

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**NÖRAL KÖK HÜCRE AKTİVASYONU,
PROLİFERASYONU VE MİGRASYONUNDA ROLLERİ
OLAN BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN KARŞILIKLI
ETKİLEŞİMLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

BURCU SARYA TUNÇ

**DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. SELÇUK SÖZER TOKDEMİR**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Burcu Sarya TUNÇ tarafından Yard. Doç. Dr. Selçuk SÖZER TOKDEMİR'in danışmanlığında hazırlanan "**Nöral Kök Hücre Aktivasyonu, Proliferasyonu Ve Migrasyonunda Rollerini Olan Büyüme Faktörlerinin Karşılıklı Etkileşimlerinin İn Vitro Araştırılması**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 27.09.2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Erdem TÜZÜN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Sinirbilim Anabilim Dalı



Prof. Dr. Tamer YAĞCI
Gebze Teknik Ü. Temel Bil. Fak.
Moleküler Biy. ve Genetik A. D.



Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Sibel Uğur İŞERİ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE.
Genetik Anabilim Dalı



Yard. Doç. Dr. Selçuk SÖZER TOKDEMİR
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Burcu Sarya TUNÇ



İTHAF

Bu projenin de öncüsü olan ve zamansız yitirdiğimiz hocam,
Yard. Doç. Dr. Kenan ATEŞ'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Ömrünü bilime ve insanlığa adayan ve bu yolda bildiğim pek çok şeyi bana öğreten, bugün ne yazık ki aramızda olamayan hocam Yard. Doç. Dr. Kenan Ateş'e

Tez danışmanlığımı kabul ettiğinden bu yana verdiği muazzam emek için minnettar olduğum Yard. Doç. Dr. Selçuk Sözer Tokdemir'e,

Tez çalışmamdaki yardım ve katkısının yanında sabrı için çalışma arkadaşım Bio. Tuğba Gürbüz'e,

Aynı laboratuvarı paylaştığımız ve yardımlarını çokça aldığım MSc. İldeniz Uslu, MSc. Hilal Hekimoğlu, Mol. Bio. Cemil Altunay ve Mol. Bio. Can Veysel Şoroğlu'na,

Tezimdeki teknik destekleri ve ilgisinden ötürü Dr. Emrah Yücesan'a,

Deneylerimin bir kısmında faydalandığım kontrol örneklerini benden esirgemeyen Dr. Özkan Özdemir'e

Migrasyon verilerimin sunumundaki teknik desteği ve emeğinden ötürü Sevil Atar'a,

Tüm bu süreçte ne zaman ihtiyaç duysam bildiklerini esirgemeyen, samimiyet ve dostlukları için MSc. Yeşim Kesim, MSc. Didem Seven, Bio. Garen Hayranyan, Mol. Bio. Barış Salman, MSc. Khudson Khozayev, MSc. Ebru Özer'e

Herhangi bir mesai saati olmaksızın, her daim bana gösterdikleri sabır, sevgi ve dayanışmaları için ailem ve arkadaşlarıma,

Ve akademik hırslarına yenik düşüp bizi bir süre tökezletenlere;

İnsanı daha çok düşünmeye yönlendirip zihin açtıkları için, azmimizden hiçbir şey kaybettirmeden yeni fikirler üretip daha güçlü hissetmemize neden oldukları için,

Teşekkürler...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 50267

Bu proje İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP), Acil İhtiyaç Projeleri (ACİP) tarafından desteklenmiştir. Proje No: THZ-2016-21839



İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| TEZ ONAYI | İİ |
| BEYAN..... | İİİ |
| İTHAF..... | İV |
| TEŞEKKÜR..... | V |
| İÇİNDEKİLER | Vİİ |
| TABLolar LİSTESİ..... | X |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | Xİ |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ | Xİİ |
| ÖZET | XİV |
| ABSTRACT..... | XVİ |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Kök Hücre..... | 4 |
| 2.1.1. Nöral Kök Hücre..... | 4 |
| 2.1.2. Nöral Kök Hücre Tarihi | 5 |
| 2.1.3. Nöral Kök Hücre Merkezleri | 6 |
| 2.1.4. Nöral Kök Hücre ve Büyüme Faktörü İlişkisi | 7 |
| 2.2. Büyüme Faktörleri | 7 |
| 2.2.1. Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1)..... | 7 |
| 2.2.2. Mechano Growth Factor (MGF / IGF-1 Ec)..... | 8 |
| 2.2.3. Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) | 9 |
| 2.2.4. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)..... | 11 |
| 2.2.5. Eritropoietin (EPO)..... | 12 |
| 2.2.6. Epidermal Growth Factor (EGF) | 13 |
| 2.3. Nöral Kök Hücre ile İlişkili Genler | 13 |
| 2.3.1. Nestin | 15 |
| 2.3.2. Glial Fibrilar Asidic Protein (GFAP)..... | 16 |
| 2.3.3. Beta Tubulin 3 yada β -Tubulin III (TUBB-3) | 16 |
| 2.3.4. Doublecortin (DCX) | 17 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 3.1. Kullanılan Gereçler | 18 |
| 3.1.1. Kullanılacak Sıçan Hipokampal Nöral Kök Hücre Hattı | 18 |
| 3.1.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Maddeler | 18 |
| 3.1.3. Kullanılan Cihazlar | 19 |
| 3.1.4. Kullanılan Kitler | 21 |
| 3.1.5. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler | 21 |
| 3.2. Deney Tasarımları | 22 |
| 3.2.1. Yapılan Deney Tasarımı | 22 |
| 3.3. Kullanılan Yöntemler | 24 |
| 3.3.1. Hücre Kültürü | 24 |
| 3.3.1.1. Kullanılacak Platelerin Kaplanması | 24 |
| 3.3.1.2. Besiyeri Hazırlama | 25 |
| 3.3.1.3. Besiyerine Eklenecek FGF-2 konsantrasyonu hazırlama | 25 |
| 3.3.1.4. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi | 25 |
| 3.3.1.5. Besiyeri Değişimi | 26 |
| 3.3.1.6. Hücre Pasajlama | 26 |
| 3.3.1.7. Petriden 24'lük kuyulu-plakaya ekim | 26 |
| 3.3.1.8. Hücelere Büyüme Faktörlerinin Eklenmesi | 27 |
| 3.3.1.9. Bromodeoksiüridin (BrdU) muamelesi ve Protokolü | 28 |
| 3.3.1.10. Hücrelerin Dondurulması | 29 |
| 3.3.2. RNA İzolasyonu | 29 |
| 3.3.3. cDNA Sentezi | 31 |
| 3.3.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (GZ-PZR) (Q-PCR) | 33 |
| 3.4. Migrasyon Deneyleri | 37 |
| 3.4.1. Migrasyon Plate Özellikleri | 37 |
| 3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi | 41 |
| 4. BULGULAR | 43 |
| 4.1. Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları | 43 |
| 4.2. Gen Anlatım Sonuçları | 49 |
| 4.2.1. GFAP Geni Anlatım Sonuçları | 49 |
| 4.2.2. Nestin Geni Anlatım Sonuçları | 49 |
| 4.2.3. DCX geni anlatım sonuçları | 50 |
| 4.2.4. TUBB3 Geni Anlatım Sonuçları | 50 |

| | |
|---|----|
| 4.3. Migrasyon değerleri sonuçları | 57 |
| 5. TARTIŞMA | 63 |
| 5.1. Aktivasyon Deneyleri | 63 |
| 5.2. Proliferasyon Deneyleri | 67 |
| 5.3. Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları | 70 |
| 5.4. Migrasyon Deneyleri | 73 |
| KAYNAKLAR | 76 |
| ÖZGEÇMİŞ | 86 |



TABLolar LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 3-1: Kullanılan Solüsyonlar..... | 18 |
| Tablo 3-2: Kullanılan Cihazlar | 19 |
| Tablo 3-3: Kullanılan Kitler | 21 |
| Tablo 3-4: Kullanılan Büyüme Faktörleri ve Konsantrasyonları | 23 |
| Tablo 3-5: Poly-L-Ornithine ve Laminin Konsantrasyonları | 24 |
| Tablo 3-6: Kalıp RNA/Primer Karışımı | 31 |
| Tablo 3-7: Reaksiyon Karışımı..... | 32 |
| Tablo 3-8: cDNA Sentez Koşulları..... | 32 |
| Tablo 3-9: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR’da Kullanılan Primerler | 34 |
| Tablo 3-10: PZR Reaksiyon Karışımı | 34 |
| Tablo 3-11: Nestin Geni için Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı | 35 |
| Tablo 3-12: GFAP Geni için Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı | 35 |
| Tablo 3-13: TUBB3 Geni için Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı..... | 36 |
| Tablo 3-14: DCX Geni için Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı | 36 |
| Tablo 4-1: Migrasyon Deneyleri Sonucu Boyutlarına Göre Nörosfer Sayıları | 58 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2-1: SGZ ve Dentate Gyrus (DG)'ta yetişkin nörojenezi (113) | 15 |
| Şekil 3-1: Yapılan BrdU ve GZ-PZR Analiz Deneylerinin Şema ile Gösterimi | 22 |
| Şekil 3-2: Cell Asic ONIX Cihazı M04G Plaka Görünümü..... | 38 |
| Şekil 3-3:M04G Platelerinin daha yakından görünüşü..... | 39 |
| Şekil 3-4: Hücre Ekildikten Sonraki Kültür Odalarının Görünümü | 40 |
| Şekil 3-5: Program Yazılımının Görünümü..... | 41 |
| Şekil 4-1: Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları G0/G1 Safhası | 45 |
| Şekil 4-2: Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları – Sentez Safhası | 46 |
| Şekil 4-3: Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları – G2+M Safhası | 47 |
| Şekil 4-4: Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları – Apoptotik Hücre Sayısı..... | 48 |
| Şekil 4-5: GFAP Geninin GZ-PZR Analiz Sonuçları..... | 52 |
| Şekil 4-6: Nestin Geninin GZ-PZR Analiz Sonuçları | 53 |
| Şekil 4-7: DCX Geninin GZ-PZR Analiz Sonuçları | 54 |
| Şekil 4-8: TUBB3 Geninin GZ-PZR Analiz Sonuçları | 55 |
| Şekil 4-9: GFAP, Nestin, DCX ve TUBB3 Genlerinin GZ-PZR Analizi Sonuçlarının Heatmap Grafiğinde Gösterimi..... | 56 |
| Şekil 4-10: Migrasyon Deneyi Kontrol Örneği. | 59 |
| Şekil 4-11: Migrasyon Deneyi - FGF-2 ve Normal Besiyeri Örneği | 60 |
| Şekil 4-12: Migrasyon Deneyi - MGF ve Normal Besiyeri Örneği. | 61 |
| Şekil 4-13: Migrasyon Deneyi - FGF-2+MGF ve Normal Besiyeri Örneği..... | 62 |

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|-----------------|---|
| NKH | Nöral Kök Hücre |
| aNKH | Aktif Nöral Kök Hücre |
| EKH | Embriyonik Kök Hücre |
| SVZ, V-SVZ, SEZ | Subventriküler Zon |
| SGZ | Subgranüler Zon |
| DG | Dentate Gyrus |
| OB | Olfactory Bolb |
| MSS | Merkezi Sinir Sistemi |
| RMS, RGA | Rostral Migratory Stream, Rostral Göç Akımı |
| FGF-2, bFGF | Fibroblast Growth Factor -2, Basic Fibroblast Growth Factor |
| IGF-1 | Insulin -Like Growth Factor-1 |
| MGF, IGF-I Ec | Mechano Growth Factor |
| EPO | Eritropoietin |
| EPO-R | Eritropoietin Reseptörleri |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| BDNF | Brain-Derived Neurotrophic Factor |
| NGF | Nerve Growth Factor |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| GDNF | Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor |
| TGF- α | Transforming Growth Factor Alpha |
| NT-3 | Nörotrofin 3 |
| NT-4/5 | Nörotrofin 4/5 |
| NT-6 | Nörotrofin 6 |
| RGL | Radial Glia Like Cells |
| DCX | Doublecortin |
| GFAP | Glial Fibrillar Asidic Protein |
| TUBB3 | Beta Tubulin 3, β -Tubulin III |
| GAPDH | Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase |

| | |
|-----------------|---|
| ALS | Amyotrofik Lateral Skleroz |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| cDNA | Complementary Deoksiribonükleik Asit |
| DNAaz | Deoksiribonükleaz |
| BrdU | Brdomodeoxyuridine |
| DMEM/F-12 | Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F12 |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| CO ₂ | Karbondioksit |
| PWB | Perm Wash Buffer |
| 7AAD | 7-Aminoactinomycin D |
| dNTP | Deoksinükleotid Trifosfat |
| DTT | Dithiothreitol |
| PTFE | Polytetrafluoroethylene |
| PZR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| GZ-PZR | Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu |

ÖZET

Tunç, BS. **Nöral Kök Hücre Aktivasyonu, Proliferasyonu ve Migrasyonunda Rollerini Olan Büyüme Faktörlerinin Karşılıklı Etkileşimlerinin in vitro Araştırılması.** İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2017.

Bugüne dek yetişkin nörogenezi ve nöral kök hücre biyolojisi alanlarında çok sayıda çalışma yapılmasına ve pek çok bilgi elde edilmesine rağmen, nöral kök hücreleri suskun halde tutan, aktif hale geçiren, aktif kök hücreleri proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyona uğratan mekanizmalar ve bu mekanizmalarda rol oynayan etken ve uyarılar henüz yeterince açığa çıkarılamamıştır. Bu mekanizmalarda, değişik sinyal yolları ve büyüme faktörlerinin etkisinin olduğu bilinmektedir. Bunların içinden büyüme faktörleri tek başlarına ve birlikte verildiklerinde farklı etkiler ortaya çıkmakta, etkileri farklı kombinasyonlarda artıp azalmaktadır.

Bu nedenle projemizde rat hipokampal kökenli nöral kök hücreler (NKH)'lerin suskunluk, aktivasyon, proliferasyon ve migrasyon mekanizmalarında rollerini olan büyüme faktörlerinden, IGF-I, MGF, EGF, FGF-2, BDNF ve EPO'nun tek başlarına ve birlikte olan etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada hücre kültüründe yetiştirilen NKH'lere büyüme faktörleri ve kombinasyonları belirlenen oranlarda eklenmiş ve 1. gün, 3. gün ve 7. günlük zaman dilimlerinde bekletilip hem BrdU eklenmesi ile Akım Sitometri cihazında hücre döngüsü analizi yapılmış, hem de Gerçek Zamanlı RT-PCR yöntemi ile GFAP, Nestin, DCX ve TUBB3 genlerinin aktivasyon düzeyleri analiz edilmiştir. Migrasyon deneyleri için ise Cell Asic ONIX cihazı kullanılarak ölçümler yapılmıştır.

Elde ettiğimiz bulgular arasında; FGF-2+EGF kombinasyonunun birlikte etkisinin suskun NKH'leri aktive ettiği tespit edilmiştir. MGF+EPO kombinasyonunun NKH'leri genç nöron halinde tuttuğu ve göç etmeleri üzerinde de etkisi bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, EPO ve BDNF'in de NKH'leri olgun nöron fazına yönelttiği düşünülmektedir.

Bu sonuçlar ışığında, yetişkin nörogenezi, nöral kök hücre biyolojisi ve sinirbilim alanlarına gelecek yıllarda yapılacak çalışmalara alt yapı oluşturarak katkı sağlamak hedeflenmiştir. Nörogenez ve rejenerasyon gerektiren beyin dokusu patolojilerine köklü ve kalıcı tedavilerin geliştirilmesi yönünde yeni projeler geliştirilecektir.

Anahtar Kelimeler: Nöral Kök Hücre, Nörogenez, Büyüme Faktörleri, Proliferasyon, Migrasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 50267

Bu proje İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP), Acil İhtiyaç Projeleri (ACİP) tarafından desteklenmiştir. Proje No: THZ-2016-21839



ABSTRACT

Tunc BS. **Investigation of mutual in vitro effects of growth factors which have roles in neural stem cell's activation, proliferation and migration.** Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. MSc. Thesis. Istanbul. 2017.

Although there has been many studies on the fields of adult neurogenesis and neural stem cells biology, still there are many unknowns including, holding neural stem cells in quiescent phase and initiation of activation, mechanisms of differentiation, proliferation and migration for active stem cells and also the factors playing role for these mechanisms.

Therefore, in this project, we investigated the effect of growth factors such as IGF-I, MGF, EGF, FGF2, BDNF and EPO alone and together on activation, proliferation and migration mechanisms for quiescent neural stem cells that have hippocampal origin.

In this study, growth factors and combinations were added to the NSCs at the determined ratios, and they were kept at the 1st, 3rd and 7th day time intervals following BrdU addition for cell cycle and apoptosis analysis with flow cytometry and the activation and proliferation changes of GFAP, Nestin, DCX and TUBB3 genes by expression levels with real time RT-PCR analysis. Furthermore, the Cell Asic ONIX instrument were used for the migration experiments.

It has been determined that the synergistic effect of FGF-2 + EGF co-stimulation activates silent NSCs. The combination of MGF and EPO also has an effect on migrating NSCs as young neurons. EPO and BDNF are also thought to direct NSCs to the mature neuron phase.

With the future studies to be done in the light of these results, it is aimed to contribute adult neurogenesis, neural stem cell biology and neuroscience fields. New projects will be developed to develop fundamental and permanent therapies for brain tissue pathologies that require neurogenesis and regeneration.

Key Words: Neurogenesis, Neural Stem Cells, Growth Factors, Proliferation, Migration

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 50267

This Project was also supported by Scientific Research Project of Istanbul University. Project No: THZ-2016-21839

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler doğumdan itibaren hayat boyu farklı dokularda yapım-onarım merkezleri olarak işlev görürler. Beyin dokusundaki doku onarım ve yenilenme süreci (nörogenez ve nöral rejenerasyon) doğumdan kısa bir süre sonra tamamlanmasına rağmen yeni nöron yapımının aslında hayat boyu devam ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Oluşan bu yeni nöronlar beyinde, lateral ventrikülün subventriküler bölgesi (SVZ) ile hipokampustaki dentate gyrus'un subgranüler bölgesi (SGZ)'nde, çoğunluğu suskun (quiescent) / inaktif halde bulunan Nöral Kök Hücreler (NKH) tarafından üretilirler (1-5).

Genellikle belirtilen nişlerde suskun halde bekleyen nöral kök hücreler, herhangi bir beyin hasarı durumunda aktifleşmekte ve çoğalıp, farklılaşıp, göç ederek hasar bölgesine doğru yönelmektedir. Bu göç ile (migrasyon) konumlandığı yeni bölgede Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nin değişik hücre tiplerine dönüşerek rejenerasyonu tamamlamaktadır (1-9).

Nörogenezin genel olarak memelilerde postnatal beyinde de yapıldığının tespit edilmesinden bu yana nörogenez üzerine yapılan çalışmalar da hayli artmıştır. Yapılan çalışmalarda, beyinde oluşan hasarın kendiliğinden onarılıp onarılamayacağı incelenmiş, ancak çıkan sonuçlarda deri, kan hücreleri gibi yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip hücrelerin aksine, beynin rejenerasyon kapasitesinin oldukça düşük olduğu ortaya konmuştur.

Nörogenezin yetişkin dokularda esas olarak bir hasar durumunda aktifleştiği, nöral kök hücrelerin bu uyarıyla 'suskun' halden aktif hale geçip proliferasyon yaptıkları ve hasarlı bölgeye farklılaşarak yol aldığı tespit edilmiştir. Ancak bu hücrelerden de yalnızca küçük bir kısmının nöron haline gelip beyine entegre olduğu anlaşılmıştır. Yeni doğan hücrelerin büyük kısmının öldüğü, kalanların da önemli bir kısmının nöron yerine astrosit ya da oligodentrosit haline geldiği tespit edilmiştir (8,10).

Yapılan çalışmalarla nörogenez ve nöral kök hücre biyolojisine açıklık getirilmeye çalışılsa da, büyük oranda ana mekanizmayı anlamada eksiklikler devam etmektedir. Kök hücre nişlerinde suskun halde bekleyen kök hücrelerin hangi uyaranlar

etkisi ile aktif hale geçtiği, aktif kök hücrelerin hangi mekanizmalar ile proliferasyon ve migrasyon ve farklılaşmaya uğradığı henüz tam olarak ortaya konamamıştır.

Sözü edilen bu süreçlerde değişik büyüme faktörleri, nörotrofik faktörler, sitokinler ve nörotransmitterlerin etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bunların içinden en çok öne çıkanlar, EGF (6,7,11-14), bFGF de denilen FGF2 (6,7,11,13,14), BDNF (6,7,13,15,16), Eritropoietin (EPO) (13,17,18), ve IGF-I (6,7,16,19-22) ve benzerleridir.

Bugüne dek yapılan çalışmalarda gösterilmiş olan, bu büyüme faktörleri ve nörotrofik faktörler tek başlarına veya kombinasyonlar halinde birlikte verildiklerinde farklı etkiler ortaya çıkarmakta, gösterdiği etkiler değişmekte veya etkileri artıp azalmaktadır (16,17,23).

Araştırmaların yoğunlaştığı son 20-25 yılda yetişkin nörogenez, nöral rejenerasyon ve yetişkin nöral kök hücre biyolojisi alanında pek çok çalışma yapılarak özgün bilgiler elde edilmiştir. Ancak bu alanda hala bilinmeyen pek çok şey, pek çok soru vardır. Bunlar araştırılmayı beklemektedir.

Tüm bunların ışığında bu projede; FGF-2, MGF, IGF-1, EPO, EGF ve BDNF'i tek başlarına ve çeşitli kombinasyonları ile Rat Hipokampal kökenli Nöral Kök Hücrelere uygulamanın, bu hücrelerin Aktivasyonu, Proliferasyonu ve Migrasyonu üzerinde etkilerinin olduğu yönünde bir hipotez kurulmuştur.

Bu hipotez doğrultusunda rat hipokampal kökenli nöral kök hücreler, hücre kültürü koşullarında yetiştirilmiş ve uygun protokoller kullanılarak yukarıdaki büyüme faktörleri ile muamelesi gerçekleştirilmiştir. Deneyler 2 kez tekrarlanmış ve zaman içerisindeki farklılıklar yada benzerlikleri gözlemlenmiştir. Büyüme Faktörü uygulamasını takip eden 1. gün, 3. gün ve 7. gün zaman dilimlerinde deneyler yapılmıştır.

Çalışmanın GZ-PZR Analizi sırasında bakılacak genlerden Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP), astrosit ve suskun nöral kök hücre belirteci olarak çalışmalarda kullanılmaktadır. Nestin yine suskun haldeki kök hücre belirteçlerinden biri olarak kullanılmakta, Doublecortin (DCX) olgunlaşmaya başlayan ve migrasyona uğrayan hücre belirteci ve son olarak β -Tubulin-III (TUBB3) ise olgunlaşmış nöron belirteci olarak yayınlarda kullanılmıştır.

Her bir zaman diliminde Nestin, DCX, GFAP ve TUBB3 genlerinin ekspresyon değişimleri Gerçek Zamanlı-Polimer Zincir Reaksiyon yöntemi ile tespit edilmiştir. Aynı zamanda Brdodeoxyuridine (BrdU) eklenmesi ile her bir zaman diliminde kullanılan büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonu üzerinde, hücre siklusu üzerindeki ve apoptotik hücre oranı açısından etkileri Akım Sitometrisi cihazı ile de incelenmiştir. Bunun yanında, büyüme faktörlerinin nöral kök hücre migrasyonu üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla da Cell Asic ONIX cihazı kullanılmış ve burada hücreler 72 saat boyunca kültür edilmiş, her 12 saatte bir fotoğrafları çekilerek bunların karşılaştırılması yolu ile nöral kök hücrelerin migrasyonu incelenmiştir. Migrasyon deneyleri için Cell Asic ONIX cihazı ve bu cihaza özel M04G Platelere kullanılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler elde edildikleri, köken aldıkları hücelere veya farklılaşmış diğer hücre tiplerine dönüşebilen, rejenerasyon, uzun süre bölünebilme ve çeşitli özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip hücreler olarak tanımlanır.

Rejenerasyon, ana hücre ile aynı özelliklere sahip yeni kardeş hücre üretebilme yeteneği olarak tanımlanır ve başta kök hücre tanımlamalarının en genel özelliği olarak değerlendirilir.

Kök hücreyi yalnızca rejenerasyon ile tarif eden bu tanımla, başından beri genel kabul görmüş bir tanımlama olsa da kök hücre üzerine yapılan çalışmalar arttıkça kök hücre tanımı da gelişme göstermiş, zamanla değişmiştir. Bir hücreye kök hücre özelliği kazandıran belli kriterler araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Bunlar 3 başlıkta toplanabilir:

1. Kendini yenileme,
2. Farklı hücelere veya doku tiplerine farklılaşma yetkinliği (potensi),
3. Klon oluşturma yeteneği (klonalite) (24,25)

Zaman içerisinde araştırmaların çoğalması ile kök hücreleri tarif eden bu üç kriter de, bir organizmanın yaşamı boyunca devam eden kök hücre davranışlarının tümünü açıklayamaz hale gelmiştir.

Her dokunun, kök hücre kriterlerinden sayılan; kendini yenileyebilme ya da farklılaşma gibi özelliklerinin potansiyeli dokudan dokuya farklılık gösterebilir. Örneğin, Embriyonik Kök Hücreler (EKH) bu örnekte en çok farklılaşma potansiyeline sahip hücreler olarak bilinirler. Aynı şekilde Nöral Kök Hücrelerin (NKH) ise kendini yenileyebilme kabiliyetinde sınırlı olduğu bilinmektedir.

2.1.1. Nöral Kök Hücre

Sinir sisteminin gelişmesi Nöral Kök Hücre (NKH) farklılaşmasının temelini oluşturur. Çünkü gastrülasyon evresinden sonra nöral kök hücrelerden farklılaşarak gelişen ilk sistemlerden biri sinir sistemidir (26).

Yakın zamana kadar, başta beyin olmak üzere tüm sinir sistemi üzerindeki gelişimin doğumdan bir süre sonra tamamlanarak rejenerasyon yeteneğinin ortadan kalktığı düşünülmekteydi. Bu yüzden de yetişkinlerde yeni sinir yapımı yani yetişkin nörogenezi ve rejenerasyonunun olmadığı; beyinde ölen hücrelerin yerine yeni hücre gelmediği öne sürülmüştür (27).

Yeni gelişmeler ışığında sinir kök hücrelerinin kendini yenilediği ve nöronlar, astrositler ve oligodendrositleri oluşturduğu bilinmektedir. Bu hücreler, yaralanma veya hastalıktan sonra nöral tamir için büyük bir potansiyel taşırlar. Sinirsel onarımın temel kavramlarından biri hastalık veya yaralanma sonucu kaybedilen hücrelerin yerini almasıdır.

2.1.2. Nöral Kök Hücre Tarihi

Nöral Kök Hücreler temelde nöronlar, astrositler ve oligodendrositlere farklılaşarak Merkezi Sinir sistemini oluştururlar. Bu hücreler, yaralanma veya hastalıktan sonra nöronal tamir görevleri için büyük bir potansiyel taşırlar.

Uzun yıllar boyunca gelişmekte olan canlı Merkezi Sinir Sisteminde (MSS) kolaylıkla bulunan kök hücrelerin, yetişkin beyninde bulunmadığı düşünülmüştür. Hatta araştırmacı Santiago Ramón Y Cajal 1928 yılında canlı sistemler açısından "Everything may die, nothing may regenerate." yani "Her şey ölebilir, ama hiçbir şey yenilenemez." öngörüsünü ortaya atmış ve zamanı açısından çok etki görmüştür (27).

Erişkin beyninde nörogenez ve rejenerasyon kapasitesinin varlığına ilişkin ilk kanıt 1962'de Amerikalı Nörobiyolog Joseph Altman tarafından, yetişkin memelilerin serebral korteksinde gösterilmiştir (28). Altman bir yıl ve üç yıl sonra yetişkin sıçanlarda bu nörogenezin beyinde hipokampusun Dentate Gyrus denilen bölgesinden başladığını ortaya koymuştur (29,30). 1969'da da farklı yaşlardaki prenatal ve postnatal sıçan beyninde bölünen hücrelerin popülasyonunu timidin aracılığı ile incelemiş ve nörogenez sırasında yeni oluşmaya başlayan hücrelerin Rostral Göç Akımı (Rostral Migratory Stream-RMS-RGA) yoluyla Olfactory Bulb'a doğru göç ettiklerini bulmuştur ve bu bölgeye RMS adını vermiştir (31).

Buna rağmen Altman ve doğal olarak da yetişkin nörogenezi, 1980'lerin ortalarına hatta 1990'ların başlarına dek pek ilgi görmemiştir.

1980'lerde kuşlarda yeni sinir hücresi yapımı gösterilmiştir (32). 1990'lardan itibaren memeliler üzerinde başlayan yoğun çalışmalar, insan dahil memeli beyinde nöroenezin doğumla bitmediğini, doğumdan sonra da, yaşla azalmakla birlikte hayat boyu devam ettiğini göstermiştir (2,6,33-35).

Bu aşamadan sonra zamanla nöroenez kanaryalarda (36), kemirgenlerde (33) ve insanlarda da (35,37) ispatlanmıştır (33,35,36).

Daha sonra spesifik nöronal antikorların ve timin analogu olan Bromodeoksiüridin (BrdU)'nun gelişimi Altman'ın yetişkin beyindeki erişkin-doğan nöronların varlığı hipotezini doğrulamıştır (38).

1990'ların sonlarında Peter Eriksson ve arkadaşları ise aynı metodolojiyi kullanarak, insan hipokampusunda yetişkin nöroenezinin varlığını göstermiştir (35).

Bu çalışma ve buluşlar sonrasında izole edilen 'kendini yenileme kabiliyeti olan multipotent hücreler' Nöral Kök Hücre olarak isimlendirilmiştir (36,39,40).

2.1.3. Nöral Kök Hücre Merkezleri

Nöroenez sonucu oluşan yeni nöronlar, beyin esas olarak 2 nörogenik bölgesindeki niş (nich) denilen alanlarda yuvalanmış ve çoğunluğu suskun (quiescent) halde bulunan, yani bölünmeden inaktif halde bekleyen, Nöral Kök Hücreler tarafından üretilirler (3,5).

Yetişkin beyinde Nöral Kök Hücre nişlerinin bulunduğu bu iki bölge;

- (a) lateral ventrikülün subventriküler bölgesi (SVZ) ile
- (b) hipokampustaki Dentate Gyrus'un subgranüler bölgesi (SGZ) dir (1-4).

Bu 2 ana nörogenik bölgelerden SubVentriküler Bölgeyi (SVZ), Ventriküler-SubVentriküler Bölge (V-SVZ) ya da SubEpendymal Bölge (SEZ) gibi farklı isimlerle adlandıran yayınlar da bulunmaktadır(5,8).

Bunlardan SubVentriküler Zon (SVZ)'un, nörogenik potansiyeli Reynolds ve Weiss tarafından 1992'de farelerde gösterilmiş ve o zamandan bu yana SVZ'nin kök hücre rezervuarı olması potansiyeli çokça çalışılmıştır (33,41).

Bazı yazarlar bu iki bölgeye üçüncü bir nörogenik bölge olarak Olfactory Epithelium / OE'u da eklerler (8). Bununla birlikte beyin iki ana nörogenik bölgesi olarak SVZ ve SGZ ezici çoğunlukla genel kabul görmüş durumdadır.

Çoğunlukla belirtilen nişlerinde bekleyen bu nöral kök hücreler, beyin hasarı durumunda aktifleşerek harekete geçmekte ve sonra proliferasyon olup farklılaşmaya (diferansiyasyona) uğrayıp hasar bölgesine doğru göç ederek (migrasyon), o bölgede MSS'nin farklı hücrelerine dönüşerek rejenerasyon yapmaya çalışmaktadırlar (1-6,8).

2.1.4. Nöral Kök Hücre ve Büyüme Faktörü İlişkisi

Çoğunlukla bu belirtilen nişlerde “uyuklar” (quiescent) halde bekleyen suskun Nöral Kök Hücreler, beyin hasarı durumunda aktifleşerek proliferasyon olmakta ve sonra diferansiyasyona uğrayarak hasar bölgesine doğru göç etmektedirler (1-4,6).

Quiescent/Suskun nöral kök hücreleri aktifleştirip proliferasyon ve migrasyonu indükleyen moleküler mekanizmalar çoğunlukla henüz bilinmemektedir (6). Sözü edilen süreçlere değişik büyüme faktörü, nörotrofik faktör, sitokin ve nörotransmitterlerin etkide buldukları da bilinmektedir.

Bunların içinden en çok öne çıkanlar, EGF (6,11-14), VEGF (6,13,14,42), FGF2 de denilen bFGF (6,11,13,14), BDNF (6,13,15,16), GDNF (6,43), TGF- α (13,14), Eritropoietin (EPO) (13,17,18), NGF (16), IGF-I (6,16,19-22,44) ve benzerleridir.

Bu büyüme faktörü ve nörotrofik faktörler tek başlarına ve bir kaç birliktede farklı etkiler göstermekte; etkileri artıp azalmaktadır. Örneğin yapılan çalışmalarla IGF-I'in FGF-2'nin etkisini artırdığı gösterilmiştir(16,23,45).

2.2. Büyüme Faktörleri

2.2.1. Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1)

Sıçanlarda IGF-1 geni 7. kromozom üzerinde yer alır. 4 ayrı transkripti bulunur. IGF'ler yapı ve işlev bakımından insüline oldukça benzeyen polipeptid yapıda moleküllerdir (46).

IGF-1 farklı dokularda en az üç ayrı alternatif kırılmaya uğrayarak farklı izoform peptidleri üretir. Bu izoformlar, IGF-I Ea, IGF-I Eb ve IGF-I Ec olarak tanımlanır (47).

IGF-1 birçok vücut dokusu tarafından ekspresyon edilen tek zincirli bir polipeptiddir (46,48). Ağırlıklı olarak karaciğerde sentezlenir (48). Kas, böbrek, over, testis, plasenta, deri ve akciğer gibi organlarda da IGF üretilmektedir.

IGF'ler, embriyonik gelişimin erken dönemlerinden başlayarak yaşam boyunca devam eden geniş bir fizyolojik etki özeliğine sahiptir (48). Ayrıca protein sentezini uyararak migrasyonu teşvik eder (48). IGF-I'in bir diğer önemli özelliği, hücre döngüsünün sürdürülebilmesi ve mitogenezin düzenlenmesidir (48). IGF'ler, çeşitli hücrelerde apoptozu azaltarak hayatta kalma faktörleri (survival factor) olarak da işlev görür (48,49).

Çoğu hücre tipi, kültürde büyüme için IGF-1 gerektirir ve IGF-1 reseptör sayısındaki azalma, tümör hücrelerinde apoptoza neden olur (49). İnsülin ve IGF'ler biyolojik etkilerini ilgili transmembran reseptörlerine bağlayarak uygularlar (49).

IGF-1'in oligodendrositlerin proliferasyon ve farklılaşmasını uyararak merkezi sinir sisteminde miyelinizasyonu arttırdığı da bilinmektedir. IGF-1'in hücre proliferasyonunda ve diferansiyasyonundaki genel etkileri biliniyor olsa da bilinmeyen önemli bir kısım hala araştırılmaktadır.

2.2.2. Mechano Growth Factor (MGF / IGF-1 Ec)

Yukarıda IGF-I'i anlatırken söylediğimiz gibi; IGF-I farklı dokularda en az üç ayrı alternatif kırılmaya uğrar ve alternatif izoform peptidleri üretir. Bu izoformlar, IGF-I Ea, IGF-I Eb ve IGF-I Ec olarak tanımlanır (47).

Bunlardan IGF-I Ec, mekanik etkilere duyarlılığı nedeniyle 1996 yılında, Mechano Growth Factor – MGF olarak isimlendirildi (50). Yani MGF, diğer ismi ile IGF-I Ec, IGF-1 in varyantlarından biridir.

MGF'in molekül büyüklüğü henüz gösterilmemiştir (51). Günümüzde IGF-1'in bir izoformu olarak tanımlanan MGF dokularda onarımı başlatır ve beyin, kalp gibi önemli organları iskemik hasardan korur. MGF rejeneratif bir faktör olarak kök hücreleri aktive eder (51).

Literatürde MGF'in başta iskelet kası (52) ve kalp kası (53), beyin/sinir (51,54,55), kemik olmak üzere (8) pek çok dokuda, travmatik, iskemik ve dejeneratif patolojilerde rejenerasyonun sağlanmasında önemli rol oynadığı gösteren çalışmalar bulunmaktadır (56).

Goldspink ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda, MGF'in, suskun (quiescent) durumdaki kas progenitör hücreleri olan satellite hücreleri aktive ederek çoğalmalarını sağladığı gösterildi (52,57-60). MGF'in aynı etkiyi kemik progenitor

hücreleri olan osteoblastlar (61) ve mezenkimal kök hücreler üzerinde de gösterdiği ortaya konuldu (62,63).

MGF normal koşullarda eksprese olmamakta, doku hasarının yanı sıra daha çok egzersiz ve fiziki aktivite yapıldığı durumlarda hızla eksprese olmaktadır (47,50,52,56).

Bunlara ek olarak, özellikle de iskemik beyin hasarlarından sonra fare ve sıçanlara egzersiz / fiziksel aktivite yaptırıldığı durumlarda nörogenezin başladığı, yani egzersizin nörojenezde rolünün olduğu bazı çalışmalarca gösterilmiştir (6,64,65).

Bugüne dek değişik ülke ve gruplarda yapılan çalışmalarda MGF'in pek çok özellikleri ortaya konulmuştur. Bu özellikler arasında en önemlilerden birisi MGF'in - neredeyse tüm dokularda- değişik doku hasarı durumlarında genel "doku onarım faktörü" olarak rol oynamasıdır. Hasara uğramış her dokuda rejenerasyonu tetiklediği öne sürülmektedir (56). Bu etkisinin de dokulardaki yetişkin kök hücreleri aktive edip suskun halden çıkararak proliferasyona sokma yoluyla sağladığı iddia edilmektedir (56).

MGF'in travmatik doku kayıpları; dejenerasyonla seyreden kas dokusu hasarları, kardiyak ve beyin iskemisi, kemik, kırık, tendon ve endometriyal doku hasarları gibi durumlarda eksprese olduğu ve bu hasarlı dokularda, rejenerasyon ve doku onarımını gerçekleştirdiği daha önce yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Bu etkisini de daha çok doku hasarının olduğu bölgedeki kök hücreleri aktive edip proliferasyona sokarak gösterdiği gözlenmiştir.

MGF doku onarımı için suskun/inaktif (quiescent) olan kök hücrelerin aktifleşmesinden sorumlu olduğunu bildiren çalışmalar vardır (57,58).

2.2.3. Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)

Fibroblast büyüme faktörleri (FBF'ler), nematodlardan insanlara kadar uzanan organizmalarda bulunan geniş bir polipeptid büyüme faktörü ailesini oluşturur (66).

En çok bilinen FBF'ler asidik FBF ve bazik FBF'dir. Asidik FBF, aFGF veya FGF-1, bazik FBF ise, bFGF veya FGF-2 olarak ifade edilebilir (67,68). Omurgalılarda, FBF familyasının 22 üyesi bulunmaktadır ve molekül kütlesi 17 ila 34 kDa aralığındadır (66).

FGF-2 (bFGF) 2. kromozom üzerinde yer alır ve bir transkripti bulunur. Toplam 4 exonu bulunur ve bunların 3'ü kodlayan bölgededir. 1269 baz çifti içerir, 154 aminoasit kodlar.

FGF-2 ilk kez sıgır hipofizinden elde edilmiştir ve bu 146 aminoasitlik bir polipeptit zincirden oluşur (69,70). Omurgalı türleri arasında, FGF'ler hem gen yapısı hem de amino asit dizilimi bakımından oldukça korunmuş olduğu bilinmektedir (66).

FGF-2 ilk olarak fibroblastlarda hücre bölünmesini uyarıcı bir faktör olarak tanımlanmıştır. Ancak sonraki yıllarda çok sayıda hücrenin, dokunun ve organın büyümesinde, yenilenmesinde, gelişiminde, fonksiyon ve işlevlerini yerine getirmesinde önemli bir faktör olduğu anlaşılmıştır.

Yapılan çalışmalarca FGF-2'nin sinir hücrelerinin yaşamlarını sürdürmelerini sağladığı, yeni damar yapımını, mezodermal şekillenmeyi, hücre bölünmesini ve hücre göçünü uyardığı, yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir (71).

Genel olarak hücre içerisinde çekirdekte ve sitoplazmada bulunurlar. Hücrenin ölümü veya hasara uğraması durumunda dışarı salınırlar (72).

Yetişkin dokusunda ifade edilen FGF-2, merkezi ve periferik sinir sistemlerinde nöronal sinyal iletiminde önemlidir (66).

MSS'de FGF-2'nin hücrelerin çoğalmasında, büyümelerinde, yaşamlarını sürdürmelerinde, farklılaşmalarında önemli işlevleri bulunmaktadır. Mitoz sonrası farklılaşmış nöronların yaşamını artırır (68,73). Doğum sonrası dönemde de dışarıdan FGF-2 verilmesinin nöron yapımını arttırdığı gösterilmiştir (74). Santral Sinir Sistemi yaralanmaları sonrasında sistemin rejenerasyonunda FGF-2 önemli bir rol oynamaktadır (75).

Embriyonik gelişim sırasında da, FGF'lerin hücre çoğalması, göç ve farklılaşmayı düzenleyen farklı rolleri vardır (66).

Yetişkin organizmada, FGF'ler homeostatik faktörlerdir ve doku onarımı ve yaralanmaya yanıtta işlev görürler. Uygunsuz şekilde ifade edildiğinde, bazı FGF'ler kanser patogeneze katkıda bulunabilir (66).

İskemi çalışmalarında da koruyucu etkisi tespit edilmiştir. Hipokampusta yaşanan iskemi hızlı bir şekilde nöronların ölümüne yol açar ve bu FGF-2 gibi bir takım nöron koruyucu büyüme faktörleriyle önlenir (76). FGF-2 beyni geçici ve devamlı iskemiyeye karşı korur (77,78).

Ayrıca FGF-2 nöronları serbest radikallere, nitrik okside, hipoglisemiye, uyarıcı aminoasitlere, toksin ve ekstatör amino asitler, intraselüler kalsiyum akışı, ekstatör aminoasitlere (glutamik asit), hipoksiye (oksijensizliğe) ve iskemiyeye karşı da korur (78).

MSS yaralanmaları sonrasında onarım sürecinde FGF-2 önemli rol oynar. Kültürde çoğaltılmış nöronların yaşamını yüksek oranda artırmıştır (79).

Sonuç olarak FGF-2'nin yaşamın devamını sağlayan önemli etkileri vardır. Yapılan çalışmaların toplamında FGF-2'nin yokluğu olgunlaşmış normal hücrelerin apoptozisi ile sonuçlanırken, FGF-2 verilmesi apoptotik uyarılara karşı hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlar.

2.2.4. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor/ Beyinden Türetilmiş Nörotrofik Faktör) ilk kez 1982 yılında Nörotrofik Faktör ailesinin ikinci bir üyesi olarak bulunmuştur. 3. Kromozom üzerinde yer alır ve 8 transkript içerir (80-82).

BDNF de nörogenezde rol alan önemli bir nörotrofik faktördür. BDNF nöronların büyümesini sağlayan dimerik küçük bir proteindir; beyinde fazla miktarda bulunur ve nöronlarda sentezlenir. BDNF beyinde en fazla bulunan nörotransmitter olmasına rağmen günümüzde az araştırılmış bir faktördür (83).

BDNF gelişim süresinde embriyoda oluşan nöronların ölmesini engeller. BDNF düzeyinin canlıda gelişim süresince düşük olduğu, olgunlaşmayla birlikte artış gösterdiği bildirilmiştir. Rossi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada BDNF'in, bulbus olfactorius ve diğer bölgelerdeki nöron sayısını artırdığı, ayrıca in vitro olarak da nöral kök hücre proliferasyonunu stimüle ettiği bildirilmiştir (84).

Gelişim sırasında BDNF'in merkezi ve periferik sinir sistemindeki bazı nöronal popülasyonun hayatta kalmasını desteklediği tespit edilmiştir.

Nörotrofinler arasında BDNF, merkezi sinir sisteminde en bol ve yaygın miktarda bulunandır. Dentritlerin büyümesine olumlu etki ederek nöronların devamlılığını ve plastisiteyi düzenler (85).

BDNF başlıca küçük ve orta boylu nöronlarda eksprese edilir, en fazla bulunduğu yer serebral korteks ve hipokampustür (86). Ancak özellikle nöron dışı hücrelerde mesane, kolon ve akciğerde de ekspresyonu vardır (87-89).

BDNF üretiminin ve sekresyonunun çeşitli hastalıklarda değiştiği gözlenmiştir. Alzheimer, Parkinson gibi, nörodejeneratif hastalıklarda azalırken, inflamatuvar hastalıklarda ve inflamasyon dokusunda yüksek miktarda bulunmuştur. Artmış olan

BDNF sentezinin inflamatuvar durumlarda sinir hücrelerini koruduğu düşünülmektedir (90,91).

BDNF'nin nöronal sağkalım, farklılaşma, nörotransmitter salınımı, dendritik yeniden şekillendirme ve akson büyümesi sürecinde hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir (92).

Buna ek olarak, BDNF, erişkin beynin öğrenme ve hafıza kabiliyetinin hücreler biyolojik temelini oluşturan sinaptik plastisite için esastır, bu nedenle BDNF'nin bilişsel bozukluğun etiolojisinde yer alabileceğini önermektedir (93).

Bu bulgulara dayanarak, BDNF üretiminin bozulması ile nörodejeneratif patogeneze arasında bir ilişki olduğunu ortaya koyan çeşitli nörodejeneratif hastalıkların gelişimini geciktirmek için umut verici bir aday olabilir.

2.2.5. Eritropoietin (EPO)

EPO başlangıçta bir hematopoietik faktör olarak eritropoiezdeki rolü üzerinden tanımlanmış, 30.4 kDa'lık bir glikoproteindir ve vücutta doğal olarak üretilir (18,94).

12. kromozom üzerinde yer alır ve tek transkripti bulunur. 5 exon ve 1376 baz çifti içerir, 192 aminoasit kodlar. EPO farklı birçok beyin hasarlı hayvan modellerinde nörotrafik ve nöroprotektif ajan olarak tanımlanmıştır (17,95).

EPO molekülü insanlarda son derece iyi çalışılmış ve iyi tolere edilebilen bir moleküldür(96,97).

EPO ve EPO reseptörleri (EPO-R) nöral, hematopoetik ve endotelial hücrelerde tespit edilmiş, ekspresyon gözlemlenmiştir. Nöral hücrede EPO, EPO-R'ye bağlanarak farklı yolları aktive eder ve nöral hücre yaşamında bu şekilde rol alır (95,98).

Hem nöroblast göçünün hem de göç edilen yerde uygun çevrenin sağlanması EPO'nun etkinliğinde rol almaktadır. Göç eden nöroblastlar için uygun mikroçevre sağlanmaktadır (18).

2.2.6. Epidermal Growth Factor (EGF)

Epidermal büyüme faktörü (EGF), Stanley Cohen tarafından sinir büyüme faktörü (NGF) üzerine çalışırken tesadüfen gözlem yoluyla 1962'de keşfedilmiştir. EGF, çeşitli hücre tipleri için iyi bilinen bir güçlü mitojendir (99-101).

Başlangıçta erkek farenin çene altı tükürük bezinden izole edilmiştir(101). Fare tükürüğünde EGF konsantrasyonları yüksektir. Bunun dışında süt (102-104), tükürük, idrar, plazma, bağırsak sıvısı, amniotik sıvı ve diğerleri gibi çeşitli vücut sıvılarında saptanmıştır (100,102,105).

EGF, etkinliğini hücre yüzeyinde bulunan kendisine ait EGFR reseptörüne bağlanarak gösterir.

Bugüne kadar saflaştırılmış büyüme faktörlerinden Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinden en iyi şekilde karakterize edilenlerden biridir (100).

Ve EGF/EGF reseptörü sinyal yolunun çeşitli hücre tiplerinde -özellikle epitelyal hücrelerde- hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve migrasyonunda önemli rol oynar (105,106).

EGF'in nöronları koruduğu rapor edilmektedir. Özellikle iskemi kaynaklı nöron kaybı üzerine in vivo yapılan çalışmalarda pozitif etkisi olduğu rapor edilmiştir (101).

EGF, gelişmekte olan ve erişkin beyinde eksprese edilmektedir (107,108). Ayrıca hücrelerin subventrikuler zonda (SVZ) ve dentat girusta proliferasyon ve uzun sağ kalım için FGF-2 ve EGF'ye gereksinim gösterdiklerini belirten çalışmalar bulunmaktadır (109,110). EGF ve FGF-2 verilmesi global iskemiden sonra nörojenezi uyarmıştır (111).

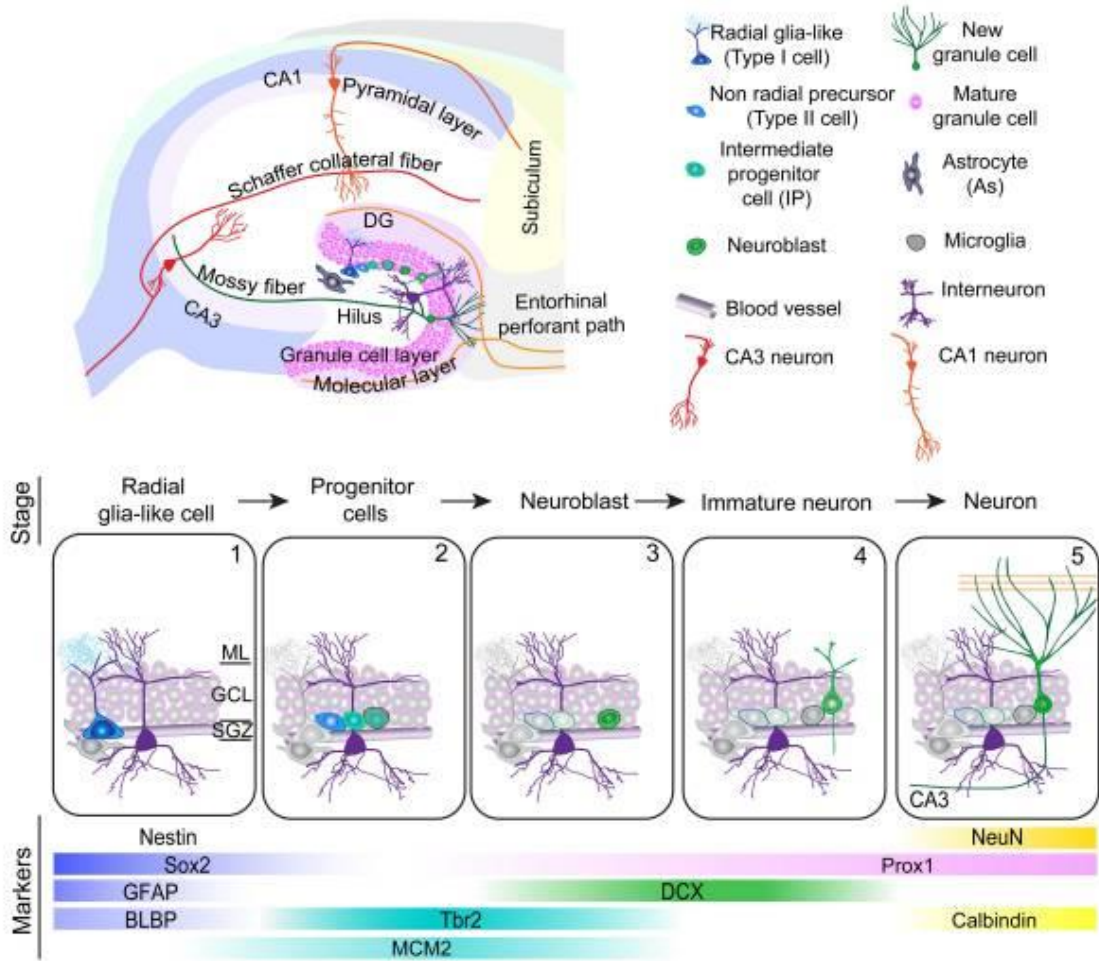
2.3. Nöral Kök Hücre ile İlişkili Genler

Nöroenez sonucu oluşan yeni nöronlar beyinin genel kabul gören 2 nişi olan SVZ ve SGZ'de bulunmaktadır.

Bu iki nörogenik bölgeden hipokampusün Dentate Gyrus (DG)'undaki SGZ'de yaygın kabul gören nöroenez modeli şöyledir: Suskun (Quiescent) haldeki kök hücreler Radial Glia benzeri hücreler (RGL)'dir ve bunlar RGL yada Tip 1 hücre adıyla

anırlılar. Bu quiescent haldeki NKH'ler mitotik değillerdir ve çoğalmazlar. Proliferatif olmayan suskun NKH (Tip1)'lerin aktif hale geçmesiyle yüksek proliferasyon kapasitesi olan aktive olmuş NKH'ler oluşur. Bunlardan radial olmayan (nonradial) hücreler ve intermediate progenitor hücreler gelişir, bunlara IPC yada Tip 2 hücreler denir. Tip 2 hücreleri kendi aralarında gelişim sırasına göre Tip 2a, Tip 2ab ve Tip 2b gibi alt sınıflara ayrılır. Aktif NKH (aNKH) denilen Tip 2 hücrelerinden nöroblast adlı Tip 3 hücreleri gelişir. Tip 3 hücrelerinden olgunlaşmamış nöron hücreleri (immature nöron) gelişir ve bu hücrelerden de granüler nöronlar ve yetişkin nöron hücreleri oluşur. (112) SGZ'deki bu hücrelerden Tip 1/RGL hücreleri (qNKH) GFAP, Sox2, BLBP ve Nestin pozitiflerdir. Bazı yazarlara göre RGL hücreleri Nestin negatiftir (5).

Tip 2 hücreleri MCM2 ve Tlx2, göç eden Tip 3 hücreleri (nöroblastlar) ise DCX (Doublecortin) pozitiflerdir. Olgunlaşmamış nöronlar DCX ve Prox1 pozitif, olgunlaşmış nöronlar ise Neun, β -Tubulin-III ve Calbindin pozitiflerdir (ŞEKİL 2-1) (112-114).



Şekil 2-1: SGZ ve Dentate Gyrus (DG)'ta yetişkin nörojenezi (113)

2.3.1. Nestin

İkinci kromozom üzerinde yer alır. İki transkript içerir, protein kodlayan bir gendir. Bu çalışmada kullanılan dizi Nes-201 isimli transkriptte yer alır. 5682 baz çifti içerir ve 1893 aminoasit kodlar; 4 ekzom içerir.

Nestin, ilk olarak Hockfield ve McKay (1985) tarafından bir monoklonal antikor ile tanımlanan bir ara filament proteindir. Genellikle sinir tüpünde merkezi sinir sisteminin kök hücrelerinde ifade edilir. Terminal sinirsel farklılaşma üzerine, nestin down regüle olur ve nörofilamentlerle değiştirilir (115).

Dahlstrand ve ark. (1992) sıçan geninden bir prob kullanarak bir genomik DNA kütüphanesinden insan Nestin genini klonlamıştır (116).

İnsandaki alfa sarmal alanı, sıçan proteinine % 82 benzerlik gösterir, ancak dizinin diğer bölgeleri daha az korunmuştur (116).

Ayrıca ratlarda yapılan çalışmalarda nöral öncü hücrelerin hücre proliferasyonunda (117), beyin enfaktüsü (118), hücre morfogenezi (119) ve proliferasyonu (120,121) bunun yanında hücre döngüsünde G2/M safhasında (121), nöron hücre ölümü/apoptoz döngüsünde (122), sinir sistemi gelişimi (123) üzerinde etkisi vardır.

2.3.2. Glial Fibrilar Asidic Protein (GFAP)

10. kromozom üzerinde yer alır. 1 transkripti bulunur ve o da 9 exon içerir. Toplam 2688 baz çifti uzunluğundadır ve 430 amino asitlik protein kodlar.

Glikoprotein bağlanmasını sağlayan bir proteini kodlar. Glial hücre çoğalmasını pozitif olarak düzenlediği, beyin ödemi ile ilişkili olduğu, astrosit projeksiyonunu etkilediği anlaşılmıştır.

GFAP, astrositleri ve ana filament proteinleri kodlar. Bu gendeki bozukluklar MSS'deki nadir bulunan bir astrosit bozukluğu olan Alexander Hastalığına neden olur.

Bozukluğunun yol açtığı Alexander hastalığı hem insanlarda hem sıçanlarda ortaktır. (124) ALS hastalığı ile ilişkisi (125) beyin ödemi (126), epilepsi (127), sinir sistemi hasarları (128-130) , parkinson hastalığı (131), inme (132) , astrosit gelişimi (133) , nöron projeksiyon rejenerasyonu(134) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

GFAP, NKH'ler açısından ise astrosit ve suskun haldeki (Tip-1) kök hücre belirteci olarak kullanılmaktadır (112,113).

2.3.3. Beta Tubulin 3 yada β -Tubulin III (TUBB-3)

Beta tubulin 3, beta 3 class III olarak da adlandırılır. 19. Kromozomda yer alır. 1 transkripti, 4 exonu vardır. 1767 baz çifti içerir ve 450 amino asit üretir.

Olgun nöron farklılaşması ve mitotik hücre bölünmesi üzerine etkisi bilinmektedir. Buradan yola çıkarak çalışmalarda olgun NKH belirteci olarak kullanılmaktadır (114).

2.3.4. Doublecortin (DCX)

Doublecortin, X kromozomu üzerinde yer alır. Tek transkripti vardır, 7 exon içerir. 6 exonu kodlayan bölgededir. 8827 baz çifti içerir ve 365 aminoasit üretir.

Nöron göçü ile ilişkisi kurulmuştur hatta nöronal migrasyondan sorumlu gen olarak da bilinir. Beyin hastalıkları (135), beyin gelişimi (136), nöron migrasyonu (9,135-138), hipokampus gelişimi (139) dendrit morfogenezisi (9,136) ile ilişkilidir.

İlk olarak 10,5. embriyonik günde saptanan DCX'in, gelişen fare MSS'sinde yüksek oranda ekspresse edildiği tespit edildi. (140,141)

DCX geni en başta insan kortikal hastalıkları bağlamında tanımlanmıştır (140,142).

DCX ekspresse eden çoğu hücrelerin morfolojisi migrate olan nöroblastları ile uyumludur (143).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması boyunca yapılan tüm deneyler için İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Araştırma Enstitüsü Genetik Bölümü Laboratuvarları, Tüm Genom Analiz Laboratuvarı ve İmmünoloji Bölüm Laboratuvarları kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılacak Sıçan Hipokampal Nöral Kök Hücre Hattı

Çalışmada kullanılan hücre hattı Merck Milipore Yetişkin Sıçan Hipokampal Nöral Kök Hücre satın alınmıştır (Merck Milipore Adult Rat Hippocampal Neural Stem Cell, Katalog No: SCR022). Çalışmada kullanılan örnekler, bu Sıçan Hipokampal Nöral Kök Hücrelerinden çoğaltılıp çeşitli büyüme faktörleri uygulandıktan sonra izole edilen hücre pelletleridir.

3.1.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Maddeler

Kullanılan Solüsyonlar TABLO 3-1’de gösterilmektedir.

Tablo 3-1: Kullanılan Solüsyonlar

| |
|---|
| DMEM/HAM'S F-12 Medium w/o L-Glutamine, 500 ml (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Biochrom) |
| Accutase (Sigma) |
| Fetal Bovin Serum (FBS) (Capricorn) |
| 50x B-27 Supplement (İnvitrogen) |
| Poly-L-Ornithine (Sigma) |
| Laminin (Sigma) |
| IGF-1 peptidi (Insulin Like Growth Factor) (Sigma) |
| FGF-2 peptidi (Fibroblast Growth Factor) (PeproTech) |
| EPO peptidi (Eritropoietin) (Biolegend) |

| |
|--|
| BDNF peptidi (Brain Derived Neurotrophic Factor)(Aviscera) |
| MGF peptidi (Mechano Growth Factor) (Phoenix Peptide) |
| EGF peptidi (Epidermal Growth Factor) (Peprotech) |
| Penisilin/Streptomisin karışımı |
| DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Sigma) |
| DPBS (Fosfat Tampon Çözeltisi) (Gibco) |
| Etil Alkol (Merck) |
| İzopropanol (Merck) |
| Steril su |
| Kloroform |
| L-Glutamin (200nm) (Gibco) |

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar TABLO 3-2’de gösterilmektedir.

Tablo 3-2: Kullanılan Cihazlar

| |
|---|
| Buzdolabı (+4°C) (Samsung) |
| Derin Dondurucular (-20°C ve -80°C) (Haier, Haier) |
| Buz Makinası (Cornelius) |
| Sıvı Azot Tankı |
| CO ₂ inkübatörü |
| Laminar Akışlı Steril Kabin (Nuair) |

| |
|--|
| Akım Sitometri Cihazı (BD FACSCalibur) |
| Hassas Terazı (Shimadzu) |
| Otoklav (Kermanlar, Alp) |
| Hibridizasyon Fırını / Kuru Etüv |
| Mikroskop (Olympus) |
| Pipetörler |
| Distile Su Cihazı (Millipore) |
| Su banyosu (Mettler) |
| Vorteks (Scientific Industries) |
| Masaüstü Mini Santrifüj (Beckman Coulter) |
| Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter) |
| Isı blokları |
| PZR Cihazı (BIO-RAD T-100, Thermal Cycler) |
| Gerçek zamanlı Kantitatif PZR Cihazı (LightCycler 480 II, Roche) |
| Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) |
| Sıcak su banyosu (Mettler) |
| Otomatik pipetler (Eppendorf, Axygen) |
| Güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation) |
| Cell Asic ONIX (Merck) |

3.1.4. Kullanılan Kitler

Kullanılan Kitler TABLO 3-3'de gösterilmiştir.

Tablo 3-3: Kullanılan Kitler

| |
|--|
| SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience) |
| Total RNA Purification İzolasyon Kit (Jena Bioscience) |
| BD Pharmingen BrdU Flow Kit (BD Pharmingen) |
| SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline) |

3.1.5. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

%70 lik Etil Alkol

70 ml Etil Alkol

Steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

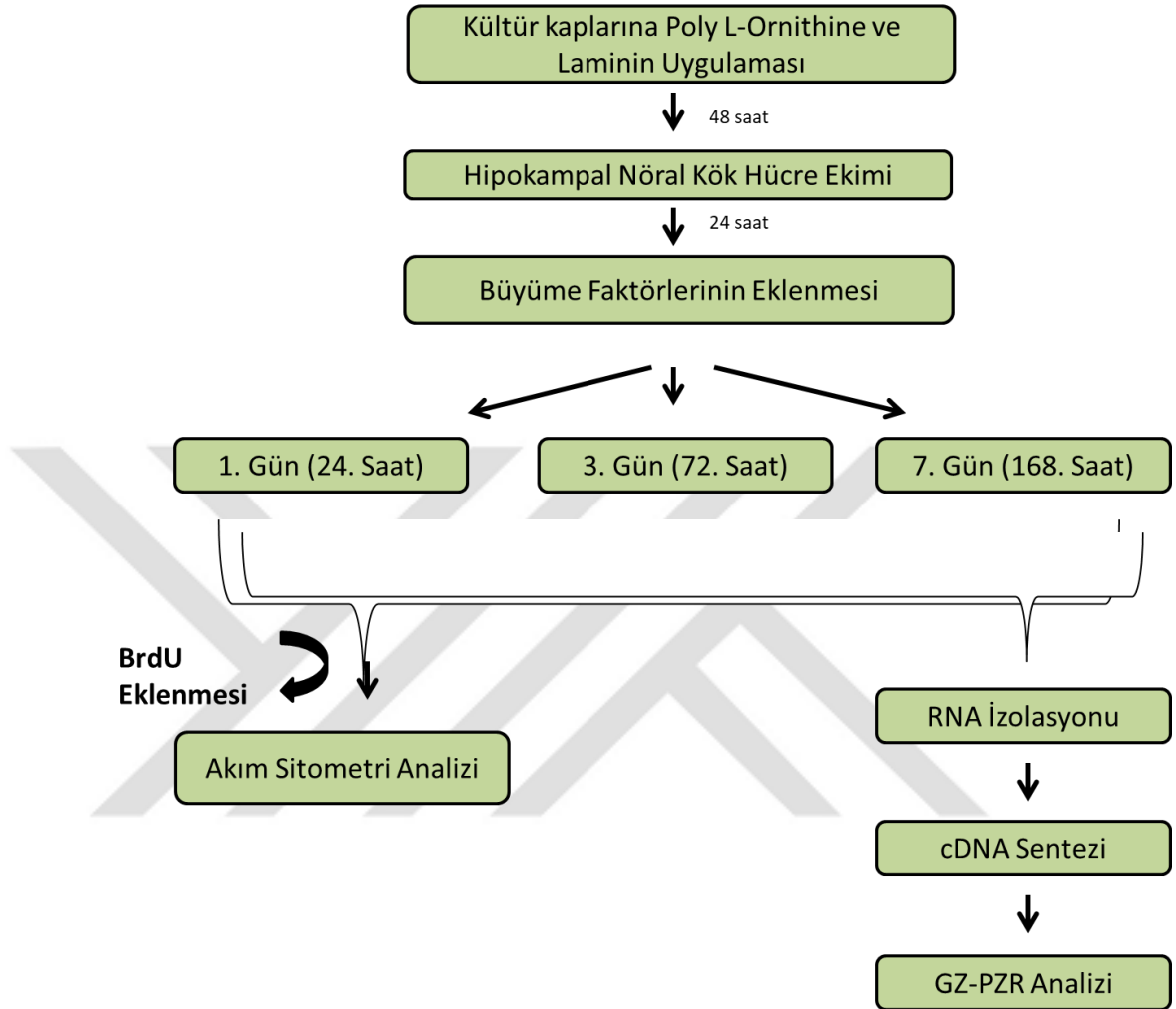
Hücre Dondurma Solüsyonu

%80 FBS (Fetal Bowl Serum)

%20 DMSO ile tamamlanır.

20 dk buzda bekletilir

3.2. Deney Tasarımları



Şekil 3-1: Yapılan BrdU ve GZ-PZR Analiz Deneylelerinin Şema ile Gösterimi

3.2.1. Yapılan Deney Tasarımı

Deney için seçilen büyüme faktörleri hem tek başlarına hücrelere uygulandı hem de literatürde öne çıkan FGF-2 ve MGF büyüme faktörleri ile kombinasyon kurularak çalışmaya dahil edildi. Bunlar; FGF-2+IGF-1, FGF-2+BDNF, FGF-2+EPO, FGF-2+EGF, FGF-2+MGF, MGF+IGF-1, MGF+EPO, MGF+BDNF ve MGF+EGF'dir. Tek başına uygulananlar ve kontrol ile birlikte toplam 16 farklı çalışma grubu oluşturuldu.

Her bir büyüme faktörü için önceki çalışmalardan konsantrasyonlar araştırıldı ve bu çalışmada kullanılacak büyüme faktörü konsantrasyonları belirlendi. Büyüme faktörleri ve konsantrasyon oranları TABLO 3-4'de gösterilmiştir. Kombinasyon örneklerinin yer aldığı gruplarda aynı büyüme faktörlerinin tek başına iken verilen miktar ve konsantrasyonları aynen uygulandı. Bu deneylerden 2 set olarak yapıldı. Bunların bir grubuna BrdU Pharmingen kit protokolü uygulanıp Akım Sitometri cihazında ölçüm yapıldı. Aynı deney setinden yapılan diğer deney grubunda ise hücre kültüründen elde lizatlardan önce RNA izolasyonu yapıldı. Ardından cDNA sentezi ve Gerçek Zamanlı PZR yapılarak Nestin, GFAP, DCX, TUBB3 genlerinin ekspresyon düzeyinde bakıldı. Her bir deney iki kere tekrarlandı.

Migrasyon deneyleri için ise Cell Asic ONIX cihazı ve bu cihazlara özgü M04G kodlu plakalar kullanıldı. Migrasyon düzeyleri kontrol, FGF-2, MGF ve FGF2+MGF büyüme faktörleri için gerçekleştirildi. Deney 3 gün (72 saatlik) olarak tasarlandı ve periyodik aralıklarla (12 saatte bir) hücrelerin fotoğrafları çekildi. Analizler bu fotoğraflar üzerinden gerçekleştirildi. Bu deney de iki kere tekrar edilmiştir.

Tablo 3-4: Kullanılan Büyüme Faktörleri ve Konsantrasyonları

| Büyüme Faktörleri | Final Konsantrasyonları |
|--------------------------|--------------------------------|
| FGF-2 | 60 ng/ml |
| MGF | 15 ng/ml |
| EPO | 150 ng/ml |
| BDNF | 10 ng/ml |
| EGF | 60 ng/ml |
| IGF-1 | 10 ng/ml |

3.3. Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Hücre Kültürü

3.3.1.1. Kullanılacak Platelerin Kaplanması

Nöral Kök Hücrelerin hücre kültürü ortamında yetiştirilebilmesi için, büyüüp gelişebilecekleri bir zeminin hazırlanması açısından kullanılan petri ve/veya plakaların deney öncesinde Poly-L-Ornithine ve Laminin ile muamele edilmiş olmaları gerekmektedir.

Poly-L-Ornithine Hazırlanması ve Uygulanması

Elimizde bulunan 100 mg toz halde Poly-L-Ornithine'den (Sigma) 10 mg/ml konsantrasyondaki stok solüsyon steril su ile hazırlandı.

Kullanacağımız plate ve petrilere uygulamak içinse final konsantrasyon TABLO 3-5'de yazdığı oranda steril su ile hazırlandı. Petrilere 10'ar ml, plaalara da 24 kuyulu için her kuyucuğa 600 µl olacak şekilde bu solüsyondan muamele yapıldı. Ve petri/plakalar 1 gece oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyon sonrası plate içerisindeki Poly-L-Ornithine kaldırıldı. Ve plakalar 2 kere 10 ml steril su ile yıkandı.

Tablo 3-5: Poly-L-Ornithine ve Laminin Konsantrasyonları

| Kimyasal | İlk konsantrasyon | Final konsantrasyon |
|------------------|-------------------|---------------------|
| Poly-L-Ornithine | 100 mg (toz) | 10 µg/mL |
| Laminin | 1 mg/mL | 6 µg/mL |

Laminin Hazırlanması ve Uygulanması

1 mg'lık stok Lamininden final konsantrasyonu 6 ug/ml olacak şekilde PBS ile dilüe edilip hazırlandı.

Önceki gece Poly-L-Ornithine ile inkübe edilmiş ve 2 kere steril su ile yıkanmış kültür kaplarına; petrilere 10 ml, 24'lük plaklarda her kuyuya 600 µl olacak şekilde muamele edilip, uygulandı. Hafifçe karıştırılıp, 1 gece de bu şekilde oda sıcaklığında inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası Lamininli kültür kapları eğer hemen kullanılmayacaksa etrafı parafilm ile kapatılıp -20 °C’de derin dondurucuya kaldırıldı.

Kullanılacak plakaların içesindeki lamininli solüsyon kaldırıldı ve plakalar 2 defa PBS ile yıkandı.

3.3.1.2. Besiyeri Hazırlama

Bir şişe (500 ml) DMEM/F-12’den 20 ml bir falkona ayrılır. Kalan besiyerine 10 ml B-27 Suplementi (50x), 5ml Penisilin+Streptomisin ve 5 ml L-Glutamin (200mM) stoğundan eklenerek besiyeri yeniden 500 ml’ye tamamlanarak hazırlanır.

3.3.1.3. Besiyerine Eklenecek FGF-2 konsantrasyonu hazırlama

Stokta bulunan 100 mg/ml konsantrasyonundaki FGF-2, besiyeri ile 10 kat sulandırıldı. Yukarıda hazırlanışı yazan besiyerinin yanı sıra, hücrelere inkübasyon sırasında kültür kaplarına her seferinde taze FGF-2, final konsantrasyon 20 ng/mL olacak şekilde stoktan eklendi.

3.3.1.4. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekimi

Hazırlanan nöral kök hücre için DMEM/F12 mediumu işlemlerden en az 20-30 dk önce 37°C su banyosuna konuldu. Sıvı Azot tankından vidalı kapaklı tüpteki sıçan Hipokampal Nöral Kök Hücreler çıkarıldı, hızlıca 37°C su banyosunda büyük bir kısmının çözülmesi beklendi. Hücreler çözünmüş halde çok fazla kalmasın diye bu süreç hassasiyetle izlendi. Stoktaki 1 ml’lik donmuş NKH’li solüsyon 15 ml’lik falkon tüpüne aktarıldı. 10 ml’ye tamamlamak için üzerine 9 ml’lik medium eklendi. Hücrelerin osmotik şoka girmemesi için medium damla damla ve nazıkçe eklendi.

Ardından bu tüp 300xg de 3-5 dk arası santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 10 ml taze medium eklendi. Pipetaj yapıp, çözdürüldü. Hücreler ekilmeden üzerlerine taze FGF-2 stokundan 20 µl eklendi, tekrar karıştırıldı.

Taze besiyeri içerisinde çözdürülen hücreler, hücre kültürü için özel olan kültür kaplarına (petri) aktarıldı. Petri 37°C, %5 CO₂ koşullarını içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.3.1.5. Besiyeri Değişimi

Besiyeri gün aşını/2 güne bir şeklinde değiştirildi. Medium değiştirilecek petrideki hücreler önce mikroskopta kontrol edildi. Eski medium pipet yardımı ile çekildi. 15 ml'lik falkona önceden 37°C'de ısıtılmış taze NKH mediumu eklendi. zerine 20 µl (final cons: 20 ng/ml) FGF-2 eklenip karıştırıldı.

Medium petride hücrelerin üzerine pipet ile eklenip tekrar mikroskop ile kontrol edildi. Ve petri tekrar 37°C, %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı.

3.3.1.6. Hücre Pasajlama

İnkbatrdeki hücreler mikroskopta kontrol edildi. Hücrenin bulunduğu alandaki yoğunluğuna göre pasaj yapıldı. Bunun için petrideki hücrelerin üzerindeki besi yerinin tamamı çekildi. Besi yeri kalıntılarını uzaklaştırmak ve yıkamak için kültür kabına 10 ml PBS konuldu, çalkalandı ve tamamı çekilip atıldı. Nöral Kök Hücreler yapışan hücreler olduğu için hücreleri petri yüzeyinden ve birbirinden ayırmak için Accutase (Sigma) kullanıldı.

-20°C de 5'er ml'lik bölünen Accutaselardan biri oda sıcaklığında çözdürüldü. Petrinin zerine Accutaselardan biri eklenip karışması sağlandıktan sonra kontrol etmek şartı ile 3-5 dakika arası 37°C, %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin ayrışıp ayrışmadığı mikroskoptan bakarak kontrol edildi Hücreler ayrışmış ise solüsyon pipet yardımı ile çekilip boş 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Ve zerine Accutase aktivitesini inhibe etmek için 10 ml'ye tamamlanacak kadar medium eklendi. Falkon 300xg de 3-5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet taze besiyerinde çözdürülüp yeni petriye ya da platalere aktarıldı. zerine 20 µl (final cons: 20 ng/ml) FGF-2 eklenip karıştırıldı ve kültür kapları -petri ya da plak- 37°C, %5 CO₂ inkübatöre kondu.

3.3.1.7. Petriden 24'lk kuyulu-plakaya ekim

Petride yetiştirilen hücreler deney protokolünü uygulamak üzere 24 kuyulu plakalara eklendi. Bu sebeple yukarıdaki hücre pasajlama protokolünün ilk aşamasına göre hücreler Accutase yardımı ile kaldırıldı. Her bir kuyuya sabit sayıda hücre ekleyeceğimiz için hücreler önce hematocytometer yardımı ile sayıldı.

Bunun için; santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra pellet halindeki hücrelerin üzerine 1 ml medium eklenir. Gerekli görüldüğü kadar 1/10 oranında seyreltmeye devame dilir. Seyreltilen bu hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp, 10 µl tripan mavisi ile 0,5 ml PZR tüpünde karıştırılır. Karışımdan thoma lamının yüzeyine 10 µl eklenir. Mikroskopta thoma lamında sayım yapılır.

24 kuyulu plate için her bir kuyuya 60 bin hücre ekilecek şekilde yeterli hücre miktarı belirlendi. Sayımdan sonra yeterli sayıdaki hücreyi içeren miktar ayrıldı, boş falkona kondu. Son aşamada 24'lük kuyulu plağın her bir kuyusuna 600 µl besiyeri+hücre karışım solüsyonu eklenecektir. Bunu için yeterli sayıdaki hücre çöküntüsü üzerine yine kuyu başına 600 µl besiyeri hücre solüsyonu karışımı düşeceğinden hesapla yeterli miktarda taze besiyeri eklendi, karıştırıldı. Hücreler kültür kabına geçirildikten sonra besiyerine FGF-2 eklenmez. 24 kuyulu plaklar her bir kuyuya 600 µl olacak şekilde ekildi. Mikroskopta kontrol edildikten sonra 37°C, %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı.

Bu şekilde büyüme faktörü uygulamaksızın 24 saat hücrelerin kendine gelmesi ve açılması için inkübe edildi.

3.3.1.8. Hücrelere Büyüme Faktörlerinin Eklenmesi

24 saatlik büyüme faktörü uygulamaksızın yapılan inkübasyondan sonra inkübatörden alınan hücrelerin üzerine TABLO 3-4'de yazan son final konsantrasyon olacak şekilde bu büyüme faktörleri eklendi.

Kombinasyon halinde verilecek olan büyüme faktörlerinin oranları her bir faktörün tek başına verilen konsantrasyonları ile aynı olacak şekilde hesaplanıp uygulandı.

Bu işlem 1. gün (24 saat), 3. gün (72 saat) ve 7. gün (168 saat) deney düzenekleri için ayrı ayrı tekrarlandı.

Deneyler için büyüme faktörü muamelesi şu şekilde yapılmıştır;

Hücreler 24 saat hiçbir büyüme faktörü eklenmeksizin besiyeri ile kültür kaplarında yetiştirildikten sonra 24. saatte tüm kültür kaplarına belirtilen miktarlarda büyüme faktörleri eklenmiştir. 24 saat sonra 1. gün deneyi durdurulup analiz edilmiştir.

Ardından 3. gün deneyi için 72. saatte durdurulup analiz edilmiştir. Tam bu 72. saate denk gelen sürede de 7. gün deneyi için hazırlanan kültür kaplarına taze besiyeri ve büyüme faktörü eklenmesi yapılmıştır.

3.3.1.9. Bromodeoksiüridin (BrdU) muamelesi ve Protokolü

Bu aşamada BD Pharmingen BrdU Flow Kits kiti kullanıldı ve firma tarafından oluşturulmuş protokole uyuldu.

1. BrdU muamelesi için önce kit içerisinde gelen BrdU'dan 31 µl alınır, 1 ml NKH besiyeri içerisinde çözdürüldü. Ardından ışık almayan ortamda, deneyin durdurulmasından 2 saat öncesinde 24 kuyulu plateteki hücelere her bir kuyuya 6'şar µl gelecek şekilde eklendi ve 24 kuyulu plaklar tekrar inkübatöre kaldırıldı.

2. 2 saatin sonunda BrdU solüsyonunu içeren besiyeri plaklardan çekildi. Ve Accutase ile hücre kaldırma protokolü uygulandı. Her bir kuyuya 500 µl Accutase ilave edildi. 3-5 dk kadar inkbatörde bekletildi. Mikroskopta hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. Üzerine 500 µl besiyeri ilave edilip, süspansiyon 1.5'luk ependorf tüplerine aktarıldı.

3. 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

4. Pellete BrdU kit protokolünü uygulamak üzere protokolün ilk basamağında hücreler Flow tüplerine aktarıldı.

5. Flow tüpüne aktarılan hücrelerden her bir tüpün üzerine 100 µl Cytotfix/CytoPerm buffer eklendi.

6. 15-30 dk oda sıcaklığında ya da buzda inkübe edildi. Hücreler 1 ml 1x BD Perm/Wash Buffer ile yıkandı. 5 dk 200-300 g de santrifüj edilip ve süpernatant atıldı.

7. Hücreler 100 µl BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus ile resüspanse edildi. 10 dk buzda -ya da +4'te- inkübe edildi. Ardından hücreler tekrar 1 ml 1x BD Perm/Wash Buffer ile yıkandı. Ve 5 dk 200-300 xg de santrifüj edilip, süpernatant atıldı.

8. Ardından 100 µl dilüe edilmiş DNase ile resüspanse edildi. 60 dakika 37 °C kuru etüvde tüpler inkübe edildi ve hücreler yeniden yıkandı.

9. Hücreler 1/50 oranında PWB ile dilüe edildi, 50 µl Anti-BrdU ile resüspanse edildi ve 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu aşama kontrol tüpüne uygulanmaz. Ardından yeniden yıkama protokolü uygulandı.

10. Hücreler 20 µl 7AAD ile yeniden resüspanse edildi. Bu total DNA'yı boyamayı sağlar. Üzerlerine 1 ml PBS eklenip ve Akım Sitometri Cihazında analiz edildi.

Çalışma mümkün olduğu kadar en az ışıklı ortamda yapıldı.

3.3.1.10. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler dondurulmak üzere sıvı nitrojene kaldırılırken vidalı kapaklı cryo tüplerde muhafaza edildi. Ve her tüpte 1 milyon hücre olacak şekilde solüsyonlar hazırlandı.

Sayımından sonra pellet halindeki hücrelerin üzerine eklemek için %80 FBS ve %20 DMSO içerikli solüsyon hazırlanıp 20 dk buzda bekletildi ve ardından süspansiyon halindeki hücreyi içeren falkona kenardan yavaş yavaş eklendi. Bu karışım 1'er ml olacak şekilde vidalı kapaklı cryo tüplere paylaştırıldı. Her bir tüpteki içeriğin 1 milyon hücre olmasına dikkat edildi.

Dondurucu kapta -80 °C de 2 gün bekletildikten sonra yaklaşık -195°C derecedeki sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.3.2. RNA İzolasyonu

Birinci, üçüncü ve yedinci gün olmak üzere 3 farklı gün grubunda, her grubun kontrolü ile birlikte 16 farklı kombinasyonuna RNA izolasyonu yapıldı.

Rat Hipokampal Nöral Kök Hücrelerin kültüründen kaldırılan çöküntü halindeki hücrelerin RNA izolasyonunun yapılmasında Jena Bioscience RNA Purification Kit kullanıldı. Kit protokolünde uygulanan adımlar aşağıdaki gibidir:

1. Filtrelerin üzerini ıslatmak için önce tüplere 100 µl "Aktivasyon Buffer" eklendi. 10 000 xg'de 30 saniye santrifüj edildi.
2. 1.5 ml'lik tüp içerisindeki hücre süspansiyonu 3000 xg'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atılarak hücreler pellet haline getirildi.

3. Hücre pelletine 250 µl “Lysis Buffer” eklenip, vorteksenerek hücreler buffer içerisinde parçalandı.
4. Hücre lizatına -Lysis Buffer’ı çekmeden- 150 µl izopropanol eklendi, vorteks uygulandı ve karışım spin kolonuna alındı.
5. Spin kolondaki karışım 10 000 xg’de 30 sn santrifüjlendi ve toplama haznesine geçen sıvı atıldı. Bu aşamada RNA, spin kolon içerisindeki membranda bulunmaktadır.

Yıkama aşamaları;

1. Spin kolon tekrar toplama haznesine alındı ve spin kolonuna 350 ul “Primary Washing Buffer” eklendi.
2. Spin kolon 10000xg’de 30 sn santrifüjlenir ve santrifüj sonrası toplama haznesindeki sıvı atıldı.
3. 350 ul “Secondary Washing Buffer” spin kolonuna eklendi.
4. Spin kolon 10000xg 30 sn santrifüjlenir ve toplama haznesine geçen sıvı atıldı.
5. Spin kolonu içerisindeki sıvının elimine olması için 10000 xg’de 2 dk daha santrifüj yapıldı.

RNA Elüsyonu

1. Spin kolon içerisindeki sıvı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra, DNaz/Rnaz içermeyen 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Mikrosantrifüj tüpü içerisindeki spin kolon membranına mikropipet ucu temas edecek şekilde 20 ul “Elution Buffer” eklendi ve 2 dk inkübe edildi.
3. 10000xg’de 1 dk santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrasında mikrosantrifüj tüpü içerisinde RNA elde edilmiş oldu.
4. RNA -20°C de kısa süreli olarak veya -80 °C de uzun süreli saklanabilir.

3.3.3. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenmiştir. Öncesinde bu RNA örnekleri 50 ng/ul sabitlendi.

cDNA sentez aşamasında Jena Bioscience “ScriptcDNA Sentez Kiti” kullanılmıştır ve aşağıdaki protokol izlenmiştir:

Kalıp RNA/Primer Karışımını hazırlanması:

1. TABLO 3-6’de belirtilen miktarlar DNase/Rnaz içermeyen steril PZR tüplerine eklenerek RNA/primer karışımı hazırlandı. İşlemlerin tamamı buz üzerinde gerçekleştirildi.
2. RNA/primer karışımı hazırlandıktan sonra PZR cihazında 70 °C de 5 dakika inkübe edilip hemen buza alındı.

Tablo 3-6: Kalıp RNA/Primer Karışımı

| Bileşen | Bileşenin stok konsantrasyonu | Reaksiyon konsantrasyonu | Miktar (10ul) |
|----------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|
| H2O | - | - | 10 µl’ye tamamlanır |
| Primer: | - | | |
| Oligo-dT15-25 | | 50 pmol (300ng) | 0.5 µl |
| Random Hexamer | | 50 pmol (100 ng) | 0.5 µl |
| Kalıp RNA | - | 50 ng | x µl |

Reaksiyon Karışımının Hazırlanması:

3. İnkübasyon sırasında TABLO 3-7’de yazan bileşenler ile örnek sayısına göre bir reaksiyon karışımı hazırlandı.
4. İnkübasyondan sonra primer/kalıp RNA karışımına, inkübasyon esnasında Tablo 3-9’a göre hazırlanmış reaksiyon karışımından 10’ar µl eklendi. Toplam hacim bu aşamada 20 µl olmuş olur.

Tablo 3-7: Reaksiyon Karışımı

| Bileşen | Bileşenin stok konsantrasyonu | Reaksiyon konsantrasyonu | Miktar (10 µl) |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|
| H ₂ O | - | - | 10 µl'ye tamamlanır |
| SCRIPT-RT Tampon Solüsyonu | 5x | 1x | 4 µl |
| dNTP Karışımı | Her biri için 10 mM | Her biri için 500 uM | 1 µl |
| DTT Solüsyonu | 100 mM | 5 mM | 1 µl |
| Rnaz inhibitörü | 40 ünite/µl | 40 ünite | 1 µl |
| SCRIPT Ters Transkriptaz | 200 ünite/µl | 100 ünite | 0.5 µl |

5. Belirtilen miktarlarda bileşenleri içeren PZR tüpleri, PZR cihazına yerleştirildi ve TABLO 3-8'da yazan koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3-8: cDNA Sentez Koşulları

| | |
|-------|-----------|
| 42 °C | 10 dakika |
| 50 °C | 50 dakika |
| 70 °C | 10 dakika |

cDNA'nın saklanması:

6. PZR sonucunda elde edilen cDNA -20 °C'de kısa süreli saklandı.

3.3.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (GZ-PZR) (Q-PCR)

Hücre kültüründe uygulanan büyüme faktörü kombinasyonlarının gen ekspresyonu düzeyinde değişimlerini incelemek için Gerçek zamanlı kantitatif PZR yapıldı. NKH'lerin aktivasyon, proliferasyon ve migrasyonunu gösteren literatürde belirlenen belirteç antikorlar proje bütçesini çokça aşacağından tezde bu gen primerlerinin ekspresyonlarını incelemek yoluyla tespit etmeye karar verilmiştir. Bu bağlamda PZR'de DCX, TUBB3, Nestin ve GFAP genleri ve referans gen olarak GAPDH kullanıldı. Bu genlere ait primerler ise daha önce çalışılan makalelerden belirlenip alınmıştır. Primerlerin dizilimi TABLO 3-9'da gösterilmektedir. Gen ekspresyonları 1. gün, 3. gün ve 7. gün zaman dilimlerinde ayrı ayrı incelendi.

Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR'de ekspresyon analizi için hücre kültüründen sonra elde edilen cDNA örnekleri ve reaksiyonda ışımaya sağlamak için ise SYBER Green Boyası kullanılmıştır.

Yine PZR Plakasında negatif kontrol olarak su, pozitif kontrol olarak ise Dr. Özkan Özdemir'den temin edilen rat hipokampal bölge hücreleri kullanılmıştır.

Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR için şu basamaklar uygulandı:

1. PZR işlemi laminer akışlı kabin içerisinde yapıldı ve kullanılacak malzemeler (filtreli pipet uçları, 96 kuyulu PZR plate, sling, steril su, 1.5 ml lik steril tüpler, pipetler (200, 10, 2.5'lük)) 15 dakika kadar kabinde UV ışını altında bekletildi.
2. PZR bileşenlerini içeren ortak reaksiyon karışımı örnek miktarından %10 fazla olacak şekilde hazırlandı.

Ortak karışımda; PZR karışımı, primerler, steril su bulunmaktadır. Bileşenlerin konsantrasyonu TABLO 3-10'de gösterilmiştir.

3. Hazırlanan reaksiyon karışımından 96 kuyulu PZR plağındaki her bir kuyuya 19 µl olacak şekilde dağıtıldı ve her bir örneğin kuyusuna 1 µl cDNA eklendi. Sling ile üzeri kapatılıp, yapıştırıldı.
4. Hazırlanan plaka 1500 xg'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra cihaza yerleştirildi. TABLO 3-11, TABLO 3-12, TABLO 3-13 ve TABLO 3-14'da gösterilen PZR koşullarında amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 3-9: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR’da Kullanılan Primerler

| Primer | Primer dizileri |
|---------------------|--------------------------------------|
| Nestin İleri Primer | 5' CCGGGTCAAGACGCTAGAAGA 3' (144) |
| Nestin Geri Primer | 5' CTCCAGCTCTTCCGCAAGGTTGT 3' (144) |
| GFAP İleri Primer | 5' CTCCTATGCCTCCTCCGAGACGAT 3' (144) |
| GFAP Geri Primer | 5' GCTCGCTGGCCCCGAGTCTCTT 3' (144) |
| DCX İleri Primer | 5' TTGGACATTTTGACGAACGA 3' (7) |
| DCX Geri Primer | 5' CCCTTCTTCCAGTTCATCCA 3' (7) |
| TUBB3 İleri Primer | 5' GTCCGCCTGCCTCTTCGTCTCTA 3' (144) |
| TUBB3 Geri Primer | 5' GGCCCCTATCTGGTTGCCGCACT 3' (144) |
| GAPDH İleri Primer | 5' GGTGTGAACGGATTTGGCCGTAT 3' (144) |
| GAPDH Geri Primer | 5' CTCAGCACCAGCGTCACCCCATT 3' (144) |

Tablo 3-10: PZR Reaksiyon Karışımı

| Bileşen | Konsantrasyon | Miktar |
|-------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 2x SensiFAST SYBER No-ROX Mix | 1x | 10 µl |
| İleri Primer (10µM) | 400 nM | 0.8 µl |
| Geri Primer (10µM) | 400 nM | 0.8 µl |
| H ₂ O | - | 8.4 µl (10 µl'ye tamamlanacak) |
| cDNA ürünü | - | 1 µl |
| TOPLAM | | 20 µl |

Tablo 3-11: Nestin Geni için Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı

| | | | |
|-------------------------|-------|-----------|----------|
| Başlangıç Denatürasyonu | 95 °C | 3 dk | 1 Döngü |
| Amplifikasyon | 95 °C | 5 saniye | 45 Döngü |
| | 68 °C | 20 saniye | |
| | 72 °C | 20 saniye | |
| Erime Eğrisi Analizi | 95 °C | 5 saniye | 1 Döngü |
| | 65 °C | 1 dakika | |
| Soğuma | 40 °C | 20 saniye | 1 Döngü |

Tablo 3-12: GFAP Geni için Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı

| | | | |
|-------------------------|-------|-----------|----------|
| Başlangıç Denatürasyonu | 95 °C | 3 dk | 1 Döngü |
| Amplifikasyon | 95 °C | 5 saniye | 45 Döngü |
| | 65 °C | 20 saniye | |
| | 72 °C | 20 saniye | |
| Erime Eğrisi Analizi | 95 °C | 5 saniye | 1 Döngü |
| | 65 °C | 1 dakika | |
| Soğuma | 40 °C | 20 saniye | 1 Döngü |

Tablo 3-13: TUBB3 Geni için Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı

| | | | |
|-------------------------|-------|-----------|----------|
| Başlangıç Denatürasyonu | 95 °C | 3 dk | 1 Döngü |
| Amplifikasyon | 95 °C | 5 saniye | 45 Döngü |
| | 60 °C | 20 saniye | |
| | 72 °C | 20 saniye | |
| Erime Eğrisi Analizi | 95 °C | 5 saniye | 1 Döngü |
| | 65 °C | 1 dakika | |
| Soğuma | 40 °C | 20 saniye | 1 Döngü |

Tablo 3-14: DCX Geni için Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Programı

| | | | |
|-------------------------|-------|-----------|----------|
| Başlangıç Denatürasyonu | 95 °C | 3 dk | 1 Döngü |
| Amplifikasyon | 95 °C | 5 saniye | 45 Döngü |
| | 56 °C | 20 saniye | |
| | 72 °C | 20 saniye | |
| Erime Eğrisi Analizi | 95 °C | 5 saniye | 1 Döngü |
| | 65 °C | 1 dakika | |
| Soğuma | 40 °C | 20 saniye | 1 Döngü |

3.4. Migrasyon Deneyleri

Migrasyon deneyleri için Cell Asic ONIX cihazı ve o cihaza spesifik M04G plakları kullanıldı. Migrasyon deneyleri diğer deney setlerinden farklı olduğu için bu ayrı planlandı ve diğer deneyler için planlanan tüm büyüme faktörü kombinasyonları yerine, yalnızca FGF-2, MGF, FGF-2 + MGF seçenekleri kontrol örneği ile birlikte çalışıldı. Konsantrasyon olarak yine TABLO 3-4'deki konsantrasyonların aynısı kullanıldı.

3.4.1. Migrasyon Plate Özellikleri

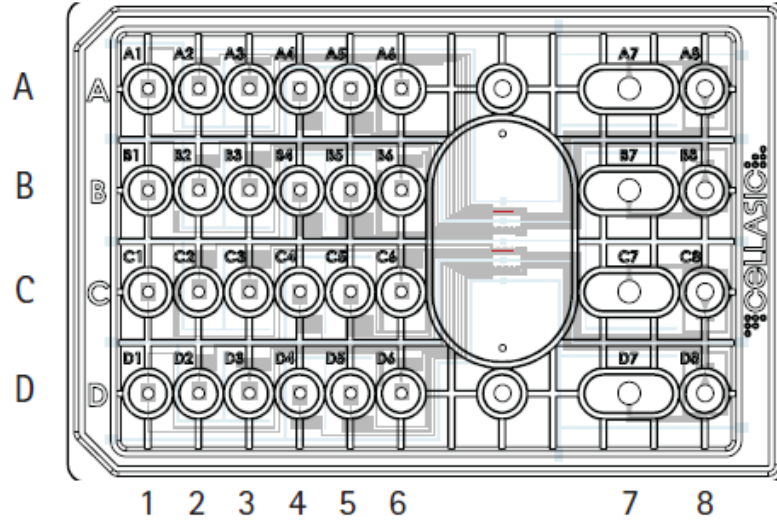
Cell Asic ONIX Cihazı yalnızca cihaza özel plakalar kullanılarak çalıştırılabilen bir cihazdır. Önemli özelliklerinden biri de cihazın kendi inkübasyon ortamını ayarlayabiliyor olmasıdır. Bunu da özel plateleri aracılığı ile kapağına bağlanan manifold ve gaz tüpleri yardımı ile yapar. Bu vesile ile hem normal şartlardaki inkübasyon ortamını sağlayabilir hem de hipoksi deneyleri istenilen azot ve oksijen oranında değiştirilerek kullanılabilir. Her deney için farklı plate seçenekleri sunulmaktadır.

Migrasyon deneyleri için kullanılan M04G plakları da bunlardan biridir ve bu tezin deneylerinde bu plakalardan faydalanılmıştır.

Plakanın görünüşü ŞEKİL 3-2'de verilmiştir. Birbirinden bağımsız 4 havuz ve bu havuzlara bağlanan 6 giriş, 2 çıkış kuyusu bulunmaktadır. Hücreler ŞEKİL 3-3'te görünen C kısmındaki PTFE halkası içerisine özel protokolü ile eklenir. Ve manifold yardımı ile havuza itilir. ŞEKİL 3-3'te A kısmında cihazın protokolünde yer alan hücrelerin dizilimini gösteren çizim ve B kısmında hücrelerin kültüre edildikleri alan, C kısmında ise hücrenin ekimin yapıldığı kuyunun yakından görünümü gösterilmektedir. ŞEKİL 3-4'de ise deneyin ilk aşamasında, hücre ekimini gerçekleştirdikten sonraki ilk görsel bulunmaktadır.

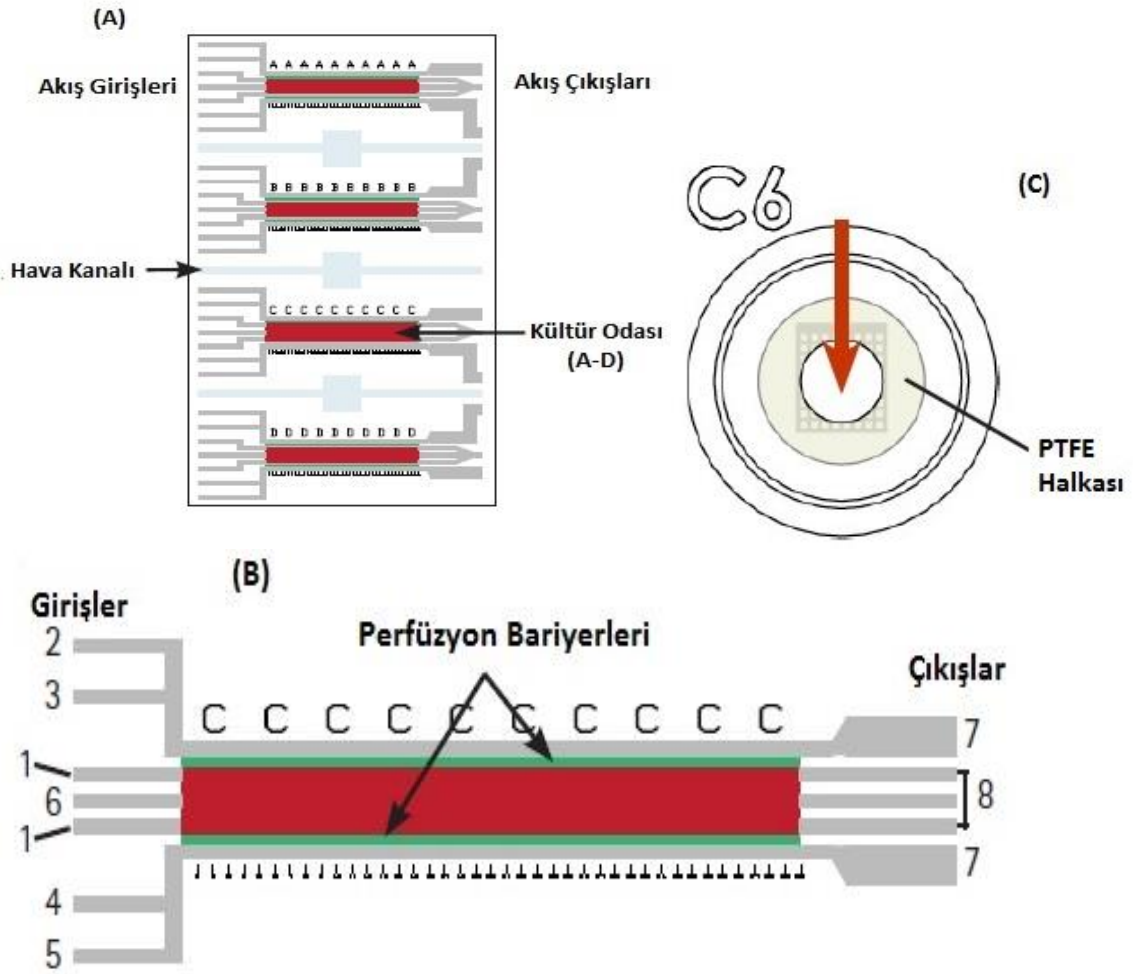
Ardından bu havuzda istenilen zaman aralığında, istenilen hızda ve istenilen etken maddeler alt ve üst bariyerlerden istenilen periyotlarda akıtılır. Bu ayarlama cihazın bağlandığı bilgisayara kurulu bir program aracılığı ile yapılır. Program arayüzünün görünümü ŞEKİL 3-5'te verilmiştir. Ve zaman içerisinde hücrelerin yönelimleri resmedilip tespit edilir.

Bu tez dizaynı açısından migrasyon deneyleri 3 gün olarak yapıldı. Her 12 saatte bir fotoğraf çekildi. Ve tüm deney planı 2 tekrar olacak şekilde kuruldu.



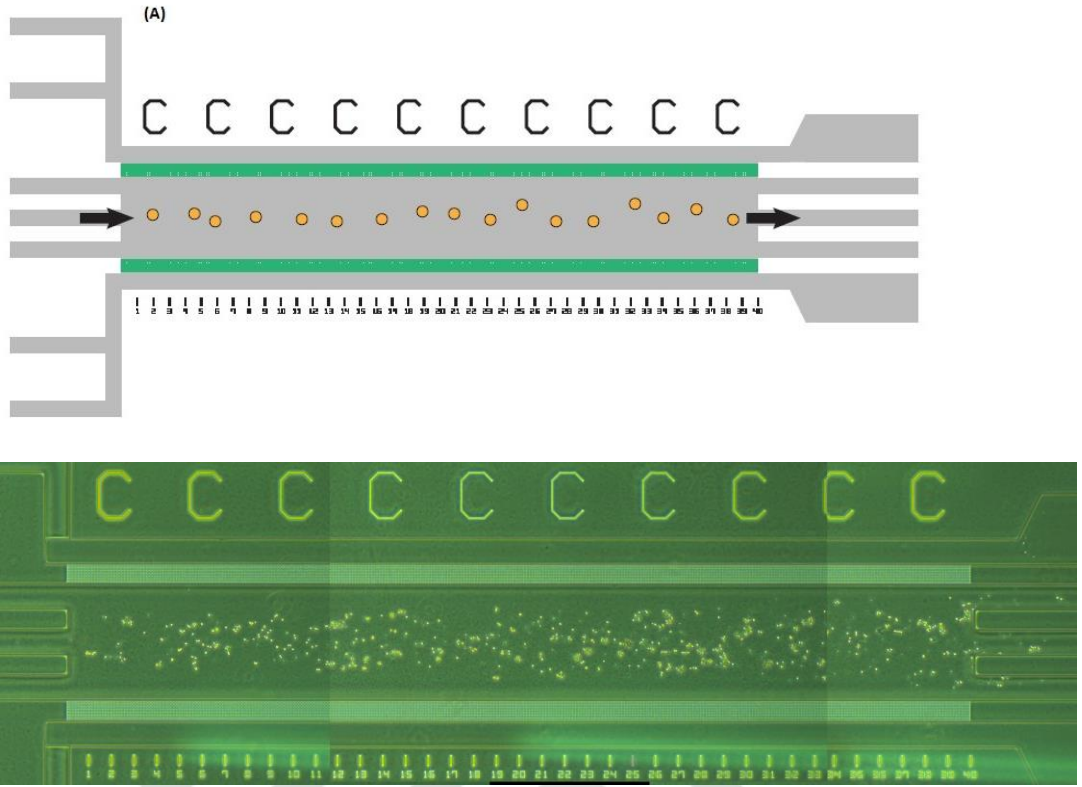
Şekil 3-2: Cell Asic ONIX Cihazı M04G Plaka Görünümü

1)Yer Çekimi Akış Girişi 2-5) Dört adet çözelti girişleri 6) bir adet hücre girişi 7-8) iki adet ortak çıkış. M04G Mikroakışkan Platelerde dört adet bağımsız kültür üniteleri bulunmaktadır (A-D). Herbir plate kuyuların içerisinde PBS solüsyonu ile dolu şekilde gelir. Deney öncesi protokole göre bu solüsyon değiştirilir. Plateler tek kullanımlıktır.



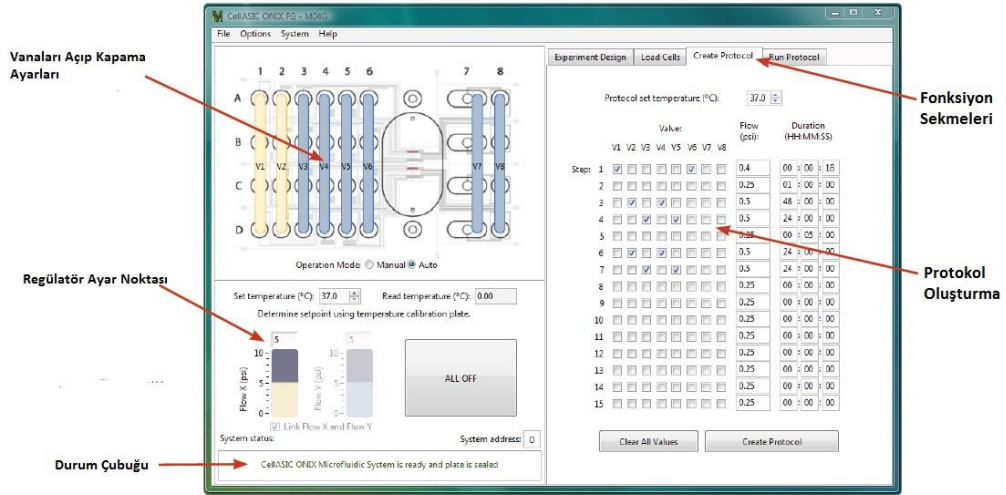
Şekil 3-3:M04G Platelere daha yakından görünüşü

(A) Odaların Görüntüleme Penceresi (B) Kültür Odası Görünümü (C) Hücrenin eklendiği 6. Kuyunun yakından görünümü, PTFE halkası içerisinde (10µl hacminde) hücre bırakılır



Şekil 3-4: Hücre Ekildikten Sonraki Kültür Odalarının Görünümü

(A) Cell Asic ONIX Protokolünde bulunan Çizim (B) Deney protokolüne uygun hücre ekildikten hemen sonraki deney görseli



Şekil 3-5: Program Yazılımının Görünümü

3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

NKH'lere hücre kültüründe yapılan uygulamaların ardından RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve gen ekspresyonu analizi için Gerçek zamanlı PZR yapıldı. Yapılan kantitatif PZR'de örnekler duplike çalışıldı. Tüm deneyler iki tekrarlı olarak yapıldı.

Hücre kültüründe hiçbir uygulama yapılmayan hücreler kontrol örneği olarak değerlendirildi. Aynı zamanda PZR'de pozitif kontrol olarak rat hipokampal bölgesinden izole edilen örnekler kullanıldı.

Referans gen olarak GAPDH kullanıldı. Sonuçlar $\Delta CT = 2^{-(CT_{\text{örnek}} - CT_{\text{referans}})}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Daha sonra her bir örnek deneyin kendi kontrol örneğine -hiç bir büyüme faktörü eklenmeden deney protokolünün uygulandığı bölüme ($\Delta CT_{\text{örnek}} / \Delta CT_{\text{kontrol}}$).

Ardından çıkan sonuçlar eğer 1'den büyük ise aynen alınmış, 1'den küçükse (-1) eklenmiştir. Böylelikle tüm örnekler kontrol örneğine sıfırlanmış ve kontrole göre artış veya azalış tespiti yapılmıştır.

BrdU Analizi sonuçları da aynı şekilde kontrol örneğine göre değerlendirilmiş ve önce deneyin kontrol örneğine bölünmüş, ardından 1'den büyükse aynen alınıp, küçükse -1 eklenmiştir.

Migrasyon deneyi analizleri ise tamamen görsel olarak fotoğraflardan analiz edilmiştir. NKH'lerin sayıca yoğunluğu, nörosferlerin varlığı, yoğunluğu ve büyüklüğü değerlendirilmiştir. Ayrıca görsel olarak analiz edilip sayıya dökülen bu sonuçlar Mann-Whitney t testi kullanılarak da analiz edilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışma boyunca hücre kültüründe biri kontrol olmak üzere toplam 16 örnek üzerine büyüme faktörü uygulamaları yapılmıştır. Bu 16 örnekli deneyin gün bazlı değişimlerini incelemek üzere 1. gün 3. gün ve 7. gün gibi farklı gün seçenekleri düzenlenmiştir.

Bu deney düzenekleri hem BrdU uygulaması sonrası Akım ölçer cihazında analiz edilmiştir. Hem de aynı deney düzeneğinden yapılarak, GZ-PZR ile 4 genin (GFAP, Nestin, DCX, TUBB3) anlatım düzeyine bakılmıştır.

Migrasyon deneyleri için ise Cell Asic ONIX cihazı kullanılmıştır.

4.1. Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları

NKH'ler belirtilen gün ve konsantrasyonlarda büyüme faktörleriyle muamele edildikten sonra BrdU eklenip Akım Ölçer cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonucu hücreler G0/G1 fazı, G2/M fazı, S fazı ve Apoptotik faz olmak üzere 4 ayrı fazda incelenmiştir.

Büyüme faktörlü örneklerin kontrole göre göstermiş olduğu değişimin değerlendirilmesi sonucu 1. gün deneylerinde FGF-2 (-1.10 kat) ve MGF (-1.18 kat) büyüme faktörlü deney gruplarında hücrelerin kontrole göre G0/G1 fazından çıktığı tespit edilmiştir. Fakat bu büyüme faktörlerinin birlikte kullanıldığı FGF-2+MGF (1.25 kat) örneğinde ise hücrelerin G0/G1 fazında yani uyku fazında kalma oranının kontrole göre arttığı tespit edilmiştir.

FGF-2 ve IGF-1 büyüme faktörlerinin tek başına uygulanmasından farklı olarak birlikte kullanıldığında FGF-2+IGF-1 birlikte etki göstererek hücreleri G0/G1 fazında tuttuğu gösterildi. (ŞEKİL 4-1'de de gösterilmiştir.) Bu da NKH karakterinde istenilen bir özelliktir. Hücreler quiescent (uyku) fazında tutularak proliferasyon ve farklılaşma (diferantiasyon) yeteneklerinin baskılanması şeklinde görülebilir. FGF-2'nin diğer büyüme faktörleriyle yapılan kombinasyonlarında ise aynı etki görülmemektedir. Aynı şekilde IGF-1'in MGF'le yaptığı kombine etki de bu düzeyi yakalayamamıştır. BDNF ve EPO tek başına hücreleri G0/G1 fazından çıkarmaktadır.

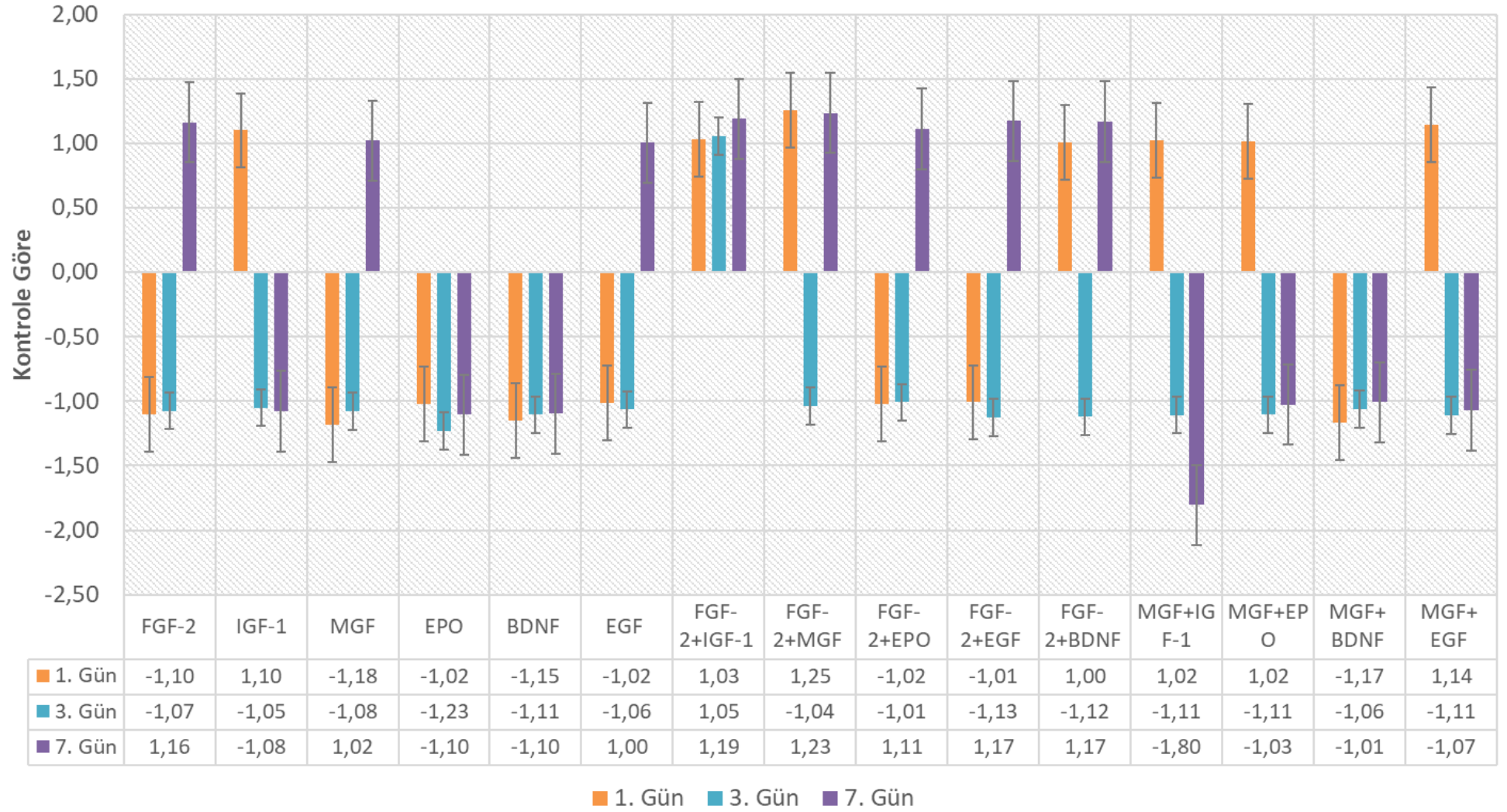
ŞEKİL 4-2’de ki sonuçlar apoptotik faza ait sonuçlardır. Bunlara göre; FGF-2 ve IGF-1 tek başlarına uygulandıklarında tüm zaman dilimlerinde NKH’leri apoptoza yönelmekten kontrole göre bir koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Yine bu deney sonucunda MGF’li hücre grubu 3. günde, EPO’lu hücre grubu 3. ve 7. günde, BDNF’li deney grubu 1. ve 3. günde ve EGF’li deney grubu ise 3. günde apoptotik hücre oranını kontrole göre arttırdığı tespit edilmiştir. Fakat bu büyüme faktörleri FGF-2 ile kombine edilip hücrelere uygulandığında yine belirtilen günlerde apoptotik cevabın değiştiği, apoptotik hücre sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Bu etki MGF ile oluşturulan kombine uygulamada gösterilememiştir.

IGF-1, MGF ve EPO tek uygulandığında her bir zaman dilimi içerisinde NKH’leri mitoz sokarak hücrenin bölünmesine ve farklılaşmasına destek olduğu sonucu elde edilmiştir (ŞEKİL 4-3). Aynı şekilde FGF-2+EGF ve FGF-2+BDNF ve MGF+EPO ve MGF+EGF de zamana bağlı hücrenin mitoz girmesini indüklediği gösterilmiştir. FGF-2 ve BDNF’li deney gruplarında 1. günde hücrelerin kontrole göre mitoz fazında olmadığı görülürken bu büyüme faktörleri birlikte verildiğinde bu sonuç değişmiş ve mitoz fazına yönelim olmuştur.

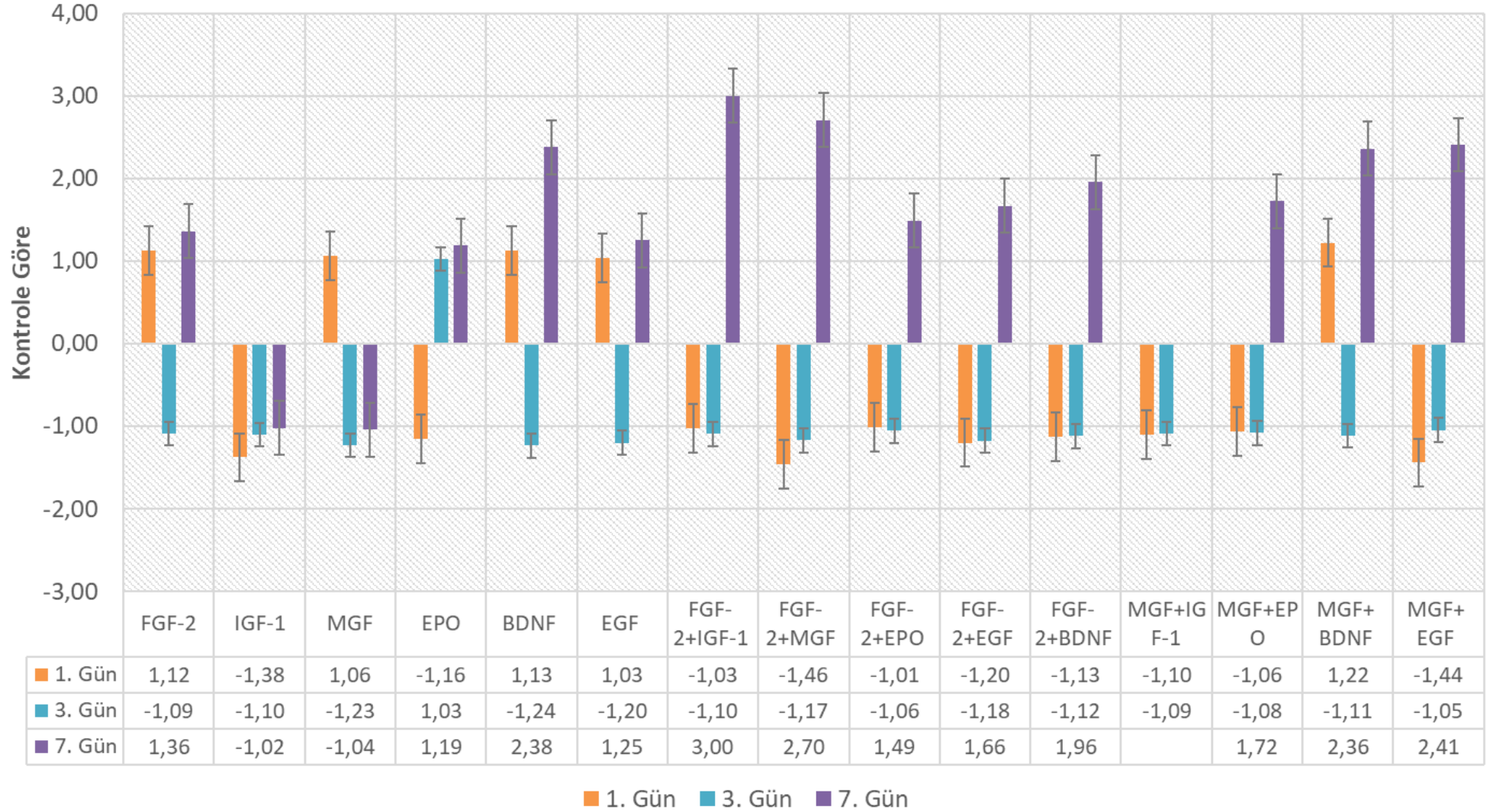
FGF-2’nin kombine uygulamalarının uzun süreli (7 gün) kısımlarında NKH’lerin sentez fazda kontrole göre daha fazla kaldıkları tespit edilmiştir (ŞEKİL 4-4).

G0/G1 Fazı



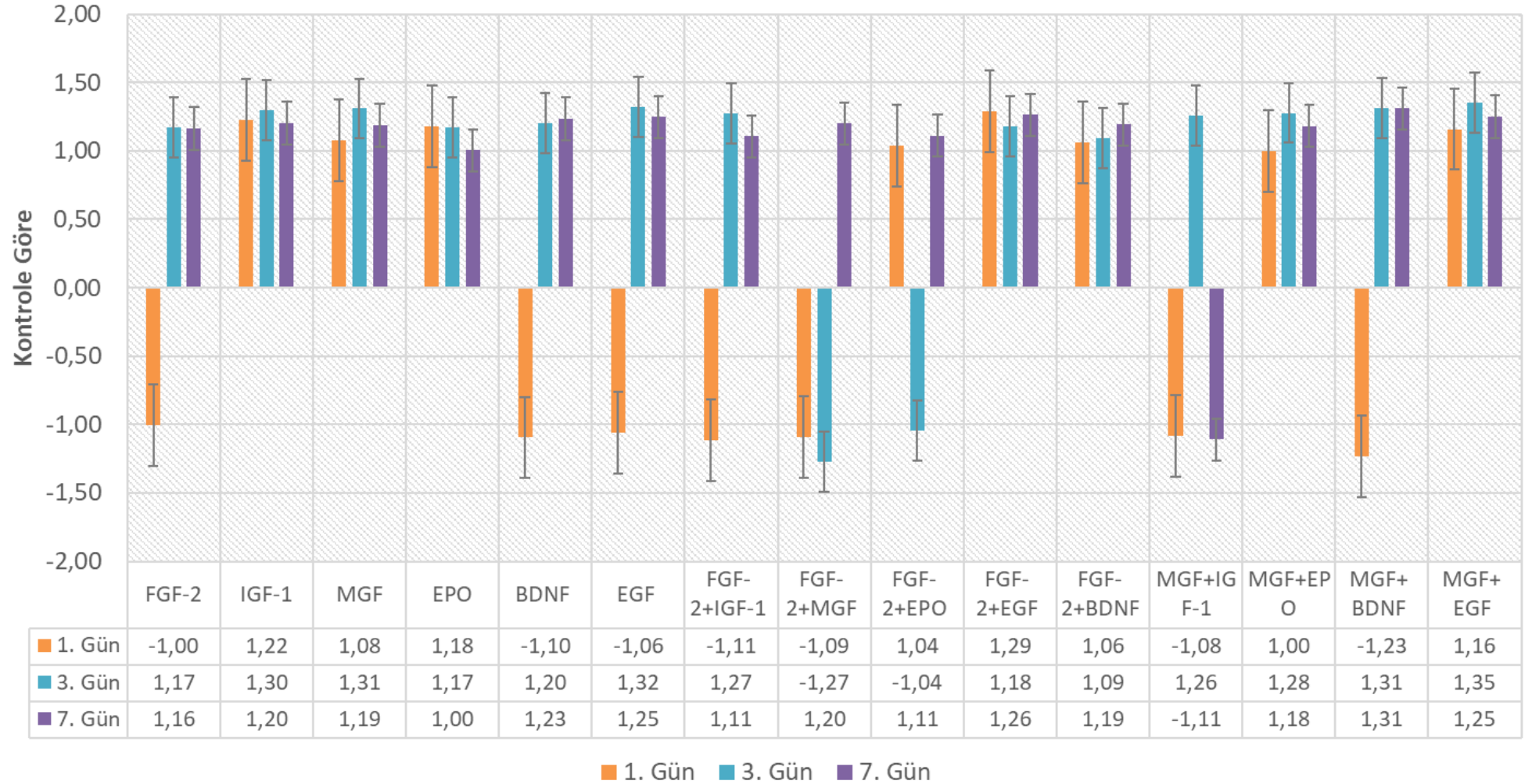
Şekil 4-1: Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları G0/G1 Safhası

S Fazı

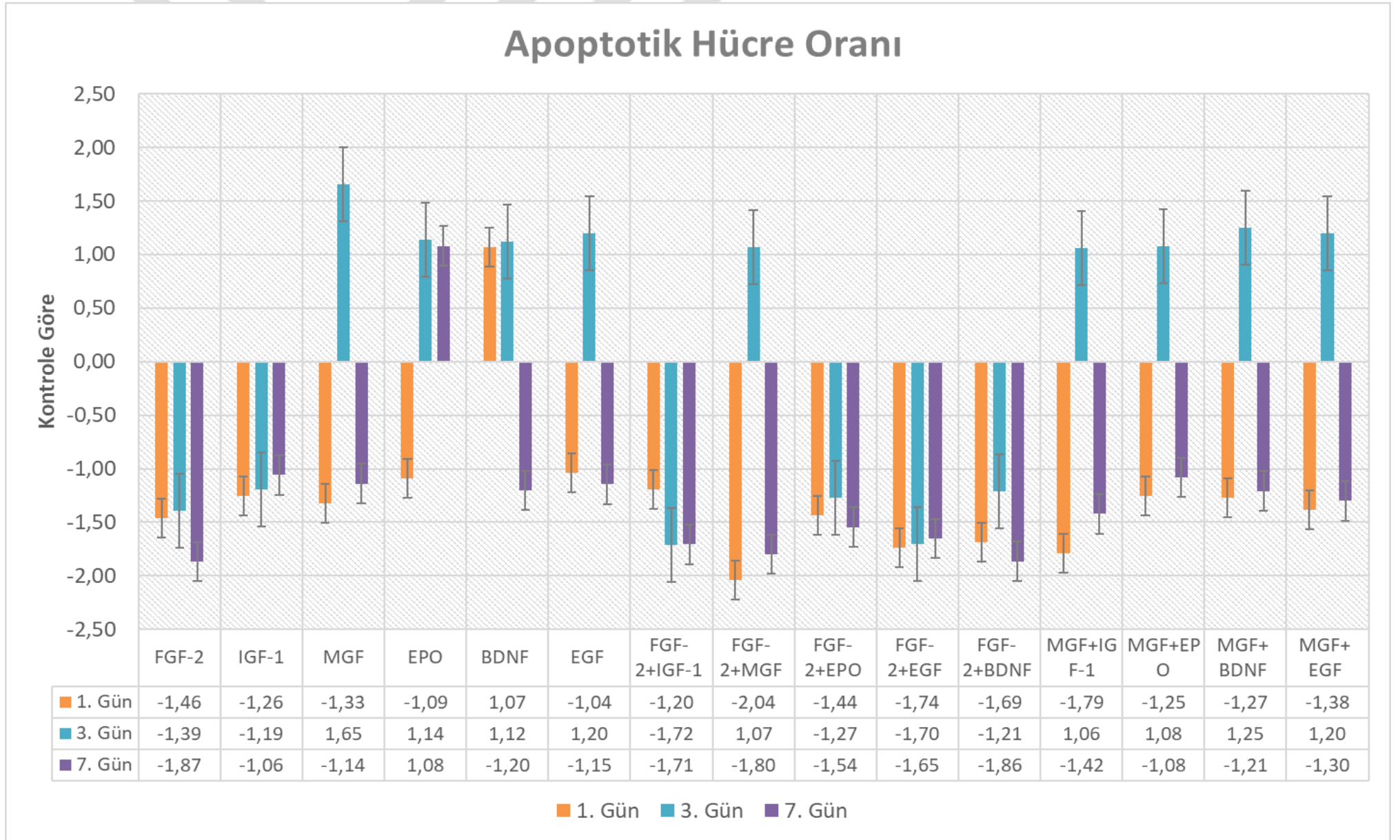


Şekil 4-2: Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları – Sentez Safhası

G2+M Fazı



Şekil 4-3: Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları – G2+M Safhası



Şekil 4-4: Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları – Apoptotik Hücre Sayısı

4.2. Gen Anlatım Sonuçları

4.2.1. GFAP Geni Anlatım Sonuçları

GFAP Geninin GZ-PZR Analiz sonuçları ŞEKİL 4-5'te verilmektedir.

GFAP Geni quiescent (suskun) NKH'lerde yüksek düzeyde ifade edilmektedir. Buradan yola çıkarak GFAP gen anlatım düzeyi yüksek çıkan büyüme faktörlü deneyin sonuçlarında suskun NKH düzeyi yüksektir, yani NKH'lerin aktifleşme sürecinde o büyüme faktörünün etkisi düşüktür denilebilir.

GFAP geni için FGF-2, EGF ve FGF-2+EGF'li hücre kombinasyonlarında ve tüm günlerde kontrole göre baskılanmış -düşük ekspresyon- olduğu tespit edilmiştir. Tüm gün seçenekleri ve diğer büyüme faktörleri içerisinde de en yüksek baskılanma düzeyi FGF-2+EGF kombinasyonunda 1. günde görülmüştür. Bu da FGF-2+EGF'in birlikte etkisinin bu büyüme faktörlerinin tek başına uygulandığı halinden daha fazla NKH'leri aktive ettiğini göstermektedir.

Yine FGF-2 ve MGF büyüme faktörlü örneklerin 1. gününde de bu faktörlerin kombinasyonunun tek tek uygulanmış örneklere göre NKH'lerin aktivasyonunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca GFAP geninde MGF, BDNF ve MGF+IGF'in 1. gündeki azalmış regülasyonunun 3. gün örneklerinde artarak artmış regülasyon olarak değiştiği hesaplanmıştır. Bunun büyüme faktörlerinin aktivasyon üzerindeki etkilerinin daimi sitokin sitümlasyonuna bağlı olduğundan kaynaklı olduğu söylenebilir.

4.2.2. Nestin Geni Anlatım Sonuçları

Nestin Geninin GZ-PZR Analiz sonuçları ŞEKİL 4-6'te verilmektedir.

Nestin Geninin ekspresyon sonuçlarında özellikle FGF-2, IGF-1, MGF, FGF-2+IGF-1 ve FGF-2+MGF örnekleri tutarlı bir şekilde tüm günlerde artmış regülasyon göstermiştir.

Çoğunlukla tüm örneklerde artmış ekspresyon görülmektedir. MGF+BDNF ve MGF+EGF örneklerinde tüm gün seçeneklerinde azalmış ekspresyon görülmektedir.

FGF-2 ve MGF'li deney gruplarında 1. günde artmış ekspresyon görünmekte, BDNF'li örnekte ise yine 1. günde azalmış ekspresyon görülmektedir. FGF-2 ve MGF

büyüme faktörleri BDNF ile kombine edilerek uygulandığında ise her iki örnek de 1. günde azalmış ekspresyon olarak tespit edilmiştir.

4.2.3. DCX geni anlatım sonuçları

DCX Geninin GZ-PZR Analiz sonuçları ŞEKİL 4-7'te verilmektedir.

DCX geninde tüm büyüme faktörü muamelelerinde ilk 24 saatteki sonuçlarda artmış regülasyon tespit edilmiştir.

DCX geninin 1. günü açısından en yüksek upregülasyon oranı MGF+EPO kombinasyonunda tespit edilmiştir. MGF ve EPO'nun tek başlarına muamelesindeki upregülasyon oranını da çokça aştığı için bu kombinasyonun NKH'leri genç nöron halinde bulundurma ve göç etmesi açısından birlikte daha fazla etkilerinin olduğu söylenebilir.

Ayrıca MGF'in tüm diğer kombinasyonları olan MGF+IGF, MGF+BDNF ve MGF+EGF'te de tek başına uygulanan oranlardan çok daha yüksek bir upregülasyon oranı görülmektedir. Bu açıdan MGF'in birlikte kullanıldığı diğer büyüme faktörleri ile birkarşılıklı etki içine girdiği söylenebilir.

DCX geninin 3. gün sonuçlarında ise yalnızca EPO, BDNF, FGF+EPO ve MGF+EGF uygulamalarında upregülasyon görülmekte, bunun da 1. gün sonucuna kıyasla çok daha düşük oranda olduğu görülmektedir.

Bunlar dışındaki DCX geninin tüm büyüme faktörü uygulamaları ve kombinasyonlarında 3. gün sonuçları downregüle olduğunu göstermektedir.

4.2.4. TUBB3 Geni Anlatım Sonuçları

TUBB3 Geninin GZ-PZR Analiz sonuçları ŞEKİL 4-8'te verilmektedir.

TUBB3 geninde de tüm büyüme faktörleri muamelelerinde ilk 24 saatteki sonuçlarda artmış regülasyon tespit edilmiştir.

FGF-2 muamelesi yapılan hücrelerde 1. günde TUBB3 Geni upregüle olmuştur. Burada FGF-2 etkisi ile NKH'lerin olgun nöronlara dönüşme eğilimi olduğu yorumu yapılabilir. Fakat bu değer 3. günde, down regülasyona düşmüş ve bu düşüş 7. günde de devam etmiştir. Bu FGF-2 büyüme faktörünün NKH'leri 1. gündeki olgun nöron

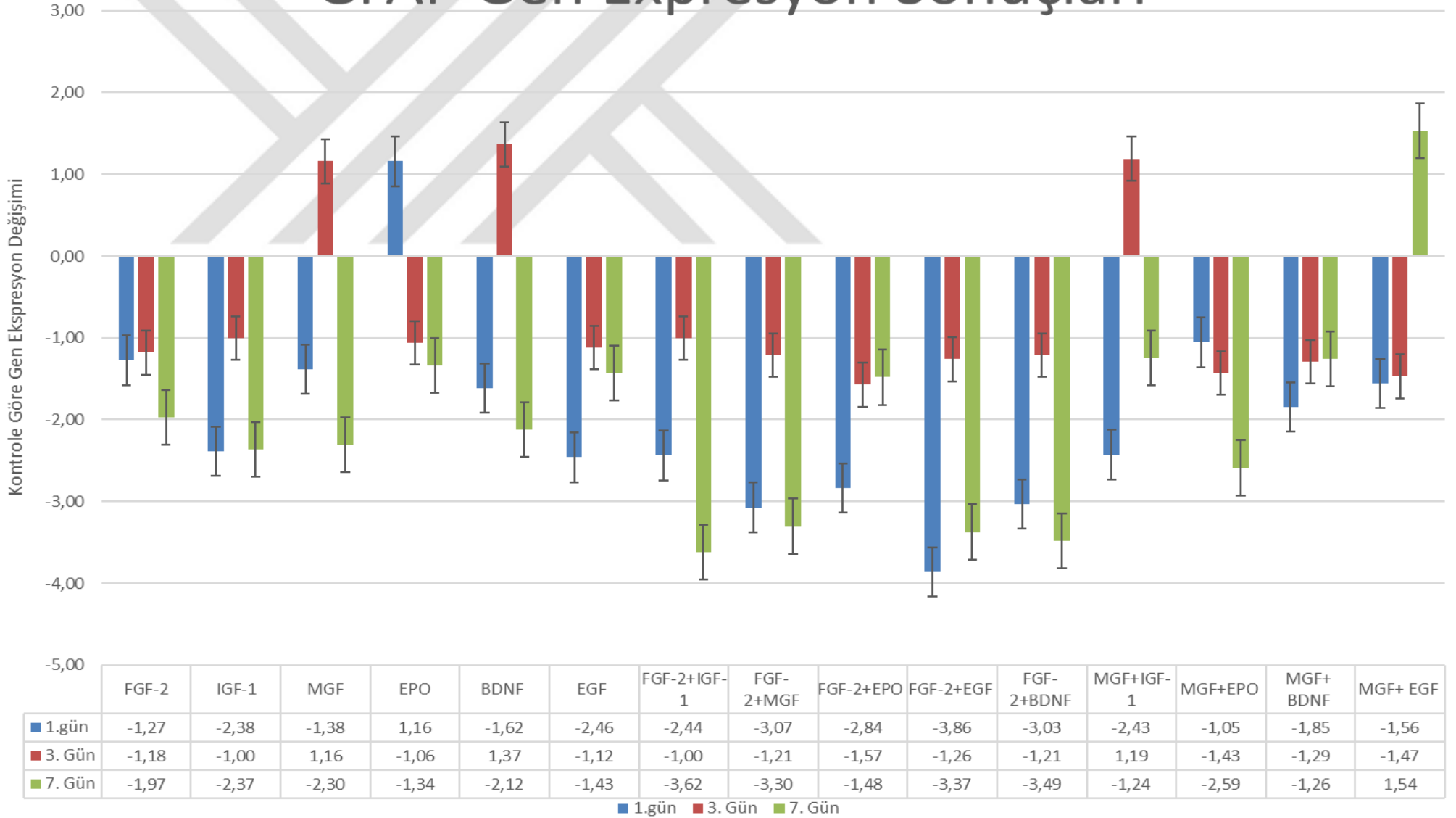
hücrelerine teşvik etmesi potansiyelinin uzun süreli kültürlerde kaybolduğu ve hatta NKH'leri dediferansiyasyona soktuğu düşünülebilir.

Ayrıca FGF-2'li deneylerin bu 3. ve 7. gündeki baskılanmış sonucu EPO ve MGF'li deney gruplarındaki kombinasyonlarda da tespit edilmektedir. Hatta tek başlarına EPO ve MGF'li örnekler tamamen upregüle iken, FGF-2'li örneğin kombine uygulandığı FGF-2+EPO ve FGF-2+MGF kombinasyonlarında 3. ve 7. günlerde tamamen azalmış ekspresyon olduğu görülmüştür.

FGF-2+IGF-1 ve BDNF'li örneklerde TUBB3 geni açısından 3. gün uygulaması incelendiğinde 1. gün değerlerinden daha yüksek bir upregülasyon oranı görülmektedir. Buradan yola çıkarak FGF-2+IGF-1 kombinasyonu ve BDNF uygulamasının NKH'leri uzun süreli kültürde -3. güne kadar- daha çok olgun hücre fazına yönelttiği tespit edilmiştir.

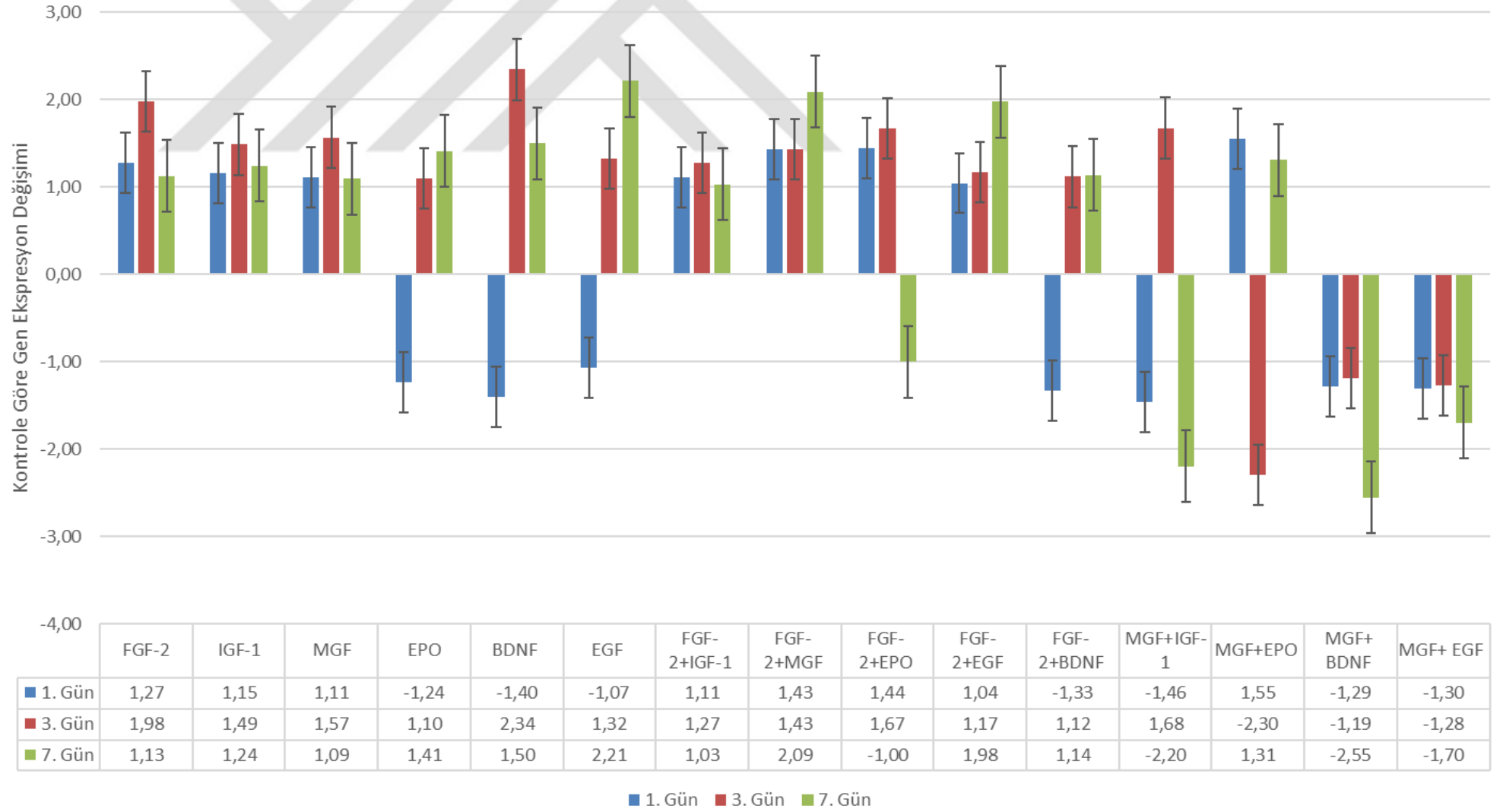
GFAP, Nestin, DCX ve TUBB3 genlerinin anlatım sonuçları heatmap grafiği şeklinde ŞEKİL 4-9'te toplu bir şekilde verilmektedir.

GFAP Gen Ekspresyon Sonuçları



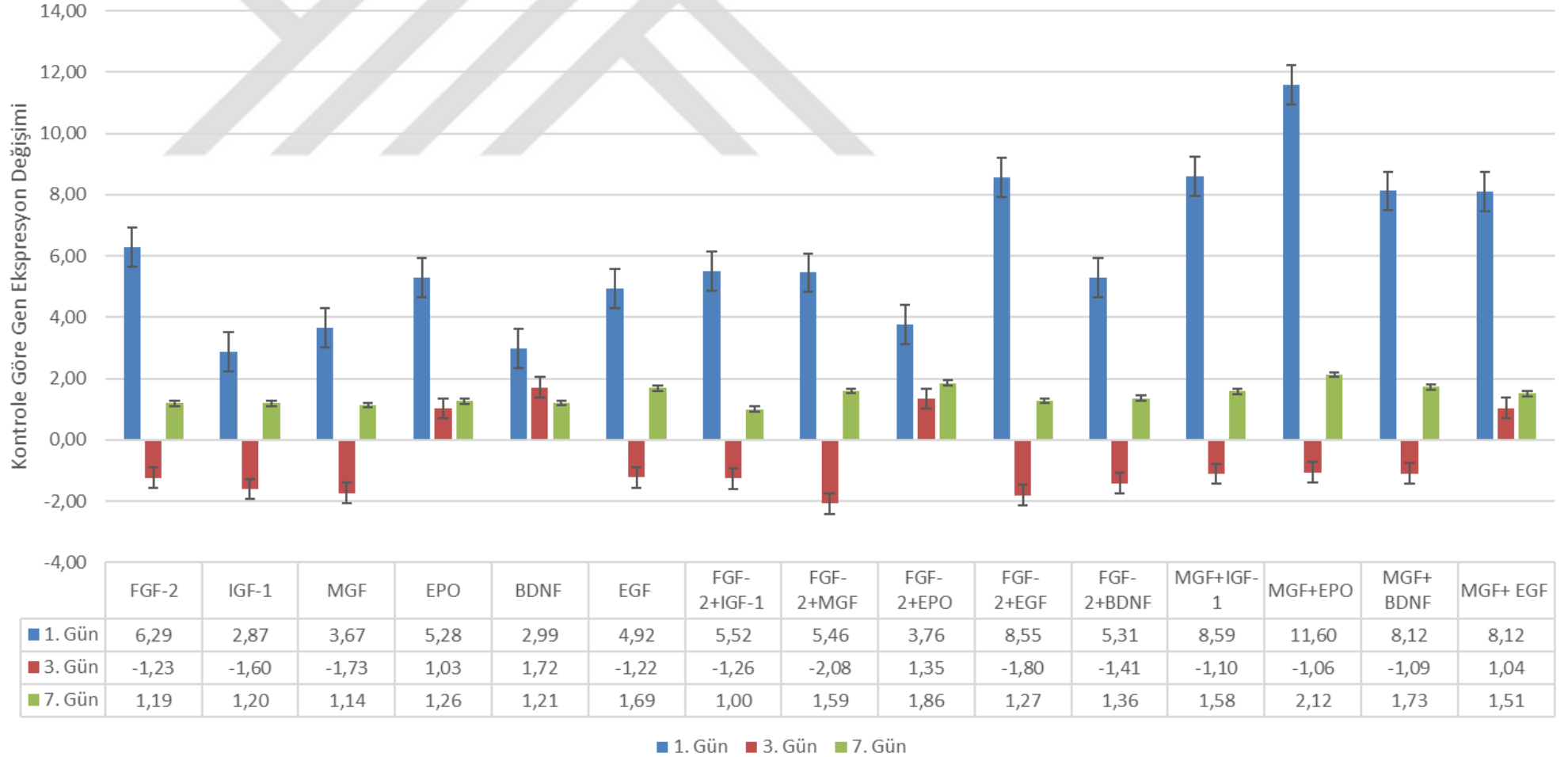
Şekil 4-5: GFAP Geninin GZ-PZR Analiz Sonuçları

NESTIN Geni Expresyon Sonuçları



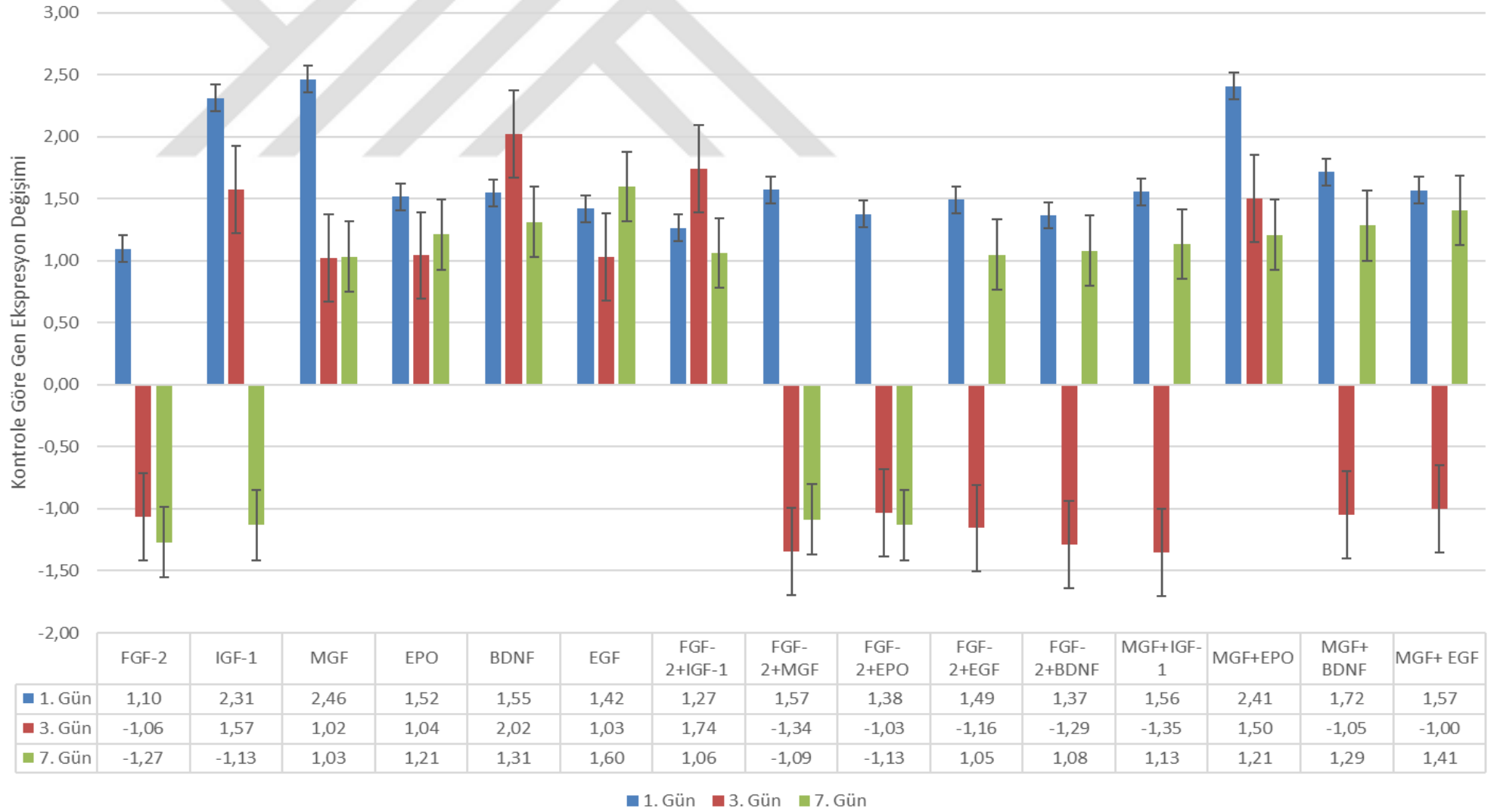
Şekil 4-6: Nestin Geninin GZ-PZR Analiz Sonuçları

DoubleCortin (DCX) Geni Expresyon Sonuçları

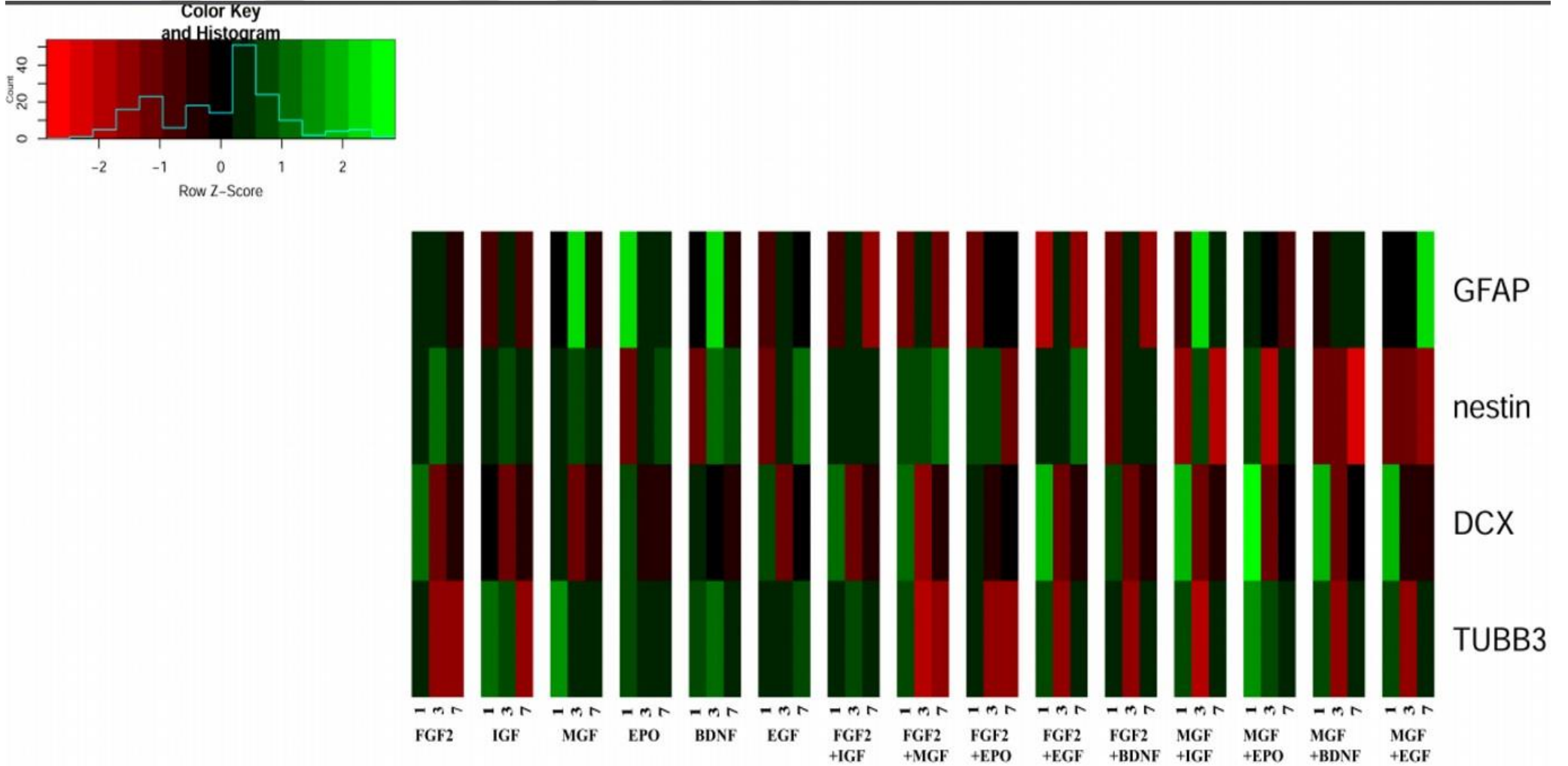


Şekil 4-7: DCX Geninin GZ-PZR Analiz Sonuçları

TUBB3 Geni Expresyon Sonuçları



Şekil 4-8: TUBB3 Geninin GZ-PZR Analiz Sonuçları



Şekil 4-9: GFAP, Nestin, DCX ve TUBB3 Genlerinin GZ-PZR Analizi Sonuçlarının Heatmap Grafiğinde Gösterimi

GFAP; suskun NKH ve astrosit belirteci. Nestin; suskun NKH belirteci (fakat bu gen üzerinde tersini iddia eden tartışmalar da bulunmaktadır). DCX; olgunlaşmaya başlayan ve migrasyon yapabilen genç nöronların belirteci. TUBB3; olgun nöron belirteci.

4.3. Migrasyon değerleri sonuçları

Cell Asic ONIX cihazı ile 3 gün boyunca farklı büyüme faktörleri muamelesine bırakılan hücreler periyodik olarak, 12 saatte bir fotoğraflanarak deney sonunda görsel olarak analizi yapılmıştır. Deney iki tekrarlı olarak yapılmıştır. Aşağıda eklenen sonuçlar 2. tekrar deney grubuna aittir. Normal şartlar Altında cihazın kılavuzunda da yazdığı gibi hücreler deney sonu fotoğraflarda tek tek tespit edilerek yukarı ya da aşağı ilerleme durumlarının incelenmesi planlandı. Fakat deney için bizim kullandığımız hücre hattı olan rat hipocampal NKH'ler nörosfer yapma ve bir araya gelme eğiliminde oldukları için bu durum pek mümkün olmadı. Bunun yerine nörosfer sayıları, büyüklükleri, yoğunlukları ve görsel olarak hücre ve nörosferlerin durumlarına dikkat edildi (145).

Buna göre; herhangi bir büyüme faktörü muamelesi yapılmayan nöral kök hücrelerin bu faktörlerin uygulandığı diğer tüm örneklere göre sayıca daha fazla görünen fakat çok ufak nrosferleri bulunduğu tespit edilmiştir. FGF-2'li havuzdaki nörosferlerin de kontrol örneğinden nörosfer büyüklüğü ve yoğunluğu açısından bariz fark vardır. Fakat en büyük fark MGF'li solüsyonlu bulunan havuzdaki hücrelerde görünmektedir. Nörosferler bir araya gelme eğilimi göstermiş ve büyük nörosferler oluşturmuşlardır. Sonuçlara göre oluşturulan TABLO 4-1'de verilmiştir.

Mann-Withney t testi ile yapılan istatistiksel analiz sonucu 5 mm ve altındaki nörosferlerin olduğu sonuçlarda FGF-2 için p value değeri 0,8457, MGF'li deney için p value değeri >0,9999, FGF-2+MGF için p value değeri >0,9999'tir.

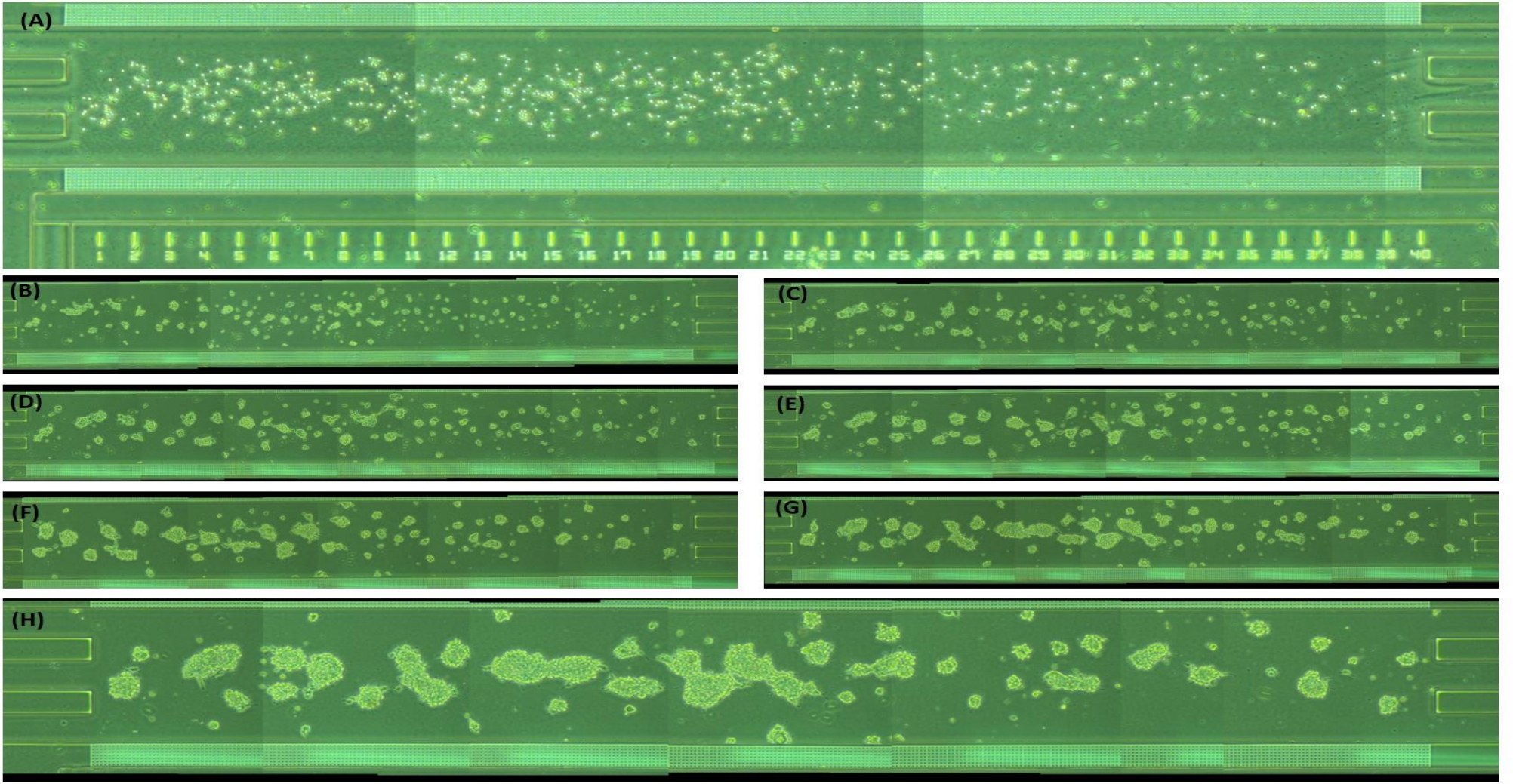
5-10 mm arasındaki nörosferlerin bulunduğu deney sonuçlarında FGF-2 için p value değeri 0,3333, MGF'li deney için p value değeri >0,9999, FGF-2+MGF için p value değeri >0,9999'tir.

10-20 mm arasındaki nörosferlerin bulunduğu deney sonuçlarında FGF-2 için p value değeri >0,9999, MGF'li deney için p value değeri 0,3333, FGF-2+MGF için p value değeri 0,3333'tir.

20 mm ve üstündeki nörosferlerin bulunduğu deney sonuçlarında FGF-2 için p value değeri >0,9999, MGF'li deney için p value değeri >0,9999, FGF-2+MGF için p value değeri >0,9999'tir.

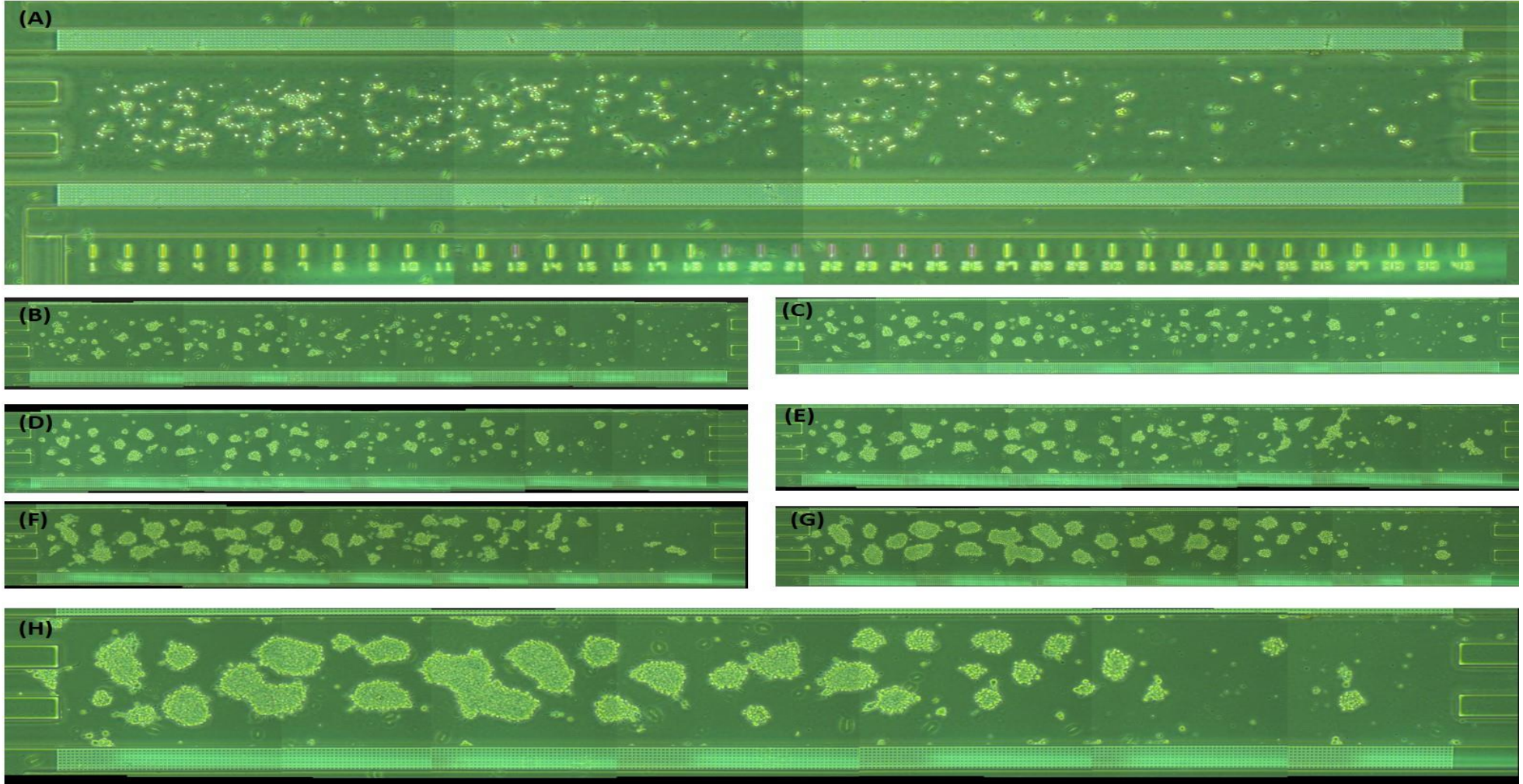
Tablo 4-1: Migrasyon Deneyleri Sonucu Boyutlarına Göre Nörosfer Sayıları

| Boyutlar | Kontrol Örneği | FGF-2 ve Normal Besiyeri | MGF ve Normal Besiyeri | FGF-2+MGF ve Normal Besiyeri |
|--|-----------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 5 mm ve altındaki nörosferler (küçük) | 14 ±4 | 14,5 ±0,5 | 13 ±2 | 14 ±1 |
| 5 – 10 mm arasındaki nörosferler (orta) | 3,5 ±0,5 | 6,5 ±0,5 | 2 ±2 | 5,5 ±3,5 |
| 10-20 mm arasındaki nörosferler (büyük) | 4 ±1 | 3,5 ±0,5 | 1,5 ±0,5 | 1 |
| 20 mm ve üstündeki nörosferler (çok büyük) | 1,5 ±1,5 | 1 | 3 | 2,5 ±0,5 |



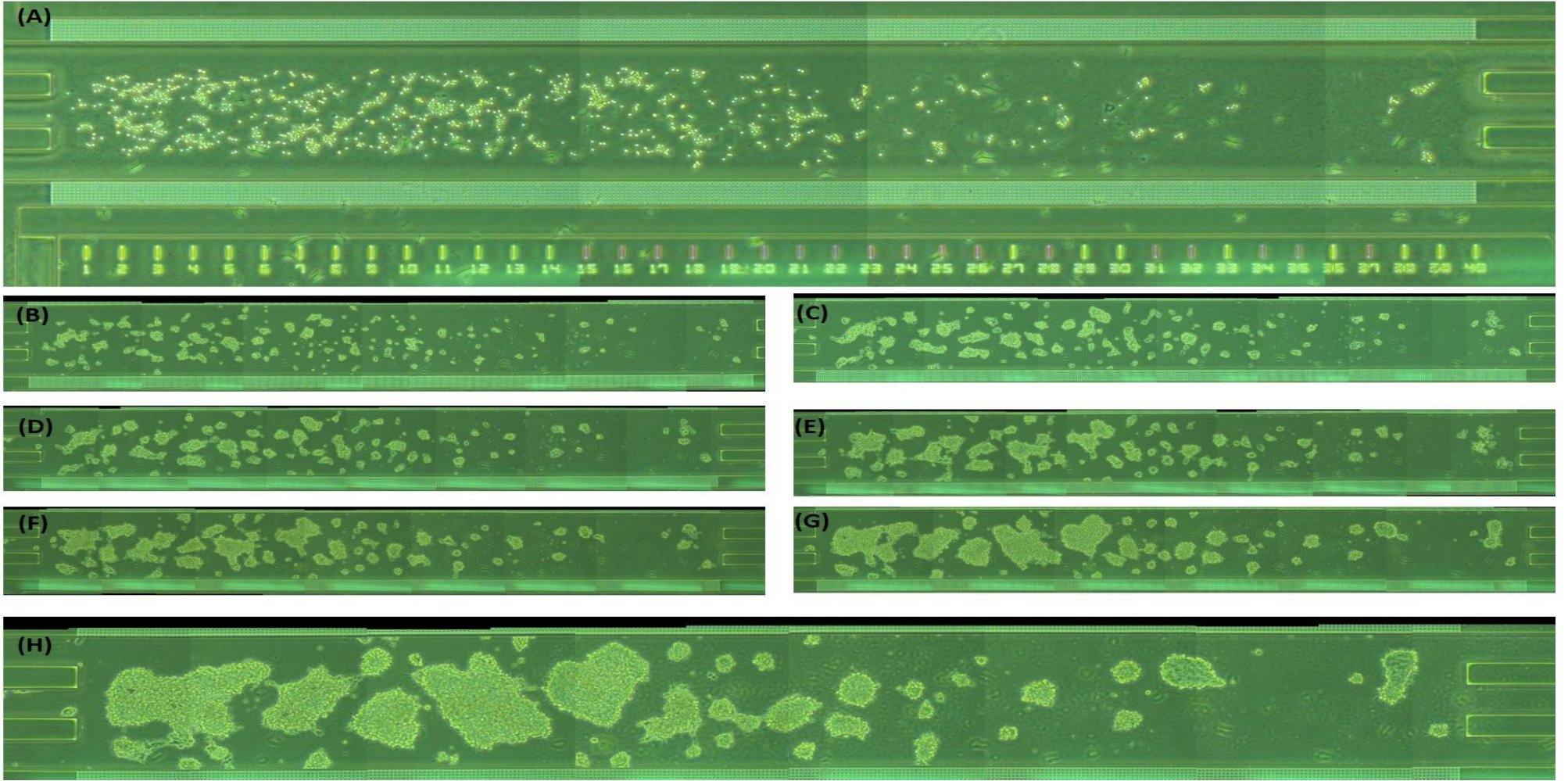
Şekil 4-10: Migrasyon Deneyi Kontrol Örneği.

Bu deney dizaynında plakanın hem üst hem de alt bariyerinden kültür besiyeri verilmiştir. (A) Hücrelerin M04G plakalarına ilk aktarıldığı zamanki görünüm, (B) Deneyin 12. saatindeki görüntüsü, (C) Deneyin 24. saatindeki görüntüsü, (D) Deneyin 36. saatindeki görüntüsü, (E) Deneyin 48. saatindeki görüntüsü, (F) Deneyin 60. saatindeki görüntüsü, (G) Deneyin 72. saatindeki görüntüsü, (H) G Görselinin büyütülmüş hali



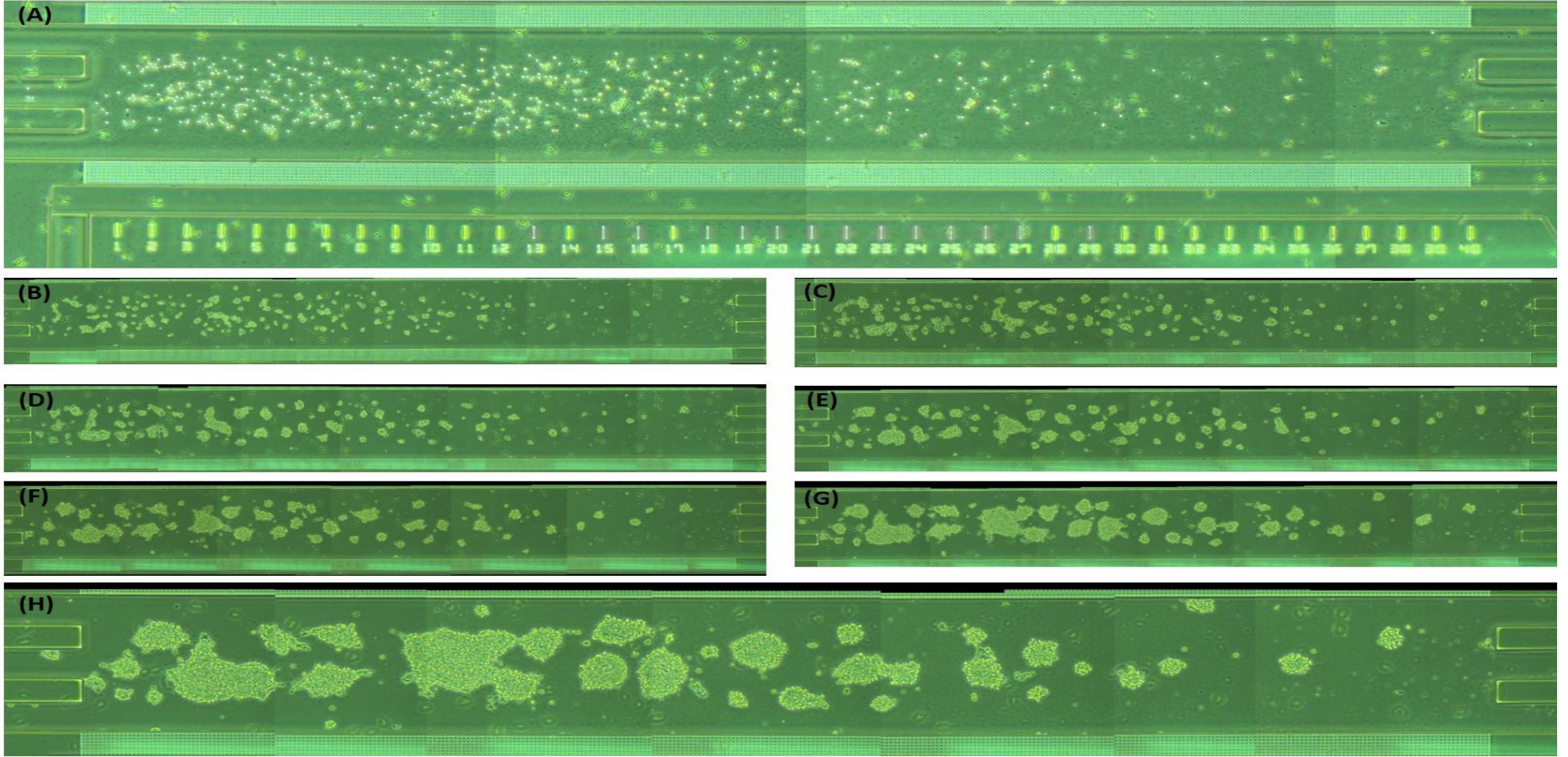
Şekil 4-11: Migrasyon Deneyi - FGF-2 ve Normal Besiyeri Örneği

Bu deney dizaynında plakanın üst bariyerinden FGF-2 büyüme faktörlü besiyeri, alt bariyerinden ise yalnızca normal kültür besiyeri verilmiştir. (A) Hücrelerin M04G plakalarına ilk aktarıldığı zamanki görünüm, (B) Deneyin 12. saatindeki görüntüsü, (C) Deneyin 24. saatindeki görüntüsü, (D) Deneyin 36. saatindeki görüntüsü, (E) Deneyin 48. saatindeki görüntüsü, (F) Deneyin 60. saatindeki görüntüsü, (G) Deneyin 72. saatindeki görüntüsü, (H) G Görselinin büyütülmüş hali



Şekil 4-12: Migrasyon Deneyi - MGF ve Normal Besiyeri Örneği.

Bu deney dizaynında plakanın üst bariyerinden MGF büyüme faktörlü besiyeri, alt bariyerinden ise yalnızca normal kültür besiyeri verilmiştir. (A) Hücrelerin M04G plakalarına ilk aktarıldığı zamanki görünüm, (B) Deneyin 12. saatindeki görüntüsü, (C) Deneyin 24. saatindeki görüntüsü, (D) Deneyin 36. saatindeki görüntüsü, (E) Deneyin 48. saatindeki görüntüsü, (F) Deneyin 60. saatindeki görüntüsü, (G) Deneyin 72. saatindeki görüntüsü, (H) G Görselinin büyütülmüş hali



Şekil 4-13: Migrasyon Deneyi - FGF-2+MGF ve Normal Besiyeri Örneği.

Bu deney dizaynında plakanın üst bariyerinden FGF-2+MGF büyüme faktörlü besiyeri, alt bariyerinden ise yalnızca normal kültür besiyeri verilmiştir. (A) Hücrelerin M04G plakalarına ilk aktarıldığı zamanki görünüm, (B) Deneyin 12. saatindeki görüntüsü, (C) Deneyin 24. saatindeki görüntüsü, (D) Deneyin 36. saatindeki görüntüsü, (E) Deneyin 48. saatindeki görüntüsü, (F) Deneyin 60. saatindeki görüntüsü, (G) Deneyin 72. saatindeki görüntüsü, (H) G Görselfinin büyütülmüş hali.

5. TARTIŞMA

Postnatal beyinde nörogenezin keşfedilmesinden bu yana nöral kök hücrelerin aktivasyon, proliferasyon ve migrasyonunda etkisi olan etmenler çok tartışılmakta, bilim insanları tarafından çok araştırılmaktadır. Buradan yola çıkarak bu projede kurduğumuz hipotez FGF-2, MGF, IGF-1, EPO, EGF ve BDNF'in ve bazı kombinasyonlarının NKH aktivasyon proliferasyon ve migrasyonunda etkisinin olduğu yönünde idi.

Bu hipotezi test etmek için geliştirilen deneysel platformlarda: Rat Hipokampal kökenli NKH'ler hücre kültüründe uygun koşullarda yetiştirildi. TABLO 3-4'de belirtilen büyüme faktörleri tek başlarına ve belirtilen kombinasyonlarda hücrelere uygulandı.

Bu deney dizaynı 3 ayrı zaman diliminde incelenmiştir: 1. gün, 3. gün, ve 7. gün. Ardından bu NKH'lere BrdU eklenerek Akım Ölçer Cihazı ile hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Diğer yandan benzer şekilde yapıla bir diğer deneyden elde edilen hücrelere GZ-PZR yapılarak GFAP, Nestin, DCX ve TUBB3 genlerinin gen ekspresyon değişimleri tespit edilmiştir. Tüm bunların dışında Cell Asic ONIX cihazı ile yalnızca FGF-2, MGF ve FGF-2+MGF büyüme faktörü gruplarının migrasyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Her bir deney iki kere tekrar edilmiştir.

5.1. Aktivasyon Deneyleri

NKH'lerin yer aldıkları rezervuarlarda quiescent -suskun- halde buldukları önceki çalışmalarca elde edilmiş bir bilgidir. Bu suskun haldeki NKH'ler herhangi bir yaralanma anında aktive olup farklılaşarak dejenere olmuş bölgeye göç etmektedirler. Bu aktivasyon aşamasında burada oluşturulan deney düzeneği ile bu aşamada rolleri olduğu düşünülen büyüme faktörleri test edilmiştir.

Hücrelere, hücre kültüründe TABLO 3-4'de belirtilen büyüme faktörleri eklenmiş ve 1. gün, 3. gün ve 7. gündeki değişimleri ölçülmüştür. Bu aşamada astrosit belirteci olduğu bilinen ve quiescent/suskun NKH'ler tarafından ekspresse olan GFAP geninin ürününün PZR yöntemi kullanılarak tayini yapılmıştır.

GFAP geninin ekspresyonu quiescent (suskun) NKH'lerde yüksek düzeyde görülmektedir. Buradan yola çıkarak GFAP gen anlatım düzeyi yüksek çıkan büyüme

faktörü sonuçlarında suskun NKH düzeyi yüksektir, yani NKH'lerin aktifleşme sürecinde o büyüme faktörünün etkisi düşüktür/yoktur denilebilir. GFAP down regülasyon görünmüş ise o büyüme faktörünün nöral kök hücreleri aktive etmekte kontrole göre başarılı olduğu söylenir ve NKH'leri diferansiyasyon fazına soktuğu düşünülür.

Buna göre; GFAP geni için 1. gündeki deney sonuçlarında FGF-2'nin tek başına uygulaması NKH'leri kontrole göre -1.27 kat, IGF-1 -2.38 kat, MGF -1.38 kat ve BDNF ise -1.62 kat NKH aktivasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir.

FGF-2+MGF kombinasyonunun NKH'lerin aktivasyonunda oynadığı rol ise deney sonuçlarında kontrole oranla -3.07 kat fazla çıkmıştır. (Sonuçlardaki down regülasyon hücrelerin aktive olmuş hali ile ilişkilendirilir.) Bu büyüme faktörlerinin yalnız başına uygulamalarının sonuçları (FGF-2: -1.27 kat, MGF: -1.38 kat) düşünüldüğünde bu FGF-2+MGF kombinasyonun NKH'leri aktive etme açısından daha fazla etkili olduğu söylenebilir.

FGF-2+IGF-1 kombinasyonu ise 1. günde NKH'leri kontrole göre -2.44 kat oranında aktive etmiştir. Bu açıdan bu kombinasyonun da FGF-2 (-1.27 kat) ve IGF-1 (-2.38 kat) büyüme faktörlerinin yalnız başına uygulamalarından pozitif yönde bir farkı olduğu tespit edilmiştir. Bu tespit daha önce de literatürde yer alan bilgileri doğrulamaktadır (16,23,45).

En yüksek nöral kök hücre aktivasyon oranı (GFAP gen ekspresyonu açısından down regülasyon) FGF-2+EGF (-3.86 kat) kombinasyonunda tespit edilmiştir. Bu oran aynı zamanda bu büyüme faktörlerinin tek başlarına uygulamalarından (FGF-2: -1.27 kat, EGF: -2.46 kat) daha fazla NKH'leri aktive ettiği tespit edilmiştir.

GFAP ekspresyonunu 1. günde arttırdığı gösterilen tek örnek EPO olmuştur (1.16 kat). Buradan yola çıkarak EPO'nun NKH'leri suskun halde tutmaya yönelttiği yorumu yapılabilir. EPO'nun kombine edildiği FGF-2+EPO (-2.84 kat) ve MGF+EPO (-1.05 kat) kombinasyonlarında ise yine 1. gün açısından bu durumun tersine döndüğü, NKH'leri aktive etme yoluna dönüştüğü görünmüştür. Daha önceki literatür taramalarında EPO'nun nöral kök hücrelere mikroçevre hazırladığına refere edilen çalışmalar düşünüldüğünde, EPO'nun, yanındaki bir diğer büyüme faktörünün etkisini mikroçevre hazırladığı için güçlendirdiği fakat kendisinin tek başına 1. gün açısından NKH aktivasyonunda pek etkisi olmadığı söylenebilir.

FGF-2+BDNF kombinasyonunun NKH'lerin aktivasyonunda oynadığı rol ise deney sonuçlarında kontrole oranla 1. gün -3.03 kat fazla çıkmıştır. Bu büyüme faktörlerinin yalnız başına uygulamalarının sonuçlarını (FGF-2: -1.27 kat, BDNF: -1.62 kat) düşünsek bu kombinasyonun da NKH'leri aktive etmede katkısı fazladır diyebiliriz.

Ayrıca toplamda FGF-2 ile kombine edilen tüm büyüme faktörleri, FGF-2'nin tek başına uygulamasından daha fazla NKH'leri aktivasyon yoluna soktuğu tespit edilmiştir. Bu da FGF-2'nin başka büyüme faktörleri ile kombine uygulandığında tek başına uygulanmasına göre etkisinin NKH'leri aktive etme lehine arttığını göstermektedir.

MGF büyüme faktörü tek başına uygulandığında 1. günde NKH'leri (-1.38 kat) aktive ettiği görünmüştür.

MGF+IGF-1 kombinasyonunda 1. günde bu oran -2.43 kat ile her iki büyüme faktörünün de tek başına uygulamasının üstüne çıkmıştır.

MGF+BDNF kombinasyonu ise 1. günde -1.85 kat kontrole göre NKH'leri aktivasyona yönlendirmiştir.

GFAP geni ekspresyon sonuçlarında bir diğer farklı veri ise 3. günlerdeki MGF, BDNF ve MGF+IGF-1 büyüme faktörü ve/veya kombinasyonlarında yaşanmıştır. MGF büyüme faktörü uygulanmış deneyde 1. gün -1.38 kat kontrole oranla NKH'leri aktive ettiği görülürken 3. günün sonunda burada bir artmış regülasyon olmuş ve 1.16 kat GFAP gen ekspresyonunun arttığı yani NKH aktivasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalma 7. gün yeniden NKH aktivasyonuna dönüşmüştür (-2.30 kat).

Yine BDNF büyüme faktörü uygulanmış 1. gün deneyinde -1.62 kat tespit edilen GFAP gen ekspresyonu 3. gün 1.37'ye çıkmış yani NKH aktivasyonu kontrole göre oldukça azalmıştır. 7. gün deneylerinde bu oranın yeniden -2.12 kat arttığı tespit edilmiştir.

Aynı şekilde MGF+IGF-1 kombinasyonunda da 1. gün deneylerinde -2.43 kat NKH aktivasyonu açısından pozitif etki tespit edilmiş, bu etki 3. gün deneyinde 1.19 kat olmuş yani NKH'lerin suskun faza yöneldiği görülmüş ve 7. günde yeniden -1.24 kat oranına değişmiştir.

Bunun nedeni olarak bu büyüme faktörü ve/veya kombinasyonlarının ilk etki olarak nöral kök hücreleri aktive ettiği fakat bu etkisinin uzun süreli devam etmesi için daimi bir sitokin stimülasyonuna ihtiyaç duyduğu söylenebilir. Hatta uzun vadede (3. gün) bu hücreleri de-diferansiye ettiği yani aktive olmuş NKH'leri yeniden inaktif/susukun faza yönelttiği düşünülebilir. 3. gündeki bu etkiden sonra 7. günde yeniden NKH aktivasyonu üzerinde pozitif etki göstermeleri, öncelikle deney uygulamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çünkü deneyler sırasında büyüme faktörleri hücrelere uygulandıktan sonra (0. saat) ilk deney grubu 24. saatte durdurulmuş, diğer deney grubu (3. gün) 72. saatte durdurulmuş ve analiz edilmiştir. 7. gün deneyleri için ise yaklaşık 72. saatte kültür kaplarındaki besiyeri, taze büyüme faktörlü besiyeri ile yenilenmiştir. Bu sebeple bu ve toplamda tüm deneylerdeki 7. gün sonuçlarını değerlendirirken bu faktörü göz önüne alarak, 7. gün sonuçları için; 1. ve 3. gündeki büyüme faktörü muamelesinin devamı, ve uzun vadedeki etkisi olarak ifade edilmekten kaçınılmıştır. Fakat 7. Gün deneyleri de kendi için iki doz uygulamanın gösterildiği özgün bir deney sonucu oluşturmaktadır.

Gün bazlı değerlendirme de 1. günkü sonuçlarda NKH aktivasyonunda pek etkisi bulunmadığı gösterilen EPO'nun 3. ve 7. gündeki deneylerde NKH aktivasyonu üzerindeki etkisi oluşmaya başlamıştır. Burada EPO'nun uzun süreli kültürde NKH aktivasyonu üzerinde bir etki yaratabildiği sonucu çıkarılabilir.

Bunlar dışında toplamda diğer büyüme faktörleri ve kombinasyonlarında (FGF-2, IGF-1, EGF, FGF-2+IGF-1, FGF-2+MGF, FGF-2+EPO, FGF-2+EGF, FGF-2+BDNF, MGF+BDNF, MGF+EGF) 3. gün GFAP ekspresyon sonuçları 1. Gün sonuçlarına oranla daha düşüktür. Bunun da sebebi olarak bu büyüme faktörlerinin sürekli enjeksiyonunun bu etkileri gösterdiği, tek muamelenin devamlı uzun süreli etkisi olmadığını düşündürmektedir.

Bir tek MGF+EPO (1. gün: -1.05; 3. gün: -1.43 kat; 7. gün: -2.59 kat) kombinasyonu sonuçlarında 1. gün, 3. güne oranla daha çok aktivasyon oranı göstererek devam etmiştir; yine aynı düzende 7. gün de, 3. güne oranla daha çok ekspresyon göstermiştir. EPO'nun tek başına uygulamasının 3. günde NKH'leri aktive etme lehine değiştirdiğini de göz önünde bulundurursak uzun vadede MGF+EPO kombinasyonunda NKH aktivasyonu üzerinde etkisi vardır diyebiliriz.

Nestin geni literatürde üzerinde hala tartışmalar olan, suskun NKH'lerin ekspresyon etmediği yönünde bir görüş birliğine varılamayan bir genidir. Doğrudan antikorları ile çalışma da yüksek lisans tez projesi için maliyeti arttıracığından dolayı üzerine tartışma yapılamamıştır.

5.2. Proliferasyon Deneyleri

Bu aşamada da DCX ve TUBB3 gen ürünlerinin GZ-PZR sonuçları kontrolle kıyaslanarak incelendi. DCX özellikle henüz olgunlaşmaya başlayan genç nöronlar ile migrasyon belirteci olarak kullanılmaktadır. TUBB3 ise olgun nöron hücrelerinin belirteci olarak kullanılmaktadır (146,147).

Hem DCX geni için hem de TUBB3 geni için tüm büyüme faktörlerinin uygulamaları ve kombinasyonlarında ilk 24 saatteki sonuçlarda upregülasyon tespit edilmiştir.

DCX geninin 1. günü açısından en yüksek upregülasyon oranı MGF+EPO (11.60 kat) kombinasyonunda tespit edilmiştir. MGF (3.67 kat) ve EPO'nun (5.28 kat) tek başlarına muamelesindeki upregülasyon oranını da çokça aştığı için bu kombinasyonun NKH'leri genç nöron halinde bulundurma ve migrate etmesi açısından karşılıklı etkileri olduğu söylenebilir. Ayrıca bu sonuç TUBB3 genindeki sonuçlar ile de konfirme edilmektedir. TUBB3 geninde de 1. günde MGF+EPO artmış regülasyon oranı diğer büyüme faktörlerinin içinde en yüksek ikinci sıradadır (2.41 kat). Buradan bu büyüme faktörü kombinasyonunun NKH'leri proliferetme eğiliminde olduğunu ve migrate edip olgun nöron olmaya yönelttiğini söyleyebiliriz.

Ayrıca DCX geninde MGF'in tüm kombinasyonlarında (FGF-2+MGF (5.46 kat), MGF+IGF-1 (8.59 kat), MGF+EPO (11.60 kat), MGF+BDNF (8.12 kat) ve MGF+EGF (8.12 kat)) MGF'in (3.67 kat) tek başına uygulanan oranlarından çok daha yüksek bir upregülasyon oranı görülmektedir. Bu açıdan MGF'in birlikte kullanıldığı diğer büyüme faktörleri ile NKH'leri proliferetme eğiliminde olduğunu ve migrate etmeye yönlendirmesi açısından pozitif yönde bir etki içine girdiği söylenebilir.

Ayrıca yine literatüre yeni geçen bir yayına göre de MGF'in nöral kök hücreleri olgunlaşmaya teşvik ettiği ve genç nöron seviyelerinde tutmaya katkısı olduğu

belirtilmiştir. EPO'nun ise göç eden hücrelere mikroçevre hazırladığı bilgisi ile birlikte düşünüldüğünde bu bulgu da son yayını destekler niteliktedir (148,149).

Sonuçlarımıza göre DCX gen ekspresyon sonuçlarında tüm büyüme faktörü ve kombinasyonlarında 1. günde görülen artmış regülasyon, 3. günde bazı büyüme faktörü ve kombinasyonlarında downregüle olmuştur. Artmış regülasyon devam edenlerde ise bu oran oldukça düşmüştür. FGF-2 (6.29 kat, -1.23 kat), IGF-1 (2.87 kat, -1.60 kat), MGF (3.67 kat, -1.73 kat), EPO (5.28 kat, 1.03 kat), BDNF (2.99 kat, 1.72 kat), EGF (4.92 kat, -1.22 kat), FGF-2+IGF-1 (5.52 kat, -1.26 kat), FGF-2+MGF (5.46 kat, -2.08 kat), FGF-2+EPO (3.76 kat, 1.35 kat), FGF-2+EGF (8.55 kat, -1.80 kat), FGF-2+BDNF (5.31 kat, -1.41 kat), MGF+IGF-1 (8.59 kat, -1.10 kat), MGF+EPO (11.60 kat, -1.06 kat), MGF+BDNF (8.12 kat, -1.09 kat), MGF+EGF (8.12 kat, 1.04 kat) (parantez içinde ilk sırada yazılanlar 1. gün, ikinci sıradakiler ise 3. gün sonuçlarıdır).

Bu sonuçlar 7. günde diğer günlere kıyasla çok ufak bir oranda da olsa yeniden upregüle olarak devam etmiştir. Buna daha önce bahsettiğimiz aradaki besleme neden olmuş olabilir. Böyle bile olsa devamlı büyüme faktörü sitümilasyonunun DCX geni üzerinde ilk gündeki etki kadar etkisi olmadığı görülmektedir.

Birinci gün deneyinde DCX geninde tüm büyüme faktörleri ve kombinasyonları aktivasyona neden olmuştur. Böylelikle bu faktörlerin tamamının ilk 24 saatte aktive olan hücreleri olgun nöron fazı aşamalarından genç nöron fazında tuttuğu /getirdiği ve migrasyon yapma eğiliminde olduğu söylenebilir.

DCX geninin 3. gün sonuçlarında ise yalnızca EPO (5.28 kat; 1.03 kat), BDNF (2.99 kat; 1.72 kat), FGF+EPO (3.76 kat; 1.35 kat) ve MGF+EGF (8.12 kat; 1.04 kat) uygulamalarında upregülasyon görülmekte, onda da 1. gün sonucuna kıyasla çok daha düşük oranda olduğu görülmektedir (parantez içlerinde ilk veri 1. gün, ikinci veri 3. gün verisidir).

Bunlar dışındaki DCX geninin tüm büyüme faktörü uygulamaları ve kombinasyonlarında 3. gün sonuçları downregüle olduğunu göstermektedir. Bu da bize NKH'lerin genç nöron aşamasında kalması, migrasyona uğrayabilmesi için daimi sitokin sitümilasyonunun gerektirdiğini düşündürmektedir.

Bir diğ er ölçülen gen TUBB3 gen ekspresyonudur. TUBB3 olgun nöron belirtecidir.

TUBB3 geni açısından 1. günde FGF-2 (gün bazında sırasıyla 1.10 kat, -1.06 kat, -1.27 kat) muamelesi yapılan hücreler upregüle olmuştur. Burada FGF-2 etkisi ile NKH'lerin olgun nöronlara dönüşme eğilimi olduğu yorumu yapılabilir. Fakat 3. gün bu değ er, down regülasyona düş müş ve bu düş üş 7. günde de devam etmiştir. Bu FGF-2 büyüme faktörünün NKH'leri 1. gündeki olgun nöron hücresine teşvik etmesi potansiyelinin uzun süreli kültürlerde kaybolduğ u ve hatta NKH'leri dediferansiyasyona soktuğ u düşünülebilir.

Ayrıca FGF-2'in bu 3. ve 7. gündeki baskılanmış sonucu FGF-2+EPO (1.38 kat, -1.03 kat, -1.13 kat) ve FGF-2+MGF (1.57 kat, -1.34 kat, -1.09 kat) kombinasyonlarında da tespit edilmektedir. Hatta tek başlarına EPO (1.52 kat, 1.04 kat, 1.21 kat) ve MGF (2.46 kat, 1.02 kat, 1.03 kat) tamamen upregüle iken, FGF-2'nin kombine uygulandığ ı FGF-2+EPO (1.38 kat; -1.03 kat; -1.13 kat) ve FGF-2+MGF (1.57 kat; -1.34 kat; -1.09 kat) kombinasyonlarında 3. ve 7. günlerde tamamen downregüle olduğ u görülmüştür.

GFAP geninin astrositlerin suskun hücrelerin belirteci olduğ u düşünüldüğ ünde MGF (GFAP geni 1. gün: -1.38 kat; 3. gün: 1.16 kat) büyüme faktörlü örnek için 1. gün deneyinde downregüle olan, yani quiescent/suskun halden çıkıp aktive olan NKH'ler 3. günde upregüle olmuştur. Bu sonuç bize 24 saatlik MGF muamelesinde suskun halden çıkıp aktive olan NKH'lerin, 3 günlük kültür süresi boyunca MGF etkisi ile yeniden quiescent hale dönme eğilimi gösterdiğ ini yani dediferansiye olduğunu düşündürmektedir. Bu büyüme faktörü muamelesine maruz kalan örnekler (MGF'li örnekler) (DCX geni için 1. gün: 3.67 kat; 3. gün: -1.73 kat) aynı zamanda DCX geninde 1. günde upregüle iken 3. günde downregüle olmuştur. Bu kurduğ umuz önermeyi güçlendirmektedir.

Yine benzer bir örnek MGF+IGF-1 kombinasyonunda da yaşanmaktadır. Burada MGF+IGF-1 örneğ i 1. günde GFAP geninde downregüle olmuş (GFAP geni için sırasıyla; -2.43 kat, 1.19 kat), aynı şekilde genç nöronların ve aynı zamanda migrasyon belirteci DCX geninde de upregülasyon görülmüştür (DCX geni için sırasıyla; 8.59 kat, -1.10 kat). Ve olgun nöron belirteci TUBB3 geni de aynı oranda 1. gün upregüle olmuştur (MGF+IGF-1 (TUBB3 geni için sırasıyla; 1.56 kat, -1.35 kat). 3. günkü deney

ölçümlerinde GFAP'nin upregüle olduğu, DCX ve TUBB3 genlerinin downregüle olduğu görülmektedir.

TUBB3 geni açısından BDNF ve FGF-2+IGF-1 örneklerinin uygulandığı deneylerde ise TUBB3 upregülasyon oranlarınının 3. günleri örneklerin kendi 1. gün sonuçlarından fazla olduğu görünmüştür burada bu büyüme faktörlerinin muamelesinin nispeten uzun sürede NKH'lerin olgun nöron haline gelmesini teşvik ettiğini düşündürmektedir. Bu örneklerin DCX geni sonuçlarına bakıldığında 3. günde düşüş olduğu görülmektedir. Özellikle FGF-2+IGF-1 örneğinde bu düşüş downregülasyona ilerlemiştir. Bu açıdan bakıldığında özellikle FGF-2+IGF-1 örneğinin NKH'leri olgun nöron fazına daha çok ilerletme eğiliminde olduğu düşünülmektedir.

Olgun nöron belirteci olan TUBB3'te toplamda 1. gün sonuçlarının tüm büyüme faktörleri ve kombinasyonlarının kontrole göre upregüle olduğunu görülmektedir. Yani bu büyüme faktörleri ve kombinasyonlarının uygulanması sonrası 24 saatte olgun nöron yapımına katkı sunmaktadır. Fakat bu upregülasyon oranları DCX'inki kadar yüksek değildir. Buradan bu büyüme faktörlerinin NKH'leri daha çok genç nöron fazında tutma eğilimlerinin fazla olduğu söylenebilir.

5.3. Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları

Apoptozdan koruma, BrdU eklenerek, Akım Sitometri cihazında ölçülerek test edilmiştir. ŞEKİL 4-2'de de görülen kontrole göre değerlendirilen sonuçlara göre; FGF-2 (gün sırasıyla; -1.46 kat, -1.39 kat, -1.87 kat) ve IGF (-1.26 kat, -1.19 kat, -1.06 kat) tek başlarına NKH'ler için apoptoza karşı bir direnç oluşturmaktadırlar.

MGF (-1.33 kat, 1.65 kat, -1.14 kat) ve EGF (-1.04 kat, 1.20 kat, -1.15 kat)'in 3. gün deneylerinde; BDNF'in (1.07 kat, 1.12 kat, -1.20 kat) 1. ve 3. gün deneylerinde; EPO (-1.09 kat, 1.14 kat, 1.08 kat) 'nun ise 3. veya 7. günlerinde apoptotik fazda bir artmış regülasyon görülmüştür. Bu büyüme faktörlerinde belirtilen günlerde hücreleri apoptoza yönelttiği yada nöral kök hücreleri apoptozdan korumadığı yönünden değerlendirilebilir.

Bunun yanında FGF-2; yalnız kullanıldığında upregülasyon gösterdiği tespit edilen EPO, EGF ve BDNF ile birlikte kullanılınca farklı etki göstermiş ve NKH'lerinin apoptozdaki cevabı değişmiş, direnç gelişmiştir. Tüm deney zamanlarında downregüle

olmuş, apoptoza karşı bir koruma geliştirmiştir. (FGF-2+EPO; -1.44 kat, -1.27 kat, -1.54 kat) (FGF-2+EGF; -1.74 kat, -1.70 kat, -1.65 kat), (FGF-2+BDNF; -1.69 kat, -1.21 kat, -1.86 kat). Bu etki MGF ile oluşturulan kombine uygulamada bu şekilde gösterilememiştir.

Fakat MGF kendi içinde ayrı ilginç sonuç göstermiştir. MGF muamesesi olan hücreler 1. gün downregüle olmuş yani kontrole göre ölen hücre sayısının daha az olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu oran 3. gün artmış regülasyon göstermiş yani ontrole oranla MGF uygulanmış NKH'lerdeki apoptotik hücre oranı fazla çıkmıştır. Ardından 7. gün yeniden NKH'lerin apoptozdan korunması yani azalmış regülasyon söz konusudur.

MGF (-1.33 kat, 1.65 kat, -1.14 kat) ile kombine edilen tüm büyüme faktörü kombinasyonlarında FGF-2+MGF (-2.04 kat, 1.07 kat, -1.80 kat), MGF+EPO (-1.25 kat, 1.08 kat, -1.08 kat), MGF+IGF-1 (-1.79 kat, 1.06 kat, -1.42 kat), MGF+BDNF (-1.27 kat, 1.25 kat, -1.21 kat), MGF+EGF (-1.38 kat, 1.20 kat, -1.30 kat) 1. gün down regülasyon, 3. gün up regülasyon ve 7. gün yeniden down regülasyon oranları aynı şekilde gözlemlenmektedir.

En yüksek down regülasyon sonucu FGF-2+MGF kombinasyonunun 1. gününde ortaya çıkmıştır (-2.04 kat). MGF'in birlikte bulunduğu tüm kombinasyonlarda ilk 24 saatte NKH'leri apoptoza karşı koruduğunu söylenebilir. Literatür ile uyumlu bu sonucun devamlı gerçekleşmesi için daimi bir MGF muamelesi gerekli olduğu tespit edilmiştir.

NKH'lerin büyüme faktörleriyle yapılan muamelesi sonucunda hücre döngüsü analizi ile kontrole göre göstermiş olduğu değişimin değerlendirilmesi sonucu (ŞEKİL 4-1) IGF-1'in (G0/G1 fazı için sırasıyla; 1.10 kat; -1.05 kat; -1.08 kat) tek başına uygulamasının G0/G1 safhasında 1. günde upregüle olduğu görülmektedir. G0/G1 fazı hücrelerin uyuklar halde beklediği bir fazdır. Bu sonuçlar IGF-1'in hücreleri senteze ve mitozla yönelmektense hücreleri G0/G1 fazında, uyuklar halde beklettiği hipotezini düşündürmektedir. Aynı şekilde aynı deney dizaynında S fazında 1. güne baktığımızda da IGF-1'in downregüle olduğu görülmektedir. Burdan yola çıkarak IGF-1'in hücreleri daha ziyade uyku fazında tuttuğu diğer sonuç ile de desteklenmektedir.

Ayrıca FGF-2 ve IGF-1 ikili kullanıldığında farklı etki göstererek hücreleri G0/G1 fazında tutar. Hücreler quiescent (uyku) fazında tutularak proliferasyon ve

diferansiyasyona olma yeteneklerinin baskılanması şeklinde görülebilir. FGF-2'nin diğer büyüme faktörü kombinasyonlarında ise aynı etki görülmemektedir. Aynı şekilde IGF-1'in MGF'le yaptığı kombine etki de bu düzeyi yakalayamamıştır.

FGF-2 (-1.10 kat) ve MGF'in (-1.18 kat) uygulandığı deney gruplarının 1.gün sonuçlarında NKH'lerin kontrole göre uyku fazından çıktığı tespit edilmiştir. Fakat bu büyüme faktörlerinin birlikte uygulandığı FGF-2+MGF örneğinde ise bu etkinin terse döndüğü ve bu kombinasyonun 1.25 kat oranında NKH'leri uyku fazında belettiği sonucu elde edilmiştir. Burada bu büyümne faktörlerinin karşılıklı etkisi sonucu bu etki gözlemlenmiştir.

ŞEKİL 4-3'te, yani G2+M fazında ise IGF-1 (1.22 kat, 1.30 kat, 1.20 kat), MGF (1.08 kat, 1.31 kat, 1.19 kat) ve EPO (1.18 kat, 1.17 kat, 1.00 kat) tek uygulandığında uygulanan her bir zaman dilimi içerisinde NKH'leri mitoz sokarak hücrenin bölünmesine ve farklılaşmasına destek olmuşlardır. Aynı şekilde FGF-2+EGF (1.29 kat, 1.18 kat, 1.26 kat) ve FGF-2+BDNF (1.06 kat, 1.09 kat, 1.19 kat) ve MGF+EPO (1.00 kat, 1.28 kat, 1.18 kat) ve MGF+EGF (1.16 kat, 1.35 kat, 1.25 kat) kombinasyonlarında da zamana bağlı kalmaksızın hücrenin mitoz girmesini indüklediği gösterilmiştir.

FGF-2 ve BDNF'in tek başına muamelesinde 1. günde NKH'leri mitoz fazına yönlendirmede kontrole göre etkisiz olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu büyüme faktörlerinin birlikte uygulandığı FGF-2+BDNF örneğinde ise bu etkinin terse döndüğü ve bu kombinasyonun 1.06 kat oranında NKH'leri mitoz indüklediği tespit edilmiştir. Burada bu büyümne faktörlerinin karşılıklı etkisi sonucu bu etki gözlemlenmiştir.

Tüm deneylerde gün ve büyüme faktörü muamelesi kısımları şu şekilde ilerlemiştir; Hücreler 24 saat hiçbir büyüme faktörü eklenmeksizin kültür kaplarında yetiştirilmiştir. Ardından 24. saatte tüm kültür kaplarına belirtilen miktarlarda bu faktörler eklenmiştir. İlk 1. gün deneyi büyüme faktörü eklenmesinin 24. saatinde durdurulup analiz edilmiştir. Ardından 3. gün deneyi için 72. saatte durdurulup analiz edilmiştir. Tam bu 72. saate denk gelen sürede de 7. gün deneyi için hazırlanan kültür kaplarına taze besiyeri ve büyüme faktörü eklenmesi yapılmıştır. Tüm deneyler toplamında 7. gün sonuçlarının bu sebeple analiz aşamasında tam olarak tek enjeksiyonlu uzun süreli kültür açısından tartışması yapılamamaktadır. 3. gün ve 7. gün arasındaki değişim veya benzerliklerin tam olarak bir uzun süreli kültür etkisi ile mi

olduğu yoksa aradaki besi yeri tazelemenin farklı bir etkisinden mi kaynaklandığı tam anlaşılammıştır.

5.4. Migrasyon Deneyleri

Kullanılan CellAsic ONIX cihazı özel plakalar ile çalışan bir cihazdır. Önceki bölümlerde anlatıldığı gibi bu plakalar içerilerinde ince kanallar içerir. Hücreyi bu kanallar vasıtası ile havuza aktardıktan sonra yine başka kanallar yardımı ile de bu havuzda besleme yapılır. Bu besleme üst kanaldan farklı alt kanaldan farklı içerikli besiyerlerini aktarabilmemizi sağlar. Biz de bu deney dizaynında NKH'leri havuza yerleştirdikten sonra birinde üst kanaldan MGF'li medium, alt kanaldan normal medium; ikincisinde üst kanaldan FGF-2'li medium, alt kanaldan normal medium; üçüncüsünde üst kanaldan FGF-2+MGF'li medium, alt kanaldan kontrol mediumu ve sonuncusunda da her iki kanaldan normal medium kontrol grubu olarak akıtmak üzere de 4 deney seti şeklinde planlanmış ve deneyler iki defa tekrar edilmiştir.

Alt ve üst kanallardan farklı besiyerleri akarak ortaya dizilen hücrelerin de deney sonunda hangi yöne hareket etme eğilimi olduğu hücreler tek tek işaretlenerek tespit edileceği planlanmıştı. Fakat, nöral kök hücrelerin nörosferleşme eğiliminde olması nedeniyle tek tek işaretleyerek hücreleri tespit etmenin mümkün olmadığı, hücrelerin bir araya gelerek nörosferler oluşturduğu gözlemlendi. Bu sebeple, nörosferlerin sayısı, büyüklüğü gibi morfolojik özelliklerinden yola çıkarak yorumlama yapılmıştır.

Buna göre; nöral kök hücrelerin herhangi bir büyüme faktörü muamelesi yapılmayan kontrol örneğinin diğer tüm örneklere göre sayıca daha fazla görünen fakat çok ufak nörosferler içerdiği tespit edildi.

Burada yöntem olarak ortalama 5 mm ve altında olan nörosferler küçük nörosfer, 5-10 mm arasındaki nörosferler orta boyutta nörosferler, 10-20 mm (1-2 cm) arasındaki nörosferler büyük nörosferler ve 20 mm (2 cm) üstü nörosferler de çok büyük nörosferler olarak ele alınmıştır. Sonuçlar iki deneylerin sonuçlarının hesaplanıp, ortalamalarının alınması ile elde edilmiştir. Standart sapmalarını da içeren bu sonuçlar tablo olarak da TABLO 4-10'da gösterilmiştir.

FGF-2'li besiyeri içeren havuzda yetişen hücrelerde büyüme faktörsüz besiyeri ile yetişen hücelere göre nörosfer boyutlarının büyüdüğü tespit edilmiştir.

Kontrol örneğinde 14 küçük nörosfer, 3.5 orta, 4 büyük nörosfer bulunurken iki deney arasında ortalama alındığında 1.5 adet kadar çok büyük nörosfer bulunmaktadır.

FGF-2'li havuzda ise 14.5 küçük, 6.5 orta, 3.5 büyük ve 1 çok büyük nörosfer bulunmaktadır.

Özellikle MGF'li kültür örneğinde nörosferlerin birleşme eğilimi daha fazla gösterdiği ve bu nedenle burada bulunan çok büyük saydığımız nörosferlerinde gerçekten büyük oldukları söylenebilir. MGF'li havuzda 13 küçük, 2 orta, 1.5 büyük ve 3 çok büyük nörosfer bulunmaktadır.

FGF-2+MGF solüyonu içeren deneyde de yine büyük hacimli ve çok hücre içeren nörosferler bulunmaktadır. 14 küçük, 5.5 orta, 1 büyük ve 2.5 çok büyük nörosfer vardır.

Fakat en çok MGF'in tek başına uygulandığı deney grubunda görsel açıdan çok büyük nörosferler görülmüştür. MGF'in nörosfer oluşturma yöneliminde daha çok etkisi bulunmaktadır diyebiliriz.

Migrasyon yeteneklerinin kıyaslanmasının hedeflendiği bu deney grubunda migrasyon yeteneklerine dair kaliteli bir veri bulunmadığından bu konuda bir yorum yapmak mümkün olamamıştır.

Sonuç olarak, rezervuarlarında suskun halde bulunan nöral kök hücreleri aktive etmek için özellikle uygulamadan sonraki ilk 24 saatte büyüme faktörlerinin etkili olduğu, fakat bu etkinin zamanla azaldığı tespit edilmiştir. EPO büyüme faktörünün NKH'leri aktive etmede uzun süreli bir pozitif etkisi olduğu, zamanla arttığı tespit edilmiştir. MGF, BDNF ve MGF+IGF-1 kombinasyonu ve büyüme faktörü uygulamalarında nöral kök hücre aktivasyonunun uzun vadede de-diferansiyasyona yöneldiği tespit edilmiştir. Nöral kök hücre proliferasyonu ve migrasyonunda da yine bu büyüme faktörlerinin ilk 24 saatteki etkisinin en fazla olduğu tespit edildi. Toplamda bu büyüme faktörlerinin nöral kök hücreleri olgun nöron fazına yöneltmekteki oranı migrasyona uğrayan genç nöron fazında tutma oranından daha düşük oranda artış ile bulunmuştur. Ayrıca yine bu büyüme faktörlerinin yine akut olara ilk 24 saatteki etkisinin hücreleri apoptoza yöneltmekten koruduğu tespit edilmiştir. Hücre döngüsü açısından da hücreleri uyku fazından çıkardıkları, bu fazdan çıkan hücrelerin ise sentez fazında fazla kalmadan çoğunlula mitozu yöneldiği tespit edilmiştir.

Tüm bu sonuçlar ve tartışmalardan yola çıkarak;

Bu çalışmanın son ayağı olarak gelecekte yapılması planlanan spesifik nöral kök hücre antikorları ile immünohistokimya yöntemleri kullanılarak NKH ve nöral hücelere ait antikörlerin gösterilmesi bölümü yer almaktadır. Ancak belirtilen bu çalışmalar burada uygulanan proje bütçesini çokça aşacağı için tez önerisine dahil edilmemiştir.

Bu çalışmanın ışığında ilerleyen dönemlerde nörodejeneratif fare modelleri tasarlanarak bir in vivo çalışma düşünülmekte, bu vesile ile nörolojik rejenerasyon gerektiren nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik elde edilecek yeni bilgiler hedeflenmektedir. Postnatal dönem rejenerasyon mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için bu çalışmanın sonuçlarından faydalanarak seçilen bazı büyüme faktörleri detaylı olarak incelenebilir, konsantrasyon değişiklikleri bazında da farklılıkları ortaya koyacak deneyler yapılabilir.

İskemi oluşturulmuş hayvan modelleri üzerinde de in vivo olarak bu büyüme faktörleri uygulanarak nöral kök hücre belirteçlerinin incelenmesi tercih edilebilir.

Gelecek dönemde ayrıca kullanılacak büyüme faktörlerinin tek doz uygulamasının kısa ve uzun süreli etkisi, uzun vadedeki sitümilasyonunun farklı dönemler açısından etkisinin karşılıklı değerlendirilmesi planlanarak deney düzenekleri kurulabilir.

Ayrıca migrasyon deneyinin beklenen sonucu vermemesinden dolayı nöral kök hücrelerin migrasyon yeteneklerini yeniden hem in vivo hem in vitro deneylerle desteklenerek tekrarlanması mümkündür.

Bu çalışma ile MGF+IGF-1, MGF+EPO, MGF+BDNF ve MGF+EGF büyüme faktörü kombinasyonlarının literatürde ilk defa nöral kök hücrelerde çalışılmıştır ve bir ilk olma özelliğindedir.

Nörodejeneratif hastalılarda tedavi potansiyeli ve umudu veren bu uygulama canlıda doğal olarak var olan büyüme faktörleri üzerinde çalışıldığı için tedavi sırasında dışarıdan kök hücre gönderimi gibi tedavi yollarından daha güvenilir olacaktır.

Elde ettiğimiz sonuçların gelecekte yapılacak yukarıda bahsedilen çalışmalara alt yapı oluşturarak çok müspet sonuçlar ortaya çıkacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 1996; **271**(5251): 978-981.
2. Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 2006; **7**(3): 179-193.
3. Niu W, Zou Y, Shen C, Zhang CL. Activation of postnatal neural stem cells requires nuclear receptor TLX. *J Neurosci* 2011; **31**(39): 13816-13828.
4. Saha B, Jaber M, Gaillard A. Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair. *Front Cell Neurosci* 2012; **6**: 14.
5. Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, et al. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* 2014; **82**(3): 545-559.
6. Liu YP, Lang BT, Baskaya MK, Dempsey RJ, Vemuganti R. The potential of neural stem cells to repair stroke-induced brain damage. *Acta Neuropathol* 2009; **117**(5): 469-480.
7. Liu XS, Chopp M, Zhang XG, Zhang RL, Buller B, Hozeska-Solgot A, et al. Gene profiles and electrophysiology of doublecortin-expressing cells in the subventricular zone after ischemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2009; **29**(2): 297-307.
8. Wang YZ, Plane JM, Jiang P, Zhou CJ, Deng W. Concise review: Quiescent and active states of endogenous adult neural stem cells: identification and characterization. *Stem Cells* 2011; **29**(6): 907-912.
9. Wang Y, Yin X, Rosen G, Gabel L, Guadiana SM, Sarkisian MR, et al. Dcdc2 knockout mice display exacerbated developmental disruptions following knockdown of doublecortin. *Neuroscience* 2011; **190**: 398-408.
10. Li L, Harms KM, Ventura PB, Lagace DC, Eisch AJ, Cunningham LA. Focal cerebral ischemia induces a multilineage cyrogenic response from adult subventricular zone that is predominantly gliogenic. *Glia* 2010; **58**(13): 1610-1619.
11. Türeyen K, Vemuganti R, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. *Neurosurgery* 2005; **57**(6): 1254-1263; discussion 1254-1263.
12. Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, Okano H, Sawamoto K. Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone. *Neurosci Lett* 2006; **403**(1-2): 63-67.
13. Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. *J Comp Neurol* 2009; **515**(1): 125-144.
14. Bath KG, Lee FS. Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Neurobiol* 2010; **70**(5): 339-349.
15. Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 2007; **38**(7): 2165-2172.

16. Choi KC, Yoo DS, Cho KS, Huh PW, Kim DS, Park CK. Effect of single growth factor and growth factor combinations on differentiation of neural stem cells. *J Korean Neurosurg Soc* 2008; **44**(6): 375-381.
17. Fletcher L, Kohli S, Sprague SM, Scranton RA, Lipton SA, Parra A, ve ark. Intranasal delivery of erythropoietin plus insulin-like growth factor-I for acute neuroprotection in stroke. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 2009; **111**(1): 164-170.
18. Kumral A, Tüzün F, Oner MG, Genç S, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin in neonatal brain protection: the past, the present and the future. *Brain Dev* 2011; **33**(8): 632-643.
19. Lin S, Fan LW, Pang Y, Rhodes PG, Mitchell HJ, Cai Z. IGF-1 protects oligodendrocyte progenitor cells and improves neurological functions following cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res* 2005; **1063**(1): 15-26.
20. Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor actions during development of neural stem cells and progenitors in the central nervous system. *J Neurosci Res* 2006; **83**(1): 1-6.
21. Supeno NE, Pati S, Hadi RA, Ghani AR, Mustafa Z, Abdullah JM, ve ark. IGF-1 acts as controlling switch for long-term proliferation and maintenance of EGF/FGF-responsive striatal neural stem cells. *Int J Med Sci* 2013; **10**(5): 522-531.
22. Zhu W, Fan Y, Frenzel T, Gasmi M, Bartus RT, Young WL, ve ark. Insulin growth factor-1 gene transfer enhances neurovascular remodeling and improves long-term stroke outcome in mice. *Stroke* 2008; **39**(4): 1254-1261.
23. Kalluri HS, Dempsey RJ. Growth factors, stem cells, and stroke. *Neurosurg Focus* 2008; **24**(3-4): E14.
24. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 435-462.
25. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 387-403.
26. Weiner LP. Definitions and criteria for stem cells. *Methods Mol Biol* 2008; **438**: 3-8.
27. Ramón Y Cajal S. Degeneration & regeneration of the nervous system. *Oxford University Press* 1928; **1**, **396**; **2**, **369-769**.
28. ALTMAN J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 1962; **135**(3509): 1127-1128.
29. ALTMAN J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 1963; **145**: 573-591.
30. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965; **124**(3): 319-335.
31. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1969; **137**(4): 433-457.
32. Paton JA, Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 1984; **225**(4666): 1046-1048.
33. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; **255**(5052): 1707-1710.

34. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(18): 8591-8595.
35. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, ve ark. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; **4**(11): 1313-1317.
36. Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**(8): 2390-2394.
37. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *The New England journal of medicine* 2005; **353**(8): 811-822.
38. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996; **16**(6): 2027-2033.
39. Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Nilsen J, Rhee J, Zhou M, ve ark. Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nature neuroscience* 1999; **2**(3): 246-253.
40. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(20): 11619-11624.
41. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 1992; **12**(11): 4565-4574.
42. Wang Y, Jin K, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, ve ark. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res* 2007; **85**(4): 740-747.
43. Horita Y, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *J Neurosci Res* 2006; **84**(7): 1495-1504.
44. Yan YP, Sailor KA, Vemuganti R, Dempsey RJ. Insulin-like growth factor-1 is an endogenous mediator of focal ischemia-induced neural progenitor proliferation. *Eur J Neurosci* 2006; **24**(1): 45-54.
45. Frederick TJ, Wood TL. IGF-I and FGF-2 coordinately enhance cyclin D1 and cyclin E-cdk2 association and activity to promote G1 progression in oligodendrocyte progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 2004; **25**(3): 480-492.
46. Le Roith D. The insulin-like growth factor system. *Experimental diabetes research* 2003; **4**(4): 205-212.
47. Goldspink G. Research on mechano growth factor: its potential for optimising physical training as well as misuse in doping. *British journal of sports medicine* 2005; **39**(11): 787-788; discussion 787-788.
48. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circulation research* 2000; **86**(2): 125-130.
49. Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of biological chemistry* 1997; **272**(1): 154-161.
50. Yang S, Alnaqeeb M, Simpson H, Goldspink G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *Journal of muscle research and cell motility* 1996; **17**(4): 487-495.

51. Dluzniewska J, Sarnowska A, Beresewicz M, Johnson I, Srai SK, Ramesh B, ve ark. A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005; **19**(13): 1896-1898.
52. Ates K, Yang SY, Orrell RW, Sinanan AC, Simons P, Solomon A, ve ark. The IGF-I splice variant MGF increases progenitor cells in ALS, dystrophic, and normal muscle. *FEBS Lett* 2007; **581**(14): 2727-2732.
53. Stavropoulou A, Halapas A, Sourla A, Philippou A, Papageorgiou E, Papalois A, ve ark. IGF-1 expression in infarcted myocardium and MGF E peptide actions in rat cardiomyocytes in vitro. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 2009; **15**(5-6): 127-135.
54. Gorecki DC, Beresewicz M, Zablocka B. Neuroprotective effects of short peptides derived from the Insulin-like growth factor 1. *Neurochemistry international* 2007; **51**(8): 451-458.
55. Beresewicz M, Majewska M, Makarewicz D, Vayro S, Zablocka B, Gorecki DC. Changes in the expression of insulin-like growth factor 1 variants in the postnatal brain development and in neonatal hypoxia-ischaemia. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2010; **28**(1): 91-97.
56. Matheny RW, Jr., Nindl BC, Adamo ML. Minireview: Mechano-growth factor: a putative product of IGF-I gene expression involved in tissue repair and regeneration. *Endocrinology* 2010; **151**(3): 865-875.
57. Hill M, Goldspink G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *The Journal of physiology* 2003; **549**(Pt 2): 409-418.
58. Hill M, Wernig A, Goldspink G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *Journal of anatomy* 2003; **203**(1): 89-99.
59. Mills P, Lafreniere JF, Benabdallah BF, El Fahime el M, Tremblay JP. A new pro-migratory activity on human myogenic precursor cells for a synthetic peptide within the E domain of the mechano growth factor. *Experimental cell research* 2007; **313**(3): 527-537.
60. Kandalla PK, Goldspink G, Butler-Browne G, Mouly V. Mechano Growth Factor E peptide (MGF-E), derived from an isoform of IGF-1, activates human muscle progenitor cells and induces an increase in their fusion potential at different ages. *Mechanisms of ageing and development* 2011; **132**(4): 154-162.
61. Peng Q, Qiu J, Sun J, Yang L, Zhang B, Wang Y. The nuclear localization of MGF receptor in osteoblasts under mechanical stimulation. *Molecular and cellular biochemistry* 2012; **369**(1-2): 147-156.
62. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *The Journal of cell biology* 2003; **160**(6): 909-918.
63. Collins JM, Goldspink PH, Russell B. Migration and proliferation of human mesenchymal stem cells is stimulated by different regions of the mechano-growth factor prohormone. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2010; **49**(6): 1042-1045.
64. Komitova M, Zhao LR, Gido G, Johansson BB, Eriksson P. Postischemic exercise attenuates whereas enriched environment has certain enhancing effects

- on lesion-induced subventricular zone activation in the adult rat. *Eur J Neurosci* 2005; **21**(9): 2397-2405.
65. Lee SH, Kim YH, Kim YJ, Yoon BW. Enforced physical training promotes neurogenesis in the subgranular zone after focal cerebral ischemia. *Journal of the neurological sciences* 2008; **269**(1-2): 54-61.
 66. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome biology* 2001; **2**(3): Reviews3005.
 67. Baird A, Klagsbrun M. The Fibroblast Growth Factor Family An Overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991; **638**(1): xi-xii.
 68. Baird A, Walicke PA. Fibroblast growth factors. *British medical bulletin* 1989; **45**(2): 438-452.
 69. Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A, Bohlent P. Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-Sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**(22): 6963-6967.
 70. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Fibroblast growth factor. *Molecular and cellular endocrinology* 1986; **46**(3): 187-204.
 71. Santiago FS, Lowe HC, Day FL, Chesterman CN, Khachigian LM. Early growth response factor-1 induction by injury is triggered by release and paracrine activation by fibroblast growth factor-2. *The American journal of pathology* 1999; **154**(3): 937-944.
 72. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine reviews* 1997; **18**(1): 26-45.
 73. Oldendorf WH. Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Res* 1970; **24**(2): 372-376.
 74. Perez JA, Clinton SM, Turner CA, Watson SJ, Akil H. A new role for FGF2 as an endogenous inhibitor of anxiety. *J Neurosci* 2009; **29**(19): 6379-6387.
 75. Huebers HA, Finch CA. The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiological reviews* 1987; **67**(2): 520-582.
 76. Zechel S, Werner S, Unsicker K, von Bohlen und Halbach O. Expression and functions of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in hippocampal formation. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 2010; **16**(4): 357-373.
 77. Haller MF, Saltzman WM. Nerve growth factor delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 1998; **53**(1-3): 1-6.
 78. Fisher M, Meadows ME, Do T, Weise J, Trubetskoy V, Charette M, et al. Delayed treatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1995; **15**(6): 953-959.
 79. Tabata Y, Nagano A, Ikada Y. Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue engineering* 1999; **5**(2): 127-138.
 80. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006; **117**(3): 583-589.
 81. Metsis M, Timmusk T, Arenas E, Persson H. Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**(19): 8802-8806.

82. Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, ve ark. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 1993; **10**(3): 475-489.
83. Pezet S, Malcangio M, McMahon SB. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain research. Brain research reviews* 2002; **40**(1-3): 240-249.
84. Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, ve ark. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 2006; **24**(7): 1850-1856.
85. Horch HW. Local effects of BDNF on dendritic growth. *Reviews in the neurosciences* 2004; **15**(2): 117-129.
86. Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *The EMBO journal* 1990; **9**(8): 2459-2464.
87. Merighi A, Carmignoto G, Gobbo S, Lossi L, Salio C, Vergnano AM, ve ark. Neurotrophins in spinal cord nociceptive pathways. *Progress in brain research* 2004; **146**: 291-321.
88. Zhou XF, Rush RA. Endogenous brain-derived neurotrophic factor is anterogradely transported in primary sensory neurons. *Neuroscience* 1996; **74**(4): 945-953.
89. Pinto R, Frias B, Allen S, Dawbarn D, McMahon SB, Cruz F, ve ark. Sequestration of brain derived nerve factor by intravenous delivery of TrkB-Ig2 reduces bladder overactivity and noxious input in animals with chronic cystitis. *Neuroscience* 2010; **166**(3): 907-916.
90. Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 2006; **27 Suppl 1**: S1-7.
91. Gielen A, Khademi M, Muhallab S, Olsson T, Piehl F. Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Scandinavian journal of immunology* 2003; **57**(5): 493-497.
92. Voineskos AN, Lerch JP, Felsky D, Shaikh S, Rajji TK, Miranda D, ve ark. The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and prediction of neural risk for Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry* 2011; **68**(2): 198-206.
93. Sandhya VK, Raju R, Verma R, Advani J, Sharma R, Radhakrishnan A, ve ark. A network map of BDNF/TRKB and BDNF/p75NTR signaling system. *Journal of cell communication and signaling* 2013; **7**(4): 301-307.
94. Koury MJ, Bondurant MC. The molecular mechanism of erythropoietin action. *European journal of biochemistry* 1992; **210**(3): 649-663.
95. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Critical reviews in oncology/hematology* 2007; **64**(2): 159-171.
96. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, ve ark. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* 2002; **22**(23): 10291-10301.
97. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, ve ark. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in

- mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1999; **19**(6): 643-651.
98. McPherson RJ, Juul SE. Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2008; **26**(1): 103-111.
 99. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *The Journal of biological chemistry* 1962; **237**: 1555-1562.
 100. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annual review of biochemistry* 1979; **48**: 193-216.
 101. Peng H, Wen TC, Tanaka J, Maeda N, Matsuda S, Desaki J, ve ark. Epidermal growth factor protects neuronal cells in vivo and in vitro against transient forebrain ischemia- and free radical-induced injuries. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1998; **18**(4): 349-360.
 102. Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Developmental biology* 1965; **12**(3): 394-407.
 103. Starkey RH, Cohen S, Orth DN. Epidermal growth factor: identification of a new hormone in human urine. *Science* 1975; **189**(4205): 800-802.
 104. Savage CR, Jr., Cohen S. Epidermal growth factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *The Journal of biological chemistry* 1972; **247**(23): 7609-7611.
 105. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annual review of biochemistry* 1987; **56**: 881-914.
 106. Zeineldin R, Hudson LG. Epithelial cell migration in response to epidermal growth factor. *Methods Mol Biol* 2006; **327**: 147-158.
 107. Kaser MR, Lakshmanan J, Fisher DA. Comparison between epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and EGF receptor levels in regions of adult rat brain. *Brain research. Molecular brain research* 1992; **16**(3-4): 316-322.
 108. Ferrer I, Alcantara S, Ballabriga J, Olive M, Blanco R, Rivera R, ve ark. Transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) and epidermal growth factor-receptor (EGF-R) immunoreactivity in normal and pathologic brain. *Progress in neurobiology* 1996; **49**(2): 99-123.
 109. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, ve ark. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(25): 11879-11883.
 110. Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, ve ark. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 1996; **16**(3): 1091-1100.
 111. Baldauf K, Reymann KG. Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. *Brain Res* 2005; **1056**(2): 158-167.
 112. Bonaguidi MA, Song J, Ming GL, Song H. A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Current opinion in neurobiology* 2012; **22**(5): 754-761.

113. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 2011; **70**(4): 687-702.
114. Dennis K, Uittenbogaard M, Chiaramello A, Moody SA. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat neuron-specific Class III beta-tubulin gene. *Gene* 2002; **294**(1-2): 269-277.
115. Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 1985; **5**(12): 3310-3328.
116. Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *Journal of cell science* 1992; **103** (Pt 2): 589-597.
117. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990; **60**(4): 585-595.
118. He YD, Zeng JS, Yu J, He MX, Cui CM, Zhao Z, et al. [EphB2-Fc promotes activation of endogenous neural stem cells after cerebral cortex infarction: experimental with hypertensive rats]. *Zhonghua yi xue za zhi* 2005; **85**(34): 2395-2399.
119. Chen J, Boyle S, Zhao M, Su W, Takahashi K, Davis L, et al. Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006; **17**(5): 1283-1291.
120. Xue XJ, Yuan XB. Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 2010; **45**(1): 26-36.
121. Yamamoto A, Shofuda T, Islam MO, Nakamura Y, Yamasaki M, Okano H, et al. ABCB1 is predominantly expressed in human fetal neural stem/progenitor cells at an early development stage. *J Neurosci Res* 2009; **87**(12): 2615-2623.
122. Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, et al. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells* 2010; **28**(12): 2162-2171.
123. Liu Z, Martin LJ. Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol* 2003; **459**(4): 368-391.
124. Li R, Johnson AB, Salomons G, Goldman JE, Naidu S, Quinlan R, et al. Glial fibrillary acidic protein mutations in infantile, juvenile, and adult forms of Alexander disease. *Annals of neurology* 2005; **57**(3): 310-326.
125. Bendotti C, Tortarolo M, Suchak SK, Calvaresi N, Carvelli L, Bastone A, et al. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *Journal of neurochemistry* 2001; **79**(4): 737-746.
126. Gohara T, Ishida K, Nakakimura K, Yoshida M, Fukuda S, Matsumoto M, et al. Temporal profiles of aquaporin 4 expression and astrocyte response in the process of brain damage in fat embolism model in rats. *Journal of anesthesia* 2010; **24**(2): 225-233.
127. Su M, Tong XX. [Astrocytic gap junction in the hippocampus of rats with lithium pilocarpine-induced epilepsy]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 2010; **30**(12): 2738-2741.
128. Cappon GD, Morford LL, Vorhees CV. Ontogeny of methamphetamine-induced neurotoxicity and associated hyperthermic response. *Brain research. Developmental brain research* 1997; **103**(2): 155-162.

129. Cappon GD, Pu C, Vorhees CV. Time-course of methamphetamine-induced neurotoxicity in rat caudate-putamen after single-dose treatment. *Brain Res* 2000; **863**(1-2): 106-111.
130. Fumagalli F, Gainetdinov RR, Valenzano KJ, Caron MG. Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J Neurosci* 1998; **18**(13): 4861-4869.
131. Tong M, Dong M, de la Monte SM. Brain insulin-like growth factor and neurotrophin resistance in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: potential role of manganese neurotoxicity. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2009; **16**(3): 585-599.
132. Brouns R, De Vil B, Cras P, De Surgeloose D, Marien P, De Deyn PP. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients. *Clinical chemistry* 2010; **56**(3): 451-458.
133. Menet V, Gimenez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E, ve ark. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci* 2001; **21**(16): 6147-6158.
134. Triolo D, Dina G, Lorenzetti I, Malaguti M, Morana P, Del Carro U, ve ark. Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *Journal of cell science* 2006; **119**(Pt 19): 3981-3993.
135. Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nature neuroscience* 2003; **6**(12): 1277-1283.
136. Deuel TA, Liu JS, Corbo JC, Yoo SY, Rorke-Adams LB, Walsh CA. Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron* 2006; **49**(1): 41-53.
137. Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG. Doublecortin-like kinase functions with doublecortin to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron* 2006; **49**(1): 55-66.
138. Schaar BT, Kinoshita K, McConnell SK. Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* 2004; **41**(2): 203-213.
139. Kerjan G, Koizumi H, Han EB, Dube CM, Djakovic SN, Patrick GN, ve ark. Mice lacking doublecortin and doublecortin-like kinase 2 display altered hippocampal neuronal maturation and spontaneous seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(16): 6766-6771.
140. des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrie A, ve ark. A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 1998; **92**(1): 51-61.
141. Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, ve ark. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 1999; **23**(2): 247-256.
142. Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, ve ark. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 1998; **92**(1): 63-72.

143. Bonfanti L, Theodosis DT. Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience* 1994; **62**(1): 291-305.
144. Abranches E, O'Neill A, Robertson MJ, Schaffer DV, Cabral JM. Development of quantitative PCR methods to analyse neural progenitor cell culture state. *Biotechnology and applied biochemistry* 2006; **44**(Pt 1): 1-8.
145. Durbec P, Franceschini I, Lazarini F, Dubois-Dalcq M. In vitro migration assays of neural stem cells. *Methods Mol Biol* 2008; **438**: 213-225.
146. Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita N, Murayama A, Akamatsu W, et al. Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci* 2001; **17**(2): 259-273.
147. Usui T, Sakurai M, Kawasaki H, Ohama T, Yamawaki H, Sato K. Establishment of a novel three-dimensional primary culture model for hippocampal neurogenesis. *Physiological reports* 2017; **5**(12).
148. Tang JJ, Podratz JL, Lange M, Scrable HJ, Jang MH, Windebank AJ. Mechano growth factor, a splice variant of IGF-1, promotes neurogenesis in the aging mouse brain. *Molecular brain* 2017; **10**(1): 23.
149. Iwai M, Cao G, Yin W, Stetler RA, Liu J, Chen J. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke* 2007; **38**(10): 2795-2803.