

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

**YAĞ DOKUSU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE
KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN
ANOZMİ İNDÜKLENMİŞ FARE MODELİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. BURAK HAZIR

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ALPER CEYLAN

ANKARA

MART 2022

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

**YAĞ DOKUSU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE
KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN
ANOZMİ İNDÜKLENMİŞ FARE MODELİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. BURAK HAZİR

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ALPER CEYLAN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2020-
39 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
MART 2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve bu tez çalışması sırasında bana her anlamda ve her zaman destek olan çok değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Alper CEYLAN’a,

Zaman kavramı olmaksızın tüm bilgi ve birikimlerini bana aktaran başta Dr. Öğr. Üyesi M. Melih ŞAHİN olmak üzere tüm Kulak Burun Boğaz AD. hocalarıma,

Bu tez çalışması sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK, Dr. Öğr. Üyesi Duygu DAYANIR ve Dr. Öğr. Üyesi Betül ÖĞÜT’e,

Asistanlık eğitimim boyunca omuz omuza görev yaptığımız, zorlukları beraber aştığımız, başta değerli arkadaşım Dr. Eray UZUNOĞLU olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

KBB kliniğinin olmazsa olmazı servis, poliklinik, ameliyathane hemşireleri ve personellerine,

Beni yetiştiren, bu günlere getiren tüm eğitim hayatım boyunca daima yanımda olan annem, babam ve ablama,

Ve son olarak tüm zorluklara karşı beraber mücadele ettiğimiz sevgili hayat arkadaşım Dr. Gözde DURMUŞ’a,

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Burak HAZIR

Mart 2022 / ANKARA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Koku Anatomisi ve Histolojisi	3
2.1.1 Olfaktör Epitel	3
2.1.2 Olfaktör Bulbus	7
2.1.3 Üst Koku Yolları	8
2.1.4 Vomer nazal Organ	9
2.2 Fare Koku Anatomisi	10
2.3 Koku Fizyolojisi	12
2.4 Koku Alma Bozuklukları	14
2.4.1 Tanımlar	15

2.4.2 Koku Alma Bozukluklarının Sınıflandırılması	17
2.4.3 Klinik Değerlendirme	27
2.4.4. Koku Alma Bozukluklarının Tedavisi	34
2.5 Kök Hücreler	37
2.5.1 Erişkin Kök Hücreler	38
2.5.2 Mezenkimal Kök Hücreler.....	38
3. GEREÇ ve YÖNTEM	40
3.1 Deney Hayvanları.....	40
3.2 Yemek Bulma Testi	41
3.3 Koku Kaybının Oluşturulması	43
3.4 Kök Hücre Elde Edilmesi ve Kök Hücre Uygulaması	44
3.4.1 Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Üretilmesi	44
3.4.2 Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Üretilmesi	45
3.4.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	46
3.4.4 Kök Hücre Uygulanması	47
3.5 Histomorfolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme	47
3.5.1 Dokuların İzolasyonu	47
3.5.2 Kök Hücre Yerleşimlerinin İncelenmesi	49

3.5.3 Histolojik İncelemeler	49
3.5.4 İmmünohistokimyasal İncelemeler	50
3.6 İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	52
4.1 Yemek Bulma Testlerinin Sonuçları	52
4.2 Transplante Edilen Kök Hücrelerin Değerlendirilmesi	54
4.3 Histolojik Sonuçlar	56
4.3.1 Histomorfolojik İnceleme Sonuçları	56
4.3.2 İmmünohistokimyasal İnceleme Sonuçları.....	62
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ	75
7. ÖZET.....	76
8. SUMMARY.....	78
9. KAYNAKLAR.....	80
10. EKLER.....	95
10.1 Etik Kurul Onayı.....	95
11. ÖZGEÇMİŞ.....	97
12. KABUL ve ONAY.....	100

ŞEKİLLER DİZİN

Şekil 1: Olfaktör epitel	4
Şekil 2: Olfaktör bulbus	7
Şekil 3: Sarı-kahverengi renkli olfaktör epitel	11
Şekil 4: T şeklinde tasarlanmış labirent	42
Şekil 5: A) Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre inverted floresan mikroskopik görüntü (10x) B) Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre inverted floresan mikroskopik görüntü (10x)	47
Şekil 6: Olfaktör nöroepitel izolasyonu için sagital ayırma işlemi	48
Şekil 7: Olfaktör epitel ve olfaktör bulbus	49
Şekil 8: Transplante edilen yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 1. hafta görüntüsü (10x)	55
Şekil 9: Transplante edilen yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 3. hafta görüntüsü (10x)	55
Şekil 10: Transplante edilen kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin 1. hafta görüntüsü (10x)	56
Şekil 11: Transplante edilen kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin 3. hafta görüntüsü (10x)	56
Şekil 12: Grupların 2. hafta olfaktör epitellerinin görüntüleri	61
Şekil 13: Grupların 4. hafta olfaktör epitellerinin görüntüleri	62

Şekil 14: 2. hafta gruplardaki olfaktör marker protein eksprese eden hücrelerin durumu 64

Şekil 15: 4. hafta gruplardaki olfaktör marker protein eksprese eden hücrelerin durumu 64



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Psikofiziksel testler	32
Tablo 2: Deney grupları	41
Tablo 3: Yemek bulma testleri	43
Tablo 4: Yemek bulma testinde farelerin ortalama yemek bulma süreleri (saniye)	52
Tablo 5: Yemek bulma testi gruplara göre başarı durumu	53
Tablo 6: Grupların 2. hafta histopatolojik skorlama bulguları	57
Tablo 7: Grupların 4.hafta histopatolojik skorlama bulguları	58
Tablo 8: Grupların olfaktör epitel kalınlıkları	60
Tablo 9: Grupların olfaktör marker protein eksprese eden hücre sayıları	62

GRAFİKLER DİZİN

Grafik 1: Ortalama yemek bulma testi süreleri	54
Grafik 2: Grupların toplam epitel hasar skorları	59
Grafik 3: Grupların zaman göre epitel kalınlıkları	60
Grafik 4: Gruplardaki olfaktör marker protein eksprese eden hücre sayıları	63



KISALTMALAR

BDNF	: Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
DAB	: Diaminobenzedin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
D-PBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EEG	: Elektroensefalografi
EOG	: Elektroofaktogram
fMRG	: Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
FBS	: Fetal Bovin Serum
HE	: Hematoksilen Eozin
İP	: İntraperitoneal
KBB	: Kulak Burun Boğaz
KİMKH	: Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
KRS	: Kronik Rinosinüzit
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
OB	: Olfaktör Bulbus
OBP	: Odorant Binding Protein
OE	: Olfaktör Epitel

OKH	: Olfaktör Kaplayıcı Hücre
OMP	: Olfaktör Marker Protein
ONE	: Olfaktör Nöroepitel
OR	: Olfaktör Reseptör
ORN	: Olfaktör Reseptör Nöron
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate buffered saline)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	: Phycoerythrin
PEKAB	: Postenfeksiyöz Koku Alma Bozukluğu
PET	: Pozitron Emisyonel Tomografisi
PPOD	: Position Paper on Olfactory Dysfunction
PTKAB	: Posttravmatik Koku Alma Bozukluğu
TAAR	: Trace Amine-Associated Receptor
VMO	: Vomeronazal Organ
YBT	: Yemek Bulma Testi
YFP	: Yeşil Floresan Protein
YDKMKH	: Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
3-MI	: 3 Metil İndol

1. GİRİŞ

Koku, önemi yokluğunda daha iyi anlaşılan, hayata anlam katan diğer duyularımızdan farklı özellikler gösteren bir duyumuzdur. Koku; yemek yerken yemeklerin aromasını daha iyi anlamamızı sağlar, hayatı tehdit eden durumlara karşı bizi uyarır. Koku kaybı tamamen ya da kısmi, geçici veya kalıcı olabilir. Çalışmalarda bakılan yaş grubuna göre değişmekle beraber toplumun yaklaşık %20'sinde hipozmi, %5'inde fonksiyonel anozmi olduğu söylenebilir (1, 2). Oranlar koku kaybının nasıl tanımlandığına, nasıl tespit edildiğine, hangi popülasyonda araştırıldığına ve inceleme yapılan yaş grubuna göre değişiklikler göstermektedir. Koku molekülleri burunda bulunduğu bölgede olfaktör reseptör hücreleri uyarak kokunun algılanmasını sağlar.

Olfaktör reseptör nöronların (ORN) aksonlarının oluşturduğu olfaktör sinir dışarı ile temas eden ve bu özelliğe sahip tek kranial sinirdir (3). Bu temas sonucu çok fazla etkilenir ve bu yüzden rejenerasyon özelliğine sahip tek sinirdir (4). Hasarlandığı zaman bu rejenerasyon yeteneği ile tamamen iyileşebilse de bazı durumlarda kısmi ya da tam işlev kaybı olabilmektedir. Bu durumda tedavide denenen çok fazla ajan olmasına rağmen üstünde fikir birliğine varılmış seçenek fazla değildir ve etkileri sınırlıdır.

Dış ortam teması sebebiyle hasarlanmaya müsait ancak kendi kendini yenileyerek bu durumdan kurtulmaya çalışan koku duyumuz, bazı durumlarda kendini iyileştirememektedir. Klinikte koku alma bozuklukları olarak karşımıza çıkan bu durumda etkisi kesin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Sistemik ve intranazal steroidler, A vitamini, statinler, çinko, hücresel tedaviler, koku eğitimi

tedavide denenmektedir. Tedavide ana amaç rejenerasyonu indüklemek, hatta mümkünse yeni hücreleri olfaktör epitele (OE) yerleştirerek işlev kaybını ortadan kaldırmaktır.

Erişkin kök hücreler birçok hastalığın tedavisinde denenen umut verici bir tedavi yöntemidir. Dejenere olan olfaktör nöroepitelin (ONE) hasarlanan kök hücre özelliği taşıyan hücrelerinin yerine yenilerini yerleştirmenin koku bozukluğunu düzelteceği düşünülmektedir. Bununla ilgili yapılan çalışmalarda kök hücre transplantasyonunun nörotrofik büyüme faktörleri ve proanjiogenik sitokin salınımı yaparak ya da salınımını tetikleyerek nöral yenilenmeye katkı sağladığı gösterilmiştir (5).

İşte bu çalışmada, kök hücre tedavilerinin etkinliğinin 3-metil indol (3-MI) ile anozmi indüklenen fare modeli üzerinde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Koku Anatomisi ve Histolojisi

Kokunun algılanması burundan geçen havanın olfaktör epitel içindeki reseptör hücreleri uyarması ile olur. Koku, sağ kalımı arttırması uzun yaşamayı sağlamanın yanında hayattan zevk almamızı sağlayan duyumuzdur (6). İnsanlarda diğer memelilerden farklı olarak regrese olmuştur (7).

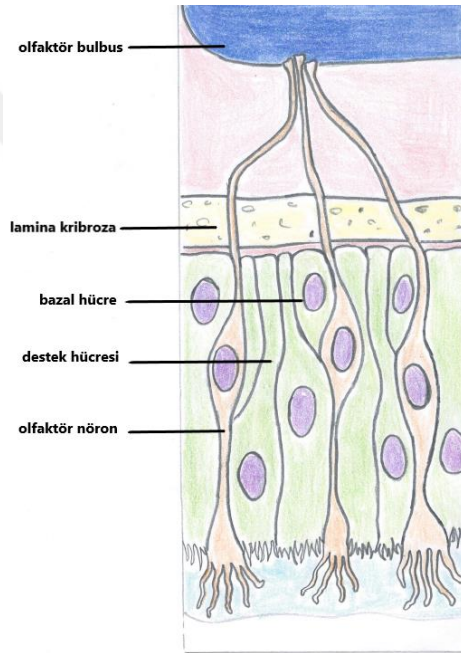
Olfaktör bölge, orta ve üst konkalar ile septum arasında bulunan, yalancı çok katlı kolumnar epitel ile döşeli bir alandır (8). Koku anatomisinde bu bölge çok önemli olmakla birlikte hava içerisindeki koku moleküllerinin bu bölgeye ulaşması için tüm burnun bütünlük içinde görev alması gerekmektedir. Özellikle nazal valv, laminar akımı türbülant akıma dönüştürerek ısıtılan nemlendirilen havanın superiordaki olfaktör bölgeye yönlendirilmesini sağlar (7, 9).

İnsanlarda ORN aksonlarının oluşturduğu olfaktör sinir dışında koku almada etkili olabileceği düşünülen iki sinir daha vardır. Bunlar trigeminal sinir ve terminal sinirdir. Trigeminal sinir çoğu kokular tarafından uyarılır ve olfaktör sinirle birbirlerinin etkilerini bastırır ya da arttırırlar (10). Trigeminal sinir uçları belirli uyaranlara karşı korunma reflekslerini harekete geçirir (11). Terminal sinir 0. kranial sinir olarak adlandırılır. Nazal boşluktan çıkarak kribriform plaktan santral bölgeye girer. İşlevi tam anlaşılamamıştır (12).

2.1.1 Olfaktör Epitel

Yalancı çok katlı kolumnar epitel ile döşeli ONE nazal boşluğun üst kısmında bulunur ve altındaki lamina propriyası ile birlikte olfaktör mukozayı

oluşturur, submukoza tabakası yoktur (13, 14). Olfaktör epitel dört ana hücreden oluşur. Bunlar: ORN, mikrovillus hücreleri, destek hücreleri, bazal hücrelerdir. Bu hücrelerin yanında az sayıda salgı hücresi ve lamina propria tabakasında Bowman salgı bezleri, bağ dokusu ve olfaktör kaplayıcı hücreler de (özelleşmiş bir glial hücre) yer alır (15).



Şekil 1. Olfaktör epitel

ORN'ler genç erişkinlerde sayıları 5-30 milyon olan özelleşmiş bipolar nöronlardır (3). Hücre gövdeleri olfaktör epitelin içinde bulunur, dendritlerini epitelyal yüzeye uzatırlar; bunlar hareketsiz silyalar içerir, reseptörleri bu silyalardadır (8). ORN'nin miyelinsiz aksonları bazal membranı geçerek lamina proprianın derininde diğer aksonlarla demetler oluşturur (13). Etrafları olfaktör kaplayıcı hücreler (OKH, *olfactory ensheathing cells*) ile sarılıdır (13). Bu sinir lifleri (*fila olfactoria*) lamina kribrozadaki deliklerden geçerek olfaktör bulbusa (OB)

gider (13, 16). Dış ortamla temas halindeki bu aksonlar hasarlanmaya çok müsaitlerdir ve hasarlanan hücre ONE içindeki bazal hücreler ile yenilenmektedir (8). Ayrıca bu sürece olfaktör kaplayıcı hücreler de destek verir (7). OKH, aksonal rejenerasyona yön verir (7). OB ve ONE içinde mevcuttur (17, 18). OKH'lerin sinir hasar modellerinde akson iyileşmesine katkısı tedavide kullanımını da gündeme getirmiştir (19). Güvenli bir şekilde olfaktör bölgeden alınıp transfer edilmesi, gelecek için umut vadeden tedavi yöntemlerindendir (20). Yaşla birlikte ONE rejenerasyon kapasitesi azalmakta ve olfaktör epitel küçülerek metaplastik değişikliklere uğramaktadır (8, 21, 22).

Mikrovillus hücreleri, en az bulunan hücre grubudur (3, 23). Apikal membranlarında mukus içine kadar uzanan mikrovilluslar vardır (24). Taban kısmından çıkarak lamina propriaya uzanan akson benzeri uzantılarının olması ve OB'ye verilen işaretli moleküllerin bu hücrelerde gösterilmesi koku işlevinde bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (25).

Destek hücreleri, ORN'lerden sonra sık bulunan diğer bir hücre grubudur. Elektrofizyolojik çalışmalarda birbirleriyle elektriksel bağlantıları ve aksiyon potansiyelleri olduğu gösterilmiştir (26, 27). Mukus salgılanmasında, kimyasalların metabolizmasında, olfaktör nöronlardan kokuların uzaklaştırılmasında görev yaptığı düşünülmektedir (28-30).

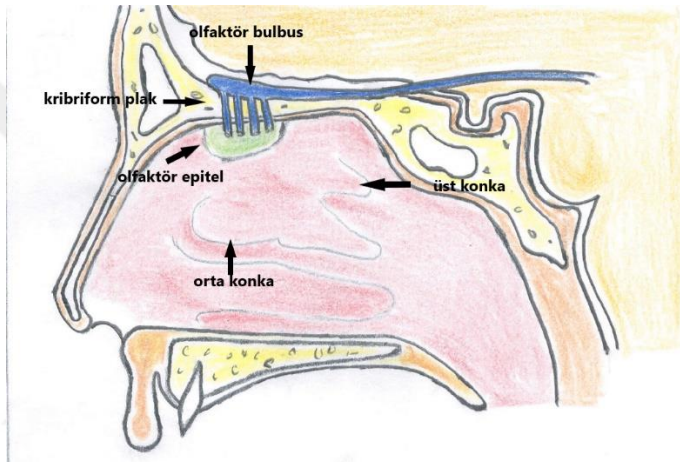
Bazal hücreler, kök hücre işlevi gören, olfaktör epitelin tüm kısımlarını yeniden oluşturabilen hücre grubudur (8). Horizontal ve küresel (*globose*) olmak üzere iki tip bazal hücre vardır (7).

Olfaktör epitelin altındaki lamina propria da bulunan Bowman bezleri mukus salgılar; ayrıca daha önce bahsettiğimiz gibi destek hücreleri de koku moleküllerine cevap olarak mukus salgılar (30, 31). Bu mukus komşu respiratuvar mukozadaki goblet hücrelerin ürettiği mukus ile karışır (13). Büyük ölçüde sudan oluşur ancak mukopolisakkarit, tuz ve protein de içerir (13). İçeriğindeki *odorant-binding-protein* (OBP) denilen şaperon proteinler koku reseptör bağlantısını kolaylaştırır (13). Olfaktör mukus tabakasında OBP dışında başka proteinler ve antikorlar da bulunur. Olfaktör liflerin geçtiği küçük delikler beyine doğrudan yayılım imkanı sağladığı için mukusun bir diğer görevi bu geçişi engelleyecek bir koruyucu tabaka oluşturmaktır (32). Farklı hastalıklarda bu mukus konsantrasyonu ve içeriği değişiklikler gösterebilir (33, 34).

Olfaktör yarık üstte kribriform plak, lateralde üst konka, medialde üst septum ile sınırlandırılan alandır (13). Uzun zamandır ONE'nin sadece bu bölgeye sınırlı olduğu düşünülmüştür ancak özellikle erken yaşlarda bulunduğu lokalizasyon farklılık gösterebilir (35). Gençlerde erişkin fonksiyonel ORN'ler orta konka yapışma yerinin ön kısmına kadar uzanabilir (36, 37). İlerleyen yaşla birlikte dejenerasyon ve metaplaziye bağlı olarak, ONE'nin sadece kribriform plağın altında olduğu gösterilmiştir (35). Gençlerde olfaktör epitel 2-5 cm² alanı kapsar ve yaşla beraber azalır (13). Bu bölgelere yapılacak olan cerrahi işlemler esnasında bu anatomik farklılıkların göz önüne alınması ve özellikle erken yaşlarda anteromedialde dikkatli davranılması iyatrojenik koku kaybını engellemede önemlidir.

2.1.2 Olfaktör Bulbus

Olfaktör bulbus, olfaktör nöronların sinaps yaptığı ön kafa tabanında bulunur. (Şekil 2) Olfaktör sistemin ilk durak noktası, primer olfaktör beyin ağının en önemli kısmıdır. Kribriform plağın superiorunda orbitofrontal korteksin dorsalinde yer alır (13).



Şekil 2. Olfaktör bulbus

OB çeşitli tabakalardan oluşur. Dıştan içe doğru bu tabakalar şu şekildedir:(8)

1. Olfaktör sinir tabakası
2. Glomerüler tabaka
3. Dış pleksiform tabaka
4. Mitral hücre tabakası
5. İç pleksiform tabaka
6. Granüler hücre tabakası

Glomerüler tabaka yuvarlak böbrek benzeri glomerüllerden oluşur (8). Bu glomerüllerde mitral ve tufted hücrelerin dendritleri olfaktör nöronların aksonları ile sinaps yapar (7). Glomerüllerin etrafında inhibitör özellikle periglomerüller hücreler vardır (7).

Dış pleksiform tabaka, mitral ve tufted hücrelerin ve inhibitör ara nöron olan granül hücrelerin dendritlerini içerir (8).

Mitral hücre tabakası, mitral hücrelerin gövdesinin bulunduğu tabakadır (7). Mitral hücreler glomerüllere tek bir dendrit gönderirken dış pleksiform tabakaya birden fazla dendrit gönderirler (7). Aksonu olfaktör trakta katılır (7).

İç pleksiform tabaka, mitral ve tufted hücrelerin aksonu ile granüler hücrelerin dendritlerini içerir (7).

Granüler hücre tabakası, granüler hücrelerin gövdesini içerir (7). Granüler hücrelerin aksonları yoktur ve dendritleri diğer tabakalara uzanır (7). Bir ara inhibitör nörondur ve bağlantıları ile mitral ve tufted hücreleri kontrol eder.

2.1.3 Üst Koku Yolları

Bulbustan çıkan lifler traktus olfaktorius olarak ilerler ve stria olfaktoria medialis ve lateralis olarak ikiye ayrılırlar. Bazen ince bir stria intermediate de olabilir (7). Koku duyusu, talamusa uğramadan kortekse ulaşan tek duydur (7).

Medial ve lateral lifler; medial ve lateral olfaktif alan denilen bölgelere giderler. Medial olfaktif alan beyinde hipotalamusun anterior ve superiorunda yerleşen, septum pellucidum, gyrus subcallosus, olfaktif trigon, anterior perforated

substansın medial ve lateral kısımları ve amygdaloid çekirdekten oluşan bir grup çekirdektir (38). Medial ve lateral olfaktif alandan çıkan ikincil lifler hipokampus, talamus, hipotalamus ve beyin sapına giderek otonomik yanıtları düzenlerken lateral olfaktif alandan çıkan ikincil lifler temporal lobun hipokampal gyrusu ve frontal lobun gyrus singulatusuna giderler (38).

Stria olfactoria lateralis ana santral olfaktör yoldur ve ağırlıklı olarak mitral hücrelerin aksonları tarafından oluşturulur. Olfaktör kortekse uzanır (8). Olfaktör korteks; anterior olfaktör çekirdek, olfaktör tüberkül, periamygdaloid korteks, amygdaloid çekirdekler, piriform korteks ve entorhinal korteksten oluşur (8, 39).

Piriform korteks; kokuların algılanmasında ve işlenmesinde anahtar rol oynayan bölgedir (40). Ayrıca koku hafızasında rol oynar (41). Entorhinal korteks hipokampusa komşudur ve arasında bağlantılar mevcuttur (42). Koku hafızasının oluşumunda rol oynar (42). Koku duyusu ile limbik sistem arasında güçlü bir ilişki mevcuttur; bu kokunun duygu ve davranışlar üstündeki etkisini açıklamaktadır (13, 40, 42).

2.1.4 Vomeronazal Organ

Memelilerde bazı koku ve feromonların uyardığı ve aksesuar olfaktör bulbusa lifler gönderen vomeronazal organ (VMO) mevcuttur (43). Bazı insanlarda da septum inferiorunda bulunan VMO'nun, insanlarda santral bağlantısı gösterilememiştir (44, 45). VMO insanda nonfonksiyonel kabul edilse de bazı feromonları tanıdığı ve bazı uyarılara karşılık nöroendokrin sistem gibi işlev gördüğünü düşündürten çalışmalar mevcuttur (46-48).

2.2 Farelerde Koku Anatomisi

Memelilerde türler arası benzerliklere rağmen burun yapıları farklılıklar içermektedir. Kemirgenlerde de, köpek gibi türlerde olduğu gibi koku alma işlevi çok önemlidir ve bunlar makrosmatik olarak adlandırılırlar (49). Bu makrosmatik hayvanlarda geniş bir olfaktor epitel ve karışık konka yapıları vardır (49). Kemirgenlerde nazal boşluğun solunum ve koku sistemine yardımcı görevleri vardır. Alınan havayı ısıtır, nemlendirir ve filtreleyip solunum yoluna ve koku reseptörlerine yönlendirir (50).

Fare nazal boşluğu iki burun deliği ile dışarıya açılır. Bu deliklerin üst tarafında filtrum ile birbirlerinden ayrılan nazal tüberküller mevcuttur (51). Bu tüberküller parmak izi gibidir, kıvrımları her hayvana özgü karakteristik özellikler içerir (51). Burun deliklerinden başlayan nazal boşluk arkada nazofarinkse kadar uzanır ve septum ile simetrik iki parçaya bölünür (52). Septumun ön kıkırdak kısmı burun deliklerinin kıkırdağı ile birleşirken, kemik kısmı; vomer, etmoid kemik, nazal kemik ve frontal kemik ile birleşir (51). Burun boşluğu kraniyalden kaudale doğru dört bölgeden oluşur: vestibül, nazal valv, nazal boşluk, nazofarinks (51).

Nazal boşluk; konkaları oluşturan kemikler tarafından çevrelenmiştir. Bu yapıların kompleksliği türün olfaktör kapasitesi ile ilgilidir (53). Nazal boşluğun çoğunu dolduran konkalar, kemik ya da kıkırdak yapıdadırlar (51). *Concha nasalis dorsalis* nazal kemikten, *concha nasalis medialis* ve *ventralis* maksiller kemikten oluşmuştur (51). *Labyrinthus ethmoidalis*, etmoid kemik lamina kribrozasından köken alır ve ince bir kemik lamelle çevrili yüksek kanlanmaya ve inervasyona

sahip mukozası vardır. Konkaların yapısına katılır. Olfaktör fonksiyon ile ilgilidir (54).

Kemirgenlerde olfaktör mukoza nazal boşluğun kaudodorsalinde bulunur (55). Nazal septumun ventralinde vasküler boşlukların oluşturduğu şişme cisimcikleri vardır, bu şişme cisimcikleri alınan havanın nazofarinks veya olfaktör girintiye yönlendirilmesini sağlar (56).

Kemirgen nazal boşluğunda dört tip epitel vardır: skuamöz, transisyonel, respiratuvar, olfaktör. Skuamöz ve transisyonel epitel sadece nazal boşluğun giriş kısmında bulunur, geri kalan kısımlarda respiratuvar ve olfaktör epitel mevcuttur (57). Nazal boşluğun yaklaşık %50'sinin epiteli, olfaktör epiteldir (57). Nazal septumun kaudodorsal üçte birlik kısmı, maksilloturbinateler, nazoturbinateler, ethmoturbinatelerin dorsal yüzeyi ve kaudolateral nazal duvar olfaktör epitel ile örtülüdür (57).



Şekil 3. Sarı-kahverengi renkli olfaktör epitel (sağ burun boşluğu sagital kesit, beyin çıkartılmış)

2.3 Koku Fizyolojisi

Kokunun algılanması için ilk olarak hava akımının içindeki koku moleküllerinin burun içindeki olfaktör bölgeye ulaşması gerekir. Bu molekülleri taşıyan hava akımı anteroposterior yönde ise ortonazal yol ile, posteroanterior yönde ise retronazal yol ile koku alınır (13). Retronazal olfaksiyonun özellikle yeme içme esnasında aromaların algılanması ve daha kaliteli tat alınması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (58).

Ortonazal akımın %15'ten daha az bir kısmı olfaktör yarığa yönelir (59-61). Toplam nazal hava akımını ve nazal direnci ölçen standart rinomanometrik teknikler olfaktör fonksiyonlar ile uyumlu değildir (62, 63). Nazal boşluğun bazı önemli noktalarındaki anatomik problemler (nazal valv, olfaktör yarık) nazal akımı değiştirmese bile ONE'ye yönelen akımın miktarında büyük değişiklikler yapabilir (9). Koklama hareketi ile hava akım hızı ve volümü artırılır ve ayrıca oluşan türbülans nazal akım koku fonksiyonlarını artırır (64).

Yaklaşık 50 µm kalınlığında ince bir mukus tabakası ONE üstünde bulunur ve koku molekülleri bu mukus tabakasının içine girerek ORN'ler tarafından algılanırlar (13). Mukus tabakasına girdikten sonra algılanma özelliği molekülün kimyasal özellikleri, çözünübilirliği ve mukus tabakasının özellikleri ile ilişkilidir. Mukus tabakasında bulunan OBP, hidrofobik olan koku moleküllerinin konsantrasyonu artırır ve reseptör ile etkileşimlerini sağlayacak çevre düzenlemesini yaparak molekül-reseptör ilişkisinin kurulmasına katkıda bulunur (65). Düşük molekül ağırlıklı çözünübilir proteinlerdir (13). Koku moleküllerinin

havaya göre konsantrasyonunu 10.000 kata kadar artırabilirler (66, 67). Ayrıca koku iletimi sağlandıktan sonra reaktif oksidanları ortamdan uzaklaştırır (68). Olfaktör bölgedeki mukus ayrıca ORN'lerin dendritlerini ve silyalarını koruyarak dış ortamdan mümkün olduğunca az etkilenmesini sağlar (32).

Olfaktör reseptör gen ailesi yaklaşık 1000 gen içerir ve insan genomunda toplam genlerin %1'ünü oluşturur (69, 70). Olfaktör reseptörleri kodlayan bu genler insan genomundaki en büyük gen ailesidir (71).

Koku ile ilgili üç reseptör olduğu düşünülmektedir: Olfaktör reseptör (OR), *putiative feromen reseptör*, *trace amine-associated receptor* (TAAR) (72, 73). Beş alt tipi bulunmuş olan TAAR'ı eksprese eden nöronlar OR eksprese etmezler. Tam işlevini anlamamız için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (73, 74).

Olfaktör reseptörler, G-protein reseptör ailesinin bir üyesidirler ve bu G proteini sadece olfaktör epitelde bulunur (Golf) (75). Bu G protein reseptörü dendritik silyaların yüzeyinde bulunur. Reseptöre koku molekülü bağlandıktan sonra Golf tarafından adenilat siklaz aktive edilir. Aktive olan adenilat siklaz, adenosin trifosfatı siklik adenosin monofosfata (cAMP) dönüştürür. cAMP sodyum ve kalsiyum kanallarını açar, bu iyonlar hücre içerisine girer ve hücre depolarize olur. Ayrıca kalsiyumun hücre içine girmesi kalsiyum bağlı klor kanallarının da açılmasını sağlar ve klor hücre dışına çıkar, bu da depolarizan etki yaratır. Oluşan aksiyon potansiyeli OB'ye doğru uyarıyı taşır (76, 77).

Uzun süreli koku temasında koku uyarımını engellemek ve kokuya adaptasyonu sağlamak için bir takım inhibisyon mekanizmaları da tanımlanmıştır.

Bunlardan iki tanesi artan hücre içi kalsiyumun oluşturduğu inhibisyon mekanizmaları ile oluşur (78, 79). Diğer inhibisyon mekanizmaları ise hücre içi kalsiyumun sodyum-kalsiyum kanallarından dışarı çıkması ve hücre içi cAMP'nin fosfodiesteraz ile parçalanması ile oluşur (80).

Olfaktör reseptör nöronlar sadece tek tip OR eksprese ederler (81, 82). Ancak her reseptör belirli kokuları algılayabilir (82). Yani belli kokular belli bir reseptör grubu tarafından algılanıp santrale belli bir düzen ile iletilirler (82). Aynı reseptörü bulunduran ORN'ler olfaktör bulbustaki aynı glomerüllere uzanırlar (83, 84). Benzer kokulara duyarlı reseptörler ONE'nin belirli bölgelerine toplanmışlardır (85). Ayrıca bazı kokular agonist, bazıları parsiyel agonist, bazıları da antagonist etkiler gösterirler (86, 87). İşte bu mekanizmalar ile oluşan farklı kombinasyonlar ile binlerce farklı kokuyu birbirinden ayırt edebildiğimiz düşünülüyor.

Reseptörde algılanan uyarılar glomerüllerdeki tufted ve mitral hücrelere iletilir. Bu eksitator nöronların yanında OB'de periglomerüler ve granül hücreleri gibi inhibitör nöronlarda vardır ve bunlar da koku duyusunun şekillenmesinde rol oynar (88). Aynı OR içeren ORN'lerin aksonları birleşerek stereotipik yerleşmiş biri medialde biri lateralde bulunan iki glomerülde sonlanır (84, 89). Buralarda işlenen bilgiler daha sonra santral sinir sisteminin diğer bölgelerine gönderilir.

2.4 Koku Alma Bozuklukları

Koku alma bozuklukları üzerinde giderek daha fazla durulmaya başlanan, çalışmalar yapılan bir durumdur. Uzun yıllardır klinisyenler diğer duyu

bozukluklarının yanında koku alma bozukluklarına çok fazla önem vermemişlerdir. Aslında toplum da çoğu zaman koku duyusu tam kaybolmadığı sürece koku alma ile ilgili bozuklukları çok önemsememektedir. Koku kaybı yaşam kalitesini bozar, koku duyusu bozuk olan kişiler tehlikeli gazlara maruziyet gibi kokunun fark edilmesi ile engellenebilecek kazalara yatkındırlar (90-92). Bozulmuş gıdaları fark etmezler, yeme kaliteleri bozulmuştur, beslenme ile ilgili problemleri vardır (93). Ayrıca koku kaybı ile nörodejeneratif hastalıklar dahil birçok önemli sağlık problemini ilişkilendiren kanıtlar giderek artmaktadır (6, 94). Bu yüzden özellikle bu bölge hastalıkları ile yakından ilgilenen Kulak Burun Boğaz (KBB) uzmanlarının bu sorunu dikkatle ele alması, tanı ve tedavisini düzenlemesi önemlidir.

2.4.1 Tanımlar

Genel olarak koku alma bozukluklarını niteliksel (kalitatif) ve niceliksel (kantitatif) olarak sınıflandırabiliriz (1). Niceliksel bozukluklarda kokunun kalitesi bozulmaz, koku alma gücü azalırken; niteliksel bozukluklarda koku alma gücünden ziyade algılamada farklılıklar vardır. Niteliksel değişiklikler genelde niceliksel değişikliklerle bir arada bulunurlar (1).

Koku alma bozuklukları ile ilgili tanımlar şu şekildedir:(1)

Normozmi: Normal koku fonksiyonu

Hipozmi: Niceliksel olarak azalmış koku fonksiyonu

Fonksiyonel anozmi: Niceliksel olarak azalan koku duyusunun günlük hayatta işe yarar bir işlevinin olmaması

Spesifik anozmi (parsiyel anozmi): Belirli bir kokuya karşı niceliksel olarak koku fonksiyonunun azalması; ancak diğer kokuları almada bir problem yoktur. Genelde klinik önemi az olan fizyolojik bir durum olarak düşünülür (95).

Hiperozmi (superozmi): Koku duyusunun niceliksel olarak artarak normal seviyelerin üzerine çıkması. Nadir olsa da migren gibi bazı durumlarda görüldüğü gösterilmiş (96).

Parozmi (Disozmi, kakozmi, öozmi, tropozmi): Bir koku uyarının niteliksel olarak farklı algılanması

Fantozmi: Olmayan bir kokuya karşı oluşmuş niteliksel işlev bozukluğu (koku halisünasyonu)

Ortonazal olfaksiyon: Nazal hava akımının içindeki koku molekülleri aracılığıyla algılanan koku alma

Retronazal olfaksiyon: Nefes verme ya da yutkunma esnasında orofarinksten nazofarinkse geçen hava içindeki koku moleküllerinin olfaktör yarığa ulaşması ile algılanan koku alma; lezzet algısının temelini oluşturur.

Literatürde yukarıdaki tanımlamalar ile ilgili bazı farklılıklar vardır. Parozmi genelde bir uyarı varlığında bu uyarı ile ilgili niteliksel işlev bozukluklarını tanımlamak için kullanılsa da niceliksel işlev bozukluklarını içine alacak şekilde geniş anlamda kullananlar da mevcuttur (97). Disozmiyi koku ile ilgili niteliksel niceliksel tüm bozukluklar için kullananlar olsa da genellikle parozmi ile eş anlamlı kullanılır (98). Kakozmi olan ya da olmayan duyuyu niteliksel olarak kötü bir duyu olarak algılamadır ve parozmi, fantozmi veya ikisinin başlığı altına alınabilir (97-

99). Özmi de ise olan bir duyu iyi bir duyu olarak algılandığı için parozmi başlığı altında ele alınmalıdır (100). Tropozmi ise parozmi ile eş anlamlı olarak düşünülebilir (97).

Çoklu kimyasal hassasiyet (*multiple chemical sensitivity*), kişilerin çeşitli kimyasallara düşük doz maruz kaldıktan sonra ortaya çıkan çeşitli düzeylerdeki subjektif semptomları içeren bir tablodur (1). Organik bir durumdan daha çok psikolojik bir durum gibi düşünülmektedir (1).

2.4.2 Koku Alma Bozukluklarının Sınıflandırılması

Koku alma bozuklukları, işitme kayıplarında olduğu gibi anatomik olarak patolojinin mevcut olduğu yere göre sınıflandırılabilir (1):

İletim tip kayıplar: Koku molekülleri burundaki bir obstrüksiyon sebebiyle ONE'ye ilerleyemez, iletimde bir problem vardır.

Sensörinöral kayıplar: ONE veya olfaktör sinirde hasar ya da kayıp mevcuttur.

Santral disfonksiyon: Santral sinir sisteminin olfaktör iletim yollarında mevcut hasar ya da kayıp sebebiyle koku alma bozukluğu mevcuttur.

Ancak yukarıdaki sınıflandırma koku alma bozukluğunu anlamada bizi sınırlandırabilir. Çünkü koku alma bozuklukları çoğu zaman iç içe geçmiştir. Örneğin kronik rinosinüzit (KRS) burun ve paranazal sinüslerin sık gözüken inflamatuvar bir hastalıktır. Mukozada ödem veya nazal polipler sebebiyle olfaktör yarığa koku moleküllerinin ulaşamaması sebebiyle koku kaybı oluşabilir

(101). Bu bir iletim tipi koku kaybıdır. Ayrıca KRS’de mevcut ONE’deki inflamasyonun da ONE’de hasara yol açtığı ve ayrıca KRS’li hastalarda OB volümünün azaldığı gösterilmiştir (102-104). Yani aslında KRS’li hastalardaki koku kaybında iletim, sensörinöral ve hatta santral problemlerin iç içe geçtiği söylenebilir (1).

İşte bu kısıtlamaları aşmak için koku alma bozuklukları genellikle sık görülen etiyolojik sebeplere göre ele alınıp sınıflandırılır. Literatürde koku kaybına yol açan çok fazla durum olsa da en sık görülen etiyolojik sebepler şunlardır:(1)

-Sinonazal hastalıklara ikincil oluşan koku alma bozuklukları

-Postenfeksiyöz koku alma bozuklukları (PEKAB)

-Posttravmatik koku alma bozuklukları (PTKAB)

-Nörolojik hastalıklarla ilişkili koku alma bozuklukları

-İlaç/toksin maruziyeti ile ilişkili koku alma bozuklukları

-Konjenital koku alma bozuklukları

-Yaş ile ilişkili koku alma bozuklukları

-İdiyopatik koku alma bozuklukları

-Diğer olası sebepler: İyatrojenik hasar (sinonazal veya kafa tabanı cerrahisi, larinjektomi), tümörler, çoklu sistemik komorbid hastalıklar

2.4.2.1 Sinonazal Hastalıklara İkincil Gelişen Koku Alma Bozukluklar

Rinosinüzitler sinonazal hastalıklara bağlı oluşan koku kayıplarının en sık sebebidir (1). En sık nazal polipli KRS ile birlikte görülür bunu nazal polipsiz KRS, non-alerjik rinit, atrofik rinit, alerjik rinit takip eder (105). Rinosinüzit ve Nazal Polipler Üzerine Avrupa Durum Raporu ve Amerikan Otolaringoloji ve Baş Boyun Cerrahisi Akademisi kılavuzlarına göre KRS’de niceliksel koku alma bozukluğu anahtar semptomlardandır (106, 107).

Sinonazal hastalıklarda koku alma bozukluğu yavaş yavaş gelişir ve dalgalı seyir gösterir (108). Genelde tedavisiz iyileşmez ve sıklıkla parozmi ile ilişkili değildir (109-111). Yukarıda bahsedildiği gibi koku moleküllerinin ONE’ye iletiminde sorun olmasının yanında ONE ve OB’de remodelling gelişir. Bu nedenle sinonazal olfaktör bozukluklar mümkün olduğu kadar erken tedavi edilmelidir (13).

Tam nazal obstrüksiyonlarda koku kaybı oluşur. Olfaktör yarığa ulaşmak için havanın orta konka mediali ve anteriorundan geçtiği düşünülmektedir ve bu bölgedeki tıkanıklıklar koku kaybına yol açar (112). Bu tıkanıkların açılması ile koku yeteneği geri döner, minimal nazal açıklıkta bile koku fonksiyonlarının geri kazanıldığı gösterilmiştir (113).

2.4.2.2 Postenfeksiyöz Koku Alma Bozuklukları

Üst solunum yolu enfeksiyonları koku alma bozukluklarının sık görülen sebeplerindendir (1). Orta ya da ileri yaş kadınlarda erkeklerden daha çok gözükür ve bunun ONE’nin rejenerasyon kapasitesinin azalması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (1, 103). Kadınların yatkınlığının sebebi de daha fazla üst

solunum yolu enfeksiyonu geçirmeleri ile açıklanmıştır. Enfeksiyonlarda genellikle koku almada bir bozukluk oluşur; ancak bu duruma PEKAB dememiz için koku alma bozukluğunun diğer enfeksiyon bulguları geçtikten sonra da devam etmesi gerekmektedir (13, 114). Genellikle birden oluşur ve bazen kişiler enfeksiyon geçirdiğinin farkında değildir, bu nedenle idiyopatik olarak sınıflandırabilir (1). Genellikle dalgalanma göstermeyen ve enfeksiyon sonrası birinci ve üçüncü aylar arasında ortaya çıkan bir parozmi vardır (109). Sıklıkla iyileşse de ve prognozu diğer etyolojik sebeplere göre daha iyi olsa da bazen kalıcı olarak koku kaybı oluşabilir (115). İlk başta oluşan koku kaybının şiddetli olduğu olgularda iyileşmenin daha iyi olduğu gösterilmiştir (116). Ayrıca genç yaş, kadın cinsiyet, sigara içmemek ve parozmi net olmasa da iyileşmede pozitif prediktörlerdir (117-119).

En sık virüslerle oluşsa da bakteri, mantar ve mikrofilarya gibi diğer nadir mikroorganizmalar da koku alma bozukluğuna yol açar (98). Patofizyolojik mekanizması tam anlaşılamamıştır. Genellikle ONE'nin hasarlanması ve patojenlerin santral iletim yollarına olfaktör sinir yoluyla transmisyonu ile koku alma bozukluklarının oluştuğu düşünülmektedir (120, 121). PEKAB olan hastalardan alınan biyopsilerde nöroepitelin respiratuvar epitele ve metaplastik skuamöz epitele farklılaştığı gösterilmiştir (103, 122). Kalan ONE'de de ORN sayısı azalmış ve düzensizlikler vardır (103).

2.4.2.3 Posttravmatik Koku Alma Bozukluğu

Posttravmatik koku alma bozukluğu (PTKAB) kalıcı görülen koku kaybının sık sebeplerindendir (1). Travma sonrası koku kaybının oluşmasındaki başlıca sebepler; etkilenen burundaki bir tıkanıklığın koku moleküllerinin ONE'ye ulaşmasını engellemesi, ONE'nin doğrudan hasarlanması ve ödemlenmesidir (123). Diğer sebepler; olfaktör sinir liflerinin kribriform plakta hasarlanması ve santral bölge olfaktör yollarının intraparaklimal bir yaralanma sebebiyle görevlerinin yapamaması, bilgiyi işleyememesidir (124, 125).

Major ya da minör kafa travması sonrası koku kaybı geçirme oranı erişkinlerde %5-10 arasındadır (126, 127). Çocuklarda ise travma sonrası geçici kayıp %3,2, kalıcı kayıp %1,2 oranında görülür (128). Travmanın şiddetine göre koku kaybı gelişme ihtimali artmakla birlikte bazen hafif travmalarda bile kalıcı anozmi gelişebilir (126). Frontal travmalardan sonra koku kaybı daha sık görülmesine rağmen anozmi oksipital travmalardan sonra daha sık görülmektedir (129).

Hastalarda, koku kaybı travma sonrası birden olabileceği gibi kademeli bir şekilde de gelişebilir (124). Bu hastalarda koku bozukluğu şiddetlidir ve koku alma nicel olarak azalmıştır, genelde dalgalı seyir görünmez (109). Ayrıca fantozmi gibi niteliksel bir fonksiyon bozukluğu da oluşabilir (109, 130, 131). Prognozu genelde kötüdür. Hasarın şiddetine göre değişmekle beraber %30 oranında iyileşme görülür (115, 126, 131-133).

2.4.2.4 Nörolojik Hastalıklarla İlişkili Koku Alma Bozuklukları

Nörolojik hastalıklar ve koku alma bozuklukları arasındaki ilişki ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bilgi birikimi artmaya başlamıştır. Koku alma bozuklukları; epilepsi, inme, myastenia gravis gibi nörolojik hastalıklarla ilişkili olmakla birlikte en sık Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla birliktelik gösterir (134-138).

Gerçekten de Parkinson hastalığında koku alma bozukluğu istirahat tremorundan daha sık görülür ve motor semptomlardan daha erken ortaya çıkar (139-142). Parkinson hastalarının %96,7'sinde koku alma bozukluğu mevcuttur (%45 fonksiyonel anozmi, %51,7 hipozmi) (142). Fonksiyonel görüntüleme çalışmalarında Parkinson hastalarında amigdala ve hipokampusta koku uyaranlarına kontrol grubuna göre azalmış cevap vardır (143). OB, anterior olfaktör çekirdek gibi santral koku bölgelerinde Lewy cisimciklerinin birikimi ve azalmış nöral yoğunluk vardır (136, 144). Antiparkinson ilaçlar koku alma bozukluğunda bir iyileşmeye yol açmaz (145).

Alzheimer hastalığında koku kaybı %80-90 oranında görülür ve hastalığın ilk görülen belirtilerinden olabilir (146). Hatta bazı çalışmalara göre koku tanımlama bozuklukları hafif kognitif bozukluğu öngörmeye kullanılabilir (147). Alzheimer hastalığı ilerledikçe koku kaybı da ilerler ancak hastalar bunun farkında değildirler. Genelde Alzheimer hastalığında, hipozmi anozmiden daha sık görülür (146).

Alınacak biyopsilerin ve nazal salgıların Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tanısında yardımcı olacağı düşünülmekle beraber bununla ilgili yapılan çalışmalardan kesin bir sonuç alınamamıştır (103, 148-154).

2.4.2.5 Konjenital Koku Alma Bozuklukları

Doğuştan itibaren olan koku alma bozuklukları koku alamama sebeplerinin nadir bir etiyolojisini oluşturur. Özelleşmiş kliniklere başvuruların %5'inden azında etiyolojide konjenital sebepler vardır. Spesifik anozmi sadece belli kokulara karşı oluşmuş anozmidir, klinik önemi yoktur, psikolojik bir özellik olarak düşünülür ve bunları konjenital koku kayıpları içinde değerlendirmemek gerekir (95). Bazı genetik bozukluklarda doğuştan koku alma bozukluğu olabilir. Bunlardan en bilineni hipogonadotropik hipogonadizm ile koku kaybının birlikte olduğu Kallmann sendromudur. Bir sendromun parçası olmayan, izole koku kaybı ile kendini gösteren genetik sebep bulunamamış, doğumsal koku kayıpları da olabilir. Bu izole koku kayıplarında tanı diğer etiyolojik sebepleri dışlayarak ve çekilen manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gelişmemiş OB ve olfaktör yarığın gösterilmesi ile konulur (155). Bu nonsendromik koku alma bozukluklarının sıklığının sendromiklerden daha fazla olduğu düşünülmektedir (156). Konjenital koku alma bozukluğu olanlar genelde geç çocukluk ya da adolesan dönemde aile üyelerinin fark etmesi ile tanı alırlar. Diğer kemosensoöriyal işlevleri normal olan bu bireylerde normal bireylere göre hayat kalitesi azalsa da kazanılmış koku alma bozukluğuna sahip olanlar kadar etkilenmezler (157). Turner sendromu ve Bardet-Biedl sendromunda da koku alma bozukluğu tespit edilmiştir (158, 159).

2.4.2.6 Endokrin Bozukluklarla İlişkili Koku Alma Bozuklukları

Koku alma bozuklukları bazı endokrin problemlerle birliktelik gösterebilir. Bunlardan en çok bilineni Kallmann sendromudur.

Kallmann sendromu hipogonadotropik hipogonadizmin konjenital formudur ve koku alma bozukluğu ile ilişkilidir. Kallmann sendromu 12-15 yaş arası tanı alır ve erkeklerde 5 kat sık görülür; orta hat kranifasyol anormallikler, renal problemler, sensörinöral işitme kaybı ve renal anomaliler ile birliktelik gösterebilir (160). Kallmann sendromlularda doğumda şiddetli hipozmi ya da fonksiyonel anozmi vardır ve hormon tedavileri ile bu düzelmez.

Diyabet, Addison hastalığı, Cushing sendromu, hipotiroidi koku alma bozukluğunun görülebildiği diğer endokrin problemlerdir (1, 98).

2.4.2.7 İlaç/Toksin İlişkili Koku Alma Bozuklukları

İlaç ya da toksik madde hasarına bağlı koku alma bozuklukları özelleşmiş kliniklere başvuruların %4-6'sını oluşturur (161). Kadmiyum, manganez gibi ağır metaller, pestisitler, herbisitler, kemoterapötik ajanlar koku alma bozukluğuna sebep olabilirler (1). Koku alma bozukluğu doğrudan ONE'de oluşan hasar veya olfaktör sinir aracılığıyla santral bölgeye geçen toksinlerin santralde yarattığı problemler sonucu gelişir (98). Olfaktör bölgeye toksik çok fazla ilaç ve ajan tanımlansa da tedavide etkili bir ilaç henüz mevcut değildir.

2.4.2.8 Yaşa Bağlı Koku Alma Bozuklukları

Yaşlanma ile tüm diğer duylarda olduğu gibi koku fonksiyonlarında da azalma olur. Bir klinik çalışmada 80 yaş üstü bireylerin %62,5'inde koku alma bozukluğu gösterilmiştir (162). Koku alma bozukluğunun diğer tüm değişkenlerden bağımsız olarak mortalite için önemli bir risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur (6, 94, 163-165). *National Social Life Health and Aging Project*'te beş yıllık mortalite oranlarının anozmik bireylerde normozmik bireylere göre üç kat fazla olduğu bulunmuştur (164).

Yaşlılıkta gelişen koku alma bozukluklarının birçok sebebi vardır. Yaşlılıktaki fizyolojik değişiklikler burnu ve koku almayı da etkiler. Parasempatik ve sempatik disregülasyon, azalmış mukozal kan akımı, kribriform foraminalardaki fibrozis, yaş ilişkili mukosiliyer disfonksiyon bu değişikliklerden bazılarıdır (1). Ayrıca ONE, OB, ve santral yolaklarda da yaş ilişkili değişiklikler meydana gelir (166). ORN'lerde rejenerasyon kapasitesi azalmıştır ve üst solunum yolu enfeksiyonları ya da toksin maruziyeti sonrası kalıcı hasar daha kolay gelişebilmektedir (167).

2.4.2.9 Diğer Nedenler

Intrakraniyal tümörler; santral olfaktör sistem ya da komşuluğundaki yer kaplayıcı lezyonlar, niteliksel veya niceliksel koku bozukluklarına yol açabilir. Hipofiz tümörleri, suprasellar ridge menenjiomları, olfaktör yarık menenjiomları, frontal lob gliomlarına ikincil koku bozuklukları bildirilmiştir (98). Frontal kitle lezyonlarının rezeksiyonu sonrası koku bozukluklarının toparladığı söylenmektedir

(168). Olfaktör yolakların ve orbitanın yakın ilişkisi, bu bölgelerdeki lezyonlarda hem görme hem koklama ile ilgili problemlere yol açabilir. Örneğin bu bölgedeki bir olfaktör yarık menenjiomu olfaktör ve optik sinirlere bası yaparak ve intrakraniyal basıncı arttırarak Foster-Kennedy sendromuna yol açabilir (169). Bu sendromda ipsilateral olfaktör disfonksiyon, ipsilateral optik atrofi, santral skotom kontralateral papil ödem mevcuttur.

Intranazal tümörler, özellikle mekanik obstrüksiyon yaparak koku kaybı yaratırlar. Genellikle tek taraflı oldukları için kontralateral tarafın kompanse etmesi ile belirgin koku kaybı görülmeyebilir. Olfaktör nöroblastom (esteziyönöroblastom), inverted papillom, yassı hücreli karsinom koku kaybı yaratabilen intranazal tümörlerden bazılarıdır (170).

İyatrojenik sebeplerle de koku kaybı oluşabilir. Sinonazal, (septoplasti, rinoplasti, ethmoidektomi) nöroşirürjik (anterior kafa tabanı, kraniofasiyal rezeksiyon, hipofizektomi) cerrahi prosedürler sonrası santral ya da periferik koku alanlarının hasarlanması sonucu koku alma bozuklukları meydana gelebilir (171-173). Yine larinjektomi sonrası nazal hava akımının azalması sonucu koku almada azalma gelişmektedir (174).

Psikiyatrik patolojilerden en sık şizofreni ve depresyon koku alma bozukluğuna yol açar. Duygu ve koku alma yolakları santral sinir sisteminde iç içe geçmiştir. Hatta bilateral olfaktör bulbektomi depresyon modeli oluşturmak için kullanılır (175). Ayrıca OB volümü azalmış olanlarda depresyona yatkınlık ve kötü terapötik sonuçlar bildirilmiştir (90).

Sigara ve alkol de koku alma bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. Alkol bağımlılarında koku alma bozukluğu görülmektedir (176-178). Sigara da ayrıca olfaktör fonksiyonları olumsuz etkiler (179, 180). Sigaranın; ONE’de inflamasyona, ORN’de apoptozise ve ONE’nin skuamöz epitele dönüşmesine sebep olarak koku alma bozukluğu yarattığı düşünülmektedir (181, 182).

2.4.2.10 İdiyopatik Koku Alma Bozuklukları

Etiyolojide olabilecek tüm klinik durumlar dışlandıktan sonra tanı konulabilir. Özel kliniklerde sıklığı değişkenlik göstermektedir (161). Hafif veya belirtisiz geçirilmiş üst solunum yolu enfeksiyonu sonrası ya da daha tanı konulmamış nörodejeneratif hastalıklara bağlı koku alma bozuklukları, idiyopatik olarak yanlış tanı konuluyor olabilir.

2.4.3 Klinik Değerlendirme

2.4.3.1 Hikâye

Hastalığın gidişatını belirlemek, tedaviyi yönetmek ve doğru tetkikleri istemek için iyi bir hikâye olmazsa olmazdır. Öncelikle niteliksel niceliksel ayrımı yapılmalı, hipozmi mi anozmi mi olduğu belirlenmeli daha sonra santral mi periferik mi ayrımı yapılmaya çalışılmalıdır. Çoğu olguda iyi bir hikâye bizi etiyoolojiye ve tanıya yaklaştırır.

Koku kaybının süresi, başlangıcı, fluktuasyon gösterip göstermemesi sorgulanmalıdır. Yavaş yavaş ilerleyen kayıplarda sistemik hastalıklardan şüphelenilir. Koku kaybı gelişmeden önce kafa travması, üst solunum yolu enfeksiyonu öyküsü gibi durumlar sorgulanmalıdır. Koku kaybına eşlik eden sinonazal semptomların değerlendirilmesi önemlidir. Hastanın nörodejeneratif

hastalıklar açısından da hafıza kaybı gibi durumları not edilmelidir. Yakın zamanda kullandığı ilaçlar, maruz kaldığı toksik maddeler açısından değerlendirilmeli, yine etiyolojide rol oynayabilecek ek hastalıklar da sorulmalıdır. Aile öyküsü (ailede koku alma bozukluğu, nörodejeneratif hastalıklar gibi) sorgulanmalı ve koku alma bozukluğunun şiddeti günlük hayata etki düzeyi belirlenmelidir (1). Hikâyede önemli bir noktayı atlamamak adına genel bir hikâye formu hazırlanarak hikâye bu form üzerinden şekillendirilebilir.

2.4.3.2 Fizik Muayene

Koku alma bozukluğu ile kliniğe başvuran bir kişiye tüm KBB ve nörolojik muayeneler yapılmalıdır. Ayrıca nazal boşluk rijid endoskopi ile değerlendirilmelidir. Orta ve üst konka, superior septum laterali ve olfaktör yarık açılı endoskoplar ile muayene edilmelidir. Nazal dekonjestanlar veya topikal anestezi maddeler muayene yardımcı olarak kullanılabilir. Ancak lokal anestezi ajanların geçici koku kaybı yapabileceği akılda tutulmalı ve muayene sonrası koku testleri yapılacak hastalarda kullanılmamalıdır (183, 184). Olfaktör yarık değerlendirilirken bu bölgedeki polip, ödem, skarlar “Olfactory Cleft Endoscopy Scale” kullanılarak kaydedilebilir (185, 186). Basit bir nörolojik muayene de yapılmalı ancak nörolojik bir durumdan şüphelenildiği zaman uygun uzman hekime hasta yönlendirilmelidir.

2.4.3.3 Koku Değerlendirme Testleri

Koku duyusunun değerlendirilmesinde kullanılan testler literatürde farklılıklar içermektedir. Bu da aslında tanı ve tedavinin değerlendirilmesinde farklılıklara yol açmaktadır. Objektif testler olsa da kullanımı yaygın değildir.

Genel olarak koku testleri üç farklı başlık altında incelenebilir:(1)

- 1- Subjektif hasta beyanına dayanan testler
- 2- Psikofiziksel testler
- 3- Elektrofizyolojik çalışmalar ve fonksiyonel görüntülemeler

Subjektif Değerlendirme Testleri

Hastalara sorulan soruların puanlanması ile yapılan testlerdir. Vizüel analog skalası, Likert ölçeği kullanılarak bir değerlendirme yapılabilir ya da bazı hastalıkların değerlendirilmesinde kullanılan anketlerin bir kısmında yer alan koku ile ilgili sorular da kullanılabilir. Ancak bu anketlerdeki koku değerlendirmesi genelde yetersizdir, mesela KRS için kullanılan *Sino-Nasal Outcome Test – 22*'de koku sadece bir soru ile değerlendirilmektedir (187). Koku ile ilgili hastaları değerlendiren özel anketler de vardır. *Questionnaire of Olfactory Disorders* bunlardan biridir ve hipozmi normozmi ayrımını sinüs spesifik değerlendirme anketlerine göre daha iyi yapmaktadır (188).

Position Paper on Olfactory Dysfunction (PPOD) kılavuzu, subjektif koku değerlendirme testlerinin tek başına kullanımını önermemektedir (1). Yapılan çalışmalarda psikofiziksel testlerle uyumlu sonuçlar çıkmamıştır (189-195). Çünkü insanlar kendi koku duyularını iyi değerlendirememektedirler.

Psikofiziksel Testler

Subjektif testlerden daha güvenilir sonuçlar sağlarlar (1). Odyolojik testler gibi hasta cevaplarına dayandığı için hastanın teste uyum sağlayabilecek yapıda olması gerekmektedir. Ortonazal ya da retronazal yapılabilir.

Ortonazal Psikofiziksel Değerlendirme

Ortonazal fonksiyonun değerlendirildiği psikofiziksel testler ile kişinin koku alma eşiği belirlenir ve eşik üstü uygulanan kokular ile kokuları ayırt etme ve tanımlama yeteneği değerlendirilir. Koku hafızası ve hedonik skala da sorgulanabilir.

Koku alma eşiği, kişinin bir kokuyu algıladığı minimum konsantrasyon seviyesidir. Yapılan denemelerin yarısında koku algılanmalıdır. Kokuyu tanımlamasına gerek yoktur (1). Ancak genelde boş kokusuz bir uyararla karşılaştırılarak eşik belirlendiği için kısa süreli hafızaya ihtiyaç vardır ama semantik, epizodik hafıza kullanılmaz (196). Koku alma eşiğinin belirlendiği testlerde en sık n-butil alkol ve fenil etil alkol kimyasalları kullanılır.

Eşik üstü testlerde; algılama seviyesinin üstündeki konsantrasyonlarda bulunan kokuları kişinin ayırt edip tanımlaması beklenir. Ayırt etmede kokuyu isimlendirme gerekmezken tanımlamada algılanan kokunu isimlendirilmesi beklenmektedir. İpucu verilmeden isimlendirme zordur, bu yüzden genelde yazılı sözel ya da görsel seçenekler arasından seçim yapılması istenilir (197, 198). Koku tanımlamada; kültürel faktörler, eski deneyimler ve yaş önemli bir rol oynar. Bu yüzden bu testlerde bölgesel kültürel ve yaş ile uyumlu değerlilik çalışmaları yapılmış olmalıdır (199).

PPOD kılavuzuna göre psikofiziksel testler ile koku alma eşiğine ve en az bir eşik üstü test bileşenine bakılması (tanımlama ya da ayırt etme) önerilmektedir (1). Bunun sebebi; koku alma eşiği (T), ayırt etme (D), ve tanımlama (I) puanlarının

beraber hesaplanmasının daha hassas tanı konulmasını sağlamasıdır (200). Ayrıca koku eşik testlerinin daha çok periferik problemleri yansıttığı düşünülürken eşik üstü testler daha çok santral problemleri göstermektedir.

Klinik ve araştırma amaçlı farklı olfaktör komponentleri ölçen birçok test geliştirilmiştir (1). (Tablo 1) Bunlardan “*University of Pennsylvania Smell Identification Test*” (UPSIT) ve “*Sniffin’ Sticks*” en çok bilinen iki tanesidir. UPSIT testi Doty ve ark. geliştirdiği Pensilvanya Üniversitesinin koku tanımlama testidir (201). Klasik UPSIT testi Türk toplumunun koku fonksiyonlarını değerlendirmek için yetersiz bulunmuştur (202). Türk toplumuna uyarlanmış bir versiyonu da mevcuttur (203). Sniffin sticks testi yaygın olarak kullanılan bir diğer testtir (204, 205). Kobal ve Hummel tarafından geliştirilen bu test eşik bulma ve iki eşik üstü (tanımlama, ayırt etme) testi içerir. Türk popülasyonu ile ilgili geçerlilik çalışmaları yapılmıştır (206).

Tablo 1: Psikofiziksel testler (1)

Psikofiziksel Test	Değerlendirilen Fonksiyon
Sniffin Sticks	Eşik, Ayırt etme, Tanımlama
University of Pennsylvania Smell Identification Test	Tanımlama
Connecticut Chemosensory Clinical Research Center Test	Eşik, Tanımlama
T & T Olfactometer	Eşik, Tanımlama
Smell Diskettes Test	Tanımlama
Cross-Cultural Smell Identification Test	Tanımlama
Pocket Smell Test	Tanımlama
San Diego Odor Identification Test	Tanımlama
Scandinavian Odour Identification Test	Tanımlama
Smell Threshold Test	Eşik
Olfactory Perception Threshold Test	Eşik
Barcelona Smell Test (BAST-24)	Koku algılama, tanımlama, hafıza
Odourized Marker Test	Tanımlama
Snap & Sniff Olfactory Test System	Eşik
Open Essence	Tanımlama

Retronazal Olfaksiyonun Değerlendirilmesi

Lezzet ve aroma algısı retronazal olfaksiyon ile de ilişkilidir. Koku alma bozuklukları, tat alma bozukluklarına göre daha sık görüldüğü için tat ile alakalı problemler genelde retronazal olfaksiyon bozukluğundan kaynaklanmaktadır (207). Tanıyı netleştirmek adına ağız içine konulan çeşitli tatlardaki tozları (burun delikleri kapalı olacak) kişinin tanımlaması istenilir. Ayrıca tat alma duyusu da koku alma bozukluğu şikâyeti ile başvuran bir kişide değerlendirilmelidir (1).

Elektrofizyolojik ve Fonksiyonel Görüntüleme

Elektrofizyolojik yöntemler ve fonksiyonel görüntüleme koku kayıplarını değerlendirmede kullanılan subjektif ve psikofiziksel testlere göre daha objektif sonuçlar verir. Elektroensefalografi (EEG) ve elektroolfaktografi (EOG) ile bir koku uyaranına karşı ONE veya beyinde oluşan potansiyeller ölçülür (208-212).

Fonksiyonel görüntülemelerde ise bir koku uyaranına karşı oluşan beyin aktivitesi pozitron emisyon tomografi (PET) veya fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (fMRG) ile değerlendirilir (213). Her iki görüntüleme yönteminde de koku uyaranına karşı beyin kan akımı değerlendirilir (214). Radyoaktif madde kullanımı sebebiyle PET'in kullanımı fMRG'ye göre daha sınırlıdır.

Subjektif testler ve psikofiziksel testler çoğu koku kaybına klinik yaklaşımda yeterlidir. Elektrofizyolojik ve fonksiyonel görüntüleme yöntemleri daha çok klinik araştırmalar ve medikolegal amaçlar için kullanılırlar (1).

Diğer Tanı Yöntemleri

MRG ve bilgisayarlı tomografi (BT) tanıda kullanılabilecek diğer yöntemlerdendir. BT genelde sinonazal inflamatuvar hastalıklarda inflamasyonun yaygınlığının tespitinde kullanılır. BT’de olfaktör yarık opasifikasyonu koku fonksiyonları ile ilgili fikir verebilir (198). Yine koku alma bozukluğu olan hastaların değerlendirilmesinde rutin MRG istenilmesi tartışmalıdır (215). MRG ile ONE, OB ve santral yolakların değerlendirilmesi mümkündür. İntrakraniyal paranazal kitleleri gösterir. OB volümü ve olfaktör sulkus derinliği MRG ile ölçülebilir.

2.4.4 Koku Alma Bozukluklarının Tedavisi

Koku alma bozukluğu tanısı konulduktan sonra tedaviye başlamadan önce atılması gereken adımlar vardır. Öncelikle koku alamadığı için günlük hayatta karşılaşacağı problemler ve alması gereken önlemler ile ilgili danışmanlık verilmelidir. Örneğin gaz ve duman algılayıcıları evine kurulmalı, besinlerin son kullanma tarihine dikkat edilmelidir. Koku alma bozukluğu multidisipliner ve bu konu ile ilgili uzmanlar bulunduğu bir konseyde değerlendirilmelidir. Klinik buna uygun değilse hasta uygun merkezlere yönlendirilmelidir. Olfaktör disfonksiyon, toksin maruziyeti sonucu meydana gelmişse, gerekli toksinlere ya da ilaçlara kişinin maruziyeti engellenmeye çalışılmalıdır (13).

2.4.4.1 Koku Eğitimi

Farklı koku moleküllerinin günlük olarak koklatılmasına dayanan bir tedavi yöntemidir. İlk kez Hummel ve ark. tarafından 2009 yılında ayrıntılı tanımlanmış

ve posttravmatik, postenfeksiyöz ve idiyopatik sebeplerle koku alma bozukluğu yaşayan kişilerde etkinliği gösterilmiştir (216). Klasik koku eğitiminde dört odorant (gül, limon, karanfil, okaliptüs) 12 hafta boyunca uygulanırken; eğitimin farklı odorantların farklı sürelerde uygulandığı modifiye versiyonları da tanımlanmıştır (217).

Koku eğitiminin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte olfaktör rejenerasyon kapasitesini arttırarak etki gösterdiği düşünülmektedir. Düşük maliyeti ve güvenilirliği sebebiyle farklı etiyolojik sebeplerle koku alma bozukluğu yaşayan hastaların tedavisinde kullanımı önerilmektedir (1).

2.4.4.2 Medikal Tedaviler

Kortikosteroidler

Kortikosteroidler, KRS ve diğer inflamatuvar sebeplerle koku alma bozukluğu yaşayan kişilerde ilgili hastalığın kılavuzlarındaki önerileri değerlendirilerek kullanılabilir. Bunun dışındaki etiyolojilerde kullanımı ile ilgili veriler yeterli değildir. Kullanılacaksa şayet potansiyel yan etkiler göze alınmalıdır (1).

Fosfodiesteraz İnhibitörleri

Artan cAMP ile etkili olacağı düşünülmüş. İlk yapılan çalışmalarda koku fonksiyonlarını arttırdığı gösterilse de daha sonraki yapılan çalışmalarda bu etkinlik gösterilememiştir (218-221). Yan etki potansiyelleri de göz önüne alındığında klinik kullanımı sınırlıdır (1).

İntranazal Kalsiyum Tamponları

İntranazal mukus içindeki kalsiyumun koku almadaki negatif feedback etkisi baskılanırsa koku alma fonksiyonlarının iyileşeceği düşünülerek tedavide denenmiştir. Whitcroft ve ark. yaptıkları bir prospektif çalışmada postenfeksiyöz sebeplerle koku kaybı yaşayan hastalarda intranazal sodyum sitrat kullanımının etkin olduğunu göstermiştir (222). Ancak klinik kullanımı için hala kanıt düzeyi yüksek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Diğer

Koku alma bozukluğunun tedavisinde sistemik veya intranazal pek çok ajan denenmektedir; ancak bunların etkinlikleri şu an için sınırlı gözükmektedir. İntranazal A vitaminin koku eğitime eklenmesinin tek başına koku eğitiminden daha etkin olduğu bir retrospektif çalışmada gösterilmiştir (223). Yine benzer şekilde Ginkgo biloba, alfa lipoik asit, caravarine, B vitamini, statinler, çinko tedavide denenilen ancak kullanımı için henüz yeterli kanıt düzeyi yüksek verinin olmadığı ajanlardır (224-228).

2.4.4.3 Cerrahi

Sinonazal sebeplerle olan koku alma bozukluklarında altta yatan mevcut durumun cerrahi ile düzeltilmesinin koku fonksiyonlarını iyileştirebileceği düşünülmektedir. Kronik sinüzit sebebiyle oluşmuş olfaktör disfonksiyon endoskopik sinüs cerrahisi ile iyileşme göstermekle birlikte cerrahi kararı ilgili hastalığın kılavuzu doğrultusunda verilmelidir (1). Fantozmi tedavisinde olfaktör

epitelin rezeke edilmesi denenmektedir. Ancak riskli bir işlemdir ve son are olarak, deneyimli merkezlerde yapılmalıdır (229).

2.5 Kök Hücreler

Kök hücreler insan vücudunun gelişiminin embriyonik, fetal veya erişkin aşamalarında bulunan farklılaşmamış kendini yenileyebilen ve başka hücreye gelişim ve farklılaşma gösteren hücre tipidir. Embriyoda ve erişkin hücrelerde bulunabilir. Farklılaşma kapasitesi totipotentten oligopotente doğru ilerlerken azalır (230).

Farklılaşma kapasitesine göre kök hücrelerin sınıflandırmasını şu şekilde yapabiliriz:(231)

Totipotent: Tam bir bireyi oluşturabilecek kapasitedeki hücrelerdir. Zigot bu gruba örnektir.

Pluripotent: Üç germ tabakasından gelişen hücreleri oluşturabilse de tek başına tam bir organizmayı oluşturamaz. Blastokist aşamasındaki i hücre kitlesi bu gruba örnektir.

Multipotent: Daha az sayıda hücre tipine farklılaşabilir. Bulunduğu dokuya göre farklılaştığı hücre tipleri değişebilen erişkin kök hücreleri bu gruba örnektir.

Oligopotent: Birkaç farklı hücre tipine farklılaşabilir.

Unipotent: Tek bir hücre tipine farklılaşır.

2.5.1 Erişkin Kök Hücreler

Her yaştaki insanda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Bulundukları dokulara göre ihtiyaç duyulduğunda farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Kaynaklandıkları dokunun özelleşmiş hücre tiplerine dönüşmelerinin yanında köken almadıkları dokunun hücre tiplerine de dönüşebilirler (232). Farklı dokulardan kaynaklanabilirler ve bu dokulara göre isimlendirilirler. Kemik iliği, yağ dokusu, diş pulpası, beyin, karaciğer, çizgili kas, deri gibi pek çok doku, erişkin kök hücresi kaynağı olabilir (232). Günümüzde üzerinde en fazla çalışma yapılan kök hücreler; mezenkimal kök hücreler (MKH), hematopoetik kök hücreler, nöral kök hücrelerdir denilebilir.

2.5.2 Mezenkimal Kök Hücreler

Friendstein ve ark. fare kemik iliğinde kemik, yağ, kıkırdak gibi hücrelere dönüşen bir grup hücre olduğunu ortaya koymuştur (233). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu hücre grubunun in vitro olarak farklı hücre tiplerine farklılaştıkları gösterilmiş ve bu hücre grubu mezenkimal kök hücre olarak adlandırılmıştır (234). MKH'ler günümüzde birçok farklı dokulardan elde edilmiş ve bu elde edilen kök hücrelerin farklı alanlarda tedavide kullanımı ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu MKH içeren kaynaklardır. Köken aldığı dokuya göre MKH'lerin içerdiği hücre sayısı, büyüme, onarım, farklılaşma kapasiteleri ve salgıladıkları sitokinler farklılıklar içermektedir.

Günümüzde kök hücreler ile ilgili bilgi birikimimizin gelişmesiyle hücre hasarı ve yenilenmesi sürecinde kök hücre tedavileri kullanılmakta veya kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır. Tümör oluşturma ihtimali, embriyonik kök hücreler ile ilgili etik tartışmalar ve rejeksiyon ihtimali gibi kullanımını sınırlayan sebeplere rağmen; kök hücre tedavilerinin gelişiminin devam edeceği ve daha birçok hastalığın patogenezi anlamamızda ve tedavisinde kullanımının yaygınlaşacağı söylenebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından G.Ü.ET-20.048 kod numarası, 26.08.2020 tarih ve E.89045 sayılı yazı ile onaylanmıştır. Bu proje Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2020-39 proje kodu ile desteklenmiştir. Araştırma, Gazi Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi İmmünooloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezinde yürütülmüştür.

3.1 Deney Hayvanları

Çalışmada deneyin uygulandığı 36 erkek C57BL-6 fare (9-10 haftalık, 18-22 gram) ve kök hücrelerin üretildiği 5 transgenik C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)1Osb/J fare kullanılmıştır. Deneyin uygulandığı fareler İzmir Biyotıp ve Genom Merkezinden, kök hücre üretimi için kullanılan transgenik fareler Jackson Laboratuvarından temin edilmiştir. Farelerin hormonal değişimlerinin koku almayı etkilememesi adına erkek fareler seçilmiş ve laboratuvar koşullarına bir hafta uyum sağlamaları beklendikten sonra yapılan yemek bulma testi (YBT) ile koku fonksiyonlarının sağlam olduğu gösterilen fareler deneye dahil edilmiştir. Hayvanlar standart laboratuvar yemi ile ad libitum beslenmiş, 21-23 °C sıcaklıkta 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü uygulanan ortamda barındırılmışlardır.

Deney yapılan fareler randomize olarak her birinde 12 farenin yer aldığı üç gruba ayrıldı. Bu farelere koku kaybı yaratmak için 300 µg/g 3-MI uygulandı.

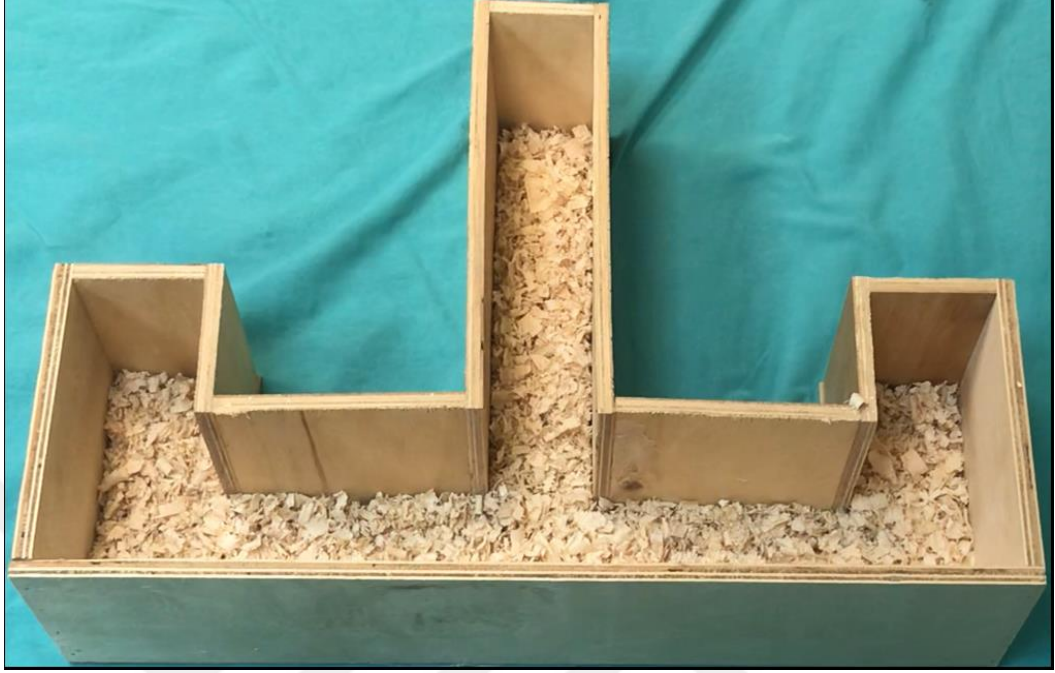
Birinci gruba; enjeksiyon sonrası 7.gün intranazal fosfat tamponlu salin (PBS), ikinci gruba yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre (YDKMKH), üçüncü gruba kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre (KİMKH) uygulandı. Gruplardaki farelerin 6 tanesi 3-MI enjeksiyonu sonrası 2. hafta, kalan fareler 4. hafta kurban edilerek incelemelerde bulundu. Tüm hayvanlara haftalık YBT yapıldı.

Tablo 2. Deney grupları

Deney Grupları	2.hafta kurban edilen fare sayısı	4.hafta kurban edilen fare sayısı
1.grup Kontrol grubu	6	6
2.grup YDKMKH	6	6
3.grup KİMKH	6	6

3.2 Yemek Bulma Testi

Daha önce çalışmalarda kullanılan YBT modelleri incelenerek tasarlandı (227, 235, 236). Hayvanlara 1 hafta öncesinden günlük, aynı marka peynirlerden birer parça verilerek tadına ve kokusuna alışmaları sağlandı. Hayvanlar 24 saat boyunca aç bırakıldı, su içmelerine izin verildi. Test için “T” şeklinde bir labirent tasarlandı. (Şekil 4)



Şekil 4. T şeklinde tasarlanmış labirent

Tabanı kafeslerindeki aynı talaş ile kaplanan labirentin bir ucuna, talaşların altında olacak şekilde peynir (2x1cm) saklandı. Test yapılan fare T'nin başlangıç noktasına bırakıldı ve peynirleri bulma süreleri kaydedildi. Her testte, kullanılan talaş ve peynir değiştirildi. Bir fareye test 5 kez uygulandı. Tüm yapılan işlemler video ile kayıt altına alındı. 3 dakika içerisinde peyniri bulamayan fareler “kaldı” kabul edildi. Kalan farelerin test süresi 180 saniye olarak kaydedildi. Her 5 testin üçünde 3 dakika içerisinde peyniri bulamayarak kalan fareler başarısız kabul edildi. Test tüm farelere aynı yerde yapıldı ortam sessiz idi. İlk test 3-MI enjeksiyonu öncesi koku fonksiyonları değerlendirmek için (YBT 1), 2. test 3-MI sonrası 1. hafta anozmiyi göstermek amacıyla (YBT 2), daha sonra haftalık olarak yapıldı. (Tablo 3)

Tablo 3. Yemek bulma testleri

1.YBT	Koku fonksiyonlarının sağlam olduğunu göstermek için 3-MI enjeksiyonu öncesi
2.YBT	3-MI enjeksiyonundan 1 hafta sonra
3.YBT	2.hafta
4.YBT	3.hafta
5.YBT	4.hafta

3.3 Koku Kaybını Oluşturulması

Daha önceki çalışmalarda uygun dozlarda 3-MI'nın olfaktör epitele sınırlı nekrotizan bir lezyon oluşturarak koku kaybı yarattığı gösterildiği için biz de çalışmamızda 3-MI kullandık (227, 235-238). 3-MI uyguladığımız zaman dilimi çalışmamızda 0.hafta olarak kabul edilmiş bundan sonraki zamanlar buna göre belirtilmiştir. Koku fonksiyonları YBT ile test edilen ve koku alma bozukluğu olmayan hayvanlara 300 µg/g 3-MI (Sigma-Aldrich, ABD) intraperitoneal (İP) olarak tek doz enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası hayvanlar yakın takip edildi, davranışları gözlemlendi ve 1.hafta YBT ile anozmi olup oluşmadığı değerlendirildi.

3.4 Kök Hücre Elde Edilmesi ve Kök Hücre Uygulanması

Kök hücreler, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarında Uluslararası Hücresel Tedavi Topluluğunun mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu ile ilgili yayınladıkları kriterler baz alınarak, daha önce yapılan üretimler ile karakterizasyonları ve farklılaşma kapasiteleri gösterilerek standardize edilmiş yöntem ile üretildi (239).

İki farklı kök hücre üretildi ve karakterize edildi. Her bir kök hücre üretilmesi için farklı bir deneysel yöntem kullanıldı.

3.4.1 Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Üretilmesi

Kullanılan tüm malzeme ve solüsyonlar steril olarak satın alındı veya otoklavda steril edildi. YDKMKH'ler Qi ve ark. tarafından yayınlanan yöntemin modifikasyonu ile üretildi (240). Yeşil floresan protein (YFP) transgenik farelerin steril şartlar altında inguinal bölgelerinden alınan yağ dokusu Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi) içinde, steril kaplarda toplandı. Küçük parçalar halinde hazırlanan yağ dokusu 2 mg/ml tip I kollejenaz enzimi (Sigma-Aldrich, ABD) içeren tampon çözeltide mekanik olarak parçalandı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 70 µm porlar içeren hücre filtresinden geçirildikten sonra, 1200 rpm de iki kez santrifügasyon ile yıkandı. Besi yerinde karıştırılarak hazırlanan hücre süspansiyonu, steril hücre kültürü flasklarına (Greiner Bio-one, Almanya) ekildi. Besi yeri olarak penisilin/streptomisin, L-glutamin (Sigma-Aldrich, ABD) ve %10 fetal bovin serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich,

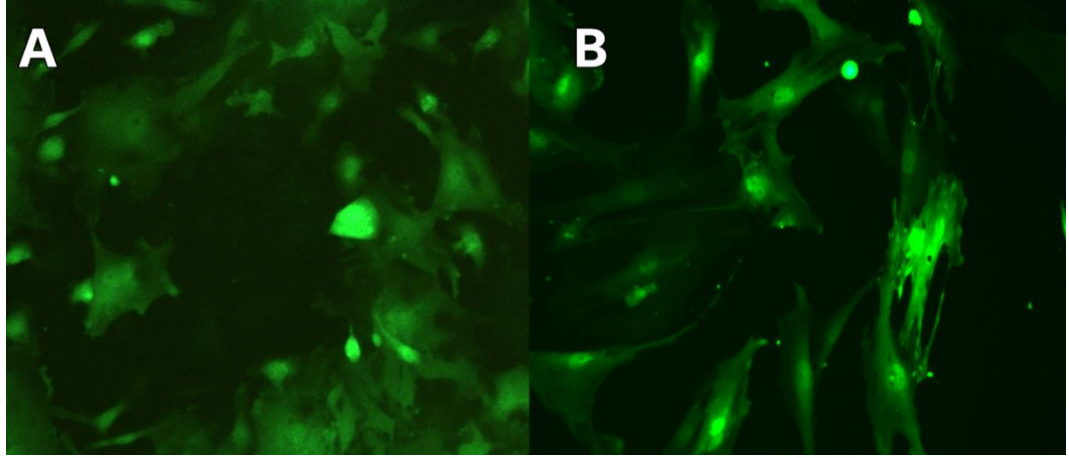
ABD) kullanıldı. Hücreler 37°C’ de %5 CO₂ içeren inkübatör (Sanyo, Japonya) içinde inkübe edildi. İnkübasyon sırasında her üç günde bir besi yeri değiştirildi. Flasklarda yeterli doluluk sağlandıktan sonra yapışarak üreyen hücreler Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, ABD) ile kaldırıldıktan sonra tripsin aktivitesi inhibe edilip pasajlama yapılarak yeni flasklara aktarıldı.

3.4.2 Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Üretilmesi

Kullanılan tüm malzeme ve solüsyonlar steril olarak satın alındı veya otoklavda steril edildi. KİMKH’ler, Tropel ve ark tarafından yayınlanan bir yöntemin modifikasyonu ile yapıldı (241). Kemik iliği temini için steril şartlar altında her iki farenin femur ve tibia kemikleri kullanıldı. Kemiklerin epifizleri ayrıldıktan sonra, antibiyotik içeren besi yeri (DMEM) ile yıkanarak kemik iliği aspire edildi. Kemik iliği aspiratları 70 µm porlar içeren hücre filtresinden geçirildikten sonra, 1200 rpm de iki kez santrifügasyon ile yıkandı. Besi yeri ile süspanse edilen kemik iliği hücreleri kültür flasklarına ekilerek 37°C’de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Besi yeri olarak penisilin/streptomisin, L-glutamin (Sigma-Aldrich, ABD) ve %10 FBS içeren DMEM (Sigma-Aldrich, ABD) kullanıldı. Kültürler sırasında besi yeri üç günde bir değiştirilerek tazelendi. Flasklar üreyen hücreler tarafından doldurulduktan sonra yapışarak üreyen hücreler Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, ABD) ile kaldırıldıktan sonra yeni flasklara transfer edilerek pasajlama yapıldı.

3.4.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İzole edilerek saflaştırılan mezenkimal kök hücreler akım sitometrik yöntem ile immünofenotiplendirilerek karakterize edildi. Eppendorf tüpleri içinde 5×10^5 hücre 100 µl boyama solüsyonu (D-PBS + %1 FBS) içinde floresan işaretli antikorlarla karıştırılarak +4° de 30 dakika inkübe edildi. İmmünofenotiplendirme için phycoerythrin (PE) işaretli anti-mouse CD29 (Clon No: HMβ1-1), PE işaretli anti-mouse CD44 (Clon No:IM7), PE işaretli anti-mouse CD45 (Clon No:30-F11), PE işaretli anti-mouse CD90.2 (Clon No:53-2.1) ve PE işaretli anti-mouse CD73 (Clon No:TY/11.8) antikorları kullanıldı. Antikorların hepsi Sony Biotechnology, ABD firmasından satın alındı. İnkübasyon sonrasında hücreler santrifügasyonla iki kez yıkandıktan sonra %2 paraformaldehit içeren tampon çözeltisinde fikse edildi. Fikse edilen hücreler, CytExpert ölçüm ve analiz programı ile donatılmış akım sitometre cihazında (Cytotflex, Beckman&Coulter, USA) fenotiplendirildi. CD45 markerı negatif, CD44, CD90.2, CD29 ve CD73 markerları pozitif olan hücrelerin mezenkimal kök hücre oldukları doğrulandı.



Şekil 5. A) Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre inverted floresan mikroskopik görüntü (10x) B) Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre inverted floresan mikroskopik görüntü (10x)

3.4.4 Kök Hücre Uygulanması

3-MI enjeksiyonu sonrası 1.hafta anozmik olduğu gösterilen hayvanlara 1×10^7 hücre 50 μ L PBS içerisinde uygulandı. Uygulama esnasında farelere hafif anestezi uygulandı. Her bir burun deliğine daha önceki çalışmalarda güvenilirliği gösterilen şekilde, 5 μ L damlalar halinde, 5 dakikalık aralarla, 25 μ L volüm içerisinde mikropipet ile kök hücreler transplante edildi (242). Kontrol grubuna benzer şekilde intranazal olarak hafif anestezi altında aynı volümde PBS uygulandı.

3.5 Histomorfolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

3.5.1 Dokuların izolasyonu

Her birinde 12 hayvan bulunan her 3 gruptaki hayvanların randomize seçilmiş 6'sı 2.hafta kalan 6'sı ise 4.hafta sakrifiye edilerek olfaktör bulbus ve olfaktör epitelleri incelendi.

Hayvanlar yüksek doz anestezi ile (en az 200mg/kg ketamine, 10 mg/kg ksilazin) sakrifiye edildikten sonra dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası alt çene ayrıldı ve etraf kaslar çıkarıldıktan sonra sagital düzlemde kafa ikiye ayrıldı. Sağ ve sol parçalardan rastgele seçilen biri formaldehite konulurken diğer taraf transplante edilen yeşil floresan proteinli (YFP+) kök hücrelerin mikroskop altında incelenebilmesi için OB ve ONE'leri izole edilerek ayrı bir kaba konuldu. YFP+ hücrelerin herhangi bir boyama yapılmadan incelenebilmesi açısından bir taraf olfaktör nöroepitel altındaki ethmoturbinateden ve septumdan mikroskop altında mikro cerrahi aletler kullanılarak dikkatli bir şekilde kaldırıldı, olfaktör bulbus etraf dokulardan ayrılarak izole edildi. (Şekil 6-7)



Şekil 6. Dekapite Edilen Kafaların Sagital Olarak İkiye Bölünmesi



Şekil 7: Olfaktör epitel ve olfaktör bulbus

3.5.2 Kök Hücre Yerleşiminin İncelenmesi

Tüm grupların randomize belirlenen bir tarafındaki olfaktör epitel ve olfaktör bulbusları mikroskop altında etraf dokulardan ayrılarak izole edildi. Bu dokular taze halde iken -20 °C’de krisyostat cihazı (Leica CM1900, Almanya) ile 5 µm kesitler alındı. Alınan kesitler inverted immünfloresan mikroskop ile (Leica DMI4000B, Almanya) kör araştırmacı tarafından incelendi ve YFP+ hücreler değerlendirildi.

3.5.3. Histomorfolojik İncelemeler

Alınan örnekler öncelikle %10 nötral formaldehit solüsyonunda 72 saat tespit edildi. Ardından dekalsifikasyon amaçlı De Castro solüsyonuna alındı. Dekalsifikasyonun tamamlanmasını takiben, rutin takip işlemleri sağlandı. Tüm dokular kasetlere konularak akarsu altında yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için

dokular artan alkol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %100) geçirildi. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirilip ardından erimiş parafine gömüldü ve ardından parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler hematoksil-eozin (HE) yöntemi ile boyandı. Elde edilen örneklerdeki histomorfolojik değişimler ile olfaktör marker protein (OMP) tutulumları bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde ışık mikroskopi (Leica DM4000, Almanya) ile incelendi. Pseudostrafiye epitel kalınlığı ImageJ software programı ile ölçüldü. Histomorfolojik olarak incelenen alanların, Leica-Qwin programında resimleri çekilerek değerlendirildi. Epitel hasarını değerlendirmek için, silya kaybı, vakuolizasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu skorlandı.(0:hasar yok, 1:hafif, 2:orta, 3:ağır hasar, toplam maksimum skor:9) Epitel kalınlığı 3 noktadan ölçülerek ortalaması alındı(2 perifer, 1 santral) (238).

3.5.4 İmmünohistokimyasal İncelemeler

Öncelikle örnekler 2 defa 15'er dakika ksilol içerisinde bekletildi. Ksilolden çıkarılan örnekler sırasıyla %100, %96, %90, %80 ve %70 konsantrasyondaki etil alkol çözeltilerinde 10'ar dakika tutuldu. İki kez 5 dakika distile su içerisinde bekletilerek rehidrate edildi. Sonrasında nemli ortamda immünohistokimya barına dizilen dokuların etrafı PAP-Pen ile çizilerek 3'er dakika boyunca 3 kez PBS ile yıkandı. Özgün olmayan bağlanmayı engelleyebilmek için 10 dakika serum blocking solution (Genemed Biotechnologies, ABD) uygulanan örnekler OMP ve CD45 primer antikörleri ile +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası PBS ile yıkanan örneklerle endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için

15 dakika boyunca %3 hidrojen peroksit çözeltisi uygulandı. Örnekler PBS ile yıkandıktan sonra biotinli sekonder antikor (Genemed Biotechnologies, ABD) uygulandı. Yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkanan örnekler diaminobenzedin (DAB) substratı içeren kromojen (Thermo Fisher Sci., CA) uygulanarak gözle görülebilir immün tepkime oluşana kadar bekletildi. PBS ile yıkanan örnekler zemin boyası olarak Mayer'in hematoksileni kullanıldı. Alkol serisinden geçirilerek dehidrate edilen örnekler, ksilolde bekletildikten sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Tüm örnekler bilgisayar destekli görüntüleme sistemi yardımıyla (Leica DM4000, Almanya), Leica Q-Win 3 programında fotoğrafları çekilerek değerlendirildi. Her slayt için seçilen bağımsız 7 alandan sağlanan hücre sayımlarında OMP tutulumu değerlendirildi

3.6 İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için IBM SPSS Statistic 26.0 programı kullanıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistiğinde kategorik değişkenlerde frekans ve yüzde (%); sayısal değişkenlerde ortalama, ortanca, standart sapma, minimum, maksimum istatistikleri verilmiştir. Bağımsız grupların niceliksel verilerinin karşılaştırılmasında Mann Whitney-U ve Kruskal-Wallis testleri, niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ki-kare test, Fisher's Exact test veya Fisher's Freeman Halton Exact test kullanıldı. Bağımlı gruplarda ise analiz Friedman veya Wilcoxon testi ile yapıldı. Karşılaştırmalarda p değerinin 0.05'ten küçük olması anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1 Yemek Bulma Testlerinin Sonuçları

Bir YBT süresince tüm farelere 5 test yapıldı. Yapılan testlerde en küçük ve en büyük değerler dışlanarak kalan 3 değerın ortalaması alındı. Toplamda 3 defa 3 dakika içerisinde peyniri bulamayan fareler başarısız kabul edildi. Bu farelerin YBT süresi 180 saniye kabul edildi.

Tablo 4. Yemek bulma testinde farelerin ortalama yemek bulma süreleri (saniye)

FARE	GRUP	1.YBT (sn)	2.YBT	3.YBT	4.YBT	5.YBT
1	1 (kontrol)	22,3	başarısız	başarısız	-	-
2	1	30	başarısız	başarısız	-	-
3	1	19,6	başarısız	başarısız	-	-
4	1	26,3	başarısız	başarısız	-	-
5	1	14,6	başarısız	başarısız	-	-
6	1	18,3	başarısız	başarısız	-	-
7	1	27,6	başarısız	başarısız	başarısız	başarısız
8	1	32	başarısız	başarısız	başarısız	başarısız
9	1	18	başarısız	başarısız	başarısız	başarısız
10	1	10,6	başarısız	başarısız	73,3	35
11	1	17,3	başarısız	başarısız	başarısız	başarısız
12	1	23,3	başarısız	başarısız	123,3	55
1	2 (YDKMKH)	43	başarısız	165,3	159,6	24,3
2	2	25,3	başarısız	başarısız	başarısız	26,6
3	2	13,3	başarısız	başarısız	başarısız	26,6
4	2	16	başarısız	33,3	45	28,3
5	2	42,3	başarısız	98	117,3	40,6
6	2	24,3	başarısız	104,3	45	26,3
7	2	22,3	başarısız	61,3	-	-
8	2	24,6	başarısız	başarısız	-	-
9	2	41,6	başarısız	47,3	-	-
10	2	22,3	başarısız	34,6	-	-
11	2	19,3	başarısız	39	-	-
12	2	25	başarısız	34,3	-	-
1	3 (KİMKH)	18	başarısız	84	-	-
2	3	16,6	başarısız	47,3	-	-
3	3	13,6	başarısız	36	-	-
4	3	35,6	başarısız	başarısız	-	-
5	3	13,6	başarısız	başarısız	-	-
6	3	11	başarısız	62,3	-	-
7	3	14,3	başarısız	başarısız	başarısız	36
8	3	13	başarısız	21	41,6	22,6
9	3	11	başarısız	11,6	48,6	26,6
10	3	7	başarısız	32,6	46,6	43,3
11	3	22,6	başarısız	86,3	82	29
12	3	6,3	başarısız	başarısız	başarısız	21,3

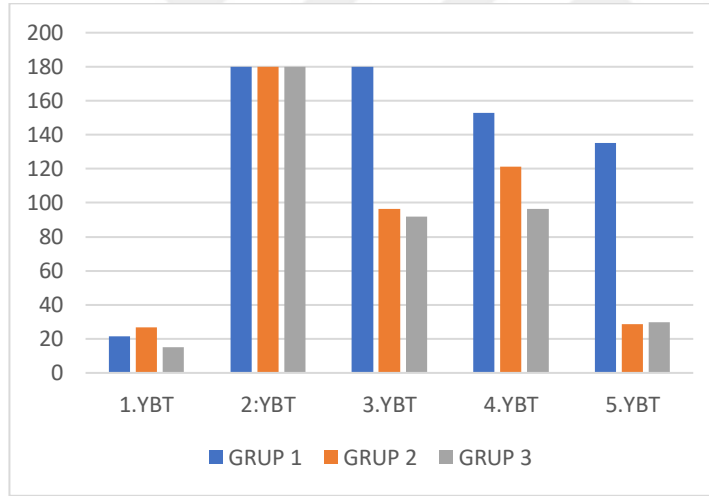
Tablo 5. Yemek bulma testinde gruplara göre başarı durumu

GRUP	1.YBT		2.YBT		3.YBT		4.YBT		5.YBT	
	başarılı	başarısız	başarılı	başarısız	başarılı	başarısız	başarılı	başarısız	başarılı	başarısız
1(kontrol)	12	0	0	12	0	12	2	4	2	4
2(YDKMKH)	12	0	0	12	9	3	4	2	6	0
3 (KİKMKH)	12	0	0	12	8	4	4	2	6	0

Birinci YBT sonuçlarına göre tüm fareler başarılı bir şekilde testi tamamlamışlardır. İkinci YBT sonuçlarına baktığımızda ise tüm farelerin başarısız olduğunu yani 3-MI enjeksiyonu sonrası tüm farelerde anozmi geliştiğini söyleyebiliriz. Diğer testlere baktığımızda; 1. grupta 3. YBT sonrası farelerin %100'ü testte başarısız olmuşken 2 ve 3. gruplarda farelerin sırasıyla %25 ve %33'ü başarısız olmuştur. Yapılan ki-kare testinde bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p=0,001$) Dördüncü YBT başarı durumlarında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamış ($p=0,589$), Beşinci YBT başarı durumlarında ise gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. ($p=0,015$) (Tablo 4)

Gruplardaki farelerin ortalama yemek bulma süreleri ise; 3. YBT için grup 1 180 sn, grup 2 96,45 sn (min:33,3 maks:180, SS:63,51, ortanca:79,65), grup 3 91,75 sn (min:11,6 maks:180, SS:68,83, ortanca: 73,15) olarak hesaplanmıştır. Dördüncü YBT için ise grup 1 152,76 sn (min: 73,3 maks:180, SS:45,05 ortanca 180) , grup 2 121,15 sn (min:45 maks:180, SS:63,27, ortanca:138,45), grup 3 96,46 sn (min:41,6 maks:180, SS:66,26, ortanca: 65,3), 5. YBT için grup 1 135 sn (min:

35 maks:180, SS:70 ortalanca:180) , grup 2 28,78 sn (min:24,3 maks:40,6, SS:5,92, ortalanca:26,6), grup 3 29,8 sn (min:21,3 maks:43,3, SS:8,43, ortalanca: 27,8) olarak ölçülmüştür. Yapılan Kruskal Wallis testinde; 3. YBT'deki gruplar arasındaki fark ($p=0,001$) ve 5. YBT'deki gruplar arasındaki fark ($p=0.008$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dördüncü YBT'de ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir. ($p=0,276$) Üçüncü ve 5. YBT'de gruplar ikiyeşli karşılaştırılmış (Mann-Whitney U ve Bonferroni düzeltmesi ile) ve her iki testte de grup 1 ile hem grup 2 hem de grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcutken grup 2 ile grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir.

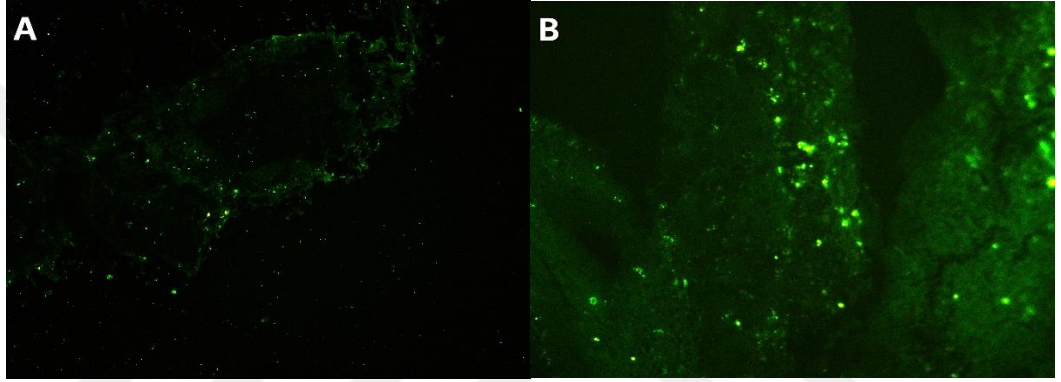


Grafik 1. Ortalama yemek bulma testi süreleri

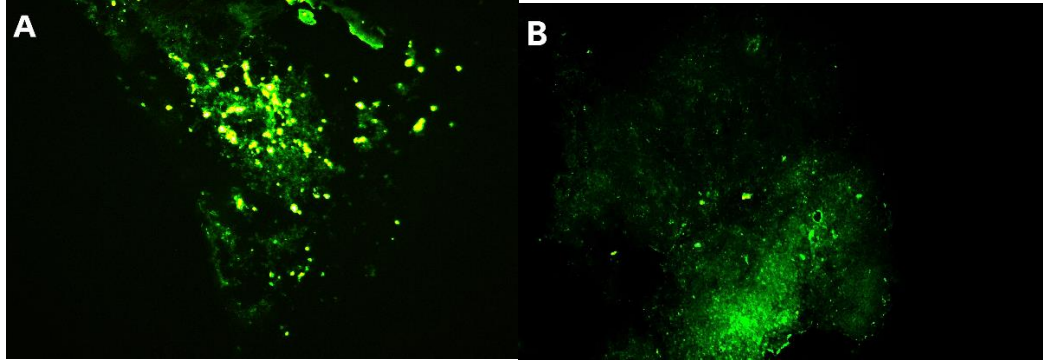
4.2 TRANSPLANTE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm farelerden izole edilen OB ve ONE'lerde yapılan mikroskopik incelemede kök hücre transplante edilmiş tüm örneklerde OB ve ONE'nin her

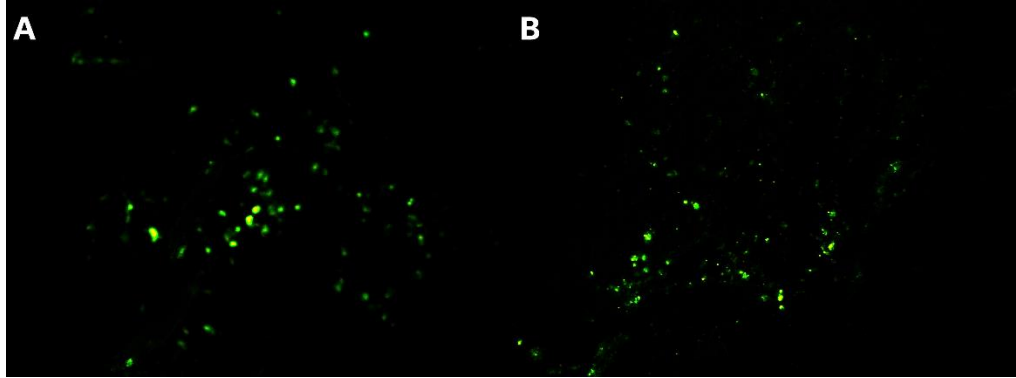
ikisinde de YFP+ hücreler izlendi. Özellikle transplantasyonun 3. haftasında sakrifiye edilen ve dokuları izole edilen hayvanlardaki YFP+ hücre yoğunluğunun 1.haftada alınan örneklerle göre daha fazla olduğu görüldü. Bulgular, intranazal olarak uygulanan YDKMKH ve KİKMKH'lerin ONE ve OB'a yerleştiğini ve süre geçtikçe bu bölgelerde çoğaldığını düşündürmektedir.



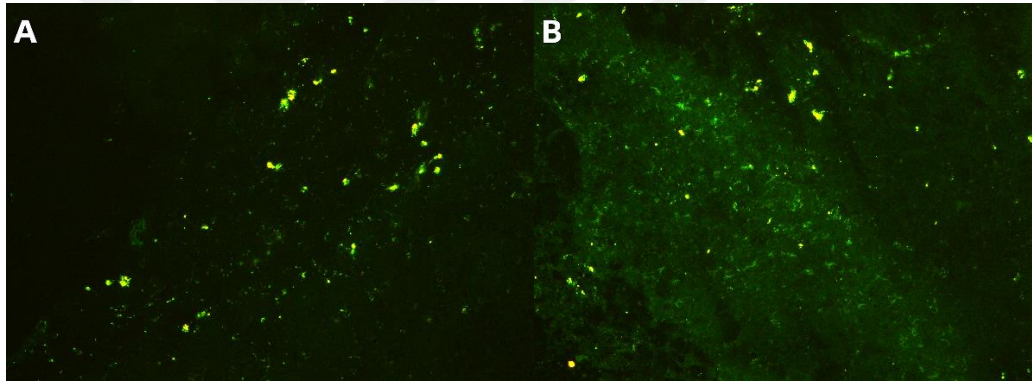
Şekil 8. Transplante edilen yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 1. hafta görüntüsü (10x) A) Olfaktör epitel B) Olfaktör bulbus



Şekil 9. Transplante edilen yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 3. hafta görüntüsü (10x) A) Olfaktör epitel B) Olfaktör bulbus



Şekil 10. Transplante edilen kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin 1. hafta görüntüsü (10x) A) Olfaktör epitel B) Olfaktör bulbus



Şekil 11. Transplante edilen kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin 3. hafta görüntüsü (10x) A) Olfaktör epitel B) Olfaktör bulbus

4.3. HİSTOLOJİK SONUÇLAR

4.3.1 Histomorfolojik İnceleme Sonuçları

Yapılan histomorfolojik değerlendirmede, olfaktör epitelin inflamatuvar hücre infiltrasyonu, silya kaybı, vakuolizasyon durumu skorlandı. Buna göre 2. hafta ve 4. hafta sonrası deney gruplarındaki farelerden elde edilen bulgular Tablo 6 ve 7’de verilmiştir.

Tablo 6. Grupların 2. hafta histopatolojik skorlama bulguları

		Kontrol	YDKMKH	KİMKH	P değeri
Histopatolojik skor	İnfiltrasyon	0	0	0	0
		1	0	0	5
		2	3	5	1
		3	3	1	0
	Vakuolizasyon	0	0	0	0
		1	0	3	5
		2	0	3	1
		3	6	0	0
	Silya Hasarı	0	0	0	0
		1	0	4	4
		2	0	2	2
		3	6	0	0
	Toplam Skor	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	=0.001**
		8,5±0,54	5±0,89	3,67±0,51	

*Fisher-Freeman-Halton- Exact

**Kruskal Wallis

Tablo 7: Grupların 4. hafta histopatolojik skorlama bulguları

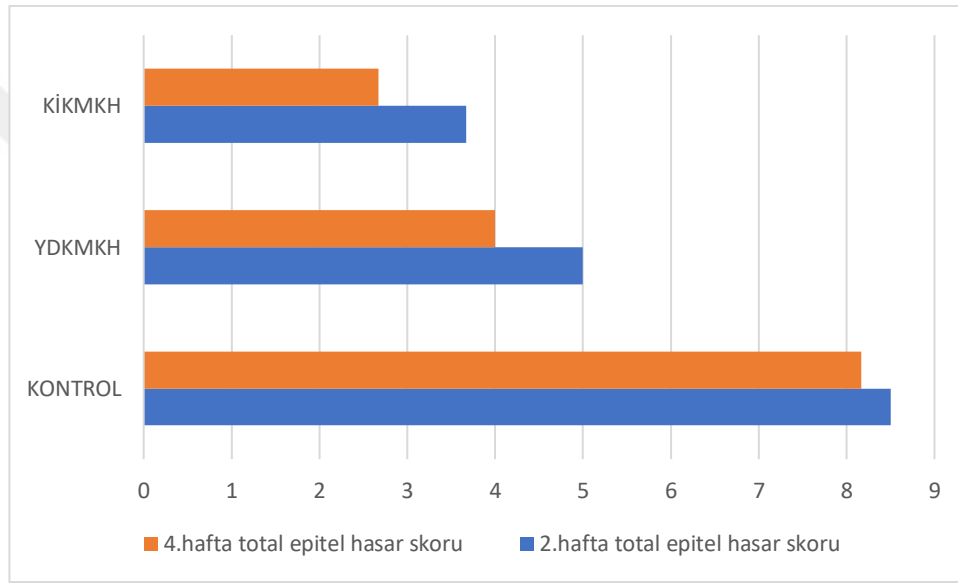
		Kontrol		YDKMKH	KİKMKH	P değeri
Histopatolojik skor	İnfiltrasyon	0	0	0	0	<0.001*
		1	0	4	6	
		2	0	2	0	
		3	6	0	0	
	Vakuolizasyon	0	0	0	0	<0.001*
		1	0	3	6	
		2	1	3	0	
		3	5	0	0	
	Silya Hasarı	0	0	0	2	=0.002*
		1	0	5	4	
		2	4	1	0	
		3	2	0	0	
		Ort±SS		Ort±SS	Ort±SS	<0.001**
Toplam Skor		8,17±0,41		4±0	2,67±0,52	

*Fisher-Freeman-Halton-Exact

**Kruskal Wallis

Bu sonuçlara göre gruplar arasında skorlanan tüm hasar bulgularında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu. Aynı zamanda toplam hasar skorlarının ortalaması arasında yapılan gruplar arası karşılaştırmada da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Grupların toplam epitel hasar skorlarının ikili karşılaştırması için yapılan analizlerde ise (Mann-Whitney U,

Bonferroni düzeltmesi ile) 2.hafta grup 1-2 ($p=0,003$), grup 1-3 ($p=0,003$) ve grup 2-3 ($p=0,016$) arasında anlamlı fark mevcuttu. Yine 4. hafta toplam epitel hasar skorları değerlendirildiğinde grup 1-2 ($p=0,001$), grup 1-3($p=0,002$), grup 2-3 ($p=0,002$) arasında da fark vardır ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Grafik 2. Grupların toplam epitel hasar skorları

Grup 1'in 2 ve 4. haftalardaki epitel durumunu kıyasladığımızda silyelerin durumunda ve vakuolizasyonda iyileşmeye yönelik bulgular izlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmemiştir. ($p=0,317$)

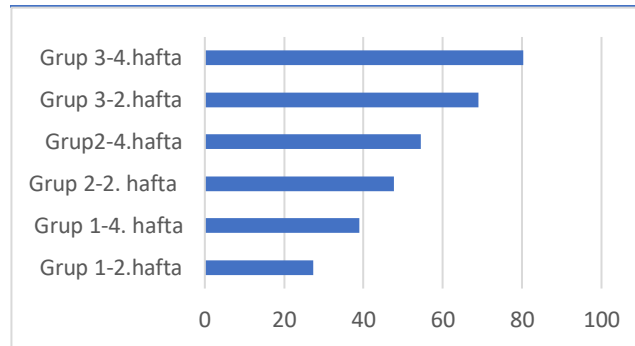
Grup 2'de 2. ve 4. hafta toplam epitel hasar skorunda iyileşme mevcutken bu durumda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p=0,063$) Grup 3'te ise toplam hasar skoru 4. haftada 2.haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır. ($p=0,034$)

Olfaktör epitel kalınlıklarında gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur. En kalın OE grup 3'te bulunuyorken en ince OE ise grup 1'de idi. (Tablo 8) Grupların ikili karşılaştırılmalarında ise; grup 3'ün grup 2'den, grup 2'nin ise grup 1'den daha kalın epitele sahip olduğu inceleme yapılan haftalarda görülmektedir ve bu farklılıklar istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. ($p < 0.016$, Mann-Whitney U, Bonferroni düzeltmesi ile) Aynı grupların 2.ve 4.hafta örnekleri kıyaslandığında ise 4. haftada tüm grupların epitel kalınlıklarının artmış olduğu görülmektedir. Bu artış tüm gruplarda istatistiksel olarak da anlamlı değerlendirilmiştir. ($p < 0,05$)

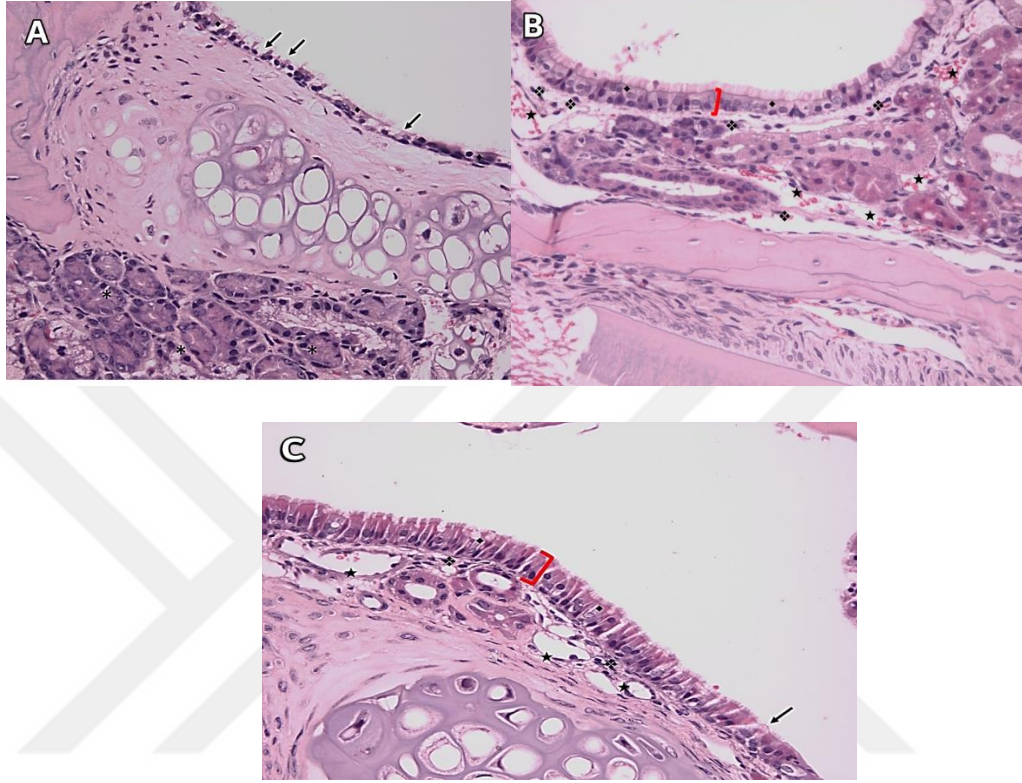
Tablo 8. Grupların olfaktör epitel kalınlıkları (μm)

	Kontrol		YDKMKH		KİMKH		P değeri
	Ort $\pm$ SS	Median	Ort $\pm$ SS	Median	Ort $\pm$ SS	Median	
Olfaktör Epitel Kalınlığı (2.hafta)	27,32 $\pm$ 0,96	27,35	47,68 $\pm$ 0,28	47,55	68,99 $\pm$ 0,81	69,07	<0,001*
Olfaktör Epitel Kalınlığı (4.hafta)	38,91 $\pm$ 1,06	39,1	54,55 $\pm$ 0,63	54,85	80,35 $\pm$ 0,2	80,32	<0,001*

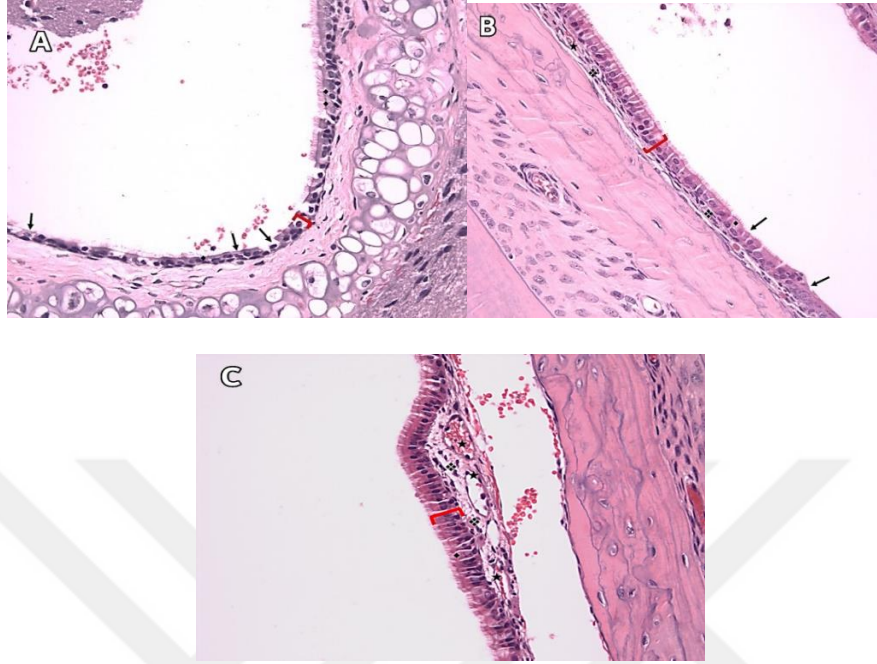
*Kruskal Wallis



Grafik 3. Grupların zamana göre epitel kalınlıkları



Şekil 12: Grupların 2. hafta olfaktör epitellerinin görüntüleri (Hematoksilen eozin) A) 1. grup B) 2. grup C) 3. grup Kırmızı çizgi: Epitel kalınlığı Siyah ok: Sil kaybı ♦: Vakuolizasyon *: Olfaktör bez yapısında bulunan hücreler arasında interselüler boşluk artışı ❖: İnflamatuvar hücre infiltrasyonu ★: Vaskülarizasyon



Şekil 13: Grupların 4. hafta olfaktör epitellerinin görüntüleri (Hematoksilen eozin) A) 1. grup B) 2. grup C) 3. grup Kırmızı çizgi: Epitel kalınlığı Siyah ok: Sil kaybı ♦: Vakuolizasyon *: Olfaktör bez yapısında bulunan hücreler arasında interselüler boşluk artışı ♦: İnflamatuar hücre infiltrasyonu ★: Vaskülarizasyon

4.3.2 İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları

Yapılan değerlendirmede; OMP+ hücre sayısı 2. ve 4.haftalarda gruplar arasında anlamlı farklılıklar içermektedir. (Tablo 9)

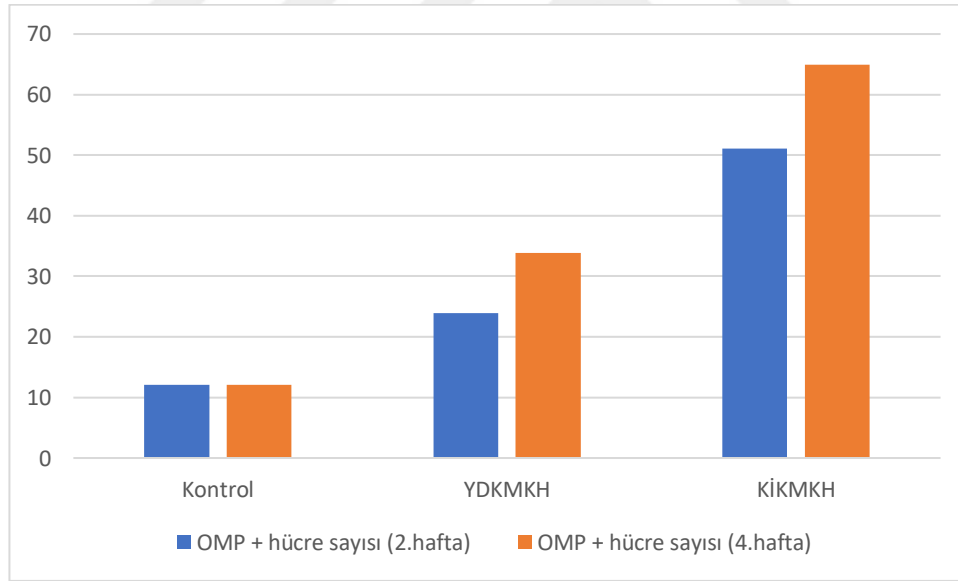
Tablo 9: Grupların olfaktör marker protein eksprese eden hücre sayıları

	Kontrol		YDKMKH		KİKMKH		P değeri
	Ort±SS	Median	Ort±SS	Median	Ort±SS	Median	
OMP + Hücre Sayısı (2.hafta)	12,05±0,93	12,5	23,88±3,03	22,83	51,05±3,39	51,67	<0,001*
OMP+ Hücre Sayısı (4.hafta)	12,05±0,80	11,83	33,83±2,09	34	64,94±3,25	64,83	=0,001*

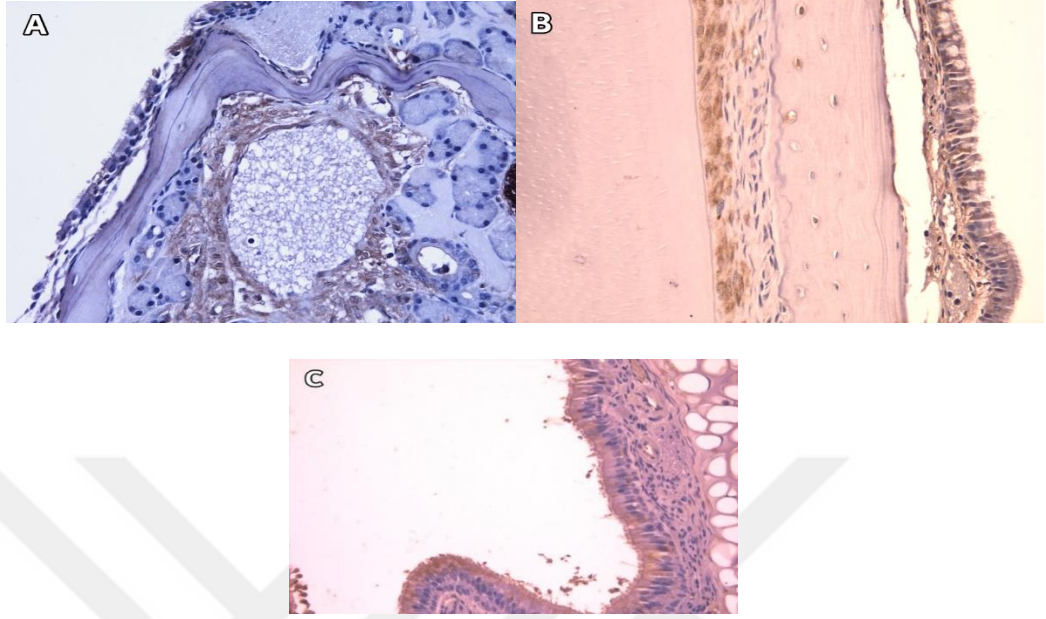
*Kruskal Wallis

OMP+ hücre her iki zaman diliminde yapılan incelemede en az kontrol grubunda mevcutken en fazla KİMKH transplante edilen grupta vardı. Grupların ikili karşılaştırılmasında, tüm zaman dilimlerinde; grup 1-2, grup 1-3 ve grup 2-3 arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0.016$, Mann-Whitney U, Bonferroni düzeltmesi ile)

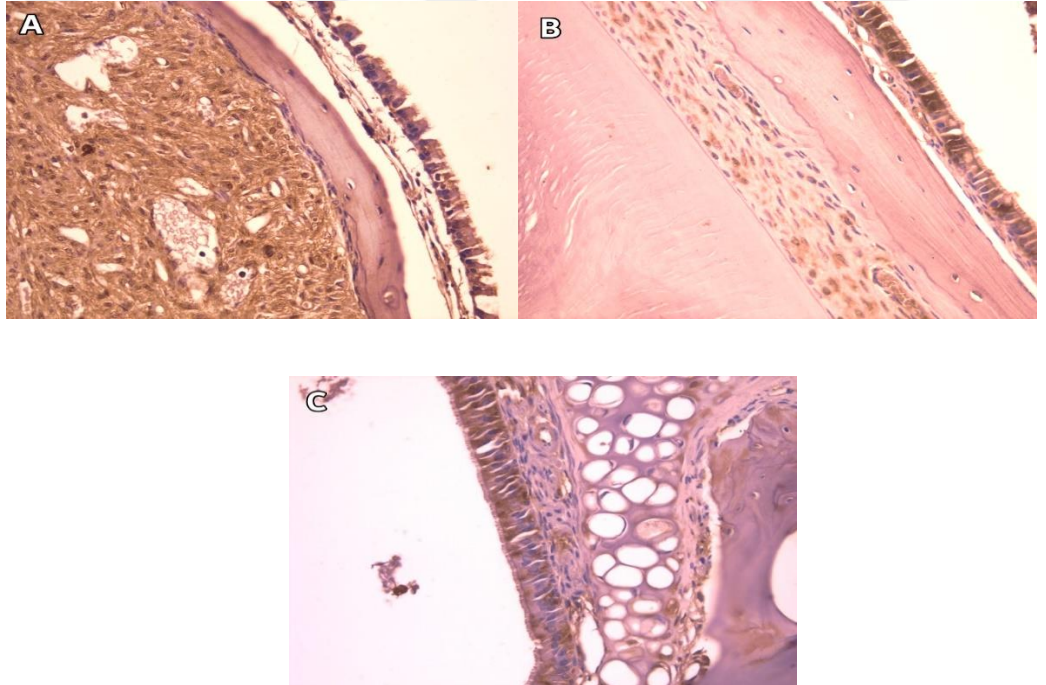
Grupların kendi içinde 2.ve 4. hafta OMP+ hücre sayısı değişimlerine bakacak olursak; grup 1’de anlamlı değişiklik izlenmemişken, grup 2’de ve grup 3’te OMP+ hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı izlenmektedir. ($p<0,05$)



Grafik 4. Gruplardaki olfaktör marker protein eksprese eden hücre sayıları



Şekil 14: 2. hafta gruplardaki olfaktör marker protein eksprese eden hücrelerin durumu (İmmünohistokimyasal boyama) A) 1. grup B) 2. grup C) 3. grup



Şekil 15: 4. hafta gruplardaki olfaktör marker protein eksprese eden hücrelerin durumu (İmmünohistokimyasal boyama) A) 1. grup B) 2. grup C) 3. grup

5.TARTIŞMA

Koku alma bozukluğu toplumda sık karşılaşılmamasına rağmen kişiler tarafından genelde göz ardı edilen bir problemdir. Bu hastalık aslında klinisyenler tarafından da çok dikkate alınmamaktadır. Bunun sebebi muhtemelen bu hastalığın tedavi seçeneklerinin kısıtlı olmasıdır (1). Ancak koku alma bozukluğu hayat kalitesini ciddi şekilde bozar ve psikososyal sorunlara yol açar. Etiyolojide sinonazal inflamatuvar hastalıklar, üst solunum yolu enfeksiyonları ve travma sık olarak karşımıza çıkar. Oluşan koku kaybı geri dönebilmektedir bunun da ONE'in kendini rejenere etme yeteneğine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak bazı durumlarda koku alma bozukluğu kalıcı olmakta ve kişi hayat boyu bu problem ile karşı karşıya kalmaktadır. İşte bu iyileşmenin olmadığı hasta grubunda spontan rejenerasyonun olmadığını ya da olsa bile sınırlı kaldığını ve koku duyusunu algılamamızı sağlayamadığını düşünebiliriz (243). Koku alma problemlerinde tedavide denenilen ve etkin olduğu düşünülen, kılavuzlarda tedavi seçeneği olarak sunulan yöntemler vardır; ancak bunların da etkisi sınırlı kalmaktadır (1). Yani kesin olarak koku kaybını tamamen iyileştiren bir tedavi yönteminin olduğunu söylemek maalesef mümkün değildir. İşte biz de çalışmamızda iyileşmeye katkısı olacağını düşündüğümüz kök hücreleri koku kaybı oluşturduğumuz farelere transplante ederek etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Tedavide bir ajanın denenebilmesi için öncelikle denenecek hastalığının indüklenmesi gerekmektedir. Literatürde hayvanlarda anozmi modeli oluşturmak için sistemik, lokal uygulanan kimyasallar veya cerrahi teknikler tanımlanmıştır (235, 244). Topikal olarak çinko sülfat, sülfür dioksit, Triton X-100, metil bromide

ile anozmi oluşturmak mümkün iken sistemik olarak 3-MI, metimazol, diklobenil anozmi oluşturduğu gösterilen ajanlardır (245-250). Hasarın tek tarafa yapılabildiği lokal ajan ile anozminin indüklendiği modeller aslında aynı hayvanda hasarsız bölge ile karşılaştırma imkanı sağladığı için avantajlı olabilir (244). Ancak lokal toksik madde uygulanan modellerde dağılımın nasıl olacağını kestirememek dezavantaj gibi gözükmektedir. Biz alışmamızda literatürde sıkça kullanılan uygulanması basit anozmi oluşturma potansiyeli yüksek sistemik 3-MI kullandık.

3-MI alt sindirim sisteminde üretilen bir triptofan metabolitidir (251). P-450 bağımlı mikst fonksiyonlu oksidazlar tarafından metabolize edilmesi ile hasar yarattığı düşünülmektedir (246, 252). İnteraperitoneal olarak enjekte edilen 3-MI olfaktör bölgede doz bağımlı olarak hasar oluşturmaktadır. Sistemik 3-MI enjeksiyonu sonrası olfaktör bölgede ülsere nekrotik lezyonlar oluşur, yüksek dozlarda pulmoner hasar da meydana gelir (246, 252). Olfaktör bölgedeki değişikler histolojik incelemelerin yanı sıra MR ile de değerlendirilebilir (237). Kim ve ark. farklı 3-MI dozlarının olfaktör bölgede etkilerini inceledikleri çalışmada 100,200,300,400 µg/g 3-MI verdikleri farelerde 300 ve 400 µg/g enjeksiyon sonrası olfaktör epitelde nöron miktarının %80 azaldığını, 200 µg/g enjeksiyon sonrası ise bu azalmanın %20 seviyesinde kaldığını göstermişlerdir (235). Bu azalmayı OMP lm ile değerlendirmişlerdir. OMP matür olfaktör hücrelerde mevcut bir proteindir, anti-OMP ile işaretleme yaparak immünohistokimyasal yöntemler ile ölçüm yapmak mümkündür. Yine aynı çalışmada OB’da da OMP ekspresyonunun azaldığı ve bu azalmanın 200 µg/g doz sonrasında %60’larda olduğu ve OMP ekspresyonunun olfaktör fonksiyonu daha

yüksek oranda gösterdiği rapor edilmiştir. 3-MI etkisi en uzun toksik ajanlardan olmasına rağmen olfaktör epitelin rejenerasyon yeteneği sebebiyle bu etki geçicidir (253). Miller ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada üçüncü gün rejenerasyona ait kanıtlar olmasına rağmen 21.gün normal Bowman bezlerini ve diferansiye olfaktör epiteli gözlemediklerini belirtmişler, Turk ve ark. ise yine farelerde yaptıkları çalışmada 28. gün nazal boşluğun hala fibrotik dokular ile oblitere olduğunu raporlamışlardır (246, 253). Biz de doz olarak olfaktör bölgede ciddi bir hasar oluşturmaya rağmen diğer bölgelerde lezyon oluşturmayan ve literatürde de sıkça kullanılan 300 µg/g dozunu uygulamayı tercih ettik ve spontan rejenerasyon sebebiyle histolojik incelemeleri de en son 3-MI enjeksiyonu sonrası 28. gün yapacak şekilde çalışmamızı planladık.

Kök hücreler birçok hastalığın tedavisinde denenen umut vadeden tedavi yöntemlerindendir. Embriyonik ve yetişkin kök hücreler, üzerinde en çok çalışılan kök hücrelerdir. Etik kaygılar, tümör oluşturma potansiyelleri gibi sebepler embriyonik kök hücrelerin klinik uygulamalarını sınırlandırmıştır. Yağ dokusu ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler üzerinde sık çalışılan karakterizasyonları tanımlanmış kök hücrelerdir. Osteojenik, kondrojenik, adipojenik farklılaşma kapasitesine sahiplerdir ve ayrıca uygun çevresel koşullar sağlandığı takdirde nöral veya kardiyojenik yapılara da farklılaşabilirler (254-256). Hücrelerin karakterizasyonu ve farklılaşmaları eksprese ettikleri marker proteinlerinin incelenmesi ile anlaşılır. Bu nöral yapılara farklılaşma kapasitesi, nöral kök hücrelere ulaşımın invaziv olması sebebiyle MKH'lerin nöral dejenerasyon durumlarında kullanımını gündeme getirmiştir. Farklılaşma potansiyelleri dışında

mezenkimal kök hücreler nörotrofik faktörlerin ve anjiogenik sitokinlerin salgılanması ya da salgılanmasını indüklenmesi ile de işlev görebilirler (257, 258). Sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), koku fonksiyonlarını düzelttiği düşünülen MKH'lerce salgılanan sitokinlerden bazılarıdır (250).

İşte bu sebeplerden dolayı diğer nörodejeneratif hastalıkların yanında koku alma bozukluklarında da kök hücre tedavilerinin kullanımı rejenerasyonu indüklemek, azalan ORN'lerin zaten mevcut olan kök hücreler veya transplante edilen kök hücreler ile sayısını arttırarak, koku fonksiyonlarını yeniden sağlamak amacıyla gündeme gelmiştir. Jo ve ark. ratlar üstünde yaptıkları çalışmada tek taraflı Triton X-100 ile koku kaybı modeli yaratmış ve intranazal uyguladıkları KİMKH ile bu tedavinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. ONE kalınlığının ve morfolojik özelliklerin kontrol grubuna göre daha iyi olduğunu göstermişlerdir (250). Kwon ve ark. ratlarda tek taraflı Triton X-100 ile ONE hasarı yaratmışlar ve KİMKH uygulanması ile bu hasarın kontrol grubuna göre transplantasyon sonrası 4. hafta daha iyi iyileştiğini raporlamışlardır (243). Franceshini ve ark ise rejeksiyonu engellemek için immün yetmezlikli Nod-scid farelerde yaptıkları çalışmada insan YDKMKH etkinliğini diklobenil ile anozmik yaptıkları farelerde incelemişlerdir. İnsan YDKMKH'leri sistemik olarak uygulamışlar ve engraftmanı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile değerlendirmişlerdir. 30 ve 60. gün yaptıkları incelemelerde fonksiyonel, histomorfolojik ve immünohistokimyasal olarak iyileşmenin kök hücre verilen grupta daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Kök hücreler kuyruk veninden sistemik verilmiş ve deri, karaciğer, böbrekte de bu kök

hücreler izlenmiştir (259). Kim ve ark. da sistemik YDKMKH tedavisinin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada cerrahi olarak olfaktör dejenerasyon oluşturduktan sonra kuyruk veninden YDKMKH uygulamışlar ve kontrol grubuna göre kök hücre verilen grubun OMP ekspresyonunun daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (244). Lee ve ark. da nöral kök hücre tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında olfaktör bulbustan ürettikleri nöral kök hücreleri 3-MI ile anozmi indükledikleri farelere vermişler, fonksiyonel ve histolojik iyileşme elde ettiklerini bildirmişlerdir (260). Kurtenbach ve ark. ise intranazal globose basal cell transplante ettikleri konjenital olarak hipozmik farelerde fonksiyonel ve histolojik iyileşme elde etmişlerdir (242).

Nöral kök hücreler ile yapılan çalışmalarda gördüğümüz gibi bu kök hücreler tedavide etkin olarak bulunmuştur. Ancak klinik pratikte nöral kök hücrelere ulaşım ve bu hücreleri izole etmek zordur. Dolayısıyla benzer şekilde etkin olduğu hayvan çalışmalarında gösterilmiş MKH'lerin kullanımı daha kolay olacaktır. YDKMKH'lerin KİMKH'lere göre elde edilmesi daha kolay ve daha az invazivdir. Ayrıca YDKMKH'leri çok miktarda ve tekrarlayan uygulamalarla elde etmek ve üretmek mümkündür. Kök hücrelerin sistemik verilmesi ise Franceshini ve ark.'nın çalışmasında gördüğümüz gibi bu hücrelerin tüm vücuda yayılmasına yol açmakta ve asıl hasar bölgesine giden hücre yoğunluğunu azaltmaktadır. İşte bu yüzden biz çalışmamızda kök hücreleri intranazal olarak uyguladık. Aspirasyon olmaması için daha önce gösterildiği gibi 5 µl damlalar halinde 5 dakikalık aralıkla her bir burun deliğine 25 µl, toplamda 50 µl olacak şekilde verdik (242). Aspirasyon bulgusu ile karşılaşmadık ve bu dozda yapılan

uygulamanın güvenli olduğunu düşünüyoruz. YDKMKH ve KİKMKH'ler mezenkimal kök hücreler olmakla birlikte farklı kaynaklardan elde edilen bu kök hücrelerin; hücre sayısı, farklılaşma kapasiteleri, sitokin ve kemokin salgılama yetenekleri birbirinden farklılıklar gösterebilir (261-263). Çalışmamızda ayrıca bu farklılıkları da değerlendirmeyi amaçladık.

Hayvanlarda koku fonksiyonlarını değerlendirebilmek için literatürde pek çok davranış testi tanımlanmıştır. Genel olarak iki tip davranış testinin olduğu söylenebilir; kaçınma testleri, tercih testleri (264). Tercih testlerinde hayvanlardan saklanılan bir gıdayı bulmaları istenir. Bulmaları istenilen yemeğe daha önceden alışmaları lazımdır ve bu yemek sevdiği bir tat ve kokuda olmalıdır. Bu tip testlerde hayvanlar 1-3 gün arası aç bırakılarak teste daha kolay uyum göstermeleri sağlanır. Saklanılan gıda olarak literatürde fıstık ezmesi, cips, peynir, vanilin kullanılmıştır (227, 235, 236, 264-267). Kaçınma testlerinde ise suya karıştırılmış ya da talaş altına gizlenmiş rahatsız edici bir kimyasal maddeden hayvanların kaçınma davranışları değerlendirilir (264). Hayvanlarda koku fonksiyonlarını EOG ile de ölçmek mümkündür; ancak tekrarlanabilir olması, basit olması ve koku fonksiyonlarını başarılı bir şekilde göstermesi sebebiyle biz çalışmamızda davranış testi kullandık. Hayvanları 1 gün aç bıraktıktan sonra (su serbest) daha önce tadına ve kokusuna alıştırdığımız peyniri bulmalarını (2x1 cm) değerlendirdik. Testi her hayvan için 5 sefer tekrarladık, en yüksek ve en düşük süreleri çıkartarak ortalama süreleri hesapladık. Peyniri 180 saniye içerisinde bulamayan hayvan başarısız kabul edildi ve test süresi 180 saniye olarak hesaplandı. Her yaptığımız testte T labirentin talaşı değiştirildi. Yapılan 5 testten 3'ünde başarısız olan hayvan anozmik kabul

edildi. 3-MI enjeksiyonu öncesinde tüm hayvanların koku alabildiği bu test ile kanıtlandı (1.YBT). 3-MI enjeksiyonu sonrası 1. hafta ise tüm hayvanlar yapılan YBT’de peyniri toplamda 3 kez 180 sn. içinde bulamadı ve 3-MI enjeksiyonu sonrası anozminin başarı ile indüklendiği düşünüldü (2.YBT). Üçüncü YBT ve 5.YBT başarı oranlarına baktığımız zaman kontrol grubu ile YDKMKH ve KİKMKH verdiğimiz grupların arasında anlamlı bir fark mevcuttu, bu durumda kök hücre tedavisinin 1. haftasında kök hücrelerin koku fonksiyonlarını iyileştirdiği düşünülebilir. Hayvanların peyniri bulma süreleri ortalaması değerlendirildiğinde ise 3 ve 5. YBT’lerde başarı oranları ile benzer şekilde kontrol grubunun 2. ve 3. gruba göre daha uzun bir sürede peyniri bulduğu görüldü. Yine burada da YDKMKH ile KİKMKH verilen gruplardaki fareler arasında bulma süreleri açısından anlamlı bir farklılık izlenmemektedir. Dördüncü YBT’de 2 ve 3. gruptaki farelerin ortalama yemek bulma sürelerinin 3. YBT’ye göre daha uzun olduğu izlenmiştir. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu farklılık, YBT’de yemek bulma ortalama sürelerindeki küçük farklılıkların koku fonksiyonlarını göstermede önemli olmadığını ve yemek bulma başarı oranlarının ortalama süreden koku fonksiyonlarını göstermede daha değerli olduğunu düşündürmektedir.

Yasak ve ark. anozmi indükleri fare modelinde trombosit zengin plazmanın etkinliğini inceledikleri çalışmalarında olfaktör epitel dejenerasyonunu; olfaktör epitelde inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, epitelyal hücre vakuolizasyonunu ve silia hasarını derecelendirerek incelemiştir (238). Biz de çalışmamızda benzer bir skorum kullandık. Ayrıca literatürde pek çok çalışmada

kullanıldığı gibi olfaktör epitel kalınlığı da ölçülerek gruplar arasında karşılaştırıldı. İkinci ve 4. hafta sonuçlarında epitelin 2.ve 3. grupta yer alan farelerde daha kalın olduğu izlendi. Dejenerasyon skorlarında da benzer şekilde kök hücre verilen gruplarda dejenerasyon skorları kontrol grubuna göre daha düşüktü. Kök hücre verilen gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda; epitel kalınlığının KİMKH verilen farelerde daha kalın, epitel hasar skorlarının ise daha düşük olduğu görüldü.

OMP matür olfaktör nöronlarda mevcut olan bir proteindir. Bu proteinin immünohistokimyasal yöntemler ile gösterilerek miktarının ölçülmesi, literatürde anozmi indüklenen modellerde iyileşmeyi değerlendirmek için kullanılmaktadır (227). Biz de çalışmamızda OMP+ hücreleri değerlendirdik. 2.ve 4. haftada OMP+ hücre sayısının kök hücre verilen farelerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazla olduğu izlendi. Kök hücre gruplarının arasında ise KİMKH grubundaki OMP+ hücre sayısı YDKMKH'ye göre daha fazla idi. Histolojik testlerin birlikte değerlendirilmesi ile elde edilen bulgular, KİMKH verilen gruptaki deneklerde olan iyileşmenin YDKMKH verilen gruba göre daha iyi olduğunu göstermekle birlikte, her iki MKH'nin de kontrol grubu ile kıyaslandığında iyileşmeyi olumlu etkilediğini düşündürmektedir. Literatürde KİMKH ve YDKMKH'lerin kıyaslandığı çalışmalar mevcuttur. Karaöz ve ark. yaptıkları çalışmada KİMKH'nin immünsupresif etkisinin diğer kök hücrelere göre daha güçlü olduğunu raporlamışlardır (268). Takahashi ve ark. ise YDKMKH'lerin stress ve hipoksi durumlarına karşı dayanıklı olduklarını ve bu sebeple dokuda daha fazla miktarda kalarak iyileşmeye etkisinin KİMKH'ye göre daha fazla olacağını bildirmişlerdir (269). Bununla birlikte spinal kord hasarı, nöropatik ağrı gibi

durumların tedavisinde KİKMKH ve YDKMKH'nin benzer etkinliklere sahip oldukları gösterilmiştir (269-271).

Literatürde anozmi modeli oluşturarak tedavi etkinliği denenmiş pek çok ajan mevcuttur. Kim ve ark. 3-MI ile anozmi indükledikleri farelere 3 hafta boyunca feeding tüpü ile statin vermişler ve 3 haftanın sonunda kontrol grubuna göre iyileşmede anlamlı sonuçlar gözlediklerini bildirmişlerdir. İyileşmeyi göstermek için fonksiyonel davranış testini ve western blot ile OMP ölçümünü kullanmışlardır (227). Nota ve ark. da 3-MI ile indükledikleri anozmi modelinde davranış testi, epitelyal kalınlık ve OMP+ hücre sayısını kullanarak değerlendirmeler yapmışlardır (272). Yani OMP, olfaktör epitel kalınlığı ve olfaktör epitelin histomorfolojik özellikleri incelenerek koku kaybı modellerinde uygulanan tedavilerin rejenerasyona etkisini değerlendirmek mümkündür.

Nöral dejeneratif hastalıkların tedavisinde kök hücre uygulamaları ile başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Özellikle spinal kord hasarında kök hücrelerin etkin olduğunu gösteren prelinik çalışmalar sonrası kök hücre tedavilerinin bu hastalıkta denendiği klinik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (273). Olfaktör dejenerasyonda da kök hücre tedavilerinin başarılı olduğuna dair prelinik çalışmalar mevcuttur. Ancak literatürde bildiğimiz kadarı ile olfaktör dejenerasyonda YDKMKH'nin lokal olarak etkinliğinin denendiği bir çalışma mevcut değildir. İşte biz çalışmamızda lokal olarak YDKMKH'nin koku kaybı indüklenmiş fare modelinde etkinliğini inceledik; ayrıca bu hastalık modelinde etkinliği gösterilmiş çalışmaların olduğu KİKMKH ile de YDKMKH etkinliğini karşılaştırdık. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre kimyasal olarak anozmi indüklediğimiz fare modelinde

KİKMKH ve YDKMKH'nin olfaktör epitel üzerinde histolojik olarak iyileştirici etkinliğinin olduğu görülmektedir. Ayrıca KİKMKH ve YDKMKH davranış testleri ile değerlendirilen koku fonksiyonlarında da iyileşmeyi hızlandırmıştır.

Çalışmamızın kısıtlılıklarına bakacak olursak; bir hayvan çalışmasıdır ve elde ettiğimiz sonuçların insanlarda farklılıklar göstermesi mümkündür. Kemirgenler insanlara göre kokuya daha bağımlıdır ve ORN turnoverı daha hızlıdır. Kimyasal olarak indüklenen anozmi iyi bir dejenerasyon oluştursa da insandakine benzer bir hastalık modeli oluşturmamaktadır. Kök hücre veya başka tedavilerinin etkinliğini değerlendirmek için daha ideal hastalık modelleri oluşturulmalıdır. Ayrıca çalışmamızda kök hücrelerin yerleşimini sadece immünfloresan mikroskopta değerlendirdik. İmmünohistokimyasal ve genetik yöntemler ile bu kök hücrelerin transplante edilen dokularda incelenmesi kök hücrelerin dokuya yerleşimi ile ilgili daha kesin sonuçlar verecektir. Ayrıca kök hücrelerin eksprese ettikleri proteinlerin de analiz edilmesi bu hücrelerin farklılaşma durumlarını da göstermek açısından yararlı olacaktır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda; 3-MI ile kimyasal olarak olfaktör dejenerasyon oluşturularak, kök hücrelerin bu dejenerasyondaki etkinliği değerlendirildi. Elde ettiğimiz verilere göre;

- Yağ dokusu ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin her ikisi de intranazal olarak uygulandığı zaman kimyasal olarak hasarlanmış olan olfaktör nöroepitele ve olfaktör bulbusa yerleşmektedir.
- Yaptığımız davranış testi sonucuna göre YDKMKH ve KİKMKH uygulanan farelerde fonksiyonel iyileşme daha çabuk olmaktadır.
- Kök hücre uygulamaları olfaktör epitel rejenerasyonunu hızlandırmaktadır.
- Olfaktör dejenerasyonda KİKMKH'nin YDKMKH'ye göre etkinliği daha fazladır.

Kök hücre uygulamaları olfaktör dejenerasyon sebebiyle oluşan koku alma bozukluklarında yeni bir tedavi seçeneği olma potansiyeli taşımaktadır.

7.ÖZET

Koku hayat kalitesini arttıran, yaşama renk katan bir duyumuzdur. Diğer duylardan farklı olarak kendi kendini yenileme özelliğine sahip nöronları vardır. Bu rejenerasyon olfaktör epitel içerisindeki kök hücre görevi gören hücreler ile olmaktadır. Dış dünya ile temas halindeki olfaktör nöronlar koku moleküllerini reseptörleri ile algırlar. Bu nöronların hasar görmesi ve yenilenememesi koku almada bozukluklara yol açar. Koku alma bozukluklarında etkinliği kesin olarak gösterilmiş bir tedavi yöntemi mevcut değildir. İşte biz çalışmamızda, yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (YDKMKH) ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin (KİMKH) bu dejenerasyon durumunda etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Çalışmamızda 3-metil indol (3-MI) ile anozmi indüklediğimiz 36 fareyi her birinde 12 fare olan alt gruplara ayırdık. Farelere 3-MI enjeksiyonu sonrası 1.haftada yemek bulma testi (YBT) yapılarak anozmi doğrulandı. Daha sonra 1. gruba intranazal fosfat tamponlu salin (PBS), 2. gruba YDKMKH, 3. gruba KİMKH uygulandı. Kök hücreler yeşil floresan proteinli (YFP) transgenik farelerden üretildi. Haftalık YBT'lerle koku alma fonksiyonları değerlendirilen fareler, 3-MI enjeksiyonu sonrası 2. ve 4. haftalarda sakrifiye edilerek histopatolojik incelemeler yapıldı.

Kök hücre verilen fare gruplarında 3-MI sonrası 2. hafta ve 4. hafta YBT başarı durumları ve yemek bulma süreleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha iyiydi. Ayrıca kök hücre verilen gruplarda kontrol grubuna göre OMP ekspresyonunun ve olfaktör epitel kalınlığının arttığı, olfaktör epitel hasar

durumunun daha az olduğu izlendi. Olfaktör rejenerasyona etkisi KİKMKH'nin YDKMKH'ye göre daha fazla idi. Kök hücre verilen grupların olfaktör epitel ve olfaktör bulbuslarında YFP+ hücreler mevcuttu.

Çalışmamızdaki sonuçlara göre olfaktör dejenerasyon durumunda intranazal verilen kök hücreler hasar bölgesine yerleşmektedir. Ayrıca bu kök hücreler olfaktör epitel rejenerasyonunu ve fonksiyonel iyileşmeyi sağlamaktadır. Yağ dokusu ve kemik iliğı kökenli mezenkimal kök hücrelerin her ikisi de tedavide etkindir ve potansiyel bir tedavi yöntemi gibi durmaktadır.

Anahtar Kelimeler: mezenkimal kök hücre, anozmi, koku alma bozuklukları

8. SUMMARY

Smell is a sense that enhances the quality of life and adds excitement to life. Unlike other senses, it has neurons that have the ability to regenerate themselves. This regeneration occurs with stem cells being in olfactory epithelium. Olfactory neurons, which are in contact with the outside, perceive odors with their receptors. Olfactory disorders occur as a result of these neurons being damaged and unable to regenerate. There is no definitive treatment method for olfactory disorders. In our study, we aimed to evaluate the efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSC) and bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC) in olfactory degeneration.

In our study, 60 mice that we induced anosmia with 3-methyl indole (3-MI) were divided into subgroups containing 12 mice. Anosmia was confirmed by performing a food finding test (FFT) one week after 3-MI injection. Then, intranasal phosphate-buffered saline (PBS) was applied to the 1st group, ADSC to the 2nd group, and BMSC to the 3rd group. Stem cells were prepared from green fluorescent protein (GFP)-transgenic mice. Mice whose olfactory functions were evaluated with weekly FFTs were sacrificed at 2nd and 4th weeks after 3-MI injection and histopathological examinations were performed.

Stem cell-transplanted mouse groups had statistically better success status and food findings time compared to the control group at FFT, 2 weeks and 4 weeks after 3-MI. In addition, it was observed that OMP expression and olfactory epithelial thickness increased and olfactory epithelial damage was less in the stem cells groups compared to the control group. BMSC had higher efficiency in

olfactory regeneration than ADSC. There were GFP+ cells in the olfactory epithelium and olfactory bulbs of the stem cell-transplanted groups.

According to the results of our study, intranasal transplanted stem cells present in the damage area in case of olfactory degeneration. In addition, these stem cells provide olfactory regeneration and functional recovery. Both ADSCs and BMSCs are effective in treatment and seem to be a potential treatment modality.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Anosmia, Olfactory disorders

9.KAYNAKLAR

1. Hummel T, Whitcroft KL, Andrews P, Altundag A, Cinghi C, Costanzo RM, et al. Position paper on olfactory dysfunction. *Rhinol Suppl.* 2017;54(26):1-30.
2. Yang J, Pinto JM. The Epidemiology of Olfactory Disorders. *Curr Otorhinolaryngol Rep.* 2016;4(2):130-41.
3. Jafek BW. Ultrastructure of human nasal mucosa. *Laryngoscope.* 1983;93(12):1576-99.
4. Graziadei GA, Graziadei PP. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol.* 1979;8(2):197-213.
5. Chen X, Katakowski M, Li Y, Lu D, Wang L, Zhang L, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res.* 2002;69(5):687-91.
6. Schubert CR, Fischer ME, Pinto AA, Klein BEK, Klein R, Tweed TS, et al. Sensory Impairments and Risk of Mortality in Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72(5):710-5.
7. Smith TD, Bhatnagar KP. Anatomy of the olfactory system. *Handb Clin Neurol.* 2019;164:17-28.
8. Hadley K, Orlandi RR, Fong KJ. Basic anatomy and physiology of olfaction and taste. *Otolaryngol Clin North Am.* 2004;37(6):1115-26.
9. Zhao K, Scherer PW, Hajiloo SA, Dalton P. Effect of anatomy on human nasal air flow and odorant transport patterns: implications for olfaction. *Chem Senses.* 2004;29(5):365-79.
10. Cain WS, Murphy CL. Interaction between chemoreceptive modalities of odour and irritation. *Nature.* 1980;284(5753):255-7.
11. Sant'Ambrogio G, Tsubone H, Sant'Ambrogio FB. Sensory information from the upper airway: role in the control of breathing. *Respir Physiol.* 1995;102(1):1-16.
12. Peña-Melián Á, Cabello-de la Rosa JP, Gallardo-Alcañiz MJ, Vaamonde-Gamo J, Relea-Calatayud F, González-López L, et al. Cranial Pair 0: The Nervus Terminalis. *Anat Rec (Hoboken).* 2019;302(3):394-404.
13. Whitcroft KL, Hummel T. Olfactory Function and Dysfunction. In: Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Richardson MA, Robbins KT, Thomas JR, editors. *Cummings Otolaryngology Head&Neck Surgery.* 7th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2021. p. 586-602.
14. Escada PA, Lima C, da Silva JM. The human olfactory mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009;266(11):1675-80.
15. Young B, Heath J: Special sense organs. In Young B, Heath J, editors: *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*, 4th ed, 2000, Elsevier Science, p 380.
16. Morrison EE, Costanzo RM. Morphology of the human olfactory epithelium. *J Comp Neurol.* 1990;297(1):1-13.
17. Au E, Roskams AJ. Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia.* 2003;41(3):224-36.
18. Barnett SC, Chang L. Olfactory ensheathing cells and CNS repair: going solo or in need of a friend? *Trends Neurosci.* 2004;27(1):54-60.
19. Mackay-Sim A, St John JA. Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries. *Exp Neurol.* 2011;229(1):174-80.

20. Andrews PJ, Poirrier AL, Lund VJ, Choi D. Safety of human olfactory mucosal biopsy for the purpose of olfactory ensheathing cell harvest and nerve repair: a prospective controlled study in patients undergoing endoscopic sinus surgery. *Rhinology*. 2016;54(2):183-91.
21. Nakashima T, Kimmelman CP, Snow JB, Jr. Structure of human fetal and adult olfactory neuroepithelium. *Arch Otolaryngol*. 1984;110(10):641-6.
22. Murrell W, Bushell GR, Livesey J, McGrath J, MacDonald KP, Bates PR, et al. Neurogenesis in adult human. *Neuroreport*. 1996;7(6):1189-94.
23. Moran DT, Rowley JC, 3rd, Jafek BW, Lovell MA. The fine structure of the olfactory mucosa in man. *J Neurocytol*. 1982;11(5):721-46.
24. Elsaesser R, Paysan J. The sense of smell, its signalling pathways, and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells. *BMC Neurosci*. 2007;8 Suppl 3(Suppl 3):S1.
25. Rowley JC, 3rd, Moran DT, Jafek BW. Peroxidase backfills suggest the mammalian olfactory epithelium contains a second morphologically distinct class of bipolar sensory neuron: the microvillar cell. *Brain Res*. 1989;502(2):387-400.
26. Vogalis F, Hegg CC, Lucero MT. Ionic conductances in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *J Physiol*. 2005;562(Pt 3):785-99.
27. Vogalis F, Hegg CC, Lucero MT. Electrical coupling in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *J Neurophysiol*. 2005;94(2):1001-12.
28. Zhuo X, Gu J, Behr MJ, Swiatek PJ, Cui H, Zhang QY, et al. Targeted disruption of the olfactory mucosa-specific Cyp2g1 gene: impact on acetaminophen toxicity in the lateral nasal gland, and tissue-selective effects on Cyp2a5 expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(2):719-28.
29. Ogura T, Szebenyi SA, Krosnowski K, Sathyanesan A, Jackson J, Lin W. Cholinergic microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium and effect of acetylcholine on olfactory sensory neurons and supporting cells. *J Neurophysiol*. 2011;106(3):1274-87.
30. Eibenstein A, Fioretti AB, Lena C, Rosati N, Amabile G, Fusetti M. Modern psychophysical tests to assess olfactory function. *Neurol Sci*. 2005;26(3):147-55.
31. Okano M, Takagi SF. Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium. *J Physiol*. 1974;242(2):353-70.
32. Jones N. The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;51(1-3):5-19.
33. Federico G, Maremmani C, Cinquanta L, Baroncelli GI, Fattori B, Saggese G. Mucus of the human olfactory epithelium contains the insulin-like growth factor-I system which is altered in some neurodegenerative diseases. *Brain Res*. 1999;835(2):306-14.
34. Fujikura T, Okubo K. Adrenomedullin level in the nasal discharge from allergic rhinitis cohort. *Peptides*. 2011;32(2):368-73.
35. Holbrook EH, Wu E, Curry WT, Lin DT, Schwob JE. Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *Laryngoscope*. 2011;121(8):1687-701.
36. Leopold DA, Hummel T, Schwob JE, Hong SC, Knecht M, Kobal G. Anterior distribution of human olfactory epithelium. *Laryngoscope*. 2000;110(3 Pt 1):417-21.
37. Féron F, Perry C, McGrath JJ, Mackay-Sim A. New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;124(8):861-6.

38. K G. Kulak Burun Boğaz Baş Boyun Cerrahisi. In: M O, editor. *Burun ve Yüz Hastalıkları* 2016. p. 220-5.
39. Cleland TA, Linster C. Central olfactory structures. *Handb Clin Neurol*. 2019;164:79-96.
40. Wang L, Zhang Z, Chen J, Manyande A, Haddad R, Liu Q, et al. Cell-Type-Specific Whole-Brain Direct Inputs to the Anterior and Posterior Piriform Cortex. *Frontiers in Neural Circuits*. 2020;14(4).
41. Howard JD, Plailly J, Grueschow M, Haynes JD, Gottfried JA. Odor quality coding and categorization in human posterior piriform cortex. *Nat Neurosci*. 2009;12(7):932-8.
42. Xu W, Wilson DA. Odor-evoked activity in the mouse lateral entorhinal cortex. *Neuroscience*. 2012;223:12-20.
43. McGann JP. Poor human olfaction is a 19th-century myth. *Science*. 2017;356(6338).
44. Witt M, Hummel T. Vomeronasal versus olfactory epithelium: is there a cellular basis for human vomeronasal perception? *Int Rev Cytol*. 2006;248:209-59.
45. Meredith M. Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. *Chem Senses*. 2001;26(4):433-45.
46. Savic I, Berglund H, Gulyas B, Roland P. Smelling of odorous sex hormone-like compounds causes sex-differentiated hypothalamic activations in humans. *Neuron*. 2001;31(4):661-8.
47. Monti-Bloch L, Jennings-White C, Berliner DL. The human vomeronasal system. A review. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;855:373-89.
48. García-Velasco J, García-Casas S. Nose surgery and the vomeronasal organ. *Aesthetic Plast Surg*. 1995;19(5):451-4.
49. Andres KH. [The fine structure of the olfactory region of macrosmatic animals]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1966;69:140-54.
50. Keck T, Lindemann J. Numerical simulation and nasal air-conditioning. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2010;9:Doc08.
51. Alvites RD, Caseiro AR, Pedrosa SS, Branquinho ME, Varejão ASP, Maurício AC. The Nasal Cavity of the Rat and Mouse-Source of Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Peripheral Nerve Injury. *Anat Rec (Hoboken)*. 2018;301(10):1678-89.
52. Reznik GK. Comparative anatomy, physiology, and function of the upper respiratory tract. *Environ Health Perspect*. 1990;85:171-6.
53. Mills RP, Christmas HE. Applied comparative anatomy of the nasal turbinates. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1990;15(6):553-8.
54. Harkema JR, Carey SA, Wagner JG. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol*. 2006;34(3):252-69.
55. Schoenfeld TA, Cleland TA. The anatomical logic of smell. *Trends Neurosci*. 2005;28(11):620-7.
56. Negus VE. The function of the paranasal sinuses. *Acta Otolaryngol*. 1954;44(5-6):408-26.
57. Gross EA, Swenberg JA, Fields S, Popp JA. Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice. *J Anat*. 1982;135(Pt 1):83-8.
58. Hummel T. Retronasal perception of odors. *Chem Biodivers*. 2008;5(6):853-61.

59. Hahn I, Scherer PW, Mozell MM. Velocity profiles measured for airflow through a large-scale model of the human nasal cavity. *J Appl Physiol* (1985). 1993;75(5):2273-87.
60. Subramaniam RP, Richardson RB, Morgan KT, Kimbell JS, Guilmette RA. COMPUTATIONAL FLUID DYNAMICS SIMULATIONS OF INSPIRATORY AIRFLOW IN THE HUMAN NOSE AND NASOPHARYNX. *Inhalation Toxicology*. 1998;10(2):91-120.
61. Kelly JT, Prasad AK, Wexler AS. Detailed flow patterns in the nasal cavity. *J Appl Physiol* (1985). 2000;89(1):323-37.
62. Damm M, Vent J, Schmidt M, Theissen P, Eckel HE, Lötsch J, et al. Intranasal volume and olfactory function. *Chem Senses*. 2002;27(9):831-9.
63. Li C, Jiang J, Kim K, Otto BA, Farag AA, Cowart BJ, et al. Nasal Structural and Aerodynamic Features That May Benefit Normal Olfactory Sensitivity. *Chem Senses*. 2018;43(4):229-37.
64. Zhao K, Dalton P, Yang GC, Scherer PW. Numerical modeling of turbulent and laminar airflow and odorant transport during sniffing in the human and rat nose. *Chem Senses*. 2006;31(2):107-18.
65. Hajjar E, Perahia D, Débat H, Nespoulous C, Robert CH. Odorant binding and conformational dynamics in the odorant-binding protein. *J Biol Chem*. 2006;281(40):29929-37.
66. Briand L, Nespoulous C, Perez V, Rémy JJ, Huet JC, Pernollet JC. Ligand-binding properties and structural characterization of a novel rat odorant-binding protein variant. *Eur J Biochem*. 2000;267(10):3079-89.
67. Senf W, Menco BP, Punter PH, Duyvesteyn P. Determination of odour affinities based on the dose-response relationships of the frog's electro-olfactogram. *Experientia*. 1980;36(2):213-5.
68. Grolli S, Merli E, Conti V, Scaltriti E, Ramoni R. Odorant binding protein has the biochemical properties of a scavenger for 4-hydroxy-2-nonenal in mammalian nasal mucosa. *Febs j*. 2006;273(22):5131-42.
69. Glusman G, Yanai I, Rubin I, Lancet D. The complete human olfactory subgenome. *Genome Res*. 2001;11(5):685-702.
70. Axel R. The molecular logic of smell. *Sci Am*. 1995;273(4):154-9.
71. Olender T, Lancet D, Nebert DW. Update on the olfactory receptor (OR) gene superfamily. *Hum Genomics*. 2008;3(1):87-97.
72. Rodriguez I, Greer CA, Mok MY, Mombaerts P. A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nat Genet*. 2000;26(1):18-9.
73. Liberles SD, Buck LB. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*. 2006;442(7103):645-50.
74. Berry MD, Gainetdinov RR, Hoener MC, Shahid M. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges. *Pharmacol Ther*. 2017;180:161-80.
75. Jones DT, Reed RR. Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*. 1989;244(4906):790-5.
76. Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*. 2001;413(6852):211-8.
77. Breer H, Boekhoff I, Tareilus E. Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature*. 1990;345(6270):65-8.

78. Kramer RH, Siegelbaum SA. Intracellular Ca²⁺ regulates the sensitivity of cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor neurons. *Neuron*. 1992;9(5):897-906.
79. Chen TY, Yau KW. Direct modulation by Ca(2+)-calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature*. 1994;368(6471):545-8.
80. Reisert J, Matthews HR. Na⁺-dependent Ca²⁺ extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells. *J Gen Physiol*. 1998;112(5):529-35.
81. Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*. 1999;96(5):713-23.
82. Hallem EA, Carlson JR. Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell*. 2006;125(1):143-60.
83. Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*. 1994;79(7):1245-55.
84. Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nuñez JM, Vosshall LB, Axel R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*. 1994;79(6):981-91.
85. Moulton DG. Spatial patterning of response to odors in the peripheral olfactory system. *Physiol Rev*. 1976;56(3):578-93.
86. Spehr M, Schwane K, Heilmann S, Gisselmann G, Hummel T, Hatt H. Dual capacity of a human olfactory receptor. *Curr Biol*. 2004;14(19):R832-3.
87. Oka Y, Omura M, Kataoka H, Touhara K. Olfactory receptor antagonism between odorants. *Embo j*. 2004;23(1):120-6.
88. Wilson RI, Mainen ZF. Early events in olfactory processing. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:163-201.
89. Mori K, Sakano H. How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain? *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:467-99.
90. Croy I, Hummel T. Olfaction as a marker for depression. *J Neurol*. 2017;264(4):631-8.
91. Philpott CM, Boak D. The impact of olfactory disorders in the United kingdom. *Chem Senses*. 2014;39(8):711-8.
92. Miwa T, Furukawa M, Tsukatani T, Costanzo RM, DiNardo LJ, Reiter ER. Impact of olfactory impairment on quality of life and disability. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;127(5):497-503.
93. Mattes RD, Cowart BJ, Schiavo MA, Arnold C, Garrison B, Kare MR, et al. Dietary evaluation of patients with smell and/or taste disorders. *Am J Clin Nutr*. 1990;51(2):233-40.
94. Schubert CR, Cruickshanks KJ, Fischer ME, Huang GH, Klein R, Tsai MY, et al. Carotid Intima Media Thickness, Atherosclerosis, and 5-Year Decline in Odor Identification: The Beaver Dam Offspring Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70(7):879-84.
95. Croy I, Olgun S, Mueller L, Schmidt A, Muench M, Hummel C, et al. Peripheral adaptive filtering in human olfaction? Three studies on prevalence and effects of olfactory training in specific anosmia in more than 1600 participants. *Cortex*. 2015;73:180-7.
96. Blau JN, Solomon F. Smell and other sensory disturbances in migraine. *J Neurol*. 1985;232(5):275-6.
97. Leopold D. Distortion of olfactory perception: diagnosis and treatment. *Chem Senses*. 2002;27(7):611-5.

98. Murphy C, Doty RL, Duncan HJ. Clinical disorders of olfaction. In: Doty RL, ed. *Handbook of Olfaction and Gustation*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 2003
99. Hong SC, Holbrook EH, Leopold DA, Hummel T. Distorted olfactory perception: a systematic review. *Acta Otolaryngol*. 2012;132 Suppl 1:S27-31.
100. Landis BN, Frasnelli J, Hummel T. Euosmia: a rare form of parosmia. *Acta Otolaryngol*. 2006;126(1):101-3.
101. Alobid I, Benítez P, Cardelús S, de Borja Callejas F, Lehrer-Coriat E, Pujols L, et al. Oral plus nasal corticosteroids improve smell, nasal congestion, and inflammation in sino-nasal polyposis. *Laryngoscope*. 2014;124(1):50-6.
102. Doty RL, Mishra A. Olfaction and its alteration by nasal obstruction, rhinitis, and rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2001;111(3):409-23.
103. Jafek BW, Murrow B, Michaels R, Restrepo D, Linschoten M. Biopsies of human olfactory epithelium. *Chem Senses*. 2002;27(7):623-8.
104. Rombaux P, Potier H, Bertrand B, Duprez T, Hummel T. Olfactory bulb volume in patients with sinonasal disease. *Am J Rhinol*. 2008;22(6):598-601.
105. Rombaux P, Huart C, Levie P, Cingi C, Hummel T. Olfaction in Chronic Rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016;16(5):41.
106. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*. 2020;58(Suppl S29):1-464.
107. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Krampner M, et al. Clinical practice guideline (update): adult sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;152(2 Suppl):S1-s39.
108. Enriquez K, Lehrer E, Mullol J. The optimal evaluation and management of patients with a gradual onset of olfactory loss. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;22(1):34-41.
109. Whitcroft KL, Cuevas M, Haehner A, Hummel T. Patterns of olfactory impairment reflect underlying disease etiology. *Laryngoscope*. 2017;127(2):291-5.
110. Seiden AM. *Olfactory loss secondary to nasal and sinus pathology. Taste and smell disorders* New York: Thieme. 1997:52-71.
111. Jafek BW, Moran DT, Eller PM, Rowley JC, 3rd, Jafek TB. Steroid-dependent anosmia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987;113(5):547-9.
112. Apter AJ, Mott AE, Frank ME, Clive JM. Allergic rhinitis and olfactory loss. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1995;75(4):311-6.
113. Leopold DA. The relationship between nasal anatomy and human olfaction. *Laryngoscope*. 1988;98(11):1232-8.
114. Pellegrino R, Walliczek-Dworschak U, Winter G, Hull D, Hummel T. Investigation of chemosensitivity during and after an acute cold. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2017;7(2):185-91.
115. Temmel AF, Quint C, Schickinger-Fischer B, Klimek L, Stoller E, Hummel T. Characteristics of olfactory disorders in relation to major causes of olfactory loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128(6):635-41.
116. Cavazzana A, Larsson M, Münch M, Hähner A, Hummel T. Postinfectious olfactory loss: A retrospective study on 791 patients. *Laryngoscope*. 2018;128(1):10-5.
117. Reden J, Maroldt H, Fritz A, Zahnert T, Hummel T. A study on the prognostic significance of qualitative olfactory dysfunction. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007;264(2):139-44.

118. London B, Nabet B, Fisher AR, White B, Sammel MD, Doty RL. Predictors of prognosis in patients with olfactory disturbance. *Ann Neurol*. 2008;63(2):159-66.
119. Hummel T, Lötsch J. Prognostic factors of olfactory dysfunction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;136(4):347-51.
120. Baker H, Genter M. The Olfactory System and the Nasal Mucosa as Portals of Entry of Viruses, Drugs, and Other Exogenous Agents into the Brain. In: Doty RL, ed. *Handbook of Olfaction and Gustation*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2003:549-574.
121. Youngentob SL, Schwob JE, Saha S, Manglapus G, Jubelt B. Functional consequences following infection of the olfactory system by intranasal infusion of the olfactory bulb line variant (OBLV) of mouse hepatitis strain JHM. *Chem Senses*. 2001;26(8):953-63.
122. Yamagishi M, Fujiwara M, Nakamura H. Olfactory mucosal findings and clinical course in patients with olfactory disorders following upper respiratory viral infection. *Rhinology*. 1994;32(3):113-8.
123. Costanzo RM, DiNardo LJ, Reiter ER. Head injury and olfaction. In: Doty RL, ed. *Handbook of Olfaction and Gustation*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2003:629-638.
124. Lötsch J, Reither N, Bogdanov V, Hähner A, Ultsch A, Hill K, et al. A brain-lesion pattern based algorithm for the diagnosis of posttraumatic olfactory loss. *Rhinology*. 2015;53(4):365-70.
125. Yamagishi M, Hasegawa S, Nakano Y. Examination and classification of human olfactory mucosa in patients with clinical olfactory disturbances. *Arch Otorhinolaryngol*. 1988;245(5):316-20.
126. Sumner D. POST-TRAUMATIC ANOSMIA. *Brain*. 1964;87:107-20.
127. Zusho H. Posttraumatic anosmia. *Arch Otolaryngol*. 1982;108(2):90-2.
128. Jacobi G, Ritz A, Emrich R. Cranial nerve damage after paediatric head trauma: a long-term follow-up study of 741 cases. *Acta Paediatr Hung*. 1986;27(3):173-87.
129. Hendriks AP. Olfactory dysfunction. *Rhinology*. 1988;26(4):229-51.
130. Yee KK, Costanzo RM. Changes in odor quality discrimination following recovery from olfactory nerve transection. *Chem Senses*. 1998;23(5):513-9.
131. Christensen MD, Holbrook EH, Costanzo RM, Schwob JE. Rhinotomy is disrupted during the re-innervation of the olfactory bulb that follows transection of the olfactory nerve. *Chem Senses*. 2001;26(4):359-69.
132. Fan LY, Kuo CL, Lirng JF, Shu CH. Investigation of prognostic factors for post-traumatic olfactory dysfunction. *J Chin Med Assoc*. 2015;78(5):299-303.
133. Doty RL, Yousem DM, Pham LT, Kreshak AA, Geckle R, Lee WW. Olfactory dysfunction in patients with head trauma. *Arch Neurol*. 1997;54(9):1131-40.
134. Leon-Sarmiento FE, Leon-Ariza DS, Doty RL. Dysfunctional chemosensation in myasthenia gravis: a systematic review. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2013;15(1):1-6.
135. Wehling E, Naess H, Wollschlaeger D, Hofstad H, Bramerson A, Bende M, et al. Olfactory dysfunction in chronic stroke patients. *BMC Neurol*. 2015;15:199.
136. Attems J, Walker L, Jellinger KA. Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*. 2014;127(4):459-75.
137. Bahuleyan B, Singh S. Olfactory memory impairment in neurodegenerative diseases. *J Clin Diagn Res*. 2012;6(8):1437-41.
138. Doty RL. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis*. 2012;46(3):527-52.

139. Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, et al. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2008;63(2):167-73.
140. Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol*. 2008;255 Suppl 5:18-32.
141. Ponsen MM, Stoffers D, Booij J, van Eck-Smit BL, Wolters E, Berendse HW. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2004;56(2):173-81.
142. Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay-Sim A, Fleischmann J, Silburn PA, et al. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease--a multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009;15(7):490-4.
143. Westermann B, Wattendorf E, Schwerdtfeger U, Husner A, Fuhr P, Gratzl O, et al. Functional imaging of the cerebral olfactory system in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(1):19-24.
144. Duda JE. Olfactory system pathology as a model of Lewy neurodegenerative disease. *J Neurol Sci*. 2010;289(1-2):49-54.
145. Doty RL, Stern MB, Pfeiffer C, Gollomp SM, Hurtig HI. Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55(2):138-42.
146. Doty RL, Hawkes C, Good K, Duda J: Odor Perception and Neuropathology in Neurodegenerative Diseases and Schizophrenia. In Doty R, editor: *Handbook of olfaction and gustation*, 3rd ed, Hoboken, New Jersey, 2015, Wiley Blackwell, pp 403–451
147. Wilson RS, Arnold SE, Tang Y, Bennett DA. Odor identification and decline in different cognitive domains in old age. *Neuroepidemiology*. 2006;26(2):61-7.
148. Tabaton M, Cammarata S, Mancardi GL, Cordone G, Perry G, Loeb C. Abnormal tau-reactive filaments in olfactory mucosa in biopsy specimens of patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991;41(3):391-4.
149. Talamo BR, Rudel R, Kosik KS, Lee VM, Neff S, Adelman L, et al. Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature*. 1989;337(6209):736-9.
150. Duda JE, Shah U, Arnold SE, Lee VM, Trojanowski JQ. The expression of alpha-, beta-, and gamma-synucleins in olfactory mucosa from patients with and without neurodegenerative diseases. *Exp Neurol*. 1999;160(2):515-22.
151. Lee JH, Goedert M, Hill WD, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau proteins are abnormally expressed in olfactory epithelium of Alzheimer patients and developmentally regulated in human fetal spinal cord. *Exp Neurol*. 1993;121(1):93-105.
152. Trojanowski JQ, Newman PD, Hill WD, Lee VM. Human olfactory epithelium in normal aging, Alzheimer's disease, and other neurodegenerative disorders. *J Comp Neurol*. 1991;310(3):365-76.
153. Arnold SE, Lee EB, Moberg PJ, Stutzbach L, Kazi H, Han LY, et al. Olfactory epithelium amyloid-beta and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2010;67(4):462-9.
154. Witt M, Bormann K, Gudziol V, Pehlke K, Barth K, Minovi A, et al. Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009;24(6):906-14.

155. Huart C, Meusel T, Gerber J, Duprez T, Rombaux P, Hummel T. The depth of the olfactory sulcus is an indicator of congenital anosmia. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32(10):1911-4.
156. Abolmaali ND, Hietschold V, Vogl TJ, Hüttenbrink KB, Hummel T. MR evaluation in patients with isolated anosmia since birth or early childhood. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002;23(1):157-64.
157. Croy I, Negoias S, Novakova L, Landis BN, Hummel T. Learning about the functions of the olfactory system from people without a sense of smell. *PLoS One*. 2012;7(3):e33365.
158. Ros C, Alobid I, Centellas S, Balasch J, Mullol J, Castelo-Branco C. Loss of smell but not taste in adult women with Turner's syndrome and other congenital hypogonadisms. *Maturitas*. 2012;73(3):244-50.
159. Iannaccone A, Myktyyn K, Persico AM, Searby CC, Baldi A, Jablonski MM, et al. Clinical evidence of decreased olfaction in Bardet-Biedl syndrome caused by a deletion in the BBS4 gene. *Am J Med Genet A*. 2005;132a(4):343-6.
160. Valdes-Socin H, Rubio Almanza M, Tomé Fernández-Ladreda M, Debray FG, Bours V, Beckers A. Reproduction, smell, and neurodevelopmental disorders: genetic defects in different hypogonadotropic hypogonadal syndromes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:109.
161. Nordin S, Brämerson A. Complaints of olfactory disorders: epidemiology, assessment and clinical implications. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008;8(1):10-5.
162. Murphy C, Schubert CR, Cruickshanks KJ, Klein BE, Klein R, Nondahl DM. Prevalence of olfactory impairment in older adults. *Jama*. 2002;288(18):2307-12.
163. Gopinath B, Sue CM, Kifley A, Mitchell P. The association between olfactory impairment and total mortality in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67(2):204-9.
164. Pinto JM, Wroblewski KE, Kern DW, Schumm LP, McClintock MK. Olfactory dysfunction predicts 5-year mortality in older adults. *PLoS One*. 2014;9(10):e107541.
165. Devanand DP, Lee S, Manly J, Andrews H, Schupf N, Masurkar A, et al. Olfactory identification deficits and increased mortality in the community. *Ann Neurol*. 2015;78(3):401-11.
166. Attems J, Walker L, Jellinger KA. Olfaction and Aging: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015;61(6):485-90.
167. Loo AT, Youngentob SL, Kent PF, Schwob JE. The aging olfactory epithelium: neurogenesis, response to damage, and odorant-induced activity. *Int J Dev Neurosci*. 1996;14(7-8):881-900.
168. Ishimaru T, Miwa T, Nomura M, Iwato M, Furukawa M. Reversible hyposmia caused by intracranial tumour. *J Laryngol Otol*. 1999;113(8):750-3.
169. Ruben S, Elston J, Hayward R. Pituitary adenoma presenting as the Foster-Kennedy syndrome. *Br J Ophthalmol*. 1992;76(2):117-9.
170. Skolnik EM, Massari FS, Tenta LT. Olfactory neuroepithelioma. Review of the world literature and presentation of two cases. *Arch Otolaryngol*. 1966;84(6):644-53.
171. Jones-Gotman M, Zatorre RJ. Olfactory identification deficits in patients with focal cerebral excision. *Neuropsychologia*. 1988;26(3):387-400.
172. Pfaar O, Hüttenbrink KB, Hummel T. Assessment of olfactory function after septoplasty: a longitudinal study. *Rhinology*. 2004;42(4):195-9.

173. Bonfils P, Malinvaud D, Soudry Y, Devars du Maine M, Laccourreye O. Surgical therapy and olfactory function. *B-ent*. 2009;5 Suppl 13:77-87.
174. Risberg-Berlin B, Möller RY, Finizia C. Effectiveness of olfactory rehabilitation with the nasal airflow-inducing maneuver after total laryngectomy: one-year follow-up study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;133(7):650-4.
175. Song C, Leonard BE. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):627-47.
176. Rupp CI, Kurz M, Kemmler G, Mair D, Hausmann A, Hinterhuber H, et al. Reduced olfactory sensitivity, discrimination, and identification in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(3):432-9.
177. Maurage P, Callot C, Chang B, Philippot P, Rombaux P, de Timary P. Olfactory impairment is correlated with confabulation in alcoholism: towards a multimodal testing of orbitofrontal cortex. *PLoS One*. 2011;6(8):e23190.
178. Maurage P, Callot C, Philippot P, Rombaux P, de Timary P. Chemosensory event-related potentials in alcoholism: a specific impairment for olfactory function. *Biol Psychol*. 2011;88(1):28-36.
179. Vennemann MM, Hummel T, Berger K. The association between smoking and smell and taste impairment in the general population. *J Neurol*. 2008;255(8):1121-6.
180. Katotomichelakis M, Balatsouras D, Tripsianis G, Davris S, Maroudias N, Danielides V, et al. The effect of smoking on the olfactory function. *Rhinology*. 2007;45(4):273-80.
181. Vent J, Robinson AM, Gentry-Nielsen MJ, Conley DB, Hallworth R, Leopold DA, et al. Pathology of the olfactory epithelium: smoking and ethanol exposure. *Laryngoscope*. 2004;114(8):1383-8.
182. Yee KK, Pribitkin EA, Cowart BJ, Vainius AA, Klock CT, Rosen D, et al. Smoking-associated squamous metaplasia in olfactory mucosa of patients with chronic rhinosinusitis. *Toxicol Pathol*. 2009;37(5):594-8.
183. Hummel T, Rothbauer C, Pauli E, Kobal G. Effects of the nasal decongestant oxymetazoline on human olfactory and intranasal trigeminal function in acute rhinitis. *Eur J Clin Pharmacol*. 1998;54(7):521-8.
184. Welge-Lüssen A, Wille C, Renner B, Kobal G. Anesthesia affects olfaction and chemosensory event-related potentials. *Clin Neurophysiol*. 2004;115(6):1384-91.
185. Soler ZM, Hyer JM, Karnezis TT, Schlosser RJ. The Olfactory Cleft Endoscopy Scale correlates with olfactory metrics in patients with chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(3):293-8.
186. Schlosser RJ, Smith TL, Mace JC, Alt JA, Beswick DM, Mattos JL, et al. The Olfactory Cleft Endoscopy Scale: a multi-institutional validation study in chronic rhinosinusitis. *Rhinology*. 2021;59(2):181-90.
187. Hopkins C, Gillett S, Slack R, Lund VJ, Browne JP. Psychometric validity of the 22-item Sinonasal Outcome Test. *Clin Otolaryngol*. 2009;34(5):447-54.
188. Soler ZM, Smith TL, Alt JA, Ramakrishnan VR, Mace JC, Schlosser RJ. Olfactory-specific quality of life outcomes after endoscopic sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(4):407-13.
189. Landis BN, Hummel T, Hugentobler M, Giger R, Lacroix JS. Ratings of overall olfactory function. *Chem Senses*. 2003;28(8):691-4.
190. Pade J, Hummel T. Olfactory function following nasal surgery. *Laryngoscope*. 2008;118(7):1260-4.

191. Philpott CM, Rimal D, Tassone P, Prinsley PR, Premachandra DJ. A study of olfactory testing in patients with rhinological pathology in the ENT clinic. *Rhinology*. 2008;46(1):34-9.
192. Delank KW, Stoll W. Olfactory function after functional endoscopic sinus surgery for chronic sinusitis. *Rhinology*. 1998;36(1):15-9.
193. Doty RL, McKeown DA, Lee WW, Shaman P. A study of the test-retest reliability of ten olfactory tests. *Chem Senses*. 1995;20(6):645-56.
194. Philpott CM, Wolstenholme CR, Goodenough PC, Clark A, Murty GE. Comparison of subjective perception with objective measurement of olfaction. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(3):488-90.
195. Wehling E, Lundervold AJ, Espeset T, Reinvang I, Bramerson A, Nordin S. Even cognitively well-functioning adults are unaware of their olfactory dysfunction: Implications for ENT clinicians and researchers. *Rhinology*. 2015;53(1):89-94.
196. Hedner M, Larsson M, Arnold N, Zucco GM, Hummel T. Cognitive factors in odor detection, odor discrimination, and odor identification tasks. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2010;32(10):1062-7.
197. Cain WS. To know with the nose: keys to odor identification. *Science*. 1979;203(4379):467-70.
198. Sorokowska A, Albrecht E, Hummel T. Reading first or smelling first? Effects of presentation order on odor identification. *Atten Percept Psychophys*. 2015;77(3):731-6.
199. Hugh SC, Siu J, Hummel T, Forte V, Campisi P, Papsin BC, et al. Olfactory testing in children using objective tools: comparison of Sniffin' Sticks and University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT). *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;44(1):10.
200. Lötsch J, Reichmann H, Hummel T. Different odor tests contribute differently to the evaluation of olfactory loss. *Chem Senses*. 2008;33(1):17-21.
201. Doty RL, Shaman P, Kimmelman CP, Dann MS. University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic. *Laryngoscope*. 1984;94(2 Pt 1):176-8.
202. Yücepur C, Özücer B, Değirmenci N, Yıldırım Y, Veyseller B, Ozturan O. University of Pennsylvania smell identification test: application to Turkish population. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. 2012;22(2):77-80.
203. Altundag A, Tekeli H, Salihoglu M, Cayonu M, Yasar H, Kendirli MT, et al. Cross-culturally modified University of Pennsylvania Smell Identification Test for a Turkish population. *Am J Rhinol Allergy*. 2015;29(5):e138-41.
204. Kobal G, Hummel T, Sekinger B, Barz S, Roscher S, Wolf S. "Sniffin' sticks": screening of olfactory performance. *Rhinology*. 1996;34(4):222-6.
205. Hummel T, Sekinger B, Wolf SR, Pauli E, Kobal G. 'Sniffin' sticks': olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chem Senses*. 1997;22(1):39-52.
206. Tekeli H, Altundağ A, Salihoğlu M, Cayönü M, Kendirli MT. The applicability of the "Sniffin' Sticks" olfactory test in a Turkish population. *Med Sci Monit*. 2013;19:1221-6.
207. Deems DA, Doty RL, Settle RG, Moore-Gillon V, Shaman P, Mester AF, et al. Smell and taste disorders, a study of 750 patients from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1991;117(5):519-28.

208. Rombaux P, Huart C, Mouraux A. Assessment of chemosensory function using electroencephalographic techniques. *Rhinology*. 2012;50(1):13-21.
209. Kobal G, Hummel C. Cerebral chemosensory evoked potentials elicited by chemical stimulation of the human olfactory and respiratory nasal mucosa. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1988;71(4):241-50.
210. Hummel T, Knecht M, Kobal G. Peripherally obtained electrophysiological responses to olfactory stimulation in man: electro-olfactograms exhibit a smaller degree of desensitization compared with subjective intensity estimates. *Brain Res*. 1996;717(1-2):160-4.
211. Knecht M, Hummel T. Recording of the human electro-olfactogram. *Physiol Behav*. 2004;83(1):13-9.
212. Gottschlich M, Hummel T. Effects of handedness on olfactory event-related potentials in a simple olfactory task. *Rhinology*. 2015;53(2):149-53.
213. Savic I. Imaging of brain activation by odorants in humans. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12(4):455-61.
214. Lundström JN, Boesveldt S, Albrecht J. Central Processing of the Chemical Senses: an Overview. *ACS Chem Neurosci*. 2011;2(1):5-16.
215. Decker JR, Meen EK, Kern RC, Chandra RK. Cost effectiveness of magnetic resonance imaging in the workup of the dysosmia patient. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(1):56-61.
216. Hummel T, Rissom K, Reden J, Hähner A, Weidenbecher M, Hüttenbrink KB. Effects of olfactory training in patients with olfactory loss. *Laryngoscope*. 2009;119(3):496-9.
217. Altundag A, Cayonu M, Kayabasoglu G, Salihoglu M, Tekeli H, Saglam O, et al. Modified olfactory training in patients with postinfectious olfactory loss. *Laryngoscope*. 2015;125(8):1763-6.
218. Gudziol V, Hummel T. Effects of pentoxifylline on olfactory sensitivity: a postmarketing surveillance study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;135(3):291-5.
219. Henkin RI, Velicu I, Schmidt L. An open-label controlled trial of theophylline for treatment of patients with hyposmia. *Am J Med Sci*. 2009;337(6):396-406.
220. Meusel T, Albinus J, Welge-Luessen A, Hähner A, Hummel T. Short-term effect of caffeine on olfactory function in hyposmic patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273(8):2091-5.
221. Whitcroft KL, Gudziol V, Hummel T. Short-Course Pentoxifylline Is Not Effective in Post-Traumatic Smell Loss: A Pilot Study. *Ear Nose Throat J*. 2020;99(1):58-61.
222. Whitcroft KL, Ezzat M, Cuevas M, Andrews P, Hummel T. The effect of intranasal sodium citrate on olfaction in post-infectious loss: results from a prospective, placebo-controlled trial in 49 patients. *Clin Otolaryngol*. 2017;42(3):557-63.
223. Hummel T, Whitcroft KL, Rueter G, Haehner A. Intranasal vitamin A is beneficial in post-infectious olfactory loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2017;274(7):2819-25.
224. Lyckholm L, Hedding SP, Parker G, Coyne PJ, Ramakrishnan V, Smith TJ, et al. A randomized, placebo controlled trial of oral zinc for chemotherapy-related taste and smell disorders. *J Pain Palliat Care Pharmacother*. 2012;26(2):111-4.
225. Quint C, Temmel AF, Hummel T, Ehrenberger K. The quinoxaline derivative caroverine in the treatment of sensorineural smell disorders: a proof-of-concept study. *Acta Otolaryngol*. 2002;122(8):877-81.

226. Lee CH, Mo JH, Shim SH, Ahn JM, Kim JW. Effect of ginkgo biloba and dexamethasone in the treatment of 3-methylindole-induced anosmia mouse model. *Am J Rhinol*. 2008;22(3):292-6.
227. Kim HY, Kim JH, Dhong HJ, Kim KR, Chung SK, Chung SC, et al. Effects of statins on the recovery of olfactory function in a 3-methylindole-induced anosmia mouse model. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26(2):e81-4.
228. Hummel T, Heilmann S, Hüttenbriuk KB. Lipoic acid in the treatment of smell dysfunction following viral infection of the upper respiratory tract. *Laryngoscope*. 2002;112(11):2076-80.
229. Morrissey DK, Pratap U, Brown C, Wormald PJ. The role of surgery in the management of phantosmia. *Laryngoscope*. 2016;126(3):575-8.
230. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):68.
231. Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2002;197(4):419-23.
232. SARGIN D. Kök Hücre ve Kök Hücre Tedavisi. XXX Ulusal Hematoloji Kongresi,<<http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/kokhucre.pdf>>,(0311 2019). 2003.
233. Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. 1966.
234. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*. 1999;284(5411):143-7.
235. Kim JW, Hong SL, Lee CH, Jeon EH, Choi AR. Relationship between olfactory function and olfactory neuronal population in C57BL6 mice injected intraperitoneally with 3-methylindole. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;143(6):837-42.
236. Kim BY, Park JY, Kim EJ, Kim BG, Kim SW, Kim SW. The neuroplastic effect of olfactory training to the recovery of olfactory system in mouse model. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(7):715-23.
237. Wiethoff AJ, Harkema JR, Koretsky AP, Brown WE. Identification of mucosal injury in the murine nasal airways by magnetic resonance imaging: site-specific lesions induced by 3-methylindole. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;175(1):68-75.
238. Yasak AG, Yigit O, Araz Server E, Durna Dastan S, Gul M. The effectiveness of platelet-rich plasma in an anosmia-induced mice model. *Laryngoscope*. 2018;128(5):E157-e62.
239. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
240. Qi Y, Liu W, Wang X, Lu N, Yang M, Liu W, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from obese mice prevent body weight gain and hyperglycemia. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):277.
241. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*. 2004;295(2):395-406.
242. Kurtenbach S, Goss GM, Goncalves S, Choi R, Hare JM, Chaudhari N, et al. Cell-Based Therapy Restores Olfactory Function in an Inducible Model of Hyposmia. *Stem Cell Reports*. 2019;12(6):1354-65.

243. Kwon JW, Jo HG, Park SM, Ku CH, Park DJ. Engraftment and regenerative effects of bone marrow stromal cell transplantation on damaged rat olfactory mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273(9):2585-90.
244. Kim YM, Choi YS, Choi JW, Park YH, Koo BS, Roh HJ, et al. Effects of systemic transplantation of adipose tissue-derived stem cells on olfactory epithelium regeneration. *Laryngoscope*. 2009;119(5):993-9.
245. Min YG, Kim JW, Hong SC, Dhong HJ, Jarin PR, Jin Y. Pathogenetic mechanism of olfactory cell injury after exposure to sulfur dioxide in mice. *Laryngoscope*. 2003;113(12):2157-62.
246. Turk MA, Henk WG, Flory W. 3-Methylindole-induced nasal mucosal damage in mice. *Vet Pathol*. 1987;24(5):400-3.
247. Bergström U, Giovanetti A, Piras E, Brittebo EB. Methimazole-induced damage in the olfactory mucosa: effects on ultrastructure and glutathione levels. *Toxicol Pathol*. 2003;31(4):379-87.
248. Genter MB, Owens DM, Carlone HB, Crofton KM. Characterization of olfactory deficits in the rat following administration of 2,6-dichlorobenzonitrile (dichlobenil), 3,3'-iminodipropionitrile, or methimazole. *Fundam Appl Toxicol*. 1996;29(1):71-7.
249. Keller M, Douhard Q, Baum MJ, Bakker J. Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chem Senses*. 2006;31(4):315-23.
250. Jo H, Jung M, Seo DJ, Park DJ. The effect of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation for restoration of olfactory disorder. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;467(2):395-9.
251. Yokoyama MT, Carlson JR. Dissimilation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal microorganisms in vitro. *Appl Microbiol*. 1974;27(3):540-8.
252. Durham SK, Castleman WL. Pulmonary lesions induced by 3-methylindole in mice. *Am J Pathol*. 1985;121(1):128-37.
253. Miller MA, O'Bryan MA. Ultrastructural changes and olfactory deficits during 3-methylindole-induced olfactory mucosal necrosis and repair in mice. *Ultrastruct Pathol*. 2003;27(1):13-21.
254. Taha MF, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell*. 2010;42(4):211-6.
255. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
256. Black IB, Woodbury D. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27(3):632-6.
257. Beecher K, St John JA, Chehrehasa F. Factors that modulate olfactory dysfunction. *Neural Regen Res*. 2018;13(7):1151-5.
258. Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolte JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*. 2010;5(6):933-46.
259. Franceschini V, Bettini S, Pifferi S, Menini A, Siciliano G, Ognio E, et al. Transplanted human adipose tissue-derived stem cells engraft and induce regeneration in mice olfactory neuroepithelium in response to dichlobenil subadministration. *Chem Senses*. 2014;39(7):617-29.
260. Lee CH, Jeon SW, Seo BS, Mo JH, Jeon EH, Choi AR, et al. Transplantation of neural stem cells in anosmic mice. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2010;3(2):84-90.

261. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1402-16.
262. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*. 2016;37(1):115-25.
263. Wu W, Le AV, Mendez JJ, Chang J, Niklason LE, Steinbacher DM. Osteogenic performance of donor-matched human adipose and bone marrow mesenchymal cells under dynamic culture. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(9-10):1621-32.
264. Cho HJ, Lee YH, Kim BR, Kim HK, Chung HJ, Park SC, et al. Newly developed method for mouse olfactory behavior tests using an automatic video tracking system. *Auris Nasus Larynx*. 2018;45(1):103-10.
265. Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, et al. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature*. 2007;450(7169):503-8.
266. Suzukawa K, Kondo K, Kanaya K, Sakamoto T, Watanabe K, Ushio M, et al. Age-related changes of the regeneration mode in the mouse peripheral olfactory system following olfactotoxic drug methimazole-induced damage. *Journal of Comparative Neurology*. 2011;519(11):2154-74.
267. Yang M, Crawley JN. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current Protocols in Neuroscience*. 2009;48(1):8.24.1-8..12.
268. Karaöz E, Çetinalp Demircan P, Erman G, Güngörürler E, Eker Sarıboyacı A. Comparative Analyses of Immunosuppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly, and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Turk J Haematol*. 2017;34(3):213-25.
269. Takahashi A, Nakajima H, Uchida K, Takeura N, Honjoh K, Watanabe S, et al. Comparison of Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Murine Adipose Tissue and Bone Marrow in the Treatment of Spinal Cord Injury. *Cell Transplant*. 2018;27(7):1126-39.
270. Ryu HH, Kang BJ, Park SS, Kim Y, Sung GJ, Woo HM, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *J Vet Med Sci*. 2012;74(12):1617-30.
271. Liu L, Hua Z, Shen J, Yin Y, Yang J, Cheng K, et al. Comparative Efficacy of Multiple Variables of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of Neuropathic Pain in Rats. *Mil Med*. 2017;182(S1):175-84.
272. Nota J, Takahashi H, Hakuba N, Hato N, Gyo K. Treatment of neural anosmia by topical application of basic fibroblast growth factor-gelatin hydrogel in the nasal cavity: an experimental study in mice. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;139(4):396-400.
273. Cofano F, Boido M, Monticelli M, Zenga F, Ducati A, Vercelli A, et al. Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11).

10. EKLER

10.1 Etik Kurul Onayı



SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1.Cochlear Implantation in Chronic Otitis Media with and without Cholesteatoma:
Surgical Considerations and Auditory Outcomes, Gulhan Yasar N., Karamert R. ,
Tutar H. , Uğur M. B. , Hazır B. , Bayazıt Y. A., Orl-Journal for Oto-Rhino-
Laryngology Head and Neck Surgery, 2021

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1.Sinonasal SMARCB1 (INI1) Deficient Carcinoma with Yolk Sac Tumor Differentiation: A Case Report and Treatment Options, Hazir B, Şimşek B, Erdermir A et al. Head and Neck Pathology, 2021

2.Pott's Puffy Tümörüne Sekonder Gelişen Frontokutanöz Fistül: Akut Sinüzitin Nadir Bir Komplikasyonu, Ceylan T, Hazir B, Sahin MM, Ceylan A, Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi, 2021

Hakemli Kongre / Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

1.İleri Evre Nazal Vestibül Kanserlerinde Rekonstrüksiyon Sonuçlarımız, Hazir B, Şahin MM, Yüz Plastik Cerrahi Derneği 15. Ulusal Kongresi, Ankara, 26-28 Kasım 2021

2.Koku Kayıplarına Yaklaşım, Hazir B, 6. İlkbahar Toplantısı, Antalya, 24-27 Ekim 2021

3.Frontal Sinüse Yönelik İleri Cerrahi Müdahaleler, Hazir B, Şahin MM, Ceylan A, 6. İlkbahar Toplantısı, Antalya, 24-27 Ekim 2021

4. Postoperatif Ventilasyon Tüpü Gereksinimi Ortaya Çıkan Kronik Otitis Media Olgularının İncelenmesi, Hazir B. , Kemaloğlu Y. K. , Uğur M. B. , Tutar H. , Şahin Kemişli G. İ. , Karamert R., 14. Uluslararası Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, Ankara, 24-26 Aralık 2020

5. Benign larinks lezyonları ayırıcı tanısında amiloidoz olgu sunumu, Yalçın M. , Düzlü M. , Yıldız ., Hazir B. , Ceylan A. , Yılmaz M.

6. Temporal Bölge Tümörlerinde Elektif Boyun Diseksiyonu ve Parotidektomi,

Hazır B. , Eravcı F. C. , Türkcan A. K. , Düzlü M. , Tutar H. , Karamert R.

Ödüller

Sözlü Bildiri İkincilik Ödülü

İleri Evre Nazal Vestibül Kanserlerinde Rekonstrüksiyon Sonuçlarımız, Hazır B, Şahin MM, Yüz Plastik Cerrahi Derneği 15. Ulusal Kongresi, Ankara, 26-28 Kasım 2021

12. KABUL ve ONAY

