



---

**DENEYSEL TRAVMATİK BEYİN YARALANMASINDA  
ERİTROPOETİN VE KÖK HÜCRELERİN ETKİSİ**

**Melek TUNÇ ATA**

**Ocak 2014**

**DENİZLİ**



**DENEYSEL TRAVMATİK BEYİN YARALANMASINDA  
ERİTROPOETİN VE KÖK HÜCRELERİN ETKİSİ**

**Pamukkale Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi  
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**Melek TUNÇ ATA**

**Danışman: Prof.Dr.Günfer TURGUT**

**Ocak, 2014**

**DENİZLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU**

**Melek TUNÇ ATA** tarafından, Prof. Dr. Günfer TURGUT yönetiminde hazırlanan “**DeneySEL Travmatik Beyin Yaralanmasında Eritropoietin (EPO) ve Kök Hücrelerin Etkisi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



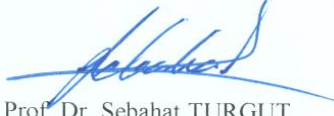
Prof. Dr. Günfer TURGUT  
Jüri Başkanı (Danışman)



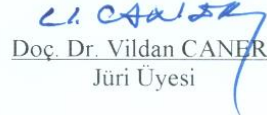
Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN  
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY  
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Sebahat TURGUT  
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Vildan CANER  
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **16.01.2014** tarih ve **2014.01-13** sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY**  
Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :

Öğrenci Adı Soyadı: Melek TUNÇ ATA

## TEŞEKKÜR

Eğitim hayatımın dönüm noktası olarak sayılabilecek yüksek lisans eğitimim boyunca karşılaştığım ve her manada desteğini sonsuz hissettiğim değerli hocam Sayın Prof.Dr.Günfer Turgut'a, tezimin her aşamasına sihirli parmaklarıyla küçük dokunuşlar yapan ama desteklerin en büyüğünü gösteren Sayın Prof.Dr.Sebahat TURGUT'a, yüksek lisans eğitimim boyunca daima sağlam adımlar atmama öncü olan ve bilgi birikimlerinden istifade ettiğim Sayın Prof.Dr.Melek BOR KÜÇÜKATAY, Sayın Prof.Dr.Vural KÜÇÜKATAY ve Sayın Prof.Dr.Saadettin ÇALIŞKAN'a ve çıktığım bu zorlu yolda fikirleri ve tüm samimiyeti ile desteğini esirgemeyen Sayın Prof.Dr.Bayram ÇIRAK'a teşekkürü bir borç bilirim. Tezimin histopatolojik ve radyolojik ve test aşaması boyunca laboratuvarını açan ve değerli vaktini ayıran Sayın Doç.Dr.Metin AKBULUT ve Sayın Yrd.Doç.Dr.Ali KOÇYİĞİT'e, Farmakoloji AD'na, kordon kanının teminini sağlayan Sayın Doç.Dr.Aysun KARABULUT'a, istatistiksel analiz aşamasında yardımcı olan değerli arkadaşım Sayın Arş. Gör. Hande ŞENOL'a, tüm asistan arkadaşlarıma ve tabiki ailem ve eşim Ali ATA'ya sonsuz teşekkürler.

Bu tez, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen,  
2013SBE004 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Bu tezin yapılmasına Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu tarafından onay  
verilmiştir (PAUHDEK-2012/027).

## ÖZET

### DENEYSEL TRAVMATİK BEYİN YARALANMASINDA ERİTROPOETİN VE KÖK HÜCRELERİN ETKİSİ

Tunç Ata, Melek

Yüksek Lisans Tezi, Fizyoloji ABD

Tez Yöneticisi: Prof.Dr.Günfer Turgut

Ocak 2014, 74 Sayfa

Travmatik beyin hasarı (TBH)'nda eritropoetin ve kök hücrelerin iyileşmedeki etkisini araştırmayı amaçlayan bu çalışmada deney hayvanı olarak ortalama ağırlığı 200-250 gram olan 6-8 aylık 29 adet Wistar Albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları rastgele ayrılarak 4 ayrı çalışma grubu oluşturulmuştur; Kontrol (K), Eritropoetin (EPO), Kök hücre (KH), Kök hücre+Eritropoetin (KH+EPO). K grubuna sadece TBH yapılmıştır. EPO grubuna TBH'dan yarım saat sonra intraperitoneal (i.p.) 1000 U/kg EPO verilmiştir. KH grubuna hasar bölgesine  $3 \times 10^4$  miktarında CD34+ kök hücre süspansiyonu verilmiştir. KH+EPO grubuna ise TBH'dan yarım saat sonra i.p. olarak 1000 U/kg EPO ve hasar bölgesine  $3 \times 10^4$  miktarında CD34+ kök hücre süspansiyonu uygulanmıştır. TBH oluşturmadan önce ve hasar oluşturduktan sonra yedi haftalık takip boyunca sıçanların motor koordinasyon ve performans değerlendirilmesi rotarod performans testi ve eğik düzlem testi ile yapılmıştır. Yedi haftalık iyileşme takibi sonunda beyin dokuları radyolojik ve histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir. TBH sonrasında gruplar arasında rotarod performans test sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. KH+EPO grubunda K, KH ve EPO grubuna göre, KH grubunda K ve EPO grubuna göre, EPO grubunda ise K grubuna göre eğik düzlem test sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. KH+EPO grubunda K, KH ve EPO grubuna göre, KH grubunda K ve EPO grubuna göre, EPO grubunda ise K grubuna hasar iyileşmesinin daha iyi olduğu hem histolojik hem de radyolojik bulgularda görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda KH ve EPO ayrı ayrı verilmesinin nörolojik fonksiyon ve hasar iyileşmesi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz. Buna ilaveten bulgularımız birlikte verilmelerinin iyileşmedeki olumlu etkilerinin tek tek verilmelerinden daha güçlü olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Travmatik beyin hasarı, kök hücre, eritropoetin



## ABSTRACT

### EFFECT OF ERYTHROPOIETIN AND STEM CELLS AT EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY

Tunç Ata, Melek

M. Sc. Thesis in Physiology

Supervisor: Prof.Dr.Günfer Turgut

January 2014, 74 Pages

In this study, we aimed to investigate the effect of healing of erythropoietin and stem cells in traumatic brain injury (TBI), Twenty nine wistar albino rats who had the average weight 200-250 g in 6-8 month were used. The experimental animals were randomly divided into four different working groups: Control (C), Erythropoietin (EPO), Stem cells (SC) and Stem cell + Erythropoietin (SC+EPO). K group was created only TBI. In EPO group, 1000 U/kg EPO was given intraperitoneally at the 30 minutes after TBI. Immediately after formation TBI amount of  $3 \times 10^4$  CD34+ stem cell suspension was injected directly onto the defect area. Immediately after formation TBI in an amount of  $3 \times 10^4$  CD34+ stem cell suspension to the defect area+half an hour after TBI i.p. 1000 U/kg EPO were injected. Before creating TBI and after damage during seven weeks experimental damage period to rats for the measurement of motor coordination- performance was performed rotarod performance and inclined plane test. At the end of the seven-week experimental period brain tissues evaluated in the sense of were radiological and histopathological. Rotarod performance test did not change remarkably even after the injury. KH+EPO group compared to K, EPO and KH groups, KH group compared to K, EPO groups, EPO group compared to K, the were found positively statistically significant differences in the inclined plane test results and healing damage. As a result of this study we can say that separately given KH and EPO have positive effect on the healing damage and neurological function. Furthermore, our findings suggests that their administration is more powerfull than their coadministration in the positive effects in healing.

**Keywords :** Traumatic brain injury, stem cell, erythropoietin

## İÇİNDEKİLER

## Sayfa

Tez Onay Sayfası.....	i
Bilimsel Etik Sayfası.....	ii
Teşekkür .....	iii
Proje Desteği ve Etik İzin .....	iv
Özet.....	v
Abstract.....	vi
İçindekiler Dizini.....	vii
Şekiller Dizini.....	ix
Tablolar Dizini.....	x
Simge ve Kısaltmalar Dizini.....	xi
1. GİRİŞ.....	13
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	15
2.1. Kafa Travmaları.....	15
2.1.1. Kafa Travmalarının Sınıflandırılması.....	15
2.1.2. Kafa Travmalarının Fizyopatolojisi.....	16
2.1.2.1. Birincil Hasarlar.....	16
2.1.2.2. İkincil Hasar.....	17
2.1.2.3. İyonik Akışlara Bağımlı Hücre Hasarı.....	18
2.1.2.3.1. Kalsiyum.....	18
2.1.2.3.2. Magnezyum.....	19
2.1.2.3.3. Potasyum.....	19
2.1.2.4. Eksitotoksisite.....	19
2.2. Kök Hücre.....	21
2.2.1. Emriyonik Kök Hücre.....	22
2.2.2. Embriyonik Germ Hücre.....	22
2.2.3. İnsan Kordon Kanından Elde Edilen Kök Hücre.....	22
2.2.4. Fetal Kaynaklı Nöronal Kök Hücre.....	24
2.2.5. Periferik Kan Kaynaklı Kök Hücre.....	24
2.2.6. Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücre.....	25
2.2.7. Stromal (Mezenkimal) Kök Hücreler.....	26
2.3. Eritropoetin.....	27
2.3.1.Eritropoetin Reseptörü.....	29
2.4. Hipotez.....	30
3. MATERYAL ve METOD.....	31
3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanışı.....	31
3.2. Deneyin Yapılışı.....	31
3.3. Rotarod Performans Testi.....	33
3.4. Rivlin Ve Tator'un Eğik Düzlem Testi.....	34
3.5. Travmatik Beyin Hasarının Oluşturulması.....	34
3.6. Yeni Doğan Göbek Kordon Kanının Alınması.....	36
3.7. Kordon Kanından CD 34+ Kök Hücre Elde Edilmesi.....	36
3.8. Elde Edilen CD34+ Kök Hücrelerin Sayımı.....	37
3.9. Histopatolojik İnceleme.....	38
3.10. Radyolojik İnceleme.....	38
3.10.1. Radyolojik Görüntüleme.....	38

3.10.2. Radyolojik Değerlendirme.....	39
3.11. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Eğik Düzlem Testi Bulguları.....	40
4.2. Rotarod Performans Testi Bulguları.....	44
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	45
4.4. Radyolojik Bulgular.....	51
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	73

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1	Çift yönlü eğik düzlem testi ..... 32
Şekil 3.2	Rotarod performans testi ..... 32
Şekil 3.3	Yüksek devirli drill ile kraniyektomi (A), Kraniyektomi sonrası beyin dokusu (B)..... 34
Şekil 3.4	Hasarın oluşturulacağı alanın koordinatları..... 35
Şekil 3.5	Stereotaksi cihazı ile hasarın oluşturulması (A), Hasar sonrası otolog kemiklerin yerine yerleştirilmesi (B)..... 35
Şekil 3.6	Göbek kordon kanından CD34+ hematopoetik kök hücre eldesi ... 36
Şekil 3.7	Beyin dokusu..... 38
Şekil 4.1	Kontrol grubunun yedi haftalık eğik düzlem sonuçlarının karşılaştırılması..... 42
Şekil 4.2	Eritropoetin grubunda yedi haftalık eğik düzlem sonuçlarının karşılaştırılması..... 42
Şekil 4.3	Kök hücre grubunda yedi haftalık eğik düzlem ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması ..... 43
Şekil 4.4	Kök hücre+eritropoetin grubunda yedi haftalık eğik düzlem sonuçlarının karşılaştırılması ..... 44
Şekil 4.5	K (A), EPO (B), KH (C), KH+EPO (D) gruplarına ait hematoksilen eozin preparat görüntülerinin karşılaştırılması (10X büyütme)..... 46
Şekil 4.6	K (A), EPO (B), KH (C), KH+EPO (D) gruplarına ait GFAP preparat görüntülerinin karşılaştırılması (10X büyütme)..... 47
Şekil 4.7	K (A), EPO (B), KH (C), KH+EPO (D) gruplarına ait Ki-67 preparat görüntülerinin karşılaştırılması (20X büyütme)..... 49
Şekil 4.8	Gruplar arasında hasarlı alanda sayılan Ki-67 hücre ortalamalarının karşılaştırılması..... 50
Şekil 4.9	K (A), EPO (B), KH (C), KH+EPO (D) gruplarına ait CD34 preparat görüntülerinin karşılaştırılması (20X büyütme)..... 51
Şekil 4.10	Gruplara ait 1. ve 7. hafta MR görüntülerinin karşılaştırılması..... 52
Şekil 4.11	Grup içinde, 1, 3, 5, ve 7. haftalarda hasar boyutu karşılaştırması... 54

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Tablo 4.1 Gruplara ait yedi haftalık eğik düzlem test sonuçlarının karşılaştırılması (Ort±S.S.).....	40
Tablo 4.2 Gruplara ait yedi haftalık rotarod performans testi sonuçlarının karşılaştırılması (Ort±S.S.).....	45
Tablo 4.3 Gruplara ait GFAP skorlama sonuçlarının karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.4 Gruplara ait hasar ölçüm karşılaştırmaları (Ort±S.S.).....	53

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	Amino-3-hydroxyl- 5-methyl-4-isoxazole propionate
CFUE	Colony forming unit-erythroid
DAH	Diffüz aksonal yarananma
EKH	Embriyonik kök hücre
EPO	Eritropoetin
EPO-R	EPO reseptörü
FIESTA	Fast Imaging Employing Steady State Acquisition
FOV	Görüş alanı
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HE	Hematoksilen-eosin
HIF-1	Hipoksinin indüklediği faktör-1
HKH	Hematopoetik kök hücre
HSPC	Hemopoetik kök ve progenitör hücre
i.p	Intraperitoneal
İHK	İç hücre kitlesi
JAK-2	Janus-tyrosin-kinaz-2
LAVA	Liver Acquisiton Volume Acceleration
MKH	Mezenkimal kök hücre
ml	Mililitre
MR	Manyetik rezonans
MSC	Mezenkimal stromal hücre
NEX	Uyarı Sayısı
NF-k $\beta$	Nükleer faktör kappa $\beta$
NMDA	N-Metil-D-Aspartat
PBS	Phosfat buffer saline
PGC	Premidal germ hücre

RECIST	Katı Tümörlerde Yanıt Değerlendirme Kriterleri
STAT	Sinyal-transducing activators of transcription
T1A	Aksiyal T1 ağırlıklı
T2A	T2 ağırlıklı
TBH	Travmatik beyin hasarı
TR	Tekrarlama zamanı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WJC	Wharton jel hücre

## 1. GİRİŞ

Ölümlerin en sık nedenleri içerisinde vasküler hastalıklar ve kanser ilk iki sırayı almakla birlikte üçüncü en sık sebep trafik kazalarıdır. Motorlu taşıtların daha yaygın olarak kullanılması, şiddet olaylarının daha sık görülmeye başlaması nedeniyle travmatik beyin hasarı (TBH) olan hasta sayısı gün geçtikçe artmaktadır ve buna bağlı olarak da ölümler gerçekleşmektedir (Lyngge 1984, Ökten vd 1997, Dawodu 2008 ).

TBH 'na bağlı gelişen ölümlerin yaklaşık %90'ı ilk 48 saat içinde gerçekleşmekte ve bunun kontrolsüz kafa içi basınç artışına bağlı olduğu düşünülmektedir (Gentry 1994, Eugene vd 2008 ). TBH; direkt darbe, delici bir alet veya bir patlamadan kaynaklanan dalgalar sonucu oluşan dış etkinin neden olduğu beyin hasarını içeren heterojen bir hastalıktır. Bu etkilerin kaynağı, yoğunluğu, yönü ve süresi hasarın şeklini ve sonuçlarını belirler (Maas vd 2008).

Travmatik beyin yaralanmalarında asıl ölüm sebebi kafa travması ile birlikte olan primer yaralanmadır ve travma sonrası birkaç dakika veya saatler içinde gelişen sekonder yaralanma ile mortalite ve morbidite artmaktadır. Kafa travmasının akut etkilerini ya da geç sekonder hasarını azaltmak için yeni ufuklar açabilecek ve yol gösterici olacak tedavi stratejilerini araştırmak için mekanik beyin yaralanmasını temsil eden hayvan modelleri geliştirilmiştir (Bontke ve Boake 1996).

Günümüzde kafa travmasından sonra ortaya çıkan TBH medikal ve cerrahi tedavideki gelişmelere karşın hala önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Travma sonucu santral sinir sisteminde ilk olarak primer beyin hasarı ortaya çıkmakta, primer beyin hasarı; deri yaralanması, kafatası kırığı, diffüz aksonal hasar (DAH) ve intrakraniyal kanamaları içermektedir. Ancak kafa travması sonucu oluşan hasardan sadece primer hasar sorumlu değildir. Primer beyin hasarını takiben ortaya çıkan birçok karmaşık fizyopatolojik olaylara bağlı olarak saatler veya günler sonra sekonder beyin hasarı oluşmaktadır (Maas vd 2008).



TBH yüksek oranda gençleri etkilemesi ve hayatta kalanlarda ileri fonksiyonel kısıtlamaların görülmesi nedeniyle, aynı zamanda önemli bir sosyal sağlık problemidir. TBH 'nın fonksiyonel kısıtlılık veya psikososyal morbidite en belirgin sonucunu oluşturur ve kendine bakım, sosyal entegrasyon, iş bulma ve ailesel sorunlar gibi problemler ise uzun dönem ekonomik ve sosyal sonuçlardır (Dikmen vd 2003).

Nörotravmalı hastaların ilk yardım, bakım ve tedavisindeki ilerlemelerin sonucunda son yirmi yıldır TBH geçiren hastaların hayatta kalma oranları giderek yükselmiştir. TBH zamanın başlangıcından bu yana ölüm ve sakatlığa sebep olmaktadır. Ancak kalp hastalığı, felç, meme kanseri veya diyabet gibi hastalıkların aksine klinik bakım ve araştırmanın ilgi alanına çok geç girebilmiştir. İleri bilgi ve tecrübeye dayalı girişimlerin gerekli olduğu ve yüksek beklentilerin bulunduğu bu alanda bilgi birikimi ve gelişimi halen erken dönemlerindedir. Özellikle uygulanan tedavi ve girişimlerin etkinliğini değerlendiren çalışmalar oldukça sınırlıdır (Gordon vd 2006).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda TBH oluşturulmuş sıçanlarda kök hücre ve eritropoetinin (EPO) motor performans ve hasar iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerini görmeyi amaçladık.

## **2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI**

### **2.1. Kafa Travmaları**

TBH; fiziksel, bilişsel ve psikososyal fonksiyonlarda bozulma ile neticelenen bir yaralanmadır (Okie 2005). Bu yaralanmalarla sinir liflerinin harabiyeti, beyin dokusunun hasarı, beyin sapı yaralanmaları ve beyin ödemi oluşmaktadır (Krych ve Ashley 1995, Özyurt ve Uzan 1997, Secer vd 2007 ).

TBH çoğunlukla trafik kazası ve düşmelere bağlı olarak görülmektedir (Özyurt ve Uzan 1997, Xydakis vd 2005). Baş ağrısı, bilinç kaybı, bulantı, motor ve bilişsel etkileşimler yanında depresyon, duygusal ve davranışsal değişiklikler yaygın olarak görülmektedir (Secer vd 2007). Bu hastalarda öğrenme, anlama, iletişim, hareket, günlük aktiviteler, kişisel bakım, sosyal davranışlar gibi günlük rutin aktiviteleri içeren fiziksel ve zihinsel fonksiyonlar etkilenmektedir (Corrigan ve Deming 1995). Ortaya çıkan bulgular, yaralanma şiddeti ve kişilik özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Bulguların çeşitliliği tedavinin uzun süreli olmasına yol açmaktadır (Liebenberg vd 2005). TBH'lı hastaların tedavisinde diğer medikal cerrahi tedavilerin yanında rehabilitasyon uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır (Katz ve Alexander 1994, Zafonte vd 1997, Bogner vd 2001). Motorlu taşıtların daha yaygın olarak kullanılması, şiddet olaylarının daha sık görülmeye başlaması ve yaşlanma süresinin uzamasıyla düşmelere bağlı olarak TBH'lı hasta sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Nörotravmalı hastaların ilk yardım, bakım ve tedavisindeki ilerlemelerin sonucu olarak son yirmi yıldır TBH geçiren hastaların hayatta kalma oranları giderek yükselmiş ve bu hastalar rehabilitasyon ünitelerinde daha sık görülür hale gelmiştir (Gordon vd 2006).

#### **2.1.1. Kafa Travmalarının Sınıflandırılması**

TBH terimi, beyinde bir dış kuvvetin etkisiyle oluşan tüm hasarları tanımlamak için kullanılmaktadır. Eskiden kullanılan kafa travması gibi terimlerin artık kullanılmaması hastalarda beyin yaralanması olmadan kafa travması ya da kafada hasar olmadan beyin yaralanması gelişmesinden ileri gelmektedir (Newbery 2003). Travmatik beyin hasarı; kapalı kafa yaralanması, açık kafa yaralanması ve penetran kafa yaralanması şeklinde sınıflandırılabilir. Kapalı ve açık kafa yaralanması terimleri kafa ile delici bir cisim

arasında olan çarpışmaları tanımlar. Kapalı kafa travması beyin zarının sağlam olduğu ve mekanizması daha çok akselerasyon-deselerasyon sonucu meydana gelen diffüz aksonal hasar (DAH)'dır (Anderberg vd 2007). Açık kafa travması ise beyin zarının açıldığı yaralanmaları tanımlar. Penetran kafa travması yabancı bir cismin beyin zarını delerek beyne girdiği ateşli silah yaralanmaları veya bıçakla yaralanma şeklinde oluşan yaralanmalardır (Newbery 2003).

### **2.1.2. Kafa Travmalarının Fiziopatolojisi**

Kafa travmalarının fiziopatolojisi birincil ve ikincil hasar olmak üzere ikiye ayrılır. Birincil hasarlar çarpma sırasında meydana gelen hasarlar olup ikincil hasarlar, bu sürecin sonucunda ortaya çıkan hasarlardır. Birincil hasarlar, beyin metabolizmasında, iyon dengesinde, kafa içi kan akımında, beyin sıvı bölümlerinde ard arda ikincil değişikliklerin oluşmasını tetikler (Erdogan vd 2004).

#### **2.1.2.1. Birincil Hasarlar**

Primer yaralanma serebral hasar, intrakranial hematoma (epidural, subdural, subaraknoid), aksonal yaralanma ve akselerasyon-deselerasyon sonucu meydana gelir (Greenwald vd 2003). Primer beyin hasarında makroskopik düzeyde bakıldığında beyaz madde yollarında kopma, fokal hasarlar, intraserebral diffüz veya ekstra serebral hematomlar ve diffüz ödem görülebilir. Hücresel düzeyde ise, ilk hasardan dakikalar ya da saatler sonra, membranlarda küçük deliklerin oluşması, iyon kanallarından sızıntılar ve proteinlerde yapısal değişiklikler gibi erken sinir hasarı bulguları ortaya çıkar. Şiddetli yırtılmalar mikro kanamalara neden olabilir (Maas vd 2008).

Patofizyolojik olarak primer beyin hasarı, fokal ve diffüz olarak ikiye ayrılmaktadır. Fokal beyin hasarında kubbe ve kaide kırıkları gibi kafatası kırıkları, hasar ve hematomlar görülür (Maas vd 2008). Diffüz aksonal yaralanma, TBH nedenlerinin %40-50'sidir. Travmadan sonra şuur kaybının en önemli nedenidir (Warner vd 2010, Sharp vd 2011 ). Diffüz aksonal yaralanma, genellikle motorlu araç kazalarından sonra fokal ve diffüz beyin travmasında travmanın şiddetinden bağımsız olarak oluştuğu gibi iskemi sonucu da ortaya çıkabilir (Fork vd 2005). Beyin ve beyin sapı boyunca aksonlarda morfolojik ve fonksiyonel hasarla karakterizedir ve beyaz cevherde diffüz dejenerasyona yol açar (Aarabi 2003). Travmayı takiben gelişen primer beyin hasarında DAH'nın karakteristik özellikleri olarak, şişen aksoplazmaya ait belirgin bir şekle sahip

olmayan ve retraksiyon topları olarak adlandırılan, beyaz cevher içerisine dağılmış aksonal parçalanmalar görülür (Bakir vd 2005). Travmatik diffüz aksonal yaralanma, serebral atrofi ile ilişkilendirilse de beyaz madde hacmi ile afferent ve efferent aksonal yolların travmatik aksonal yaralanma ile ilişkisi bilinmemektedir. Aksonal hasar için özgül immunohistokimyasal belirteçler, gelişmiş görüntüleme teknikleri ve serum biyobelirteçlerinin kullanılması ile beyaz cevher hasarının ilerleyen ve gecikmiş dejeneratif bir süreç olduğu orta ve şiddetli TBH'da oluşabileceği gösterilmiştir. Warner ve ark. yapmış olduğu çalışmanın sonucu, travmatik aksonal yaralanmanın post travmatik atrofünün birincil mekanizması olabileceğini göstermektedir (Warner vd 2010).

### **2.1.2.2. İkincil Hasarlar**

Kafa travmalarında ikincil hasarlar, travmayı takiben ilerleyen dakikalar, saatler veya günler içerisinde primer travmaya cevap olarak gelişen kafa içi basınç artışı, hipoksi/iskemi, beyin ödemi ve dokunun fazla kanlanması olarak görülebilen birçok fizyopatolojik olayı takiben gelişen beyin harabiyetini ifade eder (Tisdall ve Smith 2007, Werner ve Engelhard 2007, Umamaheswara ve Radhakrishnan 2008). Nöronal harabiyet ve hücre ölümüne yol açarak klinik kötüleşme oluşturur (Czosnyka vd 2001). Kafa içi basınç artışı, serebral perfüzyon basınç azalması, nöral hücre membran harabiyeti gibi olaylar görülür (Greenwald vd 2003). Travmadan sonraki ilk 24 saat içinde serebral kan akımı normal bireylerdekinin yarısına kadar inmekte ve iskemik sınırlara varmaktadır. Yapılan otopsilerde %80 oranında post travmatik iskemik lezyonlara rastlanmıştır (Bakir vd 2005). Akut kafa travmasında kafa içi basıncının artması serebral kan akımını azaltır. Bunun sonucu olarak beyine gitmek üzere arkus aorta ve karotid arterlerden geçen kan miktarı azalır. Azalan kan akımına bağlı olarak aortik ark ve karotid sinüste bulunan baroreseptörlerden kalkan impulslar bulbusta bulunan vazomotor refleksi uyarak kalpten pompalanan kanı artırır. Böylece sistemik arteriyel kan basıncı artarak serebral kan akımı gerçekleşerek beyin dokusunun beslenmesi sağlanır. Birincil mekanizmalar yaralanma anında olduğu halde sekonder yaralanma, birincil mekanizmalara organizmanın yanıtıdır ve her ikisi de fokal veya diffüz olabilir (Marmarou vd 1991).

### 2.1.2.3. İyonik Akıslara Bağımlı Hücre Hasarı

Travmatik beyin hasarında ortaya çıkan nöronal membran iyon geçirgenliğindeki değişmeler hücrenel enerji ihtiyacını değiştirir ve böylelikle metabolik süreç etkilenir. Akut metabolik değişikliklere ek olarak nöronal hücrelere hasar veren veya hücre ölümüne sebep olan ekstrasellüler-intrasellüler iyon dengesinde bozulmalar görülür (Wolf vd 2001).

#### 2.1.2.3.1. Kalsiyum

Beyaz ve gri cevherdeki sekonder hasarın ilerlemesinde, anormal kalsiyum dengesi önemli rol oynamaktadır. Sinir hücre hasarı, eksitotoksik hücre ölümü, programlanmış hücre ölümünün başlaması ve postsinaptik reseptör modifikasyonları ile ilişkilidir. Aksonal hasarda kalsiyum, aksonlar arasındaki bağlantının kesilmesi ile sonuçlanan olaylar sürecini başlatır. Hem sinir hem de aksonal hasarda fazla kalsiyum erken mitokondriyal şişme ile ilişkilidir (Wolf vd 2001). Mitokondri tarafından fazla kalsiyum tutulması kendi membranında depolarizasyona, membran permeabilite geçiş porlarının açılmasına ve programlanmış hücre ölümü faktörlerinin salınışının başlamasına neden olur (Maxwell vd 1997). Mitokondriyal fonksiyonun kaybolması yalnız kalsiyum tamponlama kapasitesini elimine etmez, aynı zamanda ATP bağımlı iyon pompalarının bozulması ile sonuçlanan kalsiyum akışına katkıda bulunur. Beyaz cevherin sekonder hasarında önemli diğer mekanizma aksonal membranın hücre dışı kalsiyumun geçişine izin verir hale gelmesidir (Posmantur vd 1997). Aksonda kalsiyumun artması sonucu, ana yapısal proteinleri indirgeyen enzimler uyarılır ve aksonun şeklinin korunmasından ve transporttan sorumlu proteinler zarar görür. Tüm bu olaylar taşınmış proteinlerin birikimine, aksonal ödeme ve sonunda iletimin bozulmasına neden olur (Huang ve Wang 2001). Travmatik beyin yaralanmasında yaralanmaya yanıt olarak hücrenel düzeyde glutamat salgılanması AMPA (amino-3-hydroxyl- 5-methyl-4-isoxazole propionate) ve NMDA (N-Metil-D-Aspartat) reseptörlerini aktive ederek kalsiyum ve sodyum nöronal geçişini artırır. Sodyum/potasyum oranını sağlayabilmek için nöronal enerji depoları boşalır, nöronal hücre membranının harabiyeti ile serbest radikaller ve oksidanlar çıkar ve bunlar glutamatın artışına, döngünün devamına yol açar. İntrasellüler kalsiyum artışı ile kaspaz gibi enzimler nöronal apoptozise yol açar ve bu durum TBH'de devam eden engel durumdur (Meythaler vd 2001, Blumenthal 2002).

### 2.1.2.3.2. Magnezyum

Beyinde glikoliz ve oksidatif fosforilasyon, DNA ve RNA sentezi, hücre solunum ve ATP gerektiren bütün enzim tepkimelerinde yer alır. Magnezyum iyonları nöronal kalsiyum kanallarındaki kalsiyum iyonu akışını düzenleyerek nöronal nitrik oksit üretiminin düzenlenmesine yardımcı olur. Magnezyum intrasellüler sodyumun devamını ve potasyum düzeyini düzenlemeye katkıda bulunur ve kalsiyumun “fizyolojik antogonisti” olarak adlandırılır. Magnezyumun NMDA reseptörleri üzerinde ağrı iletimini inhibe edici etkisi vardır ve NMDA-aracılı eksitotoksiteyi durdurabilir (Lescot vd 2007).

### 2.1.2.3.3. Potasyum

Travmalı beyin hasarını takip ederek, intraserebral mikrodiyaliz ile ekstrasellüler sıvı içine hasarlı nörondan büyük potasyum çıkışı olduğu gösterilmiştir. Bu birçok muhtemel mekanizmalarla açıklanabilir. Bu mekanizmalar;

- 1) Beynin özellikle hasar veya kanamalara maruz kalan bölgelerinde, plazma membranlarının belirgin olmayan bozulmaları,
- 2) Nöral dokunun kendisi içinde kendisi içinde deformasyonu nöronal ateşlenmeyle sonuçlanabildiğinden, nöronal boşalmalarla ilişkili olan voltaj-kapılı potasyum kanalları boyunca potasyum akışı,
- 3) Eksitator aminoasit reseptörlerinin yönlendirdiği ligand-kapılı iyon kanallarının açılışını, bunlar da, yayılan depresyona, bilinç kaybına ya da şiddetli kafa hasarı sonrası görülen otonomik fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunur (Lescot vd 2007).

### 2.1.2.4. Eksitotoksisite

Eksitotoksisite terimi ilk kez 1969’da Olney tarafından beyinde aşırı glutamat varlığına bağlı nöronal yaralanmayı tanımlamak için kullanılmıştır (Olney 1969). Glutamatın birçok farklı nöral sistemde nörotransmitter olarak kullanıldığına ve memeli beyinde çoğu eksitator sinaptik transmisyon aracılığıyla ettiğine inanılır. Glutamat santral sinir sisteminin en önemli eksitator nörotransmitteridir. Glutamat normal beyin fonksiyonu için gerekli olmasına karşın, glutamatın aşırı miktarının varlığı eksitotoksik hücre ölümüne yol açabilir (Dumont vd 2001). Spesifik membran reseptörleri ile

etkileşerek duysal enformasyonun iletilmesi, motor aktivite, spinal reflekslerin düzenlenmesi, hafıza ve öğrenme gibi birçok fonksiyonda önemli rol oynar (Levi ve Brimble 2004). Normalde sinaptik aralığa salınan glutamat konsantrasyonu çok yüksek seviyelere çıkabilmekte ancak bu kadar yüksek konsantrasyon sadece birkaç milisaniye sürmektedir. Süre uzadığında ise nöronal glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması nöronları öldürücü bir eksitasyonla karşı karşıya bırakmaktadır. Eksitotoksitenin serebral hasarlanmalardan sonraki harabiyetten sorumlu olduğunun fark edilmesi hipoksi ve serebral etkilerinin araştırıldığı çalışmaların sonucunda elde edilmiştir. Deneysel hayvan çalışmalarında glutamat reseptör antagonistlerinin mikroenjeksiyonu ile iskemiye bağlı nöronal hasarlanma önlenilmekte, glutamat ve aspartat gibi eksitator transmitterlerin hücre dışı konsantrasyonlarında artış görülmektedir (Kumral vd 2005).

Eksitator aminoasitlerin nörotoksik etkilerini açıklamak amacıyla birçok mekanizmaları sürülmüştür. Eksitotoksinler tarafından tetiklenen hücre ölümü; akut nöronal şişmeye öncülük eden sodyum ve klorun ve daha sonra gecikmiş hasara neden olan kalsiyumun hücre içine girmesini sağlayan özel reseptörler tarafından yönetilir. Bu reseptörler 3 ana gruba ayrılır. Bunlardan biri voltaja bağlı olarak çalışan NMDA reseptörleri olup glutamik asit bağlanması sonrasında sodyum ve kalsiyumun hücre içine girişine, potasyumun hücre dışına çıkışına neden olur. Diğer bir reseptör ise; AMPA olup voltaj bağımsız olarak çalışır. Bunun aktivasyonu ile sodyum hücre içine, potasyum hücre dışına doğru çıkar. Üçüncü grup reseptörler ise; metabotropik reseptörlerdir. Bunlar, aktive olduklarında fosfolipaz-C'yi aktif hale getirerek hücre içinde bağlı olarak bulunan kalsiyumun serbest hale getirilmesini sağlarlar (Kumral vd 2005). Glutamat reseptör aktivasyonu erken evrede hücre içi sodyumun artışına, bu ise sitotoksik ödem, intrasellüler asidoz ve lizise yol açar. Na-K ATPaz mekanizmasındaki yetmezlik ise sodyum ve suyun hücre içi birikimini arttırır. Bir sonraki aşamada kalsiyumun hücre içine akımı artar, bu ise kalsiyum bağımlı proteaz ve lipazların aktivasyonuna yol açarak hücre membranının ve nöroflamanların hasarına neden olur. Sonuçta; hücre içi kalsiyum birikimi santral sinir sistemindeki toksik hücre ölümünün son ortak yolu olarak belirtilmektedir. Glutamat nörotoksitesisi ayrıca lipid peroksidasyonunun başlaması, Na-K ATPaz aktivitesinin engellenmesi, mitokondriyal solunum enzimlerinin engellenmesi, gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz engellenmesi gibi mekanizmalarla nöronal ölümü şiddetlendiren, reaktif oksijen ve nitrojen

ürünlerinin meydana gelmesi ile sonuçlanan birtakım olaylar zincirini başlatır (Dumont vd 2001).

Rodent ve primatlarda glutamat antagonistlerinin kafa travmasında nöron koruyucu olduğu bildirilmiştir. Bu sonuca göre iskemi sırasında ekstrasellüler yoğun glutamat birikimi glutamat reseptörlerini uyarmakta, bu da nöronal ölüme neden olan bir dizi reaksiyonun tetiğini çekmektedir (Levi ve Brimble 2004).

## 2.2. Kök Hücre

Kök hücreler vücudumuzda bütün doku ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler sınırsız bölünebilme ve kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Vücudumuzdaki hücrelerin belli bir hedefi vardır ve bölündüklerinde yine kendileri gibi bir hücre oluştururlar. Kök hücrelerin ise bu şekilde belirlenmiş bir görevi yoktur. Aldıkları sinyale göre farklı hücre türlerine dönüşürler. Bir kök hücrenin hangi hücreye dönüşeceğini hücre çekirdeğindeki genler belirler (Pamukçu vd 2007).

Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlamak için beş temel özelliğe sahip olması gerekir; 1) Uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve yenilenebilme yeteneğinin olması, 2) Özelleşmemiş olması, 3) Kök hücreden elde edilen yavru hücre özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilmesi (farklılaşma), 4) Hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrardan çoğaltabilmesi, 5) *In vivo* ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmış kuşaklara katkı sağlaması (Karaöz ve Ovalı 2004).

Kök hücreler çoğalabilen ve ihtiyaç duyulduğunda görev yapacak olan hücrelere farklılaşarak olgunlaşmasını sağlayabilen hücrelerdir. Bunun en iyi örneği döllenmiş yumurtadır ki vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeli olan bu ilk embriyonel hücreye "totipotent" hücre denmektedir. Döllenmenin yaklaşık 5. gününde bu hücreler mezoderm, endoderm ve ektodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine dönüşebilme yeteneği olan "blastosist"e dönüşürler. Bu özelliğe sahip hücrelere de "pluripotent" hücreler denir. Hayatın ilerleyen dönemlerinde yerleştikleri dokunun hücre tipini üreten daha özelleşmiş erişkin tip kök hücreler ortaya çıkar. Kemik iliği kök hücreleri gibi olan bu hücrelere de "multipotent" hücreler denir (Pittenger vd 1999, Ural 2006, Herzog vd 2003).



Kısaca kök hücreyi 3 grup altında inceleyebiliriz; 1.Grup: embriyo kaynaklı kök hücreler: embriyonik kök hücre ve embriyonik germ hücreler, 2-Grup: yeni doğandan alınan kök hücre: insan kordon kanından elde edilen kök hücre ve fetal kaynaklı nöronal kök hücre, 3-Grup: yetişkinlerden elde edilen kök hücre: periferik kan kaynaklı kök hücre, kemik iliği kaynaklı kök hücre ve stromal (mezenkimal) kök hücreler.

### **2.2.1. Embriyonik Kök Hücre**

Embriyonik kök hücreler (EKH), memeli blastosistindeki iç hücre kitlesi (İHK)'nden elde edilen özel hücrelerdir. Kök hücre kaynakları içinde plastisitesi en yüksek olanıdır. İki önemli özelliği vardır; pluripotent özelliği ve kendini tekrar yenileyebilme. Döllenmeden sonra içi sıvı dolu küre şeklindeki blastosist yapısı bir dış hücre tabakası bir de İHK'den oluşur. Her 3 germ yaprağından hücrelere farklılaşabilme özelliğine sahiptir. *In vitro* olarak pluripotent özelliğini kaybetmeden büyüyebilir (Pamukçu vd 2007, Sue O'Shea 2004, Marques-Mari vd 2009). Pek çok bilim adamı bedeni oluşturan tüm hücre ve dokulara dönüşebilme kapasitesi olan EKH'lerin araştırmalar açısından ideal olduğunu belirtmişlerdir. Fakat EKH'nin elde edilebilmesi için yaklaşık 5 günlük embriyo kullanılması gerekmektedir, bu da etik ve politik tartışmaların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu sebeple alternatif kök hücre kaynakları araştırılmaktadır (Pamukçu vd 2007).

### **2.2.2. Embriyonik Germ Hücre**

Diğer pluripotent hücre tipi ise embriyonik karsinoma ve embriyonik germ hücreleridir. Embriyonik karsinoma kök hücreleri kültürde yayılarak çoğalırlar ve ayrıca 3 germ tabakasının türevlerini *in vitro* ya da *in vivo* teratokarsinoma oluşturarak meydana getirirler (Sue O'Shea 2004). Genel olarak insanlarda ve memelilerde premedal germ hücreleri (PGC) olarak bilinen germ hücreleri spesifik bir pluripotent popülasyondan köken alırlar. İnsanda ilk PGC embriyonun dışında gelişir. Daha sonra gelişen embriyoda gonadal çıkıntıya göç ederler. İnsanda bu göç 4. ile 6. hafta arasında gerçekleşir (Marques-Mari vd 2009).

### **2.2.3. İnsan Kordon Kanından Elde Edilen Kök Hücre**

Bebek ile anne arasındaki besin-oksijen trafiğini düzenleyen yapı göbek kordonudur. Doğumdan hemen sonra bebekle beraber göbek kordonu da rahim dışına atılır. Kordon

kanı, kordon içinde kalan kandır. 1980'li yılların başında yeni doğan bebeklerin kordon kanında da kök hücrelerin bulunmasıyla kordon kanının da tedavi amaçlı kullanılabilceği fikri ortaya atıldı (Low vd 2008).

Kordon kanında bulunan kök hücreleri; doğumda kordon kanı bağışıklık sisteminin bir reaksiyonu sonucu bazı organlarda fonksiyon bozukluğu ile seyreden kompleks bir hastalığın gelişimi açısından riski azaltır, alıcıya taşınabilir enfeksiyon riski oldukça düşüktür (Ramirez vd 2006, İnan ve Özbilgin 2009). Diğer dokularda bulunan kök hücrelere göre sayıca çok fazla olması, elde edilmesinin diğer kök hücre türlerine göre daha kolay olması, elde edilmesi ve saklanması sırasında diğerlerine göre daha az risk taşınması, olası hastalıklarda ailenin tüm fertleri için kullanılma ihtimalinin daha yüksek olması (yani doku uyum sorununun azlığı), atılacak olan kordonun değerlendirilmesi sebebiyle israfı engellemesi, kemik iliği gibi dokulardan elde edilen kök hücrelere göre farklılaşma özelliğinin daha fazla olması gibi sebepler kordon kanı kök hücrelerini diğer kök hücrelere göre daha avantajlı kılmıştır. Kordonun rahimden atılmasından sonraki yaklaşık 3 dakikalık süreçte kordon içindeki damarlarda kan akışı devam eder. Eğer bu sürede kordon kanı alınabilirse özel koşullarda dondurularak uzun yıllar saklanabilir (Giza vd 2009).

Kordon kanı kök hücreleri doğum sırasında bebeği anneye bağlayan kordondan elde edilirler. Bu hücreler, her ne kadar erken gelişim döneminde elde edilmiş olsalar da yetişkin hücre sınıfına girmektedir ve farklı doku ve hücre tipi oluşturma özellikleri benzer şekilde sınırlıdır (Low vd 2008).

Kordon kanı, hematopoetik kök hücre (HKH)'lerinin nakledilmesi için bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Hem doğum öncesi dönemde hem de doğumda HKH'ler fetal dolaşımında bulunur, fakat doğumdan birkaç saat sonra eritrosit, lökosit ve trombosit gibi tüm kan hücrelerinin öncülerini sağlayan kemik iliğine göç ederler. Yaklaşık 100 ml kadar olan bu kan doğumla birlikte atılır (Baytur Bülbül ve Cihat 2004). Yeni doğanın göbek kordonunda CD34+ ve CD133+ hücreleri içeren yaklaşık olarak 300.000 kök hücre bulunmaktadır. 1988 yılından bu yana göbek kordonu kanı birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalıklar falconi ve aplastik anemisi, lösemi, meme kanseri, prostat kanseri, over kanseri, aplastik anemi, immün sistem hastalıklarıdır. Aynı zamanda kemik iliği onarımı amaçlı kullanılmaktadır (Ramirez vd 2006).

#### **2.2.4. Fetal Kaynaklı Nöronal Kök Hücre**

Kök hücreler, kendiliğinden sonlanmış ya da ebeveynlerin izni ile ilgili hekimlerce yasal ve sistemli olarak sonlandırılmış gebeliklerin sonucu olan fetüslerden elde edilir. Fetal kaynaklı nöronal kök hücreler, serebral kotekte, hipokampus, striatum, olfaktor bulbus, subraventriküler alan ve spinal kordda yer alır. Fetüs kök hücresi, farklılaşarak kromozom sayısını yarıya indirip yumurta ya da sperm hücresine dönüşebilir. Ancak tek başına bir organizmayı oluşturma becerisine sahip değildir. Bu hücreler farklılaşmamış hücreler olarak, sinir sisteminin en az bulunan ve en öncül hücreleridir (Gu vd 2010).

Nöronal kök hücrelerin taşınması gereken özellikler şu şekilde belirlenmiştir; multipotent hücre olmaları ve sinir sistemi hücrelerinde nöron, astrosit ve oligodentrositlerin bütün alt tiplerine farklılaşabilme, sinir sistemi hücre tiplerine farklılaşabilme ve sinir sisteminin hasarlanmış bölgelerinde yeniden çoğalabilme yeteneğinde olmalı, seri olarak nakil edilebilmeli, kendi kendini yenileyebilme, aynı potansiyel ve özelliklere sahip yeni hücreler üretebilme yeteneğine sahip olmalıdırlar. Fetüsten elde edilen kök hücreler doğum öncesi gelişimin daha geç safhasında elde edildiği için çoğalma potansiyeli EKH'ye göre daha azdır (İnan ve Özbilgin 2009).

#### **2.2.5. Periferik Kan Kaynaklı Kök Hücre**

Periferik olgun kan hücrelerinin üretiminden kemik iliği kaynaklı hemopoetik kök ve progenitor hücreler (HSPC) sorumludur. Yetişkin memelilerde, HSPC'in büyük bir kısmı kemik iliğinde yer alır. HSPC'in periferik dolaşıma göçü yorucu fiziksel egzersiz, kemokinler ve hematopoetik büyüme faktörlerine yanıt olarak ortaya çıkabilir. Bu mobilizasyon interlökin-8 ve Granülosit Koloni-Stimulan faktörün kullanılmasıyla oluşabilir (Winkler ve Levesque 2006).

Normalde kanda çok az sayıda kök hücre bulunur. Ancak nakil için hücre toplanmadan önce vericilere büyüme faktörleri denen ve hormona benzeyen maddeler verilerek kök hücrelerinin daha hızlı büyümesi ve kemik iliğinden kana geçmesi sağlanır. Günümüzde HSPC'in elde edilmesi için kemik iliği kullanımı giderek azalmaktadır. Kemik iliği yerine daha yüzeysel ve kolay bir yöntem olan çeşitli sitokinlerle uyarılmış periferik kan kullanılmaktadır (Gülen 2009).

Günümüzde, periferik kan kök hücreleri hem otolog kök hücre transplantasyonu hem de allojenik kök hücre transplantasyonu için neredeyse kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin yerini almıştır. Başlıca avantajları; genel anestezi gerektirmemesi, ayaktan yapılabilmesi, daha az travmatik olması gibi uygulama kolaylıkları; aferez öncesi transfüzyon gereksiniminin daha az olması, trombosit süspansiyonu gereksiniminin daha az ve hastanede kalış süresinin daha kısa olmasıdır (Couban vd 2002).

### **2.2.6. Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücre**

Kemik iliği, kemiklerin içinde bulunan süngersi bir doku olup dolaşımdaki kan hücrelerinin üretim merkezidir. Kan hücrelerinin üretimi kemik iliği içinde yerleşmiş bulunan özelleşmiş bir grup hücre tarafından sağlanmaktadır. Bu hücrelere 'kemik iliği kök hücreleri' denir. Kemik iliği kök hücreleri gerektiğinde çoğalıp farklılaşarak kan hücrelerini oluşturmaktadır (Bianco vd 2001).

Kök hücrelerin klasik kaynağı kemik iliğidir. Uzun zamandır kemik iliğinden, vericiden anestezi altında genelde kalça kemiğinden iğne yardımı ile kemik iliği hücreleri elde edilmektedir. Bu hücrelerin her yüz binde biri uzun vadede kan elemanlarını oluşturan kök hücrelerdir, diğerleri stromal hücreler, stromal kök hücreler, kan progenitor hücreleri ve olgun beyaz ve kırmızı hücrelerdir. Günümüzde büyük ve karışık bir hücre grubu içinde az sayıda bulunabilen kök hücrelerin tanınması veya tespiti floresanla aktive hücre ayırma yöntemiyle mümkün olmaktadır. İnsan HKH'leri için tanımlanmış belirteçler; Lin, CD34, CD38, CD43, CD45RO, CD45RA, CD59, CD90, CD109, CD117, CD133, CD166, HLA-DR dir. Klinik çalışmalarda temel olarak CD34 belirteci kullanılmaktadır. Bunun nedeni bu hücrelerin potansiyel olarak daha aktif hücreler olmasıdır. Kemik iliği, periferik kan, göbek kordon kanı HKH kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu hücrelerin en önemli özellikleri kendi kopyalarını yaparak yine bir kök hücre olarak yollarına devam etme veya farklılaşarak bir progenitör hücre dizisine dönüşerek birçok olgun hücre oluşturabilmeleridir. Ayrıca göç yapabilme ve programlı hücre ölümü yoluna girebilme özellikleri de vardır. Diğer kök hücreler gibi HKH'ler de birçok farklı tipte hücre ve dokuya farklılaşma kapasitesine sahiptir. Kemik iliği hücrelerinin sadece kan hücrelerine değil kas, beyin, karaciğer, deri, akciğer, böbrek, barsak ve pankreatik hücrelere dönüşebildikleri gösterilmiştir (Sekiya vd 2002, Gülen 2009).

### 2.2.7. Stromal (Mezenkimal) Kök Hücreler

Bugünkü manada ilk mezenkimal kök hücre (MKH) tanımlaması 1999 yılında Pittenger ve arkadaşları tarafından "Kemik iliğinden köken alan ve uygun uyaranlarla üç temel seri; osteoblastik, adipositik ve kondrositik seriye farklılaşabilen fibroblastoid hücrelerdir" şeklinde tanımlanmıştır (Pittenger vd 1999). Erişkinlerde MKH için en iyi kaynak kemik iliğidir. Kemik iliğini incelediğimizde iki ayrı sistemden oluştuğunu görmekteyiz; hematopoetik doku ve stroma. Önceleri kemik iliği stromal hücrelerin, özellikle MKH'ler hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girerken daha sonraları *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla aralarında kas, sinir kemik, kalp, böbrek gibi hematopoetik olmayan dokuların parankimal hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir (Pittenger vd 1999). Friedenshtein ve ark. ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini göstermiştir (Fridenshtein vd 2008). Sonraki çalışmalar bu hücreleri multipotent kök hücre kaynağı olarak belirledi ve bu bağlamda hücreleri temsilen birçok isimlendirme kullanıldı. Son olarak bu hücreler "Multipotent Erişkin Progenitör Hücreler" olarak isimlendirildi. Mezenkimal kök hücrelerin çeşitli merkezi sinir sistemi hastalıklarında, nakillerden sonra beyin dokusunda nöral farklılaşmaya karşın, bazı destek moleküller de üreterek yararlı etkilerinin olduğu izlenmiştir. Mezenkimal kök hücre insanda genellikle superior iliak kanattan alınan kemik iliği aspiratından elde edilir (Digirolamo vd 1999, Deans ve Moseley 2000). Ancak femoral ve tibial medullar kısımlardan, torasik ve lomber vertebralardan da elde edilebilirler (Oreffo vd 1998, D'Ippolito vd 1999, Murphy vd 2002).

Mezenkimal kök hücreler için ana kaynak kemik iliği olmakla birlikte birçok dokudan izole edilebileceği bilinmektedir. Bu dokuların başlıcaları; kas, kemik, kıkırdak, tendon, yağ, fetal kemik iliği, karaciğer, kordon kanı ve matriksi, damar ve periferik kan dokularıdır (Karaöz ve Ovalı 2004).

Mezenkimal kök hücreler için diğer bir kaynak Wharton jeli olup, bu göbek kordonundaki müköz bir bağ dokusudur. Wharton jelini ilkel kök hücre kaynağı olarak görmenin nedeni embriyogenezde primordial germ ve HKH'nin embriyon ve fetüsteki hedef dokuları oluşturmak amacıyla vitellüs kesesinden bu bölge aracılığıyla göç etmeleridir. Kültür ortamında bu hücreler uyarıldıklarında birkaç saat içinde nörit

benzeri çıkıntılara sahip yuvarlak hücre gövdelerinin olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin nöron spesifik enolaz eksprese ettiği görülmüştür. Wharton jelinden elde edilen çok sayıda hücre olması, kolay elde edilebilmesi, kültür ortamlarında uzun süre yaşaması, etik yönden tartışmalı olmaması bu kaynağı cazip hale getirmektedir (Karaöz ve Ovalı 2004).

Mezenkimal stromal hücreler (MSC) göbek kordonun birkaç komponentinden elde edilebilir. Bu komponentler göbek kordon kanı, göbek kordon ven subendoteliumu ve wharton jelidir. Mezenkimal stromal hücreler wharton jelinin belli belirsiz olan 3 tabakasından elde edilir. Bu tabakalar perivasküler alan, intervasküler alan ve subamniyondur. Wharton jel hücreleri (WJC) kemik iliği stromal kaynaklı hücrelere ve diğer mezenkimal hücrelere benzerler (Ma vd 2005, Troyer ve Weiss 2008). Nestin gibi temel hücre belirteçlerini eksprese ederler. Wharton jel hücreleri çeşitli faktörlerle indüklendiğinde adipoz doku, kemik, kıkırdak, iskelet kası, nöronal ve kalp kası hücrelerine, benzer hücrelere dönüşebilme özelliğine sahiptir (Troyer ve Weiss 2008).

### 2.3. Eritropoetin

Eritrosit üretiminin başlıca düzenleyicisi olan EPO, glikoprotein yapıda bir hormon olup esas olarak böbreklerde üretilir. Molekül ağırlığı 34.000 daltondur. Eritropoetin etkinliği ünite (U) olarak belirtilir. Ünite kavramı, ilk olarak sıçanda 5 µmol kobaltın oluşturduğu eritropoietik cevaba eşdeğer etki oluşturan EPO dozu olarak tanımlanmıştır (Noguchi vd 2007). İnsan EPO'nin protein ağırlığının 1 miligramı 70.400 U, total ağırlığın 1 mg'ı ise 50.000 U etkinlik gösterir. İdrarda EPO'nin saflaştırılması, genomik DNA'sının izolasyonu ve klonlanmasını sağlamıştır (Brines ve Cerami 2005). Eritropoetin gen lokusu 7. kromozom üzerindedir (Nagai vd 2001).

Doku hipoksisi, EPO üretimi için başlıca fizyolojik uyarıdır ve dolaşan eritrosit sayısı ile ilişkilidir (Arcasoy 2008, Cariou vd 2008 ). Eritropoetin yapımı ile eritropoez arasında negatif geri besleme mekanizması vardır. Böylece kanda dolaşan eritrosit sayısının kontrol edilmesi ile doku oksijenlenmesi belirli sınırlar içinde dengede tutulmaya çalışılır. Normal bir insanda kanama veya hemoliz gibi eritrosit kaybı durumunda, doku oksijenizasyonu azalır ve böbrek ile karaciğerde EPO sentezleyen hücreler duyarlı hale gelir, eritropoetin üretimi ve plazmaya salınımı artar. Eritropoetin kemik iliğinde 'colony forming unit-erythroid' (CFU-E), proeritroblast ve bazofilik

eritroblastların hücre yüzeyinde bulunan, 72.000 kD molekül ağırlığındaki spesifik reseptörüne bağlanarak etki eder. Kemik iliğinde eritroid serinin öncü hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmalarını sağlayarak dolaşan eritrosit sayısını fizyolojik sınırlarda tutar. Dolaşan kanda eritrositlerin artması ile doku oksijenlenmesi yeterli bir şekilde sağlanmış olduğundan, EPO üreten hücrelerde üretim yavaşlar ve normal durumuna geri döner (Genc vd 2004, Ribatti vd 2003, Kertesz vd 2004).

EPO esas olarak böbrek tubuluslarından salgılanan ve kemik iliğinde eritrosit öncül hücrelerindeki reseptörüne bağlanarak bu hücrelerin yaşamasını ve farklılaşmasını sağlayan bir hormondur. Eritropoetin, karaciğer ve böbreğin dışında beyin korteksi, serebellum, hipokampus, hipofiz bezi, plsentta, testis, dalak gibi organlarda da minimal olarak üretildiği gösterildi. Birçok çalışmada spinal kord yaralanması sonrasında EPO ve EPO-R varlığı, nöronlarda ve glial hücrelerde eksprese olduğu gösterildi (Matis ve Birbilis 2009). Buradaki EPO artışı hipoksiye verilen fizyolojik bir yanıttır. Ayrıca araştırmacılar, beyaz madde içindeki kapiller damarlar üzerindeki motor nöronların dentritik uzantıları ve sinir gövdelerinde EPO-R olduğunu gösterdiler (Siren vd 2009). Omurilik travması ve TBH sonrası morfolojik, fonksiyonel ve kognitif fonksiyonlardaki iyileşmenin muhtemel mekanizmaları EPO ve EPO varyantlarının apoptozisi engellemesi, anti-enflamatuvar etkisi, antioksidan etkisi, kan-beyin bariyerinin yenilenmesi, nörogenesis ve angiogenesisin uyarılması ile açıklandı. Eritropoetin anti-apoptotik mekanizması tam olarak açıklanmasa da EPO'nin janus-tyrosin-kinaz-2 (JAK-2) ve nükleer faktör kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) kaskadlarının çapraz olarak tetiklenmesi ile apoptotik hücre ölümünü engellediği düşünülmektedir (Kontogeorgakos vd 2009). Böbrekten salgılanmasının uyarılmasında hipoksinin indüklediği Faktör-1 (HIF-1) rol oynar. Ancak EPO ve EPO reseptörünün (EPO-R) kemik iliği dışında vasküler endotelial hücreler, kalp kası hücreleri, nöronlar, makrofajlar, leyding hücreleri, kadın genital traktusu gibi normal dokularda da bulunduğu tespit edilmiştir. Beyinde nöronların iskemik hasardan korunmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Farrell ve Lee 2004, Arcasoy vd 2008). Endometrial dokularda östrojene bağlı artışta EPO'nin önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde yapılan incelemelerde akciğer, meme, mide, malign melanom, prostat, baş-boyun tümörleri, nöroblastom, glioblastom, serviks, over, endometrium tümörlerinde ve renal hücreli karsinom ile hepatosellüler karsinomda EPO yapımı ve EPO-R varlığı gösterilmiştir (Kayse ve Gabius 1992,

Yasuda vd 2002, Brower 2003, Ribatti vd 2003, Farrell ve Lee 2004, Acs vd 2004, Arcasoy vd 2005).

Pluripotent kök hücre, interlökin-1 varlığında "committed" kök hücelere (myeloid, lenfoid, eritroid ve megakaryoid serinin öncüllerine) farklılaşır. Eritroid seride bu farklılaşma için büyüme faktörleri gereklidir. Sonraki farklılaşma basamağında, özellikle "CFUE" eritropoetine ihtiyaç vardır. Eritropoetin, eritroid serinin geç öncül hücreleri için büyüme ve "canlı kalma" faktörü olarak etki eder ve apoptozislerini önler, bu hücrelerin daha geç farklılaşma basamaklarına taşınmasını sağlar, sonuçta olgun eritrositler üretilir. Eritropoetin eritroid öncül hücrelerinin yüzeyindeki EPO-R aracılığıyla etkisini gösterir (Sugawa vd 2002, Lu vd 2005).

Eritropoetinin, karaciğer ve böbreğin dışında beyin korteksi, serebellum, hipokampus, hipofiz bezi, plenta, testis, dalak gibi organlarda da minimal olarak üretildiği gösterildi. Birçok çalışmada spinal kord yaralanması sonrasında EPO ve EPO-R varlığı, nöronlarda ve glial hücrelerde eksprese olduğu gösterildi (Matis ve Birbilis 2009). Buradaki EPO artışı hipoksiye verilen fizyolojik bir yanıttır. Ayrıca araştırmacılar, beyaz madde içindeki kapiller damarlar üzerindeki motor nöronların dentritik uzantıları ve sinir gövdelerinde EPO-R olduğunu gösterdiler (Siren vd 2009). Omurilik travması ve TBH sonrası morfolojik, fonksiyonel ve kognitif fonksiyonlardaki iyileşmenin muhtemel mekanizmaları EPO ve EPO varyantlarının apoptozisi engellemesi, anti-enflamatuvar etkisi, antioksidan etkisi, kan-beyin bariyerinin yenilenmesi, nörogenesis ve angiogenesisin uyarılması ile açıklandı. Eritropoetinin anti-apoptotik mekanizması tam olarak açıklanmasa da EPO'nin janus-tyrosin-kinaz-2 (JAK-2) ve nükleer faktör kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) kaskadlarının çapraz olarak tetiklenmesi ile apoptotik hücre ölümünü engellediği düşünülmektedir (Kontogeorgakos vd 2009).

### **2.3.1.Eritropoetin Reseptörü**

Eritropoetin reseptörü ekstrasellüler, transmembran ve intrasellüler birimlerden oluşur. Amino terminali hücre dışında, karboksi terminali hücre içinde bulunur. Tek bir EPO molekülü hücre yüzeyindeki iki reseptöre bağlanır. Ligandın bağlanması ile intrasellüler birimdeki tirozinler fosforile olur ve hücre çoğalması, apoptozun önlenmesi ve farklılaşmasını etkileyen bir dizi gen ekspresyonunu tetikler. EPO-R geni 19. kromozomun uzun kolunda bulunur. Genin ekspresyonu ile 66 kD'luk 508 aminoasitli



bir protein sentezlenir. EPO-R hücre membranına girmeden önce glikozilasyon ve fosforilasyona uğrar (Zang vd 2001). Reseptörün kendi kinaz birimi yoktur. Janus-kinaz ailesinden bir tirozin protein kinaz olan JAK-2, EPO-R'nin sitoplazmik birimlerine bağlanır ve tirozin fosforilasyonunu yürütür. Janus-tyrosin-kinaz-2 geni silinen farelerde 12-13. günlerde, tıpkı EPO ve EPO-R genlerinin silindiği modellerde olduğu gibi ağır anemiyle birlikte fetal ölüm görülmektedir. Fosforile olan EPO-R, sinyal molekülleri için bir bağlanma bölgesi haline gelir. Sinyal proteinleri arasında 'sinyal-transducing activators of transcription (STAT) bulunur. STAT-1 ve STAT-5 fosforile ve dimerize olduktan sonra çekirdeğe giderek gen transkripsiyonuna neden olurlar. Sinyal proteinlerinin çekirdeğe taşınması, EPO-R'ne bağlı şekilde birleşim şeklinde de olabilmektedir. EPO-R'nin tirozin birimlerinin her birinin fosforilasyonu ayrı bir sinyal peptidinin aktivasyonunu sağlamaktadır (Cheung vd 1997, Divoky vd 2001).

#### **2.4. Hipotez**

Travmatik beyin hasarlarından sonra uygulanan klinik tedavilerin tam bir iyileşme için yeterli olmaması nedeniyle deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmakta ve bu yönde çalışmaların sayısı artarak devam etmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmaların ışığında kök hücre tedavisinin, hasarlı dokuların ve organların tamirinde önemli rol oynadığı düşünülmekte ve tedavi için umut vermektedir. Aynı zamanda apoptozisi önleme özelliği olan, beyin üzerinde önemli nörodejeneratif kayıpların geri kazanımına katkı sağladığı bildirilen EPO'nin ileride tedavide kullanılabilmesi düşünülen hedef bir ajandır. Bu bağlamda biz bu çalışma ile TBH sonrasında kök hücre verilmesinin motor performansı artıracığını ve doku iyileşmesinin daha iyi olacağını görmeyi hedefledik. Yine bu çalışmada TBH'dan sonra KH+EPO'nun birlikte verilmesinin ayrı ayrı kullanımlarından daha iyi bir şekilde hem nörolojik fonksiyonları hem de hasar iyileşmesini etkileyebileceğini düşündük.

### **3. MATERYAL ve METOD**

Araştırmamız Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi'nde yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan çalışmanın yapılmasında etik açıdan sakınca olmadığına dair onay alındı (PAUHDEK-2012/027). Tüm çalışma boyunca deney hayvanları çalışma etiğine sadık kalındı.

#### **3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanışı**

Çalışmada deney hayvanı olarak aynı yaş grubundan ortalama ağırlığı 180-250 gram olan 6-8 aylık, erkek, 29 adet erişkin wistar albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar altları plastik, üst kısımları tel olan, su ve besinlere kolaylıkla ulaşabilecek şekilde düzenlenmiş kafesler içerisine konuldu. Kafeslerin içine talaş serpidi. Kafesler haftada 4 kez temizlendi. Hayvanlara pelet adı verilen yem verildi. Hayvanlar yem ve su alımında serbest bırakıldı. Yem ve su kapları sürekli kontrol edilerek hayvanların yeterli miktarda su ve yem almaları sağlandı. Hayvanların tamamı çalışma süresi boyunca oda sıcaklığında (ortalama 22 derece) % 50 nem ortamında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusu bulunan odalarda bakıma alındı. Hayvanlara yapılan tüm işlemler hijyenik kurallara uygun olarak veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirildi.

#### **3.2. Deneyin Yapılışı**

Travmatik beyin hasarı oluşturmadan önce çalışmaya alınan tüm sıçanlara eğik düzlem testi (Şekil 3.1) ve rotarod performans testi (Şekil 3.2) üzerinde bir hafta boyunca günde bir defa yürüme ve alıştırma amaçlı egzersiz yaptırıldı. Gruplardaki tüm sıçanlar rotarod sistemi üzerinde üç dakika süreyle yürümeyi, çift yönlü eğik düzlem testinde ise eğik düzlem üzerinde durmayı öğrendikten sonra rastgele ayrılarak 4 ayrı çalışma grubu oluşturuldu.



**Şekil 3.1** Çift yönlü eğik düzlem testi



**Şekil 3.2** Rotarod performans testi

**Grup 1:** Bu gruptaki sıçanlara sadece TBH oluşturuldu ve bu sıçanlar kontrol grubu olarak belirlendi (K, n=7).

**Grup 2:** Bu gruptaki sıçanlara TBH oluşturulduktan yarım saat sonra intraperitoneal (i.p.) 1000 U/kg dozunda rekombinant insan eritropoetini enjekte edildi. Bu sıçanlar eritropoetin grubu olarak belirlendi (EPO, n=7).

**Grup 3:** Bu gruptaki sıçanlara TBH oluşturulduktan hemen sonra  $3 \times 10^4$  miktarında CD34+ kök hücre süspansiyonu enjektör yardımıyla hasar alanının üzerine direkt olarak enjekte edildi ve bu sıçanlar kök hücre grubu olarak belirlendi (KH, n=8).

**Grup 4:** Bu gruptaki sıçanlara TBH oluşturulduktan hemen sonra  $3 \times 10^4$  miktarında CD34+ kök hücre süspansiyonu hasar alanına enjekte edildi. Hasardan yarım saat sonra i.p. 1000 U/kg dozunda rekombinant insan eritropoetini enjekte edildi. Bu sıçanlar kök hücre+eritropoetin grubu olarak belirlendi (KH +EPO, n=7).

Travmatik beyin hasarı oluşturulduktan sonra hayvanlara 7 haftalık deney süresinde 1., 2., 3., 4., 5., 6., ve 7. haftalarda arka bacakların kuvvet ve lokomotor fonksiyonuna yönelik rotarod performans ve çift yönlü eğik düzlem testi yaptırıldı. Deneyin 1., 3., 5. ve 7. haftalarında hasar alanındaki iyileşmenin radyolojik gözlenmesi amaçlı olarak sıçanların beyin MR'ları çekildi.

Yedi haftalık deneyin sonunda tüm sıçanlara i.p. verilen ketamin+ksilazin altında servikal dislokasyon yapıldı. Daha sonra kraniyektomi yapılarak sıçanların kafatası açıldı ve beyinleri bütün olarak çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokuları histopatolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonu içerisine yerleştirildi.

### **3.3. Rotarod Performans Testi**

Rotarod performans testi, hayvanların motor koordinasyon ve performanslarının değerlendirildiği davranışsal bir testtir. Test cihazının çalışma prensibi hayvanları belirli bir yükseklikte belirli bir hızda (10 devir/dk) elektrik enerjisiyle dönen bir mil üzerinde belirli bir süre içerisinde yürüyebilmesi ve aşağıya düşmemesi esasına dayanır (Okano vd 2005).

Bu testte kullanılan cihazda birbirine bitişik dört kabin bulunmaktadır. Bu kabinlerin genişliği 15 cm, derinliği 30 cm ve duvar yüksekliği 50 cm'dir. Hayvan aşağıya düşmemek için milin döndüğü yönün tersi yönünde yürümeye çalışır. Operasyon öncesi deneye katılacak olan tüm hayvanlara rotarod üzerinde bir hafta boyunca günde bir defa yürüme ve alıştırma amaçlı egzersiz yaptırıldı. Gruplardaki tüm sıçanlar rotarod sistemi üzerinde üç dakika süreyle yürümeyi öğrendi. Çalışmanın başlangıcında sıçanın çalışmaya dahil edilebilmesi için rotarod sistemi üzerinde en az 180 saniye kalabilmesi gerekmektedir. Bu testler operasyon sonrasında 1., 2., 3., 4., 5., 6., ve 7. haftalarda tekrar edildi. Çalışmada 180 saniye rotarod sistemi üzerinde kalabilen sıçan normal olarak değerlendirildi. Hayvanlarda motor koordinasyonun bozulması durumunda hayvanın yürüyemediği ve mil üzerinden düştüğü gözlemlendi. Aşağıya düşen sıçanlar tekrar dönen mil üzerine konuldu. Grupları oluşturan tüm sıçanlara 3 defa yürüme şansı

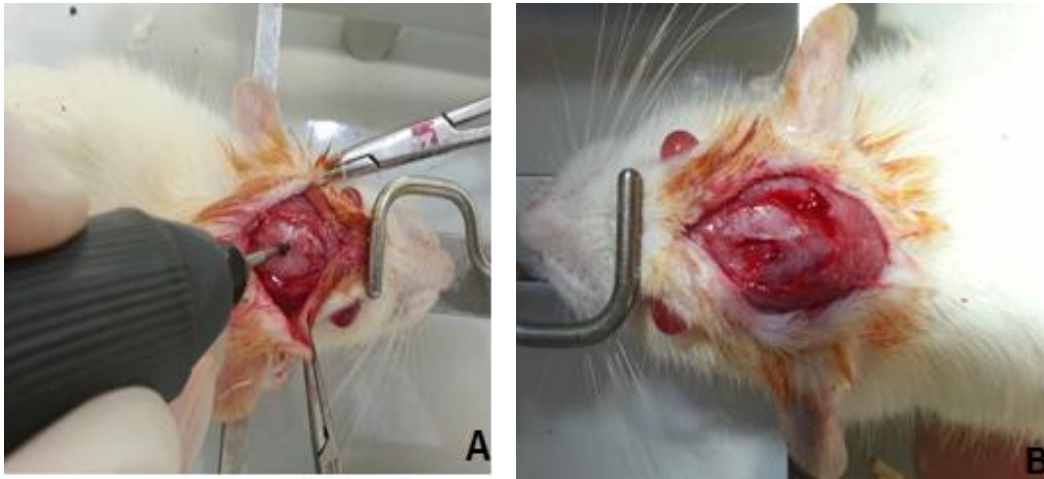
verildi ve sıçanlar yere düştüğü anda süre durduruldu. Mil üzerinde kalabildiği en uzun süre rotarod performans değeri olarak kaydedildi.

### 3.4. Rivlin Ve Tator'un Eğik Düzlem Testi

Hayvanların motor kuvvetinin ve performansının değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir test eğik düzlem testidir. Test cihazı, yanında açıölçer bulunan üst kısmı açılı olarak yükseltilebilen bir tabladan oluşmaktadır. Çalışmamızda 1., 2., 3., 4., 5., 6., ve 7. haftalarda deneklerin baş yukarı ve baş aşağı pozisyonda eğik düzlemde beş saniye süreyle kalabildikleri açı sıçanların eğik düzlem performansı olarak kaydedildi (Rivlin ve Tator 1978).

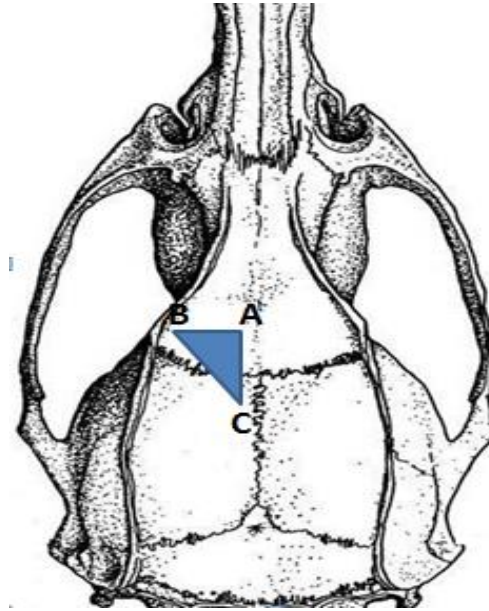
### 3.5. Travmatik Beyin Hasarının Oluşturulması

Çalışmamızda sıçanlara anestezi için 5 m/kg ksilazin hidroklorür+100 mg/kg ketamin i.p olarak verildi. Sıçanlar 4-5 dakika içinde derin anesteziye girdikten sonra, yüz üstü pozisyonda operasyon tablasına alınarak tespit edildi ve deneklerin kafaları tıraş edilip operasyon bölgesi kıllardan temizlendi. Tıraş edilen bölge polyvinyl pyrolidone iod kompleksi ile temizlendi. Daha sonra yüksek devirli drill kullanılarak sol paryetal bölgeye hasar yapılacağı motor alana denk gelecek şekilde hasar yapılacak koordinat alanını içerecek kadar kraniyektomi yapılarak çalışma sahası olan beyin dokusu ortaya konuldu (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3:** Yüksek devirli drill ile kraniyektomi (A), Kraniyektomi sonrası beyin dokusu (B)

Travmatik beyin hasarı, stereotaksi cihazı kullanılarak bregmayı merkezi nokta kabul ederek motor kortekse, A: 1,2-3,5 mm, B: 1,2-1,7 mm, C: 3,7-3,5 mm koordinatlarında minör bir hasar yapıldı ve bu hasar 1,5 mm derinliğindedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Hasarın oluşturulacağı alanın koordinatları

Hasar alanındaki beyin bölgesi steril lanset yardımı ile çıkarıldı ve kraniyektomi sırasında çıkan kemik parçası yeniden yerine konularak sıçanların kafa derisi dikildi ve böylece travmatik beyin hasarı işlemi tamamlanmış oldu (Şekil 3.5).



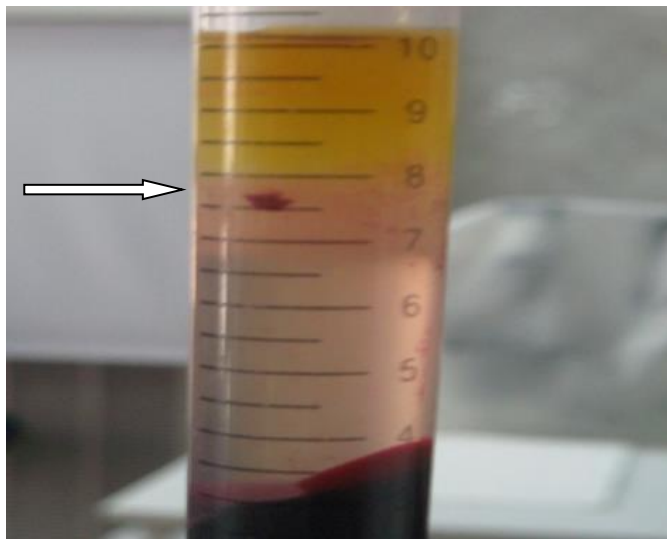
Şekil 3.5 Stereotaksi cihazı ile hasarın oluşturulması (A), Hasar sonrası otolog kemiklerin yerine yerleştirilmesi (B)

### 3.6. Yeni Doğan Göbek Kordon Kanının Alınması

CD34+ hematopoetik kök hücre eldesi yeni doğanın göbek kordon kanından alındı. Bu amaçla, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na doğum amaçlı yatırılan bir gebeye ve eşine doğum öncesi göbek bağı kesildikten sonra bebeği ve plasenta arasında bulunan kordon bağından, yapacağımız tıbbi araştırma nedeniyle kan alınacağı ve bu alınan kanın deneysel travmatik beyin hasarı oluşturulmuş sıçanlarda kullanılacağı, yapılacak bu işlemin doğum sonrasında bebeğe ve kendisine herhangi bir zararı olmayacağı, alınan kan örneğinin başka bir çalışma ya da herhangi bir amaçla kullanılmayacağı anlatılıp gönüllü onam formu imzalatıldı. Onamın alınmasını takiben, gebenin doğumu sonrası bebeğin göbek kordonu kesilip plasentaya yakın olan kısmından heparinize edilmiş 20 ml'lik enjektör yardımıyla göbek venden yaklaşık 50 ml kordon kanı alındı.

### 3.7. Kordon Kanından CD34+ Kök Hücre Elde Edilmesi

Alınmış olan kordon kanı soğuk zincirde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizioloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilerek CD34+ hematopoetik kök hücre izolasyonu yapıldı. Bu işlem yedi basamakta gerçekleştirildi.



**Şekil 3.6** Göbek kordon kanından CD34+ hematopoetik kök hücre eldesi Ok, santrifüj sonrası kök hücrelerin bulunduğu bölgeyi göstermektedir

1. Basamak: 5 ml kordon kanı direk olarak 5ml ficolle yayılarak 3250 rpm'de 25 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ficolle plazma arasında kalan bulutsu kısım (Şekil 3.6) 5 ml kapasiteli 12x75 ml boyutundaki polystyrene içeren tüpe toplandı.

2. Basamak: Tüpe konulan hücre süspansiyonu üzerine steril otomatik pipet ile her 1 ml hücre için 100 µl insan CD34+ seleksiyon kokteyli ilave edildi (Easysep Human CD34+ Selection Coctail, StemCell Technologies, Catalog number 18056). İyice karıştırılmış olan karışım oda ısısında 15 dakika bekletildi.

3. Basamak: Hücre-monoklonal antikor karışımı üzerine magnetik nanopartiküler (EasySep Magnetik Nanoparticles 1 ml, Stem Cell Tecnologies, Catalog number 18056) steril otomatik mikropipet yardımıyla her 1 ml hücre için 50 µl ilave edildi ve karışım iyice karıştırılarak oda ısısında on dakika süre ile bekletildi.

4. Basamak: Tüp içindeki süspansiyon, kitte önerilen besiyeri recomend medium ile 2.5 ml'ye tamamlanarak karışım steril bir pipet ile yukarı aşağı doğru hareketlendirilerek karıştırıldı ve tüp magnet (StemCell Tecnologies, Catalog number 18000) içerisine yerleştirilerek, beş dakika süreyle bekletildi.

5. Basamak: Tüp magnetin içerisinden çıkarılmadan süpernatant kısım atıldı. Böylece tüpte yalnızca seleksiyonu istenen hücreler kaldı. Bu işlem 3-4 sn'de yapıldı. Daha sonra tüp ve mıknatıs tekrar düz pozisyona getirildi.

6. Basamak: Tüp mıknatıstan çıkarıldı ve 2,5 ml recomend medium ilave edildi. Elde edilen karışım pipetle 3-4 kez karıştırıldı. Tüp mıknatısa tekrar kondu ve 5 dakika süreyle bekletildi.

7. Basamak: 4, 5, 6. basamaklar tekrar edildi ve 5. basamak bir kez daha tekrar edildi. Böylece tüpte kalan hücreler en az iki kez kültür solüsyonu ile yıkanarak uygun hücre süspansiyonu elde edildi. Bu işlem sonrası pozitif seleksiyonla elde edilmiş CD34+ hücreler kullanıma hazırlanmış oldu.

### **3.8. Elde Edilen CD34+ Kök Hücrelerin Sayımı**

Elde edilen pozitif seleksiyon ile seçilmiş olan hücrelerden 100 µl çekilerek 400 µl PBS (phosfat buffer saline) ve 1 µl tripan blue ile muamele edilerek ışık mikroskobu



altında thoma lamında sayım yapıldı. Hücre süspansiyonunun 60 µl ortalama  $3 \times 10^4$  hücre olduğu gözlemlendi.

### 3.9. Histopatolojik İnceleme

Deney sonunda %10'luk formol içinde alınan beyin dokuları aynı gün içinde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda hem hasarlı alanı hem de hasarsız alanı içine alacak şekilde kesilerek kasetlere yerleştirilip bir günlük doku takibine alındı (Şekil 3.7). Doku takibi sonrası parafine gömülen dokulardan mikrotom yardımı ile 3 mikron kalınlığında kesitler alınarak preparatlar hazırlandı ve bu işlemden sonra dokular hematoksilin-eosin (HE), Ki-67, CD34, S100, glial fibrillary acidic protein (GFAP) antikörleri ile boyandı. Boyama işleminden sonra preparatlar mikroskop altında incelemeye alındı. Bu incelemede hasar alanı, hasarlı alanın boyanma oranı, hasar alanındaki proliferatif hücre varlığı ve damarlanmaya bakıldı.



Şekil 3.7 Beyin dokusu

### 3.10. Radyolojik İnceleme

7 haftalık deney süresinin 1., 3., 5. ve 7. haftalarında tüm sıçanların Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji AD'da MR'ları çekildi ve hasar alanında meydana gelen iyileşme radyolojik olarak incelendi.

#### 3.10.1. Radyolojik Görüntüleme

MR incelemesi 1.5 tesla süperiletken magnet (Signa Excite HD, GE Healthcare, Milwaukee, WI) ile 8 kanallı nörovasküler sarmal kullanılarak elde edildi. Kullanılan

MRG cihazının gradiyent gücü her ekseninde 33 mT/m, maksimum gradiyent gücüne ulaşım zamanı 275 ms ve “slew rate” değeri 120 mT/m/ms idi.

Sagittal ve aksiyal T1 ağırlıklı (T1A) “Fast Gradient Echo” lokalizer görüntüler üzerinden, böbreklerin pozisyonuna göre, çekim protokolümüzdeki sekansların planlaması yapıldı. İlk olarak yağ baskılama tekniği ile T2 ağırlıklı (T2A) “Single Shot Fast Spin Echo” sekansı kullanılarak tekrarlama zamanı (TR) 645 msn, eko zamanı (TE) 90 msn, TR/TE=645/90 msn] aksiyal görüntüler elde edildi. Görüntüleme parametreleri; bant genişliği (“bandwidth” = BW) 83,33 kHz, görüntüleme alanı (“field of view” = FOV) hastanın vücut büyüklüğüne göre 20x10 cm ile 30x30 cm, kesit kalınlığı 5 mm, kesit aralığı 1 mm, veri toplama sayısı (“number of excitations” = NEX) 1 ve matriks 384x160 olarak belirlendi. Daha sonra aksiyal planda “Fast Imaging Employing Steady State Acquisition” (FIESTA) sekansı (TR/TE=4,1/1,8 msn) kullanılarak görüntüleme yapıldı. Görüntüler BW 83,33 kHz, FOV vücut büyüklüğüne göre 20x10 cm ile 30x30 cm, kesit kalınlığı 4 mm, kesit aralığı 0,5 mm, NEX 1, matris 256x224 parametreleri kullanılarak elde edildi. Daha sonra koronal planda T1A “Liver Acquisiton Volume Acceleration” (LAVA) sekansı (TR/TE=4,3/2 msn) kullanılarak görüntüleme yapıldı. Görüntüler BW 62,5 kHz, FOV vücut büyüklüğüne göre 20x10 cm ile 30x30 cm, kesit kalınlığı 1.2 mm, kesit aralığı 0,6 mm, matriks 288x160, NEX 0,7 parametreleri kullanılarak elde edildi.

### 3.10.2. Radyolojik Değerlendirme

Elde bulunan tüm görüntüler iş istasyonuna (Advantage Workstation 4.3; GE Healthcare) aktarıldı. Konvansiyonel MR görüntülerinde serebral patolojik sinyal alanının aksiyal kesitte en büyük uzunluğu ölçülerek kayıt edildi.

### 3.11. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 18.0 paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama± standart sapma (Ort±S.S), nitelik değişkenler sayı (yüzde) olarak verildi. Bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Farklılık çıkan değişkenlerde ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Bağımlı grup karşılaştırmalarında ise Friedman Testi kullanıldı. Farklılık çıkan ölçümlerde çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni Düzeltmeli Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek testi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Eğik Düzlem Testi Bulguları

Çalışmamızda çift yönlü eğik düzlem testinde yedi hafta boyunca haftalık, sıçanların baş aşağı ve baş yukarı pozisyonda beş saniye süreyle kalabildikleri açı, o hayvanın çift yönlü eğik düzlem performansı olarak kaydedildi. Gruplara ait yedi haftalık eğik düzlem testi ortalamaları karşılaştırılması istatistiksel açıdan değerlendirildi (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1** Gruplara ait yedi haftalık eğik düzlem test sonuçlarının karşılaştırılması (Ort±S.S.)

Grup Hafta	K (n=7)	EPO (n=7)	KH (n=8)	KH+EPO(n=7)	p değeri
<b>1.Hafta (Derece)</b>	37,87 ± 5,64	38 ± 2,5	40,12 ± 2,36	39,87 ± 2,7	>0.05
<b>2.Hafta (Derece)</b>	37,62±3,34 <sup>aa,bb</sup>	38,5 ± 1,6 <sup>ccc,dd</sup>	43,12±1,36 <sup>aa,ccc</sup>	42,75±2,87 <sup>bb,dd</sup>	<0.001
<b>3.Hafta (Derece)</b>	38 ± 1,8 <sup>aa,bb</sup>	39,25 ± 1,9	42,25 ± 2,55 <sup>aa</sup>	42,62 ± 3,29 <sup>bb</sup>	<0.01
<b>4.Hafta (Derece)</b>	40 ± 1,15 <sup>aa</sup>	41,25 ± 2,43	44,37 ± 2,67 <sup>aa</sup>	44 ± 3,34	<0.05
<b>5.Hafta (Derece)</b>	37,29 ± 1,11 <sup>aaa,bbb</sup>	42,12 ± 1,89 <sup>aaa,cc</sup>	42,25 ± 1,83 <sup>bbb</sup>	46 ± 1,91 <sup>aa,bb,cc</sup>	<0.001
<b>6.Hafta (Derece)</b>	38,29 ± 1,5 <sup>aa,bbb</sup>	43 ± 1,63 <sup>aa</sup>	44,25 ± 1,83 <sup>bbb</sup>	47,43 ± 0,79 <sup>aa,bb</sup>	<0.001
<b>7.Hafta (Derece)</b>	39,57 ± 1,62 <sup>aaa</sup>	41,14 ± 1,21 <sup>bbb</sup>	45 ± 1,07 <sup>aaa,bbb,ccc</sup>	49 ± 0,82 <sup>aa,bb,ccc</sup>	<0.001

p: Çoklu gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

<sup>aa,bb,cc,dd</sup>: Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki fark istatistiksel olarak p<0.01 düzeyinde anlamlıdır (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U).

<sup>aaa,bbb,ccc</sup>: Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki fark istatistiksel olarak p<0.001 düzeyinde anlamlıdır (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U).

Birinci hafta eğik düzlem ölçümleri incelendiğinde 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. İkinci hafta ölçümleri incelendiğinde; K grubu ile KH grubu ( $p<0.01$ ), K grubu ile KH+EPO grubu ( $p<0.01$ ), EPO ile KH grubu ( $p<0.001$ ), EPO ile KH+EPO grubu ( $p<0.01$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Eğik düzlem sonuçlarının üçüncü hafta ölçümleri incelendiğinde; K grubu ile KH grubu ( $p<0.01$ ), K grubu ile KH+EPO grubu ( $p<0.01$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

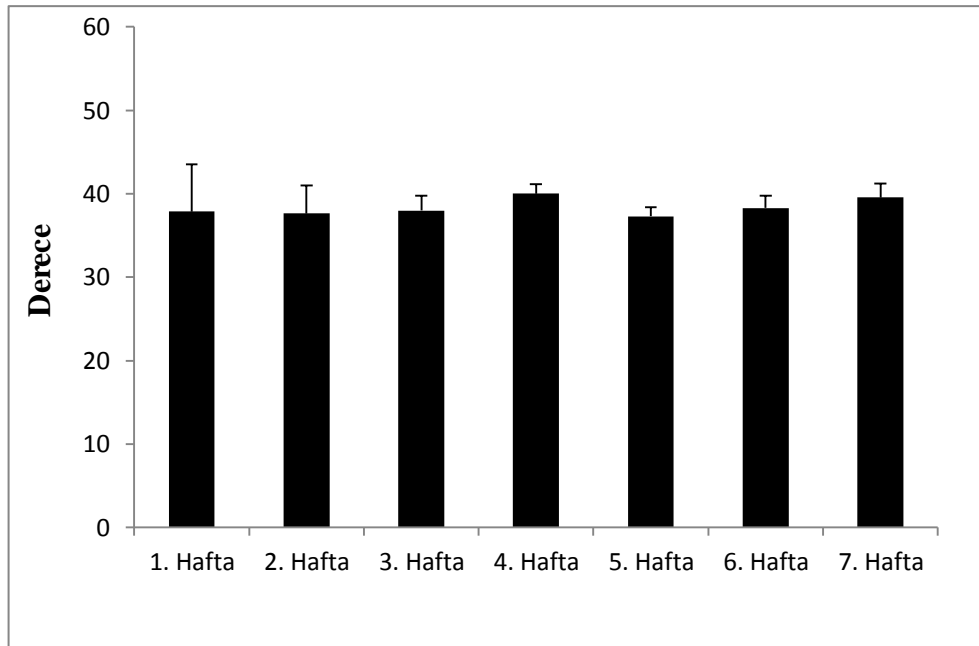
Eğik düzlem sonuçlarının dördüncü hafta ölçümleri incelendiğinde; K grubu ile KH grubu ( $p<0.01$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Eğik düzlem sonuçlarının beşinci hafta ölçümleri incelendiğinde; K grubu ile EPO grubu ( $p<0.001$ ), K grubu ile KH grubu ( $p<0.001$ ), K ile KH+EPO grubu ( $p<0.001$ ), EPO ile KH+EPO grubu ( $p<0.01$ ) ve KH grubu ile KH+EPO grubu ( $p<0.01$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Eğik düzlem sonuçlarının altıncı hafta ölçümleri incelendiğinde; K grubu ile EPO grubu ( $p<0.001$ ), K grubu ile KH grubu ( $p<0.001$ ), K grubu ile KH+EPO grubu ( $p<0.001$ ), EPO ile KH+EPO grubu ( $p<0.001$ ) ve KH grubu ile KH+EPO grubu ( $p<0.001$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

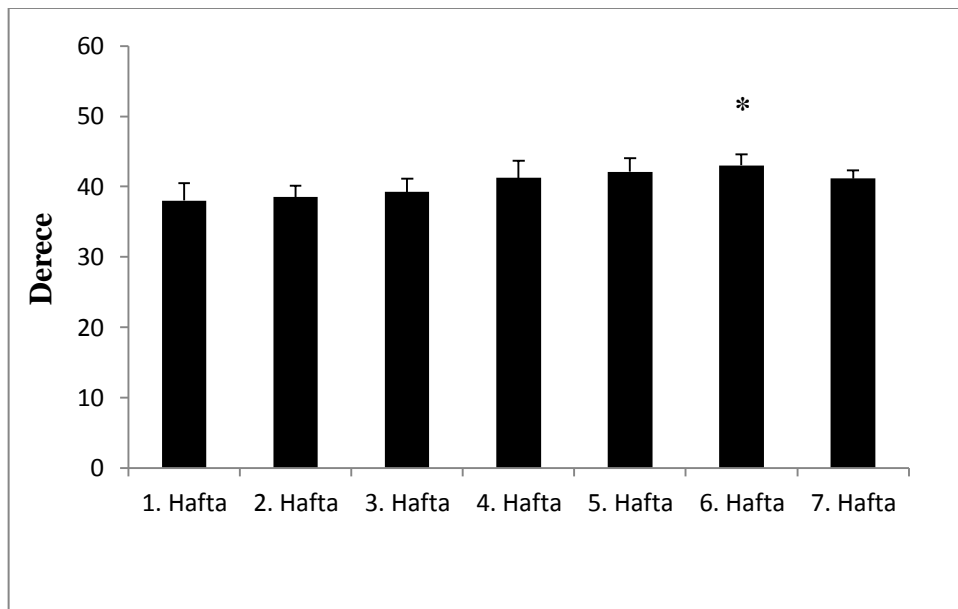
Eğik düzlem sonuçlarının yedinci hafta ölçümleri incelendiğinde; K grubu ile KH grubu ( $p<0.001$ ), K grubu ile KH+EPO grubu ( $p<0.001$ ), EPO ile KH grubu ( $p<0.001$ ), EPO ile KH+EPO grubu ( $p<0.001$ ) ve KH grubu ile KH+EPO grubu ( $p<0.001$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

K grubundaki sıçanlardan alınan eğik düzlem sonuçlarının haftalar arası değişimi incelendiğinde yedi hafta boyunca alınmış olan ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1** Kontrol grubunun yedi haftalık eğik düzlem sonuçlarının karşılaştırılması

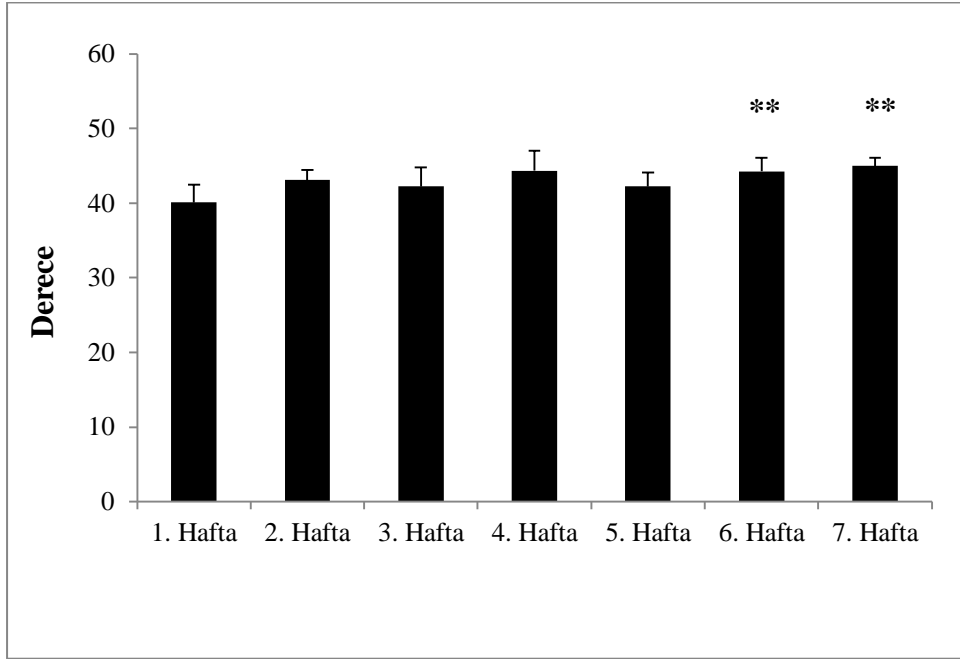
EPO grubundaki sıçanlardan alınan eğik düzlem sonuçlarının haftalar arası değişimi incelendiğinde tüm haftalar arasında eğik düzlem sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Yedi hafta boyunca alınmış olan eğik düzlem ikili değerleri haftalar olarak karşılaştırıldığında 2. ve 6. hafta arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2** Eritropoetin grubunda yedi haftalık eğik düzlem sonuçlarının karşılaştırılması

\*: 2. ve 6. haftalar arasındaki anlamlılığı ( $p < 0.05$ ) ifade eder (Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U).

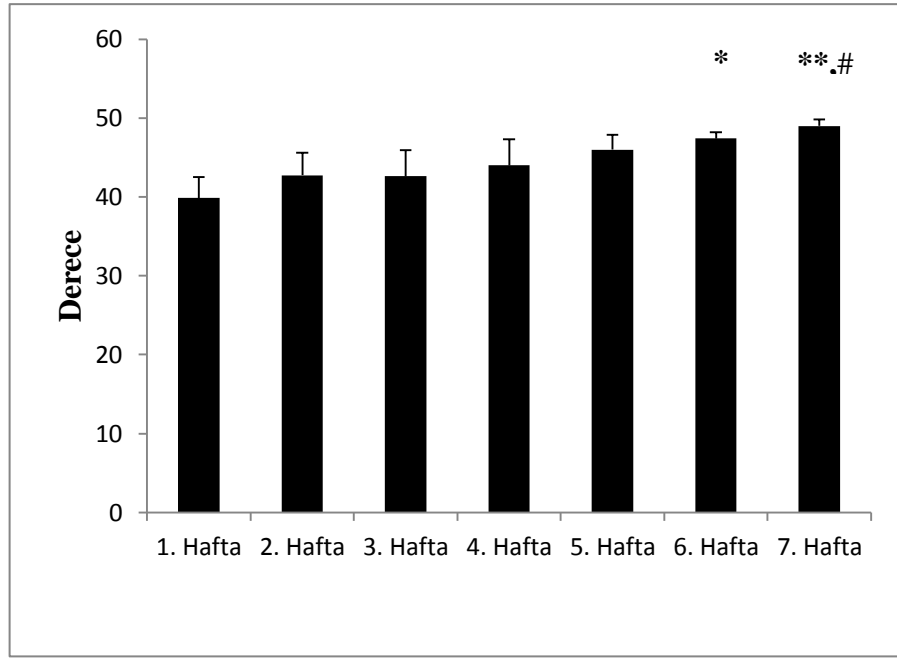
KH grubundaki sıçanlardan alınan eğik düzlem sonuçlarının haftalar arası değişimi incelendiğinde yedi hafta boyunca alınmış olan ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). Yedi hafta için alınmış olan ölçümler ikişerli olarak incelenmiştir. 1. ve 6. haftalar ( $p<0.01$ ) ve 1. ve 7. haftalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p<0.01$ ) (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3** Kök hücre grubunda yedi haftalık eğik düzlem ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması

\*\* : 1. haftanın, 6. ve 7. hafta ile arasındaki anlamlılığı ( $p<0.01$ ) ifade eder (Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U).

KH+EPO grubundaki sıçanlardan alınan eğik düzlem sonuçlarının haftalar arası değişimi incelendiğinde yedi hafta boyunca alınmış olan ölçümler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.001$ ). 1. ve 6. haftaların ( $p<0.05$ ), 1. ve 7. haftaların ( $p<0.01$ ) ve 2. ve 7. haftaların eğik düzlem değerlendirmeleri karşılaştırılması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4** Kök hücre+eritropoetin grubunda yedi haftalık eğik düzlem sonuçlarının karşılaştırılması

- \*: 1. haftanın, 6. ve 7. hafta ile arasındaki anlamlılığı ifade eder (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U) \*: ( $p < 0.05$ ), \*\*: ( $p < 0.01$ ).
- #: 2 ile 7. hafta arasındaki anlamlılığı ( $p < 0.05$ ) ifade eder (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U).

#### 4.2. Rotarod Performans Testi Bulguları

Yedi haftalık deney süresince deneklerin lokomotor sistemlerinin değerlendirilmesine yönelik, haftalık olarak her gruba rotarod performans testi yapıldı. Sıçanların rotarod performans değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Rotarod performans testi açısından istatistiksel açıdan yapılan değerlendirmede hem gruplar arasında haftalar açısından hem de grup içi haftalar arasında ölçümler arasında farklılık bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4.2** Gruplara ait yedi haftalık rotarod performans testi sonuçlarının karşılaştırması (Ort±S.S.)

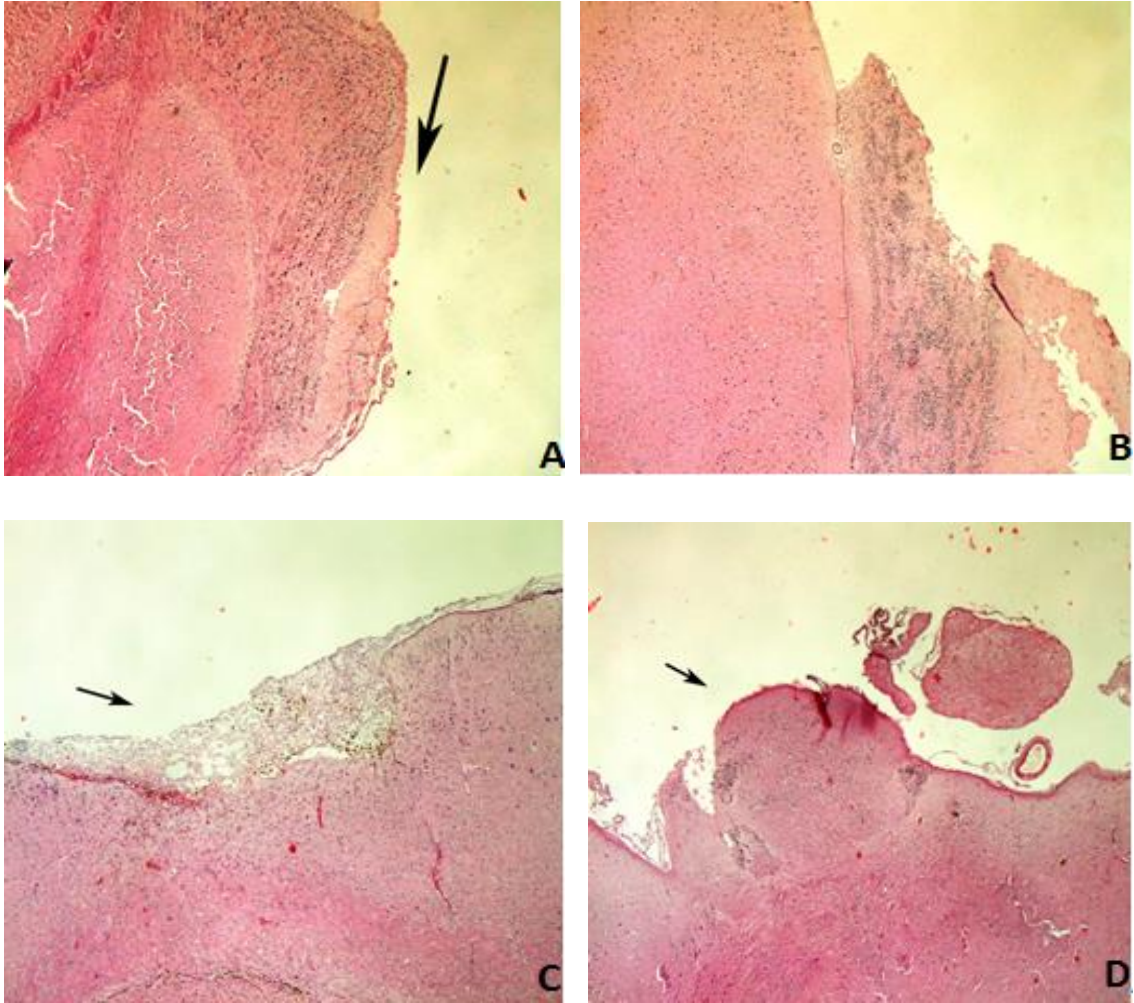
Grup Hafta	K (n=7)	EPO (n=7)	KH (n=8)	KH+EPO(n=7)	p değeri
<b>1.Hafta(sn)</b>	127,57± 50,99	142,86± 2,61	142,125± 5,11	144,71± 5,5	>0,05
<b>2.Hafta(sn)</b>	130,86 ± 50,34	142,86 ± 2,61	145,375 ± 3,02	146,29 ± 3,68	>0,05
<b>3.Hafta(sn)</b>	140 ± 2,38	143 ± 3	141,25 ± 4,03	143 ± 3,92	>0,05
<b>4.Hafta(sn)</b>	142,14 ± 2,41	140,29 ± 1,89	141 ± 4,04	142± 4,4	>0,05
<b>5.Hafta(sn)</b>	141,29 ± 1,5	143,86 ± 6,84	144,125 ± 6,03	145,86± 5,46	>0,05
<b>6.Hafta(sn)</b>	143,29 ± 3,25	142,29 ± 1,5	142,375 ± 5,32	145,43 ± 4,79	>0,05
<b>7.Hafta(sn)</b>	141,86 ± 1,21	141,43 ± 2,15	144,875 ± 3,14	143,29± 4,07	>0,05

p: Tüm gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

### 4.3. Histopatolojik Bulgular

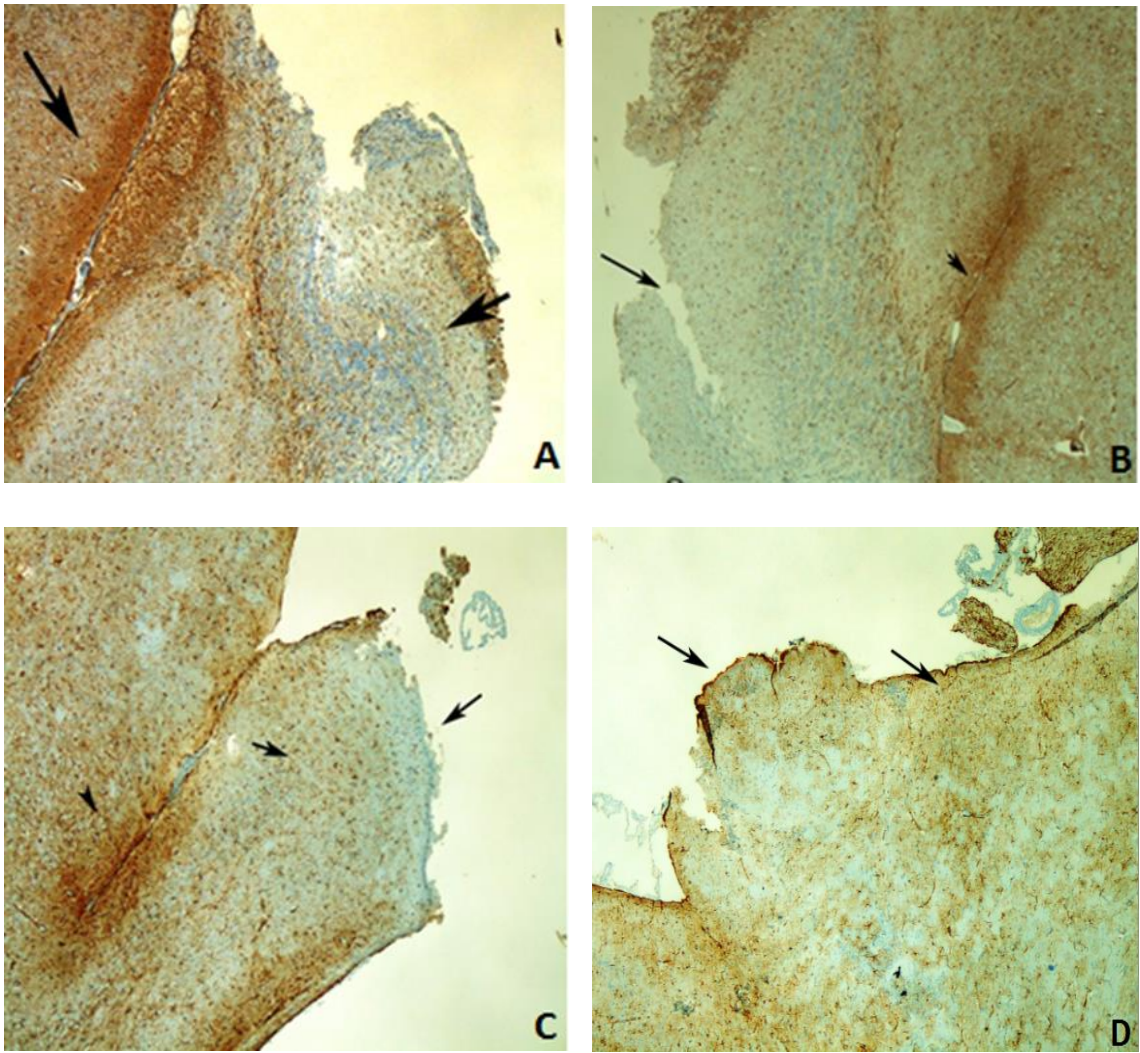
Cerrahi işlemden yedi hafta sonra alınan beyin dokularının histopatolojik değerlendirilmesi HE, GFAP, CD34, Ki-67 ve S100 antikoları ile yapıldı. Burada kullanılan HE boyası beyin dokusunda meydana getirdiğimiz hasarın tespiti amacıyla kullanıldı. Hasar alanında hasara bağlı gelişen inflamatuvar hücreler HE boyası ile boyanarak hasar alanımızı ortaya çıkarmıştır. Gruplara ait HE preparatları mikroskop altında incelendiğinde gruplara ait hasar alanları tespit edildi ve görüntülendi (Şekil 4.5).





**Şekil 4.5** K (A), EPO (B), KH (C), KH+EPO (D) gruplarına ait hematoksilin eozin preparat görüntülerinin karşılaştırılması (10X büyütme)  
Oklar hasar bölgesini göstermektedir

Gruplara ait GFAP preparatları mikroskop altında incelendiğinde hasar alanındaki glia hücrelerinin boyanma oranları tespit edildi ve görüntülendi. Hasarlı alanlarda GFAP boyamasının daha düşük oranda, hasarlı olmayan kısımların ise glial hücre varlığından ötürü daha koyu boyandığı görülmüştür (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6** K (A), EPO (B), KH (C), KH+EPO (D) gruplarına ait GFAP preparat görüntülerinin karşılaştırılması (10X büyütme)

Oklar hasarsız alan ve hasarlı alanları göstermektedir

Hasar alanına ait yapılan 0 ve 1 düşük derece, 2 ve 3 yüksek derece skorlaması ile gruplardaki tüm GFAP preparatları skorlamaya alındı. Bu skorlama ile gruplar arasındaki GFAP skorları istatistiksel açıdan değerlendirildi (Tablo 4.3). Hasar alanına ait GFAP boyamaları nükleardır.

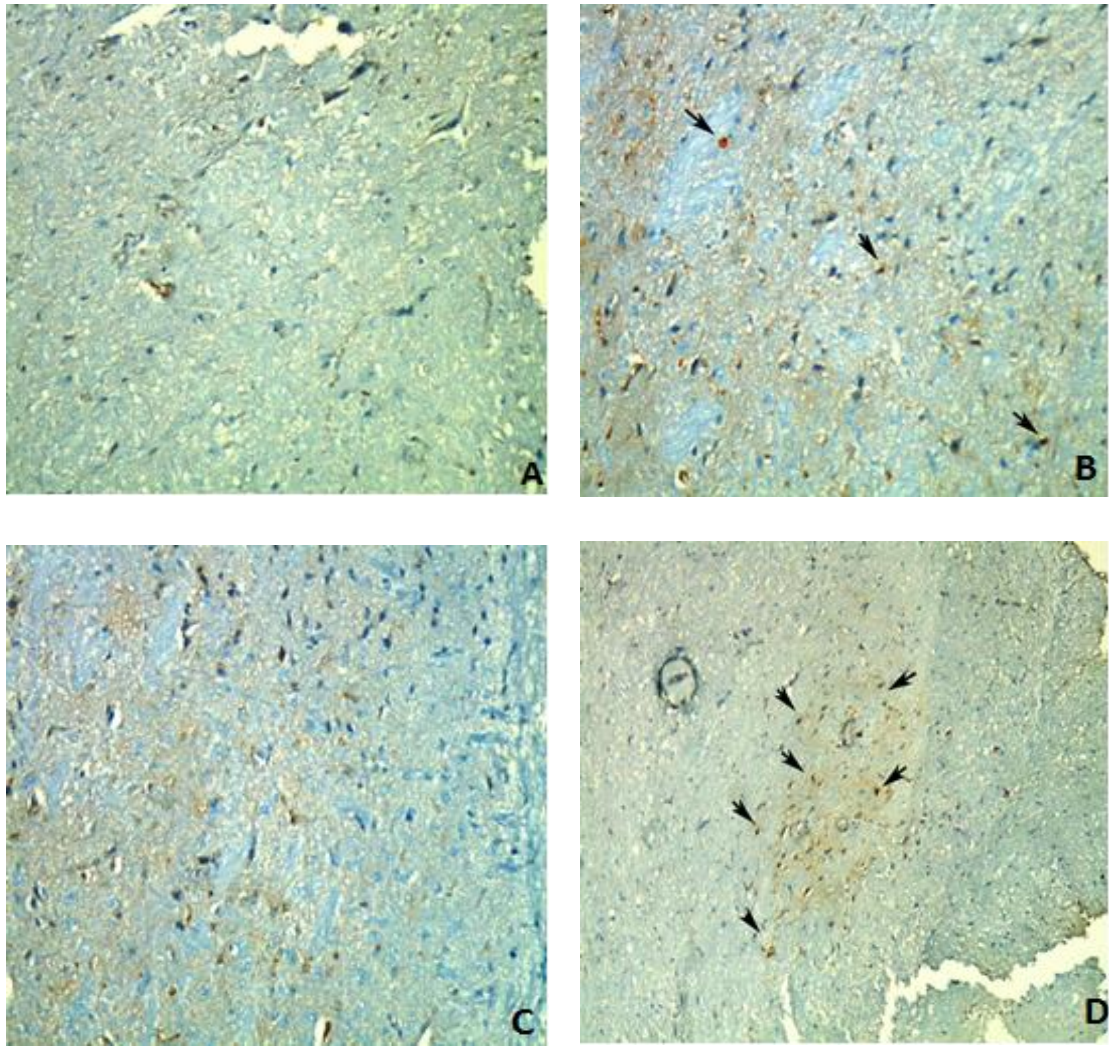
**Tablo 4.3** Gruplara ait GFAP skorumalarının karşılaştırılması

Gruplar	Skor	Düşük	Yüksek
<b>K</b>	Grup içi %	% 85,7	% 14,3
	GFAP içi %	% 37,5	% 7,7
<b>EPO</b>	Grup içi %	% 71,4	% 28,6
	GFAP içi %	% 31,3	% 15,4
<b>KH</b>	Grup içi %	% 50,0	% 50,0
	GFAP içi %	% 25,0	% 30,8
<b>KH+EPO</b>	Grup içi %	% 14,3	% 85,7
	GFAP içi %	% 6,3	% 46,2

0-1: Düşük derece boyanma, 2-3: Yüksek derece boyanma

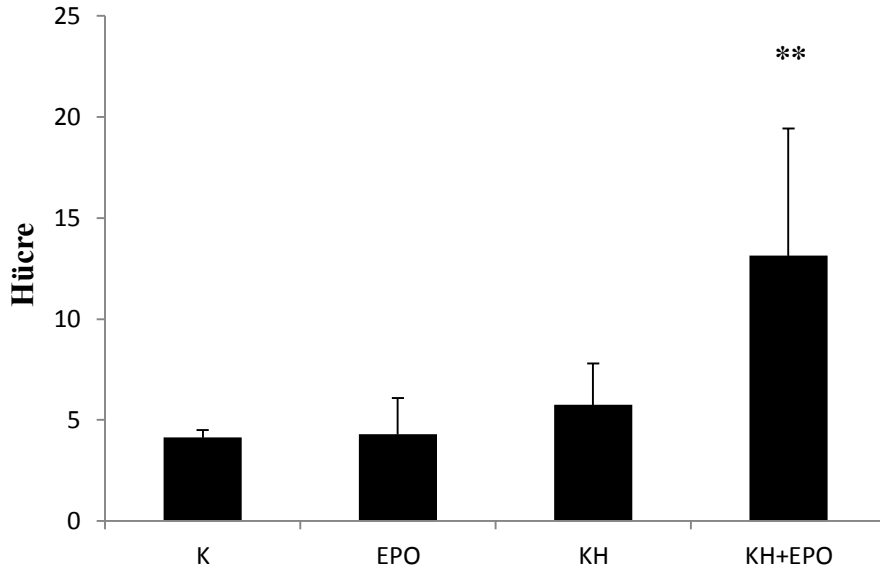
Gruplara ait GFAP boyanma skorumaları incelendiğinde yüksek derece boyanma yüzdesinin KH+EPO grubunda K grubuna göre çok daha iyi derecede olduğu bulunmuştur.

Gruplara ait Ki-67 preparatları mikroskop altında incelendiğinde hasar alanındaki hasara bağlı çoğalan hücrelerin proliferatif indeks oranları tespit edildi ve bu hücreler görüntülendi (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7** K (A), EPO (B), KH (C), KH+EPO (D) gruplarına ait Ki-67 preparat görüntülerinin karşılaştırılması (20X büyütme)  
Oklar proliferatif hücreleri göstermektedir

Hasar alanına yakın bölgelerdeki çoğalan hücreler sayılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi (Şekil 4.8).

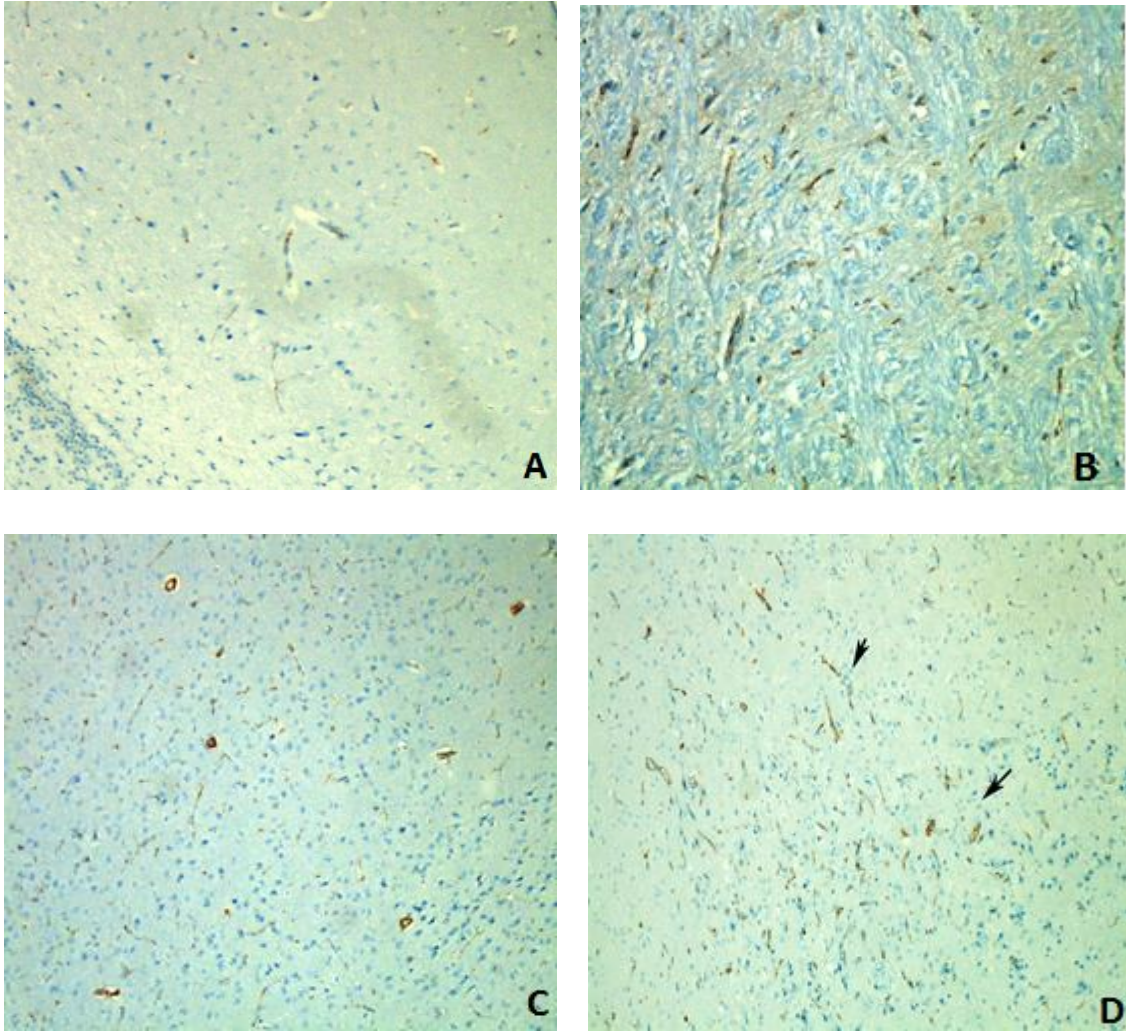


**Şekil 4.8** Gruplar arasında hasarlı alanda sayılan Ki-67 pozitif hücre Sayı ortalamalarının karşılaştırılması

\*\* : KH+EPO ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı ( $p < 0.01$ ) ifade eder (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U).

Hasar bölgesi civarında tüm gruplardaki sıçanlarda sayılan proliferatif hücre indeksi istatistiksel analizi sonucunda, KH+EPO grubunun diğer gruplarla arasında anlamlılık bulunmuştur. K grubu ve KH+EPO grubu arasında ( $p < 0.001$ ), EPO grubu ve KH+EPO grubu arasında ( $p < 0.01$ ) ve KH ve KH+EPO grubu arasında ( $p < 0.01$ ) anlamlı farklılık bulunmuştur. KH+EPO grubunda Ki-67 hücre indeksi en fazla, K grubunda ise en az olarak bulunmuştur.

Gruplara ait CD34 preparatları mikroskop altında incelendiğinde hasar alanındaki mikrodamarların yoğunluğu tespit edildi ve görüntülendi. KH+EPO grubundaki sıçanlarda hasar civarında gözlenen mikrodamar yoğunluğunun diğer gruplara göre daha fazla olduğu fakat bunun istatistiksel açıdan bir anlamı olmadığı bulundu (Şekil 4.9).

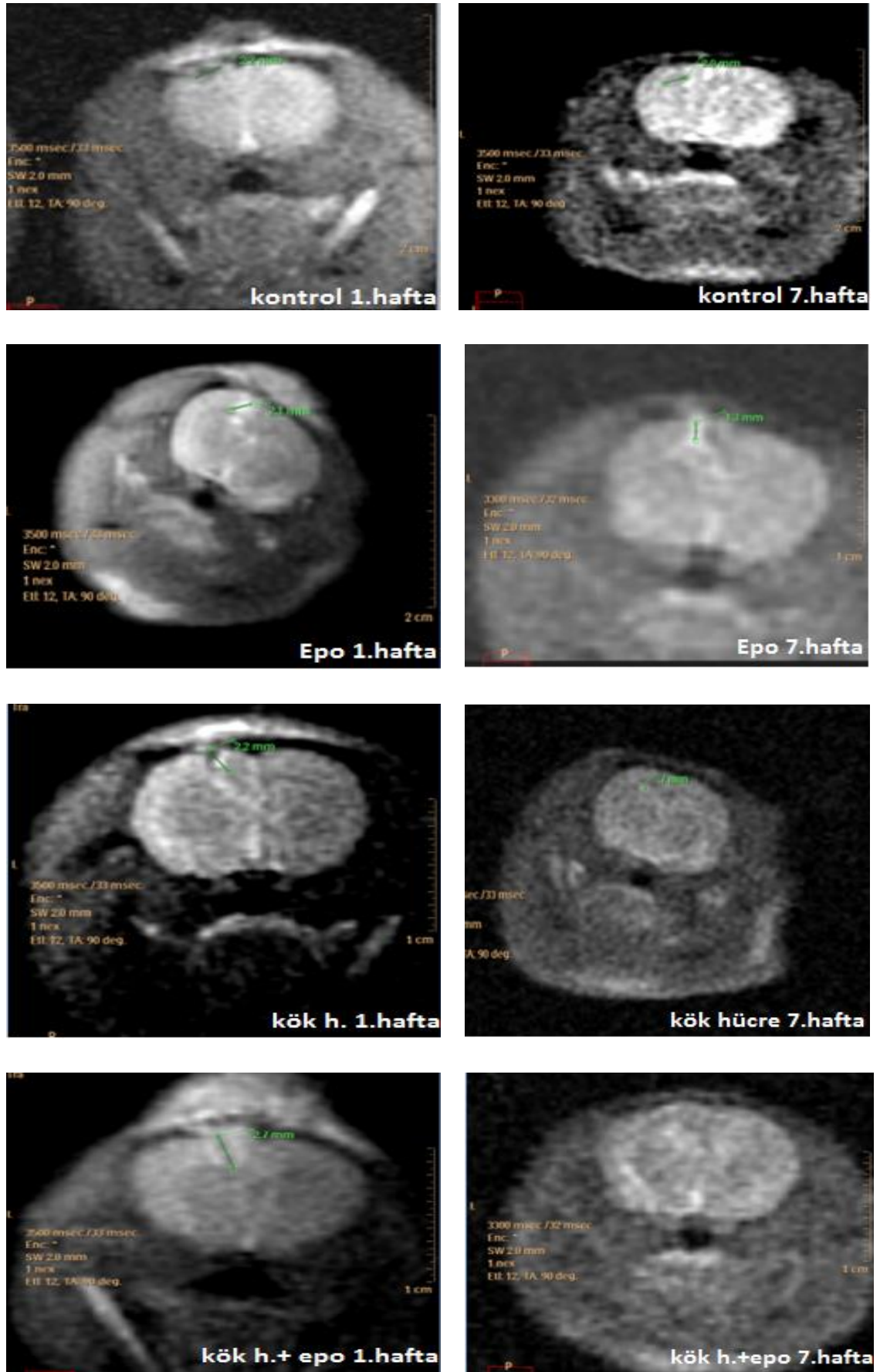


**Şekil 4.9** K (A), EPO (B), KH (C), KH+EPO (D) gruplarına ait CD34 preparat görüntülerinin karşılaştırılması (20X büyütme)

Oklar damarlanmayı göstermektedir

#### 4.4. Radyolojik Bulgular

7 haftalık deney süresinin 1., 3., 5. ve 7. haftalarında elde edilen tüm görüntüler incelendi ve MR görüntülerinde serebral patolojik sinyal alanının aksiyal kesitte en büyük uzunluğu ölçülerek kayıt edildi. Tüm grupların ilk ve son haftalarına dair görüntüleri Şekil 4.10'de verilmiştir.



Şekil 4.10 Gruplara ait 1. ve 7. hafta MR görüntülerinin karşılaştırılması

Bu ölçümlere göre verilerin istatistiksel analizi yapılarak hasar boyutunun gruplar ve haftalar arasındaki fark değerlendirilmiştir (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4** Gruplara ait hasar ölçüm karşılaştırmaları (Ort±S.S.)

Hafta Grup	K (n=7)	EPO (n=7)	KH (n=8)	KH+EPO (n=7)	p değeri
<b>1.Hafta (mm)</b>	2,04± 0,75	1,77 ± 0,45	1,74± 0,76	1,81± 0,65	>0.05
<b>3.Hafta (mm)</b>	1,94 ± 0,36 <sup>aaa,bb</sup>	1,825 ± 0,45 <sup>ccc</sup>	1,2 ± 0,32 <sup>bb</sup>	0,625 ± 0,53 <sup>aaa,ccc</sup>	<0.001
<b>5.Hafta (mm)</b>	1,57 ± 0,98 <sup>aa</sup>	1,525 ± 0,72 <sup>bb</sup>	0,65 ± 0,7	0,11 ± 0,3 <sup>aa,bb</sup>	<0.01
<b>7.Hafta (mm)</b>	1,72± 0,22 <sup>aa,bb,cc</sup>	0,36 ± 0,61 <sup>aa</sup>	0,71 ± 0,66 <sup>bb</sup>	0,11± 0,3 <sup>cc</sup>	<0.01

p: Çoklu gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

<sup>aa,bb,cc,dd</sup>: Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki fark istatistiksel olarak  $p<0.01$  düzeyinde anlamlıdır (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U).

<sup>aaa,bbb,ccc</sup>: Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki fark istatistiksel olarak  $p<0.001$  düzeyinde anlamlıdır (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U).

Hasar ölçümlerinin 1. haftasında; gruplar arası yapılan karşılaştırmada istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır.

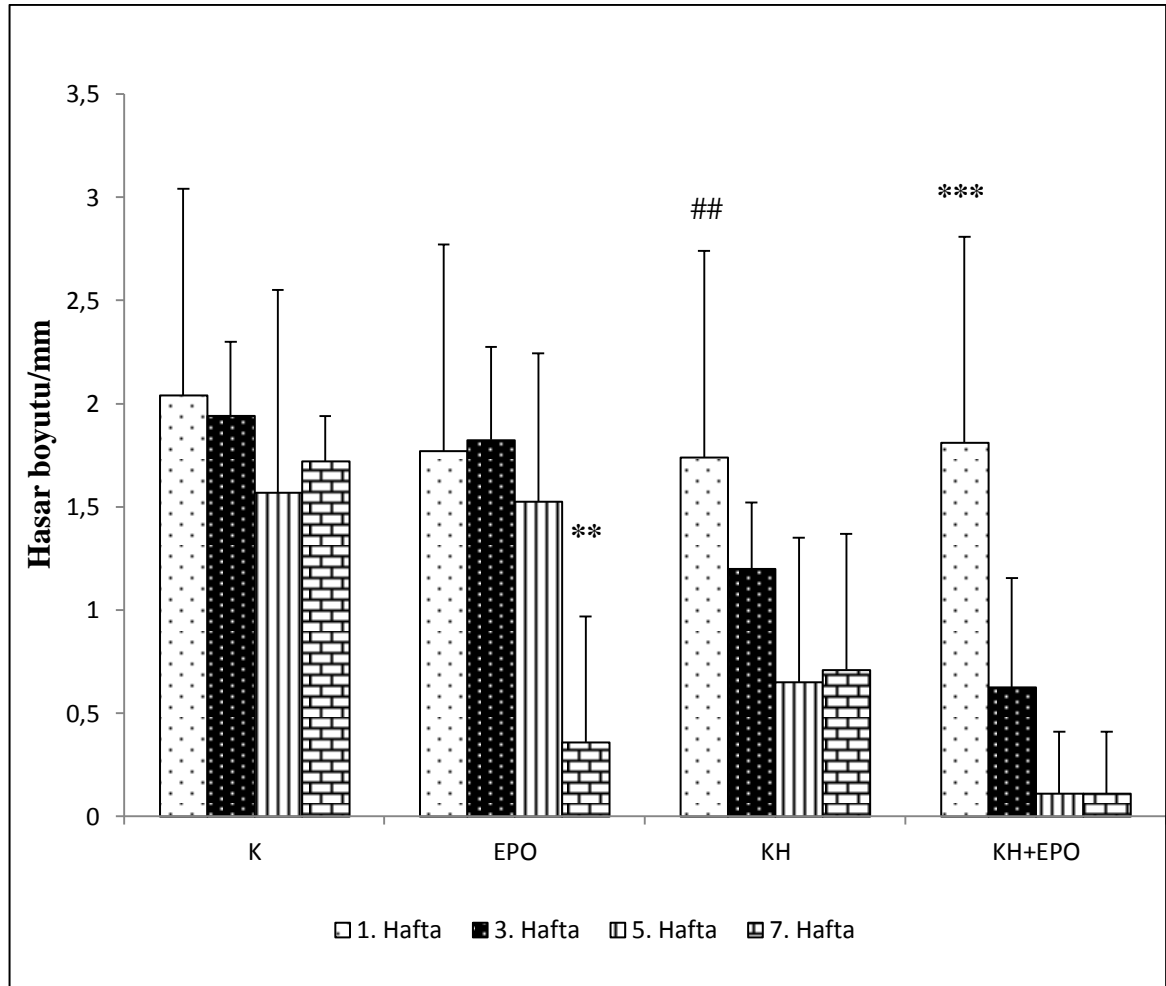
Hasar ölçümlerinin 3. haftasında; K grubu ile KH grubu arasında ( $p<0.01$ ), K grubu ile KH+EPO grubu arasında ( $p<0.001$ ), EPO grubu ile KH+EPO grubu arasında ( $p<0.001$ ) istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur. Bu sonuçlara göre KH+EPO grubuna ait hasar ölçümleri en düşük, K grubuna ait hasar ölçümleri en fazla olarak bulunmuştur.

Hasar ölçümlerinin 5. haftasında; K grubu ile KH+EPO grubu arasında ( $p<0.01$ ), EPO grubu ile KH+EPO grubu arasında ( $p<0.01$ ) istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur.

Hasar ölçümlerinin 7. haftasında; K grubu ile EPO grubu arasında ( $p<0.01$ ), K grubu ile KH grubu arasında ( $p<0.01$ ), K grubu ile KH+EPO grubu arasında ( $p<0.01$ ) istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur.



Haftalar arasındaki ölçüm değerleri (Şekil 4.11) incelendiğinde K grubunda farklılık bulunmamıştır. EPO grubunda 1. hafta-7. hafta, 3. hafta -7. Hafta, 5. hafta -7. hafta arasında fark bulunmuştur ( $p<0.01$ ). KH grubunda 1. hafta -5. hafta, 1. hafta-7. hafta arasında fark bulunmuştur ( $p<0.01$ ). KH+EPO grubunda 1. hafta-3. hafta, 1. hafta -5. hafta, 1. hafta-7. hafta arasında fark bulunmuştur ( $p<0.001$ ).



**Şekil 4.11** Grup içinde, 1, 3, 5, ve 7. haftalarda hasar boyutu karşılaştırması

\*\* : 7 ile 1, 3, 5. haftalar arasındaki anlamlılığı ( $p<0.01$ ) ifade eder (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U).

## : 1 ile 5. ve 7. haftalar arasındaki anlamlılığı ( $p<0.01$ ) ifade eder (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U).

\*\*\* : 1 ile 3, 5, 7. haftalar arasındaki anlamlılığı ( $p<0.001$ ) ifade eder (Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U).

## 5. TARTIŞMA

Travmatik beyin hasarının iyileşme mekanizmaları tam olarak bilinmese de bazı teoriler yaygın olarak kabul görmektedir. Bunların en önemlisi nöronal rejenerasyon ve reorganizasyon ile açıklanan beyin plastisitesidir. Bunu açıklamada, nöronal filizlenme ve yeni nöronal bağlantıların oluşumu, sessiz olan bazı alanların işlev kazanması, yerine geçme, reseptör duyarlılığındaki değişimlerden yararlanılmaktadır (Greenwald vd 2003).

Yapılan literatür taramasında TBH üzerine kök hücrelerle birlikte farmakolojik bir ajan olan EPO'nun birlikte kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu anlamda kök hücreler ile birlikte TBH ile ortaya çıkan glukoz yoksunluğu ve hipoksinin indüklediği hücre ölümünde nöronları koruduğu, eritroid öncül hücrelerin farklı tür hücrelere dönüşümüne etki ettiği ve bu hücrelerin hayatta kalmalarını sağlamaları yanında bu hücrelerin apoptozisini önlediği düşünülen EPO'nin kullanıldığı bu çalışma literatürde bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu çalışmamızın sonucunda KH+EPO'nin travmatik beyin hasarı oluşturduğumuz sıçanlara verilmesi ile K grubuna göre hasar boyutunda azalma ve nörolojik fonksiyonlarda iyileşme çift yönlü eğik düzlem testi ile görülmüştür.

Yapılmış olan bazı çalışmalar ile travmatik beyin hasarı sonrası nörolojik fonksiyon ve hasar boyutu üzerine olan iyileşmenin derecesi çeşitli tedavi ajanları (EPO, nimodipin, simvastatin) kullanılarak ve hasar boyutu ve motor fonksiyonlar açısından pozitif yönde elde edilen verilerle sonuç gösterilmiştir (Neelima ve Chauhan 2010, Düz 2011, Watanabe vd 2013).

Çalışmamızda motor koordinasyon ve performansın ölçümü amacıyla kullandığımız çift yönlü eğik düzlem testi, travmatik beyin hasarından bir hafta önce tüm sıçanlara alıştırmaya amacıyla yapılmıştır. Yedi haftalık deney süresinin her haftası boyunca da haftalık değişimin değerlendirilmesi amacıyla tüm sıçanlar tekrar teste tabi tutulmuştur. Deney süresi sonunda 1. hafta ölçümleri istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde anlamlı fark bulunmamıştır. Bunun nedeninin hasarın henüz çok yeni olması ve tedavi amaçlı verilen kök hücre ve EPO'nin etkisini göstermeleri için gerekli sürenin yetersiz olabileceği şeklinde yorumlayabiliriz. Kök hücre ile yapılan benzer çalışmalarda da ilk

hafta, değerlendirilebilir bir sonuç alınamamıştır. Bundan sonraki haftalarda ölçümler değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın anlam kazandığı görülmüştür. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda K grubuna göre KH+EPO, KH ve EPO gruplarındaki eğik düzlem ortalama sonuçları daha yüksek çıkmıştır. Aynı şekilde KH+EPO grubu ile KH ve EPO grupları arasında da eğik düzlem ortalamaları açısından farklılık çıkmıştır. Buradan elde ettiğimiz veriler KH+EPO uygulamasının sıçanların eğik düzlem sonuçlarına ve nörolojik performansa etkisinin daha iyi olduğunu göstermektedir.

Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda kök hücreler kullanılarak bu hücrelerin motor performans üzerinde yaptığı etkileri araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır (Lu vd 2002, Gordon vd 2006, Paula vd 2009, Düz 2011, Zanier vd 2011). Birkaç çalışmada beyin hasarı yapılmış sıçanlara kök hücre verildiğinde bu hücrelerin sıçan serebral dokusuna geçtiği ve fonksiyonel olarak motor performansta iyileşmenin olduğu gösterilmiştir (Marti vd 2000, Juul vd 2001, Kumral vd 2005). Bizim çalışmamızda TBH sonrası sadece kök hücre verdiğimiz gruptaki sıçanların motor performanslarında K grubuna göre anlamlı bir iyileşme görülmüştür.

EPO'nin de tek başına motor performans üzerine olumlu etki ettiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur (Anderson vd 2013, Schober vd 2013, Gaddam vd 2013). Ninga ve ark. yaptığı bir çalışmada sıçanlarda oluşturulan travmatik beyin hasarı sonrası EPO'nin uzun süreli hem duysal hem de zihinsel iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir (Ninga vd 2011). Bizim çalışmamızda TBH sonrası sadece EPO verdiğimiz gruptaki sıçanların motor performanslarında K grubuna göre anlamlı bir iyileşme görülmüştür. Bu bilgiler ışığında KH ve EPO'nin ayrı ayrı nörolojik fonksiyonlar üzerinde etkili bir iyileşme gösterdiklerini KH ve EPO grubunun K grubuna göre daha iyi sonuçlar vermesine dayanarak söyleyebiliriz.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda motor koordinasyon ve performansın ölçümü amacıyla kullandığımız diğer bir test olan rotarod testi, eğik düzlem testi gibi cerrahi işleminden bir hafta önce sıçanlara uygulanmış ve sıçanlara en az 180 saniye boyunca dönen mil üzerinde yürüme öğretilmiştir. Yedi haftalık deney süresinin her haftası boyunca da haftalık değişimin değerlendirilmesi amacıyla tüm sıçanlar tekrar teste tabi tutulmuştur. İstatistiksel açıdan yapılan değerlendirmede gruplar arasındaki rotarod ortalamaları arasında anlamlı farklılık çıkmamıştır. Matthew ve ark. yaptığı çalışmada TBH oluşturdukları sıçanlara kök hücre verdiklerinde rotarod performans test sonuçları

açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olduğu gösterilmiştir (Matthew vd 2009). Farklı çalışmalarda TBH'li sıçanlarda nörolojik fonksiyon değerlendirmesi için kullanılan rotarod sonuçlarında bizim sonucumuzdan farklı olarak iyileşme yönünde gruplar arasında fark olduğu gösterilmiştir (Düz 2011, Yu vd 2012, Samini vd 2013). Bunun nedeninin hasar modelinin farklılığı, hasarın derecesi ve boyutu olabileceğini düşünmekteyiz. Bunun yanında rotarod testinde sıçanların motor performanslarında meydana gelen güçsüzlük sıçanların mil üzerinde dönmelerine engel olacak kadar yetersiz değildir diyebiliriz.

Çalışmamızda kullandığımız motor performans testleri olan rotarod ve eğik düzlem testlerinde farklı sonuçlar elde etmemizin nedeni bizce yapmış olduğumuz hasarın minör derecede olmasıdır. Rotarodun majör travmatik beyin hasarlarında anlamlı sonuçlar vermesi bizim çalışmamızdaki farkı açıklayabilir. TBH'li sıçan rotarod üzerinde yürümeye çalışırken hasarını ön ayaklarını kullanarak kompanse ediyor olabilir fakat eğik düzlemde durmaya çalışan rat arka ayaklarındaki hasarı eğik düzlem üzerinden düşmemek için ön ayaklarını devreye sokarak kompanse edemez çünkü eğik düzlem üzerinde hareket kabiliyeti kısıtlıdır şeklinde yorumlayabiliriz.

Çalışmamızda TBH'nin iyileşme derecesini gösterebilme adına yaptığımız histopatolojik değerlendirmede kullandığımız boyamadan biri GFAP'dır. GFAP bize astrosit farklılaşmasını göstermektedir. GFAP proteininin ekspresyonunun başlaması astrosit farklılaşmasında anahtar rol oynamaktadır. Travmatik beyin hasarı sonrasında GFAP'ın arttığı bilinmektedir (Duman ve Yılmaz 2008). Hasar alanına ait yapılan 0 ve 1 düşük derece, 2 ve 3 yüksek derece skorlaması ile gruplardaki tüm GFAP preparatları skorlamaya alındı. Bu skorlama ile gruplar arasındaki GFAP skorları istatistiksel açıdan değerlendirildi. Gruplara ait GFAP boyanma skorlama verileri incelendiğinde yüksek derece boyanma yüzdesinin KH+EPO grubunda K grubuna göre çok daha iyi derecede olduğu bulunmuştur. Lee ve ark. yaptığı çalışmada GFAP incelemesi morfolojik olarak, Glushakov ve ark. yaptığı çalışmada ise işaretli GFAP antikoru verilip işaretli hücreler sayılarak skorlamalar yapılmış ve kök hücrelerin motor performans üzerinde olumlu yönde etkisinin olduğu gösterilmiştir (Lee vd 2009, Glushakov vd 2013). Kök hücrelerin mikrogliya ve makrofaj tipi hücrelere dönüşebildiği ve glial skar dokusunun inhibisyonunu sağlayarak serebral dokunun yapılanmasında nörotrofik faktörlerin artırılması ile serebral dokunun yapılanmasını sağladığı, nöral kök hücrelerin

proliferasyonunu arttırdığı bildirilmektedir (Gordon vd 2006, Paula vd 2009, Layla vd 2011).

Bunun yanında EPO ile yapılan çalışmalarda TBH dahil birçok merkezi sinir sistemi hastalıklarında nöral koruyucu olduğu, reaktif oksijen molekülleri ve glutamatın üretimini sınırlandırarak, apoptozu azaltarak, inflamasyonu düzenleyerek ve nöroprotektif etki gösterdiği bilinmektedir (Genc vd 2004, Lucido vd 2013).

Bizim çalışmamızda KH+EPO grubundaki GFAP boyanma oranı K grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Skorumla sonucunda şiddetli boyanma skorunu alan tek grup KH+EPO grubudur. Tek başına EPO ve KH verilen gruptaki boyanma skorlamasında ise KH skoru EPO skoruna göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu bilgiler ışığında tedavi amaçlı verdiğimiz kök hücrelerin hasar alanındaki iyileştirici etkisinin EPO tarafından desteklendiği ve ortaya tek tek kullanımlarına göre daha pozitif bir etkinin ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda TBH'nin iyileşme derecesini gösterebilme adına yaptığımız histopatolojik değerlendirmede kullandığımız antikordardan biri de Ki-67'dir. Proliferatif indeksi göstermek amacıyla kullanılan bu antikor, hücrelerin onarımı sırasında salgılanır (Sezgin vd 2003, Rola vd 2004). Gruplara ait Ki-67 preparatları mikroskop altında incelendiğinde hasar alanındaki hasara bağlı çoğalan hücrelerin istatistiksel değerlendirmesi sonucunda gruplar arasında anlamlılık bulunmuştur. Bu anlamlılığı oluşturan ikili gruplar; K grubu ve KH+EPO grubu, EPO grubu ve KH+EPO grubu, KH ve KH+EPO grubu olarak tespit edilmiştir. Fakat bu anlamlılık en yüksek K ve KH+EPO grupları arasında çıkmıştır. KH ve EPO'nin tek tek verildiği tedavi grupları arasında K grubuna göre çoğalan hücre sayısı anlamlı olmasa da bir artış göstermiştir.

Dışarıdan verilen EPO'nin beyinde iskemik alanları, endotelyal koruma sağlayarak ve farklılaşma sonucu oluşan kök hücrelerin apoptotik ölümünü engelleyerek azalttığı tespit edilmiştir (Ghezzi ve Brines 2006). Nöronal EPO-R aktivasyonu, NMDA indüksiyonu veya JAK-2 ve NFκB arasındaki etkileşimin tetiklenmesiyle açığa çıkan NO aracılığıyla olan apoptozdan koruma sağlar (Genc vd 2004).

Kök hücrelerin hasarlı lezyon alanına transplante edildiğinde oligodendrisit ve astrositlere farklılaşma olabildiği ve aksonlarda yenilenme ile hasarlı aksonlarda

remiyelinizasyon yapabildiği belirtilmiştir (Ishii vd 2001, Dezawa 2002, Nakamura ve Toyama 2003, Nishio vd 2006).

EPO ve kök hücrelerin omurilik kesisi yapılan sıçanlardaki motor koordinasyon, performans, hafıza ve bellekteki olası düzelmeyi ölçebilme adına yapılan bir çalışmada EPO ve kök hücre verilen grubun tek tek verildikleri gruplar ve kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda, KH+EPO grubundan alınan sonuçların diğer gruplara göre anlamlı olarak farklı olduğu gösterilmiştir (Kızılay 2010). Kızılay'ın çalışmasında omurilik kesisi yapılan sıçanlardaki sonuçlarına benzer şekilde, bizim araştırmamızda da TBH sonrası sıçanlarda KH+EPO kombinasyonunun iyileşme üzerine etkisi daha fazla bulunmuştur. Bu veriler üzerinden EPO'nin nöronal kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasının kontrolünde rol sahibi olabileceği ve farklılaşma sonucu oluşan kök hücrelerin apoptoz sürecine engel olarak ve hayatta kalmalarına destek olarak iyileşme derecesini arttırmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada TBH'nin iyileşme derecesini gösterebilme adına kullandığımız diğer bir histopatolojik antikor CD34'tür. CD34, lezyonlardaki artmış mikrodamar yoğunluğunun tespiti için kullanılan bir antikordur (Erdoğan vd 2010, Lia vd 2012). Gruplara ait CD34 preparatları mikroskop altında incelendiğinde hasar alanındaki mikrodamar yoğunluğunun K grubu ile kıyaslandığında morfolojik olarak en fazla KH+EPO grubuna ait olduğu görülmüştür. KH grubunda mikrodamar yoğunluğunun yaklaşık olarak EPO ile aynı olduğunu fakat her iki gruptaki mikrodamar yoğunluğu morfolojik açıdan değerlendirildiğinde K grubuna göre daha fazla olduğunu söyleyebiliriz.

Yapılan literatür taramasında TBH'da KH+EPO'nin tedavi ajanı olarak kullanılması ile mikrodamar yoğunluğunun gösterildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu veriler bize yeni nöron oluşumunu tetikleyerek hasar bölgesindeki doku iyileşmesini sağlayan kök hücrelere, yeni damar formasyonu ile hedef hücrenin oksijen alımını ve beyinde iskemik alanın sınır bölgesinde kan akımını ve doku oksijenizasyonunu arttıran EPO'nin destek sağladığını göstermektedir. Hasar bölgesinde hayatta kalmaya çalışan yeni nöronal hücrelerin ihtiyacı olan oksijen ve besin EPO'nin mikrodamar oluşumunu tetiklemesi ile sağlanmaktadır diye düşünmekteyiz. EPO'nun kök hücrelere sağladığı destek ile kök hücrelerin büyüme ve farklılaşması hasarlı bölgede iyileşmeye giden

süreç hasar bölgesine doğru olan mikrodamar oluşumuna dolaylı yoldan fayda sağlıyor diye düşünmekteyiz.

Çalışmamızda TBH'nin iyileşme derecesini gösterebilme adına yaptığımız histopatolojik değerlendirmede kullandığımız antikorlardan biri de S100'dür. S100 proteini hasar sonrası ortaya çıkan ve nöronların hayatta kalmasını sağlayan bir beyin hasarı belirteçidir. Hasar sonrası prognozu tahmin etmeye yönelik kullanılır (Duman ve Yılmaz 2008). Çalışmamızda hasar sonrası ortaya çıkan S100'ün hasarın iyileşmesi yönündeki boyanma oranına bakılmıştır. Çalışmamızda S100'e bakmamızın nedeni S100'ün hasarlı bölgede bulunma süresinin kök hücre kaynaklı bir değişime uğrayıp uğramayacağıydı. Fakat gruplara ait S100 preparatları mikroskop altında incelendiğinde morfolojik açıdan K, EPO, KH ve KH+EPO grupları arasında fark ifade edebilecek bir görüntüye rastlanmamıştır. S100'ün 60 dakikalık bir yarı ömrü vardır, hızlı ve geçici bir artış gösterir (Duman ve Yılmaz 2008). Bizim çalışmamızda da bu nedenden ötürü bir farkın olmadığını düşünmekteyiz. Çünkü S100 hasar iyileşmesi boyunca değil hasarın başladıktan kısa bir süre içinde sentez edilir. Deney süresinin daha erken dönemlerinde S100'e bakılmasının, S100 açısından değerlendirilebilir bir sonuç elde edilebileceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızda 1., 3., 5. ve 7. haftalarda sıçanların çekilen MR görüntülerinde hasar boyutunun ölçümü yapılmıştır. Bu ölçüm, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen, Solid Tümörlerde Yanıt Değerlendirme Kriterleri (RECIST) baz alınarak yapılmıştır. Bu ölçümde MR ya da başka tür görüntüleme yöntemleri ile elde edilmiş tümör, lezyon, hasar ölçümleri, ölçülebilen lezyonlar başlığı altında en büyük çap alınarak hesaplanmaktadır (Eisenhauer vd 2009, Coche 2013). Biz de çalışmamızda bu kriterleri kullanarak hasarın en uzun çapını hesaplayarak istatistiksel açıdan değerlendirdik. Bu değerlendirme sonucunda haftalar arasındaki ve gruplar arasındaki ölçüm değerleri incelendiğinde kontrol grubunda farklılık bulunmamıştır.

Gruplar arasındaki K grubu hariç, farkın 3., 5. ve 7. haftalarda K grubu ile KH+EPO grubunda anlamlı olarak devam ettiği, 3. haftaki ölçümlerde K ile KH grubu, EPO ile KH+EPO grubu arasında, 5. haftaki ölçümlerde EPO ile KH+EPO grubu arasında, 7. haftaki ölçümlerde K ile KH ve K ile EPO arasında anlamlı fark bulunmuştur. Bu haftalar içinde en anlamlı fark K ile KH+EPO grubu arasındadır. Yani KH+EPO grubuna ait sıçanlarda hasar alanının boyutu diğer gruplara göre azalmıştır.

Yapılan literatür taramasında RECİST kriterleri kullanılarak TBH ölçümü yapılan başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konuda TBH oluşturulmuş sıçanlarda verilen işaretli kök hücrelerin hasar alanına göç ettiğini gösteren bir takım çalışmalar mevcuttur (Delcroix vd 2009, Hung vd 2010, Guo vd 2012). Bu çalışma sonuçlarının iyileşme yönünde pozitif bir etki gösterdiği ve çalışmamızla uyumlu olduğu görülmüştür. Yapmış olduğumuz çalışmamızda kullandığımız MR cihazının çözünürlük ve duyarlılığının düşük olması hasar ölçümlerinin yeterli hassasiyette olmasına neden olmuştur. Bu anlamda çözünürlük ve hassasiyetin daha yüksek olduğu bir MR cihazının kullanılması ölçümlerin daha duyarlı yapılması adına oldukça önemlidir. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda KH+EPO'nin yapılan hasar ölçüm sonuçlarına göre hasar iyileşmesi üzerine olumlu etki gösteren bir kombinasyon olduğunu söyleyebiliriz.



## 6. SONUÇ

Bu araştırmamızda;

1. Eğik düzlem sonuçlarının 7 haftalık ölçümleri incelendiğinde 1. hafta ölçümlerinde 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. 2., 3., 4., 5., 6., 7. hafta ölçümleri incelendiğinde 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Gruplar arasındaki bu fark tedavi gruplarında kullanılan kök hücre ve EPO'nin motor performans üzerine olan olumlu etkilerine bağlı olarak gerçekleşmiştir diyebiliriz. İstatistiki değerlendirmede farkların 1. hafta hariç diğer tüm haftalarda oluştuğu ikili grubun K ile KH + EPO grubu olması, iki tedavi ajanının kombinasyonunun iyileşme anlamındaki olumlu etkisinin daha fazla olduğunu göstermiştir diyebiliriz.

2. Yedi haftalık deney süresince deneklerin lokomotor sistemlerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi sonucunda hem gruplar hem de haftalar arasındaki ölçümler arasında farklılık bulunmamıştır. Bu verilere dayanarak uygulamış olduğumuz kök hücre ve eritropoetinin hem ayrı ayrı hem de birlikte verilmesinin arka ayak hareketlerine bir etkisinin olmadığını söyleyebiliriz. Bunun nedeni olarak dönen mil üzerinde yürümeye çalışan sıçanlar arka ayak hareketlerinde her ne kadar bir güçsüzlük olsa da bunu ön ayaklarını kullanarak telafi ediyor olabilir diyebiliriz.

3. Gruplara ait GFAP preparatları mikroskop altında incelendiğinde yüksek derece boyanma yüzdesinin KH+EPO grubunda K grubuna göre çok daha iyi derecede olduğu bulunmuştur. Bu verilere dayanarak tedavi amaçlı uygulamış olduğumuz KH+EPO kombinasyonunun iyileşme üzerindeki olumlu etkisini GFAP boyaması ile göstermiş bulunmaktayız.

4. Gruplara ait Ki-67 boyamaları mikroskop altında incelendiğinde hasar alanındaki hasara bağlı çoğalan hücrelerin proliferatif indeksleri tespit edildiğinde ve hasar bölgesi civarında tüm gruplardaki sıçanlarda sayılan proliferatif hücre sayısının istatistiksel analizi yapıldığında KH+EPO grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel anlamda farklılık bulundu. Bu verilere dayanarak KH+EPO kombinasyonunun hasar alanında yeni hücrelerin oluşumunu tetiklediği ve iyileşmeyi arttırdığı söylenebilir.

5. Gruplara ait CD34+ preparatları mikroskop altında incelendiğinde hasar alanındaki mikrodamarların yoğunluğu morfolojik açıdan değerlendirildiğinde KH+EPO grubundaki sıçanlarda hasar civarında gözlenen mikrodamar yoğunluğunun diğer gruplara göre daha fazla olduğu tespit edildi. KH ve EPO'nin birlikte, ayrı ayrı uygulanmalarına göre mikrodamar oluşumunu daha fazla arttırdığını söyleyebiliriz.

6. Yedi haftalık deney süresinin 1., 3., 5. ve 7. haftalarında elde edilen tüm MR görüntülerinde KH+EPO grubuna ait hasar alanlarında ilk haftadan son haftaya doğru ciddi bir azalma saptanmıştır. Bu veriler bize KH+EPO kombinasyonunun nöronal iyileşmeyi sağladığı, yeni hücre oluşumunu tetiklediği ve hasarı iyileştirici yönde etki ettiğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Aarabi, B. (2003) Management of Missile Head Wounds. *Neurosurg. Quarterly*, 13 (2): 87-104.
- Acs, G., Xu, X., Chu, C., Acs, P., and Verma, A. (2004) Prognostic Significance of Erythropoietin Expression In Human Endometrial Carcinoma. *Cancer*, 100 (11): 2376-2386.
- Anderberg, L., Aldskogius, H., and Holtz, A. (2007) Spinal Cord Injury-Scientific Challenges Fort He Unknow Future. *Upsala J. Med. Sci.*, 3 (112): 259-288.
- Anderson, G. D., Peterson, T. C., Haar, C. V., Kantor, E. D., Farin, F. M., Bammler, T. K., Macdonald, J. W., and Hoane, M. R. (2013) Comparison of The Effects of Erythropoietin And Anakinra On Functional Recovery And Gene Expression In A Traumatic Brain Injury Model. *Front. Pharmacol.*, 4 (129): 1-14.
- Arcasoy, M. O. (2008) The Non-Haematopoietic Biological Effects of Erythropoietin. *Br. J. Haematol.*, 141 (1): 14-31.
- Bakir, A., Temiz, C., Umur, S., Aydin, V., and Torun, F. (2005) High-Velocity Gunshot Wounds To The Head: Analysis of 135 Patients. *Neurol. Med. Chir.*, 45 (6): 281-287.
- Baytur Bülbül, Y., and Şen, C. (2004) Kordon Kanı Bankacılığı: Neden, Kime, Nasıl?. *Perinatoloji Dergisi*, 12 (1): 1-10.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P. G. (2001) Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology And Potential Applications. *Stem Cells*, 19 (3): 180-192.
- Blumenthal, I. (2002) Shaken Baby Syndrome. *Postgrad. Med. J.*, 78 (926): 732-735.
- Bogner, J. A., Corrigan, J. D., Mysiw, W. J., Clinchot, D., and Fugate, L. (2001) A Comparison of Substance Abuse And Violence In The Prediction of Long-Term Rehabilitation Outcomes After Traumatic Brain Injury. *Phys. Med. Rehabil.*, 82 (5): 571-577.
- Bontke, C. F., and Boake, C. (1991) Traumatic brain injury rehabilitation. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 2 (2): 473-482.
- Brines, M., and Cerami, A. (2005) Emerging Biological Roles for Erythropoietin In The Nervous System. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6 (6): 484-94.
- Cariou, A., André, S., and Claessens, Y. E. (2008) Extra-Hematopoietic Effects of Erythropoietin. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.*, 8 (3): 173-178.
- Cheung, J. Y., Zhang, X. Q., Bokvist, K., Tillotson, D. L., and Miller, B. A. (1997) Modulation of Calcium Channels In Human Erythroblasts By Erythropoietin. *Blood*, 89 (1): 92-100.
- Coche, E. (2013) Recist And Beyond. *JBR-BTR*, 96 (3): 167-171.

- Corrigan, J. D., and Deming, R. (1995) Psychometric Characteristics of The Community Integration Questionnaire: Replication And Extension. *J. Head Trauma Rehabil.*, 10 (4): 41-53.
- Couban, S., Simpson, D. R., Barnett, M. J., Bredeson, C., Hubesch, L., Howson-Jan, K., Shore, T. B., Walker, I. R., Browett, P., Messner, H. A., Panzarella, T., and Lipton, J. H. (2002) A Randomized Multicenter Comparison of Bone Marrow And Peripheral Blood In Recipients of Matched Sibling Allogeneic Transplants for Myeloid Malignancies. *Blood*, 100 (5): 1525-1531.
- Czosnyka, M., Smielewski, P., Piechnik, S., Steiner, L., and Pickard, J. (2001) Cerebral Autoregulation Following Head Injury. *J. Neurosurg.*, 95 (5): 756-763.
- Dawodu, S. T. (2008) Traumatic Brain Injury: Definition, Epidemiology, Pathophysiology. *Med. J.*, 17 (1): 46-57.
- Deans, R. J., and Moseley, A. B. (2000) Mesenchymal Stem Cells: Biology And Potential Clinical Uses. *Exp. Hematol.*, 28 (8): 875-84.
- Delcroix, G. J. R., Jacquarta, M., Lemairea, L., Sindjia, L., Franconic, F., Jeunea, J. J. L., and Montero-Menei, C. (2009) Mesenchymal And Neural Stem Cells Labeled With Hedp-Coated Spio Nanoparticles: In Vitro Characterization And Migration Potential In Rat Brain. *Brain Res.*, 1255 (19): 18-31.
- Dezawa, M. (2002) Central And Peripheral Nerve Regeneration By Transplantation Of Schwann Cells And Transdifferentiated Bone Marrow Stromal Cells. *Anat. Sci. Int.*, 77 (1): 12-25.
- D'ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., and Howard, G. A. (1999) Age-Related Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Stem Cells From Human Vertebral Bone Marrow. *J. Bone Miner. Res.*, 14 (7): 1115-1122.
- Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., and Prockop, D. J. (1999) Propagation And Senescence of Human Marrow Stromal Cells In Culture: A Simple Colony-Forming Assay Identifies Samples With The Greatest Potential To Propagate And Differentiate. *Br. J. Haematol.*, 107 (2): 275-281.
- Dikmen, S. S., Machamer, J. E., Powell, J. M., and Temkin, N. R. (2003) Outcome 3 to 5 years after moderate to severe traumatic brain injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 84 (10): 1449-1457.
- Divoky, V., Liu, Z., Ryan, T. M., Prchal, J. F., Townes, T. M., and Prchal, J. T. (2001) Mouse Model of Congenital Polycythemia: Homologous Replacement of Murine Gene By Mutant Human Erythropoietin Receptor Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 98 (3): 986-991.
- Duman, C., and Yilmaz, S. (2008) Traumatic Brain Injury Markers. *J. Turkish Clin. Bio.*, 6 (1): 33-41.
- Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., and Hurlbert, J. (2001) Acute Spinal Cord Injury, Part I: Pathophysiology Mechanisms. *Clin. Neuropharmacology.*, 24 (5): 254-264.

- Düz, E. (2011) The Effects Of Nimodipine And Human Umbilical Cord Blood Derived CD34+ Stem Cell Transplantation On The Structure And Functions of Central Nervous System: An Experimental Study, Uzmanlık Tezi, **Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Denizli, 87s.
- Eisenhauer, E. A., Therasseb, P., Bogaertsc, J., Schwartzd, L. H., Sargente, D., Fordf, R. J., Arbuckh, S., Gwytheri, S., Mooneyg, M., Rubinsteing, L., Shankarg, L., Doddg, L., Kaplanj, R., Lacombec, D., and Verweijk, J. (2009) New response evaluation criteria in solid tumours. **Eur. J. Cancer.**, 45 (2): 228-247.
- Erdogan, E., Izci, Y., Gonul, E., and Timurkaynak, E. (2004) Ventricular Injury Following Cranial Gunshot Wounds: Clinical Study. **Mil. Med.**, 169 (9): 691-695.
- Erdoğan, N., Dengizmen, A., Akyıldız İğdem, A., Şahan, E., and Seza Tetikkurt, Ü. (2010) Angiogenesis In Breast Cancers Without Lymph Node Metastasis. **Med. Pathol.**, 26 (2): 136-139.
- Eugene, P., Bell, J. D., and Baker, A. J. (2008) Traumatic Brain Injury: Can The Consequences Be Stopped?. **CMAJ**, 178 (9): 1163–1170.
- Farrell, F., and Lee, A. (2004) The Erythropoietin Receptor And Its Expression In Tumor Cells And Other Tissues. **Oncologist.**, 9 (5): 18-30.
- Fork, M., Bartels, C., Ebert, A. D, Grubich, C., Synowitz, H., and Wallesch, C. W. (2005) Neuropsychological Sequelae of Diffuse Traumatic Brain Injury. **Brain Inj.**, 19 (2): 101–108.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. (2008) The Development of Fibroblast Colonies In Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow And Spleen Cells. **Cell Tissue Kinet.**, 3 (4): 393–403.
- Gaddam, S. K., Cruz, J., and Robertson, C. (2013) Erythropoietin And Cytoprotective Cytokines In Experimental Traumatic Brain Injury. **Methods Mol. Biol.**, 982: 141-162.
- Genc, S., Koroglu, T. F., and Genc, K. (2004) Erythropoietin And The Nervous System. **Brain Res.**, 1000 (1-2): 19-31.
- Gentry, L. R. (1994) Imaging of Closed Head Injury. **Radiology**, 191 (1): 1–17.
- Ghezzi, P., and Brines, M. (2006) Alterations in hippocampal neurogenesis following traumatic brain injury in mice. **Exp. Neurol.**, 202 (9) 189–199.
- Giza, C. C., Kolb, B., Harris, N. G., Asarnow, R. F., and Prins, M. L. (2009) Hitting A Moving Target: Basic Mechanisms of Recovery from Acquired Developmental Brain Injury. **Developmental. Dev. Neurorehabil.**, 12 (5): 255–268.
- Glushakov, A. V., Robbins, S. W., Bracy, C. L., Narumiya, S., and Doré, S. (2013) Prostaglandin F2 $\alpha$  Fp Receptor Antagonist Improves Outcomes After Experimental Traumatic Brain Injury. **J. Neuroinflammation.**, 10: 132.
- Gordon, W. A., Zafonte, R., Cicerone, K., Cantor, J., Brown, M., and Lombard, L. (2006) Traumatic brain injury rehabilitation: state of the science. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.**, 85: 343-82.

- Greenwald, B. D., Burnett, D. M., and Miller, M. A. (2003) 1. Brain injury: Epidemiology And pathophysiology. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 84 (1): 3-7.
- Gu, S., Shen, Y., Xu, W., Xu, L., Li, X., Zhou, G., Gu, Y., and Xu, J. (2010) Application of Fetal Neural Stem Cells Transplantation In Delaying Denervated Muscle Atrophy In Rats With Peripheral Nerve Injury. *Microsurgery*, 30 (4): 266-274.
- Guo, R. M., Cao, N., Zhang, F., Wang, Y. R., Wen, X. H., Shen, J., and Shuai, X. T. (2012) Controllable labelling of stem cells with a novel superparamagnetic iron oxide-loaded cationic nanovesicle for MR imaging. *Eur. Radiol.*, 22 (11): 2328-2337.
- Gülen, H. (2009) Hematopoetik Kök Hücreler, *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1 (5): 67-80.
- Herzog, E. L., Chai, L., and Krause, D. S. (2003) Plasticity of Marrow-Derived Stem Cells. *Blood*, 102 (10): 3483-3493.
- Huang, Y., and Wang, K. K. (2001) The Calpain Family And Human Disease. *Trends Mol. Med.*, 7 (8): 355-362.
- Hung, C., Yao, C., Cheng, F., Wu, M., Wang, T., and Hwang, S. (2010) Establishment of Immortalized Mesenchymal Stromal Cells With Red Fluorescence Protein Expression for In Vivo Transplantation And Tracing In The Rat Model With Traumatic Brain Injury, *Cytotherapy*, 12 (4): 455-465.
- Ishii, K., Toda, M., Nakai, Y., Asou, H., Watanabe, M., Nakamura, M., Yato, Y., Fujimura, Y., Kawakami, Y., Toyama, Y., and Uyumera, K. (2001) Increase of Oligodendrocyte Progenitor Cells After Spinal Cord Injury. *J. Neurosci. Res.*, 65 (6): 500-507.
- İnan, S., and Özbilgin, K. (2009) Kök Hücre Biyolojisi, *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1 (5): 11-23.
- Juul, S., Ledbetter, D., Joyce, A., Dame, C., Christensen, R., Zhao, Y., and Demarco, V. (2001) Erythropoietin Acts As A Trophic Factor In Neonatal Rat Intestine. *Gut.*, 49 (2): 182-89.
- Karaöz, E., and Ovalı, E. (2004) Kök Hücreler, *Celepler Matbaacılık*, Trabzon, 17-63.
- Katz, D. I., and Alexander, M. P. (1994) Traumatic Brain Injury: Predicting Course of Recovery And Outcome for Patients Admitted To Rehabilitation. *Arch. Neurol.*, 51 (7): 661-70.
- Kertesz, N., Wu, J., Chen, T. H., Sucov, H. M., and Wu, H. (2004) The Role of Erythropoietin In Regulating Angiogenesis. *Dev. Biol.*, 276 (1): 101-110.
- Kızılay, Z., (2010) Deneysel Omurilik Yaralanmasında İnsan Ve Umbilikal Kordon Kanından Elde Edilmiş Kök Hücre Naklinin Ve Eritropoietinin Spinal Kord İyileşmesi Ve Nörolojik Fonksiyonlara Etkisi, Uzmanlık Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Denizli, 88s.

- Kontogeorgakos, V. A., Voulgaris, S., Korompilias, A. V., Vekris, M., Polyzoidis, K. S., Bourantas, K., and Beris, A. E. (2009) The Efficacy of Erythropoietin On Acute Spinal Cord Injury An Experimental Study On A Rat Model. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 129 (2): 189–194.
- Krych, D. K., and Ashley, M. J. (1995) The Field Evaluation. In: Traumatic Brain Injury Rehabilitation. *J. Head Trauma Rehabil.*, 1-23.
- Kumral, A., Tugyan, K., Gonenc, S., Genc, K., Genc, S., Sonmez, U., Yilmaz, O., Duman, N., Uysal, N., and Ozkan, H. (2005) Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration And oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 160 (2): 146-56.
- Galindo, L. T., Filippo, T. R., Semedo, P., Ariza, C. B, Moreira, C. M., Camara, N. O., Porcionatto, M. A. (2011) Mesenchymal Stem Cell Therapymodulates The Inflammatory Response In Experimental Traumatic Brain Injury. *Neurol. Res. Int.*, 2011 (9): 564-569.
- Lee, D., Hong, S. H., Kim, S., Lee, C., Phi, J. H., Cho, B., and Wang, K. (2009) Reproducible And Persistent Weakness In Adult Rats After Surgical Resection of Motor Cortex: Evaluation With Limb Placement Test. *Childs. Nerv. Syst.*, 25 (12): 1547–1553.
- Lescot, T., Abdennour, L., Boch, A. L., and Puybasset, L. (2007) Management of severe traumatic brain injury. *Curr. Opin. Crit. Care*, 36 (7-8): 1117-1126.
- Levi, M. S., and Brimble, M. A. (2004) A Review of Neuroprotective Agents. *Curr. Med. Chem.*, 11 (18): 2383-2397.
- Lia, S., Wei, M., Zhoua, Z., Wang, B., Zhao, X., and Zhang, J. (2012) Sdf-1 $\alpha$  Induces Angiogenesis After Traumatic Brain Injury. *Brain Res.*, 1144 (20): 76-86.
- Liebenberg, W. A., Demetriades, A. K., Hankins, M., Hardwidge, C., and Hartzenberg, B. H. (2007) Penetrating Civilian Craniocerebral Gunshot Wounds: A Protocol of Delayed Surgery. *Neurosurgery*, 57: 293- 299.
- Low, C. B., Liou, Y. C., and Tang, B. L. (2008) Neural Differentiation And Potential Use of Stem Cells From The Umbilical Cord for Central Nervous System Transplantation Therapy. *J. Neurosci. Res.*, 86 (8): 1670–1679.
- Lu, G. W., Yu, S., Li, R. H., Cui, X. Y., and Gao, C. Y. (2005) Hypoxic Preconditioning: A Novel Intrinsic Cytoprotective Strategy. *Mol. Neurobiol.*, 31 (1-3): 255-271.
- Lu, D., Sanberg, P. R., Mahmood, A., Li, Y., Wang, L., Sanchez-Ramos, J., and Chopp, M. (2002) Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Reduces Neurological Deficit In The Rat After Traumatic Brain Injury. *Cell Transplant.*, 11 (3): 275-81.
- Lucido, L., Ponce, C. N., Osama, A., and Claudia, S. R. (2013) Erythropoietin Neuroprotection With Traumatic Brain Injury. *Pathophysiology*, 20 (1): 31-8.
- Lynge, E. (1984) Trends And Perspectives In Mortality, In: Demographic Trends In The European Region. *WHO Reg. Publ. Eur. Ser.*, No. 17.

- Ma, L., Feng, X. Y., Cui, B. L., Law, F., Jiang, X. W., Yang, L. Y., Xie, Q. D., and Huang, T. H. (2005) Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation Into Nerve-Like Cells. *Chin. Med. J.*, 118 (23): 1987–1993.
- Maas, A. R., Stocchetti, N., and Bullock, R. (2008) Moderate And Severe Traumatic Brain Injury In Adults. *Lancet Neurol.*, 7 (8): 728–741.
- Marmarou, A., Eisberg, H. M., Foulkes, M. A., Marshall, L. F., and Jane, J. A. (1991) Impact of Icp Instability And Hypotension On Outcome In Patients With Severe Head Trauma. *J. Neurosurg.*, 75 (1): 59–66.
- Marques-Maria, A. I, Lacham-Kaplan, O, Medrano, J. V, Pellicer, A, and Simon, C. (2009) Differentiation of Germ Cells And Gametes from Stem Cell. *Hum. Reprod. Update*, 15 (18): 379–390.
- Marti, H. H., Bernaudin, M., Petit, E., and Bauer, C. (2000) Neuroprotection And Angiogenesis, Dual Role of Erythropoietin In Brain Ischemia. *News. Physiol. Sci.*, 15 (5): 225-229.
- Matis, G. K., and Birbilis, T. A. (2009) Erythropoietin In Spinal Cord Injury. *Eur. Spine J.*, 18 (3): 314-323.
- Matthew, T. H., Lee Ann, E. S., Jimenez, F., Baumgartner, J., and Charles, S. C. (2009) Subacute Neural Stem Cell Therapy for Traumatic Brain Injury. *J. Surg. Res.*, 153 (2): 188–194.
- Maxwell, W. L., Povlishock, J. T., and Graham, D. L. (1997) A Mechanistic Analysis of Nondisruptive Axonal Injury: A Review. *J. Neurotrauma*, 14 (7): 419–440.
- Meythaler, J. M., Peduzzi, J. D., Eleftheriou, E., and Novack, T. A. (2001) Current Concepts: Diffuse Axonal Injury–Associated Traumatic Brain Injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 82 (10): 1461-1471.
- Murphy, J. M., Dixon, K., Beck, S., Fabian, D., Feldman, A., and Barry, F. (2002) Reduced Chondrogenic And Adipogenic activity of Mesenchymal Stem Cells From Patients With Advanced Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 46 (3): 704-713.
- Nagai, A., Nakagawa, E., Choi, H. B., Hatori, K., Kobayashi, S., and Kim, S. U. (2001) Erythropoietin And Erythropoietin Receptors In Human Cns Neurons, Astrocytes, Microglia And Oligodendrocytes Grown In Culture. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60 (4): 386-392.
- Nakamura, M., and Toyama, Y. (2003) Transplantation of Neural Stem Cells Into Spinal Cord After Injury. *J. Clin. Med.*, 61: 463–468.
- Neelima, B., and Chauhan, R. G. (2010) Synergistic Benefits of Erythropoietin And Simvastatin After Traumatic Brain Injury. *Brain Res.*, 1360 (11): 177-192.
- Newbery, L. (2003) Sheehy's Emergency Nursing Principles And Practice, *London*, 202–215.



- Ninga, R., Xionga, Y., Mahmooda, A., Zhanga, Y., Menga, Y., Qua, C., and Choppb, M. (2011) Erythropoietin Promotes Neurovascular Remodeling And Long-Term Functional Recovery In Rats Following Traumatic Brain Injury. *Brain Res.*, 1384 (12): 140-150.
- Nishio, Y., Koda, M., Kamada, T., Someya, Y., Yoshinaga, K., Okada, S., Harada, H., Okawa, A., Moriya, H., and Yamazaki, M. (2006) The Use of Hemopoietic Stem Cells Derived From Human Umbilical Cord Blood To Promote Restrtaion of Spinal Cord Tissue And Recovery of Hindlimb Funtion In Adult Rats. *J. Neurosurg. Spine*, 5 (5): 424-433.
- Noguchi, C. T., Asavaritikrai, P., Teng, R., and Jia, Y. (2007) Role of Erythropoietin In The Brain. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 64 (2): 159-171.
- Okano, H., Okada, S., Nakamura, M., and Toyama, Y. (2005) Neural stem cells And regeneration of injured spinal cord. *Kidney Int.*, 68 (5): 1927-1931.
- Okie, S. (2005) Traumatic Brain Injury In The War Zone. *N. Engl. J. Med.*, 20 (352): 2043-2047.
- Olney, J. W. (1969) Brain lesions, obesity And other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164 (3880): 719-721
- Oreffo, R. O., Bord, S., and Triffitt, J. T. (1998) Skeletal Progenitor Cells And Ageing Human Populations. *Clin. Sci.*, 94: 549-555.
- Ökten, A. İ., Ergün, R., Beşkonaklı, E., Akdemir, G., Bostancı, U., Gezici, A. R., Ergüngör, F., and Taşkın, Y. (1997) Kafa Travmasında Prognozu Ve Ölüm Oranını Etkileyen Unsurlar. *Türk Nöroşirurji Dergisi*, 7 (2): 51-59.
- Özyurt, E., and Uzan, M. (1997) Kafa Travmaları, *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Acil Hekimlik Sempozyumu*, İstanbul, s. 69-79.
- Pamukçu Baran, Ö., Nergiz, Y., and Bahçeci, S. (2007) Göbek Kordon Kanı Ve Stromal Kökenli Hücrelerin Sinir Hücrelerine Farklılaşması. *Dicle Tıp Dergisi*, 34 (3): 233-238.
- Paula, S., Vitola, A. S., Greggio, S., Paula, D., Mello, P. B., Lubianca, J. M., Xavier, L. L., Fiori, H. H., and Dacosta, J. C. (2009) Hemispheric Brain Injury And Behavioral Deficits Induced By Severe Neonatal Hypoxia-İschemia In Rats Are Not Attenuated By İntravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Cells. *Pediatr. Res.*, 65 (6): 631-635.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284 (5411): 143-147.
- Posmantur, R., Kampfl, A., Siman, R., Liu, J., Zhao, X., Clifton, G. L., and Hayes, R. L. (1997) A Calpain İnhibitor Attenuates Cortical Cytoskeletal Protein Loss After Experimental Traumatic Brain Injury In The Rat. *Neuroscience*, 77 (3): 875-888.
- Ramirez, F., Steenblock, D. A., Payne, A. G., and Darnell, L. (2006) Umbilical Cord Stem Cell Therapy for Cerebral Palsy. *Med. Hypotheses Res.*, 3 (6): 679-686.

- Ribatti, D., Vacca, A., Roccaro, A. M., Crivellato, E., and Presta, M. (2003) Erythropoietin As An Angiogenic Factor. *Eur. J. Clin. Invest.*, 33 (10): 891-896.
- Rivlin, A. S., and Tator, C. H. (1978) Regional Spinal Cord Blood Flow In Rats After Severe Cord Trauma. *J. Neurosurg.*, 49: 844-853.
- Rola, R., Mizumatsu, S., Otsuka, S., Morhardt, D. R., Noble-Haeusslein, L. J., Fishman, K., Potts, M. B., and Fike, J. R., (2004) Erythropoietin As An Antiapoptotic, Tissue Protective Cytokine. *Cell Death Differ.*, 1 (11): 37-44.
- Samini, F., Samarghandian, S., Borji, A., Mohammadi, G., and Bakaian, M. (2013) Curcumin Pretreatment Attenuates Brain Lesion Size And Improves Neurological Function Following Traumatic Brain Injury In The Rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 110: 238-244.
- Schober, M. E., Requena, D., Block, B. P., Davis, L. J., Rodesch, C., Casper, T. C., Juul, S. E., Kesner, R. P., and Lane, R. H. (2013) Erythropoietin Improved Cognitive Function And Decreased Hippocampal Caspase Activity In Rat Pups After Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma*, 205-215.
- Secer, H. I., Gonul, E., and Izci, Y. (2007) Head Injuries Due To Landmines. *Acta Neurochir.*, 149 (8): 777-782.
- Sekiya, I., Larson, B. L., Smith, J. R., Pochampally, R., Cui, J. G., and Prockop, D. J. (2002) Expansion of Human Adult Stem Cells From Bone Marrow Stroma: Conditions That Maximize The Yields of Early Progenitors And Evaluate Their Quality. *Stem Cells*, 20 (6): 530-541.
- Sezgin, V. C., Karabulut, B., Şanlı, U. A., Uslu, R., Göker, E., Sanal, S., and Özdemir, N. (2003) Meme Kanserinde Ki-67 Ekspresyonu Ve Diğer Prognostik Faktörler İle İlişkisi Ki-67 Expression In Breast Cancer And Its Relationship With Other Prognostic Factors. *Ege Tıp Dergisi*, 42 (3): 173-177.
- Sharp, D. J., Beckmann, C. F., and Greenwood, R. (2011) Default Mode Network Functional And Structural Connectivity After Traumatic Brain Injury. *Brain*, 134 (8): 2233-2247.
- Siren, A. L., Fasshauer, T., Bartels, C., and Ehrenreich, H. (2009) Therapeutic Potential of Erythropoietin And Its Structural Or Functional Variants In The Nervus System. *Neurotherapeutics*, 6 (1): 108-127.
- Sue, O'shea. (2004) Self-Renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Biol. Reprod.*, 71 (6): 1755-1765.
- Sugawa, M., Sakurai, Y., Ishikawa-Ieda, Y., Suzuki, H., and Asou, H. (2002) Effects of Erythropoietin On Glial Cell Development; Oligodendrocyte Maturation And Astrocyte Proliferation. *Neurosci. Res.*, 44 (4): 391-403.
- Tisdall, M. M., and Smith, M. (2007) Multimodal Monitoring In Traumatic Brain Injury: Current Status And Future Directions. *Br. J. Anaesth.*, 99 (1): 61-67.
- Troyer, D. L., and Weiss, M. L. (2008) Wharton's Jelly-Derived Cells Are A Primitive Stromal Cell Population. *Stem Cell*, 26 (3): 591-599.

- Umamaheswara, G. S., and Radhakrishnan, M. (2008) Benefits And Drawbacks of Current Monitoring Modalities In Traumatic Brain Injury. *Search J. Anaesthesia*, 1 (1): 58-66.
- Ural, A. U. (2006) Hematopoetik Kök Hücre, *2. Ulusal Kök Hücre Kongresi*, Trabzon, s. 49-54.
- Warner, M. A., Marquez, C., and Spence, J. (2010) Assessing Spatial Relationships Between Axonal Integrity, Regional Brain Volumes And Neuropsychological Outcomes After Traumatic Axonal Injury. *J. Neurotrauma*, 27 (12): 2121-2130.
- Watanabe, J., Shetty, A. K., Hattiangady, B., Kim, D., Forakerj, E., Nishida, H., and Prockop, D. J. (2013) Administration of TSG-6 improves memory after traumatic brain injury in mice. *Neurobiol. Dis.*, 59: 86–99.
- Werner, C., and Engelhard, K. (2007) Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Br. J. Anaesth.*, 99 (1): 9-4.
- Winkler, I. G., and Levesque, J. P. (2006) Mechanisms of Hemopoietic Stem Cell Mobilization: When Innate Immunity Assails The Cells That Make Blood And Bone. *Exp. Hematol.*, 34 (8): 996-1009.
- Wolf, J. A., Stys, P. K., Lusardi, T., Meaney, D., and Smith, D. H. (2001) Traumatic Axonal Injury Induces Calcium Influx Modulated By Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels. *J. Neurosci.*, 21 (6): 1923–1930.
- Xydakis, M. S., Fravell, M. D., Nasser, K. E., and Casler, J. D. (2005) Analysis of Battlefield Head And Neck Injuries In Iraq And Afghanistan. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 133 (4): 504-597.
- Yu, F., Wang, Z., Tchanchou, F., Chiu, C. T., Zhang, Y., and Chuang, D. M. (2012) Lithium Ameliorates Neurodegeneration, Suppresses Neuroinflammation and Improves Behavioral Performance In A Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma*, 29 (2): 362-374.
- Zafonte, R. D., Mann, N. R., Millis, S. R., Wood, D. L., Lee, C. Y., and Black, K. L. (1997) Functional Outcome After Violence Related Traumatic Brain Injury. *Brain Inj.*, 11 (6): 403-407.
- Zang, H., Sato, K., Nakajima, H., McKay, C., Ney, P. A., and Ihle, J. N. (2001) The Distal Region And Receptor Tyrosines of The Epo Receptor Are Non-Essential for In Vivo Erythropoiesis. *EMBO. J.*, 15 (20): 3156-3166.
- Zanier, E. R., Montinaro, M., Vigano, M., Villa, P., Fumagalli, S., Pischiutta, F., Longhi, L., Leoni, M. L., Rebulli, P., Stocchetti, N., Lazzari, L., and Simoni, M. G. (2011) Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells Protect Mice Brain After Trauma. *Crit. Care Med.*, 68 (5): 631-636.

## ÖZGEÇMİŞ

01.03.1987 tarihinde Siirt'in Tillo ilçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2005 yılında Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2009 yılında bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi'nde Moleküler Biyoloji alanında yüksek lisansa başladı ve 2011 yılında yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2011 yılından beri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evlidir.

