

# Fasiyal Sinirin Keskin Travmasında Dental Pulpa Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Tabaka Teknolojisinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Ahmet Kara, Prof, [doktor.kbb@hotmail.com](mailto:doktor.kbb@hotmail.com)<sup>1</sup>  
Halil Elden, MD, [eldenhalil@gmail.com](mailto:eldenhalil@gmail.com)<sup>1</sup>  
Aykan Kandemir, MD, [aykan.kandemir96@gmail.com](mailto:aykan.kandemir96@gmail.com)<sup>1</sup>  
Busra Oncel Duman, Asist Prof, [busraoncel@gmail.com](mailto:busraoncel@gmail.com)<sup>2</sup>  
Gökhan Duruksu, [gokhanduruksu@gmail.com](mailto:gokhanduruksu@gmail.com)<sup>3</sup>  
Selenay Hümeýra Furat Rençber, Asist Prof, [selenay.furat@kocaeli.edu.tr](mailto:selenay.furat@kocaeli.edu.tr)<sup>3</sup>  
Ahmet Öztürk, Phd, [ahmet.ozturk@kocaeli.edu.tr](mailto:ahmet.ozturk@kocaeli.edu.tr)<sup>3</sup>  
Yusufhan Yazır · Prof, [yusufhan.yazir@kocaeli.edu.tr](mailto:yusufhan.yazir@kocaeli.edu.tr)<sup>3</sup>  
Murat Demir, MD, [drmuratdemirr@gmail.com](mailto:drmuratdemirr@gmail.com)<sup>4</sup>

1. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye
2. Kocaeli Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Avrupa Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Kocaeli, Türkiye
3. Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kocaeli, Türkiye
4. Kulak. Burun Boğaz Kliniği, Sakarya Eğitim Araştırma Hastanesi, Sakarya, Türkiye

*Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 124S462)*

*Araştırma protokolü, Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (SAÜ HADYEK 06.12.2023 tarih ve 37 nolu karar) tarafından onaylanmıştır.*

## **Sorumlu Yazar;**

Aykan Kandemir  
Sakarya University Faculty of Medicine, 54000, Korucuk, Sakarya, Turkey  
e-mail: [aykan.kandemir96@gmail.com](mailto:aykan.kandemir96@gmail.com)  
Phone: +90 505 782 74 87

## Giriş

Periferik sinir yaralanması kişinin yaşam kalitesini bozarak fonksiyonel sorunlara yol açabilen önemli bir klinik durumdur. Gelişmiş ülkelerde sıklığı 100000'de yaklaşık 18 olmakla beraber travma merkezlerine yapılan başvuruların yaklaşık %2-3'lük bir kısmını oluşturur (Kornfeld vd., 2019). Periferik sinir yaralanmalarından biri sayılan periferik fasiyal sinir hasarı; enfeksiyon, inflamasyon, demiyelinizasyon ve kompresyon gibi sebeplerle ortaya çıkabileceği gibi fasiyal ve kafa travmalarına sekonder veya kulak burun boğaz hastalıklarının klinik cerrahi pratiklerinden önemli bir kısmını oluşturan parotis ve otolojik cerrahileri sırasında da oluşabilmektedir.

Periferik fasiyal sinire yönelik künt travmalarda gözlenen patoloji sinir kılıfında meydana gelen ödem ve nöronal hasara sekonder nöral iletim blokajıdır. Bu durumda asıl tedavi sinir çevresindeki ödemi kaldırmaya yönelik sınırlı cerrahi işlemler ve asıl olarak sinir kılıfı içerisindeki ödemi azaltmaya yönelik medikal tedavidir. Bu noktada etkinliği kanıtı ve evrensel kabul gören medikal tedavi kortikosteroid tedavisidir. Sunulan çalışmanın konusu olan keskin travmalar ise tedavisi daha kompleks klinik durumlardır. Cerrahi esnasında meydana gelebilecek bir sinir kesisi için günümüzde en sık kullanılan cerrahi teknik gerilimsiz şekilde uç uca anastomozdur (Tulaci vd., 2016). Ancak sinir iyileşmesini arttıracak ek medikal ve cerrahi teknikler halen bilimsel araştırma konuları arasındadır.

Fasiyal sinir anastomoz bölgesi sütürasyonun ardından açık bırakılabileceği gibi fasya, arter veya ven greftleri gibi otojen materyallerle veya silikondan yapılmış nörotüpler, kollajen, poliglukolik asit ve kaprolakton gibi yapay malzemelerden üretilen ürünlerle sarılabilir (Kornfeld vd., 2019; Costa Serrão de Araújo vd., 2017). Bu noktada otojen greftler ek cerrahi morbidite ve süre kaybının yanında sinir kılıfı çevresinde inflamasyon riski oluştururken, yapay malzemeler ise yabancı cisim reaksiyon riskini her daim taşımaktadırlar.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) dokudaki yenilenme süreçleri sırasında çoğalma ve farklılaşmada önemli rol oynar (Satija vd., 2009). Dental pulpa kaynaklı MKH'ler ise sinir sistemini onarmak için nörojenik hücrelere farklılaşma potansiyeli en yüksek olan doku kaynağıdır. Ayrıca, nöral krest kökenlerini gösteren nöral hücre belirteçlerini ifade ederler (Morsczech vd., 2008). Sasaki ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada mezenkimal kök hücreler bio-çözünür bir madde olan poli laktik glukolik asit (PLGA)'ten oluşturulmuş bir nörotüpe transplante edilerek rat fasiyal sinir travma modelinde denenmiş ve sinir rejenerasyonunda kök hücre bulundurmeyen kontrol gruplarına göre on iki haftanın sonunda anlamlı şekilde daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Sasaki vd., 2021). Watanabe ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir fasiyal sinir travma modelinde de benzer şekilde adipöz kök hücrelerin aksonal rejenerasyon üzerine terapötik bir etkinliği olduğu gösterilmiştir (Watanabe vd., 2017). Bahsedilen çalışmalarda olduğu gibi, kök hücrelerin fasiyal sinir travma sahasını kapatacak şekilde bir nörotüp içinde, sıvı bir ortamda aktarılma fikri pek çok çalışmada kullanılmış olsa da sıvı bir

ortamda bulunan hücrelerin nakil bölgelerinde uygun pozisyonlarda yerleşebilme ihtimalinin zayıf olacağı ve hücreleri sarmak için kullanılan sinir kılıflarına ait yabancı cisim reaksiyon risklerinin görülebileceği de aşıkardır. Bu sorun kök hücrelerin klinik kullanımlarının sınırlı kalmasındaki majör sebeptir ve hücrelerin doku formunda transfer edilebilmesi kök hücre çalışmalarındaki temel hedef olmalıdır.

Bu bağlamda çalışmalar incelendiğinde biyobozunur bazı materyallerin yapay doku iskeleti (scaffold) olarak kullanılabilceği görülebilir (Kornfeld vd., 2019; Guo ve Dong, 2009). Bu yöntem kök hücre nakilleri ile ilgili çok önemli sorunları çözümlemiş olsa da yapay iskeletlerin merkez bölgelerindeki hücrelerdeki yüksek nekroz oranları, hücresiz alanlarda iyileşmenin yoğun ekstraselüler matriks ile dolması ve bu materyallere karşı oluşan inflamasyon, bu yöntemin en önemli sorunlarından. Yine biyobozunur malzemeler ile yapılan hücre nakilleri, bu malzemeler üzerine hücrelerin tek tek aktarılması ile gerçekleştiğinden hücre-hücre bağlantısı olmayan ve rölatif olarak düşük hücre yoğunluklu nakillerin gerçekleştirilmesine yol açmaktadır. Bu sebepler bahsedilen scaffold teknolojisinin de klinik kullanıma aktarımını sınırlamaktadır.

Bu noktada farklı bir biyoteknolojik ürün olan hücre tabaka teknolojisinin fasiyal sinir travmalarında kullanılması mümkün olabilir. Hücre tabaka teknolojisinde hücreler tek tek değil, hücre hücre ve hücre ekstraselüler matriks bağlantılarının korunduğu bir doku greftine benzer şekilde elde edilebilmekte ve bu sayede hücreden yoğun ve cerrahi olarak uygun anatomik bölgelere kolaylıkla yerleştirilebilir bir formda elde edilebilmektedir (Nakayama vd., 2010; Ohki vd., 2006, (Matsuda vd., 2007). Bu sayede kök hücrelerin avantajlarından yararlanılırken, hücreleri bir arada tutmak için kullanılan yapay ürünlerin komplikasyonlarından da korunmuş olunur.

Şu ana kadar hücre tabakaları; kornea oluşturulması amacıyla (Yamoto ve Okano, 2004), dış çevresindeki periodontin hastalıklarında (13), üriner mukoza rejenerasyonunda (Shiroyanagi vd., 2003), nazal mukoza oluşturulması amacıyla (Topdag vd., 2019) ve orta kulak mukozal rejenerasyonuna katkı sunacak bir teknik olarak (Yamamoto vd., 2017) kullanılmıştır. Bahsedilen sıcaklık duyarlı kültür kaplarının kullanılması yoluyla elde edilen hücre tabakalarının fasiyal sinir rejenerasyonundan kullanılması çalışmamız ile birlikte ilk kez denenmiştir.

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

Çalışmamızda kullanılan Wistar Albino ratlar Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Uygulamaları ve Araştırmaları Merkezi'nden (SUDETAM) temin edildi. Deneklerin büyüme etkisini elemine etmek için en az 250-300 gram ağırlığında toplam 35 adet Wistar Albino rat kullanıldı.

Çalışma kapsamında oluşturulan deneysel modelde denekler yedi denekten oluşan beş ana gruba ayrılmıştır: Grup 1 (Kontrol), herhangi bir cerrahi müdahale uygulanmayan sağlıklı deneklerden

oluşurken; Grup 2 (Model), fasiyal sinir hasarı oluşturulup tedavi uygulanmayan grubu temsil etmektedir. Tedavi protokollerinin değerlendirildiği gruplarda ise; Grup 3'te hasarlı sinir uçlarına uç uca anastomoz işlemi uygulanmış, Grup 4'te sadece dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre (DP-MKH) tabakası yerleştirilmiş ve son olarak Grup 5'te uç uca anastomoz ile birlikte DP-MKH tabakası kombinasyonu (Anastomoz + Hücre) uygulanarak iyileşme süreçleri karşılaştırılmıştır.

*Dental Pulpa Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (Dp-Mkh) Kültürü ve İşaretlenmesi, Canlılık ve Apoptoz Değerlendirmesi*

Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre (DP-MKH) hattı olarak Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezinde (KÖGEM) daha önceden etik kurulu alınmış ve de izolasyonları tamamlanmış olan insan dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreleri kullanıldı. Hücreler çözüldü ve T175 kültür kabına ekildi. Kültür boyunca hücrelere MEM Eagle's, %10 FBS (fetal bovine serum), %1 penicilin-streptomycin eklendikten sonra 37°C' de (%5 CO<sub>2</sub>) kültüre edildi. Sonrasında kullanılacak mezenkimal kök hücrelerin çalışma süresince izlenebilmesi ve hücre kaynağının belirlenebilmesi için DP-MKH'lara yeşil fluoresan proteinin (GFP) geni aktararak işaretlendi. Hücrelerin işaretlenmesi Neon Transfection Sistemi (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ve 10 µl Neon Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Hücrelerin GFP proteinini ifade ettiklerini göstermek için kültür sonrasında hücreler belli bir antikor ile boyanmadan doğrudan akım (flow) sitometrisinde 480 nm dalga boyunda okutuldu. Bu aşamada hücrelerde %95'in üzerinde pozitif okuma alındı (Demirayak vd., 2016; Cakici vd., 2013; Karaoz vd., 2012) (Şekil 1)

Hücreler yeterli sayıda çoğaltıldıktan sonra 12 kuyucuklu Upcell (UpCell, CellSeed, Inc. Tokyo, Japan) kültür kabına planlanan nakil gününden 1 gün önce bir göze 2x10<sup>6</sup> olacak şekilde ekildi. Bir gün boyunca çoğalması beklendikten sonra poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) kültür kabındaki bu hücreler, 37°C' deki inkübasyondan alınarak 20 °C' de 30 dk inkübasyona bırakıldı. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında hücreler, enzimatik reaksiyona gerek kalmadan ve tek-hücre süspansiyonu yerine tabaka halinde kültür kabından kaldırıldı (Şekil 2.a). Elde edilen hücre tabakalarının çapı 7x3 mm olarak belirlendi. Hücre tabakası üzerine destekleyici membran konuldu ve bu şekilde nakil bölgesine transfer edildi.

Hücre tabakasının canlılık düzeylerinin belirlenmesi için ölü ve canlı hücrelerin mikroskopik olarak görüntülenmesine olanak tanıyan Cell-Check™ Viability/Cytotoxicity Kit (ABP Biosciences, Cat No:A017) testi uygulandı. Sıcaklık duyarlı kültür kabından kaldırılarak elde edilen hücre tabakalarının işaretlenmesi için kit protokolü uygulandı. Süre bitiminde tabaka lamın üzerine koyulup lazer taramalı konfokal mikroskopta (Leica DMI8) inceleme yapıldı. Mikroskopik incelemede canlı hücreleri işaretleyen Calcein (ex/em: 494/517) yeşil renk ile görüntülenirken ölü hücreleri işaretleyen Propidium iodide (ex/em: 528/617) kırmızı renk ile görüntüledi. Örneklerin konfokal mikroskopik incelemesinde

3 boyutlu incelemeye olanak tanıyan z-stack inceleme yapılmış ve görüntü analizi için LasX software kullanılmıştır (Şekil 2b).

Sıcaklık duyarlı kültür kaplarında enzimsiz kültür sonrası oluşturulan tabaklardaki hücrelerin üzerine lizis eklendi, Cell death Detection Elisa Plush (Roche daignostic Mannheim, Germany) kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile analiz edildi. Apoptoz düzeyleri monokromatör sistemli mikroparka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi. DP-MKH hücrelerinin 1 günlük kültür sürecinde apoptoz düzeyini belirlemek için uygulanan apoptoz deneyi sonrasında kontrol grubu (standart kültür) ve deney grubu (hücre tabakası) student't testi ile karşılaştırıldığında sonuç  $**p<0.01$  olduğundan apoptozun polisitiren (standart kültür) kaplı kültür kabında anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi.

### Travmatik Fasiyal Sinir Paralizi Modeli Oluşturma ve Rekonstruksiyon Süreci

Deney hayvanlarına 5 mg/kg ksilazin hidroklorid ve 35 mg/kg ketamin hidroklorit intraperitoneal olarak uygulandı. Aseptik teknik kullanılarak rat sol yüz yarımı 3 kez %10 luk pavidon iyot ile boyandı ve aurikula ön kısmında cerrahi saha traşlandı. Nörofizyolojik ölçümler gerçekleştirildikten sonra sol aurikula posteroinferiorundan yay şeklinde uzanarak 1. bıyık hizasında sonlanacak insizyon yapıldı. Cilt ve cilt altı geçilerek sinirin bukkal dalı ortaya kondu ve ardından posteriorda takip edilerek parotis gland ekartasyonu ile fasiyal sinir ana trunkusuna ulaşıldı. Sinirin bukkal ve marjinal dalında 11 numara bistüri ile sinir kesisi meydana getirildi. Rekonstruksiyon aşamasında sadece bukkal dala işlem gerçekleştirildi. İşlem sonrası takipler fasiyal sinirin bukkal dalı üzerinden gerçekleştirildi (Şekil 3.a). Hücre tabakalarının translantasyonu hazırlanması aşamasında on iki-gözlü ısı duyarlı petrideki hücreler, CO<sub>2</sub> inkübatörden çıkarıldı. Isı duyarlı kültür petrisinin her bir gözündeki medyumunun tamamı aspire edilerek 2 kez PBS ile yıkandı. Her bir göze 500 µl PBS, hücre tabakalarının üzerine eklendi. PVDF membran, her bir göze, gözlerin ortasına gelecek şekilde mezenkimal kök hücre tabakasının üstüne yerleştirildi. Dikkatli bir şekilde forceps ile hücre tabakasının etrafına iyice bastırılarak destekleyici membrana tutunması sağlandı. PVDF membran tarafından kaplanmayan ve kenarda kalan hücre tabakası pens yardımı ile PVDF membran üzerine doğru katlandı (3b). PVDF membrana tutunmuş olan tüm hücre tabakası, pens ile kaldırılıp transplante edilecek bölgeye göre büyüklüğü ayarlandı.

Sinir kesisinin proksimal ve distal uçları 3. ve 5. grupta 8/0 monofilament suture ile suture edilecek ve takiben sırasıyla 5. gruptaki deneklere hücre tabakası uygulaması yapıldı (Şekil 3c,d). 3. gruptaki deneklere sutureasyonun ardından ek işlem yapılmadı. 2. ve 4. gruptaki deneklere sinir sutureasyon işlemi de yapılmadı. Bu grupların kesi hatları yakınlaştırıldı ve 4. grubun kesi hattına hücre tabakası sarıldı. İkinci grup sekonder iyileşmeye bırakıldı.

Operasyon sonrasında bıyık ve yüz hareketleri ile elektrofizyolojik ölçümler; postoperatif 1. Hafta, 4. Hafta, 8. hafta ve 12. hafta olarak gerçekleştirildi. Post operatif 12. haftada intraperitoneal yüksek doz

anestezik ile sakrifikasyon gerçekleştirildi ve fasiyal sinir rezeke edilerek histopatolojik, immunfloresan ve PCR incelemeleri gerçekleştirildi.

### İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki verilerin normal dağılıma uygunluğu için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Test sonucunda normal dağılıma uygun veriler parametrik testlerle, uymayan veriler parametrik olmayan testlerle incelendi. Bulgular ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. Grupların karşılaştırılmasında, ANOVA, Kruskal Wallis, Friedmann testleri uygulandı.  $p < 0.05$  durumunda veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### **Bulgular**

Fasiyal sinirin paralizi skorlaması için, dinlenme halindeki vibrissa simetrisi, titreşim hareketi, dinlenme halindeki burun simetrisi ve burun hareketi dikkate alınarak puanlama yapıldı. Toplam yedi puan fasiyal felci olmayan normal bir orta yüzü gösterirken, sıfır puan ise tam orta yüz fasiyal felcin olarak kabul edildi.

Yüz hareket skorlarının ortanca (min-max) değerleri Tablo 1’de verilmiştir. Zamanla grup içi değişimleri değerlendirmek amacıyla Friedman testi uygulandı. Buna göre Grup 4 (Hücre tabakası) ve Grup 5’de (Anastomoz + Hücre tabakası) sırasıyla ( $p = 0.021$ ;  $p = 0.008$ ) anlamlı düzeyde zamanla artış eğilimi saptandı. Her iki grupta da skorların özellikle postoperatif 8. ve 12. haftalarda belirgin şekilde yükseldiği görüldü. Buna karşın Grup 2 (Model) ve Grup 3 (Anastomoz) gruplarında zamanla anlamlı bir iyileşme gözlemlenmedi ( $p > 0.05$ ). Sonuç olarak, cell-sheet uygulaması yapılan gruplarda yüz hareket skorlarının zamana bağlı olarak anlamlı artış göstermesi, hücre tabakasının fonksiyonel iyileşme sürecine katkıda bulunduğunu desteklemektedir.

### EMG Bulguları

Deney gruplarındaki tüm sıçanların fasiyal sinir kesisi öncesi MÜP amplitüdü ölçüldü. Sinir kesisi öncesi yapılan kontrol EMG kayıtları Latans, uyarı eşiği ve BKAP amplitüd değerleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Preoperatif ölçümlerde tüm gruplarda benzer değerler izlendi ( $p > 0,05$ ) (Tablo 2).

Postoperatif 1 haftada alınan EMG kayıtlarına göre latans değerleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Grup 1’de latans değerleri diğer gruplara kıyasla belirgin derecede daha düşük bulundu ( $p < 0,0001$ ). Bu fark tüm ölçüm haftalarında aynı şekilde devam etti. (Tablo 3).

Postoperatif 1 haftada alınan EMG kayıtlarına göre uyarı eşiği açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Grup 1’de latans değerleri diğer gruplara kıyasla belirgin derecede daha düşük

bulundu ( $p < 0,0001$ ). Bu fark dördüncü ve sekizinci ölçüm haftalarında aynı şekilde devam etti. (Tablo 3). On ikinci hafta EMG kayıtları incelendiğinde sinir kesisi ve onarım yapılan deney grupları arasında anlamlı farklılıkların olduğu görüldü. 12. Haftada Grup 1 en düşük uyarı eşiğine sahipti ( $p < 0,0001$ ); Grup 2'nin uyarı eşiği ise Grup 3-5'e kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0,01$ ), ancak Grup 3, 4 ve 5 arasında anlamlı fark izlenmedi ( $p > 0,05$ ) (Tablo 4).

BKAP amplitüdü açısından da Post operatif 1. Haftada Grup 1'in değerleri, Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'e kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ( $p < 0,0001$ ). Bu fark tüm ölçüm haftalarında aynı şekilde devam etti (Tablo 5).

Genel olarak EMG sonuçları değerlendirildiğinde kesi ve tedavi uygulanan gruplar olan Grup 2, 3, 4 ve 5'in 12 haftaya kadar kendi aralarında çoğunlukla anlamlı fark göstermediği, 12. haftada grup 2'nin uyarı eşiğinin tedavi gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunduğu gösterilmiştir. İstatistiki anlam oluşturmaya da gruplar arasında 12. hafta EMG değerleri arasında en iyi değerlerin sırasıyla Grup 5, Grup 4, Grup 3 şeklinde sıralandığı gözlenmiştir.

### Histopatolojik İncelemeler

Tüm gruplarda sakrifikasyonu takiben çıkarılan fasiyal sinir ve dalları %10'luk nötral tamponlanmış formalin çözeltisi içerisine alınarak 48 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından doku takibi gerçekleştirildi ve örnekler parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan yaklaşık 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Bu kesitlerde Hematoksilin & Eozin (H&E) boyaması, toluidin mavisi boyaması ve İmmünofloresan boyamalar yapıldı. Toluidin mavisi boyanan kesitlerde miyelinizasyon ve akson sayısı; H&E boyalı kesitlerde akson çapı, akson rejenerasyonu, akson yoğunluğu gibi parametreler ışık mikroskopik olarak değerlendirildi (Matsumine vd 2014; Toraman vd 2021). İmmünofloresan boyamada ise neurofilament, S100, Growth Associated Protein 43, TNF- $\alpha$ , CD31 ve yarıklanmış kaspaz-3 protein ekspresyonları lazer taramalı konfokal mikroskop altında (Leica) değerlendirildi. Ayrıca GFP-işaretli DP-MKH'lerin dokudaki varlığı gösterildi.

### Hemotoksilen & Eosin ve Toluidin Blue Boyama Sonuçları

Grup 1'e ait fasiyal sinir (FS) içeren kesitler incelendiğinde; beklenildiği üzere miyelinli aksonların sıkıca paketlendiği, sinir fasiküllerini çevreleyen kılıfın devamlılık gösterdiği/intakt olduğu; etrafındaki bağ ve kas dokusundan bu kılıf ile ayrıldığı; FS'nin sağlıklı morfoloji sergilediği tespit edilmiştir. Grup 2'ye ait FS içeren kesitler incelendiğinde, sinir bütünlüğünün bozulduğu; miyelinizasyonun azaldığı ve sinir çevresindeki bağ dokuda lökositik infiltrasyon geliştiği tespit edilmiştir. Grup 3'e ait FS içeren kesitler incelendiğinde, Grup 1 ile benzer olarak sinir sınırlarının belirginliği ve sinir kılıfının devamlılığı dikkat çekmektedir. Ancak bazı bölgelerde miyelinli akson sayısında azalma tespit

edilmiştir. Grup 4'e ait FS içeren kesitler incelendiğinde, nöron bütünlüğünün sağlandığı, sinir fasikülünü dıştan çevreleyen kılıfının bütünlük sergilediği ve siniri çevre bağ-kas dokudan izole ettiği; fasikül içerisindeki Schwann hücre sayısının ve miyelinizasyonun arttığı tespit edilmiştir. Grup 5'e ait FS içeren kesitler incelendiğinde; Grup 4'e göre nöron bütünlüğünde bozulma, fasiyal sinir sınırlarının belirginliğinde azalma ve bağ dokuda yer yer sinir öbekleri tespit edilmiştir (Şekil 4).

Toluidin mavisi kullanılarak yapılan kesitlerde, fasiyal sinirin miyelin kalınlığı, miyelinli akson çapı ve akson sayısı incelendi. Sonuçlara ait görsel şekil 5 de, veriler tablo 6'da izlenmektedir.

#### İmmunofloresan İnceleme Sonuçları

Gruplar S100, GAP 43, NF açısından değerlendirildiğinde, hücre tabakası ile desteklenen grupta boyanmanın daha yoğun, düzenli ve homojen bir görünüm sergilediği görülmüştür. Travmatik model sonrası uç uca onarımın hücre tabakası ile desteklendiği grupta yapılan onarımda boyanma orta düzeyde ve kısmen düzenli bir görünüm sergilemiştir. Grup 2 ye ait sonuçlar ise en düşüktür. İnflamasyon ve apoptoz parametreleri açısından değerlendirildiğinde ise iyileşmenin olumlu ilerlediğinin göstergesi olacak şekilde hücre tabakası grubu en düşük boyanmanın görüldüğü grup olmuştur (Şekil 6-10)

#### qPCR ile Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları

Fasiyal sinir yaralanması tedavisinde kontrol, deney modeli ve farklı tedavi gruplarının (Anastomoz, Hücre Tabakası ve Anastomoz+Hücre tabakası) GFAP, Nestin, Tubb3 ve CD31 için gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, farklı tedavi yaklaşımlarının ilgili gen ekspresyonları üzerindeki etkilerini göstermiştir.

GFAP (Glial Fibrillar Asidik Protein) ekspresyonu, Fasiyal motor nöronlar tarafından ifade edilen ve sinir hasarını gösteren önemli bir belirteçtir. Verilere göre, Grup 3' e ait veriler normale en yakın değerlerde izlendi (Şekil 6). Nestin, kök hücrelerin ve progenitor hücrelerin bir nöral farklılaşma belirteci olup nöral rejenerasyon süreçlerinde rol oynamaktadır. Çalışmada, Nestin ekspresyonu açısından kontrol ile tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). Tubulin-beta-3 (Tubb3), olgunlaşmamış ve olgun nöronlarda bulunan bir hücre içi iskelet (sitoskeletal) proteini olup nöronal yenilenmenin bir göstergesidir. Anastomoz grubunda Tubb3 ekspresyonu  $1,99 \pm 0,41$  değeri ile tüm gruplardaki en yüksek değerini göstermiştir. CD31 (PECAM-1), endotel hücrelerinde bulunan bir yüzey proteindir ve anjiyogenezin (yeni damar oluşumu) bir belirtecidir. En düşük değerler anastomoz grubunda izlenmiştir (Şekil 11).

## Tartışma

Bu çalışmada, dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre (DP-MKH) tabakalarının fasiyal sinir keskin travma modelinde rejeneratif etkileri araştırılmıştır. Bulgular, hücre tabakası uygulamasının miyelinizasyon, Schwann hücre yoğunluğu ve akson bütünlüğü üzerinde belirgin iyileşmeler sağladığını ortaya koymuştur. Sadece hücre tabakası uygulanan grupta hem histolojik hem de fonksiyonel testlerde (EMG amplitüd, uyarı eşiği) anlamlı iyileşme gözlenmiştir. Ancak hücre tabakası uygulamasının anastomoz ile kombine edildiği grupta bu etkinin kısmen azaldığı dikkati çekmiştir. Bu durum, travma sonrası cerrahi manipülasyonun hücre tutulumunu ve mikroçevre bütünlüğünü olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, rat sinir kalibresinin cerrahi işlemleri zorlaştırması nedeniyle bu farkın insan fasiyal siniri cerrahilerinde kombinasyon grubu lehine olumlu sonuçlar doğurabileceği de olasıdır.

Mezenkimal kök hücrelerin periferik sinir onarımındaki etkinliği, Schwann-benzeri hücrelere farklılaşma potansiyelleri ve nörotrofik faktör salınımı ile ilişkilendirilmektedir (Kingham & Pittenger, 2019). Dental pulpa kökenli MKH'lerin nöral krest orijinli olmaları, nöronal farklılaşmaya diğer kaynaklara göre daha yatkın olmalarını sağlamaktadır (Gronthos vd., 2000; Arthur vd., 2008). Bu özellik, fasiyal sinir rejenerasyonunda DP-MKH'leri özellikle uygun bir hücre aday haline getirmiştir.

Hücre tabakası teknolojisi, klasik süspansiyon hücre nakillerinden farklı olarak hücre-hücre bağlantılarını ve ekstrasellüler matris bütünlüğünü korur; böylece transplantasyon bölgesinde daha etkin entegrasyon sağlar (Takahashi vd., 2019; Zhang vd., 2021). Çalışmamızda da bu avantaj, apoptoz oranlarındaki azalma ve konfokal mikroskopide yüksek hücre canlılığı ile doğrulanmıştır. Yamato ve Okano (2004) benzer şekilde cell-sheet teknolojisinin kornea ve mukozal rejenerasyonda canlı hücre tabakası bütünlüğü sayesinde başarılı entegrasyon sağladığını bildirmiştir.

Fonksiyonel değerlendirmede, postoperatif 12. Hafta ölçümlerinde aradaki fark istatistiksel fark oluşturmasa da hücre tabakası uygulanan gruplarda kaydedilendüşük latans ve uyarı eşikleri ile yüksek MÜP değerleri remiyelinizasyonun yeniden sağlandığını düşündürmektedir. Bu bulgular, adipöz veya kemik iliği kaynaklı MKH'lerin fasiyal sinir modellerinde rejeneratif etki gösterdiğini bildiren Watanabe vd. (2017) ve Sasaki vd. (2021) ile uyumludur.

Histopatolojik incelemelerde, hücre tabakası grubunda miyelin kalınlığındaki artış ve miyelinli akson sayısındaki yükselme, DP-MKH'lerin sinir onarımını hem doğrudan hücre katkısı hem de parakrin etkiler aracılığıyla desteklediğini göstermektedir. Miyelin bütünlüğünün korunması, Schwann hücre aktivasyonundaki artışla ilişkili görünmektedir. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda MKH kaynaklı sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve glial hücre kaynaklı

nörotrofik faktör (GDNF) salınımının sinir rejenerasyonunda kritik rol oynadığı vurgulanmıştır (Zhang vd., 2021; Kingham vd., 2007).

İmmunfloresan sonuçları da bu tabloyu desteklemektedir. Hücre tabakası ve kombinasyon tedavisinin uygulandığı beşinci grupta, nöral rejenerasyon belirteçleri (GAP43, NF), Schwann hücre belirteci (S100) düzeylerinde hücre tabakası grubunda daha fazla olmak üzere, ikinci ve üçüncü gruba kıyasla anlamlı iyileşme eğilimi göstermiştir. Yine bu gruplarda, benzer şekilde dördüncü grupta daha da düşük olmak kaydıyla apoptoz ve inflamasyon göstergeleri de Grup 2 ve 3' e göre daha düşük tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, MKH tabakasının nöral rejenerasyon ve vaskülarizasyonu destekleyerek etkin bir tedavi stratejisi oluşturduğunu güçlü biçimde göstermektedir. Bununla birlikte, Grup 5'te hücre tabakasına anastomoz eklenmesine rağmen histolojik bütünlüğün Grup 4'e kıyasla zayıf olması, mekanik sütürasyonun tabaka bütünlüğünü bozarak transplant hücrelerin adezyonunu sınırlayabileceğini düşündürmektedir. Zhang vd. (2021) bu tür mekanik streslerin greft yerleşimini ve mikrodamarlanmayı olumsuz etkileyebileceğini bildirmiştir. Dolayısıyla cell-sheet teknolojisinin sinir greftleriyle birlikte kullanımında optimal cerrahi koşulların belirlenmesi, ileri araştırmalarla desteklenmelidir.

PCR analizleri, incelenen tedavi yöntemlerinin moleküler düzeyde farklı gen ekspresyon profilleri oluşturduğunu ortaya koymuştur. Anastomoz tek başına uygulandığında, nöronal yenilenme çabasının bir göstergesi olan Tubb3 ekspresyonu artmıştır. Buna karşılık, hücre tabaka tedavisi tek başına uygulandığında, sinir hasarının neden olduğu glial reaksiyonu temsil eden GFAP ekspresyonu en belirgin şekilde baskılanmıştır. Nestin ve CD31 ekspresyonlarında ise gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Kombine tedavinin uygulandığı beşinci grupta, Tubb3 artışı anastomoz grubuna göre daha sınırlı kalmasına rağmen, GFAP düzeyinin azalması ve CD31'in yükselme eğilimi; DP-MKH'nin rejenerasyonun miktarından ziyade kalitesini ve mikroçevre sürdürülebilirliğini desteklediğini düşündürmektedir. Burada dikkat çekilmesi gereken en kritik nokta: PCR analizlerinin hücredeki anlık moleküler çabayı ve dinamik iyileşme sürecini yansıtmaması, histolojik ve fonksiyonel bulguların ise bu sürecin nihai yapısal sonucunu göstermesidir. Bu bağlamda, PCR verilerindeki farklılıklar iyileşmenin henüz tamamlanmamış ara evrelerini temsil ediyor olabilir. Fasiyal sinir hasarının tedavisinde hem yapısal onarımın (anastomoz) hem de rejeneratif mikroçevre düzenlemesinin (hücre tabakası) kritik önem taşıdığı görülse de; bu moleküler parametrelerin iyileşmenin farklı aşamalarındaki değişken rollerini tam olarak aydınlatılabilmek için, daha geniş denek sayılarıyla farklı zaman dilimlerini kapsayan prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Klinik uygulama açısından değerlendirildiğinde, elde edilen veriler özellikle iyatrojenik fasiyal sinir hasarları veya parotis cerrahileri sonrası gelişen sinir defektleri için potansiyel bir biyolojik onarım stratejisi sunmaktadır. Hücre tabakası uygulamaları, mevcut greft ve nörotüp yaklaşımlarına kıyasla daha düşük immün yanıt, daha hızlı fonksiyonel toparlanma ve doku bütünlüğüne daha iyi entegrasyon sağlayabilir. Ancak çalışmada kullanılan insan DP-MKH hattının immünolojik uyumluluğu,

translasyonel uygulamalarda otolog veya allojenik hücre kaynağı seçimini doğrudan etkileyecek önemli bir faktördür. Bu nedenle gelecekteki çalışmaların immünmodülasyon, biyouyumluluk ve uzun dönem hücre varlığı üzerine odaklanması gerekmektedir (Wei vd., 2023).

Ayrıca cell-sheet teknolojisinin ilerleyen dönemde biyoçözünür destek materyalleri, mikrokanallı sinir kılavuzları veya vaskülarizasyonu artırıcı büyüme faktörleriyle kombine edilmesi; daha hızlı aksonal büyüme ve stabil miyelinizasyon sağlayabilir. 3D bio-printing ve mikroakışkan sistemler aracılığıyla bu tabakaların çok katmanlı biçimde üretilmesi, sinir dokusunun doğal mikroçevresinin taklit edilmesine olanak tanıyabilir (Chen vd., 2021; Georgiou vd., 2013). Böyle bir yaklaşım, yalnızca fasiyal sinirde değil, rekürren larengeal sinir, brakiyal pleksus ve optik sinir gibi diğer periferik sistemlerde de uygulanabilir hale gelebilir.

Sonuç olarak, bu çalışma sinir rejenerasyonunda biyoteknolojik hücre tabakası (cell-sheet) yaklaşımının hem histolojik hem de fonksiyonel düzeyde etkili olabileceğini göstermiştir. Ancak, kullanılan deneysel modelin sinir kalibrasyonunun düşük olması, cerrahi işlemlerin standardizasyonunu güçleştirmiştir. Bu durum, her denekte aynı düzeyde travma oluşturulamaması veya sütürasyonun tam olarak aynı lokalizasyondan yapılamaması nedeniyle sonuçlarda kısmi varyasyonlara yol açmış olabilir. Dolayısıyla, gelecekte bu yöntemin etkinliğini değerlendirmek amacıyla daha büyük örneklemli ve kontrollü prospektif insan çalışmalarının yapılması büyük önem taşımaktadır.

Ayrıca, özellikle kafa tabanı cerrahileri gibi doğrudan anastomozun teknik olarak mümkün olmadığı durumlar için, yalnızca hücre tabakası uygulamasıyla elde edilen histolojik ve fonksiyonel iyileşmeler dikkat çekicidir. Bu bulgu, cell-sheet teknolojisinin, cerrahi onarımın yapılamadığı vakalarda, bağımsız bir biyolojik rekonstrüksiyon stratejisi olarak anlamlı bir alternatif oluşturabileceğini ortaya koymaktadır.

## Literatür:

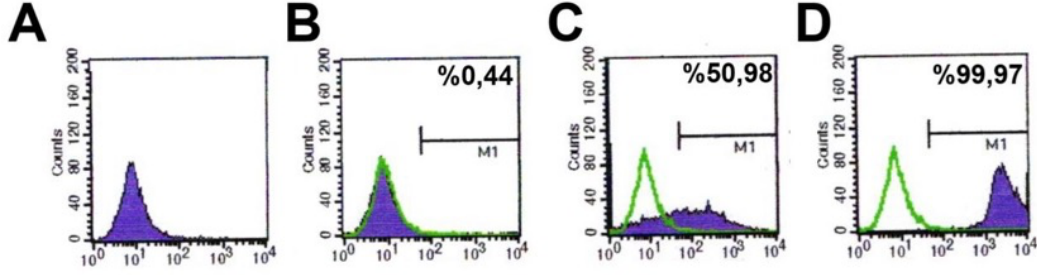
- Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A., & Gronthos, S. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(7), 1787–1795.
- Cakici, C., Buyrukcu, B., Duruksu, G., Haliloglu, A. H., Aksoy, A., Isik, A., Uludag, O., Ustun, H., Subasi, C., Karaoz, E. 2013. “Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation.” *BioMed research international*, 2013, 529589.
- Chen, Y., Long, X., Lin, W., Du, B., Yin, H., Lan, W., Zhao, D., Li, Z., Li, J., Luo, F., & Tan, H. 2021. Bioactive 3D porous cobalt-doped alginate/waterborne polyurethane scaffolds with a coral reef-like rough surface for nerve tissue engineering application. *Journal of materials chemistry. B*, 9(2), 322–335.
- Costa Serrão de Araújo, G., Couto Neto, B., Harley Santos Botelho, R., & Carpi Malta, M. 2017. “Clinical evaluation after peripheral nerve repair with caprolactone neurotube. *Hand*”, 12(2), 168-174.
- Demirayak, B., Yüksel, N., Çelik, O. S., Subaşı, C., Duruksu, G., Unal, Z. S., Yıldız, D. K., Karaöz, E. 2016. “Effect of bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the natural course of corneal scarring after penetrating injury.” *Experimental eye research*, 151, 227–235.
- Georgiou, M., Bunting, S. C., Davies, H. A., Loughlin, A. J., Golding, J. P., & Phillips, J. B. 2013. Engineered neural tissue for peripheral nerve repair. *Biomaterials*, 34(30), 7335–7343.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., & Shi, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630.
- Guo, B. F., & Dong, M. M. 2009. “Application of neural stem cells in tissue-engineered artificial nerve.” *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 140(2), 159–164.
- Karaoz, E., Kabatas, S., Duruksu, G., Okcu, A., Subasi, C., Ay, B., Musluman, M., Civelek, E. 2012. “Reduction of lesion in injured rat spinal cord and partial functional recovery of motility after bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation.” *Turkish neurosurgery*, 22(2), 207–217.
- Kingham, P. J., Kalbermatten, D. F., Mahay, D., Armstrong, S. J., Wiberg, M., & Terenghi, G. 2007. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental neurology*, 207(2), 267–274.
- Kornfeld, T., Vogt, P. M., & Radtke, C. 2019. “Nerve grafting for peripheral nerve injuries with extended defect sizes.” *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)*, 169(9), 240.
- Matsuda N., Shimizu T., Yamato M., Okano T. 2007. “Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology”, *Adv. Mater.* 19, 3089–3099.
- Matsumine, H., Sasaki, R., Yamato, M., Okano, T., & Sakurai, H. 2014. “A polylactic acid non-woven nerve conduit for facial nerve regeneration in rats.” *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 8(6), 454–462.

- Morszeck, C., Schmalz, G., Reichert, T. E., Völlner, F., Galler, K., & Driemel, O. 2008. "Somatic stem cells for regenerative dentistry." *Clinical oral investigations*, 12, 113-118.
- Nakayama M., Okano T, Françoise M. 2010. "Winnik. Poly (N-isopropylacrylamide)-based Smart Surfaces for Cell Sheet Tissue Engineering", *Material Matters*, 5.3, 56.
- Ohki, T., Yamato, M., Murakami, D., Takagi, R., Yang, J., Namiki, H., Okano, T., & Takasaki, K. 2006. "Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model." *Gut*, 55(12), 1704–1710.
- Sasaki, R., Watanabe, Y., Yamato, M., & Okamoto, T. 2021. "Tissue-engineered nerve guides with mesenchymal stem cells in the facial nerve regeneration." *Neurochemistry international*, 148, 105062.
- Satija, N. K., Singh, V. K., Verma, Y. K., Gupta, P., Sharma, S., Afrin, F., Sharma, M., Sharma, P., Tripathi, R. P., & Gurudutta, G. U. 2009. "Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine." *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(11-12), 4385–4402.
- Shiroyanagi, Y., Yamato, M., Yamazaki, Y., Toma, H., & Okano, T. 2003. "Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature." *Tissue engineering*, 9, 1005-1012.
- Takahashi H, Shimizu T, Nakayama M, Yamato M, Okano T. Thermally-triggered fabrication of cell sheets for tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;138:276–292. doi:10.1016/j.addr.2019.01.004.
- Topdag, M., Karaoz, E., Kara, A., Subasi, C., Duman, B. O., Demir, N., Konuk, E., Ozturk, M., & Iseri, M. 2019. "Comparative Analysis of the Healing Effects of the Transplanted Cell Sheets to the Experimentally Injured Maxillary Sinuses." *Journal of Craniofacial Surgery*, 30, 2285-2292.
- Toraman, M., Külekçi Öztürk, S., Uslu Coşkun, B., & Güneş, P. 2021. "The effects of 4-aminopyridine and methylprednisolone on recovery of the facial nerve crush injury." *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 278, 3057-3063.
- Tulaci, K. G., Tuzuner, A., Karadas Emir, H., Tatar, İ., Sargon, M. F., Tulaci, T., Karadavut, Y., & Samim, E. E. 2016. "The effect of tacrolimus on facial nerve injury: Histopathological findings in a rabbit model." *American journal of otolaryngology*, 37(5), 393–397.
- Watanabe, Y., Sasaki, R., Matsumine, H., Yamato, M., & Okano, T. 2017. "Undifferentiated and differentiated adipose-derived stem cells improve nerve regeneration in a rat model of facial nerve defect." *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 11(2), 362–374.
- Wei, B., Li, Z., Lin, Y., Hu, X., Xu, L., Wang, S., Ji, M., & Lu, J. 2023. BMP-2/TGF-β1 gene insertion into ligament-derived stem cells sheet promotes tendon-bone healing in a mouse. *Biotechnology journal*, 18(5), e2200470.
- Yamamoto, K., Yamato, M., Morino, T., Sugiyama, H., Takagi, R., Yaguchi, Y., Okano, T., & Kojima, H. 2017. "Middle ear mucosal regeneration by tissue-engineered cell sheet transplantation." *NPJ Regenerative medicine*, 2(1), 1-11.

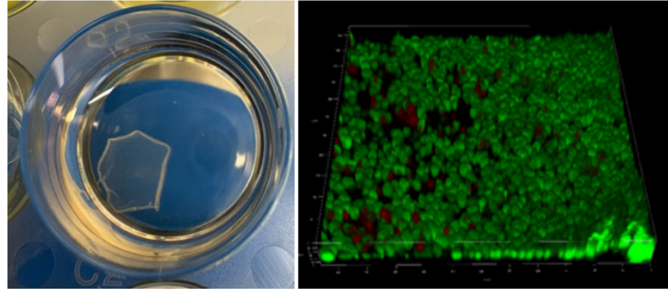
- Yamato, M., & Okano, T. 2004. "Cell sheet engineering." *Materials today*, 7(5), 42-47.
- Zhang, R. C., Du, W. Q., Zhang, J. Y., Yu, S. X., Lu, F. Z., Ding, H. M., Cheng, Y. B., Ren, C., & Geng, D. Q. 2021. Mesenchymal stem cell treatment for peripheral nerve injury: a narrative review. *Neural regeneration research*, 16(11), 2170–2176.

## ŞEKİL VE TABLOLAR

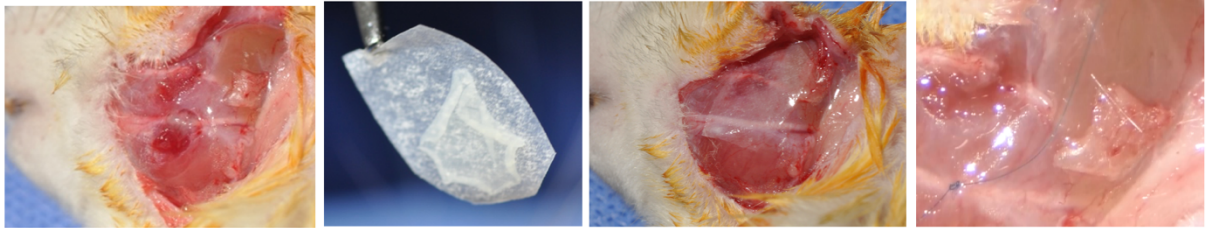
Şekil 1. GFP+ hücrelerin akım (flow) sitometri ile kantifikasyonu. GFP geni aktarılmış hücrelerin kültüründe hücre seçimi G418 (genetisin) ile gerçekleştirilmiştir. İlerleyen pasajlarda (P0 > P4) pozitif ışına gösteren hücrelerin sayıları artmıştır. İşaretlenmemiş hücreler kontrol (A) olarak kullanılarak önce P0 hücreleri (B), sonra P3 (C) ve P4 (D) hücreleri incelenmiştir. P4 hücrelerinde seçim süreci istenen düzeye ulaştığı gözlemlenmiştir.



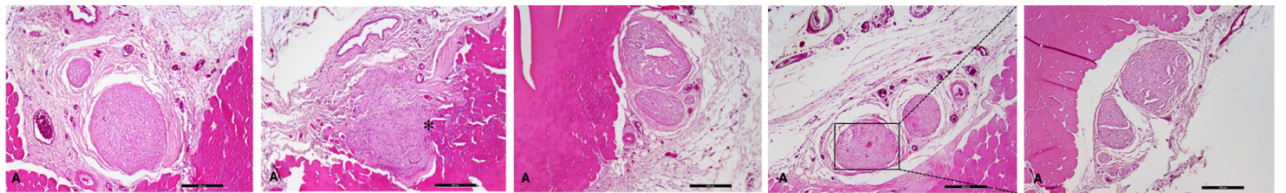
Şekil 2. a. Hücre tabakası, b. Konfokal mikroskopi ile hücre tabakasının canlılık düzeylerinin belirlenmesi



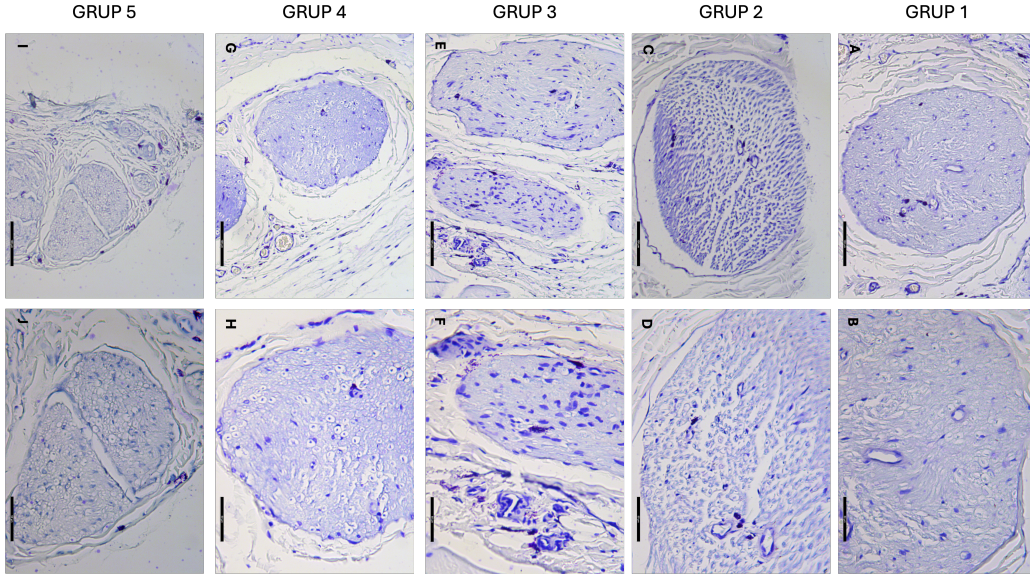
Şekil 3. a. Fasiyal sinirin ekspozisyonu ve travmanın gerçekleştirilmesi, b. PVDF membran üzerindeki hücre tabakası. c,d. Hücre tabakasının yerleştirilme aşamaları



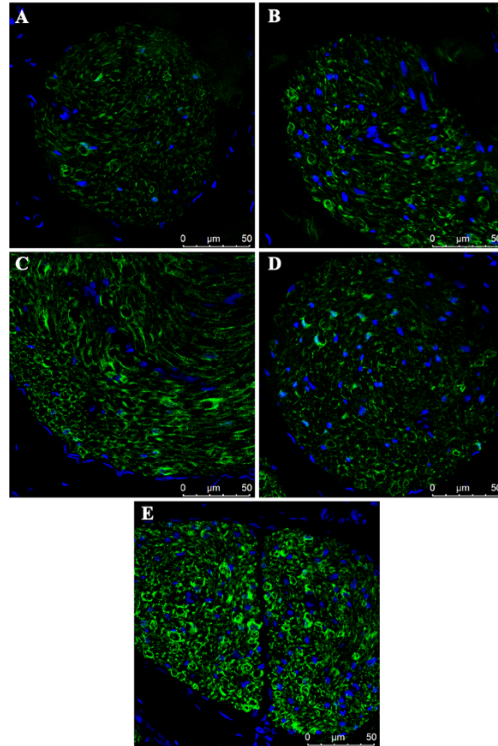
Şekil 4. Sırasıyla Grup 1-5'e ait FS fotomikrografları. H&E. A: 100X magnifikasyon.



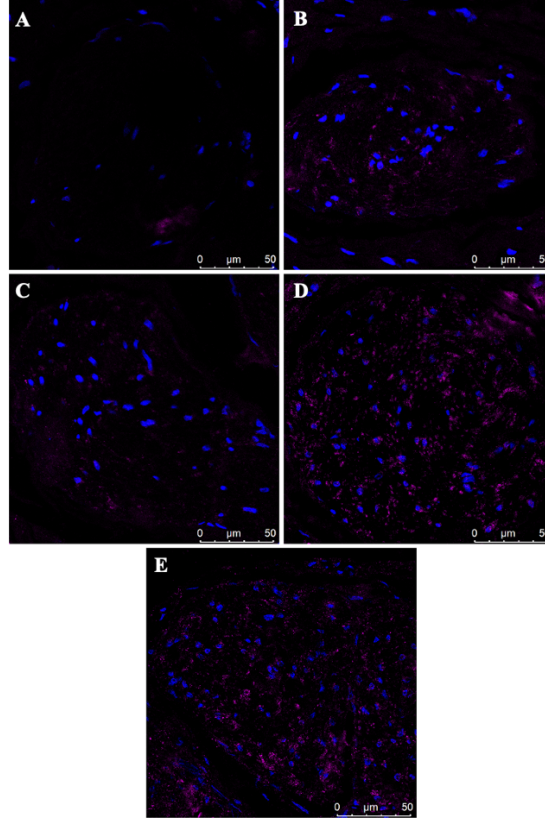
**Şekil 5. Grup 1 (A-B), Grup 2 (C-D), Grup 3 (E-F), Grup 4 (G-H) ve Grup 5 (I-J)'e ait FS içeren kesitler. Toluidine blue. A, C, E, G, I: 200X; B, D, F, H, J: 400X magnifikasyon**



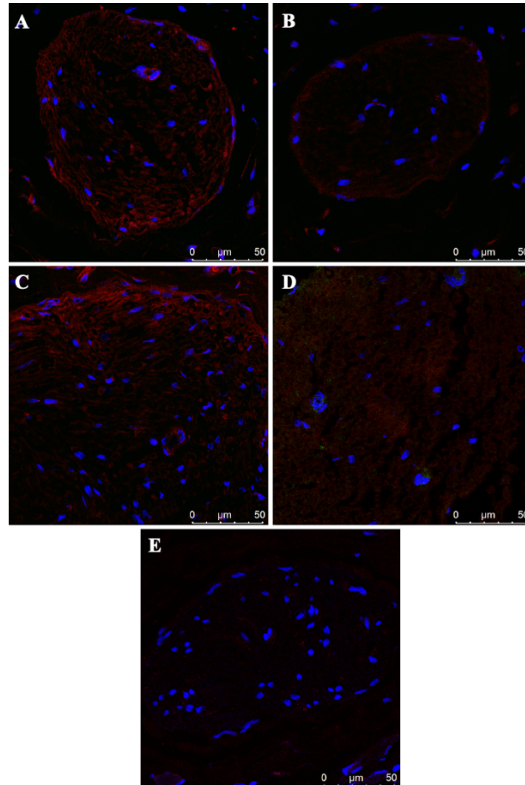
**Şekil 6. S 100 boyama sonuçları. A.sağlıklı kontrol, B. Sham grubu, C. Primer sütürasyon grubu, D. Cell sheet grubu, E. Sütürasyon+Cell sheet grubu**



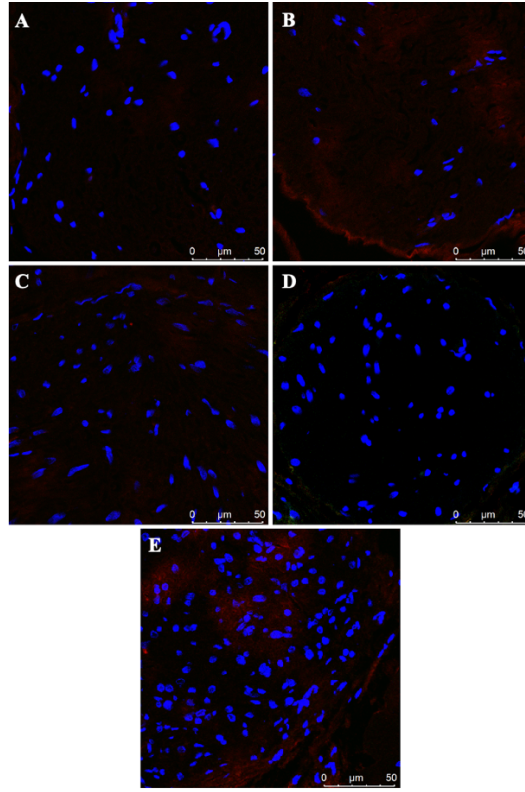
**Şekil 7. GAP-43 boyama sonuçları. A.sağlıklı kontrol, B. Sham grubu, C. Primer sütürasyon grubu, D. Cell sheet grubu, E. Sütürasyon+Cell sheet grubu**



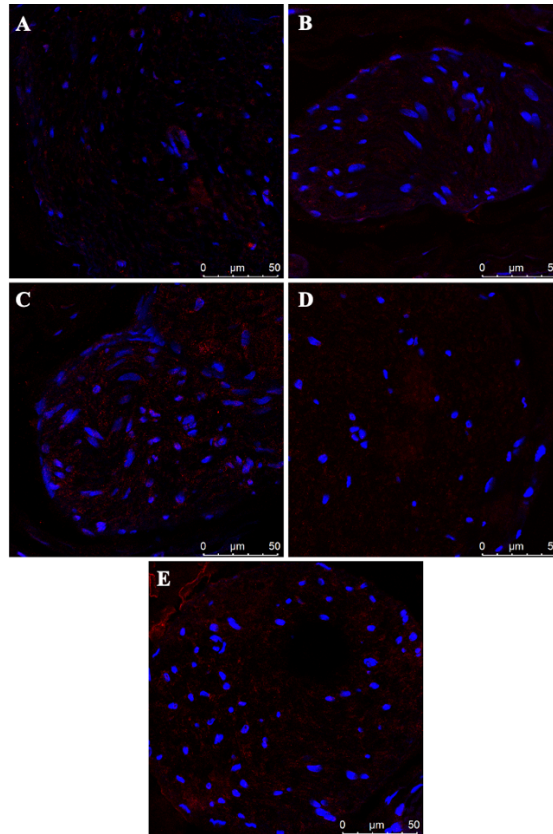
**Şekil 8. GFP- NF boyama sonuçları. A.sağlıklı kontrol, B. Sham grubu, C. Primer sütürasyon grubu, D. Cell sheet grubu, E. Sütürasyon+Cell sheet grubu**



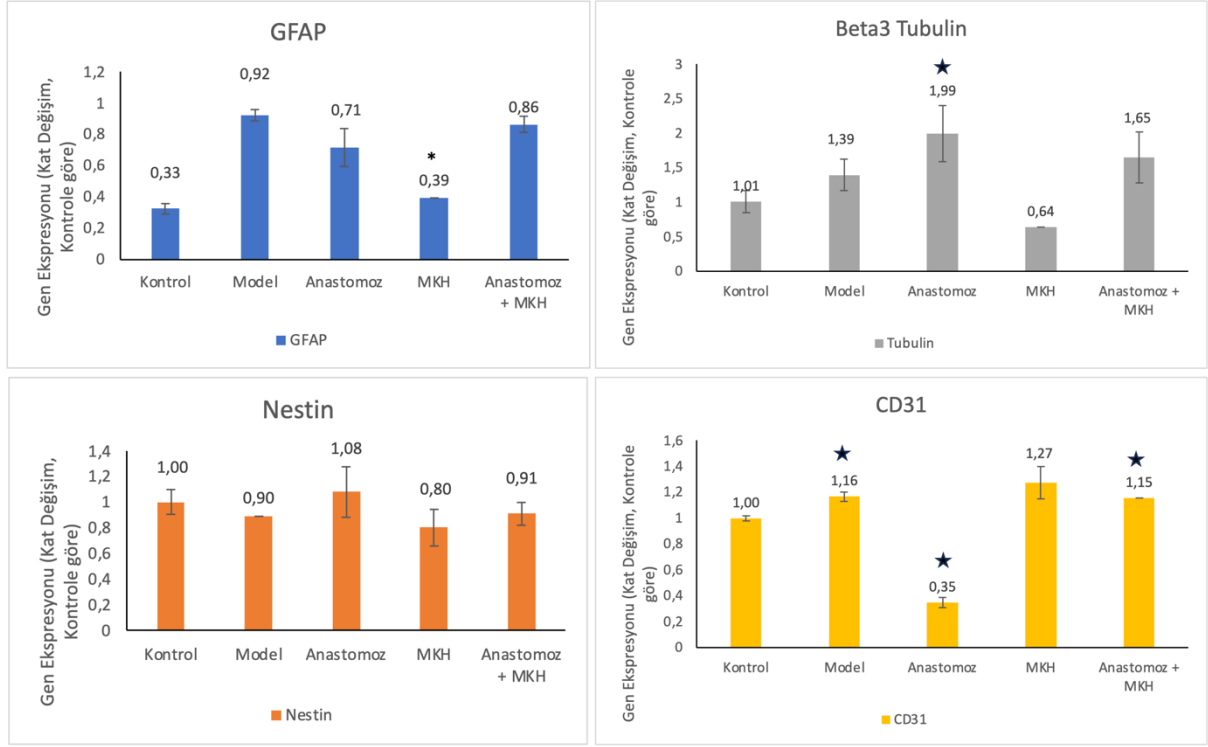
**Şekil 9. GFP-TNF alfa boyama sonuçları. A.sağlıklı kontrol, B. Sham grubu, C. Primer sütürasyon grubu, D. Cell sheet grubu, E. Sütürasyon+Cell sheet grubu**



**Şekil 10. Caspase 3 boyama sonuçları. A.sağlıklı kontrol, B. Sham grubu, C. Primer sütürasyon grubu, D. Cell sheet grubu, E. Sütürasyon+Cell sheet grubu**



**Şekil 6. Gruplar arasındaki GFAP, Beta3 Tubulin, Nestin ve CD 31 gen ekspresyonlarının karşılaştırması**



**Tablo 1. Deney süresince gruplara ait yüz hareket skorlarının ortanca (min-max) değerleri**

Zaman	Grup1 (Kontrol)	Grup2 (Model)	Grup 3 (Anastomoz)	Grup 4 (Hücre Tabakası)	Grup 5 (Anastomoz Hücre tabakası)
Pre-op	7 (7-7)	7 (7-7)	7 (7-7)	7 (7-7)	7 (7-7)
1. Hafta	7 (7-7)	1 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-1)	0 (0-1)
4. Hafta	7 (7-7)	2 (0-2)	2 (0-3)	2 (0-2)	1 (0-2)
8. Hafta	7 (7-7)	2 (0-3)	3 (0-3)	1 (0-3)	2 (0-4)
12. Hafta	7 (7-7)	3 (0-3)	3 (0-3)	3 (0-5)	3 (0-4)

**Tablo 2. Sinir hasarı öncesi deney grupların ait latans, uyarı eşiği ve BKAP (MÜP) sonuçları**

Zaman	Grup1 (Kontrol) Ort± SD	Grup2 (Model) Ort± SD	Grup 3 (Anastomoz) Ort± SD	Grup4 (Hücre tabakası) Ort± SD	Grup 5 (Anastomoz Hücre tabakası) Ort± SD	P değeri
Latans	2,017±0,187	1,970±0,101	1,979±0,156	1,960±0,175	1,883±0,231	0,704
Uyarı Eşiği	0,068±0,013	0,071±0,013	0,067±0,0149	0,067±0,013	0,064±0,013	0,911
MÜP	2,141±0,639	2,270±0,350	2,254±0,312	2,112±0,501	2,348±0,337	0,854

Sonuçlar Ortalama±standart sapma olarak verildi. SD: Standart sapma.

**Tablo 3. Deney süresince gruplara ait latans (ms) sonuçları**

Zaman	Grup1 (Kontrol) Ort± SD ortanca (IQR)	Grup 2 (Model) Ort± SD ortanca (IQR)	Grup 3 (Anastomoz) Ort± SD ortanca (IQR)	Grup 4 (Hücre tabakası) Ort± SD ortanca (IQR)	Grup 5 (Anastomoz hücre tabakası) Ort± SD ortanca (IQR)	P değeri
1. Hafta	1,926±0,1962	3,704±0,490	4,299±0,441	4,139±0,970	4,271±0,6483	<0,0001
4. Hafta	2,00 (0,25)	3,79 (0,7)	4,38 (0,80)	3,45 (1)	3,87 (1,32)	0,0007
8. Hafta	1,97 (0,32)	3,89 (0,64)	3,86 (1)	3,45 (1)	3,57 (0,50)	0,0009
12. Hafta	1,930±0,211	4,804±,519	4,154±0,528	3,778±0,977	3,565±0,900	<0,0001

Sonuçlar Ortalama±standart sapma olarak verildi. SD: Standart sapma.

**Tablo 4. Deney süresince gruplara ait uyarılma eşiği (mA) sonuçları**

Zaman	Grup1 (Kontrol) Ort± SD ortanca (IQR)	Grup 2 (Model) Ort± SD ortanca (IQR)	Grup 3 (Anastomoz) Ort± SD ortanca (IQR)	Grup4 (Hücre tabakası) Ort± SD ortanca (IQR)	Grup 5 (Anastomoz hücre tabakası) Ort± SD ortanca (IQR)	P değeri
1. Hafta	0,070±0,015	1,189±0,407	1,011±0,144	0,995±0,163	1,123±0,150	<0,0001
4. Hafta	0,06 (0,03)	1,01 (0,14)	0,98 (0,22)	0,90 (0,20)	0,97 (0,20)	0,0013
8. Hafta	0,070±0,018	1,187±0,191	0,965± 0105	0,861±0,268	0,848±0,242	<0,0001
12. Hafta	0,07(0,03)	1,35(0,40)	1,05(0,20)	0,90(0,32)	0,70(0,25)	<0,0001

Sonuçlar Ortalama±standart sapma olarak verildi. SD: Standart sapma.

**Tablo 5. Deney süresince gruplara ait MÜP (mV) amplitüd sonuçları**

Zaman	Grup1 (Kontrol) Ort± SD	Grup2 (Model) Ort± SD	Grup3 (Anastomoz) Ort± SD	Gru 4 (Hücre tabakası) Ort± SD	Grup (Anastomoz hücre tabakası) Ort± SD	P değeri
1. Hafta	1,856±0,492	0,296±0,202	0,381±0,110	0,357±0,221	0,375±0,143	<0,0001
4. Hafta	1,842±0,498	0,323±0,190	0,417±0,132	0,428±0,190	0,480±0,160	<0,0001
8. Hafta	1,825±0,447	0,280±0,203	0,474±0,130	0,587±0,267	0,552±0,212	<0,0001
12. Hafta	1,888±0,494	0,284±0,152	0,582±0,125	0,700±0,312	0,706±0,337	<0,0001

**Tablo 6. Gruplara ait ortalama akson sayıları ve çapları**

	Miyelin kalınlığı (µm) (Ort.)	Skorlama	Miyelinli akson çapı (µm) (Ort.)	Skorlama	Akson sayısı (Ort.)	Skorlama
GRUP 1	6.841		10.952		126	
GRUP 2	3.781	2	8.655	2	83	1
GRUP 3	3.054	1	6.927	2	62	3
GRUP 4	5.098	3	9.049	3	101	0
GRUP 5	4.217	2	7.468	3	74	2