar koyu maviye boyandı ve yapıları ışık mikroskopu altında incelendi (Resim 10 ve Resim 11). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasar grubuna ait akson miyelinlerinde incelme ve aksonal deformasyon görülmektedir. Kontrol grubunda schwann hücreleri aksonları çevrelemiş bir halde bulunurken hasar grubunda schwann hücrelerinin fasiküler boşlukta serbest bir şekilde dolaştığı görülmektedir (Resim 10 (a) ve (b)).

Tablo 19. Deneysel gruplarına ait miyelin kalınlık verilerinin aritmetik ortalaması, ortalamasının standart hatası.

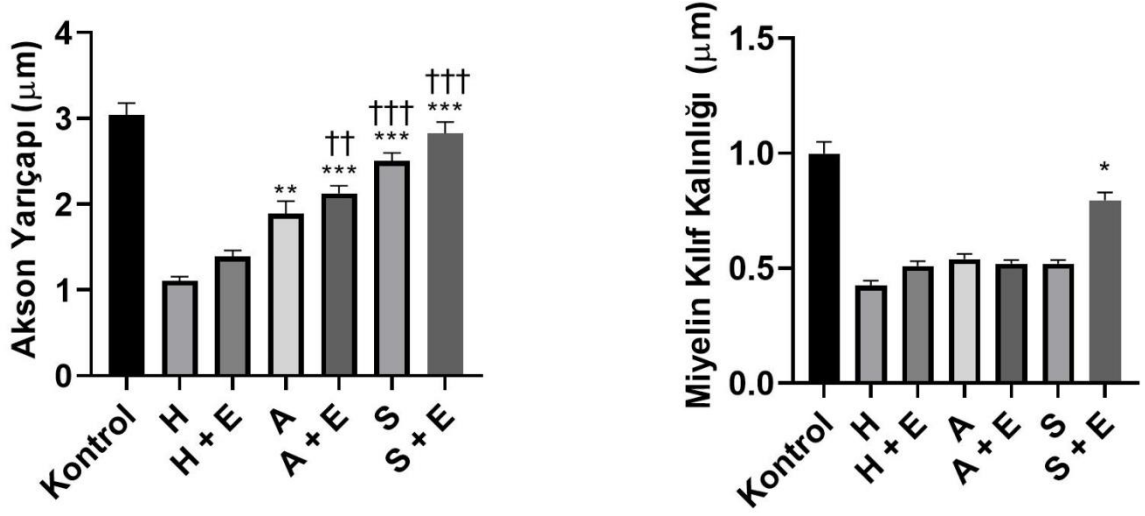
| | Kontrol | H | H + E | A | A + E | S | S + E |
|-----------------|----------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|
| Minumum | 0,19 | 0,20 | 0,33 | 0,32 | 0,33 | 0,33 | 0,010 |
| Maksimum | 1,51 | 0,61 | 0,78 | 0,87 | 0,71 | 0,71 | 1,06 |
| Ortalama | 0,99 | 0,42 | 0,50 | 0,53 | 0,51 | 0,51 | 0,79 |
| Standart Sapma | 0,28 | 0,10 | 0,11 | 0,12 | 0,092 | 0,09 | 0,18 |

Uygulanan tedavi protokollerine göre ortalama miyelin kılıf kalınlıkları karşılaştırıldığında sadece schwann-benzeri hücre + elektriksel stimülasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer tedavi protokollerinde tespit edilen miyelin kılıf kalınlığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 20). Tedavi gruplarında ise aksonal organizasyonun hasar grubuna oranla daha iyi düzenlendiği ve miyelin kılıf kalınlığında S+E grubu hariç zayıf bir artış gözlemlenmiştir. Tedavi gruplarında ise fasiküler boşlukta serbest schwann hücre varlığı A+E ve S+E gruplarında diğer gruplara oranla daha düşük gözükmektedir.

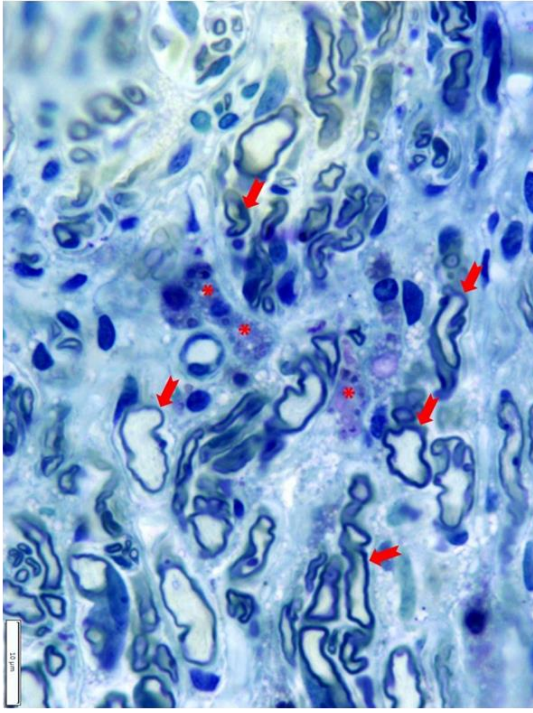
Tablo 19. Deneysel gruplarına ait akson yarıçapı verilerinin aritmetik ortalaması, ortalamasının standart hatası (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

| | Kontrol | H | H + E | A | A + E | S | S + E |
|-----------------------|----------------|----------|--------------|----------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Minumum | 1,97 | 0,49 | 0,90 | 0,58 | 1,31 | 1,25 | 1,52 |
| Maksimum | 4,61 | 1,56 | 5,11 | 2,34 | 3,04 | 3,43 | 4,22 |
| Ortalama | 3,03 | 1,10 | 1,89 | 1,39* | 2,12* ^β | 2,50* ^{βα} | 2,82* ^{βα} |
| Standart Sapma | 0,76 | 0,25 | 0,79 | 0,38 | 0,49 | 0,53 | 0,73 |

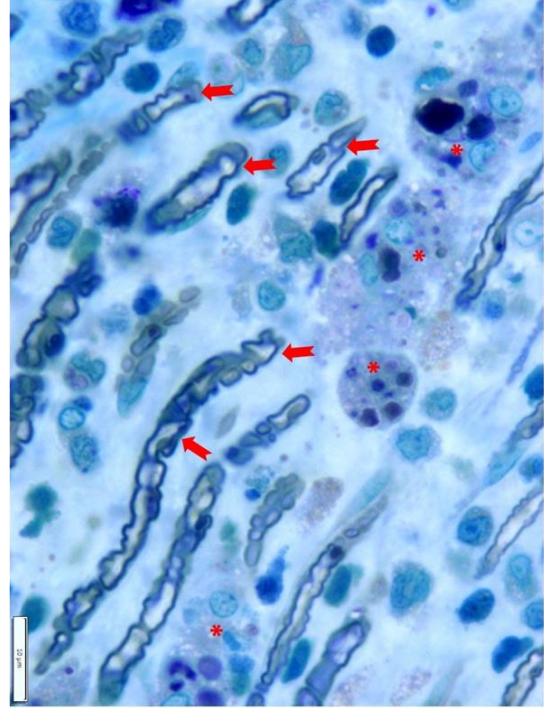
Gruplar arasında akson yarıçaplarının değerlendirilmesi yapıldığında sırasıyla hasar grubuna göre incelendiğinde A, A+E, S ve S+E gruplarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Elektriksel stimülasyona göre ise A+E, S ve S+E gruplarındaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) ve son olarak A grubuna göre ise A+E, S ve S+E gruplarındaki artış anlamlılık taşımaktadır ($p<0,05$).



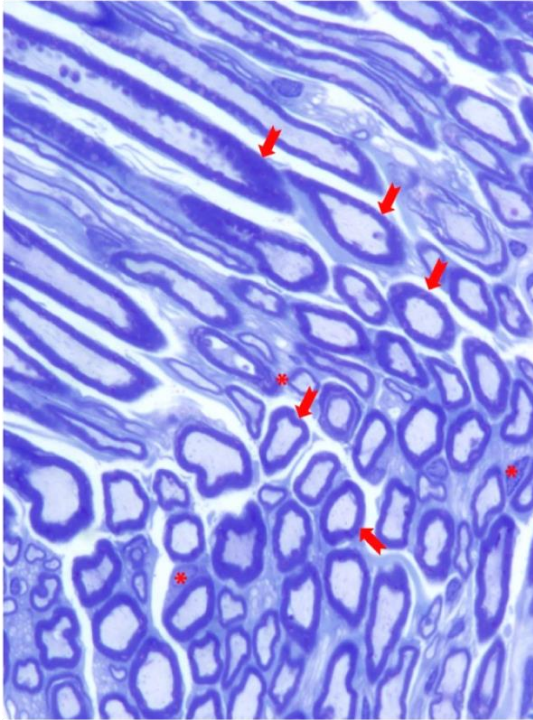
Şekil 22. Gruplar arasında akson yarıçapı (sol) ve miyelin kılıf kalınlığının karşılaştırması (sağ) * işareti H ile , † işareti H+E, ‡ ise A grupları arasında istatistik anlamlılığı ifade etmektedir.



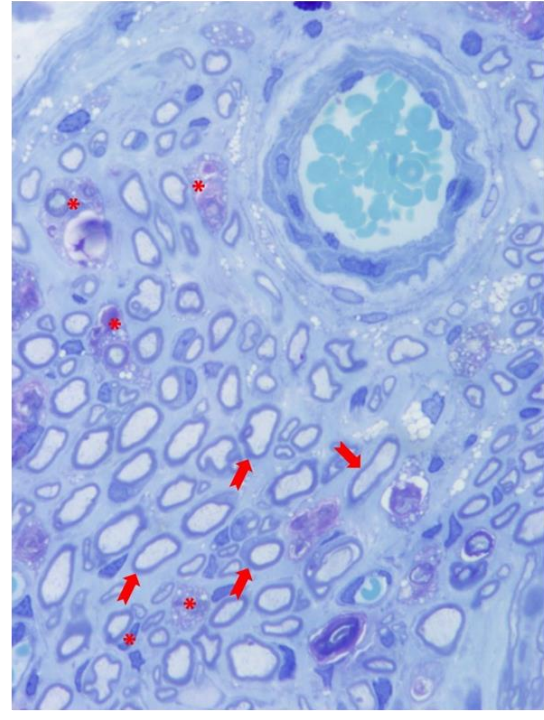
(b)



(d)

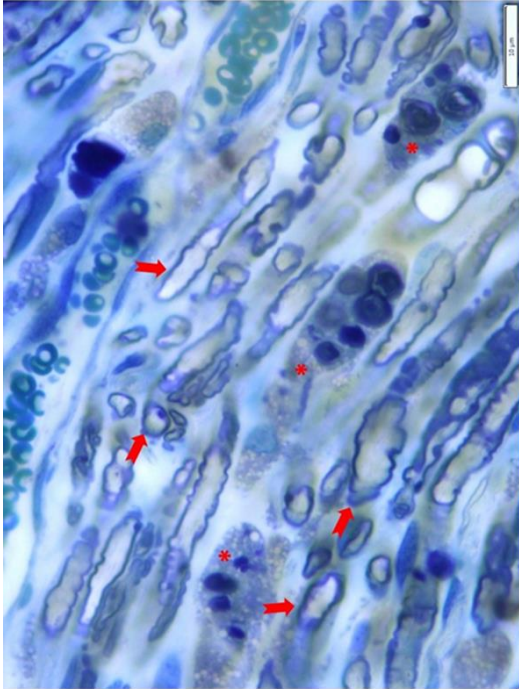


(a)

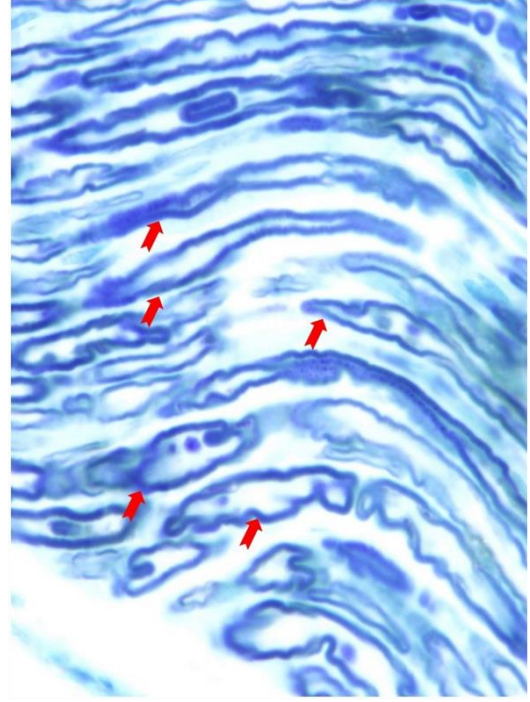


(c)

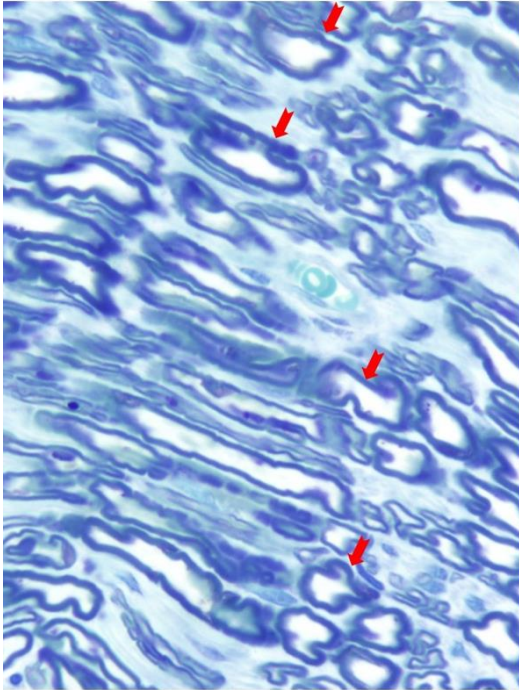
Resim 10. Gruplara ait Toluidine mavisi ile boyalı siyatik sinir örnekleri (a) kontrol, (b) hasar, (c) elektriksel stimülasyon, (d) adipoz kök hücre gruplarına aittir. Kırmızı oklar miyelin kılıfları gösterirken, * işareti miyelin kılıfı oluşturan veya serbest haldeki schwann hücre çekirdeklerini göstermektedir.



(f)



(g)



(e)

Resim 11. Gruplara ait Toluidine mavisi ile boyalı siyatik sinir örnekleri (e) adipoz + elektrik, (f) schwann-benzeri hücre, (g) schwann-benzeri hücre + elektrik gruplarına aittir. Kırmızı oklar miyelin kılıfları gösterirken, * işareti miyelin kılıfı oluşturan veya serbest haldeki schwann hücre çekirdeklerini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları, vücutta periferik sinirlerde diyabet, otoimmün hastalıklar veya akut travmalar sonucu meydana gelen, hasarın büyüklüğüne bağlı olarak distalde duysal, motor veya otonomik fonksiyon eksikliği/yokluğuyla karakterize problemlerin tamamını kapsar. Akut yaralanmalar, travma sonucu meydana gelen yumuşak doku zedelenmesi veya kemik kırılmasına bağlı bölgesel nörolojik problemler olarak tanımlanabilir. Hasarın şiddetine bağlı olarak akson kopması, nöral hücrelerin ölümü veya hasarı takip eden wallerian dejenerasyon sonucu fonksiyon eksikliği veya kaybı mevcuttur.

Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık 50,000 yeni travmatik sinir hasar vakası rapor edilmektedir ve bu ülke için mevcut vakalarda birlikte toplamda yıllık 7 milyar dolarlık bir maddi kayba sebep olmaktadır (Evans, 2001). Periferik sinir yaralanmaları özellikle alt ve üst ekstremitelerde karşımıza çıkmakta olup yetişkinlerde rastlanan en yaygın sensorimotor problem ve üretkenlik kaybı sebeplerinden birisidir. Ülkemizde travmatik sinir hasarı insidansını gösteren güncel bir epidemiyolojik çalışma bulamamakla birlikte farklı ülkelerden elde edilen çalışmalara göre toplam travma hastalarının yaklaşık %1,3-3 aralığında başta ekstremiteler olmak üzere farklı derecelerde periferik sinir yaralanma vakası olduğu tahmin edilebilir (Huckhagel ve ark, 2018; Noble ve ark, 1998; Saadat ve ark, 2011).

Travmatik sinir hasarı çalışmalarında deney hayvanlarının kullanımı özellikle uygulanan tedavi metotlarının biyoyumluluğunu kanıtladığı gibi sinir rejenerasyonuna bağlı olarak fonksiyonel iyileşmeyi birden fazla parametre ile takip etme olanağı veren kuvvetli bir araştırma metodudur. Maddi açıdan elverişli oluşlarının yanı sıra sıçanlar periferik sinir hasarı modellerinde yaygın olarak kullanılmış deney hayvanlarıdır ve sıçan siyatik sinir modelleri periferik sinir hasarı çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir modeldir (Vela ve ark, 2020). Siyatik sinir ezilme hasarı modeli (crush injury model) özellikle bu tür çalışmalarda sıklıkla kullanılan en temel hasar modellerindendir (Zerinci ve ark, 2010; Ek ve ark, 2007) . Açığa çıkartılan siyatik sinirin forseps veya benzeri bir cerrahi aletle belirli sürelerde ve şiddetlerle sıkıştırılmasıyla elde edilen sinir hasarı Sunderland sınıflandırmasına göre kendi kendine iyileşebilen 2. ve nadiren de 3. dereceler arasında değişen bir hasar şiddeti oluşturmaktadır (Alvites ve ark, 2018; Bridge ve ark, 1994).

Bu çalışmada yaygın olarak kullanılan sinir ezilme hasar modeli yerine kendiliğinden iyileşmesi daha zor olan “sürekli nöroma” hasar modelini kullanmayı uygun görülmüştür. Bu modelde siyatik sinir 50 N şiddetinde bir kuvvetle gerildikten sonra 2 farklı noktadan malleus pensi ile birkaç saniye sıkıştırarak Sunderland sınıflandırmasına göre 3. veya 4. derecede hasar elde edilebileceğini göstermişlerdir. Ayrıca bu model sinir ezilme hasarı ile karşılaştırıldığında 8 haftada iyileşmenin zayıf olduğunu rapor etmişlerdir (Alant ve ark, 2012). Çalışmamızda bu modelin oluşturulmasında Alant ve arkadaşları tarafından önerilen protokol uygulanmıştır.

Kök hücreler embriyonik gelişim evresinden başlayarak ömür boyunca vücudun gelişimi, bakımı ve onarımdan sorumlu farklılaşmamış hücre grubudur. Embriyonik gelişim aşamasında sahip oldukları potansiyel ile yeni bir bireyi oluşturacak yetenekteyken erişkinlerde homeostazis ve onarımı yönlendirirler (Chagastelles ve Nardi, 2011). Yetişkin vücudunda bulunan mezenkimal kök hücreler kaynak alındığı doku tipine göre belirli hücre soylarına farklılaşma potansiyeli taşırlar. Kemik iliği, diş, kan, yağ doku gibi farklı birçok doku tipinde kendilerine has mezenkimal kök hücreler mevcuttur (Ullah ve ark, 2015). Klinik kullanımda embriyonik kök hücrelerin önündeki etik engel ve spontan teratorm oluşturabilme potansiyelleri sebebiyle çalışmalar sınırlıdır. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ise maddi açıdan yüklü olup hala yaygın bir kullanıma sahip değildir. Öte yandan mezenkimal kök hücrelerin kolay izole edilebilmeleri, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda karakterlerinin stabil olması ve diğerlerine göre düşük maliyetli oluşu sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Chagastelles ve Nardi, 2011; Ullah ve ark, 2015).

Yağ dokudan elde edilen adipoz kök hücrelerin tıpkı diğer mezenkimal kök hücreler gibi kendisini yenileyebilme ve yüksek çoğalma kapasitesine sahiptir. *In vitro* deneylerde adipoz kök hücrelerin osteoblast, kondrosit, adipoz ve hatta nöral hücreler gibi birden fazla farklı doku tipine farklılaşma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Zuk ve ark, 2002). Adipoz kök hücreleri klinik ve deneysel çalışmalar için vücuttaki diğer mezenkimal kök hücrelere göre daha kullanışlı yapan en önemli özelliklerinden birisi kolaylıkla izole edilebilmeleridir. İnsanlardan ve hayvanlardan lokal veya genel anestezi altında lipoaspirayon ile edilen yağ dokudan kısa süre içerisinde izole edilebilir, düşük immün aktivite göstermeleri sayesinde otolog olarak kullanılabilirler. Yağ doku vücuttaki diğer mezenkimal kök hücre kaynaklarına göre çok daha zengin bir kök hücre havuzuna sahiptir. Kolay erişim ve kısa süre içerisinde yüksek sayıda ve canlılıkta adipoz kök hücre elde edilebilmesi günümüzde birçok hastalık ve doku mühendisliği çalışmasında yaygın olarak kullanılmalarının ve klinik açıdan faydasının

yaygın bir şekilde kabul görmesini sağlamıştır (Di Summa ve ark, 2010; Faroni ve ark, 2013; Mazini ve ark, 2019).

Deneylemizde kullanılacak adipoz kök hücrelerin izolasyonu için 8-10 haftalık 1 adet erkek wistar albino sıçan kullanılmıştır. Elde edilen stromal vasküler fraksiyon 3. pasaja kadar çoğaltılıp hücre popülasyonunun karakterizasyonu için daha önce sıçan adipoz kök hücrelerinde bulunan yüzey işaretçilerinin varlığı/yokluğu ile tayin edilmiştir (%99 CD44 (+), %99 CD90 (+), %88 CD45(-), %95 CD11b(-), %97 CD29(+), Şekil 14.). Elde edilen bu bulgular daha önce tayin edilen adipoz kök hücre işaretçileri ile uyumlu olup elde ettiğimiz bu hücre popülasyonunun adipoz kök hücreler olduğunu teyit etmektedir (Mildmay-White ve Khan, 2017; Niyaz ve ark, 2012; Xie ve ark, 2009).

Schwann-benzeri hücreler, kök hücrelerin *in vitro* ortamda schwann hücre farklılaşma protokolüne tabi tutulmasıyla elde edilen, bu işlem sonrası sınırlı seviyede schwann hücrelerine ait gen ekspresyon profiline (S100, GFAP, MBP ve ark) ve morfolojisine sahip olan farklılaşmış kök hücrelerdir (Dezawa ve ark, 2001; Gao ve ark, 2015). Embriyonik, mezenkimal veya indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden elde edilebildiği gibi (Ikeda ve ark, 2014; Ziegler ve ark, 2011), bu amaçla mezenkimal kök hücre kullanımı daha yaygındır; literatür incelendiğinde kemik iliği ve adipoz kök hücrelerinin schwann-benzeri fenotipe dönüştürülebildiği görülmektedir (Al-Zer ve Kalbouneh, 2015; Chen ve ark, 2019; McKenzie ve ark, 2006; Xue ve ark, 2017). İlk olarak 2001 yılında Dezawa ve arkadaşların tarafından sıçan kemik iliği kök hücrelerinden elde edilebileceği gösterilmiştir (Dezawa ve ark, 2001).

Sıçan adipoz kök hücrelerinden elde edilen schwann-benzeri hücrelerinin çeşitli büyüme faktörleri ve nörotrofik faktörler (NGF, GDNF, BDNF, NGR-1 vs) bunlara ait reseptörler (TrkA, TrkB, TrkC, Nt-3) ve çeşitli nörotransmitterleri sentezlediği, hayvan deneylerinde ise sinir rejenerasyonunu ve remiyenilizasyonu hızlandırdığı rapor edilmiştir (G. Fan ve ark, 2011; Gao ve ark, 2014).

Çalışmamızda schwann-benzeri hücre fenotipi eldesi için Dezawa tarafından geliştirilen protokol uygulanmış olup süreç sonucunda elde edilen hücrelerimiz, kaynak olarak kullanılan adipoz kök hücre popülasyonu ile birden fazla farklı metotla karşılaştırılmıştır (Faroni ve ark, 2016). Farklılaşma protokolüne maruz bırakılan hücrelerin RT-PCR analizleri sonucunda schwann hücre işaretçileri olan s100 ve P75 ekspresyon düzeylerinin (s100; değışimi $5,808 \pm 0,746$, p75; $10,36 \pm 0,6672$) literatürde gösterildiği gibi yüksek oranda arttığı gözlemlenmiştir (Faroni ve ark, 2016; Han ve ark, 2015). Hücrelerin morfolojik değışiklikleri incelendiğinde

farklılaşan hücrelerin tıpkı Faroni ve arkadaşlarının gösterdiği gibi en/boy oranları adipoz kök hücrelere göre artmış (adipoz kök hücreler; $3,513 \pm 0,05721$, schwann benzeri hücreler; $4,228 \pm 0,07214$), tripsinize edilen hücrelerin yarıçapları (adipoz kök hücreler; $27,9 \pm 1,047$, schwann benzeri hücreler; $22,12 \pm 0,8304$) ise genel olarak küçülmüştür (Faroni ve ark, 2016). Yapılan bu genetik ve morfolojik inceleme hücrelerimizde farklılaşmanın başarılı bir şekilde yapıldığını göstermek için yeterlidir.

Omurgalılarda embriyonik süreçte iyonik akımlar sinyal transdüksiyonu ve embriyogenezin kontrolünde rol oynamaktadır. Yaralanma sonrası hasar bölgesinde iyonik akımla birlikte değişen elektriksel potansiyel çevre hücrelerin yara bölgesine doğru hareket etmelerini sağladığı bilinmektedir (Foulds ve Barker, 1983) . İlk olarak elektrik akımlarının kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi deneysel ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Klinik denelerle çok parçalı kırık tedavisi ve kemik greftlerinin başarılı iyileşmelerini sağladığı bilinmektedir (Aleem ve ark, 2016; Khalifeh ve ark, 2018). Osteoblast hücreleri üzerindeki etkileri incelendiğinde düşük şiddetli elektriksel stimülasyonun minerilizasyonu, hücre göçünü, dizilimini iyileşmeyi olumlu etkileyebilecek şekilde manipüle edebildiği. Kök hücrelerin osteoblastlara doğru farklılaşmasını ve Bmp2, Bmp4, TGF-beta 1 ve ALP gibi kemik iyileşmesini destekleyen büyüme faktörlerinin salgılanmasını sağladığı bilinmektedir (Leppik ve ark, 2018).

Burke (1981)'ün motor nöronların ortalama ateşleme frekansı olarak tespit ettiği 20 Hz frekansının Nix ve Hopf (1983) tarafından kısa süreli stimülasyonda kullanılarak motor iyileşmeyi hızlandırabileceği gösterildi (kaynak). 20 Hz frekansında 1 saatlik elektriksel stimülasyon *in vitro* ortamda dorsal kök ganglia hücrelerinde nörit uzama hızını arttırdığını gösterilmiştir (S. Han ve ark, 2019). Aynı özellikteki elektriksel stimülasyonun *in vivo* denemelerde de ağır periferik sinir hasarında iyileşme hızını arttırdığı (Shapira ve ark, 2019), sinir allograft uygulamasında daha kısa sürede daha kalın miyelin kılıf ve daha etkin motor ve duyu fonksiyon geri kazanımı sağladığı rapor edilmiştir (Zuo ve ark, 2020).

Çalışmamızda 1 saatlik 20 Hz 3V şiddetle elektriksel stimülasyon sonrası 6. haftada yapılan sinir ileti hızı ölçümlerinde sürekli nöroma hasarı modelinde sinir iletim hızı $19,26 \pm 4,54$ m/sn olarak kaydedilirken elektriksel stimülasyonla iletim hızı $25,48 \pm 4,95$ m/sn olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasında iletim hızında bir artış tespit edilmiş olsa bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Siyatik sinir ezilme hasarında ise elektriksel stimülasyonun tek başına

sinir ileti hızını arttırmak için yeterli olabildiği rapor edilmiştir (Al-Majed ve ark, 2000; Zhang ve ark, 2013).

Shapira ve arkadaşları (2019)' da nöroma hasar modeli ve elektriksel stimülasyon koşullarında gruplar arasındaki latans farklarını karşılaştırdığında 12. hafta boyunca anlamlı bir fark elde edememiştir. Yatay merdiven testi (horizontal ladder assay) ile fonksiyonel iyileşme hızları değerlendirildiğinde ise elektriksel stimülasyon ile fonksiyonel iyileşmenin 6. haftadan itibaren net bir şekilde hızlandığını göstermişlerdir (Shapira ve ark, 2019). Biz ise çalışmamızda fonksiyonel iyileşmeyi SFI ile takip ettik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre elektriksel stimülasyonla birlikte bir SFI skorunda hasar grubuna göre bir artış tespit edilmiş olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak anlam bulunamamıştır. Daha önce yapılan benzeri çalışmalarda da SFI skorları ve elektrofizyolojik ölçümlerinin her zaman körele olmayabildiği rapor edilmiş olup, şiddetli yaralanmalarda bu testin ayıricılığının zayıf olduğu düşünülmektedir (Munro ve ark, 1998; Varejão ve ark, 2001). Bu sonuçlara göre nöroma hasar modelinde SFI skorlamasının fonksiyonel iyileşmeyi göstermedeki ayıricılığının zayıf olduğu söylenebilir. Akson yarıçapı ve miyelin kılıf kalınlıkları incelendiğinde ise elektriksel stimülasyonla her iki parametrede hasar grubuna oranla bir artış elde edilmişse de kaydedilen bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulunmamışlardır.

Deneyimizde hücre transplantasyonu için lokal ve sistemik hücre enjeksiyonunun avantaj ve dezavantajlarını karşılaştırdığımızda lokal enjeksiyonun pratik açıdan daha uygun olduğuna karar verdik (Kean ve ark, 2013). Literatürde çalışmamızda kullanılan schwann-benzeri hücrelerin sistemik olarak verilmesinin nasıl bir etki göstereceğine dair örnek bulunmamakla birlikte nöral soya farklılaşmış bu hücrelerden beklentimiz siyatik sinir hasarının olduğu bölgede tamir ve miyelinizasyon üzerindeki etkilerini doğrudan etkilerini incelemektir.

Wei ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada mental sinire transplante edilen PKH26 boyalı schwann benzeri hücrelerin *in vivo* takibini yapmışlar ve hücrelerin en az 3 hafta boyunca ekildikleri bölgede lokalize olabildiklerini göstermiştir. Adipoz kök hücre transplantasyonunda ise Liu ve arkadaşları aynı metotla bu hücrelerin kavenöz sinire transplante edilmelerinin ardından bölgede 12 haftaya kadar kalabildiklerini göstermişlerdir (Liu ve ark, 2011).

Biz de hücrelerimizin transplante edildikleri bölgede kaldıklarını teyit etmek için ilk olarak PKH26 boyalı adipoz kök hücreleri siyatik sinire transplante ettikten 24 saat sonra

inceledik (Resim 8). 24 saatlik tutulumun başarılı olduğunu teyit ettikten sonra. 1 haftalık süreçte hücre sayısının değişim gösterip göstermediğini anlamak için PKH26 boyalı adipoz kök hücre ve schwann-benzeri hücrenin ayrı hayvanlara enjeksiyonu sonrası 1 hafta beklenerek alınan örneklerde floresans yoğunlukları karşılaştırıldı ve hemen hemen aynı şiddette ışığa tespit edildi (Resim 9 ve Tablo 14). Bu, hücrelerimizin bölgede tutulum sağlandıktan sonra büyük ölçüde ayrılmadıklarını gösterilmiştir.

Çalışmamızda sinir hasarı sonrasında sadece hücre transplantasyonu yapılan gruplarda (schwann-benzeri hücre grubu $41,95 \pm 7,308$ m/sn, adipoz kök hücre grubu $32,66 \pm 5,29$ m/sn) 6 haftalık iyileşme süresinin sonunda sinir ileti hızlarının hasar ($19,26 \pm 1,071$ m/sn) ve elektriksel stimülasyon gruplarına (Hasar + Elektrik; $25,48 \pm 1,168$ m/sn) oranla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Burada tek başına elektriksel stimülasyonun sinir iyileşmesinde hücre transplantasyonu kadar başarılı olmadığı görülmüştür. Ashour ve arkadaşları ise insan umbilikal kök hücrelerinin ve 30 dakikalık 20 Hz frekansındaki elektriksel stimülasyonun sinir hasarına etkilerini karşılaştırdığında neredeyse aynı derece etkili olduklarını rapor etmiştir (Ashour ve ark, 2015). Ancak bu bulgu bizim deney koşullarımızda teyit edilememiştir. Gruplar arasında akson yarıçapları karşılaştırıldığında hasar grubuna oranla ($1,10 \pm 0,05$) adipoz kök hücre ($1,89 \pm 0,14$) ve schwann-benzeri hücre ($2,50 \pm 0,09$) transplantasyonu gruplardaki akson yarıçaplarının literatüre uygun bir şekilde büyük olduğu görülmüştür ancak bu gruplara ait miyelin kılıf kalınlıklarında çok büyük farklılık gözlenmemiştir.

Sadece transplantasyon grupları arasında en büyük ileti hızının ve akson yarıçapının schwann-benzeri hücre grubunda bulunması özellikle nörotrofik faktörler açısından zengin olmaları ile açıklanabilir (Tomita ve ark, 2013). Bunu destekler nitelikte çalışmada beklendiği gibi schwann-benzeri hücrelerin *in vitro* denemelerde NGF ekspresyon düzeyinin adipoz kök hücrelere oranla 5 kata kadar daha fazla olduğu tespit edilmiştir (NGF; $5,138 \pm 1,163$).

Bizim çalışmamızda da elektriksel stimülasyonun ıslak kas ağırlığının yanı sıra nöroma hasar modelinde sinir ileti hızının arttırdığı görülmektedir (Hasar; $19,26 \pm 1,071$, Hasar + Elektrik; $25,48 \pm 1,168$). Adipoz kök hücrelerin ve schwann benzeri hücrelerin elektriksel stimülasyonun etkisi altında sinir iletimi ve histoloji üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda, her iki grupta da tek başına hücre ekiminden daha yüksek iletim hızı elde edilmiştir (Adipoz; $32,66 \pm 1,247$, Adipoz + Elektrik; $33,41 \pm 1,809$, Schwann-Benzeri Hücre; $41,95 \pm 1,887$, Schwann-Benzeri Hücre + Elektrik; $45,28 \pm 1,004$). Histolojik incelemelerde ise miyelin kılıf kalınlığı schwann-benzeri hücre + elektriksel stimülasyon

grubunda kontrol grubuna yaklaşılabilmektedir. Sadece schwann-benzeri hücre transpalantasyonu veya elektriksel stimülasyon+adipoz hücre grubunun sahip olduğu miyelin kılıf kalınlıkları anlamlı bir artış göstermemiştir. Ancak akson yarıçapları karşılaştırıldığında sinir iletim hızı grafiğine benzer bir şekilde sırasıyla artış görülmekte olup artan sinir iletim hızı daha çok aksonal iyileşme ile ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları incelediğimizde adipoz veya schwann-benzeri hücre ekiminin tek başına sinir hasarını iyileştici özelliğinin olduğunu ve beklendiği gibi schwann-benzeri hücrelerin farklılaşmamış adipoz kök hücrelere oranla daha iyi iyileşme sağladığını teyit ettik. Schwann-benzeri hücreler nörotrofik faktörlerin yanı sıra vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi yine sinir rejenerasyonu ile ilişkilendirilen büyüme faktörleri açısından zengin olduğu gösterilmiştir (Park ve ark, 2010). Bunu yanı sıra BDNF ve NGF ekspresyon düzeyleri gerçek schwann hücrelerinden çok daha fazladır ve rejeneratif kapasitesinin yüksek olmasını sağlamaktadır (Mahay ve ark, 2008). Kültür ortamında schwann-benzeri hücrelerin varlığında bu büyüme faktörlerinin etkisiyle nöral hücrelerde aksonal rejenerasyon desteklenirken hücre ölüm oranının azaldığı (Park ve ark, 2010), hayvan deneylerinde ise miyelin kılıf oluşumuna aktif olarak katıldıkları düşünülmektedir (Zaminy ve ark, 2013).

Hücre uygulamalarına oranla elektrik stimülasyonunun sinir iletim hızı, SFI ve histolojik incelemelerden gördüğümüz kadarıyla olumlu etkisini literatürde tanımlandığı kadar yüksek bulmadık. Sinir hasarının hemen ardından uygulanan elektrik stimülasyonu ile miyelin kılıf dizimilimi ve bakımında hayati rol oynayan P0 proteinin ve mRNA ekspresyon düzeyinin arttığını ve sonuç olarak sinir iletim hızının ve miyelin kılıf kalınlığının arttığı rapor edilmiştir (Zhang ve ark, 2013).

Çalışmamızda beklentimiz elektrik stimülasyonu hücre uygulamaları ile birlikte kombine edildiğinde tek başına uygulamadan daha başarılı ve hızlı bir iyileşmeydi. Adipoz kök hücre + elektriksel stimülasyon ve schwann-benzeri hücre + elektriksel stimülasyon gruplarına baktığımızda her ikisinde sinir iletim hızında ve akson yarıçaplarının sadece hücre veya elektrik akımı uygulamalarına göre daha büyük olduğu gözükmekte. Ancak miyelin kılıf kalınlığı en önemli artış sadece schwann-benzeri hücre + elektriksel stimülasyon grubunda tespit edildi.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada periferik sinir hasarında schwann-benzeri hücrelerin rejeneratif etkisini elektrik stimülasyonu ile biraz daha arttırmayı başardık. Ancak

deneylerimizde, bu süreçte hangi moleküler mekanizmaların rol oynadığını değerlendirme olanağımız olmadı. Daha önce gösterildiği gibi schwann-benzeri hücreler dışarıdan verilen büyüme faktörlerinin yokluğund 3-4 içerisinde mezenkimal kök hücrelere geri farklılaşabiliyorlar (Faroni ve ark, 2016). Hücre kültür ortamında gösterilen bu olayın transplantasyon sonrasında *in vivo* koşullarda gerçekleşmeyebileceğine dair bulgular bulunmakta birlikte deney koşullarımızın bu süreçteki etkisi farklı olabilir ve araştırılması gereklidir (Sowa ve ark, 2016). Deneylerimizde SFI skorlamasıyla gruplarımız arasında motor fonksiyonun geri kazanımını göstermeyi amaçladık. En önemli deney gruplarımız olan A + E grubu ve S + E gruplarında gözle görülür bir artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde etmeyi başaramadık. Deneylerimizde tek motor fonksiyon testi olarak SFI skorlamasının kullanılması yerine birden fazla motor fonksiyon testi ile daha başarılı bir takip yapılabilirdi (Munro ve ark, 1998; Varejão ve ark, 2001). Çalışmamızda sadece motor liflerle ilgilenmiş olduğumuz için duyuşal lifler üzerindeki etkiyi gözden kaçırmış olabiliriz. Daha önce gösterildiği gibi motor liflerin ve duyuşal liflerin rejenerasyon hızları farklılık gösterebilmektedir (Jianping vd, 2012; Moldovan vd, 2006). Gelecek çalışmalarda özellikle bu farklılık göze alınarak motor fonksiyon testlerinin yanı sıra duyuşal fonksiyon testlerinin de dikkate alınmasında fayda görüyoruz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Elde ettiğimiz sonuçlara göre;

- Sürekli nöroma modelinde elektriksel stimülasyon sinir ileti hızı, akson yarıçapı ve miyelin kılıf kalınlığında artış elde edilmiştir ancak deney koşullarımızda literatürde gösterildiği kadar etkili bulunmamıştır.
- Adipoz kök hücreler ve onlardan elde edilen schwann-benzeri hücreler iyileşme hızını arttırmaktadır ve elektriksel stimülasyonla kombinasyonu sonucu sinir ileti hızları anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu bulgu elektrofizyolojik ve histolojik olarak tespit edilmiştir.
- Histolojik incelemelerde elektriksel stimülasyon ve hücre terapisinin birlikte kullanılması sonrası serbest schwann hücrelerine rastlanmamaktadır. Bu iyileşmenin bu gruplarda deney süresi içerisinde tamamlandığına işaret etmektedir.

İleriki Çalışmalarda;

- Nöroma hasar modelinde tek başına elektriksel stimülasyonun sinir rejenerasyonuna etkisi, hücre uygulaması kadar başarılı değildir bu uygulama, farklı parametre (süre, frekans, şiddet) denenebilir.
- Schwann-benzeri hücreler ve elektriksel stimülasyon kombinasyonunun diğer uygulamalarla birlikte sinir hasarında motor ve duyu lifleri üzerindeki etkisinin ayrı değerlendirilmesi.
- Duyusal veya fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için birden fazla testin kullanılması iyileşmenin daha başarılı bir şekilde değerlendirilmesini sağlayabilir.
- Çalışmamızda hücre ekimi öncesi elektriksel stimülasyonun ekilen hücreler üzerindeki etkilerinin *in vivo* ortamda moleküler boyutta araştırılması, olası tedavi protokollerinin daha başarılı olması için gerekli bilgiyi sağlayabilir.
- Transplantasyon öncesi uygulanan elektriksel stimülasyonun ekilen schwann-benzeri hücrelerin *in vivo* kaderi ve diferansiyasyon olasılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

Al-Majed AA, Brushart TM, Gordon T. Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *European Journal of Neuroscience* 2000, 12(12), 4381–4390.

Al-Majed AA, Neumann CM, Brushart TM, Gordon T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *Journal of Neuroscience* 2000, 20(7), 2602–2608.

Al-Majed AA, Siu LT, Gordon T. Electrical stimulation accelerates and enhances expression of regeneration-associated genes in regenerating rat femoral motoneurons. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2004, 24(3), 379-402.

Al-nbaheen M, Ali D, Bouslimi A, Al-jassir F, Adjaye J, Kassem M. Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow , Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. *Stem Cell Reviews and Reports* 2013, 9(1), 32-43.

Al-Zer H, Kalbouneh H. Dental pulp stem cells-derived schwann cells for peripheral nerve injury regeneration. *Neural Regeneration Research* 2015, 10(12), 1945–1946.

Alant JDDV, Kemp SWP, Khu KJOL, Kumar R, Webb AA, Midha R. Traumatic neuroma in continuity injury model in rodents. *Journal of Neurotrauma* 2012, 29(8), 1691–1703.

Aleem IS, Aleem I, Evaniew N, Busse JW, Yaszemski M, Agarwal A, Einhorn T, Bhandari, M. Efficacy of Electrical Stimulators for Bone Healing: A Meta-Analysis of Randomized Sham-Controlled Trials. *Scientific reports* 2016, 6, 31724.

Alexander JK, Fuss B, Colello RJ. Electric field-induced astrocyte alignment directs neurite outgrowth. *Neuron Glia Biology* 2006, 2(2), 93–103.

Alvites R, Rita Caseiro A, Santos Pedrosa S, Vieira Branquinho M, Ronchi G, Geuna S, Varejão ASP, Colette Maurício A. Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances. *Cogent Medicine* 2018, 5(1), 1–45.

Araña M, Mazo M, Aranda P, Pelacho B, Prosper F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization. *Methods in Molecular Biology* 2013, 1036, 47-61.

Armati PJ, Mathey EK. An update on Schwann cell biology - Immunomodulation, neural regulation and other surprises. *Journal of the Neurological Sciences* 2013, 333(1–2), 68–72.

Ashour FA, Elbaz AA, Sabek NA, Hazzaa SM, Metwally EM. Effect of electrical stimulation and stem cells on experimentally induced peripheral nerve injury in rats. *Menoufia Medical Journal* 2015, 28, 742–747.

Bergmeister K, Daeschler S, Rhodius P, Schoenle P, Böcker A, Kneser U, Harhaus L. Promoting axonal regeneration following nerve surgery: A perspective on ultrasound treatment for nerve injuries. *Neural Regeneration Research* 2018, 13(9), 1530–1533.

Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 2010, 119(1), 37–53.

Bragança J, Lopes JA, Mendes-Silva L, Santos JMA. Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications. *World Journal of Stem Cells* 2019, 11(7), 421–430.

Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve crush injuries—a model for axonotmesis. *Experimental Neurology* 1994, 127(2), 284–90.

Brohlin M, Mahay D, Novikov LN, Terenghi G, Wiberg M, Shawcross SG, Novikova LN. Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells. *Neuroscience Research* 2009, 64(1), 41–49.

Brushart TM, Hoffman PN, Royall RM, Murinson BB, Witzel C, Gordon T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *Journal of Neuroscience* 2002, 22(15), 6631–6638.

Cavalcante Miranda De Assis D, Martins Lima Ê, Teixeira Goes B, Zugaib Cavalcanti J, Barbosa Paixão A, Vannier-Santos MA, ... Baptista AF. The Parameters of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation Are Critical to Its Regenerative Effects When Applied Just after a Sciatic Crush Lesion in Mice. *BioMed Research International* 2014, 2014, 572949.

Chagastelles PC, Nardi NB. Biology of stem cells: An overview. *Kidney International Supplements* 2011, 1(3), 63–67.

Chen W, Xiao S, Wei Z, Deng C, Nie K, Wang D. Schwann cell-like cells derived from human amniotic mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration through a microRNA-214/c-jun pathway. *Stem Cells International* 2019, 2019, 2490761.

Chen YS. Effects of electrical stimulation on peripheral nerve regeneration. *BioMedicine* 2011, 1(1), 33–36.

Ching RC, Wiberg M, Kingham PJ. Schwann cell-like differentiated adipose stem cells promote neurite outgrowth via secreted exosomes and RNA transfer 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Stem Cell Research and Therapy* 2018, 9(1), 1–12.

Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Harris DT. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytotherapy* 2013, 15(3), 330–343.

Colciago A, Melfi S, Giannotti G, Bonalume V, Ballabio M, Caffino L, Fumagalli F, Magnaghi V. Tumor suppressor Nf2/merlin drives Schwann cell changes following electromagnetic field exposure through Hippo-dependent mechanisms. *Cell Death Discovery* 2015, 2015 15021.

Daeschler SC, Harhaus L, Bergmeister KD, Boecker A, Hoener B, Kneser U, Schoenle P. Clinically Available Low Intensity Ultrasound Devices do not Promote Axonal Regeneration After Peripheral Nerve Surgery—A Preclinical Investigation of an FDA-Approved Device. *Frontiers in Neurology* 2018, 9(December), 1–11.

- Daeschler SC, Harhaus L, Schoenle P, Boecker A, Kneser U, Bergmeister KD.** Ultrasound and shock-wave stimulation to promote axonal regeneration following nerve surgery: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Scientific Reports* 2018, 8(1), 1–11.
- De Wert G, Mummery C.** Human embryonic stem cells: Research, ethics and policy. *Human Reproduction* 2003, 18 (4), 672–682.
- Del Bigio MR.** Ependymal cells: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica* 2010, 119(1), 55–73.
- Dezawa M, Kawana K, Usami EA.** The Role of Schwann Cells During Retinal Ganglion Cell Regeneration Induced by Peripheral Nerve Transplantation Schwann cell graft Schwann cell eliminated graft Partial Schwann cell graft. *Investigative Ophthalmology* 1997, 38(7), 1401-1410.
- 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. *European Journal of Neuroscience* 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. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 2009, 63(9), 1544-1552.
- Draper D.** Low Intensity Ultrasound for Promoting Soft Tissue Healing: A Systematic Review of the Literature and Medical Technology. *Internal Medicine Review* 2016, 2(11), 271-280.
- Ek, RO, Zencirci, ŞG, Dost, T, Birincioğlu, M, Bilgin, MD.** Effects of Melatonin Supplementary on the Sciatic Nerve Conduction Velocity in the Ovariectomized Aged Rat. *Neuroendocrinology Letters* 2007, 28(5), 666–670.
- El-Badawy A, Amer M, Abdelbaset R, Sherif SN, Abo-Elala M, Ghallab YH, Abdelhamid H, Ismail Y, El-Badri N.** Adipose Stem Cells Display Higher Regenerative Capacities and More Adaptable Electro-Kinetic Properties Compared to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Scientific Reports* 2016, 6(1), 37801.
- Evans GRD.** Peripheral nerve injury: A review and approach to tissue engineered constructs. *Anatomical Record* 2001, 263(4), 396–404.
- Fan G, Kim D, Hua M, Jun K, Son Y.** Schwann-like cells from human melanocytes and their fate in sciatic nerve injury. *NeuroReport* 2011, 20(12), 603–608.
- Fan L, Yu Z, Li J, Dang X, Wang K.** Schwann-like cells seeded in acellular nerve grafts improve nerve regeneration. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2014a, 15(1), 165.
- Faroni A, Smith RJP, Lu L, Reid AJ.** Human Schwann-like cells derived from adipose-derived mesenchymal stem cells rapidly de-differentiate in the absence of stimulating medium. *European Journal of Neuroscience* 2016, 43(3), 417–430.
- Faroni A, Terenghi G, Reid AJ.** Adipose-derived stem cells and nerve regeneration: Promises and pitfalls. *Çinde International Review of Neurobiology*. 2013, 108, 121-136.
- Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox CS Jr.** Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary first-pass effect. *Stem Cells and Development* 2009, 18(5), s 683–691.
- Foulds IS, Barker AT.** Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. *British Journal of Dermatology* 1983, 109(5), 515–522.

Fu, X, Tong, Z, Li, Q, Niu, Q, Zhang, Z, Tong, X, Tong, L, & Zhang, X. Induction of adipose-derived stem cells into Schwann-like cells and observation of Schwann-like cell proliferation. *Molecular Medicine Reports* 2016, 14(2), s 1187–1193.

Gao S, Zheng Y, Cai Q, Deng Z, Yao W, Wang J, Wang X, Zhang P. Combination of acellular nerve graft and schwann cells-like cells for rat sciatic nerve regeneration. *Neural Plasticity* 2014, 2014, 139085.

Gao S, Zheng Y, Cai Q, Wu X, Yao W, Wang J. Different methods for inducing adipose-derived stem cells to differentiate into Schwann-like cells. *Archives of Medical Science* 2015, 11(4), 886–892.

Gaudet AD, Fonken LK. Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* 2018, 15(3), 554–577.

Geremia NM, Gordon T, Brushart TM, Al-Majed AA, Verge VMK. Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Experimental Neurology* 2007, 205(2), 347-359.

Goodman EM, Greenebaum B, Marron MT. Effects of electromagnetic fields on molecules and cells. *International Review of Cytology* 1995, 158, 279–338.

Gordon T, Amirjani N, Edwards DC, Chan KM. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *Experimental Neurology* 2010, 223(1), 192–202.

Gordon T, Brushart TM, Chan KM. Augmenting nerve regeneration with electrical stimulation. *Neurological Research* 2008, 30(10), 1012-1022.

Gordon T, Udina E, Verge VMK, Posse De Chaves EI. Brief electrical stimulation accelerates axon regeneration in the peripheral nervous system and promotes sensory axon regeneration in the central nervous system. *Motor Control* 2009, 13, 412-441.

Greenebaum B. Calculated spinal cord electric fields and current densities for possible neurite regrowth from quasi-DC electrical stimulation. *Bioelectromagnetics* 2015, 36(8), 564–575.

Guyton AC, Hall JE. *Guyton And Hall Textbook Of Medical Physiology* (12. baskı) , Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2011:57-69.

Han IH, Sun F, Choi YJ, Zou F, Nam KH, Cho WH, Choi BK, Song GS, Koh K, Lee J. Cultures of Schwann-like cells differentiated from adipose-derived stem cells on PDMS/MWNT sheets as a scaffold for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2015, 103(11), 3642–3648.

Han S, Kim DH, Sung J, Yang H, Park JW, Youn I. Electrical stimulation accelerates neurite regeneration in axotomized dorsal root ganglion neurons by increasing MMP-2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2019, 508(2), 348–353.

Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: From form to function. *Brain Research Reviews* 2005, 48(3), 457–476.

Heo JS, Choi Y, Kim HOH-SH, Kim HOH-SH. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International Journal of Molecular Medicine* 2015, 37(1), 115–125.

Herberts CA, Kwa MSG, Hermsen HPH. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine* 2011, 9, 29, PMC3070641.

Hille B. *Ion Channel Excitable Membranes*(3.baskı), Sinauer Associates Inc, Sunderland 2001: 5-7

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005, 7(5), 393–395.

Houshyar KS, Momeni A, Pyles MN, Cha JY, Maan ZN, Duscher D, Jew OS, Siemers F Schoonhoven J van. The Role of Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair. *Plastic Surgery International* 2016, 4175293, s 1–8.

Huckhagel T, Nüchtern J, Regelsberger J, Gelderblom M, Lefering R. Nerve trauma of the lower extremity: Evaluation of 60,422 leg injured patients from the TraumaRegister DGU between 2002 and 2015. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* 2018, 26, 40, PMC5952611.

Hyperphysics. y.y. Tarihinde adresinden erişildi <http://hydrogen.physik.uni-wuppertal.de/hyperphysics/hyperphysics/hbase/biology/nervcell.html>

Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Kazuki K, Tabata Y, Ikada Y, Nakamura H. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2014, 102(5), 1370-1378.

Ifeld BM, Preciado J, Trescot AM. Novel cryoneurolysis device for the treatment of sensory and motor peripheral nerves. *Expert Review of Medical Devices* 2016, 13(8), 713–725.

Ishiguro M, Ikeda K, Tomita K. Effect of near-infrared light-emitting diodes on nerve regeneration. *Journal of Orthopaedic Science* 2010, 15(2), 233–239.

Isseroff RR, Dahle SE. Electrical Stimulation Therapy and Wound Healing: Where Are We Now? *Advances in Wound Care* 2012, 1(6), 238–243.

Jäkel S, Dimou L. Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2017, 11(February), 1–17.

Jessen K R, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of Physiology* 2016, 594(13), 3521-3531.

Jessen K R, Mirsky R. Schwann cell precursors; multipotent glial cells in embryonic nerves. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2019a, 12(March), 1–16.

Jessen K R, Mirsky R. The success and failure of the schwann cell response to nerve injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2019b, 13(February), 1–14.

Jiang W, Wang Y, Tang J, Peng J, Wang Y, Guo Q, Guo Z, Li P, Xiao B, Zhang J. Low-intensity pulsed ultrasound treatment improved the rate of autograft peripheral nerve regeneration in rat. *Scientific Reports* 2016, 6, 22773.

Jianping P, Xiaofeng Y, Yanhua W, Zhenwei W, Yuhui K, Chungui X, Peixun Z, Baoguo J. Different multiple regeneration capacities of motor and sensory axons in peripheral nerve. *Artificial Cells. Blood Substitutes, and Biotechnology* 2012, 40(5), 309–316.

Kean TJ, Lin P, Caplan AI, Dennis JE. MSCs: Delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation. *Stem Cells International* 2013, 732742.

Khalifeh JM, Zohny Z, MacEwan M, Stephen M, Johnston W, Gamble P, ... Ray WZ. Electrical Stimulation and Bone Healing: A Review of Current Technology and Clinical Applications. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering* 2018.

Kim Y, Park J, Choi YK. The role of astrocytes in the central nervous system focused on BK channel and heme oxygenase metabolites: A review. *Antioxidants* 2019, 8(5), 7–13.

Kumar PJ, Adams RD, Harkins AB, Engeberg ED, Willits RK. Stimulation Frequency Alters the Dorsal Root Ganglion Neurite Growth and Directionality In Vitro. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 2016, 63(6), 1257–1268.

Leppik L, Zhihua H, Mobini S, Thottakkattumana Parameswaran V, Eischen-Loges M, Slavici A, Helbing J, Pindur L, Oliveira KMC, Bhavsar MB, Hudak L, Henrich D, Barker JH. Combining electrical stimulation and tissue engineering to treat large bone defects in a rat model. *Scientific Reports* 2018, 8, 6307.

Li R, Liu Z, Pan Y, Chen L, Zhang Z, Lu L. Peripheral Nerve Injuries Treatment: A Systematic Review. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2014, 68(3), 449-454

Liu G, Cheng Y, Guo S, Feng Y, Li Q, Jia H, Wang Y, Tong L, Tong X. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. *International Journal of Molecular Medicine* 2011, 28(4), 565–572.

Loyola-Sánchez A, Richardson J, Beattie KA, Otero-Fuentes C, Adachi JD, MacIntyre NJ. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the cartilage repair in people with mild to moderate knee osteoarthritis: A double-blinded, randomized, placebo-controlled pilot study. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2012, 93(1), 35-42.

MacEwan MR, Gamble P, Stephen M, Ray WZ. Therapeutic electrical stimulation of injured peripheral nerve tissue using implantable thin-film wireless nerve stimulators. *Journal of Neurosurgery* 2018, 9,1-10.

Mahay D, Terenghi G, Shawcross SG. Schwann cell mediated trophic effects by differentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* 2008, 314(14), 2692-2701.

Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *International Journal of Cell Biology* 2016, 2016, 6940283.

Martens W, Sanen K, Georgiou M, Struys T, Bronckaers A, Ameloot M, Phillips J, Lambrechts I. Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. *FASEB Journal* 2014, 28(4), 1634–1643.

Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka G. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20(10), 1–30.

McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, Midha R, Miller FD. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *Journal of Neuroscience* 2006, 26(24), 6651–6660.

Mert T, Gunay I, Gocmen C, Kaya M, Polat S. Regenerative effects of pulsed magnetic field on injured peripheral nerves. *Altern Ther Health Med* 2006, 12(5), 42–49.

Mildmay-White A, Khan W. Cell Surface Markers on Adipose-Derived Stem Cells: A Systematic Review. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2012, 12(6), 484-492.

- Miranda GE, Torres RY.** Epidemiology of traumatic peripheral nerve injuries evaluated with electrodiagnostic studies in a tertiary care hospital clinic. *Puerto Rico Health Sciences Journal* 2016, 35(2), 76–80.
- Moldovan M, Sørensen J, Krarup C.** Comparison of the fastest regenerating motor and sensory myelinated axons in the same peripheral nerve. *Brain* 2006, 12(99) 2471–2483.
- Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G.** Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *Journal of Neuroscience Methods* 2008, 170(2), 255–261.
- Morries LD, Cassano P, Henderson TA.** Treatments for traumatic brain injury with emphasis on transcranial near-infrared laser phototherapy. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2015, 11, 2159–2175.
- Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R.** Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle and Nerve* 1998, 21(8), 1095–1097.
- Niyaz M, Gürpınar ÖA, Günaydin S, Onur MA.** Isolation, culturing and characterization of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: A simple technique. *Turkish Journal of Biology* 2012, 36(6), 658–664.
- Noble J, Munro CA, Prasad VSSV, Midha R.** Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care* 1998, 45(1), 116-122.
- Orbay H, Little CJ, Lankford L, Olson CA, Sahar DE.** The Key Components of Schwann Cell-like Differentiation Medium and their Effects on Gene Expression Pattern of Adipose-Derived Stem Cells. *Annals of Plastic Surgery* 2015, 74(5), 584–588.
- Panagopoulos GN, Megaloikononimos PD, Mavrogenis AF.** The Present and Future for Peripheral Nerve Regeneration. *Orthopedics* 2017, 40(1), 141–156.
- Park DH, Eve DJ, Musso J, Klasko SK, Cruz E, Borlongan C V., Sanberg PR.** Inflammation and stem cell migration to the injured brain in higher organisms. *Stem Cells and Development* 2009, 18(5), 693-702.
- Park HW, Lim MJ, Jung H, Lee SP, Paik KS, Chang MS.** Human mesenchymal stem cell-derived Schwann cell-like cells exhibit neurotrophic effects, via distinct growth factor production, in a model of spinal cord injury. *GLIA* 2010, 58(9), 1118-1132.
- Pereda AE.** Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 2014, 15(4): 250–263.
- Piovesana R, Faroni A, Magnaghi V, Reid AJ, Tata AM.** M2 receptors activation modulates cell growth, migration and differentiation of rat Schwann-like adipose-derived stem cells. *Cell Death Discovery* 2019, 5(1).
- Purdy MT, Wijdenes P, Zaidi W, Syed NI, Dalton C.** Accelerating neurite outgrowth through electric field manipulation. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, 1169–1172, Haziran 7-12, 2015, Toronto, Kanada.
- Ren C, Chen X, Du N, Geng S, Hu Y, Liu X, Wu X, Lin Y, Bai X, Yin W, Cheng S, Yang L, Zhang Y.** Low-intensity pulsed ultrasound promotes Schwann cell viability and proliferation via the GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *International Journal of Biological Sciences* 2018, 14(5), 497–507.
- Rosso M, Buchaim D, Kawano N, Furlanette G, Pomini K, Buchaim R.** Photobiomodulation Therapy (PBMT) in Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review. *Bioengineering* 2018, 5(2), 44.

Saadat S, Eslami V, Rahimi-Movaghar V. The incidence of peripheral nerve injury in trauma patients in Iran. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi* 2011, 17(6), 539–544.

Shapira Y, Sammons V, Forden J, Guo GF, Kipp A, Girgulis J, Mishra T, de Villers Alant JD, Midha R. Brief Electrical Stimulation Promotes Nerve Regeneration following Experimental In-Continuity Nerve Injury. *Clinical Neurosurgery* 2019, 85(1), 156–163.

Shen CC, Yang YC, Huang T Bin, Chan SC, Liu BS. Neural regeneration in a novel nerve conduit across a large gap of the transected sciatic nerve in rats with low-level laser phototherapy. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2013, 101(10), 2763–2777.

Sowa Y, Kishida T, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Tabata Y, Mazda O. Adipose-Derived Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration in Vivo without Differentiation into Schwann-Like Lineage. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2016, 137(2), 318-330.

Steel HC, Alessandrini M, Mellet J, Dessels C, Oloyo AK, Pepper MS. Cord Blood Stem Cell Bankig, In: *Stem Cell Processing (1. Baskı)*, Phuc Van Pham, Springer International Publishing, Cham, İsviçre 2016:225.

Sun X, Zhu Y, Yin HY, Guo ZY, Xu F, Xiao B, Jiang WL, Guo WM, Meng HY, Lu SB, Wang Y, Peng J. Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell-like cells through intermittent induction: Potential advantage of cellular transient memory function. *Stem Cell Research and Therapy* 2018, 9(1), 1–20.

Suszyński K, Marcol W, Szajkowski S, Pietrucha-Dutczak M, Cieślak G, Sieroń A, Lewin-Kowalik J. Variable spatial magnetic field influences peripheral nerves regeneration in rats. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2014, 33(3), 198–205.

Sutton MT, Bonfield TL. Stem cells: Innovations in clinical applications. *Stem Cells International* 2014, 516278.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006, 126(4), 663–676.

Tamaki T, Hirata M, Nakajima N, Saito K, Hashimoto H, Soeda S, Uchiyama Y, Watanabe M. A A long-gap peripheral nerve injury therapy using human skeletal muscle-derived stem cells (Sk-SCs): An achievement of significant morphological, numerical and functional recovery. *PLoS ONE* 2016, 11(11), 1–28.

Taylor CA, Rice JB. The Incidence of Peripheral Nerve. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* 2008, 87(5), 381-385.

Thakral G, LaFontaine J, Najafi B, Talal TK, Kim P, Lavery LA. Electrical stimulation to accelerate wound healing. *Diabetic Foot and Ankle* 2013, 4, 10.3402.

Tomita K, Madura T, Sakai Y, Yano K, Terenghi G, Hosokawa K. Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: Implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience* 2013, 16(236), 55–65.

Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Bioscience Reports* 2015, 35(2), e0019.

Varejão ASP, Meek MF, Ferreira AJA, Patrício JAB, Cabritae AMS. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: Walking track analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 2001, 108(1), 1–9.

- Vela FJ, Martínez-Chacón G, Ballestín A, Campos JL, Sánchez-Margallo FM, Abellán E.** Animal models used to study direct peripheral nerve repair: A systematic review. *Neural Regeneration Research* 2020, 15(3), 491-502.
- Wang CZ, Chen YJ, Wang YH, Yeh ML, Huang MH, Ho ML, ... Chen CH.** Low-level laser irradiation improves functional recovery and nerve regeneration in sciatic nerve crush rat injury model. *PLoS ONE* 2014, 9(8), e103348.
- Wang E, Inaba K, Byerly S, Escamilla D, Cho J, Carey J, Stevanovic M, Ghiassi A, Demetriades D.** Optimal timing for repair of peripheral nerve injuries. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2017, 83(5), 875–881.
- Wagh A, Grant A.** *Anatomy & Physiology in Health and Illness* (12. baskı). Churchill Livingstone, Londra, Birleşik Krallık, 2014: 139-190.
- Wei Y, Gong K, Zheng Z, Liu L, Wang A, Zhang L, Ao Q, Gong Y, Zhang X.** Schwann-like cell differentiation of rat adipose-derived stem cells by indirect co-culture with Schwann cells in vitro. *Cell Proliferation* 2010, 43(6), 606–616.
- Willand MP, Nguyen MA, Borschel GH, Gordon T.** Electrical Stimulation to Promote Peripheral Nerve Regeneration. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 2016, 30(5), 490–496.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Reichenbach A, Mack AF.** *Encyclopedia of Neuroscience* (1. baskı), Larry R. Squire, Academic Press, San Diego, Kaliforniya, ABD, 2009: 1133-1140
- Wood M, Willits RK.** Short-duration, DC electrical stimulation increases chick embryo DRG neurite outgrowth. *Bioelectromagnetics* 2006, 27(4), 328–331.
- Xiao YZ, Wang S.** Differentiation of Schwannlike cells from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in vitro. *Molecular Medicine Reports* 2015, 11(2), 1146–1152.
- Xie LW, Fang H, Chen AM, Li F.** Differentiation of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like pheno-type in vitro. *Chinese Journal of Traumatology - English Edition* 2009, 12(2), 98–103.
- Xue J, Yang J, O'Connor DM, Zhu C, Huo D, Boulis NM, Xia Y.** Differentiation of Bone Marrow Stem Cells into Schwann Cells for the Promotion of Neurite Outgrowth on Electrospun Fibers. *ACS Applied Materials and Interfaces* 2017, 9(14), 12299–12310.
- Yamaguchi S, Aoyama T, Ito A, Nagai M, Iijima H, Tajino J, Zhang X, Waturu K, Kuroki H.** Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound after Mesenchymal Stromal Cell Injection to Treat Osteochondral Defects: An In Vivo Study. *Ultrasound in Medicine and Biology* 2016, 42(12), 2903-2913.
- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z.** Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy* 2019, 10, (68) 2019.
- Zaminy A, Ali Shokrgozar M, Sadeghi Y, Noroozian M, Hassan Heidari M, Piryaee A.** Mesenchymal stem cells as an alternative for Schwann cells in rat spinal cord injury. *Iranian Biomedical Journal* 2013, 17(3), 113–122.
- Zencirci, ŞG, Bilgin, MD, Yaraneri, H.** Electrophysiological and theoretical analysis of melatonin in peripheral nerve crush injury. *Journal of Neuroscience Methods* 2010, 191(2), 277–282.

Zhang X, Xin N, Tong L, Tong XJ. Electrical stimulation enhances peripheral nerve regeneration after crush injury in rats. *Molecular Medicine Reports* 2013, 7(5), 1523–1527.

Zhang Y, Yan J, Xu H, Yang Y, Li W, Wu H, Liu C. Extremely low frequency electromagnetic fields promote mesenchymal stem cell migration by increasing intracellular Ca²⁺ and activating the FAK/Rho GTPases signaling pathways in vitro. *Stem Cell Research and Therapy* 2018, 9(1), 143.

Ziegler L, Grigoryan S, Yang IH, Thakor N V., Goldstein RS. Efficient Generation of Schwann Cells from Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurospheres. *Stem Cell Reviews and Reports* 2011, 7(2), 394-403.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 2002, 13(12), 4279-4295.

Zuo KJ, Shafa G, Antonyshyn K, Chan K, Gordon T, Borschel GH. A single session of brief electrical stimulation enhances axon regeneration through nerve autografts. *Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open* 2019, 7(4), 51-52.

EKLER



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK
KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 22.Ağustos. 2017

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2017 Yılı VIII. Oturum
Sayı : 64583101/2017/087
Proje Başlığı :Elektriksel Stimülasyon ve Schwann-Benzeri Hücrelerin Periferik Sinir Hasarına Etkileri.
Proje Yürütücüsü : Mehmet Dinçer BİLGİN
Proje Ekibi : Mahmut Alp KILIÇ

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötusu kullanılması
İnsan embriyosu ve fötusu dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır

(Değerlendirmede Bulunmadı)
Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN

Başkan

Prof. Dr. Deniz ÇOBAN

Üye

Vet. Hek. Serdar AKTAŞ

Üye

Prof. Dr. Tushan DOST

Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Yücel KOCA

Üye

Vet. Hek. Dr. Birgül ÜNALP

Üye

Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ

Üye

(Yıllık İzinli)

Doç. Dr. Evrim DERELİ FİDAN

Üye

(Toplantıya Katılmadı)
Yurdagül ALTINBAŞ

Üye

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : KILIÇ, MAHMUT ALP
Uyruk : TÜRKİYE CUMHURİYETİ
Doğum yeri ve tarihi : BALIKESİR - 28.06.1985
Telefon : 05051065738
E-mail : mahmutalpkillic@adu.edu.tr
Yabancı Dil : İNGİLİZCE

EĞİTİM

| Derece | Kurum | Mezuniyet tarihi |
|-----------|--|------------------|
| Doktora | AYDIN ADNAN MENDERS ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ/BİYOFİZİK (YL) | Ağustos/2020 |
| Y. Lisans | (TEZLİ) TRAKYA ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ/FİZİK | Ağustos/2012 |
| Lisans | BÖLÜMÜ/FİZİK PR. (İÖ) | 2009 |

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

Sözlü Bildiri İkincilik Ödülü, 1st International Urban Environment Health Congress, 2016

Sözlü Bildiri Üçüncülük Ödülü, 1st International Urban Environment Health Congress, 2016

Excellent Abstract, 8th Annual Meeting of Chinese College of Surgeons and the 19th Annual Meeting of the European Society of Surgery, ÇİN HALK CUMHURİYETİ, 2015

İŞ DENEYİMİ

| Yıl | Yer/Kurum | Ünvan |
|-----------|---|------------|
| 2014 - | Adnan Menderes Üniversitesi/Tıp Fakültesi/Temel Tıp Bilimleri Bölümü/Biyofizik Anabilim Dalı) | Araş. Gör. |
| 2016-2017 | University Of Manchester/Faculty Of Medical And Human Sciences/Centre For Tissue Injury And Repair/Blond Mcindoe Laboratories (Ekim 2016 - Temmuz 2017 Tarihleri Arasında Erasmus Staj Programı Kapsamında) | Researcher |

2012-2014

İstanbul Üniversitesi/Cerrahpaşa Araş. Gör.

Tıp Fakültesi/Temel Tıp Bilimleri

Bölümü/Biyofizik Anabilim Dalı)

AKADEMİK YAYINLAR

1.MAKALELER

1. KIZILAY, Z., AKTAŞ, S., KAHRAMAN ÇETİN, N., KILIÇ, M.A., and ÖZTÜRK, H. 2019. Effect of tarantula cubensis extract theranekron on peripheral nerve healing in an experimental sciatic nerve injury model in rats. Turkish Neurosurgery 29, 5, 743–749.
2. KIYLIOĞLU, N., KILIÇ, M.A., KOCATÜRK, T., ÖZKAN, S.B., and BİLGİN, M. 2018. A Custom made Pupillometer System for Characterizing Pupillary Light Response. Turkish Journal of Ophthalmology 48, 4, 185–189.
3. MORTIMER, A.E., FARONI, A., KILIÇ, M.A., and REID, A.J. 2017. Maintenance of a Schwann Like Phenotype in Differentiated Adipose Derived Stem Cells Requires the Synergistic Action of Multiple Growth Factors. Stem Cells International 2017, 1–7.
4. AYDEMİR, B., CİNEMRE, F.B., CİNEMRE, H., et al. 2016. Evaluation of metallothionein 1 metallothionein 2 lipid peroxidation and trace elements status in the progression of the spontaneous mitral chordae tendineae rupture patients. Trace Elements and Electrolytes 33, 10, 162–170.
5. YILMAZ ABDOLSAHEB, T., KILIÇ, M.A., ERDOĞAN, M., et al. 2016. Machine learning aided diagnosis of hepatic malignancies through dielectric measurements with microwaves. Physics in Medicine and Biology 61, 13, 5089–5102.

2. PROJELER

1. Mikrodalga Frekanslarında Elektriksel Özelliklerin Ölçümü ile Biyolojik Doku Tanıma, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü:KALKAN MUSTAFA TUNAYA,Araştırmacı:ÖZCAN MURAT,Araştırmacı:SÖYLET YUNUS,Araştırmacı:TEKSÖZ SERKAN,Araştırmacı:KILIÇ MAHMUT ALP, , 08/08/2012 - 01/01/2014 (ULUSAL)
2. 50 HZ MANYETİK ALAN UYGULANAN SIÇAN DOKULARININ HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, , 01/06/2014 - 05/08/2014 (ULUSAL)
3. Manyetik Alan Uygulanan Siçanlarda Melatonin Salgısı ve Epifiz Bezi Clock Genleri Düzeyi, TÜBİTAK PROJESİ, Araştırmacı, , 01/06/2014 - 01/06/2015 (ULUSAL)

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. CİNEMRE FATMA BEHİCE, CİNEMRE HAKAN, BAHTİYAR NURTEN, ÖĞÜT SELİM, AKDEMİR RAMAZAN, VATAN MEHMET BÜLENT, KILIÇ MAHMUT ALP, KIZILER ALİ RIZA, AYDEMİR BİRSEN (2017). The Levels of Copper, Iron, Zinc and Lipid Peroxidation in the Pathogenesis of Mithral Chordae Tendinea Rupture. Association of Thrance Universities 1sr International Health Sciences Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3857677)
2. CİNEMRE FATMA BEHİCE, CİNEMRE HAKAN, BAHTİYAR NURTEN, ÖĞÜT SELİM, AKDEMİR RAMAZAN, VATAN MEHMET BÜLENT, KILIÇ MAHMUT ALP, KIZILER ALİ RIZA, AYDEMİR BİRSEN (2017). Relationship of Fe/Zn, Fe/Cu, Cu/Zn Ratios with Proinflammatory Cytokines in Mitral Chorda Tendinea Rupture. International Meeting on Education and Research in Health Sciences (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3857831)
3. CİNEMRE FATMA BEHİCE, CİNEMRE HAKAN, BAHTİYAR NURTEN, ÖĞÜT SELİM, AKDEMİR RAMAZAN, VATAN MEHMET BÜLENT, KILIÇ MAHMUT ALP, KIZILER ALİ RIZA, AYDEMİR BİRSEN (2017). Roles of Fe/Zn, Fe/Cu, Cu/Zn Ratios and Oxidative Damage in the Pathogenesis of Mitral Chordae Tendinea Rupture. International Meeting on Education and Research in Health Sciences (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3857753)
4. SARİBAL DEVRİM, BAHTİYAR NURTEN, KILIÇ MAHMUT ALP, KANBER EYÜP MURAT, AYDIN KİREÇTEPE ASLI, AKYOLCU MEHMET CAN (2017). Investigation of Relations Between GSTT1 Polymorphism and Lower Extremity Varix. ACTA PHYSIOLOGICA, 221(null), 76-76. (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4941745)
5. BİLGİN MEHMET DİNÇER, EVCİ KİRAZ EMİNE DİDEM, BOZKURT ÖZLEM, KILIÇ MAHMUT ALP, BAKAY İLHAN DİDEM, AKSEL MEHRAN, KÖKEN ERGÜN CEM (2016). Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüsünde ELF EMF Ölçümleri ve Öğrencilerin ELF EMF Maruziyet Hakkındaki Bilgi Düzeyleri. 1st International Urban Environment Health Congress (Tam Metin Bildiri/)(Yayın No:2913295)
6. BİLGİN MEHMET DİNÇER, EVCİ KİRAZ EMİNE DİDEM, BOZKURT ÖZLEM, KILIÇ MAHMUT ALP, BAKAY İLHAN DİDEM, KÖKEN ERGÜN CEM, AKSEL MEHRAN (2016). Cep Telefonları ve Sağlık Üzerine Zararlı Etkileri Hakkında Üniversite Öğrencilerinin Bilgi Düzeylerinin Değerlendirilmesi. 1st International Urban Environment Health Congress (Tam Metin Bildiri/)(Yayın No:2913298)

7. EVCİ KİRAZ EMİNE DİDEM, BİLGİN MEHMET DİNÇER, BOZKURT ÖZLEM, BAKAY İLHAN DİDEM, KILIÇ MAHMUT ALP (2016). Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrencilerinin Ultraviyole Radyasyon ve Korunma YöntemleriHakkındaki Farkındalıkları. 1st International Urban Environment Health Congress (Tam Metin Bildiri/)(Yayın No:2913294)
8. AYDEMİR BİRSEN, KILIÇ MAHMUT ALP (2015). Relations Of Copper Iron Zinc Selenium And Metallothionein 1 Levels In The Mitral Chordae Tendineae Rupture Patients. 9th International Physics Conference of the Balkan Physical Union (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:1674522)
9. MERT MURAT, BAHİYAR NURTEN, SARIBAL DEVRİM, KILIÇ MAHMUT ALP, ERDOĞAN SİNAN, AKYOLCU MEHMET CAN (2015). Evaluation of Oxidative Stress in Hip FractureOperated Elderly Patients. 10th European Biophysics Congress (EBSA 2015), 44(5), 60, Doi: 10.1007/s00249-015-1045-6 (Özet Bildiri/)(Yayın No:1674539)
10. SARIBAL DEVRİM, BALKAYA MUSTAFA, BAHTİYAR NURTEN, KILIÇ MAHMUT ALP, ASLI KİREÇTEPE AYDIN, AKYOLCU MEHMET CAN (2015). Does early maternal separation effect antioxidantenzyme and telomerase activity in adulthood. 10th European Biophysics Congress (EBSA 2015), 44(5), 248, Doi: 10.1007/s00249-015-1045-6 (Özet Bildiri/)(Yayın No:1674547)
11. KILIÇ MAHMUT ALP, BAHTİYAR NURTEN, SARIBAL DEVRİM, KİREÇTEPE AYDIN ASLI, GÜRKAN KORAY, KALKAN TUNAYA (2015). Does lighting conditions effect on hormone andantioxidant levels of magnetic field exposed rats. 10th European Biophysics Congress (EBSA 2015), 44(5), 247, Doi: 10.1007/s00249-015-1045-6 (Özet Bildiri/)(Yayın No:1674543)
12. ÖZCAN MURAT, ÇAYÖREN MEHMET, ARIKAN AKİF ENES, KILIÇ MAHMUT ALP, SERKAN TEKSÖZ, AKDUMAN İBRAHİM, TUNAYA KALKAN (2015). New imaging technique for breast carcinoma Cerrahpasa experience Preliminary Report. 8th annual meeting of Chinese Collegeof Surgeons and 19th annual meeting of the EuropeanSociety of Surgery, Doi: 10.1007/s10353-015-0335-7 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:2309026)
13. KILIÇ MAHMUT ALP, ERDOĞAN MELİKE, ÇAYÖREN MEHMET, KEPİL NURAY, AKDUMAN İBRAHİM, KALKAN MUSTAFA TUNAYA (2014). Comparison of Electrical Properties Between Normal and Pathological Tissues in

- Rats. 8 th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields Radiofrequency (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:1674383)
14. AYDEMİR BİRSEN, AKDEMİR RAMAZAN, VATAN MEHMET BÜLENT, CİNEMRE FATMA BEHİCE, CİNEMRE HAKAN, KIZILER ALİ RIZA, BAHTİYAR NURTEN, KILIÇ MAHMUT ALP (2014). Trace Elements Lipid Peroxidation And Glutathione Levels In Erythrocytes And Metallothionein Levels Of Patients With Chordae Tendineae. Annual Meeting of the German Biophysical Society (/)(Yayın No:1674510)
 15. GÜROL ÇİFTÇİ GÖNÜL, AYDEMİR BİRSEN, KIZILER ALİ RIZA, SARI SİBEL, EYVAN TOPÇU NAZLI, KILIÇ MAHMUT ALP, UTKAN TİJEN, ATEŞ NURBAY (2014). Effects of YC 1 on zinc copper lipid peroxidation nitric oxide levels and superoxide dismutase activities in single dose pentylenetetrazole induced epileptic seizures. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:1674438)
 16. KILIÇ MAHMUT ALP, BUDAK METİN, TUNCEL HANDAN, KALKAN MUSTAFA TUNAYA (2012). Influence of Magnetic Fields on Experimental Colon Tumor Model and Effect of Beta Catenin Interaction. 7 th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields Radiofrequency with Continuous Wave (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:1674362)
 17. TUNCEL HANDAN, BUDAK METİN, DEVELİOĞLU ÖMER, KILIÇ MAHMUT ALP, KALKAN MUSTAFA TUNAYA (2012). Single Strand Conformation Polymorphism SSCP Analysis Of Survivin And Beta Catenin Genes in Rats which Exposed to 900 Mhz. 7 th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields Radiofrequency with Continuous Wave (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:1674366)
 18. BUDAK METİN, KILIÇ MAHMUT ALP, TUNCEL HANDAN (2010). Genetic analysis of the survivin in rats Is there any relation with magnetic field sensitivity and alterations. 6th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:1674335)
 19. KILIÇ MAHMUT ALP, ÇEREZCİ OSMAN, ÇEVİK ÖZGE , KALKAN MUSTAFA TUNAYA (2010). Electromagnetic Field Map of a Medical Faculty Campus. 6th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:1674330)

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. SARIBAL DEVRİM, KANBER EYÜP MURAT, KILIÇ MAHMUT ALP, AYDIN KİREÇTEPE ASLI, BAHTİYAR NURTEN, AKYOLCU MEHMET CAN (2017). Alt Ekstremitte Varislerinde Antioksidan Savunma Sistemi Yetersizliği ve Sistem Elemanlarındaki Genetik Değişikliklerin Etkisinin Belirlenmesi. 28-29. ULUSAL BİYOFİZİK KONGRESİ (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3949503)
2. BAKAY İLHAN DİDEM, BOZKURT GİRİT ÖZLEM, KILIÇ MAHMUT ALP, KÖKEN ERGÜN CEM, AKSEL MEHRAN, BİLGİN MEHMET DİNÇER (2017). Elektromanyetik Alanın Sağlık Üzerine Etkileri Hakkında Adnan Menderes Üniversitesi Öğrencilerinin Farkındalıkları. 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi (/Poster)(Yayın No:3580999)
3. KIYLIOĞLU NEFATİ, KILIÇ MAHMUT ALP, BAKAY DİDEM, MAVİOĞLU MUSTAFA TAYFUN, BİLGİN MEHMET (2015). Düşük maliyetli pupilometre sistemiyle görev uyarımlı pupiler tepkinin karakterizasyonu. ULUSLARARASI KATILIMLI 27. ULUSAL BİYOFİZİK KONGRESİ (/)(Yayın No:1674559)
4. KILIÇ MAHMUT ALP, BAHTİYAR NURTEN, SARIBAL DEVRİM, KİREÇTEPE AYDIN ASLI, GÜRKAN KORAY, KALKAN MUSTAFA TUNAYA (2015). Farklı Işık Koşulları Altında 50 Hz Manyetik Alanın Serum Melatonin ve Serotonin Düzeyine Etkisi. ULUSLARARASI KATILIMLI 27. ULUSAL BİYOFİZİK KONGRESİ (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:1674569)
5. AYDEMİR BİRSEN, GÜROL ÇİFTÇİ GÖNÜL, EKİNCİ FATİH, CİNEMRE FATMA BEHİCE, KIZILER ALİ RIZA, KILIÇ MAHMUT ALP, EYVAN TOPÇU NAZLI (2014). Genetik Absans Epilepsili WAG Rij Sıçanlarda Bazı Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin İncelenmesi. 8.HÜCRESEL SINIR BİLİM GÜNLERİ SAÜ Kültür ve Kongre Merkezi (/)(Yayın No:1674512)
6. KILIÇ MAHMUT ALP, TEKSÖZ SERKAN, CANLI GÜRAY ALİ, ÖZCAN MURAT, AKDUMAN İBRAHİM, KALKAN MUSTAFA TUNAYA (2011). Tiroid Dokusunun Mikrodalgalara Tepkisinin Belirlenmesi İçin Dielektrik Sabiti Ve Elektriksel İletkenliğinin Ölçülmesi. Çevre ve Halk Sağlığı İçin Emanet (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:1674359)