

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE ERİTROPOETİN
KOMBİNASYONUNUN İSKEMİK İNMEDE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. Hamit ÖZYÜREK

Samsun
Ocak-2012

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE ERİTROPOETİN
KOMBİNASYONUNUN İSKEMİK İNMEDE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. Hamit ÖZYÜREK

Danışman: Prof.Dr. Gülsen ÖKTEN

Samsun
Ocak-2012

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Doktora Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Erdal Karaöz

Üye: Prof.Dr. Hasan Bağcı

Üye: Prof. Dr. Gülsen Ökten

Üye: Doç.Dr. Sezgin Güneş

Üye: Yrd.Doç.Dr. Levent Güngör

Tezin Adı : Mezenkimal Kök Hücre ve Eritropoetin Kombinasyonunun İskemik
İnmede Etkisi

Tezi Teslim Eden: Dr. Hamit ÖZYÜREK

Tez Savunma Sınav Tarihi: 27/01/2012

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülsen ÖKTEN

Bu tez Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof.Dr. Süleyman Kaplan
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin en zorlu aşaması olan bu tezin düşünce safhasından sonlandırılmasına kadar geçen süreçte her türlü desteğini gördüğüm ve Teoman ile bizim kahrımızı bir anne sıcaklığı ile çeken Sayın Hocam Prof.Dr. Gülsen Ökten'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Böyle bir proje yapmaya karar verdiğimizde kendilerine başvurduğumda projeye katılarak bize her türlü desteği veren ve birlikte çalışmaktan zevk aldığım Sayın Prof.Dr. Tolga Güvenç, Doç.Dr. Sezgin Güneş, Prof. Dr. Feride Duru, Uz.Dr. Ferda Alpaslan Pınarlı, Teknisyen Mustafa Düz ve Dilek Usta'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tıbbi Biyoloji doktora programına başvuru aşamasında bana yol gösteren ve beni yüreklendiren Sayın Hocam Prof.Dr. Hasan Bağcı'ya da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora arkadaşlarım Teoman, Akın ve Zeynep sizi de yanaklarınızdan öpüyorum. Beraber geçirdiğimiz o günleri hep güzel birer hatıra olarak hatırlayacağım.

Laboratuvar teknisyenleri sevgili Pınar, Aslı ve Tayfun'a sonsuz teşekkürler.

PYO.TIP.1904.09.036 numaralı projemizin kabul edilmesi ve gerekli maddi desteğin sağlanmasından dolayı OMU Rektörlüğü ve Proje Yönetim Ofisi'ne de teşekkür ederim.

Sanırım teşekkürlerin en büyüğünü doktora eğitimim döneminde hem benim kahrımı çeken hem de bir kız çocuğu büyüten Sevgili Eşim hak ediyor.

ÖZET

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE ERİTROPOETİN KOMBİNASYONUNUN İSKEMİK İNMEDE ETKİSİ

Doç. Dr. Hamit Özyürek, Doktora Tezi

Bir çok deneysel ve az sayıda klinik çalışmada iskemik inmede mezenkimal kök hücre (MKH) tedavisinin faydalı etkileri gösterilmiştir. Bununla birlikte iskemik inme tedavisinde MKH ve eritropoetin kombinasyonu konusunda bilgi yoktur. Bu çalışmada, MKH ve eritropoetin kombinasyonunun geçici global iskemik inmedeki etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır.

Toplam 32 yetişkin dişi Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. İki saat süre ile bilateral common karotis arter bağlanarak geçici tipte global iskemi oluşturuldu ve sonrasında hayvanlar 4 gruba ayrıldı:

- I. Grup (n:8): Kontrol grubu: İskemiden 24 saat sonra 1 ml intravenöz serum fizyolojik uygulanan
- II. Grup (n:8): İskemiden 24 saat sonra 3×10^6 /ml MKH intravenöz uygulanan
- III. Grup (n:8): İskemiden 24 saat sonra eritropoetin (5000U/kg tek doz) intraperitoneal uygulanan
- IV. Grup (n:8): İskemiden 24 saat sonra 3×10^6 /ml MKH intravenöz + Eritropoetin (5000U/kg tek doz) intraperitoneal uygulanan

İskemiden sonraki 15. günde gruptaki tüm sıçanlar sakrifiye edilerek beyinleri çıkarıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için Ki67, nöronal nükleer antijen (NeuN) ve glial fibriler asidik protein (GFAP) antikoları kullanıldı. Gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesinde one-way ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

Grup II, III ve IV'de kontrol grubuna göre Ki67 pozitif hücre sayısında anlamlı derecede artış vardı ($p < 0.05$). Ayrıca grup IV, grup II'ye göre de anlamlı Ki67 pozitif hücre artışı gösterdi ($p < 0.05$). Kontrol grubuna göre grup II, III ve IV'de istatistiksel olarak anlamlı NeuN pozitif hücre artışı vardı ($p < 0.05$). GFAP boyamada gruplar arasında farklılık tespit edilmedi.

İskemik inmedeki fonksiyonel ve yapısal iyileşmeye nörogenezin indüklenmesi katkıda bulunmaktadır. Ventriküler ve subventriküler alanlarda nöronal ve glial belirteçleri taşıyan immatür nöral hücreler vardır. Mezenkimal kök hücreler bu yeni nöral hücreleri indükleyip iskemik alana da göç etmelerini sağlamaktadır. Çalışmamız

iskemik inmede MKH etkinliğinin eritropoetin ile kombine edildikten sonra anlamlı derecede artışını göstermiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Ocak-2012

ABSTRACT
THE EFFECT OF COMBINATION OF MESENCHYMAL STEM CELL AND
ERYTHROPOIETINE ON ISCHEMIC STROKE

Assos. Prof. Hamit Ozyurek, Ph.D. Thesis

Several studies have shown beneficial effects of treatment with MSC in animal models of ischemia and in a few clinical trials of ischemic stroke. There is no data about the combination of MSC and erythropoietine in the treatment of ischemic stroke. In the study, we aimed to investigate the effect of MSC and erythropoietine (EPO) combination on transient global ischemic stroke. Experiments were performed on 32 adult female Sprague-Dawley rats. The bilateral common carotid artery of all SD rats were ligated for 2h to achieve the transient global ischemia. The animals were divided

into four groups after ischemia;

Group I (n:8): Saline (1ml) was injected into the rats intravenously 24 h after ischemia

Group II(n:8): MSC (3×10^6 /ml) was injected into the rats intravenously 24 h after ischemia

Group III (n:8): EPO (5000U/kg) was injected into the rats intraperitoneally 24h after ischemia

Group IV(n:8): The combination of MSC (3×10^6 /ml) and EPO (5000U/kg) was injected into the rats 24h after ischemia

For the immunohistochemical studies, we sacrificed all rats at 15 day after ischemia and their brains were removed. The following primary antibodies were used: Ki67, NeuN, and GFAP. Differences among groups were assessed by one-way ANOVA test. Differences with p-values less than 0.05 were considered statistically significant.

The number of Ki67 positive cells were significantly higher in the group II, III and IV compared with the control group ($p < 0.05$). Additionally, group IV showed significantly higher Ki67 positive cells than group II ($p < 0.05$). The number of NeuN positive cells increased significantly at group II, III and IV compared with the control group ($p < 0.05$). There was no difference on GFAP staining between groups.

In ischemic stroke, induction of neurogenesis may contribute to functional and structural improvement. Immature neural cells with immunoreactive neuronal markers and glial cell markers are found in the ventricular zone and subventricular zone. The

presence of MSCs may promote the induction and migration of new cells from these areas into the ischemic region. Our study showed that the efficacy of MSC therapy in ischemic stroke was significantly potentiated after combination with erythropoietin.

Ondokuz Mayıs University, Samsun, January-2012

SİMGELER VE KISALTMALAR

AEC	: 3-amino 9-etilkarbazol
ANG-1	: Angiopoietin 1
BDNF	: Beyinden elde edilen nörotrofik faktör
BSA	: Bovine serum albumin
CFU-F	: Koloni oluşturan birim-fibroblast
DCX	: Doublekortin
DMEM-LG	: Dulbecco's modified eagle's medium-low glucose
DMSO	: Dimetilsulfoksit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EPO	: Eritropoetin
EPOR	: EPO reseptörü
FBS	: Fetal sığır serumu
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
GABA	: Gama amino bütirik asit
G-CSF	: Granülosit koloni stimule edici faktör
GFAP	: Glial fibriler asidik protein
HE	: Hematoksilen-eozin
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HKH	: Hematopoetik kök hücre
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
JAK2	: Janus kinaz 2
MAP	: Mikrotübül ilişkili protein
MAPK	: Mitojen aktive edici protein
MCAO	: Orta serebral arter oklüzyonu
MKH	: Mezenkimal kök hücre
MMP2 ve 9	: Matriks metalloproteinaz 2 ve 9
NeuN	: Nöronal nükleer antijen
NF-kB	: Nükleer faktör kB
NGF	: Sinir büyüme faktörü

NK	: Doğal öldürücü
NKH	: Nöral kök hücre
NMDA	: N-metil D-aspartat
NSE	: Nöron spesifik enolaz
OD	: Optik dansitometre
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDE-5	: Fosfodiesteraz tip 5
rHuEPO	: Rekombinat insan eritropoetini
SABK	: Strepto avidin biotin peroksidaz kompleksi
SDF α -1	: Stromadan elde edilen faktör α -1
SRY	: Sex-determining region Y
STATs	: Sinyal çevrimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri
TB	: Tris borik asit
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

İÇİNDEKİLER

Özet	iv
Abstract	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
İçindekiler	x
I.Giriş	1
II. Genel Bilgiler	2
II.A. Eritropoetin	2
II.B. İnmede Hücresel Tedavi	5
II.B.1. Mezenkimal Kök Hücre	5
II.B.2. İnmede MKH Uygulaması	8
II.B.3. MKH Etki Mekanizması	9
II.B.4. Nöronal Kök Hücreler	14
III.Gereç ve Yöntem	20
III.A. Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	20
III.A.1. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar	21
III.A.2. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan	21
Kimyasal Maddeler	
III.A.3. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Çalışma	21
Solüsyonları	
III.B. Akım sitometre ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması	22
III.B.1. Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar	22
III.B.2. Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan	22
Kimyasal Maddeler	
III.C. Global İskemi ve Grupların Oluşturulması	26
III.D. Beyin Dokularının Çıkarılması	26
III.E. DNA Eldesi	26
III.F. SRY Geninin Gösterilerek Belirlenmesi	28
III.F.1. DNA'ların ve Primerlerin Optik Dansitometre	28
Ölçümlerinin Yapılması	
III.F.2. SRY Gösterimi için PCR Çalışması	29

III.F.3. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar	30
III.F.4. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
III.F.5. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Çalışma Solüsyonları	31
III.G. Histoloji ve İmmunhistokimyasal Boyama	31
III.G.1. Histopatolojik İnceleme için doku kesitlerinin hazırlanması	31
III.G.2. İmmunhistokimyasal inceleme için doku kesitlerinin hazırlanması	31
III.G.3. Veteriner Fakültesi Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	32
III.G.4. Veteriner Fakültesi Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları	32
III.H. İstatistiksel İnceleme	33
IV. Bulgular	34
V. Tartışma	53
VI. Sonuç ve Öneriler	58
VII. Kaynaklar	59
VIII. Ek (OMÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı)	70
IX. Özgeçmiş	71

I. GİRİŞ

Serebral arterlerdeki geçici veya kalıcı tıkanmanın neden olduğu iskemik inme, nöron ve glia kaybına neden olmaktadır. İskemik inmenin neden olduğu fonksiyonel ve yapısal hasarı en aza indirgeyecek yeni tedavi çalışmalarına son yıllarda hız verilmiştir. Geliştirilmeye çalışılan hücresel ve farmakolojik tedavi yaklaşımları ile beynin intrinsik özelliklerinin artırılarak nöral plastisitenin dolayısıyla nörolojik iyileşmenin sağlanması amaçlanmaktadır. İnme sonrası izlenen fonksiyonel iyileşmede etkili olan nörorestoratif olaylar nörogenez, anjiogenez ve sinaptik plastisiteyi içermekte olup bunların tümü bu iyileşmeye katkı sağlamaktadır (Chen ve Chopp, 2006).

Hücresel veya farmakolojik ajanlar anjiogenez, nörogenez ve sinaptogenezden biri veya birkaçı ile inmeden sonra nörolojik iyileşme üzerine etki etmektedir. Nöral kök hücre (NKH), kord kanı ve mezenkimal kök hücre (MKH) uygulamaları hücresel yaklaşımı oluşturmaktadır. Bununla birlikte farmakolojik uygulamalar konusunda da hızlı ilerlemeler mevcut olup, trofik, büyüme faktörleri ve tıbbi endikasyonlarda kullanılan bazı ajanların da nöronal hasarı azaltıcı etkinliği gösterilmiştir. Bu ajanlara örnek olarak statin, eritropoetin (EPO) ve fosfodiesteraz tip 5 inhibitörleri (PDE-5) örnek verilebilir (Chen ve Chopp, 2006; Dharmasaroja, 2009).

Hem kemik iliği hem de umbilikal korddan elde edilen MKH'lerin endotelial hücre ve nöronal hücreler de olmak üzere birçok hücreye farklılaşma kapasitesi vardır. Çeşitli çalışmalar verilen MKH'lerin beyinde nöron-benzeri hücre, endotelial hücre ve astrositlere farklılaştığını göstermiştir (Liu ve ark., 2009). Ayrıca subventriküler yerleşimli NKH'lerin göç, yaşam ve farklılaşmaları üzerine MKH'nin olumlu etkisi ile endojen nörogenezi artırdığı gösterilmiştir (Yoo ve ark., 2008). Son yıllarda MKH'nin iskemik inme tedavisinde etkinliğini artırmak amacı ile antiinflamatuvar ve/veya antiapoptotik etkinliği olan ajanlar birlikte denenmektedir. Serebral iskemide etkinliği deneysel ve klinik olarak gösterilmiş olan EPO (Dame ve ark.,2001; Buemi ve ark.,2002) ile MKH'nin birlikte kullanımının etkinliği konusunda literatürde bilgi mevcut değildir. Bu deneysel çalışmada MKH ve EPO kombinasyonunun serebral iskemide etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

İskemik inmedeki nöronal hasarın en aza indirilmesinde beyin nöroplastisite yeteneğini artırma amaçlı hücrel ve farmakolojik tedavi yaklaşımları kritik öneme sahiptir. İnme sonrası fonksiyonel iyileşmede nörogenez, anjiogenez ve sinaptik plastisite tek veya birlikte rol alarak bu iyileşmeye katkı sağlamaktadır. Yetişkin beyin subventriküler alanında ve hipokampal dentat girüsda nöronal progenitör hücreler hayat boyunca çoğalabilmektedir. Yetişkin beyinde de nörogenezin devam etmesi, beyin hasarlarından sonra bu endojen öncül hücrelerin nöronal iyileşmede kaynak olabileceklerini düşündürmektedir. Yetişkin beyninde iskemiden sonra subventriküler yerleşimli nöroblastlar sayıca artmakta, infarkt alanına doğru göç etmekte ve nöronlara farklılaşarak hasarlanan nöronların yerine geçmektedir. Ayrıca nöroblastlar lokal mikroçevredeki anjiogenez ve sinaptik aktivitenin stimüle edilmesinde de etkili olarak nörolojik iyileşmeyi ilerletmektedir (Chen ve Chopp, 2006).

Hücrel veya farmakolojik ajanlar anjiogenez, nörogenez ve sinaptogenezden biri veya birkaçı ile inmeden sonra nörolojik iyileşme üzerine etki etmektedir. Nöral kök ve progenitör hücreler, kord kanı ve MKH uygulamaları hücrel yaklaşımı oluşturmaktadır. Bununla birlikte farmakolojik uygulamalar konusunda da hızlı ilerlemeler mevcut olup, trofik ve büyüme faktörleri, granülosit koloni stimule edici faktör (G-CSF), anjiopietin 1 (ANG1), tıbbi endikasyonlarda kullanılan bazı ajanların da nöronal onarıcı etkinliği olduğu gösterilmiştir. Bunlara statin, EPO ve PDE-5 inhibitörleri örnek verilebilir (Dame ve ark.,2001; Buemi ve ark.,2002; Chen ve Chopp, 2006; Yoo ve ark., 2008; Liu ve ark., 2009).

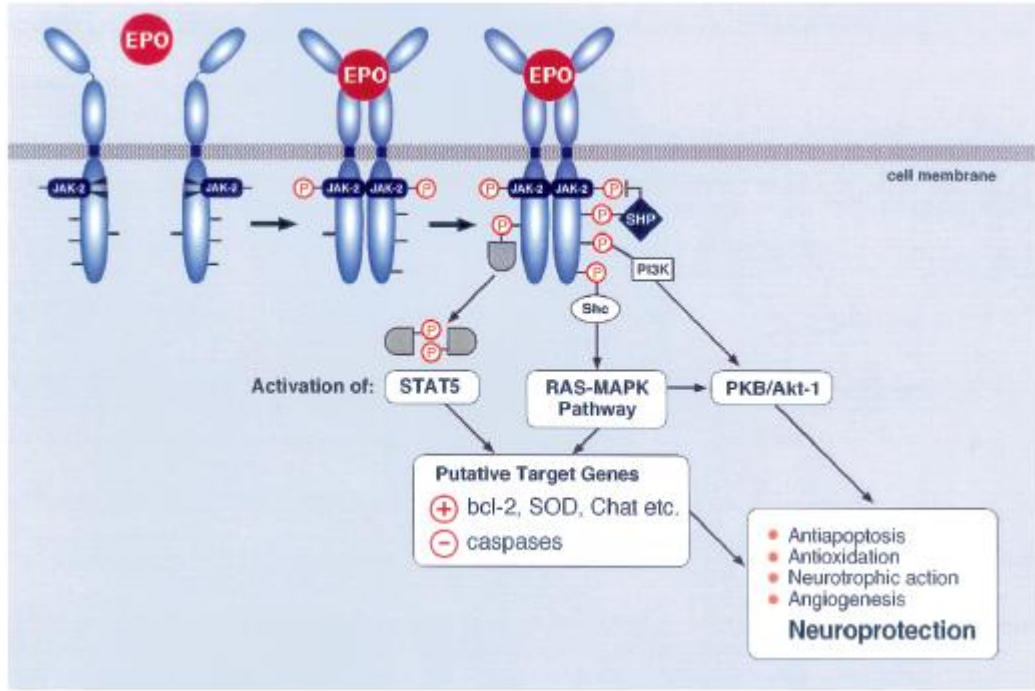
II.A.Eritropoetin

Eritropoetin hematopoetik büyüme hormonu olup, membrandaki spesifik reseptörüne (EPOR) bağlanarak eritroid progenitör hücrelerin yaşam, proliferasyon ve farklılaşmalarını düzenlemektedir. Deneysel ve klinik çalışmalar EPO'nun multifonksiyonel bir trofik faktör olduğunu, farklı bölgelerde eksprese edildiğini ve doku spesifik regülasyonda rol aldığını göstermiştir. EPO için fonksiyonel reseptörler eritroid seri dışındaki kan hücreleri, ayrıca endotelial hücre, mezenkimal, miyokardial ve nöronal hücre orijinleri gibi non-hematopoetik hücre serilerinde de eksprese edilmektedir. EPO ve EPOR normal yetişkin beyninde zayıf şekilde eksprese edilirken beyin hipoksisi veya nöronların metabolik stresinde dramatik olarak ekspresyonu

artmaktadır. Bu da beyin hasarlanmasında EPO'nun nörotrofik ve nöroprotektif bir faktör olduğunu göstermektedir. EPO ve EPOR ekspresyonu anlamlı derecede beyin gelişimi döneminde de artış göstermektedir (Dame ve ark., 2001; Buemi ve ark., 2002; Chen ve Chopp, 2006).

Beyinde eksprese olan EPO, rekombinat EPO'ya göre daha düşük ağırlıklı olup *in vitro* olarak düşük konsantrasyonlarda daha aktiftir. Astrositler tarafından üretilen EPO komşu nöronlar üzerindeki EPOR'e bağlanarak nöronları parakrin ve otokrin olarak etkilemektedir. EPO ve EPOR insan, sıçan ve maymunların embriyonik, fetal ve yetişkin beyinlerinde özel bölgelerde eksprese olmaktadır. EPO ve EPOR mRNA'sı temporal korteks, hipokampus, serebellum ve amigdala biyopsilerinde gösterilmiştir. Santral sinir sisteminde EPO ve EPOR ekspresyonu gestasyonel yaşa göre değişmektedir. İnsan beyininde özellikle periventriküler alanda konsepsiyondan sonraki 5. haftada EPO ve EPOR mRNA'sı tespit edilmiştir. 10. haftada EPO ağırlıklı olarak kortikal duvar boyunca eksprese olurken EPOR ise multipotent hücreleri içeren subventriküler alanda lokalize olmaktadır. Bu multipotent hücreler de oligodendrosit ve astrositlere dönüşmektedir. Nöral farklılaşma ilerledikçe de EPOR astrositlere, EPO da nöronlara lokalize olmaktadır. Konsepsiyondan sonraki 20. haftalarda nöronal sitoplazmik EPO ekspresyonu talamus, hipokampus, lateral genikulat cisimcik, korteks ve spinal korda belirgin hale gelmektedir. Postnatal dönem ve yetişkinlikte de EPO ve EPOR hem nöron hem de astrositlerde lokalize olmaktadır. Ağırlıklı olarak da temporal korteks, amigdala ve hipokampus ekspresyonu belirgindir. EPO ve reseptörünün gelişmekte olan beyinde farklı miktar ve lokalizasyonlarda eksprese edilmesi ve yetişkin hayatta da bunun devam etmesi beyin gelişimi ve beyin homeostazı açısından önemini göstermektedir (Dame ve ark., 2001; Buemi ve ark., 2002).

EPO'nun nöroprotektif ve nörotrofik ajan olarak etkin olmasındaki mekanizmalar konusunda birçok görüş vardır. EPO bir proanjiogenik sitokin olup endotelial hücre proliferasyonu ve göçünü regüle etmekte; anjiogenez, eritropoez ve vasküler resistansı artırmaktadır. Bu etkisini reseptörünü aktive ettikten sonra Janus kinaz2 (JAK2), sinyal çevrimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri (STATs), mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK), Bcl-x_L, protein kinaz B ve C gibi bir çok hücrel sinyal sistemini etkinleştirerek göstermektedir (Şekil 1) (Chong ve ark., 2003; Siren ve Ehrenreich., 2001).



Şekil 1. EPO ve reseptörünün hücre içi sinyal mekanizmaları (Siren ve Ehrenreich.'dan, 2001).

Hipoksi, hipoglisemi veya iskemide nöronal ölümden sorumlu esas faktörün glutamat nörotoksisitesi olduğu görülmüştür. İskemiden sonra hücre dışı glutamat artışı olmakta ve iskeminin şiddeti ile de bu artış korelasyon göstermektedir. Artan glutamatın N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörünü uyarması ile hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu artış göstermekte ve nöronal ölüme neden olan enzimatik yollar aktive olmaktadır. EPO'nun hücre koruyucu etkinliğindeki mekanizmalardan biri de glutamat toksisitesine karşı nöronun direncinin artırılmasıdır (Siren ve Ehrenreich.,2001; Buemi ve ark.,2002). Morishita ve arkadaşları 19 günlük sıçan embriyosundan elde ettikleri serebral kortikal nöron ve hippocampal hücre kültürlerinde glutamat nörotoksisitesi ve EPO etkinliğini çalışmışlardır. Beş dakika gibi kısa süreli bir EPO ile inkübasyon glutamat toksisitesine karşı nöroprotektif olabileceği gibi, glutamat toksisitesine karşı rezistans kazanmak için 8 saat öncesinden EPO ile inkübasyona başlamak gerektiğini tespit etmişlerdir (Morishita ve ark.,1997).

EPO'nun etkinliğinde değişik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. EPO endotelial hücrelerden matriks metalloproteinaz 2 ve 9 (MMP2 ve MMP9) salınımını artırmakta bu da nöroblast göçü için kemotaktik etki yapmaktadır (Wang ve ark.,2006). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve beyinden elde edilen nörotrofik faktör (BDNF), EPO uygulamasına bağlı olarak iskemik beyinde artmakta bunun sonucunda

da göç eden nöroblastlar için uygun mikroçevre ortamı sağlanmaktadır (Chen ve Chopp.,2006). Hem nöroblast göçünün hem de göç edilen yerde uygun çevrenin sağlanması EPO'nun etkinliğinde rol almaktadır. Nükleer faktör-kB (NF-kB) ailesinde yer alan transkripsiyon faktörlerinin çoğu hücrenin proliferasyon, farklılaşma ve yaşam gibi fonksiyonlarında rol almaktadır. Eritropoezde eritroid progenitör hücresinin nükleusuna NF-kB translokasyonu hücre proliferasyonunda etkili olmaktadır. NF-kB benzer etkiyi nöral progenitör hücrelerde göstererek nörogenezde uyarıcı etki göstermektedir. Bunu destekler şekilde NF-kB translokasyon bloke edici ajan (SN50) ile EPO birlikte hücre kültürü ortamlarına uygulandığında yeni nöral hücre sayısında azalma görülmektedir (Shingo ve ark.,2001). Bir başka çalışmada da EPO'nun JAK2'yi aktive ederek NF-kB inhibitörünü fosforilasyona uğrattığı, inhibitör fosforilasyonu ile de bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB'nin transloke olduğu ve sitoplazmadan nükleusa geçerek nöroprotektif genleri transkripsiyona uğrattığı görülmüştür (Digicaylioglu ve Lipton, 2001).

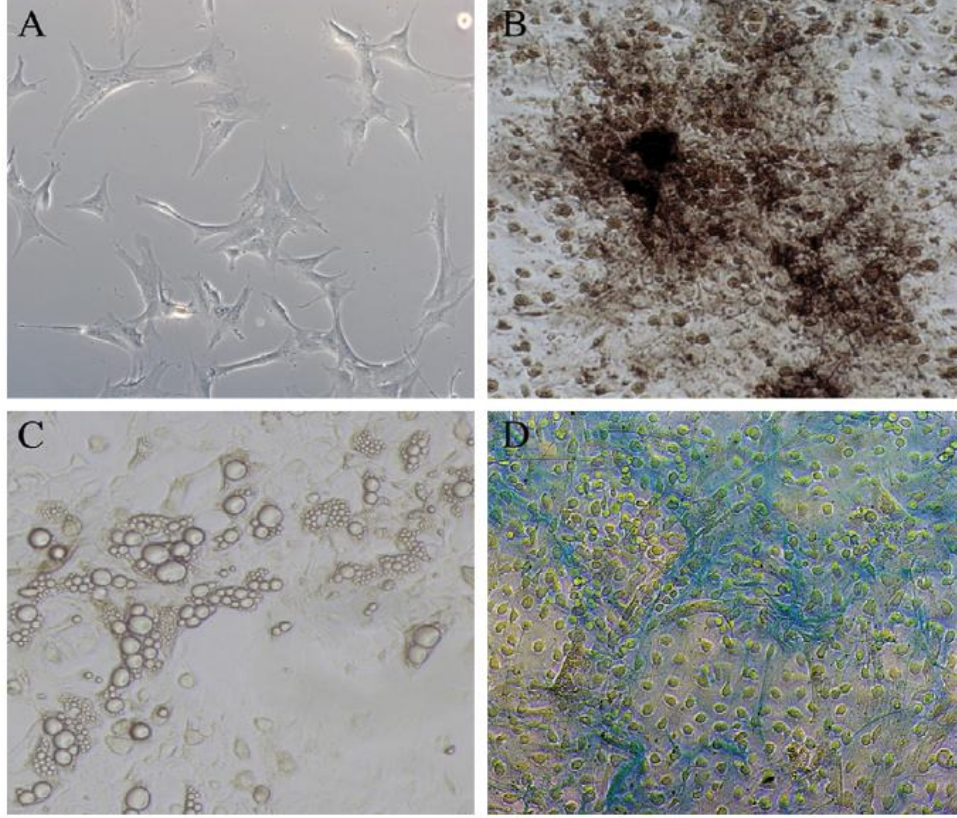
II.B. İnmede Hücresel Tedavi

II.B.1. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücreler bağ dokunun temel hücreleridir. MKH, ilk kez 1976 yılında fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenstein tarafından tanımlandı (Fridenstein ve ark., 1976). MKH'leri tanımlamak için koloni oluşturan birim-fibroblast (CFU-F), kemik iliği stromal hücre, multipotent stromal hücre, mezenkimal stromal hücre, kemik iliği stromal kök hücre, stromal öncül hücre, iskelet kök hücre ve multipotent yetişkin progenitör hücre isimleri kullanılmıştır. Ancak bu isimlerin hiçbiri hücrenin gelişimsel orijinini ve farklılaşma kapasitesini tam yansıtamadığı için mezenkimal kök hücre ismi halen geçerli olan kullanımdır (Chen ve ark.,2008).

MKH'ler mezoderm kökenlidir ve multipotent farklılaşma potansiyeli göstermektedir. In vivo ve in vitro uygun deneysel ortam altında osteoblast, kondroblast ve adiposit gibi mezodermal hücre dizilerine farklılaşabilmektedir (Şekil 2). Ayrıca in vitro olarak özel deneysel ortam sağlandığında visseral mezoderm, nöroektoderm ve endoderm karakterinde hücrelere de farklılaşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda da MKH transplante edildiğinde kemik, kas, beyin, akciğer, kalp, gastrointestinal sistem ve

hematopoetik sisteme yerleşebilmektedir (Bianco ve ark., 2001; Kotton ve ark., 2001; Jiang ve ark., 2002; Anjos-Afonso ve ark., 2004; Chen ve ark.,2008)



Şekil 2. MKH ve farklılaşmaları. Farklılaşmamış MKH (A), Osteojenik ortamda alkalın fosfataz ekspresye eden hücreler (B), Lipid damlaları (C), Kondrositler (D) (Chen ve ark.'dan, 2008)

MKH kemik iliği ile birlikte birçok doku kaynağından elde edilmektedir. Yağ dokusu, sinovyal membran, iskelet kası, dermis, perisit, trabeküler kemik, insan umbilikal kordu, akciğer, diş pulpası, amniotik sıvı, fetal karaciğer ve periferik kan bu dokulara örnek olarak verilebilir (Da Silva ML.,2006; Baksh ve ark.,2007). Kök hücreler için ana kaynak olan kemik iliğinde MKH'lerin yanı sıra ana hücreler olarak hematopoetik ve endotel hücreler bulunmaktadır. Kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücreye (MNH) karşılık 2-5 arasında değişen sayılarda MKH bulunmaktadır. Kemik iliği transplant uygulamalarında 2×10^8 MNH/kg verildiğinde bunun içinde yaklaşık 400-1000 arasında MKH bulunmaktadır (Koç ve Lazarus, 2001).

Hem laboratuvar temelli bilimsel araştırmalar hem de prelinik çalışmalar için MKH tanımlamada bazı standartlar belirlenmiştir (Dominici ve ark.,2006). Bunlar;

- Plastiğe yapışabilme
- Spesifik yüzey antijen ekspresyonları
- Multipotent farklılaşma potansiyeli (Tablo 1)

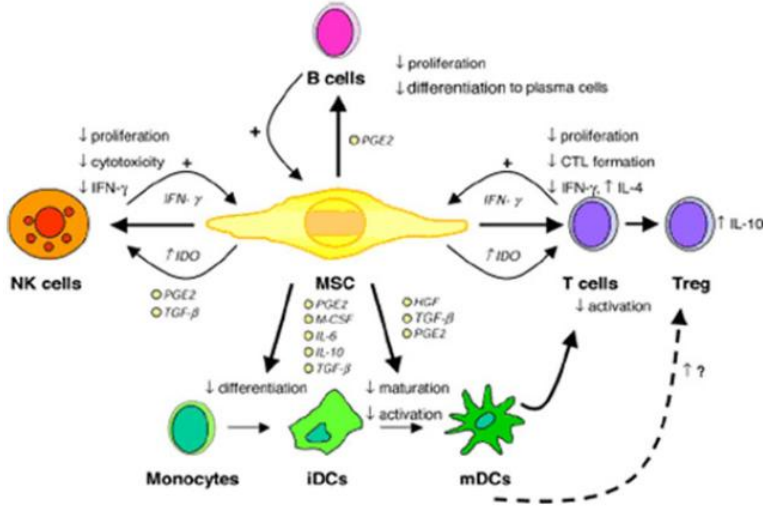
Tablo 1. MKH tanımlama kriterleri (Dominic ve ark.'dan, 2006)

1. Standart kültür ortamlarında plastiğe yapışabilme
2. Fenotip
 - a. CD105, CD73, CD90 pozitifliği (>%95+)
 - b. CD45, CD34, CD14 veya CD11b negatifliği (<%2+)
3. Osteoblast, adiposit, kondroblasta *in vitro* farklılaşma
(*in vitro* hücre kültürlerinde boyama ile gösterilmesi)

Kültürde çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerin antijenik özelliklerine bakıldığında eşsiz bir tanımlayıcı belirteç eksprese etmedikleri; endotelial, epitelyal ve kas hücrelerine benzer immünojenotipik özellikler taşıdıkları görülmektedir. Bu hücreler hematopoetik hücre belirteçleri (CD45, CD34, CD14, CD11b/c) ve ko-stimülatör molekülleri (CD80, CD86, CD40) eksprese etmezler. MKH'ler için pozitif olan belirteçler ise; CD44 (HCAM-1), CD105 (SH2-endoglin), CD106 (VCAM-1), CD73 (SH3/4), Stro-1 (fibroblast yüzey belirteci), CD71 (transferin reseptör) ve CD90 (thy-1)'dir. MKH ve HKH'ler bir çok adezyon molekülünü ortak olarak bulundurlar. Bunların başlıcaları fibronektin, laminin ve kollajene bağlanmadan sorumlu olan integrin ailesi, intrasellüler adezyon molekülü (ICAM), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) ve L-selektindir (Anjos-Afonso ve ark.,2004; Yılmaz, 2008).

MKH genellikle zayıf immünojenik hücre olarak kabul edilmektedir. Çoğu T, B ve doğal öldürücü (NK) hücrelerini baskılamakta ve dendritik hücrelerin farklılaşma, maturasyon ve fonksiyonlarını etkilemektedir (Şekil 3). CD28, CD3 agonist antikorları ve mitojen ile proliferasyonu indüklenen T lenfositleri *in vitro* ortamda baskılamaktadır. Sitotoksik T hücrelerinin sitotoksik etkilerini de inhibe edebilmektedir. IL-2 veya IL-15 ile stimüle edilen NK hücre proliferasyonunu baskılamaktadır (Bernardo ve ark.,2009). Bu immunomodulator etkilerinin ortaya çıkmasında hem de göç etme fonksiyonunda rol alan çeşitli büyüme faktörü, sitokin, kemokin ve proteazlar sentezlemektedir. MKH ayrıca hasarlı dokuya göç edebilme ve fonksiyonel hale gelebilmek için hasarlı dokunun

değişen nişinden salınan spesifik kemotaktik uyarıcılar için kemokin reseptörleri eksprese etmektedir. Hasarlı dokudan salınan stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), hücre içi sinyal ve adezyon molekülleri (selektinler ve integrinler) ve proteazlar bu kemotaktik uyarıcılara örnek verilebilir (Komatsu ve ark.,2010).



Şekil 3. MKH'nin immünomodülatör etkisi (Bernardo ve ark.'dan, 2009)

II.B.2. İnmede MKH Uygulaması

İnmenin rejeneratif ve koruyucu tedavisinde anjiogenik, antiapoptotik ve mitojenik faktörleri sağlamasına bağlı olarak MKH iyi bir aday gibi görünmektedir. Ayrıca hasarlı bölgeye göç edebilmesi ve nöronal farklılaşma yeteneğinin olması da bu aday özelliğini artırmaktadır (Yoo ve ark.,2008). Deneysel iskemik inme modellerinde MKH, intrastriatal, intrakarotid ve intravenöz olmak üzere 3 farklı yol ile uygulanmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar en iyi uygulama yolu konusunda net bir sonuç ortaya koyamamıştır (Dharmasaroja,2009).

Orta serebral arter oklüzyonuna (MCAO) bağlı iskemik inmede, intraserebral MKH uygulaması sonrasındaki fonksiyonel iyileşme, transplante edilen MKH'lerinin nöral hücre serilerine farklılaşmaları ile açıklanmaktadır. Transplante olan MKH'ler nöronal nükleer antijen (NeuN), mikrotübül ilişkili preotejin 2 (MAP-2), nöron spesifik gama amino bütirik asit (GABA) reseptör ve astrosit işaretleyicisi glial fibriller asidik protein (GFAP) eksprese etmektedir (Chen ve ark.,2001a; Dharmasaroja,2009).

İnme tedavisinde intraarterial MKH uygulaması da etkili bir yoldur. Bununla birlikte intraarterial uygulamaların yapıldığı çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Bu çalışmaların birinde 2 saatlik geçici tipte MCAO sonrası 24. saatte intrakarotid MKH uygulandığında 14. gündeki motor fonksiyonlarda plasebo grubuna göre anlamlı düzelme tespit edilmiştir. Ayrıca verilen MKH'lerinin astrosit için karakteristik GFAP ve nöron için karakteristik MAP-2 antijenlerini eksprese ettikleri görülmüştür (Li ve ark.,2001). Yine bir benzer 2 saatlik geçici tipte MCAO çalışmasında intrakarotid uygulanan 2×10^6 MKH grubunda plaseboya göre anlamlı derecede damarlanmada, sinaptofizin ekspresyonunda ve oligodendrosit öncül hücre işaretleyicisi taşıyan hücre sayısında artış izlenmiştir. Bununla korele olacak şekilde de fonksiyonel iyileşme MKH grubunda plaseboya göre anlamlı derecede artmış olarak bulundu (Shen ve ark.,2006).

Serebral iskemide intravenöz MKH uygulaması sonrası beyin dışında karaciğer, böbrek, dalak ve kemik iliğinde de MKH tespit edilmektedir. Ancak bu hücrelerin çoğunluğu da parenkim yerine mikro damarlar içinde izlenmektedir. Beyinde tespit edilen hücrelerin yaklaşık %80'ni iskemik hemisferde ve çoğunlukla da lezyonun çevresinde yerleşim göstermektedir. İntravenöz verilen MKH'nin hasarlı beyin dokusuna yerleştikten sonra NeuN, MAP2 ve GFAP eksprese ettiği, apoptotik hücre ölümünün azaldığı, subventriküler alanda endojen hücre proliferasyonu ve iskemik alan sınırında fibroblast büyüme faktörü (FGF) ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Chopp ve Li,2002; Chen ve ark.,2003; Dharmasaroja,2009).

II.B.3. MKH Etki Mekanizması

İskemik inmede MKH uygulamasının etki mekanizmasında birçok faktörün rolü olabileceği kabul edilmektedir (Dharmasaroja,2009). Bunlar;

1. MKH'lerinin nöral seri hücrelerine transdifferansiye olması
2. Nörogenezin indüklenmesi
3. Anjiogenezin indüklenmesi
4. Sinaps oluşumunun indüklenmesi
5. Nöron koruyuculuk
6. Kan beyin akımı ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin regülasyonu
7. Endojen tamir mekanizmalarının aktivasyonu

Mezenkimal kök hücre, mezenkimal seri hücreleri dışında uygun ortam varlığında *in vivo* ve *in vitro* olarak non-mezenkimal dokudan köken alan hepatosit, kardiyomyosit, akciğer alveolar epitelyum gibi hücrelere de farklılaşabilmektedir. Ayrıca nöron ve glial hücreye farklılaşarak NeuN, GFAP gibi nöronal işaretleyicileri de eksprese ettikleri gösterilmiştir. Bu hücreler GABA, glisin ve glutamat gibi çok sayıda nörotransmittere de cevap vermektedir (Chen ve ark.,2003; Wislet-Gendebien ve ark.,2005; Lei ve ark.,2007). Bununla birlikte nöronal ve glial hücre belirteçlerinin eksprese etmek ya da nörotransmitterlere cevap vermek tam anlamı ile bir farklılaşmayı ve nöronal ya da glial hücre fonksiyonlarını tamamen gösterme gerekliliğini ortaya çıkarmamaktadır. Ayrıca verilen MKH'lerin çok az bir kısmı bu belirteçleri eksprese etmektedir. Dolayısıyla MKH etkinliğinde farklı mekanizmalar sorumlu gibi görünmektedir.

Nörogenezin indüklemesi iskemik inmedeki fonksiyonel iyileşmeden sorumlu mekanizmalardan bir diğeridir. Santral sinir sisteminde var olan nöral kök hücrelerin bölünerek yeni hücreleri oluşturması ve bu hücrelerin de nöral farklılaşmaları nörogenez olarak isimlendirilir. Nörogenezin çoğunluğu gelişim aşamasında izlenmekte olup beyinde bazı bölgelerde ise hayat boyu devam etmektedir. Hipokampus dentat girus ve lateral ventrikül subventriküler alanları nörogenezin hayat boyu devam ettiği bölgelerdir. Bu bölgelerdeki nörogenez statik olmayıp fizyolojik veya patolojik olaylara pozitif veya negatif düzenlenme şeklinde cevap vermektedir (Kuruba ve ark.,2009). Serebral iskemi durumunda bu bölgelerden iskemik alanlara yeni nöral hücrelerin uyarılarak göç etmeleri MKH tarafından indüklenebilmektedir. Verilen MKH, iskemik beyin mikroçevresi ile etkileşime girerek trofik faktörlerin üretimine neden olmakta bu da hem apoptozu azaltmakta hem de endojen kök ve progenitör hücrelerin proliferasyonunu uyarmaktadır. Bununla birlikte bu uyarılan ve göç eden yeni hücrelerin fonksiyonel iyileşmenin ortaya çıkmasındaki rolleri de tam olarak ortaya konamamıştır (Li ve ark.,2000; Chen ve ark.,2001; Chen ve ark.,2003).

MKH uygulamasının terapötik mekanizmalarından bir diğeri de anjiogenezin indüklenmesidir. Anjiogenez ile nörogenez oluşması arasında koordineli bir ilişki vardır. İskemi sonrası kan damarları etrafında nöroblast konsantrasyonu artmakta bu da anjiogenez ile nöronal iyileşme arasındaki mekanik ilişkiyi desteklemektedir. MKH'ler çok sayıda anjiogenik büyüme faktörü ortama salmakta ve iskemik beyin bölgesinde

anjiojenezi uyararak fonksiyonel iyileşmeye katkı sağlamaktadır (Onda ve ark.,2008; Toyama ve ark.,2009; Komatsu ve ark.,2010). Ang-1 anjiogeneik bir faktör olup yeni damar oluşmasında önemli rol oynamaktadır. İskemik beyin dokusunda endojen Ang-1'in düzeyinin arttığı rapor edilmiştir. Bu da iskemik bir hasarlanmanın endojen tamirinde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu bilgiler ışığında yapılan bir çalışmada ANG-1 gen ile modifiye edilen MKH, kalıcı tipte MCAO modelinde 6. saatte intravenöz olarak uygulandığında plasebo grubuna göre infarkt hacminde anlamlı bir azalma izlenmiştir. Normal MKH uygulanan grup ile karşılaştırıldığında da her iki grupta da anjiogeneizde artış izlenmekle beraber ANG-MKH grubunda bazı bölgelerde yeni damarlanma ve bölgesel serebral kan akımı daha belirgin olarak tespit edilmiştir (Onda ve ark.,2008).

MHK uygulamasının etkinliğinde bir diğer mekanizma da nöroproteksiyondur. Nöroproteksiyonda apoptoz, inflamasyon ve demyelinizasyonda azalma ile birlikte astrositlerin yaşam sürelerinde artış olmaktadır (Chen ve ark.,2003; Kurozumi ve ark.,2004; Zhao ve ark.,2006; Shen ve ark.,2007).

Kan beyin bariyerinin serebral iske mi sonrası hasarlı bölge etrafında bütünlüğü bozulmakta ve haftalarca bu durum devam edebilmektedir. Kan beyin bariyerinin bütünlüğünün bozulması intravenöz olarak verilen MKH'nin seçici olarak hasarlı beyin dokusuna ulaşmasına katkı sağlamaktadır (Komatsu ve ark.,2010). Beyin kan akımı ve kan beyin bariyeri geçirgenliği, intraserebral MHK uygulaması sonrası değişiklik göstermektedir. Lazer dopler çalışmalarında MHK uygulaması ile kontrol gruplarına göre kan beyin akımının daha erken normale döndüğü görülmüştür. Sıçanlardaki bir çalışmada intrastriatal uygulanan fare kemik iliği stromal hücresi ile plasebonun kan beyin bariyeri geçirgenliği ve serebral kan akımı üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Serebral kan akımının kök hücre grubunda hücre verildikten sonraki 4. günde, plasebo grubunda ise 12.günde normale yakınlaştığı görülmüştür. Kan beyin bariyeri hücre grubunda 5., plasebo grubunda ise 11. günlerde normale yakınlaşmaktadır (Borlongan ve ark.,2004a). MCAO oklüzyonu sonrası MKH uygulaması ile izlenen beyin kan akımı ve kan beyin bariyeri geçirgenliğindeki iyileşmelerin doz bağımlı olduğu da görülmüştür (Borlongan ve ark.,2004b).

Yine aynı şekilde endojen tamir edici veya rejeneratif mekanizmalar da MKH etkinliğinde sorumlu mekanizmalardan biridir. İskemik beyin dokusuna ulaşan MKH

birçok sitokin ve büyüme faktörünü eksprese etmekte veya üretmektedir. Aynı şekilde MKH'ler nörolojik fonksiyonların hızlı ve etkili şekilde düzelmesi yönünde endojen hücrelerden de gerekli moleküllerin sentezlenmesini indüklemektedir. MKH uygulaması sonrası iskemik beyinde BDNF, sinir büyüme faktörü (NGF), FGF-2, transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-beta), VEGF ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi sitokin ve trofik faktörler eksprese olmaktadır. Bu trofik faktörlerin hasarlı beyin dokusuna direkt uygulanmaları durumunda da nöral hücre ölümünde azalma izlenmiştir. Sitokin ve trofik faktörlerinin direkt veya indirekt yol ile eksprese edilmesinin sağlanması MKH'lerin en önemli etki mekanizması olarak kabul edilmektedir (Chen ve ark.,2002; Li ve ark.,2002,2005; Zhang ve ark., 2004; Shen ve ark.,2007; Yoo ve ark.,2008; Dharmasaroja,2009).

MKH Terapi Etkinliği:

Birçok değişken iskemik inmede MKH tedavisinin etkinliğini etkilemektedir (Dharmasaroja,2009). Bunlar;

1. MKH'nin tipi
 - a. MKH tek başına uygulanması
 - b. Gen-transfer edilmiş MKH
 - c. Erken veya geç pasaj MKH
2. MKH dozu
3. Tedavi zamanı
 - a. Hiperakut dönem
 - b. Akut dönem
 - c. Geç dönem
4. MKH uygulama şekli
5. İnme olgusunun özellikleri
 - a. Yaş
 - b. İnme tipi
 - c. Nörolojik kaybın derecesi
 - d. Beyin kan akımı ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin etkileyen altta yatan faktörler

Uygulanan hücre dozu ile birlikte etkinlik arasındaki ilişki Chen ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (Chen ve ark.,2001b). Bu çalışmada MCAO sonrası hücre

verilmeyen grup ile birinci günde 1×10^6 MKH verilen grup arasında davranışsal fonksiyonel testler arasında fark tespit edilmezken, 3×10^6 MKH intravenöz uygulandığında fonksiyonel düzelme kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha belirgin olmuştur. Düşük doz MKH uygulanan grup ile karşılaştırıldığında ise aradaki fark anlamlı olmamakla beraber yüksek doz MKH lehine sonuçlar alınmıştır. Ayrıca serebral kan akımı ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin onarılması da doz bağımlı özellik göstermektedir. Yine MCAO modelinde 10, 40, 100 ve 200 bin MKH intrastriatal uygulama ile plasebo serebral kan akımı ve kan beyin bariyeri geçirgenliği üzerine etkileri açısından karşılaştırılmıştır. Serebral kan akımı 40, 100 ve 200 bin MKH grubunda iskemiden sonraki 4. günde, plasebo ve 10 bin MKH grubunda ise 12. günde normale yaklaşmıştır. Evans mavisi ile çalışılan kan beyin bariyeri geçirgenliğinde de 40, 100 ve 200 bin MKH grubu diğer gruplara göre geçirgenliğin normale döndürülmesinde daha etkili bulunmuştur (Borlongan ve ark., 2004a, 2004b).

MKH tedavisinin uygulanma zamanı da etkinlik üzerine etki eden bir faktördür. Sıçanlarda iskemiden sonra 15 dakika içinde intraserebral MKH uyguladığında doz ile bağımlı olarak serebral kan akımı ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinde düzelme izlenmiştir (Borlongan ve ark.,2004b). Zhao ve arkadaşları 2 saatlik MCAO'dan sonra hiperakut dönemde (2 saat içinde) intraserebral MKH uygulandığında infarkt hacminde azalma tespit ederken aynı etki MKH 24 saat sonra uygulandığında görülmemiştir (Zhao ve ark.,2006). Bununla birlikte diğer çalışmalarda MKH iskemiden 24 saat sonra intraserebral uygulansa bile infarkt alanında değişiklik olmaksızın nörolojik iyileşme üzerine olumlu etkide bulunmaktadır. Benzer sonuçlar intravenöz ve intrakarotid MKH uygulamalarında da elde edilmiştir (Li ve ark.,2000; Chen ve ark.,2001b; Li ve ark.,2001; Ikeda ve ark.,2005; Zhao ve ark.,2006). Hatta MCAO'dan 1 ay sonra da MKH intravenöz verildiğinde fonksiyonel iyileşme izlenebilmiştir (Shen ve ark.2007). Komatsu ve arkadaşları yaptığı çalışmada kalıcı MCAO'dan sonra 7, 14 ve 28. günlerde MKH uygulanarak hem fonksiyonel hem de yapısal iyileşme incelemiş, özellikle 7. günde MKH uygulanması ile nöroproteksiyona bağlı iskemik alan hacminde azalma tespit edilmiştir. 14. ve 28. günlerdeki MKH uygulamaları sadece fonksiyonel iyileşmede etkili bulunmuştur. Geç dönemde MKH uygulaması ile izlenen fonksiyonel iyileşmenin anjiogenezin uyarılması ile ortaya çıktığı görülmüştür (Komatsu ve ark, 2010).

Trofik faktörlerin MKH ile birlikte verilmesi veya genlerinin MKH'ye aktarılması serebral iskemide MKH etkinliğini potansiyalize etmektedir. İki saatlik orta serebral arter oklüzyonu (MCAO) sonrası 24. saatte taze kemik iliği ile birlikte BDNF intraserebral olarak uygulandığında sıçan iskemik beyinde kemik iliği hücrelerinin farklılaştıkları ve motor düzelme üzerine olumlu bir etkisinin olduğu görülmüştür (Chen ve ark.,2000). BDNF gen transferi yapılan MKH'nin uygulandığı MCAO yapılan sıçanlarda iskemiden sonraki 7. ve 14. günlerde hem fonksiyonel düzelme hem de infarkt hacminde azalma görülmüştür. MKH-BDNF grubu kontrol ile karşılaştırıldığında TUNEL (+) hücre sayısında da anlamlı azalma görülmüştür. Bu etkinin ortaya çıkmasında BDNF gen transferi yapılan MKH'lerin normal MKH'lere göre daha yüksek oranlarda BDNF üretmeleri rol oynamaktadır (Kurozumi ve ark., 2004). FGF-2 ile modifiye edilen MKH uygulamalarında da MCAO sonrası 14. günde infarkt volümü azalmaktadır. İskeminin olduğu tarafta FGF-2 düzeyi ölçüldüğünde MKH-FGF-2 grubunda kontrol ve MKH grubuna göre anlamlı derecede artış izlenmiştir (Ikeda ve ark.,2005). Hepatosit büyüme faktörü (HGF) ile modifiye edilen ve intrastriatal verilen MKH'ler iskemiden sonra süper akut dönemde (2. saat) uygulandı ise iskeminin 3. gününde, akut dönemde (24. saat) verildi ise de iskeminin 14. gününde infarkt hacminde azalmaya neden olmaktadır (Zhao ve ark.,2006).

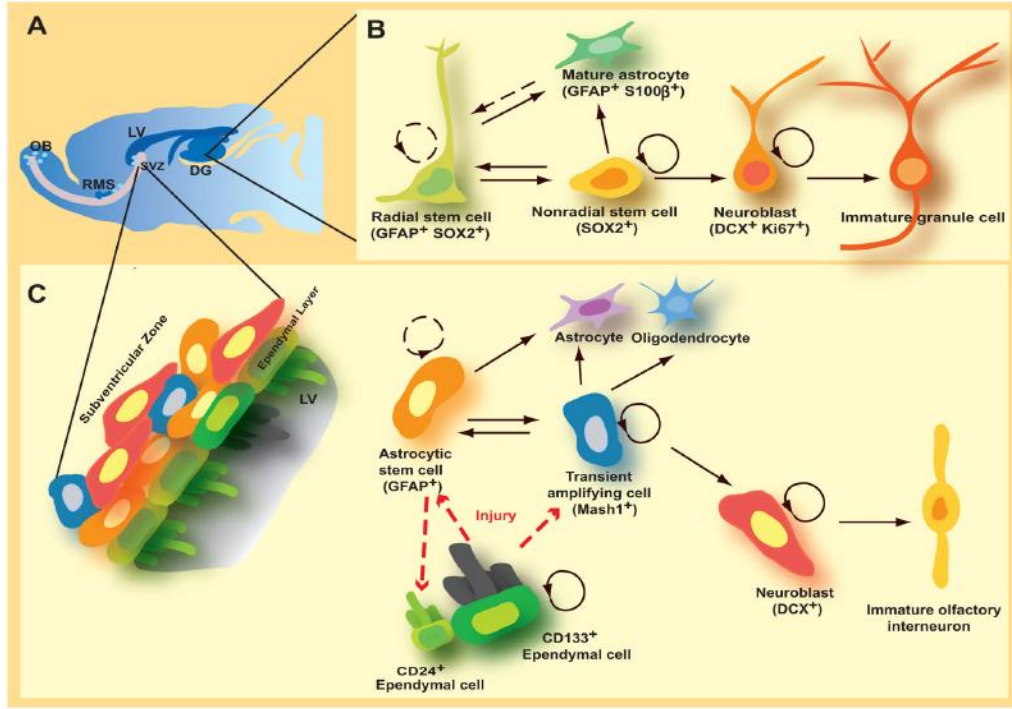
İntraserebral veya intrakarotid uygulama MKH'lerinin beyine kolayca ulaşabilmeleri açısından tercih edilebilecek uygulamalar gibi görünmektedir. Deneysel modellerde intravenöz uygulamanın lokal lezyonlarda optimal bir tercih olamayacağı görülmekte, MKH'lerinin pulmoner kapillerlerde retansiyona uğradıkları ve dolaşımdan uzaklaştırıldıkları görülmüştür. Yine intravenöz uygulama ile verilen MKH'lerinin dalak, karaciğer ve böbrek gibi diğer organlara da dağılım gösterdikleri ancak belli bir yan etki de tespit edilememiştir. Bununla birlikte insanlarda intrakarotid veya intraserebral uygulama, hastanın içinde bulunduğu kötü klinik tabloya bağlı olarak zor hatta imkansız olabilmektedir. Ayrıca intrakarotid uygulama ek tromboz oluşumuna da neden olabilmektedir. Bu yüzden klinik uygulamalarda MKH'nin intravenöz verilmesi daha güvenilir ve uygulanabilir görünmektedir (Dharmasaroja,2009).

II.B.4.Nöronal Kök Hücreler:

Yüz yıldan daha uzun bir süre yeni nöronların oluşumunun yalnızca gelişim aşamasında olabileceği ve ergenlikte durduğuna inanılmıştır. İlk olarak 1960'larda

postnatal sıçan beyinlerinde bulbus olfactorius ve hipokampus bölgelerinde granüler nöron karakteristiğinde yeni hücrelerin varlığını gösterildi (Duan ve ark, 2008). Ancak bu konudaki bilgiler 1990'lara kadar gelişim göstermedi. 1992'de Weiss ve Reynolds yetişkin fare beyin dokusunda belirgin nörojenik bölge olan subventriküler alanı da içeren striatal dokudan ilk kez nöral progenitör hücreyi izole etti (Reynolds and Weiss,1992). Bu rapordan sonra bir seri çalışma ile de hipokampus dentat girusu subgranüler alanında ve lateral ventrikül subventriküler alanında NKH varlığı ve nörogenez kanıtlandı (Şekil 4). Bu yerleşimleri nedeniyle de yeni nöronların beyin öğrenme, hafıza ve koku alma gibi özel fonksiyonları için gerekli olduğu düşünülmektedir. Multipotent özellikteki yetişkin NKH'nin kendini yenileyebilme özelliği dışında üç ana hücre serisini (nöron, astrosit, oligodendrosit) oluşturabildikleri fare, sıçan ve insanlarda gösterilmiştir. Subventriküler ve subgranüler bölgede izlenen yetişkin nörogenezdeki hücre proliferasyonunu fiziksel ekzersiz, nöbet, inme ve antidepresan ilaçlar gibi çeşitli fizyolojik, patolojik ve farmakolojik uyarıcılar etkilemektedir (Jin ve ark.,2001;Yoshimura ve ark.,2001; Jin ve Galvan, 2007; Duan ve ark.,2008).

Nöral kök hücre diğer kök hücreler gibi hem simetrik hem de asimetric hücre bölünmesi göstermektedir. Simetrik bölünme ile aynı özellikte iki yavru hücre oluşmakta ve bu hücreler kök hücre özelliklerini göstermeye devam etmektedir. Asimetric bölünmede ise iki farklı boyutta yavru hücre oluşmakta, bu hücrelerden bir tanesi kök hücre özelliğinde iken diğeri nöral progenitör hücre özelliğinde olup kısıtlı oranda kendini yenileme kapasitesi göstermektedir. Progenitör hücreler santral sinir sistemindeki tüm hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahip değildir. Nöronal progenitör nörona, glial progenitör de astrosit ve oligodendrosite dönüşmektedir (Jin ve Galvan, 2007). Yaşam boyu nörogenezin devam etmesi yetişkin NKH devamlılığını gerektirmektedir. Subventriküler and subgranüler alanda uygun miktarda NKH havuzunun devam ettirilebilmesinde Hedgehog sinyalleri rol almaktadır. Ayrıca lösemi inhibitör faktörün ekspresyonu da yetişkin NKH'nin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını önleyerek NKH havuzunun devamlılığında etkili olmaktadır (Duan ve ark.,2008).



Şekil 4. Hipokampus ve subventriküler alandaki nörogenez (Duan ve ark.'dan,2008)

Nöral kök hücrenin farklı olgunlaşma dönemi veya farklı hücre tipleri birbirlerinden çeşitli fenotipik işaretleyiciler kullanılarak ayrılabilir. NeuN ve MAP-2 olgun nöron, GFAP astrosit, galaktoserebrozid de oligodendrositi tanımak için kullanılmaktadır (Jin ve Galvan,2007). Doublecortin (Dcx) geni bir hidrofilik protein kodlamakta, bu protein de fetal ve yetişkin beyinde göç eden ve farklılaşan nöronlarda eksprese olmaktadır (Francis ve ark.,1999). Nöral progenitör hücrelerin tanımlanmasında nestin, beta III tubulin, Hu gibi işaretleyiciler de kullanılmaktadır (Şekil 5). Hu, nöron spesifik RNA'ya bağlanan bir protein olup farklılaşmadan hemen sonra nöronal nükleusda eksprese olmaktadır (Marusich ve ark.,1994; Jin ve Galvan, 2007). Musashi1 de RNA'ya bağlanan bir protein olup yetişkin beyin subventriküler alanında yerleşim gösteren kök hücrelerde eksprese olmaktadır (Kaneko ve ark.,2000).

Bölünen NKH, progenitör hücrelere dönüşerek farklılaşma bölgelerine göç etmektedir. Bu hücreler göç edilecek bölgeye ulaşana kadar da matür hale gelebilmekte veya orada bu özelliği alarak fonksiyonel hücre halini almaktadır. Subventriküler alandaki NKH'ler immatür nöronları oluşturarak lateral ventrikül duvarı boyunca yoğun bir nöroblast zincir ağı oluşturmaktadır. Bu nöroblast ağı da belirli bir göç

rotasını subventriküler alanın önünden bulbus olfactoriusa doğru oluşturmaktadır. Subgranüler alandan oluşan yeni hücreler ise dentat girusun granüler tabakasına doğru göç ederek olgunlaşmaktadır (Curtis ve ark.,2007; Jin ve Galvan,2007).

Yetişkin beyin subgranüler ve subventriküler alanından oluşan yeni nöronların fonksiyonları halen açık değildir. Ancak bazı elde edilen veriler bu nöronların matür ve fonksiyonel nöron olabileceğini düşündürmektedir (Jin ve Galvan,2007).

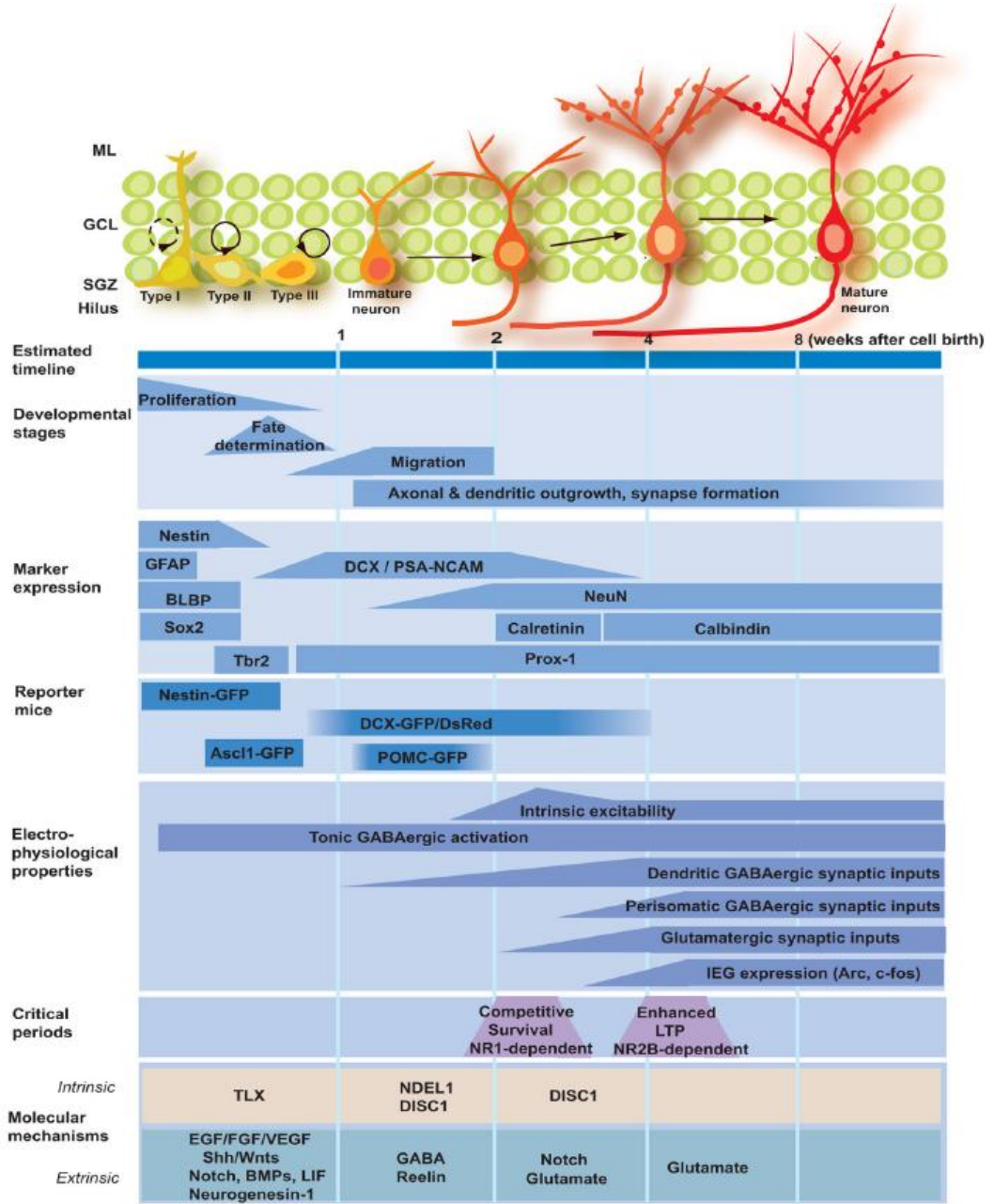
1. Bu hücreler matür nöronal işaretleyicilerinden olan nöron spesifik enolaz (NSE), calbindin ve NeuN eksprese etmekte
2. Bu hücreler sinaptik input almakta, elektriksel olarak aktif nörona dönüşmekte ve nöronal ağa karışarak fonksiyonel sinaptik transmisyon göstermekte
3. Bu hücrelerin aksonları bulunmakta
4. Bu hücreler tipik nöronal voltaj kapılı Ca^{+2} ve K^{+} ile depolarize olmakta ve hızlı ve geridöşümlü olarak hücre içi Ca^{+2} artmakta
5. Hipokampal bağımlı öğrenme çalışmalarındaki ön eğitim bu yeni oluşmuş granül hücrelerinde erken gen protein ekspresyonlarını indüklemekte

Yetişkin nöral kök hücre biyolojik davranışlarının düzenlenmesinde genetik, büyüme faktörleri, nörotansmitterler, stres, hormon, yaş ve çevresel faktörler gibi çok sayıda etken rol almaktadır (Jin ve Galvan, 2007). Büyüme faktörleri nöral kök ve progenitör hücrelerin proliferasyonunu hem *in vitro* hem de *in vivo* etkilemektedir. Yetişkin sıçan ve fare beyin subventriküler alanında epidermal büyüme faktörü (EGF) uygulandığında proliferasyonda artış izlenmiştir (Craig ve ark.,1996). FGF ailesi en az 15 üyeden oluşmakta ve çoğu gelişmekte olan beyinde nörogenezin olduğu alanlarda eksprese olmaktadır. Postnatal dönemde nöroproliferatif alanlardaki ekspresyonuna devam etmektedir. Bu bulgular FGF ailesinin nörogenezde rol oynadığını göstermektedir (Cameron ve ark.,1998). FGF-2 sistematik olarak uygulandığında yenidoğan sıçan hipokampusunda hücre proliferasyonunu artırmaktadır (Wagner ve ark.,1999). Kuhn ve arkadaşları subventriküler ve subgranüler nörogenez üzerine EGF ve FGF-2'nin etkisini inceledikleri çalışmalarında dentat girus hilus ve granüler tabakasında nörogenez miktarında değişiklik tespit edememişlerdir. Ancak EGF ve FGF-2 yeni oluşan hücrelerin granüler tabaka veya hilusa göç etmesinde farklı etkiler ortaya koymuşlardır. FGF grubunda hücrelerin çoğunluğu granüler tabakaya gitmekte

ve nörona farklılaşmakta iken EGF grubunda önemli bir oranda hücre de hilusa göç etmekte ve granüler tabakada nörona yakın miktarda astrosite farklılaşma olmaktadır (Kuhn ve ark.,1997). BDNF de nörogenezde rol alan önemli bir nörotrofik faktördür. BDNF, bulbus olfactorius ve diğer bölgelerdeki nöron sayısını artırmaktadır. Ayrıca *in vitro* olarak da nöral kök hücre proliferasyonunu stimüle etmektedir (Rossi ve ark.,2006). Nörotransmitterler de nörogenezde rol almaktadır. Glutamat nöral kök ve progenitör hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve yaşamlarını devam ettirmelerinde önemli bir rol oynamaktadır (Cameron ve ark.,1998). NMDA reseptörlerinin glutamat ile uyarılması sonucu nörogenez inhibe olmaktadır (Suzuki ve ark.,2006). Hormonların da yetişkin nörogenezi düzenlemede etkileri vardır. Dentat girusdaki nörogenez adrenal hormon düzeyi ile ters bir korrelasyon göstermektedir. Kortikosteroid düzeyinde azalma olması hücre proliferasyonuna artışa ve yeni granül nöron sayısının artmasına neden olmaktadır. Nörogenez böbrek üstü bezi çıkarılan sıçanlarda artarken, glukokortikoid uygulaması bu etkiyi antagonize etmektedir (Gould ve ark.,1992).

Herhangi bir nedenle ortaya çıkan beyin hasarında, yeni oluşan hücreler hasarlı bölgeye göç etmekte ve orada fonksiyonel nöral hücrelere farklılaşmaktadır (Zhang ve ark.,2007). Bununla birlikte bu tamir mekanizması yeterli olamamaktadır. Çoğalarak göç eden hücrelerin yaklaşık %80'i 6 hafta içinde ölmekte ve inme ile hasarlanan hücrelerin sadece % 0.2'si nörogenez sayesinde yenilenebilmektedir (Nadareishvili ve Hallenbeck,2003). Bu nedenle de özellikle iskemide geliştirilmekte olan hücresel tedaviler endojen nöral kök hücrelerin proliferasyonunu stimüle etmek yönünde olmaktadır.

Son yıllarda MKH'nin iskemik inme tedavisinde etkinliğini artırmak amacı ile antiinflamatuvar ve/veya antiapoptotik etkinliği olan ajanlar birlikte denenmektedir. Serebral iskemide etkinliği deneysel ve klinik olarak gösterilmiş olan EPO (Dame ve ark.,2001; Buemi ve ark.,2002) ile MKH'nin birlikte kullanımının etkinliği konusunda literatürde bilgi mevcut değildir. Bu deneysel çalışmada MKH ve EPO kombinasyonunun serebral iskemide etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 5. Nöronal kök hücrenin farklı olgunlaşma dönemleri (Duan ve ark.'dan,2008)

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma öncesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvurulmuş, kurulun 02.03.2009 tarihli toplantısında çalışmamızın Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna karar verilmiştir.

III.A. Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi:

Kemik iliği vericisi olarak 5 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Global iskemi oluşturulacak dişi sıçanlarda MKH takibinin SRY ile yapılabilmesi için MKH vericisi olarak erkek sıçanlar seçildi. Bu erkek sıçanlardan inhalasyon anestezisi altında her birinden 8-10 ml olmak üzere eksternal intrakardiyak yol ile kan alındı. Daha sonra 10 dakika süre ile 4000 devir/dakika (rpm)'da santrifüj edilen kanlardan otolog serum elde edildi. Anestezide devam edilerek deney hayvanları öldürülürken femur, tibia ve humeruslarının medüller kavitelerinden yıkama yöntemi kullanılarak kemik iliği alındı. Medüller kavitelerin yıkanmasında heparinle yıkanmış Dulbecco's Modified Eagle's Medium-low glucose (DMEM-LG) çekilmiş insülin enjektörleri kullanıldı. Her hayvan için yaklaşık 8-12cc DMEM-LG kullanıldı. Hücreler tüp içerisindeki eşit hacimdeki Ficoll solüsyonu (1.077 g/ml) üzerine yayıldı. Dansite gradiyent yöntemi kullanılarak 900 devirde 30 dakika süre ile solüsyon santrifüj edilerek mononükleer hücreler ayrıldı (Şahin, 2006). İnterfazdan toplanan mononükleer hücrelerden 3 ml örnek alınarak Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarına akım sitometre çalışması için teslim edildi. Kalan 3 ml'lik örnek, daha önceden 200 mL/L fetal sığır serumu (FBS), 100 U/ml penisilin, 100 U/ml streptomisin ve 20 ml/L L-glutamin eklenerek hazırlanmış olan DMEM-LG besiyeri içinde 25 cm²'lik (T25) hücre kültür kaplarına 10⁶/ml konsantrasyonunda yayılarak ekildi. Hücrelerin inkübasyonu için 50 ml/L CO₂ içeren ve % 95 nem oranına sahip 37⁰C inkübatörü kullanıldı. İlk üç gün besiyerleri hergün, sonraki günlerde de miktarı 5 ml'ye çıkarılarak 3 günde bir değiştirildi. İvert mikroskopta hücrelerin kültür kabının %75'ini kapladığının görüldüğü 14. günde hücreler pasajlandı. Pasaj işleminde kültür kaplarının içerisindeki besiyerleri aldıktan sonra 1,5 ml tripsin- etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)-C konuldu. İki üç dakikalık elle perküsyon sonrasında 37⁰C'lik inkübatörde 3-5 dakika arası tutuldu ve tekrar elle 2 dakika kadar perküte edilen hücrelerin mikroskopta yapıştıkları plastik yüzeyden kalktıkları görüldü. Hücreler toplamda 5 kez pasajlandı. Pasajlanma işlemi tamamlanan 12 kültür kabındaki hücreler tripsin-EDTA-C

kullanılarak kaldırıldı ve akım sitometre çalışması için Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarına götürüldü.

Pasajlanarak çoğaltılan diğer hücre kültürleri yine aynı yöntem kullanılarak tripsin-EDTA-C ile kaldırıldı. % 10 dimetil sulfoksit (DMSO) ve % 20 FBS içeren DMEM-LG'den 1,5ml eklenerek 2ml'lik kriyotüplerde daha sonra deneyde kullanılmak üzere -80°C ' ye kaldırıldı.

III.A.1. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj (Heraeus, Almanya)
- Hücre Kültür Kabini (Nuaire, Almanya)
- CO₂ İnkübatörü (Hera-cell, Almanya)
- Invert Mikroskop (Zeiss-Axiovert 100, Almanya)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)

III.A.2. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Ficoll solüsyonu (1.077 g/ml) (Merck, Almanya)
- DMEM-LG (Biological Industry, Israil)
- Penisilin (Sigma-Aldrich, St. Louis)
- Streptomisin (Sigma-Aldrich, St. Louis)
- FBS (Hyclone, Logan, UT)
- L-Glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis)
- Tripsin-EDTA C (Sigma-Aldrich, St. Louis)
- DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis)

III.A.3. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Çalışma Solüsyonları

- **MKH besiyeri:** 1000 ml besiyeri için;
 - 200 ml FBS
 - 20 ml L-glutamin
 - 5 ml penisilin
 - 5 ml streptomisin
 - 770 ml DMEM-LG
- **-80°C kriyotüp saklama besi yeri:** 10 ml besiyeri için;

- 7 ml DMEM-LG
- 2 ml FCS
- 1 ml DMSO

III.B. Akım Sitometre ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması

İnterfazda toplanan mononükleer hücrelerden oluşan ekim yapılmadan önce alınmış 3 ml'lik örneğin kullanımında her hücre dizini için 6 tüp kullanıldı. Tüplerin üzerleri sırasıyla yüzey belirteçlerinin adları ve kontrol grubu olarak yazıldı. Sonra her tüpe hücre konsantrasyonu 1×10^6 olacak şekilde getirilen hücre süspansiyonundan 100'er μ l konuldu. Birden beşe kadar olan tüplere yüzey belirteçleri sırası ile 10'ar μ l eklendi. Altıncı tüpe belirteç konulmadı. Tüpler vortekslendi. 4°C 'de karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildikten sonra üzerine daha önceden hazırlanmış olan yıkama solüsyonundan 1 ml eklendi ve 1400 devir/dakikada 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan hücre çöktüsüne tekrar 0.5 ml yıkama solüsyonu eklenerek akım sitometre cihazında tanımlandı. Bu işlemde hematopoetik kök hücre (HKH) ve MKH hücre belirteçlerinin (CD11b/c, CD44, CD45, CD90, CD106) kullanımı sonucunda HKH'lerde CD11b/c [%98,6 (+)], CD44 [%0,4 (-)], CD45 [%99,7 (+)], CD90 [%11,2 (-)] ve CD106 [%14,1 (-)] olduğu gösterildi (Şekil 6). Aynı işlemler, pasajlanan kültür kabından tripsin-EDTA-C ile kaldırılarak toplanan MKH'lerinde de tekrarlandı. Aynı belirteçlerin kullanımı sonucunda MKH'lerde CD11b/c [%1,3 (-)], CD44 [%99,5 (+)], CD45 [%0,7 (-)], CD90 [%80,8 (+)] ve CD106 [%63,6 (+)] olarak tanımlandı (Şekil 7).

III.B.1. Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar

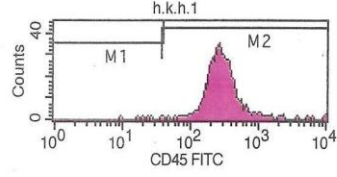
- FACSCalibur TM (Becton Dickinson and Company)
- Cell Quest Software (Becton Dickinson and Company, immünsitometre sistemi, Mac OS X10.3.6/7R28)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)

III.B.2. Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

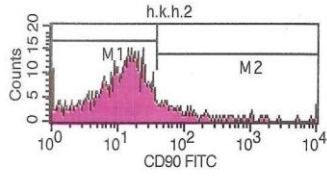
- CD11b/c [Integrin α_M - α_X chains/OX-42, R-Phycoerythrin (R-PE)] (BD Pharmingen, San Diego)

- CD44 [Hyaluronate Receptor Cell Adhesion Molecule/H-CAM, (FITC)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD45 [Leukocyte Common Antigen/Ly-5 (LCA), (FITC)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD90 [Thy-1, Flurescein Isothiocyanate (FITC)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD106 [Vascular Cell Adhesion Molecule-1/VCAM-1, (R-PE)] (BD Pharmingen, San Diego)

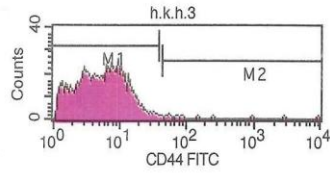
A



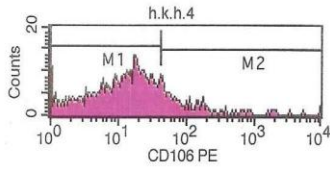
Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	26.89
M1	1, 38	0.26	0.07
M2	41, 9910	99.74	26.82



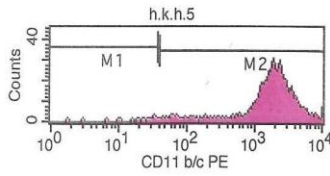
Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	37.16
M1	1, 40	89.02	33.08
M2	39, 9910	11.25	4.18



Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	77.26
M1	1, 38	99.43	76.82
M2	41, 9910	0.47	0.36



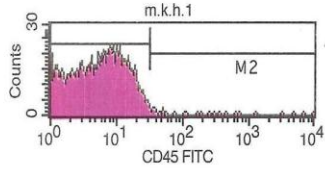
Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	39.24
M1	1, 42	85.63	33.60
M2	43, 9910	14.17	5.56



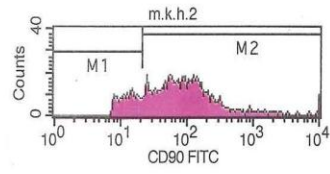
Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	27.87
M1	1, 38	1.26	0.35
M2	41, 9910	98.64	27.49

Şekil 6. Akım sitometre ile HKH'lerin belirlenmesi. CD11b/c⁺ CD44⁻ CD45⁺ CD90⁻ ve CD106⁻

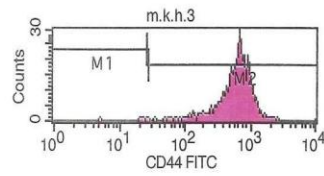
B



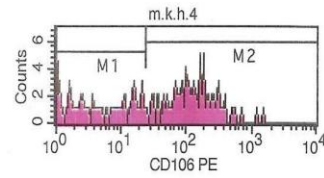
Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	100.00
M1	1, 32	99.26	99.26
M2	32, 9910	0.76	0.76



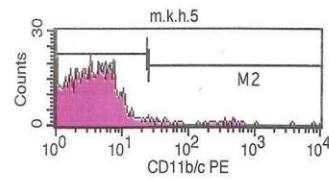
Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	62.96
M1	1, 21	19.28	12.14
M2	21, 9910	80.84	50.90



Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	34.22
M1	1, 25	0.35	0.12
M2	28, 9910	99.53	34.06



Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	7.70
M1	1, 24	36.62	2.82
M2	24, 9910	63.64	4.90



Marker	Left, Right	% Gated	% Total
All	1, 9910	100.00	73.38
M2	25, 9910	1.34	0.98
M1	1, 24	98.47	72.26

Şekil 7. Akım sitometre ile MKH'lerin belirlenmesi. CD11b/c⁻ CD44⁺ CD45⁻ CD90⁺ ve CD106⁺

III.C. Global İskemi ve Grupların Oluşturulması:

Mezenkimal kök hücre elde edildikten sonra geçici global serebral iskemi modeli için toplam 32 yetişkin dişi Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Bu dişi sıçanların İskemi oluşturmak için sıçanlar genel anestezi altında sırt üstü pozisyonda yatırılarak boyun bölgesinde orta hatta 1.5 cm'lik kesi yapıldı. Yumuşak doku ve kas tabakası geçildikten sonra trakea izlendi. Sonrasında trakeanın her iki tarafında sinir damar paketine ulaşıldı (n.vagus ve karotis arterler) ve karotid arter serbestleştirildi (Şekil 8). İki saat süre ile bilateral common karotid arter bağlanarak geçici tipte global iskemi oluşturuldu ve sonrasında hayvanlar 4 gruba ayrıldı.

I. Grup (n:8): Kontrol grubu: İskemiden 24 saat sonra 1 ml iv SF uygulandı.

II. Grup (n:8): İskemiden 24 saat sonra 3×10^6 /ml MKH iv (kuyruk veninden) uygulandı.

III. Grup (n:8): İskemiden 24 saat sonra EPO (5000U/kg tek doz) ip uygulandı.

IV. Grup (n:8): İskemiden 24 saat sonra 3×10^6 /ml MKH iv + EPO(5000U/kg tek doz) ip uygulandı.

III.D. Beyin Dokularının Çıkarılması:

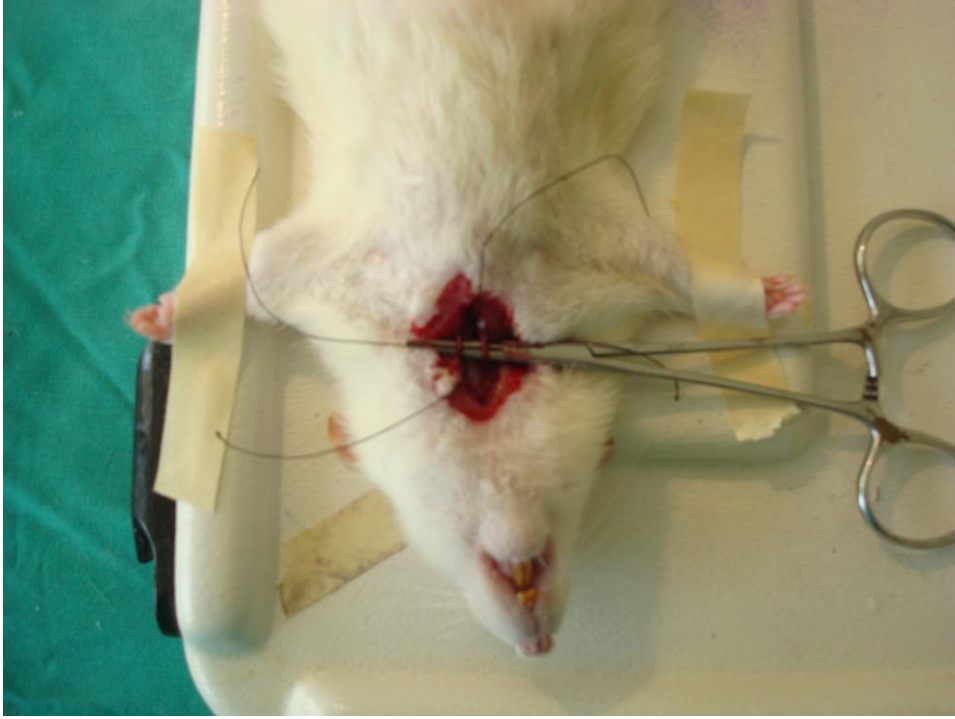
İskemiden sonraki 15. günde gruplardaki tüm sıçanlar anestezi altında dekapite edildi. Alınan serebrum ve serebellum eşit şekilde orta hattın ikiye ayrıldı. Bir yarı histopatoloji ve immünohistokimya çalışma için Veteriner Fakültesi Patoloji ABD'na, diğer yarısı da Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD'na SRY çalışılmak üzere ayrıldı. Tıbbi Biyoloji ABD'na teslim edilen örneklerden DNA eldesi yapılarak -20°C 'de SRY çalışılmak üzere saklandı.

III.E. DNA Eldesi

Beyin dokusundan DNA elde etmek için doku DNA kiti olarak Purelink Genomic DNA mini Kit (İnvitrogen, ABD) kullanıldı. İzolasyona başlamadan ön hazırlık olarak kit içerisindeki Genomic Wash Buffer I'e 15 ml ve Genomic Wash Buffer II'ye ise 17,5 ml etanol absolu eklendi. Absolu alkol kullanılmadan önce oda ısısında muhafaza edildi. DNA'nın izole edilebilmesi için aşağıdaki işlemler sırası ile uygulandı.

1. $+4^{\circ}\text{C}$ DMEM-LG içinde bekleyen beyin dokuları pastör pipeti ile Eppendorf tüpüne alındılar.
2. Dokuların üzerine tüp başına 180 μl "Genomic Digestion Buffer" konuldu.

3. Kısa süreli vorteks uygulandı.
4. Her tüpe 20 µl “Proteinaz K” eklendi.
5. Dokular 55°C’lik su banyosuna yatırıldı.
6. Her yarım saatte bir kısa vorteks uygulandı.
7. Dokular 3 saat 20 dakika sonra banyodan alındı.
8. Maksimum hızda (15.000 rpm) 3 dk. süresince santrifüj edildi.
9. Süpernatantı alınarak başka Eppendorf tüpüne konuldu ve kalan pelet kısmı atıldı.
10. Tüplere 20 µl “RNA’az” solüsyonu eklendi.
11. Kısa vorteks uygulandı.
12. Oda ısısında 2 dk. inkübe edildi.
13. Üzerlerine 200 µl “Genomik lizis bağlanma tamponu” eklendi ve iyice vortekslendi.
14. Üzerlerine 200 µl “Absolu Alkol” eklendi.
15. 5 sn süresince iyice vorteks uygulandı.
16. Örnekler çevirme kolonlarının (tüp) içerisine boşaltıldı.
17. 8200 rpm (10.000 g) de 1 dk. süresince oda ısısında santrifüj edildi.
18. Çevirme kolonlarının filtreli üst bölümü alınarak toplama tüplerinin içine koyuldu.
19. Bunun üzerine yıkama tamponu I’ den 500 µl koyuldu.
20. 8200 rpm (10.000 g) de 1 dk. süresince oda ısısında tekrar santrifüj edildi.
21. Filtreli bölüm yeni temiz toplama tüplerinin içine alındı.
22. Üzerlerine yıkama tamponu II’den 500 µl koyuldu.
23. Maksimum hızda (16.000 rpm) 3 dk. süresince oda ısısında santrifüj edildi.
24. Filtreli bölüm alınarak 1,5 ml’lik Eppendorf tüplerine yerleştirildi.
25. 50 µl (25-200 µl arası olabilir) “Genomik elüsyon tamponu” eklendi.
26. Maksimum hızda (16.000 rpm) 1 dk. süresince oda ısısında santrifüj edildi.
27. Üzerlerine tekrar 20 µl “Genomik elüsyon tamponu” eklendi.
28. Maksimum hızda (16.000 rpm) 2 dk. süresince oda ısısında santrifüj edildi.
29. Eppendorf tüpte elde edilen pürifiye DNA daha sonra cinsiyet belirleyen bölge Y (*SRY*) geninin saptanmasında kullanılmak üzere -20 °C ye kaldırıldı.



Şekil 8. İki taraflı karotid arter bağlanarak global iskeminin oluşturulması

III.F. *SRY* Geninin Gösterilerek Belirlenmesi

III.F.1. DNA'ların ve Primerlerin Optik Dansitometre Ölçümlerinin Yapılması

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılacak olan primerlerin ve beyin dokusundan elde edilmiş olan DNA'ların optik dansitometre (OD) ölçümleri spektrofotometre cihazı ile yapıldı. DNA'lar için konsantrasyon hesaplamasında;

- Konsantrasyon = $OD_{260} \times 100$ (seyreltme faktörü) $\times 50$ (çift zincir DNA)

formülü kullanıldı.

Primerlerin konsantrasyon hesaplamasında ise;

- Konsantrasyon = $OD_{260} \times 100$ (seyreltme faktörü) $\times 33$ (tek zincir DNA) formülü uygulandı.

III.F.2. *SRY* Gösterimi İçin PCR Çalışması

Deneyde kullanılan dişi sıçanların beyin dokularında Y kromozomunun üzerinde bulunan ve cinsiyetin belirlenmesini sağlayan *SRY* geninin gösterilmesi için PCR çalışması yapıldı. Dokulardaki DNA'nın varlığını değerlendirebilmek için internal kontrol olarak β -aktin geni kullanıldı. Hem *SRY* hem de β -aktin geninin PCR çalışmaları için gerekli olan primer dizileri saptandı.

SRY primeri olarak;

- sense 5'-CAGAGATCAGCAAGCATCTGG-3'
- antisense 5'TCTGGTTCTTGGAGGACTGG-3'

β -aktin primeri olarak;

- sense 5'AGAGAAGCTGTGCTATGTTG3'
- anti-sense 5'-GTACTCCTGCTTGCTGATCC-3' kullanıldı. (Ise ve ark., 2004).

PCR için kullanılacak olan 25 μ l'lik toplam hacim içinde bulunan maddeler ve oranları şu şekilde oranlandı:

- Reaksiyon tamponu \rightarrow 1X
- $MgCl_2 \rightarrow$ 3 mM
- dNTP karışımı \rightarrow 200 μ M
- *SRY* primeri \rightarrow 0.2 μ M
- β -aktin primeri \rightarrow 0.15 μ M
- Genomik DNA \rightarrow 200 ng
- *Taq* polimeraz \rightarrow 1,5 ünite/2 μ l

PCR çalışma programı olarak ise, 95°C'de 5 dakika başlangıç denetürasyonu, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 57°C'de 30 saniye annealing ve 72°C'de 60 saniye elongasyon olmak üzere 37 döngü olarak uygulandı. % 2'lik agaroz jel elde etmek için; 100 ml 1 X Tris-borik asit (TB)-EDTA'dan alınarak üzerine 2 gr. agar eklendi. Karıştırıldıktan sonra 30'ar saniyede bir karıştırılarak kaynaya kadar ısıtıldı. Berraklaşınca mikrodalgadan alınarak soğumaya bırakıldı. 75 °C'de 100 μ l etidyum bromür eklenerek çalkalandı ve sete dökülerek soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra 4 °C'ye kaldırıldı. Elde edilen PCR materyali %2'lik agaroz jelde brom fenol mavisi ile boyanarak 25 dakika boyunca elektroforezde 135 voltta yürütüldü. Her çalışmaya pozitif örnek olarak erkek fare DNA'sı ve negatif kontrol olarak steril su kullanıldı.

SRY negatif ve amplifikasyon olmayan örnekler ikişer kez çalışılarak pozitif sonuç elde edildi (Ise ve ark., 2004)

III.F.3. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar

- Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya; Capp, Danimarka)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Mikrosanrifüj (Hettich, Almanya)
- Spektrofotometre cihazı (Pharmacia Biotech Gene Quant II)
- Spektrofotometre küvetleri
- Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)
- Hassas terazi (Mettler AJ 100, Almanya)
- Mikrodalga (Arçelik MD581-TC)
- Yatay elektroforez sistemi (Scie-Plas, İngiltere)
- Elektroforez güç kaynağı (Wealtec, Tayvan)
- UV transilluminator (Uvitec-BTX-26-M, İngiltere)
- UV görüntü analiz sistemi (Biolab-UVIphoto MW, İngiltere)

III.F.4. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Absolu alkol (Sigma-Aldrich)
- Genomic DNA mini kit (Purelink, İnvitrogen)
- 10 X PCR tamponu (Gen Tag)
- *SRY* primeri (İnvitrogen)
- *β -aktin* primeri (İnvitrogen)
- Magnezyum klorür (Gen Tag)
- Deoksiribonükleosid trifosfatlar (dNTPs, Fermentas)
- *Taq DNA polimeraz* enzimi (Gen Tag)
- Tris (Merck)
- Borik asit (Sigma)
- EDTA, sodyum tuzu (Merck)
- Nü mikropor (Prona)
- Etidyum bromür (Sigma)

- Brom fenol mavisi
- Marker DNA (Gene Ruler 100bp DNA Ladder, Fermentas)

III.F.5. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Çalışma Solüsyonları

- 0,5 M EDTA
- 1 M Tris
- 10 X TB-EDTA
- 1 X TB-EDTA
- Etidyum Bromür solüsyonu

III.G. Histoloji ve İmmünohistokimyasal Boyama

III.G.1. Histopatolojik inceleme için doku kesitlerinin hazırlanması

Beyin örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edilip 24 saat sonra süzöldü ve postfiksasyonları yapıldı. Doku örnekleri bir gün boyunca musluk suyu altında yıkandıktan sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Mikrotom (Leica RM2125RT) ile 5 µm kalınlığında alınan kesitler, rutin histopatolojik muayene için hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı. Sonuçların değerlendirilmesi Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu yardımıyla yapıldı ve Nikon DS Camera Head DS-5M ile mikroskobik fotoğrafları çekildi.

III.G.2. İmmünohistokimyasal inceleme için doku kesitlerinin hazırlanması

Parafinde hazırlanan doku bloklarından alınan kesitlere Strepto Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks tekniği (SABK) uygulandı. Primer antikorlar, üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce yapılan ön çalışmalarla belirlenen oranlarda fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, pH 7,4) ile sulandırıldı. İmmünohistokimyasal boyamalarda SABK teknik için alınan hazır kit (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) kullanıldı ve tüm uygulamalar önerilen standart işleme göre yapıldı. Primer antikorların üretici firmalarının önerileri doğrultusunda pozitif kontroller ile negatif kontrol olarak PBS (pH 7,4) kullanıldı. Buna göre kesitler, aseton-3-etoksipropilamin (Merck, 100 ml aseton, 2 ml 3-etoksipropilamin) ile kaplanmış lamlara alındı. 30 dakika 58 °C'lik etüvde kurutuldu. Kesitler ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Formalinin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için kesitler, sitrat tamponlu solüsyonda mikrodalga fırında 600 watta 20 dakika kaynatıldı ya da %

0,1'lik bovine serum albumin (BSA) damlatılarak 20 dakika bekletildi. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂'te 7 dakika bekletildi ve protein bloke edici serumda 10 dakika tutuldu. Daha sonra primer antikorlar ile inkubasyona bırakıldı. Kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 30 dakika bekletildikten sonra Streptavidin peroksidaz enzimi (Histostain-Plus Kits, California, USA) ile 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumu ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 2 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Son olarak kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD) kromojeni ile mikroskop altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle boyandı. Gill's hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldı. Su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immumount) ile kesitler kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi.

III.G.3. Veteriner Fakültesi Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Mikrotom (Leica RM2125RT)
- Işık mikroskobu (Nikon Eclipse E600W)
- Fotoğraf Makinesi (Nikon DS Camera Head DS-5M)

III.G.4. Veteriner Fakültesi Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları

- Zymed, Histostain Plus Kit (California, USA)
- Anti-Ki67 (Chemicon, AB9260)
- Anti-NeuN (Millipore, MAB 377)
- Anti-GFAP (Chemicon, MAB3402)
- Hematoksilen Eozin
- 3-etoksipropilamin (Merck)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Sigma Aldrich)
- Streptavidin peroksidaz enzimi (Histostain-Plus Kits, California, USA)
- 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD)
- Su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immumount)

Hematoksilen-eozin ile boyanan preparatlar ışık mikroskopu ile değerlendirilerek nöronal hasar, lökomalazi ve fokal gliozis açısından incelendi.

İmmunohistokimyasal incelemede anti-Ki67 (hücre proliferasyon belirteci), anti-NeuN (nöronal belirteç), anti-GFAP (astroitik belirteç) antikorları kullanıldı.

III.H. İstatistiksel İnceleme:

Patolojik incelemelerden elde edilecek sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme kriteri olarak hücre sayısı dikkate alındı. Örnekler 3 farklı kişi tarafından incelendi ve boyanma pozitif olan hücreler sayılarak ortalamalar alındı. Grupların değerlendirilmesinde one-way ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

IV. BULGULAR

Mezenkimal kök hücre vericisi olarak kullanılan erkek sıçanların kemik iliklerinden MKH karakterizasyonundaki hücreler başarılı şekilde elde edildi ve kullanılmadan önce -80°C 'de saklandı (Şekil9).

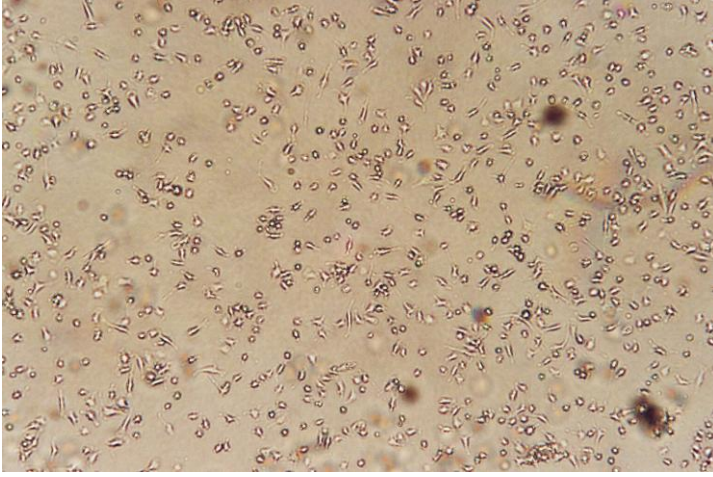
Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu gösteren bu hücrelerin uygulandığı gruplardaki dişi sıçanların beyin dokularında *SRY* geni değerlendirildi. Dişi sıçanların tümünde *SRY* geni pozitif olarak tespit edildi (Şekil 10). Bu da erkek sıçanlardan elde edilen ve dişi sıçanlara intravenöz yol ile verilen MKH'nın beyin dokusuna başarılı bir şekilde ulaştığını göstermekte idi.

Hematoksilen-eozin boyama ile nöronal hasar, dokuda yumuşama, ödem ve dejeneratif süreç (lökomalazi) ve fokal gliosis açısından gruplar karşılaştırıldı. Gruplar arasında bir farklılık tespit edilmedi. Bununla birlikte iskemi sonrası kontrol grubunda diğer gruplara göre daha belirgin dejenerasyon, ödem ve gliosis izlendi (Şekil 11-14).

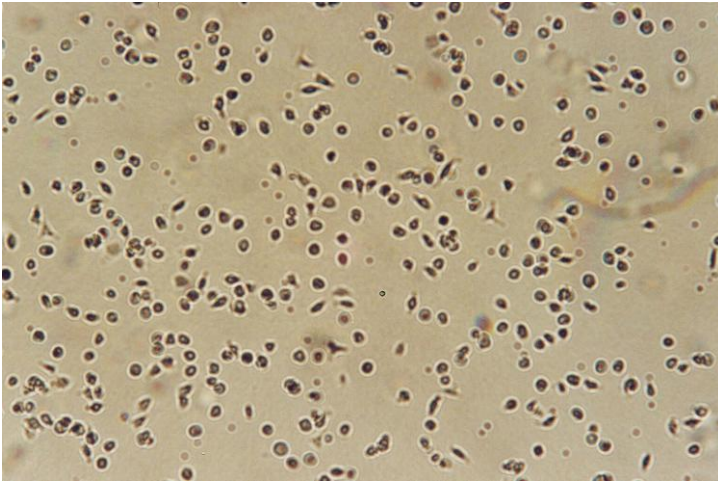
İmmunhistokimyasal incelemede hücre proliferasyon belirteci olan Ki67, gruplar arasında karşılaştırıldı. Ki67 bir nükleer protein olup hücre siklusunun mitoz fazında eksprese olmaktadır. Grup II, III ve IV'de kontrol grubuna göre anti-Ki67 antikor pozitif hücre sayısında anlamlı derecede artış izlendi ($p<0.05$). Ayrıca grup IV, grup II'ye göre de anlamlı hücre proliferasyonu artışı gösterdi ($p<0.05$). Grup II ile grup III arasında ve grup III ile grup IV arasında anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$) (Şekil 15-19). Nöronal hücre işaretleyicisi olarak kullanılan NeuN değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre grup II, III ve IV'de istatistiksel olarak anlamlı nöronal hücre boyanması izlendi ($p<0.05$) (Şekil 20-24). Grup II, III ve IV arasında ise anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Astrositik belirteç olarak kullanılan GFAP incelemesinde ise gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenmezken özellikle grup IV'de belirgin boyanma izlendi ($p>0.05$) (Şekil 25-27) (Tablo 2).



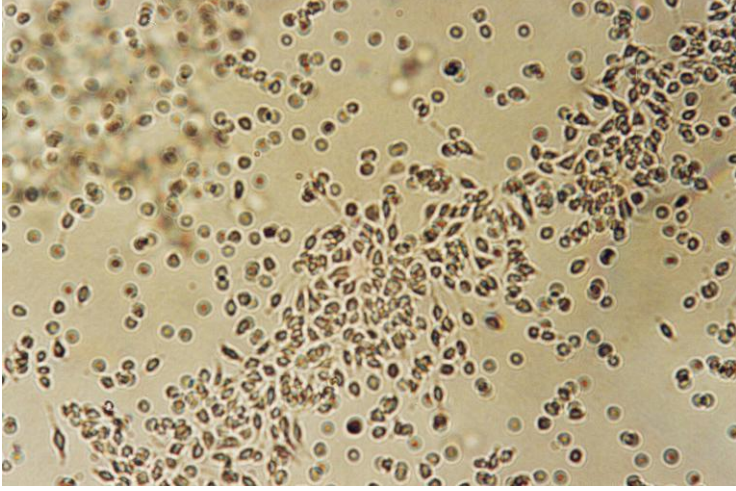
Şekil 9a: Mononükleer hücrelerin 1. gün invert mikroskop görüntüsü (Orijinal büyütme; X48)



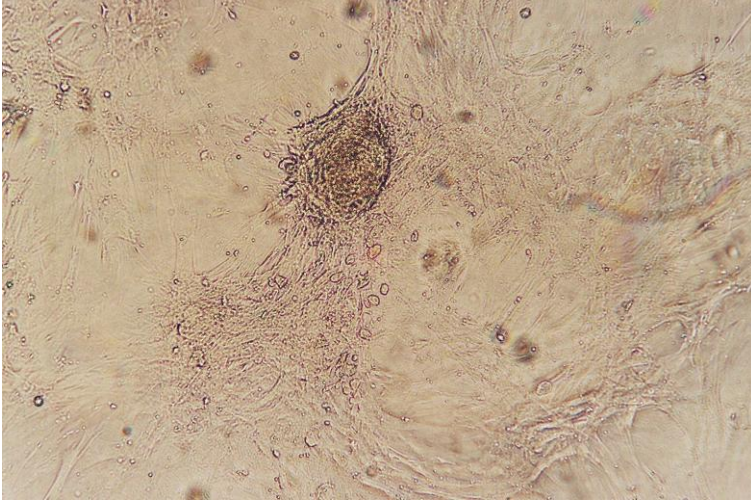
Şekil 9b: Mononükleer hücrelerin 3. gün invert mikroskop görüntüsü (Orijinal büyütme; X200)



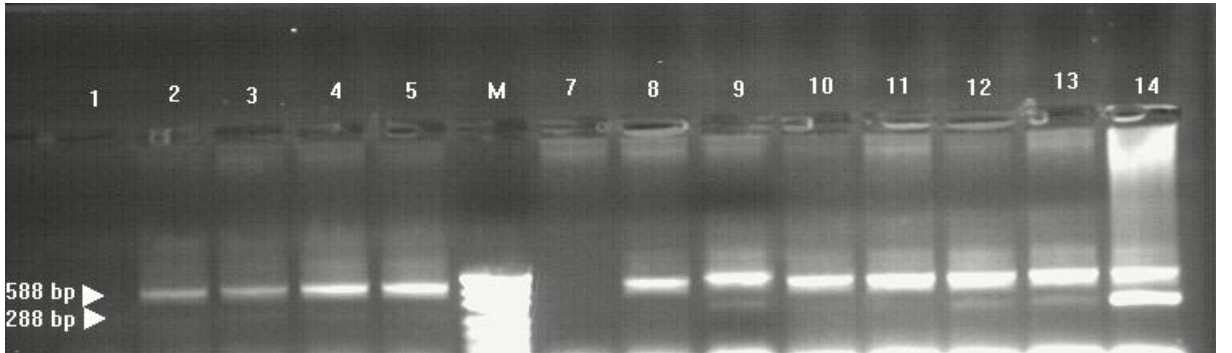
Şekil 9c: Mononükleer hücrelerin 4. gün invert mikroskop görüntüsü (Orijinal büyütme; X200)



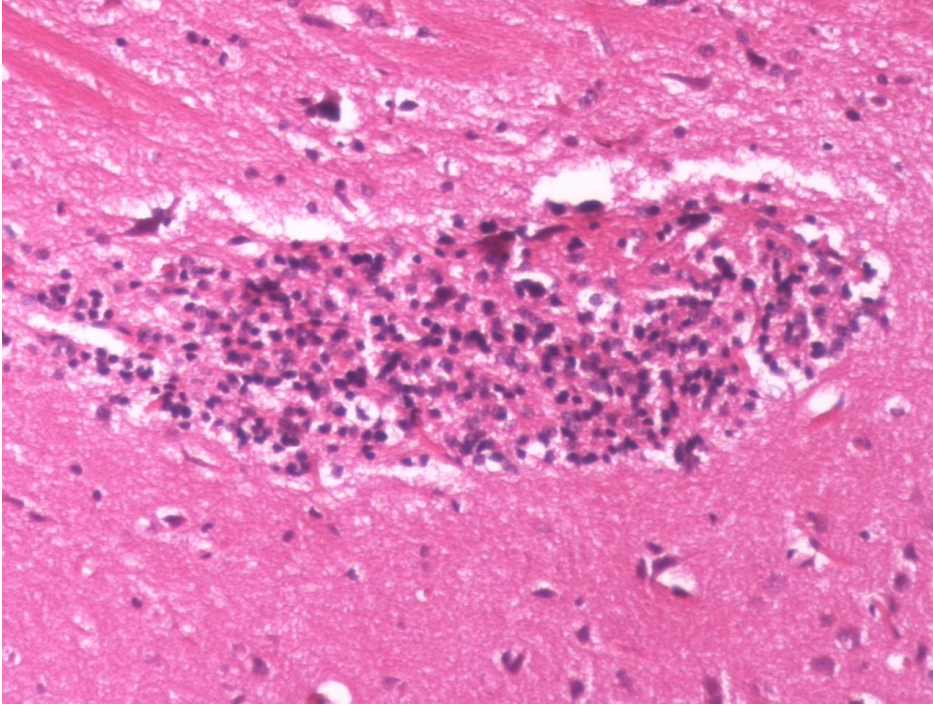
Şekil 9d: Mononükleer hücrelerin 9. gün invert mikroskop görüntüsü (Fibroblastların koloni oluşturmaya başlaması) (Orijinal büyütme; X200)



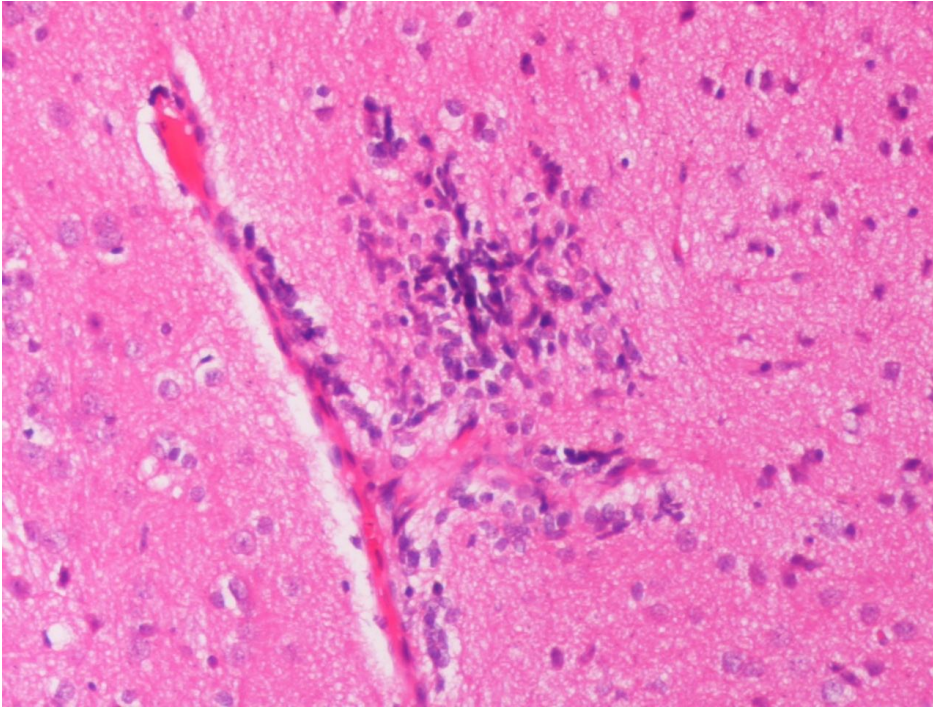
Şekil 9e: Mononükleer hücrelerin 13. gün invert mikroskop görüntüsü (CF-U odaklarının oluşması) (Orijinal büyütme; X200)



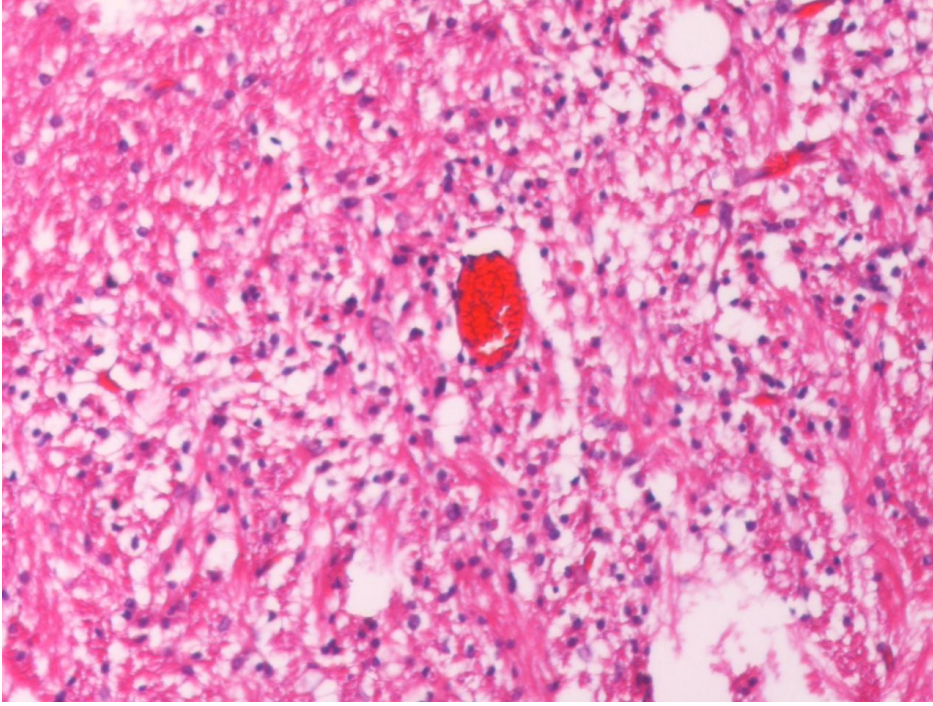
Şekil 10. 1. kuyu negative control, 2. kuyu female rat, 7 unplifiye olmamış örnek, 14 male rat, Marker pUC19 DNA/Hpa II.



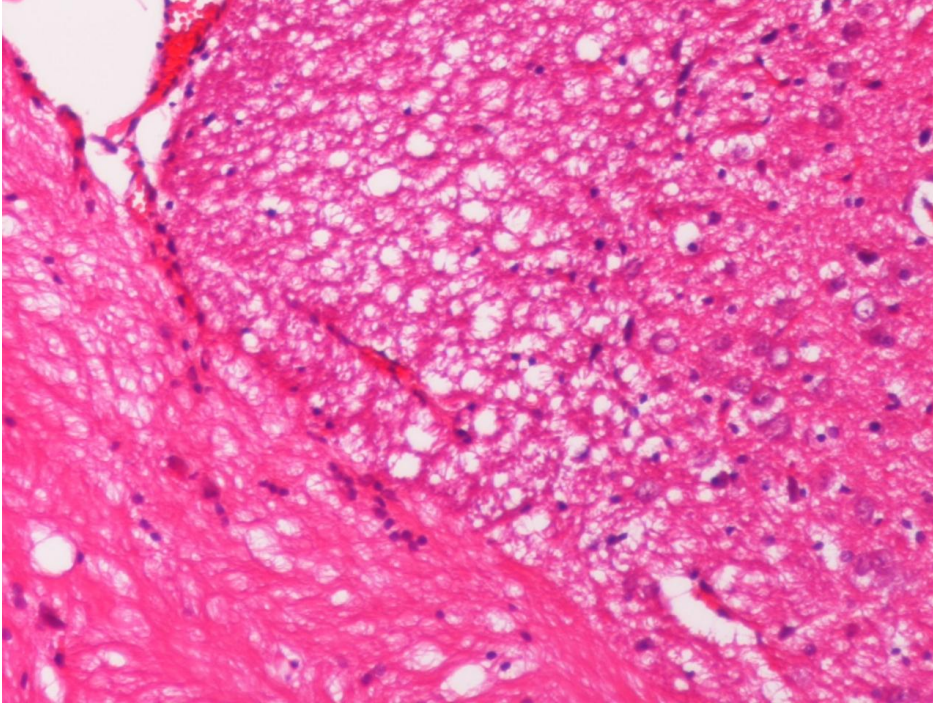
Şekil 11. Fokal gliozis, Grup I, X10



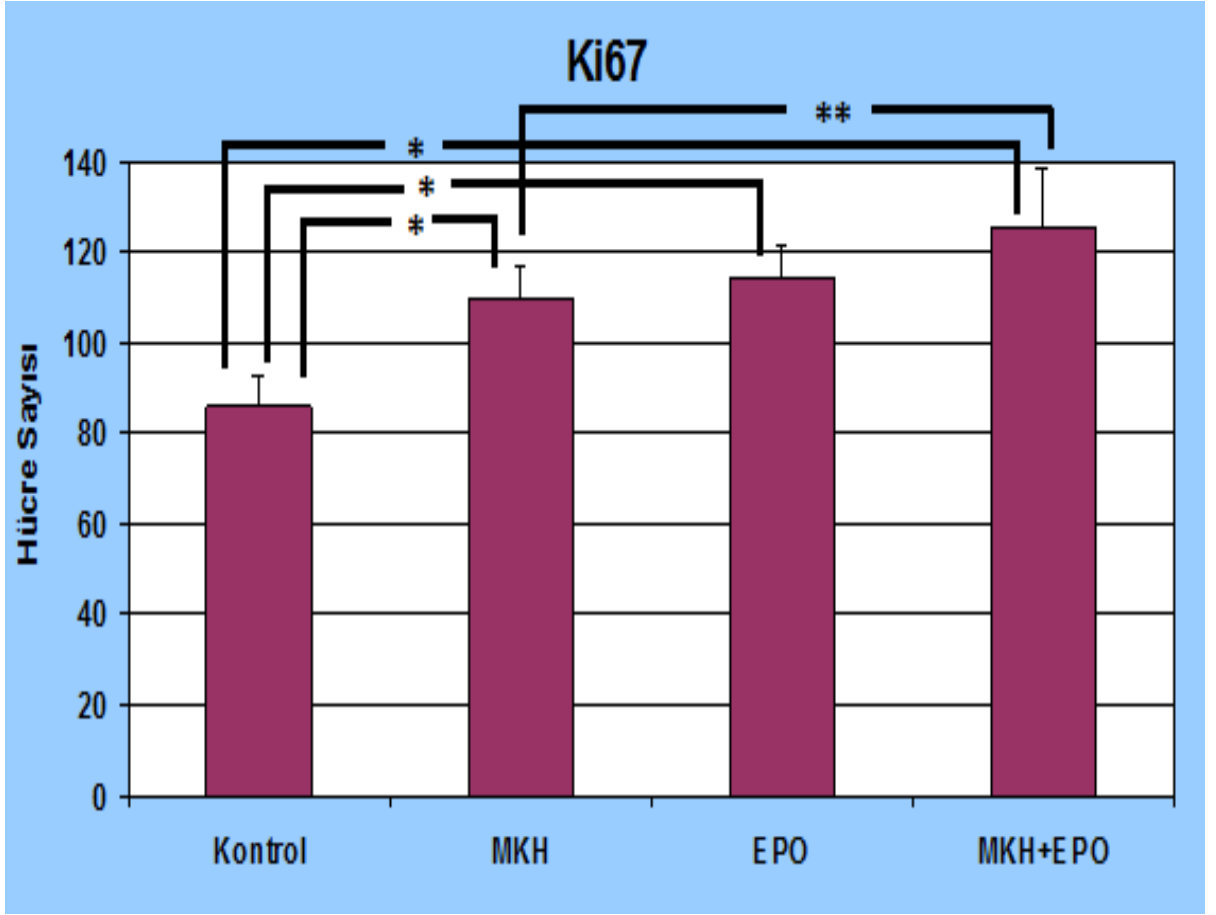
Şekil 12. Fokal gliozis, Grup IV, X10



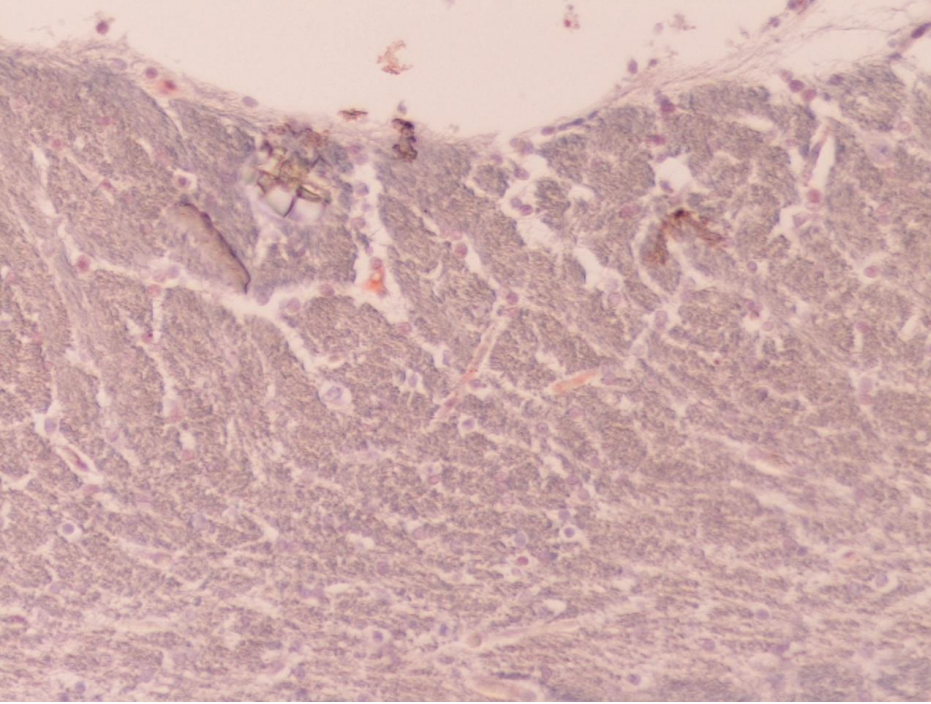
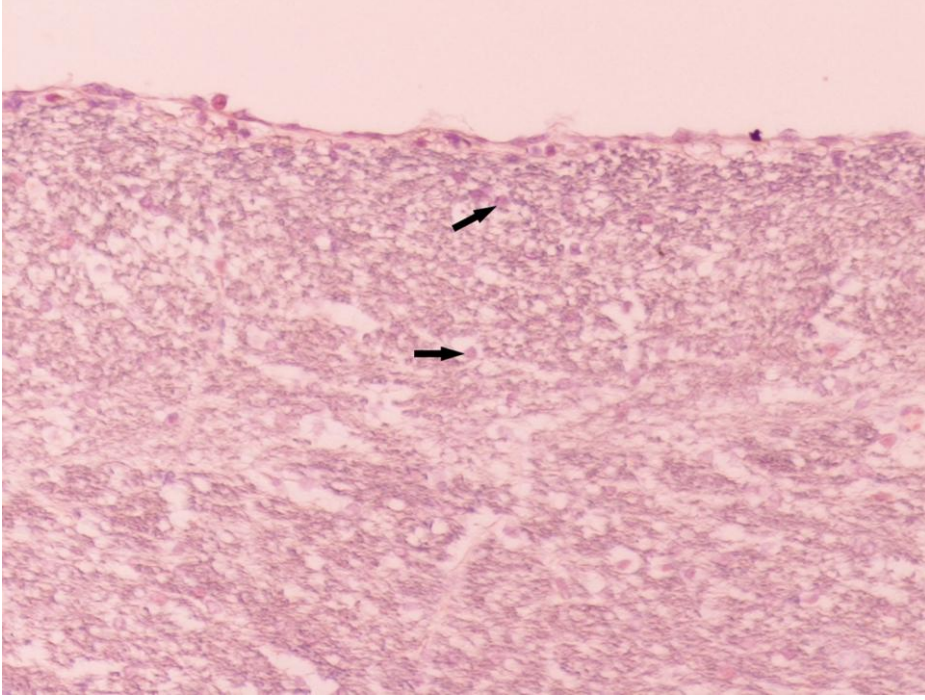
Şekil 13. Lökomalazik değişiklikler, Grup I, X10



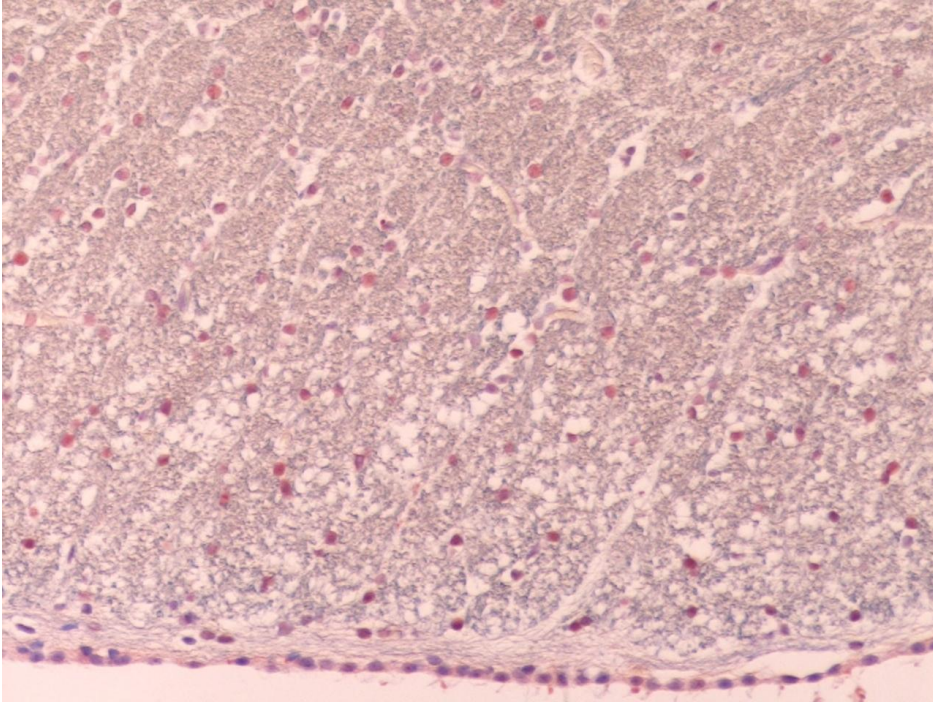
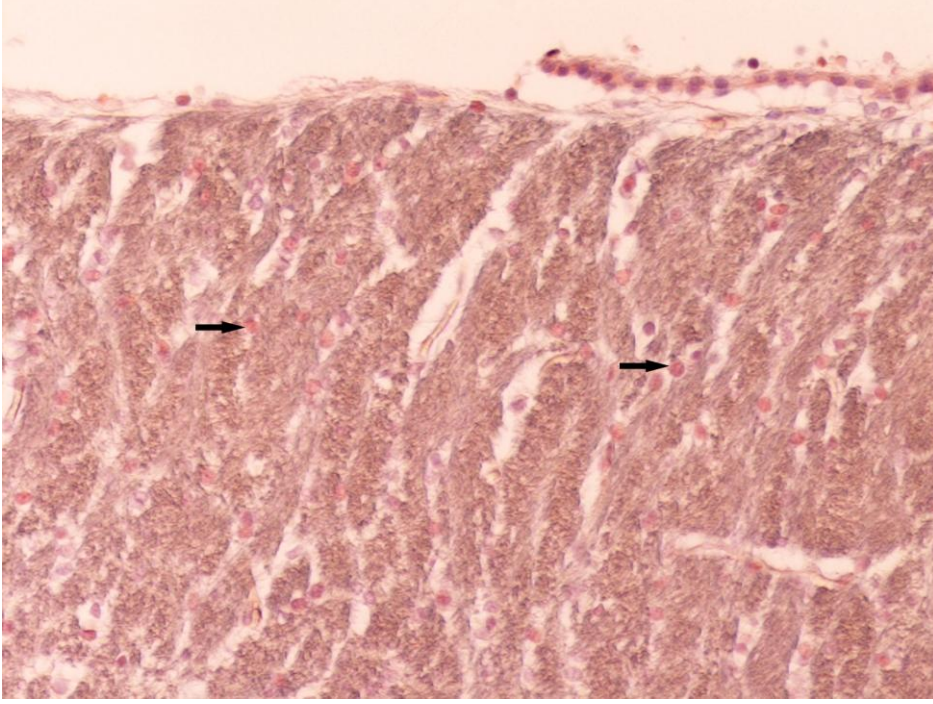
Şekil 14. Lökomalazik değişiklikler, Grup IV, X10



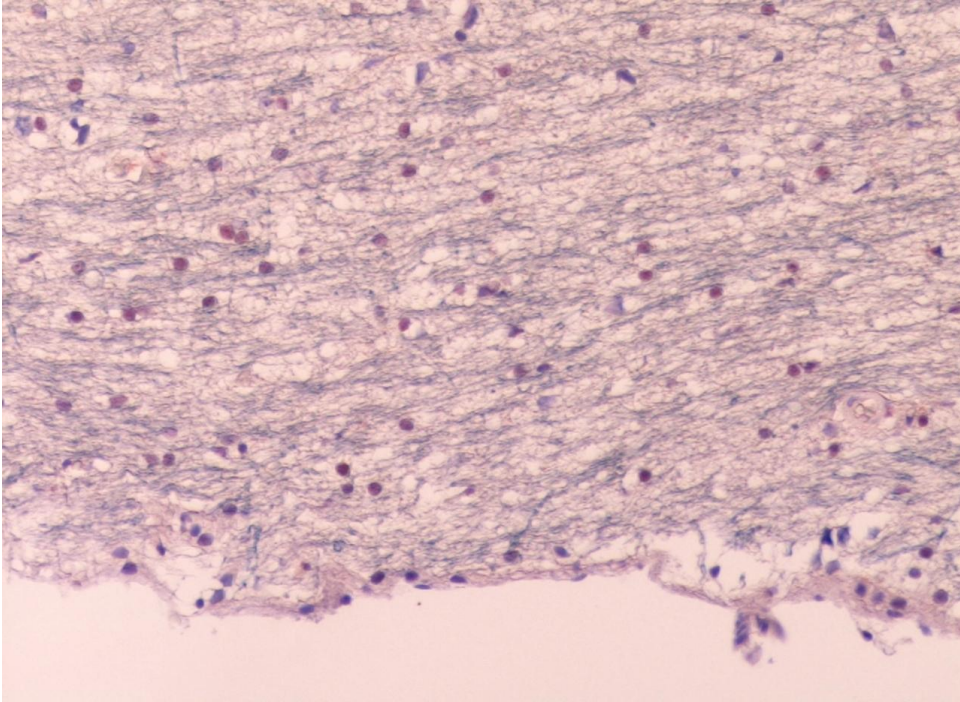
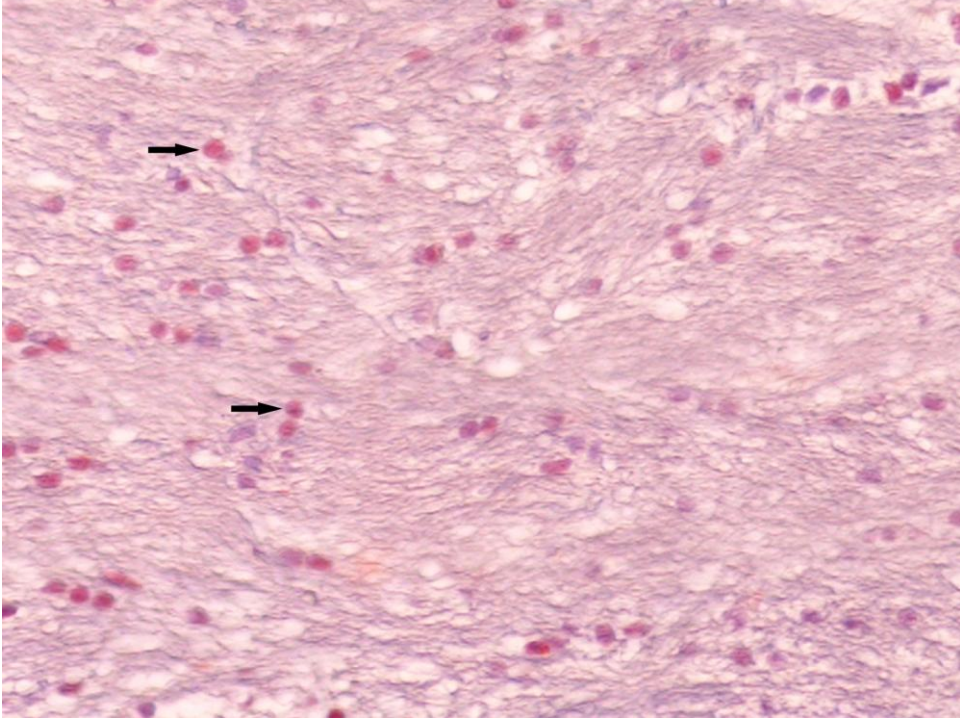
Şekil 15. Ki67 immünopozitifliği gösteren hücre sayıları, * p<0.05, ** p<0.05



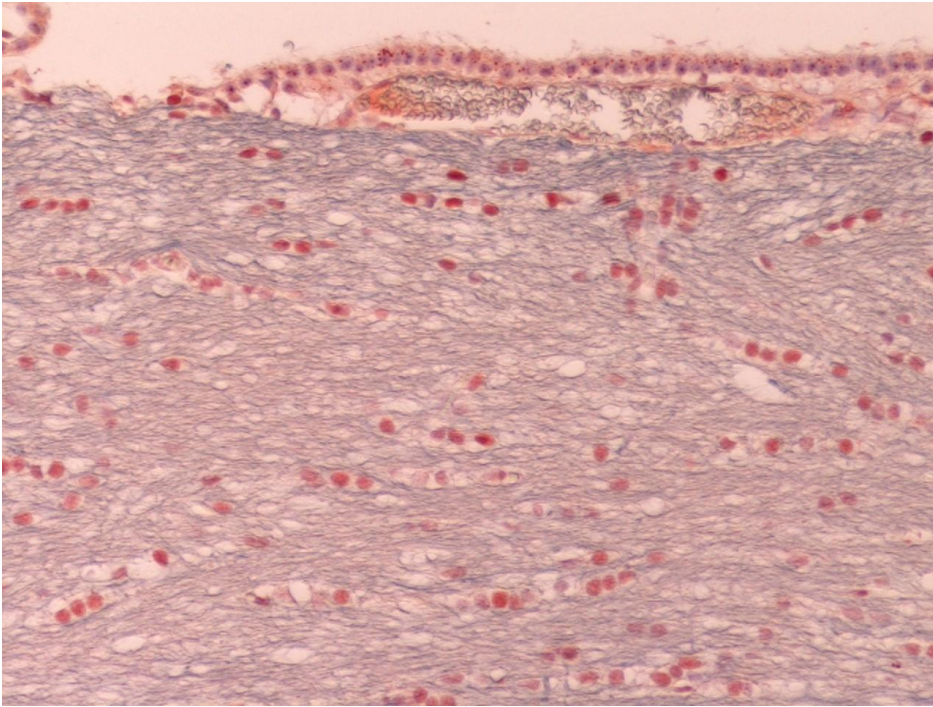
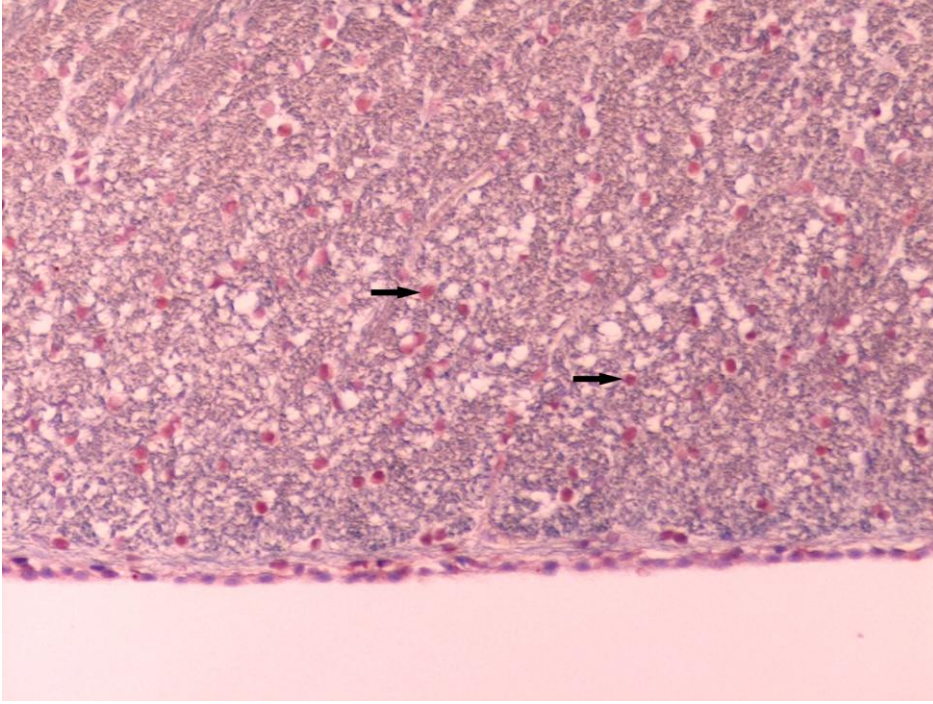
Şekil 16a,b. Ki67 immünopozitifliği, Grup I, X10, Kontrol



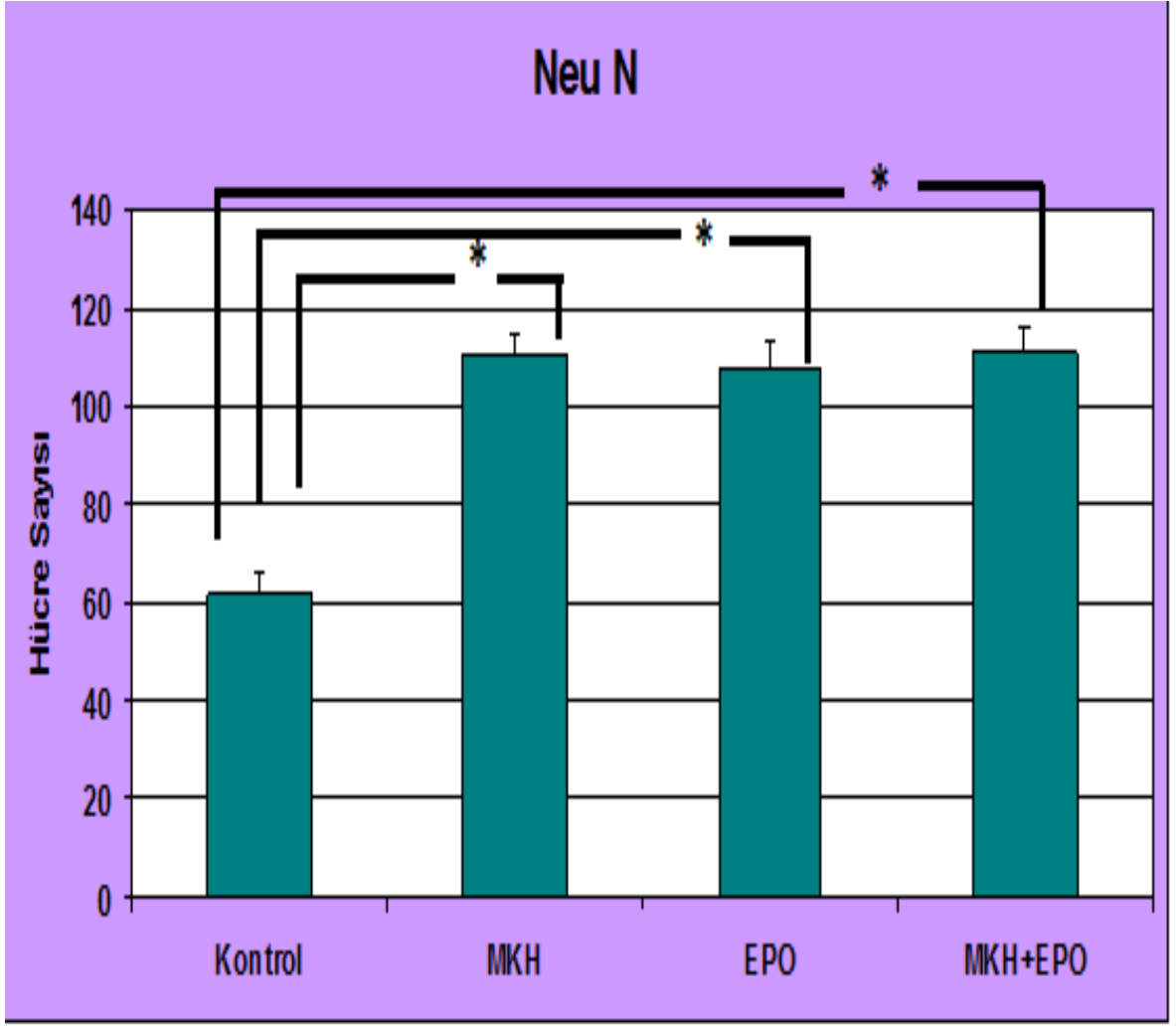
Şekil 17a,b. Ki67 immünopozitifliği, Grup II, X10



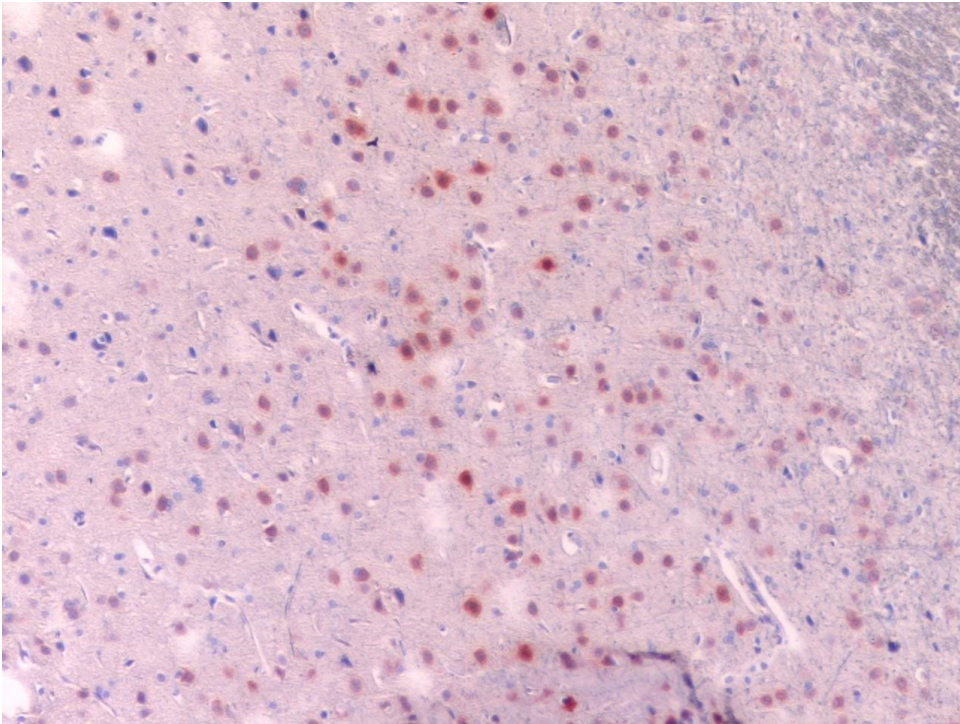
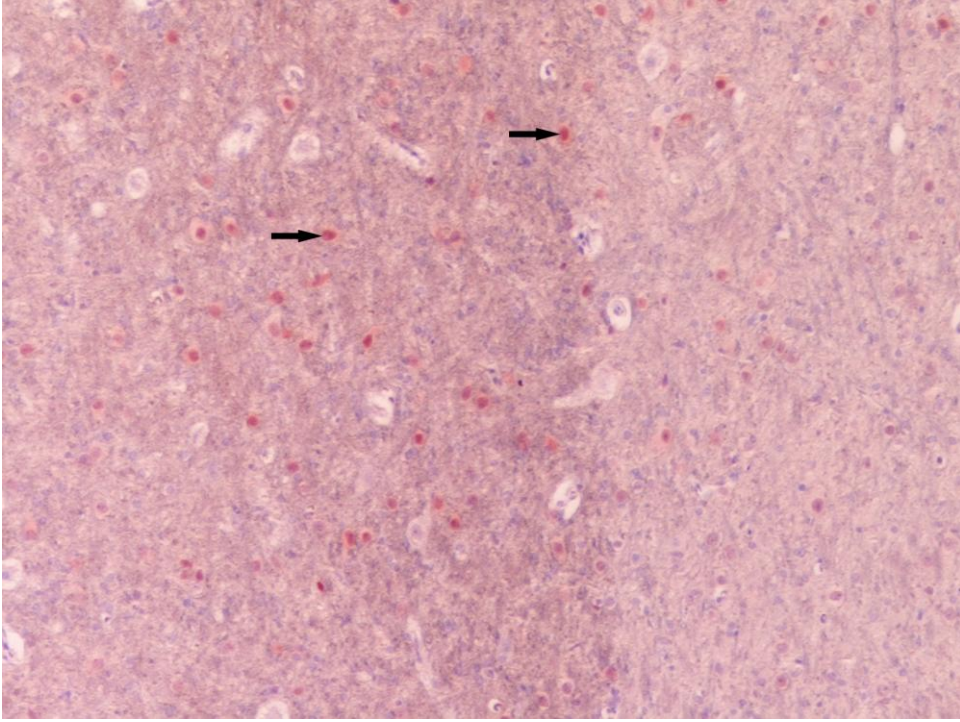
Şekil 18a,b. Ki67 immünopozitifliği, Grup III, X20 ve X10



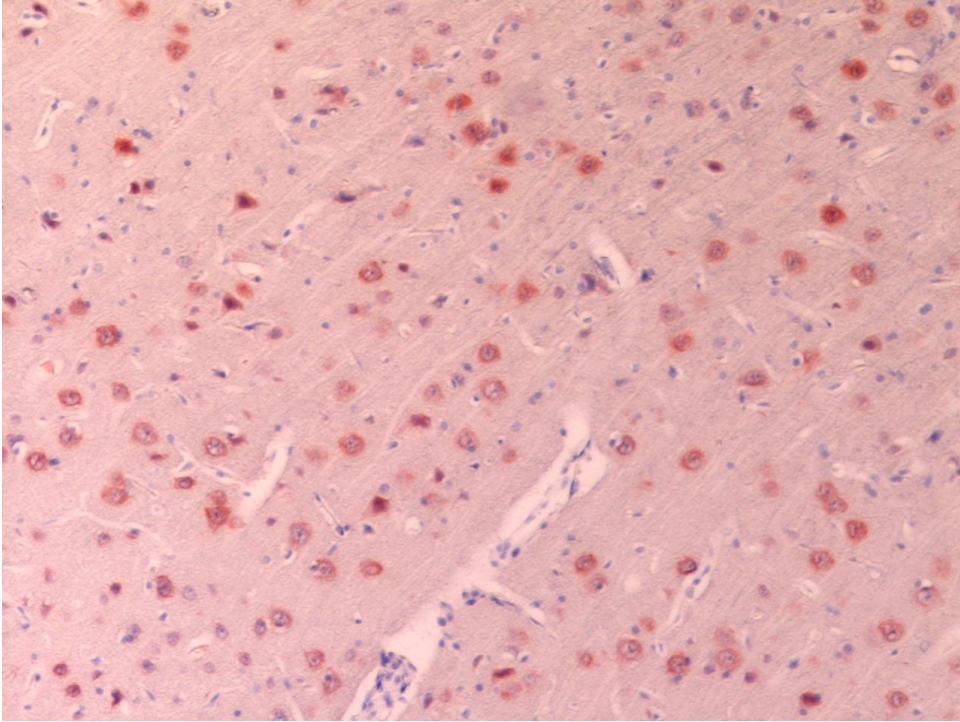
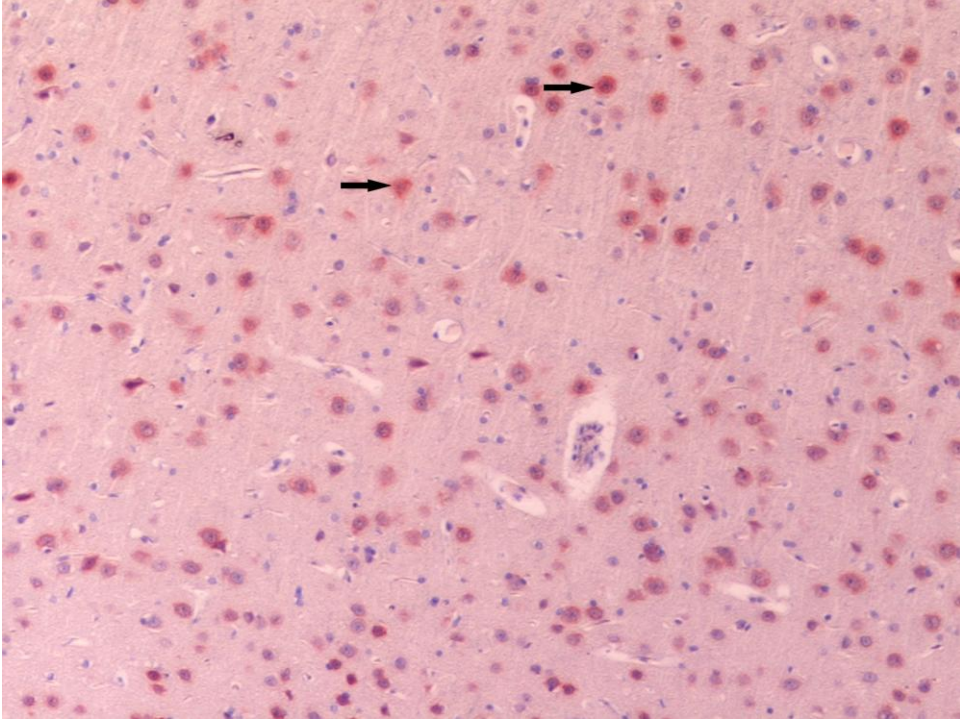
Şekil 19a,b. Ki67 immüno pozitifliği, Grup IV X10



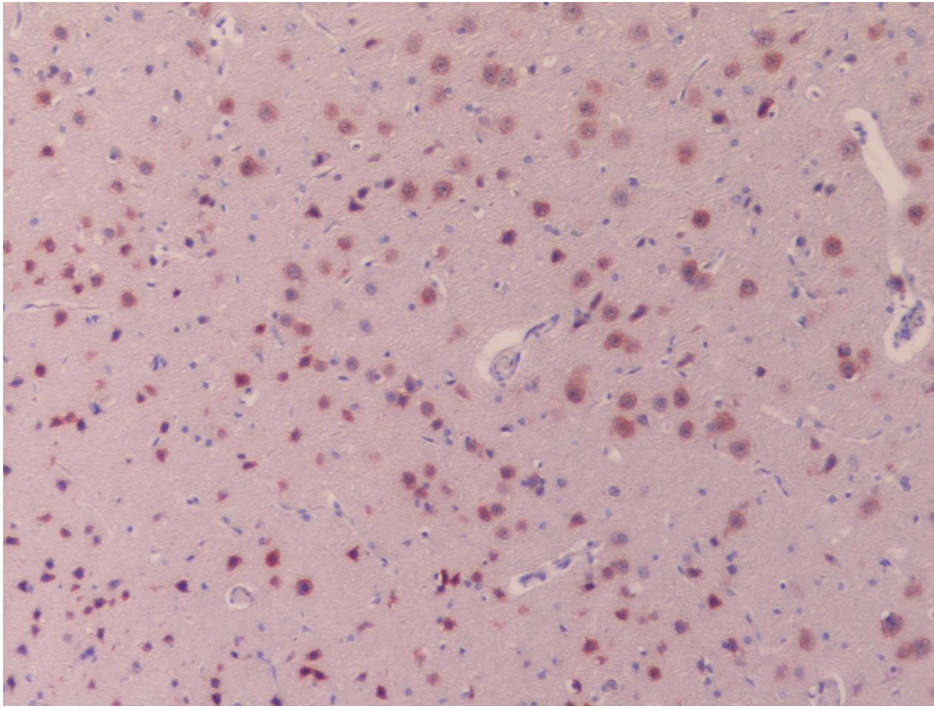
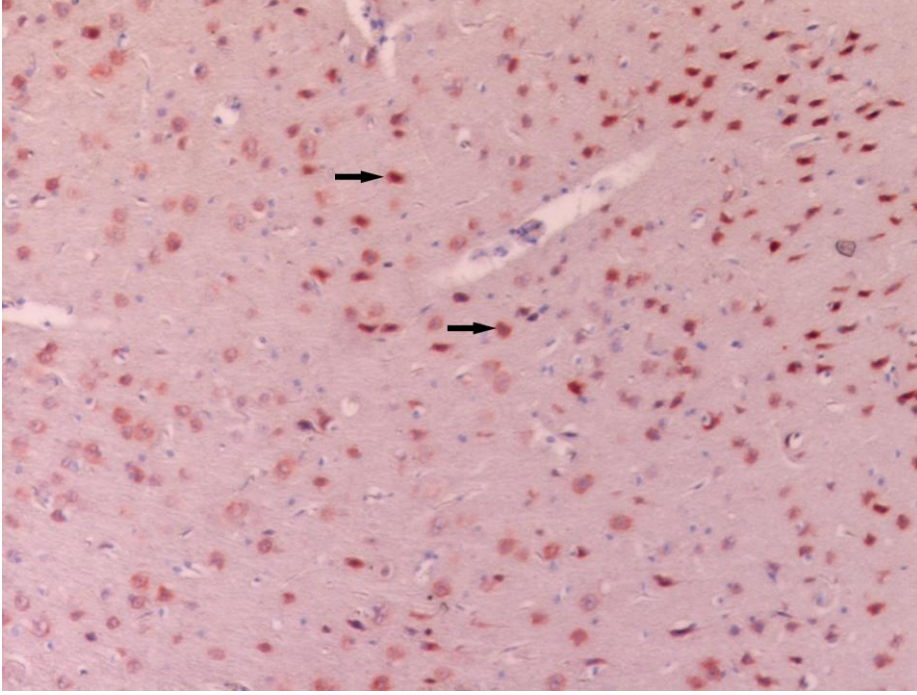
Şekil 20. NeuN immünopozitifliği gösteren hücre sayıları, * p<0.05



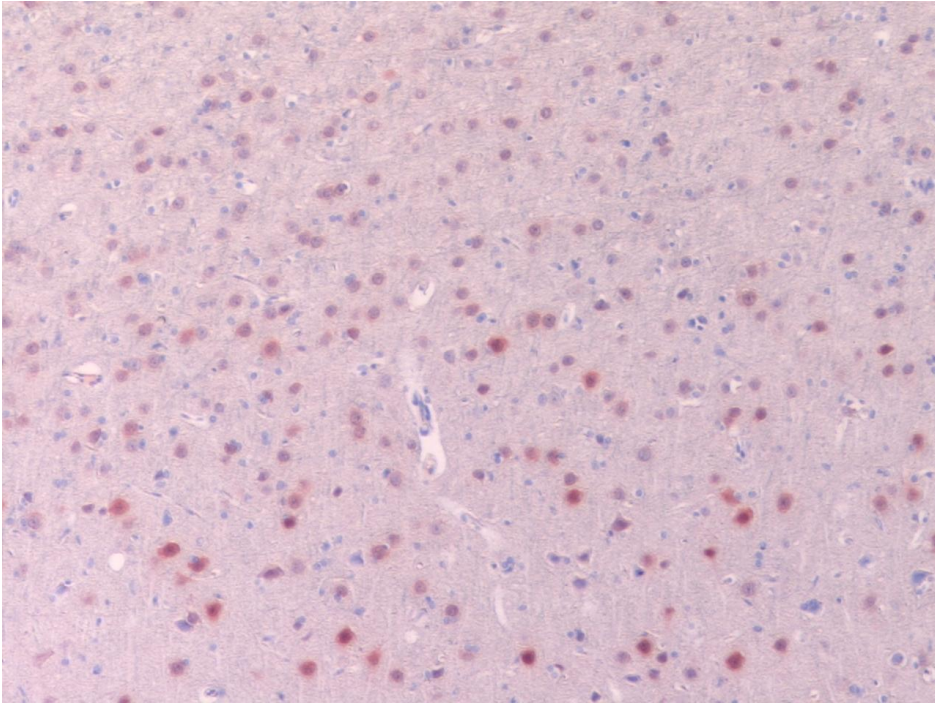
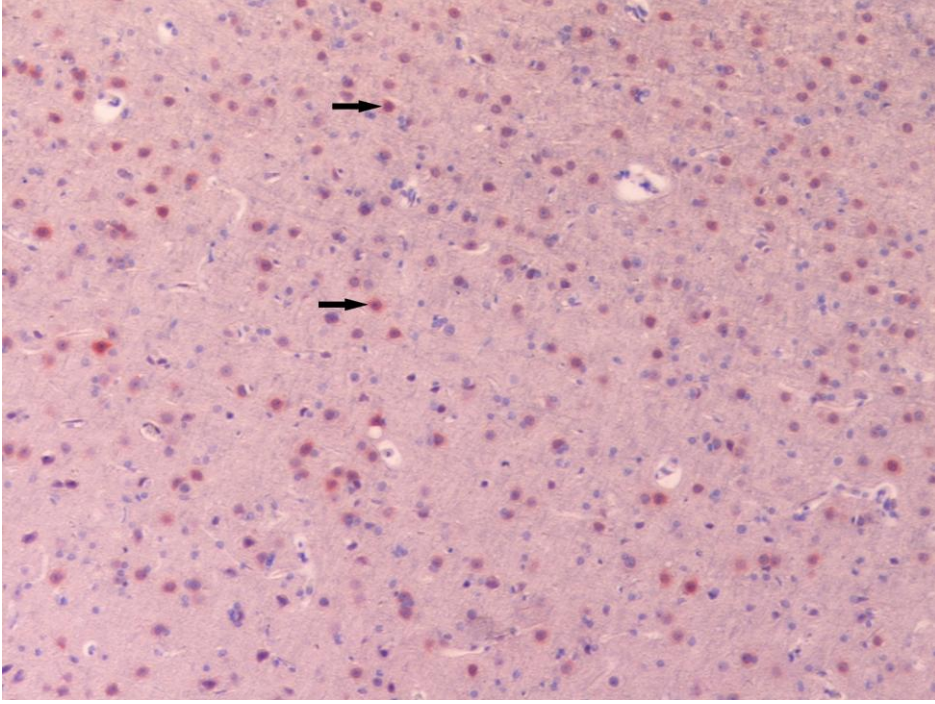
Şekil 21a,b. NeuN immünopozitifliği, Grup I, X10



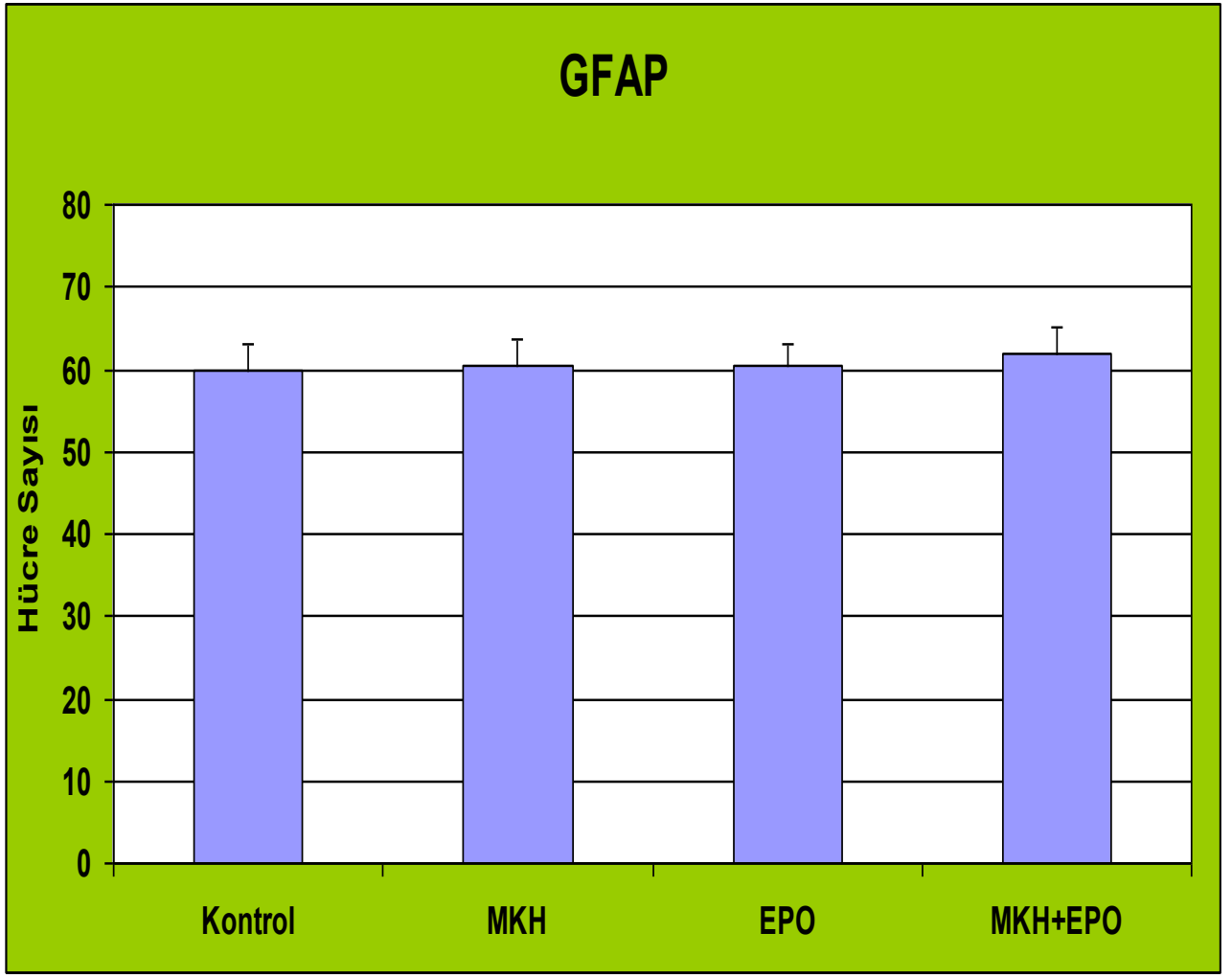
Şekil 22a,b. NeuN immünopozitifliği, Grup II, X20



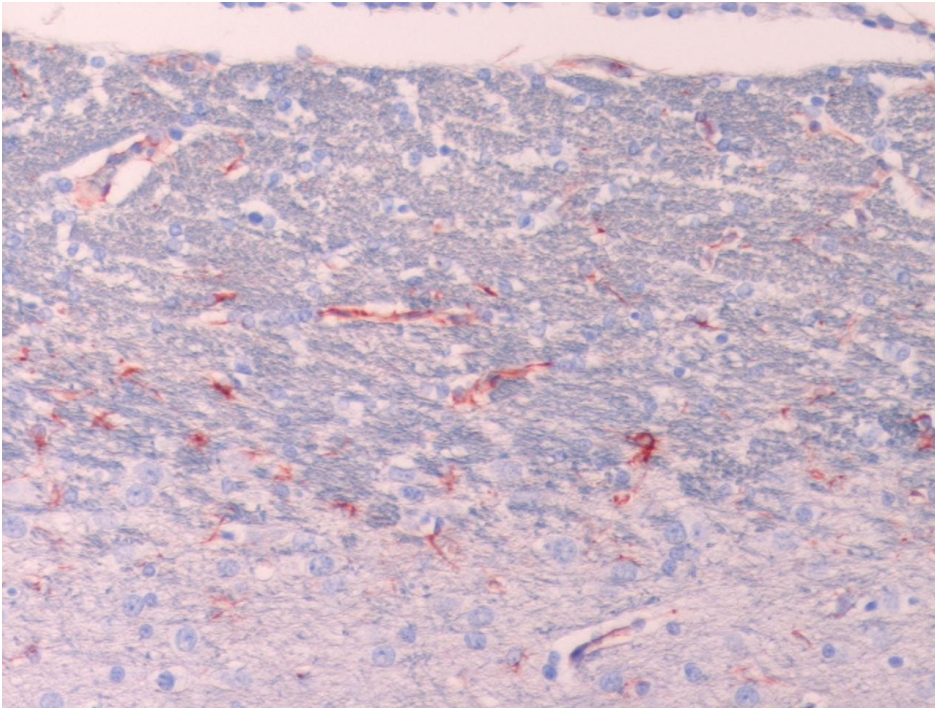
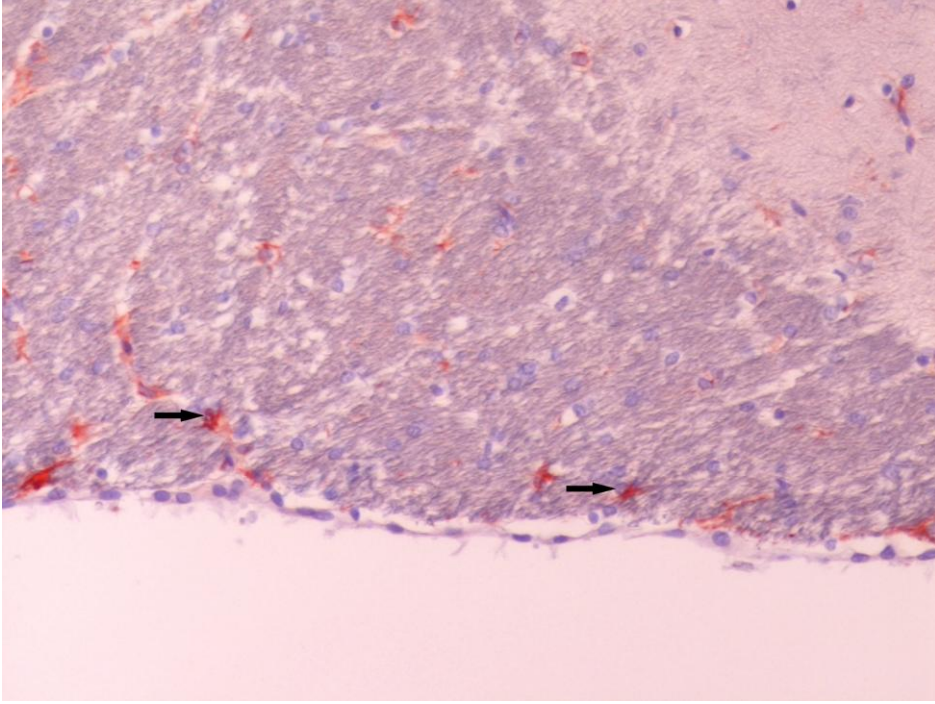
Şekil 23a,b. NeuN immünopozitifliği, GrupIII, X20



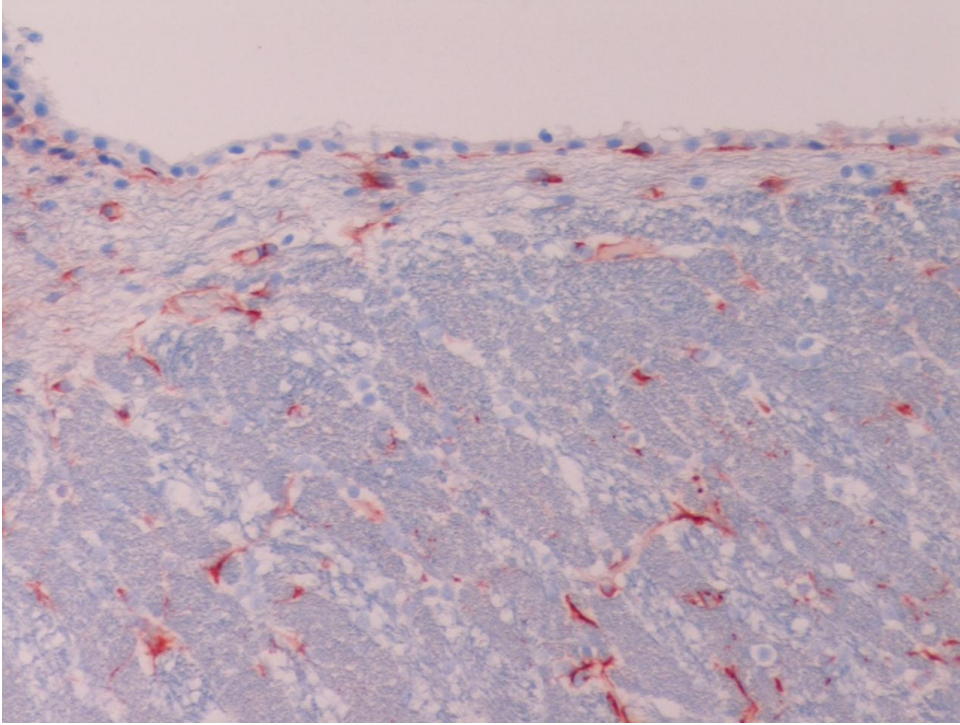
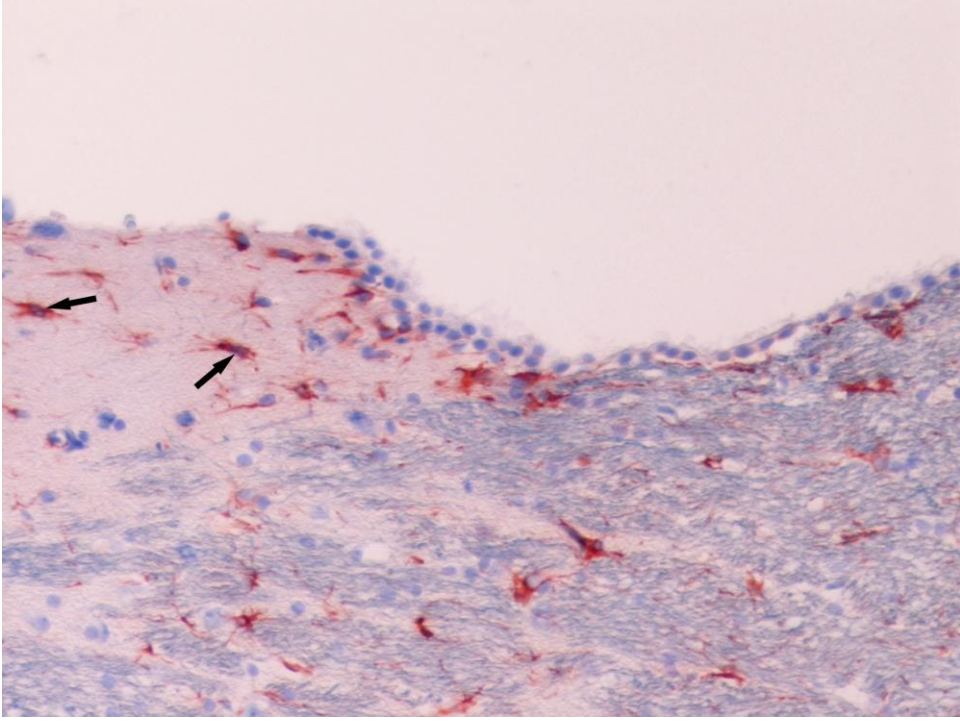
Şekil 24a,b. NeuN immünopozitifliği, Grup IV, X10



Şekil25. GPAP immüno pozitifliği gösteren hücre sayıları



Şekil 26a,b. GFAP immüno pozitifliği, Grup I, X20



Şekil 27a,b. GFAP immünopozitifliği, GrupIV, 20

Tablo2. İmmünohistokimyasal değerlendirme sonuçları

	Grup I (Kontrol)	Grup II (MKH)	Grup III (EPO)	Grup IV (MKH+EPO)
Ki67 (+)	86,2 ± 6,7	109,7 ± 7,4* [¶]	114,5 ± 7,3*	125 ± 13,3* [¶]
NeuN (+)	61,7 ± 5,1	110,3 ± 4,1 [#]	107,4 ± 5,7 [#]	110,7 ± 5,2 [#]
GFAP (+)	59,8±3,3	60,3±3,4	59,8±2,6	61,8±3,3

* Grup II,III ve IV, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı artış var (p<0.05)

¶ Grup IV, grup II'ye göre istatistiksel anlamlı artış var (p<0.05)

Grup II, III ve IV, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı artış göstermekte (p<0.05)

V. TARTIŞMA:

İnme dünya genelinde yetişkinler arasında ölüm nedenleri içinde üçüncü sırada yer almakta ve yaşayan inme hastalarında da ciddi nörolojik problemler izlenmektedir. Bu nedenle uzun yıllar araştırmacılar bu hasarlanan nöronları azaltma yöntemlerini belirlemeye çalışmışlar ve inme hayvan modellerinde uygulanan kök hücre tedavilerinin gelecek için umut verici olabileceğini gözlemlemişlerdir.

Çalışmaların çoğunda kemik iliği veya umbilikal kord kan kaynaklı MKH'ler kullanılmıştır. Deneysel iskemik inme modellerinde MKH uygulamasında intraserebral (Li ve ark.,2000; Chen ve ark.,2001a; Borlongan ve ark.,2004b; Kurozumi ve ark.,2004; Ikeda ve ark.,2005; Yano ve ark.,2005), intrakarotid (Li ve ark.,2001; Shen ve ark.,2006) ve intravenöz (Chen ve ark.,2001b; Li ve ark.,2002; Chen ve ark.,2003; Zhong ve ark.,2004; Shen ve ark.,2007) olmak üzere 3 farklı yol denenmektedir. Ancak yapılan çalışmalar en etkili uygulama yolu konusunda net bir sonuç ortaya koyamamıştır. Bununla birlikte Willing ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MCAO yapılan sıçanlarda insan umbilikal kord kanının intravenöz verilmesinin striatal uygulamaya göre uzun dönem fonksiyonel iyileşmede daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Willing ve ark.,2003). Yapılan çalışmalar intravenöz uygulanan MKH'lerin çoğunluğunun iskemik hemisfere hareket ettiğini, lezyon etrafında yerleşim gösterdiğini ve NeuN, MAP2 ve GFAP gibi nöronal işaretleyicileri eksprese ettiklerini göstermiştir. Ayrıca intravenöz uygulama ile apoptozun azaldığı, endojen hücre proliferasyonu ve FGF-2 pozitif hücrelerin sayısının arttığı tespit edilmiştir (Chen ve ark.,2001b; Chopp ve Li.,2002; Shen ve ark.,2007). Bu nedenlerle intravenöz uygulama sıklıkla tercih edilen uygulama şekli olmuştur. Biz de teknik olarak daha kolay olması, intravenöz uygulamaya rağmen MKH'nin hasarlı beyin bölgesine kolayca ulaşabilmesi nedeniyle bu uygulama yolunu tercih ettik. Dişi beyin dokularında *SRY* geninin pozitifliği de verdiğimiz MKH'nin beyin dokusuna ulaştığını kanıtlamaktadır. Ayrıca hasarlanmış beyin dokusu çevresindeki kan beyin bariyerinin bütünlüğünün iskemiye bağlı olarak haftalarca sağlanamaması intravenöz uygulanan MKH'nin bu alana spesifik olarak ulaşmasında önemli rol oynamaktadır. Verilen MKH santral sinir sistemine ulaşabilmek için bir yandan kan beyin bariyerinin bütünlüğünün bozulmasını kullanırken bir yandan da bu bütünlüğünün tekrar sağlanmasına da katkı sağlamaktadır (Borlongan ve ark.,2004a; Komatsu ve ark.,2010).

Hem kemik iliği hem de umbilikal korddan elde edilen MKH'lerin endotelial hücre ve nöronal hücreler de olmak üzere birçok hücreye farklılaşma kapasitesi vardır. Bir çalışmada MKH'lerin in vitro olarak uyarılabilir nöron benzeri hücrelere farklılaşabildikleri ve bu hücrelerin de GABA, glisin ve glutamat gibi çok sayıda nörotransmittere cevap verdiği tespit edilmiştir (Wislet-Gendebien ve ark.,2005). Yine başka bir çalışmada embriyonik MKH'lerin iskemik inme olan beyine uygulandığında, nöronal, astroglial ve endotelial işaretleyiciler kullanılarak farklılaşmaları incelenmiştir. MKH uygulamasından 2 gün gibi kısa bir süre sonra MKH'lerin beta-tubulin III, MAP2 ve nörofilament gibi çok sayıda nöronal işaretleyiciyi eksprese ettiği görülmüştür. Bu da embriyonik MKH'nin de nöronal farklılaşmasının olduğunu göstermektedir (Liu ve ark.,2009). Ancak nöronal veya glial hücre belirteçlerini eksprese etmek tam anlamı ile bir farklılaşmayı ve nöronal ya da glial hücre fonksiyonlarını tamamen gösterme gerekliliğini ortaya çıkarmamaktadır. Bunu destekler nitelikteki bir çalışmada umbilikal korddan elde edilen MKH'lerin in vitro ortamda nöronal farklılaşma göstererek nöronal işaretleyici pozitif hücreler haline döndükleri gösterilmiştir. Ancak morfolojik olarak nöronal farklılaşma sonucu oluşan nöronal hücrelerin elektrofizyolojik çalışmalar ile fonksiyonel olarak aktif olmadıkları görülmüştür (Koh ve ark.,2008). Çalışmamızda hayvanların motor fonksiyonel becerilerinin değerlendirilmemiş olması veya elektrofizyolojik çalışmalarının yapılamamasına bağlı olarak immunhistokimyasal olarak tespit ettiğimiz nöronal farklılaşmanın fonksiyonel bir farklılaşma olup olmadığı konusunda yorum yapmamız mümkün değildir. Ayrıca Yoo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MKH'lerin NeuN ve Dcx eksprese etmediklerini, Dcx (+) hücrelerin NKH'lerden köken aldığını tespit etmişlerdir (Yoo ve ark.,2008). Dolayısı ile MKH uygulaması sonrası gözlenen iyileşmeden farklı mekanizmalar sorumlu gibi görünmektedir. Biz de çalışmamızda tespit ettiğimiz subventriküler alandaki hücre proliferasyonunda ve nöronal farklılaşmadaki artmadan ikili boyamalar yapamadığımız için MKH'nin nörojenezi aktive ederek mi yoksa direkt nöronal farklılaşma ile mi etkili olduğu konusunda yorum yapamamaktayız. Ancak MKH'lerin farklılaşmadan çok var olan NKH'lerin çoğalma ve farklılaşmalarını uyararak etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda GFAP ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi. Sinir sisteminde herhangi bir zedelenmenin neden olduğu glial skarın değerlendirilmesinde GFAP ekspresyonu kullanılabilir (de Vasconcelos

ve ark.,2010). Verilerimiz ışığında hem MKH hem de EPO'nun tek veya kombine şekilde skar oluşumu üzerine koruyucu bir etkisinin olmadığı görüldü. Hatta GFAP pozitif hücre sayısı özellikle MKH'nin verildiği gruplarda plasebo grubuna göre çok az miktarda artmış idi. Bu etki, uygulanan MKH'nin endojen nörogenezi uyararak yeni nöronal hücreler oluşturması ve bu hücrelerin bir kısmının da astrositlere farklılaşması ile açıklanabilir. Literatürde de farklı sonuçlar elde eden çalışmalar bulunmaktadır. Li ve ark. iskemik alan çevresindeki glial skar oluşumunda MKH'nin azaltıcı etkisini görürken, de Vasconcelos ve arkadaşları ise kemik iliği kökenli mononükleer hücrelerin skar oluşumu üzerine etkisini gösterememişlerdir (Li ve ark.,2005; de Vasconcelos ve ark.,2010).

Nörogenezin indüklenmesi de iskemik inmedeki fonksiyonel iyileşmeden sorumlu ana mekanizmalardan biridir. Subventriküler ve subgranüler bölgede izlenen yetişkin nörogenezdeki hücre proliferasyonunu iskemik inme dahil olma üzere çeşitli fizyolojik, patolojik ve farmakolojik uyarıcılar etkilemektedir. NKH'ler serebral iskemiye cevap olarak proliferasyonlarını artırmakta, matür striatal nöronlara farklılaşarak da hasarlanmış nöronların yerine geçebilmektedirler (Jin ve ark.,2001; Yoshimura ve ark.,2001; Jin ve Galvan,2007; Duan ve ark.,2008). Ancak bu proliferasyon ve farklılaşma anlamlı bir fonksiyonel iyileşme için yeterli olamamaktadır. Bu nedenle de endojen nörogenezi artırmaya yönelik çalışmalarda EPO, epidermal büyüme faktörü, VEGF ve statin gibi çeşitli ajanlar denenmiştir (Sun ve ark.,2003; Teramoto ve ark.,2003; Cimino ve ark.,2005; Kim ve Jung,2010; Yuen ve ark.,2010; Zhang ve ark.,2010). MKH ile de benzer çalışmalar yapılmaktadır (Li ve ark.,2000; Chen ve ark.,2001a; Chen ve ark.,2001b; Li ve ark.,2001; Chen ve ark.,2003; Borlongan ve ark.,2004b; Kurozumi ve ark.,2004; Ikeda ve ark.,2005; Yano ve ark.,2005; Shen ve ark.,2006; Shen ve ark.,2007; Yoo ve ark.,2008). Geçici tipte MCAO modelinde MKH uygulaması ile subventriküler yerleşimli endojen NKH proliferasyonunda ve yeni ortaya çıkan nöroblastların yaşam sürelerinde artma tespit edilmiştir (Yoo ve ark.,2008). Çalışmamızda da immunhistokimyasal olarak Ki67 boyanmasında MKH ve EPO ile artışın gösterilmesi proliferasyon üzerine olumlu etkilerini göstermektedir. Ancak proliferasyon olan bu hücrelerin NKH olup olmadıkları konusunda ikili boyamalar yapılmadığı için yorum yapılamamaktadır. Ancak NeuN immunhistokimyasal

boyamalarda matur nöron sayısında artışın gösterilmesi proliferen olan hücrelerin nöral progenitör hücre olma olasılıklarını artırmaktadır.

İskemik inme çalışmalarında BDNF, FGF ve HGF gibi çeşitli trofik faktörler MKH ile birlikte verilerek MKH etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Büyüme faktörleri ya direkt olarak MKH ile birlikte verilmekte ya da genleri MKH'ye aktararak uygulanmaktadır. Bu çalışmalarda MKH etkinliğinin potansiyalize olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark.,2000; Kurozumi ve ark., 2004; Ikeda ve ark., 2005; Zhao ve ark., 2006). Literatürde EPO ile MKH birlikteliğinin etkinliğini inceleyen tek çalışmada EPO geni MKH'ye aktararak çalışılmıştır. EPO-MKH birlikteliğinin tek MKH uygulamasına göre infarkt alanının azaltılmasında ve fonksiyonel düzelmede daha etkili olduğunu görülmüştür. Ayrıca BDNF, HGF ve SDF-1alfa ekspresyonu EPO-MKH grubunda daha da artmış olarak bulunmuştur (Cho ve ark.,2010).

İskemide EPO kullanımı ile ilgili deneysel ve klinik çalışmalar bulunmaktadır (Kim ve Jung,2010; Yuen ve ark.,2010; Zhang ve ark.,2010; Siren ve ark., 2001). Çalışmaların birinde 60 dakikalık MCAO'nda intraperitoneal olarak uygulanan 5000 U/kg rekombinat insan EPO (rHuEpo) ile plasebo karşılaştırılmıştır. EPO ve plasebonun iskemi ile eş zamanlı uygulandığı bu çalışmada, 24. saatte EPO grubunda plaseboya göre enfarkt alanında %75 azalma tespit edilmiştir. Ayrıca EPO grubunda inflamatuvar hücre infiltrasyonunda da belirgin azalma görülmüştür. Plasebo grubunda TUNEL(+) hücre sayısı EPO grubuna göre artış göstermiştir. Bu bulgular iskemik hasara maruz kalan nöronun apoptotik süreçten EPO ile korunabildiğini göstermektedir (Siren ve ark., 2001). Bir klinik çalışmada da MCAO tespit edilen hastalarda rhEPO etkinliği araştırılmıştır. rhEPO hastalara ortalama 5 saat içinde intravenöz uygulanmış ve 30. günde hastalar nörolojik fonksiyonları açısından skorlanmışlardır. Hastalara 1, 3 ve 18. günlerde kraniyal görüntüleme yapılarak lezyon hacmi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar EPO grubunda hem klinik iyileşme hem de lezyon hacminde azalmanın kontrol grubuna göre daha anlamlı olduğunu desteklemektedir (Ehrenreich ve ark., 2002). EPO inme hastalarında etkinliği gösterilen ve güvenilirliği kabul edilen ilk nöroprotektif ajan olmakla beraber hipertansiyon, tromboz ve hematokrit artışı gibi yan etkiler bildirilmektedir. Bu nedenle karbamillenmiş-EPO hizmete sunulmuştur. EPO'nun bu formu eritropoezisi indüklemeksizin antiapoptotik ve nöroprotektif etkinliği göstermektedir. İnmeden 24 saat sonra uygulanan karbamillenmiş EPO ile

perifokal mikroglial aktivasyon ve beyaz cevher hasarı azalmakta, buna bağlı olarak da inme sonrası fonksiyonel iyileşme anlamlı olarak artmaktadır (Chen ve Chopp,2006; Villa ve ark,2007).

Sonuç olarak çalışmamız MKH ve EPO'nun tek veya kombine olarak uygulandığında iskemik inmenin neden olabileceği hasarın azaltılmasında, nöronal farklılaşmayı artırarak etkili olduğunu göstermiştir. Ancak nöronal farklılaşmadaki mekanizmaları ve fonksiyonel iyileşmenin de ortaya konabilmesi için ek çalışmalara gerek duyulmaktadır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER:

1. Erkek sıçanlardan elde edilen ve dişi sıçanlara kuyruk veninden verilen MKH hasarlanmış beyin dokusuna başarılı bir şekilde ulaşmıştır.
2. Nöronal hasar, lökomalazi ve fokal gliozis açısından gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$).
3. Grup II, III ve IV'deki anti-Ki67 antikor pozitif hücre sayısında kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış izlendi ($p < 0.05$). Ayrıca grup IV'de de, grup II'ye göre anlamlı hücre proliferasyonu artışı vardı ($p < 0.05$).
4. Grup II, III ve IV'de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artan nöronal hücre boyanması izlendi ($p < 0.05$). Grup II, III ve IV arasında ise anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.
5. Gruplar arasında, GFAP pozitif hücre sayısı açısından anlamlı farklılık tespit edilmedi.

Bu çalışma öncelikle göstermiştir ki intravenöz olarak uygulanan MKH, beyin dokusuna başarılı şekilde ulaşmaktadır ve serebral iskemi de dahil olmak üzere çeşitli serebral hasarlanma modellerinde invazif bir yöntem olmadığı için tercih edilebilir.

Hem MKH hem EPO'nun tek başına veya birlikte verildiğinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede hücre proliferasyonunu ve nöronal farklılaşmayı artırması iskeminin neden olduğu hasarın azaltılmasında etkili olabileceklerini göstermektedir. Ancak motor ve kognitif fonksiyonların çalışılmamış olması nedeniyle iskemik hasarın azaltılmasının fonksiyonel iyileşmedeki etkinliği belirlenememiştir. Bu nedenle benzer bir çalışmanın nörokognitif fonksiyonlarla korele edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışma MKH'nin EPO ile kombine edildiğinde etkinliğinin arttığını göstermiştir. Aynı şekilde nöroprotektif etkinliği bilinen ajanlarla MKH kombinasyonunu deneyen çalışmaların sayısı artırılmalıdır.

Serebral iskemide hasarın azaltılmasında MKH ve EPO çok iyi birer aday gibi görünmekle beraber yakın ve uzun dönemde ortaya çıkabilecek yan etkilerin bu çalışma da dahil olmak üzere yeteri kadar çalışılmamış olması klinik uygulamalar için bir sorun teşkil etmektedir. İleriye dönük çalışmaların daha çok yan etkiler üzerine yoğunlaşarak klinik uygulamalarda karşılaşılabilecek olumsuz durumların belirlenmesi amaçlanabilir.

VII. KAYNAKLAR

- Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 23):5655-5664
- Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25(6):1384-1392.
- Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;(1176):101-117.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells* 2001;19(3):180-192
- Borlongan CV, Lind JG, Dillon-Carter O, Yu G, Hadman M, Cheng C, Carroll J, Hess DC. Intracerebral xenografts of mouse bone marrow cells in adult rats facilitate restoration of cerebral blood flow and blood-brain barrier. *Brain Res*. 2004a;1009(1-2):26-33.
- Borlongan CV, Lind JG, Dillon-Carter O, Yu G, Hadman M, Cheng C, Carroll J, Hess DC. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res*. 2004b;1010(1-2):108-116.
- Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Grasso G, Corica F, Frisina N. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103(3):275-282.
- Cameron HA, Hazel TG, McKay RD. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol*. 1998;36(2):287-306.
- Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology*. 2000;39(5):711-716.

- Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci.* 2001a;189(1-2):49-57.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 2001b;32(4):1005-1011.
- Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res.* 2003;73(6):778-786.
- Chen J, Chopp M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx* 2006;3:466-473
- Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam SC, Chopp M. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology.* 2002;22(4):275-279.
- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(5):815-820
- Cho GW, Koh SH, Kim MH, Yoo AR, Noh MY, Oh S, Kim SH. The neuroprotective effect of erythropoietin-transduced human mesenchymal stromal cells in an animal model of ischemic stroke. *Brain Res.* 2010;1353:1-13.
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin: cytoprotection in vascular and neuronal cells. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2003;3(2):141-154

- Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* 2002;1(2):92-100
- Cimino M, Balduini W, Carloni S, Gelosa P, Guerrini U, Tremoli E, Sironi L. Neuroprotective effect of simvastatin in stroke: a comparison between adult and neonatal ratmodels of cerebral ischemia. *Neurotoxicology.* 2005;26(5):929-33.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci.* 1996;16(8):2649-2658.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsö C, Holtås S, van Roon-Mom WM, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Frisén J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science.* 2007;315(5816):1243-1249.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 11):2204-2213.
- Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate.* 2001;79(3-4):228-235.
- Dharmasaroja P. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J Clin Neurosci* 2009;16:12-20
- Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001;412(6847):641-647
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans

R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.

de Vasconcelos Dos Santos A, da Costa Reis J, Diaz Paredes B, Moraes L, Jasmin, Giraldi-Guimarães A, Mendez-Otero R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Res*. 2010;1306:149-158.

Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2008;18(1):108-115.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rüter E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*. 2002;8(8):495-505

Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*. 1999;23(2):247-256.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-274.

Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci*. 1992;12(9):3642-3650.

Ikeda N, Nonoguchi N, Zhao MZ, Watanabe T, Kajimoto Y, Furutama D, Kimura F, Dezawa M, Coffin RS, Otsuki Y, Kuroiwa T, Miyatake S. Bone marrow stromal cells that enhanced fibroblast growth factor-2 secretion by herpes simplex virus

vector improve neurological outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2005;36(12):2725-2730

Ise H, Nikaido T, Negishi N, Sugihara N, Suzuki F, Akaike T, Ikeda U. Effective hepatocyte transplantation using rat hepatocytes with low asialoglycoprotein receptor expression. *Am J Pathol*. 2004;165(2):501-510.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult bone marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-49.

Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4710-4715.

Jin K, Galvan V. Endogenous neural stem cells in the adult brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007;2(3):236-242.

Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci*. 2000;22(1-2):139-153.

Kim YJ, Jung YW. Systemic injection of recombinant human erythropoietin after focal cerebral ischemia enhances oligodendroglial and endothelial progenitor cells in rat brain. *Anat Cell Biol*. 2010;43(2):140-9.

Koç ON, Lazarus HM. Mesenchymal Stem Cells: Heading into The Clinic. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27(3):235-239

Koh SH, Kim KS, Choi MR, Jung KH, Park KS, Chai YG, Roh W, Hwang SJ, Ko HJ,

- Huh YM, Kim HT, Kim SH. Implantation of human umbilical cord-derived stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Res* 2008;1229:233-243
- Komatsu K, Honmou O, Suzuki J, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia. *Brain Res*. 2010;1334:84-92.
- Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*. 2001;128(24):5181-5188.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci*. 1997;17(15):5820-5829.
- Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther*. 2004;9(2):189-197
- Kuruba R, Hattiangady B, Shetty AK. Hippocampal neurogenesis and neural stem cells temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2009;14 Suppl 1:65-73
- Lei Z, Yongda L, Jun M, Yingyu S, Shaoju Z, Xinwen Z, Mingxue Z. Culture and neuronal differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 2007;31(9):916-923
- Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Zhang Z. Intrastratial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(9):1311-1319.

- Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology*. 2001;56(12):1666-1672.
- Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*. 2002;59(4):514-523.
- Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, Gao Q, Shen LH, Zhang J, Lu M, Chopp M. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*. 2005;49(3):407-417.
- Liu YP, Seckin H, İzci Y, Du ZW, Yan YP, Baskaya MK. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(4):780-791
- Marusich MF, Furneaux HM, Henion PD, Weston JA. Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J Neurobiol*. 1994;25(2):143-155.
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents *in vitro* glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997;76(1):105-116.
- Nadareishvili Z, Hallenbeck J. Neuronal regeneration after stroke. *N Engl J Med*. 2003;348(23):2355-2356.
- Onda T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(2):329-340.
- Pınarlı F. Sıçan kemik iliği mezenkimal kök Hücrelerin insan amnion membranı ile kornea yanık tedavisinde kullanımı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Doktora Tezi, 2009;1-32.

- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707-1710.
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*. 2006;24(7):1850-1856.
- Shen LH, Li Y, Chen J, Zhang J, Vanguri P, Borneman J, Chopp M. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience*. 2006;137(2):393-399.
- Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, Lu M, Raginski K, Vanguri P, Smith A, Chopp M. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(1):6-13.
- Siren AL, Ehrenreich H. Erythropoietin- a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001;251:179-184
- Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(7):4044-4049.
- Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*. 2001;21(24):9733-9743.
- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1843-1851.

- Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci.* 2006;24(3):645-653.
- Şahin F. Mezenkimal Kök Hücre Üretiminde Sorunlar ve Çözümleri. II. Ulusal Kök Hücre Kongresi, Trabzon, Özet kitabı, 2006;55–59.
- Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, Moskowitz MA. EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1125-1132.
- Toyama K, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Therapeutic benefits of angiogenic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 2009;216(1):47-55.
- Villa P, van Beek J, Larsen AK, Gerwien J, Christensen S, Cerami A, Brines M, Leist M, Ghezzi P, Torup L. Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(3):552-563.
- Wagner JP, Black IB, DiCicco-Bloom E. Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci.* 1999;19(14):6006-6016.
- Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeTourneau Y, Wang Y, Chopp M. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci.* 2006;26(22):5996-6003.

- Willing AE, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, Hart C, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res.* 2003;73(3):296-307.
- Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells.* 2005;23(3):392-402.
- Yano S, Kuroda S, Shichinohe H, Hida K, Iwasaki Y. Do bone marrow stromal cells proliferate after transplantation into mice cerebral infarct?--a double labeling study. Do bone marrow stromal cells proliferate after transplantation into mice cerebral infarct?--a double labeling study. *Brain Res.* 2005;1065(1-2):60-7.
- Yılmaz M. Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması ve fenotipik özellikleri. Türk Hematoloji Derneği Mezenkimal Kök Hücre Kursu (teorik), İzmir, Kurs kitabı, 2008;11-13.
- Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, Kim HS. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med.* 2008;40(4):387-397.
- Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas SS, Waeber C, Bakowska JC, Breakefield XO, Moskowitz MA. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(10):5874-5879.
- Yuen CM, Leu S, Lee FY, Yen CH, Lin YC, Chua S, Chung SY, Chai HT, Sheu JJ, Ko SF, Sun CK, Yip HK. Erythropoietin markedly attenuates brain infarct size and improves neurological function in the rat. *J Investig Med.* 2010;58(7):893-904.

- Zhang J, Li Y, Chen J, Yang M, Katakowski M, Lu M, Chopp M. Expression of insulin like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. *Brain Res.* 2004;1030(1):19-27.
- Zhang L, Chopp M, Zhang RL, Wang L, Zhang J, Wang Y, Toh Y, Santra M, Lu M, Zhang ZG. Erythropoietin amplifies stroke-induced oligodendrogenesis in the rat. *PLoS One.* 2010;5(6):e11016.
- Zhang RL, LeTourneau Y, Gregg SR, Wang Y, Toh Y, Robin AM, Zhang ZG, Chopp M. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J Neurosci.* 2007;27(12):3157-3162.
- Zhao MZ, Nonoguchi N, Ikeda N, Watanabe T, Furutama D, Miyazawa D, Funakoshi H, Kajimoto Y, Nakamura T, Dezawa M, Shibata MA, Otsuki Y, Coffin RS, LD, Kuroiwa T, Miyatake S. Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(9):1176-1188.

VIII.EKLER

IX.ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı, Ünvanı:	Hamit Özyürek, Doç.Dr.
T.C. Kimlik No:	15514118578
Doğum yeri ve tarihi:	Kalemler 10.04.1969
Yazışma Adresi:	OMÜ Tıp Fak. Çocuk Nöroloji BD Samsun
Telefon No:	3121919-3757
E-mail:	hozyurekibu@hotmail.com

Öğrenim Dönemi	Derece (*)	Üniversite	Öğrenim Alanı
2000-2003		Hacettepe Üniversitesi	Çocuk Nöroloji
1993-1998	Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi	Çocuk sağlığı ve Hastalıkları
1986-1993	Lisans	Hacettepe Üniversitesi	Tıp Fakültesi

Görev Dönemi	Ünvan	Üniversite	Bölüm
1993-1998	Araş. Görevlisi	Hacettepe Üniversitesi	Çocuk Sağlığı ve Hast.
1998-2000	Yrd.Doç.Dr.	Abant İzzet Baysal Üni.	Çocuk Sağlığı ve Hast.
200-2003	Yrd.Doç.Dr.	Hacettepe Üniversitesi	Çocuk Nöroloji
2006-	Yrd.Doç.Dr.	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	Çocuk Nöroloji
2011-	Doç.Dr.	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	Çocuk Nöroloji

YAYIN BİLGİLERİ

ISI indeksine kayıtlı dergilerde yayımlanan	22
Diğer indekslere kayıtlı / Hakemli dergilerde yayımlanan	21
İndekslere kayıtlı / Hakemli konferans kitaplarında yayımlanan	15
Diğer yayınlar	39
TOPLAM	97

YAYINLARINIZA ALDIĞINIZ TOPLAM ATIF SAYISI: 283