

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN OLFAKTOR KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU KÜLTÜRÜNÜN
YAPILMASI KARAKTERİZASYONU VE HASAR GÖRMÜŞ FASİYAL SİNİRİN
(RATLARDA) REJENERASYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

OLGA NEHİR ÖZTEL

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ADİL ALLAHVERDİYEV**

İSTANBUL, 2014

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN OLFAKTÖR KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU KÜLTÜRÜNÜN
YAPILMASI KARAKTERİZASYONU VE HASAR GÖRMÜŞ FASİYAL SİNİRİN
(RATLARDA) REJENERASYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Olga Nehir ÖZTEL tarafından hazırlanan tez çalışması 19.08.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü'nde DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Mehmet Veli KARAALTIN
Acıbadem Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Alper YILMAZ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tülay İREZ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü' nün 2012-07-04 KAP02 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca akademik bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, değerli danışman hocam Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e; çalışmalarım boyunca aynı ilgi ve desteği gösteren hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya;

Tezin gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK'a, Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığı'na, Yıldız Teknik Üniversitesi Rektörlüğü'ne,

Tez çalışmasına değerli katkılarından dolayı Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Kliniği, Uzm. Dr. Aysegül BATIOĞLU KARAALTIN başta olmak üzere, Acıbadem Hastanesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Bölümü'nden Doç. Dr. Mehmet Veli KARAALTIN'a, Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği Uzm. Dr. Belit Merve ŞENER ve Başhekim Doç. Dr. Özgür YİĞİT, Asistan Dr. Artunç Kaan TURANOĞLU'na, Nöroloji Bölümü Uzm. Dr. Turgut ADATEPE'ye, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'na ve çalışanlarına,

Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM) Müdürü Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e ve çalışmalarına desteklerinden dolayı Dr. Ayça AKSOY ve Biyolog Gülay Beyazıt'a,

Acıbadem LabCell Hücre Laboratuvarı ve Kordon Kanı Bankası Mesul Müdürü Prof. Dr. Ercüment OVALI'ya ve Dr. Fatma EYÜBOĞLU'na

Bu çalışmayı 2012-07-04 KAP02 numaralı proje ile destekleyen Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü'ne;

Biyomühendislik Bölümümüzün kurucusu ve eski bölüm başkanı değerli bilim adamı rahmetli Prof. Dr. M. Mustafa AKDESTE ve yine eski bölüm başkanımız ve değerli hocamız rahmetli Prof. Dr. Huriye KUZU'ya;

Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği grubumuza özellikle de, Melike ERSÖZ, Sezen CANIM ATEŞ, Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Emrah Şefik ABAMOR, Gökçe ÜNAL, Rabia ÇAKIR KOÇ, Serkan YAMAN, Hilal TOPTAŞ, Özlem Ayşe ÖZYILMAZ, Necati FINDIKLI, Zafer Nihat CANDAN, Aslı Pınar ZORBA' ya,

Biyomühendislik Bölümünün Değerli Öğretim Üyesi hocalarıma, asistanlara ve çalışma arkadaşlarıma,

Sabrı ve emekleri için çok sevgili Sarper GÜDEK' e,

Hayatımın her anında desteklerini benden esirgemeyen en değerli varlıklarım annem Fatma ÖZTEL ve babam Ömer ÖZTEL'e;

SONSUZ TEŞEKKÜRLER

Temmuz, 2014

Olga Nehir ÖZTEL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez.....	4
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 Fasiyal Sinir	6
2.1.1 Fasiyal Sinirin Tarihçesi.....	6
2.1.2 Fasiyal Fasiyal Sinirin (Yüz Siniri- Nervus Facialis) Yapısı.....	7
2.2 Fasiyal paraliziler.....	8
2.2.1 Patofizyoloji	9
2.2.2 Santral Fasiyal Paraliziler	10
2.2.3 Periferik Fasiyal Paraliziler.....	11
2.2.4 Fasiyal Sinir Hasarlarının Sınıflandırılması	11
2.3 Fasiyal Paralizin Değerlendirmesinde Kullanılan Nörodiagnostik Testler	12
2.3.1 Elektromiyografi	13
2.4 Kök Hücreler.....	14
2.4.1 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri	15
2.4.1.1 Totipotent Hücreler	17
2.4.1.2 Pluripotent Kök Hücreler	17
2.4.1.3 Multipotent Kök Hücreler.....	18
2.4.1.4 Unipotent Hücreler.....	18
2.4.2 Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynaklar	18
2.4.2.1 Embriyonik Kök Hücreler	19
2.4.2.2 Erişkin Kök Hücreler.....	20
2.4.2.2.1 Mezenkimal Kök Hücreler.....	21

2.4.2.2.1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Genel Özellikleri	23
2.4.2.2.1.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri	24
2.4.2.2.1.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünotipik Özellikleri.....	24
2.4.2.2.1.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması	25
2.4.2.2.2 Hematopoetik Kök Hücreler	27
2.4.2.2.3 Nöral kök hücreler	28
2.4.3 Olfaktör bulbus yapısı ve olfaktör bulbusdaki nörojeniz.....	31
2.4.4 Olfaktör kök hücreler.....	32
2.4.5 Olfaktör epiteldeki nörolojik niş	33
2.5 Olfaktör Bulbus Nörojenizi	35
2.5.1 Olfaktör epitelde nörojenizin düzenlenmesi.....	39
2.6 Erişkin hücrelerin kriyoprezervasyonu.....	40
2.7 CM-Dil	40
2.8 Neurotube Konduit	41

BÖLÜM 3

MATERYEL ve METOD	42
3.1 Materyel.....	42
3.1.1 Ekipman	42
3.1.2 Kimyasallar.....	44
3.1.3 Deneylerde Kullanılan Kimyasalların, Tamponların, Besiyerlerinin, Kültür Ortamlarının, Dondurma ve Farklılaşma Medyumlarının Hazırlanışı.....	45
3.1.3.1 Tamponlar ve Kimyasallar	45
3.1.3.1.1 Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS) Çözeltisi	45
3.1.3.1.2 Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması	45
3.1.3.2 Besiyerlerinin Hazırlanması	46
3.1.3.2.1 Düşük Glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM)	46
3.1.3.2.1.1 Kültürün ve Kullanılan Besiyerlerinin Sterillik Kontrolü	47
3.1.3.3 Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması.....	47
3.2 Metod	50
3.2.1 Hücre Kültür Çalışmaları	50
3.2.1.1 Donörün Çalışma Hakkında Bilgilendirilmesi Ve Etik Kurul Onayı Alınması	50
3.2.1.2 Olfaktör Mukozadan Biyopsi Alınması.....	50
3.2.1.3 Olfaktör Mukozadan Kök Hücrelerin İzolasyonu	50
3.2.1.4 Olfaktör Kök Hücrelerin Devamlı Kültürünün Yapılması	51
3.2.1.5 Olfaktör Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	52
3.2.1.5.1 İmmün Boyama ve Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) Analizi	52
3.2.1.5.2 Olfaktör Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaştırılması.....	52

3.2.1.5.3 Olfaktör Mezenkimal Kök Hücrelerin Nörojenik Farklılaştırılması.....	53
3.2.1.5.4 Olfaktör Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaştırılması.....	53
3.2.1.5.4.1 Kondrojenik Farklılaştırılma Medyumu ile indüklenen Olfaktör Mezenkimal Kök Hücrelerin Alcian Blue ile Boyanması	53
3.2.2 CM-Dil ile olfaktör kök hücrelerin işaretlenmesi.....	54
3.2.3 Çok tabakalı hücre kitlesinin hazırlanması	54
3.2.4 <i>in vivo</i> Deney Hayvanı Çalışmaları	55
3.2.4.1 Ön çalışmalar	55
3.2.4.1.1 Ratlarda Anestezi ve fasiyal paraliz oluşturulması	55
3.2.4.2 <i>in vivo</i> ön çalışmaların değerlendirilmesi	57
3.2.5 Esas Çalışmalar	57
3.2.5.1 Ratlara Anestezi Verilmesi ve fasiyal paraliz oluşturulması	57
3.2.5.2 Whiskers Skrolama	59
3.2.5.3 Elektromyografi	59
3.2.5.4 Histopatolojik inceleme.....	62
3.2.5.4.1 Hücrelerin 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile işaretlenmesi	62
3.2.6 İstatistik	62

BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	63
4.1 <i>in vitro</i> Deneysel Çalışmalar	63
4.1.1 Farklı Donörlerin Olfaktör Mukoza Biyopsilerinden Kök Hücrelerin İzolasyonu.....	63
4.1.2 Olfaktör Mukoza Biyopsisinden Olfaktör Kök Hücrelerin İzolasyonu Ve Kültürünün Yapılması	64
4.1.3 Olfaktör Mukozadan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	65
4.1.3.1 Olfaktör Dokudan Elde Edilen Hücrelerin Adipojenik Kondrojenik Nörojenik Farklılaşması	65
4.1.3.2 Olfaktör Bölgeden İzole Edilip Kültürü Yapılan Hücrelerin İmmünofenotiplendirilmesi	67
4.1.4 Olfaktör Kök Hücrelerin CM-Dil ile işaretlenmesi	68
4.1.5 Çok Tabakalı Hücre Pelleti Oluşturulması	69
4.1.5.1 Hücre pelletinin <i>in vivo</i> transplantasyon için hazırlanması	70
4.1.5.2 Ön çalışma sonuçları.....	71
4.1.5.2.1 Wiskers Skrolama sonuçları	71
4.2 Esas Çalışmalar.....	72
4.2.1 Esas Çalışmaların Wiskers Skrolama Sonuçları.....	73
4.2.2 Olfaktör Kök Hücre transplante edilen ratlarda EMG ile fasiyal sinirin elektrofizyolojik Değerlendirmesi.....	74
4.2.3 Bıyık Hareketleri ve Aksonal Rejenerasyonun Korelasyonu.....	77

4.2.4 Lif Dejenerasyonu	77
4.2.5 Fasiyal sinirin histolojik analizi.....	78
4.2.6 S100 boyama sonuçları.....	79
4.3 Tartışma	79
 BÖLÜM 5	
SONUÇ ve ÖNERİLER	86
5.1 Sonuç Değerlendirmesi	86
5.2 Öneriler	86
KAYNAKLAR	87
 EK-A	
Etik Kurul Onay Belgeleri	102
ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGE LİSTESİ

Bp	Baz çifti
c	Konsantrasyon
Ca	Kalsiyum
cm	santimetre
cm ²	santimetre kare
cm-1	Işınlar dalga sayıları
CO ₂	Karbondioksit
Da	Dalton
I	Geçen ışının şiddeti
I ₀	Gelen ışının şiddeti
kDa	kilo dalton
k	Absorpsiyon katsayısı
kJ	Kilo Joule
M	molar
Mg	miligram
ml	mililitre
mm	milimetre
mM	milimolar
Na ₂ HPO ₄	Sodyum hidrojen fosfat
NAC	N-asetil sistein
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojen fosfat
NaHB ₄	Sodyum Bor Hidrür
NaHCO ₃	Sodyum Hidrojen Karbonat
NaN ₃	Sodyum azid
NaOH	Sodyum hidroksit
NH ₂	amino
nm	nanometre
α	alfa
β	beta
γ	gama
μ	mü
μg	mikrogram
μl	mikrolitre
μm	mikrometre
°C	santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

7-AAD	7 -Amino-Aktinomisin D
ADKMKH	Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
CD	CD hücre yüzey antijeni bulunduran hücre
CO ₂	Karbondioksit
dH ₂ O	distileSu
dk	dakika
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSO	Dünya Sağlık Örgütü
EC ₅₀	Etkili konsantrasyonun %50'si
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Test [Enzyme Linked Immunosorbent Assay]
FBS	Fetal Sığır Serum [Fetal Bovine Serum]
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HE	Hematoksilen Eozin boyası
IMDM	Iscove'un Modifiye Eagle Medyumu
MKH	Mezenkimal kök hücre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid
OBKMKH	Olfaktör Bulb Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu [Phosphate buffered saline]
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Polymerase Chain Reaction]
pH	Potansiyel hidrojen
Rpm	Revolutions per minutes
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
SB	Sağlık Bakanlığı
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Fasiyal sinirin dalları 7
Şekil 2.2	Sinirin yapısı 8
Şekil 2.3	Kök hücrelerin genel özellikleri 15
Şekil 2.4	Kök hücre kaynakları 19
Şekil 2.5	Embriyonik kök hücreler 20
Şekil 2.6	Mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre türlerine farklılaşma potansiyeli . 23
Şekil 2.7	MKH farklılaşmasında rol alan gen sayıları 26
Şekil 2.8	Multipotent özelliğe sahip hematopoetik kök hücreler 27
Şekil 2.9	Nöral kök hücreler..... 28
Şekil 2.10	Nöral kök hücreler beynin subventriküler bölge ve subgranüler bölgelerinde üretilir 29
Şekil 2.11	İnsan olfaktör sisteminin anatomisi..... 36
Şekil 2.12	Hipokampusün beyinde yerleşimi 36
Şekil 2.13	Olfaktör epitelyum 37
Şekil 2.14	Neurotube sinir konduiti. Emilebilir örülmüş poliglikolik asit meş tüpü 41
Şekil 3.1	Tripan mavisi molekül yapısı 47
Şekil 3.2	Thoma lamı üzerindeki yivler 48
Şekil 3.3	Rat fasiyal sinirin bulunması 55
Şekil 3.4	Rat fasiyal sinirinde tam kat kesi ile paraliz oluşturulması 56
Şekil 3.5	Fasiyal sinirin bulunması 57
Şekil 3.6	Fasiyal sinirin kesilmesi 58
Şekil 3.7	Kesilen sinir uçlarının konduite anastomozu 58
Şekil 3.8	Ratlara EMG elektrodlarının bağlanması 60
Şekil 3.9	Dudak kasları üzerine kayıt elektrod olarak yapışkan yüzey elektrodlarının yerleştirilmesi 60
Şekil 3.10	Toprak elektrod olarak kullanılan subdermal tekli iğne elektrod (A). Dudak kasları üzerine kayıt elektrod olarak yapışkan yüzey elektrodları (B) 61
Şekil 4.1	Olfaktör doku biyopsisinden izole edilen kök hücrelerin kültürü. Hücrelerin dokudan adezyonu, 8. Gün (10X) 64
Şekil 4.2	Olfaktör dokudan elde edilen hücrelerin alt kültürü. 1. pasaj,14. Gün (20 X)..... 65
Şekil 4.3	Olfaktör kök hücrelerin adipojenik farklılaşması 66
Şekil 4.4	Olfaktör kök hücrelerin nörojenik farklılaşması..... 66
Şekil 4.5	Olfaktör kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması. Alcian Blue ile boyama 67
Şekil 4.6	Olfaktör mukoza kaynaklı kök hücrelerin immünofenotiplendirilmesi. 68
Şekil 4.7	CMDil ile işaretlen olfaktör kök hücreler (A. 10X, B. 40X) 68
Şekil 4.8	Çok tabakalı hücre kitlesi elde etmek amacıyla kültürü yapılan OKH'ler. Monolayer hücreler (A), trpisinize edilerek 2. flask içine pasajlanan OKH'ler (B). (20X)..... 69

Şekil 4.9	Üst üste 9 pasaj yapılan OKH'lerin mikroskopik görüntüsü (20X)	69
Şekil 4.10	Üst üste 9 pasaj yapılan CM-Dil ile işaretlenen OKH'lerin mikroskopik görüntüsü (20X)	70
Şekil 4.11	CMDil ile işaretlenen olfaktör kök hücrelerden hazırlanan çok tabakalı hücre kitlesi (10X).....	71
Şekil 4.12	Fasiyal sinir kesisi sonrası O'a düşen bıyık hareket skorundaki artışın gruplara göre dağılımı	74
Şekil 4.13	Kesi öncesi A, sonrası B ve 2. Haftadan itibaren amplitüd değerlerindeki yükseliş C.....	76
Şekil 4.14	4. hafta 1mV amplitüdü polifazik yanıtlar.	76
Şekil 4.15	Gruplara göre akson hasarının haftalara göre düzelmesi.....	78
Şekil 4.16	Sinir aksiyal kesitinde CM-Dil ile işaretlenmiş OE-MKHler (Florasana mikroskobu (X60).....	78
Şekil 4.17	Schwann hücrelerinin bulunduğu alanlar (kahverengi).....	79

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Fasiyal paralizin nedenleri.....	11
Çizelge 2.2 Embriyonik Germ Tabakalarından Gelişen Farklı Dokular	16
Çizelge 2.3 Bazı mezenkimal kök hücre kaynakları (Alfabetik sırayla)	22
Çizelge 3.1 Ön Çalışmalar	56
Çizelge 3.2 Deney Grupları	59
Çizelge 4.1 Ön çalışma Wiskers Skorlama sonuçları	72
Çizelge 4.2 Esas Çalışmaların Wiskers Skorlama Sonuçları	73
Çizelge 4.3 Grupların haftalara göre amplütüd (mV) ortalamaları	75
Çizelge 4.4 4 ve 10. haftalardaki lif dejenerasyonu yüzdeleri.....	77

İNSAN OLFAKTÖR KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU KÜLTÜRÜNÜN YAPILMASI KARAKTERİZASYONU VE HASAR GÖRMÜŞ FASİYAL SİNİRİN (RATLARDA) REJENERASYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Olga Nehir ÖZTEL

Biyomühendislik Bölümü

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV

Fasiyal paraliz dünyada ve ülkemizde görülen, popülasyonda 30/100.000 insidansı olan, konjenital, nörolojik, metabolik, toksik, neoplastik, enfeksiyöz, travmatik, iatrojenik ve idiopatik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilen bir hastalıktır. Bu hastalık, insan sağlığını ciddi olarak etkilemenin yanında estetik ve dolayısıyla psikolojik problemlere de neden olur. Şimdiye kadar hastalığın tedavisine yönelik çeşitli yaklaşımlar uygulanmasına rağmen gerek iyileşme hızı gerekse de iyileşme hızına bağlı sekeller, hastalığın tedavisinin önünde önemli engeller oluşturmaktadır. Bu nedenle hasar görmüş sinire bağlı patolojilerin giderilmesinde yeni yaklaşımların geliştirilmesi oldukça önemlidir. Kök hücre alanındaki gelişmeler ve kök hücreye dayalı tedavi yaklaşımlarındaki ilerlemeler sinir doku hasarlarının tedavisinde de yeni ümitlere yol açmaktadır. Periferik sinir hasarlarında yağ, kemik iliği ve hipokampal nöral kök hücre kullanan deneysel çalışmalarda bazı olumlu sonuçlar elde edilse de problemin çözümü henüz mümkün olmamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kök hücre tedavilerinde başarının sağlanması için hasar görmüş bölgenin sahip olduğu mikroçevre ile uygulanan kök hücre kaynağının uygun olması gerektiği vurgulanmaktadır. Literatürde bu konu ile ilgili çalışmalar az sayıda olsa da giderek önem kazanmaktadır. Ayrıca şimdiye kadar fasiyal sinir hasarlarının rejenerasyonunda bu alanda herhangi bir çalışmaya da rastlanılmamıştır. Buna göre de bu tez çalışmasının amacı; insan olfaktör mukoza biyopsi örneklerinden kök hücrelerin izolasyonu, devamlı kültürünün yapılması, karakterizasyonu ve kriyoprezervasyonunu gerçekleştirilmekle, olfaktör kök hücrelerden yeterli miktarda hücre kitlesi elde edilip ilk kez olarak hasar görmüş fasiyal sinir rejenerasyonunda (ratlarda) niş temellerine dayalı yeni bir yaklaşım geliştirilmesi ayrıca ileride hücresel tedaviler ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere olfaktör kök hücre kriyobankının oluşturulması olmuştur. Bu amaçla tez kapsamında İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Baş ve Boyun Cerrahisi

Bölümü'nde septoplasti operasyonu öncesi onamları alınan 3 hastadan olfaktör mukoza biyopsi örnekleri alınarak Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda getirildi ve olfaktör kök hücrelerin izolasyonu, kültürü, karakterizasyonu ve kriyoprezervasyonu gerçekleştirildi. Devamlı kültürü yapılan hücreler morfolojik olarak incelendi. Elde edilen hücrelerin kök hücre karakterizasyonunu yapmak üzere hücreler adipojenik, osteojenik ve nörojenik farklılaşma kitleri ile indüklendi ve akım sitometri yöntemi ile immünofenotipik karakterizasyonları yapıldı ve elde edilen kök hücrelerin kriyoprezervasyonu gerçekleştirildi. Olfaktör kök hücreler, in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere CM-Dil ile işaretlendi ve hücrelerin üst üste 9 kez pasajlanmasıyla çok tabakalı hücre kitlesi elde edildi. Elde edilen çok tabakalı hücre kitlesinin canlılığının belirlenmesi için in vitro kültürü yapıldı. CM-Dil ile işaretli olfaktör kök hücre kitlesi ile deneysel fasiyal paraliz oluşturulan ratlarda kök hücrelerin periferik sinir rejenerasyonuna etkisini belirlemek üzere in vivo çalışmalar iki aşamada gerçekleştirildi. Bezm-i Alem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda 7 adet Wistar Hannover (350–380 gr) dişi rat kullanılarak yapılan ön çalışmalarda fasiyal kesi sonrası 4 farklı yöntem kullanılarak kök hücrelerin kesi bölgesine inokülasyonu sağlandı. Çalışmada 1. ratın hasar bölgesine 10µl PBS içinde CM-Dil ile işaretlenen 500.000 olfaktör kök hücre inoküle edildi, 2. ratın hasar bölgesine 10µl PBS içinde CM-Dil ile işaretlenen 500.000 olfaktör kök hücre inoküle edildi ve inokülasyon bölgesi rattan alınan yaklaşık 1mm³ yağ dokusu ile (fasya) ile sarıldı, 3 ve 4. ratın hasar bölgesine 10µl PBS içinde CM-Dil ile işaretlenen 500.000 olfaktör kök hücre inoküle edildi ve inokülasyon bölgesine fibrin glue uygulaması yapıldı, 5 ve 6. ratların hasar bölgesine CM-Dil ile işaretlenen çok tabakalı hücre kitlesi inoküle edildi, kontrol grubu olarak 7. ratın hasar bölgesine 10µl PBS aktarıldı. Deney öncesi fasiyal paralizin ölçümü, deney sonrası ise iyileşmenin belirlenmesi için tam kat kesi öncesi ve sonrası 2., 4., 6., ve 8., haftalarda bıyık hareketleri Wiskers skorlama olarak değerlendirildi. Sonuçlar Mann Whitney U istatistiği kullanılarak hesaplandı. Ön çalışma sonuçları dikkate alınarak in vivo çalışmaların ikinci basamağında 27 adet rat M, T ve K isimleri verilerek 3 gruba ayrıldı her bir grupta ratların sol fasiyal siniri kesildikten ve sinir uçları neurotube poliglikolik asit konduite anastomoz yapıldı. Konduitin içine M grubu için hazırlanan çok tabakalı hücre pelleti, T grubu için PBS eklendi. Kontrol grubu olan K grubuna herhangi bir madde verilmedi. Ratlarda iyileşme 2., 4., 6., 8., ve 10. haftalarda fizyolojik, bıyık hareketleri ve elektrofizyolojik olarak izlendi. 10 hafta sonunda ratlar kurban edilerek hasar bölgesinden histolojik inceleme için preparatlar hazırlandı. Preparatlar hematoksilen, eozin, S100, Toluidin Blue ile boyandı ve florasan mikrokopta incelendi. Sonuçlar Mann-Whitney U ile ve Anova ile yapılan istatistik ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre olfaktör dokudan elde edilen hücrelerin morfolojik, immünofenotipik ve farklılaşma özellikleri bakımından kök hücre karakterine sahip oldukları ayrıca dondurularak saklanan hücrelerin 24 ay sonunda canlılıklarını %91 oranında korudukları belirlendi. Olfaktör kök hücrelerin CM-Dil boyası ile işaretlediği ayrıca hücrelerin 9 kez üst üste pasajlanmasıyla elde edilen çok tabakalı hücre kitlesinin kültür ortamında canlılığını koruduğu belirlendi. Whiskers skorlamalarına göre yapılan ön çalışma sonuçlarına göre, uygulanan 4 farklı yöntem içinde en fazla iyileşmenin görüldüğü grubun olfaktör kök hücreler ile hazırlanan çok tabakalı hücre kitlesi uygulanan grup olduğu belirlendi. 27 rat ile yapılan in vivo çalışmalarda elde edilen fizyolojik ve elektrofizyolojik sonuçlara göre fasiyal sinir rekonstrüksiyonunda olfaktör kök hücreler kullanılan grupta sinir rejenerasyonun daha hızlı gerçekleştiği (p=0,030) ve bıyık hareketlerindeki düzelmenin amplitüd

değerlerindeki artış ilişkili olarak daha fazla ve anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,001$). S100 boyama ile yapılan histolojik değerlendirmede gözlenen sonuçlara bakıldığında da M grubunda hasar bölgesine nakledilen kök hücrelerin Schwann benzeri hücrelere dönüştükleri belirlendi. Elde edilen bu sonuçlar olfaktör kök hücrelerin kullanıldığı grupta belirlenen sinir rejenerasyon hızı ve düzeyini destekler niteliktedir ($p<0,05$). 2012-07-04 KAP02 numaralı proje ile Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklen bu çalışma ile TÜBİTAK tarafından yayınlanan 2003-2023 Teknoloji Öngörü Çalışmasında vurgulanan “Türkiye’de yapılması gereken bilimsel çalışmalar için kök hücre teknolojilerinin geliştirilmesi ve özellikle rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılabilir hale gelmesi” hedefine de uygun olarak ulaşılabilir tek nöral kök hücre olan olfaktör kök hücrelerin ülkemizde ilk kez olarak izolasyonu, karakterizasyonu ve kriyoprezervasyonu gerçekleştirildi, kriyobankı oluşturuldu, doku mühendisliğinde kullanılmak üzere çok tabakalı hücre kitlesi hazırlandı ve fasiyal sinir hasarlarında kullanılmasıyla sinir rejenerasyonunu hızlandıran etkin bir hücresel tedavi yöntemi önerildi.

Anahtar Kelimeler: Fasiyal Sinir, Olfaktör Kök Hücre, Elektromyografi

**ISOLATION, CULTURE AND CHARACTERIZATION OF HUMAN OLFACTORY
STEM CELLS AND INVESTIGATION OF THEIR EFFECT ON REGENERATION
OF DAMAGED RAT FACIAL NERVES**

Olga Nehir ÖZTEL

Department of Bioengineering

PhD. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEY

Facial paralysis is a disorder that is seen in our country and worldwide, has an incidence of 30/100.000 and can result from congenital, neurological, metabolic, toxic, neoplastic, infectious, traumatic, iatrogenic and idiopathic reasons. The disorder, as well as affecting human health seriously, creates esthetic and psychological problems. Although several approaches are in application in order to treat this disorder, recovery rate and sequels related to recovery rate are grand obstacles against treatment. For that matter, development of new approaches is required to remove pathologies related to damaged nerves. Progresses in stem cell research and their application for treatment are also very promising for treatment of the damages in nervous tissue. Although fat, bone marrow and hippocampal neural stem cells have been shown to have affirmative consequences on peripheral nerve damages in some experimental studies, a precise solution has not been shown yet. Latest studies state that in order to succeed in stem cell treatments, the micro-environment of the damaged area and the stem cell source have to be coherent. Studies in the literature related to this topic are numerically few, but they progressively gain importance. Besides, until now, no study has been conducted in this area to show the effect on regeneration of damaged facial nerves. Hereunder, the aim of this thesis study is stem cell isolation from human olfactory mucous biopsies, continuous culture, characterization and cryopreservation of these cells, development of a new approach based on niche for regeneration of damaged facial nerves (of rats) for the first time and generation of an olfactory stem cell cryobank for the use of cellular treatment and tissue engineering studies. For this purpose, olfactory mucous biopsy samples were obtained from three patients with consent prior to a septoplasty operation in Istanbul Education and Research Hospital, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery and brought to Yildiz Technical University, Department of Bioengineering in Cell Culture and Tissue Engineering Laboratory for isolation, culture, characterization and cryopreservation.

Continuously cultured cells were morphologically investigated. Cells that were obtained from biopsy samples were induced with adipogenic, osteogenic and neurogenic differentiation kits for stem cell characterization, immunophenotypically characterized by flow cytometry and obtained stem cells were cryopreserved. Olfactory stem cells were stained with CM-Dil to be used in *in vivo* studies and a multi-layered cell mass was obtained after passaging the cells 9 times. Obtained multi-layered cell mass was cultured *in vitro* to determine viability. *In vivo* studies to investigate the effect of CM-Dil labeled olfactory stem cell mass on peripheral nerve regeneration of experimentally face paralyzed rats have been conducted in two steps. In the preliminary examination, 7 Wistar Hannover (350-380 gr) female rats were used for a facial cut and inoculation of stem cells in the cut area using 4 different methods in Bezm-i Alem University Experimental Animal Laboratory. In this study, 500.000 CMD-Dil labeled olfactory stem cells in 10µl PBS were inoculated in damaged area of rat 1, 500.000 CMD-Dil labeled olfactory stem cells in 10µl PBS were inoculated in damaged area of rat 2 and the inoculation area was covered with approximately 1mm³ fat tissue (fascia) from the same rat, 500.000 CMD-Dil labeled olfactory stem cells in 10µl PBS were inoculated in damaged area of rat 3 and 4 and fibrin glue was applied to inoculation area, CM-Dil labeled multi-layered cell mass was inoculated on damaged area of rats 5 and 6 and as a control group rat 7 was given 10µl PBS into damaged area. In order to determine facial paralysis before the experiment and recovery rate after the experiment; whisker movements were scored on Weeks 2, 4, 6 and 8 before and after the full-thickness cut. The results were calculated using Mann Whitney U statistics. Considering the results of preliminary experiments; on the second step of *in vivo* studies, 27 rats were divided into 3 groups named M, T and K and for each group rat facial nerves on the left side were cut and nerve ends were anastomosed into neurotube polyglycolic acid conduit. Multi-layered cell pellet was added into conduit for Group M and PBS was added into conduit for Group T. Group K was not supplemented additionally since it was the control group. Recovery in rats was monitored physiologically, electrophysiologically and with whisker movements on weeks 2, 4, 6, 8 and 10. At the end of Week 10, rats were sacrificed and preparations were taken from damage area for histological examination. Preparations were stained with hematoxyline, eosin, S100, Toluidine Blue and observed under fluorescent microscope. The results were statistically evaluated using Mann-Whitney U and Anova. According to the results, the cells obtained from olfactory tissue had stem cell characteristics in terms of morphology, immunophenotype and differentiation features and the cells were able to remain 91% viable after 24 months after cryopreservation. It was determined that the olfactory stem cells were labeled with CM-Dil stain and the multi-layered cell mass obtained from passaging the cells 9 times was able to preserve viability in the culture media. According to the whisker scores, among the four different methods the highest recovery rate was observed in the group that was applied with multi-layered cell mass prepared from olfactory stem cells. Physiological and electrophysiological results obtained from *in vivo* studies on 27 rats show that nerve regeneration in facial nerve reconstruction was faster in groups applied with olfactory stem cells ($p=0,030$). It was shown using histological evaluation with S100 staining that stem cells applied to the damage area in Group M were differentiated into Schwann-like cells. This study, supported by 2012-07-04 KAP02 numbered project and Yıldız Technical University Scientific Research Projects Coordination Department, aims to fulfill the statement published on 2003-2023 Technology Foresight Study by TÜBİTAK that highlights the importance of “development of stem cell technologies for scientific studies to be conducted in Turkey and their availability especially in regenerative medicine” by isolating, characterizing

and cryopreserving of olfactory stem cells which are the only available neural stem cells for the first time in our country, by creating a cryobank, by generating a multi-layered cell mass to be used in tissue engineering and by pointing to a new cellular treatment method that accelerates nerve regeneration of facial nerve damages.

Key words: Facial nevire, Olfactory Stem Cells, Electromyography

1.1 Literatür Özeti

Fasiyal sinir; yüz kaslarının inervasyonunu, dudak hareketleri ile konuşma ve ses çıkarma işlevlerini, gülme, ağlama gibi otonomik mimik hareketlerini sağlayan yedinci kafa çifti siniridir [1], [2], [3]. İnflamasyon, travma, tümör çıkarılması veya cerrahi manipülasyonlar insanda periferik yüz sinirlerinin dejenerasyonuna yol açabilir [4]. Bu durum hastalarda fonksiyonel ve estetik sorunlara, dolayısıyla da sosyal ve psikolojik açıdan yıkıcı durumlara neden olan yüz felcini meydana getirebilir [5]. Değişik nedenlerle ortaya çıkan periferik fasiyal sinir hasarlarında, özellikle tam kat kesiye bağlı paralizilerde kendiliğinden iyileşme görülmez. Bu nedenle fasiyal sinir hasarlarının tedavisinde günümüzde uç-uca anastomoz, otolog veya desellülerize greftler ile anastomoz, konduit ile anastomoz veya distal fasiyal sinirin proksimal kranial sinirlere anastomozu gibi birçok tedavi yöntemi kullanılmaktadır. Uç uca anastomoz yaygın tedavi yöntemi olmasına rağmen sinir kaybının fazla olduğu durumlarda kullanılamamaktadır. Sinir kaybının fazla olduğu durumlarda, Schwann hücresi (SH) ve bazal lamina içeren otojen sinir grefti ve proksimal kranial sinirin kullanılması altın standart olarak kabul edilmesine rağmen sağlam bir sinirin feda edilmesi ve bu sinirdeki fonksiyon kaybı nedeniyle dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca tedavi sonrası fasiyal diskinezi, sinkinezi, timsah gözyaşları ve stapes kas kontraksiyonları gibi sekeller oluşabilmektedir [6]. Yapılan çalışmalarda sinir fonksiyonlarının geri kazanılması için Schwann hücreleri, bazal lamina, nörotropik faktörler (NTF) ve hücre adezyon moleküllerinin (HAM) hasar bölgesinde

rejenerasyonu sağlamada elzem olduğu bildirilmiştir [7], [8], [9]. Schwann hücrelerinin myelinizasyon sağlamaları konduit kullanımında başarının sağlanmasında önemli rol oynar [8], [9], [10], [11], [12]. Ancak konduit kullanılarak yapılan anatomozda mevcut Schwann hücre kaynağı sınırlı olduğuunda remyelinizasyon etkin olarak gerçekleşemez [10], [11], [12].

Son yıllarda rejeneratif tıbbın gelişmesiyle kök hücrelerin (KH) klinikte uygulanmasına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Kök hücreler organizmayı oluşturan ve organizmanın yaşamı boyunca birçok hücre tipine farklılaşabilme, kendini yenileyebilme ve çoğalabilme yeteneğine sahip, farklı kaynaklardan elde edilebilen özel hücrelerdir [13], [14]. Günümüzde kök hücreler kullanılarak yapılan hücresel tedavilerin merkezi sinir hastalıklarında (Parkinson, şizofreni, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer) kullanımı ile ilgili çalışmalar umut vericidir [15], [16], [17], [18]. Bunun yanında periferik sinir hasarlarında yağ, kemik iliği ve hipokampal nöral kök hücre kullanan deneysel çalışmalarda da olumlu sonuçlar elde edilmiştir [19], [12], [20], [21]. Günümüzde hücresel tedavi yöntemlerinde, mezenkimal kök hücrelerin (MKH) Schwann hücrelerine farklılaşmasıyla, periferik sinir rejenerasyonunda tedavi etkinliğinin artması yeni ümitlere yol açmıştır [20].

Yakın zamanda insan burun boşluğu mukozasında da kök hücrelerin bulunduğu tespit edilmiştir. Olfaktör kök hücreler (OKH) olarak adlandırılan bu hücreler sinir hasarlanmasını takiben duyu nöronlarının rejenere olmasını böylece koku alma duyularının yeniden kazanılmasını sağlar. Yapılan çalışmalarda olfaktör nörosfer kaynaklı hücrelerin sadece kök hücrelerden oluşmadığı, kök hücrelerin bir alt türü olan nörosfer formunda hücreler, progenitör ve prekürsör hücrelerden meydana geldiği bildirilmiştir [22], [23], [24], [25], [26], [27]. Ayrıca olfaktör nörosfer kaynaklı hücrelerin, kondrosit farklılaşmasına indüklenerek rat intervertebral disk rejenerasyonunda başarı ile kullanıldığı gösterilmiştir [28]. Bunun yanında deneysel hipokampal hasar oluşturulan farelerde yapılan bir çalışmada olfaktör kök hücrelerin hasar bölgesine göç ettiği, orada endojen nörojenezi uyardığı, sinaptik transmisyonu tamir ettiği böylece farelerin öğrenme ve hafıza davranışlarının düzeldiği gösterilmiştir [29]. Merkezi sinir sistemi hasarlarının tamirinde de kullanılan olfaktör kaynaklı kök

hücrelerin, omuriliğin hasarlı bölgesinde kortikospinal nöronların rejenerasyonunu sağladıkları da bildirilmiştir[30], [31].

Desellülerize allojenik arter konduit ile Schwann hücreleri ve otolog adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (AD-MKH) rat fasiyal sinir rejenerasyonunda karşılaştırıldığı bir çalışmada, AD-MKH'lerin immün reaksiyona neden olmayan, nöronların hayatta kalmalarını ve nörojenezi uyaran, Schwann hücrelerinin büyümelerini, olgunlaşmalarını ve farklılaşmalarını sağlayan nörotropik faktörleri salgıladıkları bildirilmiştir. Çalışmada hücre ekilen konduitlerde daha iyi rejenerasyon görülmesine rağmen fonksiyonel iyileşme sağlanamamıştır [32], [12]. Bu nedenle de sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşme için yeni yaklaşımlar geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri, içinde bulundukları niş ortamı ile yönlendirildiğinden, farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin [33] farklılaşma özellikleri değişkendir. Niş bileşenleri de kök hücrenin bulunduğu bölgeye göre değişebilir [34], [35], [36]. Buna göre de sinir dokusu kaynaklı kök hücrelerin ve bulundukları bölgedeki çevresel faktörlerin sinir hasarlarının rejenerasyonunda kullanılması umut vericidir. Bu nedenle sinir dokusunun rejenerasyonunda uygun kök hücre - niş ortamı belirlenmelidir.

Nöral ve glial spesifik antijenlere sahip olfaktör bölge kök hücrelerinin [37], [38], [39], [40] yağ dokusu, kemik iliği göbek kordonu gibi diğer kök hücre kaynaklarına göre nöral hücre serilerini oluşturmada daha avantajlı olduğu düşünülebilir.

Son 10 yılda sinir hasarlarının tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir. Doku mühendisliği ile oluşturulan yapılar kullanılarak fonksiyonunu kaybeden sinirlerin nöral imputlarının ve kas fonksiyonlarının iyileştirilmesiyle doğal yüz hareketleri, kabul edilebilir morbidite ve uzun süreli stabilite sağlanabilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir [41], [42], [43], [44].

Yine de günümüzde fasiyal sinir paralizisinde farklı tedavi yöntemlerinin uygulanmasına rağmen henüz problemin çözülmesi mümkün olmamıştır. Olfaktör kaynaklı kök hücreler(OKH) ile ilgili son yıllardaki çalışmalar ise periferik sinir hasarlarında OKH'lerin tedavi açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir[12], [23], [24], [25], [27], [32].

Literatüre bakıldığında, yakın zamanda keşfedilen OKH ile ilgili dünyada henüz az sayıda çalışma bulunmaktadır (Pubmed sonuçlarına göre, başlığında “olfactory stem cell” geçen 73 makale bulunuyor). Ülkemizde ise olfaktör bölge kaynaklı kök hücrelerin izolasyonu, kültürünün yapılması ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı; insan burun boşluğundan olfaktör kök hücreleri içeren biyopsi örneklerinden OKH’lerin izolasyonu, uzun süreli kültürünün yapılması karakterizasyonu, kriyoprezervasyonu gerçekleştirerek, OKH’lerden yeterli miktarda hücre kitlesi elde edilip ilk kez olarak hasar görmüş fasiyal sinir rejenerasyonunda (ratlarda) etkinliğinin incelenmekle hasar görmüş sinir hücrelerinin rejenerasyonunda yeni bir yaklaşım geliştirilmesi ile ileride doku mühendisliğinde kullanılmak üzere OKH’lerin kriyobankının oluşturulmasıdır.

1.3 Hipotez

Çalışmanın hipotezini hasar görmüş fasiyal sinir dokusunun rejenerasyonunda önemli rol oynayan niş ortamını göz önünde bulundurarak ilk kez olarak olfaktör kök hücrelerinin kullanılması oluşturur.

Hedefe ulaşmak için aşağıdaki basamaklar gerçekleştirildi;

- Onamı alınan septoplasti hastalarından alınan olfaktör biyopsilerinin uygun koşullarda laboratuvara getirilmesi,
- Olfaktör biyopsilerinden olfaktör kök hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonunun yapılması,
- Olfaktör kök hücrelerin kriyoprezervasyonu gerçekleştirilerek kriyobankının oluşturulması,
- Olfaktör kök hücrelerin CM-Dil ile işaretlenmesi ve *in vitro* çok tabakalı hücre kitlesinin elde edilmesi,

- Ön çalışma için Wistar Hannover dişi ratlarda fasiyal paraliz modeli oluşturulması ve farklı kök hücre uygulama yöntemleri karşılaştırılarak en uygun yöntemin belirlenmesi,
- 27 Wistar Hannover dişi rat 3 gruba ayrılarak fasiyal paraliz deney grupları oluşturulması ve kesilen sinir uçları neurotube poliglikolik asit konduite anastomozunun yapılması, konduit içine işaretlenen ve çok tabakalı hücre kitlesi halinde hazırlanan olfaktör kök hücrelerin aktarılması,
- Deney hayvanlarının 8 hafta boyunca elektrofizyolojik ve whiskas skortama ile incelenmesi, 8 hafta sonunda hayvanların sakrifiye edilmesi ve sinir dokusunun histolojik olarak incelenmesi,
- Elde edilen sonuçların histolojik ve istatistiksel olarak değerlendirmesidir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

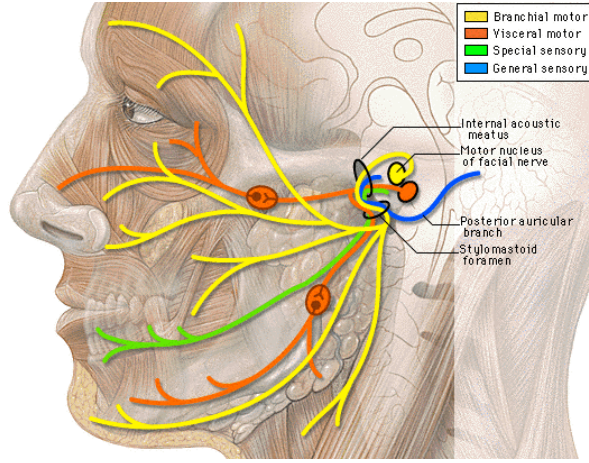
2.1 Fasiyal Sinir

2.1.1 Fasiyal Sinirin Tarihçesi

Fasiyal sinirin varlığına ilişkin bilgiler uzun zaman önceye dayanmaktadır. Fasiyal sinirin petröz kemik kanalındaki ilk tespiti 1523-1562 yılları arasında yaşamış olan Gabriel Fallopius tarafından yapılmıştır. Daha sonra 1621-1675 yılları arasında yaşamış olan Thomas Willis kulak fizyolojisini açıklamıştır. Willis, 1664 de yazmış olduğu “Cerebri Anatome” de fasiyal siniri kafa boşluğu içinde tarif etmiş fakat bu sinirin işitme fonksiyonu ile ilişkili olduğunu düşünmüştür [4], [7], [45]. Sir Charles Bell, 1821 yılında trigeminal sinir ve fasiyal sinirin anatomik ayrımını belirlemiş, yüz mimik kaslarının motor dalının fasiyal sinir motor dalı olduğunu göstermiştir [1], [7], [46].

2.1.2 Fasiyal Fasiyal Sinirin (Yüz Siniri- Nervus Facialis) Yapısı

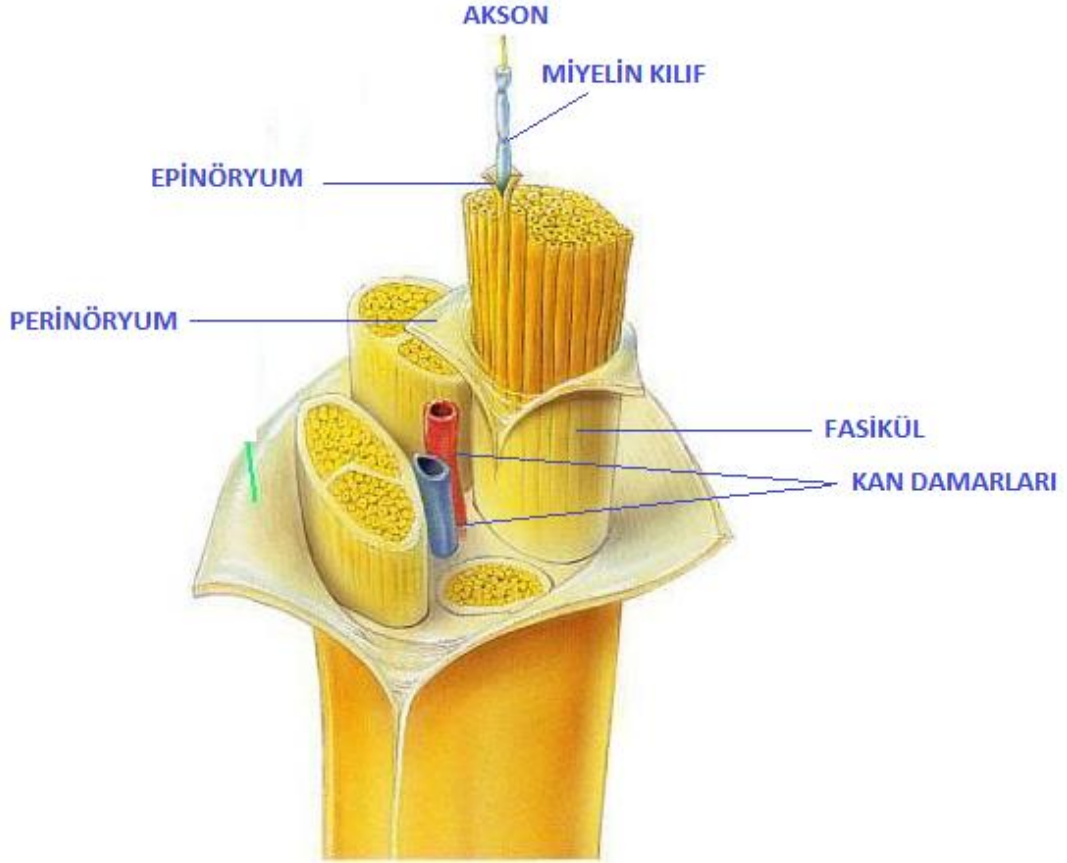
Fasiyal sinir, intrakranial, intratemporal ve ekstratemporal olmak üzere 3 kısımdan oluşan, motor lifler, özel viseral tat lifleri, parasempatik otonomik lifler ve genel duyu lifleri olarak adlandırılan 4 sinir lifi içeren, temporal, zigomatik, bukkal, mandibular ve servikal olarak adlandırılan dallara ayrılan mikst (karışık) bir sinirdir (Şekil 2.1) [1], [9], [12], [32], [46], [47].



Şekil 2.1 Fasiyal sinirin dalları

Fasiyal sinir yüz mimik kaslarının inervasyonundan sorumlu olan, dudak hareketleri ile konuşma ve ses çıkarma işlevlerini yerine getiren, bunun yanında gülme, ağlama gibi otonomik mimik hareketleri ile duygusal durumların da ifadesini sağlayan yedinci kafa çifti siniridir. Emosyonların fasyo-vokal gösterisi denen bu ifade şekillerinin önemli bir kısmını sağlayan yüz mimiklerini oluşturur. Tat duyusunu ise genikulat gangliona kadar beraber seyrettiği intermedier sinir ile submandibular, sublingual ve lâkrimal glandın otonomik sekretuar inervasyonu ile dilin $\frac{3}{4}$ ön bölümünde sağlar.

Fasiyal sinir multifasiküler sinir yapısına sahiptir. Meatal, labirentin ve timpanik kısımda tek fasikül bulunurken, distal mastoid kısım 2-3 fasikül, ekstrakranial kısım ise 6-10 fasikülden oluşur. En dışta epinörium, fasiküllerin arasında ise perinörium tabakası bulunur (Şekil 2. 2) [1], [46], [47].



Şekil 2.2 Sinirin yapısı

2.2 Fasiyal Paraliziler

Fasiyal sinir paralizi en sık görülen kranial sinir hastalığıdır ve sinir dallarının bir kısmında hasar oluşturarak karakteristik fasiyal bozuklukla sonuçlanır. Travma, tümör oluşumu, idiyopatik şartlar, serebral felç, psödobulbar palsi ve virüslerin neden olduğu çoklu etyolojiye sahiptir. Nadir olarak dental tedaviler sırasında da lokal anestezi enjeksiyonu veya üçüncü azı dişinin çekilmesi ile oluşan enfeksiyondan sonra ortaya çıktığı da bildirilmiştir. Postoperatif fasiyal paralizlerin veya lingual ve/veya inferior alveolar sinir hasarlarının insidansı birçok yazar tarafından bildirilmiştir. Literatürde konu ile ilgili; lokal anestezi sırasında iğneye bağlı travma (yanlış iğne seçimi veya anesteziklerin epinöryuma bulaşması), diş çekilmesine bağlı olarak intranöral hematoma oluşumu veya sıkışma, lokal anestezi toksisitesi, enfeksiyonlar, osteotomiler, preprostetik işlemler, tümör ve kistlerin çıkarılması temporomandibular bağlantı ameliyatlari, yüz kırıkları ve yarık dudak/damak cerrahi tedavileri gibi farklı

etiyolojilerden söz edilmektedir. Fasiyal sinir paralizileri ortaya çıkma nedenlerine bağlı olarak merkezi ve periferik orjinli, tam veya kısmi olabilir [12], [32], [48], [49], [50].

2.2.1 Patofizyoloji

Sağ ve sol fasiyal sinirler göz kırpmaya, gözleri açıp kapama, gülme, kaş çatma, gözyaşı ve tükürük salgılaması gibi birçok fonksiyonu kontrol eder. Ayrıca orta kulaktaki stapedial kası inerve eder ve dilin 2/3 anterior bölgesinden tat duyusunu taşır. Fasiyal sinir yüzün her iki kısmında kafatası içindeki dar bir kemik kanaldan kulağın altından kaslara doğru uzanır. Akut inflamasyon ve fasiyal sinir ödemi gibi patolojiler kemik kanalı içindeki fasiyal sinire hasar verir ve ezilmeye bağlı iskemi oluştururlar [47]. Bunun dışında çocuklukta görülen, etiyolojisi aydınlatılmamış ve genellikle spontan geliştiği düşünülen, nadir olarak da altta yatan patolojilerle ortaya çıkan akut düşük motor nöron fasiyal paralizi görülmektedir. Bozulmaların yayılması hasar bölgesi ile ilgilidir. Proksimal lezyonlar gözyaşının azalması, hiperakuzi ve dilin 2/3'lük ön bölümünde tat kaybıdır. İdiyopatik fasiyal paralizilerin patofizyolojisi ise belirsizdir. Belirtiler sıklıkla viral hastalığı takiben 2-3 hafta içinde ortaya çıkar. Nöropatinin altında yatan sebebin, sinire aktif viral invazyon ve immün demiyelinizasyon olduğu düşünülmektedir. Sinirdeki fiziksel şişmenin patolojik rolü henüz açıklık kazanmamıştır. Spesifik patolojilerin çeşitliliği akut düşük motor nöron fasiyal paralize neden olabilir ki bu durum bazı araştırmacılar tarafından çocuklarda lösemi ile de ilişkilendirilmiştir. Erişkinlerde yapılan çalışmalarda asiklovirin tek başına kullanılmasının steroid tedavisinden daha az etkili olduğu bildirilmiştir. Asiklovir steroid kombinasyonu idiyopatik fasiyal paralizin sonucunu değiştirmemiştir. Varicella zoster virüsünün genülat gangliyonda neden olduğu Ramsay-Hunt sendromu (Herpes Zoster Otikus). Unilateral fasiyal paralizlere dış kulak kanalındaki veya yumuşak damaktaki herpetik veziküller eşlik eder ve prognozu idiyopatik fasiyal paralizilerden daha iyi değildir. Tedavide intravenöz asiklovir steroid kombinasyonu önerilir. Erişkinlerde alternatif tedavi olarak B12 vitamininin tek başına ya da steroidler ile kombinasyonu steroidlerin tek başına kullanılmasından daha hızlı etki gösterdiği belirlenmiştir. Randomize kör çalışmalarda %100 hiperbarik oksijen tedavisinin, aynı basınçta %7 oksijenli ortamda yapılan steroid tedavisinden daha hızlı sonuç verdiği, yüksek oksijen konsantrasyonunun etkili olduğu belirlendi. Cerrahi

olarak fasiyal sinir kanalı üzerindeki baskının azaltılması idiyopatik fasiyal palsinin tedavisinde etkili olmadığından günümüzde kabul görmemektedir. Yüz bölgesindeki kalıcı zayıflığın fonksiyonel ve kozmetik etkileri bulunur. Şekilsel bozukluklar belirgin fizyolojik morbiditeye neden olurlar. Sinir onarımı, greft veya yer değiştirme gibi cerrahi tetkikler fonksiyonların ve görünüşün geri kazanılmasını amaçlar. Sinir nakli etkilenen ucun distalinden iletim sağlayan kranial sinir gövdesine örneğin kontralateral fasiyal sinir veya hipoglosal “atlama grefti”ne bağlanır. Bu tekniğin paralizin oluşumunu takiben 2 yıl içinde uygulanması zorunludur. Kas nakli veya mikronörovasküler serbest kas transferi de tercih edilir [1].

Fasiyal sinir embriyolojik gelişimde ikinci brankial arkten meydana gelir. Motor lifleri yüzün mimik kaslarının yanında ikinci brankial arkten kaynaklanan çeşitli kasları (stilohyoid, stiloglossus, digastrik kas arka karnı, platisma, kulak kepçesi kasları ve m.stapediu) da inerve eder. Fasiyal sinir çekirdekleri ponsta bulunur. Klinik açıdan supranuklear (fasiyal sinirin korteks ile ponstaki çekirdekleri arasındaki kısmı)ve infranuklear (fasiyal sinir çekirdeklerinden uç dallara kadar olan kısmı)olarak iki anatomik parçaya ayrılan fasiyal sinirin bu parçalarında meydana gelen lezyonların ortaya çıkardığı klinik tablolar birbirinden tamamen farklıdır.

Fasiyal sinirin korteks ve çekirdekler dâhil olmak üzere supranuklear parçasında meydana gelen paralizilere santral fasiyal paralizi, çekirdeklerden sonra ortaya çıkan paralizilere ise periferik fasiyal paralizi adı verilir [1],[9], [51].

2.2.2 Santral fasiyal paraliziler

Santral fasiyal paralizilerde alın bölgesine giden liflerin fonksiyonu sağlam ipsilateral korteksten katılan supranükleer sinir lifleri nedeniyle normaldir. Santral paralizilerde ayrıca, yüz alt yarımında meydana gelen felce, aynı tarafta bulunan dil, kol, el ve parmaklar da parezi biçiminde katılabilir.

2.2.3 Periferik fasiyal paraliziler

Nükleer ve periferik fasiyal paralizilerde, yüz yarımına ait tüm liflerde fonksiyon kaybı oluşur. Bunun nedeni yüzün üst yarımında her iki beyin yarımküresinden gelen lifler

bulunurken, alt yarımında ancak bir yarım küreden gelen liflerin bulunmasıdır [1], [9], [52].

2.2.4 Fasiyal Sinir Hasarlarının Sınıflandırılması

İdiopatik paraliziler periferik tüm fasiyal paralizilerin %50'sinden fazlasını oluşturarak birinci sırada yer alırlar. İkinci sırada %20 ile travmalar, üçüncü sırada ise enfeksiyöz nedenler gelir (Çizelge 2. 1). Periferik sinir hasarlarının sınıflandırılmasında Sunderland'ın belirlediği hasar dereceleri kabul edilir [53]. Bunlar; nöropraksi, aksonotmezis, nörotmezis, cerrahi travma, temporal kemik kırıkları, ve tümör invazyonu ile oluşan hasarlardır. Hasarların ilk üç derecesi viral, inflamatuvar ve immün hastalıklar ile ilişkilidir. İlk iki derece hasarlarda (nöropraksi ve aksonotmezis), genellikle inflamatuvar sinir lezyonlarında, ödemin neden olduğu intranöral sıkışma sonucunda görülür. Bu Bell paralizi ve herpes zoster otikusda da görülen tablodur [1]. Venöz drenajın bozulmasına bağlı olarak ödem gelişmesi ve bu ödemin sinirdeki sıkışmayı daha da şiddetlendirerek aksonlardan sonra endonöriumda da hasar vermesiyle oluşan tablo üçüncü derece hasar (nörotmezis) olarak adlandırılır. Bu duruma akut supüratif otitis media, kolestetomlu kronik otitis media, yavaş büyüyen tümörler ve sinir kesisine neden olmayan temporal kemik kırıkları neden olur. Burada sinirdeki ektranöral sıkışma sonucunda aksoplazma akımında kesilmeye neden olan ve sinir dokusundaki venöz drenajın bozulması en önemli etkidir. Dördüncü ve beşinci dereceleri travma, temporal kemik kırıkları, veya tümör invazyonu gibi sinir devamlılığının bozulduğu durumlardaki sınıflandırmadır ve derecelerdeki iyileşme en iyi koşullarda bile ilk üç derecedeki hasardaki kadar başarılı sonuçlanmaz [1], [47], [54].

Çizelge 2.1 Fasiyal paralizinin nedenleri.

Tablo-1: Fasiyal Paralizi Nedenleri		
Doğum	Enfeksiyon	İatrojenik
Molding	Otitis eksterna/media	Serebellopontin köşe cerrahisi
Forseps kullanımı	(akut/kronik)	Mandibuler blok anestezisi
Myotonik distrofi	Mastoidit	Parotis cerrahisi
Möbius Sendromu	Herpes Zoster	Antitetanoz serum
	Poliomyelit	Temporal kemik cerrahisi
Nörolojik	Suçiçeği	
Opferkuler sendrom	Kızamık	İdiopatik
Millard-Gubler sendromu	Enfeksiyöz mononukleoz	Bell
Sefalik tetanoz	Influenza	Melkerson-Rosenthal sendromu
Psödötümör serebri	Akut supuratif parotid	Otoimmun sendrom
	Granulomatöz	Temporal arterit
Neoplastik	enfeksiyonlar	Multipl skleroz
Kolesteatoma		Wegener granuloatozisi (10)
7. sinir tümörü	Travma	
Glomus jugulare	Kafa tabanı kırıkları	Toksik
Lösemi	Yüz yaralanmaları	Talidomid
Meningiom	Penetrant orta kulak	Tetanoz
Karsinom(primer yada	yaralanmaları	Difteri
metastatik)	Barotravma (yükseklik ve	Karbonmonoksit
Sarkomlar	sualtı)	Etilen glikol
		Alkolizm
Epinöral psödokist (9)	Metabolik	
	Diabetes mellitus	

2.3 Fasiyal Paralizin Değerlendirmesinde Kullanılan Nörodiagnostik Testler

Fasiyal paralizinin tanısında ve değerlendirilmesinde birçok farklı test kullanılır. Bunlar anatomik, fizyolojik, akustik ve elektriksel temelli testlerdir. Bu testler genel olarak, iki taraftaki gözyaşı salgısının karşılaştırılması için yapılan Schirmer Gözyaşı Testi, saf ton odyogram ile stapedial sinir fonksiyonu incelemede kullanılan akustik refleks testi ve elektriksel testler olan (Sinir ileti zamanı (Latency), şiddet-süre eğrisi (SDC), Sinir eksitabilite testi (NET), Maksimal Stimülasyon Testi (MST), Elektromiyografi (EMG), Elektronöronografi (ENoG), Antidromik Potansiyeller, Trigemino-fasiyal Refleks

(TFR))sinirin fizyolojik durumunun belirlenmesinde kullanılan testlerdir. Bu testler fasiyal sinirin ulaşılabilir kısmı çok kısa olduğundan, genellikle lezyonun distalinden yapılır [55]. Fasiyal paralizilerin en sık karşılaşılan nedenlerinden biri travmadır. Travmanın derecesi, müdahalenin yapılma zamanı, belirtilerin ortaya çıkma süresinin yanında yaranın temiz ya da kontamine olması da prognozu belirleyici sebeplerdendir. Motor çekirdeği ponsta bulunan fasiyal sinir çekirdeğinin rostral kısmından kaynaklanan lifer sadece kontralateral kortikobulber yoldan inerve olurlar. İnervasyondaki bu farklılık, periferik ve santral fasiyal paralizilerin ayırıcı tanısında kullanılır. Santral fasiyal paralizilerde alın bölgesine giden liflerin fonksiyonu normaldir. Nükleer ve periferik fasiyal paralizilerde ise, yüz yarımına ait bütün liflerde fonksiyon kaybı meydana gelir. Kafa travmaları ve iatrojeni, travmatik paraliz olgularında ilk iki sırayı oluştururlar. Hematom ve kemik fragman batması gibi sık görülen hasar nedenlerinin yanında ateşli silah yaralanmaları görülme sıklığı olarak daha az olmasına rağmen şiddeti ve başlangıç hızı açısından en kötü prognoza sahip grubu oluşturmaktadır.

2.3.1 Elektromiyografi

Kas hareketleri ve duruşları, kaslar ile periferik ve merkezi sinir sistemi arasında ileri ve geri olarak ilerleyen elektrik sinyalleri ile sağlanır. Omurilikte veya motor sistemde bir patoloji oluştuğunda motor nöronlar, kaslar ya da nöromuskular bağlantılardaki elektrik sinyallerinin karakteristiği değişir. Bu nedenle mevcut patolojinin belirlenerek teşhis edilmesi için hem kasların hem de motor sistemin birlikte değerlendirilmesi gerekir. Kas içindeki elektrik sinyalleri elektromiyograma göre değerlendirilir. Kasların aksiyon potansiyellerinin kaydedilmesi ve yorumlanmasında elektromiyografi kullanılır [56].

Sinir hücreleri arası iletişim (neural network) mikro ya da milivoltlar düzeyinde elektrik akımları ile sağlanır. Bu voltajların gerek merkezi sinir sistemi (MSS) gerekse periferik bölgelerde yorumlanıp anlamlandırılması ile sinir sistemindeki iletim değerlendirilebilir hale gelir. Elektromiyografi merkezi kontrol stratejileri, sinir hücreleri boyunca olan sinyalin sinir kas kavşağına transferi, motor ünite de kas hücrelerinin elektriksel aktivasyonu, karmaşık biyomekaniksel olaylar zinciri, agonist ve antagonist kas

tendonları üzerine etki eden ve kemiklere taşınan baskının üretimi hakkında bilgi edinilmesini sağlar.

EMG, uzun yıllar boyunca laboratuvar araştırmalarında kullanılmasının yanında elektrik, elektronik, bilgisayar ve biyomedikal alanlarda teknolojinin de gelişmesiyle birçok deneysel çalışmada da kullanıma uygun hale gelmiştir. EMG uygulamalarının büyük çoğunluğunun temel amacı, kasların aktivasyon zamanlarını ölçmek, kasların kasılma profillerini tanımlamak ve kas kasılmasının fiziksel yükünü ve yorgunluk oluşumunu tanımlamak için kullanılmaktadır [57]. Elektronörografi, elektromiyografinin periferik sinirin incelenmesinde kullanılan yöntemidir.

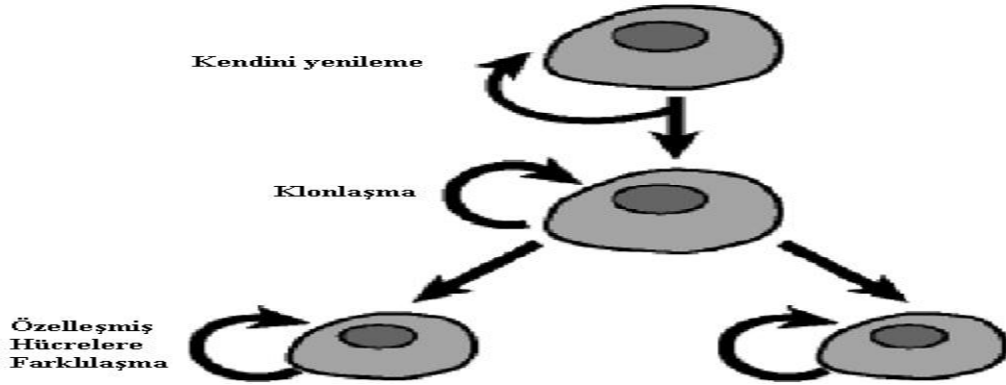
2.4 Kök Hücreler

Kök hücreler organizmayı oluşturan ve organizmanın yaşamı boyunca birçok hücre tipine farklılaşabilme, kendini yenileyebilme ve çoğalabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir [58], [59]. Uygun koşullarda farklılaşarak çeşitli doku ve organları oluşturan farklı hücrelere dönüşebilme özelliğine sahip olan kök hücreler bu özellikleri ile günümüzde tıbbın birçok alanında ve doku mühendisliği çalışmalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır. Kök hücreler bu özellikleri ile ileride vücutta hasar görmüş doku veya organların hücresel tedavisinde uygulanabilmesinin ümit verici olmasıdır. Kök hücrelerin bu özellikleri birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve kemik iliği başta olmak üzere, farklı kök hücre kaynaklarını kullanarak yapılan araştırmalar ve uygulamalar sonucu, “rejenaratif tıp” kavramı gelişmiştir [60], [61].

Elde edildikleri kaynaklara göre farklı farklılaşma potansiyellerine sahip olan kök hücreler ile yapılan çalışmalar, hücrelerin elde edildiği kaynaklar ve kullanım alanları, birçok tartışmayı da beraberinde getirmiştir [62]. En çok tartışılan kök hücre olan embriyonik kök hücreler, farklı hücre hatlarına dönüşme potansiyeli açısından avantajlı olmalarına rağmen, etik sorunlar ve donör sağlığı açısından oluşturduğu tehlikeler sebebiyle bazı çalışmalarda tercih edilememektedirler [63], [64].

2.4.1 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

Kök hücreler, kendini yenileme, klonlaşarak kendi kopyasını oluşturabilme ve farklı hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir [65]. Bu 3 özelliğin tümüne (Kendini yenileme, Klonlaşma, Farklılaşma) sahip olan bir hücre kök hücre olarak tanımlanabilir (Şekil 2. 3).



Şekil 2.3 Kök hücrelerin genel özellikleri

Kendini Yenileme

Kök hücrelerin temel özelliklerinden biri olan kendini yenileme terimi, hücrenin çoğalma yeteneğini belirler. Kök hücreler bu yönden ölümsüz, sürekli ve sınırsız bölünme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bunun yanında, Houck ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* çalışmalarda, kök hücrelerden farklı olarak somatik hücrelerin en fazla 80 kez bölünebildiği ve daha sonra bu hücrelerin yaşlanması sonucunda replikasyonlarının azaldığı gösterilmiştir [66].

Klonlaşma

Klonlaşma, bir hücrenin aynı yapıya sahip birden fazla hücreyi üretme kapasitesi olarak tanımlanır. Klonlaşma özelliği hücrelere, kendi özelliklerine sahip yeni hücreler üretebilme yeteneği kazandırır. Böylece hücrelerin homojen hücre grupları oluşturabilmelerini sağlar. Sonuçta tamamen aynı hücresel ve genetik yapıya sahip olan hücrelerden bir hücre hattı oluşturulabilir [64].

Farklılaşma

Kök hücreler organizmada ihtiyaç duyulduğunda farklı hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Ancak, her kök hücre türü, elde edildiği kaynağa bağlı olarak farklı farklılaşma potansiyeline sahiptir. Kök hücreler farklı sinyaller verildiğinde bu özellikleri *in vitro* koşullarda da gösterebilir. Erişkin kaynaklardan elde edilen kök hücrelerde, embriyonik ve fetüs kaynaklı kök hücrelerin sahip olduğu yetenekler sınırlıdır. Bu nedenle kök hücrelerin işlevlerini tanımlamada, hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Kök hücreler mezoderm, endoderm ve ektoderm olarak adlandırılan üç germ tabakasından meydana gelen hücrelerden oluşur. Bu üç germ tabakası, tüm vücut hücrelerinin embriyonik kaynağını oluşturmaktadır. Vücudun oluşumu sırasında, bu 3 germ tabakasının her biri farklı özelleşmiş hücreleri meydana getirir (Çizelge 2. 2) [67].

Çizelge 2.2 Embriyonik Germ Tabakalarından Gelişen Farklı Dokular

Embriyonik Germ Tabakaları	Farklılaşmış Dokular
Endoderm	Timus, Tiroid, Paratiroid Bezi, Larinks, Trake, Akciğer, İdrar kesesi, Vajina, Üretra Gastrointestinal Dokular, Karaciğer, Pankreas, Gastrointestinal Sistem İç Yüzeyi Solunum Sistemi İç Yüzeyi
Mezoderm	Kemik İliği, Kan, Adrenal Korteks, Lenf Dokuları, Çizgili, Düz ve Kalp Kasları, Bağ Doku (Kemik ve Kıkırdak dâhil), Ürojenital Sistem, Kalp ve Kan Damarları (Vasküler Sistem)
Ektoderm	Deri, Sinir Sistemi (Nöroektoderm), Adrenal Medulla, Hipofiz Bezi, Baş ve Yüz Bağ Dokuları, Göz, Kulak

Elde edildikleri kaynağa bağılı olarak kök hücreler, totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak adlandırılan 4 farklı farklılaşma potansiyeli gösterirler [67].

2.4.1.1 Totipotent Hücreler

Totipotent terimi Totus-Tam, bölünmemiş ve Potentia-Güç, potansiyel anlamına gelen kelimelerden türeyen ve her şeyi yapabilen anlamına gelen Latince bir terimdir. Fertilizasyon ile oluşan tek hücreli embriyo (zigot) ilk totipotent hücre olarak adlandırılır ve tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve potansiyele sahiptir.

Ayrıca erken embriyonik dönem olarak adlandırılan blastomerin oluştuğı embriyonun ilk 4- 5. gününe kadar oluşan hücrelere de “totipotent hücreler” adı verilmektedir. Totipotent hücreler organizmanın tüm yapılarını ve ekstra embriyonik yapılarda olan göbek kordonu, amniyon kesesi, Wharton Jeli ve plasentayı da oluşturabilecek yeteneğe sahiptirler. Totipotent hücreler organizmanın gelişimini takiben farklılaşma potansiyellerine göre pluripotent, multipotent, ünipotent özellik gösterebilirler.

2.4.1.2 Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent terimi Latince “çeşitli, çok” anlamına gelen Plures ve Potentia-Güç kelimelerinden türemiştir. Pluripotent hücreler fertilizasyondan sonra, 4- 5. günde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücrelerdir. Bu hücreler, *in vivo* embriyonik gelişim sırasında ve *in vitro* koşullar altında embriyonun üç germ tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektodermden meydana gelen her türlü hücre tipini (yaklaşık 200 farklı hücre) oluşturabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Bu eşsiz farklılaşma özelliğine sahip olmalarına rağmen pluripotent hücreler, işlev gören bir organizmayı oluşturabilecek kabiliyette değildirler. Pluripotent kök hücreler birçok farklı hücre türünü oluşturmalarına rağmen totipotent hücreler gibi ekstra embriyonik tabakaları oluşturamazlar. Yapılan çalışmalarda erken dönem insan embriyolarından alınan hücreler ile fetüs dokusundaki gonad kökenli hücrelerin de pluripotent özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir [68], [69].

2.4.1.3 Multipotent Kök Hücreler

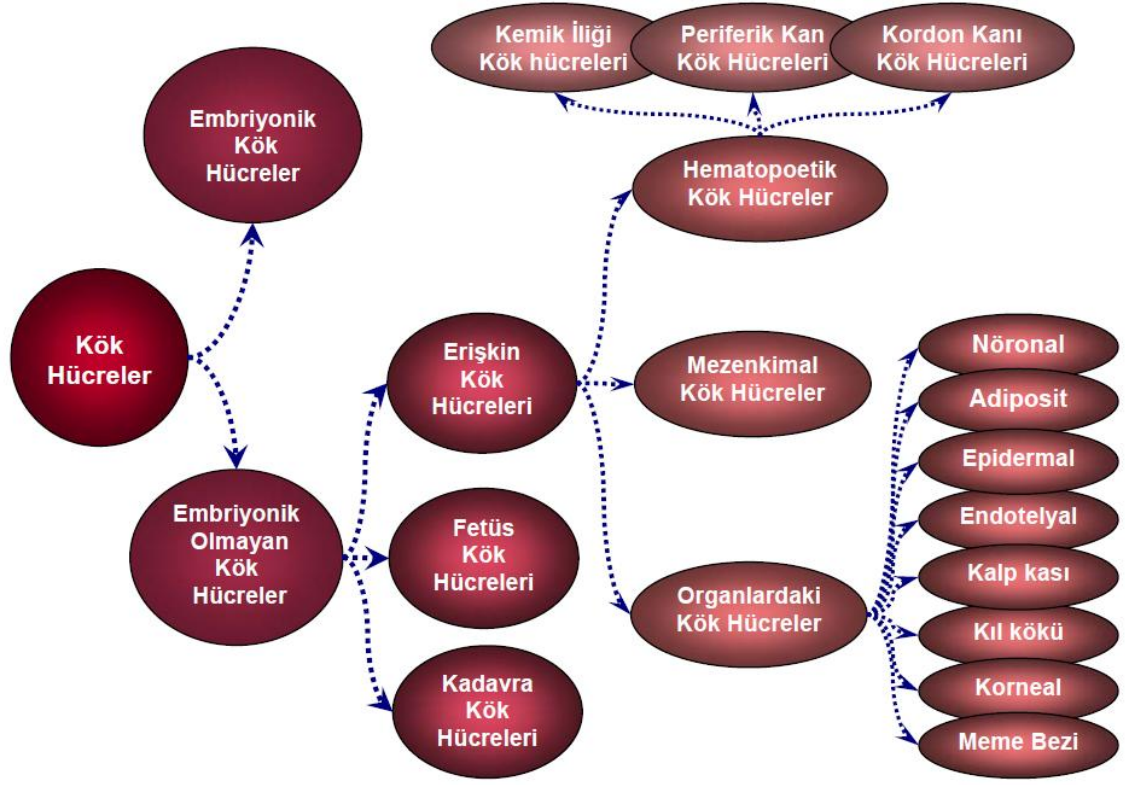
Embriyonik gelişimin daha ileri evresinde görülen bu hücreler sadece kendi kökeninde bulunan özelleşmiş hücrelere ve doku gruplarına farklılaşabilirler. Bu hücreler sınırlı farklılaşabilme kapasitesine sahip olmalarına rağmen çok sayıda hücre türüne farklılaşabilmektedir. Multipotent hücreler, kemik iliğinde yüksek miktarda olmak üzere kordon kanı ve yağ dokusunda da bulunur [68].

2.4.1.4 Unipotent Hücreler

Latince “tek, bir” anlamına gelen unus kelimesinden türetilmiştir. Unipotent hücreler, sadece bir çeşit hücre grubuna farklılaşabilen hücrelerdir. Bu hücreler, erişkin organizmada, tek bir seri boyunca farklılaşabilirler. Ayrıca, doku yenilenmesinde de rol oynarlar. Ancak, daha geniş doku hasarlarında, hasarlı bölgenin tamiri için pluripotent kök hücreler devreye girer [68], [70].

2.4.2 Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynaklar

Embriyonik kök hücre kaynakları olan, erken embriyon dönemindeki blastosist, embriyonel yapraklar ve fetal dokular dışında kök hücreler, birçok farklı erişkin dokudan da izole edilir (Şekil 2. 4). Günümüzde mevcut olan kök hücre kaynaklarına ek olarak tıbbi ve laboratuvar tekniklerinin gelişmesiyle ileride, daha farklı kök hücre kaynaklarının da keşfedilmesi beklenmektedir [71], [72].



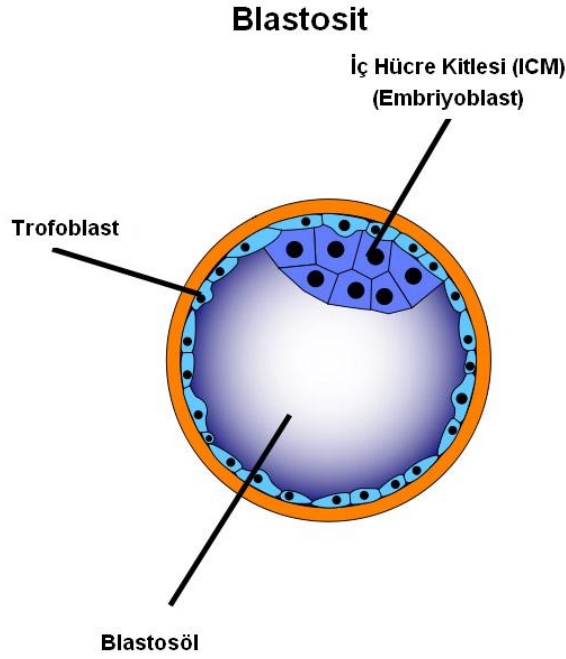
Şekil 2.4 Kök hücre kaynakları

2.4.2.1 Embriyonik Kök Hücreler

Fertilize yumurta, olgun bir organizma oluncaya kadar bölünür ve farklılaşır. İnsan dâhil tüm erişkin memeliler, sinir (nöronlar), kas (miyositler), deri (epiteller), kan (eritrositler, monositler, lenfositler, v.b.), kemik (osteositler) ve kıkırdak hücreleri (kondrositler) gibi 200’ den fazla hücre çeşidinden oluşur [73].

Embriyonik kök hücrelerinin 1998 yılında Wisconsin-Madison Üniversitesinde James Thomson tarafından keşfinden sonra insan embriyonik kök hücrelerinin (iEKH) elde edilmesi ve kültürünün yapılması, biyoloji bilimi için çok önemli bir ilerleme olmasının yanında doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için de dev bir adım olmuştur [74], [75].

İnsan embriyonik kök hücrelerinin elde edildiği embriyolar, blastosist adı verilen 4–5 günlük içi boş mikroskobik kürelerdir. Blastosist üç yapıdan oluşur: Blastosisti kaplayan katman olan trofoblast; blastosistin içinde bulunan boşluk olan blastosöl ve blastosölün bir ucunda bulunan ve yaklaşık 200 hücreden oluşan iç hücre kitlesidir (Şekil 2. 5) [76].



Şekil 2.5 Embriyonik kök hücreler

2.4.2.2 Erişkin Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler, erişkin vücudunda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Bunlar, hasar gören dokuları tamir etmede kullanılan hücreleri oluşturan ve/veya ölen hücrelerin yerini alan hücrelerdir ve üretildikleri farklı organlardaki özel yerlerde bulunurlar [77]. Erişkin kök hücreler, 1950' li yıllarda kemik iliğinden alınan kök hücreler kullanılarak kök hücre nakli yapılmasından bu yana klinikte kullanılmaktadır. Bu tarihten bu yana, alternatif doku onarım olasılıkları sunan ve kordon kanı, yağ, cilt, goblet hücreleri ve periferik kan (PK) gibi elde edilmesi daha kolay hücre kaynaklarından elde edilen diğer kök hücre türleri tanımlanmıştır. Erişkin kök hücreler farklılaştıkları dokular temel alınarak hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler olarak 2 gruba ayrılırlar [78], [79], [80].

2.4.2.2.1 Mezenkimal Kök Hücreler

Memeli kemik iliği mikro çevresi, kemik homeostazisi ve hematopoezini destekleyen birçok farklı elemandan oluşur. Bu elemanlardan biri de mezenkimal hücreler olarak

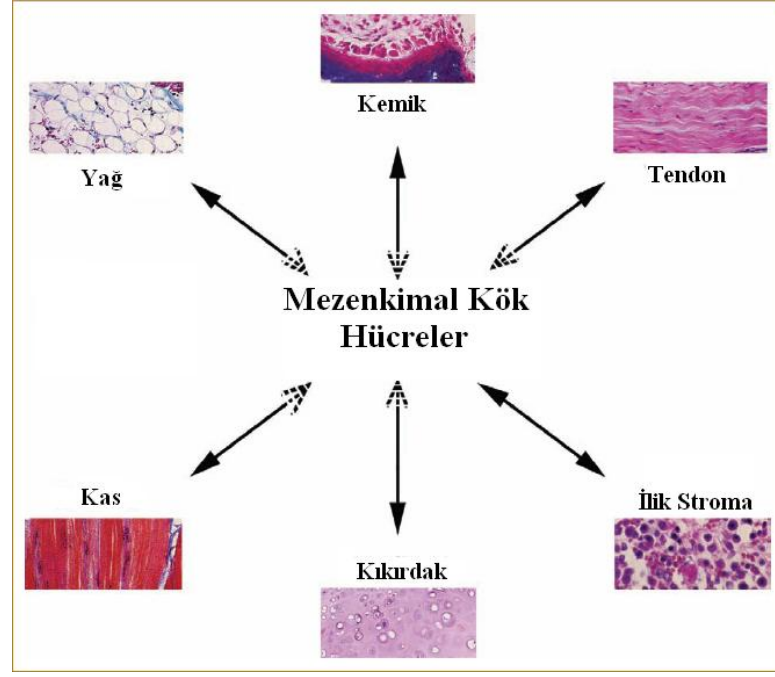
adlandırılan hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler; başlıca kemik iliğinde bulunan kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ ve kemik iliği stromal hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan multipotent progenitor hücrelerdir. Kemik iliğinde non-hematopoetik kök hücrelerin varlığı ilk olarak 130 yıl önce Alman patolog Cohnheim tarafından ile sürülmüştür. Friedenstein ve arkadaşları, 1976'da fibroblast kolonisi yapan ünitelerde (CFU-F), nonhematopoetik kemik iliği progenitörleri olan mezenkimal kök hücreleri (MKH) tanımlamıştır. Friedenstein, fetal buzağı serumu içeren kemik iliği materyalinin ortama yayılması sonucunda, adezyon yeteneği olan, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip hücre kolonilerinin varlığını bildirmiştir. Takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokulara farklılaşabilen non-hematopoetik multipotent kök hücreler oldukları anlaşılmıştır. Günümüzde bu hücreler genel olarak mezenkimal tip hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı mezenkimal kök hücre olarak adlandırılmışlardır. Farklı hücre hattına farklılaşabilme yeteneğine sahip MKH'ler ile yapılan yoğun çalışmalar sonucu birçok farklı dokudan mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi mümkün olmuştur [80], [81], [82] (Çizelge 2. 3).

Çizelge 2.3 Bazı mezenkimal kök hücre kaynakları (Alfabetik sırayla)

1. Adipoz doku kaynaklı MKH'ler

2. Amniyotik sıvı ve amniyotik membran kaynaklı MKH'ler
3. Kemik iliği MKH'ler
4. Dental pulp MKH'ler
5. Endometriyal MKH'ler
6. Limbal doku kaynaklı MKH'ler
7. Menstrual-kan kaynaklı MKH'ler
8. Kas ve periost kaynaklı MKH'ler
9. Periferik kan kaynaklı MKH'ler
10. Plasenta ve fetal membran kaynaklı MKH'ler
11. Tükürük bezi kaynaklı MKH'ler
12. Deri ve sünnet derisi kaynaklı MKH'ler
13. Amniyotik insan umbilikal kord altı membran kaynaklı MKH'ler
14. Snovial sıvı kaynaklı MKH'ler
15. Wharton's jeli (WJ) kaynaklı MKH'ler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), yayılma potansiyeli olan ve *in vitro* olarak kondrojenik, osteojenik, adipojenik ve miyojenik serilere dönüşebilen hücreler olarak tanımlanır (Şekil 2. 6).



Şekil 2.6 Mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre türlerine farklılaşma potansiyeli.

Mezenkimal kök hücreler, sahip oldukları farklılaşma potansiyelleri ve zayıf immün yanıt oluşturma özellikleri sayesinde klinik kullanıma uygundurlar. Bu özellikleri ile mezenkimal kök hücreler Avrupa Birliği (AB) tıp ajansı tarafından İlaç Hücre (Cell Drug) kapsamına almışlardır [83], [84].

2.4.2.2.1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu (ISCT) mezenkimal kök hücreleri tanımlamak için 3 özellik bildirmiştir:

- MKH'ler standart kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilen hücrelerdir,
- MKH'ler yüzeylerinde CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) ve CD90 gibi non-hematopoetik hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmelerine rağmen, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR gibi tipik hematopoetik belirteçleri göstermezler,
- İn vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilirler [85].

2.4.2.2.1.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri

Kültür ortamındaki mezenkimal kök hücrelerin morfolojileri, ışık veya faz kontrast

mikroskobu ile incelendiğinde fusiform şekilli, iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olarak görülürler. Morfolojik özellikleri fibroblastlara benzemekle birlikte en önemli farkları nükleus yerleşiminin fibroblastlarda asimetrik olmasına karşın bu hücrelerde simetrik olmasıdır [86], [87].

2.4.2.2.1.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünojenotipik Özellikleri

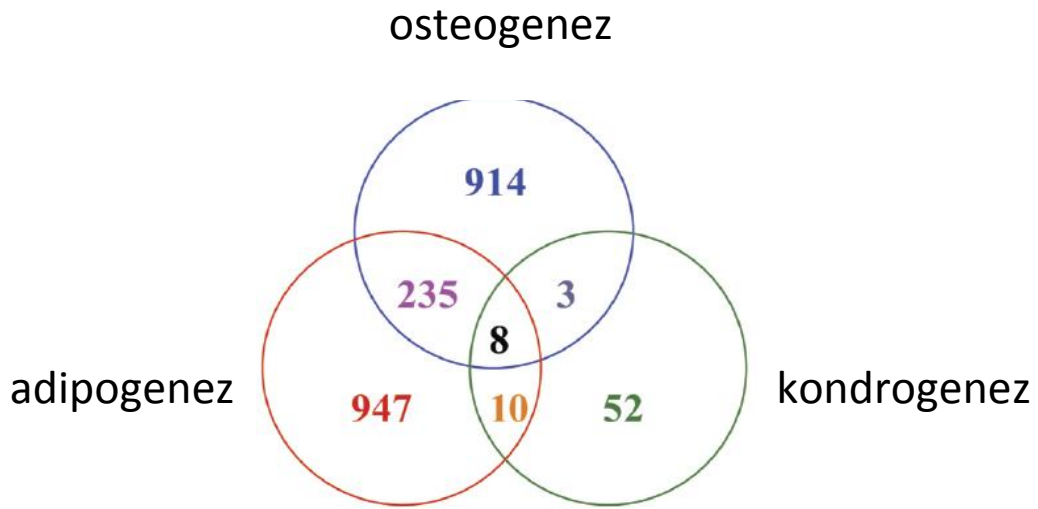
Mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri ile ilgili çalışmalar genellikle primer hücreden ziyade kültürde çoğaltılmış hücrelerde araştırılmıştır. Primer mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır. Kültürde çoğaltılmış mezenkimal kök hücrelerin antijenik özelliklerine bakıldığında kendilerine has bir belirteç taşımadıkları; endotel, epitel ve kas hücrelerine benzer fenotipik özelliklere sahip oldukları görülmektedir. Kültürde çoğaltılmış mezenkimal kök hücreler CD45, CD34, CD14, CD11 gibi hematopoetik belirteçleri ve CD80, CD86, CD40 gibi ko-stimülator molekülleri eksprese etmezler. Mezenkimal kök hücre için tipik olarak kabul edilen belirteçler CD105 (SH2) ve CD73 (SH3/4)'tür. Fibroblast yüzey markeri olan STRO-1 mezenkimal kök hücreler tarafından da eksprese edilmektedir. Ayrıca mezenkimal kök hücreler CD71 (transferin reseptör) ve CD90 (thy-1) taşırlar. Farklı dokulardan elde edilen hücreler genel olarak benzer fenotipik özelliklere sahip olmakla birlikte, bazı farklılıklar da göze çarpmaktadır. Örneğin, yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler, yüzeyinde CD49d taşıırken, CD106 taşımamaktadır; kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler de ise aksine CD49d negatif, CD106 pozitifir. Erişkin mezenkimal kök hücrelerin, hücre yüzeyinde HLA sınıf I antijenlerini zayıf eksprese ettikleri, HLA sınıf II antijenlerini taşımadıkları, ancak hücre yüzeyinde taşınmayan HLA sınıf II antijenlerin stoplazmada bulunduğu saptanmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin ko-stimülator molekülleri ve HLA sınıf II antijenlerini eksprese etmemeleri gibi özellikleri graft versus host hastalığı tedavisinde kullanılmalarına olanak sağlamıştır. Fetal karaciğer kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ise HLA sınıf II antijenleri hem hücre yüzeyinde hem de intrastoplazmik olarak içermedikleri gösterilmiştir. Bu bulgular MKH antijen ekspresyonunun fetal yaşamdan erişkin yaşama geçişte değiştiğini düşündürmektedir.

Mezenkimal kök hücreler ve hematopoetik kök hücreler bir çok adezyon molekülünü ortak olarak bulundururlar. Bunların başlıcaları fibronektin, laminin ve kollojene bağlanmadan sorumlu olan integrin ailesi ve L-Selektindir. Mezenkimal kök hücrelerin ayrıca sitokin, kemokin ve ekstraselüler matriks proteinlerini sentezleme yeteneği vardır. Salgıladıkları başlıca sitokinler Interleukin-6 (IL-6), IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), Flt-3 ligand ve stem cell faktördür (SCF). Ayrıca kültür ortamlarına IL-1 α ilave edildiğinde, granulocyte-colony stimulating faktör (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating faktör (GM-CSF) salgılama yeteneği kazanırlar. Mezenkimal kök hücrelerin GM-CSF, G-CSF, SCF ve IL-6 salgılama yetenekleri, allojeneik ve otolog hematopoetik kök hücre nakillerinde, hematopoetik kök hücrelerin yerleşim, çoğalma ve farklılaşmalarına katkı sağlayarak nötrofil ve trombosit engrafmanını hızlandırıcı etki gösterdiği düşünülmektedir [88] [89], [90], [91], [92]

2.4.2.2.1.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması

Erişkin kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler farklı dizilere farklılaşabilir (Adiposit, Miyofibroblast, Osteoblast, Endotelial hücre, Kondrosit, Nöral hücre, Kalp kası, Karaciğer hücresi, İskelet kası, Böbrek tübül hücresi, Tenosit). Farklılaşmalarda rol oynayan genlerin bir kısmı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Şekil 2. 7). Osteogenez, adipogenez ve kondrogenezin her üçünde de rol oynayan genler: Period homolog 1(PER1), Nebulette (NEBL), nöronal hücre adezyon molekülü (neuronal cell adhesion molecule-NR-CAM), FK506-BP 5, İnterlökin 1 tip-II reseptörü (IL1R2), Çinko parmak protein 145 (ZNF145), Doku inhibitörü MMP 4 (TIMP4), Serum amiloidi A2. Bu farklılaşmış hücreler CD29, CD44, CD105 ve CD166 için pozitifdir ve yaklaşık iki günlük bir iki katına çıkma ömrü vardır, altı kata kadar kültürde genişleyebilir ve biyolojik işlevleri yaşlanma ile azalmaz. MKH'lerin basit bir kemik iliği aspiratından 10 hafta içinde yaklaşık 50 kez ikiye katlanarak çoğaltılması mümkündür. Bunların özellikleri, ilk ve ikinci trimesterde fetal kan, karaciğer ve kemikten, amniyotik sıvı ve kordon kanından ve erişkin periferik kandan, yassı kemikler ve adipöz dokudan alınan hücrelere benzerdir. Ayrıca, herhangi bir telomer kısalması ya da karyotipik anomali olmaksızın belirli koşullar altında yüzden fazla kez çoğaltılabilen bu hücrelerin CD133

pozitif bir alt popölasyonunun, yalnızca mezenkimal hücre türlerine değil (osteoblastlar, kondrositler, adipositler, miyositler) aynı zamanda endotel ve nöroektodermal fenotip ve işleve sahip hücrelere de farklılaşma kabiliyeti de kanıtlanmıştır. İnsan MKH'lerinin (iMKH'ler) fare iskelet miyositler ile kültüre edildiğinde kas hücrelerine farklılaşması ve sınırlı miyojenik potansiyel göstermesi ile insan MKH'lerinin daha geniş bir farklılaşma kabiliyeti olduğu da öne sürülmüştür. Kardiyomiyosit farklılaşma da, uygun morfoloji, fizyolojik kardiyomiyojenik yanıt ve uygun adrenerjik ve muskarinik yüzey reseptörlerinin ifadesi ile gösterilmiştir [116]. Daha önce, erişkin kemik iliğinden alınan kök hücrelerin, embriyonik hücrelerin totipotent olması karşısında benzer bir hücre türünü ürettiği düşünülmekteydi. Bu multipotent erişkin kök hücrelerin keşfi ile kalıtsal ya da dejeneratif hastalıkların tedavisi ve kırıkta, kemik ve miyokardiyum gibi dokuların onarımı için gelecek vaat eden ve daha bol bir potansiyel kaynak sunulmuştur [93], [94], [95], [96], [97], [98].

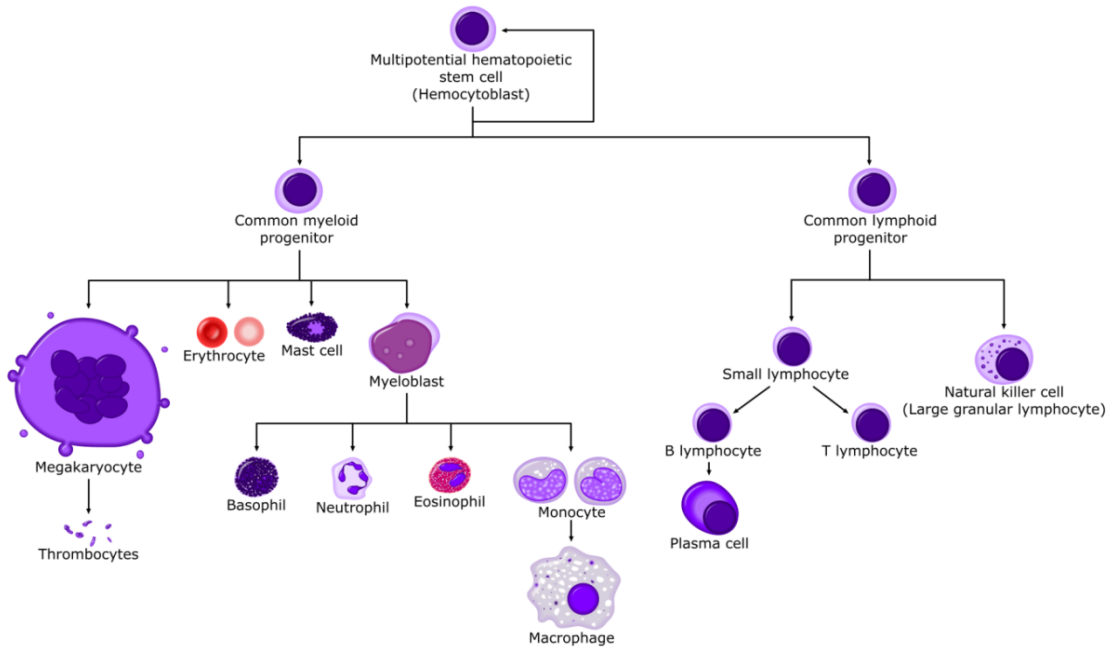


Şekil 2.7 MKH farklılaşmasında rol alan gen sayıları

2.4.2.2.2 Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoetik kök hücreler, kendini yenileme kabiliyetine ve özelleşmiş kan hücrelerine, (eritrositler, trombositler ve lökositlere) farklılaşma kabiliyetine sahip, farklılaşmamış hücrelerdir. Farklı fonksiyonel hücre tiplerini (, monosit/makrofaj,

bazofil, eozinofil, eritrosit, trombosit, mast hücreleri, dendritik hücreler, B ve T lenfositler) oluşturabilirler (Şekil 2. 8).

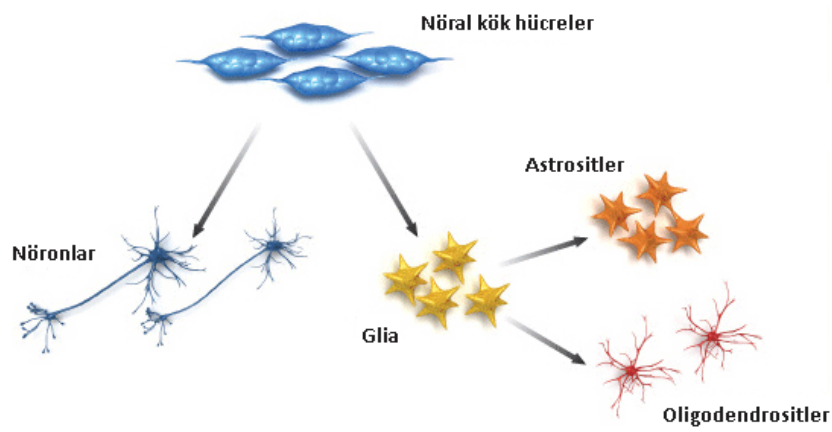


Şekil 2.8 Multipotent özelliğe sahip hematopoetik kök hücreler

Günümüzde 4 farklı kaynaktan (kemik iliği, kordon kanı, periferik kan ve plasenta) elde edilen hematopoetik kök hücreler, miyeloablatif, miyeloablatif benzeri ya da miyeloablatif olmayan işlemlerden sonra lenfohematopoetik işlevin geri kazanımı için kullanılmaktadır. E. D. Thomas tarafından 1963'te tanımlanan, kemik iliğinden elde edilen kök hücreler, klasik kök hücre kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bir hematopoetik kök hücre kaynağı olarak periferik kan 1981'de kanıtlanmıştır ve kordon kanı bir kaynak olarak 1988'de tanıtılmıştır. Farklı kök hücre kaynakları, hücrelerin sayı ve özelliklerine göre farklı rekonstrüktif ve immünojenik özelliklere sahiptir. Hematopoetik kök hücreler, miyeloid ve lenfoid dizileri de içerecek şekilde tüm kan hücresi türlerini meydana getirme kabiliyetine sahiptir. Hematopoetik kök hücrelerin iskelet kası, kalp kası, karaciğer, endotel hücreler ve nöronlara farklılaştığını bildiren çalışmalar da günümüzde mevcuttur [99], [100].

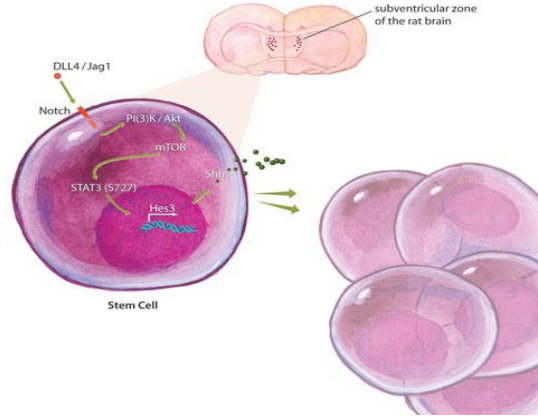
2.4.2.2.3 Nöral kök hücreler

Kısa süre öncesine kadar sinir sistemi hücrelerinin kendilerini yenileyemedikleri düşünülüyordu. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalarda insan beyinde nöral hücrelerin öncülü olan kök hücrelerin olduğu anlaşıldı [101]. Bu kök hücrelerin, fetusun beyin ve sinir sistemini oluşturan ve nöron, astrosit ve oligodendrositleri oluşturan kök hücrelere benzediği belirlenmiştir (Şekil 2. 9).



Şekil 2.9 Nöral kök hücreler

Nöral kök hücreler (NKH) uzun süreli kendini yenilemeye yönelik kapasiteye sahip ve farklı nöral soylar üretebilen özel somatik hücrelerdir. *in vivo* olarak büyük ölçüde pasif olduğuna inanılan erişkin NKH'lerin kimlikleri halen tartışma konusudur. Bir dizi genetik izleme serisine dayalı önde gelen model olan farmakolojik ablasyon, morfolojik ve immünohistokimya analizi, gliyal fibriller asidik protein (GFAP) ortaya koyan ve belli radyal gliyal özellikler gösteren özel astrositlerin subventriküler bölge (SVZ) ve subgranüler bölgede (SGZ) erişkin NKH'lerin bulunduğunu öne sürmektedir (Şekil 2. 10).



Şekil 2.10 Nöral kök hücreler beynin subventriküler bölge ve subgranüler bölgesinde üretilir.

Yaralanma halinde memeli ön beyindeki karıncıkların etrafındaki CD133+ endependimaller etkinleşerek erişkin NKH görevini gören radyal gliya benzeri hücrelere dönüştüğü gözlenmiştir. Erişkin SGZ’de cinsiyet belirleme bölgesi Y-kutusu 2’yi (Sox2) ifade eden ve daha fazla Sox2+ hücrelerinin, nöron ve astrositin artmasına sebep olan bir grup hücre popülasyonunun erişkin NKH’si olduğu öne sürülmüştür. Erişkin merkezi sinir sistemindeki (MSS) bazı hücrelerin normal şartlarda ya da büyük yaralanmalar sonrasında nörojenezde aracılık etmede NKH rolü üstleniyor olması, olfaktör epiteldeki erişkin nörojenezinin kanıtıdır.

Erişkin NKH’lerinin özellikleri tamamen karakterize edilmiştir. Örneğin, insan beyinde nöron, astrosit ve oligodendrosit üretme kapasitesine sahip tripotent NKH’nin varlığı *in vivo* olarak gösterilmiştir [94], [100], [102], [103].

Memeli beyinde hem kendini yenileyebilen hem de merkezi sinir sistemin üç nesil yolu boyunca üretebilen bir NKH popülasyonu mevcuttur, fakat NKH’nin postnatal MSS’deki *in vivo* tanımlanması ve lokalizasyonunun zor olduğu ortaya konmuştur. Kısa süre önce, farklı çalışmalar kirpikli endependimal (CE) hücrelerinin ve özel subependimal bölge (SEZ) astrositlerinin erişkin beyindeki NKH için aday olduklarını göstermiştir. Başka bir çalışmada ise bu iki NKH adayının *in vitro* olarak multipotent küresel klon – nörosfer – oluşturma potansiyelini incelenmiş ve postnatal ve erişkin beyinden izole edilen ve multipotent proliferatif klonlar – nörosferler – olarak büyüeyebilen hücreler nöron, astrosit ve oligodendrosit oluşturma özelliğine sahip olduğu gözlenmiştir.

Nörosfer oluşturan hücreler nöral kök hücre olarak kabul edilebilir ve hem temel nörogelişim süreçleri için bir model, hem de beyin yaralanmaları ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için potansiyel bir kaynak teşkil etmektedir. NKH'nin biyolojisini anlamada önemli bir adım da onların tanımlanmaları ve *in vivo* lokalizasyonlarıdır. Periventriküler subependimal bölgenin bir nörojenez kaynağı olduğu ve bu bölgenin muhtemelen postnatal ve erişkin beyindeki en yüksek NKH yoğunluğunu içerdiği gösterilmiştir. Subependimal bölgenin altındaki ventriküler sistemin etrafındaki kirpikli ependimal hücreler başka bir önerilen NKH kaynağıdır. Kirpikli ependimal hücrelerinin erişkin memelilerde yeni nöronlar üretme yeteneğine sahip olma ihtimalinden uzun süredir şüphe edilmiştir ve bu durum düşük omurgalılarda MSS yaralanmaları sonrasında CE'nin nöron üretmesine dair raporlarla desteklenmiştir.

NKH'lerin anatomik konumu ve nesil özellikleri ancak nihayet subependimal bölgede ve koku alma bulbunda farklılaşmak ya da etraftaki hipokampal nöral devreye entegre olmak amacıyla rostral migratör akımda migrasyona uğrayan progenitörler üretmek için bölündükleri hipokampal dentat girus (DG) içinde tanımlandıkları zaman tespit edilmiştir. HKH'lere benzer biçimde, netsin+ olan NKH'ler işlevsel olarak sürekli kendini yenileyen ve hem gliyal hem de nöral nesilden ara ve olgun hücreler üretme potansiyeline sahip olan hücreler olarak tanımlanabilir. Memeli merkezi sinir sisteminde yer alan nöron ve nöroglial hücreler aynı progenitor nöronal kök hücresinden köken almaktadır. Bu hücreler farklılaşmamış hücreler olarak, sinir sisteminin en az bulunan ve en primordial hücreleridir. Nöronal kök hücrelerin taşıması gereken özellikler şu şekilde belirlenmiştir: 1. Multipotent hücreler olmalı ve sinir sistemi hücrelerinden nöron, astrosit ve oligodendrositlerin bütün alt tiplerine farklılaşabilmelidir, 2. Sinir sistemi hücre tiplerine farklılaşabilme ve sinir sisteminin dejenere veya hasarlanmış bölgelerinde yeniden çoğalabilme yeteneğinde olmalıdır 3. Seri olarak transplante edilebilir olmalıdır. 4. Kendi kendini yenileyebilir olmalı, aynı potansiyel ve özellikleri taşıyan yeni hücreler üretebilme yeteneğinde olmalıdır. Multipotent nöronal kök hücreler, merkezi sinir sisteminin gelişimi boyunca bulunan hücreler olmakla birlikte, erişkinlerde, belirli bölgelerde bulunabilirler. Bir HMG box transkripsiyon faktörü olan, SOX2, farelerde *in vivo* ve *in vitro* nöral kök/progenitor hücrelerde gösterilmiştir. Sinir sistemi gelişmesi sırasında, NKH'lerin, SSEA-1, HNK-1,

PSA-NCAM, prominin-1, gp130, kondroidin sülfat proteoglikanları, heparan sülfat proteoglikanları, cystatin C, galectin- 1, glikolipidler, ve Notch I eksprese ettikleri gösterilmiştir [104], [105], [106].

2.4.3 Olfaktör bulbus yapısı ve olfaktör bulbusdaki nörojenez

Erişkin burnunda olfaktör mukoza nazal boşluğun superior-posterior bölgesinde solunum mukozasıyla serpiştirilerek parçalı dağılım gösterir. Olfaktör duyu aksonları demet halinde toplanır ve kibriform plakasından ön beynin altındaki kafatası tabanına yayılan olfaktör bulbus sinaps yapan kafatasına girer. Olfaktör duyu nöronları ile diğer nöronların en büyük farkı ölüm riskini azaltmak için dış çevre ile yakınlık kurmasıdır. Olfaktör duyu nöronlarının dendritleri epitelin içine gömülüdür ve duyu iletim proteinleri içeren çoklu siller ile sarılıdır. Bu siller üzerini kaplayan mukus içinde uzanır ve yüzeyin sadece birkaç mikron altında bulunur. Toksik gazların solunması durumunda olfaktör epitelium ve nöronlar zarar görür. N-metil-formimino-metilester ve metil bromidin solunması duyu nöronlarının geri dönüşümlü kaybına ve geçici koku alma kaybına yol açar. Buğday tohumu agglutinin- yaban turp peroksidaz ile nazal lavaj yapıldığında, epitelium içindeki duyu nöronların kaybına neden olur ve duyu iletim nöronların hayatta kalmasını etkileyecek büyük moleküller için potansiyel gösteren, bazal hücre proliferasyonu stimüle edilir. Olfaktör nöronlar virüsler ve bakterilerin beyne gitmeleri için de yön sağlar ve bu nedenle onlar, enfeksiyona yanıt olarak koruyucu bir mekanizma gibi apoptoz karşı savunmasız olabilirler [139]. Çevre hassasiyeti de olfaktör nörojenezinin kullanıma karşı savunmasız olduğunu ispatlamaktadır. Örneğin yetişkin farelerde tek naris kapatılması ile indüklenen aşırı kullanımda açık tarafı epitel kalınlığı azalır ve rejenerasyonun devamlılık kabiliyetinin yok olmasıyla birlikte duyu iletim nöronlar kaybolur. Bu kaybın mekanizması bilinmemekle birlikte aşırı kullanıma toksinlere veya enfeksiyonlara bağlı olarak açık tarafta 7 ve 8 aylık kapanmaya bağlı olarak yüksek miktarda polimorfonükleer lökositlerin oluşmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Yaşın ilerlemesiyle birlikte ratlarda özellikle de antero-dorsal bölgede olfaktör epitelin proliferatif ve nörojenik kapasitesinin gerilediği belirlenmiştir. Posterior burun boşluğunda nörojenez daha iyi korunmuş olduğu için bu yaştan ziyade kendiliğinden kullanımı etkileyebilir. Antero-

dorsal bölgedeki olfaktör epitelin histolojisi yaşlanan ratlarda tabakaların azalması, nöronların kaybı ve destek hücrelerinin proliferasyonunun artmasıyla değerlendirilir. Benzer değişiklikler insanlarda da yaşa bağlı olarak olfaktör epitelyum kalınlığının artması, duyu nöronlarının azalması ve solunum epitelindeki olfaktör epitelinin parçalı dağılımı ile gözlenir [140].

2.4.4 Olfaktör kök hücreler

Yapılan birçok çalışma göstermiştir ki olfaktör epitelden normal gelişen erişkin olfaktör mukozada nöral ve nöral olmayan bileşenlerden oluşan bir kök hücre hattı hiyerarşisi bulunur. Bu kanıtlar fare ve sıçanlarda görülmesine rağmen insanların da dâhil olduğu tüm omurgalıların olfaktör mukozasında aynı prensipler kabul edilir ancak yine de insan dokusunda bazı farklılıklar olduğu rapor edilmiştir [141]. Olfaktör sinirinin hasarlanmasını takiben duyu nöronları rejenere olur ve hayvanlar koku alma duyularını yeniden kazanırlar. Bu önemli delil yatay bazal hücrelerin kök hücre olduğunu ve rejenerasyondan sorumlu olduklarını ortaya koyar. Yatay bazal hücreler yavaş çoğalır, kendini yeniler ve *in vivo* ve *in vitro* olarak tüm olfaktör epitelyum hücre tiplerini oluştururlar. Olfaktör epitelin kimyasal ablasyonu yatay bazal hücrelerin proliferasyonunu ve daha sonra ve epitelin rejenerasyonunu indükler, böylece koku alma fonksiyonunu geri kazandırır. Kimyasal ablasyondan sonra olfaktör epitelin yenilenmesi yatay bazal hücreler gibi, duyu nöronlarının destekleyici hücreler Bowman bezi ve kanal hücrelerin oluşmasını sağlayan küre şeklindeki bazal hücrelerin transplantasyonu ile sağlanır. Bu küre hücrelerinin mi yatay bazal hücrelerin mi gerçek kök hücre rolü oynadığının tartışılmasına neden olur. Hücre dinamiklerinin analizi olfaktör epiteldeki bazal hücrelerin bir hızlı bölünen popülasyonu (1 bölünme/gün) ve bir yavaş bölünen (1 bölünme/~60 gün) popülasyonu olan iki ayrı popülasyonu arasında belirlenir. Hızlı bölünen popülasyon bazal membrandan nöronal tabakaya göç ederken yavaş bölünen popülasyon bazal membranda kalır. Bu davranışlar yavaş bölünen kök hücreler ile uyumludur ve hızlı bölünmeye imkân verir, *in vitro*da görüldüğü gibi direk amplifiye olan nöral progenitörler ve lokasyonlarının da yatay bazal hücrelerle tutarlı olması kök hücre olduklarını ve küresel bazal hücrelerin de hızlı bölünen prekürsörler olduğunu gösterir. Elektron mikroskobu altında da küresel bazal

hücrelerden duyu nöronlarına geçiş tipi olduğunun görülmesi bazı küresel bazal hücrelerin olgunlaşmamış nöronlar olduğunun kanıtıdır. Küresel bazal hücreler *in vitro* açıl nöronal öncüllerdir, yatay bazal hücreler çoğalabilir ve küresel bazal hücrelere, olfaktör nöronlara ve olfaktör ensheathing hücrelere dönüşebilir. Bu çalışmalar yatay bazal hücrelerin olfaktör epitelin tüm hücrelerini oluşturabileceğini göstermiştir. *In vivo* olarak küresel bazal hücrelerin yatay bazal hücrelerden ortaya çıkması yatay bazal hücrelerinin olfaktör epitelin uzun süreli rejenerasyonunu sağlayan gerçek kök hücreler olduğunu, küresel bazal hücrelerin multipotent transit geçiş ve nöronal öncül hücreleri olduklarını gösterir. Bazal tabakanın altında bulunan olfaktör ensheating hücrelerin kaynağı henüz tam olarak belirlenememiştir ancak elektron mikroskobu çalışmaları epitelin bazal tabakasını ortaya çıkarmış ve bunların yatay bazal hücreler olduğunu göstermiştir. Buna rağmen hücre tipi kesin olarak belirlenememiştir bir ek olarak kök hücreler fare, sıçan ve insan olfaktör mukozasından *in vitro* olarak çoğaltılabilmektedir. Bu hücreler multipotenttirler ve epitelyal ve nöral hatların yanında embriyonik mezodermal ve endodermal hatları da oluşturabilirler. Multipotent kök hücreler embriyonik sıçan olfaktör mukozasından alınıp kültüre edilmiş lamina propriadaki bazı hücreler tarafından eksprese edilen 3 mezenkimal markırı da eksprese etmişlerdir. Erişkin insan olfaktör lamina propriasından kültürü yapılan hücreler CD 19/32 ve insan mezenkimal kök hücre markırlarını eksprese ederler, nöral hat fenotipini halen koruduğundan isim olarak ekto-mezenkimal kök hücre olarak da önerilmiştir. Bu çalışmalar kök hücrelerin epitelyum içindeki yatay bazal hücrelerden farklı olarak alttaki olfaktör lamina propriadan da sağlanabileceğini göstermiştir. Buna rağmen hücre kültüründe elde edilen bu gibi hücrelerin dokudaki yerleşik hücre tipi kimlikleri bilinmemektedir. Bu muhtemelen daha önce fare nöral kök hücreleri için gösterilen izolasyonu gerektirir [23], [24], [107], [108], [109], [110].

2.4.5 Olfaktör epiteldeki nörolojik niş

Hücrel bir niş hücreler arası matriks, lokal parakrin ve otokrin sinyal çevresi, komşu hücreler ile temasın yanında yakınlardaki damarlardan difuz eden hormonlar gibi dış faktörlerden meydana gelir. Hücrel bir niş aynı zamanda hücre yüzeyinde bulunan hücre yüzey reseptörleri ve bu reseptörlerin hücreler arası sinyallere cevap verme

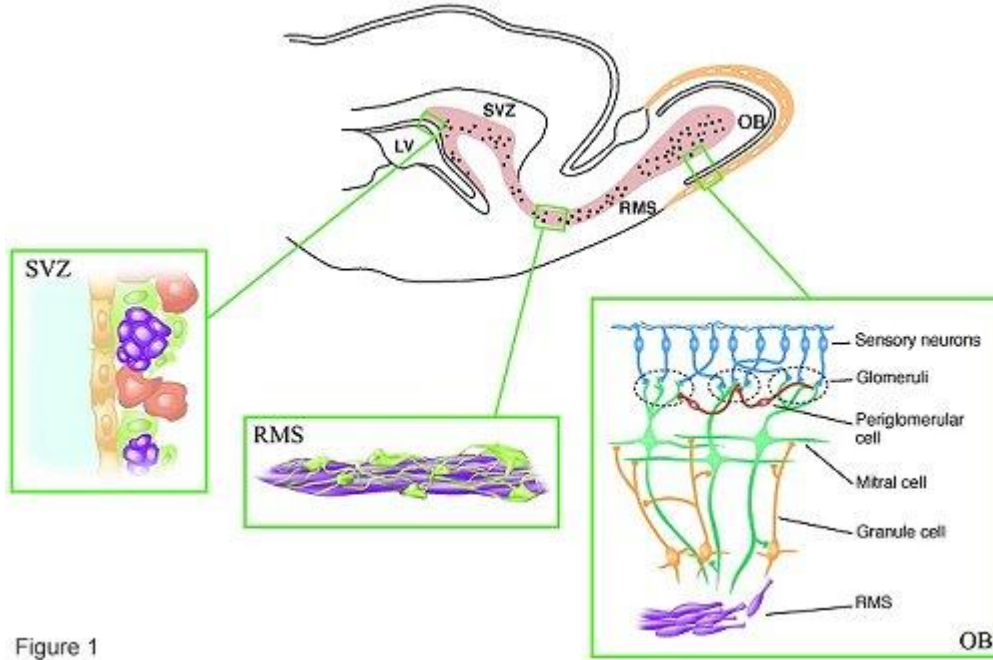
yetenekleriyle tanımlanır. Yatay bazal hücreler bazal membran içinde ICAM-1 ve $\beta 1$, $\beta 4$, $\alpha 1$, $\alpha 3$ integrinlerini, kollajen reseptörü görevi gören ayrıca $\alpha 6$, fibronektin ve laminin eksprese ederler. ICAM-1 ekspresyonu için seçilip koloni olarak büyütüldüğünde, yatay bazal hücreler kök hücre özelliği olan kendini yenileme ve küresel bazal hücrelere, olfaktör duyu nöronlarına ve glialara dönüşme özelliği gösterirler. Kök hücre nişinin önemli bir yönü ise asimetric hücre bölünmesine karşı simetric hücre bölünmesini düzenlemek üzere kutuplaşma mekanizması sağlamasıdır. Sinir sisteminin gelişiminde nöral kök hücreler iki kutupludurlar ve bazal membrandan apikal yüzeye doğru yayılırlar. Apikal membrandaki proteinlerin hücrenin simetric mi asimetric mi bölüneceğinin belirlenmesinde rol oynadığı öngörülmektedir. Kök hücre, bir bazal membran üzerinde epitelde yer aldığı durumunda, yüzey membran, kutupları belirtmek üzere bazal membranın matris proteinleri ile etkileşir. Bazal membranın asimetric bölünmeye karşı simetric bölünmesindeki spesifik rolünde yatay bazal membranın henüz rolü belirlenmemiştir. Olfaktör epitelin nörojenik nişinin karmaşıklığı çok geniş sayıda büyüme faktörleriyle ve olfaktör epitelde bulunan reseptörleriyle gösterilir. Örneğin nörotropinler ve onların reseptörleri bazı özel hücreler tarafından eksprese edilirler. Yatay bazal hücreler TrkA ve NT4 eksprese ederken duyu nöronları TrkB ve TrkC ve tüm nörotropinleri eksprese eder. Destek hücreler, gelişen nöronlar ve olfaktör ensheating hücreler diğer kombinasyonları eksprese ederler. Bazal hücreler ve nöronlar CNTF ve dopamin D2 reseptörünü eksprese eder. Destek hücreler nöronlar, bazal hücrelerin tümü FGF2' yi eksprese ederken sadece nöronlar GDNF eksprese ederler. Yatay bazal hücreler epidermal büyüme faktör reseptörünü eksprese eder ve EGFR, EGF ve TGF α sinyallerine yanıt olarak artar. Yatay bazal hücrelerin reseptörlerinin tüm repertuarı bilinmemektedir ancak yatay bazal hücrelerin proliferasyonlarını inhibe eden aynı zamanda stimüle eden EGFR aktivasyonu gibi faktörlerin var olduğu kabul edilir. Bu tahmin yatay bazal hücrelerin her 30-60 günde bölünmesinin sadece dış etkenlerle nöronların ve onların küresel bazal hücre progenitörlerinin tahrip olmasıyla olfaktör hücre hatlarının ortaya çıkmasından kaynaklanır. Diğer yandan duyu nöronları multipotent küresel hücreler tarafından sürdürülürler. Organizmanın yaşam süresi için proliferasyon kapasitesini sürdürebilmek için yatay bazal hücrelerin proliferasyonunu baskılayan çoklu faktörler bulunabilir.

Bazal laminaya yakın olan lamina propriada bulunan kılcal damardan kaynaklı olabilen bazı faktörler tiroksine ile nöral progenitörlerin hayatta kalmalarının regülasyonunu gerçekleştirir. Difuz olabilen faktörlerin ve hormonların yanında direk temas ile hücreler arası sinyaller sinir sisteminin gelişiminin düzenlenmesinin önemli bir parçasıdır. Erişkin olfaktör epitelin çevresel etmenler ile zarar görmesi durumunda farklılaşmış hücrelerden kök hücrelerin kendilerini oluşturmak üzere direk sinyal iletmesi avantajlıdır. Destek hücreler epitelin lüminal yüzeyine uç ayaklarıyla yatay bazal hücreler ile yakın ilişkisi olan bazal membrana yayılır. Destek hücreleri duyuusal nöron dendritleriyle çevrilidir ve epitel yüzey ile sıkı bağlantı yapar. Bunların dış çevrede mukus içine yayılmış mikrovilileriyle yerleştikleri görülür. Duyu nöronlarıyla birlikte destek hücreler çevreden yatay bazal hücrelere taşıyıcı sinyaller için yolak sağlar. Nöronların farklılaşması gibi aksonları da bazal yayılarak yatay bazal hücrelerle demet halinde sarılıp bazal membrandan epiteli terk eder. Lamina propriaya giren akson demetleri bazal membranla yakın ilişkili olfaktör ensheating hücreler ile sarılır ve epitelyum üzerinden görünür hale gelir. Sonuç olarak yatay bazal hücreler de lamina propriadaki Bowman bezi ve epiteldeki demetleriyle yakından ilgilidir[111], [112], [113], [114].

2.5 Olfaktör Bulb Nörojenezi

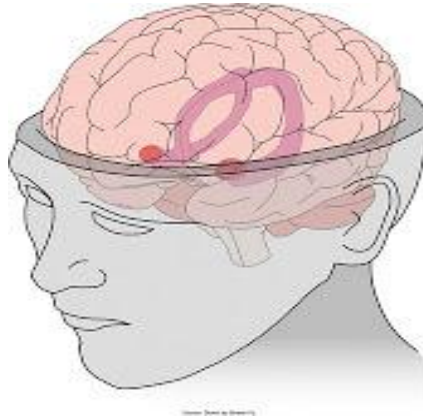
Olfaktör epitel olfaktör mukozanın en üst tabakasıdır özelleşmiş koku bezlerini (Bowman bezleri) içeren lamina-propriayı ve kendi özelleşmiş glia hücreleri ile çevrelenmiş koku duyu aksonları olan olfaktör ensheating hücrelerini barındırır. Erişkin olfaktör epitelyum nöral gelişimi ve rejenerasyonu anlamak için ilgi çekici bir model sağlar. Olfaktör epitelyum tüm erişkin insanlarda nöronlara ve progenitörlere erişim sağlanabilen tek kök hücre kaynağıdır. Bu da insanda kök hücreden olgun nörona nörojenezinin kontrolünü, düzenleyici genlerin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin belirlenmesine imkân sağlar. Yatay bazal hücreler olarak adlandırılan doku spesifik kök hücreler olfaktör sistemdeki nöral olan ve olmayan tüm hücre tiplerini oluşturabilirler. Yatay bazal hücrelerin “kök hücre nişi” bazal membranın lokasyonu ve epitelin diğer hücre tipleriyle direk temasıyla ilgilidir. Bu hücre soyunun durumunu ve hücrelerarası boşlukta bulunan çoklu büyüme faktörlerine cevabını izlemek için

ideal bir lokasyondur. Bu niş proliferasyonun normal seviyesini düşükte tutar (~50 gün) ancak olfaktör epitelyum yeterince zarar gördüğünde multipotent transit çoğalan hücreler ve küresel bazal hücrelerin hızlı proliferasyonu tetikler (Şekil 2. 11) [115], [116], [117], [118], [119], [120], [121], [122].



Şekil 2.11 İnsan olfaktör sisteminin anatomisi.

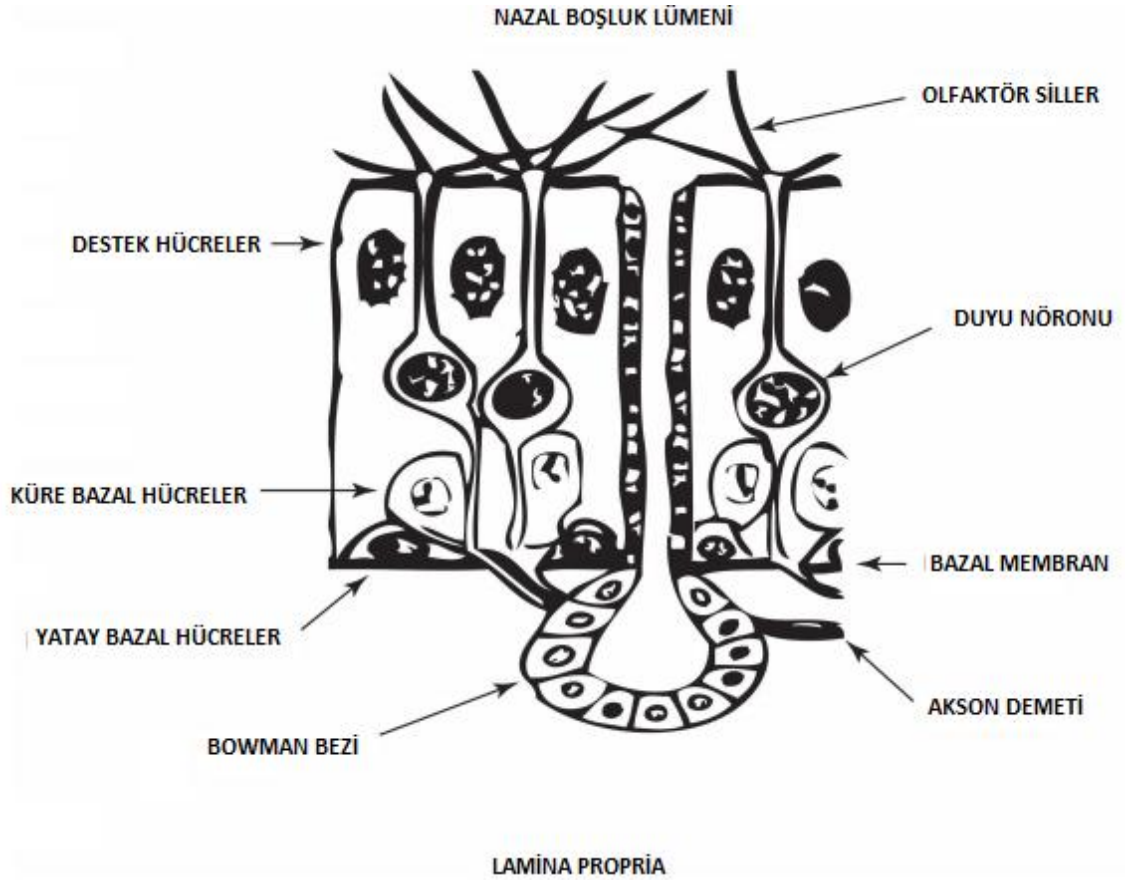
Bilindiği gibi erişkin beyinde yeni nöronlar, hipokampusün (Şekil 2. 12) subventriküler bölgesinde üretilir. Nöral progenitorler subventriküler bölge içinde oluşarak göç ederler ve ara nöronlar olarak burun içindeki olfaktör duyu nöronlarının aksonları için hedef olan olfaktör bulb içinde nöral çevrime katılır [120], [121], [122].



Şekil 2.12 Hipokampüsün beyinde yerleşimi

Bu nöronlar erişkinlikte olfaktör epitelyum içindeki bir nörojenik niş içinde kök hücrelerden sürekli olarak farklılaşmak suretiyle oluşurlar. Kök hücreler, travma ve toksinler tarafından hasar olduğunda olfaktör epitel içindeki tüm hücrelerin rejenere olmasından sorumludur. Bu kök hücreler, yatay bazal hücreler, bazal membran olarak adlandırılan hücreler arası matriksin yanında aynı zamanda etraflarındaki hücreler tarafından salgılanan birçok büyüme faktörü ve dolaşımdan taşınan hormonlar ile birlikte bir niş meydana getirirler. Olfaktör mukozadan izole edilen multipotent kök hücreler, endodermal ve mezodermal kökenli hücrelerin yanında bilinen nöral hatları oluşturan hücreleri de meydana getiriler [117], [118], [119], [120], [121], [122].

Diğer memelilerde olduğu gibi insanlarda da subventriküler bölgede nörojenez, nöronların oluşturup göç etmesiyle olfaktör bölge içindeki ara nöronları meydana getirmek suretiyle devam eder [123]. Beynin bir bölümü olan olfaktör bulb, burnun içindeki olfaktör epitelin içindeki duyu nöronlarından aksonal sinyalleri alır (Şekil 2. 13).



Şekil 2.13 Olfaktör epitelyum

Memelilerde olfaktör mukoza tipik olarak nazal boşluğun dorsal posterior kısmında medyal ve lateral olarak nazal septum ile sarı, türbinat kemikleri ile çevrilidir, duyu nöronlarının dendritlerinden duyu sillerinin çıkıntıları için çok geniş bir yüzey alanı sunar. İnsan olfaktör mukozası yapısal olarak diğer omurgalılardakine benzer şekilde aynı hücre tipleri içeren yalancı tabakalı (pseudostratified) olfaktör epitelyumdan oluşur. Fetus ile karşılaştırıldığında erişkin insanlarda nazal kavitenin superior posterior bölgesindeki olfaktör epitelin kaybolduğu, yerine solunum ve kübik epitelin geçtiği görülür. Olfaktör bölge yetişkinlerde olfaktör epitelde bitişik olmayan parçalı bir dağılım gösterir. Diğer taraftan olfaktör epitelin erişkin insandaki dağılımı fetusa göre aneterior ve inferiyor olarak daha geniştir. Günümüze kadar insan olfaktör mukoza analizleri otopsi ve biyopsi ile çıkarılan materyal ve sistematik olmayan ve olfaktör mukozanın tamamen ayrılması ile yapılmaktaydı. Subventriküler bölgede nörojenezi meydana getiren olfaktör duyu nöronlarının aksonları olfaktör epiteli terk eder ve lamina propria içinde mitral/tufted hücreleri ve ara nöronlar ile sinaps yaptığı olfaktör bulba girmeden fasikül ve demet şekline dönüşür [123], [124]. Yetmiş yıl önce ilk kez olarak erişkin fare olfaktör epitelinin bazal hücrelerinde mitotik aktivite görüldükten [125] kısa süre sonra toksik olarak hasarlanan maymunda olfaktör duyu nöronlarının rejenerasyonu gözlemlendi [126]. Kurbağada, balıkta, kedi ve köpekte, yılanbalığında, farede, maymunda ve insanda yapılan birçok çalışmada da bu gözlem doğrulandı. Olfaktör duyu nöronlarının çevresel faktörlerle hasarlanması, olfaktör epitelde, tüm omurgalıların günlük hayatlarındaki yemek aramak, avlanmak, sosyal iletişim ve üreme amaçlı birçok durum için gerekli olan koku duyusunun sağlanması için nörojenezi meydana getirir. Bunun önemi erişkin ön beyninin nörojenezi için olfaktör bulbdaki ara nöronların periferde meydana gelen nörojenezin devamlılığı için yeni merkezi dolaşım sağlaması için gerekli olmasıdır. Örneğin; olfaktör bulb ara nöronlarının kimyasal hasar ile kaybı ve duyu inervasyonu ile geri gelmesi bunun kanıtıdır[127], [128]. Olfaktör mukoza yaşayan erişkin insanlarda ulaşılabilir ve sağlıklı ve hasta dokulardaki erişkin nörojenezinin biyolojisini anlamak için erişilebilir bir kaynak sunar [129]. Aynı zamanda sinir sisteminin tedavisi için hücre transplantasyonu kaynağıdır [25], [130]. Olfaktör

nöral kök hücrelerin ve nişinin biyolojisinin anlaşılması klinik uygulamaların optimizasyonu için oldukça önemlidir.

2.4.3 Olfaktör epitelde nörojenezin düzenlenmesi

Olfaktör epitelde nörojenez birçok olgun duyu nöronunda olduğu gibi duysal dendritlerin yoğunluğunun sabit yüzey yoğunluğuyla sürdürülmesi için sıkı bir şekilde düzenlenmesine rağmen üretilen olgunlaşmamış birçok nörondan yalnızca bir kısmı hayatta kalır. Nörojenez, olfaktör sinir kesilmesine bağlı olarak apoptotik hücre ölümüne neden olan çinko sülfat ve metimazol gibi toksinlerle bağlı olarak duyu nöronlarının ölümüyle uyarılır [125], [131],[132], [133], [134]. Nöronların kaybı, duysal nöron popülasyonlarının geri kazanılmasıyla bazal hücre mitozunu artırır ve fonksiyonlar geri kazanılır. Nöral prekürsörlerin yüksek olmasına bağlı olarak olfaktör epitelin kalınlığı erişkin sıçanda yaşa bağlı olarak 60-330 gün sabit kalır. Epitelyum kalınlığının artmamasını, proliferasyonun apoptotik hücre ölümüyle dengelenmesi takip eder. Apoptoz olgunlaşmış ve olgunlaşmamış nöronlardan meydana gelen bazal hücrelerden yeni oluşan olfaktör nöronların tüm gelişim basamaklarında meydana gelir. Kök ve progenitör proliferasyonu düzenleyen bazı büyüme faktör sinyalleri belirlenmiştir. Yatay bazal hücre proliferasyonu EGF ve TGF α , küre şekilli bazal hücreler FGF2 tarafından uyarılır. *In vivo*' da uygun FGF reseptör alt tipleri (FGFR1 ve FGFR2) sunulur ve FGF2 immün reaktivitesi küre şekilli bazal hücreler ve destek hücrelerde de bulunur. EGF ve FGF2 nöral kök hücre proliferasyonunun önemli indikatörlerindendir ve erişkin beyninden nörosferlerin oluşması için gerektiği gibi olfaktör mukozadan multipotent nörosferlerin oluşması için de gereklidir. Doku homeostazı bazal hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmasını uyaran LIF salgılayan boyanmış nöronlardan pozitif feed-back olarak sürdürülür. Benzer şekilde inflamasyon veya hücre ölümünde açığa çıkan nitrik oksit diğer büyüme faktörlerinin proliferasyonunu belirgin şekilde uyarır. Bazal hücre proliferasyonunun negatif feed-backi *in vivo* ve *in vitro* gelişen nöronların lokal yoğunluğu ile muhtemelen BMP2/4/7 yoluyla sağlanır. *In vitro*' da duyu nöron farklılaşması TGF β 2, IGF1 ve dopamin ile indüklenir. IGF1 ve dopamin olfaktör epiteldeki mukus lavajında bulunur ve hedef kaynaklı faktör gibi davranarak nöron epitelyum yüzeye ulaşan dendritler olarak nöronların gelişiminde seçici avantaj

sağlar. Dopamin olfaktör bulb içindeki sinaps yapan periglomerular ara nöronlardan ulaşılan duyu aksonları için hedef kaynaklı faktör olarak benzer rol oynayabilir. Olgunlaşmamış olfaktör nöronların hayatta kalması büyük ölçüde PGDF daha az ölçüde BDNF' ye bağlıdır.

2.6 Erişkin hücrelerin kriyoprezervasyonu

Kriyoprezervasyon hücrelerin toplanmasında ve transplatasyonundan önemli rol oynar. Birçok ülkenin kriyobankında 250,000'den fazla insan lökosit antijen tiplendirilmiş kordon kanı bulunmaktadır. KH'ler için optimal dondurma derecesi ve kriyoprezervasyon formülasyonları kliniklerde rutin olarak yapılmaktadır. Standart KH kriyoprezervasyon çözeltisi olan %10 DMSO içeren 90% fetal dana serumunda (FBS) hücrelerin canlılığı korunabilmektedir. İyi bir hücre saklanması ile erişkin kök hücrelerin klinik olarak güvenli olması sağlanabilir [135], [136], [137].

2.7 CM-Dil

CM-Dil güçlü, fotostabil floresan özelliğe ve minimal sitotoksositeye sahip, uzun süreli olarak intrasellüler membranlar, lipozomlar, virüsler ve lipoproteinleri işaretlemeye imkân veren bir Dil türevidir. CM-Dil diğer lipofilik karbosiyaninlerden (Dil, DiO, PKH2 ve PKH26) farklı olarak işaretleme sırasında hücre süspansyonunda osmolarite düzenleyici ajanlara veya boyama sırasında medyumda boyanın çökmemesi için tuzsuzlaştırma gerektirmez. Bunun yanında Dil standart doku fiksasyonları sırasında uzun süre korunmamaktadır. CM-Dil bu sınırlayıcı etkileri giderecek şekilde Dil'in sabit aldehitlerinin yerine peptid ve proteinlere konjuge olarak bağlanan hafif tiyol-reaktif klorometil içeren klorometilbenzamid ve metilbenzamid türevidir [138].

2.8 Neurotube Konduit

Neurotube primer veya sekonder periferel sinir tamiri veya rekonstrüksyonu için tasarlanmış bir emilebilir örölmüş poliglikolik asit meş tñpüdüdür. Tñp sinir aralıklarının tamiri için klasik sinir grefti tekniğinin yerini alır. Tñpün duvarları kuvvet ve esneklik için olukludur. Bu oluklar tñpün normal fizyolojik yumuşak doku basınçları altında kapanmasını önler (Şekil 2. 14). Neurotube hidroliz işlemi yoluyla emilir [139].



Şekil 2.14 Neurotube sinir konduiti. Emilebilir örölmüş poliglikolik asit meş tñpü.

MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman

- ✓ Steril Hücre Kültür Odası
- ✓ Hava akımlı kabinler (Laminar flow -Thermo Scientific Hera Safe, Faster BH-EN 2006)
- ✓ Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150 37°C)
- ✓ İnverted mikroskop (Olympus CKX41)
- ✓ Işık mikroskobu (Olympus)
- ✓ Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF, Hettich ZENTRIFUGEN – EBA20)
- ✓ Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- ✓ Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- ✓ Buz makinesi (Scotsman AF100)
- ✓ Vortex (LMS VTX-3000L)
- ✓ Su banyoları (GFL (Gessellschaft Für Labortechnik) mbH, Kerman)
- ✓ Dondurucular (Beko (+4,-20°C), Arçelik (+4,-20°C), GFL (-40°C))
- ✓ -195°C Azot Tankı ve Azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- ✓ Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)

- ✓ UV-spektrofotometre (Jasco V-530)
- ✓ Saf su ve ultra saf su sistemleri (GFL2104)
- ✓ 10, 50, 100, 1000 µl 'lik mikropipetler (Thermo, Pippetman)
- ✓ 100, 300 µl 'lik çok kanallı pipetler (Thermo)
- ✓ 1-10, 10-100, 100-1000 µl 'lik Tek Kullanımlık Pipet Uçları (AxyGen)
- ✓ Santrifüj tüpleri 15, 50 ml' lik (IsoLAB)
- ✓ Hücre kültür flaskları 25cm², 75cm² (TPP, Corning)
- ✓ Serolojik Pipet Tabancası (Thermo)
- ✓ Serolojik pipetler 1, 2, 5, 10, 25 ml (Blau Brand Germany)
- ✓ 5ml'lik Kriyotüpler (TPP)
- ✓ 50-1000 ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler (ISOLAB, SCHOTT)
- ✓ 2, 5, 10, 50 cc' lik enjektör (Ayset)
- ✓ 0,22 µm ve 0, 45 µm'lik şırınga filtreleri (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- ✓ Lam ve Lamel (Isolab)
- ✓ Lateks eldiven (Broche)
- ✓ Flow Sitometre
- ✓ Etüv (Elektro-mag)
- ✓ 96 kuyulu plakları (TPP)
- ✓ 24 kuyulu plakları (TPP)
- ✓ 6 kuyulu plakları (TPP)

3.1.2 Kimyasallar

Hidroklorik asit, HCl (Merck 100314)

Sodyum Hidroksit, NaOH (Riedel de Haen)

Azot gazı (BOS)

Sodyum klorür, NaCl (Sigma)

Sodyum bi karbonat, NaHCO₃(Merck)

Potasyum hidroksit, KOH (Merck)

Dipotasyum fosfat, K₂HPO₄(Sigma)

Potasyum di hidrojen fosfat, KH₂PO₄(Riedel de Haen8210A)

Sodyum di hidrojen fosfat mono hidrat, NaH₂PO₄H₂O (Merck)

Di sodyum hidrojen fosfat, Na₂HPO₄(Riedel de Haen81890)

Potasyum klorür, KCl (Carlo Erba 360107)

Fetal Bovine serum, FBS (Biochrom AG 1038K)

Dimetilsülfoksit (DMSO)(Sigma D2650)

Mayer's hematoksilen (Lab vision)

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 1.0 g/L D-Glucose(1X)(Invitrogen 11880)

Glutamax™-I (Invitrogen 35050-079)

Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen 15240-062)

Trypan blue (%0,5)(Biological Industry 628255)

Trypsin, 0.05% (1X) with EDTA 4Na, liquid (Invitrogen 25300-054)

DMEM-F12 (Sigma D6421)

CM-Dil (Invitrogen™)

Dispaz II (Gibco 17105-041)

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tamponların, Kimyasalların, Besiyerlerinin, Dondurma, Boyama ve Farklılaşma Solüsyonlarının Hazırlanması

3.1.3.1 Tamponlar ve Kimyasallar

3.1.3.1.1 Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS) Çözeltisi

Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu tamponu hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan, böylece hücrelerin su alıp şişmesini ve büzülerek zarar görmesini engelleyen bir solüsyondur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. Ortamın pH'ını tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar. 1x PBS çözeltisinin hazırlanması için NaCl 4g, KCl 0,2g, Na₂HPO₄ 1,44g ve KH₂PO₄ 0,24g olacak şekilde tartıldı. Distile deiyonize su ile 800ml'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda 40 dakika çözünmeye bırakıldı. Çözelti pH 7,4 olacak şekilde NaOH ve COOH ile hazırlandı. Son hacim 1 litreye deiyonize su ile tamamlandı. Hazırlanan PBS otoklav'da 1atm basınçta 121°C'de 20 dakika steril edildi. Steril PBS tamponu +4°C' da saklandı.

3.1.3.1.2 Tripsin-EDTA Solüsyonu

Tripsin hücre pasajlarında kullanılan serin proteaz tipi temel bir enzimdir. Tripsin, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptid bağlarını yıkarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmasını sağlar. Tez çalışmasında kök hücrelerin pasajında %0,25 EDTA'lı tripsin solüsyonu kullanıldı.

3.1.3.1.3 Dispaz II Solüsyonu

Doğal proteaz olan dispaz, *Bacillus polymyxa* tarafından üretilen, amino-endopeptidaz metalloenzimdir. Çalışmada stok dispaz solüsyonu için 10mg olarak tartılan enzim DPBS ile 10mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Çalışma solüsyonu olan 2,4U dispazın hazırlanması için stok çözeltiden 138ml alınarak DPBS ile 1ml' ye tamamlandı.

3.1.3.2 Besiyerlerinin Hazırlanması

3.1.3.2.1 Düşük Glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM)

Eagle bazal medyumu literatürdeki ilk orijinal formülasyonundan beri birçok modifikasyona uğratarak günümüze kadar geliştirilmiştir. En yaygın olarak kullanılan modifikasyonu ise DMEM bazal medyumudur. DMEM, Bazal Besiyeri Eagle'ın (Basal Medium Eagle) aminoasit ve vitaminlerinin bunların yanında diğer destekleyici bileşiklerin de fazla bulunduğu modifikasyonudur. Orijinal DMEM formülasyonu ilk olarak fare embriyonik hücrelerinin kültüründe gösterilmiştir ve 1000mg/L glukoz içerir. 4500ml/L glukoz eklenmiş olan daha gelişmiş bir modifikasyonunun da belirli hücre tipleri için daha optimum koşulları oluşturduğu gösterilmiştir. Çalışmalarda, ticari olarak satın alınan 500ml lik DMEM'in içine çalışmaya hazır hale gelebilmesi için 2,5ml Anti-anti (Invitrogen) ve 5ml Glutamax (Gibco) eklendi. Hazırlanan stok bazal medyundan 45ml alınarak 50ml'lik bir falkon içerisine konuldu ve üzerine 5ml FBS eklenerek %10 FBS içeren tam besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri kısa bir vorteks işlemi ile homojen hale getirildi ve 4°C de muhafaza edildi. Çalışma öncesinde hücreler üzerinde negatif bir etki oluşturmaması için hazırlanan tam besiyeri 37°C de ısıtılarak kullanıldı.

Fetal Sığır Serumı (FBS)

Fetal Sığır Serumı, içeriğindeki yüksek düzeydeki büyümeyi hızlandırıcı ve düşük düzeydeki büyümeyi yavaşlatıcı faktörler nedeniyle, hücre kültüründe en sık kullanılan bileşenlerden biridir. Çalışmamızda ısı ile inaktive edilen hazır FBS, 0,22'lik filtrelerden geçirilerek alikotlandı ve son konsantrasyonu %10 olacak şekilde, DMEM ile hazırlanan tam besiyerinde kullanıldı.

Dondurma Solüsyonu (Kriyoprotektan)

Çalışmamızda olfaktör kök hücrelerin kriyoprezervasyonunda %80 Dimetil Sülfoksit (DMSO) ve %20 FBS ile hazırlanan ve dondurma sırasında eşit hacimde süspanse hücre ile karıştırılıp son konsantrasyonu %10 DMSO olacak şekilde literatürde de yaygın olarak kullanılan dondurma solüsyonu hazırlandı.

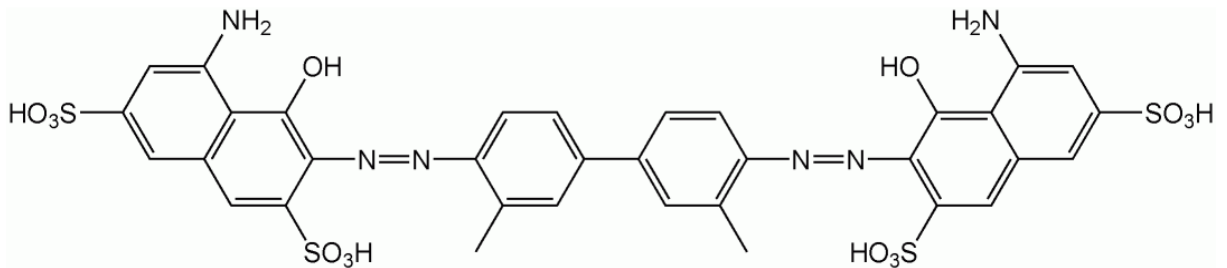
3.1.3.2.1.1 Kültürün ve Kullanılan Besiyerlerinin pH ve Sterillik Kontrolü

Her bir pasaj esnasında kültür ve besiyerleri, kontaminasyon ve pH açısından incelendi. Sterilliği tayin edilecek besiyeri ve kültür ortamından alınmış örnekler kanlı agara, sabouraud agara ve %10 FBS içeren sıvı besiyerlerine inoküle edildi. Örnekler 37°C’de 72 saat inkübe edilerek kontrolleri yapıldı. Ayrıca hücre kültürlerinden besiyeri örnekleri alınarak yayma preparat hazırlandı ve Giemsa boyama ile incelendi.

3.1.3.3 Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması

Tripan Mavisi (TB) Solüsyonu

Tripan Mavisi molekül yapısı $C_{34}H_{23}N_6O_{14}S_4Na_4$ olan (şekil 3. 1), canlı hücrelerde fagositoz olayını incelemek için kullanılan vital bir boyadır. Canlı hücreler boyanmazken, l hücreler hücre zarından boyayı geçirerek mavi renkte görülür. Çalışmalarda hazır TB solüsyonu %50 süspanse hücre içeren besiyeri ile karıştırılarak kullanıldı.



şekil 3.1 Tripan mavisi molekül yapısı.

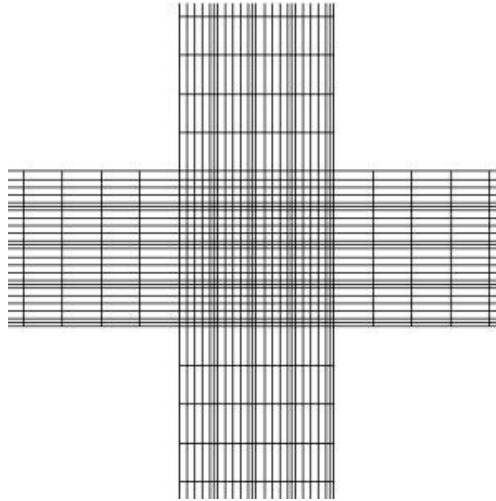
Tripan Mavisi (TB) ile Canlı Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımının kolay yapılması için 100 kat seyretme tercih edildi. Besiyeri ile yıkanarak santrifüj edilen, süpernatantı uzaklaştırılan ve ardından resüspanse edilen hücre süspansiyonundan 2µl otomatik pipet ile çekilerek 1,5ml’lik steril eppendorf tüpü içine aktarıldı. zerine 98µl tripan mavisi solüsyonu ve 100µl besiyeri eklenerek iyice pipetaj yapıldı. Thoma lamının her iki bölümüne de lam ile lamel arasına 10 ar µl

hücre süspansiyonundan dikkatlice yayıldı. Ters mikroskop altında tripan mavisi ile maviye boyanmamış olan hücreler sayıldı.

Thoma lamı

Hücre kültüründe hücrelerin sayılması için kullanılan Thoma lamı üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan özel mikroskop bir lamıdır. Her büyük karenin alanı 1mm^2 'dir (Şekil 3. 2).



Şekil 3.2 Thoma lamı üzerindeki yivler

Lam üzerine konulan sıvının derinliği $0,1\text{mm}$ 'dir. Sonuçta her büyük kare üzerindeki sıvı hacmi 10^{-4}ml 'dir. Thoma lamı üzerindeki karelerin içine düşen hücrelerin sayısı, seyreltme faktörü ve Thoma lamı sabiti olan 10.000 ile çarpılarak 1ml 'deki hücre sayısı bulunur. Daha sonra aşağıdaki formül ile istenilen dilüsyon yapıldı.

$$\text{Dilüsyon Miktarı} = \frac{\text{Başlangıçtaki Dilüsyon} \times \text{Ortalama Sayılan Hücre} \times 10.000}{\text{İçin Katılan Miktar} \times \text{Sayısı} \times \text{(Sabit)}}$$

ml' de İstenilen Hücre Sayısı

CM-Dil Stok Solüsyonunun Hazırlanması

CM-Dil stok solüsyonunun hazırlanmasında dimethyl sulfoksit (DMSO) kullanıldı. Steril 15ml falkon tüpü içerisinde 1mg CM-Dil, steril DMSO ile laminar flow kabinde 1–2 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Karanlık ortamda hazırlanan stok solüsyon pipetaj ile

homojenize edildikten sonra alikotlandı ve ışık görmeyecek şekilde ambalajlanıp -20°C' da kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

CM-Dil Çalışma Solüsyonu

CM-Dil ve benzeri diğer karbosiyaninlerin moleküler ağırlıkları 1'e yakın olduğundan $1\mu\text{M} \approx 1\mu\text{g/mL}$ olarak kabul edilir. Boyama solüsyonunun hazırlanması için CM-Dil, laminar flow kabinde ve karanlık ortamda, steril PBS içinde 1ml'de 5 μL olacak şekilde hazırlandı (Sülfonatlanmış karbosiyaninler 20 μM 'nin üzerindeki konsantrasyonlarda çözünürdüler ancak görüntülenmeleri zaman alır. Belirgin bir görüntü için 4 saat beklenmesi gerekmektedir). Hazırlanan solüsyon alüminyum folyo ile ışık görmeyecek şekilde sarılarak -20°C' da muhafaza edildi.

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

DAPI, floresan mikroskopi ve akım sitometride DNA'yı işaretlemek için kullanılan floresan bir boyadır. Stok solüsyonun hazırlanması için, 5mg tartılan DAPI flakon içine aktarılır. Üzerine 250 μL bidistile su eklenip vorteksenerek stok solüsyon hazırlanır. Stok solüsyon 1 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde metanol ile seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanır.

Histolojik Boyamalar

Çalışmamızda, histolojik incelemeler için kurban edilen ratlardan çıkarılan fasiyal sinir dokuları, 0,5ml PBS içeren steril 2ml'lik eppendorf tüpleri içinde İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'na götürüldü. Biyopsi örnekleri burada, 10% formalin içerisinde fikse edildi, parafim bloklara gömüldü ve mikrotom ile kesitler hazırlandı. Hazırlanan preparatlar hematoksilin, eosin (Merck, Darmstadt, Germany) ve rejenerasyonu değerlendirmek için toluidin blue (Merck, Darmstadt, Germany) ve S100 ile boyandı. Boyama işleminin ardından preparatlar Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'na getirilerek ters faz kontrast mikroskobu altında UV ışıktaki incelendi.

3.2 Metot

3.2. 1 Hücre Kültür Çalışmaları

3.2.1.1 Donörün Çalışma Hakkında Bilgilendirilmesi ve Onamlarının Alınması

Çalışma öncesi İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi Etik Kurul'una yapılan başvurumuz değerlendirilerek çalışma için onay verildi (Ek 1). Septoplasti ameliyatı öncesi donörler çalışma hakkında bilgilendirildi, onayları alınan gönüllüler Etik Kurul Onam Formu'nu doldurup imzaladı. Ameliyatı yapacak olan doktorlar da konu hakkında bilgilendirildi ve işlemin herhangi bir risk taşımadığı onayı alındı. Onay alma işlemine hastane personelinden bir kişi de şahitlik etti.

3.2.1.2 Olfaktör Bölgeden Biyopsi Alınması

Çalışmada 22, 36 ve 41 yaşlarında 3 erkek donördün biyopsi örnekleri kullanıldı. Onamı alınan septoplasti hastalarından, genel anestezi altında iken Uzman Doktor Ayşegül BATIOĞLU KARAALTIN tarafından 0° teleskop (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) ile endoskopik görüş altında olfaktör bölgeden yaklaşık 0,3cm çapında biyopsi alındı. Örnekler, içinde PBS bulunan 1.5ml'lik eppendorf tüpleri içine steril şekilde aktarıldı ve soğuk taşıma ortamında Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'na getirildi.

3.2.1.3 Olfaktör Dokudan Kök Hücrelerin İzolasyonu

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'na getirilen doku örneği ince uçlu pens ile alınarak steril petri kabı içinde PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkanan olfaktör mukoza dokusu steril pens yardımıyla içinde 1ml 2,4Ul dispaz enzimi bulunan petri kabı içine aktarıldı. Dokunun enzim ile muamelesi için 37°C' da 30 dakika inkübe edildi. Enzim ile inkübe edilen olfaktör dokusu steril pens ile içinde anti-anti içeren PBS bulunan petri kabı içine aktarıldı. Olfaktör dokudan kök hücrelerin mekanik olarak ayrılabilmesi için insülin enjektörleri kullanıldı. Uçları 90° eğilen enjektörlerin bir tanesi dokuyu sabit tutmak diğer ise olfaktör kök hücrelerin

bulunduğu lamina propria tabakasının fiziksel olarak ayrılması için kazıma işleminde kullanıldı. Mekanik ayrılmanın ardından olfaktör epitelden ayrılan lamina propria dokusu yaklaşık 1mm²'lik parçalar halinde kesilerek 6 kuyulu kültür plaklarına yerleştirildi. Parçaların üzerine 12mm çapında lameller kapatılıp %10 fetal dana serumu içeren DMEM besiyerinde %5CO₂ ve %95 nem içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. 2 hafta sonunda doku üzerine kapatılan lameller steril pens yardımıyla ters çevrilerek yeni bir kuyuya aktarıldı, hücrelerin bulunduğu bütün kuyuların üzerine %FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek %5CO₂ ve %95 nem içeren 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.2.1.4 Olfaktör Kök Hücrelerin Devamlı Kültürünün Yapılması

Hücrelerin bulunduğu besiyeri 2 günde bir tazelandı. Hücrelerin yüzey kaplamaları günlük olarak invert faz kontrast mikroskobu ile yapıldı. Yüzey kaplaması %80'e ulaştığında hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı. 3ml PBS ile hücreler ve içinde bulundukları kültür kabı yıkandı. Daha sonra serolojik pipet yardımıyla PBS uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 3ml Tripsin-EDTA eklenerek 3 dakika CO₂ içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin ayrılması invert faz kontrast mikroskobunda incelendi. Kültür kabına hafifçe vurularak hücrelerin zeminden tamamen ayrılmaları sağlandı. Kültür kabının yüzeyinden ayrılan hücreler 5ml serolojik pipet yardımıyla çekilerek 15ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 0,1ml serum eklenerek pipetaj yapıldı. Bu aşamada serum kullanılması ile Tripsin-EDTA enzim aktivasyonu durduruldu. Daha sonra hücrelerin içinde bulundukları falkon tüpleri 400xg' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet el ile vurularak resüspanse edildi ve üzerine 5ml PBS eklendi. Pipetaj yapılarak yeniden 400xg' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet el ile vurularak resüspanse edildi. Hücrelerin TB ile Thoma lamında sayımı yapıldıktan sonra hücrelerin üzerine %10 FBS içeren DMEM eklendi ve 6X10³ hücre/cm² olacak şekilde 25cm²'lik flasklara aktarıldı.

3.2.1.5 Olfaktör Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında, olfaktör dokudan izole edilen hücrelerin kök hücre özelliklerinin belirlenmesi için morfolojik inceleme, flow sitometri ile immünofenotipleme ve adipojenik, nörojenik ve kondrojenik farklılaşma protokolleri uygulandı.

3.2.1.5.1 İmmün Boyama ve Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) Analizi

Olfaktör bölgeden izole edilerek kültürü yapılan hücrelerin 3. pasajında hücreler Tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden ayrıldı ve PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama sonunda resüspanse edilen hücre pelletinden sayım yapılarak 8×10^6 hücre olacak şekilde hücreler eppendorf tüplerine aktarıldı. Hücrelerin üzerine belirlenen yüzey işaretleyicilerine özel fluorasan izosiyonat (FITC) ve fikoeritrin (PE)- konjuge monoklonal antikolar (CD14-PE, CD117-PE, CD11b-PE, CD13-PE, CD44-PE, anti-human CD90, anti-human CD116-PE, Mouse IgG1-PE, CD146-PE, CD73-PE, HLA-ABC-PE, CD29-PE, Mouse IgG1 K- PE, CD105-PE, Mouse IgG1- FITC, anti-HLA-DR-FITC) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek oda ısısında karanlıkta 45 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerine %0,1 sodyum azid içeren PBS yıkama solüsyonu eklenerek 5 dakika 1780 rpm'de hücreler santrifüj edildi. Daha sonra hücrelerin üzerine 400µl hücre yıkama solüsyonu eklendi ve hücreler pipetaj yapılarak resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, USA) akış sitometri cihazında okutularak ve analizi BD Cell Quest TM software programı ile gerçekleştirildi.

3.2.1.5.2 Olfaktör Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaştırılması

İzolasyonun ardından ikinci pasajı yapılan olfaktör kök hücreler 10^4 hücre olacak şekilde center well içine aktarıldı. Hücreler, kültüre adaptasyon için 24 saat %10 FBS içeren DMEM besiyerinde inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin bulunduğu besiyeri uzaklaştırıldı. Center well içindeki hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Daha sonra olfaktör kök hücreler üzerine 2ml STEMPRO® Adipogenesis Differentiation medyumu eklendi. Hücreler 7 gün boyunca gün aşırı STEMPRO® Adipogenesis Differentiation medyumu eklenerek kültüre edildi. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler her gün invert faz kontrast mikroskop ile gözlemlendi.

3.2.1.5.3 Olfaktör Mezenkimal Kök Hücrelerin Nörojenik Farklılaştırılması

İzolasyonun ardından ikinci pasajı yapılan olfaktör kök hücreler 10^4 hücre olacak şekilde önceden fibronektin ile kaplanan center well içine aktarıldı. Hücreler, kültüre adaptasyon için 24 saat %10 FBS içeren DMEM besiyerinde inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin bulunduğu besiyeri uzaklaştırıldı. Center well içindeki hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Hücrelerin üzerine 2ml Mesenchymal Stem Cell Neurogenic Differentiation medyumunu eklendi. Hücrelerin nörojenik farklılaşma medyumunu 7 gün boyunca gün aşırı değiştirildi. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler her gün invert faz kontrast mikroskop ile gözlemlendi.

3.2.1.5.4 Olfaktör Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaştırılması

İzolasyonun ardından ikinci pasajı yapılan olfaktör kök hücreler 10^4 hücre olacak şekilde center well içine aktarıldı. Hücreler, kültüre adaptasyon için 24 saat %10 FBS içeren DMEM besiyerinde inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin bulunduğu besiyeri uzaklaştırıldı. Center well içindeki hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Hücrelerin üzerine 2ml StemPro® Chondrogenesis Differentiation medium eklendi ve medyum 26 gün boyunca gün aşırı tazelendi. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler her gün invert faz kontrast mikroskop ile gözlemlendi.

3.2.1.5.4.1 Kondrojenik Farklılaştırılma Medyumunu ile İndüklenen Olfaktör Mezenkimal Kök Hücrelerin Alcian Blue ile Boyanması

Kondrojenik farklılaşmanın 26. gününde hücrelerin kondrojenik farklılaşmasının gösterilmesi için Alcian Blue kiti kullanıldı. Bunun için öncelikle besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 2ml saf alkol pastör pipeti yardımıyla damlatıldı. 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra pastör pipeti yardımıyla 2ml dH_2O ile alkolün yıkanması sağlandı. Daha sonra üzerine 2ml %3'lük asetik asit (Sciencell, 8378c) damlatıldı ve 3 dakika bekletildi. Asetik asit uzaklaştırılarak 2ml %1 Alcian Blue (pH: 2,5) ile 30-60 dakika boyunca hücrelerin boyanması sağlandı. Boya uzaklaştırılarak 2 dakika 2ml dH_2O ile yıkandı, üzerine %0,1'lik Nuclear Fast Red 10-20 dakika uygulandı ve boya uzaklaştırılarak dH_2O ile yıkandı. Hücreler invert faz kontrast mikroskopla incelendi.

3.2.2 CM-Dil ile Olfaktör Kök Hücrelerin İşaretlenmesi

Yüzey kaplaması %90'a ulaşan olfaktör kök hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. 5ml PBS içinde hazırlanan CM-Dil hücrelerin üzerine eklendi. Hücreler 37°C' da 4 dakika, ardından 4°C'da 15 dakika inkübe edildi. Düşük sıcaklıktaki inkübasyon boyanın plazma membranında görünür olmasını sağlarken endositozisi yavaşlatır. Böylece boyanın sitoplazmik veziküllere yerleşmesini engeller. Boyama işlemi tamamlandığında flastaki boya uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı ve hücrelerin besiyeri tazelenerek boya görünür hale gelinceye dek 37°C' da inkübasyona bırakıldı.

3.2.3 Çok Tabakalı Hücre Kitesinin Hazırlanması

Çok tabakalı hücre kitesinin hazırlanması için, 25cm²'lik flask içinde kültürü yapılan olfaktör kök hücreler yüzey kaplaması %90' a ulaştığında Tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Pelletin hazırlanması için tripsinize edilip yıkama yapılan hücreler %90 yüzey kaplaması yapmış olan diğer bir 25cm²'lik flask içine eklendi. Bu işlem 8 kez olmak üzere gün aşırı tekrarlandı. 14. gün flaskın kenarına hafifçe vurularak hücrelerin flask yüzeyinden kalkmaları sağlandı. Elde edilen çok tabakalı hücre pelleti, içinde steril ve anti-anti içeren PBS bulunan steril bir petri kabı içine transfer edildi. Steril pensler yardımıyla 1mm³'lük parçalara ayrılan çok tabakalı hücre pelleti, *in vivo* deneylerde kullanılmak üzere 500µL PBS içeren eppendorf tüplerine aktarıldı. Çok tabakalı hücre pelletinden ayrılan parçalardan bir kısmı, hücrelerin invazyon yeteneklerinin korunup korunmadığının belirlenmesi için 6 kuyulu petri kabına transfer edildi. Üzerine 12mm²'lik lamel kapatıldıktan sonra %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 37C''da %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin adezyonu 2 hafta boyunca gözlendi.

3.2.4 *in vivo* Deney Hayvanı Çalışmaları

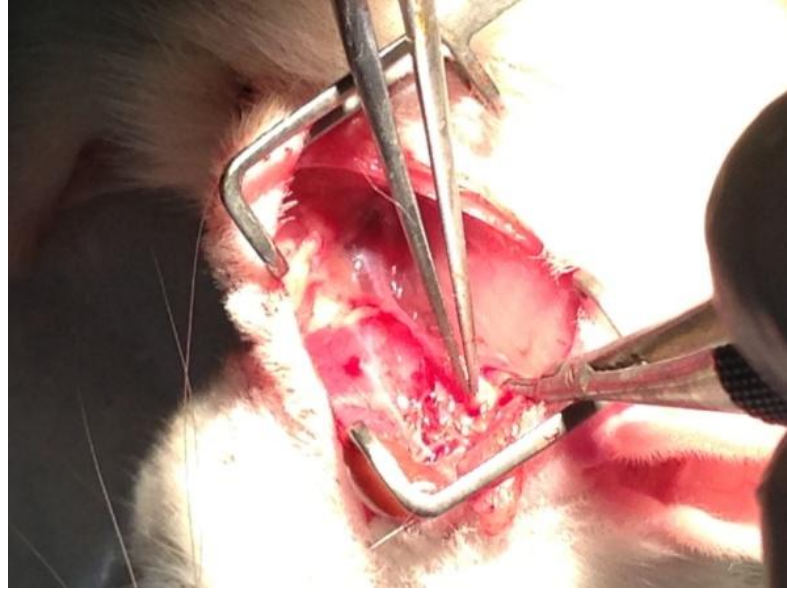
3.2.4.1 Ön çalışmalar

3.2.4.1.1 Ratlarda Anestezi ve fasiyal paraliz oluşturulması

Ön çalışmalar için 7 rata 5mg/kg intramusküler ksilazine HCl (Rompun %2 Bayer) ile premedikasyon yapıldıktan sonra 35mg/kg intramusküler ketamine HCl (Alfamine %10 Ege Vet) ile genel anestezi sağlandı. Tüm hayvanlarda sağ kulak altındaki bölge tıraş edildi ve yaklaşık 1cm' lik insizyonla girilerek fasiyal sinir stilomastoid foremene en yakın bölgede Uzm. Dr. Ayşegül Karaaltın tarafından bulunup (Şekil 3. 3) kesi yapıldı (Şekil 3. 4) ve 0,2mm'lik segment çıkartıldı. Fasiyal sinir kesisi sonrası, sinir uçları Zeiss mikroskop (Carl Zeiss Inc, Thornwood, NY), altında 11.0 mikrosuture (Ethicon Inc, Somerville, NJ) edildi.



Şekil 3.3 Rat fasiyal sinirin bulunması



Şekil 3.4 Rat fasiyal sinirinde tam kat kesi ile paraliz oluşturulması.

Yüz siniri, oldukça ince bir sinir olduğundan, hücre transplantasyonunda hasar bölgesine hücre lokasyonunun sağlanması önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda, kültürü yapıp CM-Dil ile işaretlenen hücreler 4 farklı şekilde hazırlandı (Çizelge 3. 1). Hazırlanan hücreler 0,2ml' lik eppendorf tüpler içinde, soğuk taşıma ortamında Bezm-i Alem Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarına getirildi ve hasar bölgesine transplantasyon yapıldı.

Çizelge 3.1

Yöntem Adı	Yöntem Açıklaması	Rat No
Yöntem 1	Hasar bölgesine 10µl PBS içinde CM-Dil ile işaretlenen 500.000 olfaktör kök hücre inoküle edildi	1
Yöntem 2	Hasar bölgesine 10µl PBS içinde CM-Dil ile işaretlenen 500.000 olfaktör kök hücre inoküle edildi ve inokülasyon bölgesi rattan alınan yaklaşık 1mm ³ yağ dokusu ile (fasya) ile sarıldı	2
Yöntem 3	Hasar bölgesine 10µl PBS içinde CM-Dil ile işaretlenen 500.000 olfaktör kök hücre inoküle edildi ve inokülasyon bölgesine fibrin glue+olfaktör kök hücre uygulaması yapıldı	3, 4
Yöntem 4	Hasar bölgesine CM-Dil ile işaretlenen çok tabakalı hücre kitlesi inoküle edildi.	5, 6
Kontrol	Hasar bölgesine 10µl PBS aktarıldı	7

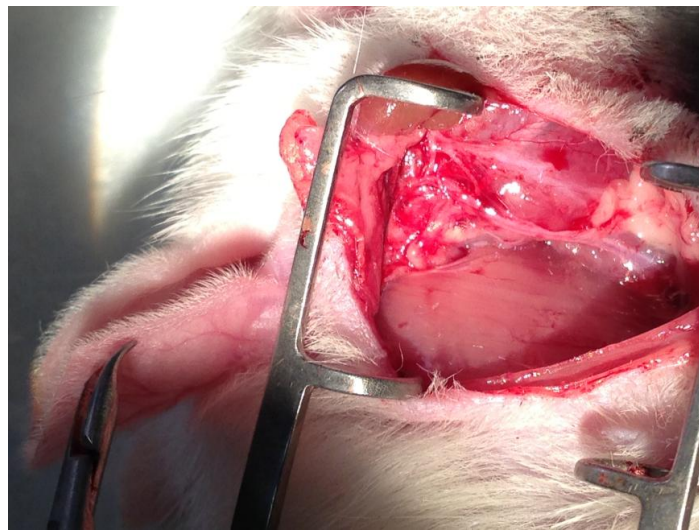
3.2.4.2 *in vivo* Ön Çalışmaların Değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında *in vivo* ön çalışmaların değerlendirilmesinde ratların fizyolojik değerlendirmesi, tam kat kesi öncesi ve sonrası Wiskers skorlama olarak preoperatif ve postoperatif olarak skorlama yapıldı. Elde edilen sonuçlar Mann-Whitney U istatistik yöntemi ile değerlendirildi.

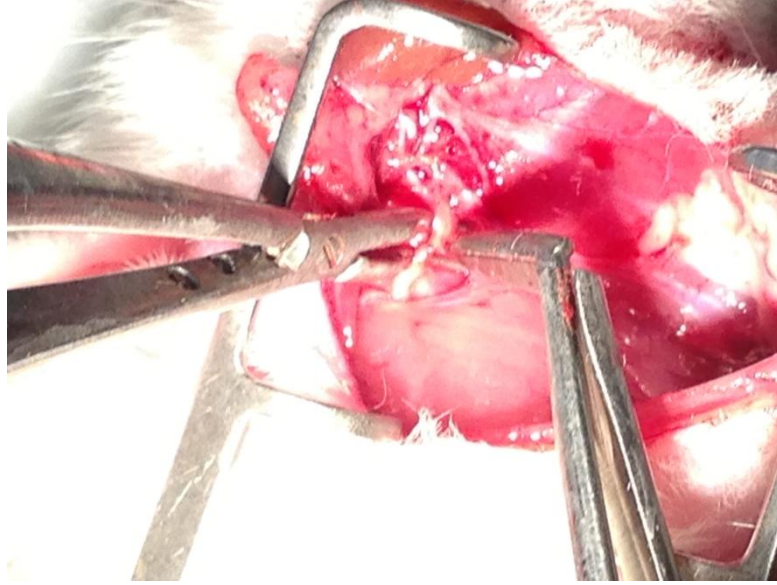
3.2.5 Esas Çalışmalar

3.2.5.1 Ratlara Anestezi Verilmesi ve fasiyal paraliz oluşturulması

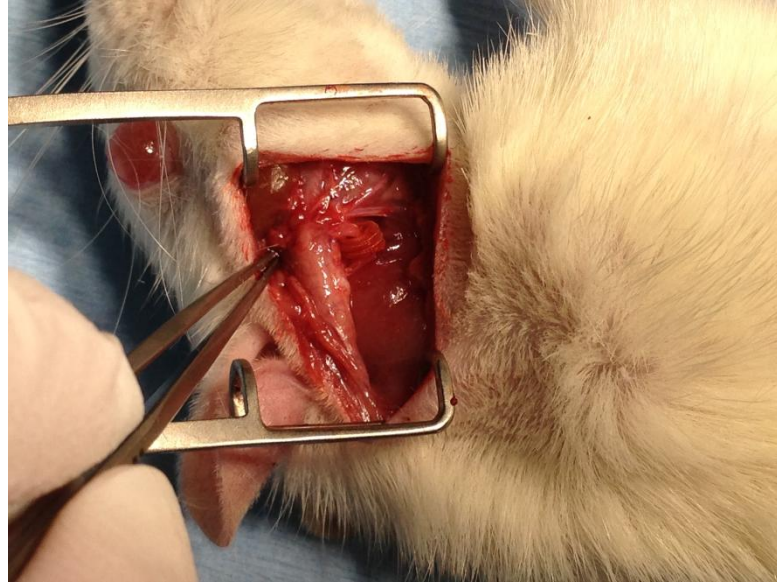
Çalışma kapsamında 3 gruba ayrılan 27 adet rata 5mg/kg intramusküler ksilazine HCl (Rompun %2 Bayer) ile premedikasyon yapıldıktan sonra 35mg/kg intramusküler ketamine HCl (Alfamine %10 Ege Vet) ile genel anestezi sağlandı. Deneyin birinci gününde tüm gruptaki hayvanlarda sağ kulak altındaki bölge tıraş edildi ve yaklaşık 1cm' lik insizyonla girilerek fasiyal sinir stilomastoid foramene en yakın bölge Uzm. Dr. Ayşegül BATIOĞLU KARAALTIN, Doç. Dr. Mehmet Veli KARAALTIN, Uzm. Dr. Belit Merve ŞENER ve Asistan Dr. Artunç Kaan TURANOĞLU tarafından bulunup (Şekil 3. 5) kesi yapıldı (Şekil 3. 6) ve 0,2mm'lik segment eksize edildi. Fasial sinir kesisi sonrası, sinir uçları Zeiss mikroskop (Carl Zeiss Inc, Thornwood, NY), altında 11.0 sütür ile nörotube konduite mikrosuture (Ethicon Inc, Somerville, NJ) edildi (Şekil 3. 7). M, T ve K olarak 3 gruba ayrılan ratlara yapılan uygulama çizelge 3. 2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5 Fasiyal sinirin bulunması



Şekil 3.6 Fasiyal sinirin kesilmesi



Şekil 3.7 Kesilen sinir uçlarının konduite anastomozu

Çizelge 3.2 Deney Grupları

M grubu	Ratların sol fasiyal siniri kesildikten sonra açık kalan konduit içine CM-Dil ile işaretlenen çok tabakalı olfaktör kök hücre kitlesi 100µL pipet yardımıyla aktarıldı
T grubu	Ratların sol fasiyal siniri kesildikten sonra sinir uçları konduite anastomoz yapıldı ve konduitin içine 100µL pipet yardımıyla PBS eklendi
K grubu	Ratların sol fasiyal siniri kesildikten sonra sinir uçları konduite anastomoz yapıldı.

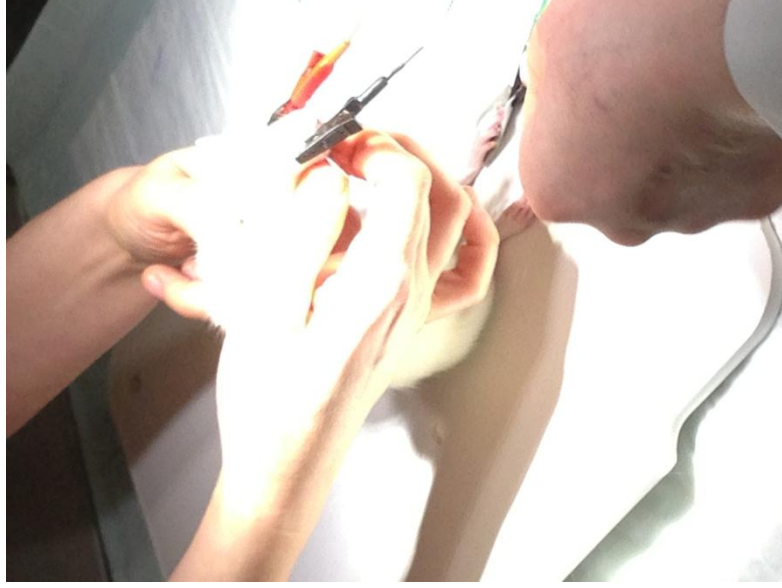
Postoperatif dönemde işlem yapılan bölgede akıntı, kızarıklık ya da şişme takip edildi. Deney öncesi fasiyal paralizin ölçümü, deney sonrası ise iyileşmenin belirlenmesi için tam kat kesi öncesi ve sonrası bıyık hareketleri, Wiskers skora olarak ölçüldü.

3.2.5.2 Whiskers Skorlama

Bıyık hareketleri 5 point-skala göre değerlendirildi. 0:hiç hareket yok; 1: Güçlkle farkedilebilir hareket; 2: Az anlamlı hareket; 3: Anlamlı fakat simetrik olmayan hareket; 4:Simetrik hareket.

3.2.5.3 Elektromiyografi

Elektrofizyolojik incelemeler Uzman Doktor Turgut Adatepe tarafından Neuro-MEP 2 kanallı dijital EMG ve EP cihazı (Neurosoft, Russia) ile yapıldı. Toprak elektrot olarak kullanılan subdermal tekli iğne elektrot (Subdermal Single Needle Electrodes,13 mm ve 0.4mm 27G TE/S50716-002, Technomed, USA) sağ arka ayağa yerleştirildi (Şekil 3. 8).



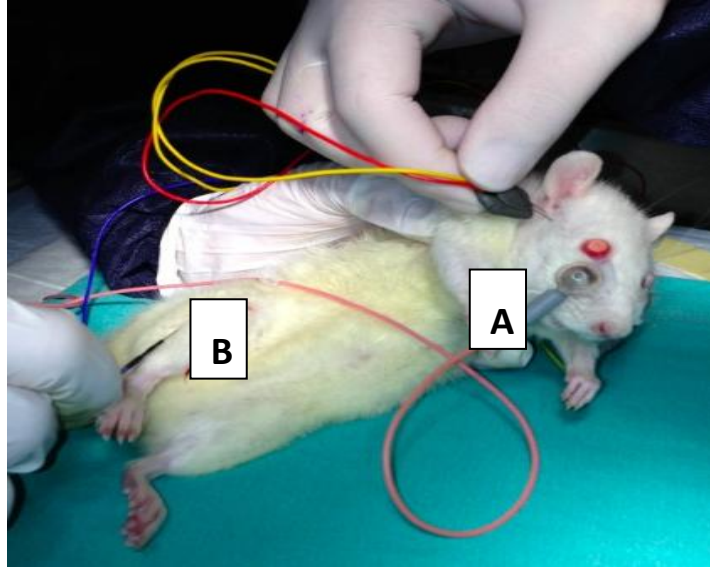
Şekil 3.8 Ratlara EMG elektrotlarının bağlanması

Ratlarda sağ tarafa yapılan fasiyal sinir kesisi ve tamiri sonrası dudak kasları üzerine kayıt elektrot olarak yapışkan yüzey elektrotları (Plaquette Adhesive Surface Electrodes, TE/K50431-002, Techmomed, USA) yerleştirildi (Şekil 3. 9).



Şekil 3.9 Dudak kasları üzerine kayıt elektrot olarak yapışkan yüzey elektrotlarının yerleştirilmesi

Fasiyal sinir ana trunkusu sağda (fasiyal sinir kesisi yapılan taraf) ve solda (kontrol) stilomastiod foramenden çıktığı yerde yapılan kesinin hemen proksimalinden (fasiyal sinir ana trunkusuna tam kesinin hemen proksimaline dış kulak yolunun 2-3mm altına) maksimum ulaşılan şiddetin %10 üzerinde bir şiddette (supramaksimal) elektriksel olarak uyarıldı (şekil 3. 10).



şekil 3.10 Toprak elektrot olarak kullanılan subdermal tekli iğne elektrot (A). Dudak kasları üzerine kayıt elektrot olarak yapışkan yüzey elektrotları (B).

Elde edilen bileşik kas aksiyon potansiyelleri ölçölerek milisaniye cinsinden latans, milivolt cinsinden amplitüd, milisaniye cinsinden süre ve milisaniye X milivolt cinsinden alan değerleri kaydedildi. ENoG incelemesi, fasiyal sinir kesisi yapılmadan önce, kesi yapıldıktan sonra rekonstrüksiyondan önce ve rekonstrüksiyondan sonra 2., 4., 6., 8. ve 10. haftalarda tekrarlandı. Elektrofizyolojik incelemeler tek kör olarak çalışıldı. Amplitüd değerleri hasarda akson kaybını, rejenerasyonda da aksonal rejenerasyonu gösterdiği için sinir iyileşmesi tüm gruplarda kesi sonrası 0'a düşen amplitüd değerlerinin yükselişi ile takip edildi.

3.2.5.4 Histopatolojik İnceleme

10. hafta sonunda histopatolojik çalışma için ratlar 100mg/kg intramuskular Ketamine HCl ile sakrifiye edildi. Fasiyal sinir dokuları, 0,5ml PBS içeren steril 2ml'lik eppendorf tüpleri içinde İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'na götürüldü. Biyopsi örnekleri burada, 10% formalin içerisinde fikse edildi parafim bloklara gömüldü ve mikrotom ile kesitler hazırlandı. Hazırlanan preparatlar hematoksilin, eosin (Merck, Darmstadt, Germany) ve rejenerasyonu değerlendirmek için toluidin blue (Merck, Darmstadt, Germany) ve troponin C gibi kalsiyum bağlı protein ailesinin üyesi olup Schwann hücrelerinin boyanmasını sağlayan S100 boyası ile boyandı. Boyama işleminin ardından preparatlar Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'na getirilerek ters faz kontrast mikroskobu altında UV ışıktaki incelendi.

3.2.5.4.1 Hücrelerin 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile işaretlenmesi

Hazırlanan preparatların DAPI boyama işlemi Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Boyama işlemi öncesi distile su ile 5mg/ml stok DAPI solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon 300nM olacak şekilde PBS ile seyreltilerek çalışma solüsyonu olarak hazırlandı. Hazırlanan çalışma solüsyonu preparatların üzerine uygulandı ve 3 dakika inkübe edilir. Örnek birkaç kez PBS ile yıkanır.

3.2.6 İstatistik

Ratların bıyık hareketlerine bağlı Whiskers skorumu sonucu elde edilen veriler Mann Whitney U istatistiği kullanılarak hesaplandı. Elektrofizyolojik test sonuçları ise ANOVA ve student t-test kullanılarak değerlendirildi. Tüm veriler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 16.0 for Windows) ile değerlendirilmiş ve $p < 0.05$ istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın amacına uygun olarak deneysel çalışmalar *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar olarak 2 temel başlık altında toplandı. *in vitro* çalışmalarda; farklı donörlerin olfaktör mukozalarından kök hücrelerin izolasyonu, kültüre adaptasyonu, devamlı kültürünün yapılması, kriyoprezervasyonu ve kriyobankının oluşturulması sağlandı. İkinci aşamada olfaktör kök hücrelerin, fasiyal paraliz oluşturulan ratlarda periferik sinir rejenerasyonuna etkisinin belirlenmesi için 7 adet rat ile ön çalışmalar yapıp ardından ön çalışma sonuçlarına göre belirlenen stratejiler kullanılarak 27 rat ile deneysel çalışmalar tamamlandı. Elde edilen tüm sonuçlar, morfolojik, immün fenotipik, histolojik ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.1 *in vitro* Deneysel Çalışmalar

4.1.1 Farklı Donörlerden Olfaktör Biyopsilerin Elde Edilmesi

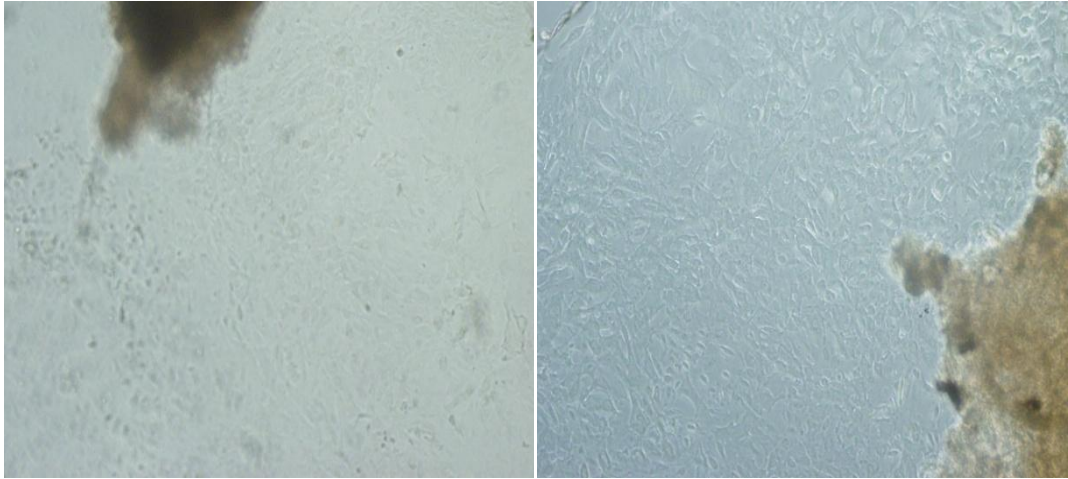
İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan alınan izinle olfaktör bölgeden 0,3mm çapında biyopsi alınmak üzere tüm gönüllülere işlem hakkında bilgi verildi ve yazılı onamları alındı. Çalışmada septoplasti operasyonu yapılan 20, 36 ve 41 yaşlarındaki 3 erkek bireyden 0° teleskop (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) ile endoskopik görüş altında olfaktör bölgeden biyopsiler Uzm Dr. Ayşegül BATIOĞLU KARAALTIN TARAFINDAN alındı. İzole edilip kültürü yapılan olfaktör mezenkimal kök hücrelerin morfolojik özellikleri ve çoğalma kapasiteleri, ilerleyen pasajlarda morfolojik incelemeler ve hücre sayımı ile karşılaştırıldığında donörler arasında yaşa bağlı belirgin bir fark gözlenmedi. Bu nedenle tez çalışmasının ilerleyen aşamalarında 36 yaşındaki

bireyden elde edilen OKH'ler kullanıldı.

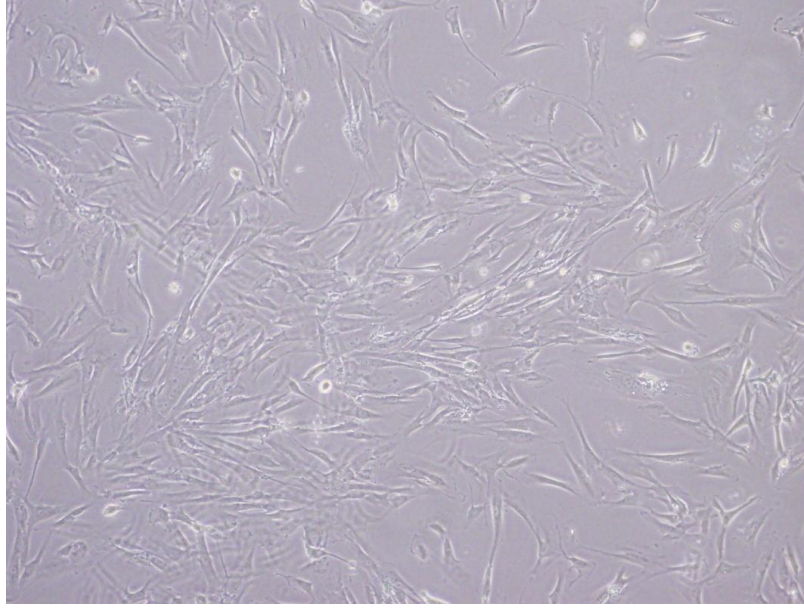
4.1.2 Olfaktör Biyopsisinden Olfaktör Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürünün Yapılması

Olfaktör bölge kaynaklı kök hücrelerin izolasyonunda olfaktör epitel bölge ile kök hücrelerin bulunduğu lamina propria tabakasının ayrılması için kazıma yöntemi kullanılmakla, izolasyon için steril kabin şartlarından uzaklaşmaya ve mikroskoba gerek kalmadan dokuların birbirlerinden ayrılması sağlandı. Lamina propriadan hücrelerin ayrılması ve devamlı kültürünün yapılması için eş büyüklükte 6 parçaya ayrılan ve düşük glikozlu DMEM besiyerlerinde kültürü yapılan olfaktör hücrelerin ilerleyen pasajlarda yapılan morfolojik incelemelerinde hücrelerin mezenkimal kök hücre morfolojisine sahip hücreler oldukları gözlemlendi.

%10 FBS içeren DMEM besiyerinde primer kültürü yapılan olfaktör dokudan hücrelerin adezyonu 8. günde görüldü (Şekil 4.1). Yüzey kaplaması %80' e ulaştığında hücreler 25cm²'lik flaslara pasajlandı. Hücrelerin alt kültürleri devam ettirildi (Şekil 4.2)



Şekil 4.1 Olfaktör doku biyopsisinden izole edilen kök hücrelerin kültürü. Hücrelerin dokudan adezyonu, 8. Gün (10X)



Şekil 4.2 Olfaktör dokudan elde edilen hücrelerin alt kültürü. 1. pasaj,14. Gün (20 X)

4.1.3 Olfaktör Bölgeden Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Çalışmada olfaktör bölgeden izole edilen hücrelerin kök hücre özelliklerinin belirlenmesi için farklılaşma ve immünofenotipleme yöntemleri kullanıldı.

4.1.3.1 Olfaktör Bölgeden Elde Edilen Hücrelerin Adipojenik Kondrojenik Nörojenik Farklılaşması

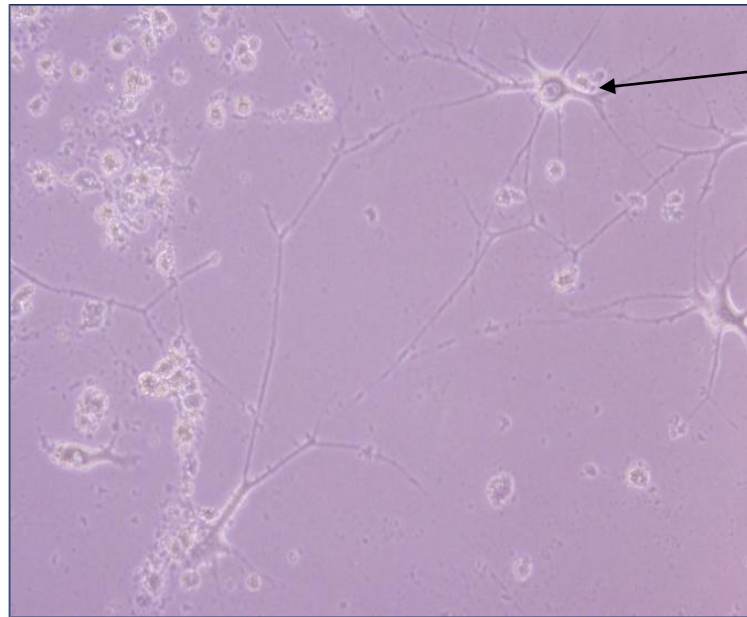
Olfaktör biyopsilerden izole edilip kültürü yapılan hücrelerin Adipojenik Kondrojenik Nörojenik farklılaşma medyumları ile indüklenmesi sonucunda invert faz kontrast mikroskobu ile yapılan inceleme ile hücrelerin adiposit hücrelerine dönüştükleri ve hücre içi yağ veziküllerinin oluştuğu görüldü (Şekil 4.3).



Hücre içi yağ
vezikülleri

Şekil 4.3 Olfaktör kök hücrelerin adipojenik farklılaşması

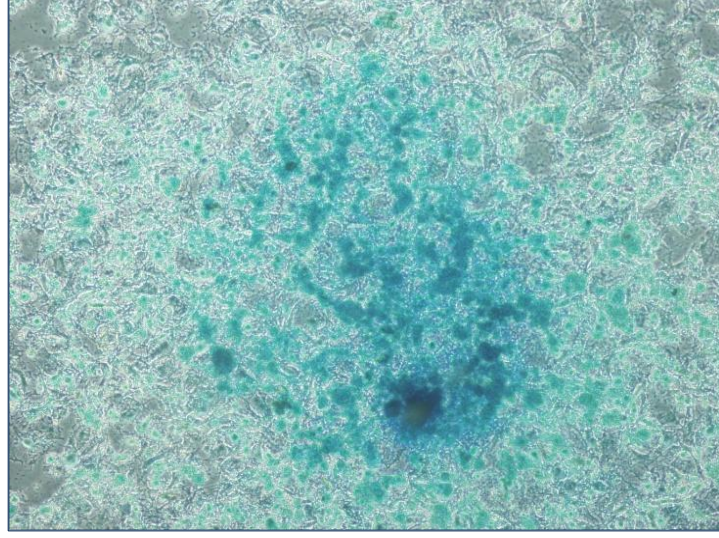
Nörojenik farklılaşma medyumuna ile indüklenen hücrelerin kullanılan Mesenchymal Stem Cell Neurogenic Differentiation Kit'te belirtilen morfolojiye sahip, sinir hücre benzeri akson ve dendritik uzantıları olan hücreler oldukları gözlemlendi (Şekil 4.4).



Nöron
benzeri hücre
morfolojisine
sahip
hücreler

Şekil 4.4 Olfaktör kök hücrelerin nörojenik farklılaşması

Kondrojenik farklılaşma medyumuna ile indüklenen olfaktör kök hücreler, farklılaşmayı takiben Alcian Blue ile boyandı. İnvert faz kontrast mikroskobu ile yapılan inceleme sonucunda farklılaşan hücrelerin mavi boyandıkları gözlemlendi (Şekil 4.5).

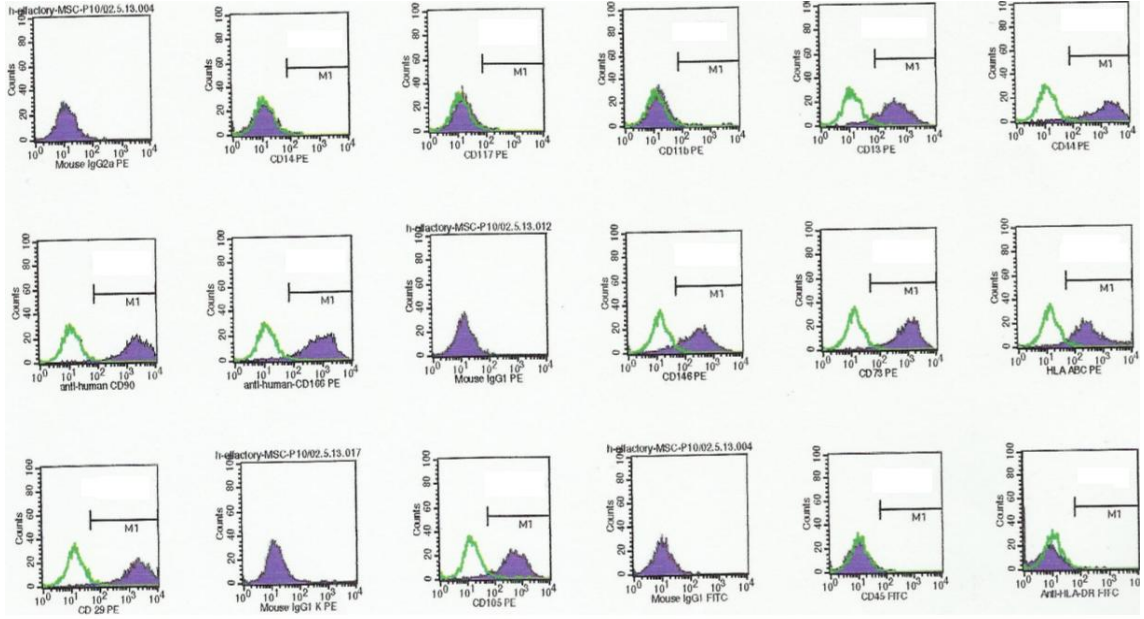


Şekil 4.5 Olfaktör kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması. Alcian Blue ile boyama (10X)

Böylece elde ettiğimiz hücrelerin kök hücrelerin özelliği olan adipojenik, nörojenik ve kondrojenik farklılaşma özelliğine sahip oldukları görüldü.

4.1.3.2 Olfaktör Bölgeden İzole Edilip Kültürü Yapılan Hücrelerin İmmünojenotiplendirilmesi

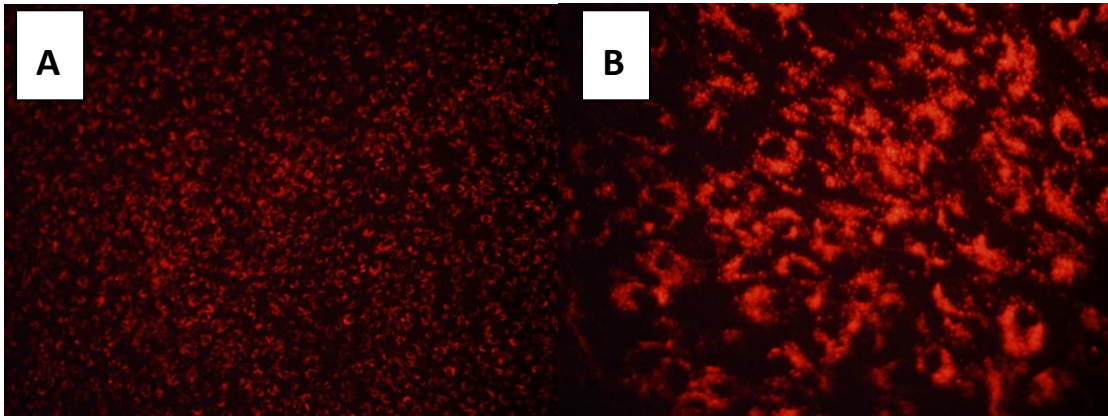
Olfaktör bölgeden izole edilip kültürü yapılan 2 pasajındaki hücrelerin immünojenotiplendirilmesi için FACSCalibur akım sitometri cihazı kullanılarak yapılan analiz sonuçlarına göre; elde edilen hücrelerin, mezenkimal kök hücreler için pozitif yüzey markerları olan CD14-PE, CD44, anti-human CD90, CD146, CD73, CD29, CD105 markerlarını yüksek seviyede, negatif yüzey markerları olan CD117, CD11b, CD13, anti-human CD116, Mouse IgG1, HLA-ABC, Mouse IgG1 K, Mouse IgG1, anti-HLA-DR markerlarını ise düşük seviyede eksprese ettikleri gösterildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Olfaktör kök hücrelerin immünofenotiplendirilmesi.

4.1.4 Olfaktör Kök Hücrelerin CM-Dil ile işaretlenmesi

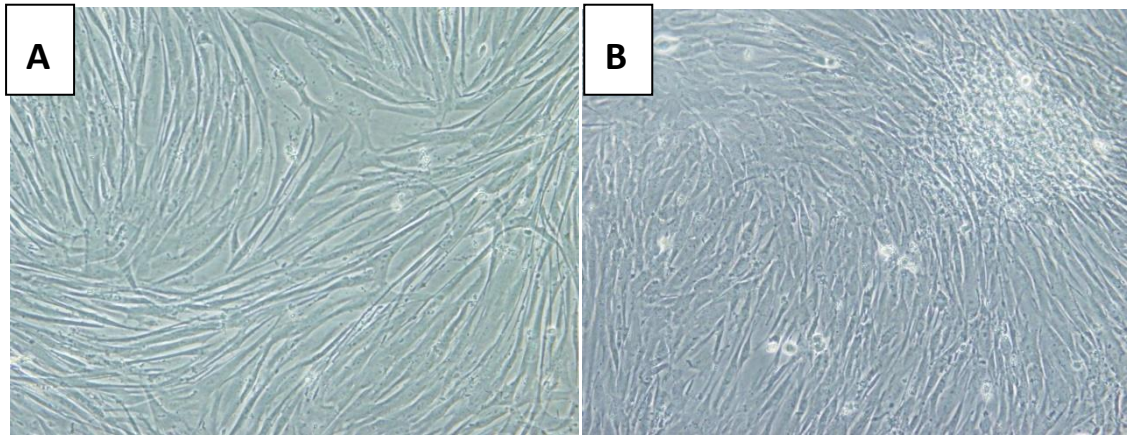
CM-Dil ile işaretlenen OKH'ler invert mikroskop altında incelendi. Boya ile inkübasyonun ardından 4 saat kültürde bekletilen hücrelerin floresan ışık altında yeşil filtre ile yapılan görüntülenmesinde yüzey kaplaması gerçekleşen flask içindeki tüm alanlardaki hücrelerin boyandığı görüldü. Böylece boyama optimizasyonu sağlandı ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere uygulanacak boyama yöntemi belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 CM-Dil ile işaretlen olfaktör kök hücreler (A. 10X, B. 40X)

4.1.5 Çok Tabakalı Hücre Pelleti Oluşturulması

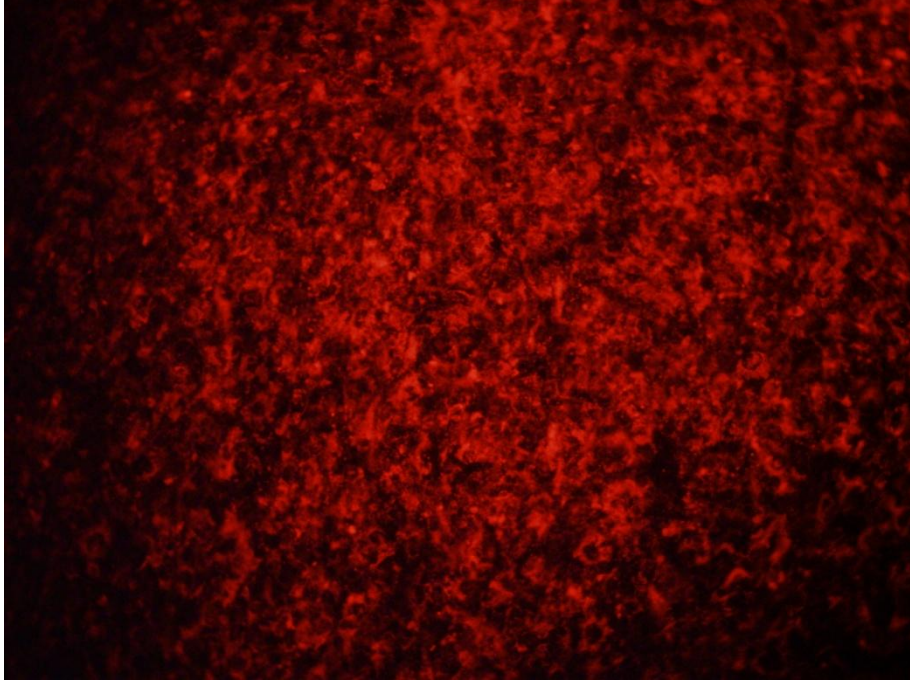
CM-Dil ile işaretlenen olfaktör kök hücrelerin üst üste pasaj yapılarak hazırlanan çok tabakalı hücre kitlesinin invert faz kontrast mikroskopta hem beyaz ışık altında hem de yeşil filtre ile UV ışık altında yapılan incelemelere göre kültürdeki hücrelerin canlılıklarını korudukları ve adezyon kabiliyetlerini sürdürdükleri gözlemlendi (Şekil 4.8, 4.9, 4.10).



Şekil 4.8 Çok tabakalı hücre kitlesi elde etmek amacıyla kültürü yapılan OKH'ler. Tek tabakalı hücreler (A), trypsinize edilerek 2. flask içine pasajlanan OKH'ler (B) (20X)



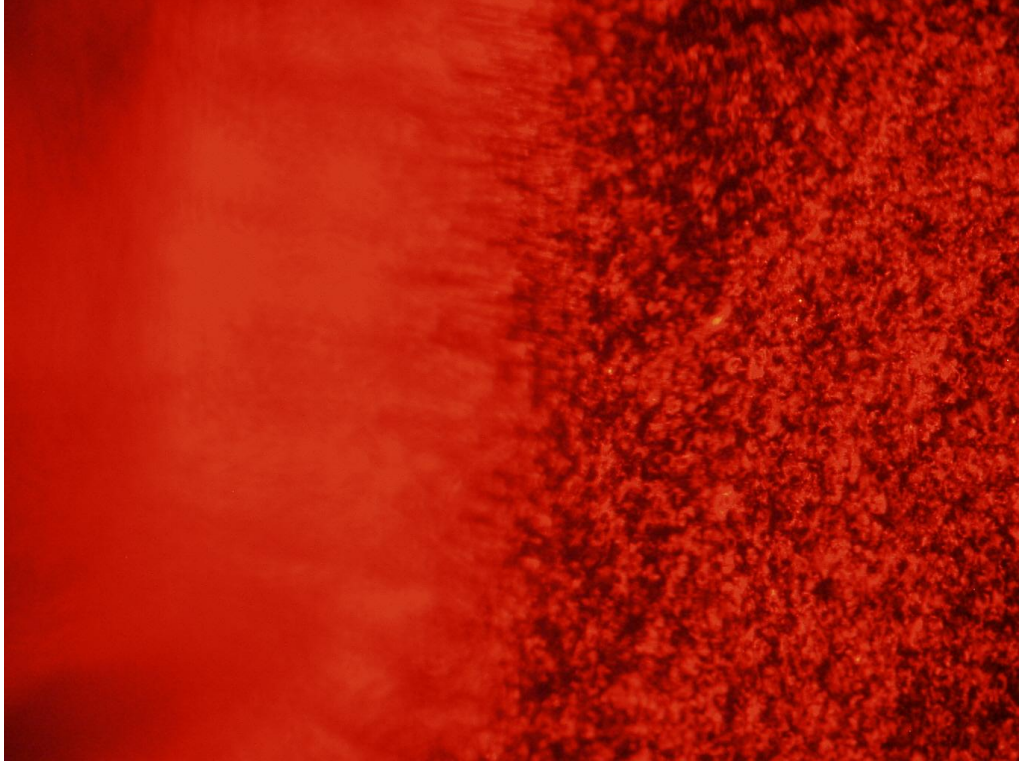
Şekil 4.9 Üst üste 9 pasaj yapılan OKH'lerin mikroskopik görüntüsü (20X)



Şekil 4.10 Üst üste 9 pasaj yapılan CM-Dil ile işaretlenen OKH'lerin mikroskopik görüntüsü (20X)

4.1.5.1 Hücre pelletinin *in vivo* transplantasyon için hazırlanması

CM-Dil ile boyanıp birer gün ara ile üst üste pasajlanan OKH'lerden oluşan hücre pelleti, 9. pasajın ardından flaska hafifçe vurularak flaskın köşelerinden başlayarak ayrıldı (Şekil 4. 11). Elde edilen pellet enjektör ucu yardımıyla gözle eşit görülen parçalara ayrılarak içinde PBS bulunan 0,2ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı.



Şekil 4.11 CM-Dil ile işaretlenen olfaktör kök hücrelerden hazırlanan çok tabakalı hücre kitlesi (10X)

4.1.5.2 Ön çalışma sonuçları

4.1.5.2.1 Wiskers Skorlama Sonuçları

Ratlarda deney öncesi fasiyal paralizin ölçümü, deney sonrası ise iyileşmenin belirlenmesi için tam kat kesi öncesi ve sonrası bıyık hareketleri Wiskers skorlama olarak ölçüldü. Buna göre 7 ratın preop bıyık hareketlerinin skorları 4 olarak belirlendi. Fasiyal kesi sonrası 4 farklı yöntem kullanılarak kök hücrelerin kesi bölgesine inokülasyonu sağlandıktan sonra ratların 4., 6., ve 8., haftalarda yapılan whiskers skorlamalarına göre kök hücre uygulanan ratlarda bıyık hareketlerinde kontrole göre artış gözlemlendi. Sonuçlar Mann Whitney U istatistiği kullanılarak hesaplandı ($p < 0,05$). Elde edilen sonuçlara göre olfaktör kök hücrelerden elde edilen çok tabakalı hücre kitlesinin diğer hücrelere göre 2. ayda sinir rejenerasyonunu sağladığı belirlendi. Böylece *in vivo* çalışmalarda OKH'lerin hasar bölgesine inokülasyonu için çok tabakalı hücre kitlesi kullanılması uygun olduğu belirlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Ön çalışma Wiskers Skorlama sonuçları.

Ratlar	Preop değeri	Postop 4. Hafta	Postop 6. Hafta	Postop 8. Hafta
1. Rat	4	0	1	2
2. Rat	4	1	2	3
3 ve 4. Rat	4	2	2	3
5 ve 6. Rat	4	2	3	4
7. Rat	4	0	0	1

4.2 Esas Çalışmalar

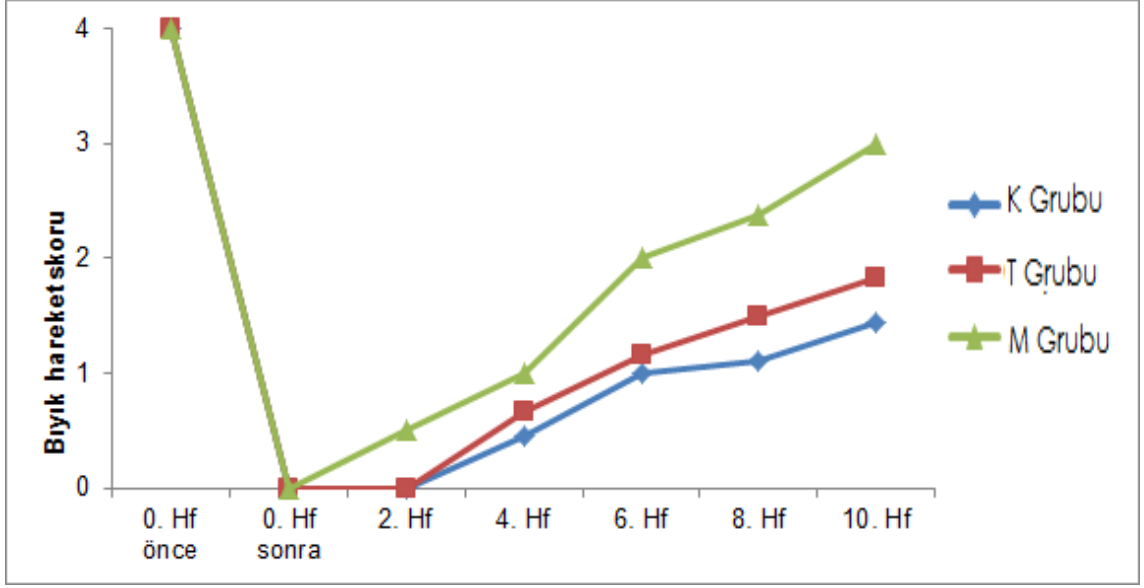
Ratlarda deney öncesi fasiyal paralizin ölçümü, deney sonrası ise iyileşmenin belirlenmesi için tam kat kesi öncesi ve sonrası bıyık hareketleri Wiskers skorlama olarak ölçüldü. Wiskers skorlama için 27 adet ratın bıyık hareketleri incelendi, herhangi bir patoloji izlenmediğinden tüm ratlar için preop wiskers skor değeri 5point-skalaya göre değerlendirildi (0: hiç hareket yok; 1: güçlükle farkedilebilir hareket; 2: az anlamlı hareket; 3: anlamlı fakat simetrik olmayan hareket; 4: simetrik hareket). Bu dönemde işlem yapılan bölge akıntı, kızarıklık ya da şişme açısından ve ratlar da bıyık hareketleri yönünden takip edildi. Bıyık hareketleri Ratların postop 2, 4, 6, 8 ve 10. haftalardaki elektrofizyolojik değerlendirmelerinde, her seferinde 5mg/kg intramusküler ksilazine HCl (Rompun %2 Bayer) ile premedikasyon ve 35mg/kg intramusküler ketamine HCl (Alfamine %10 Ege Vet) ile genel anestezi uygulandı. Anestezi sonrası elektrofizyolojik testler ile sinir hasarındaki düzelme kaydedildi.

4.2.1 Esas Çalışmaların Wiskers Skorlama Sonuçları

Fasiyal sinir kesisi öncesi tüm ratlarda yüz kaslarının hareketli, bıyık hareketlerinin simetrik olduğu belirlendi. Fasiyal sinir kesisinden sonra tüm gruplarda sağ taraftaki bıyıklar hareketini kaybetti. Klinik gözlemlerde bıyık hareketlerinde 5 nokta skalasına göre ortalama 4.hafta K grubunda $0,4\pm0,5$; T grubunda $0,7\pm0,5$; M grubunda $1,0\pm0,5$ olarak kaydedilirken 10. hafta K grubunda $1,4\pm0,5$; T grubunda $1,8\pm0,4$; M grubunda $3,0\pm0,5$ olarak kaydedildi. 6. haftadan itibaren tüm grup skorlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla birlikte M grubundaki skorların sinir kesisi öncesi normal skorlara ulaşmada 6. haftadan itibaren K grubundan, 10. Haftadan itibaren T grubundan anlamlı farklı olduğu izlendi ($p<0,001$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.12).

Çizelge 4.2 Esas Çalışmaların Wiskers Skorlama Sonuçları

Haftalar	Whiskers Skorlama		
	M Grubu	T Grubu	K Grubu
4. Hafta	$1,0\pm0,5$	$0,7\pm0,5$	$0,4\pm0,5$
10. Hafta	$3,0\pm0,5$	$1,8\pm0,4$	$1,4\pm0,5$



Şekil 4.12 Fasiyal sinir kesisi sonrası 0'a düşen bıyık hareket skorundaki artışın gruplara göre dağılımı

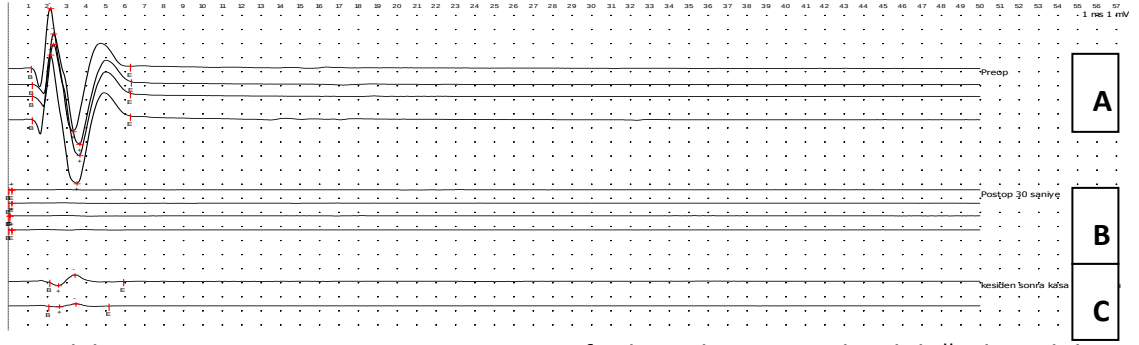
4.2.2 Olfaktör Kök Hücre Transplante Edilen Ratlarda EMG ile Fasiyal Sinirin Elektrofizyolojik Değerlendirmesi

Ratlarda deney öncesi fasiyal paralizin ölçümü, deney sonrası ise iyileşmenin belirlenmesi için tam kat kesi öncesi ve sonrası bıyık hareketleri Wiskers skorlama olarak ölçüldü. Latens ve amplitüd değerleri ise elektromiyografi (EMG) ile ölçüldü. Aksonal rejenerasyon hızı amplitüd değerlerindeki artış üzerinden değerlendirildi. Buna göre de ikinci haftadan itibaren tüm gruplardaki amplitüd artışı (sinir kesisi sonrası değerlere göre) istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla birlikte M grubundaki amplitüd değerlerinin sinir kesisi öncesi değerlere ulaşmada 2. haftadan itibaren K grubunda, 4. haftadan itibaren T grubundan anlamlı farklı olduğu izlendi ($p=0,030$, $p>0,001$) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Grupların haftalara göre amplitüd (mV) ortalamaları

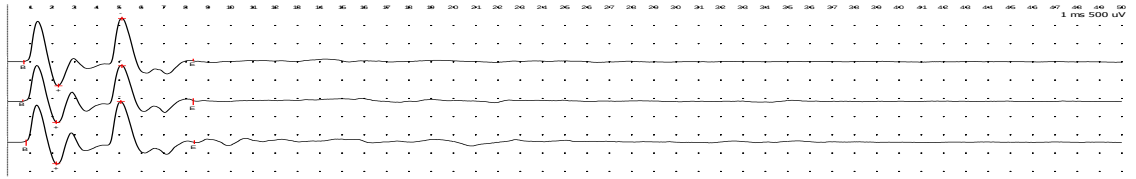
Amplitüd (mV)	M grubu	T grubu	K grubu	0.119
0. Hafta (Önce)	7,1±1,1	7.9±1,8	8,6±1,6	<0.001
0. Hafta (Sonra)	1,1±0,8	0,0±0,1	0,1±0,1	0,012
2. Hafta	1,2±0,8	0,3±0,2	0,5±0,3	0,011
4. Hafta	2,3±0,9	1,0±0,5	1,4±0,7	0,004
6. Hafta	3,1±0,7	2,2±0,6	1,8±0,8	<0,001
8. Hafta	4,7±0,9	2,6±0,6	3,1±0,6	<0,001
10. Hafta	5,4±0,7	4,0±0,5	3,6±0,6	<0,001
p	<0,01	<0,01	<0,01	

Amplitüd değerleri hasarda akson kaybını, rejenerasyonda da aksonal toparlanmayı gösterdiği için sinir iyileşmesi tüm gruplarda kesi sonrası 0'a düşen amplitüd değerlerinin yükselişi ile takip edildi. Sinir kesisi yapılmadan önce elde ettiğimiz ENoG yanıtları ortalama 1ms latensli ve 8-10 mV amplitüdlü iken sinir kesildikten sonra kesi proksimalinden yapılan uyarıya yanıt alınamadı. Rekonstrüksiyon sonrası M grubunda 2. hafta geç latensli (2ms) ve düşük amplitüdlü (0,3mV) yanıtlar alınmaya başlanırken, 4. hafta 1mV amplitüdlü polifazik yanıtlar elde edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Kesi öncesi A, sonrası B ve 2. Haftadan itibaren amplitüd değerlerindeki yükseliş C

Rekonstrüksiyon sonrası M grubunda 2. hafta geç latensli (2ms) ve düşük amplitüdlü (0,3mV) yanıtlar alınmaya başlanırken, 4. hafta 1mV amplitüdlü polifazik yanıtlar elde edildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 4. hafta 1mV amplitüdlü polifazik yanıtlar

2., 4., 6., 8. ve 10. haftalarda yapılan ENoG incelemelerinde latens, amplitüd, süre ve alan değerleri kaydedilse de aksonal rejenerasyon hızı amplitüd değerlerindeki artış üzerinden değerlendirildi. İkinci haftadan itibaren tüm gruptaki amplitüd artışı (sinir kesisi sonrası değerlere göre) istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla birlikte (Çizelge 4.2), 3. gruptaki amplitüd değerlerinin sinir kesisi öncesi değerlere ulaşmada 2. haftadan itibaren K grubundan, 4.haftadan itibaren T grubundan anlamlı olarak farklı olduğu izlendi ($p=0,030$, $p>0,001$).

4.2.3 Bıyık Hareketleri ve Aksonal Rejenerasyonun Korelasyonu

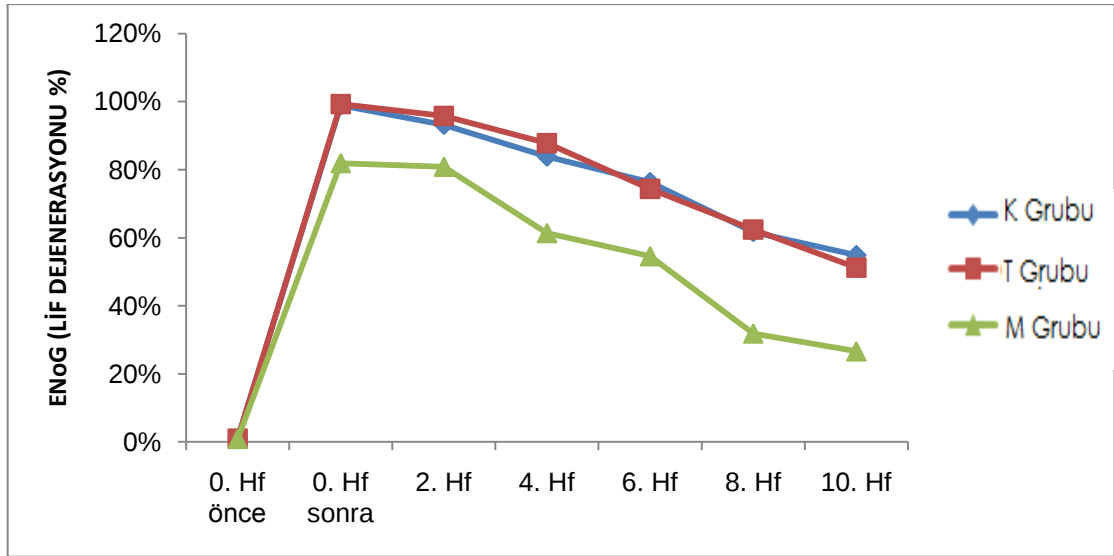
Bıyık hareket skorlarındaki artış ile aksonal rejenerasyon hızındaki artış arasında korelasyon Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 16.0 for Windows) ile değerlendirildi ve $p < 0.05$ istatistiki olarak anlamlı kabul edildi ($p = 0,001$, $r = 0,769$).

4.2.4 Lif Dejenerasyonu

Dejenerasyon derecesi elde edilen bileşik aksiyon potansiyellerinin amplitüdleriyle doğrudan ilişkilidir. Bu ilişkiden yararlanılarak sağlam ve hasta taraf cevapları karşılaştırıldı ve aksonal dejenerasyonun yüzdesi belirlendi. Buna göre; fasiyal sinir tam kat kesisi sonrası lif dejenerasyonu K grubunda $98,9 \pm 1,9$; T grubunda $99,3 \pm 1,2$; M grubunda $81,9 \pm 10,3$ iken rekonstrüksiyon sonrası 10. haftada K grubunda $54,9 \pm 8,6$; T grubunda $51,2 \pm 8,3$; M grubunda $26,6 \pm 7,4$ olarak belirlendi. Fasiyal sinir tam kat kesisi sonrası M Grubundaki lif dejenerasyonunun, sinir kesisi öncesi normal değerlere ulaşmada 4. haftadan itibaren T ve K grubundan anlamlı farklı olduğu izlendi ($p = 0,005$) (Çizelge 4.4) (Şekil 4.15).

Çizelge 4.4 4 ve 10. haftalardaki lif dejenerasyonu yüzdeleri

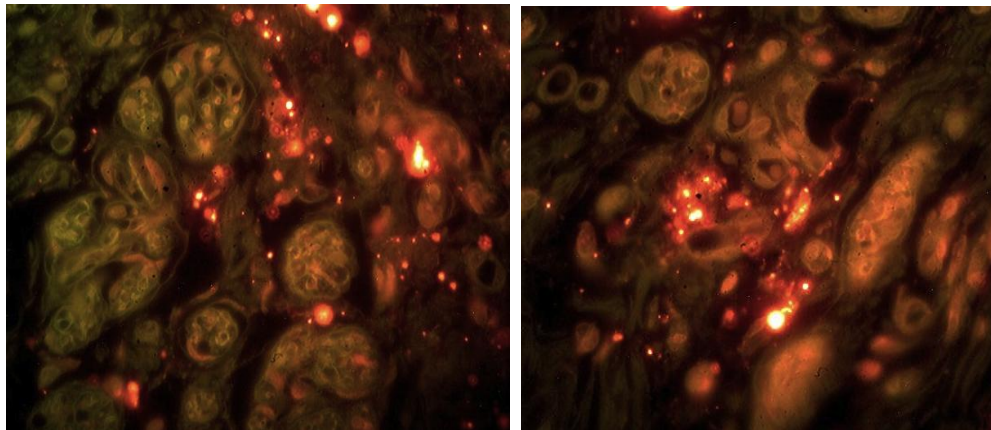
Haftalar	Lif Dejenerasyonu		
	M Grubu	T Grubu	K Grubu
4. Hafta	$81,9 \pm 10,3$	$99,3 \pm 1,2$	$98,9 \pm 1,9$
10. Hafta	$26,6 \pm 7,4$	$51,2 \pm 8,3$	$54,9 \pm 8,6$



Şekil 4. 15 Gruplara göre akson hasarının haftalara göre düzelmesi

4.2.5 Fasiyal sinirin histolojik analizi

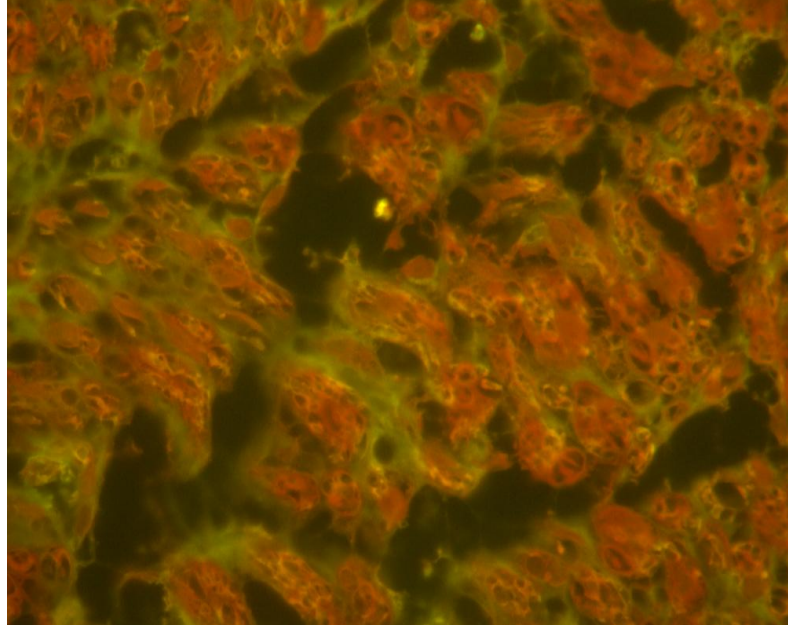
Hematoksilen eosin ve toluidine blue ile boyanan preparatların mikroskopik incelemesinde T ve K grubunda 10. haftada yara iyileşmesine bağlı konnektif doku artışı ve desorganize nöral fibriller görülürken, M grubunda sinir fasiküllerinin daha organize olduğu ve normal sinir aksial kesitine benzediği görüldü. Floresan mikroskobu altında sinir aksiyal kesitinde CM-Dil ile işaretlenmiş OE-MKH' ler fibriller arasında kırmızı renkte izlendi (Şekil 4.16)



Şekil 4.16 Sinir aksiyal kesitinde CM-Dil ile işaretlenmiş OE-MKHler (Floresan mikroskobu X60).

4.2.6 S100 boyama sonuçları

Fasiyal sinirin parafim kesitlerinin S100 boyası ile boyanması sonucu OKH verilen grupta hasar bölgesindeki sinirin remyelinizasyonunu sağlayan Schwann hücrelerinin bulunduğu bölgelerin kahverengi olarak boyandığı görüldü (Şekil 4.17). S100 boyası ile.



Şekil 4.17 Schwann hücrelerinin bulunduğu alanlar (kahverengi)

4.3 Tartışma

Bu çalışmada farklı donörlerin olfaktör mukozasından alınan örneklerden olfaktör kök hücrelerin izolasyonu, kültürünün yapılması, karakterizasyonu, kriyoprezervasyonu ve ilk kez olarak sinir rejenerasyonunda kullanılmak üzere çok tabakalı kök hücre kitlesi elde edildikten sonra fasiyal paraliz oluşturulmuş ratlarda sinir rejenerasyonuna etkisi gösterildi.

Çeşitli nedenlerden kaynaklanan sinir hasarları, insan sağlığını ciddi olarak etkilemenin yanında estetik ve dolayısıyla psikolojik problemlere de neden olur [140], [141], [142]. Şimdiye kadar bu patolojinin tedavisine yönelik çeşitli tedavi yaklaşımları uygulanmasına rağmen gerek iyileşme hızı gerekse de iyileşme hızına bağlı sekeller hastalığın tedavisinin önünde önemli engeller oluşturmaktadır [49], [143], [144], [145], [146]. Bu nedenle hasar görmüş sinire bağlı patolojilerin giderilmesinde yeni

yaklaşımların geliştirilmesi oldukça önemlidir. Son yıllarda kök hücre alanındaki gelişmeler ve kök hücreye dayalı tedavi yaklaşımlarındaki ilerlemeler nörolojik hastalıkların tedavisinde de yeni ümitlere yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda Parkinson, Alzheimer, gibi hastalıkların tedavisinde kök hücreler ile tedaviye yönelik alınan olumlu sonuçlar [64], [147], [148], [149], kök hücrelerin klinikte kullanılmasına olan ilgiyi giderek arttırmıştır. Aynı zamanda periferik fasiyal sinir hasarlarının tedavisinde yağ dokusundan elde edilen kök hücreler ile yapılan çalışmada bazı olumlu sonuçlar elde edilmiş ancak yeterli olmamıştır [12], [32]. Bunun yanında hipokampus kaynaklı nöral kök hücrelerin periferik fasiyal sinir hasarlarında kullanıldığı bir çalışmada Schwann hücre yerine nöral kök hücre kullanılması ile Schwann hücrelerin kaynağının sınırlı olmasına bağlı dezavantajların giderildiği bildirilmiştir [150]. Ancak hipokampus kaynaklı kök hücrelerin klinik uygulamalarda kullanılması günümüzde mümkün olmadığından bu yöntemin sinir hasarlarında klinik kullanımı mümkün olmamaktadır.

Son yıllarda kök hücre niş kavramı ile ilgili gelişmeler tedavinin temelinde kök hücrelerin tek başına değil aynı zamanda onların bulundukları niş ortamının da mutlaka dikkate alınmasının gerekli olduğunu ortaya koymaktadır [106], [151], [152]. Ancak şimdiye kadar fasiyal sinir hasarlarının rejenerasyonunda bu alanda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında hasar görmüş sinir hücrelerinin tedavisinde tedavi hedefleri niş temelleri dikkate alınarak belirlendi. Böylece sinir rejenerasyonunda ulaşılabilir tek nöral kök hücre kaynağı olan olfaktör dokudan [23], [24], [26], [109], [153], [154], [155] elde edilen kök hücrelerin fasiyal sinir hasarlarına etkisini incelemeyi amaçladık. Bunun esas nedenlerinden biri olfaktör bölgenin niş komponentlerinin sinirin rejenerasyonunu sağlamada uygun bir aday kök hücre kaynağı olduğunun düşünülmesidir.

Literatürde, hücresel tedavilerde otolog hücre kaynaklarının kullanılmasının önemi vurgulanmaktadır. Bunun en önemli nedeni nakledilen retrovirüs ve lentivirüsler ile indüklenmiş pluripotent hücrelerdeki ekzojen DNA ya da bu yönteme alternatif olarak geliştirilen plazmid bazlı ya da protein RNA veya küçük moleküller ile yapılan manipülasyonlarla geri dönüşümsüz genetik modifikasyonları içeren hücresel ürünlerin

hastaya nakledilmesiyle oluşabilecek potansiyel problemlerdir. Otolog kök hücrelerin indüklenmiş kök hücrelerden farklı olarak immün ret riski bulunmaz. Diğer yandan hasta kaynaklı kök hücreler epigenetik hafızayı muhafaza edemediklerinden tamamen farklılaşmış dokuların gelişmesini sınırlarlar. Tüm bu avantajlarının yanında hasta kaynaklı farklılaşmamış kök hücrelerin otolog transplantasyonunda nakledilen hücrelerin tümör hücresi gibi davrandıkları ve kanser oluşturma risklerinin bulunduğu bildirilmiştir. Oysaki nöral kök hücreler gibi farklılaşma potansiyelleri daha düşük olan ve farklılaşmamış hücrelere göre daha fazla farklılaşmış olan kök hücrelerin kullanımının tümörojenite riskini azalttığı bildirilmiştir [156]. Bu bilgiler ışığında hücresel tedavilerde otolog kök hücrelerin kullanımının mevcut tedavi yaklaşımları içinde en uygun olduğu düşünülebilir. Böylece niş temelleri de göz önüne alındığında özellikle de sinir hasarlarından ulaşılabilir ve hasta açısından alınması risk oluşturmayan tek nöral kök hücre kaynağı olan olfaktör bölgeden elde edilen olfaktör kök kullanılması, sinir hasarlarının tedavisi için oldukça umut vericidir. Tüm bu veriler göz önüne alındığında bu tez çalışmasında deneysel fasiyal paraliz oluşturan ratlarda olfaktör bölge kaynaklı kök hücrelerin sinir rejenerasyonuna etkisini belirlemeyi amaçladık.

Amaca ulaşmak için tez kapsamında deneyler 2 aşamada gerçekleştirildi. 1. aşamada İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Baş ve Boyun Cerrahisi Bölümü'nde onamı alınan 20, 36 ve 41 yaşlarında 3 erkek donörden septoplasti operasyonu sonrası olfaktör mukoza biyopsileri Uzm. Dr. Ayşegül Batioğlu Karaaltın tarafından alındı. Soğuk taşıma ortamında Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'na getirildi. Olfaktör biyopsilerin kök hücrelerin izolasyonu için literatürde Dispaz enzimi ile inkübasyonun ardından olfaktör epitel ve kök hücreleri içeren lamina propria tabakasının fiziksel olarak ayrılması, parçalara ayrılan lamina propria tabakasından hücrelerin kültür kaplarına adezyonunun yapılması için lamel ile kapatılarak %10 FBS içeren DMEM besiyerinde inkübasyon yöntemi gösterilmiştir [153]. Tez çalışması kapsamında laboratuvarımıza getirilen biyopsi örnekleri literatüre uygun şekilde hazırlandı. İzolasyon sonunda hücrelerin kültür kaplarına adezyonu günlük olarak izlendi. Elde edilen

sonuçlara göre olfaktör dokudan iç şeklinde simetrik çekirdekli kök hücre morfolojisine sahip hücrelerin kültüre adaptasyon sağladıkları ve proliferasyon oldukları görüldü.

Literatürde olfaktör kök hücrelerin karakterizasyonu için immünohistokimya ve farklılaşma çalışmaları yapılmış elde edilen sonuçlara göre olfaktör kaynaklı kök hücrelerin kendini yenileyebilme ve nörosfer oluşturma, kondrojenik, nörojenik, kardiyak ve adipojenik farklılaşma kapasitesine sahip, aynı zamanda multipotent kök hücre antijenleri olan CD29, CD73, CD 90, CD105, CD146 antijenlerini taşıyan hücreler oldukları bildirilmiştir [27], [155], [157], [158], [159], [160]. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda izolasyonun ardından devamlı kültürü yapılan hücrelerin karakterizasyonu için flow sitometri ile immünofenotiplendirme ve adipojenik, osteojenik ve nörojenik farklılaşma çalışmaları gerçekleştirildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre izole edilen hücrelerin, immünofenotipik olarak kök hücre markerlarını taşıdığı ve farklılaşma özellikleri bakımından kondrojenik, nörojenik ve adipojenik hücrelere farklılaşabildikleri böylece kök hücre karakterine sahip oldukları belirlendi.

Olfaktör mukoza, olfaktör bulbul, olfaktör yumru ve priform kortekste yeni nöronların sürekli kendini yenilediklerinin [161] bilinmesine rağmen bu progenitör hücrelerin rejenerasyonunda yaşa bağlı faktörlerin etkisi halen tartışılmaktadır. Ratlarda *in vivo* kendini yenileme ve nörojenez kabiliyetlerinin yaşa bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir [162]. Bunun yanında fare SVZ kaynaklı NKH'lerin yaşın ilerlemesine rağmen nöron, astrosit ve oligodendrositleri oluşturma kabiliyetlerini sürdürdükleri gösterilmiştir [12], [32]. Yapılan çalışmalar deney hayvanlarında böyleyken insan ile ilgili yaşa bağlı faktörlerin olfaktör bölgedeki nörojenez etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlamadık. Buna göre de bu çalışmada 20, 36 ve 41 yaşındaki 3 erkek donörden alınan biyopsi örneklerinden izole edilen olfaktör bölge kaynaklı kök hücrelerin kültürü incelendi. Hücrelerin alt kültürleri için her bir flaska eşit sayıda (10^5) hücre ekilerek proliferasyonları ve yüzey kaplama hızları günlük olarak incelendi. Bireylerden elde edilen OKH'lerin kültüre adaptasyon ve proliferasyonunda, primer kültürde ve devam eden pasajlardaki alt kültürlerinde göre belirgin bir fark gözlenmedi.

Literatürde olfaktör kök hücrelerin uygun kriyoprezervasyon koşullarının belirlendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanında kök hücrelerin kriyoprezervasyonunda

en yaygın olarak kullanılan yöntem %10 DMSO içeren kriyoprotektanlar kullanılarak yapılan kademeli dondurma yöntemidir [163]. Çalışmamızda olfaktör bölgeden izole edilip kültürü yapılan kök hücrelerin canlılıklarını ve kök hücre özelliklerini kaybetmeden uzun süreli saklanması için %20 DMSO ve %80 FBS ile hazırlanan ve dondurma sırasında son DMSO konsantrasyonu %10 olacak şekilde kullanılan kriyoprotektan solüsyonu kullanılarak kademeli dondurma yöntemi gerçekleştirildi. Kriyoprezervasyonu yapıp sıvı azotta saklanan hücrelerin 2, 8, 12 ve 24 ay sonra çözme işlemi yapıp canlılıkları incelendiğinde dondurulan tüm örneklerdeki hücrelerin canlılığının %89-95 arasında olduğu belirlendi. Böylece olfaktör kök hücrelerin kriyoprezervasyonunda da diğer kök hücrelerde olduğu gibi son konsantrasyonu %10 olacak şekilde hazırlanan DMSO solüsyonlarının kullanılmasının uygun olduğu gösterildi. Ayrıca bu tez çalışması ile ülkemizde ilk kez olarak Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarında olfaktör kök hücreler izole edilip kültürü yapıldı ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere sıvı azot içinde kriyobankı oluşturuldu. Oluşturulan kriyobankta canlılığını muhafaza eden hücreler kullanılarak laboratuvarımızda kıkırdak doku mühendisliği çalışması gerçekleştirildi [164].

Kök hücrelerin fiziksel ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesinin yanında *in vivo* çalışmalarda hücrenin kaderinin belirlenmesi için birçok farklı işaretleme yöntemi kullanılmaktadır. Günümüzde özellikle kök hücre çalışmalarında hücrelerinin işaretlenmesinde kullanılmak üzere daha az toksik etki ve daha uzun süre kalıcılık gösteren farklı sitoplazmik ve membran boyaları geliştirilmiştir [157]. Bunlar içinde CM-Dil minimum toksisiteye ve uzun süreli kalıcılığa sahip bir membran boyasıdır [138]. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen hücrelerin işaretlenmesinde kullanılan CM-Dil'in olfaktör bölge kaynaklı kök hücrelerde kullanılması ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Böylece çalışma kapsamında dünyada ve ülkemizde ilk kez olarak olfaktör bölge kaynaklı kök hücrelerin işaretlenmesinde CM-Dil kullanıldı.

Hasar görmüş sinir dokusunun tedavisinde günümüzde doğrudan koaptasyon altın standart olarak kullanılmaktadır. Doğrudan koaptasyonun uygulanamadığı uzun sinir boşluklarında ise otolog veya allojenik greft kullanımı veya sinir rehber kanalları gibi

birçok yöntem kullanılmaktadır [165], [166], [167], [168]. Doku mühendisliği ile sinir hasarının giderilmesinde kök hücrelerinin materyal desteği olmadan kullanıldığı durumlarda transplante edildikleri bölgedeki lokalizasyonları çoğu zaman yetersizdir. Bu da hücresel tedavi yöntemleri ile sinir rejenerasyonunda başarı sağlanmasını sınırlamaktadır. Bu sınırlamaları ortadan kaldırmak için çalışmamızda ilk kez olarak elde ettiğimiz olfaktör bölge kaynaklı kök hücrelerin transplante edildikleri bölgede kalıcı lokalizasyonunu sağlamak amacıyla çok tabakalı hücre kitlesi elde edildi. Elde edilen bu çok tabakalı hücre kitlesinin kültür ortamında canlılığını ve proliferasyon kabiliyetlerini de koruduğu gözlemlendi. Çok tabakalı hücre kitlesinin çalışmada kullanılmasının esas nedeni hücre sayısına ve etkileşimine bağlı olarak hücrelerin bulunduğu mikro çevre, salgıladıkları sinyal molekülleri ve bu çevrede hücrelerin proliferasyonunu destekleyen metabolitlerin miktarının yüksek olmasının beklenmesidir. Bu durum elde edilen bu kitlenin hasar görmüş sinir hücrelerinin rejenerasyonunda daha etkili olacağını düşündürmektedir. Yaptığımız literatür çalışmalarında konu ile ilgili herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Tez çalışması kapsamında fasiyal paraliz oluşturulan 7 rat üzerinde Bezm-i Alem Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yapılan ön çalışmalarda kullanılan CM-Dil ile işaretli çok tabakalı hücre kitlesinin diğer gruplarda kullanılan süspanse hücre, ve fibrin glue'ya göre sinir hasar bölgesine entegrasyon sağlamada daha etkin olduğu 2 ay boyunca takip edilen ratların whiskers skorlaması ile belirlendi ($p<0,05$). Böylece çalışmanın 27 rat kullanılarak yapılacak olan *in vivo* aşamalarında hazırlanan çok tabakalı hücre kitlesinin kullanılmasına karar verildi.

Günümüzde sinir hasarlarının tedavisinde uygulanan yöntemler içinde en dikkat çekici olanları doku mühendisliği ile hazırlanan sinir kanalları ile tedavi yöntemidir. Yapılan birçok çalışmada sinir boşluğunun onarılmasında aksonal rejenerasyonun ve myelinizasyonun yönlendirilmesi için otolog veya allojenik arterler, venler veya sentetik biyobozunur yapılar kullanılmaktadır [32], [150], [162], [169]. Çalışmamızda canlılığını ve proliferasyon yeteneğini kaybetmediği belirlenen olfaktör mukoza kaynaklı kök hücrelerden elde edilen çok tabakalı hücre kitlesinin sinir rejenerasyonunda kullanılmasında, etkinliği yapılan çalışmalarla ortaya konulan ve cerrahi tedavilerde insanlarda başarı ile uygulanan poliglikolik ait sinir kondüiti kullanılarak rejenerasyonun etkinliğinin artırılması amaçlandı. Böylece çalışma kapsamında emilebilir örülmüş

poliglikolik asit meş tüpü olan Neurotube’ n, 2 ucuna kesilen sinir uçlarına anastomozu yapıldı. Kesi bölgesine aktarılan kök hücreler t p içine verildi. İşlem esnasında hücrelerin tüpün duvarlarına hemen adezyon yaptıkları gözlendi. Bu şekilde transplante edilen hücrelerin kesi bölgesine entegrasyonu sağlanmış oldu. Böylece bu tez çalışması ile dünyada ve ülkemizde ilk kez olarak kök hücreden doku mühendisliğinde kullanılmak üzere herhangi bir madde kullanılmadan çok tabakalı hücre kitlesi elde edilmiş oldu. Yine bu çalışma ile ilk kez olarak elde edilen bu hücre kitlesini sinir hasarlarının tedavisinde Neurotube konduit ile kullanmakla dünyada ve ülkemizde ilk kez olarak sinir hasarlarının tedavisinde yeni bir yöntem önerildi ve literatüre katkı sağlandı.

SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç Değerlendirmesi

Bu çalışma ile ülkemizde ilk kez olarak izolasyonu ve devamlı kültürü yapılan olfaktör bölge kaynaklı kök hücrelerin kriyoprezervasyonu gerçekleştirilip kriyobankı oluşturularak periferik fasiyal sinir hasarlarının tedavisinde kullanılmak dünyada ilk kez çok tabakalı hücre kitlesi elde edildi. Ayrıca olfaktör kök hücrelerin işaretlenmesinde daha önce uygulanmayan CM-Dil boyası kullanıldı. Elde edilen işaretlenmiş hücre kitlesi deneysel fasiyal paraliz oluşturulan ratlarda sinir hasarının tedavisinde kullanıldı. Böylece bu tez çalışmasında, fasiyal paralizin tedavisinde hasta kaynaklı ve hasta açısından minimum risk oluşturan, laboratuvar şartlarında kültürü yapılarak çoğaltılabilen ve uzun süreli muhafaza edilebilen bir kök hücre kaynağı olan olfaktör kök hücreler kullanılarak yeni bir yaklaşım ortaya konuldu ve günümüzde halen etkin bir tedavisi olmayan fasiyal paraliz olgularının tedavisinde olfaktör kök hücrelerin kullanılmasının önü açılarak konu ile ilgili literatüre katkı da yapıldı.

5.2 Öneriler

Bu çalışma ile ulaşılabilir tek nöral kök hücre olan OKH'lerin fasiyal sinir hasarlarında sinir rejenerasyonunu hızlandıran etkin bir hücresel tedavi yöntemi olarak önerilebilir. Ayrıca değişik nedenlerle ortaya çıkan ve periferik sinir sisteminin farklı bölgelerinde tutulum yapan diğer periferik sinir hasarlarında ve hatta merkezi sinir hasarlarında da OKH'ler kullanılması ile doku mühendisliği yaklaşımlarının uygulanması önerilir.

KAYNAKLAR

- [1] Liggett, J., (1974). Skin and Bone in: The Human Face. Liggett J(Ed), Constable and company Limited London: 2-19.
- [2] Bell, C., (2003). "On the nerves: giving an account of some experiments on their structure and functions, which lead to a new arrangement of the system", Philos.Trans. R. Soc. London, 111:398-424.
- [3] Bell, C., (2003). On the nerves of the face, J R Soc Med., 96: 368.
- [4] O'Connor, J.P., (2003). "Thomas Willis and the background to Cerebri Anatome", J R Soc Med, 96: 139-143.
- [5] Grzybowski, A. ve Kaufman, M.H., (2007). "Sir Charles Bell (1774-1842): contributions to neuro-ophthalmology", Acta Ophthalmol Scand, 85: 897-901.
- [6] Korteweg, S.F. Van de Graaf, R.C. ve Werker, P.M., (2009). "About the right facial palsy of Charles Bell: was Sir Charles Bell himself really affected by facial paralysis? - Comment on 'peripheral facial palsy in the past. Contributions from Avicenna, Nicolaus Friedreich and Charles Bell'", Arq Neuropsiquiatr, 67: 783; author reply 783-784.
- [7] Resende, L.A. ve Weber, S., (2008). "Peripheral facial palsy in the past: contributions from Avicenna, Nicolaus Friedreich and Charles Bell", Arq Neuropsiquiatr, 66: 765-769.
- [8] Schleicher, W. Feldman, M. ve Rhodes, J., (2013). "Review of facial nerve anatomy: trauma to the temporal region", Eplasty, 13: ic54.
- [9] Myckatyn, T.M. ve Mackinnon, S.E., (2004). "A review of facial nerve anatomy", Semin Plast Surg, 18: 5-12.

- [10] Carod-Artal, F.J. ve Vazquez Cabrera, C.B., (2006). "[Evidence of facial palsy and facial malformations in pottery from Peruvian Moche and Lambayeque pre-Columbian cultures]", *Neurologia*, 21: 297-303.
- [11] Magill, C.K. Moore, A.M. Borschel, G.H. ve Mackinnon, S.E., (2010). "A new model for facial nerve research: the novel transgenic Thy1-GFP rat", *Arch Facial Plast Surg*, 12: 315-320.
- [12] Sun, F. Zhou, K. Mi, W.J. ve Qiu, J.H., (2011). "Combined use of decellularized allogeneic artery conduits with autologous transdifferentiated adipose-derived stem cells for facial nerve regeneration in rats", *Biomaterials*, 32: 8118-8128.
- [13] Rosenbaum, A.J. Grande, D.A. ve Dines, J.S., (2008). "The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment", *Organogenesis*, 4: 23-27.
- [14] Allahverdiyev, A.M. Bagirova, M. Elcicek, S. Koc, R.C. Baydar, S.Y. Findikli, N. ve Oztel, O.N., (2011). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 85: 535-539.
- [15] Yuan, H. Zhang, Z.W. Liang, L.W. Shen, Q. Wang, X.D. Ren, S.M. Ma, H.J. Jiao, S.J. ve Liu, P., (2010). "Treatment strategies for Parkinson's disease", *Neurosci Bull*, 26: 66-76.
- [16] Shihabuddin, L.S. ve Aubert, I., (2010). "Stem cell transplantation for neurometabolic and neurodegenerative diseases", *Neuropharmacology*, 58: 845-854.
- [17] Marei, H.E. Farag, A. Althani, A. Afifi, N. A, A.E. Lashen, S. Rezk, S. Pallini, R. Casalbore, P. ve Cenciarelli, C., (2014). "Human Olfactory Bulb Neural Stem Cells expressing hNGF Restore Cognitive Deficit in Alzheimer's Disease Rat Model", *J Cell Physiol*.
- [18] Yoon, K.J. Nguyen, H.N. Ursini, G. Zhang, F. Kim, N.S. Wen, Z. Makri, G. Nauen, D. Shin, J.H. Park, Y. Chung, R. Pekle, E. Zhang, C. Towe, M. Hussaini, S.M. Lee, Y. Rujescu, D. St Clair, D. Kleinman, J.E. Hyde, T.M. Krauss, G. Christian, K.M. Rapoport, J.L. Weinberger, D.R. Song, H. ve Ming, G.L., (2014). "Modeling a genetic risk for schizophrenia in iPSCs and mice reveals neural stem cell deficits associated with adherens junctions and polarity", *Cell Stem Cell*, 15: 79-91.
- [19] Jarvinen, E. Angers-Loustau, A. Osiceanu, A.M. ve Wartiovaara, K., (2010). "Timing of the cell cycle exit of differentiating hippocampal neural stem cells", *Int J Stem Cells*, 3: 46-53.

- [20] Keilhoff, G. Goihl, A. Stang, F. Wolf, G. ve Fansa, H., (2006). "Peripheral nerve tissue engineering: autologous Schwann cells vs. transdifferentiated mesenchymal stem cells", *Tissue Eng*, 12: 1451-1465.
- [21] Oliveira, J.T. Mostacada, K. de Lima, S. ve Martinez, A.M., (2013). "Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for improving nerve regeneration", *Int Rev Neurobiol*, 108: 59-77.
- [22] Mackay-Sim, A. ve St John, J.A., (2011). "Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries", *Exp Neurol*, 229: 174-180.
- [23] Mackay-Sim, A., (2012). "Concise review: Patient-derived olfactory stem cells: new models for brain diseases", *Stem Cells*, 30: 2361-2365.
- [24] Mackay-Sim, A., (2010). "Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa", *Arch Ital Biol*, 148: 47-58.
- [25] Mackay-Sim, A. Feron, F. Cochrane, J. Bassingthwaighite, L. Bayliss, C. Davies, W. Fronek, P. Gray, C. Kerr, G. Licina, P. Nowitzke, A. Perry, C. Silburn, P.A. Urquhart, S. ve Geraghty, T., (2008). "Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial", *Brain*, 131: 2376-2386.
- [26] Girard, S.D. Deveze, A. Nivet, E. Gepner, B. Roman, F.S. ve Feron, F., (2011). "Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans", *J Vis Exp*.
- [27] Delorme, B. Nivet, E. Gaillard, J. Haupl, T. Ringe, J. Deveze, A. Magnan, J. Sohier, J. Khrestchatisky, M. Roman, F.S. Charbord, P. Sensebe, L. Layrolle, P. ve Feron, F., (2010). "The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties", *Stem Cells Dev*, 19: 853-866.
- [28] Murrell, W. Sanford, E. Anderberg, L. Cavanagh, B. ve Mackay-Sim, A., (2009). "Olfactory stem cells can be induced to express chondrogenic phenotype in a rat intervertebral disc injury model", *Spine J*, 9: 585-594.
- [29] Nivet, E. Vignes, M. Girard, S.D. Pierrisnard, C. Baril, N. Deveze, A. Magnan, J. Lante, F. Khrestchatisky, M. Feron, F. ve Roman, F.S., (2011). "Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions", *J Clin Invest*, 121: 2808-2820.
- [30] Abbasi, M. Salehi, M. Pasbakhsh, P. ve Sobhani, A., (2010). "Repair of spinal cord injury by co-transplantation of embryonic stem cell-derived motor neuron and olfactory ensheathing cell", *J Stem Cells Regen Med*, 6: 81.

- [31] Ao, Q. Wang, A.J. Chen, G.Q. Wang, S.J. Zuo, H.C. ve Zhang, X.F., (2007). "Combined transplantation of neural stem cells and olfactory ensheathing cells for the repair of spinal cord injuries", *Med Hypotheses*, 69: 1234-1237.
- [32] Sun, F. Zhou, K. Mi, W.J. ve Qiu, J.H., (2011). "Repair of facial nerve defects with decellularized artery allografts containing autologous adipose-derived stem cells in a rat model", *Neurosci Lett*, 499: 104-108.
- [33] Allahverdiyev, A.M. Baydar, S.Y. Bagirova, M. ve Findikli, N., (2012). "Microcapillary culture method: a novel tool for in vitro expansion of stem cells from scarce sources", *Arch Med Res*, 43: 423-430.
- [34] Yeung, T.M. Chia, L.A. Kosinski, C.M. ve Kuo, C.J., (2011). "Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche", *Cell Mol Life Sci*, 68: 2513-2523.
- [35] Xie, T., (2013). "Control of germline stem cell self-renewal and differentiation in the *Drosophila* ovary: concerted actions of niche signals and intrinsic factors", *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2: 261-273.
- [36] Song, Y. ve Song, G., (2009). "Stem cell niche and its roles in proliferation and differentiation of stem cells", *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 26: 195-198.
- [37] Xie, S.T. Lu, F. Zhang, X.J. Shen, Q. He, Z. Gao, W.Q. Hu, D.H. ve Yang, H., (2013). "Retinoic acid and human olfactory ensheathing cells cooperate to promote neural induction from human bone marrow stromal stem cells", *Neuromolecular Med*, 15: 252-264.
- [38] Petrova, E.S., (2012). "The use of stem cells to stimulate regeneration of damaged nerve", *Tsitologiya*, 54: 525-540.
- [39] Murdoch, B. ve Roskams, A.J., (2007). "Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology", *J Mol Histol*, 38: 581-599.
- [40] Seidenfaden, R. Desoeuvre, A. Bosio, A. Virard, I. ve Cremer, H., (2006). "Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain", *Mol Cell Neurosci*, 32: 187-198.
- [41] Widgerow, A.D. Salibian, A.A. Lalezari, S. ve Evans, G.R., (2013). "Neuromodulatory nerve regeneration: adipose tissue-derived stem cells and neurotrophic mediation in peripheral nerve regeneration", *J Neurosci Res*, 91: 1517-1524.

- [42] Geuna, S. Perroteau, I. Tos, P. ve Battiston, B., (2013). "Preface. tissue engineering of the peripheral nerve: stem cells and regeneration promoting factors", *Int Rev Neurobiol*, 108: xiii-xiv.
- [43] Scholz, T. Sumarto, A. Krichevsky, A. ve Evans, G.R., (2011). "Neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells for peripheral nerve regeneration in vivo", *Arch Surg*, 146: 666-674.
- [44] Erba, P. Mantovani, C. Kalbermatten, D.F. Pierer, G. Terenghi, G. ve Kingham, P.J., (2010). "Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in peripheral nerve conduits", *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 63: e811-817.
- [45] Donaldson, I.M., (2010). *Cerebri anatome: Thomas Willis and his circle*, *J R Coll Physicians Edinb*, 40: 277-279.
- [46] Finsterer, J., (2008). "Management of peripheral facial nerve palsy", *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 265: 743-752.
- [47] May, M., Brackmann, DE., (1982). *Anatomy, physiology, and testing of the facial nerves*. In: *Neurological surgery of the ear and skull base*, New York. Raven Pres.
- [48] Ahmed, A., (2005). "When is facial paralysis Bell palsy? Current diagnosis and treatment", *Cleve Clin J Med*, 72: 398-401, 405.
- [49] Santos-Lasaosa, S. Pascual-Millan, L.F. Tejero-Juste, C. ve Morales-Asin, F., (2000). "Peripheral facial paralysis: etiology, diagnosis and treatment", *Rev Neurol*, 30: 1048-1053.
- [50] Powers, W.H., (1974). "Peripheral facial paralysis and systemic disease", *Otolaryngol Clin North Am*, 7: 397-405.
- [51] Kerrebijn, J.D. ve Freeman, J.L., (1998). "Facial nerve reconstruction: outcome and failures", *J Otolaryngol*, 27: 183-186.
- [52] Cavoy, R., (2013). "Facial palsy", *Rev Med Brux*, 34: 221-225.
- [53] Sunderland, S. ve Cossar, D.F., (1953). "The structure of the facial nerve", *Anat Rec*, 116: 147-165.
- [54] Adour, K.K., (1982). "Current concepts in neurology: diagnosis and management of facial paralysis", *N Engl J Med*, 307: 348-351.

- [55] Bastard, J. ve Goas, J.Y., (1980). "[Electrophysiological study of the trigeminofacial reflex in certain cases of facial involvement of neurological origin. Peripheral facial paralysis, hemiplegia due to hemispheric lesions (author's transl)]", *Rev Otoneuroophthalmol*, 52: 101-115.
- [56] Henneberg, K., (1995). *Principles of Electromyography, The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition*. Ed. Joseph D. Bronzino.
- [57] Cerrah A. O., E.H., Soylu A. R., (2010). "Spor Bilimlerinde Elektromiyografi Kullanımı", *Spormetre Beden Eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi*, VIII: 43-49.
- [58] Katsumoto, K. Shiraki, N. Miki, R. ve Kume, S., (2010). "Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation", *Dev Growth Differ*, 52: 115-129.
- [59] Liu, Y. Mu, R. Wang, S. Long, L. Liu, X. Li, R. Sun, J. Guo, J. Zhang, X. Yu, P. Li, C. Huang, Z. Wang, D. Li, H. Gu, Z. Liu, B. ve Li, Z., (2010). "Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis", *Arthritis Res Ther*, 12: R210.
- [60] Da Sacco, S. Sedrakyan, S. Boldrin, F. Giuliani, S. Parnigotto, P. Habibian, R. Warburton, D. De Filippo, R.E. ve Perin, L., (2010). "Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications", *J Urol*, 183: 1193-1200.
- [61] de Villiers, J.A. Houreld, N. ve Abrahamse, H., (2009). "Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine", *Stem Cell Rev*, 5: 256-265.
- [62] Moore, K.E. Mills, J.F. ve Thornton, M.M., (2006). "Alternative sources of adult stem cells: a possible solution to the embryonic stem cell debate", *Gend Med*, 3: 161-168.
- [63] Bacigalupo, A. Socie, G. Schrezenmeier, H. Tichelli, A. Locasciulli, A. Fuehrer, M. Risitano, A.M. Dufour, C. Passweg, J.R. Oneto, R. Aljurf, M. Flynn, C. Mialou, V. Hamladji, R.M. ve Marsh, J.C., (2012). "Bone marrow versus peripheral blood as the stem cell source for sibling transplants in acquired aplastic anemia: survival advantage for bone marrow in all age groups", *Haematologica*, 97: 1142-1148.
- [64] Ross, C.A. ve Akimov, S.S., (2014). "Human-induced pluripotent stem cells: potential for neurodegenerative diseases", *Hum Mol Genet*, 23: R17-R26.

- [65] Sousa, B.R. Parreira, R.C. Fonseca, E.A. Amaya, M.J. Tonelli, F.M. Lacerda, S.M. Lalwani, P. Santos, A.K. Gomes, K.N. Ulrich, H. Kihara, A.H. ve Resende, R.R., (2014). "Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications", *Cytometry A*, 85: 43-77.
- [66] Hosseinkhani, M. Shirazi, R. Rajaei, F. Mahmoudi, M. Mohammadi, N. ve Abbasi, M., (2013). "Engineering of the embryonic and adult stem cell niches", *Iran Red Crescent Med J*, 15: 83-92.
- [67] Pittenger, M.F. Mackay, A.M. Beck, S.C. Jaiswal, R.K. Douglas, R. Mosca, J.D. Moorman, M.A. Simonetti, D.W. Craig, S. ve Marshak, D.R., (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells", *Science*, 284: 143-147.
- [68] de Kretser, D., (2007). "Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology", *J Law Med*, 15: 212-218.
- [69] Kent, L., (2009). "Culture and maintenance of human embryonic stem cells", *J Vis Exp*.
- [70] Lanza R., G.J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomson J., ve West M. , (2004). "Handbook of Stem Cells", Amsterdam: Elsevier. Academic Press, Holland, 2.
- [71] Riazzi, A.M. Kwon, S.Y. ve Stanford, W.L., (2009). "Stem cell sources for regenerative medicine", *Methods Mol Biol*, 482: 55-90.
- [72] Einsiedel, E. Premji, S. Geransar, R. Orton, N.C. Thavaratnam, T. ve Bennett, L.K., (2009). "Diversity in public views toward stem cell sources and policies", *Stem Cell Rev*, 5: 102-107.
- [73] Shiraki, N. Ogaki, S. ve Kume, S., (2014). "Profiling of embryonic stem cell differentiation", *Rev Diabet Stud*, 11: 102-114.
- [74] Thomson, J.A. Itskovitz-Eldor, J. Shapiro, S.S. Waknitz, M.A. Swiergiel, J.J. Marshall, V.S. ve Jones, J.M., (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts", *Science*, 282: 1145-1147.
- [75] Stewart, R. Yang, C. Anyfantis, G. Przyborski, S. Hole, N. Strachan, T. Stojkovic, M. Keith, W.N. Armstrong, L. ve Lako, M., (2008). "Silencing of the expression of pluripotent driven-reporter genes stably transfected into human pluripotent cells", *Regen Med*, 3: 505-522.

- [76] Stewart, M.H. Bendall, S.C. ve Bhatia, M., (2008). "Deconstructing human embryonic stem cell cultures: niche regulation of self-renewal and pluripotency", *J Mol Med (Berl)*, 86: 875-886.
- [77] Dhinsa, B.S. Mahapatra, A.N. ve Khan, W.S., (2014). "Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells for Ligament and Tendon Tissue Engineering", *Curr Stem Cell Res Ther*.
- [78] Goessler, U.R. Hormann, K. ve Riedel, F., (2005). "Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery (review)", *Int J Mol Med*, 15: 899-905.
- [79] P, M. S, H. R, M. M, G. ve W, S.K., (2011). "Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature", *Open Orthop J*, 5: 253-260.
- [80] Vaananen, H.K., (2005). "Mesenchymal stem cells", *Ann Med*, 37: 469-479.
- [81] Jaganathan, B.G. ve Bonnet, D., (2012). "Human mesenchymal stromal cells senesce with exogenous OCT4", *Cytotherapy*, 14: 1054-1063.
- [82] Schipani, E. ve Kronenberg, H.M., (2009). Adult mesenchymal stem cells, *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community.
- [83] Siest, G. Medeiros, R. Melichar, B. Stathopoulou, M. Van Schaik, R.H. Cacabelos, R. Abt, P.M. Monteiro, C. Gurwitz, D. Queiroz, J. Mota-Filipe, H. Ndiaye, N.C. ve Visvikis-Siest, S., (2014). "Pharmacogenomics: from cell to clinic (Part 1)", *Pharmacogenomics*, 15: 593-599.
- [84] Siest, G. Medeiros, R. Melichar, B. Stathopoulou, M. Van Schaik, R.H. Cacabelos, R. Abt, P.M. Monteiro, C. Gurwitz, D. Queiroz, J. Mota-Filipe, H. Ndiaye, N.C. ve Visvikis-Siest, S., (2014). "Conference scene: pharmacogenomics: from cell to clinic (part 2)", *Pharmacogenomics*, 15: 739-744.
- [85] Krampera, M. Galipeau, J. Shi, Y. Tarte, K. ve Sensebe, L., (2013). "Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal", *Cytotherapy*, 15: 1054-1061.
- [86] Ding, Y. Lu, Z. Yuan, Y. Wang, X. Li, D. ve Zeng, Y., (2013). "[Comparison of human cord blood mesenchymal stem cell culture between using human umbilical cord plasma and using fetal bovine serum]", *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 30: 1279-1282.

- [87] Li, H. Frith, J. ve Cooper-White, J.J., (2014). "Modulation of stem cell adhesion and morphology via facile control over surface presentation of cell adhesion molecules", *Biomacromolecules*, 15: 43-52.
- [88] Zhou, P. Li, D. Chen, G.H. ve Wang, Y., (2013). "Serum-free culture of umbilical cord mesenchymal stem cells", *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 21: 1256-1260.
- [89] Trivanovic, D. Kocic, J. Mojsilovic, S. Krstic, A. Ilic, V. Djordjevic, I.O. Santibanez, J.F. Jovcic, G. Terzic, M. ve Bugarski, D., (2013). "Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly", *Srp Arh Celok Lek*, 141: 178-186.
- [90] Simoes, I.N. Boura, J.S. dos Santos, F. Andrade, P.Z. Cardoso, C.M. Gimble, J.M. da Silva, C.L. ve Cabral, J.M., (2013). "Human mesenchymal stem cells from the umbilical cord matrix: successful isolation and ex vivo expansion using serum-/xeno-free culture media", *Biotechnol J*, 8: 448-458.
- [91] Qiao, S.M. Chen, G.H. Wang, Y. ve Wu, D.P., (2012). "Ultrastructure of human umbilical cord mesenchymal stem cells", *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 20: 443-447.
- [92] Harvanova, D. Tothova, T. Sarissky, M. Amrichova, J. ve Rosocha, J., (2011). "Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells", *Folia Biol (Praha)*, 57: 119-124.
- [93] Placzek, M.R. Chung, I.M. Macedo, H.M. Ismail, S. Mortera Blanco, T. Lim, M. Cha, J.M. Fauzi, I. Kang, Y. Yeo, D.C. Ma, C.Y. Polak, J.M. Panoskaltsis, N. ve Mantalaris, A., (2009). "Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles", *J R Soc Interface*, 6: 209-232.
- [94] Lin, T. Islam, O. ve Heese, K., (2006). "ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis--a different perspective", *Cell Res*, 16: 857-871.
- [95] Song, L. Webb, N.E. Song, Y. ve Tuan, R.S., (2006). "Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency", *Stem Cells*, 24: 1707-1718.
- [96] Gorka, B. Skubis-Zegadlo, J. Mikula, M. Bardadin, K. Paliczka, E. ve Czarnocka, B., (2007). "NrCAM, a neuronal system cell-adhesion molecule, is induced in papillary thyroid carcinomas", *Br J Cancer*, 97: 531-538.
- [97] Vambutas, A. DeVoti, J. Goldofsky, E. Gordon, M. Lesser, M. ve Bonagura, V., (2009). "Alternate splicing of interleukin-1 receptor type II (IL1R2) in vitro correlates with clinical glucocorticoid responsiveness in patients with AIED", *PLoS One*, 4: e5293.

- [98] Tanabe, S. Sato, Y. Suzuki, T. Suzuki, K. Nagao, T. ve Yamaguchi, T., (2008). "Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture", *J Biochem*, 144: 399-408.
- [99] Korbaling, M. ve Anderlini, P., (2001). "Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?", *Blood*, 98: 2900-2908.
- [100] Domanska-Janik, K. Buzanska, L. ve Lukomska, B., (2008). "A novel, neural potential of non-hematopoietic human umbilical cord blood stem cells", *Int J Dev Biol*, 52: 237-248.
- [101] Peretto, P. ve Paredes, R.G., (2014). *Social Cues, Adult Neurogenesis, and Reproductive Behavior*.
- [102] Duan, X. Kang, E. Liu, C.Y. Ming, G.L. ve Song, H., (2008). "Development of neural stem cell in the adult brain", *Curr Opin Neurobiol*, 18: 108-115.
- [103] Sauerzweig, S. Munsch, T. Lessmann, V. Reymann, K.G. ve Braun, H., (2009). "A population of serum deprivation-induced bone marrow stem cells (SD-BMSC) expresses marker typical for embryonic and neural stem cells", *Exp Cell Res*, 315: 50-66.
- [104] Gage, F.H. ve Temple, S., (2013). "Neural stem cells: generating and regenerating the brain", *Neuron*, 80: 588-601.
- [105] Yi, B.R. Kim, S.U. ve Choi, K.C., (2013). "Development and application of neural stem cells for treating various human neurological diseases in animal models", *Lab Anim Res*, 29: 131-137.
- [106] Silva-Vargas, V. Crouch, E.E. ve Doetsch, F., (2013). "Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging", *Curr Opin Neurobiol*, 23: 935-942.
- [107] Viktorov, I.V. Savchenko, E.A. Ukhova, O.V. Alekseyeva, N.Y. ve Chekhonin, V.P., (2006). "Multipotent stem and progenitor cells of the olfactory epithelium", *Bull Exp Biol Med*, 142: 495-502.
- [108] Rawson, N.E. ve LaMantia, A.S., (2007). "A speculative essay on retinoic acid regulation of neural stem cells in the developing and aging olfactory system", *Exp Gerontol*, 42: 46-53.
- [109] Marshall, C.T. Lu, C. Winstead, W. Zhang, X. Xiao, M. Harding, G. Klueber, K.M. ve Roisen, F.J., (2006). "The therapeutic potential of human olfactory-derived stem cells", *Histol Histopathol*, 21: 633-643.

- [110] Beites, C.L. Kawauchi, S. Crocker, C.E. ve Calof, A.L., (2005). "Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium", *Exp Cell Res*, 306: 309-316.
- [111] Alvarez-Buylla, A. Kohwi, M. Nguyen, T.M. ve Merkle, F.T., (2008). "The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche", *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 73: 357-365.
- [112] de Chevigny, A. ve Lledo, P.M., (2006). "Olfactory bulb neurogenesis and its neurological impact", *Med Sci (Paris)*, 22: 607-613.
- [113] Coronas, V., (2009). "Endogenous regulation of neural stem cells in the adult mammalian brain", *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 9: 110-118.
- [114] Tepavcevic, V. Lazarini, F. Alfaro-Cervello, C. Kerninon, C. Yoshikawa, K. Garcia-Verdugo, J.M. Lledo, P.M. Nait-Oumesmar, B. ve Baron-Van Evercooren, A., (2011). "Inflammation-induced subventricular zone dysfunction leads to olfactory deficits in a targeted mouse model of multiple sclerosis", *J Clin Invest*, 121: 4722-4734.
- [115] Brann, J.H. ve Firestein, S.J., (2014). "A lifetime of neurogenesis in the olfactory system", *Front Neurosci*, 8: 182.
- [116] Cave, J.W. Wang, M. ve Baker, H., (2014). "Adult subventricular zone neural stem cells as a potential source of dopaminergic replacement neurons", *Front Neurosci*, 8: 16.
- [117] Braun, S.M. ve Jessberger, S., (2014). "Adult neurogenesis and its role in neuropsychiatric disease, brain repair and normal brain function", *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40: 3-12.
- [118] Diaz-Guerra, E. Pignatelli, J. Nieto-Estevez, V. ve Vicario-Abejon, C., (2013). "Transcriptional regulation of olfactory bulb neurogenesis", *Anat Rec (Hoboken)*, 296: 1364-1382.
- [119] Sequerra, E.B. Costa, M.R. Menezes, J.R. ve Hedin-Pereira, C., (2013). "Adult neural stem cells: plastic or restricted neuronal fates?", *Development*, 140: 3303-3309.
- [120] Porlan, E. Perez-Villalba, A. Delgado, A.C. ve Ferron, S.R., (2013). "Paracrine regulation of neural stem cells in the subependymal zone", *Arch Biochem Biophys*, 534: 11-19.
- [121] Kohman, R.A. ve Rhodes, J.S., (2013). "Neurogenesis, inflammation and behavior", *Brain Behav Immun*, 27: 22-32.

- [122] Kuwabara, T. ve Asashima, M., (2012). "Regenerative medicine using adult neural stem cells: the potential for diabetes therapy and other pharmaceutical applications", *J Mol Cell Biol*, 4: 133-139.
- [123] Curtis, M.A. Monzo, H.J. ve Faull, R.L., (2009). "The rostral migratory stream and olfactory system: smell, disease and slippery cells", *Prog Brain Res*, 175: 33-42.
- [124] Breton-Provencher, V. Lemasson, M. Peralta, M.R., 3rd ve Saghatelian, A., (2009). "Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors", *J Neurosci*, 29: 15245-15257.
- [125] Nagahara, Y., (1940). "Experimentelle studien uber die histologischen veränderungen des Geruchsorgans nach der olfactoriusdurchschneidung", *Jap. J. Med .Sci*, 5.
- [126] Schultz, E.W., (1941). "Regeneration of olfactory cells", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46: 41-43.
- [127] Nadi, N.S. Head, R. Grillo, M. Hempstead, J. Grannot-Reisfeld, N. ve Margolis, F.L., (1981). "Chemical deafferentation of the olfactory bulb: plasticity of the levels of tyrosine hydroxylase, dopamine and norepinephrine", *Brain Res*, 213: 365-377.
- [128] Baker, H. ve Farbman, A.I., (1993). "Olfactory afferent regulation of the dopamine phenotype in the fetal rat olfactory system", *Neuroscience*, 52: 115-134.
- [129] Mackay-Sim, A. ve Silburn, P., (2008). "Stem cells and genetic disease", *Cell Prolif*, 41 Suppl 1: 85-93.
- [130] Feron, F. Perry, C. Cochrane, J. Licina, P. Nowitzke, A. Urquhart, S. Geraghty, T. ve Mackay-Sim, A., (2005). "Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury", *Brain*, 128: 2951-2960.
- [131] Graziadei, P.P. ve DeHan, R.S., (1973). "Neuronal regeneration in frog olfactory system", *J Cell Biol*, 59: 525-530.
- [132] Michel, D. Moyse, E. Brun, G. ve Jourdan, F., (1994). "Induction of apoptosis in mouse [correction of rat] olfactory neuroepithelium by synaptic target ablation", *Neuroreport*, 5: 1329-1332.

- [133] Holcomb, J.D. Mumm, J.S. ve Calof, A.L., (1995). "Apoptosis in the neuronal lineage of the mouse olfactory epithelium: regulation in vivo and in vitro", *Dev Biol*, 172: 307-323.
- [134] Deckner, M.L. Risling, M. ve Frisen, J., (1997). "Apoptotic death of olfactory sensory neurons in the adult rat", *Exp Neurol*, 143: 132-140.
- [135] Miller, M.J., (2003). "Cryopreservation of adult stem cells derived from lipos aspirate", *Plast Reconstr Surg*, 111: 2466-2468.
- [136] Fleming, K.K. ve Hubel, A., (2006). "Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells", *Transfus Apher Sci*, 34: 309-315.
- [137] Renzi, S. Lombardo, T. Dotti, S. Dessi, S.S. De Blasio, P. ve Ferrari, M., (2012). "Mesenchymal stromal cell cryopreservation", *Biopreserv Biobank*, 10: 276-281.
- [138] Hu, K.X. Wang, M.H. Fan, C. Wang, L. Guo, M. ve Ai, H.S., (2011). "CM-Dil labeled mesenchymal stem cells homed to thymus inducing immune recovery of mice after haploidentical bone marrow transplantation", *Int Immunopharmacol*, 11: 1265-1270.
- [139] Holliday, M.A. ve Davison, S.P., (2014). "Use of polyglycolic acid nerve conduit (neurotube) to alleviate pedicle kinking in microvascular anastomosis", *Plast Reconstr Surg*, 133: 241e-242e.
- [140] Barr, J.S. Katz, K.A. ve Hazen, A., (2011). "Surgical management of facial nerve paralysis in the pediatric population", *J Pediatr Surg*, 46: 2168-2176.
- [141] Deveze, A. ve Paris, J., (2006). "[Facial paralysis: functional and aesthetic rehabilitation techniques]", *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*, 127: 91-96.
- [142] Vlastou, C., (2006). "Facial paralysis", *Microsurgery*, 26: 278-287.
- [143] Sidle, D.M. ve Simon, P., (2013). "State of the art in treatment of facial paralysis with temporalis tendon transfer", *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 21: 358-364.
- [144] Zhang, C. ve Wan, J., (2011). "[Analysis of evidence-based clinical practices on timing factor in acupuncture treatment for facial paralysis]", *Zhongguo Zhen Jiu*, 31: 93-96.
- [145] Tos, T. ve Krag, C., (2001). "Surgical treatment of sequelae after facial paralysis", *Ugeskr Laeger*, 163: 5647-5651.

- [146] Riordan, M., (2001). "Investigation and treatment of facial paralysis", Arch Dis Child, 84: 286-288.
- [147] Barker, R.A., (2012). "Stem cells and neurodegenerative diseases: where is it all going?", Regen Med, 7: 26-31.
- [148] Gincberg, G. Arien-Zakay, H. Lazarovici, P. ve Lelkes, P.I., (2012). "Neural stem cells: therapeutic potential for neurodegenerative diseases", Br Med Bull, 104: 7-19.
- [149] Dantuma, E. Merchant, S. ve Sugaya, K., (2010). "Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases", Stem Cell Res Ther, 1: 37.
- [150] Guo, B.F. ve Dong, M.M., (2009). "Application of neural stem cells in tissue-engineered artificial nerve", Otolaryngol Head Neck Surg, 140: 159-164.
- [151] He, N. Zhang, L. Cui, J. ve Li, Z., (2014). "Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells", Bone Marrow Res, 2014: 128436.
- [152] Kaewsuwan, S. Song, S.Y. Kim, J.H. ve Sung, J.H., (2012). "Mimicking the functional niche of adipose-derived stem cells for regenerative medicine", Expert Opin Biol Ther, 12: 1575-1588.
- [153] Feron, F. Perry, C. Girard, S.D. ve Mackay-Sim, A., (2013). "Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa", Methods Mol Biol, 1059: 107-114.
- [154] Lindsay, S.L. Johnstone, S.A. Mountford, J.C. Sheikh, S. Allan, D.B. Clark, L. ve Barnett, S.C., (2013). "Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro", Glia, 61: 368-382.
- [155] Wetzig, A. Mackay-Sim, A. ve Murrell, W., (2011). "Characterization of olfactory stem cells", Cell Transplant, 20: 1673-1691.
- [156] Ess, K.C., (2013). "Patient heal thyself: modeling and treating neurological disorders using patient-derived stem cells", Exp Biol Med (Maywood), 238: 308-314.
- [157] Lin, C.S. Xin, Z.C. Dai, J. ve Lue, T.F., (2013). "Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges", Histol Histopathol, 28: 1109-1116.
- [158] Dominici, M. Le Blanc, K. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, I. Marini, F. Krause, D. Deans, R. Keating, A. Prockop, D. ve Horwitz, E., (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement", Cytotherapy, 8: 315-317.

- [159] Lin, C.S. Ning, H. Lin, G. ve Lue, T.F., (2012). "Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells?", *Cytotherapy*, 14: 1159-1163.
- [160] Martinez, C. Hofmann, T.J. Marino, R. Dominici, M. ve Horwitz, E.M., (2007). "Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs", *Blood*, 109: 4245-4248.
- [161] Gonzales-Roybal, G. ve Lim, D.A., (2013). "Chromatin-based epigenetics of adult subventricular zone neural stem cells", *Front Genet*, 4: 194.
- [162] Palmer, T.D., (2002). "Adult neurogenesis and the vascular Nietzsche", *Neuron*, 34: 856-858.
- [163] Li, Y. ve Ma, T., (2012). "Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells", *Biores Open Access*, 1: 205-214.
- [164] Toptaş, H., (2014). Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanılmak Üzere Mezenkimal Kök Hücreler İle Poli (ε-Kaprolakton) Scaffold Arasındaki Etkileşimin İncelenmesi Ve 3D Doku Modelinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [165] Toussaint, C.P. Perry, E.C., 3rd Pisansky, M.T. ve Anderson, D.E., (2010). "What's new in the diagnosis and treatment of peripheral nerve entrapment neuropathies", *Neurol Clin*, 28: 979-1004.
- [166] Hughes, R., (2005). "Treatment of peripheral nerve disorders", *Curr Opin Neurol*, 18: 554-556.
- [167] Edshage, S., (1968). "Peripheral nerve injuries--diagnosis and treatment", *N Engl J Med*, 278: 1431-1436.
- [168] Brown, H.A. ve Brown, B.A., (1967). "Treatment of peripheral nerve injuries", *Rev Surg*, 24: 1-8.
- [169] di Summa, P.G. Kingham, P.J. Raffoul, W. Wiberg, M. Terenghi, G. ve Kalbermatten, D.F., (2010). "Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration", *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 63: 1544-1552.

EK

Etik Kurul Belgeleri

BEZMİALEM

T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2012/ 32
KONU: So. Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV 30.11.2012

Sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV,

Bağlı: "İnsan Olfaktor Kök Hücrelerin İzolasyonu Kültürünün Yapılması Karakterizasyonu ve Hasar Görmüş Fasial Sınır Hücrelerinin (Ratlarda) İyileşmesinde Etkisinin İncelenmesi" olan projenin 27.11.2012 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Ufuk Kılıç
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet Beke
Üye

Prof. Dr. Sedat Öpner
Üye

Prof. Dr. Erhan Aysan
Üye

Yrd. Doç. Dr. Mahmut Gürkan
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer Uysal
Üye

Uzm. Vet. Fik. Özgür İnan
Üye

Muhsin Ceylan
Üye

Alihan İnan
Üye

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İstanbul Eğitim Ve Araştırma Hastanesi
Baştabipliği

Sayı : B.10.4 ISM.04.34.5922-
HİZMETE ÖZEL

Konu : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
(Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV)

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ'NE
(Biyomühendislik Bölümü)

Üniversiteniz Biyomühendislik Bölümü Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'in sorumlu araştırmacılığını üstlendiği "İnsan Olfaktor Kök Hücrelerin İzolasyonu Kültürünün Yapılması Karakterizasyonu ve Hasar Görmüş Fasial Sınır Hücrelerinin (Ratlarda) İyileşmesinde Etkisinin İncelenmesi" başlıklı başvuru dosyası incelenmiş olup, Hastanemiz Sekreteryası Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 02/12/2011 tarih ve 20 sayılı kararı karar örneği ekte sunulmuştur.

Gereğini arz ederim.

Doç. Dr. Ramazan DANSUK
İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Ek : 1 Adet Karar Örneği

ASLI GÖRÜLÜP
DİKKETİNE
ALINDI

S.B. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Genel Tıbbi Gözetim
Tarih: 13.12.2011 Sayı: 22758
Müh. Göz. Gözetim
GÖNDEREN BİRİM ETİK KURULU

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Olga Nehir ÖZTEL
Doğum Tarihi ve Yeri :06.07.1982 - İstanbul
Yabancı Dili :İngilizce, Almanca
E-posta :onoztel@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2010
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Haliç Üniversitesi	2005
Lise	Fen-Matematik	Bahçelievler Anadolu Lisesi	2000

YAYINLARI

Makale

- 1.Allahverdiyev A., Bağirova M., Çakır Koç R., Elcicek S., Oztel O., Canım Ates S., Abamor E. S., Yesilkir Baydar S., Utility of The Microculture Methodüzeltme in Non-Invasive Samples Obtained from An Experimental Murine Model With Asymptomatic Leishmaniasis, American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, [2012)
- 2.Canım-Ates S., Bagirova M., Allahverdiyev A.M., Yesilkir-Baydar S., Cakir-Koc R., Elcicek S., Abamor E.S and Oztel O.N., Detection of Antileishmanial Antibodies In Blood Sampled From Blood Bank Donors in Istanbul, Future Microbiology, [2012)

3. Allahverdiyev A., Bagirova M., Elcicek S., Oztel ON., Cakir Koc R., Novruzova M., Canim Ates S., Growth of Leishmania tropica Promastigotes in Urine Samples of Different Genders and the Role of Citrate in Culture, Romanian Biotechnological Letters, Vol.17, Issue 1, [2012)
4. Allahverdiyev A. M., Bagirova M., Elcicek S., Koc R. C., Oztel O. N., Effect of human urine on cell cycle and infectivity of leishmania species promastigotes *in vitro*, Am J Trop Med Hyg., Vol.85, Issue 4, pp. 639-643, [2011)
5. Allahverdiyev A. M., Bagirova M., Elcicek S., Cakir Koc R., Yesilkir Baydar S., Findikli S., Oztel O. N., Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis, American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, Vol.85, Issue 3, [2011)
6. Allahverdiyev A. M., Koc R. C., Ates S. C., Bagirova M., Elcicek S., Oztel O. N., Leishmania tropica: The effect of darkness and light on biological activities *in vitro*, Experimental Parasitology, Vol.128, Issue 4, pp. 318-23, [2011)
7. Allahverdiyev A., Bağirova M., Çakır-Koç R., Öztel O.N., Elçiçek S., Canım-Ateş S., Karaca T.D, Leishmaniasise Karşı Aşı Geliştirilmesinde Yaklaşımlar ve Problemler, Türkiye Parazitoloj Derg. 2010, 2[34];. 122-130

Bildiriler

1. Allahverdiyev A., Bagirova M., Elcicek S. , Oztel O. N., Cakir R., Novruzova M., The Effect of Urine Samples of Different Genders on Growth of L.tropica Promastigotes, Eurasia Congress of Infectious Diseases [EACID), pp. 176, [2009)
2. O. N. Oztel, Cakir R., S. Yesilkir, M. Bagirova, A. M. Allahverdiyev. Investigation of Interaction between Adipocyte Stem Cells and PEG, 15th International Biomedical Science and Technology Symposium; 16-19 August 2009, Cyprus, p. 130
3. Allahverdiyev A., Bagirova M., Elcicek S., Cakir R., Oztel O.N. , The Study Of Viability Of Leishmania Promastigotes Under The Light Conditions *In vitro* , 4th World Congress on Leishmaniasis, 03-07 February 2009, India.
4. Bagirova M., Allahverdiyev A., Oztel O.N, Elcicek S., Cakir R, Influence Of Human Urine On Development Of L.Tropica *In Vitro* 4th World Congress on Leishmaniasis, 03-07 February 2009, India.
5. Bagirova M., Oztel O.N., Elcicek S., Cakir R., Necati Fındıklı “Isolation and cultivation of mezenchymal stem cells obtained from cord blood. International Conference for the 85. Birthday of Professor Tagizade, page: 82-85, December 2008, Baku Azerbaijan
6. Bagirova M, Cakir R, Elcicek S, Novruzova M, Oztel O.N, “The importance of Flow Cytometer on Leishmania studies” International Conference for the 85. Birthday of Professor Tagizade, page: 82-85, December 2008, Baku Azerbaijan [Tur)
7. Rabia Çakır, Olga Nehir Öztel, Sezen Canım-Ateş, Serhat Elçiçek, Melahat Bağirova, “Büyük Ölçekte Leishmania Parazitlerinin Üretilmesi: Kademeli Büyütme Yöntemi” 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye.
8. Öztel O.N., Elçiçek S., Çakır R., Bağirova M., Allahverdiyev A. “İnsan Kaynaklı Atık Maddelerin Leishmanial Biyomasın Elde Edilmesinde Destek Materyali Olarak

Kullanılmasının İncelenmesi” 4.Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir.

9.Elçiçek S., Bağirova M., Öztel O.N., Çakır R., Allahverdiyev A., “Işığa Maruz Kalmış Farklı Doku Kültürü Besiyerlerinin Hücre Kültürü Üzerine Etkisinin İncelenmesi” 4.Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir.

Kitap

1.Allahverdiyev AM, Bağirova M, Öztel ON, Yaman S, Abamor ES, Koc RC, Ates SC, Elcicek S, Baydar SY., *Aldehyde Dehydrogenase: Cancer And Stem Cells*, [2012] p:3-22.

2.Allahverdiyev AM, Bağirova M, Elcicek S, Koc RC, Ates SC, Baydar SY, Yaman S, Abamor ES, Öztel ON., *A Problem in Treatment of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase [G6PD) Deficient Patients Infected with Malaria*, [2012] p: 66-82.

Proje

1. Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEY yürütücülüğünde “Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Hepatosit Hücrelerine Farklılaşmasının Optimizasyonu” Yardımcı araştırmacı (Proje No: 2010-06-01 - 2013-06-01)
1. İnsan Olfaktör Kök Hücrelerin İzolasyonu Kültürünün Yapılması Karakterizasyonu Ve Hasar Görmüş Fasiyal Sinir Hücrelerinin (Ratlarda) İyileşmesinde Etkisinin İncelenmesi (Proje No: 2012-04-01)
2. Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEY yürütücülüğünde "Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: LPG-polimer konjugatları", TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu 1001 nolu proje, Proje No: 108S170, Bursiyer Araştırmacı 2008–2011.
3. Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA yürütücülüğünde “İstanbul’daki Kan Merkezlerinden Elde Edilen Donör Kan Örneklerinde, Yeni ve Klasik Tanı Yöntemleri ile Leishmania’nın İncelenmesi”, Proje No: 29-07-04-02, Yardımcı araştırmacı (Başvuru Tarihi 14.11.2008)
4. Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular, Şemsiye Proje, Proje No: 25-DPT-07-04-01, 2004 -2008

ÖDÜLLERİ

Ayşegül Batıoğlu Karaaltın, Mehmet Veli Karaaltın, **Olga Nehir Öztel**, Ercüment Ovalı, Belit Merve Şener, Turgut Adatepe, Özgür Yiğit, Erol Bozkurt, Serap Yeşilkır Baydar, Melahat Bağirova, Nurten Uzun, Adil Allahverdiyev. “Hasarlanmış Rat Fasiyal Sinir Rekonstrüksiyonunda İnsan Olfaktör Bölge Nöronal Kök Hücre Uygulaması” 35. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi. 02-06 Kasım Antalya. Baş Boyun Cerrahisi En İyi Araştırma 1.’lik Ödülü.