

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
FOKAL SEREBRAL İSKEMİ MODELİNDE
İNSAN TROFOBLAST PROGENİTÖR HÜCRELERİNİN
ANJİYOGENEZ MEKANİZMASINA ETKİLERİ

Müge MOLBAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2018-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
FOKAL SEREBRAL İSKEMİ MODELİNDE
İNSAN TROFOBLAST PROGENİTÖR HÜCRELERİNİN
ANJİYOGENEZ MEKANİZMASINA ETKİLERİ

Müge MOLBAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emin TÜRKAY KORGUN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2016-1653 proje numarası ile ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 114S547 proje numarası ile desteklenmiştir.

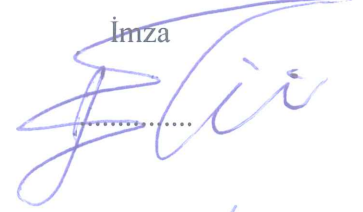
“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2018-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Üreme Biyolojisi Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 29/01/2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi

İmza


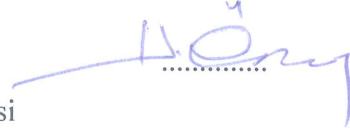
Üye : Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi



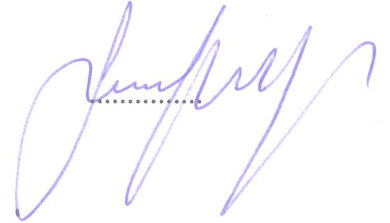
Üye : Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Hakan ÖNER
Mehmet Akif ERSOY Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Güler Leyla SATI
Akdeniz Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ETİK 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 çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Müge MOLBAY

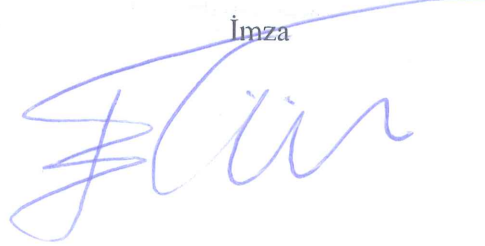
İmza



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Emin TÜRKAY KORGUN

İmza



TEŐEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐmesinde;

Danışman hocam Prof. Dr. Emin Tűrkay KORGUN'a, tezimin gerçekleŐmesi için yűksek lisans eđitimimin baŐından beri gűstermiŐ olduđu tűm destekleri için,

Anabilim Dalımızdaki tűm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Birlikte alıŐtıđım ekip arkadaşlarıma ihtiyaç duyduğum her anda bana yardımcı oldukları için,

Sađlık Bilimleri Enstitűsű'nűn deđerli çalıŐanlarına tűm emekleri için,

Akdeniz Ŭniversitesi Deney Hayvanları Ŭnitesi'nin değerli çalıŐanlarına ve Erol NİZAMOğLU'na,

Akdeniz Ŭniversitesi Sađlık Bilimleri Enstitűsű alıŐanlarına,

Bana destek oldukları, her an yanımda oldukları ve motivasyonumu yűksek tutmam için çaba gűsterdikleri için sevgili Molbay Ailesi'ne sonsuz teŐekkűr ederim.

ÖZET

Amaç: İnme sonrası merkezi sinir sisteminde (MSS) insan trofoblast progenitör hücrelerin (hTPC) transplantasyonunun anjiyogenez, vasküler yeniden modellenme ve nörogenez mekanizmalarını teşvik edebileceği, böylece iskemik alana oksijen ve besin taşınmasını sağlayabileceği ve devamında ise inme sonrası sekonder hasarın önlenmesini sağlayabileceği hipotezini araştırdık.

Yöntem: İnsan trofoblast progenitör hücreleri term plasentalardan izole edilip akım sitometresi ve immünohistokimyasal boyanmalarla karakterize edildi. Sıçanlarda inme modeli MCAO ile oluşturulup 24 saat sonrasında kuyruk veninden hTPC enjeksiyonu gerçekleştirildi. İnme sonrası 3. gün ve 11. günlerde hayvanlar sakrifiye edildi. %2 TTC ve Luxol Fast Blue boyanması ile hasar tespiti yapıldı. Devamında hTPC'lerde VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 proteinlerinin ve mRNA ekspresyonları sırasıyla Western Blot ve qRT-PCR metodlarıyla ile tespit edildi. Son olarak, iskemik hasar oluşturulmuş beyin dokularında trofoblastik kök hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası anjiyogenezle ve nörogenezle ilgili protein miktarı Western Blot ile belirlendi ve bu proteinlerin ekspresyonları ve lokalizasyonları immünohistokimya ile tespit edildi.

Bulgular: İzole edilen hücrelerle yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda bu hücrelerin trofoblast progenitor hücreleri olduğu belirlendi. İnfarkt bölgesi ve demiyelinizasyon hTPC enjeksiyonu yapılan gruplarda azalmıştır. hTPC'ler VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 ekspresyonunu mRNA ve protein düzeyinde gerçekleştirerek anjiyogenezde rol alırlar. Transplantasyon sonrasında beyin dokularında Western Blot sonuçlarına göre DLX5 ve VEGF transplantasyon sonrası 11. günde ve NKX2.2 transplantasyon sonrası 3. ve 11. günlerde anlamlı olarak artarken; LHX6, Olig1, PDGFR α , VEGFR1 ve VEGFR2 de anlamlı olmayan artışlar saptanmıştır.

Sonuç: Trofoblast progenitör hücreler inme sonrası sıçan beyinde anjiyogenik ve nörogenik faktörlerin ekspresyonunu artırır. hTPC inme onarımında terapötik olarak rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: İnsan trofoblast progenitor hücreleri, anjiyogenez, inme.

ABSTRACT

Objective: The hypothesis that human term placenta derived trophoblast progenitor cells (hTPC) transplantation into postischemic central nervous system (CNS) may enhance angiogenesis, vascular remodeling and neurogenesis resulting in oxygen and nutrition transport improvement so that hindering the secondary damage after stroke was explored.

Methods: hTPCs which isolated from term placenta were characterized by flow cytometry and immunofluorescent staining. *In vitro* differentiation of these cells to neuron-like cells was performed. *In vivo* cerebral ischemia model was generated in rats upon middle cerebral artery occlusion and after 24 hours, hTPCs were injected through tail vein. Animals were sacrificed at day 3 or day 11. For histopathological measurements %2 TTC staining and Luxol Fast Blue staining was done. Subsequently, VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 expression levels of hTPCs were examined by Western Blotting and qRT-PCR. Finally, the amounts of proteins related with neurogenesis and angiogenesis in all experimental groups was determined by Western Blot and the expression and localization of these proteins were detected by immunohistochemistry.

Results: Isolated cells have immunological characterization of trophoblast progenitor cells. Besides they express and release angiogenic factors and they can differentiate into neuron-like NeuN positive cells. Through %2 TTC staining infarct volumes were demonstrated in all groups. This area was smaller in the hTPC injected group. Visible myelin loss recovery was observed in hTPC injected group with Luxol Fast Blue staining. On the 11 day after hTPC transplantation, some angiogenic and neurogenic markers significantly increased in the brain tissues according to Western Blot results.

Conclusion: Trophoblast progenitor cells enhance the expression of some angiogenic and neurogenic factors in rat brain after stroke. hTPCs could be therapeutically involved in repair of stroke.

Key words: Human trophoblast progenitor cells, angiogenesis, stroke.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin temeli ve amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beyin Anatomisi ve Histolojisi	3
2.2. İnme	11
2.3. Serebral Sirkülasyon	17
2.4. MCAO Modeli	18
2.5. Vaskülojeniz	20
2.6. Anjiogenez	21
2.7. VEGF Ailesi	22
2.8. İskemi ve Anjiogenez	28
2.9. İskemi ve VEGF	28
2.10. Nörogeniz	30
2.11. İskemi ve Nörogeniz	36
2.12. Trofoblast	38
2.13. İskemi ve Kök Hücre	38
3. GEREÇ ve YÖNTEM	45
3.1. Denekler	45
3.2. Geçici Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması	45
3.2.1. Geçici MCAO	45
3.2.2. Reperfüzyon	46
3.3. Term Plasentadan Trofoblast Progenitör Hücrelerin İzolasyonu	47
3.4. Hücrelerin İmmüno Floresan ile Karakterizasyonu	49
3.5. Hücrelerin Flow Sitometre ile Karakterizasyonu	50
	iii

3.6. Hücrelerin Nöronal Yönlendirilmesi	51
3.7. Hücrelerin PHK26 ile Floesan İşaretlenmesi ve Takibi	51
3.8. Deney Grupları	56
3.9. Western Blot Tekniği için Dokuların Hazırlanması	57
3.9.1. Lizat Hazırlama	57
3.9.2. Protein Miktarlarının Tayin Edilmesi	57
3.9.3. SDS-PAGE Western Blot Protokolü	59
3.10.%2 TTC Boyanması ile İnfarkt Alanının Belirlenmesi	61
3.11. Luxol Fast Blue Boyanması ile Demiyelinizasyonun Belirlenmesi	63
3.12. ELISA Yöntemi	64
3.13. İmmünohistokimya Protokolü	64
3.14. İstatistiksel Analiz	66
4. BULGULAR	67
4.1. Term Plasentadan İnsan Trofoblast Progenitör Hücre (hTPC) İzolasyonu Sonuçları	67
4.2. Hücrelerin Flow Sitometre ile Karakterizasyonu Bulguları	67
4.3. hTPC'lerde İmmünofloresan Boyamaları Bulguları	68
4.4. hTPC'lerin Nöronal Yönlendirilme Bulguları	69
4.5. qRT-PCR Bulguları	70
4.6. Western Blot Analizi Bulguları	70
4.7. %2 TTC Boyanması ile İnfarkt Hacminin Belirlenmesi Sonuçları	78
4.8. Luxol Fast Blue Boyanması ile Demiyelinizasyonun Belirlenmesi Sonuçları	78
4.9. ELISA Yöntemi Sonuçları	79
4.10. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları	80
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	104

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1.	Cytowash medyum içeriği ve hazırlanması	45
Tablo 3.2.	Kollajenaz ve tripsin enzimleri içeriği ve hazırlanması	45
Tablo3.3.	Farklı konsantrasyonlarda Percoll solüsyonlarının Hazırlanması	46
Tablo 3.4.	DNaz Reaksiyonu içeriği ve hacimleri	51
Tablo 3.5.	cDNA sentez reaksiyonu içeriği ve hacimleri	52
Tablo 3.6.	qRT-PCR Reaksiyonu içeriği ve hacimleri	52
Tablo 3.7:	qRT-PCR için kullanılan oligonükleotid sekansları	53
Tablo 3.8.	Standartların hazırlanması ve değerleri	59
Tablo 3.9.	Western Blot metodunda kullanılan primer ve sekonder Antikorlar	61
Tablo 3.10.	İmmünohistokimya metodunda kullanılan primer ve sekonder Antikorlar	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan serebral korteks yapısının şeması.	11
Şekil 2.2. İskemik inme infarkt alanı iskemik kor ve kollateral damarlar ile az da olsa beslenmeye devam “risk altındaki doku” olan penumbradan oluşur	12
Şekil 2.3. Serebral iskemi sonrasında oluşan hasarların zamana bağlı grafiği	16
Şekil 2.4. MCA’daki endovasküler suture ile oluşturulan tıkanma	17
Şekil 2.5. Beyni besleyen damarların kanlandığı alanları lateralden ve medialden gösteren çizim	18
Şekil 2.6. Vaskülogenez ve anjiyogenez ile kan damarlarının oluşumu	20
Şekil 2.7. VEGF reseptörleri, hücreler ve fizyolojik etkileri ve spesifik bağlanan Ligandları	24
Şekil 2.8. VEGF reseptörlerinin membran bağımlı ve çözünür formları	25
Şekil 2.9. İskemik beyinde VEGF’in etkileri	28
Şekil 2.10. Yetişkin beyin ana nörogenik alanları	29
Şekil 2.11. Nörogenez sürecinde hücrelerin geçirdiği başlıca değişim evreleri	30
Şekil 2.12. Nöral farklılaşma basamakları ve farklılaşma belirteçleri	34
Şekil 2.13. İskemi sonrasında gerçekleşen nörogenez ve anjiyogenez	36
Şekil 3.1. MCAO disseksiyon aşamaları	44
Şekil 3.2. Deney planı şablonu	54
Şekil 3.3. Beyin üzerinde kesitlerin alındığı alanlar	
Şekil 4.1. İnsan trofoblast progenitor hücrelerin invert mikroskopundaki görüntüsü (a) 4x ve (b) 40x.	64
Şekil 4.2. İnsan trofoblast progenitor hücrelerin CDX2, EOMES ve izotip kontroller için FACS sonuçları	65
Şekil 4.3. Hücrelere ait immüno Floresan boyanmalar	65
Şekil 4.4. Nöronal farklılaşan hücrelerin immüno Floresan boyanmaları	66
Şekil 4.5. Nöron-benzeri hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüleri ve krezil viyole Boyanmaları	66
Şekil 4.6. qRT-PCR sonuçları	67
Şekil 4.7. ELISA analizi sonuçları	68
Şekil 4.8. Tüm gruplarda %2 TTC boyanma sonuçları	69
Şekil 4.9. Luxol Fast Blue 1. gün gruplarının boyanma sonuçları	70

Şekil 4.10. Luxol Fast Blue 3. gün gruplarının byanma sonuçları	71
Şekil 4.11. Luxol Fast Blue 11. gün gruplarının byanma sonuçları	72
Şekil 4.12. hTPC'lere ait Western Blot sonuçları	73
Şekil 4.13. Deney gruplarına ait beyin dokularının Western Blot bant görüntüleri	73
Şekil 4.14. Deney gruplarına ait beyin dokularının DLX2 Western Blot sonuç grafiği	74
Şekil 4.15. Deney gruplarına ait beyin dokularının DLX5 Western Blot sonuç grafiği	74
Şekil 4.16. Deney gruplarına ait beyin dokularının LHX6 Western Blot sonuç grafiği	75
Şekil 4.17. Deney gruplarına ait beyin dokularının NGN1 Western Blot sonuç grafiği	75
Şekil 4.18. Deney gruplarına ait beyin dokularının NGN2 Western Blot sonuç grafiği	76
Şekil 4.19. Deney gruplarına ait beyin dokularının NKX2.2 Western Blot sonuç grafiği	76
Şekil 4.20. Deney gruplarına ait beyin dokularının Olig1 Western Blot sonuç grafiği	77
Şekil 4.21. Deney gruplarına ait beyin dokularının Olig2 Western Blot sonuç grafiği	77
Şekil 4.22. Deney gruplarına ait beyin dokularının PDGFR α Western Blot sonuç grafiği	78
Şekil 4.23. Deney gruplarına ait beyin dokularının Sox2 Western Blot sonuç grafiği	78
Şekil 4.24. Deney gruplarına ait beyin dokularının VEGF Western Blot sonuç grafiği	79
Şekil 4.25. Deney gruplarına ait beyin dokularının VEGFR1 Western Blot sonuç grafiği	79
Şekil 4.26. Deney gruplarına ait beyin dokularının VEGFR2 Western Blot sonuç grafiği	80
Şekil 4.27. Deney gruplarına ait dokularda hücre belirleme için immünohistokimya bulguları	81
Şekil 4.28. Deney gruplarına ait dokularda anjiyogenik belirteçlerin	

immünohistokimya bulguları	82
Şekil 4.29. Deney gruplarına ait dokularda DLX2 ve DLX5 immünohistokimya bulguları	83
Şekil 4.30. Deney gruplarına ait dokularda LHX6 ve NKX2.2 immünohistokimya bulguları	84
Şekil 4.31. Deney gruplarına ait dokularda NGN1 ve NGN2 immünohistokimya bulguları	85
Şekil 4.32. Deney gruplarına ait dokularda Olig1 ve Olig2 immünohistokimya bulguları	86
Şekil 4.33. Deney gruplarına ait dokularda Sox2 ve PDGFR α immünohistokimya bulguları	87



SİMGELER ve KISALTMALAR

ACA	:Anterior Serebral Arter
AEC	:3-Amino-9-etilkarbazol
Akt	:Protein Kinaz B
ATP	:Adenozin Trifosfat
BCP	:1-bromo-3-chloropropane (BCP)
BDNF	:Beyin-Kökenli Nörotrofik Faktör
bFGF	:Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
bHLH	:Bazik heliks-loop-heliks
BMP4	:Kemik Morfogenik Proteini
BOS	:Beyin Omurilik Sıvısı
BrdU	:Bromodeoksiüridin
BSA	:Bovin Serum Albumin
CA1	:Kornus Amnu 1 (Hipokampüs)
CCA	:Ortak Karotid Arter
CD (34, 45, 105, 73, 90, 14, 11, 79, 19)	:Cluster of Differentiation
cDNA	:Komplement Deoksiribonükleik Asit
CDX2	:Caudal Type Homeobox 2
ChAT	:Kolin Asetiltransferaz
CT	:Siklus Eşik Değeri
CuSO₄ . 5H₂O	:Bakır Sülfat Pentahidrat
DAPI	:4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	:Dietilpirokarbonat
DG	:Dentat girus
DGC	:Dentat Girus Hücresi
dH₂O	:Distile Su
DKG	:Dorsal Kök Gangliyon
DLX	:Distalless-homeobox
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle Medyum
DTT	:Ditiyotreitol
ECA	:Eksternal Karotid Arter
EDTA	:Etilendiamin tetra asetik asit
EEG	:Elektroensefalografi

EGF	:Epitelyal Büyüme Faktörü
EKH	:Embriyonik Kök hücre
Elf5	:E74 Like ETS Transcription Factor 5
ELISA	:Enzim-Linked Immunosorbent Assay
EPO	:Eritropoetin
Esrrb	:Östrojen-İlişkili Reseptör Beta
Ets2	:V-Ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene 2
FACS	:Floresan-aktive hücre ayırma
FBS	:Fetal Bovin Serum
FGF	:Fibroblast Büyüme Faktörü
FITC	:Fluorescein isothiocyanate
Flt-1	:Fms Related Tyrosine Kinase 1
FSİ	:Fokal Serebral İskemi
GCL	:Granüler Hücre Tabakası
GKK	:Göbek Kordonu Kanı
HBSS	:Hank's Buffered Salt Solution
HCl	:Hidroklorik Asit
HIF1α	:Hipoksi İndüklü Faktör 1 alfa
HLA-ABC	:İnsan Lökosit Antijeni ABC
HLA-DR	:İnsan Lökosit Antijeni DR
HMG	:Yüksek Mobilite Grubu
hTPC	:İnsan Trofoblast Progenitör Hücre
HUVEC	:İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücresi
ICA	:İnternal Karotid Arter
Ig	:İmmünoglobulin
IGF	:İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IgG	:İmmünoglobulin G
IHK	:İmmünohistokimya
IL-1β	:İnterlökin 1 Beta
Intα-4	:İnterlökin alfa 4
Isl1	:İslet 1
iPKH	:İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KBB	:Kan-Beyin Bariyeri
kDa	:Kilo Dalton

KDR	:Kinase Insert Domain Receptor
Klf4	:Kruppel Like Factor 4
LFB	:Luxol Fast Blue
LHX	:LIM Homeobox
LIF	:Lösemi-Inhibe Edici Factor
LNGFR	:Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor
MACS	:Manyetik-aktive hücre ayırma
MAPK	:Mitogen-Activated Protein Kinase
mBI	:Modifiye Barthel İndeksi
MCA	:Orta Serebral Arter
MCAO	:Orta Serebral Arter Tıkanması
MCP-1	:Monosit Kemoatraktan Protein
MgCl₂	:Magnezyum Klorür
MHC	:Majör Histokompabilite Kompleksi
MKH	:Mezenkimal Kök Hücre
MMP	:Matriks Metalloproteinaz
mRNA	:Mesajcı Ribonükleik Asit
MSS	:Merkezi Sinir Sistemi
Na₂CO₃	:Sodyum Karbonat
NaCl	:Sodyum klorür
NaOH	:Sodyum Hidroksit
NEUN	:Nöron Nükleer Belirteci
NIHSS	:Ulusal Sağlık Enstitüsü İnme Ölçeği
NGN1	:Nörogenin1
NGN2	:Nörogenin2
NKH	:Nöral Kök Hücre
NKX2.2	:NK2 Homeobox2
NMDA	:N-Metil D-Aspartik Asit
NO	:Nitrik Oksit
NSF	:Nöral Hayatta Kalım Faktörü
O-2A	:Oligodentrosit tip 2 Astrosit
OA	:Oksipital Arter
Oct3/4	:Octamer-Binding Transcription Factor 4
Olig	:Oligodentrosit Transkripsiyon Faktörü

P/S	:Penisilin/Streptomizin
PBS	:Fosfat Buffer Salin
PCA	:Pterygopalatine Arter
PComA	:Posterior Communicating Arter
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGFRα	:Platelet-Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü Alfa
PG	:Prostoglandin
PI3K	: Fosfoinositol 3 Kinaz
PIK	:Proteaz İnhibitör Kokteyl
PKC	:Protein Kinaz C
PIGF	:Plasenta Kökenli Büyüme Faktörü
PPA	:Pterygopalatine Arter
PPv	:Posterior Ventriküler Bölge
RT-PCR	:Reverse Transcriptase polimerase Chain Reaction
SCF	:Kök Hücre Faktörü
SDF	:Stromal Hücre-Kaynaklı Faktör
SDS	:Sodyum Dodeçil Sülfat
SDS-PAGE	:Sodyum Dodeçil Sülfate Poliakrimamid Jel Elektroferez
SF	:Serum Fizyolojik
SGZ	:Subgranüler Zon
Shh	:Sonik Hedgehod
Smarca4	:SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4,
Sox2	:SRY Homeobox
ST	:Süperiyör Tiroid Arter
sVEGFR	:Çözünebilir Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü
SVH	:Serebrovasküler Hastalık
SVZ	:Subventriküler Zon
TBS	:Tris-buffered Saline
Tcfap2c	:Transcription Factor AP-2, Gamma
Tead4	:TEA Domain Transcription Factor 4
THK	:Trofoblast Kök Hücre
TNFα	:Tümör Nekroz Faktör Alfa
tNKH	: Trofoblastik Nöral Kök Hücre

TPF	:Triphenylformazan
trkB	:Tropomyosin receptor kinase B
trkC	: Tropomyosin receptor kinase C
TTC	:Triphenyltetrazolium
VEGF	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR1	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 1
VEGFR2	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
WB	:Western Blot



1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Kan akışının beynin tamamında ya da belirli bir bölgesinde kritik bir eşik değerinin altına düşmesi durumuna serebral iskemi denir. Genellikle bu durumda iskeminin gerçekleştiği bölgede hasar oluşur. İskemik hasarda; nöronlar, astrositler, oligodentrositler ve endotelyal hücreler gibi çok sayıda hücre tahrip olmaktadır. Bu nedenle serebral iskemi tedavisi için nöral tedavilerin yanı sıra damarlar gibi dokuları besleyen yapıların da onarılması gerekmektedir.

İnme olarak tanımlanan serebrovasküler hastalıklar (SVH); ciddi mortalite ve morbiditeye yol açan hastalıklardan biridir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 19 ölümden 1 inme görülür, bu da yılda yaklaşık olarak 795.000 ölüm demektir (Go, Mozaffarian ve ark. 2013) . Bu inme vakalarının % 87'si iskemiktir. İnme, bebeklik dönemi de dâhil olmak üzere her yaşta insanları etkiler. Aslında, canlı doğumların 4000'de 1'inde inme görülür (Roach, Golomb ve ark. 2008). Bebeklerde inme riski perinatal dönemde en fazladır ve çocuk mortalitesinin ilk 10 nedeninden biridir (Lloyd-Jones, Adams ve ark. 2009). Perinatal inme nedenleri çok faktörlüdür ve nedenleri arasında konjenital protrombojenik koşullar, vasküler malformasyonlar, doğum travması, baş ve boyun enfeksiyonları, sistemik koşullar (örneğin otoimmün hastalıklar) ve plasenta rüptürü ve preeklampsi gibi obstetrik komplikasyonlar da vardır (Roach, Golomb ve ark. 2008, Rutherford, Ramenghi ve ark. 2011). Erken yaşta inme geçiren çocuklar, hayatları boyunca nörolojik hasarla yaşamaktadırlar (Kirton and deVeber 2006, Amlie-Lefond, Sebire ve ark. 2008, Rutherford, Ramenghi ve ark. 2011, Go, Mozaffarian ve ark. 2013).

Yaşam, oosit ile spermin fertilizasyonu sonucu oluşan totipotent zigot ile başlar. Zigot bir dizi proliferasyon ve farklılaşma süreçleri geçirerek canlıdaki tüm hücre tiplerini oluşturur. Embriyo, fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra morula evresine ulaşır. Morula fazında, kompaksiyonu takiben embriyonun morfolojisinde değişimler ortaya çıkar ve bunun sonucunda blastosist oluşur. Blastosist evresinde iç hücre kitlesi polarize olmamış hücreleri içerirken (embriyoblast), dış hücre kitlesi hücreleri (trofoektoderm veya trofoblast) polarize hale gelir (Krtolica, Genbacev ve ark. 2007). Trofoektoderm kendi içinde ikiye ayrılır. Birincisi embriyoblast

komşuluğunda olan hücrelerden oluşan polar trofoektoderm, ikincisi ise embriyoblast ile ilişkili olmayıp blastosist boşluğunu çevreleyen hücrelerden oluşan mural trofoektoderm. TKH'ler; polar trofoektodermden gelişip, pluripotent hücrelerdir ve plasentayı oluşturan hücelere kaynaklık yaparlar. Embriyonal kök hücreler ise embriyo oluşumunu sağlar.

Bu tezin amacı hayvan modellerinde fokal serebral iskemik hasar sonrasında anjiyogenez ve nörogenez mekanizmasında trofoblast progenitör hücrelerin etkili olup olmadığını belirlemektir. Mezenkimal kök hücrelerin anjiogenezde rol aldığı, birçok anjiogenik faktörü salgıladığı bilinmektedir. Fakat trofoblast progenitör hücrelerin anjiogenezdeki rolü bilinmemektedir. Serebral iskemi; nöronların, astrositlerin, oligodendositlerin, endotelyal hücrelerin de dâhil olduğu çok sayıdaki hücrenin birlikte tahrip olduğu bir hastalıktır. Dolayısı ile serebral iskemideki tedavi stratejisi yalnızca nöral elementlerin tamir olması değil aynı zamanda damarlar gibi bu dokuları besleyen yapıların da tamir olmasını gerekli kılmaktadır. Bu özelliklerin trofoblast progenitör hücrelerinde mevcut olma olasılığı yüksektir. Bu nedenle fokal serebral iskemik hasarın onarılması için trofoblast progenitör hücreler oldukça iyi bir adaydır.

Genel olarak hedefimiz; *in vivo* ve *in vitro* koşullarda fokal serebral iskemik hasar sonrası anjiyogenez ve nörogenez mekanizmalarında trofoblast progenitör hücrelerin olası rollerini tespit etmektir.

Bu çalışmada trofoblast progenitör hücrelerin beyin hasarının onarılmasına olan etkisini histolojik olarak, % 2 TTC ve Luxol Fast Blue boyalarıyla belirlenmiştir.

Anjiyogenez mekanizmalarına olan etkisi için trofoblast progenitör hücre süpernatantlarından ELISA yöntemi ile hücrelerin lizatlarında ise Western Blot ile VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 protein varlığı tespit edilmiştir. Trofoblast progenitör hücrelerinde VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 protein varlığı belirlenmiştir. ,

Nörogenez süreçleriyle ilgili olarak da iskemik hasar oluşturulmuş beyin dokularında trofoblastik kök hücre transplantasyonu öncesi ve sonrası VEGF, VEGFR1, VEGFR2, DLX2, DLX5, LHX6, NGN1, NGN2, Olig1, Sox2, Olig2, PDGFR α , NKX2 protein varlığı Western Blot ve immünohistokimya ile tespit edilmiştir

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin Anatomisi ve Histolojisi

Beyin düşünme, hafıza ve şuur gibi temel olarak bilinen görevlerinin yanında çevreden uyarıları alma ve değerlendirme, motor aktiviteyi sağlama, endokrin ve somatik fonksiyonlar ile organların düzenli çalışmasını kontrol etmek gibi birçok önemli görevi üstlenmiştir (Arıncı ve Elhan 2006). Kafatası içinde yerleşik olarak bulunan beyin tüm omurgalı canlılarda olduğu gibi insanda da embriyonik evrenin başında nöral tüpün 4. çift somit hizasından başlayan kranial kısmından gelişmektedir. Beyin bu evrede ön (prosencephalon), orta (mesencephalon) ve arka (rhombencephalon) olmak üzere 3 kısımdan oluşmuştur. Daha sonra post embriyonik dönemde telensefalon, diensefalon, mezensefalon, pons, medulla oblongata ve serebellum olmak üzere altı alt bölgeye ayrılmıştır (Fix 1995).

Beyin, gelişmekte olan beynin yapısına dayanan beş ana anatomik bölüm içerir. Bunlar:

1. Serebral hemisferleri ve toplu olarak bazal gangliyon olarak bilinen derin yapıları içeren telensefalon
2. Ağırlıklı olarak talamus, epithalamus ve hipotalamustan oluşan diensefalon
3. Mezensefalon veya orta beyin
4. Pons ve serebellumdan oluşan metensefalon
5. Miyelensefalon, medulla (Seidman 2016).

Gelişimini tamamlayan beyin yetişkin insanlarda 1300-1500gr ağırlığında olup kafatası ve beyin zarları (meninks) tarafından korunmaktadır. Meninks üç tabakadan oluşur. En dıştaki dura mater olarak isimlendirilir, aynı zamanda pachymeninx (pachy = kalın) olarak da bilinir. Yoğun fibröz bağ dokusunun iki birleşik tabakasından oluşur. Dış tabaka kafatasına yapışır ve aslında periosteumu oluşturur. Yaşlı bireylerde dura kafatası ile kaynaşabilir. Araknoid ve pia birlikte leptomeninkleri oluşturur (lepto = ince). İnce bir zar olan araknoid, örümcek ağlarına benzeyen, keskin bağ dokusu lifleri vasıtasıyla alttaki piyaya bağlanır;

bunlar araknoid ("örümcek benzeri") adını verirler. Araknoid gevşek bir şekilde beyne tutunur (Garman 2011).

Pia, beyin yüzeyini yakından örten hassas bir zarıdır ve nüfuz eden arterioller ve venülleri kılcal damarlara dönüştürecek şekilde kaplar. Omurilik kanalında, pia dentikülat bağları ve filum ucunu oluşturur. Pia, astrositik ayakçıkların uçlarına ait periferik tabakayla yakından ilişkilidir. Birlikte, merkezi sinir sisteminin pia-gliyal sınırlayıcı zarını oluştururlar. Pia, beynin ve omuriliğin yüzeyine yakından bağlıdır, ancak bazı patolojik süreçler, örneğin belirli beyin tümörleri alt yüzey alanının içinde ve yanında yayılabilir (Garman 2011).

Pia ve araknoid arasındaki boşluk, beyin omurilik sıvısı (BOS) ile doldurulmuş subaraknoid boşluktur. Böylece, beyin ve omurilik, araknoid trabeküler tarafından dura-araknoidden asılır ve BOS ile yıkanır. Subaraknoid boşluk yüzeysel serebral arterler ve damarlar da içerir. Beyin ve omurilik yüzeyinin dura-araknoidten nispeten uzak olduğu alanlarda, subaraknoid boşluk sitemalarını oluşturmak üzere büyütülür (Garman 2011).

Beynin yüzeyini 2-4mm kalınlığında ve çoğu yerde 6 tabakadan oluşmuş gri cevher tabakası oluşturmaktadır. Buna cortex cerebri adı verilmektedir. Cortex cerebri ceviz içi gibi birtakım kıvrımlar ve yarıklar içermektedir. Kıvrımların herbirine gyrus adı verilmektedir. Yarıklara sulcus veya fissura denilmektedir. Hemisferleri birbirinden ayıran sagittal konumdaki yarıklar fissura longitudinalisdir. Her hemisfer fissur ve sulcuslar tarafından 4 loba ayrılmaktadır. Sulcus centralis frontal lobu parietal lobdan ayırmaktadır. Sulcus centralis'in önünde gyrus precentralis bulunmaktadır. Burası primer motor alan, sulcus centralisin arkasındaki gyrus postcentralis ise primer duyu alanı olarak adlandırılmaktadır. Koku duyusu ile ilgili alanlar, konuşmanın motor alanı (Brocca), emosyon, sosyal davranış ve entelektüel zekâ merkezleri frontal lobda yer almaktadır. Temporal lobda işitme merkezi (Heschl) ve konuşmanın duyu alanı (Wernicke), oksipital lobda görme alanı bulunmaktadır. Kortekste bazı alanlar bilgilerin yorumlandığı ve entegre edildiği alanlarıdır (Fix 1995). İnsan beyninde 12-14 milyar sinir hücresi olup bunun 9 milyarı kortekste yer almaktadır. Korteksin gelişimi insanda ancak 18-20 yaşlarında tamamlanmaktadır (Dikici 2002).

Ön Beyin (Prozensefalon)

Beynin hacimsel olarak en büyük alanıdır. Embriyo gelişimi sırasında ön beyinin büyük bir bölümü telensefalonun geri kalanı da diensefalonun yapısına katılmaktadır.

Telensefalon

Beynin en geniş kısmı olan telencephalon iki yarım küreden (sağ ve sol lob) ve koklama lobundan oluşmaktadır. Koklama lobu (Bulbus olfactoryus) beynin ön alt kısmında yer alan küçük bir alandır. Burundan gelen koku alma sinirleri önce buraya uğramakta daha sonra beyin korteksinden geçerek koklama merkezine girmektedir. Beyin yarım küreleri (serebral hemisferler) korpus kallozum ile birbirlerine bağlanmaktadır. Her bir hemisfer serebral korteks denilen milyarlarca aktif nöron içeren gri maddeden, nöron uzantılarının yer aldığı beyaz cevher ve bu cevherin içine yerleşmiş bazal gangliyonlardan meydana gelmektedir (Fix 1995). Ayrıca beyin hemisferlerinin yüzeyinde girintili ve çıkıntılı olmak üzere gyrus denen kıvrımlar ve bu kıvrımların arasında da sulkus denilen yarıklar vardır. Bu sulkuslara göre hemisferler; frontal, parietal, oksipital, temporal, insular ve limbik lob olarak adlandırılır. Limbik lob gerçekte farklı bir parça olmayıp limbik sisteme ait kortikal yapılar içerdiğinden dolayı farklı bir lob olarak algılanmaktadır (Dogan 2002).

Ara Beyin (Diensefalon)

Beyin yarım küreleri tarafından çevrelenmiş alandır. Bu alan epitalamus, hipotalamus ve talamus olmak üzere üç bölümden meydana gelmektedir (Dere 1999). Epitalamus diensefalonun üst kısmının arka bölümünde ve talamusun arka üst tarafında yer almaktadır. Kuş ve memelilerde salgı organı olarak gelişmiştir. Talamus boz çekirdeklerin en önemlilerinden olup bunlara görsel yataklarda denilmektedir. Koku duyusu impulsları hariç tüm duyu impulslarının korteks'e gitmeden önce toplandığı önemli bir merkezdir (Arıncı ve Elhan 2006). Hipotalamus diensefalonun ventral kısmında yer almaktadır (Gökmen 2003). Otonom sistem ile endokrin sistemi kontrol ederek entegrasyonunu sağlamaktadır (Arıncı ve Elhan 2006).

Orta Beyin (Mezensefalon)

Beynin en küçük parçası olan orta beyin ponsun üzerinde olup medullanın uzantısı olarak merkezi boşluğu kaplamaktadır. Miyelinli sinir liflerinden oluşmuştur. Serebellum, pons, medulla oblongata ve medulla spinalis arasında bağlantı kuran

sinir liflerinin geçit b6lgesidir. Mezensephalon mikroskobik olarak çeşitli kısımlara ayrılmaktadır. Dopaminerjik n6ronlara sahip olan substantia nigra olarak isimlendirilen gri cevher kitlesi mezensephalonun transvers kesitlerinde rahatça ayırt edilebilmektedir. Efferent lifler içeren krus serebriler içyapısında diğer g6ze çarpan b6lgelerden bir tanesidir. Diğer bir kısım ise tegmentum mezensephalidir. Bu kısım talamusa giden çeşitli afferent lifleri ve 3. , 4. ve 5. kranial sinir çekirdekleri ile n6kleus ruber'i içermektedir (G6kmen 2003). Mezensephalonun arka tarafında d6rt tane yuvarlak çıkıntıdan oluşan lamina quadrigemina bulunmaktadır. Bunlardan 6stekilere kollikulus superior, alttakilere ise kollikulus inferior denir. Kollikulus superiorlar daha b6y6kt6r ve g6rme refleks merkezi, kollikulus inferiorlar ise daha k66k olup işitme refleks merkezlerini oluşurmaktadır (Fix 1995).

Arka Beyin (Rhombensephalon)

Embriyonik d6nemin başında beynin 3. kısmı olarak yer alan bu b6l6m embriyo gelişiminin ilerlemesi ile birlikte beynin 4. kısmı metensephalon (beyincik), beynin 5. kısmı mylensephalon (medulla oblangata) ve ponsu oluşurmaktadır. Medulla oblangata pons ile medulla spinalis arasında yer almakta ve ventral y6zeyinde kortikospinal yollarıieren pyramis ile 9., 10., 11., ve 12. kranial sinirler yer almaktadır . Beyincik beyin b6l6mleri içinde b6y6kl6k olarak ikinci sırada yer almaktadır. Pons ve medulla oblangata ile birlikte 4. ventrik6l6 çevrelemektedir. Serebellum isteğimiz dışında iskelet kaslarının tonusunu ve sinerjik hareketlerini kontrol ve koordine etmekle y6k6ml6d6r. B6ylelikle kasların işbirliği içinde çalışmasını sağlayarak dengenin korunmasında 6nemli bir yere sahip g6z6kmektedir (Arıncı and Elhan 2006).

Merkezi sinir sisteminin h6creleri tipik olarak aşağıdaki iki ana kategoriye ayrılır:

I. N6roektodermal k6kenli h6creler

N6ronlar

Astrositler

Oligodentrositler

Ependim h6creleri

II. Mezenkimal kaynaklı hücreler

Meninkslerde bulunan bağ dokusuna ait hücreler

Kan damarlarında bulunan endotel hücreleri

Yağ dokusuna ait adipositler

Mikroglia (Garman 2011)

Beynin histolojik yapısı incelenirken öncelikli olarak beyin dokusunda bulunan hücrelerden bahsetmek gerekmektedir. Bunlar MSS'nin temel hücresi olan sinir hücresi (nöron) ve bunlara destek sağlayan nöroglialardır (Garman 2011).

Nöronlar

Sinir sisteminin fonksiyonel birimini nöron veya sinir hücresi adı verilen uyarılabilme yeteneğine sahip özelleşmiş hücreler oluşturmaktadır. Bir nöron genel olarak hücre gövdesi (soma), dendritler ve akson olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Soma, çekirdek ve onu çevreleyen sitoplazmadan oluşmaktadır. Dendritler uyarıyı çevreden, duyu epitel hücrelerinden ve diğer nöronlardan almak için özelleşmiş çok sayıda uzantılardır. Akson ise tek bir uzantıdır. Sinir uyarılarını diğer hücrelere (sinir hücresi, kas ve bez hücresi) yaymak ve iletmek için özelleşmiştir. Aksonlar başka nöronlardan bilgi alabilmek için özelleşmişlerdir. Nöronlar somadan çıkan uzantılarının sayısına ve işlevsel rollerine göre sınıflandırılmaktadır (Mescher 2013).

Uzantılarının sayısına göre;

Multipolar nöronlar: Poligonal şekilli somadan çıkan çok sayıda uzantıya sahip nöron tipidir. Tek bir aksona ve birden fazla dendrite sahiptir. Sinir sisteminde en fazla bulunan bu nöron tipine serebral korteksin piramidal hücreleri ile serebellar korteksin nöronları ve Purkinje hücreleri örnek olarak verilebilir (Ross, Kaye ve ark. 2002).

Bipolar nöronlar: İki uzantılı nöronlardır. Görme, işitme ve denge sisteminin nöronları örnek olarak verilebilir (Ross, Kaye ve ark. 2002).

Psödoünipolar nöronlar: Yalnızca kısa tek bir uzantıya sahip bir nöron tipi olup kranial ve spinal sinirlerin duyusal gangliyonlarında bulunmaktadır. Embriyonik olarak bipolar nöronlardan köken almakta ve başlangıçta iki uzantıya sahip gözükmektedirler. Daha sonra bu uzantılar kaynaşarak tek bir uzantı halini almakta bu yüzden de psödo terimi kullanılmaktadır (Ross, Kaye ve ark. 2002).

Nöroglia

Merkezi sinir sisteminin bir diğer önemli hücreleri gliyalardır. Gliya ya da nöroglia hücreleri çoğalma özelliği gösterebilen ve nöronlardan daha fazla sayıda bulunan hücrelerdir. Birçok benign ve malign tümörler gliya kökenli olup gliya hücrelerinin nöronların aksine aksiyon potansiyeli oluşturmadıkları ve elektriksel uyarıların alınması ve iletilmesinde rol oynamadıkları tespit edilmiştir. Bu hücreler nöroektodermden köken alan astrositler, oligodendrositler ile mezodermden köken alan mikroglia ve ependim hücrelerini içermektedir (Ross, Kaye ve ark. 2002).

Astrositler

Astrositler çok sayıdaki uzantıları nedeniyle yıldız şeklinde izlenen hücrelerdir. Bu hücrelerin yapılarını güçlendiren gliyal fibriller asit proteininden yapılmış ara filamentleri bulundurlar. Bu hücreler nöronları kılcal kan damarlarına ve pia matere bağlamaktadır. Az sayıda uzun uzantılara sahip astrositlere fibröz astrosit denilmekte ve bunlar ak madde içinde yer almaktadır. Çok sayıda kısa dallar veren uzantılara sahip olan protoplazmik astrositler ise gri madde içinde yer almaktadır (Ross, Kaye ve ark. 2002).

Oligodendrositler

Oligodendrositler astrositlerden daha küçüktür ve koyu boyanan düzensiz çekirdeğe sahiptirler. Sitoplazmaları bol miktarda Golgi aygıtı, çok sayıda mitokondriyon ile mikrotübülleri içermektedir. Bu hücrelerin görevi aksonu miyelinlemektir. Oligodendrositlerin uzantıları aksonları bir kılıf gibi sarmaktadır. Bu kılıfın oluşumu periferik sinirlerde Schwann hücreleri tarafından oluşturulan miyelin kılıfının oluşumuna benzemektedir. Bu Schwann hücreleri oligodendrositlerle aynı işleve sahip olup ancak çevresel sinir sistemindeki aksonların etrafında yer almaktadırlar. Bir Schwann hücresi, bir aksonun çevresinde miyelin oluşturmaktadır oysa oligodendrositler birden fazla nöron ve bunların uzantıları etrafında kılıf oluşturacak şekilde dallar verme yeteneğinde sahiptir (Ross, Kaye ve ark. 2002).

Mikroglia Hücreleri

Gliya hücreleri içerisinde en küçük olanlarıdır. Embriyonal evrede merkezi sinir sistemi içerisinde pia materden kan damarları çevresinde farklılaşarak oluşmaktadırlar. Sitoplâzmaları yoğundur. Nükleusları küçük kromatini koyu boyanmaktadır. Oval şekilli veya muntazam olmayan değişik görünüm verebilmektedirler. Sitoplazmik uzantıları az sayıda olup ince ve kısa gözlenmektedir (Ross, Kaye ve ark. 2002).

Ependim Hücreleri

Bu hücreler, beyin ventriküllerini ve omurilik orta kanalını döşeyen alçak prizmatik epitel hücreleridir. Bazı yerlerde ependim hücreleri beyin omurilik sıvısının hareketini kolaylaştıracak olan titretilen tüylere sahip görülmektedir (Ross, Kaye ve ark. 2002).

Beyin hemisferlerin yapısı, sinir hücrelerinin lokalizasyonlarına bağlı olarak *substansia grisea* (gri cevher) ve *substansia alba* (ak cevher)'dan oluşur. Cortex cerebri tüm bilinçli ve istemli fonksiyonları, yüksek zekâ işlemlerini gerçekleştiren, nöron gövdeleri, dendritleri, aksonları, başka alanlardan gelen sinir lifleri, nöroglia ve kan damarlarını içeren, hemisferlerin dıştan 1.5-4 mm kalınlıktaki kısmını oluşturan, gri cevher tabakasıdır. Serebral korteks filogenetik, ontogenetik ve fonksiyonel kriterlere göre allocortex ve neocortex (neopallium) olmak üzere alt tiplerde incelenir. Allocortex filogenetik olarak daha eski primitif basit korteks olup bir reseptör, bir efektör piramidal nöron katlarını içerir. Reseptörlerle alınan uyarı "arada bağlantı nöronları bulunmaksızın" direkt efektöre iletilerek görev yerine getirilir. Allocortex Archiocortex ve Paleocortex olmak üzere iki yapıdan oluşur. Archiocortex primitif kortekstir ve 3 tabakalıdır, limbik sisteme ait hipokampus, dentat girus, subikulumda görülür. Paleocortex de 3 tabakalıdır ve uncus, parahipocampal girus, bulbus olfaktorius da görülür. Neokorteks insanda korteksin %90'ını oluşturur. Yapısal özellikler nedeniyle homogenic cortex denir. 6 tabakaya sahiptir. Bu tabakalarda yapısal, küçük farklılıklar olsa da korteksin her yerinde izlendiğinden, neokortekse izokorteks de denir (Ross, Kaye ve ark. 2002, Mescher 2013). Neokorteksin tabakaları;

I. Lamina zonalis (molekölare, plexiformis)

II. Lamina granularis eksterna

III. Lamina piramidalis eksterna

IV. Lamina granularis interna

V. Lamina piramidalis interna (ganglioner tabaka)

VI. Lamina multiformis katlarıdır (Şekil.2.1) (Ross, Kaye ve ark. 2002, Mescher 2013).

Lamina zonalis / molekölare

Hücre bakımından fakirdir. Buraya gelen dendrit ve akson dallanmaları, bu tabakada; **horizontal bir pleksus** yaparlar. Çok az sayıda horizontal duruşlu nöronlar yer alır (Mescher 2013, Ross ve ark. 2002).

Lamina granularis eksterna

Yıldız hücreleri, bir miktar küçük piramidal hücre ve çeşitli sinir sonlanmalarından oluşur (Mescher 2013, Ross ve ark. 2002).

Lamina piramidalis eksterna

Küçük ve orta boyutlu piramidal hücreler ve bir miktar yıldız hücrelerden oluşur. Afferent uzun bağlantı lifleri bu tabakada horizontal **Bechterev çizgisini** yaparlar (Mescher 2013, Ross ve ark. 2002).

Lamina granularis interna

Yıldız veya granül hücrelerden oluşur. Bu tabakada talamustan gelen afferent liflerin son dallanmaları **Baillarger'in dış çizgisini** yapar (Mescher 2013, Ross ve ark. 2002).

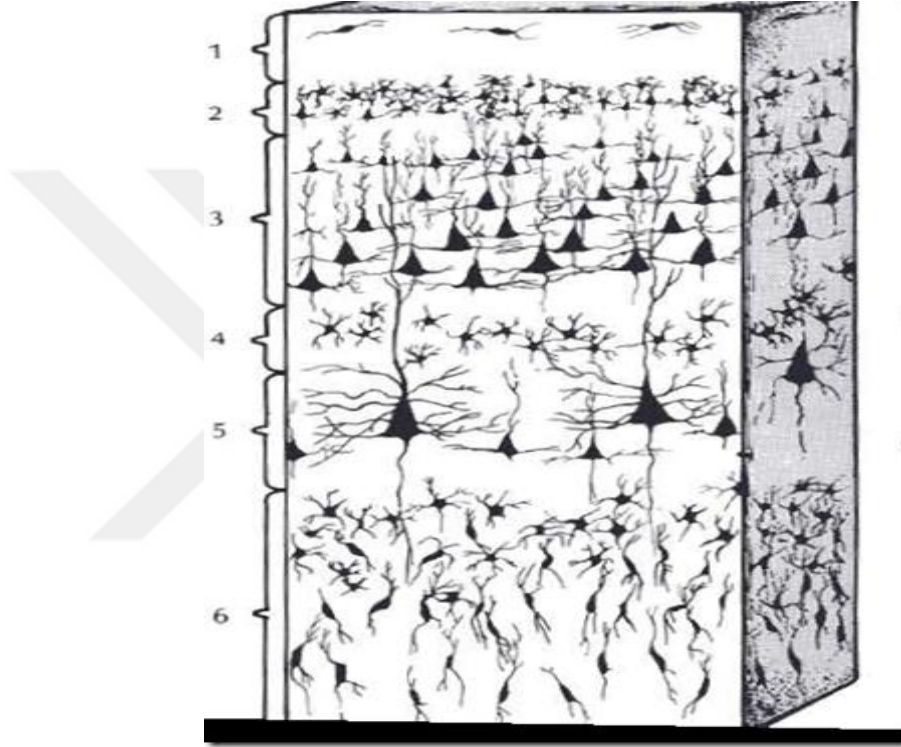
Lamina piramidalis interna

Orta ve büyük piramidal nöronlardan oluşur. Bu tabakada afferent kısa bağlantı lifleri **Baillarger'in iç çizgisini** yapacak şekilde sonlanır. Bu tabakada dev piramidal hücreler bulunur ve III. tabakadakiler gibi aksonlarını substansiya albaya gönderir (Mescher 2013, Ross ve ark. 2002).

Lamina multiformis

Bol miktarda mekik şekilli hücreler ve yıldız hücrelerinden oluşur. Mekik şekilli hücreler uzun eksenleri yüzeye dik yerleşim gösterirken aksonları substansiya albaya uzanır (Mescher 2013, Ross ve ark. 2002).

Subkortikal beyaz madde (substansiya alba) büyük ölçüde aksonlar ve oligodendroglidan oluşur. Beyaz cevherde; oligodendroglialar, merkezi sinir sisteminin miyelin oluşturan hücreleridir (Mescher 2013, Ross ve ark. 2002).



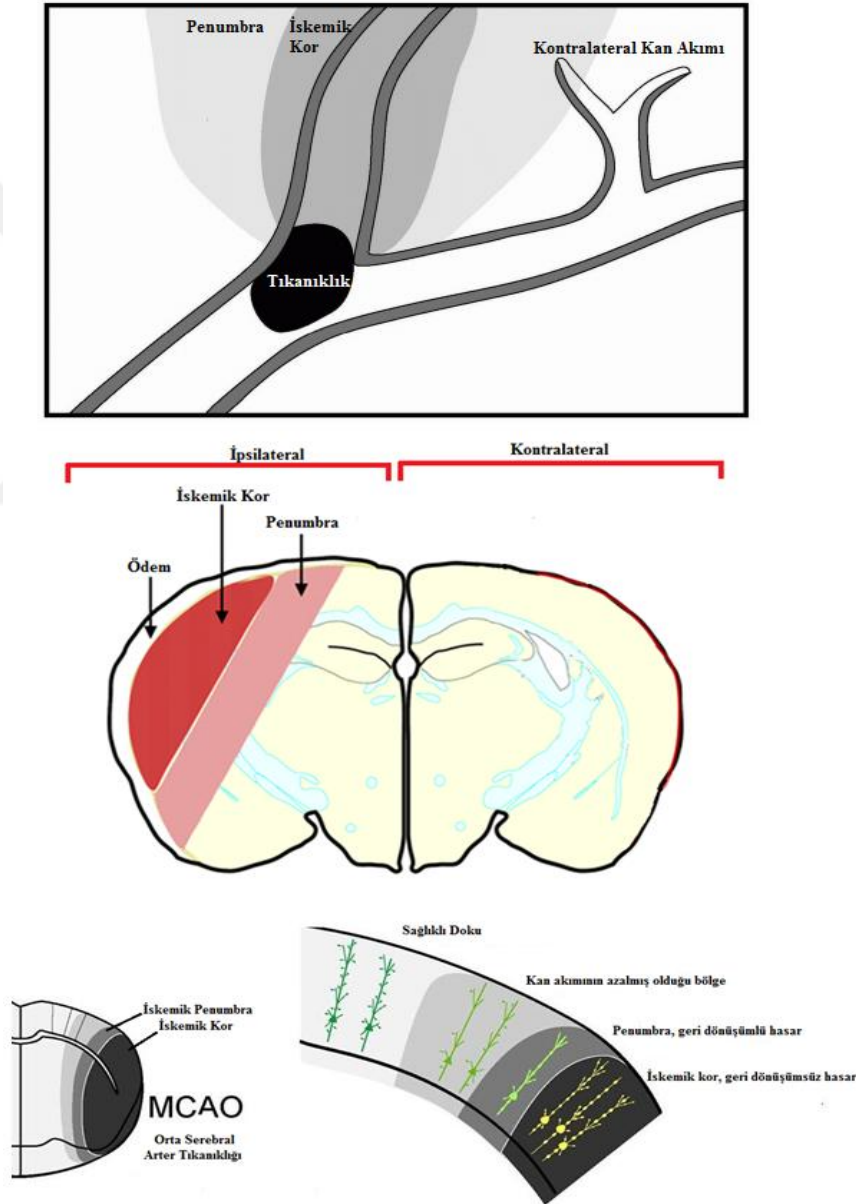
Şekil.2.1. İnsan serebral korteks yapısının şeması: (1) Lamina zonalis (moleküler, plexiformis), (2) Lamina granularis eksterna, (3) Lamina piramidalis eksterna, (4) Lamina granularis interna, (5) Lamina piramidalis interna (ganglioner tabaka), (6) Lamina multiformis.

2.2. İnme

Serebral kan akımı ortalama dakikada 50-55ml/100gr'dır. Gri cevherde serebral kan akımı dakikada 70-80 ml/100gr iken beyaz cevherde dakikada 20- 30ml/100gr'dır. Serebral kan akımı dakikada 30 ml/100gr'ın altında ise nörolojik semptomlar görülür. Serebral kan akımı dakikada 20 ml/100gr'ın altında ise Elektroensefalografi (EEG) ve uyarılmış potansiyeller bozulur. Dakikada 10 ml/100gr'ın altında membran permeabilitesi bozularak geri dönüşümsüz iskemiler gelişir. Embolik infarktlarda embolinin organizasyonu (lisis) takiben yeniden kanlanması sonucu, infarkt alanında

yıkılmış arteriol ve kapillerden eritrositlerin sızması sonucu hemorajik infarkt gelişir. Sızmalar çok olursa hematoma da oluşabilir (Yucel 2012).

İskemik nöron ölümleri genelde iskemiden günler sonra gerçekleşir ve buna ertelenmiş nöron ölümü denir. Nöron ölümündeki bu gecikme beynin etkilendiği bölgeye ve iskeminin uygulanma süresine göre değişiklik göstermektedir. Bazı durumlarda ertelenmiş nöron ölümü günler ya da haftalar alırken bazılarında ise birkaç saat veya daha kısa zamanda oluşur (Lipton 1999).



Şekil.2.2. İskemik inme infarkt alanı iskemik kor ve kollateral damarlar ile az da olsa beslenmeye devam eden “risk altındaki doku” olan penumbradan oluşur. İnfarktın bulunduğu hemisfer ipsilateral hemisfer olarak isimlendirilirken karşı yarım küre ise kontralateral hemisfer olarak isimlendirilir.

Serebral iskemi temel olarak iki şekilde olabilmektedir; global serebral iskemi ve fokal serebral iskemidir. Global serebral iskemi ventriküler fibrilasyon veya 5-10 dakika süren kardiyak arrest nedeniyle oluşabilen beynin tamamında kan akışının azalmasıdır. Fokal serebral iskemi ise tromboembolik veya atherotrombotik vazooklüziv hastalıklar sonucu oluşan kan akışının beynin belirli bir bölümünde azalması olarak tanımlanmaktadır. Fokal serebral iskemi, global iskemiden farklı olarak kan akışının ciddi derecede azaldığı odak bölge iskemik çekirdek ve bunun daha distalinde bulunan ve kollateral damarlar ile az da olsa beslenmeye devam eden iskemik penumbra bölgelerinden oluşmaktadır. İskemik çekirdekte majör olarak ölü nöronlar bulunurken, penumbra da apoptotik nöronların daha fazla olduğu belirlenmiştir (Yucel 2012) (Şekil.2.2).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 19 ölüme 1 inme görülür, bu da yılda yaklaşık olarak 795.000 ölüm demektir (Harukuni and Bhardwaj 2006). Bu inme vakalarının % 87'si iskemiktir. İnme, bebeklik dönemi de dâhil olmak üzere her yaşta insanları etkiler. Aslında, canlı doğumların 4000'de 1'inde inme görülür (Go ve ark. 2013). Bebeklerde inme riski perinatal dönemde en fazladır ve çocuk mortalitesinin ilk 10 nedeninden biridir (Roach ve ark. 2008). Perinatal inme nedenleri çok faktörlüdür ve nedenleri arasında konjenital protrombojenik koşullar, vasküler malformasyonlar, doğum travması, baş ve boyun enfeksiyonları, sistemik koşullar (örneğin otoimmün hastalıklar) ve plasenta rüptürü ve preeklampsi gibi obstetrik komplikasyonlar vardır (Go ve ark. 2013, Lloyd-Jones ve ark. 2009). Erken yaşta inme geçiren çocuklar, hayatları boyunca nörolojik hasarla yaşamaktadır (Harukuni and Bhardwaj 2006, Kirton and deVeber 2006, Lloyd-Jones ve ark. 2009, Rutherford ve ark. 2011).

İki çeşit inme vardır: hemorajik (kanamalı) ve iskemik. Beynin çevresinde veya içinde kanama meydana gelirse hemorajik, beynin bir kısmında kan akımı azalır ya da durursa iskemik inme gerçekleşir. Kan akımı olmayan beyin alanı hasar görür. İnmelerin %88'i iskemiktir. İskemik inme beyni besleyen damarların kan akımı azalacak şekilde incilmesi veya damar içi pıhtı ile de iskemik inme oluşabilir. Kan beyne ulaşmadığında beyin hücreleri dakikalar içinde ölmeye başlar (Amlie-Lefond ve ark. 2008).

Aterosklerotik plaklardan kopan emboli, kardiyak kökenli emboliler, kan hastalıkları, hemodinamik kriz iskemik inmeye neden olabilir.

İnme pek çok mekanizmadan oluşan karmaşık bir patofizyolojiye sahiptir:

1. Hücresel enerji azlığı
2. Eksitotoksisite
3. Kalsiyum sitotoksitesisi
4. Oksidatif hasar
5. İnflamasyon
6. Hücre ölüm mekanizmaları
7. Ödem
8. Mikrovasküler hasar
9. Reperfüzyon hasarı

Hücresel enerji azlığı: Beynin enerji üretimi tamamen oksidatif fosforilasyona bağlıdır. Kan akımı azalması sonrası beyin dokusuna yeterli miktarda oksijen ve glukoz sağlanamaması ile ATP üretiminin azalması, buna bağlı olarak anaerobik glikolizin tetiklenmesi ve laktik asidoz oluşumuna neden olmaktadır. Diğer taraftan hücre zarının iki taraflı iyon gradientinin sağlanması için gerekli enerji bağımlı iyon pompalarının çalışmaması hücrelerin depolarizasyonuna, şişmesine ve nekrotik yolların tetiklenmesine neden olmaktadır (TNS 2014).

Eksitotoksisite: Enerji, iyon pompa yetmezliği ve geri alım mekanizmalarındaki bozulma, ekstrasellüler ortamda glutamat birikmesine bağlı oluşmaktadır. Glutamat yüksek konsantrasyonda nöron hasarına neden olmaktadır (TNS 2014).

Kalsiyum sitotoksitesisi: Artan glutamat miktarı N-Metil D-Aspartik Asit (NMDA) reseptörlerini uyarır ve NMDA reseptörleri ve voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonu ile hücre içi kalsiyum miktarı artar. Kalsiyum artışı lipaz, proteaz ve endonükleaz gibi yıkıcı enzimlerin aktivasyonunu sağlayarak serbest radikal oluşumuna neden olmakta ve nöron ölümü tetiklenmektedir. Ayrıca kalsiyum artışı mitokondriyal membranı daha fazla bozarak enerji eksikliğinin derinleşmesine ve daha fazla serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır (TNS 2014).

Oksidatif Hasar: İskemide antioksidan mekanizmaların temizleyebileceğinden daha çok oksijen radikali oluşmakta ve bu da hücre hasarına neden olmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri hücre içindeki protein, lipid ve karbonhidratlara zarar vererek ve

Kan Beyin Bariyeri'ni (KBB) bozarak vazojenik ödeme neden olmaktadır (TNS 2014).

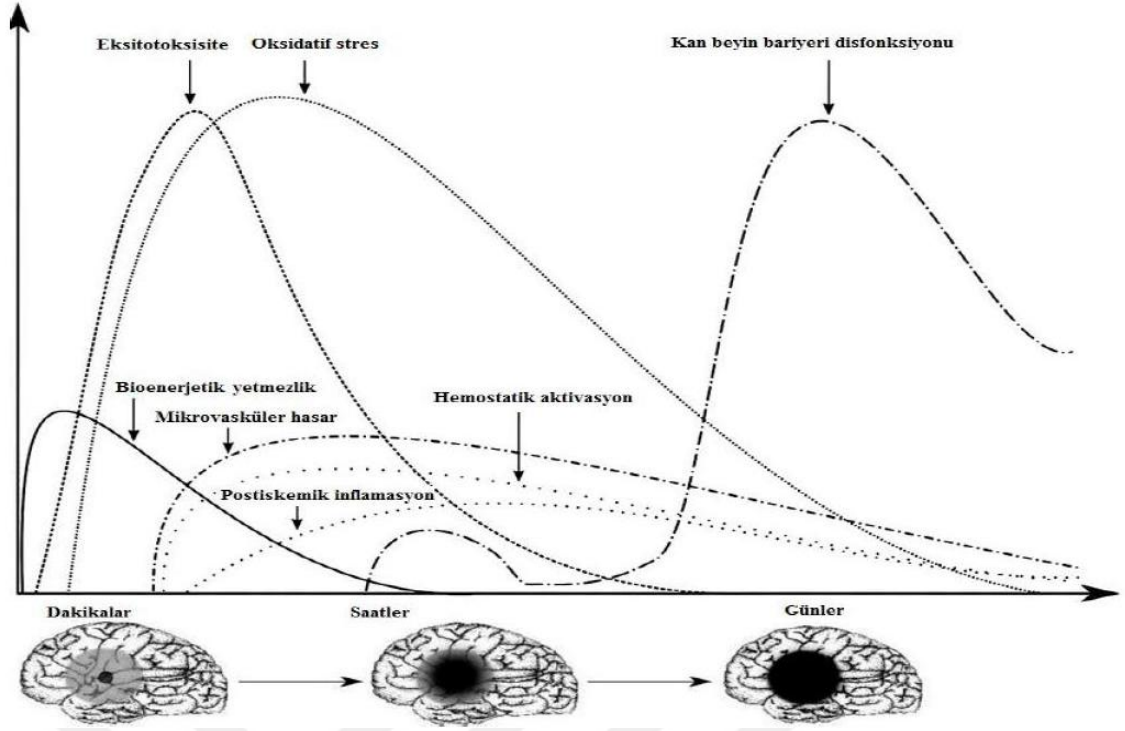
İnflamasyon: İskemi saatler içerisinde inflamatuvar yanıtı neden olur. Bu yanıtta mikroglia ve astrositlerin yanında salınan sitokinler aracılığı ile hasarlı bölgeye göç eden lökositlerde yer almaktadır. İnflamasyon erken dönemde beyin hasarını arttırmakta ve KBB zedelenmesine neden olmaktadır (TNS 2014).

Hücre Ölüm Mekanizmaları: İskemik hücreler, nekroz veya apoptoz ile ölmektedirler. TNF alfa ve FAS ligandının uyarılması kaspaz grubu protezları aktive etmekte ve apoptotik süreç başlamaktadır (TNS 2014).

Ödem: İskemide; iki tür ödem vardır. Birincisi akut gelişen sitotoksik ödemdir. İkincisi ise 4 -6 saat sonra başlayıp ve 24 - 72 saatte maksimuma ulaşan vazojenik ödemdir. Sitotoksik ödemin nedeni hücre içindeki ATP sentezindeki azalma ve buna bağlı olarak Na - K ATP az pompasının fonksiyon kaybı nedeni ile oluşan hücrelerin şişmesidir. İskeminin ilerleyen saatlerinde, matriks metalloproteinazların aktivasyonu ve endotel hücreler arasındaki sıkı bağlantıların disfonksiyonu ile KBB geçirgenliğinin artması gerçekleşir ve bunun sonucunda vazojenik ödem oluşur (TNS 2014).

Mikrovasküler Hasar: İskemide; endotel geçirgenlik artar, bazal lamina ve hücreler arası matriks yıkılır. Böylece KBB seçici geçirgenliği ve serebral otonöregülasyon bozulur. İskemideki endotel hasarı ile normalde antitrombotik ve antiinflamatuvar bir yüzey olan endotel, çeşitli doku faktörleri ve pıhtılaşma mekanizmalarının aktivasyonuna neden olur. Tüm bu mekanizmalarda mikrodolaşımın daha da bozulmasına ve iskeminin derinleşmesine yol açar (TNS 2014).

Reperfüzyon Hasarı: Serebral kan akışının yeniden sağlandığı reperfüzyon sürecinde serebral ödem ve hücre ölümlerinden ötürü reperfüzyon hasarı oluşur. Ek olarak reperfüzyon; lökotrien ve PG salınımına, endotel adhezyon moleküllerinin ekspresyonuna, lökosit migrasyon artışına ve KBB geçirgenliğinin artışına neden olmaktadır (TNS 2014).



Şekil.2.3. Serebral iskemi sonrasında oluşan hasarların zamana bağlı grafiği (Bambal 2015)

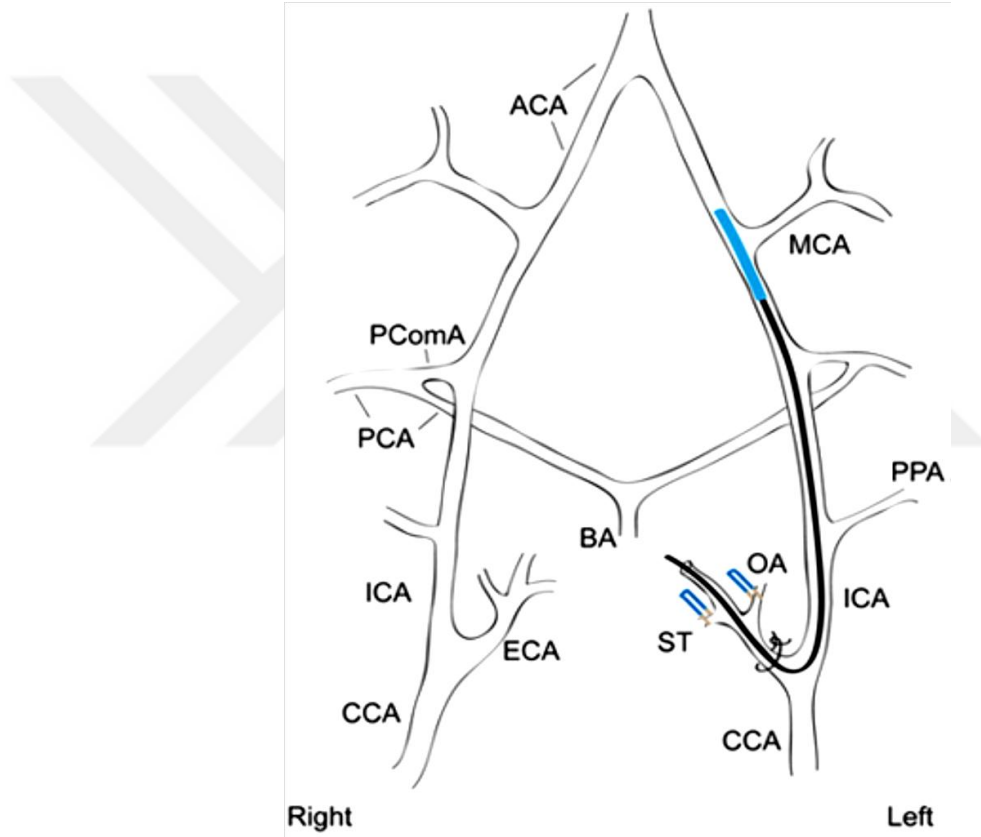
2.3.Serebral sirkülasyon

Beyin metabolik olarak vücuttaki en aktif organlardan biridir dolayısıyla zengin kan akımıyla desteklenmiştir. Beyin arteriyel kan akımını arkus aortadan alan başlıca 4 trunkus sağlamaktadır. Bunlar iki karotid arter ve iki vertebral arterlerdir. Bu arterler beyin ön kısmında karotis sistemini yani anterior sirkülasyonu; arka kısımda ise vertebrobaziller sistemle posterior sirkülasyonu oluşturmaktadır. Karotis interna, ön ve orta serebral arterden oluşan Karotis Sistemi ön dolaşımının en önemli parçasıdır ve beyin kan akımının %80'ni bu sistem sağlamaktadır (Mhairi Macrae 1992).

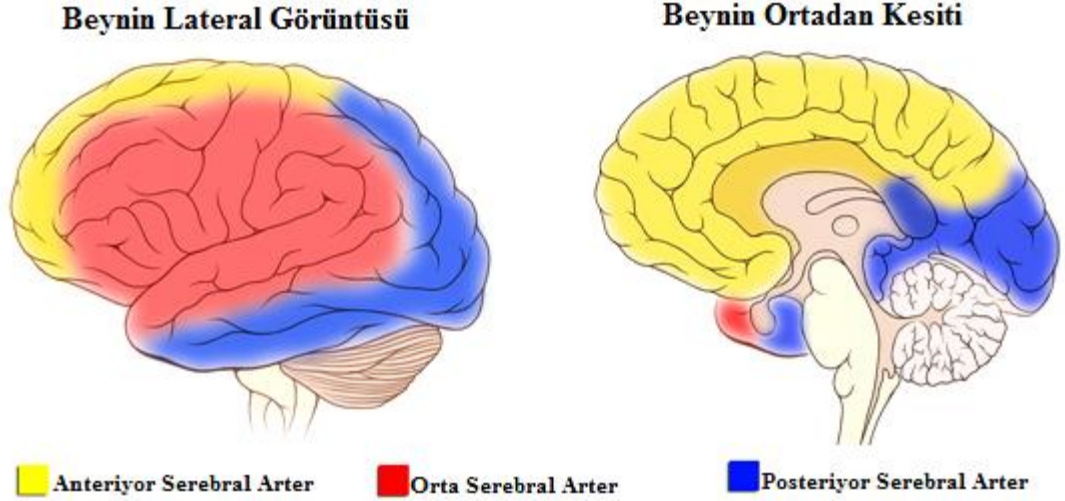
2.4.Orta Serebral Arter Tıkanma (MCAO) modeli

Rodentlerde inme modeli için geniş çaplı olarak MCAO modeli kullanılır. Bunun nedeni hayvan olarak bakımlarının daha ucuz ve kolay olması ve kranial dolaşımının insana benzemesidir (Mhairi Macrae 1992, Sasaki ve ark. 2009). İnsanlarda, orta serebral arter (MCA) en yaygın olarak inme sendromlarından etkilenir ve klinik sendromu taklit eden sayılı MCA tıkanma (MCAO) metodu bulunmuştur. İnsanda inmeden sonra rekanalizasyon genellikle olduğu için tıkanmadan bir süre sonra reperfüzyon bu modellerin birçoğunda bulunur. Silikon tipli ipek suture intraaluminar olarak MCA içerisine yerleştirilir ve 90 dakika boyunca bekletildikten sonra suturen çıkarılmasıyla reperfüzyon gerçekleştirilir. Arkasından inmeye bağlı davranışsal belirtiler sıçanlarda gösterilmiştir.

MCAO tekniğinde Eksternal Carotid Arter (ECA)'nın iki dalı oksipital arter (OA) ve superior tiroid arter (ST) bağlanıp koteter ile kesilir. Bu daha büyük damarların hareketliliğine izin verir, ECA'daki iki ipek bağ arasına ilk arteriotomi gerçekleştirilir. 2.0 mm uzunluğunda 0.39 mm çapında silikon tipi olan 2.0-2.2 cm 4/0 monofilament naylon suture ECA lümenine MCA'ya doğru doğru itilir. ECA etrafındaki suture sıkılarak naylon sutureun yeri stabilize edilir ve kanama önlenir. Bu şekilde Common Carotid Arter (CCA) ya da MCA'da kalıcı bir hasar oluşturulmaz. İskemi periyodu bitip reperfüzyon sürecine geçildiğinde beyin kanlanması normal bir şekilde sağlanır. Bu sistemde sakrifiye edilen damar ECA'dır ve bu normal beyin kanlanmasını ve infarkt bölgesini etkilememektedir.



Şekil.2.4. MCA'daki endovasküler suture ile oluşturulan tıkanma görülmektedir. Kranial dolaşım sisteminin biatleştirilmiş diyagramı üzerinde silikon kaplı intraluminal sutureun MCA kökenini tıkadığı gösterilmiştir. ECA dalları OA ve ST koterize edilerek koparılmış ve bir ipek suture gevşekçe ECA etrafına sarılmıştır ve intraluminal sutureu sabit tutar. ACA, Anterior Serebral Arter; BA, Basilar Arter; CCA, Common Carotid Arter; ECA, Eksternal Carotid Arter; ICA, Internal Carotid Arter; MCA, Middle Cerebral Arter; OA, Occipital Arter; PCA, Posterior Cerebral Arter; PComA, Posterior Communicating Arter; PPA, Pterygopalatine Arter; ST, Superior Thyroid Artery. Figürün adapte edildiği yer: Sasaki ve ark. (Sasaki ve ark. 2009) ve Zhang (Zhang S. M. ve ark. 1995)



Şekil.2.5. Beyni besleyen damarların kanlandığı alanları lateral ve medialden gösteren çizim. Orta serebral arterin (MCA) kanlandığı kortikal bölgeler kırmızı renkte görülmektedir. Uyarlama; (Patrick J. Lynch, Medikal illüstratör)

2.5.Vaskülojeniz

Vaskülojeniz, primitif kan damarlarının mezoderm kökenli öncül (prekürsör) hücrelerden ilk kez oluşturulmasıdır. Vaskülojeniz terimi; hemanjiyoplastların damarların oluşacağı bölgeye göç etmeleri, kordonlar oluşturup endotelial hücrelere farklılaşmalarını ve dolayısıyla damarların ilk kez (de novo), sıfırdan oluşturulmalarını ifade etmektedir (Carmeliet 2003).

Genellikle kan damarlarının iki ardışık süreç olan vaskülojeniz ve anjiyogenez yoluyla geliştiği kabul edilmektedir. Vaskülojeniz sırasında, en erken ilkel kılcal damarların oluşumu, pluripotent mezenkimal hücrelerden farklılanan hemanjiyogenik kök hücrelerin *in situ* farklılaşmasıyla sağlanır. Hemanjiyogenik kök hücreler, hem hematopoietik hücrelerin öncülüğünü yapan hemanjiyoplastik hücrelere, hem de endotel hücrelerinin öncülleri olan anjiyoplastik hücrelere kaynaklık edecek şekilde farklılanırlar (Daly ve ark. 2003, Li ve ark. 2008). Daha sonra, anjiyogenez sırasında yeni kan damarları mevcut damarlardan türetilir (Yancopoulos ve ark. 2000).

Endotelial ve hematopoietik hücreler, ortak bir progenitör (hemanjiyoplast) paylaşırlar. Vitellus kesesinde hemanjiyoplastlar, içteki hücrelerin hematopoietik prekürsörlere, dıştaki hücre popülasyonunun ise endotelial hücrelere farklılaşacağı agregatlar (kümeler) oluştururlar. Anjiyoplastlar, *in situ* farklılaşma ve ağ oluşumu gerçekleşmeden önce, oldukça fazla bir şekilde göç edebilirler. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), VEGF Reseptörü-2 (VEGFR- 2, Flk-1) ve bazik

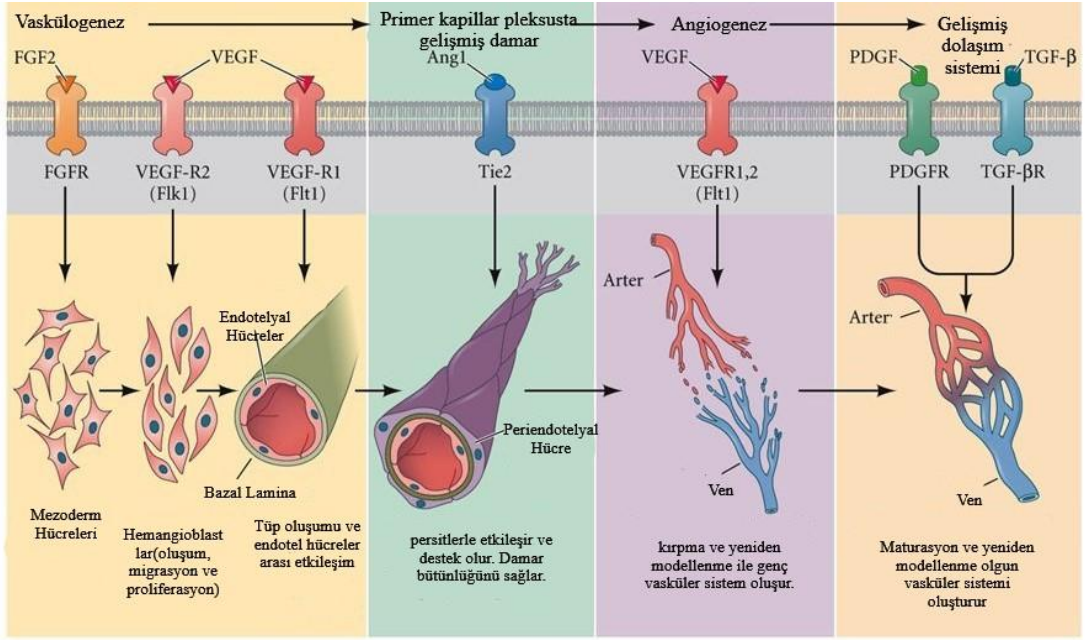
Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF), anjiyoplast farklılaşmasını artırırken (Bikfalvi 2004), VEGF Reseptörü-1 (VEGFR-1, Flt-1) hemanjiyoplastları baskılar (Ferrara 2005). Matriks makromolekülleri, fibronektin, matriks reseptörleri (α 5-integrin) ve endotel hücreler arasındaki etkileşimleri sağlayan moleküller de vaskülogenezde önemli roller üstlenirler. Endotel hücre prekürsörleri, embriyonik yaşamın haricinde, yetişkin kemik iliğinde ve periferik kanında da tespit edilmiştir. VEGF, Granülosit-Monosit Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF), bFGF ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)-1 bu hücrelerin farklılaşmasını ve mobilizasyonunu stimüle etmektedir (Kleespies ve ark. 2004, Thomas 1996).

2.6. Anjiyogenez

Vücudumuzdaki kan damarları vaskülogenez ve anjiyogenez yolları ile oluşmaktadır (Şekil.2.6) (Ferrara ve ark. 2003). Gelişimin ilk haftalarında çevre dokudan difüzyon ile beslenen embriyoda üçüncü haftanın başında anjiyogenez başlar. Anjiyogenez çoğu zaman doku ve organların oluşumu için embriyonik fazda meydana gelmektedir. Yetişkinde ovarian siklus ve yara iyileşmelerinde de anjiyogenez gerçekleşmektedir (Ortega ve ark. 1998). Anjiyogenez, büyüme ve gelişme gibi süreçlerde de gerçekleşir. Kanselerde, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıklarda, maküler dejenerasyon gibi değişik göz hastalıklarında patolojik olarak anjiyogenez meydana gelmektedir. Periferik arter hastalıkları, kalp yetmezliği, infertilite ve gecikmiş yara iyileşmesi gibi durumlarda ise anjiyogenezde yetersizlikler saptanmıştır (Zachary 1998).

Anjiyogenez 4 basamakta gerçekleşir:

1. Bazal membranın ve ekstra-sellüler matriksin proteazlar tarafından yıkılması,
2. Anjiyogenik uyarıya doğru endotel hücrelerinin göçü,
3. Endotel hücrelerinin proliferasyonu,
4. Kapiller tüp formasyonu ve endotel hücrelerin olgunlaşması (Ferrara ve ark. 2003).



Şekil.2.6. Vaskülojeniz ve anjiyogeniz kan damarlarının oluşumunu sağlayan iki ardışık süreçtir (Hanahan, 1997).

2.7.VEGF Ailesi

Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), endotel hücreleri için multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir (Rosenstein and Krum 2004). Endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve differensiyasyonuna sebep olur (Ferrara and Davis-Smyth 1997).

VEGF ailesi kobay derisinde bir vasküler sızıntı başlatmasıyla keşfedildiği için Vasküler Permeabilite Faktörü olarak isimlendirilmişti (Clauss 2000). 1980'lerin sonunda ise, bu aileden ilk özel anjiyogenik büyüme faktörü ayrıştırıldı ve buna vaskülotropin veya vasküler endotelial büyüme faktörü adı verildi. Daha sonraları da diğerleri bu aileye eklendi (Achen and Stacker 1998).

Üyeleri ve Yapısı

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri (PDGF) süperalesinin önemli bir üyesi olan VEGF ailesi VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Placenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PlGF) adı verilen altı üyeden meydana gelmektedir (Millauer ve ark. 1994, Monacci ve ark. 1993, Tamanini and De Ambrogi 2004).

VEGF-A geni, kromozom 6p21.3'de bulunmaktadır. Aynı zamanda Human-VEGF olarak bilinir ve makalelerde çoğunlukla sadece VEGF olarak adlandırılmaktadır (Tamanini ve De Ambrogi 2004). VEGF-A'nın şu ana kadar bilinen altı adet izoformu vardır. Bunlar VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ olarak isimlendirilmişlerdir (Hornig ve ark. 2000, Risau 1997, Shibuya 2006). VEGF₂₀₆, yaklaşık 34-46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir ve karakteristik VEGF formudur (Achen ve Stacker 1998, Risau 1997).

VEGF-B, başlangıçta VEGF-A ile %23'ü homolog olan bir sinyal peptidinin bölünmesinden sonra, 186 amino asitli bir protein olarak oluşur. Sonra, ekson-6'da oluşan bir alternatif mRNA birleştirme (splicing) ile tamamen farklı terminal COOH-grupları içeren 167 amino asitli bir proteine dönüşür (Millauer ve ark. 1994). VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol alır (Kendall ve ark. 1994).

VEGF-C, VEGFC; VEGF-A ile %16'sı benzeyen 388 amino asitten oluşmuştur (Millauer ve ark. 1994). Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelial hücrelerde mitojenik etki yapar (Kendall ve ark. 1994, Monacci ve ark. 1993).

VEGF-D, 334 amino asitten oluşan ve VEGF-A'ya %31 oranında aynı amino asitler içeren bir proteindir(64). C-terminal uçlarında zengin sistein domainleri içerir ve VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer işlevler yapar (Kendall ve ark. 1994, Millauer ve ark. 1994).

VEGF-E, VEGF-A ile amino asit dizilimi %25 oranında aynı olan bir polipeptittir. Güçlü bir mitojen ve permeabilite artırıcı faktördür (Kendall ve ark. 1994).

PlGF, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. VEGF-A ile %37 oranında benzeşen ve 152 amino asit içeren son şekli oluşur (Millauer ve ark. 1994). VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir (Millauer ve ark. 1994).

Sentezi

Ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırır. Erken implantasyon döneminde trofoblastlar tarafından salgılanır

(Park ve ark. 1994). VEGF yetişkinde akciğer alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir (Waltenberger ve ark. 1994). Ayrıca immuno histokimyasal olarak aktif makrofajlarda, arteriyolları çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir (Achen ve Stacker 1998).

VEGF ekspresyonunu indükleyen en önemli faktör hipoksidir. Örneğin; büyüyen tümörlerin hipoksik merkezleri, tıkanmış kalp damarlarına bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artar. Azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır (Ferrara ve Davis-Smyth 1997).

Reseptörleri

VEGF ailesine ait 6 adet reseptör mevcuttur. Bunlar; VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-1, sVEGFR-2 ve sVEGFR3 olarak isimlendirilmiştir (Şekil.2.8).

VEGF reseptör-1 (VEGFR-1,flt-1) ve VEGF reseptör-2 (VEGFR-2, flk-1, KDR) amino asitlerinin %44'ü ortaktır ve yaklaşık 1300 amino asitten oluşur ve iki bölüm içerirler. Birinci bölüm, hücre içinde kalan ve tirozin kinaz içeren hücre içi bölümdür. İkinci bölüm ise, kısa membran köprüleri dizisi ve ligand bağlama bölgeleri içeren 7 adet immüoglobülin benzeri yapıdan oluşan hücre dışı bölümdür (Monacci ve ark. 1993) (Şekil.2.7).

VEGF reseptörlerine ligand bağlandığında dimerizasyon geçirmekte ve bu da hücre içerisindeki mekanizmaları tetikleyerek cevap oluşturmaktadır (Ahmed ve ark. 1997). Heparan sülfat VEGF'in reseptörüne bağlanmasına yardım eder ve bu olayı düzenler (Ferrara and Davis-Smyth 1997).

Yapılan çalışmalar VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin farklı sinyal özellikleri olduğunu göstermiştir. VEGFR-1 hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinin kontrolü ile doku mimarisinin belirlenmesinde ve vaskülogenezde rolü vardır (Albuquerque ve ark. 2009). Bu reseptör VEGF-A, VEGF-B, srVEGF, PlGF2ün etkilerine aracılık etmektedir (Şekil 4). VEGFR-2 VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve srVEGF'in etkilerine aracılık ederken, VEGFR-1 ise ya yanıltıcı (decoy) olarak

görev yapmakta ya da sinyalizasyonu baskılayarak negatif bir etki göstermektedir (Rosenstein ve Krum 2004) (Şekil.2.7).

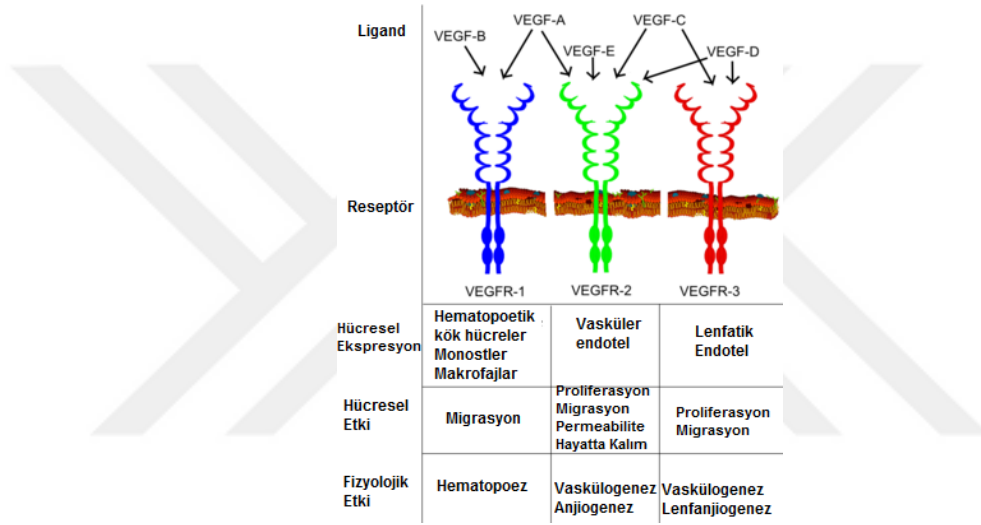
Farelerde yapılan çalışmalarda, VEGFR-2'nin eksik veya bozuk ekspresyonunda bu hayvanların hematopoietik prekürsörlere, farklılaşmış endotel hücrelerine ve organize kan damarlarına sahip olmadıkları görülmüştür. Bu da VEGFR-2'nin hem endotel, hem de hematopoetik öncül hücrelerin gelişimi için zorunlu olduğunu göstermiştir. Bunun aksine; VEGFR-1'in ekspresyonundaki eksikliklerde, olgun endotel hücreleri oluşabilmesine rağmen, bu damarların aşırı genişlediği ve yapısal bozukluklara sahip olduğu görülür. Böylece VEGFR-1'in hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinin kontrolü ile doku mimarisinin belirlenmesinde rolü olduğunu göstermiştir (Albuquerque ve ark. 2009). VEGFR-1; VEGF-A ve PlGF'e yüksek affinite ile bağlanır ama iyi bir proliferasyon ve kemotaktik cevap elde edilemez. Ancak, PlGF'e bağlanmayan ama VEGF'e sıkıca bağlanan VEGFR-2 ile iyi cevap alınır (Achen ve Stacker 1998).

VEGF stimülasyonundan sonra, VEGFR2, otoposforilasyon ile aktive edilir. Pek çok tirozin kinaz fosforilasyon bölgesi; 951, 1054, 1059, 1175 ve 1214 amino asitler, VEGFR'nin intrasitoplazmik bölgesinde bulunmaktadır. Bu fosforilasyon bölgelerine bağlı olarak, sinyal iletimi için farklı yollar (PI3K / Akt, MAPK, PKC ...) ve çeşitli ilgili mekanizmalar aktive edilir. Aktive edilmiş transdüksiyon yoluna göre sinyal iletimi sonucunda, anjiyogenez ile ilgili farklı sonuçlara neden olur (Şekil.2.7) (Huang ve ark. 1998).

Flt-1 mRNA'sının alternative mRNA birleşmesi (splicing) ile VEGFR-1'in çözünür bir varyantının (sVEGFR-1) üretilebildiği daha önce gösterilmiştir. Bu çözünür reseptör, serbest ve aktif VEGF-A seviyesini düşürerek VEGF etkisine karşı bir antagonisttir ve bu nedenle pre-eklampsi veya intra-uterin büyüme geriliği gibi vasküler hastalıkların oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır (Roeckl ve ark. 1998).

sVEGFR-1'in ligand bağlama alanı hem VEGF hem de PlGF'ye bağlanabilirken, VEGFR2'nin homolog bölgesi sadece VEGF'yi bağlayabilir. Böylece VEGF, sadece VEGFR1 ve VEGFR2 reseptör homodimerlerinin oluşumunu değil aynı zamanda burada bildirilen çözünür reseptör komplekslerinin temelinde, tam reseptör repertuarının kullanımına izin veren VEGFR1/VEGFR2 reseptörü heterodimerlerini

de indükleyebilir. PlGF daha sınırlıdır ve muhtemelen sadece Flt-1 reseptör homodimerlerinin oluşumunu indükleyebilir (Liu 2015, Pavlakovic ve ark. 2010). Bu ligand / reseptör bağlanma spesifitelerine dayanarak, VEGF / PlGF ligandı heterodimerinin sadece Flt-1 homodimerlerinde değil aynı zamanda KDR / Flt-1 reseptör heterodimerlerine de bağlanması beklenebilir. VEGFR2'nin endotel hücresi mitojenik sinyalini başlattığı bulunmuşken, hücre yüzeyi üzerinde VEGFR2 yokluğunda eksprese edilen VEGFR1, VEGF'ye yanıt olarak mitojenez başlatamamıştır (Krupinski ve ark. 1994). Fare VEGFR1 knock out edilmesi normal vasküler gelişim için önem taşıdığını gösterse de, işlevsel önemi açık değildir (Xiong ve ark. 2010).

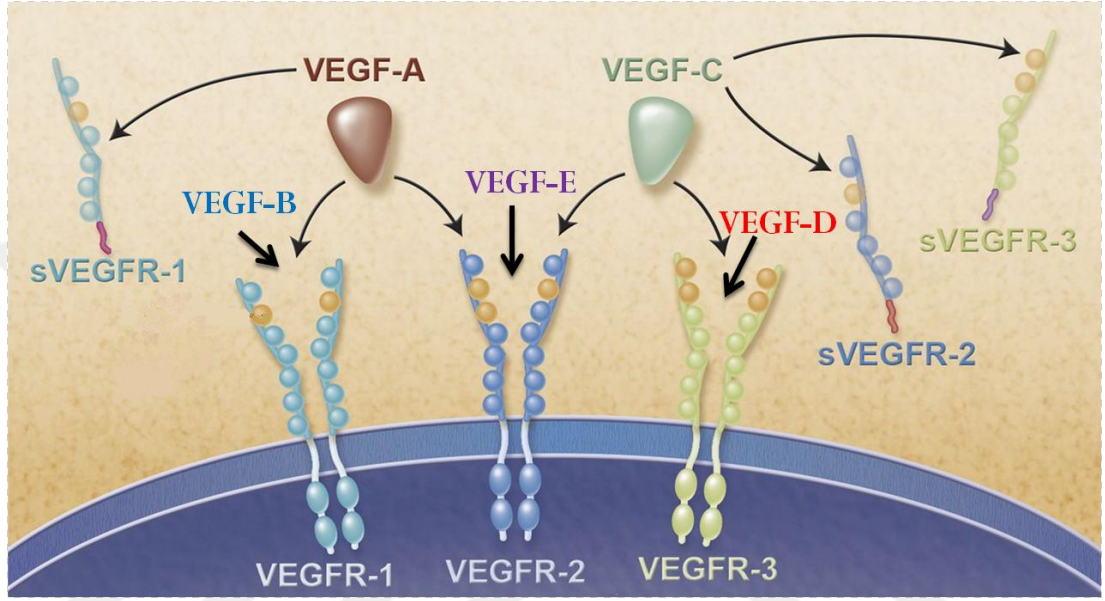


Şekil.2.7. VEGF reseptörleri, hüresel ve fizyolojik etkileri ve spesifik bağlanan ligandları görülmektedir(Shibuya, 2006)

İnsan trofoblast ve endotel hücrelerinin, yapısal NO sentaz (cNOS) aktivasyonu ile nitrik oksidin (NO) sentezini ve salınımını tetikleyen VEGF için fonksiyonel Flt-1 reseptörlerini içerdiği de daha önce bildirilmiştir (Popa-Wagner ve ark. 2010).

En son olarak, Albuquerque ve arkadaşları (Albuquerque ve ark. 2009) doğal olarak ortaya çıkan kesilmiş, çözünebilir fare ve insan VEGFR-2 formunu tanımladılar. Bu formlar yedi Ig benzeri hücre dışı domainlerin altısından alternative splicing sonucunda oluşur. Fare sVEGFR-2 bir 13 amino asit karboksi-terminal sekansı içerir ve insan sVEGFR-2, benzersiz bir 16-amino asit karboksi-terminal sekansı içerir, her ikisi de membrane bağlı VEGFR-2'de mevcut değildir. sVEGFR-1'den farklı olarak, sVEGFR-2, insan mikrovasküler endotel hücrelerine VEGF-A'in bağlanmasını antagonize etmez ve dolayısıyla VEGF-A'nın neden olduğu mitojenezini inhibe etmez (Krupinski ve ark. 1996, Yanev and Dijkhuizen 2012).

sVEGFR-2, VEGF-C'yi yakalayıp engellediği ve VEGFR-3'ün bağlanmasını ve aktivasyonunu devre dışı bıraktığı, böylece lenfanjiyogenezini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Çözülebilir VEGFR-2, VEGF-C bağlanma bölgesini içerir VEGF-C ile etkileşir. *İn vitro* deneyler, sVEGFR-2'nin VEGF-C'ye bağlı VEGFR-3'ün aktivasyonunu ve lenfatik endotel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Krupinski ve ark. 1997).



Şekil.2.8. VEGF reseptörlerinin membran bağımlı ve çözünür formları gösterilmektedir (Albuquerque, 2013)

2.8. İskemi ve anjiyogenez

İnsanlarda ve denek olarak kullanılan hayvanlarda beyin iskemisi sonrasında anjiogenezinin ortaya çıktığı kanısına rağmen, anjiyogenezin inmeden sonra beyin işlevinin düzelmesine katkısı olup olmadığı ve inmeyi tedavi etmek için bir terapi olarak kullanılıp kullanılmayacağı uzun zamandır tartışılmaktadır. Fokal iskemik kaynaklı anjiyogenez, infarkt alanıyla sınırlanmış olup ve geçici gibi görünmektedir. İskemik infarktı çevreleyen kılcak kan akışındaki bu geçici gelişimin iyi yanı diğer rejeneratif süreçleri ve nöroplastisiteyi artırabilmesidir (Villalonga 2008).

İnme sonrası hastaların postmortem beyinlerinde, peri-infarkt bölgelerdeki kılcak damar yoğunluğunun daha uzun sağkalım süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Turu ve ark. 2008). Endotel hücresi proliferasyonu, serebral iskemisi sonrası 24 saat içinde ortaya çıkabilir. Endotel hücre çoğalmasını takiben yeni kapiller oluşumu gözlenir. Bunun sonucunda birkaç hafta içinde yeniden kapillerler oluşumu istikrarlı

bir şekilde yeni oluşan vaskülariteye yol açar (Marti H. H. and Risau 1998, Tsai ve ark. 2006, Turu ve ark. 2008). Damar ağının oluşması, dokunun hayatta kalımı için gerekli olan enerji ve substratlarının sağlanmasını artırabilir, buna ek olarak nöronal filizlenme, nörogenez ve glial çoğalma gibi diğer onarıcı mekanizmaların yolunu açar (Monacci ve ark. 1993).

İnme sonrası beyinde FGF-2, PDGF, VEGF ve reseptörleri gibi anjiyojenik büyüme faktörlerinin artmış sentezi görülür (Cobbs ve ark. 1998, Kovacs ve ark. 1996, Villalonga 2008). İnmeden saatler sonra bir takım moleküller penumbra bölgesinde kan damarı büyümesi ile korele şekilde up-regüle edilir. İskemik sürecin ardından anjiyojenik faktörlerin yanı sıra, bazıları proinflamatuvar sitokinler (IL-1beta, TNF-alfa), nitrik oksit (NO) ve büyüme faktörleri (TGB-beta, PDGF, VEGT, FGF) gibi pro-anjiyojenik faktörler de, ekprese edilmektedir (Hayashi ve ark. 1997, Lee M. Y. ve ark. 1999, Marti H. H. and Risau 1998). İnme sonrası, subventriküler bölgeden peri-infarkt kortekse göç eden yeni oluşmuş nöroblastların bulunduğu alanda artmış vasküler yeniden modellenme oluşur (Lennmyr ve ark. 1998).

2.9.İskemi ve VEGF

VEGF; beyinde, sadece koroid pleksus tarafından değil aynı zamanda astrositler ve nöronlar tarafından da eksprese edilir (Marti H. J. ve ark. 2000, Plate ve ark. 1999). Çeşitli gruplar, deneysel beyin iskemisini takiben penumbra'da çeşitli hücrelerde VEGF'nin upregülasyonunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte, iskemi sonrası zamana bağlı olarak gerçekleşen VEGF gen indüksiyonu ve VEGF eksprese eden hücrelerin belirlenmesi ile ilgili pek çok çalışma vardır Astrositlerde (Beck ve ark. 2010, Marti H. J. ve ark. 2000, Plate ve ark. 1999) nöronlarda (Arvidsson ve ark. 2002, Marti H. J. ve ark. 2000) ve mikroglial hücrelerde (Lichtenwalner and Parent 2006, Marti H. J. ve ark. 2000) VEGF mRNA ve / veya VEGF protein indüksiyonu gösterilmiştir.

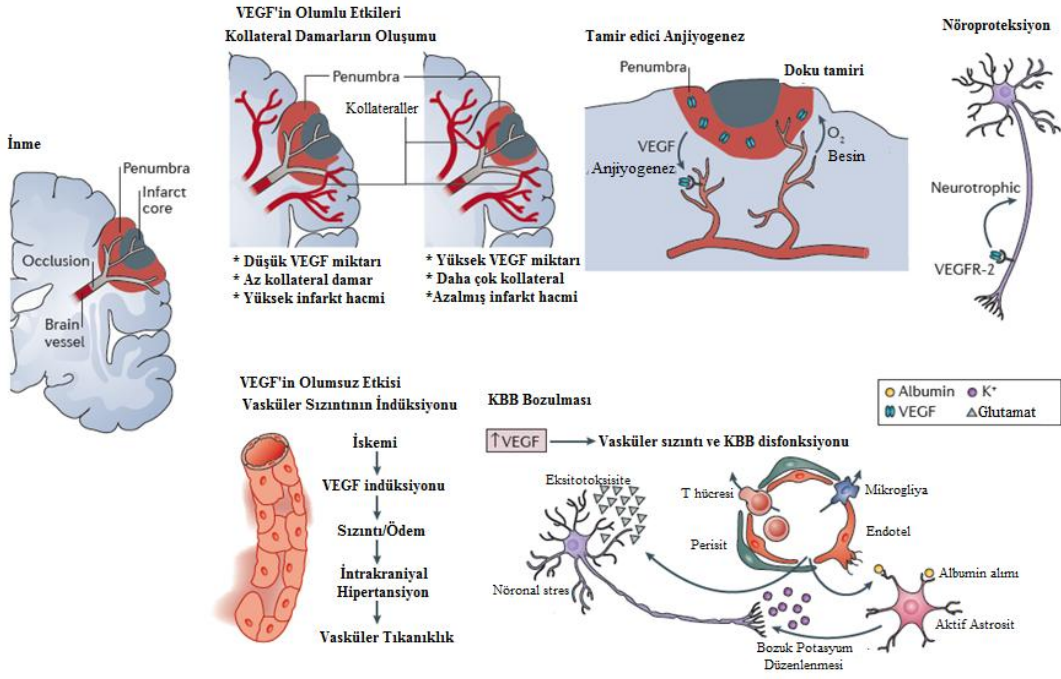
VEGF proteini, peri-iskemik bölgedeki mikro damarlarda da gösterilmiştir (Arvidsson ve ark. 2002, Lichtenwalner ve Parent 2006), bu durum diğer hücre tipleri tarafından üretilen ve salınan VEGF'nin yakın damar endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanarak anjiyojenik cevabı doğrudan başlattığını düşündürmektedir (Lichtenwalner ve Parent 2006). Enfarktüslü hemisferde VEGF ekspresyonunda bir artış, iskemik bir hasardan sonra 3 saat kadar erken bir dönemde tanımlanmıştır ve 3 (Wiltrout ve ark. 2007) veya 7 (Lichtenwalner ve Parent 2006,

Shimotake ve ark. 2010) güne kadar devam ettiği bulgulanmıştır. Beyin iskemisini takiben VEGFR-1'in analizi, serebral iskemi sonrası 48. saatte infarkt sınır bölgesinde bulunan damarlarda bu reseptörün indüksiyonu olduğunu (Lichtenwalner ve Parent 2006, Wiltrot ve ark. 2007) ve bu olaydan 7 gün sonra, ekspresyon seviyelerinin normale döndüğünü (Wiltrot ve ark. 2007) göstermiştir. Kovacs ve ark. (Marti H. J. ve ark. 2000), serebral iskemiyi takiben 3 gün ile 14 gün arasında infarkt çekirdeğindeki endotel hücrelerinde VEGFR-1 indüksiyonunu bildirmişlerdir. Çeşitli gruplar deneysel beyin iskemisini takiben VEGFR-2'nin upregülasyonunu belirtmişlerdir. Lennmyr ve ark. (Lennmyr ve ark. 1998) beyin iskemisinin sıçan modelinde endotel hücrelerinde olduğu kadar glial hücrelerde de VEGFR-2 ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Diğer gruplar fare inme modelinde nöronlarda ve endotel hücrelerinde (Shimotake ve ark. 2010) veya sadece endotel hücrelerinde (Wiltrot ve ark. 2007) reseptörün upregülasyonunu bildirdiler. VEGFR-2 ekspresyonunun indüksiyonu, enfarktüs sınırlarındaki damarlarda iskemiden 48 saat sonra başlar. Daha sonra infarkt alana istila eden damarlar da VEGFR-2 pozitif hale gelir. Güçlü VEGFR-2 ekspresyon seviyeleri 7 güne kadar sürmüştür (Wiltrot ve ark. 2007).

İskemi sonrasında artan serebral iskemi kollateral damarlanmanın artışıyla penumbra alanın küçülmesini sağlar. Bunun yanı sıra penumbra VEGF salgılayan hücrelerin çağrısına yanıt olarak buraya doğru yönelen anjiyogenez ile taşınan oksijen, besin ve diğer destekleyici maddeler ile iyileştirici sürece katkıda bulunur. Ek olarak VEGF nöronla üzerinde bulunan VEGFR2'ye bağlanarak nöronların hayatta kalımını uyarır ve nöroproteksiyonda rol oynar. Buna karşın, VEGF anjiyogenezi indüklediğinde anjiyogenezin basamaklarından olan bazal laminanın ve ekstrasellüler matriksin proteazlar ile yıkımıyla kan beyin bariyerinin bozulmasına yol açar. Bu durum iskemi patofizyolojisinde halihazırda yer alan öden ve sızıntıyı artırır. Bunu takiben bu alana infiltre olan immün hücreler infalamsyonu arttırarak daha fazla hasara yol açar (Şekil.2.9) (Lange, ve ark.,2016).

VEGF uygulaması ve VEGFR-1 modülasyonu, iskemik bir hastalığın ardından hem nörojenez hem de anjiyogenez uyarır (Zhao C. ve ark. 2008). Neonatal kemirgen inme modellerinde yapılan son çalışmalar, kısmen iyileşmenin hipoksi indüklük faktör-1-a'nın (HIF1a) ve bunun hedefi olan vasküler endotelial büyüme faktörünün upregülasyonundan kaynaklandığını düşündürmektedir. Vasküler endotelial büyüme

faktörü, hipoksi sonrasında up-regüle olur ve iyileşme süreci boyunca nöronal sağkalım, angienez ve nörogenез ile ilgilidir (Watson ve Cross 2005).



Şekil.2.9. İskemik beyinde VEGF'in etkileri (Lange, ve ark.,2016).

2.10. Nörogenез

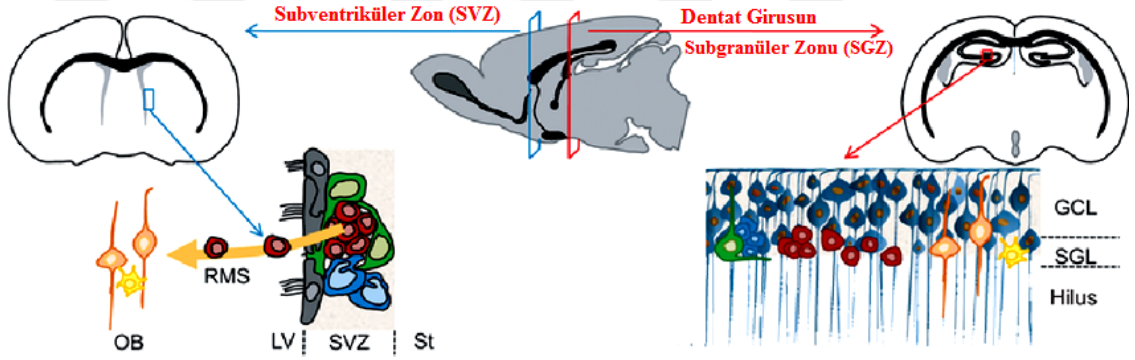
Nörogenез, öncül hücrelerden fonksiyonel nöronların oluşma süreci olarak tanımlanmaktadır. Uzun yıllar boyunca nörogenезin prenatal dönem ile kısıtlı olduğu düşünölmüş ve erişkin dönemde beynin yeni nöron üretmeyeceği dogması kabul edilmiştir. Ancak şu anki bilgilerimize göre fizyolojik koşullarda erişkin memeli beyninde iki bölgede nörogenез yaşam boyu sürmektedir (Zhao C. ve ark. 2008). Lateral ventriköllerin alt kısmını kaplayan subventriköler bölge (SVZ) ve hipokampal dentat gyrus (DG) (Gage 2000). Yetişkin nörogenез, beyin homeostazı ve hastalığında önemli bir oyuncu olarak ortaya çıkmaktadır. Normal nörogenезdeki pertürbasyon, majör depresyon ve epilepsi gibi bir takım hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Zhao C. ve ark. 2008). Kemirgen beyninde her gün binlerce yeni nöron üretilir; yenidoğan hücreleri belirli homeostaz ve beyin işlevlerine katkıda bulunurlar (Deng ve ark. 2010). Gösterdikleri bazı benzerliklere rağmen, SVZ ve subgranöler zonda (SGZ) nörogenез sürecinde bazı farklılıklar bulunmaktadır:

i) SVZ nörogenезi, SGZ'den sayıca fazla olmaktadır.

ii) SVZ'de yeni oluşan hücreler, SGZ nöroblastlarına kıyasla, proliferasyon bölgelerinden oldukça uzağa göç ederler (rostral göç zinciri).

iii) SVZ nörogenezi, bulbus olfaktoryusun ve periglomerüler alanın yeni inhibitör ara nöronlarını yaparken (Luskin 1993); SGZ nörogenezi, hipokampal DG'nin GHT'nin yeni eksitator nöronlarını oluşturur (Ambrogini ve ark. 2004). (Şekil.2.10)

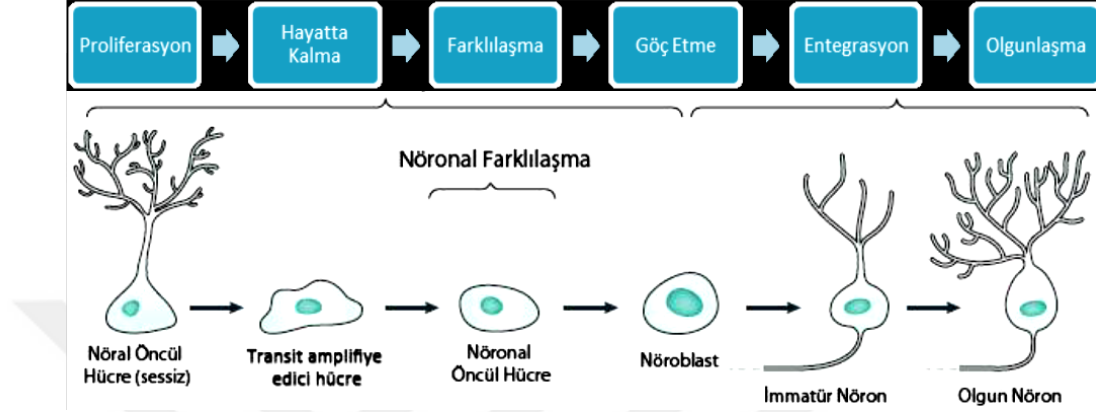
Diğer MSS bölgelerinde nörogenezin normal fizyolojik koşullar altında çok kısıtlı olduğu ancak hasarlanmalar sonrasında artış gösterdiği düşünülmektedir (Gould 2007). Normal ve patolojik koşullarda nörogenez sürecini araştıran çalışmalar hem birçok temel soruyu cevaplayabilmek, hem de kök hücre prensipleri, nöral gelişim, yapısal plastisite ve hastalık mekanizmalarını belirleyebilmek ve modelleyebilmek açısından önem taşımaktadır (Deng ve ark. 2010).



Şekil.2.10. Yetişkin beynin ana nörogenik alanları. DG, dentat girus; RMS, rostral göç zinciri; LV, lateral ventrikül; St, striatum; GCL, granül hücre tabakası; SVZ, subventriküler zon; OB, olfaktör bulbus; SGL, subgranüler tabaka; yeşil hücreler, nöral kök hücreler; mavi hücreler, TAP: kırmızı hücreler, göç eden nöroblastlar; turuncu hücreler, erişkin nöronlar; sarı hücreler, oligodentrositler; (Drapeau, 2008).

Yeni oluşan hücrelerin farklılaşması, çeşitli basamaklar halinde gerçekleşmektedir (Tanaka ve ark. 1998). Bu evreler, hücrelerde sentezlenen özgül işaretleyiciler ve hücrelerin morfolojileri, yerleşimleri ve oryantasyonlarına göre tanımlanmaktadır (Genbacev ve ark. 2011). Progenitor hücreler oluştukları yerde kalabilir ya da göç ederek yeni bir yaşama başlayabilir. Yeni oluşan hücrelerin büyük bir kısmı, doğduktan 1-2 hafta sonra ölür. Yaşama şansı bulanlar ise olgunlaşarak var olan ağa katılır ve yapısal olarak fonksiyonel hale gelir ((Roberts and Fisher 2011) (Şekil 2.11).

Nöral kök hücre farklılaşması basamaklarında diferansiyel olarak eksprese ettikleri çeşitli belirteçler vardır (Şekil.2.12). Bu belirteçlerin ekspresyon miktarları karşılaştırılarak nörogenez analizi yapılabilmektedir. Bunlardan DLX2, DLX5, LHX6, NGN1, NGN2, NKX2.2, Olig1, Olig2, PDGFR α ve Sox2 aşağıda açıklanmıştır.



Şekil.2.11. Nörogenez süreci boyunca hücrelerin geçirdiği başlıca değişim evreleri (Egeland ve ark. 2015).

2.210.1. Cinsiyet belirleyici bölge Y kutusu 2 (Sex determining region Y-box 2, Sox2)

Sox2, hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin SRY ile ilişkili yüksek mobilite grubu (HMG) kutusu (SOX) ailesinin bir üyesidir. Omurgalı genomundaki Sox genleri, HMG alanlarındaki sekans homolojilerine göre sekiz alt familyaya (SoxA-H) göre sınıflandırılır ve 20'den fazla Sox proteini kodlanır. Sekiz alt aileden B grubu alt grup B1 ve B2'ye bölünmüştür ve Sox2, SoxB1 tarafından kodlanmıştır (Bernard and Harley 2010, Kormish ve ark. 2010). Sox2 yetişkin beyinde proliferasyon öncü hücrelerde (BrdU ile işaretlenerek) ve kök hücreleri temsil ettiğine inanılan glial benzeri hücrelerde (Ferri ve ark. 2004) ifade edilir. Sox2, erişkin dönem boyunca sinir öncüleri içerisinde eksprese edildiği bilinmektedir (Brazel ve ark. 2005), Sox2 yetişkin nörogenezinde bir kök hücre belirteci olarak kabul görmektedir (Steiner ve ark. 2006).

2.10.2. Distalless-homeobox 2 ve 5 (Dlx2 ve Dlx5)

İnsanlarda bilinen altı tane Dlx geni vardır (Dlx1-6) (Panganiban and Rubenstein 2002) bağlıdır. Dlx2 proteini, homeodomain'in yanısıra DNA bağlanmasına ve diğer

proteinlerle etkileşime katkıda bulunan ilave motifleri içeren bir transkripsiyon faktörüdür.

DLX2, iskemiye bağlı nörojeneze aracılık etmede önemli bir faktör olan nöronal progenitörlerin EGF'ye proliferatif tepkisini artırır. DLX2 ve EGFR sinyallemesi postnatal SVZ'de seçici bir mekanizma ile nörojenezi teşvik etmek üzere etkileşime girer (Suh ve ark. 2009). Bazı çalışmalar, EGFR aracılığıyla sinyal vermek için endojen ligand kaynağının muhtemelen koroid pleksusta mevcut olan TGF- α olduğunu göstermiştir (Doetsch ve ark. 2002). Fakat detaylı mekanizma halen çok net değildir. Dlx2'nin hedef genlerinden biri, nevrotilin-1/2'dir ve bu, önbeyindeki interneuronların farklılaşması ve/veya göçünün düzenlenmesi için önemlidir (Le ve ark. 2007).

Farede Dlx1, Dlx2 veya Dlx5'in tekli veya birleşik inaktivasyonu, nöronal migrasyon ve farklılaşmanın bozukluklarına neden olur. Özellikle Dlx5, olfaktor sistemin doğru gelişimi için gereklidir. Farede Dlx1 ve Dlx2'nin hedefe yönelik inaktivasyonu, embriyonik subkortikal önbeyininde anormal nöronal farklılaşma ile sonuçlanır ve Dlx5 ve Dlx6 ekspresyonunun kaybıyla ilişkilidir. GABAergic farklılaşma programının başlangıcında Dlx genlerinin rolünün doğrudan bir kanıtı olarak, kortikal nöronlarda Dlx2 veya Dlx5'in transfeksiyonla eksojen ekspresyonu, GABAergic fenotipe spesifik moleküler belirteçlerin ortaya çıkmasına neden olur (Stuhmer ve ark. 2002). Dlx genleri, nörojeniz, göç ve farklılaşma ile ilişkili olarak, MSS'nin çeşitli bölgelerinde eş zamanlı olarak eksprese edilir bu durum in vivo histolojik analizleri zorlaştırır.

2.10.3. Oligodendrosit seri transkripsiyon faktörü 1 ve 2 (Olig1 ve Olig 2)

Olig faktörleri, insan genomunda 100'den fazla üyeyi içeren temel heliks-loop-helix (bHLH) transkripsiyon faktörlerinin geniş ailesine aittir. Şimdi Olig ailesinin bilinen üyeleri Olig1, Olig2 ve Olig3'tür. Olig3, nöral krest-lateral sinir plakası sınırının oluşturulmasında önemli bir rol oynamakla birlikte, Olig1 ve Olig2 motonöronların ve oligodendrositlerin ayrımında rol oynamaktadır (Filippi ve ark. 2005). Olig2, gelişim sırasında ve erişkin SVZ'de oligodendrojenik kaderin önemli bir düzenleyicisi olan gliogenik bir belirteç olarak çalıştığı bilinmektedir (Setoguchi and Kondo 2004). Olig2, glia hücreleri ve öncüllerinin altkümelerinde yaygın olarak

ifade edilir ve farklı mekanizmalara sahip olsa da, akut ve kronik yaralanmalarla farklı bölgelerde kuvvetli şekilde uyarılır (Buffo 2007, Buffo ve ark. 2005).

Olig1 nöron-gliyal dönüşümünü düzenler. Olig1, Nkx2.1 + ve Nestin + multipotent radyal gliada birlikte eksprese edilir. Olig1, oligodendrosit spesifikasyonunun başlangıç noktası olan E12.5'e kadar önbeyinde ifade edilmemektedir (He ve ark. 2001, Kessaris ve ark. 2006, Lu Q. R. ve ark. 2002)

2.10.4. LIM Homeobox 6 (LHX6)

Bir transkripsiyon faktörü olarak “lines (LIN)-11/Islet (Isl)-1/mitosis entry checkpoint (MEC)-3 (LIM)-homeobox subfamily, LIM homeobox” (Lhx) 6 ve -8, önemli ölçüde korunmaktadır ve çoklu organ sistemlerinin morfogenezinde rol oynamaktadır. Nörogenez ile ilgili transkripsiyon faktörü NKx2-1 Lhx6 ve LHX8'i uyarır. Lhx8 Lhx6 ile birlikte GABAergic nöron farklılaşmasını desteklerken, Lhx8 ve Isl1 birlikte Shh, ChAT ve LNGFR aracılı kolinerjik farklılaşmayı desteklemektedir. Lhx6 ve LHX8, kolinerjik ve GABAerjik nöronların hücre kaderinin pivotal regülatörleridir. Lhx8 ve Isl1 birlikte kolinerjik kaderi belirtirken Lhx8 ve Lhx6 GABAerjik kaderi belirler (Manabe ve ark. 2005, Zhao Y. ve ark. 2003)

2.10.5. Nörogenin 1 ve 2 (NGN 1 ve NGN 2)

Dorsal kök gangliyonunda (DKG) farklı duyu nöron sınıfları iki dalgada üretilir: büyük çaplı trkB + ve trkC + nöronları önce farklılaşırlar, bunu küçük çaplı trkA + nöronları takip eder. Bütün bu nöronlar, temel heliks-loop-heliks (bHLH) transkripsiyon faktörlerini kodlayan nörogenenin (ngn) 1 veya 2, iki nöronal belirleme geni gerektirir. ngn2, sadece trkC + ve trkB + nöronlarının üretimi için değil, esas olarak trkA + nöronlarının çoğunun veya tümünün oluşturulması için ngn1 gerektirir. (Lee J. E. ve ark. 1995). Ngn1 ve Ngn2 mutantları tamamlayıcı kranial duyu gangliyon setlerinde nörogenezin ilk aşamalarında bloke olur (Fode ve ark. 1998, Ma ve ark. 1998). Nörogeninlerin yüksek miktarda eksprese olduğu MSS'de (Gradwohl ve ark. 1996, Ma ve ark. 1997, Sommer ve ark. 1996) ngn1 mutantlarında belirgin bir fenotip yoktur (Ma ve ark. 1998). Neurogenin, nöronal farklılaşmayı teşvik eder ve farklı moleküler mekanizmalar yoluyla gliogenezini inhibe eder. Ngn1, kısmen stat yolağını inhibe ederek gliyal farklılaşmayı inhibe eder (Sun ve ark. 2001).

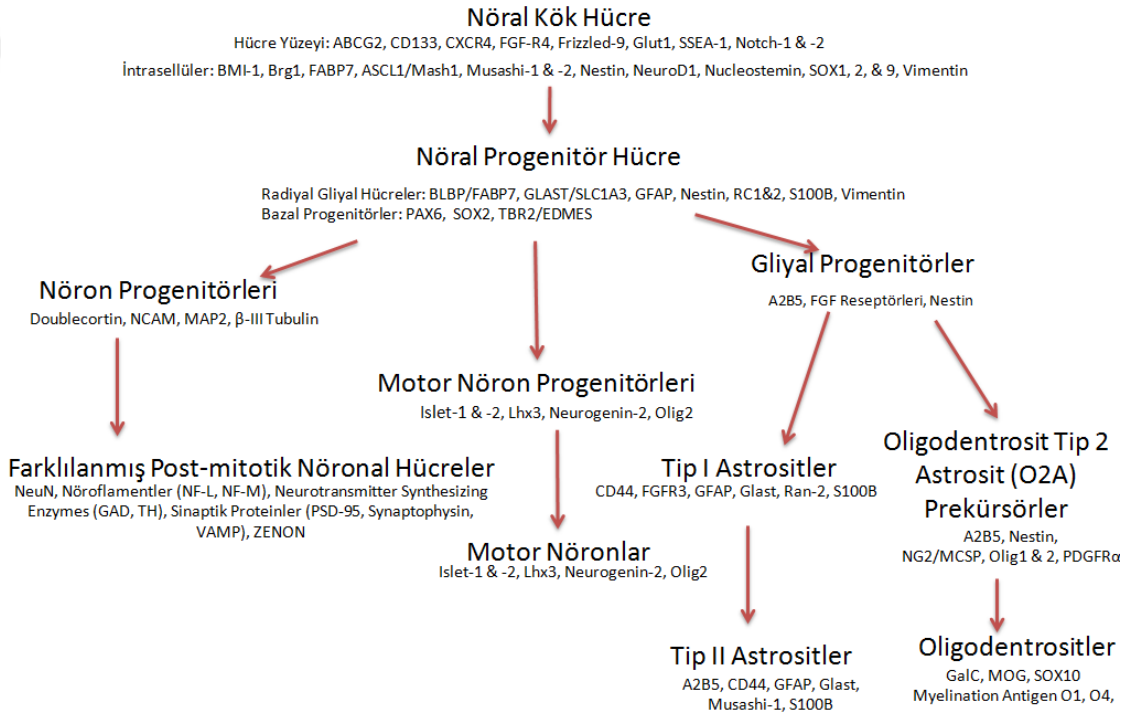
2.10.6. NK2 Homeobox 2 (NKX2.2)

Nkx2.2, nöral tüp oligodendrogenezinde rol oynayan başka bir homeobox transkripsiyon faktörüdür (Qi ve ark. 2001). Nkx2.2 ekspresyonu nöral plağın indüksiyonu esnasında Shh tarafından indüklenir ve taban plakasına bitişik ventriküler zonun küçük bir bölgesi ile sınırlandırılır. Olig2 ve Nkx2.2'nin ekspresyon alanları, nörogenezin sonuna kadar birlikte olur. Nkx2.2'nin, oligodendrosit özelliklerinin kazanılmasında değil oligodendrositlerin olgunlaşması sırasında daha önemli olduğu açıkça ortaya çıkmıştır (Sussman ve ark. 2000). Nkx2.2-pozitif hücreler aktif olarak çoğaldığı çevredeki gri ve beyaz cevher bölgelerine göç eder. Çift işaretleme deneyleri, Nkx2.2 pozitif göç eden hücrelerin çoğunluğunun oligodendrosit belirteçlerini birlikte eksprese ettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, oligodendrositlerin Nkx2.2 pozitif nöroepitelyal hücrelerden üretilebileceğini ve Nkx2.2'nin doğrudan oligodendrosit spesifikasyonunu ve farklılaşmasını kontrol edebildiğini göstermektedir (Richardson ve ark. 2006).

2.10.7. Platelet-Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü Alfa (PDGFR α)

Farklı ligand özgüllüklerine sahip iki PDGF reseptörü vardır; PDGF alfa-reseptörleri (PDGFR α), PDGF'nin hem A hem de B zincirlerini bağlarken, beta-reseptörleri (PDGFR β) sadece B zincirlerine bağlanır. Boş kalan reseptörler monomerik ve aktif değildir ancak PDGF bağlanması reseptör dimerizasyonunu uyarır ve tirozin kinaz alanlarını harekete geçirir. Gelişmekte olan medula spinaliste platelet-kökenli büyüme faktörü reseptör α (PDGFR α) (Hall ve ark. 1996, Pringle ve Richardson 1993) ve diğer farklılaşma belirteçlerini (Ono ve ark. 1995, Timsit ve ark. 1995, Yu ve ark. 1994) ekspresyonu ile tespit edilen oligodendrosit prekürsörleri, nöroepitelyumun ventral bölgesindeki dar bir bölgede çoğalırlar (Miller 1996, Pringle ve ark. 1998, Warf ve ark. 1991). Bu öncüller embriyonik 12. günde (E12.5) motor nöron üretimi dönemi bittikten sonra (Altman and Bayer 1984, Nornes and Das 1974) fare embriyolarında ortaya çıkmaya başlar (Calver ve ark. 1998). Bu bölgeden alınan oligodendrosit öncüllerinin üretilmesi, notokord ve zemin plakasından türetilen Sonic hedgehog (Shh) ile nöral tübün ventralizasyonunu gerektirir (Orentas and Miller 1996, Poncet ve ark. 1996, Pringle ve ark. 1996). PDGFR α , gelişme sonrasında oligodendrosit soyunun hücreleri ile sınırlandırılmış gibi görünmektedir. PDGFR α , glial hücrelerin bir alt kümesi tarafından eksprese edilir, ancak nöronlar tarafından ifade edilmemektedir. PDGFR α , MSS'de, tek bir

glial hücre dizisi ile sınırlandırılabilir: oligodendrosit-tip-2 astrosit (O-2A) soyunda. Bu sonuç, PDGFR α mRNA dağılımı ile O-2A soyu in situ histokimyasal belirteçleri arasındaki korelasyona (Hardy and Reynolds 1991, LeVine and Goldman 1988, Reynolds and Wilkin 1988) ve O-2A soy hücreleri üzerinde PDGFR α 'yı gösteren in vitro çalışmalara (Hart ve ark. 1989, McKinnon ve ark. 1990) fakat hücre kültüründe diğer hücrelerde gösterilmemesine (Hart ve ark. 1989) dayanmaktadır. PDGFR α + hücreleri, MSS'nin birçok bölgesinde bulunur, fakat subventriküler germinal tabakada nispeten seyrek görülmüştür; bu durum O-2A soy hücrelerinin, subventriküler zondan son varış yerlerine göç edene kadar (ya da hemen önce) PDGFR α eksprese etmeye başlamayabileceğini düşündürür.



Şekil.2.12. Nöral farklılaşma basamakları ve farklılaşma belirteçleri gösterilmiştir. İllüstrasyon nöral kök hücre farklılaşma hiyerarşisini göstermektedir.

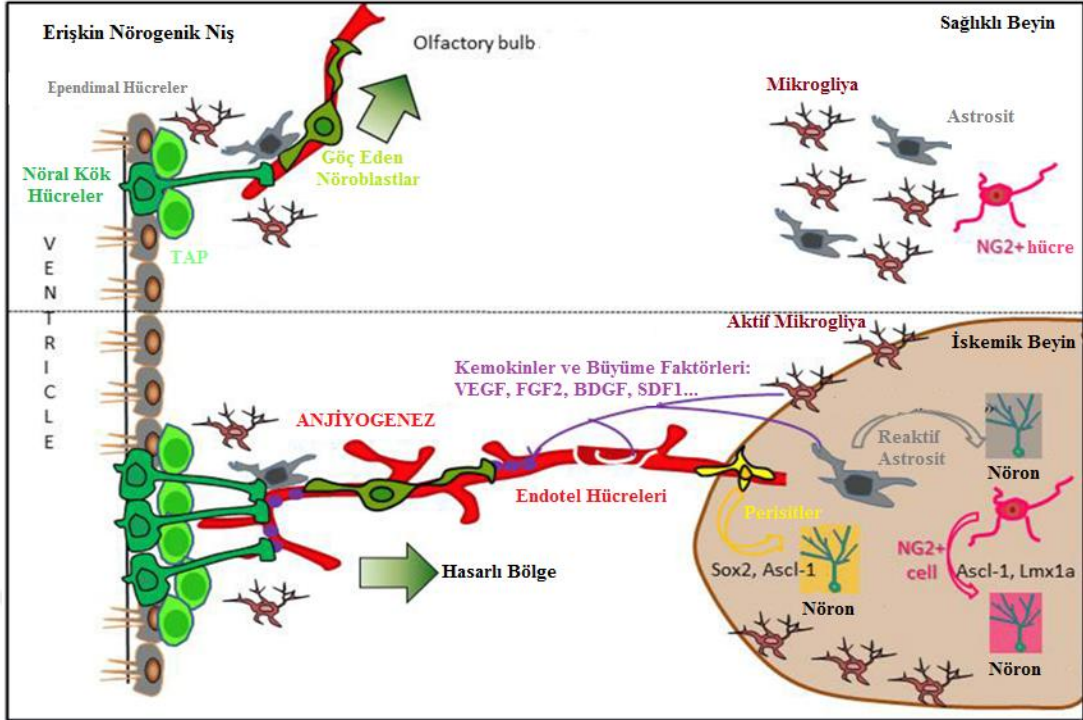
2.11. İskemi kaynaklı nörojenez

İskemi sonrasında zamanla, çeşitli hasar mekanizmalarına rağmen, çoğu nöron, belirli bir derecede işlevsel düzelme göstermiştir. Bu bulgu, sinir sisteminde nöronları, astrositleri ve oligodendrositleri üreten kendiliğinden yenilenen, multipotent hücreler olan erişkin sinir kök hücrelerinin keşfedilmesine yol açmıştır. Birçok çalışma, serebral iskemide, progenitör hücre çoğalmasını önemli ölçüde arttırdığını ve yeni çoğalmış hücrelerin beyin hasar gören alanlarına göç ettiğini göstermiştir (Kokaia ve Lindvall 2003, Lichtenwalner ve Parent 2006).

Ayrıca, fokal iskemiye takiben beyin korteksinde postiskemik nörogenezisi bildiren bazı çalışmalar da vardır. Bunun nedeni, kortekste yer alan progenitor hücrelerin, iskemi gibi patolojik koşullar altında nöron oluşturma potansiyellerini değiştirmiş olabileceğidir.

Normal koşullar altında, SVZ'de bulunan sinir kök hücreleri nöroblastlara farklılaşır ve rostral göç akımından olfaktor bulbusa göç ederek fonksiyonel internöron haline gelirler. Bununla birlikte, serebral iskemi ile uyarılan çeşitli patolojik süreçler, SVZ'daki nöroblastları, normal göç yolundan yaralanma alanlarına yönlendirmektedir (Şekil.2.13). Erişkin SGZ'de bulunan nöronlar, dentat gyrusa göç ederler ve dentat gyrus hücreleri (DGC'ler) haline gelirler (Lichtenwalner and Parent 2006, Wiltrout ve ark. 2007, Yamashita ve ark. 2006, Zhao C. ve ark. 2008). Bazı çalışmalar, yetişkin dentat gyrusundaki iskemiye bağlı nörogenezin, nöronal fonksiyon kapasitesi ile olgun DGC'ler ürettiğini ve iskemik beyindeki yeni üretilen DGC'lerin, normal hayvanlardakine benzer bir nöronal olgunlaşma seyrini izlediğini ileri sürmektedir (Lichtenwalner ve Parent 2006). Beyindeki üçüncü germinal zon, hipokampusu çevreleyen PPv'nin subependimal tabakası, hipokampal nöronları dolduran gerçek kök hücreleri ihtiva ettiği ve yeni çoğalan progenitorlerin, iskemik hücre ölümünü takiben hipokampal CA1'i göç edip yeniden fonksiyonel olmaya çalışıldığı düşünülmektedir (Wiltrout ve ark. 2007, Zhao C. ve ark. 2008).

İskemi kaynaklı nörogenezi düzenleyen moleküler mekanizmalar kısmen anlaşılmıştır. Bununla birlikte epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), kök hücre faktörü (SCF), eritropoietin (EPO), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve nitrik oksit (NO) olmak üzere, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), stromal hücre kaynaklı faktör-1a (SDF1-a) ve matriks metalloproteinazlar (MMPs) gibi iskemik beyindeki yeni proliferen progenitorlerin migrasyonunu modüle eden faktörler gibi postiskemik progenitor hücrelerde çoğalmayı düzenleyenlerde dâhil olmak üzere, şu ana kadar çok sayıda faktör bildirilmiştir (Kokaia and Lindvall 2003, Wiltrout ve ark. 2007). Bu faktörlerin nörogenez ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini uyararak veya bu transkripsiyon faktörleriyle etkileşerek nörogenezi düzenlediği bilinmektedir (Şekil.2.13).



Şekil.2.13. İskemi sonrasında gerçekleşen nörogenez ve anjiyogenez (Marlier ve ark., 2015).

2.12. Trofoblast

Plasenta, maternal ve fetal kan dolaşimleri arasındaki arayüzü sağlayan organ olup, anneyle yavru arasında besin maddeleri, oksijen, metabolitler ve diğer moleküllerin değişim yeridir (Watson ve Cross 2005). Trofoblast kök hücreleri trofoektoderm kaynaklıdır ve plasentadaki trofoblast hücrelerin kaynağıdır. Trofoblast hücrelerinin yapısal özellikleri; vasküler, endokrin ve immünolojik süreçleri modüle edebilme özelliğiyle metabolit değişimini kolaylaştırır ve optimize eder.

Trofoblast kök hücreleri ilk olarak Tanaka ve arkadaşları tarafından 1998'de fare blastositlerinden izole edilmiştir (Tanaka ve ark. 1998). Genbacev ve arkadaşlarının ise ilk kez 2011'de insan trofoblast progenitor hücrelerini plasentadan elde etmişlerdir (Genbacev ve ark. 2011). Trofoblast kök hücreleri öncelikle CDX2, Tead4, Eomes, Sox2, Gata3, Tcfap2c, Smarca4, Ets2, Elf5, Esrrb genlerini ifade ederler (Rielland ve ark. 2008, Roberts ve Fisher 2011). Günümüzde, CDX2 ve Eomes transkripsiyon faktörleri esas olarak trofoblast kök hücre belirteçleri olarak kabul edilmektedir (Johnson 2009, Lu C. W. ve ark. 2008). Bu faktörlere ek olarak, Fgfr-2 ve BMP-4 diğer bilinen trofoblast kök hücre belirteçleridir (Rielland ve ark. 2008). 2016 yılında Genbacev ve arkadaşları, Integrin α -4'ün, term plasentadan izole edilen trofoblast stem / progenitor hücrelerdeki en yüksek seviyede ifade edilen

faktör olduğunu göstermişlerdir (Genbacev ve ark. 2016). Bu nedenle, trofoblast progenitör hücre yüzeylerinde yüksek seviyedeki Integrin α -4 (Int α -4) ifadelerine göre ayrılabilir.

Trofoblast kök hücreleri, plasentada farklılaşmış hücrelerin öncüsü olup blastositin trofoektodermden veya ekstraembriyonik ektodermden köken alır (Tanaka ve ark. 1998). Trofoblast progenitör hücreler, in vitro koşullarda FGF4 içeren bir ortamda farklılaşmayıp prolifer olurlar. Kültür koşullarında FGF4 bulunmazsa trofoblast progenitör hücreler, plasentadaki diğer trofoblast hücrelerine farklırlar (Hemberger ve ark. 2004, Natale ve ark. 2009, Simmons ve ark. 2007, Tanaka ve ark. 1998).

Trofoblast progenitör hücreler hem trofoektoderm hem de iç hücre kütlesi belirteçlerini ifade eder. Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada trofoblast kök hücrelerinin, mezenkimal kök hücrelerde bulunmayan trofoektoderme spesifik belirteçler olan Cdx2, Fgfr-2, Eomes ve BMP4'ü ifade eder (Lee T. T. ve ark. 2012). Bu belirteçlere ek olarak; trofoblast kök hücreleri, iç hücre kütlesi belirteçleri olan Oct4, Nanog, FGF4 ve Sox2'yi ifade ederler (Lee T. T. ve ark. 2012). Akım sitomeri çalışmaları, 15. pasaj sonrası trofoblast kök hücrelerinin % 97,9 Oct4, % 95 Sox2, % 98,7 Nanog ve % 94 Cdx2 pozitif olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, insan trofoblast progenitör hücrelerinin homojen bir popülasyona sahip olduğunu göstermektedir. CD34 ve CD45 ekspresyonlarının yokluğu, hematopoetik kök hücrelerden farklı olduklarını ortaya koymaktadır (Lee T. T. ve ark. 2012). Uygun indüksiyonlarla bu hücrelerden osteositler, kondrositler, miyositler ve adipositler elde edilebilmektedir (Lee T. T. ve ark. 2012).

Plasental hücrelerin in vivo rejeneratif potansiyele sahip olduğuna dair birçok kanıt vardır; Gebelik sırasında fetal hücre mikrokimerizm gözlenir. Trofoblast hücreleri maternal dolaşıma katılırlar ve hasar görmüş organlara göç ederek transplante olurlar (Sueblinvong ve Weiss 2010). Ayrıca, gebelik dönemindeki kardiyomiyopatide kendiliğinden %50 oranında iyileşme olduğu iddia edilmektedir (Ro ve Frishman 2006). Kara ve ark. gebelikte miyokardiyak enfaktüs fare modelinde hasarlı maternal miyokarda fetal hücrelerin transfer olduğunu ve bu hücrelerin maternal kalpde bulunan hücrelere farklılaştığını göstermişlerdir (Kara ve ark. 2012).

İnsan trofoblast progenitör hücreler, Parkinson Hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel alternatif pluripotent hücreler gibi gözükmektedir. Retinoik asit, trofoblast progenitör hücrelerini dopaminerjik nöronlara farklılaştırmaktadır. Bu hücrelerin, hem akut hem de kronik Parkinson Hastalığı model sıçanlarda, nigrastriatal yolu tekrar oluşturduğu ve motor nöron eksikliğini fonksiyonel olarak azalttığı tespit edilmiştir (Lee T. T. ve ark. 2012).

2.13. İnme ve kök hücre

İnmeli hastalarda erişkin merkezi sinir sisteminin (MSS) onarımı için endojen hücre replasmanı, sınırlı yenileme kabiliyeti ve sinir hücrelerinin yavaş proliferasyonu nedeniyle yeterli değildir. Kök hücre tedavisi; muhtemelen nöronları koruma ve çeşitli nöral trofik faktörlerin salgılanması aracılığıyla hasar gören nöronların yerini alarak nöronal iyileşme için yeni ve umut verici bir aday olarak ortaya çıkmıştır. Temel ve translasyonel araştırmaların çoğu; embriyonik kök hücre (EKH'ler), indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH), nöronal kök hücre (NKH'ler) ve mezenkimal kök hücre (MKH') de dâhil olmak üzere dört tip kök hücre üzerinde odaklanmaktadır (Hao ve ark. 2014).

2.13.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH'ler)

Preimplantasyon embriyosunun iç hücre kütesinden türetilen EKH'ler, organizmanın neredeyse tüm hücre tiplerine farklılaşabilme ve kendini yenileme potansiyeline sahip hücrelerdir. EKH'lerin avantajı, ihtiyaç duyulan hücre miktarını karşılamak için in vitro olarak oldukça yüksek proliferasyon kabiliyetine dayanmaktadır. Buna ek olarak, EKH'ler, in vitro spesifik kültür koşullarında sinir hücre tiplerine farklılaşmak üzere indüklenebilir (Bain ve ark. 1995, Okabe ve ark. 1996, Reubinoff ve ark. 2001, Ying ve ark. 2003, Zhang S. C. ve ark. 2001). Fare EKH'leri fokal iskemi oluşturulan sıçan korteksine nakli yapıldıktan sonra lezyon bölgesinde EKH hücrelerden farklılaşan nöronlar, astrositler, oligodendrositler ve endotel hücreleri bulunabilir. Böylece EKH'ler aracılığıyla yapısal tamir ve fonksiyonel iyileşme gözlenmiştir. (Wei ve ark. 2005). Fare EKH'lerin veya EKH kaynaklı nöron benzeri hücrelerin korpus striatum içerisine nakli, orta serebral arter oklüzyonuna (MCAO) maruz kalan fokal iskemik sıçanlarda dopaminerjik fonksiyonu geliştirdi ve daha sonra davranışsal disfonksiyonu geri kazandırmıştır (Wei ve ark. 2005). Fare EKH'lerin intraserebral transplantasyonu MCAO'lu sıçanın motor ve duyuşal işlevini arttırabilir ve enfarktüs boyutunu azaltabilir (Reubinoff ve ark. 2000). EKH'nin dezavantajları

malign transformasyon ve teratom oluşumuna neden olma olasılığıdır (Reubinoff ve ark. 2000, Solter 2006, Thomson ve ark. 1998). Etik ile ilgili, sınırlı kaynaklar ve malign transformasyonun yüksek oranda görülmesi, EKH'lerin geniş bir şekilde uygulanmasını kısıtlamaktadır. Dolayısıyla, inme tedavisinde EKH uygulamaları ile ilgili çalışmalar çok sınırlı sayıdadır.

2.13.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH'ler)

Tanımlanmış faktörlerle birlikte somatik hücrelerden yeniden programlanan iPKH'ler, rejeneratif tıp alanında daha çekici hale gelmiştir. iPKH'ler başlangıçta dört transkripsiyon faktörünün(Oct3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4) fare embriyonik veya erişkin fibroblastlara aktarılması sonucunda elde edilmiştir (Takahashi and Yamanaka 2006). Daha sonra iPKH, umbilikal kord, plasental mezenkimal stromal hücreler, sinir kök hücreleri ve adipoz kaynaklı prekürsör hücreler gibi çeşitli dokulardan aynı tekniği kullanarak üretilmiştir (Cai ve ark. 2010, Tat ve ark. 2010). Bu hücreler, EKH'lerin morfolojisi ve büyüme özelliklerini kazanıp EKH'lere özgü genleri ifade ederler. MCAO oluşturulan farelere iPKH'lerin subkutan transplantasyonu sonucunda tümörlerin geliştiği gözlenmiştir.

iPKH'lerin fokal serebral iskemi sonrası subdural transplantasyonunun toplam infarkt hacmini etkili bir şekilde azaltabileceği ve davranışlarını önemli ölçüde iyileştirebileceği gösterilmiştir. Bir çalışmada, sıçan MCAO modelinde erişkin insan fibroblastlarından oluşturulan iPKH'lerin yaralı beyin alanına göç ettiği ve sensorimotor işlevleri önemli ölçüde iyileştirdiği belirlenmiştir (Jiang M. ve ark. 2011). Bununla birlikte, bir başka çalışmada geçici MCAO'nun fare beyine iPKH'lerin transplantasyonu, davranışsal düzelmeye yol açmamıştır (Kawai ve ark. 2010). Dikkat çekici olarak, iPKH'lerin bir kısmının nöroblastlara ve nöronlara farklılaştığı tespit edilmiştir. Böylece iPKH'lerinin inmede oluşan iskemi için yeterli nöronal hücreleri sağlamak açısından umut verici bir terapötik yaklaşım olabileceği düşünülmektedir. iPKH uygulamasıyla ilgili bir endişe de hücrel immünojenitedir. B6 fare embriyonik fibroblastlarından oluşturulan iPKH'lerin B6 farelere nakledildiğinde bağışıklık sistemi tarafından reddilmiştir (Zhao T. ve ark. 2011). Başka bir deyişle, iPKH'ler, otolog bile olsa, bağışıklık reddi yaratabilirler. Yeniden programlama sürecinde kullanılan faktörlerin onkojenik transkripsiyon faktörleri olduğu göz önünde bulundurulduğunda, iPKH'lerin tümörigenik potansiyeli endişe yaratmaktadır. Diğer taraftan, iPKH'lerin farelerin iskemik beyinlerine naklinden

sonra teratom oluşturduğu da gösterilmiştir (Kawai ve ark. 2010, Yamashita ve ark. 2011). Böyle olmasına rağmen iPKH'ler, tümöregenez süreçleri düzgün kontrol edildiğinde, iskemik inmeye yönelik umut verici bir potansiyele sahip olabilir.

2.13.3. Nöral Kök Hücreler (NKH)

Eksojen NKH'ler, iPKH'lerden, kemik iliği ve adipoz kaynaklı MKH'lerden, embriyonik NKH'lerden, fetal ve erişkin sinir sistemlerinden elde edilebilirler (Garzon-Muvdi and Quinones-Hinojosa 2009). Bu hücreler, EGF, FGF ve lösemi-inhibe edici faktör (LIF) gibi çeşitli büyüme faktörleri tarafından uyarıldığında *in vitro* koşullarda çoğalabilir ve retinoik asit gibi farklı faktörler tarafından indüklendiğinde nöronlar, astrositler ve oligodendrositler gibi farklı hücrelere dönüşebilirler. NKH'lerin bu özellikleri, felç de dâhil nörodejeneratif bozukluklarda dejenere olan sinir hücrelerinin yenilenmesi için umut vadeden adaylar arasında olmasını sağlıyor. İnsan fetüs NKH'leri, embriyonik kök hücrelerden daha az tümörjeniktir ve Batten hastalığında insan fetal NKH'leri kullanan klinik bir araştırmada beş hastada transplantasyondan 2 yıl sonra herhangi bir tümör tespit edilmemiştir (Lindvall and Kokaia 2011). Ayrıca, NKH'lar immünoreseksiyon sorununun temel nedeni olan MHC moleküllerini hiç veya düşük seviyede ifade etmektedir (Hori ve ark. 2003). Bununla birlikte, NKH'ler üzerinde MHC moleküllerinin ekspresyonunun inflamatuvar koşullar altında arttığını gösteren çalışmalarda vardır (Laguna Goya ve ark. 2011, Yin ve ark. 2008). NKH'lerin dezavantajı, *in vitro* kültüre edildiğinde sınırlı çoğalma ve farklılaşma kabiliyetini içerir.

Sıçan iskemi modelinde, hayatta kalan embriyonik NKH'lerin sayısı yetişkin NKH'lerinkinden anlamlı derecede yüksektir ve lezyon hacminin azaltılmasında ve nöronal fonksiyonun iyileştirilmesinde onun daha etkin işlevi olduğunu belirtilmiştir. Yetişkin NKH enjekte edilen farelerin daha belirgin Iba-1-pozitif inflamatuvar hücreleri, farklılıklar için bir gerekçe olabilir (Takahashi ve ark. 2008).

2.13.4. Mezenkimal Kök Hücreler

MKH'ler, ilk keşfedildiklerinde kemik iliği kaynaklı non-hemopoietik hücrelerin bir popülasyonunu oluşturdukları gözlemlendi (Friedenstein ve ark. 1966). Daha sonra, MKH'ler dolaşımdaki kan, göbek kordon kanı (GKK), plasenta, kalp, yağ dokusu, iskelet kası, pankreas ve diş pulpası da dâhil olmak üzere memelilerdeki hemen

hemen tüm dokulardan başarıyla izole edilmiştir (Zou ve ark. 2010). Uluslararası Hücresel Terapi Derneği Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından MKH'leri tanımlamak için üç kriter önerilmiştir:

- 1- İzole hücrelerin kültürde plastik tutunması,
- 2- CD105, CD73 ve CD90 ifadelerinin % 95'inden fazlasının pozitif ekspresyonu ve bunların CD34, CD45, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR'nin % 95'inden fazlasında negatif olması.
- 3- MKH'lerin in vitro olarak osteoblastlar, adipositler ve kondroblastlara farklılaşması (Dominici ve ark. 2006).

MKH'ler aynı zamanda sinir hücreleri, hepatositler, insülin üreten hücreler ve benzerlerine farklılanabilirler (Pittenger ve ark. 1999).

MKH'lerin intravenöz yolla verilmesi intraserebral enjeksiyona göre daha başarılıdır, çünkü daha az invaziv, daha nöroprotektiftir ve klinikte daha kolay kullanılır. Hücre tedavisinin optimal dozu halen belirsizdir. Klinik çalışmada 1-2 milyon hücre/kg vücut ağırlığı dozu önerilmiştir (Bhasin ve ark. 2013). Transplantasyonun optimal süresi, yaralı beynin dinamik olarak değişen ortamına bağlıdır. MKH'lerin erken dönemde verilmesi muhtemelen artan toksisite ve inflamasyon tepkisine karşı müdahalesi nedeniyle nöroprotektif rol oynar. İskemi sonrası 2.-3. haftada hücrelerin transplantasyonu, muhtemelen plastisite, anjiyojenez ve nörogenез gibi endojen nöron onarımını içeren süreçte daha başarılıdır. İskemik sıçanlarda transplantasyondan 1 yıl sonra bile artmış fonksiyonel iyileşme gözlenmiştir (Shen ve ark. 2007).

2.13.5. Klinik Denemeler

Gri cevherde, ak cevherde ve her ikisinde de iskemik lezyonu bulunan 12 hasta ile randomize olmayan bir çalışmada, otolog serumda çoğaltılan otolog MKH'ler inmeden 36-133 gün sonra intravenöz olarak gönderilmiştir. Tümörler, anormal hücre büyümeleri, nörolojik bozulma veya venöz tromboembolizm gibi hücre infüzyonuna bağlı yan etkiler gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak, Ulusal Sağlık Enstitüsü İnme Skalası (NIHSS) değişiminin günlük ortalama medyan hızı, infüzyondan sonraki ilk haftada artmış ve hücre infüzyonundan sonraki 1 hafta içinde MRG olarak değerlendirilen ortalama lezyon hacmi% 20 azalmıştır. Bu kör olmayan

bir çalışma olup, plasebo etkilerini veya inme doğal iyileşmesini dışlamamasına rağmen, otolog MKH'lerin transplantasyonunun uygulanabilir ve güvenli olduğunu kanıtlamıştır (Honmou ve ark. 2011).

Başka bir klinik araştırmada, orta serebral arterin kanlandığı bölgede inme geçiren dört hasta (üç iskemik ve bir hemarajik inme hastası) deneye dahil edilmiştir. Bir tek doz GKK MHK'leri MCA yoluyla enjekte edilmiştir. Tekrar eden inme, ölüm, ateş ve kızarıklık gibi yan etkiler 6 aylık takipte görülmemiştir. İskemik hastalardan ikisinde geliştirilmiş modifiye Rankin skalası (mRS, inmeli hastanın izleniminde kullanılan, inme şiddetini belirleyen ve bağımlılığı saptamak ve fonksiyonel iyileşmeleri değerlendirmek için kullanılan 0-6 arasında ölçeklendirme yapan bir ölçektir) ile iyileşme gözlenmiştir. Fakat bu çalışmada, az sayıda kayıtlı hasta ve kontrol eksikliği nedeniyle yaklaşımın etkinliği ve güvenilirliği belirlenememektedir (Jiang Y. ve ark. 2013).

Farklı bir çalışmada, 50-60 milyon kemik iliği kaynaklı MKH, 3 ay ile 2 yıl içerisinde inme teşhisi konan hastalara intravenöz yolla verilmiştir. Kök hücre tedavisi gören hastalarda mortalite veya hücreye bağlı advers reaksiyonlar görülmemiştir ve Modifiye Barthel İndeksi (mBI), kök hücre grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzelme göstermiştir Kök hücre infüzyonundan sonra artmış bir sinirsel plastisite saptanmıştır (Bhasin ve ark. 2013).

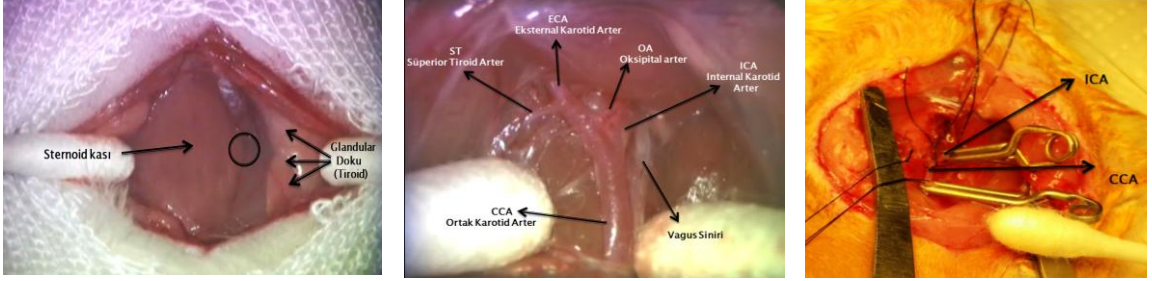
3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Geçici Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması

3.1.1. Geçici MCAO

Bu araştırmada kullanılan 300-320 gr ağırlıkları arasındaki 150 tane wistar sıçan Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden elde edildi. Ortam sıcaklığı $28\pm 4^{\circ}\text{C}$ idi ve denekler için normal diyet ve su kullanıldı. 300g-320g Wistar Rat induksiyon odasına yerleştirilir ve %4 isoflurane ile anestezi edildikten sonra stereoskopik mikroskop altında, ventral orta alan insizyonu gerçekleştirilir ve yüzey bağ dokusu diseke edildi. Yüzeydeki bağ dokusunu altından glandular doku yani tiroid bezleri görülmektedir. Glandular doku künt diseksiyonla ayırıldıktan sonra altında trakea kası görülür. Trakea kasının solundan Carotid Arter bulunana kadar künt diseksiyon yapıldı. Künt diseksiyon tercih edilmesinin nedeni doku hasarını minimize etmek istenmesidir. Eksternal, internal, and common carotid arterler (ECA, ICA, CCA) bu aşamada görülmektedir. CCA büyüktür ve nabız atımı görülmektedir. Vagus siniri CCA ve ICA'nın lateralinde görülür. ECA'nın iki dalı oksipital arter (OA) ve süperior tiroid arter (ST) 6/0 ipek ile bağlanıp koteter ile kesildi. Bu daha büyük damarların hareketliliğine izin verir. ECA mümkün olduğunca distalden 6/0 ipek ile bağlandı. Bir başka 6/0 ipek ECA'nın ICA ile birleşim yerinin yakınından gevşekçe sarılıp fakat bunun damarı tıkamamasına dikkat edildi. Mikroklempler CCA ve ICA'nın birleşim yerlerinin yakınlarına yerleştirildi. ECA'daki iki ipek bağ arasına ilk arteriotomi gerçekleştirildi. 2.0 mm uzunluğunda 0.39 mm çapında silikon tipi olan 2.0-2.2 cm 4/0 monofilament naylon suture ECA lümenine CCA'ya doğru mikroklemplerin olduğu bölgeye doğru itildi. ECA etrafındaki suture sıkılarak naylon suturen yeri stabilize edildi ve kanama önleildi. Sonrasında ICA'daki mikroklempler yavaşça çıkarıldı. Naylon suture ECA'dan ICA lümenine doğru MCA'ya ulaşana kadar itilmeye devam edildi. Bu uzunluk tipik olarak 300 gr rat için 1.8 -2.0 cm uzunluğundadır. Bu uzunluk suture yerleştirilmeye başlanmadan önce işaretlenir. Bir miktar suture yerleştirildikten sonra bir direnç hissedilebilir. Eğer bu durum suturen çoğunluğu hala dışarıdayken hissediliyorsa suture yanlış yere dönmüş ve pterygopalatine artere (PPA) girmiş demektir. Bu durumda suture bir miktar geri çekilir ve biraz kıvrılarak daha medial olan ICA boyunca ilerletmeye çalışılır. Suture 2cm işaretli bölgeye kadar girip bir direnç hissetmeye başlayana kadar lümen

içerisinde itildi. Zaman ölçer başlatıldı ve 90 dk tıkanıklık süresi ölçülmeye başlandı. CCA'daki mikroklempt çıkarıldı. Daha sonra deri 3/0 ipek ile hızlıca kapatıldı. Bütün bir paternin izlenmesi daha sonra açılmasında kolaylık sağladı. Kırmızı ışık altında hayvanın anesteziden uyanması beklendi.



Şekil.3.1. MCAO diseksiyon aşamaları. Glandular doku (tiroid) ve Sternoid kası (trakea kası) şeklinde görülmektedir. Tiroidin künt diseksiyonu sonrasında trakea kası görülmektedir. Kasın yanında şekilde görülen daire içerisinde diseksiyon yapılarak damarlara ulaşılır. Trakea kasının solundan Carotid Arter bulunana kadar künt diseksiyon yapılır. Künt diseksiyon tercih edilmesinin nedeni doku hasarını minimize etmek istenmesidir. Eksternal, internal, and common carotid arterler (ECA, ICA, CCA) bu aşamada görülmektedir. CCA büyüktür ve kan atımı görülmektedir. Vagus siniri CCA ve ICA'nın lateralinde görülmektedir. CCA ve ICA'nın birleşim yerlerinin yakınlıklarına yerleştirilmiş mikroklempler şekilde görülmektedir. Bu sayede kan akışı engellenerek arterotomi ve endovasküler süturun yerleştirilmesi sırasında kanama engellenecektir.

3.1.2. Reperfüzyon

Tıkanıklık periyodunun bitmesine çok az kala sıçan yeniden anestezi edildi ve ilk seferinde yapıldığı gibi dezenfekte edildi ve dikişler kesilerek açıldı. CCA üzerine önceki gibi mikroklempt yerleştirildi. Tıkayıcı süturu ICA boyunca çekip suture başı ICA sonunda görünene kadar çekildi. Suture ICA/ECA'dan tamamen çıkarılmamalıdır. ICA'da suturen bittiği yere mikroklempt yerleştirildi. Suture tamamen çıkarılıp, ECA tamamen sıkıca bağlandı. Tıkanıklığın tam giderilme saati (reperfüzyonun başlama saati) kaydedildi. ICA'daki mikroklempti çıkarıldı. CCA'daki mikroklempti çıkarıldı. Alanı steril Serum Fizyolojik (SF) ile ıslatıp 3/0 Katgüt ile iç dokular ve 3/0 ipek ile deri dikilerek kapatıldı. 0,1 ml Contramal intramüsküler olarak verildi. 5 ml SF intraperitoneal olarak enjekte edildi. Reperfüzyon sürecinde hidrasyon sağlandı. Anesteziden uyanan sıçan davranışsal analiz için kuyruğundan kaldırılarak tutuldu ve hayvan her iki yöne de dönebiliyor mu diye test edildi. Sağa doğru kıvrılması beklendi.

3.2. Term Plasentadan Trofoblast Progenitör Hücrelerinin İzolasyonu

Çalkalayıcı su banyosu 37°C'ye ve santrifüj 4°C'ye ayarlanır. Cytowash medyumunu hazırlandı.

Tablo 3.1. Cytowash medyum içeriği ve hazırlanması

% 96.5 DMEM high glucose (glutaminsız)	500 ml
% 2.5 FBS	12.5 ml
% 1 P/S (100X)	5 ml
% 1 Glutamin plus (100X)	5 ml
% 0.1 Gentamycin (50 mg/ml)	0.5 ml

Disseksiyon öncesi plasenta buz üzerinde tutuldu. Plasenta parçaları petri kabına alındı. Villuslar küçük parçalara ayrıldı ve HBSS ile yıkandı. Küçük makas ve pensler yardımıyla koryonik, desidual dokular, kan pıhtıları uzaklaştırıldı. Dissekte edilen dokular 50ml'lik birkaç tüpe alınıp üzerlerine birkaç kere bol miktarda cytowash eklenip boşaltılarak dokudaki kan uzaklaştırıldı. 7 dk 1200 rpm 4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant atılıp ve falkonlardaki dokular tartıldı. Üzerlerine miktarları yazıldı. Bunların toplamına göre enzimler hazırlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Kollajenaz ve tripsin enzimleri içeriği ve hazırlanması

100 ml Kollajenaz enzimi için; 100 ml 1xPBS without Ca2 and Mg2, Gibco 14190 içinde	
Collagenase Tip I, Sigma C2674 Unit activity: 1212 unit/mg	15 mg
DNase I, Sigma DN25	40 mg
BSA, Sigma A7906	100 mg
Hyaluronidase, Sigma H3506	69 mg
100 ml Tripsin enzimi için; 100 ml 1xPBS without Ca2 and Mg2, Gibco 14190 içinde	
Tripsin Tip I, Sigma T8003 Unit activity: 10,000 unit/mg	6.9 mg
DNase I, Sigma DN25	40 mg
EDTA, Gibco 15576-028	20 mg

Dokular toplanarak steril şişedeki kollajenaz I enzimi üzerine konularak 37°C su banyosunda 175 rpmde 38 dakika (dk) çalkalandı. Karışımdan pipetle 10 µl alarak 10X mikroskopta incelendi. Eğer sadece eritrositler görülürse ve trofoblast yoksa veya az sayıdaysa 5 dk daha çalkalandı. Süre sonunda tekrar mikroskopa alındı. Trofoblast hala az sayıdaysa 2 dk daha çalkalandı. Şişe su banyosundan alınıp laminer kabin içine, buz üzerine konularak biraz beklendi ve dokuların çökmesi sağlandı. Süpernatant dikkatlice çekilip atıldı. Pelletin üzerine tripsin I konulup 37°C su banyosunda 175 rpmde 10 dk çalkalandı. Karışımdan pipetle 10 µl alarak 10X mikroskopta incelendi. Tekli trofoblastların yanısıra trofoblast kümelerinin de gözlenmesi gerekir. Bu arada 50 lik falkona enzim hacminin %10'u kadar (1,5 ml) Fetal Sığır Serum (FBS) konulur ve üzerine 2 kat gazlı bez konuldu. Tripsin I sindirimi bittikten sonra şişe su banyosundan alınıp laminer kabin içine, buz üzerine

konularak biraz beklendi ve dokuların çökmesi sağlandı. Süpernatant pipet yardımıyla dikkatlice çektilererek, buz üzerinde, üstünde 2 kat gazlı bez bulunan FBS içeren 50 ml'lik tüpe (her falkona 15'er ml olacak şekilde) konuldu ve üzerine dolana kadar hücre yıkama solusyonu eklendi. Tripsin I falkonu yazılarak bekletildi. Şişedeki pellet üzerine tripsin II konularak 37°C su banyosunda 175 rpmde 10 dk çalkalandı. Karışımdan pipetle 10 µl alarak 10X mikroskopta incelendi. Trofoblast kümelerinin sayıca fazla gözlenmesi gerekir. Bu arada 50 lik falkona enzim hacminin %10'u kadar (1,5 ml) FBS konuldu ve üzerine 2 kat gazlı bez konuldu. Tripsin II sindirimi bittikten sonra şişe su banyosundan alınıp steril kabin içine, buz üzerine konularak biraz beklendi ve dokuların çökmesi sağlandı. Süpernatant pipet yardımıyla dikkatlice çektilererek, buz üzerinde, üstünde 2 kat gazlı bez bulunan FBS içeren 50 ml'lik tüpe (her falkona 15'er ml olacak şekilde) konuldu ve üzerine dolana kadar cytowash eklendi. Tripsin II falkonu yazıldı. Tripsin I ve II falkonları 1200 rpm'de 7 dk 4°C'de santrifüjlendi. Süpernatantlar atıldı ve falkonlardaki pelletler tek bir falkona toplanarak üzerine dolana kadar cytowash eklenir ve resüspanse edildi. Falkon tekrardan 1200 rpm'de 7 dk 4°C'de santrifüj yapıldı. Bu arada 50 ml'lik falkona Percoll solüsyonu hazırlandı. (Çok yavaş bir şekilde 6'şar ml giderek azalan konsantrasyonlarda (%70, %60, %50, %40, %30 ve %20) konuldu. 4°C'de tutuldu. Her 7 gr doku için bir falkon kullanıldı. Öncelikle %90 Percoll stok solüsyonu hazırlanır:

270 ml %100 Percoll + 30 ml 10X HBSS without phenol red

Tablo3.3. Farklı konsantrasyonlarda Percoll solüsyonlarının hazırlanması

Final Percoll konsantrasyonu	%90 Percoll stok solüsyonu	1X HBSS
%70	35 ml	10 ml (without phenol red)
%60	30 ml	15 ml (with phenol red)
%50	25 ml	20 ml (without phenol red)
%40	20 ml	25 ml (with phenol red)
%30	15 ml	30 ml (without phenol red)
%20	10 ml	35 ml (with phenol red)

Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet üzerine kollajenaz II eklendi ve resüspanse edildi. Steril şişe içine alınarak 37°C su banyosunda 150 rpm'de 3 dk çalkalandı. (Trofoblast kümelerinin ayrılması için) (5 dk dan fazla olmamalıdır) Süzgeçten geçirildi ve 1200 rpm'de 7 dk 4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine her percoll falkonu için 4 ml DMEM medyumunu eklendi ve resüspanse

edildi. (Her 7 gr doku için bir percoll falkonu kullanılır.) Solüsyon percoll falkonu üzerine kenardan çok yavaş şekilde konuldu. 2700 rpm'de 25 dk 4°C'de santrifüj yapıldı. Percoll gradiyesindeki 30-20 arası bulutsu katman (trofoblastlar) pipetle başka bir falkona alındı. Üzerine dolana kadar cytowash eklenir ve resüspanse edildi. Falkon 1200 rpm'de 7 dk 4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine tekrar dolana kadar cytowash eklendi ve resüspanse edildi. Falkon 800 rpm'de 6 dk 4°C'de santrifüjlendi. Pelletteki hücrelerin sayımı gerçekleştirilirdi.

3.3. Manyetik Aktive Hücre Ayrımı (MACS)

Sonraki adımda ise manyetik aktive hücre ayrımı (MACS) yapıldı. Herbir falkona 500 mikrolitre antikorlarla bağlanmış boncuklar pipetlendi. (Invitrogen goat anti mouse, 110.33) %0.1 BSA+ 200mM EDTA' dan oluşan yıkama solusyonuyla boncuklar yıkandı. Agzı açık bir şekilde MACS'a konulup ve 2-3 dakika bekletildi ve MACStan çıkarmadan yıkama solüsyonunun çekildi. Tüpler MACStan alınıp ve 500 mikrolitre yıkama solüsyonu ve 25 mikrolitre anti HLA-ABC antikor (Serotec: MCA81 mouse Anti Human HLA-ABC antikor) konuldu. 1 saat oda ısısında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. 1 saat inkübasyon süresi dolarken, FCS falkonlarını su banyosuna konuldu. 1 saatin sonunda falkonlar çalkalayıcıdan alıp MACS aletine konuldu. 3 defa yıkama yapıldı. Hücreler santrifüjden sonra peletleri 12 ml yıkama solüsyonu (%0,1 BSA) ile resüspanse edildi. Boncukların içine 6ml hücre eklenip 30 dk 4 derecede çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. 30 dk inkübasyonun sonunda solüsyon/hücreler toplanıp tekrar FBS ile karıştırıldı. HLA-ABC negatif seçilimin ardından hücreler benzer yöntem ile Integrin α 4 ile pozitif olarak da MACS kullanılarak seçildi.

3.4. Hücrelerin Flow Sitometre ile Karakterizasyonu

Hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve yıkandı (BD marka stain buffer ile). 1400 rpm +4°C 5dk santrifüj edildi. 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde pelet "BD marka Stain buffer" ile resüpanse edildi. 1-10 arası tüpler yazıldı (1.5 ml'lik steril eppendorf). 1×10^5 hücre/ml hücre süspansiyonundan 100 μ l hücre tüm tüplere pipetlendi. Böylece her bir eppendorfa 1.10^4 hücre/ml konsantrasyonda hücre konuldu. Hücreler %4 Paraformaldehit ile fikse edilip PBS ile yıkandı. Hedef proteinlerin nükleer olması sebebiyle %0,5 Triton içeren PBS ile 5 dakika inkübe edilerek permeabilizasyon yapıldı. Her bir tüp için belirlenmiş olan antikorlardan uygun miktarda pipetleme yapıldı.

1. tüp: - / - (Sadece hücre (100 µl))
2. tüp: Negatif İzotip Kontrol (1:200, Dako, X0903)/ FITC-Goat anti rabbit (1: 250, Santa Cruz, sc-2012) (20 µl)
3. tüp: - / FITC-Goat anti rabbit (1: 250, Santa Cruz, sc-2012) (20 µl)
4. tavşan monoklonal Cdx2 (1:100, Cell Signaling, Danvers, MA)/ FITC-Goat anti rabbit (1: 250, Santa Cruz, sc-2012)
5. tavşan poliklonal EOMES (1:100, Allele, San Diego, CA)/ FITC-Goat anti rabbit (1: 250, Santa Cruz, sc-2012)

Tüpler her antikor muamelesinde kısaca vortekslendi ve 20 dakika inkübe edildi. Ardından 1 ml Stain buffer ile 2 kez yıkandı. (2 yıkama arası 1400 rpm, 4°C derecede 5 dk santrifüj). Santrifüj sonrası pelet 300-500µl Stain buffer ile resüspanse edildi ve FACS Aria III Cell Sorter flow sitometri aleti ile flow sitometri ile analiz edildi.

3.5. Hücrelerin İmmüno Floresan ile Karakterizasyonu

Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüj edilip süpernantantları atıldıktan sonra Thoma lamında sayıldı. Chamber slaytlar jelatinle kaplandı ve en az 2 saat beklendi. Chamber slide'lara hücre-medyum süspansiyonu konuldu. (4'lu chamber slide için kuyucuk başına 10^4 hücre - 500 µl medyum içinde). Gece boyunca 37°C'lik inkübatörde tutuldu. Chamber slide'lar PBS'le yıkandı ve ters kapatılarak en az 1 saat oda ısısında kurumaları sağlandı. Hücreler soğuk, 1:1 metanol-aseton karışımı ile -20°C'de 10 dk boyunca fikse edildi. Fazla fiksatif uzaklaştırıldı. PBS ile yıkanır (2x5 dk) .Ultra V Block olarak isimlendirilen farklı hayvanların serumunu içeren serum kokteyi ile 5 dk boyunca bloklandı. 1 saat oda sıcaklığında primer antikor ile inkübasyon yapıldı. Primer antikor, antikor dilüe edici solusyonla dilue edilip hazırlandı. İzotip kontrolleri de primer antikorlarla aynı konsantrasyonda hazırlandı.

Antikorlar:

- 1- Tavşan monoklonal Cdx2 (1:100, D11D10; Cell Signaling, Danvers, MA),
- 2- Tavşan poliklonal EOMES (1:100, HPA028896; Atlas, San Diego, CA)

PBS ile 3x5 dk yıkama yapıldı. Florasan işaretli, primer antikora uygun sekonder antikor Keçi anti-tavşan IgG-Alexa Flour (1:250, Invitrogen, Carlsbad, CA) hazırlandı ve 1 saat, karanlıkta, oda ısısında inkübasyon yapıldı. PBS ile 3x5 dk yıkama yapıldı. DAPI'li kapama solüsyonu ile kapatma yapıldı.

3.6.Hücrelerin Nöronal Yönlendirilmesi ve Belirlenmesi

- Complete STEMdiff Medyum: 2 mL Supplement A ve 100 µL Supplement B ve 1 mL P/S, 98 mL STEMdiff Neural Progenitor Bazal Medyuma karıştırılır. Complete STEMdiff Neural Progenitor Medyum 4°C' de 2 haftaya kadar saklanabilir, dondurulmamalıdır.
- Complete Farklılaşma Medyumu: 100 ml Complete STEMdiff Neural Progenitor Medyum'a 2 ml Neural Survival Factor-1 (NSF-1) (CC-4323, LONZA), 10 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (B3795-10UG, SIGMA) ve 0.2 ml Gentamisin eklenerek nöral farklılaşma medyumu oluşturulur.
- BDNF (B3795-10UG): 100 µL dH₂O'da çözülerek 0.1 mg/mL stok solüsyonu elde edilir. 50 µL olarak aliküatlanır. 40 mL medyum için 4 µL BDNF stok solüsyonu kullanılır.

Hücreler 10⁴ hücre/well konsantrasyonda olacak şekilde, önceden poli-lizinle kaplanmış 24-well platelerde nöral farklılaşma medyumuyla 37°C'de % 5 CO₂ kültüre edilir. Medyum 2 günde bir değiştirilerek 20 gün boyunca kültüre edilir. Sonrasında NeuN ile immünofloresan yapılarak ve krezil viyole boyanmalarıyla yönlendirme teyit edilir.

3.7.Hücrelerde Anjiyogenik Faktörlerin mRNA Miktarlarının Belirlenmesi

3.7.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- MagNAlyser Green Beads (Doku parçalamak için kullanılan Bilye içeren tüpler) (Roche, #03358941001)
- Trizol (Invitrogen, #15596-026)
- BCP (1-Bromo-3-chloropropane, Sigma, #B9673)
- İzopropanol (Sigma, # I-9516)
- DNase/RNase içermeyen distile su (Gibco, #10977-035)
- MagNAlyser: Roche

- Thermomixer Comfort: Eppendorf
- MiniSpin: Eppendorf
- Soğutmalı Santrifüj: Eppendorf, 5417R

1. hTPC hücrelerinden mRNA eldesi için 24 saatin sonunda 75cm²'lik flasklardaki hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı ve hücreler 1ml Trizol ile kazındı ve steril eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüm grupların kazıma işlemi tamamlandıktan sonra 5 dakika beklendi.

2. Eppendorfların üzerine 100 mikrolitre BCP eklenerek altüst etmek sureti ile karışması sağlandı ve ardından 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

3. Doku parçalarını içeren tüpler, oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 3 saniye kısaca spin edilerek doku debrisinin dibe çökmesi sağlandı. Bilyelerin üzerinde kalan sıvı kısım yeni bir eppendorfa aktarıldı ve üzerine 100 mikrolitre BCP eklenerek altüst etmek sureti ile karışması sağlandı. Eppendorflar 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

4. Bu sürenin sonunda tüpler, 15 dakika, +4°C'de, 11.000 rpm'de santrifüj edildi.

5. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde RNA'nın bulunduğu şeffaf kısım, steril 1.5 ml'lik yeni bir tüpe alındı.

6. Tüpe 500 mikrolitre izopropanol eklenip altüst ederek karışması sağlandı ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.

7. Bu sürenin sonunda, 8 dakika, +4°C'de, 11.000 rpm'de santrifüj edildi.

8. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp geriye kalan pelet üzerine 1 ml %70'lik etanol konularak yıkama gerçekleştirildi ve ardından 5 dakika, +4°C'de, 8400 rpm'de santrifüj edilerek süpernant atıldı.

9. Elde edilen pelet oda ısısında etanolün uçması için en fazla 10 dakika bekletildikten sonra, 50 mikrolitre RNaz içermeyen distile su ile çözüldü.

10. Çözülmüş olan RNA'yı içeren tüpler, Thermomikser cihazında 55 derecede 10 dakika inkübe edildi ve ardından -80°C'de muhafaza edildi.

3.7.2. DNaz uygulaması

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- UV Half Plate Area (With UV Transparent Bottom, 96 well, Corning #3679)
- DNase I (İnvitrogen,# 18068-015)
- DEPC su (DEPC Treated water, Pyrogen Free, İnvitrogen, #46-2224)
- Spektrofotometre: µQuant BioTek Spectrophotometer

İzole edilen total RNA'ların absorbans değerleri Spektrofotometre cihazında yapılan ölçüm ile belirlendi. RNA miktarı = (Absorbans değeri) x (dilüsyon faktörü) x (RNA sabiti (40)) formülü ile hesaplandı. İşlem basamakları aşağıda belirtildiği gibi devam etti.

1. RNA konsantrasyonu 2 mikrogram olacak şekilde hesaplama yapılarak genomik DNA'nın ortamdaki uzaklaştırılması için izole edilen total RNA ayrı bir tüpe alınarak DNaz uygulaması gerçekleştirildi (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. DNaz Reaksiyonu içeriği ve hacimleri

DNaz I enzimi	1 mikrolitre
10X DNaz I tamponu	1 mikrolitre
DEPC su	10 mikrolitre'ye tamamlanacak şekilde hesaplama yapıldı

2. 0,2 ml'lik steril PCR tüpüne konulan içerikler, 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
3. Bu sürenin sonunda 1 mikrolitre DNase stop solüsyonundan konuldu. Vorteks yardımı ile içeriğin tamamen karışması sağlandı ardından tüpler spin edildi ve 65 derecede 10 dakika inkübe edildi.
4. Bu sürenin sonunda tüpler buz üzerine alındı.

3.7.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, #18080-051)
- PCR Cihazı: MyCycler Thermocycler, BioRAD

1. DNase muamelesi yapılan RNA örneklerinden 8 mikrolitre 0.2 mikrolitre'lik yeni bir steril PCR tüpüne kondu. Üzerine 1 mikrolitre Random Hexamers ve 1 mikrolitre 10mM dNTPmix pipetlendi.
2. Bu karışım 65°C'de 5 dakika bekletilerek RNA'daki ikincil kıvrımların çözülmesi sağlandı.

3. Bu sürenin sonunda tüpler buza alınarak karışım üzerine, aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi hazırlanmış olan 10 mikrolitre'lik cDNA sentez karışımı konuldu.

Tablo 3.5. cDNA sentez reaksiyonu içeriği ve hacimleri

İçerik	Hacim
10X RT buffer	2.0 mikrolitre
25mM MgCl ₂	4.0 mikrolitre
0.1 M DTT	2.0 mikrolitre
RNase out	1.0 mikrolitre
Superscript III	1.0 mikrolitre
Toplam	10.0 mikrolitre

4. PCR cihazında kurulan reaksiyon ile tüpler, 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 50 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edildi.

5. Bu sürenin sonunda tüpler buza alındı. Tüplere 1 mikrolitre RNase H kondu ve vorteks yardımı ile karıştırılarak ardından spin edildi.

6. Ardından tüpler 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 80 mikrolitre DEPC su eklenerek toplam hacim 100 mikrolitreye tamamlandı. Vorteks-spin işleminden sonra elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.7.4. qRT-PCR uygulaması

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, # 204054)
- PCR Strip Tüpleri (Axygen, #PCR-0108-LP-RT-C)
- Real Time PCR Cihazı: StepONEplus Real Time PCR System, Applied Biosystems

1. Deney gruplarından yukarıda belirtildiği gibi elde edilen cDNA'lar qRT-PCR uygulamasında kullanıldı.

2. Tablo 3.6'da belirtilen içerikler konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Tablo 3.6. qRT-PCR Reaksiyonu içeriği ve hacimleri

İçerik	Miktarları (mikrolitre)
2X SybrGreen Mastermix	12.5
Primer ileri (10 mikrom)	1
Primer geri (10 mikrom)	1
cDNA	2
RNase içermeyen su	8.5
Toplam hacim	25 mikrolitre

3. VEGF, VEGFR1, VEGFR2 ve Beta Aktin için qRT-PCR uygulaması ikili (dublik) olarak gerçekleştirildi.

3.7.5. qRT-PCR uygulamasında planlanan PCR programı:

Denatürasyon: 95°C'de 5 dakika

Amplifikasyon: 35 siklus

95°C...10 saniye,

55°C...30 saniye,

72°C...30 saniye

Melting curve

1 siklus: 95°C...1 dakika, 55°C...1 dakika

VEGF, VEGFR1, VEGFR2 ve Beta aktin için hazırlanmış strip tüpler qRT-PCR aletinde okundu ve software programı yardımıyla CT (siklus eşik değerleri) değerleri belirlendi. Elde edilen CT değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülünde kullanılarak her genin (Tablo3.7) kontrol grubuna kıyasla göreceli değişim düzeyleri hesaplandı. Amplifikasyon, 35 siklusta gerçekleştirildi. Ayrıca, Melting Curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm değerleri karşılaştırılarak PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirildi

Tablo 3.7. qRT-PCR için kullanılan oligonükleotid sekansları

	Forward primer	Reverse primer	Annealing sıcaklığı (°C)	Baz çifti sayısı
VEGF	5'-GCAGAATCATCACGAAGTGG-3'	5'-CTGCATGGTGATGTTGGACT-3'	54	214
VEGFR1	5'-GCAAGATTCAGGCACCTATG-3'	5'-CGAGGTTTCCTTGAACAGTGA-3'	53	373
VEGFR2	5'-GCATCGAGCTCTCATGTCTG-3'	5'-CTGGCTACTGGTGATGCTGT-3'	53	277
Beta Aktin	5'-CATGAAGATCCTGACCGAGC-3'	5'-CAGACAGCACTGTGTTGGCA-3'	55	335

3.8.ELISA Yöntemi Protokolü

Hücrelere ait süpernatantlardaki protein miktarını belirlemek için İnsan VEGF (R&D Systems, DVE00, MN, USA), VEGFR1 (R&D Systems, DVR100, MN, USA) ve VEGFR2 (R&D Systems, DVR200, MN, USA) ELİSA kitleri üreticinin önerdiği prosedür uyarınca kullanıldı. Kısaca;

1. 10 X yıkama solüsyonu 1 X olacak şekilde dH₂O ile dilüe edildi.
2. Kör ve örnek konulacak olan kuyucuklara 100 µL Assay solüsyonu konuldu.
3. Standartlar, kör ve örnekler kuyucuklara duplikler halinde yüklendi.
4. Antikor solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi ve yapışkan kapatıcı film ile iyice kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
5. Kapatıcı film kaldırılıp solüsyonlar uzaklaştırıldı.
6. Kuyucuklar 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
7. 100 µL enzim solüsyonu her bir uyucuğa eklendi ve yapışkan kapatıcı film ile iyice kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

8. Kapatıcı film kaldırılıp solüsyonlar uzaklaştırıldı.
9. Kuyucuklar 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
10. 100 µL substrat solüsyonu kuyucuklara eklenip yapışkan kapatıcı film ile iyice kapatılarak oda sıcaklığında 5-20 dakika inkübe edildi. Kuyucuklarda mavi rengin gözlemlenmesi reaksiyonun durdurulmasına karar vermede rol oynar. Substrat solüsyonu ile yapılan tüm çalışmalar karanlıkta yapılmalıdır.
11. 100 µL durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Tamamen durdurulduğundan emin olmak için plate elle sallanmalı ve mavi rengin net sarı renge dönüştüğü gözlemlenmelidir.
12. Plate 450-590 nm absorbans değerinde spektrofotometre ile okutuldu. Kuyucuklarda hiç köpük kalmamasına dikkat edilmelidir.

3.9. Deney Grupları

112 hayvana term plasentadan izole edilen 6×10^5 hTPC enjeksiyonu 0,7 ml medyum içerisinde kuyruk veninden verildi. Hayvanlara hücre verilmesinden 1 gün önce Cyclosporin A (Cell Signaling, #9973S) subkutan verildi ve bu işlem hücre verilmesinden 7 gün sonraya kadar ya da hayvan açılana kadar devam etti. 100 mg cyclosporin 10 ml DMSO içerisinde çözüldü ve hayvan başına 1mg/gün olmak üzere verildi. Cyclosporinin verilmesinin amacı, sıçanların insan plasentası kökenli mezenkimal kök hücrelerini reddetmesini engellemek içindir.



Şekil.3.2. Deney planı şablonu. MCAO, orta serebral arter tıkanması, hTPC, insan trofoblast progenitör hücre.

- 1- Grup: Sham grubu, n=42
- 2- Grup: Fokal serebral iskemi oluşturulan grup, n=42
- 3- Grup: Fokal serebral iskemi + trofoblast progenitör hücre enjekte edilen grup, n=28

2,3,5-Triphenyltetrazolium (TTC), Luxol Fast Blue (LFB), İmmunohistokimya (İHK), Western Blot (WB),

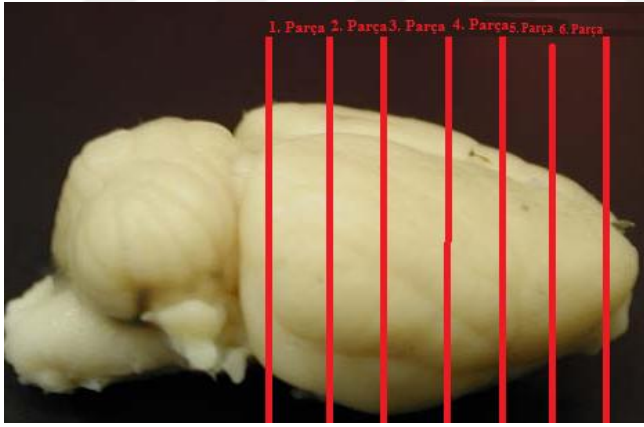
1. grup toplam =36	2. grup toplam n=36	3. toplam grup n=36
%2 TTC	%2 TTC	%2 TTC
1. gün n=2	1.gün n=2	
3.gün n=2	3.gün n=2	3.gün n=2
11.gün n=2	11.gün n=2	11.gün n=2
Toplam 6	Toplam 6	Toplam 4
İHK ve LFB	İHK ve LFB	İHK ve LFB
1. gün n=6	1.gün n=6	
3.gün n=6	3.gün n=6	3.gün n=6
11.gün n=6	11.gün n=6	11.gün n=6
Toplam 18	Toplam 18	Toplam 12
WB	WB	WB
1. gün n=6	1.gün n=6	
3.gün n=6	3.gün n=6	3.gün n=6
11.gün n=6	11.gün n=6	11.gün n=6
Toplam 18	Toplam 18	Toplam 12

3.10. %2 TTC Boyanması ile İnfarkt Alanının Belirlenmesi

TTC metabolik olarak aktif ve inaktif dokuları ayırmak için kullanılır. Beyaz TTC bileşiği canlı dokularda çeşitli dehidrogenaz aktivitelerinden ötürü enzimatik olarak kırmızı TPF (1,3,5-triphenylformazan)'ye indirgenir, fakat cansız bölgelerde TTC enzim denatüre olduğu ya da degrade olduğu için indirgenmez ve beyaz kalır.

1. %2 TTC (g/mL) (MERCK 108380 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride for microbiology) Serum Fizyolojik içinde çözülerek hazırlanır.
 - a. Kullanılmadan önce taze hazırlanmalıdır.
 - b. Işığa maruz kalmasını önlemek için alüminyum folyoya sarılmalıdır.
 - c. 37 °C'de tutulmalıdır.
 - d. Her bir sıçan beyni için 0.4gr : 20 mL TTC : SF hazırlamak yeterlidir.

2. Sıçan beyni disekte edilerek çıkarılır. İskemik kısımlarda beyinde pelteleşme gözlenmektedir. Sonra cam petri kabının tersine konularak 30 dk buzlukta tutularak sertleşmesi bu şekilde daha kolay kesilmesi sağlanır.
3. Sertleşen beyinin serebellum ve frontalden Şekil 3.3’de gösterildiği gibi kesilip ayrılır. Orta kısım yaklaşık 2 mm kesitler halinde boydan disekte edilerek 6 parçaya ayrılır.
4. Disekte edilen 6 parça hepsinin aynı yüzü yukarı gelecek şekilde cam petri kabına dizilir.
5. Petri kaplarına parçaların üstüne çıkacak kadar %2’lik TTC solüsyonu eklenir.
6. Etüv içerisine alınan petri kapları 37 °C’da 30 dakika boyunca ara ara sallanarak inkübe edilir.
7. 30 dakikanın sonunda örnekler kağıt üzerine petri kabına yapışık yüzeyleri daha çok boyanarak asıl boyanmayı yansıttığı için ters çevrilerek alınır ve fotoğraflanır. Normal beyin dokusu kırmızı boyanırken, iskemik dokular soluk pembe ya da kirli beyaz renkte görülüp boyama göstermeyecektir.



Şekil. 3.3. Beyin üzerinde kesitlerin alındığı alanlar gösterilmektedir.

3.11. Luxol Fast Blue Boyanması ile Demiyelinizasyonun Belirlenmesi

Myelin kılıf beyaz, cansız, %70 lipid ve %30 proteinden oluşan yağsı materyaldir. Luxol blue boyası miyelindeki lipoproteinlere tuz köprüleriyle bağlanır. Myelin lipoproteinlerindeki baz luxol blue boyasındaki baz ile yer değiştirir bu myelinin mavi görünmesini sağlar.

BOYALAR:

Luxol Fast Blue Solüsyonu:

Luxol fast blue (Sigma Aldrich L0294) 1.0 g

%95 alkol 100.0 mL

%10 asetik asit 5.0 mL

Karıştırılıp filtrelenir.

%0.05 Lityum Karbonat:

Lityum Karbonat (Sigma Aldrich 62470) 0.05 g

dH₂O 100.0 mL

Eosin Y Solüsyonu

%0.25 Krezil Viyole:

Krezil viyole Asetat (Sigma Aldrich C5042-105) 0.35 g

dH₂O 100.0 mL

Örnekler Ksilol I ve Ksilol II serilerinden 5'er dakika geçirilerek deparafinize edildi. Deparafinize örnekler %100 ve % 95'lik alkollerden 2'şer dakika geçirilerek rehydrate edildi. Luxol fast blue solüsyonu içerisinde alınan örnekler 60°C'da 1 saat inkübe edildi. Distile su (dH₂O) ile hızlıca yıkanıp %95 alkol ile boyanın fazlası uzaklaştırıldı. dH₂O ile hızlıca yıkanıp Lityum Karbonat solüsyonunda diferansiye edildi. dH₂O ile hızlıca yıkandıktan sonra %70 alkol ile diferansiyasyon işlemi yapıldı. dH₂O ile hızlıca yıkandı. Gri madde net bir şekilde beyaz ve ak madde mavi görüne kadar diferansiyasyon işlemine devam edildi. Bu basamak için örnekler mikroskop altında incelenir ve gerekli net ayrılma oluşana kadar devam edildi. dH₂O ile hızlıca yıkandı. Eosin Y içerisinde oda sıcaklığında 10-15 sn bekletildi. dH₂O ile hızlıca yıkandı. Krezil Viyole içerisinde oda sıcaklığında 1 dk bekletildi ve dH₂O ile hızlıca yıkandı. % 95 alkol ve %100 alkol ile dehydrate edildikten sonra ksilol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.

3.12. Western Blot Tekniği için Doku Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonlar:

- **Lizis Tamponu**

- ✓ 10 ml 0,1 M Tris (ph: 7,4)
- ✓ 1 ml Sodyum orthovanadate
- ✓ 1 gr SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
- ✓ 90 ml distile su

- **Proteaz İnhibitör Kokteyli (25x)**

- ✓ 1 tablet Roche PİK (proteaz inhibitör kokteyli tablet)

- ✓ 1 ml distile su
- **Lowry A solüsyonu**
 - ✓ 2gr NaOH
 - ✓ 10,6 gr Na₂CO₃
- **Lowry B solüsyonu**
 - ✓ 1gr KNaC₄H₄O₆
 - ✓ 100 ml distile su
- **Lowry C solüsyonu**
 - ✓ 1gr CuSO₄.5H₂O
 - ✓ 100 ml distile su

3.12.1. Lizat Hazırlama

-80 C'de kriotüpte muhafaza edilen beyin dokuları buz içine alındı. Sırayla örnekler alınıp bistüri yardımıyla ezildi ve akışkan kıvama getirildi. Bunların darası alınıp eppendorfa koyulup ağırlıkları tartıldı. 0,2 gr örnek için 600 µl lizis buffer ve 25 µl Proteaz inhibitör kokteyli koyuldu. 45 dakika-1 saat bekledikten sonra, protein ayırmanın iyi bir şekilde olması için sonikatör uygulandı. Eppendorfların içindeki dokular vortekslendi ve 15.000 rpm'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp pelet kısmı atılarak lizatlar hazırlandı. Hazırlanan lizatlar -20°C de muhafaza edildi.

Hücre lizatlarının hazırlanması için, %90-95 doluluk oranına ulaşan flasklar 1 ml Leamly Buffer (Sigma) ile kazanıp eppendorflara toplandı, -20°C de muhafaza edildi.

3.12.2. Protein Miktarının Tayin Edilmesi

Hazırlanan lizatların içerdiği protein miktarının belirlenmesi için Lowry yöntemi (Lowry ve ark., 1951) kullanıldı. Öncelikle, bu yöntemde standartların hazırlanabilmesi için 1mg/ml şeklinde BSA (Bovine serum albumin Fraction V, Sigma Katalog No: A 9647) hazırlandı. BSA ile 6 tane standart hazırlandı (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Standartların hazırlanması ve değerleri

	BSA 1mg/ml	dH ₂ O	Değerleri
Standart 1	20	-	1
Standart 2	20	20	0.5
Standart 3	20	40	0.33
Standart 4	20	60	0.25
Standart 5	20	100	0.166
Standart Kör	-	20	0

Lizatlar, 1:20 ve 1:40 dilusyonlar halinde çalışıldı. Hazırlanan standartlardan ve örneklerin her birinden 20 µl alındı. Lowry A, Lowry B ve Lowry C solüsyonları oda sıcaklığına alındı. Öncelikle Lowry B ve Lowry C solüsyonları 1:1 oranda alınıp vortexlendi. Daha sonra Lowry A 100 birim şeklinde bu karışımın içine koyuldu. Lowry A:B:C karışımından 600 µl her bir örneğe ve standarta koyuldu ve 20 dakika inkübe edildi. İnkübe edildikten sonra her birine 60 µl folin koyulur ve karanlık ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra 96'lık well plate'lere 200'er mikrolitre pipetlendi ve her bir standart ve örnek çift çalışıldı. Spektrofotometrede (BioTek, MQX200) 750nm dalga boyunda okunması sağlandı. Standartlar ile karşılaştırılarak her bir numunenin protein miktarı tespit edildi. Tüm numunelerin protein miktarlarının eşit olması sağlanarak western blot analizlerinde kullanıma hazır hale getirildi.

3.12.3. SDS-PAGE Western Blot protokolü

Kullanılan Solüsyonlar

5X Yürütme Tamponu:

- ❖ 9 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- ❖ 43.2 gr Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
- ❖ 3gr SDS (Sigma,# L4390)
- ❖ 600 ml Distile Su
- ❖ Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı

Transfer Tamponu:

- ❖ 14.3 gr Glisin (Bio-Rad, #161-0718)

- ❖ 3 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- ❖ 700 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Bu solüsyona 200 ml Metanol (Merck,#1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):

- ❖ 5gr süt tozu (Bio-Rad) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4°C'de en fazla 24 saat kalacak şekilde muhafaza edildi.

10X TBS Tamponu:

- ❖ 60.55 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- ❖ 87.66 gr NaCl
- ❖ 800 ml distile suda çözdürülür. PH HCl ile 7.4'e ayarlanır. PH ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

TBS-T Solüsyonu:

- ❖ 1 litre 1X TBS içerisine 1000µl Tween-20 (Sigma, P9416) eklendi ve oda ısısında saklandı.
- **Thick Blot Paper** (Bio-Rad,#165-0921)
- **Blotting-Grade Blocker nonfat dry milk (Süt tozu)** (Bio-Rad, # 170-6404)
- **West Pico Chemiluminescent substrates** (Pierce, #34080)
- **Nitroselüloz Membran** (Amersham,#RPN203D)
- **Kaleidoscope Prestained Standards, broad range** (Bio-Rad,#161-0324)
- **CL- Xposure film 18x24 cm** (Thermo Scientific,# 34089)
- **PQ Universal Developer 5L** (ILFORD,#1757314)
- **Hypam Fixer 5L** (ILFORD,#1758285)

Çalışılacak olan proteinin kilo dalton (kDa) ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Her kuyucuğa 18 mikrolitre numune yüklenerek jel elektroforezi gerçekleştirildi. Elektroforez sonrasında immunoblotting yapılarak jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı.

Tablo 3.9. Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Primer Antikor	Dilüsyon	İnkübasyon	Sekonder Antikor	Dilüsyon	İnkübasyon
Abcam Tavşan anti-VEGF A (ab46154)	1:250	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan anti VEGFR1 (ab32152)	1:750	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Cell Signaling tavşan anti VEGFR2 (CST9698)	1:200	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan anti-DLX5 (ab64827)	1:250	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan anti-DLX2 (ab30339)	1:250	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan anti-LHX6 (PA5-40560)	1:100	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan anti- NGN1 (ab66498)	1:550	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan Anti- NGN2 (13144S)	1:250	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan anti-Olig1 (ab124908)	1:100	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan Anti-Olig2 (ab109186)	1:750	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan anti-Sox2 (ab97959)	1:250	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan anti-PDGFR α (3164S)	1:500	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Tavşan anti-NKX2.2 (PA5-40526)	1:100	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Tavşan IgG-HRP Konjuge (170-6515)	1:1000	Oda Sıcaklığı 1 saat
Abcam Fare anti B-Aktin (ab8226)	1:5000	+4 °C, Gece Boyu	BioRad Keçi Anti Fare IgG-HRP Konjuge (170-6516)	1:10000	Oda Sıcaklığı 1 saat

Proteinlerin nitrosellüloz membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda ısında pH'sı 7.2-7.4 olan ,% 0.1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solüsyonu ile hazırlanan % 5 lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Membran VEGF, VEGFR1, VEGFR2, DLX2, DLX5, LHX6, NGN1, NGN2, Olig1, Sox2, Olig2, PDGFR α , NKX2 ve Beta Aktin antikorları ile uygun sıcaklık ve sürede karıştırıcı üzerinde inkübe edildi (Tablo 3.9).

İnkübasyon sonrasında, 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkamanın ardından membran, sekonder antikörle oda ısısında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membran SuperSignal Chemiluminisans'la uygun sürede geliştirilip, membrandaki protein bandları karanlık odada hiperfilme aktarıldı.

3.13. İmmünohistokimya Yöntemi

Deneklere ait doku bloklarından alınan 5 mikrometre kalınlığındaki kesitler superfrost plus (manyetik olarak statik) lamalar üzerine alınarak 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Deparafinizasyon aşaması için, parafin kesitler 2 defa 10'er dakika ksilolden geçirildi. Kesitler daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletildi. Distile su ile 5 dakika muamele edildi. Dokudaki antijenik epitoplara ortaya çıkması için kesitler, sitrik asit tamponu (pH:6.0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) içine alınarak üç defa 5'er dakika mikrodalga fırında 750 watta tutuldu. Mikrodalga uygulamasından sonra kesitler sitrik asit içerisinde 30 dakika boyunca oda ısısında soğutuldu. Kesitler PBS'e alındıktan sonra dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizildi. Daha sonra kesitler 3 defa 5'er dakika PBS'ten geçirildi. Kesitler endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için metanolle hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 30 dakika inkübe edildi. Kesitler PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra dokulardaki özgül olmayan antikör bağlanmasını önlemek amacıyla, bloklama solüsyonu (Ultra V Block, LabVision Corporation, #TA-125UB) ile 8 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Serum kesitler üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra, kesitler VEGF, VEGFR1, VEGFR2, DLX2, DLX5, LHX6, NGN1, NGN2, Olig1, Sox2, Olig2, PDGFR α , NKX2, CDX2, EOMES, HM primer antikörleriyle +4°C'de gece boyu muamele edildi (Tablo 3.10).

Kesitler primer antikörlerle inkübasyondan sonra, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra kesitler, biyotinleştirilmiş ve primer antiköre bağlanma özelliği olan keçi anti-tavşan sekonder antikörü (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent) (Dako LSAB 2 System-HRP #K0609) ile 45 dakika inkübe edildi. Sonrasında 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, 45 dakika streptavidin peroksidaz kompleksi (Streptavidin Peroxidase (Ready-To-Use) Dako LSAB 2 System-HRP #K0609) ile inkübasyona bırakıldı. PBS ile tekrar 3 kez 5'er dakika yıkamadan sonra, immunoreaktiviteyi saptamak için kesitler AEC (AEC substrate system (Ready-To-

Use) (Scytek,#SHP125) ile 1-5 dakika muamele edildi. Daha sonra kesitler distile suya alındı ve sonrasında Mayer'in hematoksileni ile 20 saniye zıt boyama yapılarak akar musluk suyunda yıkandı. Kesitler Kaiser'in gliserol jelatini (MERCK Darmstadt Almanya, OB514196) kapatma solüsyonu ile kapatıldı, Axioplan ışık mikroskopunda (Zeiss, Almanya) beyin kesitlerindeki VEGF, VEGFR1, VEGFR2, DLX2, DLX5, LHX6, NGN1, NGN2, Olig1, Sox2, Olig2, PDGFR α , NKX2, proteinlerinin dağılımları ve CDX2, EOMES ve insan mitokondriyal antikor proteinlerinin immunoreaktiviteleri tespit edilip incelendi ve fotoğraflandı.

Tablo 3.10. İmmünohistokimya analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Primer Antikor	Dilüsyon
Abcam Tavşan anti-VEGF A (ab46154)	1:500
Abcam Tavşan anti VEGFR1 (ab32152)	1:200
Cell Signaling tavşan anti VEGFR2 (CST9698)	1:200
Abcam Tavşan anti-DLX5 (ab64827)	1:100
Abcam Tavşan anti-DLX2 (ab30339)	1:200
Abcam Tavşan anti-LHX6 (PA5-40560)	1:100
Abcam Tavşan anti- NGN1 (ab66498)	1:500
Abcam Tavşan Anti- NGN2 (13144S)	1:200
Abcam Tavşan anti-Olig1 (ab124908)	1:200
Abcam Tavşan Anti-Olig2 (ab109186)	1:100
Abcam Tavşan anti-Sox2 (ab97959)	1:100
Abcam Tavşan anti-PDGFR α (3164S)	1:100
Abcam Tavşan anti-NKX2.2 (PA5-40526)	1:500
Cell Signaling Tavşan anti Cdx2 (D11D10)	1:100
Atlas Tavşan anti EOMES (HPA028896)	1:100
Abcam Tavşan anti-Human Mitokondriyal Antijen (ab92824)	1:250

3.14. İstatiksel Analiz

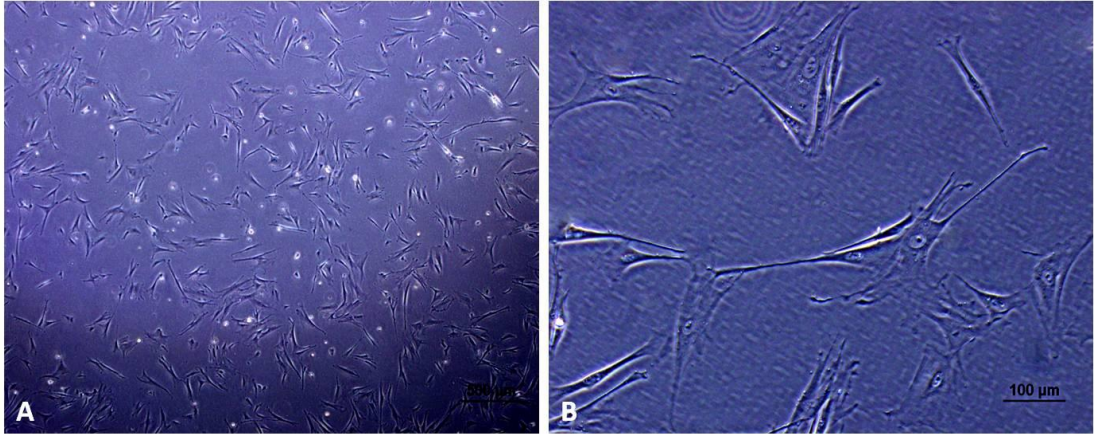
Western Blot bantların yoğunlukları DigiDog 1000 programında ölçüldü. Değerler Beta Aktin yoğunluklarına göre normalize edildi. DigiDog 1000 analizinden elde edilen verilere ve qRT-PCR sonuçlarına SigmaStat 3.5 programı kullanılarak One Way ANOVA testinde Tukey metodu ile çoklu karşılaştırma yapıldı ve $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Term Plasentadan İnsan Trofoblast Progenitör Hücre (hTPC) İzolasyonu Sonuçları

Normal gebelik süreci geçirip doğum yapan kadınlardan plasenta temini sağlanmıştır. Plasenta temin edildikten sonra term plasentadan trofoblast progenitör hücrelerin izolasyonu protokolü gerçekleştirilmiştir. Doğum sonrası alınan plasentalar, hücre kültürü laboratuvarında laminar kabin içine alınarak plasentanın koryon bölümünden kök hücre izolasyonu yapıldı. İzolasyon yapılan hücreler her gün takip edilerek 2 günde bir medyumunu değiştirildi ve pasajlanarak hücre sayısında artış sağlandı.

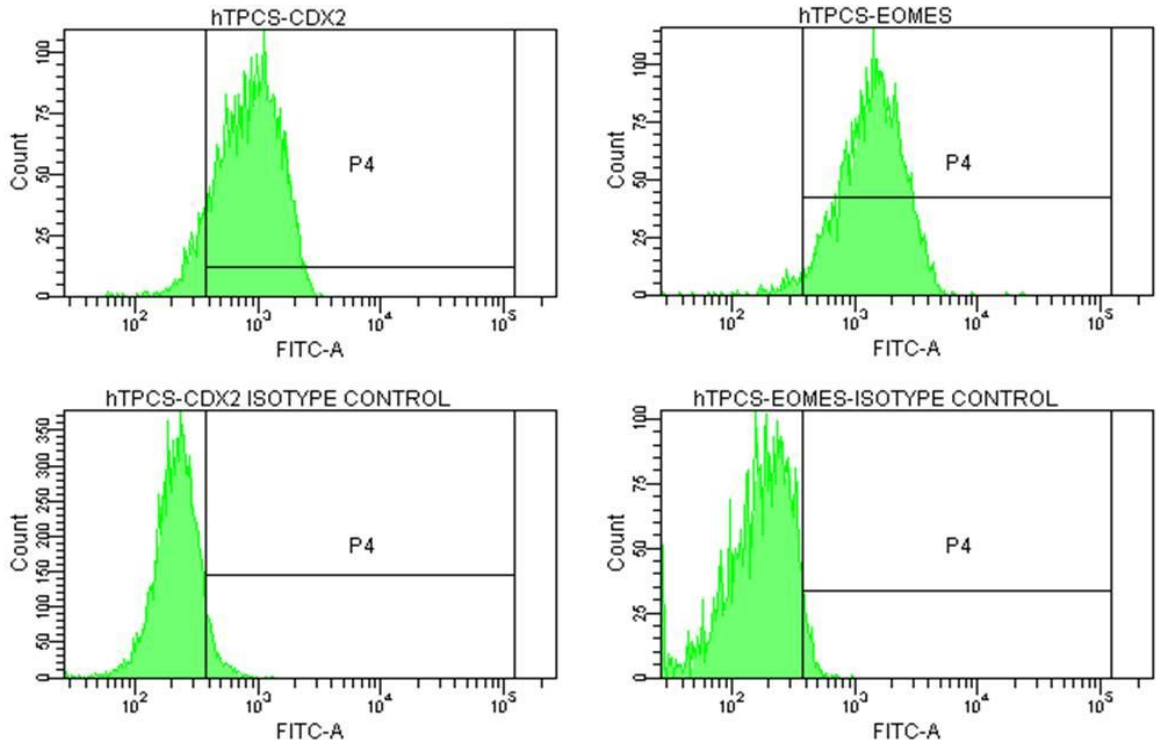
İzolasyon sonucunda hücre kültüründeki hTPCler invert mikroskop ile fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.1. İnsan trofoblast progenitör hücrelerin invert mikroskopundaki görüntüsü, (A) 4x ve (B) 40x.

4.2. Hücrelerin Akım Sitometre ile Karakterizasyonu Bulguları

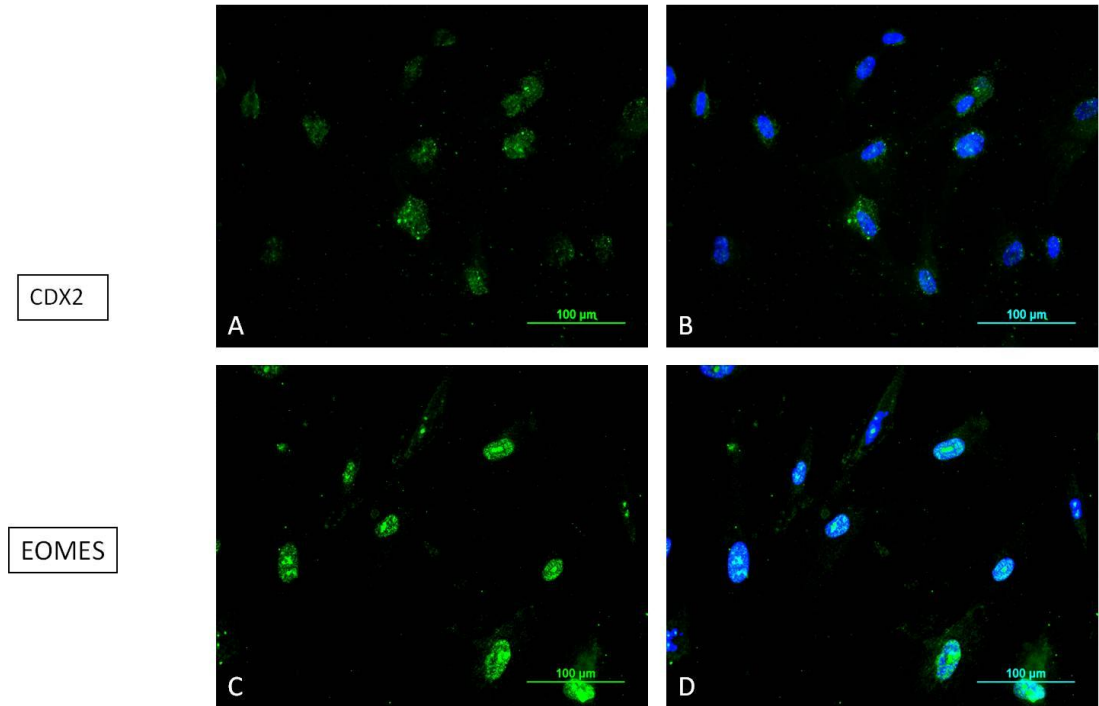
Hücreler izole edildikten sonra yeterli sayıya ulaştıklarında trofoblast progenitör hücre belirteçleri olan CDX2 ve EOMES antikorlarıyla flow sitometri ile karakterizasyonu yapıldı. FACS analizi, trofoblast progenitör hücrelerinin sırasıyla% 92.5 ve% 92.7 oranları ile CDX2 ve EOMES pozitif olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.2. İnsan trofoblast progenitör hücrelerin CDX2, EOMES ve izotip kontroller için FACS sonuçları

4.3. hTPC'lerde İmmüno Floresan Boyamaları Bulguları

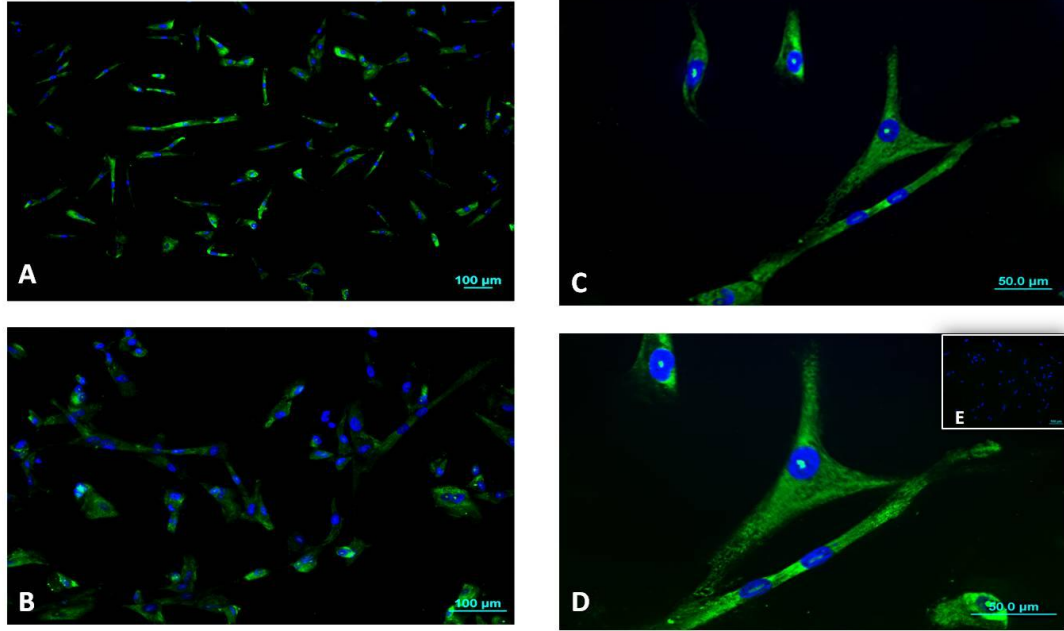
İmmüno Floresan deneyler sonucunda trofoblast progenitör hücre belirteçleri CDX2 ve EOMES boyanmaları yapıldı.



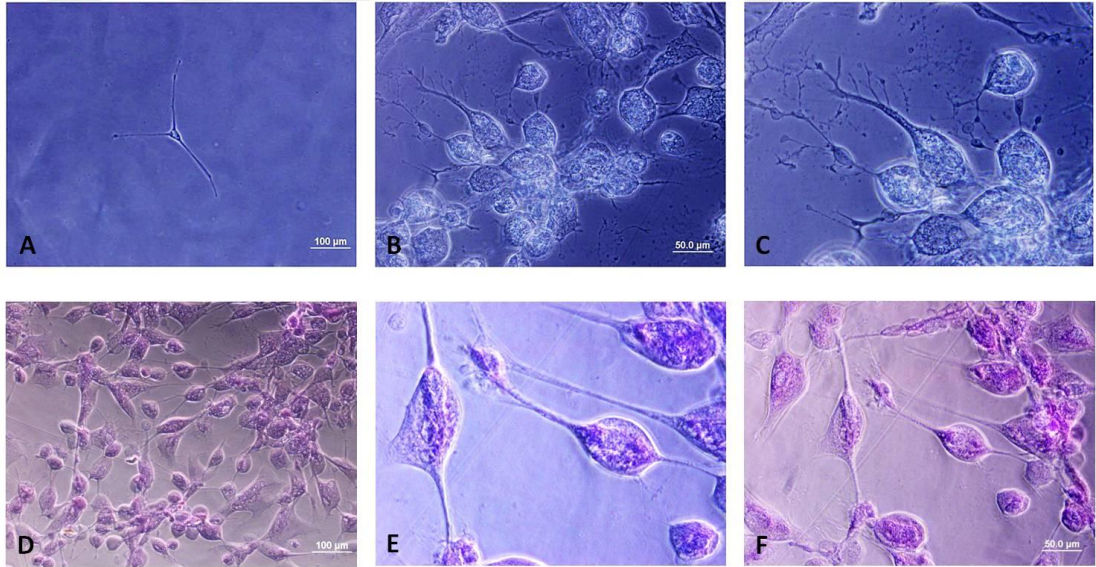
Şekil 4.3. Hücelere ait immüno Floresan boyamalar. CDX2 boyaması 40x (a). CDX2 ve DAPI kompozit görüntü (b), EOMES boyaması 40x (c), Eomes ve DAPI kompozit görüntü (d).

4.4. hTPC'lerin Nöronal Yönlendirilme Bulguları

Nöronal farklılanmayı göstermek için 20 gün sonra hücrelerde NEUN immüno Floresan ve krezil viyole özel boyamaları yapılmıştır.



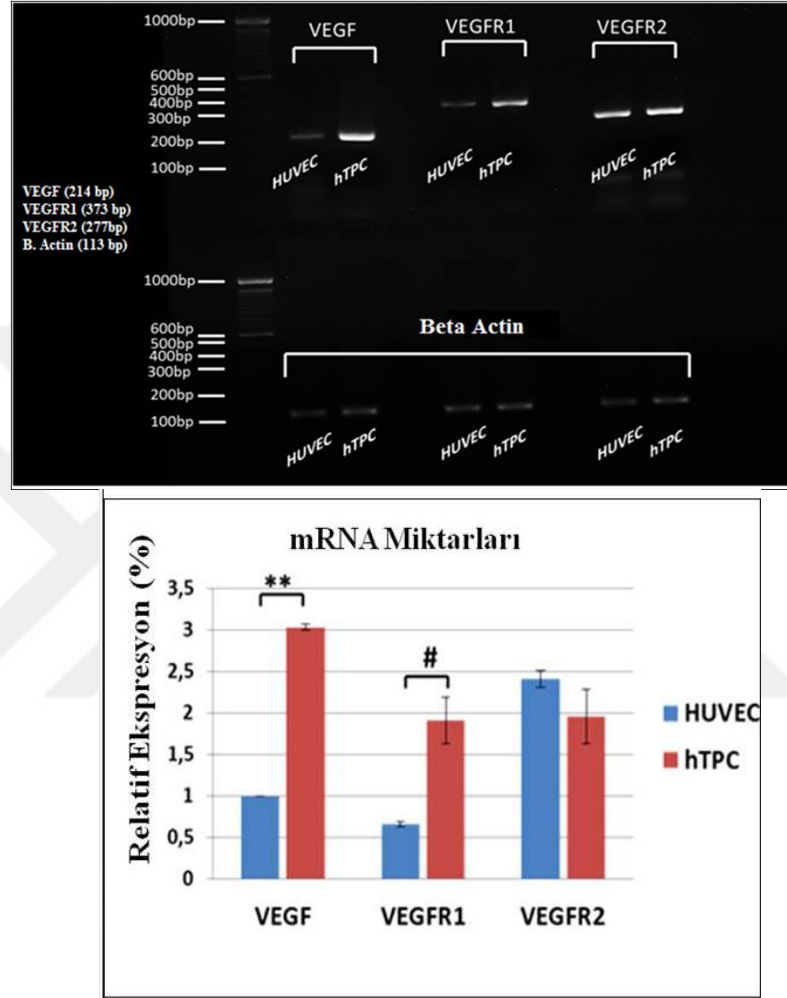
Şekil 4.4. Nöronal farklılanan hücrelerin immüno Floresan boyanmaları. Nöron-benzeri hücrelere farklılanma gerçekleşen hTPC'lerde NEUN boyanması 10x (A), 20x (B), 40x (C), 60x (D) ve izotip kontrol 20X (E).



Şekil 4.5. Nöron-benzeri hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüleri ve krezil viyole boyanmaları. Şekil a ve b, nöron benzeri hücrelerin invert mikroskop görüntüleridir. Şekil c ve d, farklılaşmış hTPC'lerin krezil viyole boyama görüntüleridir. Nissl granüllü nöron benzeri hücreler görülür (a ve c, 20X ve b ve 40X büyütme).
Şekil e ve f, nöron benzeri hücrelerin krezil viyole boyama görüntüleridir. Nissl granüllü nöron benzeri hücreler görülür (e ve f, 60X ve d ve 80X büyütme).

4.5. qRT-PCR Bulguları

Real Time PCR değerlendirmelerine göre, her üç faktörün mRNA varlığı; VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan HUVEC'ler ile karşılaştırıldığında, hTPC'lerin, VEGF ($p \leq 0.01$) ve VEGFR1 ($p \leq 0.05$) mRNA düzeyleri anlamlı olarak yüksektir.



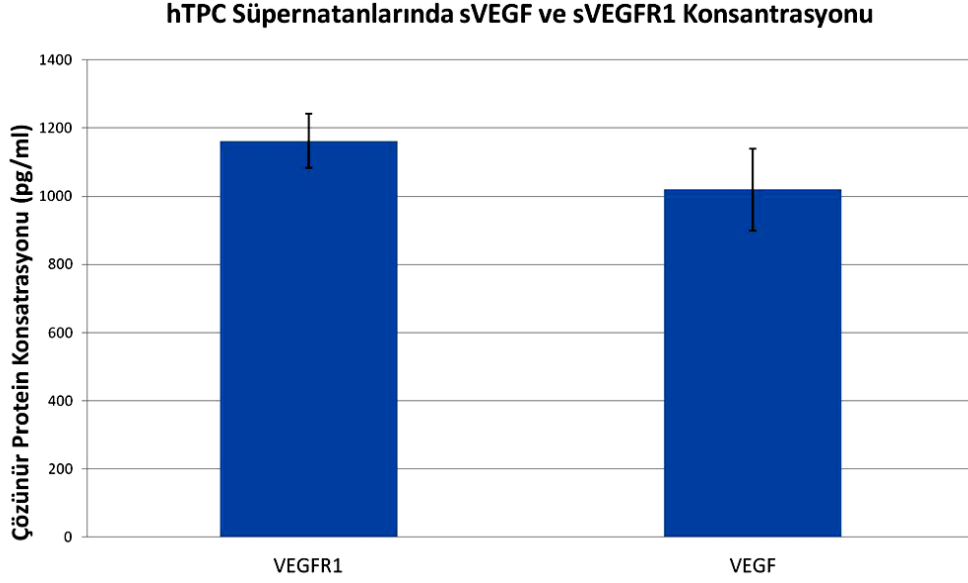
Şekil 4.6. qRT-PCR sonuçları. HUVEC ile karşılaştırmalı olarak hTPC'lerde anjiyogenez ilişkili genlerin kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonrası mRNA ekspresyon düzeyleri. hTPC'lerin, VEGF ($p \leq 0.01$) ve VEGFR1 ($p \leq 0.05$) mRNA düzeyleri anlamlı olarak yüksektir.

4.6. ELISA Yöntemi Sonuçları

ELISA analizi ile hTPC hücrelerin ürettiği ve medyuma salgıladığı çözümlü formdaki (souble) VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 proteinlerinin miktarları belirlenmiştir. Bu analiz için ticari hazır ELISA kitleri kullanılmıştır ve analiz esnasında, üretici firmanın belirttiği protokol uygulanmıştır.

Çözümlü VEGF ve VEGFR1 formları, hTPC süpernatantlarında saptanmıştır. ELISA çalışması yüksek seviyedeki sVEGFR1'in hTPC'lerinden buldukları hücre

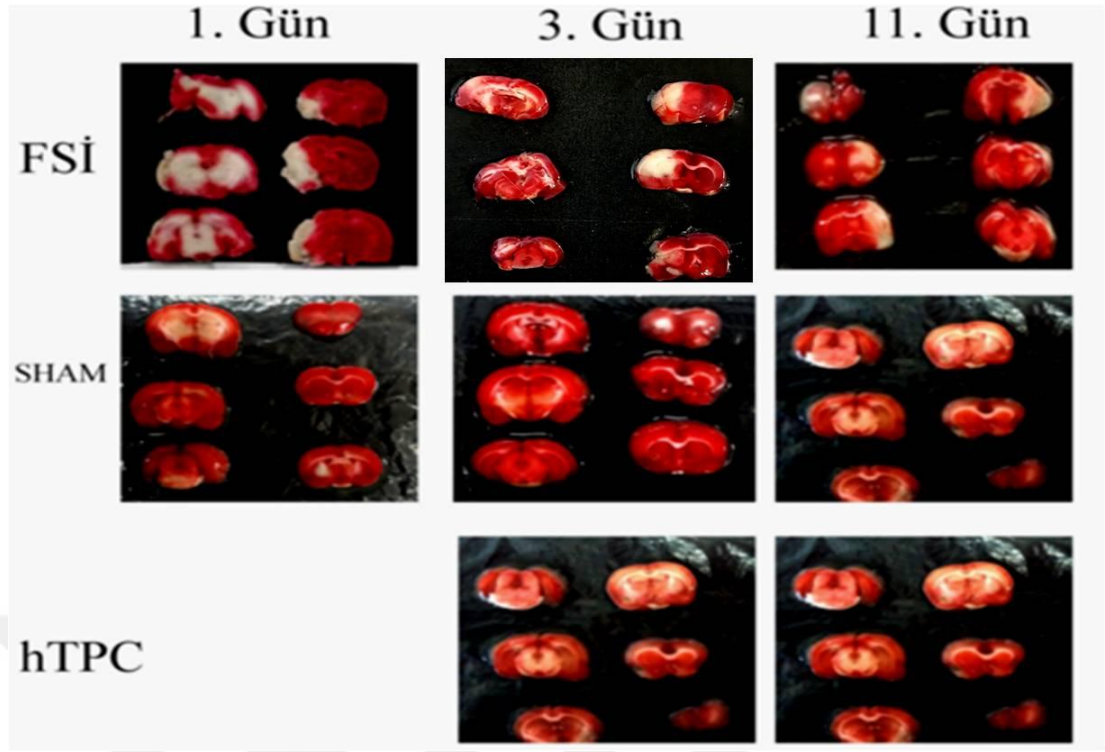
besiyerine salındığını göstermektedir. hTPC süpernatantlarında çözünebilir VEGFR2 formu bulunamadı. Sonuç olarak hTPC hücreleri çözünür formdaki VEGF ve VEGFR1 salgılamakta VEGFR2 'yi üretmemektedir.



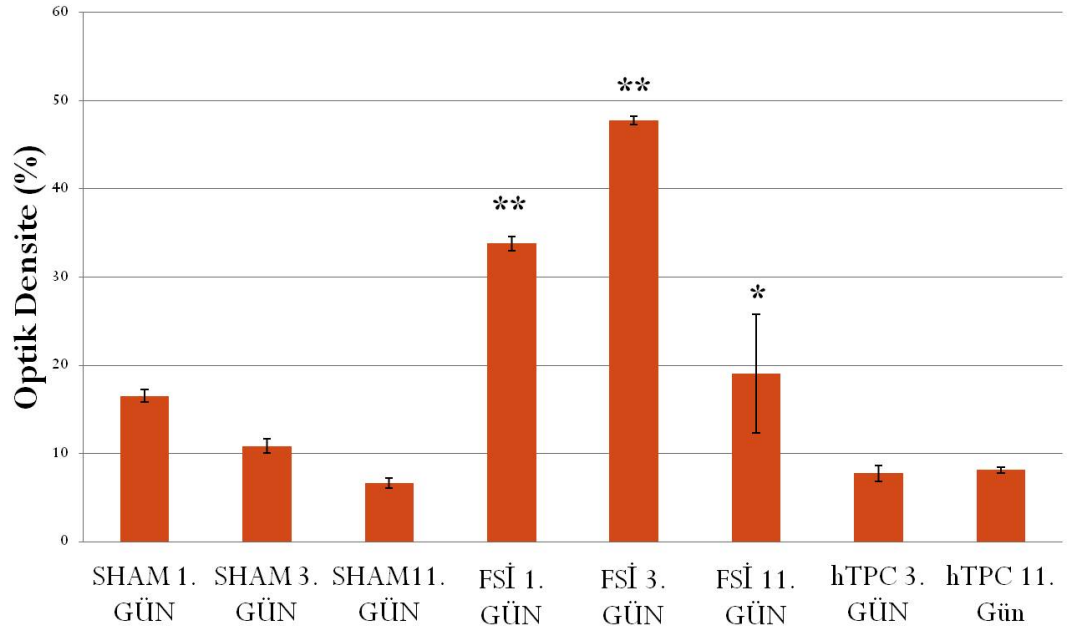
Şekil 4.7. ELISA analizi sonuçları.

4.7. %2 TTC Boyanması ile İnfarkt Hacminin Belirlenmesi Sonuçları

TTC metabolik olarak aktif ve inaktif dokuları ayırmak için kullanılır. Beyaz TTC bileşiği, canlı dokularda çeşitli dehidrogenaz aktivitelerinden ötürü enzimatik olarak kırmızı TPF (1,3,5-triphenylformazan)'ye indirgenir. Fakat cansız bölgelerde TTC enzim denatüre olduğu ya da degrade olduğu için indirgenmez ve beyaz kalır. Tüm gruplarda % 2 TTC boyanması ile infarkt hacmi belirlenmesi yapıldı. Bu alan hTPC enjeksiyonu yapılan grupların 3. ve 11. günlerinde daha küçük olduğu tespit edildi.



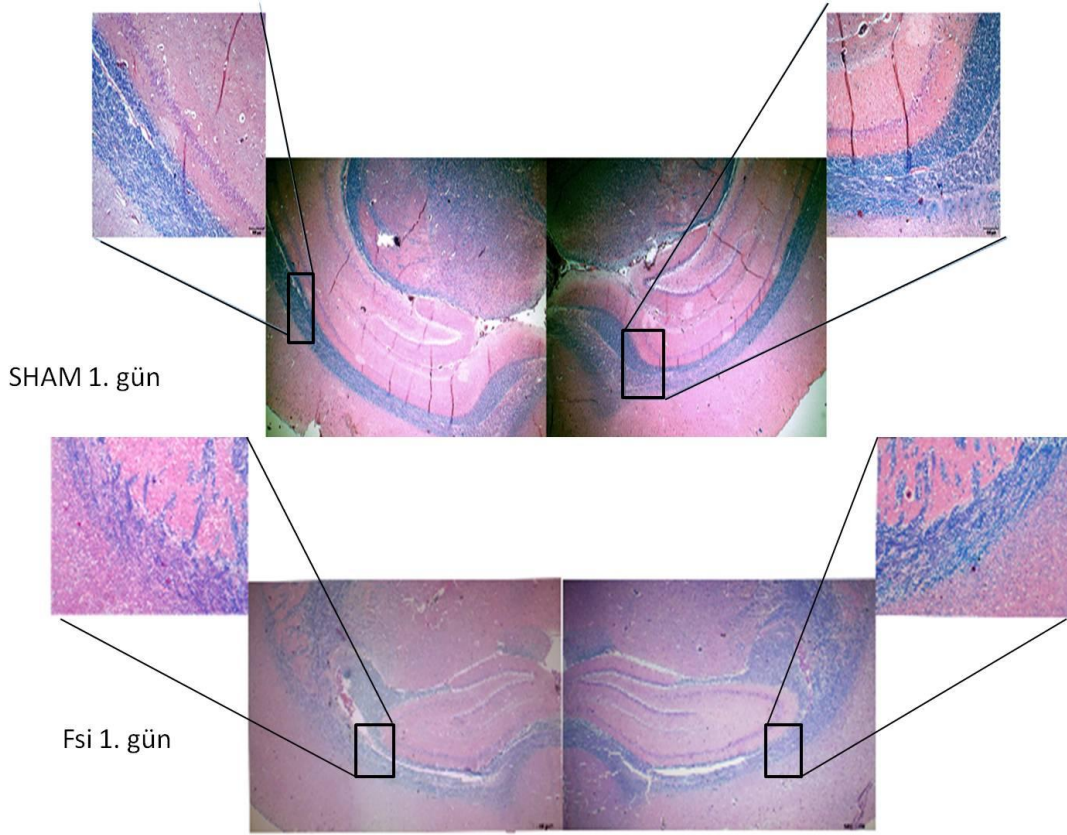
İnfarkt Hacmi



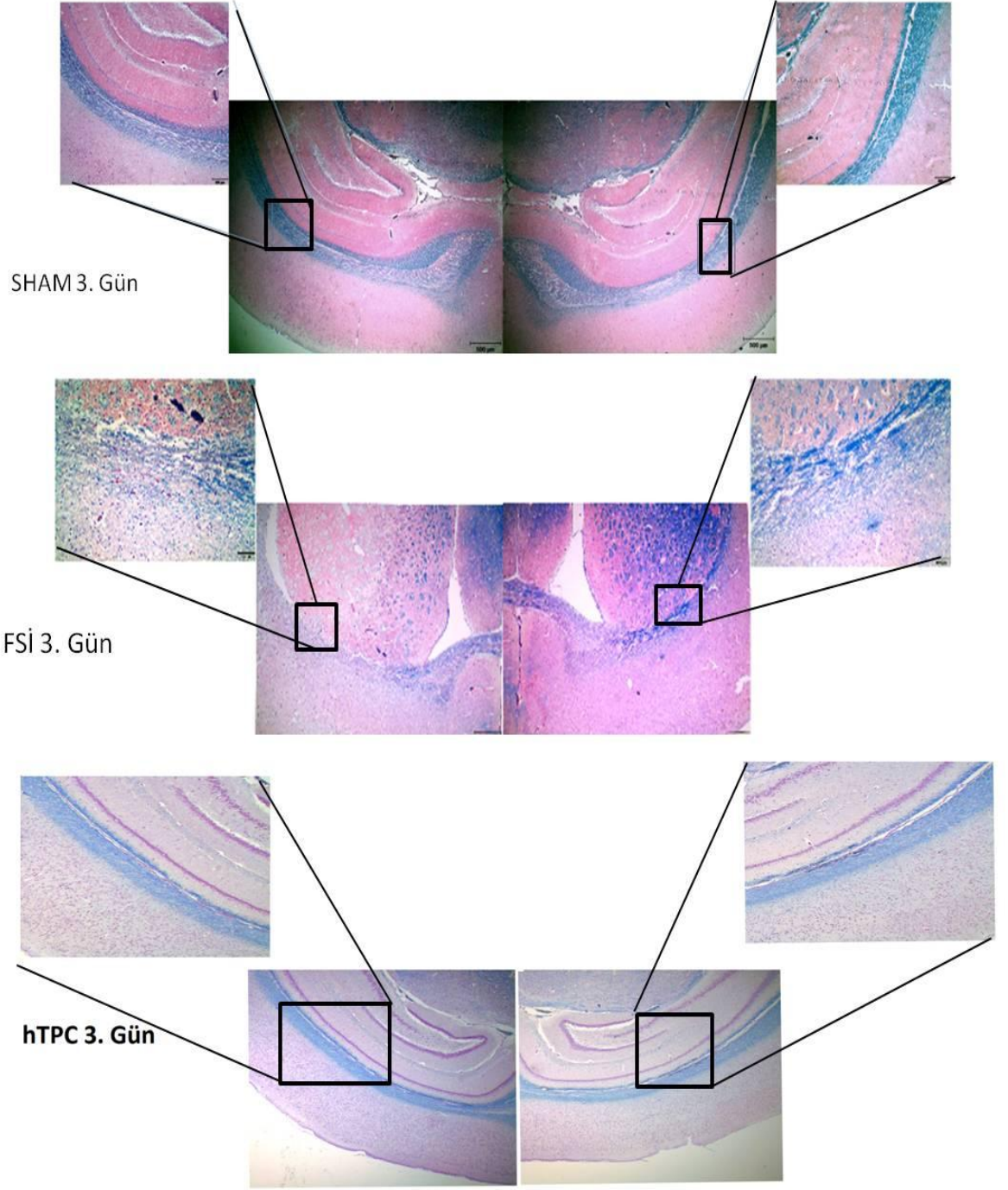
Şekil 4.8. Tüm gruplarda %2 TTC boyanma sonuçları. Beyaz infarkt alanlarını, kırmızı bölgeler ise sağlıklı dokuları göstermektedir. Grafik beyaz lanların Image J ile ölçümünü göstermektedir. Tüm gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında FSİ gruplarından 1. ve 3. günlerde FSİ 11. gün de dahil diğer gruplarla anlamlı olarak fazla iken ($p < 0.01$), FSİ 11. gün grubunun infarkt alanı SHAM ve hTPC gruplarına göre anlamlı olarak fazladır ($p < 0.05$).

4.8. Luxol Fast Blue Boyanması ile Demiyelinizasyonun Belirlenmesi Sonuçları

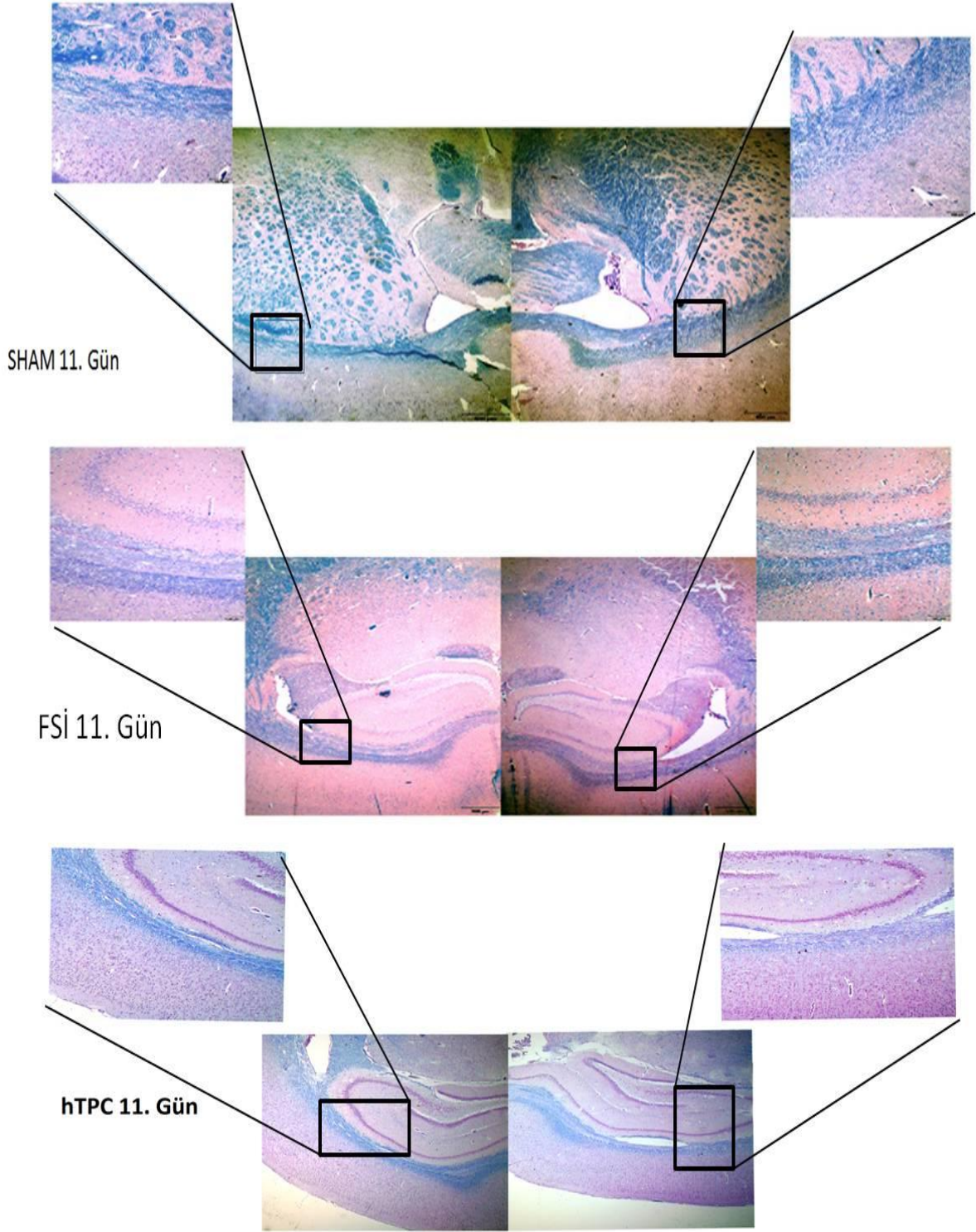
Daha önce yapılan çalışmalarda FSİ sonucunda demiyelinizasyonun meydana geldiği ve ekstrasellüler matrikste artışın olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da demiyelinizasyonu göstermek için Luxol Fast Blue boyanması yapılmıştır. Tüm gruplarda Luxol Fast Blue boyanması yapılarak aralarındaki farklılıkların gösterilmesi amaçlanmıştır. Fokal serebral iskemi grubunda SHAM grubuna göre özellikle korpus kallozum bölgesinde miyelin kaybı görülmektedir. hTPC enjeksiyonu yapılan grupların 3. ve 11. günlerinde ise bu demiyelinizasyonda azalma vardır.



Şekil 4.9. SHAM ve FSİ 1. Gün için Luxol Fast Blue özel boyanma sonuçları.



Şekil 4.10. SHAM, FSİ ve hTPC 3. Gün için Luxol Fast Blue özel boyanma sonuçları.

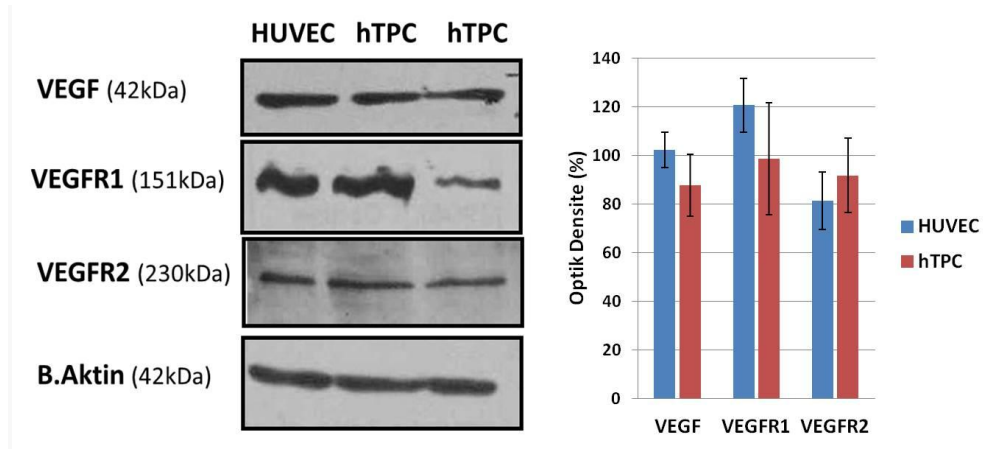


Şekil 4.11. SHAM, FSİ ve hTPC 11. Gün için Luxol Fast Blue özel boyanma sonuçları.

4.9. Western Blot Analizi Bulguları

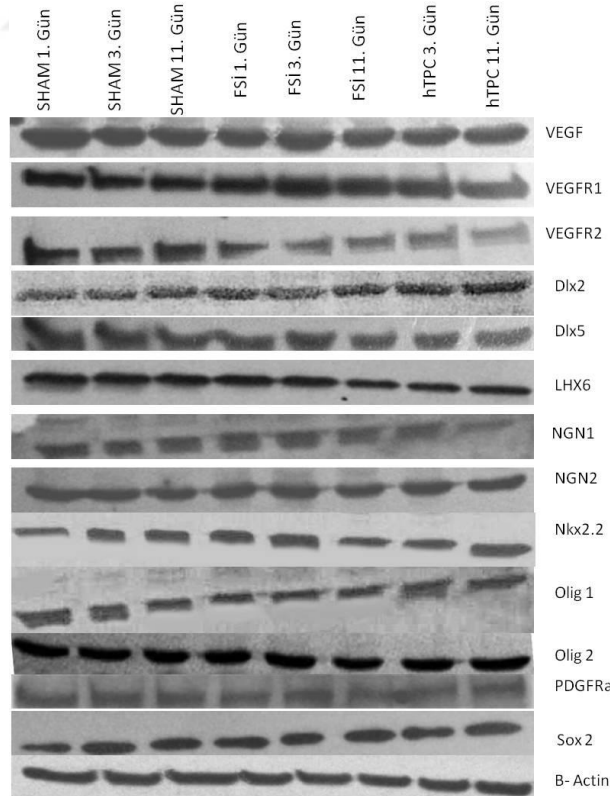
hTPC'lerde yapılan western blot analizi sonucunda hücrelerin VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 proteinlerini içerdiği tespit edilmiştir. Pozitif kontrol HUVEC ile karşılaştırıldığında, trofoblast progenitör hücreleri, VEGF ve VEGFR1 proteinleri için daha düşük protein miktarına sahip iken VEGFR2 protein için daha çok protein

miktarına sahiptir. Western Blot bantların yoğunlukları DigiDog 1000 programında ölçülerek değerler Beta Aktin yoğunluklarına göre normalize edilmiştir.

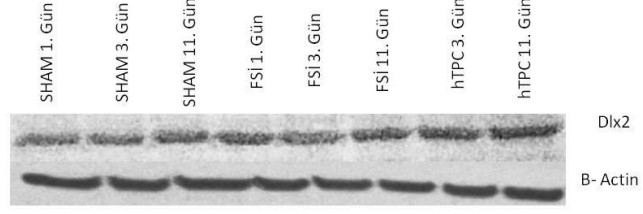


Şekil 4.12. hTPC'lere ait Western Blot sonuçları.

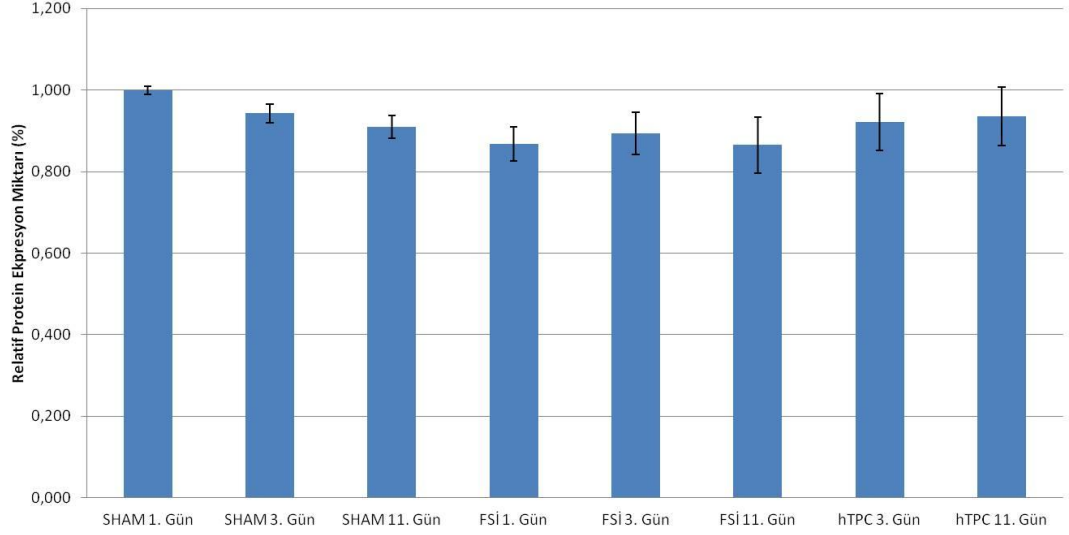
SHAM, Fokal Serebral İskemi (FSİ) ve hTPC transferi yapılan gruplara ilişkin deneylerin sonrasında alınan beyin dokularında, anjiyogenik belirteçlerden VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 için ve nörogenik belirteçlerden DLX2, DLX5, LHX6, NGN1, NGN2, Olig1, Sox2, Olig2, PDGFR α ve NKX2 için, ve internal kontrol olarak Beta Aktin için western blot analizi yapılmıştır.



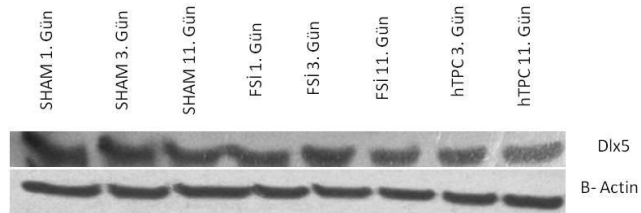
Şekil 4.13. Deney gruplarına ait beyin dokularının Western Blot bant görüntüleri.



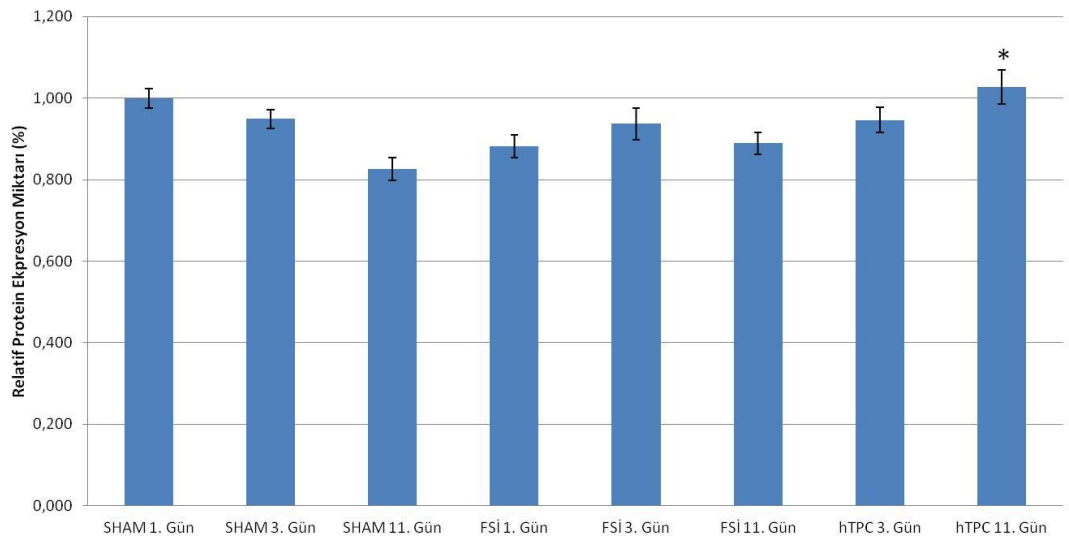
DLX2



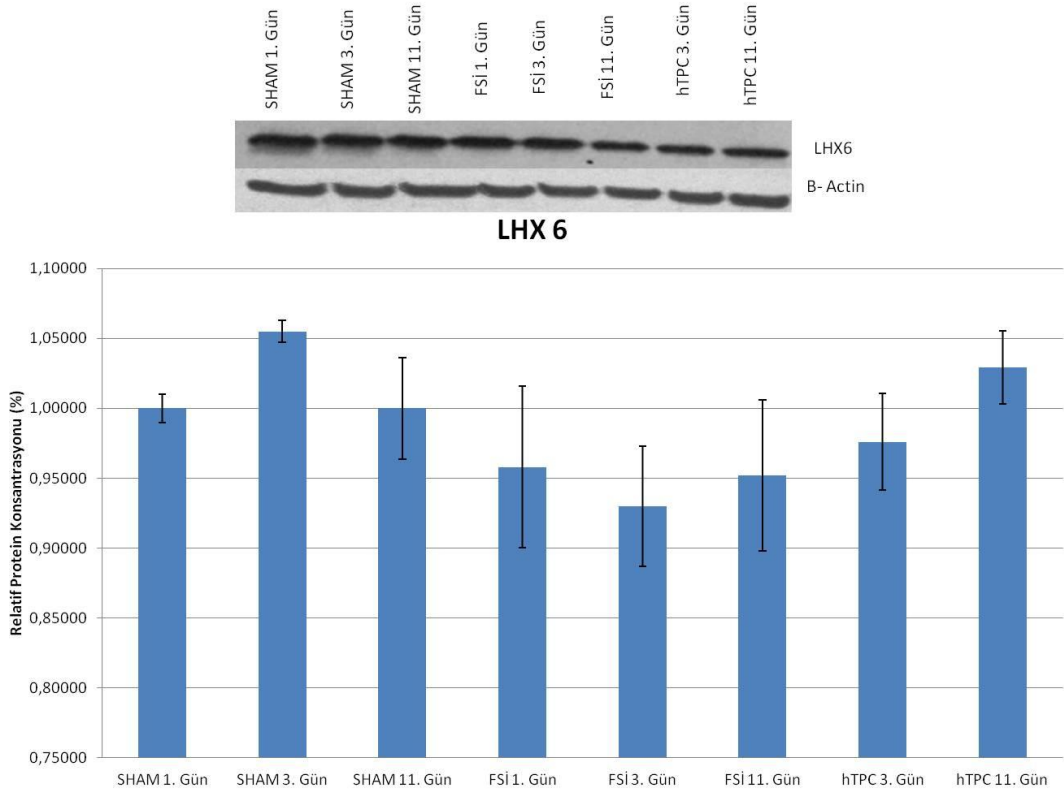
Şekil 4.14: Deney gruplarına ait beyin dokularının DLX2 için Western Blot sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark yoktur.



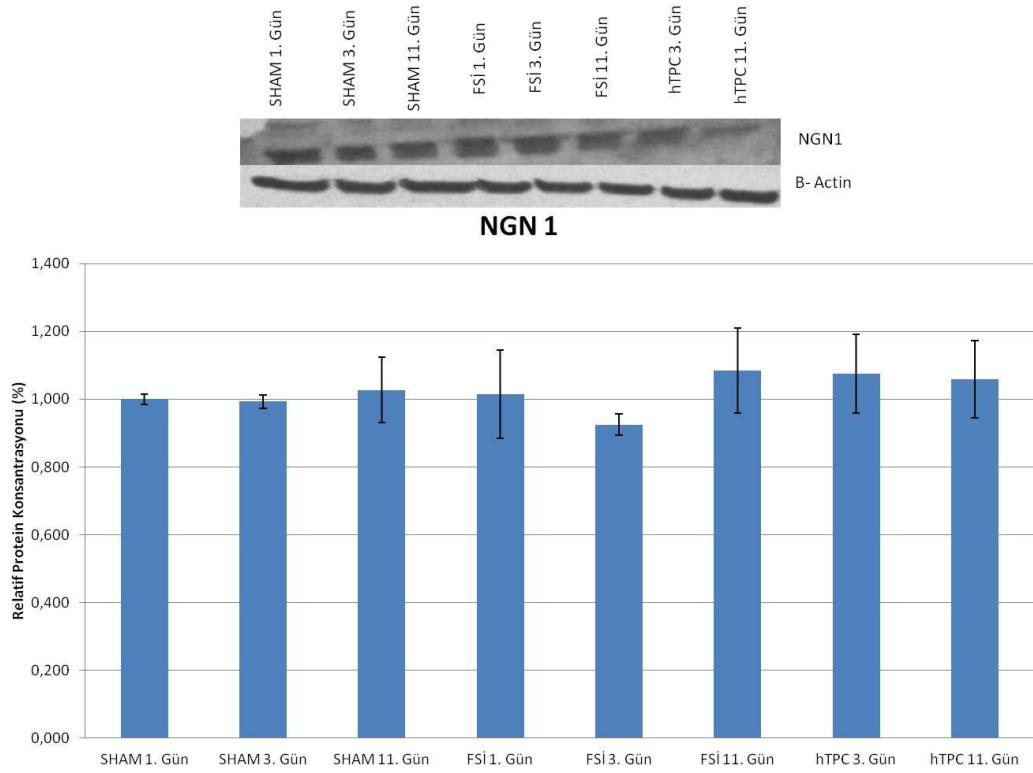
DLX 5



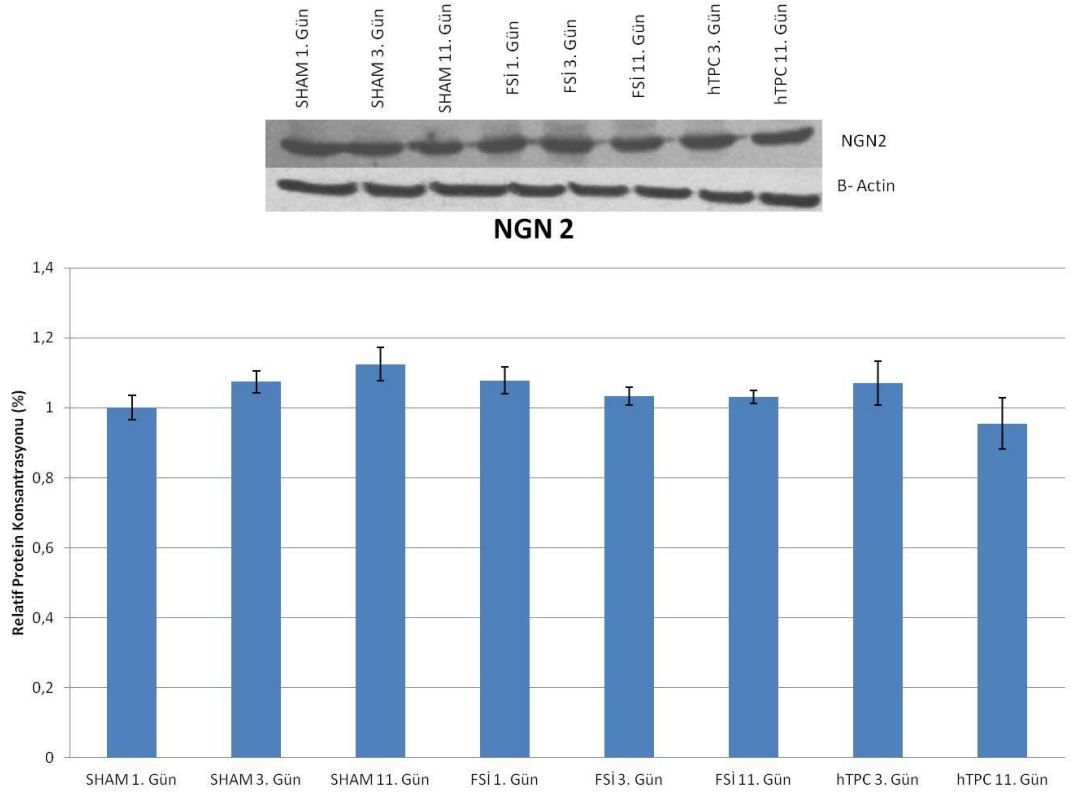
Şekil 4.15: Deney gruplarına ait beyin dokularının DLX5 için Western Blot sonuç grafiği. hTPC 11. Gün grubunda diğer gruplara göre anlamlı artış vardır ($p < 0,05$)



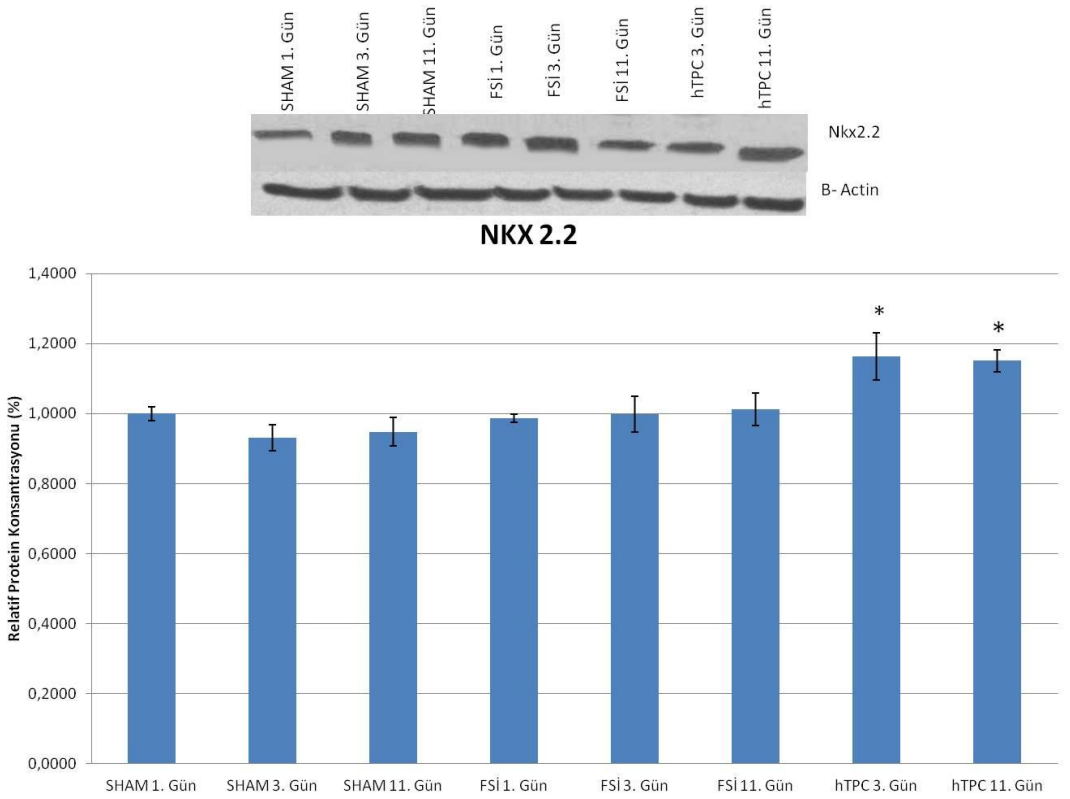
Şekil 4.16.Deney gruplarına ait beyin dokularının LHX6 için Western Blot sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark yoktur.



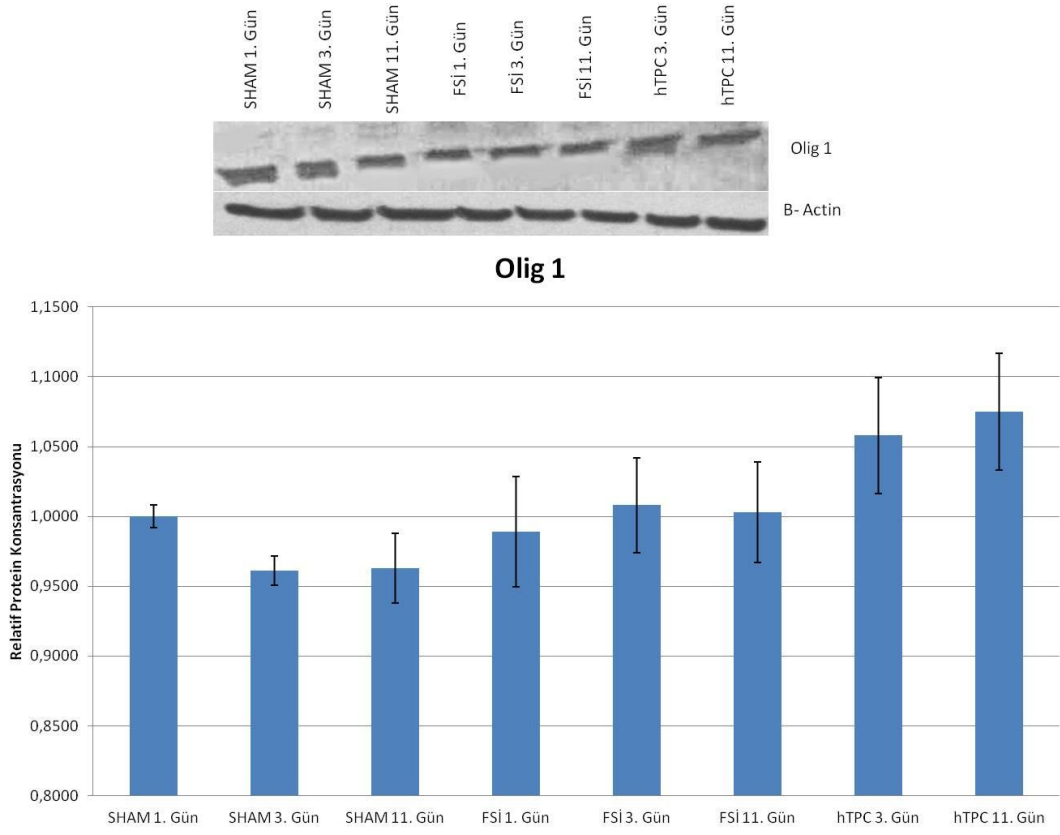
Şekil 4.17.Deney gruplarına ait beyin dokularının NGN1 için Western Blot sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark yoktur.



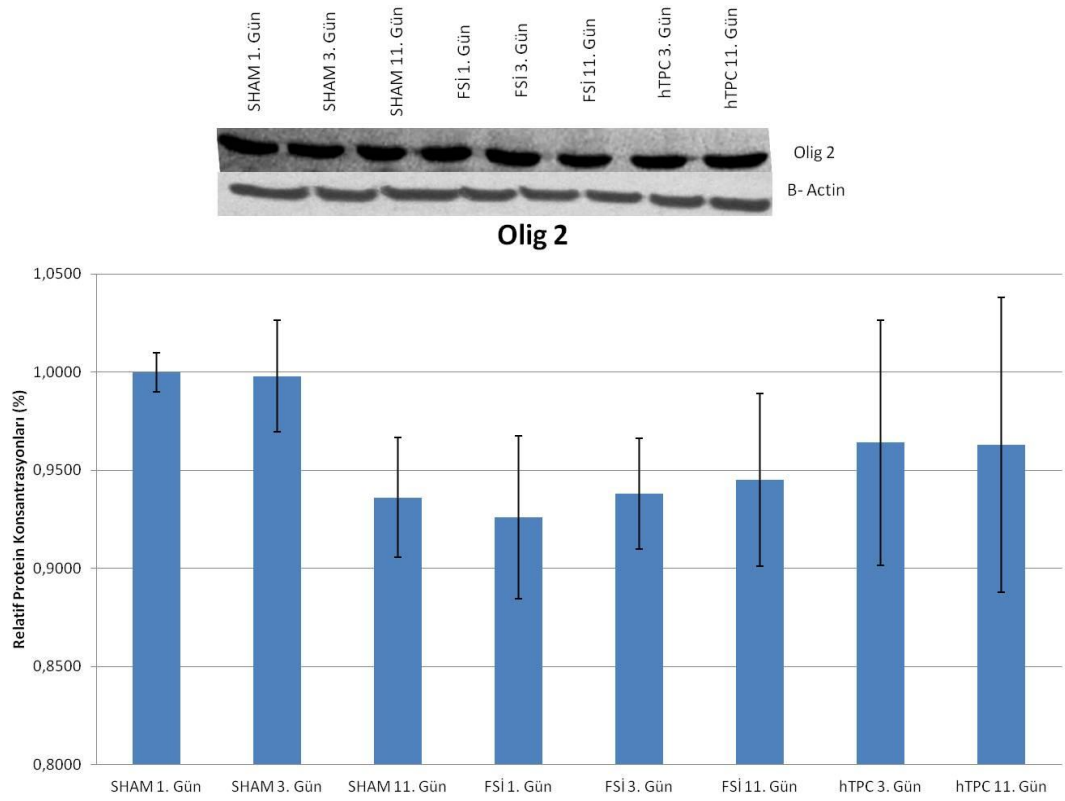
Şekil 4.18.Deney gruplarına ait beyin dokularının NGN2 için Western Blot sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark yoktur.



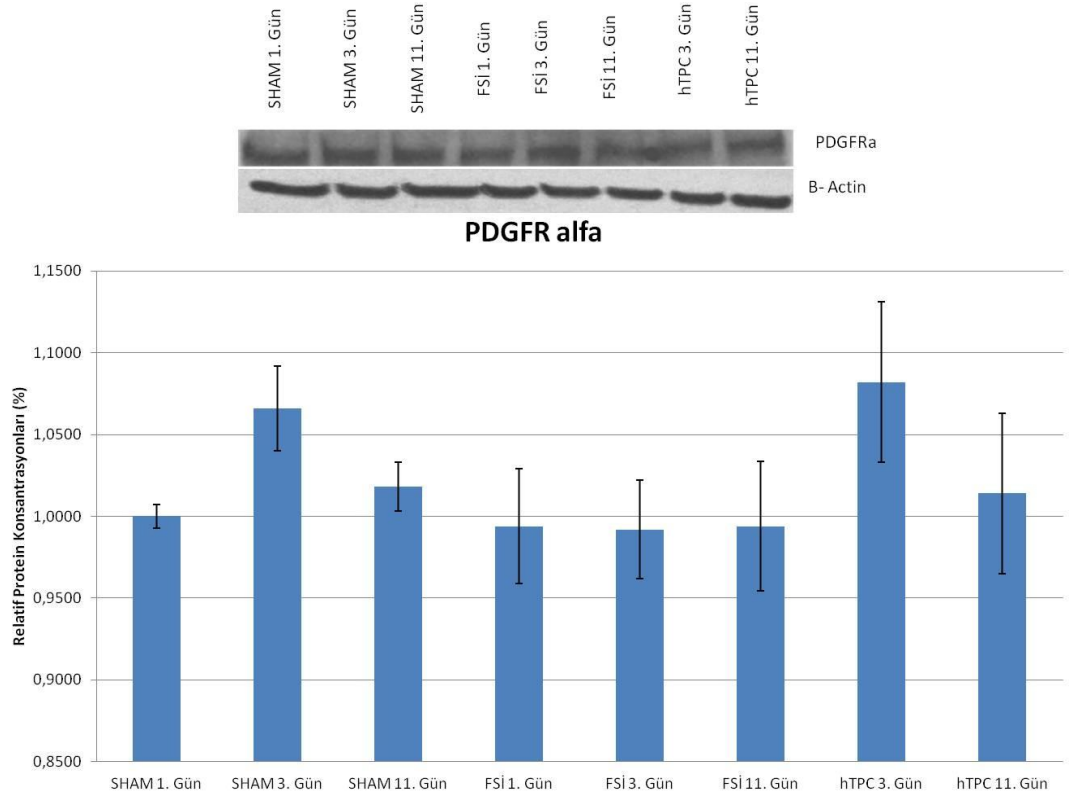
Şekil 4.19.Deney gruplarına ait beyin dokularının NKX2.2 için Western Blot sonuç grafiği. hTPC 3. ve 11. gün grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı artış vardır ($p < 0.05$).



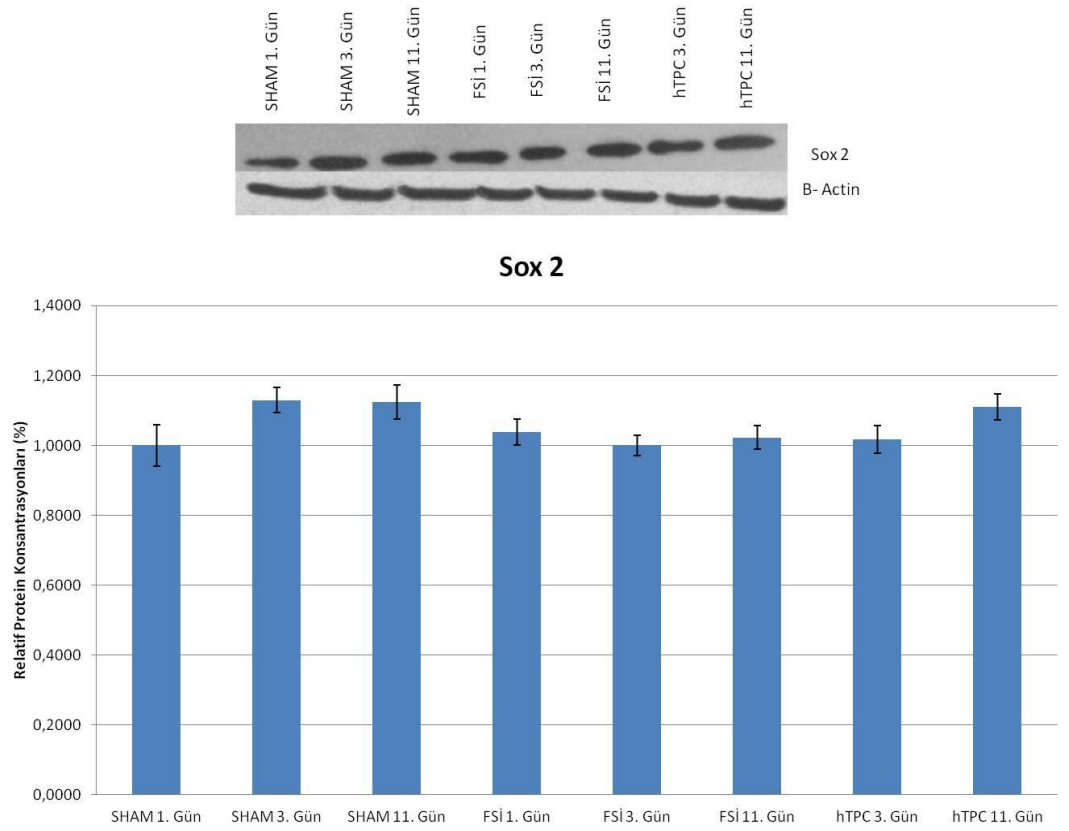
Şekil 4.20.Deney gruplarına ait beyin dokularının Olig1 için Western Blot sonuç grafiği. . Gruplar arasında anlamlı fark yoktur.



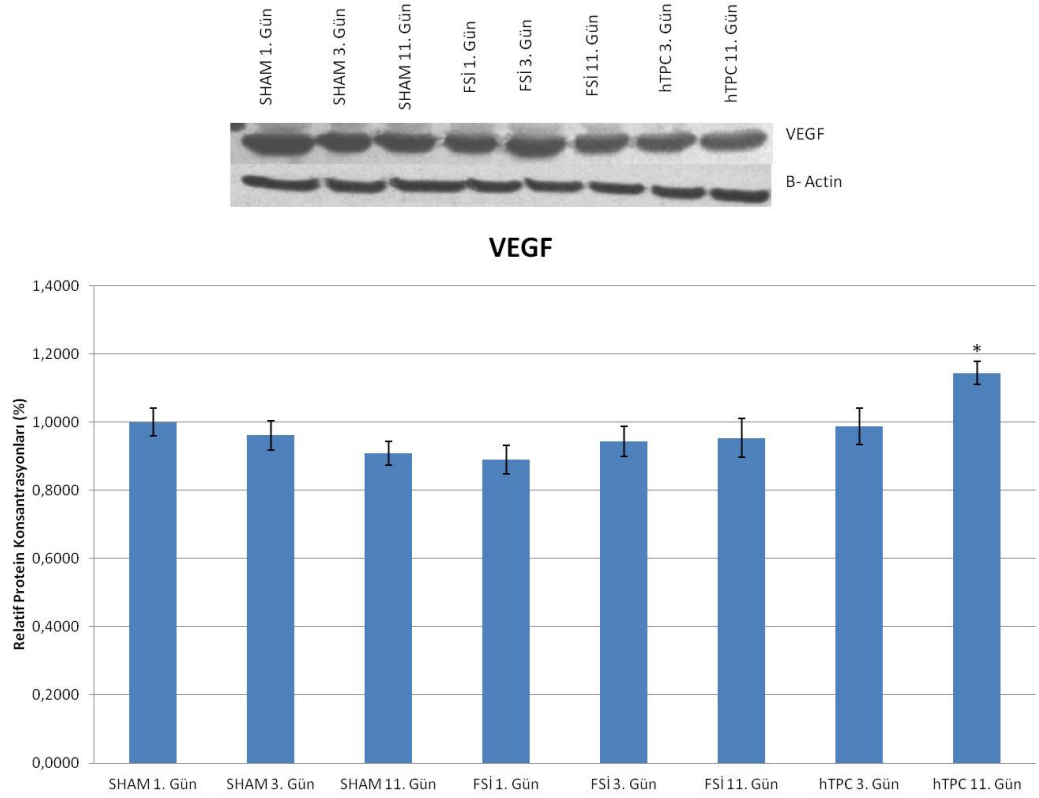
Şekil 4.21.Deney gruplarına ait beyin dokularının Olig2 için Western Blot sonuç grafiği. . Gruplar arasında anlamlı fark yoktur.



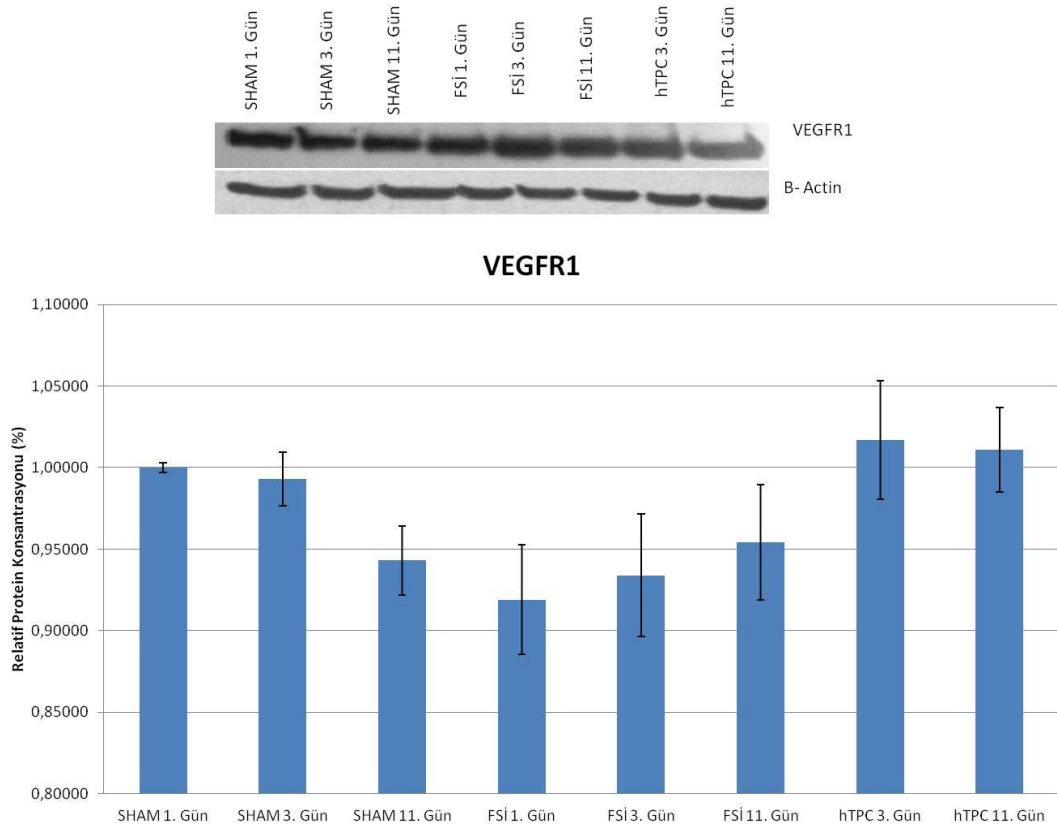
Şekil 4.22. Deney gruplarına ait beyin dokularının PDGFR α için Western Blot sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark yoktur.



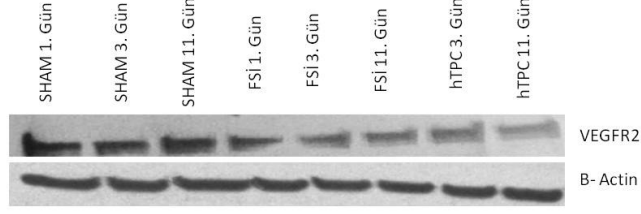
Şekil 4.23:Deney gruplarına ait beyin dokularının Sox2 için Western Blot sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark yoktur



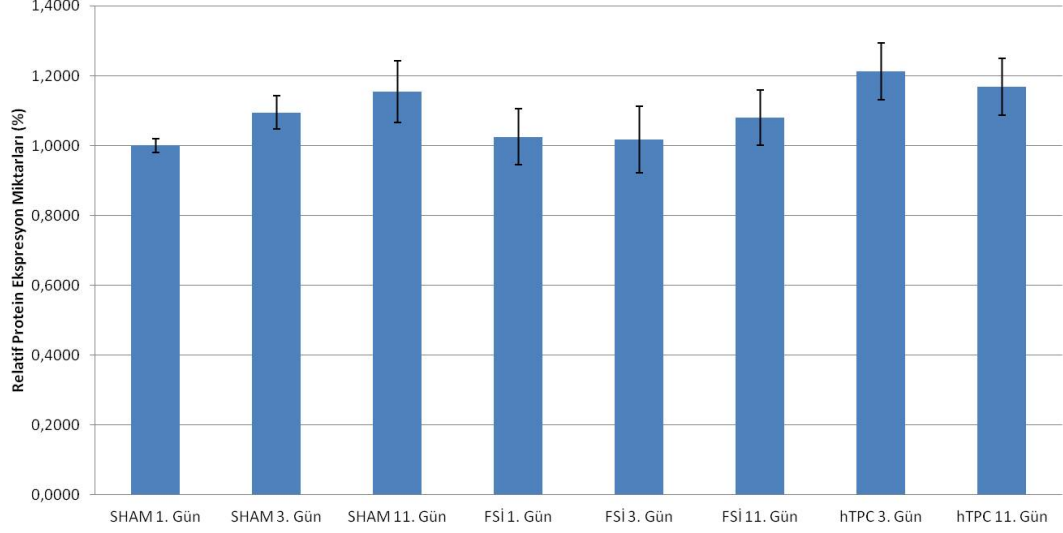
Şekil 4.24. Deney gruplarına ait beyin dokularının VEGF için Western Blot sonuç grafiği. hTPC 11. gün grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı artış vardır ($p<0.05$).



Şekil 4.25. Deney gruplarına ait beyin dokularının VEGFR1 için Western Blot sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark yoktur



VEGFR2

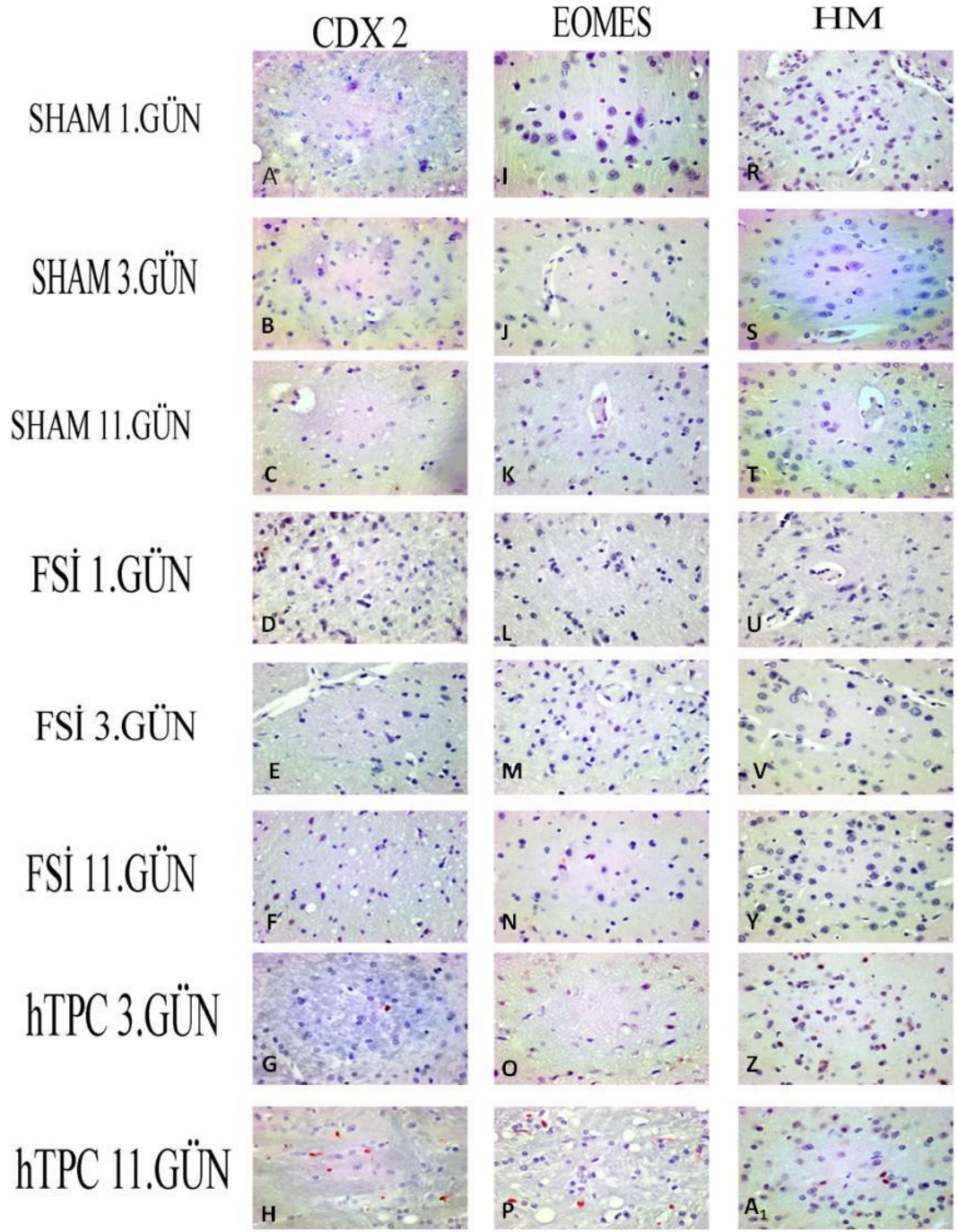


Şekil 4.26. Deney gruplarına ait beyin dokularının VEGFR2 için Western Blot sonuç grafiği. Gruplar arasında anlamlı fark yoktur

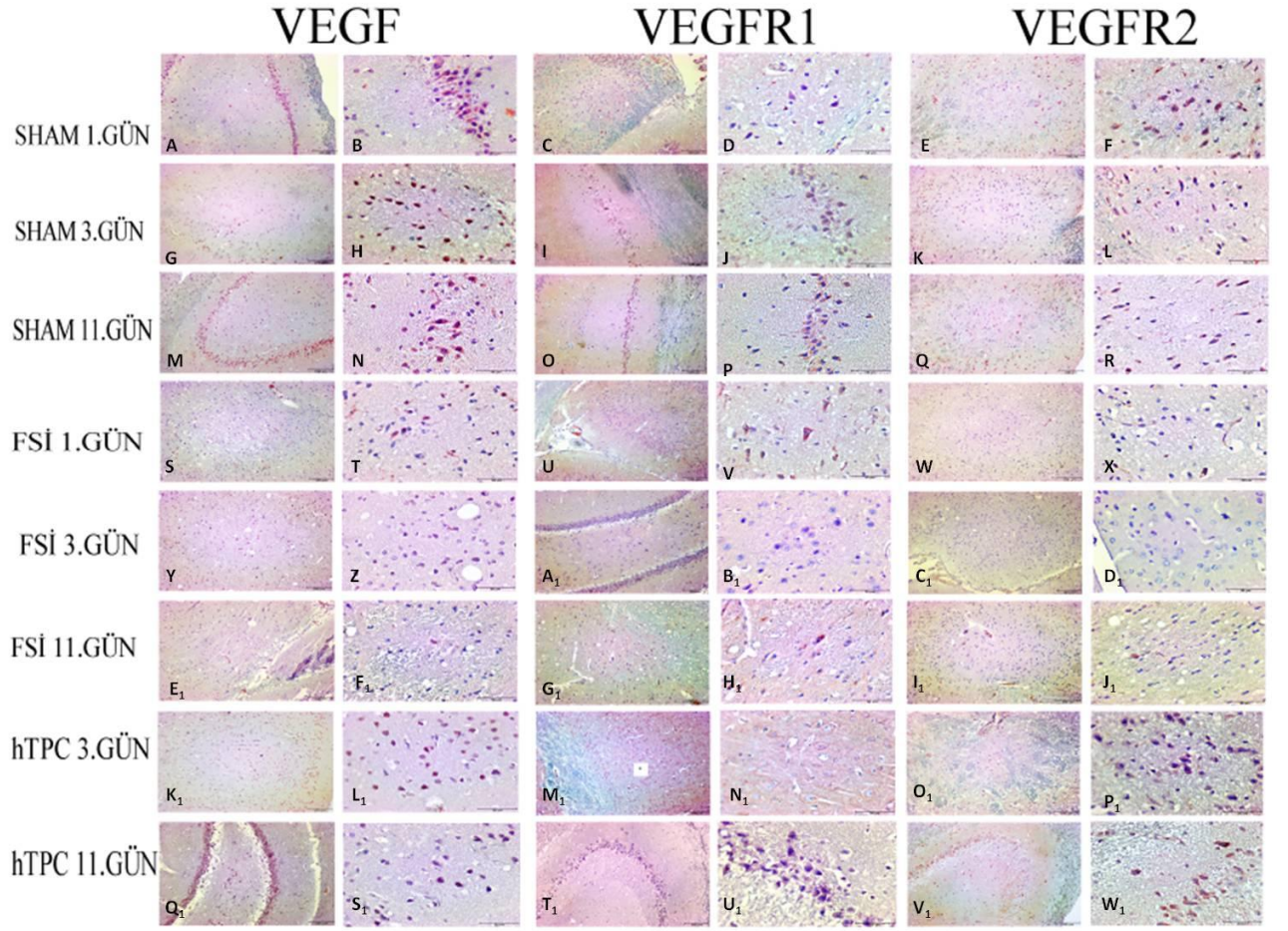
4.10. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

hTPC'lerin beyin dokusuna transplante olduğu belirlenmesi için CDX2, EOMES ve İnsan Mitokondriyal Antikor (HM) ile immünohistokimyasal boyama yapılmıştır.

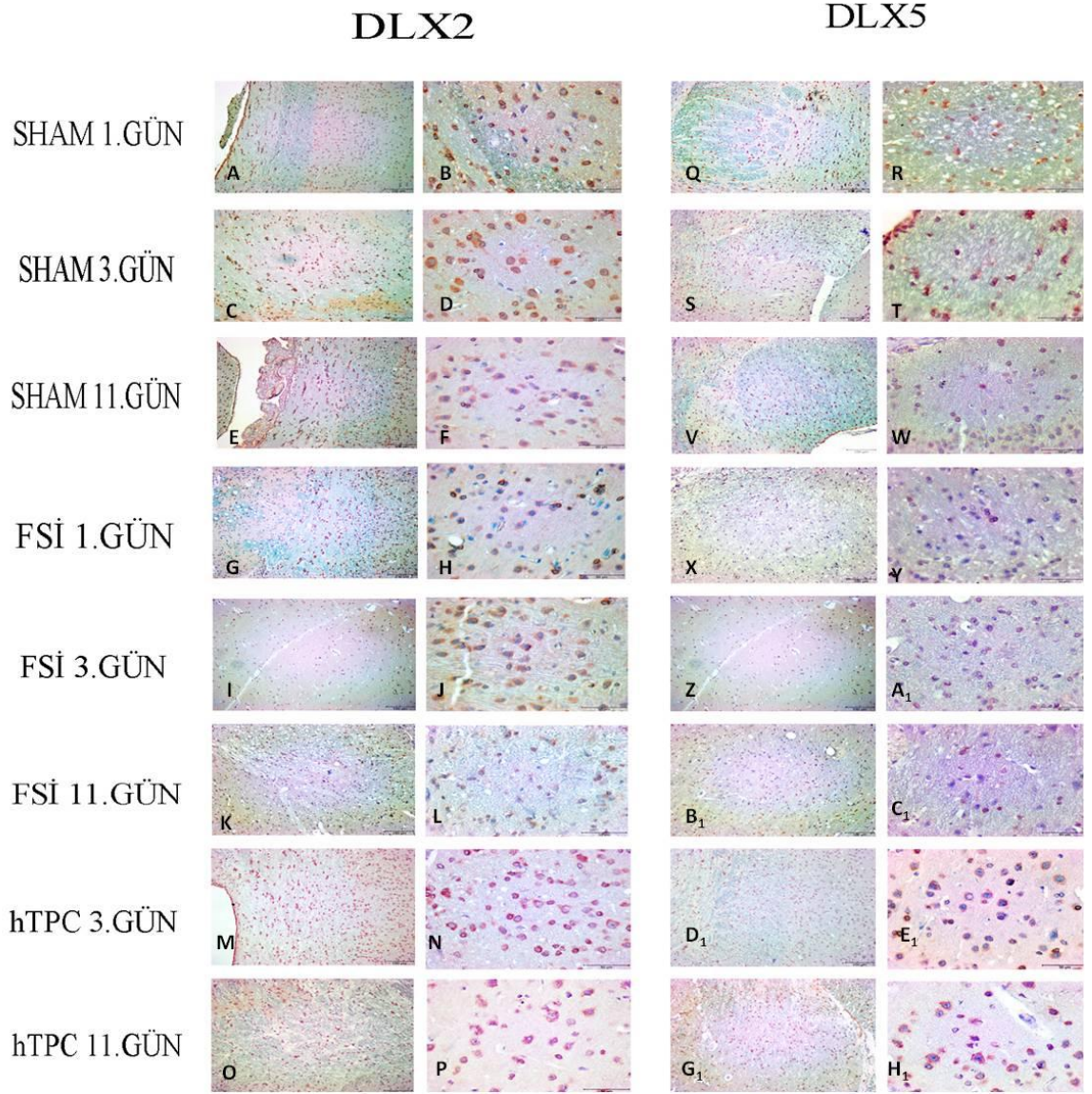
Ek olarak beyin dokusunda nörogenik belirteçlerin ve anjiyogenik belirteçlerin varlığı ve lokalizasyonu VEGF, VEGFR1, VEGFR2, DLX2, DLX5, LHX6, NGN1, NGN2, Olig1, Sox2, Olig2, PDGFR α ve NKX2 immünohistokimyasal boyanmaları gerçekleştirilmiştir.



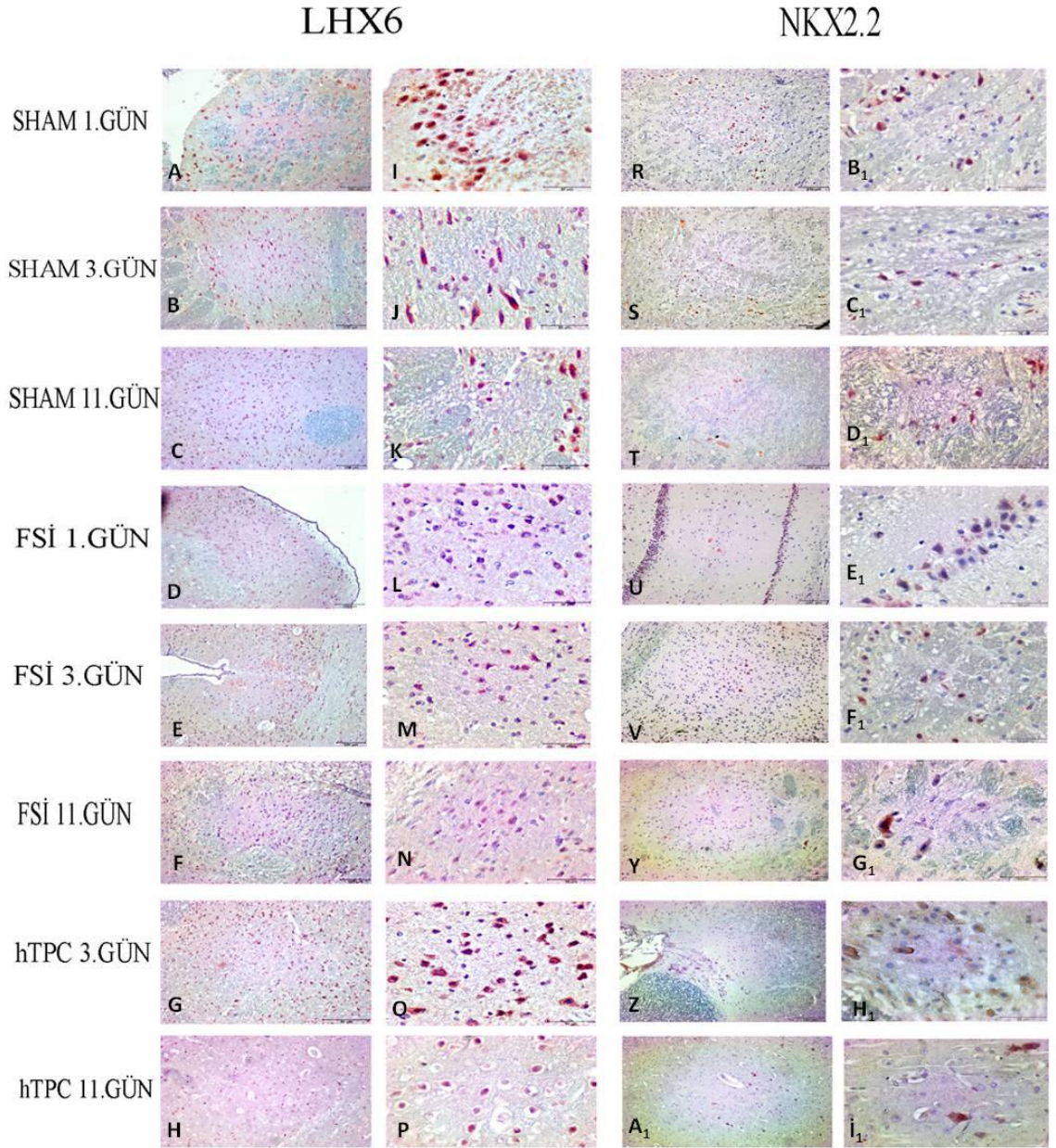
Şekil 4.27:Deney gruplarına ait dokularda hücre saptama için immünohistokimya bulguları(A, B, C, D, E, F, G, H CDX2, 40X; I, J, K, L, M, N, O, P EOMES 40X; R, S, T, U, V, Y, Z, A₁, 40X).



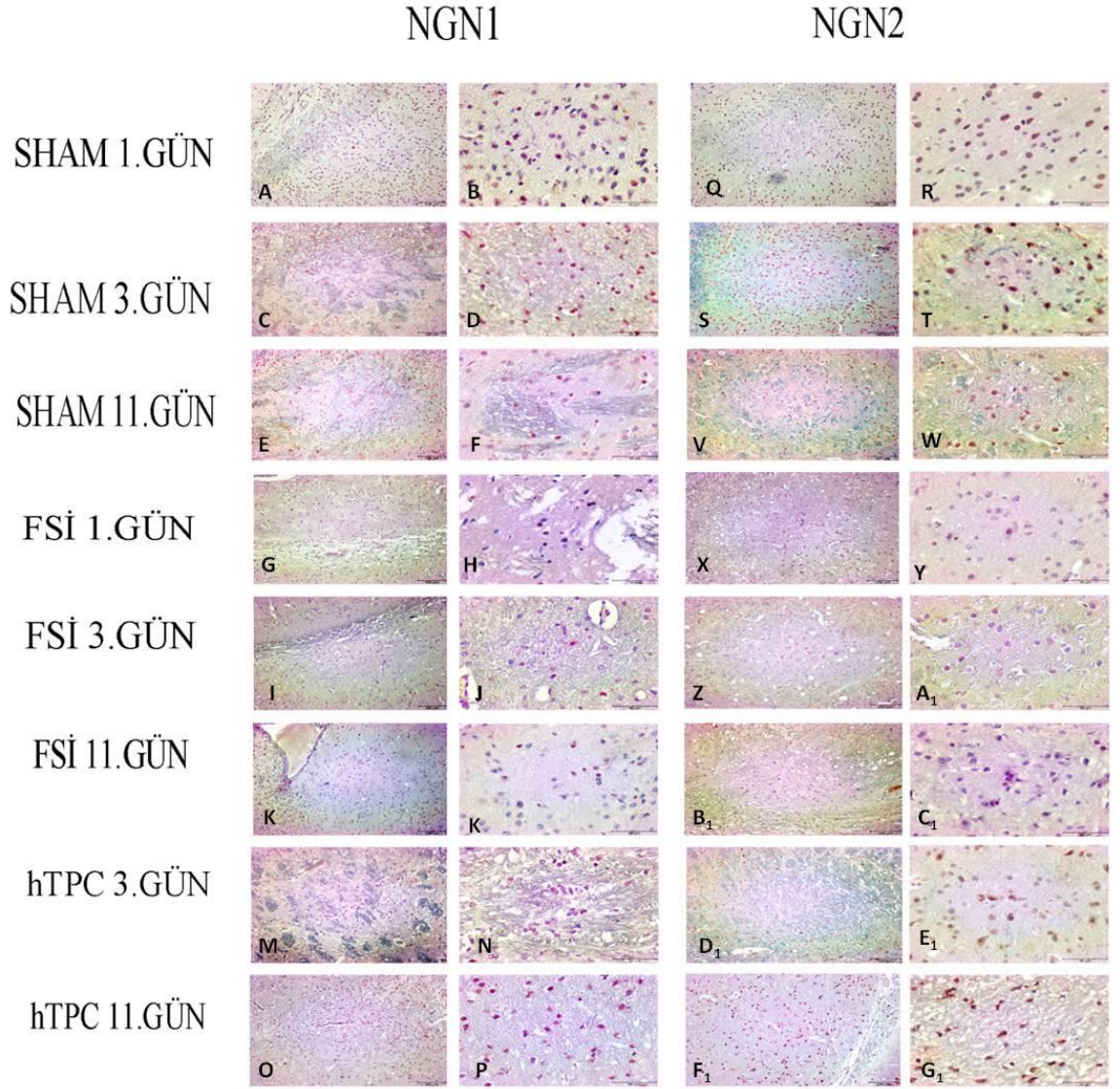
Şekil 4.28:Deney gruplarına ait dokularda anjiyogenik belirteçlerin immünohistokimya bulguları (a, b, c, d, e, f, g, h, r, s, t, u, v, y, z, a₁, j₁, k₁, l₁, m₁, n₁, o₁, p₁, r₁ 20x; i, j, k, l, m, n, o, p, b₁, c₁, d₁, e₁, f₁, g₁, h₁, i₁, s₁, t₁, u₁, v₁, y₁, z₁, a₂, b₂ 40x)



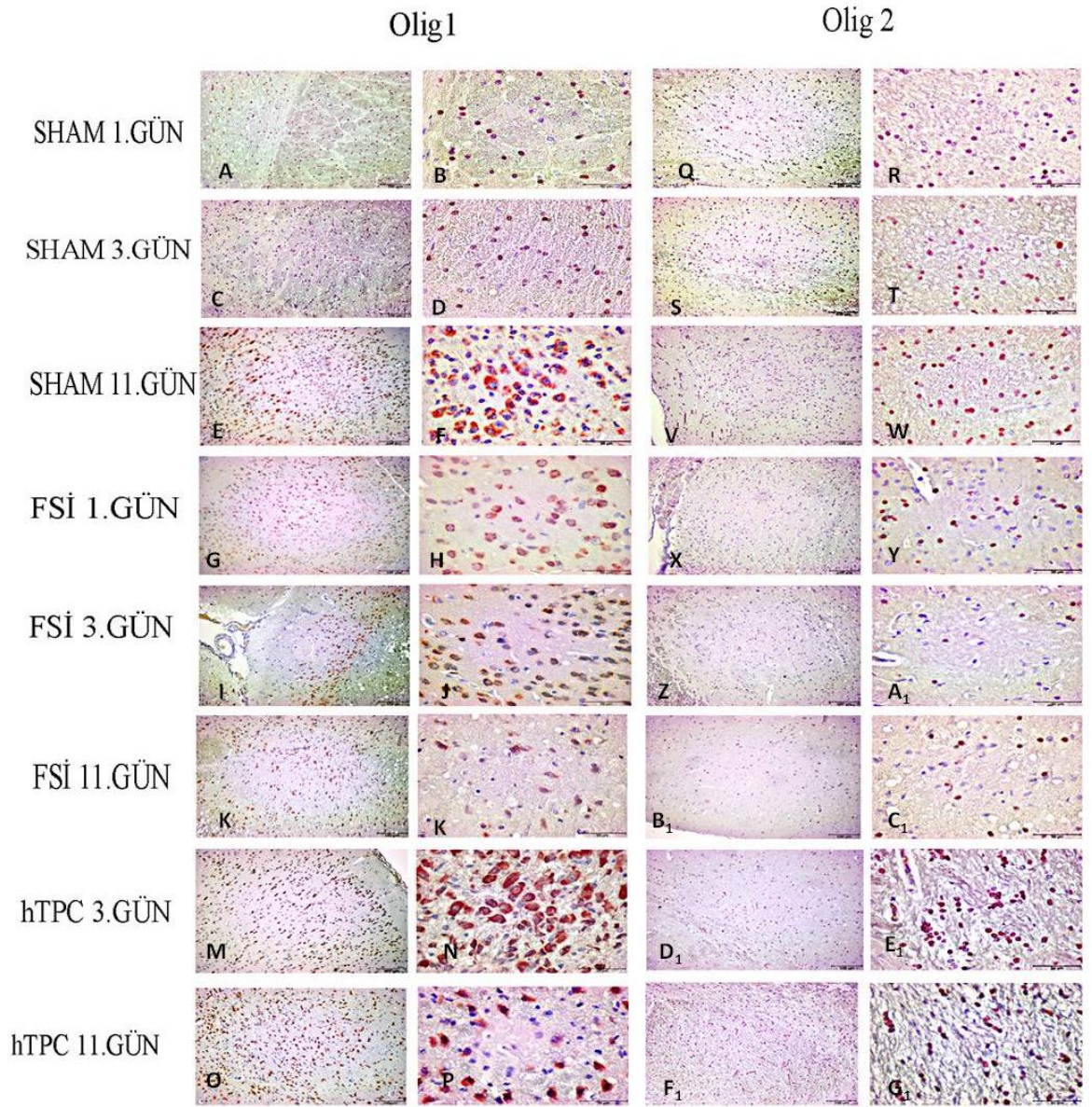
Şekil 4.29:Deney gruplarına ait dokularda DLX2 ve DLX5 immünohistokimya bulguları (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, V, X, Z, B₁, D₁, F₁ 20x; B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, W, Y, A₁, C₁, E₁, G₁ 40x).



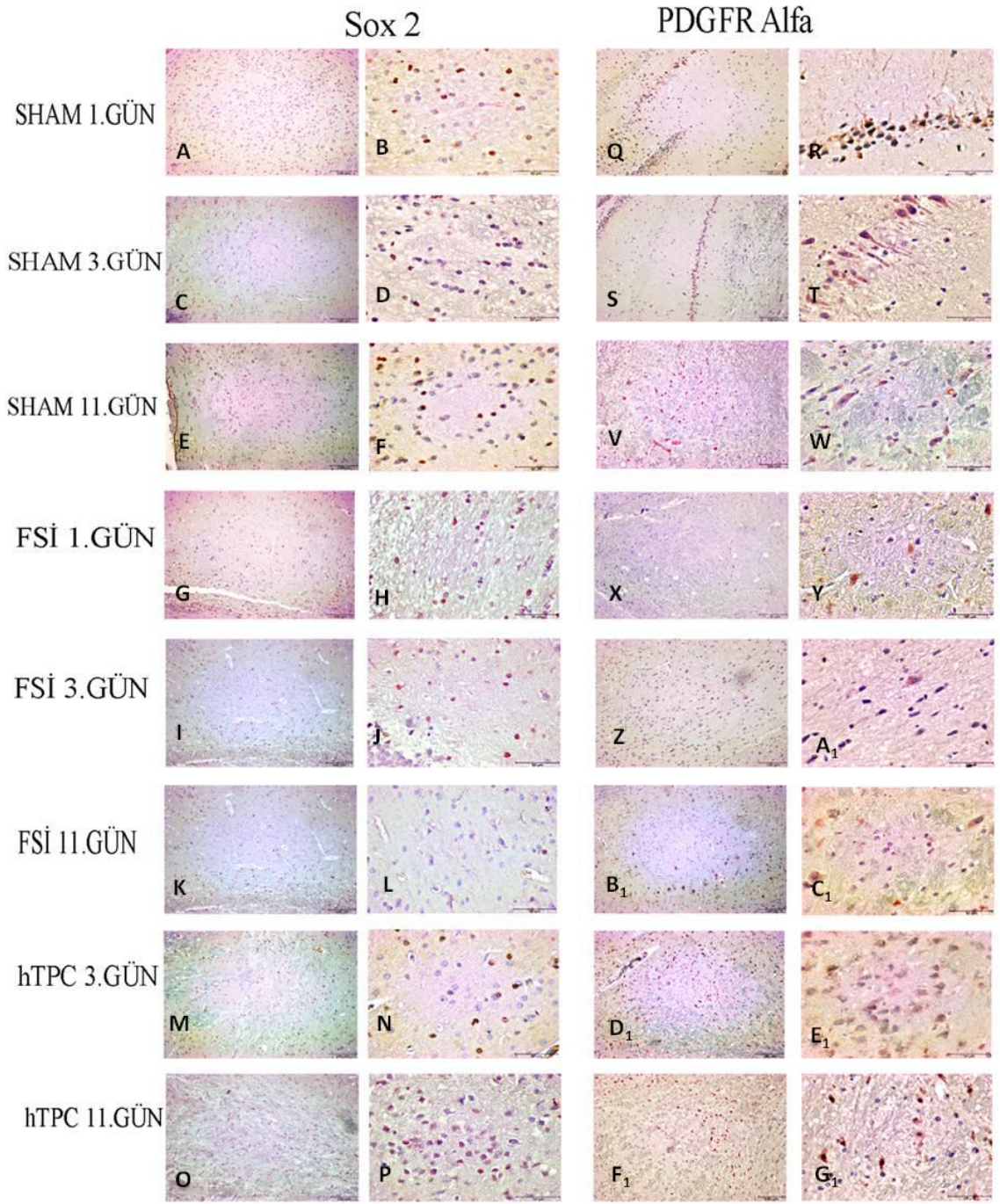
Şekil 4.30:Deney gruplarına ait dokularda LHX6 ve NKX2.2 immünohistokimya bulguları (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, V, X, Z, B₁, D₁, F₁ 20x; B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, W, Y, A₁, C₁, E₁, G₁ 40x).



Şekil 4.31:Deney gruplarına ait dokularda NGN1 ve NGN2 immünohistokimya bulguları (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, V, X, Z, B₁, D₁, F₁ 20x; B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, W, Y, A₁, C₁, E₁, G₁ 40x).



Şekil 4.32:Deney gruplarına ait dokularda Olig1 ve Olig2 immünohistokimya bulguları (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, V, X, Z, B₁, D₁, F₁ 20x; B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, W, Y, A₁, C₁, E₁, G₁ 40x).



Şekil 4.33:Deney gruplarına ait dokularda Sox2 ve PDGFR α immünohistokimya bulguları (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, V, X, Z, B₁, D₁, F₁ 20x; B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, W, Y, A₁, C₁, E₁, G₁ 40x).

5. TARTIŞMA

Nörolojik hastalıklarda tedavi oldukça zordur. Bunun nedeni santral sinir sisteminde nörogenezin sınırlı olması, iyileşmeyi geciktiren aktif inhibitörlerin varlığı ve glial skar dokusunun iyileşmeyi engellemesidir. Bütün çalışmalar ve olumlu sonuçlarına karşın, yetişkin merkezi sinir sistemi içindeki hücrelerin çeşitliliği ve her bir hücrenin görevlerinin farklı olması daha işin başında hücre temelli tedavilerin stratejisi için ayrı bir dezavantaj oluşturmakta ve bu tür çalışmalar için ümit kırıcı olmaktadır.

İnsanlarda gerçekleşen iskemik inmelerin çoğu, orta serebral arterin (MCA) oklüzyonundan kaynaklanır ve bu nedenle beyinde iskemi oluşturmak için hayvan modellerinde MCA oklüzyonu metodu geliştirilmiştir. Bu modellerin amacı; (1) insan inmesinde gerçekleşen patofizyolojik değişiklikleri taklit etmek, (2) tekrarlanabilir lezyonlar oluşturmak, (3) nispeten basit ve noninvaziv prosedürler kullanmak, (4) düşük maliyetli olmak (5) fizyolojik parametrelerin izlenmesini ve beyin dokusunun sonuç ölçümleri için analizini mümkün kılmaktır (Hsu ve ark., 1993). Birçok başka hayvan türü de yukarıda sözü edilen inme modelleme kriterlerini yerine getirir. Bununla birlikte sıçanlar, (1) serebral anatomi ve fizyolojilerinin insanlara benzerliği, (2) fizyoloji ve beyin dokusunun kolay analizini mümkün kılan küçük boyutlara sahip olması, (3) düşük maliyetleri, (4) türler arasındaki dikkate değer genetik homojenlik ve (5) daha büyük hayvanlara göre kullanımın kamu ve kurumsal etik açısından da kabul edilebilirliği, model kullanılacak denek türü için tercih nedeni olmalarını sağlamaktadır (Sicard ve Fisher 2009).

Serebral kan akımının kritik değer altına inmesiyle oluşan iskemik inme, inmelerin %88'ini oluşturmaktadır. Beyinde oluşan bu iskemi bölgelerinin %80'i orta serebral arter (MCA) ile beslenmektedir. Dolayısı ile birçok hayvanda inme modeli MCA'nın tıkanıklığı üzerine kurulmuştur (Baird ve Donnan 1993). Bizim de kullandığımız bu model ile %2 TTC boyanması ile SHAM gruplarıyla karşılaştırıldığında belirlediğimiz beyaz infarkt alanları modelin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu gözler önüne sermektedir.

hTPC'lerin nöral farklılandırılması için kullanılan iki faktör BDNF ve NSF'dir. BDNF beyinde yüksek oranda eksprese olan bir faktördür (Timmusk ve ark. 1993). hTPC hücreleriyle yaptığımız nöral hücelere farklılaşma deneyi sonucunda hem NeuN proteininin hem de Krezil Violet boyanmaların farklılanan hTPC'lerde pozitif olduğunu tespit ettik. Çalışmamız sonucunda nöronal belirteç NeuN ile işaretlenebilen, Krezil Violet ile boyanan Nissl cisimcikleri içeren ve morfolojik olarak da nöron benzeri hücelere elde edilmiştir. Bu durum da transplante olan hTPC'lerin iskemik beyinde nöron benzeri hücelere farklılanabileceğini düşündürmektedir.

İnsan trofoblast progenitor hücrelerinin, Parkinson hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için alternatif pluripotent kök hücre kaynağı olma potansiyeline sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmeye çalışılmıştır (Gupta ve ark. 2005). Retinoik asitin; insan trofoblast progenitor hücrelerini, dopaminerjik trofoblastik nöral kök hücelere (tNKHs) farklılaşmaya indüklediği belirlenmiş olup bu hücrelerin Parkinson hastalığı sıçan modelinde transplantasyonunun büyük ölçüde dopaminerjik nigrastriatal yolağını yenilediği ve böylece fonksiyonel olarak hem akut hem de kronik Parkinson hastalığı sıçanlarında, parkinson motor nöron eksikliğini azalttığı tespit edilmiştir (Gupta ve ark. 2005).

Birçok çalışma, serebral iskemide kök hücre transplantasyonunun endojen progenitor hücre çoğalmasında önemli ölçüde artırdığını ve yeni çoğalmış hücrelerin beynin hasar gören alanlarına göç ettiğini göstermiştir (Arvidsson ve ark. 2002, Kokaia ve Lindvall 2003).

Kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin hasarlı beyinde nöronal ve vasküler hücre tiplerini oluşturarak tamir sürecine yardım ettiği gösterilmiştir (Hill ve ark. 2004). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda iyi hazırlanmış hücrelerle başlangıç için oldukça tatmin edici sonuçların alınmaya başlandığı, her geçen gün artan yayınlarla da anlaşılmaktadır. Son 10 yıllık çalışmalara baktığımızda özellikle kök hücreler ile progenitor hücrelerin santral sinir sisteminde yapısal nöroplastisite potansiyeline sahip oldukları birçok kez ispatlanmıştır.

Serebral iske mi; nöronların, astrositlerin, oligodendositlerin, endotelial hücrelerin de dâhil olduğu çok sayıdaki hücrenin birlikte tahrip olduğu bir hastalıktır. Dolayısı ile

serebral iskemideki tedavi stratejisi yalnızca nöral elementlerin tamir olması değil aynı zamanda damarlar gibi bu dokuları besleyen yapıların da tamir olmasını gerekli kılmaktadır.

İnme sonrasında hasarın en yüksek olduğu iskemik korda endojen nöral progenitör hücrelerin proliferasyonu yoktur. İskemik penumbra ise oldukça azdır. Subventriküler zondan köken alan nöral progenitör hücreler kan damarları boyunca göç ederek post-iskemik kora geçerler (Kojima, Hirota ve ark. 2010). Fokal serebral iske mi sonrasında yeni oluşan damarlar göç eden nöroblastların migrasyonunu yönlendirir (Zhang, Chopp, ve ark. 2014). Bu durum, iskemik hasar sonrasında nörogenez ve anjiyogenez ilişkisini ve neden inme tedavisinin nöronların yanı sıra damarları da hedef alması gerektiğini ortaya koyar. Endometriyumda damar içine giren trofoblastlar, kan damarlarının dallanmasından sorumludur ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), KDR (VEGF reseptörü 2), Flt-1 (VEGF reseptörü 1), PLGF (plasental büyüme faktörü-1) ve iyi bir vazoaktif faktör olan eNOS'u eksprese ederler (Ahmed ve ark. 2000, Rielland ve ark. 2008). Düşük oksijenli ortamlar, bu maternal-fetal anjiyojenik değişimlerin tetiklenmesine yardımcı olur. Aslında, pre-implantasyon ve implantasyon mikroçevresi, iskemik inme sonrası nöral bölgedeki hipoksik ortama çok benzer. Bu yüzden, inme sonrası merkezi sinir sistemi (MSS) içine hTPC transplantasyonunun anjiyogenik ve vasküler yeniden modellenme mekanizmalarını teşvik edebileceği, iskemik alana oksijen ve besin taşınmasını sağlayabileceği ve böylece inme sonrası sekonder hasarın önlenmesini sağlayabileceği kuvvetli bir olasılıktır.

VEGF'in anjiyogenezi artırıcı etkisinin yanı sıra nöroprotektif etkileri de olduğu bilinmektedir. VEGF'in anjiyojenik etkisi, endotel hücre sağkalımını hızlandıran ve VEGFR-2 reseptörü ve fosfatidilinositol 39-kinaz (PI3-K) sinyal yolağı vasıtasıyla aracılık edilen bir antiapoptotik etkidir (Gerber ve ark. 1998). Bu yolak, aynı zamanda, serebellar nöronlarda (Dudek ve ark. 1997) insülin benzeri büyüme faktörünün (Neufeld ve ark. 1999) hücre sağkalımı patogenezinde ve motor nöronlarda glial hücre hattından türetilen nörotrofik faktörlerle (Soler ve ark. 1999) ilişkilendirilmiştir. VEGF'in kendisi direk nörotrofik etkilere sahip gibi görünmektedir, çünkü aksonal büyüme yi uyarır ve farede üstün servikal ve dorsal kök gangliyon nöronlarının hayatta kalmasını artırır (Sondell ve ark. 1999). Başka bir

çalışmada da sıçanın mezensefalik nöronlarının hayatta kalmasını sağladığı gösterilmiştir (Silverman ve ark. 1999).

Buna karşın, inme sonrası 1 saatte ekzojen VEGF verilmesi kan beyin bariyerinde (KBB) sızıntıyı artırır, hemorajik transformasyonu artırır ve iskemik hücre hasarını artırır. Bu bulgular, serebral mikrovasküler perfüzyonun artırılması ve iskemik beyindeki KBB sızıntısının artırılması için VEGF'nin çok yönlü bir rolü olduğunu göstermektedir. Bu durum anjiyogenik aktivitesi sırasında VEGF'in MMP indükleyici etkisiyle ilişkilidir. Yeni oluşan damarlar için KBB açılması gerekmektedir (Zhang Z. G. ve ark. 2000). Bu durum kısa vadede ödem ve hemoraji gibi riskler oluştursa da, kök hücre tedavisi için endojen VEGF yoluyla oluşan KBB sızıntısı avantajlı olabilir.

Kan-beyin bariyeri (KBB), beyin kılcal endoteli tarafından oluşturulur ve büyük molekül nöroteraptiklerinin %100'ünü ve tüm küçük molekül ilaçların % 98'inden fazlasını beyinin dışında tutar (Pardridge 2005). Terapötik maddelerin beyin belirli bölgelerine verilmesinin zorluğunun üstesinden gelmek, çoğu beyin bozukluğunun tedavisinde büyük bir zorluk oluşturmaktadır. Nöroprotektif rolünde, kan-beyin bariyeri, potansiyel olarak önemli bazı diagnostik ve terapötik ajanların beyne taşınmasını engellemek üzere işlev görür. Tanı ve tedavide etkili olabilecek terapötik moleküller ve antikolar KBB'ni yeterli miktarda geçmez. Dolayısıyla VEGF aracılı KBB sızıntıları kök hücre tedavileri için avantajlıdır.

Burada da CDX2 ve EOMES gibi trofoblast progenitör belirteçleriyle ve insan mitokondriyel antijen ile hücrelerin beyin dokusuna transplantasyonunu göstermeyi başardık. Bunun yanı sıra, hTPC'lerle yapılan qRT-PCR ve WB sonuçları da göstermektedir ki bu hücreler anjiyogenik faktör VEGF'i ve onun reseptörleri VEGFR1 ve VEGFR2'yi eksprese etmektedir. Ek olarak ELISA sonuçları da salgılanan VEGF'i bu hücrelerin süpernatantlarında göstermektedir. Sonuç olarak hücre transplantasyonunun 11.gününde beyin dokularında VEGF protein miktarının anlamlı olarak artışı, bu hücrelerin iskemik hasarlı beyinde anjiyogenezi artırıcı yönde rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır.

İnme ve travmatik beyin hasarı (TBH) ile ilgili önceki araştırmalar, gri cevher içindeki nöronal hücrelerdeki patolojik değişiklikleri ağırlıklı olarak vurgulamıştır.

Bununla birlikte, yakın tarihli araştırmalar, bu koşullardan uzun vadede iyileşmede beyaz cevher bütünlüğüne eşit önemini vurgulamıştır. Demiyelinizasyon, beyaz cevher hasarının önemli bir bileşenidir ve miyelin kılıfı ve oligodendrosit hücre ölümü ile karakterizedir. Demiyelinizasyon, uzun süreli sensorimotor ve bilişsel açıklara önemli ölçüde katkıda bulunur. Çünkü yetişkin beyin sadece oligodendrosit rejenerasyonu ve aksonal remiyelinizasyon için sınırlı kapasiteye sahiptir (Pantoni ve ark. 1996). LFB boyanmaları ile iskemi sonrasındaki miyelin kaybı SHAM ve FSİ grupları arasındaki karşılaştırma ile çalışmamızda ortaya konmuştur. Progenitör hücre transplantasyonu sonrasında bu demiyelinizasyondaki azalma dikkat çekicidir. Demiyelinizasyonun temel patolojisinde oligodendrosit ölümü vardır (Shi ve ark. 2015) hTPC transplantasyonu sonrasında oligodendrosit kader belirleyici Olig 1 ve oligodendrosit soylarından biri olan O-2A'nın belirteci olan PDGFR α 'nın miktarındaki artışların Western Blot metodu ile belirlenmesi bu sonucu açıklayabilir. Transplantasyon sonrasında artan oligodendrosit miktarı demiyelinizasyonun geri dönüşümünü sağlayabilir.

Bu çalışmada insan trofoblast progenitör hücre transplantasyonu öncesinde ve sonrasında beyin dokularında nörogenik belirteçlerin ekspresyon miktarları Western Blot kullanılarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, insan term plasenta kökenli trofoblast progenitör hücrelerin transplantasyonunun 11. gününde nöronal farklılaşma ve migrasyonda görevli DLX5 ve majör anjiyogenik faktör VEGF protein miktarlarındaki istatistiksel anlamlı artış vardır. Ek olarak, insan term plasenta kökenli trofoblast progenitör hücrelerin transplantasyonunun hem 3. hem 11. gününde oligodentrogenezin önemli transkripsiyon faktörlerinden NKX2.2'nin protein miktarındaki istatistiksel anlamlı artış saptanmıştır. Bunun yanı sıra istatistiksel olarak anlamlı olmasa da LHX6, Olig1, PDGFR α , VEGFR1 ve VEGFR2'de de protein düzeyinde artışlar saptanmıştır. İnsan term plasenta kökenli trofoblast progenitör hücrelerin transplantasyonu sonrasında tespit edilen hücrelerin miktarı azdır. Bu durum, bu hücrelerin iskemik beyindeki endojen restoratif mekanizmaları harekete geçiren bir mikro ortam sağladığını düşündürür. Bu nedenle, bu çalışmanın sonuçları, hTPC'ye dayalı tedavinin inme hastaları için etkili bir tedavi sunabileceğini düşündürmektedir. Transplante edilen hTPC'lerin terapötik etkilerinin altında yatan kesin mekanizmaları tanımlamak ve iskemik inmeden sonra hTPC'ye

dayalı tedavi ile sağlanan fonksiyonel sonucu değerlendirmek için gelecekte daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışma iskemi sonrasında 3. gün ile iskemi-reperfüzyon sonrası akut fazı 11. gün ile gecikmiş nöronal ölüm fazını kapsamaktadır. Bu çalışma insan term plasenta kökenli trofoblast progenitör hücrelerin anjiyogenik faktörler VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 eksprese ettiğini ve VEGF ve VEGFR1 salınımı yaptığını gösteren ilk çalışmadır. Dahası bu çalışma ile iskemi sonrasında insan term plasenta kökenli trofoblast progenitör hücrelerin transplantasyonunun anjiyogenez, nörogenez, remiyelinizasyon ve infarkt hacminin küçülmesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada insan term plasenta kökenli trofoblast progenitör hücrelerin transplantasyonunun iskemik beyin hasarından sonra iyileşme üzerine yararlı etkileri gösterildi.

Sonuç olarak;

1. Term plasentadan trofoblast progenitör hücre izolasyonu ve bu hücrelerin CDX2 ve EOMES ile karakterizasyonu yapılabilmektedir.
2. İnsan trofoblast progenitör hücreler uygun koşullar altında nöron-benzeri hücrelere farklanabilmektedirler. Bu nöron-benzeri hücreler NeuN eksprese ederler ve Nissl cisimciklerine sahiptirler.
3. MCAO modeli ratlarda iskemik inme oluşturmak için kullanılabilir ve bu inme sonucunda oluşan infarkt alanı %2TTC ile belirlenebilir. İskemi-reperfüzyondan 24 saat sonra kuyruk veninden yapılan insan trofoblast progenitör hücre enjeksiyonu yapıldıktan sonra 3. ve 11. günlerinde bu infarkt alanında azalma gözlemlenmiştir. Bu beyin dokularında immünohistokimya yöntemiyle CDX2, EOMES ve insan mitokondriyal antijen kullanılarak hücrelerin buraya transplantasyonu olduğu tespit edilmiştir.
4. İskemik inme özellikle korpus kallozum bölgesinde LFB ile tespit edilen demiyelinizasyona neden olur. İskemi-reperfüzyondan 24 saat sonra kuyruk veninden yapılan insan trofoblast progenitör hücre enjeksiyonunun 3. ve 11. günlerinde remiyelinizasyon saptanmaktadır.
5. Bütün gruplara ait beyin dokularında yapılan Western Blot ve immünohistokimya deneylerinden yola çıkarak; insan term plasenta kökenli trofoblast progenitör hücre transplantasyonu ile fokal iskemik sonrası beyinde bazı nörojenik ve anjiyogenik belirteçlerin arttığı gösterilmiştir.
6. Bu çalışma insan term plasenta kökenli trofoblast progenitör hücrelerin anjiyogenik faktörler VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 eksprese ettiğini ve VEGF ve VEGFR1 salınımı yaptığını göstermiştir.
7. Bu çalışma ile iskemik sonrasında insan term plasenta kökenli trofoblast progenitör hücrelerin transplantasyonunun anjiyogenez, nörogenez, remiyelinizasyon ve infarkt hacminin küçülmesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

Achen MG, Stacker SA. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol* 1998; 79: 255-265.

Ahmed A, Dunk C, Kniss D, Wilkes M. Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Lab Invest* 1997; 76: 779-791.

Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen--a review. *Placenta* 2000; 21 Suppl A: S16-24.

Albuquerque RJ, ve ark. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med* 2009; 15: 1023-1030.

Altman J, Bayer SA. The development of the rat spinal cord. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1989; 85: 1-164.

Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, Santi S, Cuppini R. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 2004; 1017: 21-31.

Amlie-Lefond C, Sebire G, Fullerton HJ. Recent developments in childhood arterial ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2008; 7: 425-435.

Arıncı K, Elhan A. *Anatomi 2. cilt: Dolaşım sistemi, periferik sinir sistemi, merkezi sinir sistemi, duyu organları: Güneş kitapevi. 2006.*

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002; 8: 963-970.

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995;168: 342-357.

Baird AE, Donnan GA. Prognostic value of reperfusion during first 48 hours of ischaemic stroke. *Lancet* 1993;342: 236.

Beck H, Raab S, Copanaki E, Heil M, Scholz A, Shibuya M, Deller T, Machein M, Plate KH. VEGFR-1 signaling regulates the homing of bone marrow-derived cells in a mouse stroke model. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010;69: 168-175.

Bernard P, Harley VR. Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 400-410.

Bhasin A, Srivastava MV, Mohanty S, Bhatia R, Kumaran SS, Bose S. Stem cell therapy: a clinical trial of stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2013; 115: 1003-1008.

Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1017-1021.

Brazel CY, Limke TL, Osborne JK, Miura T, Cai J, Pevny L, Rao MS. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* 2005; 4: 197-207.

Buffo A. Fate determinant expression in the lesioned brain: Olig2 induction and its implications for neuronal repair. *Neurodegener Dis* 2007; 4: 328-332.

Buffo A, Vosko MR, Erturk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, Gotz M. Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18183-18188.

Cai J, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 11227-11234.

Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD. Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 1998; 20: 869-882.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-660.

Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 561-569.

Cobbs CS, Chen J, Greenberg DA, Graham SH. Vascular endothelial growth factor expression in transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 1998; 249: 79-82.

Daly ME, Makris A, Reed M, Lewis CE. Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment? *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1660-1673.

Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 339-350.

Dere F. Nöroanatomî fonksiyonel nöroloji atlası ve ders kitabı: Nobel Tıp Kitabevi. 1999.

Dikici G. The electron microscopical evaluation of cell phone exposure on rat brain tissue. Master Thesis. 2002. Dicle University, Turkey.

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 2002; 36: 1021-1034.

Dogan T. Fonksiyonel nöroanatomî. ANKARA: Metu-Press. 2002.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.

Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997; 275: 661-665.

Egeland M, Zunszain PA, Pariante CM. Molecular mechanisms in the regulation of adult neurogenesis during stress. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16: 189-200.

Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* 2005; 209-231.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.

Ferri AL, et al. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 2004; 131: 3805-3819.

Filippi A, Tiso N, Deflorian G, Zecchin E, Bortolussi M, Argenton F. The basic helix-loop-helix olig3 establishes the neural plate boundary of the trunk and is necessary for development of the dorsal spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 4377-4382.

Fix JD. *High-yield Neuroanatomy*: Lippincott Williams & Wilkins. 1995.

Fode C, Gradwohl G, Morin X, Dierich A, LeMeur M, Goridis C, Guillemot F. The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 1998; 20: 483-494.

Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16: 381-390.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287: 1433-1438.

Garman RH. 2011. Histology of the central nervous system. *Toxicol Pathol* 39: 22-35.

Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Neural stem cell niches and homing: recruitment and integration into functional tissues. *ILAR J* 2009; 51: 3-23.

Genbacev O, Larocque N, Ona K, Prakobphol A, Garrido-Gomez T, Kapidzic M, Barcena A, Gormley M, Fisher SJ. Integrin alpha4-positive human trophoblast progenitors: functional characterization and transcriptional regulation. *Hum Reprod* 2016; 31: 1300-1314.

Genbacev O, ve ark. Establishment of human trophoblast progenitor cell lines from the chorion. *Stem Cells* 2011; 29: 1427-1436.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 30336-30343.

Go AS, ve ark. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013; 127: e6-e245.

Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 481-488.

Gökmen FG. *Sistematik anatomi: Güven Kitabevi*. 2003.

Gradwohl G, Fode C, Guillemot F. Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev Biol* 1996; 180: 227-241.

Gupta R, Jovin TG, Krieger DW. Therapeutic hypothermia for stroke: do new outfits change an old friend? *Expert Rev Neurother* 2005; 5: 235-246.

Hall A, Giese NA, Richardson WD. Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. *Development* 1996; 122: 4085-4094.

Hao L, Zou Z, Tian H, Zhang Y, Zhou H, Liu L. Stem cell-based therapies for ischemic stroke. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 468748.

Hardy R, Reynolds R. Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development* 1991; 111: 1061-1080.

Hart IK, Richardson WD, Heldin CH, Westermarck B, Raff MC. PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage. *Development* 1989; 105: 595-603.

Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin* 2006; 24: 1-21.

Hayashi T, Abe K, Suzuki H, Itoyama Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1997; 28: 2039-2044.

He W, Ingraham C, Rising L, Goderie S, Temple S. Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis. *J Neurosci* 2001; 21: 8854-8862.

Hemberger M, Hughes M, Cross JC. Trophoblast stem cells differentiate in vitro into invasive trophoblast giant cells. *Dev Biol* 2004; 271: 362-371.

Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, Maeda M, Fagan SC, Carroll JE, Conway SJ. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 84-96.

Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, Waxman SG, Kocsis JD. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* 2011; 134: 1790-1807.

Hori J, Ng TF, Shatos M, Klassen H, Streilein JW, Young MJ. Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts. *Stem Cells* 2003; 21: 405-416.

Hornig C, Barleon B, Ahmad S, Vuorela P, Ahmed A, Weich HA. Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids. *Lab Invest* 2000; 80: 443-454.

Huang X, Gottstein C, Brekken RA, Thorpe PE. Expression of soluble VEGF receptor 2 and characterization of its binding by surface plasmon resonance. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 643-648.

Jiang M, et al. Induction of pluripotent stem cells transplantation therapy for ischemic stroke. *Mol Cell Biochem* 2011; 354: 67-75.

Jiang Y, Zhu W, Zhu J, Wu L, Xu G, Liu X. Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery. *Cell Transplant* 2013; 22: 2291-2298.

Johnson MH. From mouse egg to mouse embryo: polarities, axes, and tissues. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009;25: 483-512.

Kara RJ, et al. Fetal cells traffic to injured maternal myocardium and undergo cardiac differentiation. *Circ Res* 2012; 110: 82-93.

Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, Zhang X, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 1487-1493.

Kendall RL, Wang G, DiSalvo J, Thomas KA. Specificity of vascular endothelial cell growth factor receptor ligand binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201: 326-330.

Kessarlis N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 2006; 9: 173-179.

Kirton A, deVeber G. Cerebral palsy secondary to perinatal ischemic stroke. *Clin Perinatol* 2006; 33: 367-386.

Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2004; 87: 95-104.

Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13: 127-132.

Kormish JD, Sinner D, Zorn AM. Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev Dyn* 2010; 239: 56-68.

Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, Inamura T, Fukui M. VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* 1996; 27: 1865-1872; discussion 1872-1863.

Krtolica A, Genbacev O, Escobedo C, Zdravkovic T, Nordstrom A, Vabuena D, Nath A, Simon C, Mostov K, Fisher SJ. Disruption of apical-basal polarity of human embryonic stem cells enhances hematoendothelial differentiation. *Stem Cells* 2007; 25: 2215-2223.

Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S. Immunocytochemical studies of cellular reaction in human ischemic brain stroke. MAB anti-CD68 stains macrophages, astrocytes and microglial cells in infarcted area. *Folia Neuropathol* 1996; 34: 17-24.

Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 1794-1798.

Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke* 1997; 28: 564-573.

Laguna Goya R, Busch R, Mathur R, Coles AJ, Barker RA. Human fetal neural precursor cells can up-regulate MHC class I and class II expression and elicit CD4 and CD8 T cell proliferation. *Neurobiol Dis* 2011; 41: 407-414.

Le TN, Du G, Fonseca M, Zhou QP, Wigle JT, Eisenstat DD. Dlx homeobox genes promote cortical interneuron migration from the basal forebrain by direct repression of the semaphorin receptor neuropilin-2. *J Biol Chem* 2007; 282: 19071-19081.

Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 1995; 268: 836-844.

Lee MY, Ju WK, Cha JH, Son BC, Chun MH, Kang JK, Park CK. Expression of vascular endothelial growth factor mRNA following transient forebrain ischemia in rats. *Neurosci Lett* 1999; 265: 107-110.

Lee TT, Tsai CF, Hsieh TH, Chen JJ, Wang YC, Kao MC, Wu RM, Singh S, Tsai EM, Lee JN. Ectopic pregnancy-derived human trophoblastic stem cells regenerate dopaminergic nigrostriatal pathway to treat parkinsonian rats. *PLoS One* 2012; 7: e52491.

Lenmyr F, Ata KA, Funa K, Olsson Y, Terent A. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 874-882.

- LeVine SM, Goldman JE. Embryonic divergence of oligodendrocyte and astrocyte lineages in developing rat cerebrum. *J Neurosci* 1988; 8: 3992-4006.
- Li WW, Hutnik M, Gehr G. Antiangiogenesis in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2008; 143: 622-631.
- Lichtenwalner RJ, Parent JM. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 1-20.
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cell research in stroke: how far from the clinic? *Stroke* 2011; 42: 2369-2375.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79: 1431-1568.
- Liu J. Poststroke angiogenesis: blood, bloom, or brood? *Stroke* 2015; 46: e105-106.
- Lloyd-Jones D, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009; 119: 480-486.
- Lu CW, Yabuuchi A, Chen L, Viswanathan S, Kim K, Daley GQ. Ras-MAPK signaling promotes trophoblast formation from embryonic stem cells and mouse embryos. *Nat Genet* 2008; 40: 921-926.
- Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 2002; 109: 75-86.
- Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 1993; 11: 173-189.
- Ma Q, Sommer L, Cserjesi P, Anderson DJ. Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. *J Neurosci* 1997; 17: 3644-3652.
- Ma Q, Chen Z, del Barco Barrantes I, de la Pompa JL, Anderson DJ. neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 1998; 20: 469-482.
- Manabe T, Tatsumi K, Inoue M, Matsuyoshi H, Makinodan M, Yokoyama S, Wanaka A. L3/Lhx8 is involved in the determination of cholinergic or GABAergic cell fate. *J Neurochem* 2005; 94: 723-730.
- Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15809-15814.
- Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 2000; 156: 965-976.

McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA. FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 1990; 5: 603-614.

Mescher A. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Thirteenth Edition: Text and Atlas, Thirteenth Edition: McGraw-Hill Education. 2013.*

Mhairi Macrae I. New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 34: 302-308.

Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994; 367: 576-579.

Miller RH. Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci* 1996; 19: 92-96.

Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993; 264: C995-1002.

Natale DR, Hemberger M, Hughes M, Cross JC. Activin promotes differentiation of cultured mouse trophoblast stem cells towards a labyrinth cell fate. *Dev Biol* 2009; 335: 120-131.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.

Nornes HO, Das GD. Temporal pattern of neurogenesis in spinal cord of rat. I. An autoradiographic study--time and sites of origin and migration and settling patterns of neuroblasts. *Brain Res* 1974; 73: 121-138.

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 1996; 59: 89-102.

Ono K, Bansal R, Payne J, Rutishauser U, Miller RH. Early development and dispersal of oligodendrocyte precursors in the embryonic chick spinal cord. *Development* 1995; 121: 1743-1754.

Orentas DM, Miller RH. The origin of spinal cord oligodendrocytes is dependent on local influences from the notochord. *Dev Biol* 1996; 177: 43-53.

Ortega N, L'Faqihi FE, Plouet J. Control of vascular endothelial growth factor angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell* 1998; 90: 381-390.

Panganiban G, Rubenstein JL. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* 2002; 129: 4371-4386.

Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke* 1996; 27: 1641-1646; discussion 1647.

Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2005; 2: 3-14.

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994; 269: 25646-25654.

Pavlakovic H, Becker J, Albuquerque R, Wilting J, Ambati J. Soluble VEGFR-2: an antilymphangiogenic variant of VEGF receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207 Suppl 1: E7-15.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.

Plate KH, Beck H, Danner S, Allegrini PR, Wiessner C. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 654-666.

Poncet C, Soula C, Trousse F, Kan P, Hirsinger E, Pourquie O, Duprat AM, Cochard P. Induction of oligodendrocyte progenitors in the trunk neural tube by ventralizing signals: effects of notochord and floor plate grafts, and of sonic hedgehog. *Mech Dev* 1996; 60: 13-32.

Popa-Wagner A, Pirici D, Petcu EB, Mogoanta L, Buga AM, Rosen CL, Leon R, Huber J. Pathophysiology of the vascular wall and its relevance for cerebrovascular disorders in aged rodents. *Curr Neurovasc Res* 2010; 7: 251-267.

Pringle NP, Richardson WD. A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* 1993; 117: 525-533.

Pringle NP, Guthrie S, Lumsden A, Richardson WD. Dorsal spinal cord neuroepithelium generates astrocytes but not oligodendrocytes. *Neuron* 1998; 20: 883-893.

Pringle NP, Yu WP, Guthrie S, Roelink H, Lumsden A, Peterson AC, Richardson WD. Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* 1996; 177: 30-42.

Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J, Fu H, Rao M, Sussel L, Rubenstein J, Qiu M. Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* 2001;128: 2723-2733.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404.

Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1134-1140.

Reynolds R, Wilkin GP. Development of macroglial cells in rat cerebellum. II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development* 1988; 102: 409-425.

Richardson WD, Kessaris N, Pringle N. Oligodendrocyte wars. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 11-18.

Rielland M, Hue I, Renard JP, Alice J. Trophoblast stem cell derivation, cross-species comparison and use of nuclear transfer: new tools to study trophoblast growth and differentiation. *Dev Biol* 2008; 322: 1-10.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.

Ro A, Frishman WH. Peripartum cardiomyopathy. *Cardiol Rev* 2006; 14: 35-42.

Roach ES, ve ark. Management of stroke in infants and children: a scientific statement from a Special Writing Group of the American Heart Association Stroke Council and the Council on Cardiovascular Disease in the Young. *Stroke* 2008; 39: 2644-2691.

Roberts RM, Fisher SJ. Trophoblast stem cells. *Biol Reprod* 2011; 84: 412-421.

Roeckl W, Hecht D, Sztajer H, Waltenberger J, Yayon A, Weich HA. Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp Cell Res* 1998; 241: 161-170.

Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. *Exp Neurol* 2004; 187: 246-253.

Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas with Cell and Molecular Biology*: Lippincott Williams & Wilkins. 2002.

Rutherford MA, Ramenghi LA, Cowan FM. Neonatal stroke. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2011.

Sasaki M, Honmou O, Kocsis JD. A rat middle cerebral artery occlusion model and intravenous cellular delivery. *Methods Mol Biol* 2009; 549: 187-195.

Seidman RJ. *Neuropathology Chapter 1: Normal gross brain and microscopy*.

Setoguchi T, Kondo T. 2004. Nuclear export of OLIG2 in neural stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte differentiation. *J Cell Biol* 166: 963-968.

Shen LH, Li Y, Chen J, Cui Y, Zhang C, Kapke A, Lu M, Savant-Bhonsale S, Chopp M. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke* 2007; 38: 2150-2156.

Shi H, Hu X, Leak RK, Shi Y, An C, Suenaga J, Chen J, Gao Y. Demyelination as a rational therapeutic target for ischemic or traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2015; 272: 17-25.

- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium* 2006; 13: 63-69.
- Shimotake J, Derugin N, Wendland M, Vexler ZS, Ferriero DM. Vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition promotes cell death and limits endothelial cell proliferation in a neonatal rodent model of stroke. *Stroke* 2010; 41: 343-349.
- Sicard KM, Fisher M. Animal models of focal brain ischemia. *Exp Transl Stroke Med* 2009; 1: 7.
- Silverman WF, Krum JM, Mani N, Rosenstein JM. Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience* 1999; 90: 1529-1541.
- Simmons DG, Fortier AL, Cross JC. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Dev Biol* 2007; 304: 567-578.
- Soler RM, Dolcet X, Encinas M, Egea J, Bayascas JR, Comella JX. Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J Neurosci* 1999; 19: 9160-9169.
- Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 319-327.
- Sommer L, Ma Q, Anderson DJ. neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 1996; 8: 221-241.
- Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1999; 19: 5731-5740.
- Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 2006; 54: 805-814.
- Stuhmer T, Anderson SA, Ekker M, Rubenstein JL. Ectopic expression of the *Dlx* genes induces glutamic acid decarboxylase and *Dlx* expression. *Development* 2002; 129: 245-252.
- Sueblinvong V, Weiss DJ. Stem cells and cell therapy approaches in lung biology and diseases. *Transl Res* 2010; 156: 188-205.
- Suh Y, Obernier K, Holzl-Wenig G, Mandl C, Herrmann A, Worner K, Eckstein V, Ciccolini F. Interaction between *DLX2* and *EGFR* regulates proliferation and neurogenesis of SVZ precursors. *Mol Cell Neurosci* 2009; 42: 308-314.

Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 2001; 104: 365-376.

Sussman CR, Dyer KL, Marchionni M, Miller RH. Local control of oligodendrocyte development in isolated dorsal mouse spinal cord. *J Neurosci Res* 2000; 59: 413-420.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.

Takahashi K, et al. Embryonic neural stem cells transplanted in middle cerebral artery occlusion model of rats demonstrated potent therapeutic effects, compared to adult neural stem cells. *Brain Res* 2008; 1234: 172-182.

Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004; 39: 206-216.

Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 1998; 282: 2072-2075.

Tat PA, Sumer H, Jones KL, Upton K, Verma PJ. The efficient generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mouse adipose tissue-derived and neural stem cells. *Cell Transplant* 2010; 19: 525-536.

Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-606.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.

Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 1993; 10: 475-489.

Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L, Zalc B. 1995. Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J Neurosci* 15: 1012-1024.

TNS. 2014. TNS Brain Year Activities.

Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* 2006; 26: 1269-1274.

Turu MM, Slevin M, Matou S, West D, Rodriguez C, Luque A, Grau-Olivares M, Badimon L, Martinez-Gonzalez J, Krupinski J. C-reactive protein exerts angiogenic effects on vascular endothelial cells and modulates associated signalling pathways and gene expression. *BMC Cell Biol* 2008; 9: 47.

Villalonga JM. Fisiopatología de la isquemia cerebral: ICG Marge, SL. 2008.

- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26988-26995.
- Warf BC, Fok-Seang J, Miller RH. Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1991; 11: 2477-2488.
- Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 180-193.
- Wei L, ve ark. Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2005; 19: 183-193.
- Wiltrout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. *Neurochem Int* 2007; 50: 1028-1041.
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11: 298-308.
- Yamashita T, Kawai H, Tian F, Ohta Y, Abe K. Tumorigenic development of induced pluripotent stem cells in ischemic mouse brain. *Cell Transplant* 2011; 20: 883-891.
- Yamashita T, ve ark. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 2006; 26: 6627-6636.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248.
- Yanev P, Dijkhuizen RM. In vivo imaging of neurovascular remodeling after stroke. *Stroke* 2012; 43: 3436-3441.
- Yin L, Fu SL, Shi GY, Li Y, Jin JQ, Ma ZW, Lu PH. Expression and regulation of major histocompatibility complex on neural stem cells and their lineages. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 53-65.
- Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 183-186.
- Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP, Richardson WD. Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* 1994; 12: 1353-1362.
- Yucel Y. Serebrovaskuler Hastaliklar in Yucel Y, ed: Dicle University. 2012.
- Zachary I. Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1169-1174.

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1129-1133.

Zhang SM, Ramirez-Lassepas M, Hernandez LA, Lee SH, Heros RC. A new model of experimental cerebral infarction in New Zealand white rabbits. *J Tongji Med Univ* 1995; 15: 5-9.

Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen N, Chopp M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000; 106: 829-838.

Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008; 132: 645-660.

Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 474: 212-215.

Zhao Y, Marin O, Hermes E, Powell A, Flames N, Palkovits M, Rubenstein JL, Westphal H. The LIM-homeobox gene *Lhx8* is required for the development of many cholinergic neurons in the mouse forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9005-9010.

Zou Z, Zhang Y, Hao L, Wang F, Liu D, Su Y, Sun H. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 215-230.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	MÜGE	Uyruğu	TC
Soyadı	MOLBAY	Tel no	
Doğum tarihi	01.0.1992	e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Eskişehir Anadolu Lisesi	2009
Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	2014
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İNGİLİZCE	YDS	77,5

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Normal ve Diyabetik Maternal Lökositlerde CX3CR1 Ekspresyonu Dağılımının Araştırılması	TUBITAK 1002 Projesi	Eylül 2015- Eylül 2016
Hiperglisemik ve normoglisemik koşulların amniyon kökenli mezenkimal kök hücrelerde glikoz taşınımı üzerine etkileri	Bilimsel Araştırmalar Projeleri	Eylül 2014- Eylül 2015
Taze ve Dondurulmuş Embriyo Transferi Sonucu Gerçekleşen Gebeliklerdeki Plasentada Epigenetik Mekanizmalarının Araştırılması	TUBITAK 1001 projesi	Eylül 2015- Eylül 2018
Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kronik Böbrek Yetmezliğinde Proliferasyon ve Apoptoz Mekanizmalarına Etkileri	Bilimsel Araştırmalar Projeleri	Şubat 2014- Şubat 2015
Siçanlarda Oluşturulan 5/6 Nefroktomi Modelinde Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Renal Fibrozis Üzerine Potansiyel Etkileri	Bilimsel Araştırmalar Projeleri	Şubat 2015- Temmuz 2017

Burslar-Ödüller:

TUBITAK 114S547 numaralı “Sıçanlarda fokal serebral iskemik hasarların trofoblast kök hücreleri ile onarımı” projesinde yüksek lisans bursiyerliği

Türk Nefroloji Derneği 33. Nefroloji kongresi sözlü sunum 2.lık ödülü:

“Sıçanlarda Oluşturulan 5/6 Nefrektomi Modelinde Plasenta Kaynakli Mezenkimal Kök Hücrelerin Renal Fibrozis Üzerine Etkileri”

Yayınlar ve Bildiriler:

Unek, G., Kipmen-Korgun, D., Cetinkaya, B., Dogum, K., Molbay, M., Koksoy, S., Korgun, E.T. “Expression Of Glucose Transporters In The Human Amnion Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Hyperglycemic Conditions” German Stem Cell Network (GSCN) Conference, 2015; 153.

Molbay, M., Unek, G., Ozmen, A., Kipmen-Korgun, D., Maltepe, E., Unal, A., Ozekinci, M., Hamidova, A., Korgun, E.T. “Repair of Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Human Trophoblast Progenitor Cells in Rats” German Stem Cell Network (GSCN) Conference, 2016; 245.

Molbay, M., Unek, G., Cetinkaya, B., Ozmen, A., Kipmen-Korgun, D., Korgun, E.T. “Proliferation Mechanism in Human Amnion Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Normoglycemic and Hyperglycemic Conditions” German Stem Cell Network (GSCN) Conference, 2016; 164.

Cetinkaya, B., Unek, G., Ozmen, A., Molbay, M., Dogum K., Koksoy, S., Suleymanlar, G., Korgun E.T. “Effects of Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells on Proliferation and Apoptosis Mechanisms in Chronic Kidney Disease” German Stem Cell Network (GSCN) Conference, 2016; 266.

Suleymanlar, G., Akan, E., Cetinkaya, B., Molbay, M., Ozmen, A., Koksoy, S., Korgun E.T. “Sıçanlarda Oluşturulan 5/6 Nefrektomi Modelinde Plasenta Kaynakli Mezenkimal Kök Hücrelerin Renal Fibrozis Üzerine Etkileri” Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 2016; 25: (3) 32.

Cetinkaya, B., Unek, G., Ozmen, A., Molbay, M., Dogum K., Koksoy, S., Suleymanlar, G., Korgun E.T. “Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kronik Böbrek Yetmezliğinde Proliferasyon ve Apoptoz Mekanizmalarına Etkileri” Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 2016; 25: (3) 27.

Korgun, E.T., Molbay, M., Ozmen, A., Kipme-Korgun, D., Unal, A., Maltepe, E., Ozekinci, M. “The Effect of Human Trophoblast Progenitor Cells on Angiogenesis in Rat Brain After Focal Cerebral Ischemia” EMBO Conference Advances in Stem Cell and Regenerative Mdicine, 2017; 155.

