



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**FASİYAL SİNİR REJENERASYONU VE
REMİYELİNİZASYONUNDA KÖK HÜCRE VE D
VİTAMİNİ UYGULAMASININ ROLÜ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Onur NURSAÇAN

KAYSERİ – 2019



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**FASİYAL SİNİR REJENERASYONU VE
REMİYELİNİZASYONUNDA KÖK HÜCRE VE D
VİTAMİNİ UYGULAMASININ ROLÜ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Onur NURSAÇAN

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet İlhan ŞAHİN

KAYSERİ – 2019

TEŞEKKÜR

Öncelikle, geçirdiğim beş yıllık asistanlık eğitimimde, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, zor çalışma şartları altında, sanatını titizlik ve özveri ile yapan bir ekibin çalışanı olmanın gururunu yaşamaktayım.

Tezin oluşmasını sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocam Prof. Dr. Mustafa Erkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç içerisinde desteklerini eksik etmeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Yaşar Ünlü'ye, Prof. Dr. İbrahim Ketenci'ye, Prof. Dr. Mehmet Akif Somdaş'a, Prof. Dr. Sedat Çağlı'ya, Prof. Dr. İmdat Yüce'ye, Dr. Öğr. Üyesi Alperen Vural 'a, Doç. Dr. Mehmet Yaşar'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın yönteminin oluşturulmasında, kök hücre temini ve uygulanmasında yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Burçin Gönen'e, elektrofizyoloji çalışmalarını birlikte yürüttüğüm kıymetli ağabeyim Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih Yetkin'e, histoloji kesitlerinin alınması ve yorumlanmasını gerçekleştiren Doç. Dr. Arzu Yay ve Arş. Gör. Dr. Gözde Özge Önder'e, sinir hasarı uyguladığımız cihazın tasarımını sağlayan makine mühendisi Dr. Öğr. Üyesi Şaban Murat Ünlü'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezin bilimsel olarak dökümanite edilmesinde büyük emeği olan, çalıştığım uzmanlık dalını sevdiren, bilgi ve becerisinin yanında, şahsiyet olarak da kendime örnek edindiğim kıymetli ağabeyim Dr. Öğr. Üyesi Mehmet İlhan Şahin'e gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında emeklerini esirgemeyen, sevgili dostlarım Dr. Furkan Şan, Dr. Sinan Akdeniz ve Dr. Veli Çetinaslan'a ve ekip olarak birlikte çalıştığımız asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştiren, eğitimim sırasında maddi ve manevi destek olan anne ve babama, varlığından huzur duyduğum sevgili eşim ve oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Onur NURSAÇAN

KAYSERİ-2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ	v
RESİM ve GRAFİK LİSTESİ	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. FASİYAL SİNİR ANATOMİSİ.....	3
2.1.1. Supranükleer Fasiyal Sinir Anatomisi	3
2.1.2. Nükleer Fasiyal Sinir Anatomisi.....	4
2.1.3. İnfranükleer fasiyal sinir anatomisi.....	4
2.1.3.1. İntrakraniyal kısım (Serebellopontin köşe).....	4
2.1.3.2. İntratemporal kısım	5
2.1.3.2.1. İnternal akustik kanal (meatal segment)	5
2.1.3.2.2. Fallop kanalı.....	5
2.1.3.3. Ekstratemporal Kısım.....	7
2.2. FASİYAL SİNİR FİZYOLOJİSİ.....	7
2.2.1. Özel visseral afferent lifler	7
2.2.2. Genel somatik afferent lifler	8
2.2.3. Genel visseral efferent lifler.....	8
2.2.4. Özel visseral efferent lifler.....	8
2.3. FASİYAL SİNİR HİSTOLOJİSİ.....	8
2.3.1. Sinirdeki lezyon	9
2.3.1.1. Nöropraksi.....	9
2.3.1.2. Aksonotimezis.....	9

2.3.1.3. Endonörotomezis	10
2.3.1.4. Perinörotomezis	10
2.3.1.5. Nörotomezis	10
2.4. PERİFERİK SİNİR DEJENERASYONU VE REJENERASYONU	11
2.5. FASİYAL PARALİZİ.....	12
2.5.1. Travmatik fasiyal paralizi	12
2.5.2. Deneysel fasiyal paralizi	13
2.5.3. Fasiyal paralizili hastaların değerlendirilmesinde kullanılan testler	14
2.5.3.1. Lezyonun yerinin tespitinde kullanılan testler	14
2.5.3.2. Prognostik Testler	15
2.6. KÖK HÜCRELER	16
2.6.1. Kök hücrelerin elde edildikleri kaynaklar.....	17
2.6.1.1. Embriyonel kök hücreler.....	17
2.6.1.2. Fetal Kök Hücreler.....	17
2.6.1.3. Erişkin kök hücreler	17
2.6.1.3.1. Mezenkimal kök hücreler.....	17
2.6.1.3.2. Nöronal kök hücreler.....	18
2.6.1.3.3. Dental pulpa kök hücreleri	18
2.7. PERİFERİK SİNİR HASARINDA KÖK HÜCRE KULLANIMI.....	18
2.8. D VİTAMİNİ	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. DENEY HAYVANLARI	22
3.2. SENSÖRLÜ KLEMP TASARIMI	22
3.3. CERRAHİ İŞLEMLER.....	23
3.4. DENEK GRUPLARI ve TEDAVİ	24
3.5. KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU	28
3.6. DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ.....	29
3.6.1. Göz kapama performans analizi.....	29
3.6.2. Elektromiyografi (EMG).....	30

3.6.3. Histolojik analiz	33
3.6.4. İstatistiksel analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. ADİPOZ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYON VE KARAKTERİZASYONU	35
4.2. GÖZ KAPATMA PERFORMANS ANALİZİ	37
4.3. ELEKTROMİYOGRAFİK ANALİZ (EMG)	39
4.4. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME	41
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	55
KABUL ONAY	65

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1.	Göz kapatma refleksi değerlendirme skalası.....	29
Tablo 2.	Fonksiyonel iyileşme sonuçları.....	37
Tablo 3.	EMG sonuçları.	40
Tablo 4.	Histoloji sonuçları.	42
Şekil 1.	Bir periferik sinirin histolojik yapısı	9
Şekil 2.	Sinir hasarı sınıflandırması.....	10
Şekil 3.	Rat fasiyal sinir şematik gösterimi	14
Şekil 4.	EMG grafiği.....	32
Şekil 5.	Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri ile karakterizasyonu.....	36

RESİM ve GRAFİK LİSTESİ

Resim 1.	Sensörlü klemp sistemi	23
Resim 2.	Sıçan fasiyal sinir anatomisi.	25
Resim 3.	Cerrahi işlem hazırlığı ve başlangıcı	26
Resim 4.	Ekstratemporal fasiyal sinir dalları ve ana trunkusu.....	26
Resim 5.	Fasiyal sinir hasarı.	27
Resim 6.	Adipoz doku kaynaklı kök hücre uygulaması ve işlemin sonlandırılması.....	27
Resim 7.	EMG cihazı.	31
Resim 8.	Deney hayvanlarına EMG uygulaması.....	31
Resim 9.	EMG elektrodlarının montajı.....	32
Resim 10.	Sinir lifi histolojik kesiti.	34
Resim 11.	Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin mikroskopik görüntüsü	35
Resim 12.	Oil-red-O boyama ile grupların örnek sinir kesitleri.	43
Grafik 1.	Fonksiyonel iyileşme sonuçları	39
Grafik 2.	EMG sonuçları, BKAP amplitüd değerleri	40
Grafik 3.	EMG sonuçları, BKAP latans süreleri.	41
Grafik 4.	Histoloji Sonuçları, akson sayıları	44

KISALTMALAR LİSTESİ

ADKMKH	: Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain derived neurotrophic factor)
BKAP	: Bileşik kas aksiyon potansiyeli
CNTF	: Siliyer nörotrofik faktör (Ciliary neurotrophic factor)
dB	: Desibel
DKY	: Dış kulak yolu
EMG	: Elektromiyografi
ENOG	: Elektronörografi
FBS	: Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
FDA	: Gıda ve ilaç dairesi (Food and drug administration)
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor)
GDNF	: Glial hücre serisi kaynaklı nörotrofik faktör (Glial cell line derived neurotrophic factor)
IU	: Uluslararası birim (International unit)
İAK	: İnternal akustik kanal
MKH	: Mezenkimal kök hücre
NET	: Sinir uyarı testi (Nerve excitability test)
NGF	: Sinir büyüme faktörü (Nerve growth factor)
NT-3	: Nörotrofin-3
NT-4/5	: Nörotrofin-4/5
NT-6	: Nörotrofin-6
PBS	: Fosfat tamponlu salin (Phosphate buffer saline)
SD	: Standart deviasyon
SH	: Schwann hücre
SPK	: Serebellopontin köşe
Th1	: Tip 1 T hücreleri
Th2	: Tip 2 T hücreleri
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (ADKMKH) ve kolekalsiferolün (Vitamin D3, aktif form) fasiyal sinirin rejenerasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 32 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanların sağ fasiyal sinirleri diseke edilerek, sinirin ana trunkusu sensörlü bir cihazla, 60 saniye sıkıştırılarak her hayvana standart bir ezilme hasarı oluşturuldu. Hayvanlar eşit olarak dört gruba ayrıldı: Grup 1 (pozitif kontrol grubu): Hasar bölgesine serum fizyolojik uygulandı; aynı hayvanların sol fasiyal sinirleri sham grubu (negatif kontrol grubu) olarak değerlendirildi. Grup 2: Dört hafta boyunca oral kolekalsiferol (3500 IU/kg/hafta) verildi. Grup 3: Hasar bölgesine 1×10^6 ADKMKH ve Grup 4: Hasar bölgesine 1×10^6 ADKMKH ve dört hafta boyunca oral kolekalsiferol (3500 IU / kg / hafta) kombine olarak uygulandı.

Sinir rejenerasyonu: Fonksiyonel olarak göz kapatma refleksinin haftalık takibi ve dört hafta sonra EMG (sinir ileti çalışması) ile; histolojik olarak ise, dört haftanın sonunda sinir kesitindeki akson sayısı ve miyelinli akson çapının analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: Fonksiyonel değerlendirmede en hızlı iyileşme Grup 3 ve Grup 4' te izlendi ($p < 0.05$). EMG' de kontrol grubuna göre, bütün deney gruplarının bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) amplitüdü anlamlı yüksek ve BKAP latansı anlamlı kısa olarak saptandı ($p < 0.05$). EMG' ye göre rejenerasyon açısından en iyi sonuçlar Grup 3 ve 4' te elde edildi. Histolojik değerlendirilmede, en iyi aksonal morfolometri ve miyelinizasyon Grup 4' te saptandı ($p < 0.05$); Grup 2 ve 3' ün sonuçları ise kontrol grubuna göre daha iyi olmakla birlikte aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Sonuç: Deneysel fasiyal sinir ezilme hasarında, ADKMKH uygulaması ve kolekalsiferol ile kombine tedavisi, sinir rejenerasyonunu ve remiyelinizasyonunu, fonksiyonel, elektrofizyolojik ve histolojik olarak artırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: mezenkimal kök hücre; fasiyal sinir; sinir rejenerasyonu; kolekalsiferol.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of the adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) and cholecalciferol (active form of vitamin D3) treatment on axonal regeneration of facial nerve and recovery of the nerve function.

Materials-Methods: Unilateral (right side) facial nerves of 32 rats were dissected and clamped for 60 seconds to obtain a standard crush injury by a newly developed device with sensor in this prospective, randomized study. Animals were divided equally into four groups: non-treated control group (*group 1*), weekly oral bolus of cholecalciferol (3500 IU/kg/week) (*group 2*), 1×10^6 ADMSCs-treated (*group 3*) and combined ADMSC and cholecalciferol treated group (*group 4*). ADMSCs were isolated and characterization of cells was performed by Flow Cytometry. Functional (eyelid closure movements) and electromyographic recovery (latency and evoked compound muscle action potential) were recorded at four weeks postoperatively. Histologically, the spectra of fiber diameter, and number of axon of the nerve were analyzed.

Results: The fastest improvement in functional evaluation was observed in Group 3 and Group 4 ($p < 0.05$). In the EMG, CMAP amplitude was significantly higher and CMAP latency was significantly short in all experimental groups compared to the control group ($p < 0.05$). Regarding the regeneration according to EMG, the best results were obtained in Groups 3 and 4. In histological evaluation, the best axonal morphometry and myelination were found in Group 4 ($p < 0.05$); The results of group 2 and 3 were better than control group, but the difference was not statistically significant ($p > 0.05$).

Conclusion: In experimental facial nerve crush injury, ADMSCs application and combined treatment with colecalciferol facilitated nerve regeneration and remyelination in functional, electrophysiological and histological terms.

Key Words: mesenchymal stem cells; facial nerve; nerve regeneration; cholecalciferol.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fasiyal sinir travmaları, fasiyal paralizilerin ikinci en sık sebebidir. Fasiyal paralizi, oküler komplikasyonlar, konuşma güçlükleri, yutma zorluğu ve yüz estetiğinde bozulma gibi problemlere neden olmaktadır (1).

Fasiyal sinir travmatik paralizilerinde, tam kat kesi durumunda uc uca anastomoz ile onarım önerilirken; sinirde segmenter kayıp varsa anastomoz gerginliğini önlemek için köprü greftler ile reanastomoz altın standart tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda hücre bazlı tedavi yöntemleri, moleküler biyoloji, biyomedikal alanlarındaki yoğun çalışmalar ile periferik sinir rejenerasyonunda yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (2-4).

Periferik sinir rejenerasyonunda Schwann hücrelerinin ve salgıladıkları lokal mediatör faktörlerin rolü olduğu bilinmektedir (5). Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (ADKMKH), kendilerini yenileme, birçok farklı hücreye dönüşebilme özelliklerine sahiptir. Bu hücrelerin Schwann hücrelerine diferansiye olmalarının yanında anjiogenezi tetiklediği, nörotrofik faktörler salgıladığı ve aksonal yapıyı koruduğu gösterilmiştir (6).

Kolekalsiferol (Vitamin D3, aktif form), günümüzde çocuklarda raşitizmi önlemek ve psöriyazis tedavisinde FDA (Food and Drug Administration) tarafından onay almış bir molekül olmakla birlikte immün ve sinir sistemi üzerine olan etkileri giderek daha iyi tanınmaktadır (7). Kolekalsiferolün inflame dokuda çeşitli nörotrofinlerin üretilmesini sağladığı ve T lenfosit (Th1/Th2) dengesini ayarladığı bilinmektedir (8). Ayrıca santral sinir sistemi hasarlarına ilişkin literatürde oldukça fazla araştırma olmasına karşın (7, 9-

11), periferik sinir hasarlarında miyelinizasyonu ve rejenerasyonu olumlu yönde etkilediğini gösteren çalışmalar sınırlı sayıdadır (12, 13).

Bu çalışmada, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve D vitamininin fasiyal sinir hasarının rejenerasyonunda, etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. FASİYAL SINIR ANATOMİSİ

Fasiyal sinir içerdiği farklı fonksiyonel yapılar nedeniyle diğer kranial sinirlerden farklılık gösterir. Motor, sensitif, sensöryal ve sekrotomotor lifleri içinde barındıran tek kranial sinirdir. Ayrıca motor korteksten itibaren kendine özgü bir anatomik seyri vardır.

Fasiyal sinir 2. Brankial arkustan gelişir ve insanda 7000' i motor (efferent), 3000' i duyu (afferent) olmak üzere 10.000 sinir lifinden oluşan karma bir sinirdir.

Fasiyal sinir klasik olarak:

1-İntrakraniyal-Supranükleer, nükleer ve infranükleer parçalara ayrılır.

2-İntratemporal- Labirenter, timpanik ve mastoid parçalara ayrılır.

3-İnfratemporal-ekstrakranial olmak üzere üç bölgede yer alır.

2.1.1. Supranükleer Fasiyal Sinir Anatomisi

Fasiyal sinir nükleusuna ait motor hücrelerin santral bağlantıları piramidal traktusun kortikobulber lifleri içinde gider. Yüzün alt yarısına ait kortikobulber liflerin hepsi çapraz yapar. Üst yarısına gidenlerin ise bir kısmı çapraz yapar bir kısmı yapmaz. Böylece, alın her iki motor korteksten innerve olur. Bilateral olmayan supranükleer lezyonlarda yüzün üst kısmında fonksiyon kaybı olmaması yanında, yüz kaslarının tonusunda veya ani yüz ifadesinde de herhangi bir bozukluk olmaz. Buna karşılık istemli kas hareketleri kaybolur. Supranükleer lezyonlarda ayrıca santral sinir sistemi

tutulumu ile ilgili bazı nörolojik bulgular da görülür. Nükleer ve infranükleer lezyonlarda hem istemli hem de istemsiz kas hareketlerinde kayıp vardır.

Duyguların etkileşimi mimikler ile gerçekleşir. Talamus ve globus pallidus ile ilişkili lifler bu emosyonel fasiyal görünüm ile ilgili liflerdir ve sinire retiküler formasyon yolu ile ulaşırlar.

Fasiyal sinirin korteks ve çekirdekler dâhil olmak üzere supranükleer kısmında meydana gelen paralizilere, santral fasiyal paralizi, nükleuslardan sonra ortaya çıkan paralizilere ise periferik fasiyal paralizi adı verilir.

2.1.2. Nükleer Fasiyal Sinir Anatomisi

Fasiyal motor nükleus yaklaşık 7000 nöron içerir. Dördüncü ventrikülün hemen tabanında bulunur. Fasiyal sinirin parasempatik liflerinin çekirdeği nükleus salivatorius süperiordur ve motor çekirdeğin üzerinde bulunur.

Fasiyal sinir nöronları motor çekirdeği terk ettikten sonra posterolateral bir seyir izler ve altıncı sinir çekirdeğinin çevresinden dolaşarak beyin sapını nervus intermedius ile birlikte terk eder. Fasiyal sinirin bundan sonraki seyri üç kompartmanda değerlendirilir. Bunlar intrakranial, intratemporal ve ekstrakranial kısımlardır.

Beyin sapında bulunan diğer kranial sinirlere ait (trigeminal, koklear) nükleuslardan çıkan lifler de fasiyal sinirin motor innervasyonuna destek olurlar. Bu nöronlar kompleks fasiyal sinir reflekslerini oluştururlar. Korneal reflekslerin trigeminal çekirdek, stapes refleksinin ise akustik çekirdek ile ilişkisi vardır.

2.1.3. İnfranükleer fasiyal sinir anatomisi

2.1.3.1. İntrakraniyal kısım (Serebellopontin köşe)

Fasiyal sinirin serebellopontin köşe (SPK) ile internal akustik kanal arasındaki seyri bu kısmı oluşturur. Sinirin uzunluğu yaklaşık 23-24 mm kadardır. N. intermedius ve VIII. kranial sinir fasiyal sinire ponsun alt kenarı seviyesinde pons ve serebellar pedinkül arasındaki mesafede eşlik eder. Beyin sapı düzeyinde fasiyal sinir VIII. sinir çekirdeğinin ön altında bulunur.

Fasiyal sinir beyin sapı ile iç kulak yolu porusu arasında ince bir glial tabaka ile sarılıdır. Orta fossa yaklaşımlarında sinir bu bölgede travmalardan kolaylıkla etkilenir. Ancak bu glial tabaka yavaş gelişen tümörlere karşı siniri korur.

2.1.3.2. İntratemoral kısım

2.1.3.2.1. İnternal akustik kanal (meatal segment)

Beyin sapı ile internal akustik kanal (İAK) arası 13-15 mm'dir. Pons ve medulla bileşkesinde beyin sapından ayrılan fasiyal sinir, n.intermedius (Wrisberg siniri) ile birlikte pontocerebellar açıda seyrederek vestibulokoklear sinirin anteriorundan İAK' ya girer. Fasiyal sinirin İAK içindeki uzunluğu 8-11 mm arasında değişir ve bu kısmı meatal segment olarak isimlendirilir. İnternal akustik kanalın iç kulak ile bağlantılı olduğu kısım fundus olarak adlandırılır.

Meningeal yapraklar, ince bir tabaka halinde İAK kemik duvarını sararlar. İAK'da sinir çevresinde epinörium yoktur. İAK' ın fundusu seviyesinde ise dura yaprakları (pia ve dura mater) fasiyal siniri de içine alır. Bazen bu birleşme fundusta olmaz ve fasiyal sinir temporal kemik içerisinde genikulat gangliona kadar epinörium olmadan gelir. Kendisi ile birlikte BOS' ta genikulat gangliona kadar gelir; bu durumda piamater ve duramater birleşmesi burada gerçekleşir. Birçok viral enfeksiyonun genikulat gangliona ulaşmasında bu anatomik yapının neden olduğu düşünülür. Bu durum aynı zamanda genikulat gangliona gelişen primer kolesteatomları, nörinomları açıklamak içinde kullanılmaktadır. N.intermedius tek başına bir sinir dalı halinde fasiyal sinire eşlik eder.

İAK fundusunda yer alan crista falciformis İAK' yı süperior ve inferior olmak üzere iki kompartmana ayırır. Süperior kompartman krista vertikalıs (Bill barı) tarafından anterior ve posterior bölümlere ayrılır. Fasiyal sinir bu kompartmanlardan ön üst kısımda bulunur. Üst arka kompartmanda süperior vestibüler sinir, alt kompartmanlarda ise koklear ve inferior vestibüler sinir bulunur.

2.1.3.2.2. Fallop kanalı

Fallop kanalı 30 mm uzunluğundadır. İnternal akustik kanal fundusu ile başlar ve stilomastoid foramen ile sonlanır. Üç segment ve iki dirsek yapacak şekilde kıvrımlı bir seyir izler. Bunlar labirentin, timpanik ve mastoid segmentlerdir.

Fallop kanalı ile fasiyal sinir arasındaki mesafe bölgelere göre değişir. Meatal foramende, fasiyal sinir, kanalın %83' ünü doldurur ve fasiyal sinir ile kanal arasında yalnızca 0,17 mm'lik mesafe vardır. Bu oran timpanik segmentte %73 olup kanal ile sinir arası 0,41 mm'dir. Sinirin en kalın olduğu mastoid segmentte ise oran %64'tür ve kanal ile sinir arası mesafe 0,54 mm'dir.

Fallop kanalı içinde bir sinirin seyrettiği en uzun kemik kanaldır. Ayrıca seyrinin nerede ise Z şeklinde olması da kayda değerdir. Kanalın en dar yeri sinirin kanala girdiği noktadır. Bu kesitin çapı ortalama 0,68 mm'dir. Kanalın bu darlığı iskemiden öncelikle bu bölgenin etkilemesine sebep olmaktadır.

Fallop kanalı boyunca, kanalın periostu, epinöryum ve perinöryum fasiyal siniri saran kılıflardır.

Labirentin (petröz) Segment: Başlangıç noktasını fundus, bitiş noktasını ise genikulat ganglion oluşturur. Sinir bu segmentte 2-4 mm uzunluğundadır. Labirentin segmentin yerleşimi kokleanın hemen posteriorunda, horizontal ve anterior semisirküler kanalların ampuller uçlarının posterolateralinde ve vestibülün anteriorundadır. Meatal foramen fallop kanalının en dar yeridir ve çapı yaklaşık olarak 0,68 mm'dir. Fasiyal sinirin, bu kısa, dar ve iyi beslenmeyen segmenti, ödem nedeniyle sinir kompresyonu, emboli, kan akımı azalması ve vasküler bası gibi patolojilerden en sıklıkla etkilenen bölgesidir. Fasiyal sinir daha sonra genikulat fossada doğrultusunu değiştirir sert bir açı yaparak arka ve dışa doğru döner. Burada açı 70 derecedir (1.dirsek).

Timpanik (horizontal) segment: Genikulat ganglion ile piramidal proses arası 8-11 mm'dir. Timpanik segment 1. dirsekten sonra genikulat gangliondan piramidal eminense dek lateral semisirküler kanalın infierorunda ve oval pencerenin süperiorunda seyreder. Siniri bu bölümde ince bir kemik lamina sarar ve sıklıkla da dehissans gösterir. Bazen sinir fallop kanalından oval pencereye doğru sarkabilir. Sinirin orta kulağa girişinin hemen medialinde kokleariform çıkıntı bulunur. Timpanik segment, distalde fossa inkudis inferomedialinde yaklaşık 120 derecelik bir açı ile dönerek 2. dirseğini yapar ve orta kulaktan çıkıp mastoid içine girer. İkinci dirsek 2-6 mm uzunluğundadır ve bu kısım mastoid cerrahisi sırasında sinirin risk altında olduğu

bölgedir. Sinir bu kısımda lateral semisirküler kanal kurvatürü ile paralellik gösterir. Yine bu düzeyde sinirin medialinde lateral ve süperior semisirküler kanalların ampullaları bulunur. Erişkinlerde Fallop kanalı iki kısımda oldukça dardır. Birincisi meatal foramen, ikincisi timpanik segmentin orta bölümüdür (14).

Mastoid (vertikal) segment: Piramidal proses ile stylomastoid foramen arası 10-14 mm'dir. Fasiyal sinirin en uzun segmentidir ve sinirin çapı 1 mm'den biraz fazladır. Mastoid segmentten 3 sinir ayrılır; bunlar nervus stapedius, korda timpani ve posterior auriküler sinirdir.

2.1.3.3. Ekstratemporal Kısım

Stylomastoid foramen ile pes anserinus arası 15-20 mm'dir. Stylomastoid foramenden çıkan fasiyal sinir, digastrik ve stylohyoid kaslar arasından seyrederken parotis bezine girmeden önce aurikula kaslarını, m. stylohyoides ve m. digastricusun posterior karnını innerve eden; sırasıyla n. aurikularis posterior, n. stylohyoideus ve n. digastricus'u verir. Parotis bezi içinde yüzeysel ve derin loblar arasında "kaz ayağı" anlamına gelen "pes anserinus" u oluşturan fasiyal sinir, temporofasiyal ve servikofasiyal olmak üzere iki ana dala ayrılır. Temporofasiyal daldan frontal, zigomatik ve bukkal; servikofasiyal daldan ise marjinal mandibuler ve servikal sinirler ayrılır. Fasiyal sinir buccinator, levator anguli oris ve mentalis kaslarına ek olarak 14 mimik kası innerve eder (15).

Lateral kantusun medialinde oluşan fasiyal sinir hasarlarında, geniş anastomoz ağından dolayı spontan iyileşme gerçekleşebilir ve nadiren cerrahi eksplorasyon gerektirir (16).

2.2. FASİYAL SİNİR FİZYOLOJİSİ

Fasiyal sinir motor, duyu, parasempatik uyarı taşıyan toplamda 10.000 sinir lifinden oluşur. Bunların 7000'i miyelinli motor, 3000'ü miyelinsiz duysal ve sekretuar özelliktedir.

2.2.1. Özel visseral afferent lifler

Korda timpani dilin 2/3 ön kısmının tat duyusunu alır. N. intermedius yoluyla traktus solitarius'a gelir ve nükleus solitarius'ta sonlanır.

2.2.2. Genel somatik afferent lifler

Dış kulak yolu (DKY) arka duvarı ve timpanik membran bir bölümü ile aurikula DKY girişinden ağrı, ısı ve dokunma duyularını alırlar. N. intermedius ile ponsta trigeminal sinire taşınır. Buradan çıkan lifler kortekste girus postsentraliste sonlanırlar.

2.2.3. Genel visseral efferent lifler

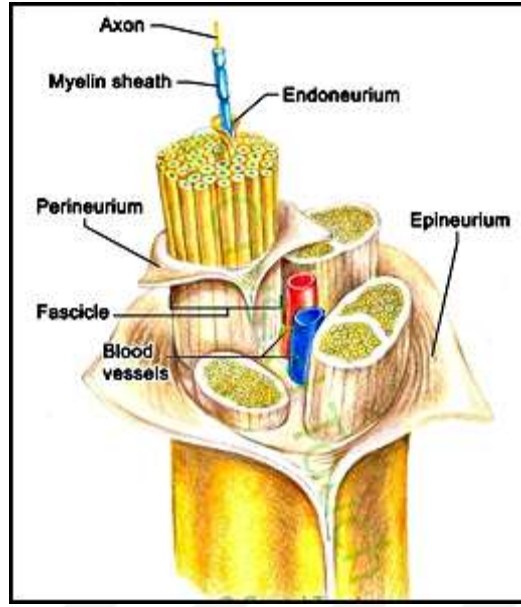
Parasempatik uyarıları taşıyan liflerdir. N.süperfisyalis petrosus majör ile sfenopalatin gangliona ve oradan lakrimal beze ve palatin glandlara sekretuvar lifleri taşır. N.petrosus süperfisyalis minör ile otik gangliona parasempatik uyarıyı taşır. Ayrıca korda timpani yoluyla da submandibüler ve sublingual glandlara parasempatik uyarıyı taşıyan liflerdir.

2.2.4. Özel visseral efferent lifler

Fasiyal sinirin motor uyarılarını taşıyan liflerdir. Mimik kasları, stilohyoid, digastrik kas arka karnına motor uyarıyı taşırlar.

2.3. FASİYAL SİNİR HİSTOLOJİSİ

Bilindiği gibi, sinir uyarıları, nöronların akson adı verilen uzantıları yoluyla iletilmektedir. Aksonlar schwann hücreleri ile sarılıdır ve iki schwann hücresi arasında miyelin kılıfın olmadığı Ranvier düğümü olarak adlandırılan kısımlar vardır. Miyelinli nöronlarda iletim saltatuar denilen atlamalı iletim sayesinde oldukça hızlıdır. Periferik sinirlerde, siniri çevreleyen üç farklı bağ dokusu bulunmaktadır. Aksonlar arasındaki destek doku endonöryum tabakasıdır. Akson fasiküllerini saran perinöryum tabakası ve en dışta siniri çevreleyen epinöryum tabakaları bulunmaktadır (Şekil 1).



Kaynak: <https://antranik.org/fundamentals-of-the-nervous-system-and-nervous-tissue>

Şekil 1. Bir periferik sinirin histolojik yapısı görülmektedir. Aksonları saran endonöryum, fasikülleri saran perinöryum ve tüm fasikülleri çevreleyen epinöryum tabakaları görülmektedir.

2.3.1. Sinirdeki lezyon

Sinir hasarları histopatolojik olarak Seddon tarafından 1943’de nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olmak üzere üçe ayrılmıştır. Daha sonra 1978’de Sunderland bir periferik sinir lifinin uğrayabileceği muhtemel beş hasar derecesi tanımlamıştır (Şekil 2).

2.3.1.1. Nöropraksi

Sinir içindeki basınç artışına bağlı olarak ileti durur. Ancak lezyonun distal kısmı elektriksel uyarıya cevap verir. Bası kaldırılırsa, hemen veya 3 hafta içinde iyileşme başlar.

2.3.1.2. Aksonotmezis

Bası hemen kaldırılmazsa, venöz drenaj bozulur ve aksonda dejenerasyon meydana gelir. Sinir kılıfı sağlamdır. Basıncın kaldırılmasından 3 hafta-2 ay sonra iyileşme başlar. Endonöral tüplerde hasar olmadığı için iyileşme tamdır. Sinirin rejenerasyon hızı günde ortalama 1 mm kadardır.

2.3.1.3. Endonörotomezis

Burada endonöryum ve akson hasara uğramıştır. Bu nedenle iyileşme tam olmayabilir. Fibrillerin rejenerasyon esnasında yanlış kas gruplarına girmesi sonucu sinkinezi gelişebilir ve iyileşme yetersiz olur.

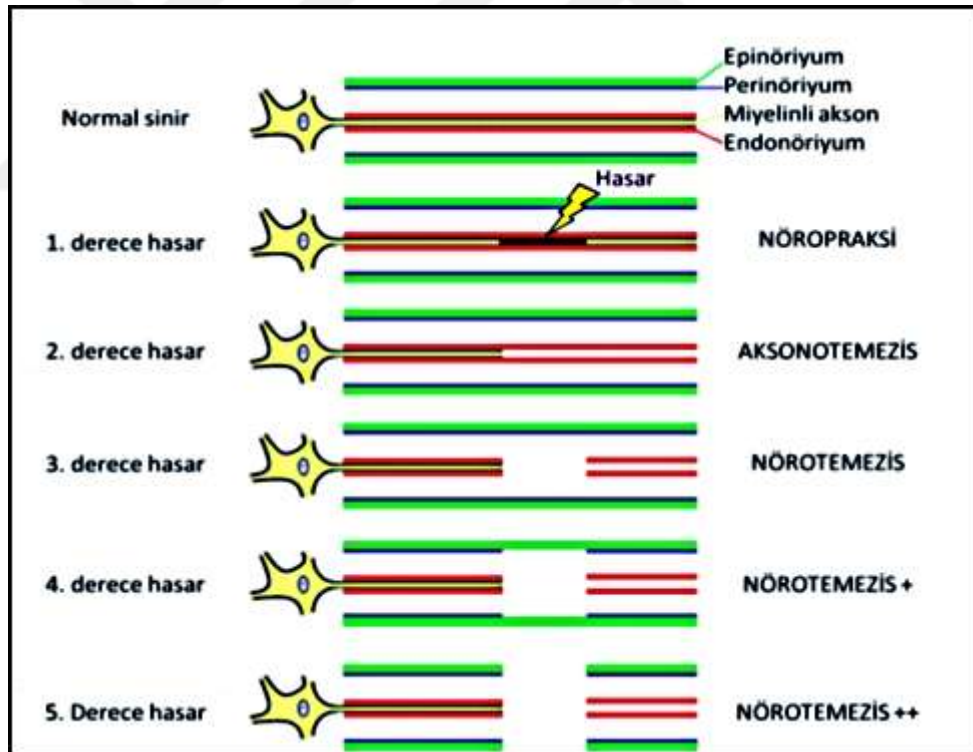
2.3.1.4. Perinörotomezis

Bunda akson, endonöryum ve perinöryum hasarlıdır. Sinkinezi oranı yüksektir.

2.3.1.5. Nörotomezis

Sinir tamamen kopmuştur. Bunlarda ağrılı nöromalar oluşabilir.

Son iki evrede (4-5) onarım yapılmadıkça, kendiliğinden iyileşme mümkün değildir.



Kaynak: https://www.researchgate.net/figure/Sunderland-classification-of-nerve-injury-adapted-from-Deumens-et-al-9-2010_fig1_270893142

Şekil 2. Sinir Hasarı Sınıflandırması. Sinire uygulanan bası sonrası 1. veya 2. derece hasar izlenmektedir. Sinir kılıflarında herhangi bir hasar spontan rejenerasyonu sağlamaktadır. Ancak evre 4 ve 5. düzeyi hasarlarda onarım olmaksızın kendiliğinden iyileşme mümkün olmamaktadır.

2.4. PERİFERİK SİNİR DEJENERASYONU VE REJENERASYONU

Periferik sinir hasarı sonrasında, histolojik düzeyde demiyelinizasyon, wallerian ve aksonal dejenerasyon olmak üzere üç ayrı nöronal cevap oluşur.

Segmental demiyelinizasyon sinirin belli bir kısmının ezilmesi veya gerilmesi nedeniyle meydana gelir. Hasarın proksimal ve distal segmentinde iletim normaldir. Hasarlı bölgedeki miyelin kaybı nedeniyle senkronize iletim bozulmuş ve milisaniyeler düzeyinde impuls iletiminde gecikmeler olmaktadır. Periferik sinir demiyelinizan hastalıklarında EMG’de latansların uzaması bu mekanizma ile açıklanmaktadır. Çalışmamızda da ezilme hasarı uygulanarak, bu sınıflandırmada evre 2 düzeyinde nöronal dejenerasyon oluşturulmuştur.

Wallerian dejenerasyon, Sunderland evre 2-5 arasındaki tüm hasar tiplerinde gelişebilir. Sinir hasarını takiben ilk reaksiyonlar hasarın distal kısmında meydana gelir. Nörotrofinler, kemokinler gibi enflamatuar sitokinler salgılanır. Bunların etkisiyle Schwann hücreleri proliferasyon olurlar ve bu hücreler tarafından, rejenerasyon ünitesi (büyüme konisi) oluşturulur. Schwann hücre sütunlarının oluşturduğu Büngner bantları ile aksonların takip edeceği yol belirlenmiş olur (17). Büyüme konisi bu yol boyunca 1-3 mm/gün hızla ilerleyerek sinirde büyüme sağlanır. Bu hız hasarın bölgesine göre değişebilir. İlerleme hızı perifere yaklaştıkça azalır. Akson iyileşme hızı türlere göre de farklılık gösterir. Örneğin bu hız kemirici hayvanlarda 2-3,5 mm/gün iken insanda 1-2 mm/gün’dür (18). Yeni oluşturulan miyelin orijinale göre genellikle daha incedir.

Hasar bölgesindeki endonöral tüplerin durumu da iyileşmenin kalitesi açısından önemlidir. Bazı aksonlar distal uca ilerleyemezler ve bağ dokusu ile Schwann hücrelerinden oluşan nöroma formasyonu gelişir. Nöromalar bası etkisiyle iyileşmeyi olumsuz yönde etkilerler. Bu sinir rejenerasyonundaki en önemli başarısızlık nedenlerindendir.

Sinir rejenerasyonunda, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain Derived Neurotrophic Factor=BDNF), nörotrofin-3 (NT-3), nörotrofin-4/5 (NT-4/5), nörotrofin-6 (NT-6), sinir büyüme faktörü (nerve growth factor=NGF), siliyer nörotrofik faktör (Ciliary Neurotrophic Factor=CNTF) gibi nörotrofik faktörlerin etkili olduğu gösterilmiştir (19-21).

2.5. FASİYAL PARALİZİ

Fasiyal sinir kranial motor sinirler içerisinde en çok fonksiyon kaybına uğrayan sinirdir. Bunun en önemli sebebi uzun ve dar kemik kanal içerisinde kıvrımlar yaparak seyretmesidir. Fasiyal paralizilerin %90'ı bu kemik kanal içerisindeki patolojiye bağlı ortaya çıkmaktadır. Fasiyal paralizi etyolojisinde konjenital, travma, nörolojik, enfeksiyon, metabolik, tümöral, toksik, iatrojenik, idiyopatik gibi bir çok sebep vardır.

2.5.1. Travmatik fasiyal paralizi

Fasiyal sinir travmaları, fasiyal paralizilerin en sık ikinci nedenidir. Travmatik fasiyal paralizinin tedavisi, değişken ve dinamik bir süreçtir.

Travmatik fasiyal paralizilerin tedavisinde, paralizinin başlangıcı (hızlı veya gecikmiş), paralizinin derecesi (komplet veya inkomplet), travmanın tipi (künt, kesici veya iyatrojenik), sinirin durumu, fasiyal paralizinin süresi ve motor son plağın durumuna göre karar verilir (22). Yine hasarlı fasiyal sinirin bütünlüğü, ulaşılabilir lokalizasyonda olması, travmanın lateral kantusa göre pozisyonu diğer belirleyici unsurlardır. Eğer motor son plak hala fonksiyonel ise fasiyal kaslarının innervasyonunun restorasyonu için tedavi planlanmalıdır. Fonksiyonel değilse, dinamik fasiyal restorasyon için bir alternatif kas transferi düşünülmelidir.

Fasiyal sinir hasarı, künt veya penetran travma sonucu oluşabilir. Künt travmalar ve bunların içerisinde motor kazaları en sık nedeni oluşturur (23). Penetran travmalar için en tipik örnek hayvan ısırıkları, bıçak yaralanmaları ve ateşli silah yaralanmaları sayılabilir. İyatrojenik olarak en sık parotis cerrahisi sırasında yaralanma ile karşılaşılır.

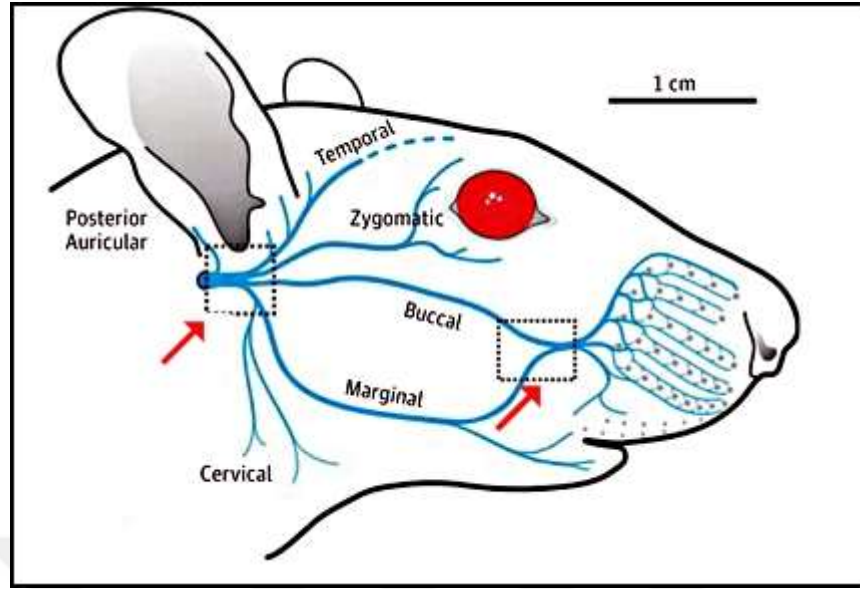
Sinire yönelik operasyonun zamanlaması önem taşır. Travma ile eş zamanlı total paralizilerde, acil eksplorasyon gerekir. Geç başlangıçlı komplet veya inkomplet paralizilerde anatomik olarak sinirin intakt olduğu akla getirilmelidir. Gecikmiş komplet paralizilerde, bazı araştırmacılar 3. ve 14. günlerde seri ENoG yapılmasını önerirler. Etkilenmeyen tarafla karşılaştırıldığında %95 üzerinde kayıp varsa fasiyal dekompresyon önerilmektedir (24). Onun haricinde gecikmiş veya inkomplet başlangıçlı fasiyal paralizilerde medikal tedavi ile yakın takip önerilmektedir. Sonradan

total hale gelmiş parsiyel paralizi olgularında, 6-12 ay içinde ameliyat edilmeleri önerilir.

Fasiyal sinirin bütünlüğünün bozulması durumunda onarım yapılmalıdır. Amaç proksimal ve distal uçların karşı karşıya getirilmesidir. Uygulanacak teknik fasiyal sinirdeki doku kaybının derecesine göre belirlenir. Sinir lezyonu % 50'nin altında ise intakt kalmış olan liflerin korunması gerekir. Lezyon %50'nin üzerinde ise sinirdeki kesinin tamamlanması ve ardından anastomoz tekniklerinin kullanılması gerekmektedir (25). Günümüzde fasiyal sinir tam kat kesilerinde uc-uc anastomoz ile onarım önerilirken; serbest sinir uçları arasında 2 cm üzerinde gap varlığında sinir otogreftleri ile onarım altın standart yaklaşım olarak kullanılmaktadır. Ancak donör saha morbiditesi, sınırlı kullanılabilirliği ve nöroma oluşma riskleri bu tekniğin dezavantajları arasındadır (26, 27). Sinirde gerginlik yaratmadan onarım yapılmalıdır. Sinir hasarında segment kaybı varsa kablo greft kullanımı önerilmektedir. En sık kullanılan greftler n. aurikularis magnus ve n. suralistir. Proksimal fasiyal sinirin bulunamadığı durumlarda kasların reinnervasyonu için bölgesel kranial sinirler kullanılabilir. Sıklıkla hipoglossal sinir anastomozda kullanılır.

2.5.2. Deneysel fasiyal paralizi

Fasiyal paralizide yeni tedavi yöntemlerinin klinik uygulamaya girebilmesi için literatürde deneysel paralizi modeli ile ilgili çok sayıda yayın bulunmaktadır. Fare (28), tavşan (13), kobay (29) ve en sık sıçanlar (30) üzerinde fasiyal paralizi modeli çalışılmaktadır. Tam kat kesi (29), segmenter sinir eksizyonu (31, 32) ve ezilme (28) hasarı şeklinde farklı hasar modelleri tanımlanmıştır. Kobaya göre daha kolay temin edilmesinden ve fasiyal sinir anatomisinin fare ve tavşana göre daha rahat ortaya konulmasından dolayı çalışmamızda da sıçan tercih edilmiştir.



Kaynak: Functional recovery after facial nerve cable grafting in a rodent model. JAMA facial plastic surgery, 2014.

Şekil 3. Sıçan fasiyal sinir şematik gösterimi; soldaki kırmızı ok ana trunkusu, sağdaki ok bukkal ve marjinal mandibüler dalların anastomozunu göstermektedir.

2.5.3. Fasiyal paralizili hastaların değerlendirilmesinde kullanılan testler

2.5.3.1. Lezyonun yerinin tespitinde kullanılan testler

Schirmer testi: Fasiyal sinir ilk dalını lakrimal beze verir. Lezyon n.petrozus süperfisyalis majör dalının çıktığı genikulat gangliyon hizasında veya daha proksimalde ise o tarafta gözyaşı salgısı azalır ve Schirmer testi pozitif denir.

Akustik refleks testi (Stapes kası refleksi): Karşı kulağa yüksek şiddette (80-90 dB) ses verilerek, stapes kasının kasılıp kasılmadığı akustik impedansmetre ile kontrol edilir. Şayet kasılma yoksa lezyon, fasiyal sinirin bu dalını verdiği yerde veya daha proksimaldedir.

Tat testi: Tat reseptörlerinin uyarılması esasına dayanır. Acı, ekşi, tuzlu, tatlı değişik maddelerle veya galvanik akımla reseptörler uyarılarak (elektrogustometri) dilin iki tarafı arasındaki tat duyusu karşılaştırılır. Sonuçlar güvenli değildir.

Blatt testi: Bu testte, wharton kanallarına yerleştirilen ince bir tüp ile iki taraf arasındaki tükürük salgısı karşılaştırılır.

Tükürük pH'sı testi: Tükürük akımı arttıkça pH'da artmaktadır. Hastalarda tam iyileşme, tükürük pH'sı 6,4 ve üstünde olanlarda daha iyidir.

Lezyonun yerinin belirlenmesinde kullanılan bu testlerin akut enfeksiyonlardaki yeri sınırlıdır. Uzun süre devam eden fasiyal paralizilerde ise değerleri çok azdır.

2.5.3.2. Prognostik Testler

Paralizin başlangıcından 3-5 gün sonra yapılan elektriksel test sonuçları faydalıdır. Sinirde dejenerasyon gelişip gelişmediğini ya da dejenere olan sinirde rejenerasyonun başlayıp başlamadığını gösterir.

Sinir uyarı testi (Nerve excitability test - NET): Fasiyal sinire elektrik akımı verilir ve kasılma meydana getiren eşik değeri belirlenir. İki taraf arasındaki farkın 3,5 miliamperden fazla olması, sinir iletiminin kötü olduğunu gösterir.

Maksimal sinir uyarı testi: Bu testte yüzün her iki tarafında en fazla kasılma meydana getiren akım miktarı ölçülür.

Elektronöronografi (ENoG): Bu testin yapılışı maksimal sinir uyarı testi gibidir. Farklı olarak; ENoG'da uyarılmış aksiyon potansiyelleri bir cihaz ile kaydedilir. Normal ve etkilenen taraftaki toplam potansiyeller arasındaki amplitüd farkına göre sinirdeki dejenerasyon oranı tespit edilir. Fasiyal paralizi takibinde, diğerlerinden daha güvenilir sonuçlar verir. Bu testler paralizi sonrası ilk 3-4 gün sinir iletimi devam ettiği için yapılmamalıdır.

Elektromiyografi (EMG): Dejenere olan sinirde rejenerasyonun olup olmadığını gösteren önemli bir prognostik testtir. Aksiyon potansiyelleri ölçülür. Bu test paraliziden 3 hafta sonra yapılır. Bir sinir dejenerasyonundan sonra motor ünit potansiyellerin gözlenmesi, rejenerasyonun ilk işaretidir ve çoğunlukla istemli kas hareketleri başlamadan kendini gösterir. Fibrilasyon potansiyellerinin görülmesi sinirdeki dejenerasyonu gösterirken, polifazik reinnervasyon potansiyellerinin gözlenmesi, rejenerasyonun işaretidir.

2.6. KÖK HÜCRELER

Kök hücreler organizmayı oluşturan özelleşmemiş hücreler olup, sınırsız bölünebilme, kendini yenileme ve çeşitli dokulara dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Farklı doku hücrelerine dönüşebilme yeteneğine “plastisite” veya “diferansiyasyon” denir. Ayrıca kök hücre sayısını sabit tutmak için, farklılaşmadan önce bölünerek kendi sayısını artırır. Buna “kendini yenileme” denir (33). Uygun ortamda, farklı hücre türlerine dönüşerek, çeşitli doku ve organları oluşturabilme yeteneğine sahip olan bu hücrelerin, rejeneratif tıpta kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır.

Bu hücreler farklılaşma yeteneklerine göre beş gruba ayrılırlar. Bunlar;

1. Totipotent hücreler
2. Pluripotent hücreler
3. Multipotent hücreler
4. Oligopotent hücreler
5. Unipotent hücrelerdir.

Totipotent kök hücreler: Fertilizasyon sonrası oluşan zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye sahiptir. Totipotent hücreler, vücudun tüm hücrelerine farklılaşabilme özelliğine sahip olan kök hücrelerdir. “Toti” Latince tüm her şey anlamında, “potent” ise güç anlamındadır. Totipotent, 'her şeyi oluşturma' anlamındadır. Blastomerin olduğu ilk 4-5. güne kadar, var olan hücreler totipotent potansiyeldedir (34).

Pluripotent kök hücreler: Emriyonun 4.-5. gününde oluşan blastokist aşamasındaki hücrelerdir. Bu hücreler, mezodermal (kemik, kas, yağ, kan, kıkırdak gibi), ektodermal (nöral sistem, deri, saç gibi) ve endodermal (hepatositler, pankreatik beta hücreleri, sindirim sistemi hücreleri gibi) yaklaşık 200 farklı hücre türüne dönüşebilme kapasitesine sahiptir. Ancak tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar (35).

Multipotent kök hücreler: Pluripotent hücreler, daha az özelleşmiş olan multipotent hücrelere de farklılaşırlar. Multipotent hücreler ise, daha sınırlı sayıda hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir. Mezenkimal stromal hücre olarak da adlandırılan MKH’ ler

multipotent kökenli hücrelerdir ve kemik, kıkırdak, kas, kalp, yağ hücreleri gibi belirli hücre tipine farklılaşabilme kabiliyetine sahiptirler (35).

Oligopotent kök hücreler: Birkaç hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir. Hematopoetik kök hücre lenfoid ve miyeloid öncül hücrelerine farklılaşırlar ve bu hücreler oligopotent özellik taşır. Lenfoid öncül hücreler T ve B lenfositlerine, NK hücrelerine farklılaşabilirlerken eritrosit, makrofaj, mast hücreleri gibi hücreler de miyeloid öncül hücrelerinin farklılaşması ile oluşurlar (36).

Unipotent kök hücreler: Sadece bir çeşit hücre grubuna farklılaşabilen hücrelerdir.

2.6.1. Kök hücrelerin elde edildikleri kaynaklar

2.6.1.1. Embriyonel kök hücreler

Embriyonik kök hücreler, embriyonun blastosist evresindeki iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent özellikteki hücrelerdir. Bu hücreler vücuttaki hemen hemen tüm somatik germ hücresini oluşturma kapasitesine sahip hücrelerdir (33, 35).

2.6.1.2. Fetal Kök Hücreler

Fetal kök hücreler, amniyotik kök hücreler veya umbilikal kord kök hücreler olarak da bilinmektedir. Diferansiye olma kapasiteleri embriyonel kök hücrelere göre daha az ancak erişkin kök hücrelere göre daha yüksektir. Kullanımı ve temin edilmesi konusunda embriyonel kök hücrelere göre etik açıdan daha uygundur (37).

2.6.1.3. Erişkin kök hücreler

Erişkin vücutundan bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Temin edildiği bölgeye göre sınıflandırılırlar.

2.6.1.3.1. Mezenkimal kök hücreler

Bu hücreler mezodermal kökenli hücrelere farklılaşabildiklerinden dolayı mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılmışlardır. Kemik, kıkırdak, kas, ligament, tendon, yağ gibi hücrelere farklılaşabilirler. Genel olarak bu hücrelerin mezodermal hücre gruplarına farklılaşabilme özellikleri olduğu düşünülse de, mezodermal olmayan hücre serilerine

de farklılaşabildikleri kabul edilmektedir. Bu nedenle nörorejeneratif etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler: Adipoz doku kaynaklı kök hücreler, temin edilmesinin kolaylığı ve tekrarlanabilir olmasının yanında, proliferasyon kapasiteleri ve farklılaşma yeteneklerinin de, kemik iliği kaynaklı kök hücrelere göre daha yüksek olması nedeniyle daha avantajlıdır. Yapılan çalışmalarda diferansiye edilmiş adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin, schwann hücre ve multiple nöronal hücre göstergeleri taşıdıkları bildirilmiştir (38).

2.6.1.3.2. Nöronal kök hücreler

Sinir sistemi hücrelerinin kendilerini yenileyemedikleri düşünülüyordu. Ancak yapılan araştırmalar, insan beyinde nöral hücrelerin öncülü olan kök hücreler olduğunu göstermiştir (39). Bu hücreler nöronal ve glial hücre gruplarına farklılaşırlar. Ancak bu dönüşüm belirli bölgelerle sınırlıdır (40).

2.6.1.3.3. Dental pulpa kök hücreleri

Nöral krest kaynaklı diştan izole edilen hücrelerdir. Periferik sinir rejenerasyonunda olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (41).

2.7. PERİFERİK SİNİR HASARINDA KÖK HÜCRE KULLANIMI

Periferik sinir hasarında, doğru teknik ile onarım yapılsa dahi, istenilen sonuçlar her zaman alınamamaktadır. Bu nedenle sinir rejenerasyonunu sağlayacak ve tedavi süresini hızlandıracak başka tedavi seçenekleri araştırılmaktadır.

Periferik sinir hasarında, kök hücre uygulamaları bu konuda dikkate değerdir. Kök hücrelerin, schwann hücrelerine farklılaştığı ve oluşturdukları mikroçevrede rejenerasyonu sağlayacak parakrin etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

Hangi tür kök hücre uygulanacağı konusunda dikkat edilmesi gereken konular: izole edilecek bölgenin kolay ulaşılabilir olması, hücrelerin in vitro kültürde hızlı proliferasyon olması, in vivo ortamda canlı kalması, konak dokulara uyum sağlayıp immün reaksiyon

oluşturmaması şeklinde sıralanabilir (38). Ayrıca uygulanan kök hücrenin tipi, farklılaşma derecesi, scaffold (iskele) ve veriliş metodu önemlidir (42).

Kök hücreler schwann hücrelerinin çoğalmasını tetikleyerek ve schwann hücre aktivitesini arttırarak etkilerini göstermektedir. Schwann hücrelerinin, temin edilme zorluğu ve kültüre edilip çoğaltılmasının uzun süreler gerektirmesi sebebiyle kullanımı sınırlanmaktadır. Bu sebeple Schwann hücrelerine farklılaşabilen kök hücreler ön plana çıkmıştır. Kök hücrelerin schwann hücrelerine diferansiye olup, Büngner bandları oluşturarak aksonal gelişmeye klavuzluk edebileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu hücrelerin, büyüme faktörleri salgılayarak veya parakrin etkilerle konak schwann hücrelerinden büyüme faktörleri salgılatarak etki ediyor olabilecekleri düşünülmektedir (38).

Kök hücrelerin, beyin-derive nörotrofik faktör (BDNF), glial hücre serisi-derive- nörotrofik faktör (GDNF), sinir büyüme faktörü (NGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerini salgılandığı gösterilmiştir (20, 43-45).

Kök hücrelerin periferik sinir hasarında uygulanmaları ile ilgili çeşitli metodlar bulunmaktadır. Direk hasarlı bölgeye uygulanma, hasarlı bölgede konduit (tüp) lümen içerisinde uygulama, periferik venöz yoldan sistemik uygulama şeklinde özetlenebilir. Bölgeye lokal uygulamalarda kök hücrenin tutunup yaşayabileceği, çoğalıp farklılaşabileceği iskele görevi gören çeşitli materyaller tanımlanmıştır. Hyaluronik asit, polietilen glikol, gelatin, fibrin ve matrijel gibi çok çeşitli iskele görevi gören yapılar kullanılmıştır. Kullanılan bu iskelelerin ana amacı hücrelerin sahada kalmasını sağlamaktır; ancak literatürde bu yapıların hücrenin diferansiyasyonunu da etkilediği bildirilmiştir (46). Kök hücre uygulama metodlarından bir diğeri de hücrelerin konduit (tüp) lümen içerisinde verilmesidir. Bu konduitler içerisi boş bir lümen şeklinde veya konduit içerisinde bir matrikse bu hücrelerin gömülmesi şeklinde uygulanmaktadır. Kök hücreler fibrin ve kollajen gibi ekstraselüler matriksden oluşan doğal konduitler içerisinde uygulanabileceği gibi; silikon tüp, poliglikolik asit, politetrafloroetilen ve sitoza gibi sentetik konduitler içerisinde de uygulanabilmektedir.

Çalışmamızda iskele olarak gelatin süngerler kullanılmıştır. Kök hücreyi sahada tutmasının yanında nöronal yapıya diferansiye olmasını etkilediği literatürde gösterildiği için bu materyal tercih edilmiştir (46).

Periferik sinir rejenerasyonunda kök hücre kullanımıyla ilgili literatürde birçok deneysel çalışma olmasına karşın, henüz klinik çalışma yoktur.

Çalışmamızda, sinir rejenerasyonuna olumu etkileri olan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre ile, literatürde periferik sinir çalışmaları nispeten az olan D vitamininin birlikte ve ayrı ayrı uygulanarak, rejenerasyona olan etkileri değerlendirilmiştir.

2.8. D VİTAMİNİ

D vitamini, yağda çözünen, hormon gibi etki göstererek vücutta kalsiyum metabolizmasını düzenleyen bir moleküldür. Vücudumuzda kalsiyum metabolizması, nöromusküler fonksiyonlar, immünmodulator ve inflamatuvar süreçlerde rol oynar. Kolekalsiferol (vitamin D3) ve ergokalsiferol (vitamin D2) olmak üzere 2 formu vardır. Kolekalsiferol hayvansal kaynaklı, ergokalsiferol ise bitkisel kaynaklıdır.

Kolekalsiferolün %5 'i günlük alınan besinlerden sağlanırken; büyük bir kısmı (%95) güneş ışınları ile ciltte sentezlenir. 25 hidroksivitamin D formuna, karaciğerdeki 25 hidroksilaz enzimi sayesinde dönüşür. Böbreklerde bir kez daha hidroksillenerek vitamin D' nin aktif formu olan; 1,25 hidroksivitamin D (kalsitriol) formuna dönüşür.

Kolekalsiferol önemli immünmodulator ajanlardandır. Tip 1 diabetes mellitus, sistemik lupus eritematozus (SLE), multipl skleroz (MS) ve romatoid artrit (RA) gibi birçok otoimmün hastalık düşük vitamin D seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur (47).

Kolekalsiferolün kalsiyum-fosfor ve kemik metabolizması üzerindeki etkileri bilinmektedir. Ayrıca birçok organda D vitamini reseptörü olduğu ve kolekalsiferolün birçok sistem üzerinde düzenleyici etkisi olduğu görülmüştür. Çalışmalar, deney hayvanlarının merkezi ve periferik sinir sistemlerinde D vitamini reseptörleri olduğunu göstermiştir (48, 49). Kolekalsiferolün ayrıca nöronal gelişime ve remyelinizasyona olumlu etkileri bulunmaktadır (50). Yapılan çalışmalar, kolekalsiferolün nöroprotektif ve nörotrofik etkileri olduğunu göstermişlerdir (51, 52). Kolekalsiferolün periferik ve

merkezi sinir sistemi üzerindeki bu olumlu etkilerinin sitokinler, nörotransmitterler ve sinir büyüme faktörü yolu ile yaptığı düşünülmektedir (12, 51). Literatürde, deneysel periferik sinir hasarında da kolekalsiferolün iyileşmeyi artırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur ancak sınırlı sayıdadır (12, 13).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiş olup; (Proje no: 7193) projeye başlamadan önce, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 15.02.2017 tarih 17/008 karar no ile onayı alınmıştır. Araştırma, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Nöroloji Anabilim Dalı, Histoloji Anabilim Dalı imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. DENEY HAYVANLARI

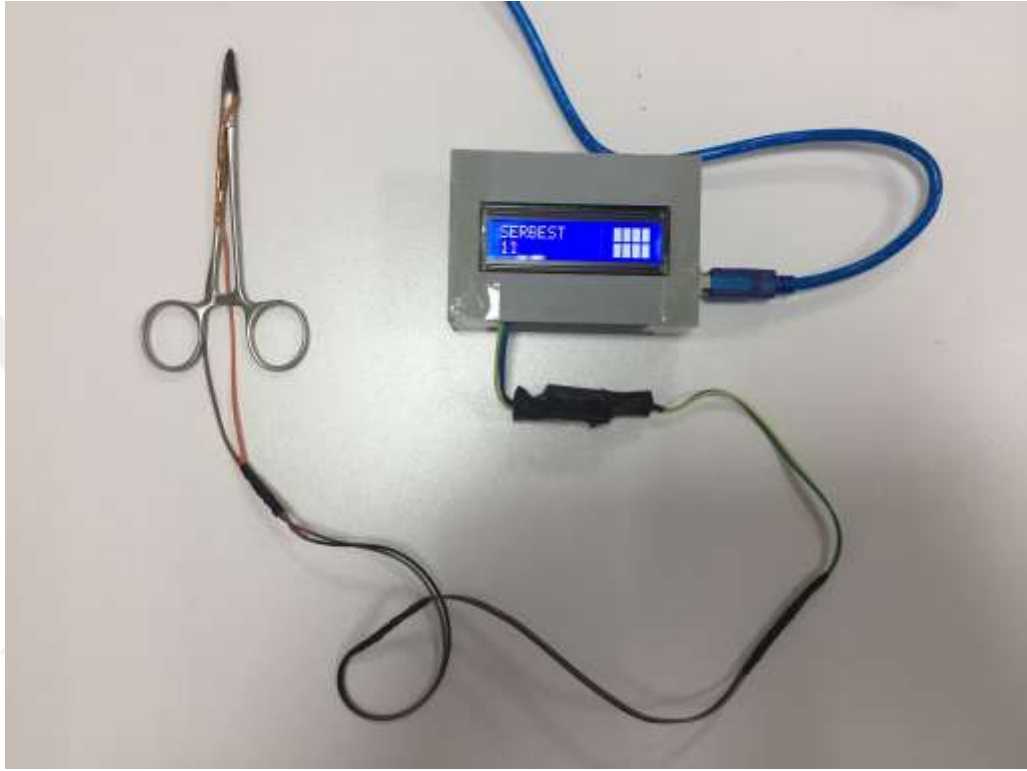
Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezinden temin edilen, 12-16 haftalık ve ortalama ağırlığı 250-300 gram olan 32 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanılmıştır.

Araştırma sürecinde sıçanlar 21-22 °C çevre sıcaklığı, 12/12 saat aydınlık/karanlık siklusunun sağlandığı, havalandırılması kontrol edilen odalarda barındırılmıştır. Beslenmeleri ve su içimi serbest bırakılmıştır (ad libitum).

3.2. SENSÖRLÜ KLEMP TASARIMI

Fasiyal sinir ezilme hasarının, her hayvanda standart olması için; uyguladığı basınçla, dişsiz mini forsepsin ağız kısmına yerleştirilen karbon plaklar arasındaki elektrik geçirgenliğinin orantılı olarak artması ve bunun monitörize edilmesi prensibiyle çalışan, 7298 kodlu ‘‘Vokal kord paralizisi sonrası lokal olarak uygulanan yağ dokusu kaynaklı

mezenkimal kök hücrelerinin sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel düzelme üzerine etkisi'' isimli çalışmada kullanılan, sensörlü klemp (Resim 1) kullanıldı. Cihazın kalibrasyonu ve standardizasyonu farklı yumuşaklıktaki cisimlerde (kablo ve pamuk) ezilme uygulanarak test edildi.



Resim 1. Sensörlü klemp sistemi

3.3. CERRAHİ İŞLEMLER

Tüm cerrahi işlemler aseptik şartlar altında, cerrahi mikroskop (Carl Zeiss OPMI Visu 200 S8, Almanya) kullanılarak, aynı kişi tarafından uygulandı.

Cerrahi işlemler intraperitoneal olarak uygulanan 50 mg/kg Ketamin HCl (Ketalar® 500 mg/10 ml, Pfizer) ve 10 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun® %2, 25 mg/ml, Bayer) kombinasyonu ile sağlanan anestezi altında uygulanmıştır. Araştırmanın sonunda sakrifiye edilen sıçanlara aynı kombine anestezi uygulanmıştır. Derin intraperitoneal anestezi altında, kornea refleksi ve ekstremitte çekme yanıtı kaybolduktan sonra sıçan sol yanına yatırılmıştır (Resim 3A). Sağ yüz yarısı tüyleri traş edildikten sonra, %10'luk Polivinilpirolidon iyot solüsyonu (Batticon, Adeka, Samsun, Türkiye) ile saha temizliği yapıldı, steril delikli cerrahi örtü örtüldü (Resim 3B-C).

Sağ aurikula ön alt kısımdan bukkal alana uzanan 1 cm cilt insizyonu yapıldı (Resim 3D). Cilt, cilt altı geçildikten sonra preauriküler lenf nodu ve parotis bezi disseke edilerek ekarte edildi (Resim 4A-B). Sağ fasiyal sinirin ana gövdesi ve dalları (Resim 2 ve 4C-D) ortaya konulduktan sonra, sensörlü klemp ile 30 saniye horizontal planda, 30 saniye vertikal planda toplam 60 saniye, sensörde 100-200 mv aralığında kalındığı gözlenerek, standart bir ezilme hasarı uygulandı (Resim 5A-B-C). Hasarlanmış ana trunkus bölgesine absorbe edilebilir spongostan parçaları (Gelfoam; Pfizer, New York, ABD) yerleştirildi (Resim 5D-6A). Spongostan içerisine hayvanın bulunduğu tedavi grubuna göre 0,2 cc serum fizyolojik içerisinde adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler veya yalnızca 0,2 cc serum fizyolojik enjekte edildi. Kontrol grubundaki sıçanların sol yüz yarısı da tarif edilen şekilde disseke edilerek fasiyal sinir ortaya konuldu ancak herhangi bir hasar verilmeden 5,0 ipek ile cilt kapatıldı (negatif kontrol-grup 1s-sham).

3.4. DENEK GRUPLARI ve TEDAVİ

Uygulanan tedaviye göre 4 denek grubu oluşturuldu:

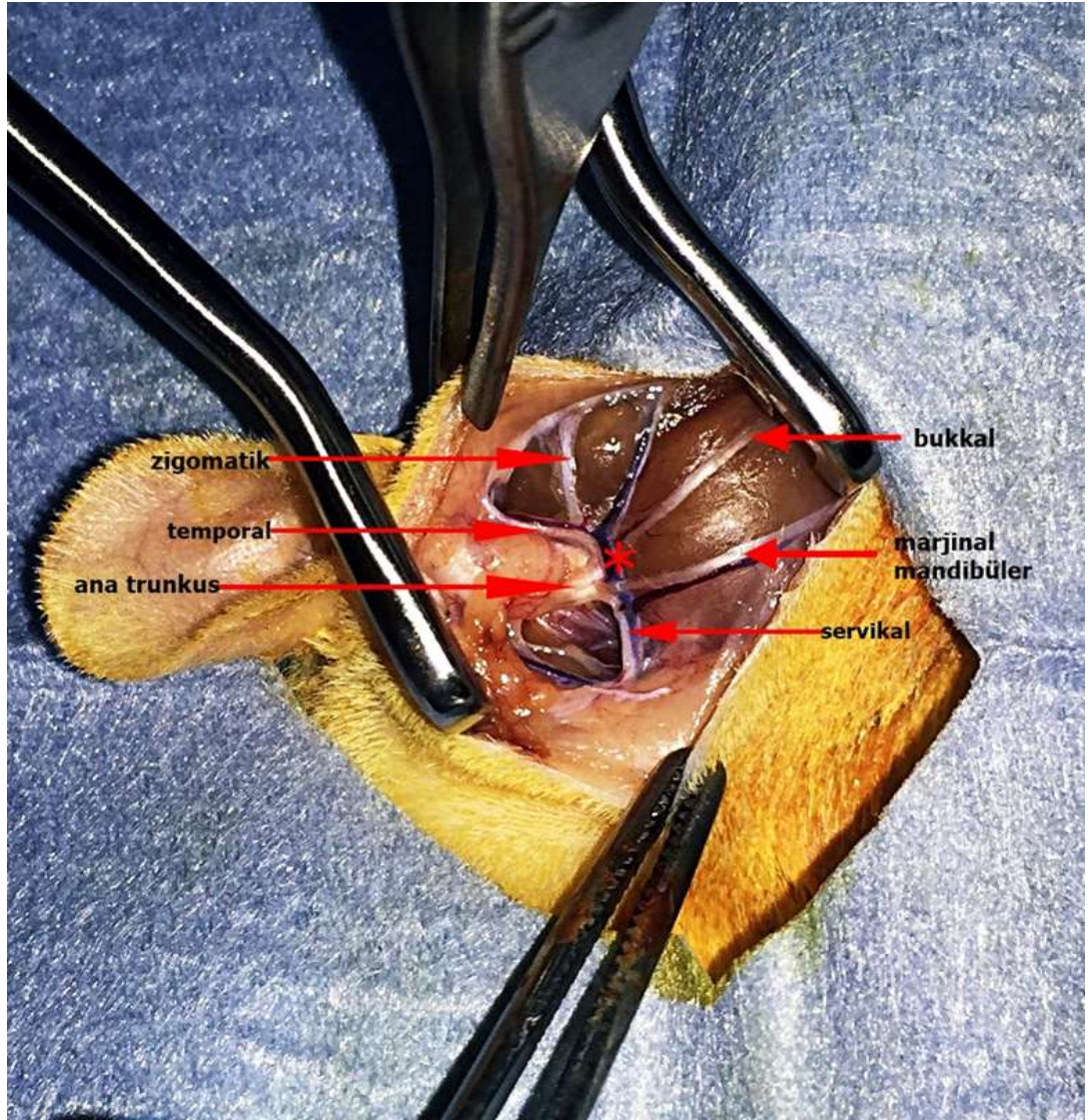
Grup 1 (Kontrol grubu, n=8): Hasarlı bölgeye gelfoam içine, 0,2 cc serum fizyolojik verildi (pozitif kontrol-grup 1k). Aynı hayvanların, aynı seansta, sol fasiyal sinirleri de diseke edildi ve herhangi bir hasar oluşturulmadan kapatıldı (negatif kontrol-grup 1s-sham).

Grup 2 (D vit. grubu, n=8): Hasarlı bölgeye gelfoam içine, 0,2 cc serum fizyolojik verildi ve 3500 IU/kg/hafta dozunda toplamda 4 kez oral kolekalsiferol uygulandı.

Grup 3 (Kök hücre grubu, n=8): Hasarlı bölgeye gelfoam içine, 0,2 cc serum fizyolojik içerisinde 10^6 adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre (ADKMKH) uygulandı.

Grup 4 (Kök + D vit grubu, n=8): Hasarlı bölgeye gelfoam içine 0,2 cc serum fizyolojik içerisinde 10^6 adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre (ADKMKH) uygulandı ve 3500 IU/kg/hafta dozunda toplamda 4 kez oral kolekalsiferol verildi.

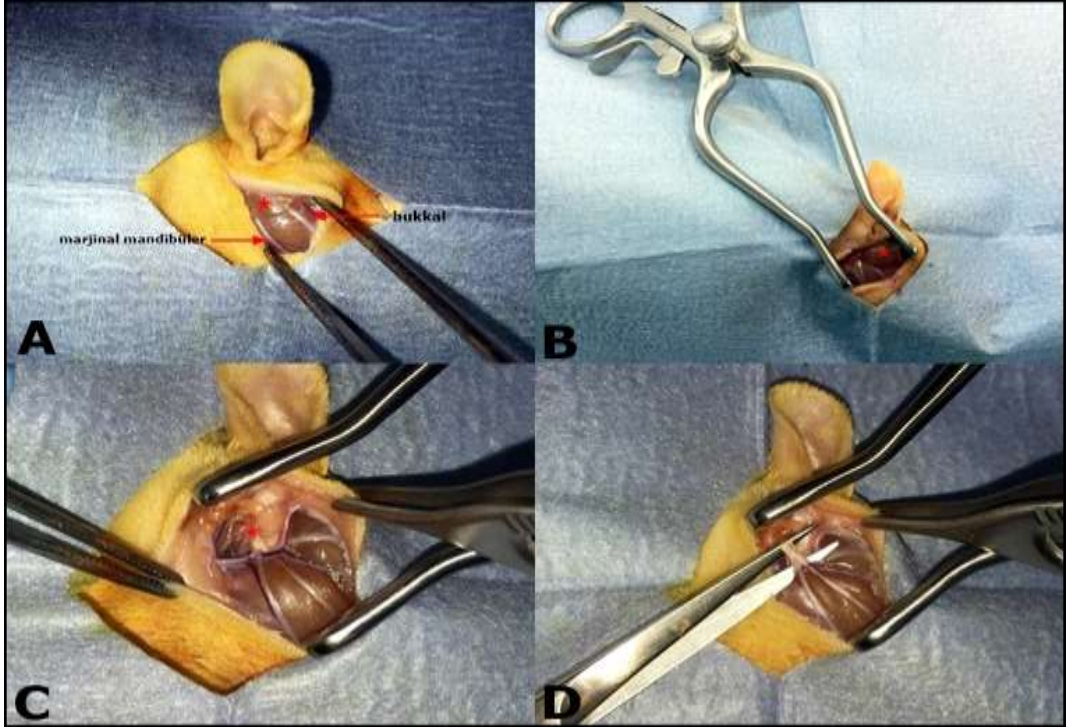
Bütün sıçanlar işlem sonrası toplam 28 gün takip edilmiştir.



Resim 2. Fasial sinir ana trunkusu ve dalları. * Eksternal juguler ven



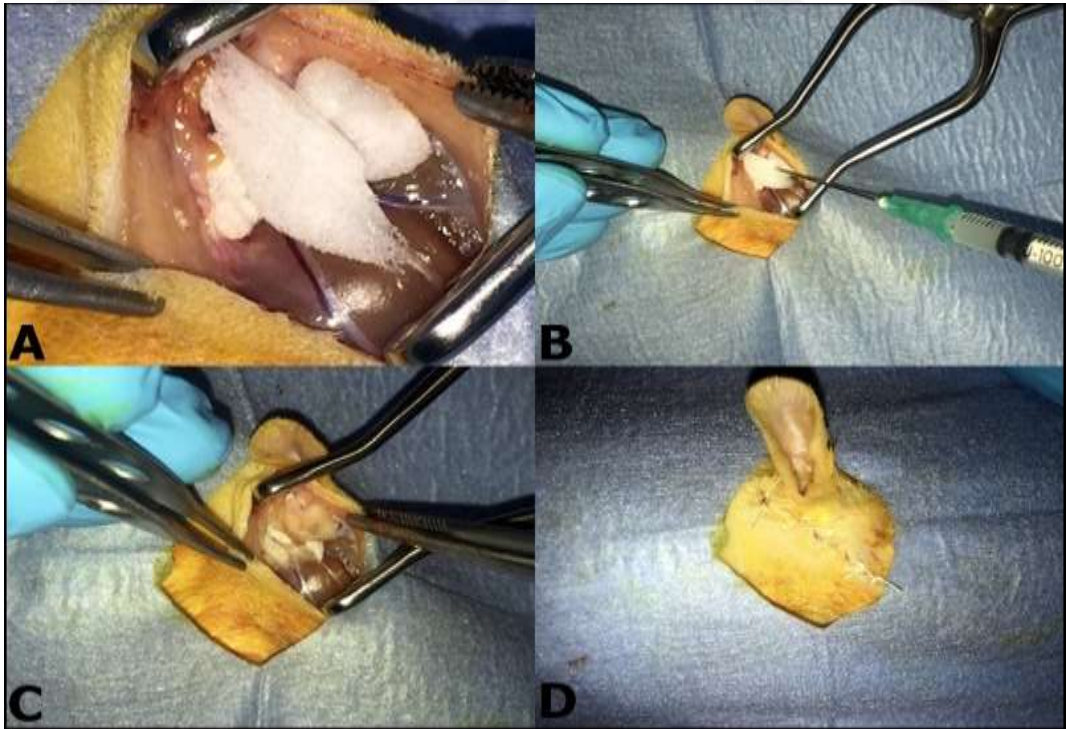
Resim 3. A, sıçanların sağ yüz yarısı traş edilip cerrahi pozisyonun hazırlanması; B, batikon ile saha temizliği; C, steril örtü ile örtme; D, infraauriküler insizyon



Resim 4. A, bukkal, marjinal mandibüler dallar ve *preauriküler lenf nodu; B, *preauriküler lenf nodu, C, fasiyal sinir ana trunkusu, dalları, *fasiyal sinir ana trunkusu; D, ana trunkus



Resim 5. A,B, sinir ana trunkusunun klemp ile hasarlanması; C,hasar sonrası; D,gelfoam parçaların bölgeye yerleştirilmesi



Resim 6. A, gelfoam yerleştirildikten sonra; B, ADKMKH' nin uygulantışı; C, uygulandıktan sonra; D, 5.0 ipek suture ile cilt sutureasyonu

3.5. KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU

Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre (ADKMKH) izolasyonu için iki adet rat kullanıldı. Ratların inguinal bölgesinden yağ yastıkçıkları eksize edildi. Fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanan yağ dokusu taşıma solüsyonu içerisinde Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'ne (GENKÖK) taşınmıştır. Taşıma solüsyonu %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri (DMEM)'dir. Ardından steril bir petri içerisine alınan yağ dokusu mekanik olarak parçalandı. 30 dakika boyunca Tip 2 Kollojenaz (2,5mg/ml; Sigma Aldrich, Almanya) kullanarak 37°C'de enzimatik olarak parçalanan yağ dokusu filtreden geçirilerek hücrelerine ve debrisine ayrıştırılmıştır. Ardından elde edilen mezenkimal kök hücreler %1 penisilin/streptomisin (Biological Industries, İsrail) ve L-glutamin (Biological Industries, İsrail) içeren standart DMEM kültür ortamında 3-4 günde bir besiyeri değiştirerek çoğaltıldı. Adipoz dokudan hücreler %80-90 yoğunluğa gelince pasajlama işlemi yapıldı. Kültür kaplarının içerisindeki besiyeri boşaltılarak PBS ile yıkama yapıldı. Hücreleri kültür kabından kaldırmak için üzerine tripsin EDTA (Biological Industries, İsrail) eklendi. Tripsin aktivitesi durdurulduktan sonra süspansiyon konik tüpler içerisine toplandı. 300 g.' de 21 °C' de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak pellet kültür kabı başına $1-1,2 \times 10^6$ canlı hücre olacak şekilde ekim işlemi yapıldı. Bu işlemler hücreler 3. pasaj olana kadar devam ettirildi. Hayvan ameliyatlarının olduğu gün sıçan başına 0.2 cc' de 1×10^6 hücre olacak şekilde hazırlandı.

İmmunfenotiplendirme analizi için, üçüncü pasaja gelen hücreler Tripsin-EDTA (Biological Industries, ABD) ile 3 dakika inkübe edildikten sonra iki defa yıkama işlemi yapıldı. 1×10^6 hücre akım sitometri analizi için kullanıldı. CD 11b/c (BD#562222), CD29 (BD#562801), CD44 (BD#550974), CD45 (BD#561587), CD73(BD#551123) ve CD90 (BD#561409) antikorları ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda inkübe edildi. Ardından hücreler santrifüjle yıkanarak akım sitometri cihazında (BD FACS Canto II) analiz edildi.

3.6. DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

3.6.1. Göz kapama performans analizi

Sıçanların pamuk çubuk ile korneaya dokunduktan sonra gözünü kapatma kabiliyeti, Borin ve arkadaşları (53) tarafından tarif edildiği gibi aşağıdaki skala kullanılarak değerlendirildi (Tablo 1).

İşlem öncesi bütün sıçanların, bilateral kornea refleksleri kontrol edilerek, normal olduğu gözlemlendi.

Tablo 1. Göz kapatma refleksi değerlendirme skalası (71).

Skor	Hareket
0	Gözle farkedilen herhangi bir hareketin olmaması
1	Kasın kasılması ancak farkedilen kapanmanın olmaması
2	Gözde % 25 kapanma gözlenmesi
3	Gözde % 25-50 kapanma gözlenmesi
4	Gözde % 50-75 kapanma gözlenmesi
5	Gözde % 75-100 kapanma gözlenmesi



Hasar öncesi ve sonrası 1., 2., 3. ve 4. haftalardaki skorlar kaydedildi. Elde edilen skorlar grupların kendi içinde ve gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.6.2. Elektromiyografi (EMG)

Tüm elektrofizyolojik ölçümler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı EMG Laboratuvarı'nda yapıldı.

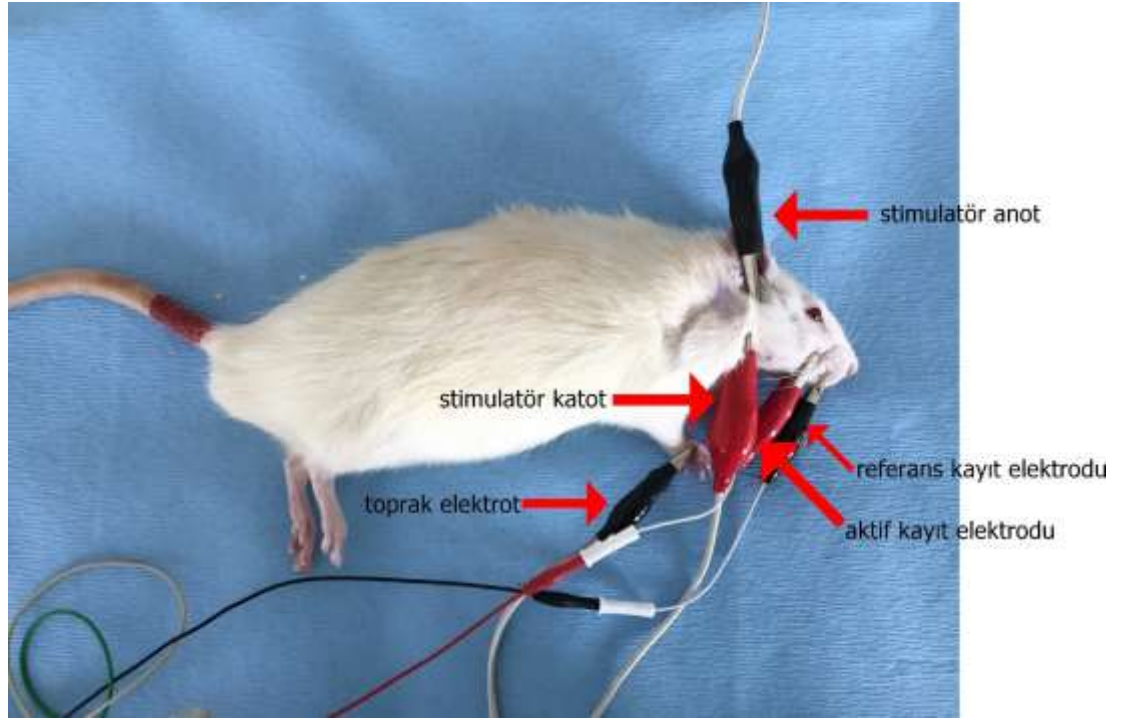
Sıçanların EMG kayıtları, Cadwell® (Sierra® Summit™, ABD) cihazı kullanılarak kaydedildi (Resim 7-8). Cerrahi işlem öncesi ve işlemten 4 hafta sonra hayvanların bilateral fasiyal sinir EMG kayıtları alındı. Tüm EMG'ler aynı nöroloji uzmanı tarafından kör olarak değerlendirildi. Cerrahi işlemten 4 hafta sonra, 50 mg/kg Ketamin HCl (Ketalar® 500 mg/10 ml, Pfizer) ve 5 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun® %2, 25 mg/ml, Bayer) kombine anestezi indüksiyonundan sonra, uyarılmış bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) sinyallerini kaydetmek için, vibrissal kaslara, aktif kayıt elektrodu yerleştirildi; referans kayıt elektrodu ise yaklaşık 10 mm distale yerleştirildi. Fasiyal sinir ana trunkusu, bipolar yüzey stimülatörü ile, stilomastoid foramen altına yerleştirilen katot (negatif kutup) klips ve bunun 10mm proksimaline yerleştirilen anot (pozitif kutup) klips ile uyarıldı. Kayıt elektrodu ile stimülatör arasındaki mesafe 2 cm olacak şekilde ayarlandı. Hayvanın sağ üst ekstremitesine toprak klips elektrodu yerleştirildi (Resim 9). Tüm BKAP'lar, 20 ila 50 miliamper yoğunluğu ve 0.1 ms'lik bir süre ile uygulanan, supramaksimal sinir stimülasyonu ile elde edildi. Filtreler 2-10.000 Hz'e ayarlandı. BKAP latansı, stimulus artefaktından, BKAP dalgasının ilk elektronegatif defleksiyonunun başlangıç noktasına kadar geçen süre (ms) olarak tanımlandı. Hasarlanan fasiyal sinirinin iyileşmesini değerlendirmek için BKAP'ların latansı ve amplitüdü kaydedildi (Şekil 4). Elde edilen BKAP amplitüd ve latans değerleri gruplar arasında kıyaslandı.



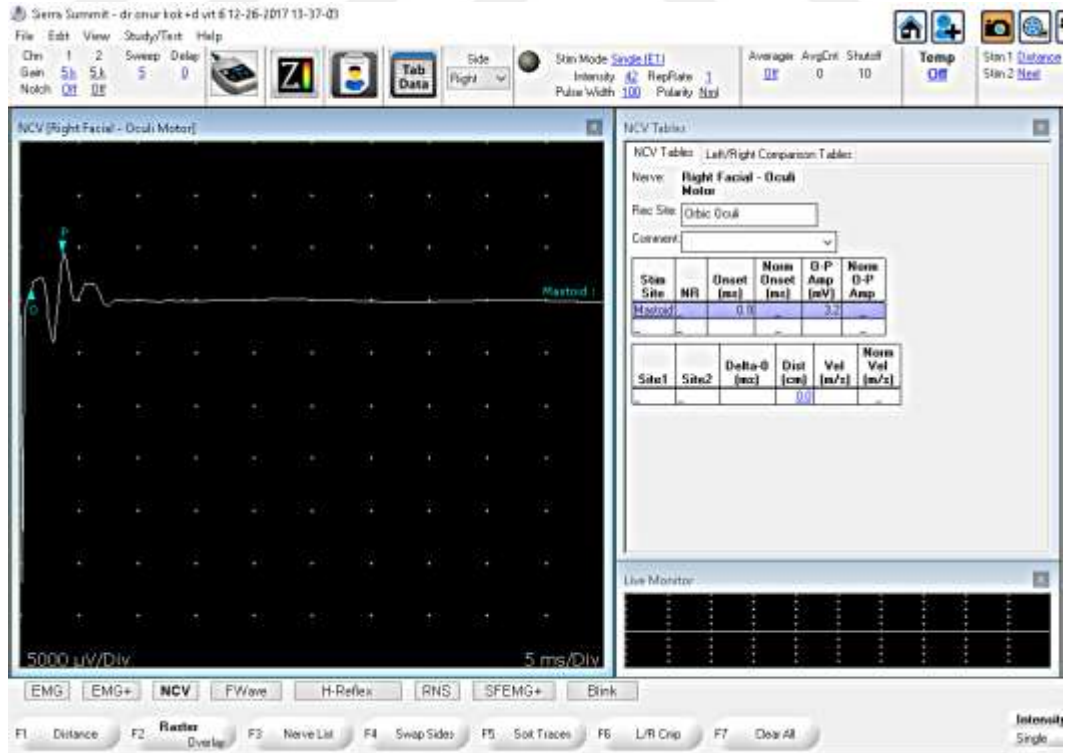
Resim 7. EMG kayıtlarının alındığı Cadwell® (Sierra® Summit™, ABD) cihazı



Resim 8. Deney hayvanlarına EMG uygulaması



Resim 9. Elektrodların montajı



Şekil 4. EMG grafiği

3.6.3. Histolojik analiz

Histolojik değerlendirme, cerrahi işlemden 4 hafta sonra yapıldı. Hayvanların sağ fasiyal sinirleri, 50 mg/kg Ketamin HCl (Ketalar® 500 mg/10 ml, Pfizer) ve 10 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun® %2, 25 mg/ml, Bayer) kombine anestezi indüksiyonundan sonra tekrar disseke edildi. Sinir, stilomastoid foramenlerden çıkış noktası ile bukkal dalının 3 mm'lik segmenti dahil olacak şekilde çıkarıldı. Kontrol grubu hayvanların sol yüzü sham grubu olarak kabul edildiği için bu sıçanların tarif edilen şekilde bilateral fasiyal sinirleri çıkarıldı. İşlem sonrası hayvanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

Alınan fasiyal sinirler % 4 paraformaldehid içinde +4 °C'de 24 saat fikse edildi. Daha sonra sinir dokuları kryomatriks içine gömölerek sıvı azot ile dondurulup bloklar hazırlandı ve boyama işlemi yapılana kadar bloklar -80 ° C' de muhafaza edildi. Kryostat cihazı yardımı ile -80 ° C' den alınan sinir dokularından 8 µm kalınlığında transvers kesitler alındı ve histopatolojik değerlendirme için kesitler Oil Red O ile boyandı. Herbir deney grubuna ait sinir kesitlerinin morfolojik değerlendirmesi için bir ışık mikroskobu kullanılarak (Olympus BX-51, Tokyo, Japonya) 100x büyütmede rastgele 5 farklı alandan mikroskobik fotoğraflar çekildi (Resim 10).

Kantitatif Histomorfometri

Fasiyal sinirdeki akson sayısı, niceliksel histomorfometride doğruluk açısından Image J yazılım programı kullanılarak sayıldı. Sinir kesitlerinde, miyelinli sinir lifi çapı, her gruptan en az 1000 tane olacak şekilde Image J yazılım programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen veriler gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildi.



Resim 10. Fasiyal sinir histolojik kesitlerinin ışık mikroskopi görüntüsü (8 µm frozen kesit, Oil red O boyama, 100x büyütme, aksonlar (siyah ok) ve etraflarında kırmızı boyanmış miyelin dokusu)

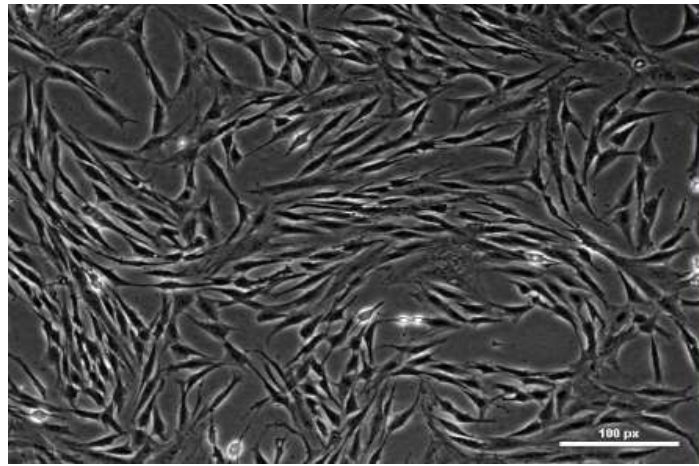
3.6.4. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler TURCOSA (Turcosa Analitik Ltd. Co., Turkey, www.turcosa.com.tr) programı kullanılarak yapılmıştır. Verideki değişkenlerin normal dağılıp dağılmadığını değerlendirmek için Shapiro-Wilk testinden, histogram, ve q-q plot grafiklerinden yararlanılmıştır. Varyans homojenlikleri için Levene test istatistiği kullanılmıştır. Veriler; sıklıklar ve yüzdelikler, ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca, minimum-maksimum olarak gösterilmiştir. Haftalar arasında fark olup olmadığına parametrik olmayan Friedman testi ile bakılmıştır. Gruplar arası farklılıkları değerlendirmek için parametrik tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve parametrik olmayan Kruskal – Wallis testi kullanılmıştır. Gruplar arası ikili karşılaştırmalar için LSD test istatistiği kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi olarak p-değeri 0.05 alınmıştır.

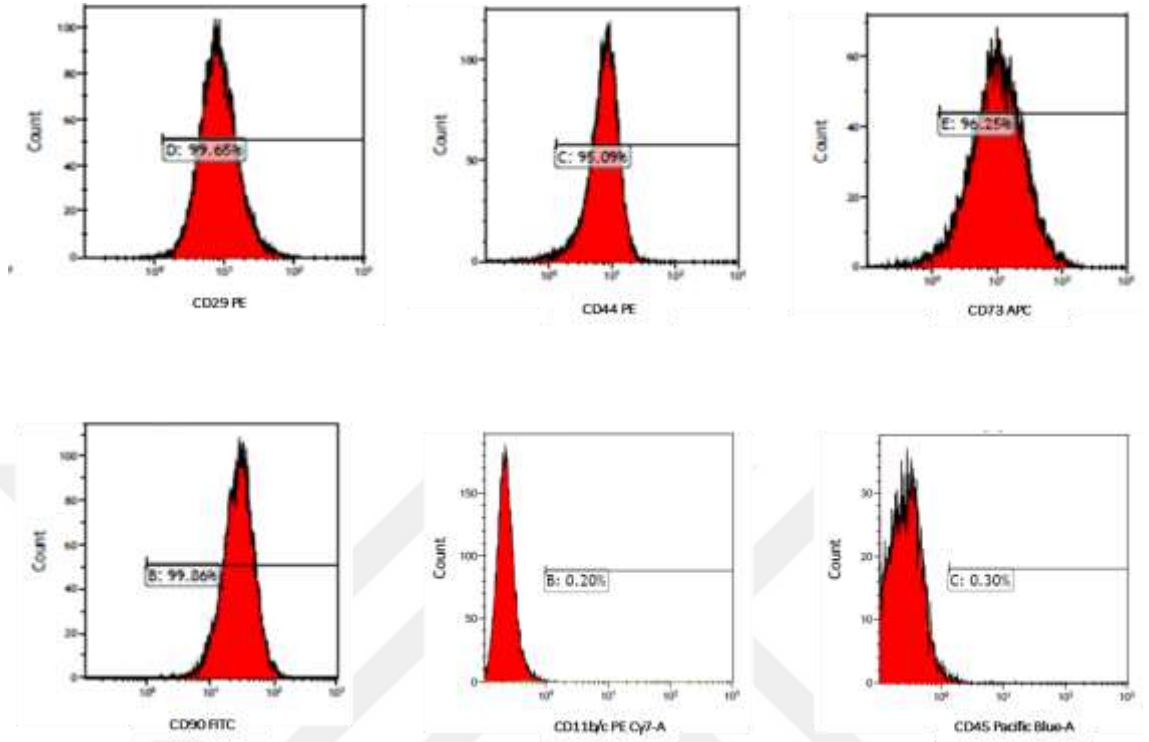
4. BULGULAR

4.1. ADİPOZ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYON VE KARAKTERİZASYONU

Adipoz mezenkimal kök hücrelerin kültür kaplarına tutunan adherent özellikte olduğu tespit edildi. İğsi yapıda ve fibroblast benzeri morfolojiyi sergiledikleri ve pasajlar boyunca koruduğu gözlemlendi (Resim 11). Akım sitometri ile yapılan analiz sonucu hücrelerin, CD45, CD11b belirteçleri için negatifken; CD44 CD73, CD90 , CD29 belirteçlerini pozitif eksprese ettiği bulundu (Şekil 5). Bu özellikleri ile mezenkimal kök hücre oldukları doğrulandı.



Resim 11. İğsi yapıya sahip sıçan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler, Invert Mikroskop x10



Şekil 5. Sıçan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri ile karakterizasyon histogramı CD29 (%99.65); CD 44 (%95.09); CD73 (%96.25); CD90 (%90.86); CD11b (%0.2) ve CD 45 (%0.3)

4.2. GÖZ KAPATMA PERFORMANS ANALİZİ

Tüm gruplarda cerrahi öncesinde yapılan bilateral kornea refleks muayenesi ve fasiyal fonksiyonların normal olduğu görülmüştür.

Tablo 2. Gruplara göre göz kapatma refleks skorumları. (Ortanca, minimum-maksimum, Küçük harfler haftalar arası, büyük harfler ise gruplar arası anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,05$))

	Hafta 1	Hafta 2	Hafta 3	Hafta 4	p
Grup 1s (Sham)	5.00 (5.00-5.00) ^{aC}	5.00 (5.00-5.00) ^{aC}	5.00 (5.00-5.00) ^{aBC}	5.00 (5.00-5.00) ^{aB}	0.99
Grup 1k (Kontrol)	0.00 (0.00-0.75) ^{aA}	2.00 (1.00-2.75) ^{abA}	3.00 (3.00-3.75) ^{bcA}	4.00 (4.00-5.00) ^{cA}	<0.001
Grup 2 (D vit)	1.00 (0.25-1.75) ^{aAB}	3.00 (2.00-3.75) ^{abAB}	4.50 (4.00-5.00) ^{bcAB}	5.00 (5.00-5.00) ^{cB}	<0.001
Grup 3 (Kök hücre)	2.00 (2.00-3.00) ^{aBC}	4.50 (3.25-5.00) ^{abBC}	5.00 (5.00-5.00) ^{bcBC}	5.00 (5.00-5.00) ^{bcB}	<0.001
Grup 4 (Kök + D vit)	3.00 (3.00-4.50) ^{aCD}	4.00 (3.25-5.00) ^{abBC}	5.00 (5.00-5.00) ^{bcBC}	5.00 (5.00-5.00) ^{bcB}	<0.001
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

1.hafta

1. hafta değerlendirme sonuçlarına göre: Grup 1k ile grup 3 ve 4 (kök hücre verilen gruplar) arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmiştir ($p<0,05$). Sadece D vitamini uygulanan grup 2 ile hem kök hücre hem D vit. uygulanan grup 4 arasında da anlamlı fark görülmüştür ($p<0,05$). Kök hücre içeren grupların kendi arasında (grup 3-4) anlamlı fark izlenmemiştir ($p>0,05$). 1. hafta fonksiyonel değerlendirme sonuçlarına göre; kök hücrenin, iyileşme hızını artırdığı görülmüştür.

2.hafta

2. haftanın sonunda grup 3 ve grup 4 ile kontrol grubu arasında anlamlı fark izlenmiştir ($p<0,05$). Grup 2 ile grup 3 ve 4 arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). Ayrıca 2. haftanın sonunda sham grubu, yani hiç hasar verilmemiş olan grup ile kök hücre

uygulanan grup 3 ve 4 arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Bu da kök hücre uygulanan gruplarda fonksiyonun tama yaklaştığını göstermektedir.

2.hafta sonuçlarına göre, 1. Haftadakine benzer şekilde kök hücrenin iyileşme hızını artırdığı görülmüştür.

3.hafta

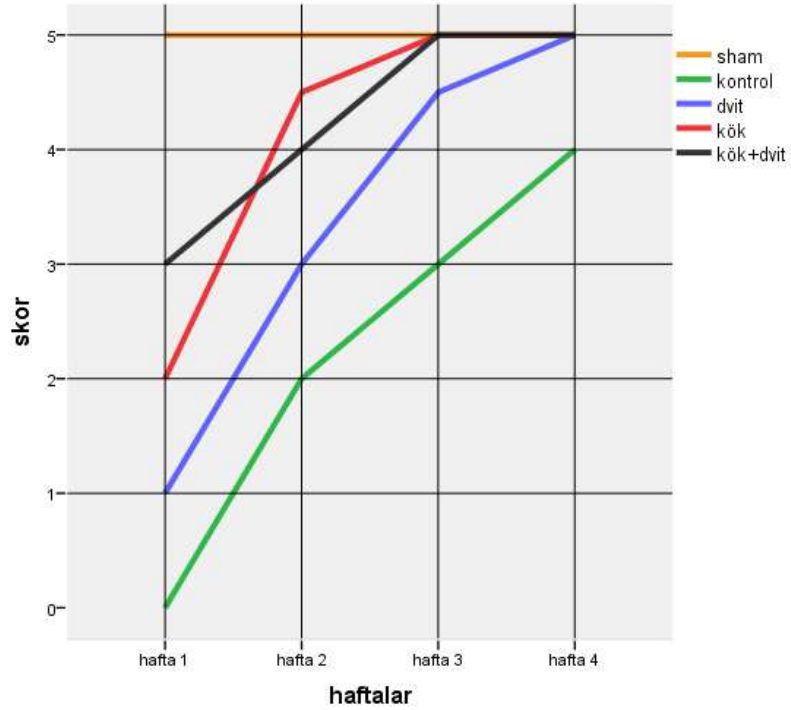
3. hafta sonunda grup 3 ve grup 4' te fasiyal fonksiyonların tamamen düzeldiği gözlenmiştir.

İyileşme hızlarına istatistiksel açıdan bakıldığında, 3. hafta sonuçları da 2. haftadakine benzer bulunmuştur. Grup 3 ve grup 4 sıçanların kontrol grubu ile anlamlı fark izlenmiştir ($p<0,01$).

4.hafta

4 hafta sonunda, kontrol grubu da dahil olmak üzere bütün gruplarda fasiyal fonksiyonların tama yakın (evre 4-5) düzeldiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak kök hücre içeren gruplarda (grup 3-4) 2. haftanın sonunda tama yakın (evre 4-5) iyileşme gözlenmiştir. 3. haftanın sonunda grup 2' de de tama yakın iyileşme izlenmiştir. Grup 1' de tama yakın iyileşme 4. haftanın sonunda izlenmiştir (Grafik 1) (Tablo 2).



Grafik 1. Grupların haftalık iyileşme eğrileri

4.3. ELEKTROMİYOGRAFİK ANALİZ (EMG)

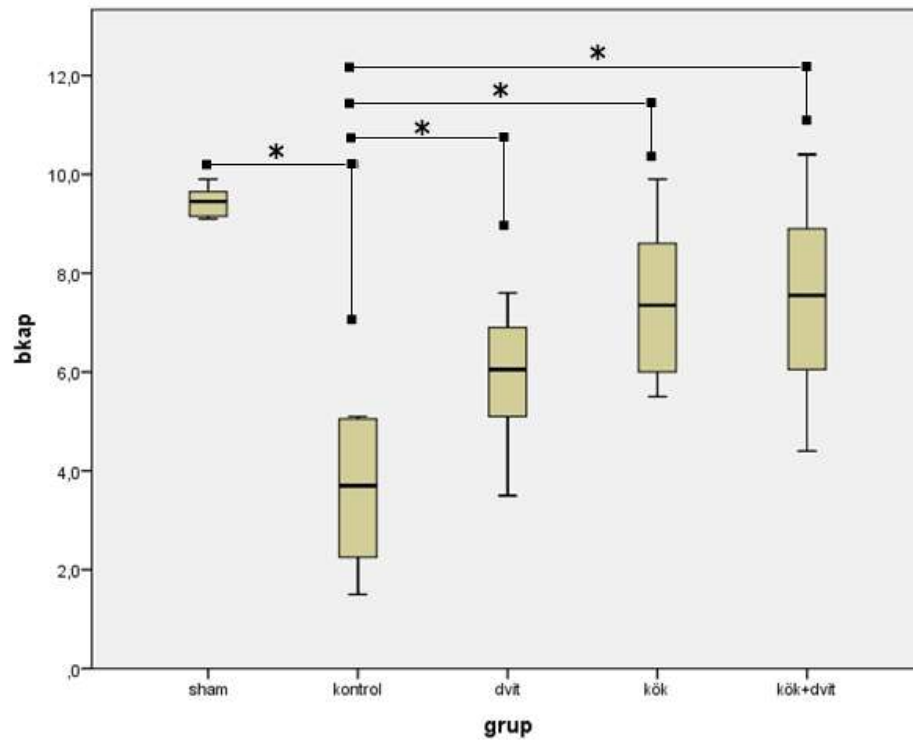
BKAP amplitüd değerleri, Sham grubunda 9.43 ± 0.30 mV, kontrol grubunda 3.57 ± 1.46 mV olarak elde edilmiştir ($p < 0,05$). Tüm deney grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı istatistiksel fark izlenmiştir ($p < 0,05$). Grup 4' ün BKAP amplitüd değerleri sham grubuna yakın izlenmiştir ($p > 0,05$). Grup 2' nin BKAP amplitüdü, kök hücre uygulanan gruplara (grup 3 ve 4) göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Grup 3 ve grup 4 kendi arasında kıyaslandığında; klinik olarak BKAP amplitüd değerlerinin grup 4' te daha iyi olmasına karşın, iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark izlenmemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 3) (Grafik 2).

BKAP latansları, sham grubunda 0.87 ± 0.04 ms, kontrol grubunda 1.83 ± 0.44 ms olarak izlenmiştir ($p < 0,05$). Tüm deney grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark izlenmiştir ($p < 0,05$). Deney grupları kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). Deney grupları ile sham grubu arasında BKAP latansı açısından anlamlı fark izlenmemesi ($p > 0,05$) sinir rejenerasyonunun fonksiyonel olarak tama yakın olduğunu düşündürmüştür (Tablo 3) (Grafik 3).

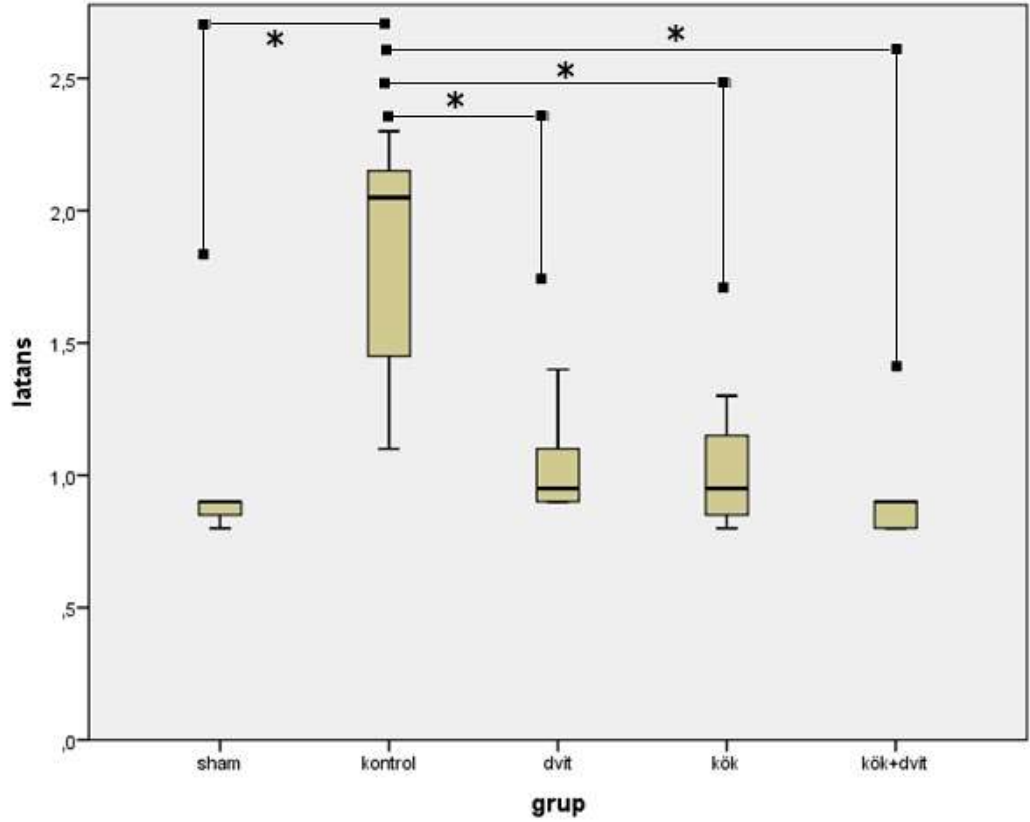
D vitamininin tek başına uygulanmasının, elektrofizyolojik açıdan rejenerasyona olumlu etkileri olduğu görülmüştür. En iyi elektrofizyolojik sonuçlar kök hücre gruplarında (Grup 3-4) izlenmiştir.

Tablo 3. BKAP Latans (ms) ve BKAP amplitüd (mV) değerlerinin gruplara göre dağılımı. (BKAP: Bileşik kas aksiyon potansiyeli, Küçük harfler gruplar arası anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)).

	Latans (ms)	BKAP Amplitüdü (mV)
Grup 1s (Sham)	0.87 ± 0.04^b	9.43 ± 0.30^a
Grup 1k (Kontrol)	1.83 ± 0.44^a	3.57 ± 1.46^b
Grup 2 (D vit.)	1.02 ± 0.17^b	5.90 ± 1.36^c
Grup 3 (Kök Hücre)	1.00 ± 0.18^b	7.41 ± 1.56^d
Grup 4 (Kök+D vit.)	0.86 ± 0.05^b	7.47 ± 2.08^d
p	$<0,001$	$<0,001$



Grafik 2. BKAP amplitüd (mV) değerlerinin gruplara göre dağılımı. * Gruplar arası istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,05$).



Grafik 3. BKAP Latans (ms) değerlerinin gruplara göre dağılımı. * Gruplar arası istatistiksel anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,05$).

4.4. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

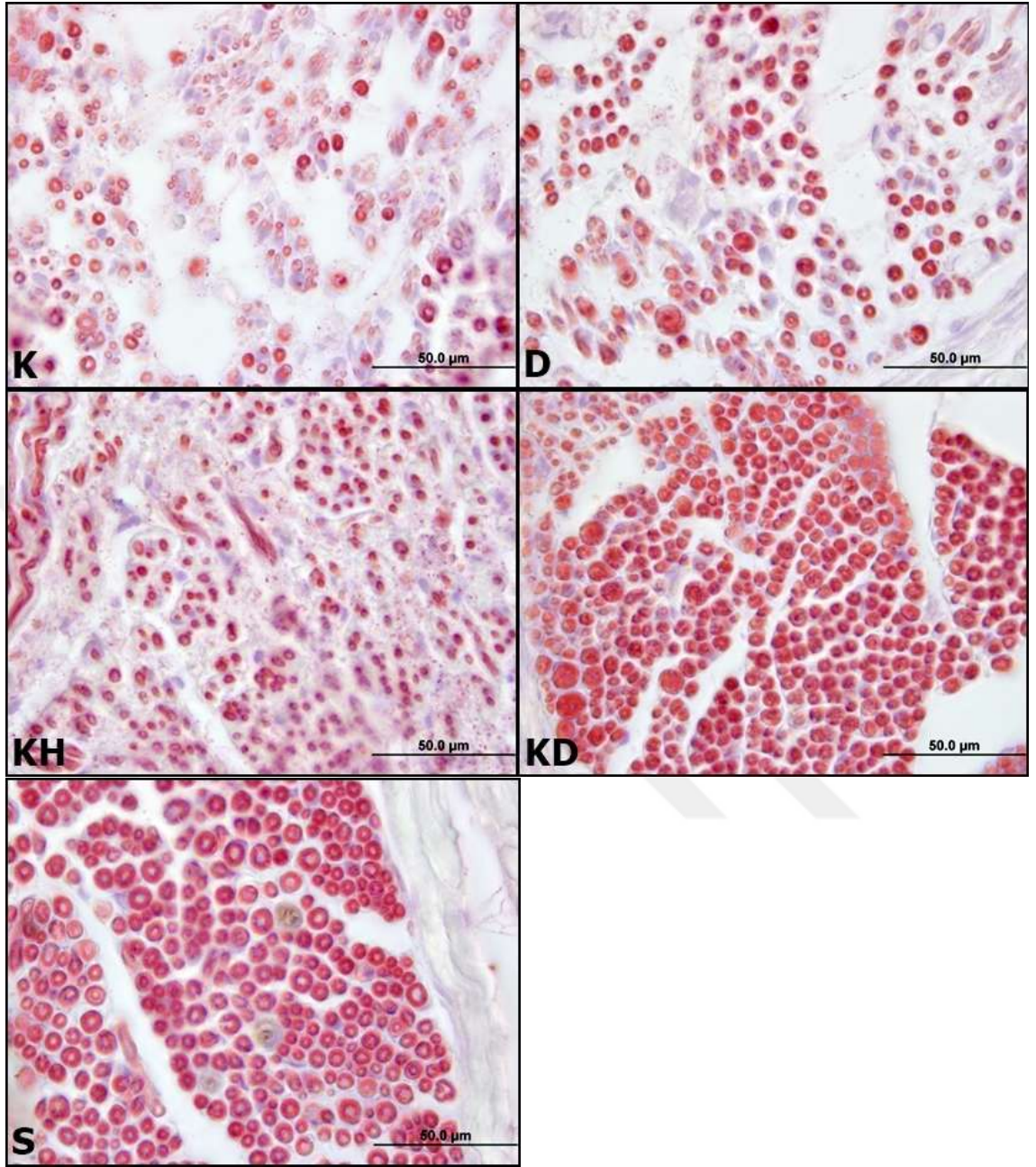
Akson sayıları, Sham grubunda 337.80 ± 48.98 , kontrol grubunda 254.68 ± 39.95 olarak elde edilmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubunun akson sayısı tüm deney gruplarından düşük olmakla birlikte; istatistiksel olarak anlamlı farklılık yalnızca Grup 4 ile arasında gözlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca Grup 4 ile sham grubu arasında anlamlı fark izlenmemesi bu grupta sinir rejenerasyonunun histolojik olarak tama yakın olduğunu düşündürmüştür ($p>0,05$) (Tablo 4) (Grafik 4).

Miyelinli akson çapları, Sham grubunda $4.41 \pm 1.27 \mu\text{m}$, kontrol grubunda $3.70 \pm 1.36 \mu\text{m}$ olarak elde edildi ($p<0,05$). Yalnızca Grup 4’ te miyelinli akson çapları, diğer gruplara kıyasla anlamlı yüksek izlendi ($p<0,05$) (Tablo 4).

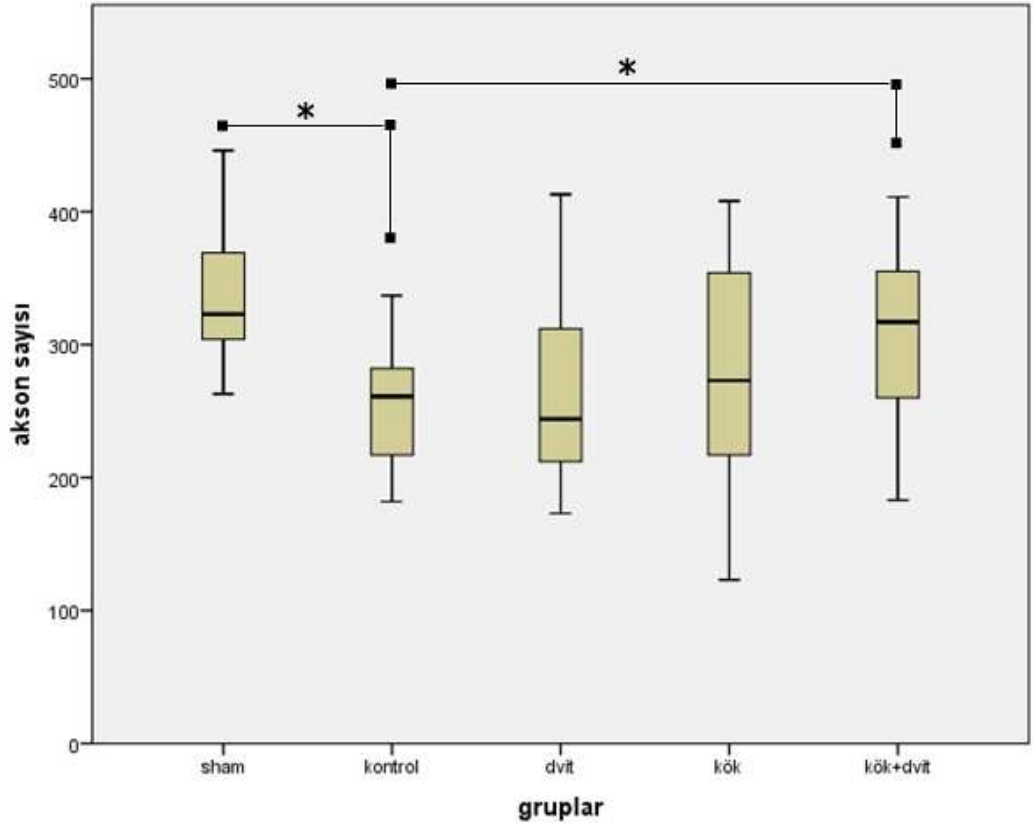
Sonuç olarak, D vitamini ve kök hücrenin birlikte uygulanmasının, daha iyi histolojik bulgulara sebep olduğu görülmüştür. Sham grubuna ait fasiyal sinirlerin histolojik kesitleri ışık mikroskopik olarak incelendiğinde, bağ dokusu ve schwann hücre kılıfı ile çevrelenmiş çok sayıda aksondan oluşan fasiyal sinir histolojisi normal görünüm sergiledi. Kontrol grubunda aksonal dejenerasyon, myelin kaybı ve inter aksonal bağ dokusu kaybı gibi histopatolojik değişiklikler dikkati çekti. Sadece kök hücre ve D vitamini verilen gruplarda görülen hasar miktarı kontrole göre azalma gösterdi. Sinir hasarından sonra kök hücre ile D vitamini birlikte verilen grupta ise sadece kök hücre ve D vitamini verilen gruplara göre iyileşmenin daha iyi olduğu ve histolojik bulguların neredeyse sham grubuna yakın olduğu belirlendi (Resim 11).

Tablo 4. Akson sayıları ve akson çaplarının gruplara göre dağılımı. (Küçük harfler gruplar arası anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$))

	Akson Sayısı	Akson Çapı (μm)
Grup 1s (Sham)	337.80 $\pm$ 48.98 ^a	4.41 $\pm$ 1.27 ^a
Grup 1k (Kontrol)	254.68 $\pm$ 39.95 ^b	3.70 $\pm$ 1.36 ^b
Grup 2 (D vit.)	269.32 $\pm$ 75.04 ^b	3.62 $\pm$ 1.11 ^b
Grup 3 (Kök Hücre)	272.80 $\pm$ 85.62 ^b	3.70 $\pm$ 1.35 ^b
Grup 4 (Kök+D vit.)	311.48 $\pm$ 63.86 ^a	4.01 $\pm$ 1.72 ^c
<i>p</i> değeri	<0,001	<0,001



Resim 12. Gruplara göre fasiyal sinir histolojik kesitlerinin ışık mikroskopi görüntüleri (8 μ m frozen kesit, Oil red O boyama, 100x büyütme, K: Grup 1k-kontrol grubu, D: Grup 2-D vitamini grubu, KH: Grup 3-ADKMKH grubu, KD: Grup 4-ADKMKH ve D vitamini grubu, S: Grup 1s-Sham grubu). Sham grubunun bağ dokusu ve schwann hücre kılıfı ile çevrelenmiş çok sayıda aksondan oluşan fasiyal sinir histolojisi normal görünümde izlenmiştir. Kontrol grubunda aksonal dejenerasyon, myelin kaybı ve inter aksonal bağ dokusu kaybı gibi histopatolojik değişiklikler görülmüştür. Sadece ADKMKH ve sadece D vitamini verilen gruplarda görülen hasar miktarı kontrol grubuna göre daha az izlenmiştir. Sinir hasarından sonra ADKMKH ile D vitamini birlikte verilen grupta ise sadece ADKMKH ve D vitamini verilen gruplara göre iyileşmenin daha iyi olduğu ve histolojik bulguların sham grubuna yakın olduğu belirlenmiştir.



Grafik 4. Akson sayılarının gruplara göre dağılımı. * İstatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

5. TARTIŞMA

Periferik fasiyal paralizinin idiyopatik (%50-80) nedenlerden sonra en sık ikinci nedeni travmadır (54). Periferik fasiyal paralizi, ateşli silah yaralanmasına, baş-boyun bölgesine alınan künt ve penetran travmalara, tümör cerrahisi gibi iyatrojenik sebeplere bağlı olarak ortaya çıkabilir. Travmatik fasiyal paralizilerde tedavinin şekli ve zamanı hastanın genel durumuna, paralizinin komplet veya parsiyel oluşuna, hemen veya gecikmiş şekilde ortaya çıkmasına, topografik testlere, elektrofizyolojik testlere, görüntülemelere, eksternal travmalarda yaranın temiz veya kontamine olmasına ve zedelenmenin lokalizasyonuna ve şiddetine göre belirlenir. Günümüzde travmatik fasiyal paralizi tedavisinde, cerrahi müdahale gereksinimi ve zamanı üzerinde fikir birliği bulunmamaktadır. Temporal kemik fraktürlerinde fasiyal paralizinin başlangıç zamanı önemlidir. Travma ile başlayan paralizi, sinirde kesi olduğunu ve erken müdahaleyi gerektirirken; daha sonra gelişen paralizi sinirde ödeme bağlanır ve prognoz daha iyi olduğunu ve medikal tedavi uygulanabileceğini düşündürür (55). Fasiyal paralizinin hafif olduğu durumlarda konservatif medikal tedaviler ile takip edilirken, travma sonrası total paralizilerde genellikle cerrahi dekompresyon ve eksplorasyon gerekmektedir. Bu tip ciddi yaralanmalar, sebep olduğu estetik ve psikolojik problemler nedeniyle, hastaların yaşam kalitelerini önemli derecede etkilemekte ve güncel tıbbi yaklaşımlar gelişse de tedavide fasiyal fonksiyonların kazanımı konusunda genellikle tatmin edici sonuçlar alınamamaktadır.

Deneyssel hayvan çalışmalarında fasiyal sinir paralizi modeli olarak tam kat kesi (29), segmental eksizyon (56) , ezilme (57) gibi çeşitli yöntemler tarif edilmiştir. Ezilme tipi hasar modeline örnek olarak anevrizma klipsleri ile ezme (58), dişsiz mini forseps ile iki

eksende, 30'ar saniye, toplam 1 dakika süreyle ezme (59) vasküler klemp yardımıyla 30 dakika veya 40 dakika süre ile ezme (60) gibi farklı uygulama metodları tanımlanmıştır. Ezilme hasarında uygulanan kuvvet ve uygulama süresindeki farklılıklar ile gelişen hasarın derecesi ve rejenerasyonun değerlendirildiği çalışmalarda; ezilme hasarı aksonotomezis tablosu oluşturmakta; şiddet ve süre değişse de sinir rejenerasyonunun belli bir süre sonra tam veya tama yakın sağlandığı bildirilmektedir (61, 62). Literatürde tarif edilen bu tekniklerde ezilme hasarını standardize edebilmek için yazarlar siyatik sinir üzerinde uyguladıkları farklı cihazlar tanımlamışlardır (63, 64). Çalışmamızda da standart ezilme hasarı oluşturulması için, sensörlü bir forseps geliştirilmiş ve fasiyal sinirde bütün hayvanlarda aynı şiddette ve sürede hasar oluşturulmuştur.

Literatürde, sinir iyileşmesinde farklı yöntemlerin kullanıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır ve bunlar çoğunlukla deneysel hayvan çalışmalarıdır. Hayvan çalışmalarında hasar sonrası, iyileşmesi beklenen sinir segmenti insana kıyasla kısa, iyileşme hızı daha yüksek (2-3 mm/gün) olduğu için iyileşmeyi değerlendirme yöntemlerinin zamanlaması da insandan farklı olmaktadır. Bu çalışma planlanırken, literatürdeki bilgilere göre, sinir rejenerasyonunun gözlemlenebilmesi için, 4 haftalık sürenin yeterli olduğu düşünüldü ve değerlendirme sonuçları bu sürenin yeterli olduğunu ortaya koydu.

Periferik sinir rejenerasyonunda, tam kat kesilerde uc uca anastomoz önerilirken, segmenter sinir defektlerinde anastomoz gerginliğini azaltmak için köprü grefler ile onarım altın standart kabul edilmektedir. Hasarlanmış sinirin tamamen doğru tekniklerle onarımı yapılsa dahi her zaman optimum sonuçlar alınamamaktadır. Bu nedenle sinir rejenerasyonunu artıracak veya hızlandıracak kök hücreler, sinir conduitleri (65), insülin-benzeri büyüme faktörü (66), melatonin (67) gibi birçok farmakolojik ilaç ve tedavi yöntemi bildirilmiştir. Bu yöntemlerden en çok umut vaad edenlerinden biri kök hücre uygulamalarıdır. Rejeneratif tıp alanında çok çeşitli kök hücreler tanımlanmıştır. Embriyonik kök hücreler, erişkin mezenkimal kök hücreler, adipoz doku kaynaklı kök hücreler bunlardan birkaçıdır. Mezenkimal kök hücreler osteoblast, adiposit, miyosit, kondrosit gibi mezenşimal hücrelere diferansiye olma kapasitesine sahip olan multipotent kök hücrelerdir.

Emrionel kök hücreler diferansiasyon kapasiteleri daha yüksek olan ancak, temin edilmesi konusunda etik problemler nedeniyle çalışma alanı daha az olan pluripotent yapıdaki hücrelerdir. Embriyonel kök hücrelere göre avantajları olan bu mezenkimal kök hücreler için çeşitli kaynak dokular mevcuttur ve en önemlilerinden biri kemik iliğidir. Ancak kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin de temininin invaziv bir metod olan kemik iliği aspirasyonu ile sağlanması, çoğalma ve farklılaşma kapasitelerinin az olması dezavantajları arasındadır. Bu nedenlerle yeni kök hücre kaynakları aranmış olup; Zuk ve arkadaşları (68) kendini yenileyebilen, progenitor, farklılaşmamış, multipotent, morfolojik ve fenotipik olarak mezenkimal kök hücre özelliklerine sahip yeni bir kök hücre kaynağı bildirmişlerdir. Bu mezenkimal kök hücrelere benzer farklılaşma kapasitesine sahip olan kök hücreler, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler olarak isimlendirilmiş ve spesifik kök hücre göstergelerini eksprese ettikleri gösterilmiştir (69). Adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin özellikle cilt altı dokudan ve tekrar edilebilir uygulamalarla kolaylıkla izole edilebilmesi, hastanın yaşı ile azalmayan kök hücre kalitesi ve çoğalma kapasitesine sahip olması kemik iliği kaynaklı kök hücrelere üstünlükleri arasındadır (70, 71). Adipoz doku kaynaklı kök hücreler ile kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, diferansiye olma kapasiteleri ve immünmodulator etkileri arasında minör farklılıklar tespit edilmiştir (72, 73). Kemik iliği kaynaklı kök hücreler daha iyi osteojenik farklılaşma özelliği gösterirken; adipoz doku kaynaklı kök hücreler daha iyi kollajen sentezleme özelliği göstermektedir. Ancak adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin, genetik ve morfolojik olarak uzun süreli kültürlerde daha dayanıklı, daha az yaşlanma özelliği gösteren ve daha yüksek çoğalma kapasitesine sahip oldukları bildirilmiştir (74). Kolay temin edilmesinin yanında, kültürde hızlı büyümesi, immünitesinin minimal olması ve donör sahada reaksiyon oluşturmada yaşayabilmesi, adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin avantajları arasında sayılabilir (75).

Periferik sinir hasarında, kök hücre uygulamasının, olumlu etkilere sebep olduğu gösterilen bir çok çalışma mevcuttur (28, 38, 76, 77). Kök hücrelerin doku mühendisliği teknikleri ile kombine kullanımının sinir rejenerasyonu ve fonksiyonel iyileşmesini artırdığı gözlenmiş ve bu alan giderek artan ilgi odağı olmuştur (78). Farklı kök hücre tiplerinin sinir rejenerasyonuna olan etkileri araştırılmıştır. Nöral kök hücrelerin Schwann hücre prekürsörü olmasından dolayı deneysel çalışmalarda sinir

rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (79). Ancak etik problemler ve temin edilmesindeki güçlükler nedeniyle kullanımı kısıtlıdır. Embriyonel kök hücrelerin de sinir rejenerasyonuna olumlu etkileri olduğu düşünülmesine karşın, aynı nedenlerle kullanımı kısıtlanmaktadır (80). Kemik iliği kök hücresi, adipoz doku kaynaklı kök hücre, dental pulpa kök hücresi gibi mezenkimal kök hücrelerin nöronlara ve schwann hücrelerine diferansiasyon gösterme ve nörotrofik faktörler üretme yeteneklerinden dolayı periferik sinir rejenerasyonuna önemli derecede yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (41, 78, 81-84).

Adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin sinir büyüme faktörü (NGF), glial hücre serisi-derive nörotrofik faktör (GDNF) ve beyin-kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) salgıladığı bildirilmiştir (20). Ayrıca bu hücrelerin nöron fonksiyon ve metabolizmasını etkileyen genleri de ürettiği gösterilmiştir (20).

Kök hücrelerin rejenerasyona ve miyelinizasyona olan bu olumlu etkilerinin, doğrudan hücre diferansiasyonuna bağlı olarak mı yoksa oluşturdukları mikroçevrede bir takım büyüme faktörleri ve sitokinlerin etkisi ile mi gerçekleştiği net olarak bilinmemektedir (85). Ancak adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin sinir iyileşmesine ve miyelinizasyona olan bu olumlu etkilerinin en önemli sebebinin Schwann hücrelerine diferansiye olma yetenekleri olduğu düşünülmektedir (38, 77, 86-88). Bu hücrelerin rejenerasyonun yanında salgıladıkları sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri ile anti-apoptotik, anti-inflamatuar, proanjiojenik, skar oluşumunu engelleyici etkileri gösterilmiştir (89). Salgıladıkları çok çeşitli nörotrofinler ile sinir sisteminde nöronal korunmayı sağladıkları da literatürde bildirilmiştir (90-92). ADKMKH'lerin immünmodülatör etkileri olduğu da bilinmektedir. Nötrofiller, makrofajlar, lenfositlerin ve dendritik hücrelerin aktivasyonunu engelleyebilirler (93). Yine literatürde ADKMKH'lerin bazı trofik faktörler salgılayarak doku iyileşmesini sağlamalarının yanı sıra yara iyileşmesi sırasında bazı pro fibrotic faktörlerin etkilerini antagonize ederek skar oluşumunu engelledikleri ve inflamasyonu düzenledikleri gösterilmiştir (94-97). Ancak, kök hücrelerin kendi doğasında var olan heterojenlik, sınırlı yaşam süreleri, öngürülemeyen hücre akıbeti ve farklı klinik sonuçları nedeniyle kullanımı oldukça sınırlanmaktadır (26).

Ozan ve arkadaşları (76) 2016 yılında yaptıkları çalışmada, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin cross face sinir greftleme uyguladıkları sıçanlarda iyileşmeyi artırdığını bildirmişlerdir.

Shinichi Esaki ve arkadaşları (28) 2018 yılında yaptıkları çalışmada, olfaktör mukozadan alınan kök hücrelerin, hasarlı fasiyal sinir bölgesine kendinden emilen scaffold (iskele) içinde enjekte edilerek sinir iyileşmesine olumlu etkilerini bildirmişlerdir. Çalışmamızın sonuçları da fasiyal sinir ezilme hasarında bölgeye lokal kök hücre uygulamasının sinir rejenerasyonunu artırdığını ve hızlandığını göstermiştir.

Kök hücrelerin uygulanan sahada hücreye tutunacağı, yaşayacağı, çoğalacağı ve hatta diferansiye olabilecekleri mikroçevre oluşturan, scaffold (iskele) adı verilen biyomateryaller gerekmektedir. Biyomühendislik alanındaki gelişmelerle birlikte kendinden absorbe edilebilen veya edilemeyen, 3D yazılımlarla üretilebilen çok çeşitli scaffold türleri önerilmiştir. Kullanılan bu farklı scaffold çeşitlerinin kök hücrenin diferansiye olacağı hücre tipini etkilediği iddia edilmiştir (46). Örneğin, adipoz doku kaynaklı kök hücre için; Alginate/gelatin matriks içeren scaffoldun adipogenezis yönünde diferansiasyonu tetiklediği (98), hyaluronik asit içeren scaffoldun iskelet kas hücresi yönünde tetiklediği (99), 3D chitosan ve gelatin scaffoldların nöron hücrelerine diferansiye olmaları yönünde tetiklediği bildirilmiştir (100).

Biz de çalışmamızda Schwann hücre yönünde diferansiasyon tetiklemesi ve diğer gerekli mikroçevreyi sağlaması için kendinden emilebilen gelatin süngerler kullandık.

Kolekalsiferolün mitozu inhibe ettiği, hücre diferansiasyonunu tetiklediği bilinmektedir. Nöronlarda ve Schwann hücresi dahil glial hücrelerde vitamin D reseptörü mevcuttur (101). Kolekalsiferolün nörotrofin üretimini tetiklediği ve akson büyümesini artırdığı gösterilmiştir (102). Ayrıca kolekalsiferolün miyelinizasyonu tetikleyen genlerin ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (12). Yine vitamin D2 (ergokalsiferol) formunun akson çapını artırdığı gösterilmiştir (103).

Montava ve arkadaşları (13) 2014 yılında, tavşanların fasiyal siniri üzerinde yaptığı çalışmada, sonuçlar histomorfometrik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada

elektrofizyolojik değerlendirme yapılamadığı için yüksek doz kolekalsiferolün fonksiyonları geri kazandırıp kazandırmadığına dair yorum yapılamamıştır.

Anne Cornet ve arkadaşları (101) 1998 yılında yaptıkları çalışmada, kolekalsiferolün etkisiyle, Schwann hücrelerinin, in vitro koşullarda, vitamin D reseptörü genini ve nöronal büyüme faktörü genini ürettiklerini göstermişlerdir.

Chabas ve arkadaşları (12) 2013 yılında yaptıkları deneysel çalışmalarında, periferik sinir hasarı sonrası kolekalsiferol desteğinden 24 saat sonra miyelinizasyonu sağlayan genlerin ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir.

Agnes E. Nystad ve arkadaşları (104) 2014 yılında yaptıkları deneysel çalışmada, demiyelinize edilen farelerde, intraperitoneal uyguladıkları kolekalsiferolün, oligodendriositlerin maturasyonuna ve astrositlerin aktivasyonuna sebep olarak remiyelinizasyonu arttırdığını bildirmişlerdir.

Stig Wergeland ve arkadaşları (105) 2011 yılında cuprizone ile demiyelinize edilen farelerde yaptıkları çalışmada, yüksek (6200 IU/kg) ve çok yüksek (12500 IU/kg) doz kolekalsiferol verilen gruplarda demiyelinizasyonun azaldığını göstermişlerdir.

Yatma Gueye ve arkadaşları (106) 2015 yılında yaptıkları çalışmada, spinal kord travması uygulanan sıçanlara, oral verilen kolekalsiferolün desteği ile, nöronal fonksiyonların kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düzeldiğini bildirmişlerdir.

Shirazi ve arkadaşları (107) 2015 yılında yaptıkları deneysel çalışmada, kolekalsiferolün, nöronal kök hücrelerin proliferasyonunu belirgin arttırdığı ve oligodendriyositlere dönüşümünü tetikleyerek miyelinizasyonu arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca NT-3, BDNF, GDNF ve CNTF gibi önemli nörotrofik faktörlerinin salınımı tetikleyerek, nöronal sağkalımı arttırdıkları ve kök hücrelerin oligodendriyositlere farklılaşmasını sağladıkları gösterilmiştir.

Kolekalsiferolün doz ayarlanması ile ilişkili olarak, literatürde düşük dozlarda (100 IU/kg/gün) ve yüksek dozlarda (500 IU/kg/gün) oral destek tedavisi yapılan karşılaştırılmal çalışmada yüksek dozlarda daha olumlu sonuçlar alındığı gösterilmiştir (12). Biz de çalışmamızda yüksek doz (500 IU/kg/gün) oral kolekalsiferol desteği uyguladık.

Bu çalışmada fasiyal sinir rejenerasyonunun değerlendirilmesinde; fonksiyonel olarak göz kapatma refleksinin skorlaması ve EMG; histolojik olarak da sinir kesitinde akson sayısı ve miyelinli akson çapı parametreleri kullanılmıştır.

Fonksiyonel iyileşmenin değerlendirmesinde kullanılmış olan göz kapatma performans skalası, Borin ve ark. (53) tarafından tanımlanmıştır. Subjektif bir değerlendirme olmasına karşın iyileşme hızının pratik olarak değerlendirilmesinde çok yararlı olmuş; bu değerlendirme sonucunda bütün deney gruplarının iyileşme hızının kontrol grubuna kıyasla daha iyi olduğu, en hızlı iyileşmenin ise kök hücre uygulaması yapılan gruplarda ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Shinichi Esaki ve arkadaşları (28), 2019 yılında yaptıkları çalışmada, ezilme hasarı ile fasiyal paralizi oluşturdıkları farelerde 14. günde tüm gruplarda tam fonksiyonel iyileşme izlemişler, olfaktör kök hücre uyguladıkları gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha hızlı iyileşme olduğunu bildirmişlerdir. Wei Zhang ve arkadaşları (108), 2009 yılında yaptıkları çalışmada, fasiyal sinirde ezilme hasarı oluşturmuşlar, yüksek doz eritropoetin vererek kontrol grubu ile göz kapama refleksi ve bıyık hareketleri arasındaki farkı değerlendirmişler; kontrol grubunda 13. Günde, deney gruplarında ortalama 10. günde tam fonksiyonel iyileşme olduğunu bildirmişlerdir.

Fonksiyonel değerlendirmede bu skalaya ilave olarak objektif bir yöntem olan EMG kullanılmıştır. EMG’de kaydedilen BKAP amplitüd ve latanslarının referans değerleri olarak sham grubu kullanılmıştır. Bu iki parametrenin de 4 haftanın sonunda bütün deney gruplarında, kontrol grubuna kıyasla daha iyi sinir iyileşmesi gösterdiği ortaya konmuştur. Üstelik, tüm deney gruplarında latans değerleri sham grubuna yakın mükemmel sonuçlar verirken; amplitüd değerleri, sham grubundan düşük çıkmış, ancak kök hücre verilen gruplarda yalnız kolekalsiferol verilen gruba kıyasla daha anlamlı yüksek olarak saptanmıştır. Jian Tan ve arkadaşları (30) 2019 yılında yaptıkları çalışmada, fasiyal sinir hasarında adipoz doku kaynaklı kök hücre uyguladıkları gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha kısa BKAP latans süreleri ve daha yüksek BKAP amplitüd değerleri izlemişlerdir. Shinichi Esaki ve arkadaşları (28), 2018 yılında yaptıkları çalışmada, fasiyal sinir ezilme hasarı oluşturdıkları farelere olfaktör mukoza kaynaklı kök hücre uygulamış ve elektrofizyolojik değerlendirmede kontrol grubuna kıyasla daha yüksek BKAP amplitüd değerleri izlemişlerdir. Fei Sun ve arkadaşları (31), 2011 yılında yaptıkları çalışmada, fasiyal sinir bukkal dalında 8 mm defekt

oluşturmuş, desellülerize edilmiş arter içerisinde adipoz doku kaynaklı kök hücre uygulamış ve yapılan EMG’de yine kontrol grubuna kıyasla daha kısa BKAP latans süresi ve daha yüksek BKAP amplitüdü izlemişlerdir. Gui-Bo Liu ve arkadaşları (109), 2011 yılında yaptıkları deneysel çalışmada, rat siyatik sinir hasarında adipoz doku kaynaklı kök hücre uygulamışlar ve kontrol grubuna kıyasla BKAP latans süresinde kısalma ve BKAP amplitüdünde artış izlemişlerdir. Literatürdeki bu örnekler, bizim çalışmamızdaki EMG bulguları ile örtüşmektedir.

Histolojik değerlendirmede, subjektifliği ortadan kaldırmak için, standart bir yöntem ve yazılım yardımıyla akson sayısı ve miyelinli akson çapı ölçüm parametreleri kullanılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda, sinir rejenerasyonunun bütün deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla daha iyi olduğu gösterilmiştir; bununla birlikte, özellikle akson sayısı bakımından sham grubuna benzer sonuçlar ortaya koyması nedeniyle kök hücre ile kolekalsiferol uygulamasının kombine yapıldığı grupta tama yakın iyileşme olduğu düşünülmüştür. Ozan L. Abbas ve arkadaşları (76), 2016 yılında, deneysel fasiyal sinir paralizisinde, cross-face anastomoz uyguladıkları ve anastomoz sahasına lokal olarak adipoz doku kaynaklı kök hücre uyguladıkları çalışmada; kök hücre uyguladıkları grubun akson sayılarının ve miyelinli akson çaplarının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Qunzhou Zhang ve arkadaşları (32), 2018 yılında yaptıkları çalışmada, deneysel fasiyal sinir hasarında nöral krest kaynaklı kök hücre ve gingiva kaynaklı mezenkimal kök hücre uyguladıkları ratlarda, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek akson sayıları ve daha yüksek miyelinize akson çapları olduğunu bildirmişlerdir. Fei Sun ve arkadaşları (31), 2011 yılında yaptıkları çalışmada, segmenter eksizyon yaptıkları fasiyal sinir modelinde, desellülerize edilmiş arter köprü içerisinde uyguladıkları diferansiye edilmiş adipoz doku kaynaklı kök hücre grubunun miyelinli akson çapları ve akson sayıları açısından daha yüksek değerlere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Literatürdeki periferik sinir hasarında kök hücre örnekleri çalışmamızdaki histolojik gözlemleri destekler niteliktedir. Ancak D vitaminin ve adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin periferik sinir hasarında birlikte ilk kez uygulanması literatüre sağlayacağı katkı açısından öncül teşkil etmektedir. Histolojik bulgular açısından her iki tedavi rejiminin birlikte uygulandığı grup 4’te en iyi sonuçların elde edilmesi hipotezimizi destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, hasarlı bölgeye adipoz doku kaynaklı kök hücre ve sistemik kolekalsiferol uygulamalarının sinir rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediği ve bunların kombine olarak kullanılmalarının sinerjistik etki göstererek iyileşmeyi belirgin şekilde artırdığı tespit edilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Fasiyal sinirde bası ile hasar oluşturmada, sensörlü klemp kullanılmasının, standart paralizi meydana getirdiği görüldü.
2. Bası sonucu fasiyal sinirde oluşturulan hasarın iyileşmesinin, fonksiyonel değerlendirilmesinde:
 - a) Göz kapatma performansı açısından incelendiğinde: Kök hücre içeren gruplarda (Grup 3-4) daha hızlı iyileşme olduğu tespit edildi.
 - b) EMG ile fonksiyonel iyileşme değerlendirildiğinde ise; en iyi sonuçlar; adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre ve kolekalsiferolün birlikte uygulandığı grupta elde edildi.
3. Fasiyal sinir hasarının histolojik olarak iyileşmesinin incelendiği çalışmada da en iyi sonuçlar; adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre ve kolekalsiferolün birlikte uygulandığı grupta izlendi.
4. Son yıllarda sinir yaralanmalarında, tek başına kök hücre veya tek başına kolekalsiferol uygulamaları ile iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Ancak kombine uygulamaların daha fazla araştırılması, bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçları destekleyecektir.

KAYNAKLAR

1. Vlastou C. Facial paralysis. *Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery*. 2006;26(4):278-87.
2. Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell stem cell*. 2015;17(1):11-22.
3. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology*. 2014;32(8):773-85.
4. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim D-H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology advances*. 2016;34(4):422-34.
5. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annual review of neuroscience*. 2001;24(1):1217-81.
6. Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D. Stem cells treatment for sciatic nerve injury. *Expert opinion on biological therapy*. 2011;11(12):1591-7.
7. Smolders J, Moen SM, Damoiseaux J, Huitinga I, Holmøy T. Vitamin D in the healthy and inflamed central nervous system: access and function. *Journal of the neurological sciences*. 2011;311(1-2):37-43.
8. De Abreu DF, Eyles D, Feron F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34:265-77.
9. Wrzosek M, Łukaszkiwicz J, Wrzosek M, et al. Vitamin D and the central nervous system. *Pharmacological Reports*. 2013;65(2):271-8.
10. Roman S, Mowry EM. Vitamin D and the Central Nervous System: Development, Protection, and Disease. *Extraskkeletal Effects of Vitamin D: A Clinical Guide* 2018:227-47.
11. Burton JM, Costello FE. Vitamin D in multiple sclerosis and central nervous system demyelinating disease a review. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 2015;35(2):194-200.
12. Chabas J-F, Stephan D, Marqueste T, et al. Cholecalciferol (vitamin D3) improves myelination and recovery after nerve injury. *Plos one*. 2013;8(5):e65034.

13. Montava M, Garcia S, Mancini J, et al. Vitamin D3 potentiates myelination and recovery after facial nerve injury. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2015;272(10):2815-23.
14. Fisch U, Esslen E. Total intratemporal exposure of the facial nerve: pathologic findings in Bell's palsy. *Archives of otolaryngology*. 1972;95(4):335-41.
15. Salame K, Ouaknine G, Arensburg B, Rochkind S. Microsurgical anatomy of the facial nerve trunk. *Clinical Anatomy: The Official Journal of the American Association of Clinical Anatomists and the British Association of Clinical Anatomists*. 2002;15(2):93-9.
16. Coombs C, Ek E, Wu T, Cleland H, Leung M. Masseteric-facial nerve coaptation—an alternative technique for facial nerve reinnervation. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2009;62(12):1580-8.
17. Wolfe SW, Pederson WC, Hotchkiss RN, Kozin SH, Cohen MS. *Green's Operative Hand Surgery* (7th edition): Elsevier Health Sciences 2016.
18. Brushart T. Nerve repair and grafting. *Green's operative hand surgery*. 1999;2:1384-403.
19. Yao Y, Cui Y, Zhao Y, et al. Effect of longitudinally oriented collagen conduit combined with nerve growth factor on nerve regeneration after dog sciatic nerve injury. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2018;106(6):2131-9.
20. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PloS one*. 2011;6(3):e17899.
21. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*. 2001;24(1):677-736.
22. Lee LN, Lyford-Pike S, Boahene KDO. Traumatic facial nerve injury. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2013;46(5):825-39.
23. May M. *Anatomy for the clinician. The facial nerve*: Thieme New York 2000;19-56.
24. Hadlock T. Facial paralysis: research and future directions. *Facial Plastic Surgery*. 2008;24(02):260-7.
25. Mykатыn TM, Mackinnon SE. The surgical management of facial nerve injury. *Clinics in plastic surgery*. 2003;30(2):307-18.

26. de Souza Lucena EE, Guzen FP, de Paiva Cavalcanti JRL, Barboza CAG, do Nascimento Júnior ES, de Sousa Cavalcante J. Experimental considerations concerning the use of stem cells and tissue engineering for facial nerve regeneration: a systematic review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2014;72(5):1001-12.
27. Volk GF, Pantel M, Guntinas-Lichius O. Modern concepts in facial nerve reconstruction. *Head & face medicine*. 2010;6(1):25-36.
28. Esaki S, Katsumi S, Hamajima Y, Nakamura Y, Murakami S. Transplantation of Olfactory Stem Cells with Biodegradable Hydrogel Accelerates Facial Nerve Regeneration After Crush Injury. *Stem Cells Translational Medicine*. 2019;8(2):169-78.
29. Cho HH, Jang S, Lee SC, Jeong HS, Park JS, Han JY, et al. Effect of neural- induced mesenchymal stem cells and platelet- rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model. *The Laryngoscope*. 2010;120(5):907-13.
30. Tan J, Xu Y, Han F, Ye X. Genetical modification on adipose-derived stem cells facilitates facial nerve regeneration. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(3):908-20.
31. Sun F, Zhou K, Mi W-j, Qiu J-h. Combined use of decellularized allogeneic artery conduits with autologous transdifferentiated adipose-derived stem cells for facial nerve regeneration in rats. *Biomaterials*. 2011;32(32):8118-28.
32. Zhang Q, Nguyen PD, Shi S, et al. Neural crest stem-like cells non-genetically induced from human gingiva-derived mesenchymal stem cells promote facial nerve regeneration in rats. *Molecular neurobiology*. 2018;55(8):6965-83.
33. Ateş U. Kök hücreyi tanıyalım. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*. 2016;1(1):19-28.
34. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Molecular aspects of medicine*. 2001;22(3):149-64.
35. Sağsöz H, Ketani MA. Kök hücreler. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008(2):29-33.
36. Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*. 2009;37(1-2):1-57.

37. Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein- Köblle N, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2009;116(2):166-72.
38. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental neurology*. 2007;207(2):267-74.
39. Peretto P, Paredes RG. Chapter 13 Social Cues, Adult Neurogenesis, and Reproductive Behavior. *Neurobiology of Chemical Communication*. CRC Press, 2014.
40. Paspala SAB, Murthy TK, Mahaboob V, Habeeb M. Pluripotent stem cells-a review of the current status in neural regeneration. *Neurology India*. 2011;59(4):558-565.
41. Yamamoto T, Osako Y, Ito M, et al. Trophic effects of dental pulp stem cells on schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Cell transplantation*. 2016;25(1):183-93.
42. Widgerow AD, Salibian AA, Kohan E, et al. “Strategic sequences” in adipose- derived stem cell nerve regeneration. *Microsurgery*. 2014;34(4):324-30.
43. Zhao L, Wei X, Ma Z, et al. Adipose stromal cells-conditional medium protected glutamate-induced CGNs neuronal death by BDNF. *Neuroscience letters*. 2009;452(3):238-40.
44. Luo H, Zhang Y, Zhang Z, Jin Y. The protection of MSCs from apoptosis in nerve regeneration by TGFβ1 through reducing inflammation and promoting VEGF-dependent angiogenesis. *Biomaterials*. 2012;33(17):4277-87.
45. Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Fushiki S. Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem cells and development*. 2011;21(11):1852-62.
46. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo K-i, Kim K. Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem cells international* 2016.

47. Houghton LA, Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D₂) as a vitamin supplement. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(4):694-7.
48. Baas D, Prüfer K, Ittel ME, et al. Rat oligodendrocytes express the vitamin D₃ receptor and respond to 1, 25- dihydroxyvitamin D₃. *Glia*. 2000;31(1):59-68.
49. Prüfer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. Distribution of 1, 25- dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Journal of chemical neuroanatomy*. 1999;16(2):135-45.
50. Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Mozafari S, Tiraihi T. Vitamins E and D₃ attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cellular and molecular neurobiology*. 2010;30(2):289-99.
51. Musiol IM, Feldman D. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ induction of nerve growth factor in L929 mouse fibroblasts: effect of vitamin D receptor regulation and potency of vitamin D₃ analogs. *Endocrinology*. 1997;138(1):12-8.
52. Neveu I, Naveilhan P, Baudet C, Wion D, De Luca HF, Brachet P. 1, 25- dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. *Molecular Brain Research*. 1994;24(1-4):70-6.
53. Borin A, Toledo RN, de Faria SD, Testa JRG, Cruz OLM. Behavioral and histologic experimental model of facial nerve regeneration in rats. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2006;72(6):776-85.
54. Popović D, Stanković M, Popović Z, Milisavljević D. Traumatic facial palsy. *Medicine and Biology*. 2003;10(3):145-7.
55. Darrouzet V, Duclos J-Y, Liguoro D, Truilhe Y, De Bonfils C, Bebear J-P. Management of facial paralysis resulting from temporal bone fractures: our experience in 115 cases. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2001;125(1):77-84.
56. Zhou L, Du H-D, Tian H-B, Li C, Tian J, Jiang JJ. Experimental study on repair of the facial nerve with Schwann cells transfected with GDNF genes and PLGA conduits. *Acta oto-laryngologica*. 2008;128(11):1266-72.
57. Esaki S, Kitoh J, Katsumi S, et al. Hepatocyte growth factor incorporated into herpes simplex virus vector accelerates facial nerve regeneration after crush injury. *Gene therapy*. 2011;18(11):1063-9.

58. Tomasello F, Brines M, Sfacteria A, Grasso G. A new computed-assisted technique for experimental sciatic nerve function analysis. *Medical Science Monitor*. 2004;10(1):BR1-3.
59. Foecking EM, Fargo KN, Coughlin LM, Kim JT, Marzo SJ, Jones KJ. Single session of brief electrical stimulation immediately following crush injury enhances functional recovery of rat facial nerve. *Journal of Rehabilitation Research & Development*. 2012;49(3):451-8.
60. Yetiser S, Kahraman E. An analysis of time-dependent changes of neurotrophic factors (BDNF, CNTF) in traumatic facial nerve injury of a nerve-cut and nerve-crush model in rats. *Otology & Neurotology*. 2008;29(3):392-6.
61. Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, et al. Nerve crush injuries—a model for axonotmesis. *Experimental neurology*. 1994;127(2):284-90.
62. Chen L-E, Seaber AV, Urbaniak JR. The influence of magnitude and duration of crush load on functional recovery of the peripheral nerve. *Journal of reconstructive microsurgery*. 1993;9(4):299-306.
63. Nissan M, Rochkind S, Ringel M. Strain-gauged haemostatic forceps for clinical and experimental use. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 1988;26(4):448-50.
64. Rydevik B, Lundborg G. Permeability of intraneural microvessels and perineurium following acute, graded experimental nerve compression. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*. 1977;11(3):179-87.
65. Chiu D, Janecka I, Krizek T, Wolff M, Lovelace R. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery*. 1982;91(2):226-33.
66. Kanje M, Skottner A, Sjo J. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain research*. 1989;486(2):396-8.
67. Odaci E, Kaplas S. Melatonin and nerve regeneration. Chapter 16. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:317-35.
68. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95.
69. Woo D-H, Hwang HS, Shim JH. Comparison of adult stem cells derived from multiple stem cell niches. *Biotechnology letters*. 2016;38(5):751-9.
70. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28.

71. Beane OS, Fonseca VC, Cooper LL, Koren G, Darling EM. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow, muscle and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PloS one*. 2014;9(12):e115963.
72. Wu W, Le AV, Mendez JJ, Chang J, Niklason LE, Steinbacher DM. Osteogenic performance of donor-matched human adipose and bone marrow mesenchymal cells under dynamic culture. *Tissue Engineering Part A*. 2015;21(9-10):1621-32.
73. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose tissue- derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow- derived counterparts. *Stem cells translational medicine*. 2013;2(6):455-63.
74. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem cells and development*. 2012;21(14):2724-52.
75. Khalifian S, Sarhane KA, Tammia M, et al. Stem cell-based approaches to improve nerve regeneration: potential implications for reconstructive transplantation? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2015;63(1):15-30.
76. Abbas OL, Borman H, Uysal ÇA, et al. Adipose-derived stem cells enhance axonal regeneration through cross-facial nerve grafting in a rat model of facial paralysis. *Plastic and reconstructive surgery*. 2016;138(2):387-96.
77. Kaewkhaw R, Scutt AM, Haycock JW. Anatomical site influences the differentiation of adipose- derived stem cells for Schwann- cell phenotype and function. *Glia*. 2011;59(5):734-49.
78. Bhangra KS, Busuttil F, Phillips JB, Rahim AA. Using stem cells to grow artificial tissue for peripheral nerve repair. *Stem cells international* 2016.
79. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, et al. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain research*. 2003;974(1-2):17-24.
80. Cui L, Jiang J, Wei L, Zhou X, Fraser JL, Snider BJ, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem cells*. 2008;26(5):1356-65.

81. Tomita K, Madura T, Sakai Y, Yano K, Terenghi G, Hosokawa K. Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience*. 2013;236:55-65.
82. Martens W, Sanen K, Georgiou M, et al. Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. *The FASEB Journal*. 2014;28(4):1634-43.
83. Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem cells and development*. 2013;23(7):741-54.
84. Guo Z-y, Sun X, Xu X-l, Zhao Q, Peng J, Wang Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms. *Neural regeneration research*. 2015;10(4):651-8.
85. Watanabe Y, Sasaki R, Matsumine H, Yamato M, Okano T. Undifferentiated and differentiated adipose- derived stem cells improve nerve regeneration in a rat model of facial nerve defect. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2017;11(2):362-74.
86. Jiang L, Zhu J-K, Liu X-L, Xiang P, Hu J, Yu W-H. Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. *Neuroreport*. 2008;19(10):1015-9.
87. Xu Y, Liu L, Li Y, et al. Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose-derived stem cells in vitro. *Brain research*. 2008;1239:49-55.
88. Mantovani C, Mahay D, Kingham PJ, Terenghi G, Shawcross SG, Wiberg M. Bone marrow-and adipose-derived stem cells show expression of myelin mRNAs and proteins. *Regenerative medicine*. 2010;5(3):403-10.
89. Bertolini F, Lohsiriwat V, Petit J-Y, Kolonin MG. Adipose tissue cells, lipotransfer and cancer: a challenge for scientists, oncologists and surgeons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2012;1826(1):209-14.
90. Kalbermatten DF, Schaakxs D, Kingham PJ, Wiberg M. Neurotrophic activity of human adipose stem cells isolated from deep and superficial layers of abdominal fat. *Cell and tissue research*. 2011;344(2):251-60.

91. Lattanzi W, Geloso MC, Saulnier N, et al. Neurotrophic features of human adipose tissue-derived stromal cells: in vitro and in vivo studies. *BioMed Research International* 2011.
92. Chung JY, Kim W, Im W, et al. Neuroprotective effects of adipose-derived stem cells against ischemic neuronal damage in the rabbit spinal cord. *Journal of the neurological sciences*. 2012;317(1-2):40-6.
93. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature immunology*. 2014;15(11):1009-16.
94. van den Broek LJ, Niessen FB, Scheper RJ, Gibbs S. Development, validation and testing of a human tissue engineered hypertrophic scar model. *Altex* 2012;4:389-402
95. Hiwatashi N, Hirano S, Suzuki R, et al. Comparison of ASCs and BMSCs combined with atelocollagen for vocal fold scar regeneration. *The Laryngoscope*. 2016;126(5):1143-50.
96. Valerie A, Vassiliki K, Irini M, Nikolaos P, Karampela E, Apostolos P. Adipose-derived mesenchymal stem cells in the regeneration of vocal folds: a study on a chronic vocal fold scar. *Stem Cells International* 2016.
97. Van Den Bogaerd AJ, Van Der Veen VC, Van Zuijlen PP, et al. Collagen cross- linking by adipose- derived mesenchymal stromal cells and scar- derived mesenchymal cells: Are mesenchymal stromal cells involved in scar formation? *Wound repair and regeneration*. 2009;17(4):548-58.
98. Yao R, Zhang R, Luan J, Lin F. Alginate and alginate/gelatin microspheres for human adipose-derived stem cell encapsulation and differentiation. *Biofabrication*. 2012;4(2):025007.
99. Desiderio V, De Francesco F, Schiraldi C, et al. Human Ng2+ adipose stem cells loaded in vivo on a new crosslinked hyaluronic acid- lys scaffold fabricate a skeletal muscle tissue. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(8):1762-73.
100. Gao S, Zhao P, Lin C, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron-like cells which are compatible with photocurable three-dimensional scaffolds. *Tissue Engineering Part A*. 2014;20(7-8):1271-84.

101. Cornet A, Baudet C, Neveu I, Baron- Van Evercooren A, Brachet P, Naveilhan P. 1, 25- dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of VDR and NGF gene in Schwann cells in vitro. *Journal of neuroscience research*. 1998;53(6):742-6.
102. Brown J, Bianco JJ, McGrath JJ, Eyles DW. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neuroscience letters*. 2003;343(2):139-43.
103. Chabas J-F, Alluin O, Rao G, et al. Vitamin D2 potentiates axon regeneration. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(10):1247-56.
104. Nystad AE, Wergeland S, Aksnes L, Myhr KM, Bø L, Torkildsen Ø. Effect of high- dose 1.25 dihydroxyvitamin D3 on remyelination in the cuprizone model. *Apmis*. 2014;122(12):1178-86.
105. Wergeland S, Torkildsen Ø, Myhr K-M, Aksnes L, Mørk SJ, Bø L. Dietary vitamin D3 supplements reduce demyelination in the cuprizone model. *PloS one*. 2011;6(10):e26262.
106. Gueye Y, Marqueste T, Maurel F, Khrestchatisky M, Decherchi P, Féron F. Cholecalciferol (vitamin D3) improves functional recovery when delivered during the acute phase after a spinal cord trauma. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;154:23-31.
107. Shirazi HA, Rasouli J, Ciric B, Rostami A, Zhang G-X. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 enhances neural stem cell proliferation and oligodendrocyte differentiation. *Experimental and molecular pathology*. 2015;98(2):240-5.
108. Zhang W, Sun B, Yu Z, An J, Liu Q, Ren T. High dose erythropoietin promotes functional recovery of rats following facial nerve crush. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2009;16(4):554-6.
109. Liu G-B, Cheng Y-X, Feng Y-K, et al. Adipose-derived stem cells promote peripheral nerve repair. *Archives of medical science: AMS*. 2011;7(4):592-6.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Onur NURSAÇAN'a ait "FASİYAL SİNİR REJENERASYONU VE REMİYELİNİZASYONUNDA KÖK HÜCRE VE D VİTAMİNİ UYGULAMASININ ROLÜ" adlı çalışma jürimiz tarafından Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 23/10/2019

Dr.Öğr.Üyesi M.İlhan ŞAHİN.....İmza

Prof.Dr. İbrahim KETENCİ.....İmza

Doç.Dr. Mehmet YAŞAR.....İmza