

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRAL KÖK HÜCRE ORGANOİD MODELİNİN MİTOKONDRI
HASARI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Onur ÖZCAN

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2021

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRAL KÖK HÜCRE ORGANOİD MODELİNİN MİTOKONDRI
HASARI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Onur ÖZCAN

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Yusufhan YAZIR

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi- Proje No: YTL-2020-2215

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Belge No: KÜ GOKAEK-2020/47

KOCAELİ

2021

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Nöral Kök Hücre Organoid Modelinin Mitokondri Hasarı Açısından Değerlendirilmesi

Tez Yazarı: Onur ÖZCAN

Tez Savunma Tarihi: 24.06.2021

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yusufhan YAZIR

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI tezi olarak kabul edilmiştir.

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /20...

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Nöral Kök Hücre Organoid Modelinin Mitokondri Hasarı Açısından Değerlendirilmesi

Amaç: Sunulan bu tez çalışmasında oksidatif stres uyarılmış nöral kök hücreler kullanılarak elde edilen 3 boyutlu nöral kök hücre organoid modelinde mitokondri hasarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: In vitro kültür ortamında çoğaltılıp 75 µM hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulaması sonucu oksidatif stres ve bunun ile bağlantılı mitokondri hasarı oluşturulan nöral kök hücreler kullanılarak organoid modeli geliştirilmiştir. Oluşturulan organoid modellerini değerlendirmek adına çeşitli belirteçler incelenmiştir. Bu incelemeler histolojik ve immünfloresan boyama teknikleri, spektrofotometrik ölçüm teknikleri ve Real Time PCR tekniği kullanılarak, gen ekspresyonu ve protein seviyesinde yapılmıştır. Elde edilen organoid modellerinde mitokondri hasarının değerlendirilmesi işlemi mitokondri membran potansiyeli ile total mitokondri oranı karşılaştırılarak sağlanmıştır.

Bulgular: Elde edilen veriler 3 boyutlu nöral kök hücre organoid modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu ve hücre organizasyonunun model içerisinde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Model içerisinde hücrelerin oluşturulan oksidatif stresten kaynaklı değişken bir hücresel dağılım profili sergiledikleri gözlenmiştir. H₂O₂'nin konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azaltabileceği gibi belirli konsantrasyon değerlerinde hücresel uyarım sağlayarak çoğalmayı uyardığı tespit edilmiştir. Oksidatif stres uyarılmış organoid modelinde 28. günde hücrelerin MAP2 ve TUBB3 nöral belirteçler kontrole kıyasla daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Aynı zamanda Alzheimer belirteçlerinden olan TAU'nun modellerde pozitif ekspresyonu gözlenmiştir. Organoid modellerinde kültür sürecinde oksidatif stres kaynaklı mitokondri membran potansiyelinde değişim ve bundan kaynaklı mitofaji sürecinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç: Multipotent olarak sınıflandırılan nöral kök hücreler kullanılarak başarılı bir organoid modeli oluşturulmuştur. Elde edilen modelde H₂O₂ 'nin spesifik hücre farklılaşmalarını yönlendirdiği ve hücre davranışlarını etkilediği ortaya koyulmuştur. Oluşturulan model organoid'den beklendiği şekilde matriks düzenlenmesi göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, bu modelin Alzheimer hastalık modeli olduğunu işaret etmektedir.

Bu sebepten dolayı bu model Alzheimer hastalığının incelenmesinde kullanım potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nöral kök hücre, organoid, oksidatif stres, mitokondri hasarı



ABSTRACT

Evaluation of Neural Stem Cell Organoid Model in Terms of Mitochondria Damage

Objective: In this study, it is aimed to investigate mitochondrial damage in a 3D neural stem cell organoid model using oxidative stress-induced neural stem cells.

Method: The organoid model was developed in vitro using neural stem cells, on which oxidative stress was induced and mitochondrial damage was generated following the hydrogen peroxide (H₂O₂) application at 75 µM. Various markers were examined to evaluate the organoid models. These analyses were at gene expression and protein level using histological and immunofluorescent staining techniques, spectrophotometric measurement techniques and Real Time PCR technique. The evaluation of mitochondria damage in the organoid models was performed by their comparing the groups with respect to their mitochondrial membrane potential and their total mitochondria ratio, separately.

Results: Obtained data revealed that the 3D neural stem cell organoid model was successfully established and the cell organization occurred within the model. It was observed that the cells in the model showed a variable cellular distribution profile due to the generated oxidative stress. It has been determined that H₂O₂ can reduce cell viability depending on the concentration, as well as induce proliferation by providing cellular stimulation at certain concentrations. In the oxidative stress-induced organoid model, cells were found to be stronger in MAP2 and TUBB3 neural markers on day 28 compared to control. At the same time, positive expression of TAU, an Alzheimer's marker, was observed in models. In organoid models, oxidative stress-induced alterations in mitochondrial membrane potential during the culture process and an increase in mitophagy process were observed.

Conclusion: A successful organoid model was generated using neural stem cells, classified as multipotent. In this model, it was revealed that H₂O₂ directs specific cell differentiation and affects cell behavior. The generated model presented the expected the matrix rearrangement similar to organoids. The obtained results indicate that this model might be used as an Alzheimer's model. For this reason, this model has the potential to be used for the studies on Alzheimer's disease.

Keywords: Neural stem cell, organoid, oxidative stress, mitochondria damage



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince beni destekleyen, bilgi ve deneyimini paylaşan bölüm başkanım, çok kıymetli danışman hocam **Prof. Dr. Yusufhan YAZIR**'a, beni her zaman destekleyerek hem bilimsel hem de manevi anlamda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam **Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya, eğitim sürem boyunca destek ve yardımlarını benden esirgemeyen saygı değer hocalarım, **Doç. Dr. Meltem Göksel ŞAHİN**, **Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**, **Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR** ve **Dr. Öğr. Üyesi Serap MERT**'e teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda hissettiğim, birlikte öğrenip birlikte keşfettiğim, çalışma arkadaşlarım ve dostlarım; **Deren ASLAN**, **Ayşegül AÇIKSARI**, **Büşra ÖNCEL DUMAN**, **Ahmet ÖZTÜRK**, **Kamil Can KILIÇ**, **Gül Sinemcan KABATAŞ**, **Candan ALTUNTAŞ**, **Floriya YULDAŞEVA** ve **Canan ÖZTÜRK**'e teşekkür ederim.

Ve en büyük teşekkürü beni sevgiyle büyütüp bu günüme getiren, hayat boyu maddi ve manevi desteğini esirgemeyen tüm eğitim hayatımda olduğu gibi, zorlu yüksek lisans eğitimim süresinde de yanımda olan ve aldığım her kararda koşulsuz arkamda duran babam **Ramazan ÖZCAN**, annem **Zerrin ÖZCAN** ve kardeşim **Ozan Tamer ÖZCAN**'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bana kriyomikrotom cihazını kullanma imkanı tanıyan Sayın **Doç Dr. Ayşe KARSON**'a teşekkür ederim.

Ayrıca, YTL-2020-2215 numaralı proje kapsamında tez çalışmam için maddi destek sağlayan Kocaeli Üniversitesi BAP Birimi'ne teşekkür ederim.

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı / Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum **“Nöral Kök Hücre Organoid Modelinin Mitokondri Hasarı Açısından Değerlendirilmesi”** başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

..... / / 20....

Onur ÖZCAN

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Temel Bilgiler	1
1.2. Kök Hücreler.....	2
1.3. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	3
1.3.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücre Sınıflandırması	4
1.3.2. Elde Edildikleri Yere Göre Kök Hücre Sınıflandırması.....	6
1.4. Beyin Histolojisi	12
1.4.1. Arka Beyin (Rombensefalon).....	12
1.4.2. Orta beyin (Mesensefalon)	13
1.4.3. Telensefalon (Beyin Yarımküreleri).....	14
1.5. Nöron Hücreleri	17
1.6. Glia Hücreleri	19
1.7. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri	20
1.8. Reaktif Oksijen Türevlerinin Mitokondri Üzerinden Yaşlılık ve Nörodejeneratif Hastalıklar ile İlişkisi	22
1.8.1. Reaktif Oksijen Türevlerinin Mitokondri Yapı ve Geçirgenliğine Etkisi	22
1.8.2. Reaktif Oksijen Türevlerinin Ca ⁺² Homeostazisine Etkisi.....	23
1.8.3. Mitokondriyal Bozuklukların Alzheimer İle İlişkisi	24
1.8.4. Mitokondriyal Bozuklukların Parkinson Hastalığı İle İlişkisi.....	24
1.8.5. Mitokondriyal Bozuklukların Diğer Nörodejeneratif Bozukluklar İle İlişkisi	25
1.9. Doku Mühendisliği	25
1.9.1. Üç Boyutlu Doku Kültürleri ve Organoid Kavramı	26
2. AMAÇ	31
3. YÖNTEM.....	32

3.1.	Hücreler ve Kültür Koşulları	32
3.1.1.	Nöral Kök Hücre Pasajı	32
3.1.2.	Nöral Kök Hücre Dondurma İşlemi	33
3.1.3.	Nöral Kök Hücre Farklılaşma.....	33
3.2.	Hidrojen Peroksit Aracılı Hücresel Yaşlanma	33
3.2.1.	Oksidatif Stres Oluşumu Adına Uygun Hidrojen Peroksit Dozunun Tespiti	35
3.3.	Oksidatif Stres Uyarılan Nöral Kök Hücreler ile Organoidlerin Oluşturulması ..	39
3.3.1.	Hücrelerin Farklılaştırılması ve Organoid Kültürü	39
3.3.2.	Organoid Karakterizasyon Analizleri	40
4.	BULGULAR	47
4.1.	Fetal sNKH'ler ve Karakterizasyonu	47
4.2.	Oksidatif Stres Oluşumu İçin Uygun Hidrojen Peroksit Dozunun Tespiti.....	48
4.2.1.	WST-1 Analizi ile Hücre Canlılık ve Çoğalmasının Tespiti	48
4.2.2.	Beta Galaktosidaz Boyaması İle Yaşlanmanın Tespiti.....	49
4.2.3.	Beta Galaktosidaz Boyamasının Spektrofotometrik Analizi.....	51
4.2.4.	Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Gen İfadelerinin Analizi	51
4.2.5.	TMRM Boyası İle Mitokondriyal Membran Potansiyelindeki Değişimin Tespit Edilmesi.....	55
4.3.	Oksidatif Stres Oluşturulan NKH'lar ile Organoid Modellerinin Oluşturulması.	55
4.3.1.	Organoid Modellerinin Hematoksilin ve Eozin Boyanması.....	58
4.3.2.	İmmünfloresan Boyama	61
4.3.3.	Organoid Beta Galaktosidaz Boyaması	65
4.3.4.	SOD Analizi İle Organoid Modellerindeki Oksidatif Stresin Tespiti	66
4.3.5.	TMRM Boyası İle Organoid Modellerinde Mitokondri Membran Potansiyelinin Değerlendirilmesi	67
4.3.6.	Mitotracker Red Boyaması İle Hücrede Total Mitokondri Sayısının Tespit Edilmesi	71
4.3.7.	Organoid Modellerinde Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Gen İfadelerinin Analizi.....	75
4.3.8.	BCA Analizi İle Organoid Modellerinin Protein Miktarının Değerlendirilmesi	80
5.	TARTIŞMA	82
5.1.	Sınırlılıklar	90
6.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	91
7.	KAYNAKLAR.....	92

8. ÖZGEÇMİŞ	102
EKLER	103
EK 1. Etik Kurul Onay Formu	103



SİMGELER ve KISALTMALAR

2B: İki Boyutlu

3B: Üç Boyutlu

BCA: Bikinkoninik Asit

BrdU: 5-Bromo-2-Deoksiüridin

cDNA: Komplementer Deoksiribonükleik Asit

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: Dimetil Sülfoksit

ECM: Hücre Dışı Matris

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

EKH: Embriyonik Kök Hücre

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

FITC: Floresan İzotiyosiyonat

GFAP: Glial Fibriller Asidik Protein

HE: Hematoksilen-Eozin

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

IF: İmmünfloresan

MKH: Multipotent Kök Hücre

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

MS: Multiple Skleroz

NKH: Nöral Kök Hücre

RNA: Ribonükleik Asit

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SGZ: Subgranular Bölge

SVZ: Subventriküler Bölge

WST-1: Suda Çözünür Tetrazolium Tuzu 1

TMRM: Tetrametilrodamin Metil Ester

uPKH: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Telomer ve Telomeraz	3
Şekil 1.2. Kök hücrelerin sınıflandırılması	4
Şekil 1.3. uPKH eldesi ve uygulamalarının şematize görüntüsü	9
Şekil 1.4. Nöron yapısı ve kısımları	19
Şekil 1.5. Başlıca glia hücre tipleri	20
Şekil 4.1. Sıçan nöral kök hücre kültürü.	47
Şekil 4.2. Farklılaşma sonrası sNKH immünfloresan boyamaları.	48
Şekil 4.3. sNKH'lara değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H ₂ O ₂ uygulamasının ardından yapılan WST-1 deneyinin grafiği	49
Şekil 4.4. sNKH'lara değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H ₂ O ₂ uygulamasının ardından yapılan WST-1 deneyine dayalı hücre canlılığı grafiği.....	49
Şekil 4.5. sNKH'lara değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H ₂ O ₂ uygulamasının ardından yapılan beta galaktosidaz boyamasının mikroskopik görüntüsü.	50
Şekil 4.6. sNKH'ların 75 µM H ₂ O ₂ ile 30 dk kültürü sonrası yapılan beta galaktosidaz boyamasının spektrofotometrik analizinin grafiği.....	51
Şekil 4.7. sNKH'ların değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H ₂ O ₂ uygulamasının ardından konsantrasyona bağlı olarak GFAP, TH, Tubb3, NF-L ve Nestin belirteçlerinin ifade düzeylerinin incelenmesi.	52
Şekil 4.8. sNKH'ların değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H ₂ O ₂ uygulamasının ardından konsantrasyona bağlı olarak oksidatif stres belirteçlerinden SOD1 ve HO1'in ifade düzeylerinin incelenmesi.	53
Şekil 4.9. sNKH'ların değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H ₂ O ₂ uygulamasının ardından konsantrasyona bağlı olarak BDNF ve CNTF belirteçlerinin ifade düzeylerinin incelenmesi.	54
Şekil 4.10. sNKH'ların değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H ₂ O ₂ uygulamasının ardından konsantrasyona bağlı olarak proliferasyon belirteçlerinden olan Ki67'nin ifade düzeylerinin incelenmesi.	54
Şekil 4.11. sNKH'ların 75 µM H ₂ O ₂ ile 30 dk kültürü sonrası yapılan TMRM Boyamasının flow sitometrik analizinin grafiği	55
Şekil 4.12. sNKH'ların 75 µM H ₂ O ₂ ile 30 dk kültürü sonrası bu hücreler ile oluşturulan organoid modellerinin ışık mikroskobu görüntüleri	57

Şekil 4.13. Kontrol sNKH'lar ile oluşturulan organoid modellerinin ışık mikroskobu görüntüleri	56
Şekil 4.14. Kontrol hücreler ile oksidatif stres uygulanmış sNKH'lar kullanılarak oluşturulan organoid modellerinin 14. gün hematoksilen ve eosin boyaması ışık mikroskobu görüntüleri..	59
Şekil 4.15. Kontrol hücreler ile oksidatif stres uygulanmış sNKH'lar kullanılarak oluşturulan organoid modellerinin 28. gün hematoksilen ve eosin boyaması ışık mikroskobu görüntüleri..	60
Şekil 4.16. Organoid modellerinde GFAP belirteci immünfloresan boyama görüntüsü.	61
Şekil 4.17. Organoid modellerinde MAP2 belirteci immünfloresan boyama görüntüsü.....	62
Şekil 4.18. Organoid modellerinde Tübülün Beta III belirteci immünfloresan boyama görüntüsü.	62
Şekil 4.19. Organoid modellerinde NG2 belirteci immünfloresan boyama görüntüsü.....	63
Şekil 4.20. Organoid modellerinde TH belirteci immünfloresan boyama görüntüsü	63
Şekil 4.21. Organoid modellerinde S100 belirteci immünfloresan boyama görüntüsü	64
Şekil 4.22. Organoid modellerinde Tau belirteci immünfloresan boyama görüntüsü.	64
Şekil 4.23. Kontrol hücreler ile oksidatif stres uygulanmış sNKH'lar kullanılarak oluşturulan organoid modellerinin 4. gün beta galaktosidaz boyaması ışık mikroskobu görüntüleri..	65
Şekil 4.24. Kontrol ve deney grubu organoidlerde kültürün 4. gününde yapılan beta galaktosidaz boyamasının spektrofotometrik analizinin grafiği.....	66
Şekil 4.25. Kontrol ve deney grubu organoid modellerinin 1., 14. ve 28. gün SOD aktivite grafiği	67
Şekil 4.26. 1. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin TMRM boyaması görüntüleri..	68
Şekil 4.27. 14. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin TMRM boyaması görüntüleri..	69
Şekil 4.28. 28. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin TMRM boyaması görüntüleri.	70
Şekil 4.29. 1. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin mitotracker red boyaması görüntüleri.	72
Şekil 4.30. 14. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin mitotracker red boyaması görüntüleri..	73

Şekil 4.31. 28. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin mitotracker red boyaması görüntüleri.....	74
Şekil 4.32. IHH, SHH ve WNT-3A belirteçlerinin 1. 14. ve 28. gün organoid modellerinde ifade düzeylerinin incelenmesi.....	76
Şekil 4.33. Organoid modellerinde NOGGIN ve NOTCH1 belirteçlerinin 1. 14. ve 28. gün ifade düzeylerinin incelenmesi.....	77
Şekil 4.34. SOD1, HO1, MCT-4 ve DUOX1 belirteçlerinin 1. 14. ve 28. gün organoid modellerinde ifade düzeylerinin incelenmesi.....	78
Şekil 4.35. RAGE ve NOD2 belirteçlerinin 1. 14. ve 28. gün organoid modellerinde ifade düzeylerinin incelenmesi.....	79
Şekil 4.36. NOX4 ve P22phox belirteçlerinin 1. 14. ve 28. gün organoid modellerinde ifade düzeylerinin incelenmesi.....	80
Şekil 4.37. 1. 14. ve 28. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinde BCA analizi grafiği	81

TABLÖLAR

Tablo 1.1. Hücre hattı, ksenograftlar ve organoidlerin birbirleri ile kıyaslanması.....	27
Tablo 3.1. Uygun Hidrojen Peroksit dozunun tespiti için yapılan kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan genler.....	38
Tablo 3.2. Primer ve sekonder antikor tablosu	42
Tablo 3.3. Organoid karakterizasyonu adına yapılan kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan genler.....	45



1. GİRİŞ

1.1. Temel Bilgiler

Nörodejeneratif hastalıklar insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Genellikle yaşlanma ile korelasyon gösteren bazı bozukluklar, kısmen yaşlı nüfusun son yıllarda artması nedeniyle de giderek yaygınlaşmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların birçok örneği mevcut iken en sık görülenler Alzheimer, Parkinson ve Multiple Skleroz (MS) 'dir. Bu hastalıklar patofizyolojileri bakımından çeşitlilik gösterirler. Bazı hastalıklar hafıza ve bilişsel bozulmalara neden olurken bazıları da kişinin hareket etme, konuşma ve nefes alma kabiliyetini etkiler.

Nörodejeneratif hastalıkların temelinde, gen düzeyinde meydana gelen mutasyonlara ek olarak yaşlanmanın hücrel kompartmanlar üzerine olan etkisinin de rol aldığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bahsi geçen kompartmanlardan biri hücrede enerji metabolizmasından sorumlu organel olan mitokondridir. Yapılan çalışmalarda mitokondriyal DNA da meydana gelen değişiklikler, anormal mitokondriyal gen ekspresyon paterninin nörodejeneratif hastalıkların temelinde yer aldığını işaret etmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için etkin yaklaşımlara acil ihtiyaç duyulmaktadır, ancak bunun için de her bir hastalığın nedenlerinin ve mekanizmalarının derinlemesine anlaşılması gerekmektedir.

Yaşlanmanın hedef alındığı yaklaşımlar ortaya çıkarmıştır ki hücrel düzeyde yaşlanma üzerine birtakım teoriler olmasına rağmen, mikroskobik başarısızlıkların dokuların, organların ve nihayetinde organizmanın makroskobik başarısızlıklarına nasıl neden olduğu hakkında neredeyse hiçbir şey bilinmemektedir. Mikroskobik mekanizmalar yaşlanmayı sürdürürken, hücreler arasındaki karşılıklı bağımlılığın doku ölümünde büyük bir rol oynadığını unutmamak gerekir. 2 boyutlu hücre kültürlerinin sağladıklarının aksine fizyolojik koşullarda yaşlanan yalnızca hücreler değil dokunun tamamı yaşlanmaktadır.

3 boyutlu hücre kültürleri, günümüzde dikkatleri üzerine çeken bir teknik olup kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Kök hücre ve memeli gelişim biyolojisi alanındaki son gelişmeler de tekniğin kullanımını önemli ölçüde arttırmıştır.

3 boyutlu hücre kültürü tekniğinin temelinde embriyonik kök hücrelerin, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin ve ayrıca ilgilenilen organın progenitör hücreleri ile oluşturulmuş bir veya daha fazla hücre tipini bünyesinde barındıran hücre kaynaklı doku ve organ benzeri yapılar oluşturulması yatmaktadır.

In vitro kültür koşullarında in vivo fizyolojik yapıları taklit eden organ benzeri yapılar yüksek potansiye sahip olan hücrelerin uygun destek matriks yapısı üzerinde spontan olarak gelişmesiyle elde edilebilmektedir. Sınırlı miktarda başlangıç materyaliyle oluşturulabilen organoid kültürler, şu anda kullanılan 2 boyutlu hücre kültür tekniklerinin tahmin etmekte yetersiz kaldığı kritik hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini ortaya koyabilme potansiyeli göstermektedir. Doku mühendisliği ve organoid teknolojileri birçok farklı hastalıkta olduğu gibi nörodejeneratif hastalıklar için de umut vaad etmektedir.

1.2.Kök Hücreler

Kök hücreler, canlılarda döllenme ile başlayarak hayatın sonlanmasına kadarki süreci kapsayan farklı hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahip sınırsız çoğalma özelliği bulunan özelleşmiş hücrelerdir (Sangkum, 2016). Kök hücreleri tanımlamada kullanılan ve onları diğer hücre gruplarından ayıran özellikleri; i) kendini yenileme, ii) farklı hücrelere farklılaşma yeteneği (potansi), iii) klon oluşturma yeteneğidir (klonite) (Smith, 2001; Weissman, Anderson, Gage, 2001).

Kök hücreler vücutta bütün doku ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler sınırsız bölünebilme ve kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Vücutta özelleşmiş hücre gruplarının hedefleri bellidir ve bu hücreler bölündükleri zaman kendileri gibi hücre oluştururlar. Oysa kök hücrelerin bu hücrelerden farklı olarak belirlenmiş bir hedefi yoktur. Bu yüzden aldıkları sinyale göre farklı hücre tiplerini oluşturabilirler. Hücrelerin bölünme kapasitesini belirleyen ve kök hücreleri diğer hücre gruplarından ayıran faktör doğrusal kromozomların uç kısımlarında bulunan ve telomer olarak adlandırılan tekrarlı DNA dizileridir (**Şekil 1.1.**). Kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlayan ve bilerce kez tekrarlanan bu kısa DNA dizileri transkripsiyon açısından faal olmayan (heterokromatin) yapıdadır. İnsanda 15 kb, kemirgenlerde 100 kb'ye kadar uzanan bu tekrarlı dizilerde her bölünmenin ardından 50-150 baz çiftlik kısaltmalar meydana gelmektedir (Batista, 2014; Reddel, 2003).

Bu kaybı tolere etmek için telomerler bünyelerinde tersine transkriptaz telomeraz proteinini (hTERT) ve telomeraz RNA (hTR) taslağını taşıyan bir ribonükleoprotein olan telomeraz enzimini barındırmaktadır. Enzim, her replikasyon sonrası telomerin kılmasını önlemek için sayısız telomerik tekrar dizilerini kromozomun 3' ucuna ekleyerek kromozomun kılma problemini çözer.

Somatik hücrelerin çoğunda telomeraz enzim aktivitesi ya yok denecek kadar az ya da hiç yoktur. Bundan dolayı, her hücre bölünmesi sonucu kromozomların telomerleri kılılır. Pek çok bölünmeden sonra telomerde ciddi aşınmalar meydana gelir ve hücre bölünme kapasitesini yitirir. Öte yandan, insan germ, tümör ve embriyonik kök hücre serilerinde telomeraz etkinliği bulunmuştur ve bu hücre tiplerinin sınırsız bir şekilde kendini yenileyebilme kapasitesinden bu enzimin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Kong, Zheng, Xu, 2014). Kök hücrelerde ise telomeraz enzim aktivitesi yüksek olduğu için uzun zaman bölünerek kendilerini yenileyebilme kapasitesi gösterirler.

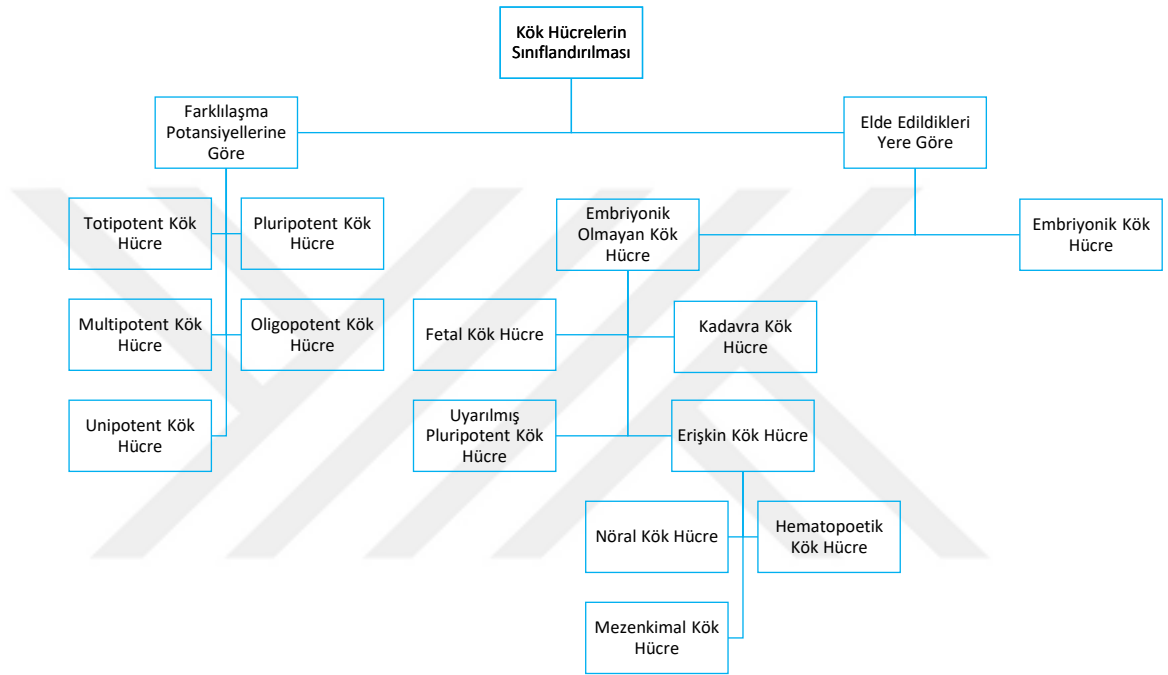


Şekil 1.1.Telomer ve Telomeraz

1.3.Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler vücutta kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesine sahip olan özel hücre gruplarıdır. Bu hücreler gerekli durumlarda somatik hücrelere farklılaşarak canlı fizyolojisinin devamlılığını sağlarken kendini yenileme yeteneği sayesinde de kök hücre potansiyelinin devamlılığını sağlar. Kök hücrelerin sınıflandırmasında temel olarak iki kriter dikkate alınmaktadır. Bu kriterlerden ilki kök hücrelerin sahip oldukları farklılaşma kapasiteleri iken (Batista, 2014), diğeri kök hücrelerin vücutta buldukları

diğer değişle elde edildikleri yere göre sınıflandırmadır (Şekil 1.2.). Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve bi/unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Elde edildikleri yerlere göre ise embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Embriyonik olmayan kök hücreler de fetal kök hücreler, kadavra kök hücreleri ve uyarılmış pluripotent kök hücreler ve erişkin kök hücreler olmak üzere alt sınıflara ayrılmaktadır.



Şekil 1.2. Kök hücrelerin sınıflandırılması

1.3.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücre Sınıflandırması

1.3.1.1. Totipotent Kök Hücreler

Zigot, canlının yapısındaki bütün hücrelere farklılaşma yeteneğinde olan ilk embriyonik kök hücredir ve bu hücreler “totipotent hücre” olarak adlandırılır (Totus-tam, bölünmemiş; potentia-güç anlamındadır). Zigotun bölünmesiyle oluşan blastomerde yer alan tüm hücreler için de totipotent özellik geçerlidir. Ayrıca plasental yapıları oluşturabilmesi (dış hücre kitlesi ile trofoektoderm) ve tüm dokulara farklılaşabilmesi (iç hücre kitlesi ile) gibi özelliklere sahip olan bu kök hücreler, erken embriyonik dönemde canlıyı tekrar oluşturabilme kapasitesine sahiptirler. Bu hücreler fonksiyonel bir canlıyı en baştan oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşabilirler. Bununla birlikte amniyon

kesesi ve plasenta gibi embriyo dışı dokulara da dönüşme potansiyeline sahiptirler. Gelişmenin ileri evrelerinde totipotent kök hücreler, pluripotent kök hücrelere farklılaşabilirler (Morgani ve ark., 2013)

1.3.1.2.Pluripotent Kök Hücre

Kök hücreler, kendini yenileme ve çeşitli hücre soylarına farklılaşma yetenekleri ile benzersiz hücrelerdir. Kök hücreler farklılaşma potansiyeline göre sınıflandırılırken, organizmadaki tüm hücre tiplerini oluşturma potansiyeline sahip olanlar pluripotent kök hücre (PKH) olarak adlandırılır (Hanna, Saha, Jaenisch 2010). Fertilizasyondan sonra, pre-implantasyon döneminin 5. gününde oluşan blastosist fazındaki embriyoda bulunan hücrelerdir. Blastosist; trofoblast hücreleri, blastosöl ve iç hücre kitlesi olma üzere üç yapıdan oluşmaktadır. İç hücre kitlesi ektoderm, endoderm ve mezoderm olarak adlandırılan vücudun 3 germ tabakasını meydana getirir. Trofoblast hücrelerine farklılaşabilen ve 3 germ tabakasına ait hücrelere farklılaşma yetenekleri bulunan iç hücre kitlesi hücreleri pluripotent hücrelere örnektir. Canlıdaki tüm doku ve organları oluşturabilmesi ile totipotent kök hücrelere benzemektedir. Ancak plasental yapıları oluşturamazlar ve buna bağlı olarakta yeni bir canlıyı meydana getiremezler. Ancak bu hücreler gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptirler (Morgani ve ark., 2013).

Kök hücrelerin farklılaşması döngüsel bir çark sistemine benzetilebilir. Bu sistem tek yönde değil çift yönlü işlemektedir. Yani ileriye doğru diferansiye olan başka bir ifade ile farklılaşan bu kök hücreler özel koşullar sağlandığında geriye dediferansiye (farklılaşma) de olabilmektedirler. Buna en iyi örnek, Yamanaka ve arkadaşlarının somatik hücrelere Oct4, Sox2, c-Myc ve Klf4 genlerini aktarmalarıyla somatik hücrelere pluripotent karakter kazandırılması verilebilir (Takahashi ve Yamanaka, 2006)

1.3.1.3.Multipotent Kök Hücreler

Multipotent kök hücreler embriyonik gelişmenin daha ileri evresine ait hücreler olup, erişkin kök hücrelerine dönüşürler ve özelleşmiş hücre tiplerini oluşturabilirler. Multipotent kök hücreler (MKH) insanda embriyo gövdesinde 16. günden ve intrauterin evrede 4. aydan itibaren tüm kan hücreleri ve birçok organa özgü çeşitli hücrelere farklılaşabilen kök hücre grubudur (Friedenstein, Chailakhjan, Lalykina, 1970). MKH

erişkin bireylerin dokularında bulunan tek bir germ yaprağına ait ve birbirine yakın hücre gruplarına farklılaşabilen hücrelerdir. MKH ilk olarak kemik iliğinden izole edilmiş ve Caplan tarafından da karakterize edilmiştir (Friedenstein ve ark., 1970).

1.3.1.4.Oligopotent Kök Hücreler

Oligopotent kök hücreler multipotent hücrelere benzer hücreler olmalarına rağmen, daha sınırlı bölünebilme ve sadece yakın ilişkili olduğu birkaç hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu özellikleri bakımından oligopotent kök hücreler, progenitör (öncü) hücreler olarak adlandırılmaktadır. Lenfoid ve miyeloid kök hücreler oligopotent kök hücrelere örnek olarak verilebilir.

Bunun dışında, iki hücre türüne farklılaşabilen hepatoblast gibi hücrelere bipotent (Chikada, Ito, Yanagida, Nakauchi, Kamiya, 2015), tek bir hücre türüne farklılaşabilen hücrelere ise unipotent kök hücreler denilmektedir.

Kaynağına göre sınıflandırma yapıldığı vakit bu başlık altında kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan izole edilen kök hücreler olarak iki kısma ayrılır. Embriyonik kök hücreler kendi başlarına bir grubu oluştururken, embriyonik olmayan kaynaklardan izole edilen kök hücreler ise fetüsten elde edilen fetal kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler ile kadavra kök hücreleri ve yetişkin kök hücreler olarak alt başlıklara dallanmaktadır.

1.3.2. Elde Edildikleri Yere Göre Kök Hücre Sınıflandırması

1.3.2.1.Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler blastosistlerin iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent karaktere sahip kök hücrelerdir (Thomson ve ark., 1998). Embriyonik kök hücreler ilk olarak 3,5 günlük fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilmişlerdir (Evans ve Kaufman, 1981). Embriyonik kök hücreler sahip oldukları pluripotent karakter sayesinde trilaminar germ diskinde ait hücrelerin tamamını oluşturabilme yeteneğine sahiptirler (Bradley, Evans, Kaufman, Robertson, 1984).

Embriyonik kök hücre (EKH) kavramı ilk olarak embriyodan köken alan pluripotent karaktere sahip hücrelerin, teratokarsinomdan köken alan pluripotent embriyonal karsinom hücrelerinden ayırımı için ortaya konulmuştur (Martin, 1981).

EKH'lerin sahip olması gereken temel özellikler şu şekilde tanımlanmıştır,

- (i) Gömülme öncesindeki veya preimplantasyone evresindeki embriyodan elde edilmeleri,
- (ii) Uzun süreli inkübasyon ortamında farklılaşmadan çoğalabilme özelliklerinin olması,
- (iii) Uzun süre kültürde tutulduktan sonra bile, her üç embriyonik germ tabakasının türevlerini kararlı bir şekilde oluşturabilme yeteneğinin bulunmasıdır (Thomson ve Marshall, 1998).

Embriyonik kök hücreleri tanımlamak için yapılan çalışmalarda bu hücrelerin Oct-4, Nanog, Rex-1 gibi transkripsiyon faktörlerini ve SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 ve TRA-1-81 hücre yüzeyi antijenlerini ifade ettikleri gözlenmiştir. Aynı zamanda bu hücreler yüksek alkalın fosfataz aktivitesi göstermektedirler. (Carpenter ve ark., 2004; Amit ve Itskovitz-Eldor, 2002)

1.3.2.2.Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Gelişimin ileriki evrelerinde görülen bu hücreler, embriyonik kök hücreler ile kıyasla potansileri az olan ve daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyeli gösteren multipotent veya pluripotent kök hücrelerdir. Dört kök hücre sınıfı bu başlık altında sıralanabilir.

1.3.2.2.1. Fetal Kök Hücreler

Fetal kök hücreler, fetüslerin organlarında bulunan birincil hücre türleridir. Fetal kök hücreler, dokuların yanı sıra fetal kan ve kemik iliği, plasenta, kordon kanı, göbek kordonu, amniyotik sıvı gibi koruyucu embriyonik dokulardan elde edilebilmektedir (Marcus, Coyne, Black, Woodbury, 2008; Cananzi, Atala, De Coppi 2009). Fetal kök hücreler etik açıdan embriyonik kök hücrelerden daha az tartışmalıdır ve farklılaşma potansiyelleri yetişkin kök hücrelere kıyasla daha fazladır. Fetal kök hücreler iki tür kök hücreye köken verebilirler: Pluripotent kök hücreler ve hematopoietik kök hücreler. Nöral

krest kök hücreleri, fetal hematopoetik kök hücreler ve pankreas adacık hücreleri de yine fetüslerden izole edilen hücrelerdir (Beattie, Otonkoski, Lopez, Hayek, 1997)

İnsan fetal kök hücreleri, insanlığın en yıkıcı hastalıklarının çoğundan muzdarip olan birçok insan, çocuk ve yetişkin tedavi amaçlı kullanılmıştır (Kakinuma, Nakauchi, Watanabe, 2009). Fetal kök hücreler, hücre transplantasyonu ve ex vivo gen terapisi için terapötik araç olarak büyük umut vaat etmektedir.

1.3.2.2.2. Kadavra Kök Hücreler

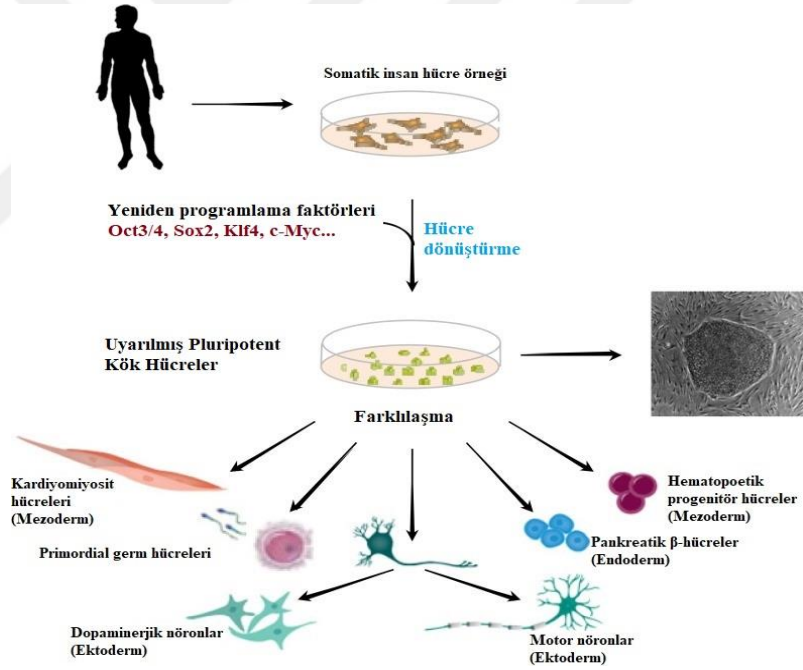
Kadavra kök hücreler, post-mortem donörlerden güvenli ve yüksek miktarda elde edilebilen multipotent karaktere sahip kök hücrelerdir. Kadavra çoklu organ ve/veya doku donörlerinden mezenkimal, hematopoetik ve nöral kök hücreler gibi farklı tiplerde kök hücre edebilmek mümkündür (Palmer ve ark., 2001). Kadavra içindeki somatik hücreler ölüm gerçekleşikten kısa süre sonra ölümler ancak ölüm sonrasında bile kök hücreler hipoksik duruma direnç göstererek canlılıklarını koruyabilirler (Suda, Arai, Shimmura, 2005). Bu şekilde post-mortem dönemde kemik iliğinden (Michalova, Savvulidi, Sefc, Forgacova, Necas, 2011), beyin dokusundan (Schwartz ve ark., 2003) ve karaciğer dokusundan (Erker ve ark., 2010) kök hücre elde edilebilir. Kadavradan elde edilen kök hücreler özgül kök hücre genlerini ifade edebilmektedirler (Valente ve ark., 2014).

1.3.2.2.3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) embriyonik kök hücre benzeri işlevi olan ve vücut somatik hücrelerinin bazı transkripsiyon faktörleri ile yeniden programlanması (re-programming) sonucu elde edilen hücrelerdir (**Şekil 1.3.**). İlk olarak Yamanaka ve ark. tarafından retroviral gen aktarım metodu ile Oct4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, genleri kullanılarak fare dermal fibroblast hücreleri pluripotent kök hücreye dönüştürülmesi ile uPKH elde edilmiştir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Bu faktörlerden Oct4 ve Sox2 pluripotensiye geri dönüş için mutlaka olması gerekmektedir. Bunlarla birlikte aktarılabilecek diğer faktörler ise değişkenlik gösterebilir. Buna ek olarak Klf4 ve c-Myc yerine Lin28 ve Nanog kullanımıyla da pluripotensi uyarılması sağlanmaktadır (Yu ve ark., 2007). İnsan UPK hücreleri ise ilk kez 2007 sonlarında insan fibroblast hücreleri kullanılarak üretilmiştir (Takahashi ve ark., 2007; Yu ve ark., 2007).

Uyarılmış pluripotent kök hücreler pluripotent kritere göre embriyonik kök hücrelere alternatif olarak görünür. Hastalık modellemelerinde yaygın olarak kullanılan bu hücreler bireye özgü üretilebilmeleri sayesinde etik sorunlara çözüm niteliği taşırlar (Somoza ve Rubio, 2012; Somoza ve Rubio, 2012). Uyarılmış pluripotent kök hücreler, kromatin metilasyon modelleri, teratom oluşumu, pluripotensi ve in vitro birçok farklı dokuyu oluşturabilme yeteneği de dahil olmak üzere birçok yönden embriyonik kök hücreler ile benzerlik gösterir.

Her ne kadar bu kök hücreler pluripotent bir güçle çalışmak için yedek anahtar gibi görünseler de bazı sınırlılıklar ve sıkıntılar barındırmaktadırlar. Bunların başında uyarımla ilgili sorunlar gelmektedir. Öyle ki pluripotensiye yeniden programlama yapılırken elde edilen verim %1'den daha düşüktür (Yamanaka, 2009) ve gen aktarımı için genellikle tercih edilen retroviral ajanlar genoma yerleşerek immünojenik özellikte uyarılmış pluripotent kök hücre oluşmasına yol açmaktadır (Zhao, Zhang, Rong, Xu, 2011).



Şekil 1.3. uPKH eldesi ve uygulamalarının şematize görüntüsü (Bayart ve Cohen-Haguenauer, 2013)

1.3.2.2.4. Erişkin Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler, farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Her yaştaki canlıda bulunan bu hücreler kendilerini yenileyebilir ve ihtiyaç halinde farklı hücre türlerine dönüşebilirler. Bu hücreler buldukları dokularda yaşanan, dejenerasyona

uğrayan veya ölen hücrelerin yerine, yenilerini üreten yedek parça sağlayıcısı olarak görev yaparlar (Özen, Gül Sancak, Ceylan, Özgenç, 2016).

İnsan vücudunda kemik iliği, iskelet kası, göz, umbilikal kord, sinir, karaciğer, dental pulpa ve deri gibi birçok dokularda bulunurlar. Organ spesifik kök hücreleri vücutta az miktarlarda oldukları için izolasyonları da ayrı bir sorun teşkil etmektedir ve canlı yapı (*invivo* ortam) dışında embriyonik kök hücreler kadar çoğalma yetenekleri yoktur. Erişkin kök hücreler embriyonik kök hücrelere göre farklılaşma kapasitesi daha azdır ancak, dokuya özgü farklılaşmaları, bu kök hücreleri diğer kök hücrelerden ayıran önemli bir özelliktir (Çerçi ve Erdost, 2019). Çalışmamızda erişkin kök hücre kaynaklarından biri olan nöral kök hücreler kullanılmıştır.

Nöral Kök Hücreler

Yetişkin memeli nöral kök hücrelerinin (NKH) keşfi, yetişkin beyin plastisitesi hakkındaki çağdaş anlayışın gelişimi bir kilometre taşıdır. Yirminci yüzyılın başlarında Koelliker, His, Bizzozero ve Cajal'ın etkili histolojik ve anatomik çalışmaları, yetişkin memeli beyninin doğumdan sonra yapısal olarak sabit kaldığını ve yetişkinlikte hiçbir yeni nöronun üretilmeyeceğini ortaya koymaktaydı. Başlarda nöronal stabilitenin, uzun süreli bellek depolamak gibi beyin fonksiyonları için gerekli olduğu düşüncesi hakimdi. Erişkin beyninin kendini yenileme kabiliyetinin varlığı ilk olarak 1960'larda sıçan beyninin mitotik aktivitesini gösteren Joseph Altman tarafından keşfedilmiştir (Altman, 1962). Bu aşamadan sonra nörogenез kanaryalarda (Goldman ve Nottebohm, 1983), kemirgenlerde (Reynolds ve Weiss, 1992) ve insanlarda da (Eriksson ve ark., 1998; Sanai ve ark., 2004) ispatlanmıştır.

Bu yapılan çalışmalarda izole edilen, kendini yenileme kabiliyeti olan multipotent hücreler nöral kök hücre olarak isimlendirilmiştir (Doetsch ve ark., 1999; Laywell, Rakic, Kukekov, Holland, Steindler, 2000). Nöral kök/öncül hücreler beyin gelişimi esnasında ve yetişkin memeli beyninde kendini yenileme süreçlerinde görev alan hücrelerdir. Aynı zamanda bu hücreler *in vitro*'da nöron, astrosit ve oligodentrositlere farklılaşabilmektedirler (McKay, 1997).

Son yirmi yılda bilimsel ve teknik açıdan ilerlemeler, özellikle hayvanlarda 5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU) kullanan haritalama yöntemi, araştırmacıların yetişkin

beyindeki oluşan yeni hücrelerin gerçekten de nöron olduğunu görmesine olanak sağlamıştır. Bununla birlikte, fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) proteinleri de dahil olmak üzere büyüme faktörlerinin trofik ve mitojenik etkilerinin tanımlanması, in vitro da çeşitli nöral hücrelerin kültürünü mümkün kılmıştır. Nöral kök hücre çalışmalarındaki hızlı ilerlemeler, yetişkin NKH'ların özellikle lateral ventrikül duvarının subventriküler bölgesinde (SVZ) ve hipokampal dentat girusun subgranular zonunda (SGZ) lokalize olduğu fikrinin kabul görmesi ile sonuçlanmıştır (Gage, 2000; Zhao, Deng, Gage, 2008)

Yetişkin beynindeki SVZ'de, sessiz yetişkin NKH popülasyonunun, ependimal tabakanın altına yerleştiğine, ancak apikal yüzeyleri aracılığıyla ventriküle temas ettiğine inanılmaktadır. Bu hücreler LeX, CD133, GFAP ve Nestin için pozitif, farklılaşmış hücre belirteçleri CD24, O4, NeuN ve S100 β için negatif olarak karakterize edilir. Dentat girusun SGZ bölgesinde, GFAP +, S100 β -, Sox2 +, Nestin + radyal hücrelerinin benzer bir alt kümesi olan sessiz NKH'lar bulunmaktadır.

Nöral kök hücrelerin taşınması gereken özellikler şu şekilde belirlenmiştir:

- 1- Multipotent hücreler olmalı ve sinir sistemi hücrelerinden nöron, astrosit ve oligodendrositlerin bütün alt tiplerine farklılaşabilmelidir,
- 2- Sinir sistemi hücre tiplerine farklılaşabilme ve sinir sisteminin hasarlanmış bölgelerinde yeniden çoğalabilme yeteneğinde olmalıdır,
- 3- Kendi kendini yenileyebilir olmalı, aynı potansiyel ve özellikleri taşıyan yeni hücreler üretebilme yeteneğinde olmalıdır.

Nöral Kök Hücre Nişi

Nöral kök hücrelerin kendilerini yenileme ve farklılaşma süreçleri, hücre içi düzenleyiciler; transkripsiyon faktörleri, epigenetik kontroller ve küçük RNA düzenleyicilerine ek olarak bu hücrelerin içerisinde buldukları mikro çevreden (niş) kaynaklı dış uyarıların etkisi altındadır (Shi, Sun, Zhao, Stewart, 2008).

“Niş”, kendini yenileme, farklılaşma ve çoğalma gibi spesifik kök hücre davranışlarını sıkı bir şekilde düzenleyen mikro çevre olarak tanımlanmaktadır (Morrison ve Spradling, 2008). NKH'ler yetişkin beyninde çok sayıda bölgede bulunmasına karşın,

benzersiz kök hücre niş yapılarının, aktif nörojenezi SVZ ve SGZ olmak üzere iki ayrı bölgede sınırladığı görünmektedir. SVZ ve SGZ nişlerinin genel yapıları incelendiğinde, lateral ventrikül duvarının subventriküler bölgesinde üretilen yeni nöronlar, olfaktör bulbus'a göç ederek yeni internöronların oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Bunun dışında hippocampus'un dentat girus'unun subgranular zonunda, yeni granüler hücreler üretir. Her niş yapının bu ayırt edici özellikleri, yetişkin SVZ veya SGZ NKH'larının, buldukları niş ortamı içerisinde dış uyaranlara bağlı olarak modüle edilen bir nöronal aktivite göstermesine neden olmaktadır (Ma, Bonaguidi, Ming, Song, 2009; Kempermann, Jessberger, Steiner, Kronenberg, 2004).

1.4.Beyin Histolojisi

Beyin, düşünme ve hafıza gibi fonksiyonların yanı sıra çevresel uyarıları almak ve bunları değerlendirmek, motor aktivite sağlamak, somatik ve endokrin fonksiyonlar ve organların düzenli çalışmasını kontrol etme gibi görevleri yerine getirmektedir (Arıncı Kaplan, 2014).

Beyin nöral tübün anterior kısmından gelişmiştir. Embriyonun 28. gününe kadar, anterior nöral tüb üç ana segmente bölünür. Bunlar arka beyin (rombensefalon), orta beyin (mesensefalon) ve ön beyin (prosencefalon)'dir. Doğuma kadar beyin ön beyin, kaudal (alt) diensefalon ve rostral (yukarı) telensefalon alt bölümlerine ayrılır ve daha da büyür.

Orta beyin ile arka beyin kısımlarını (medulla ve pons) bünyesinde barındıran karmaşık yapı, beyin sapı olarak adlandırılır. Beyin sapı değişik formlarda olsa da, tüm omurgalı canlılarda görülen bir yapıdır. Yapı, yeme ve içmenin de dahil olduğu vücudun temel fizyolojik ihtiyaçlarından sorumludur.

1.4.1. Arka Beyin (Rombensefalon)

Omurilik soğanı (Medulla veya Medulla oblongata), omurilik ile pons arasında konumlanan arka beynin en alt bölümüdür. Medullada yer alan çekirdekler solunumun ve dolaşımın düzenlenmesinde rol oynarlar. Medulla ayrıca duyu ve denge ile ilgili sinyalleri serebelluma (beyincik) yönlendirerek dengenin kontrolüne yardımcı olmaktadır.

İki serebellar hemisferin bağlanmasında köprü vazifeyi gören yapı adını Latince'de köprü anlamına gelen "Pons" kelimesinden almaktadır. Medulla ile orta beyin arasında

uzanan yapıda, ventral ponsdaki çekirdekler serebral korteksten serebelluma bilgi aktarımında görevliken, dorsal ponsdaki çekirdekler uyku kontrolüne katılmaktadır.

Arka beyin alt bölümlerinden bir diğeri de, ponsun dorsaline yerleşmiş, bir yonca yaprağı şeklinde simetrik iki yönlü bir yapı olan beyincik (serebellum) 'tir. Serebellum, serebral korteksten gelen motor faaliyetler hakkında bilgi alan, bunları denge sistemi bilgileriyle ilişkilendiren ve gerektiğinde düzenlemeler yapan bir motor düzenleyici olarak işlev görür. Serebellumun dil öğrenmede ve kavramada da rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır (De Smet, Paquier, Verhoeven, Marien, 2013).

1.4.2. Orta beyin (Mesensefalon)

Beyin sapının bölümlerinden biri olan orta beyin, tektum ve tegmentum bölümlerini bünyesinde barındırır. Latince çatı anlamına gelen tektum, yapıda dorsal olarak konumlanmıştır ve superior ve inferior kollikulus loblarını içerir. Superior kollikulus, esas olarak göz hareketleri ve görme girişleri ile ilişkilirken bunlara ek bazı ağrı ve dokunma bilgilerini de almaktadır. İnférieur kollikulus ise ses duyusunun iletilmesinde bir sinaps noktası olarak görev yapar. Tegmentum ise çoğunlukla motor kontrolüne katılıp ventral konumlanmıştır.

Beyin sapının birden fazla işlevi vardır. İşitme, denge, tat alma gibi özelleşmiş birkaç duyardan gelen sinyallerin giriş yeridir. Burada yer alan özelleşmiş nöronlar, kan basıncında azalış, bağırsak kasılmalarına artış ve göz bebeğinde kısılma gibi parasempatik kasılma ve gevşemelere aracılık eder. Beyin sapı, merkezi sinir sisteminin diğer kısımlarına duysal ve motor sinyal taşıyan yollardaki artış ve azalışa etki eder.

Diensefalon, ön beyin olarak da bilinen prosensefalonun bir parçasıdır. Birincil serebral vezikülden gelişir. Daha sonra farklılaşarak rostral telensefalon ve kaudal diensefalonu oluşturur. Diensefalon bünyesinde başlıca talamus ve hipotalamus olmak üzere iki çekirdek grubu içerir. Talamus, birincil duyu korteksine yansıtılan duysal bilginin iletiildiği son noktadır. Bilgileri filtreler, bir amplifikatör görevi görür ve istenen duysal bilgileri iletir. Talamus ayrıca bazal çekirdekleri ve serebral korteks faaliyetlerini düzenleyerek bu alanlar arasında bilgi aktarımında rol oynar. Yumurta şeklinde çekirdeklere sahip olan Talamus yaklaşık 4 cm uzunluğundadır ve diensefalonun % 80'lik kısmını oluşturur.

Talamus vücuttan gelen uyarıları sıralar ve filtre eder. Benzer işlevlerle ilgili girdileri, gruplar halinde serebral kortekse iletilir. Talamus birçok çekirdekten oluşur. Dar miyelinli sinir teli bantları ile ayrılan çekirdek gruplarından her biri duyuların ayarlanması için özelleşmiştir. Anterior çekirdekler aracılığı ile hipotalamustan duyu ve organ işlevlerinin düzenlenmesine yardımcı olan girdiler işlenir. Ayrıca, hafıza veya duysal entegrasyon için girdiler pulvinar, lateral dorsal ve lateral posterior çekirdekler yoluyla hedef bölgeye gönderilir. Talamus, hareket ve kavrama ile ilişkili beyin kabuğu kısımlarıyla beyincik ve bazal ganglionu birbirlerine bağlar.

Hipotalamus talamusun altında beyin sapını kapatacak şekilde konumlanır ve beynin yalnızca %0,3'lük kısmını oluşturur. Hipotalamus ta talamus gibi yapısında işlevsel olarak önemli birçok çekirdek barındırır. Küçük olmasına rağmen, hipotalamus birincil viseral kontrol merkezidir ve vücudun homeostazı için son derece önemlidir ve neredeyse tüm vücut dokularına etki eder. Örneğin somatik büyümede, yemede, içmede ve hipofiz bezinden salınan hormonlar tarafından düzenlenen anne davranışlarında önemli bir role sahiptir. Son olarak, hipotalamusta bir grup nöron suprakiazmatik nükleus, sirkadiyen ritim, gece/gündüz gibi döngüsel davranışları düzenler (Kandel Eric, Greendard Paul, 2000).

1.4.3. Telensefalon (Beyin Yarımküreleri)

İnsan beyininin en büyük bölümüdür ve serebral hemisferleri bilateral olarak yapısında barındırır. Telensefalon bazal ganglia, amigdala, hipokampus ve oldukça özelleşmiş yapı olan serebral korteksten meydana gelmiştir. Serebral hemisferler, hafıza ve duyu dahil olmak üzere algısal, motor ve bilişsel işlevlere sahiptirler. İki yarım küredeki benzer bölgeler Korpus Kallozum adı verilen büyük akson demetleri ile birbirine bağlanır.

Lateral ventrikülün alt kıvrımından temporal lobun medial kısmına doğru denizatına benzer kavisli bir şekilde konumlanan yapı hipokampus olarak isimlendirilir. Uzun süreli hafıza oluşumu başta olmak üzere yön bulma, öğrenme, stres tepkisi için önemli bir beyin yapısıdır (Dryden, 2012). İnsanda yaklaşık 5-8 cm büyüklüğünde olan hipokampus, ratlarda hemen hemen bir üzüm tanesinin çekirdeği boyutlarındayken, farelerde bundan çok daha küçüktür. İnsanda hipokampusun embriyonel dönemde gelişimi bölgede bulunan öncü nöronların (nöronal progenitör hücreler) çoğalması ve göç etmesi ile başlar. Embriyonik dönemin 13-14. haftasında gelişmeye başlayan hipokampus

embriyonik dönemin 18-20. haftalarda erişkin hipokampuse benzemeye başlar (Susan Standring, 2015). Farede hipokampus embriyonik dönemin 17,5 gününde öncü nöronların göç etmesi ile başlar ve 19,5 günde erişkin hipokampuse benzer.

Limbik sistem elemanlarından olup temporal lobta bulunan amigdala, burada hipokampusla bağlantı halindedir. Badem şeklindeki yapı panik, endişe ve cinsel güdülerle ilgili davranışları kontrol eder ve anılara duygusal önem katarak hafızada rol oynar (Amunts ve ark., 2005).

Ön beyin içerisinde daha merkezi konumlanmış olarak bazal ganglia bulunmaktadır. Bazal ganglia; striatum, globus pallidus, substantia nigra ve subtalamik çekirdek olmak üzere dört temel çekirdek grubu içerir. Bazal ganglianın barındırdığı çekirdekler, genel olarak (1) giriş çekirdekleri, (2) çıkış çekirdekleri ve (3) iç çekirdekler olarak kategorize edilebilir. Giriş çekirdekleri, başta kortikal ve talamik olmak üzere farklı kaynaklardan gelen bilgileri alır. Çıkış çekirdekleri, bazal gangliadan sinyalleri talamusa ileten yapılardır. Son olarak, globus pallidus ve substantia nigra gibi içsel çekirdekler, sinyalin taşınımında giriş ve çıkış çekirdekleri arasında konumlanır (Lanciego, Luquin, Obeso, 2012).

Giriş çekirdeklerinde salgılanan dopamin bazal ganglia işleyişi için oldukça önemlidir. Bu süreçte meydana gelebilecek aksamalar, Parkinson ve Distoni gibi bozukluklar ile ilişkilendirilmiştir (Albin, Young, Penney, 1989)

Omurilik, beyin sapı ve diensefalon hayati birçok sürece yön verirken, günlük yaşamdaki eylemlerin planlanması ve uygulanmasının çoğundan sorumlu olan yapı, serebral hemisferlerin üzerinde ince bir dış tabaka olarak yer alan serebral kortekstir. Serebral korteks katlanmış yapıda olup, genel olarak altında konumlandığı kafatasının kemik plakları ile adlandırılan dört loba (frontal, parietal, temporal ve oksipital) bölünmüş haldedir. Her lob, birçok farklı işlevsel alt bölge içerir. Örneğin temporal lob, işitsel, görsel ve hafıza işlevlerine sahip farklı bölgelere sahiptir. Serebrokortikal yüzeyin yapmış olduğu giruslar (çıkıntı) ve sulkuslar (girinti, oluk) yapının yüzey alanının birkaç kat artmasını sağlar.

Serebral hemisferlerin ön kısmında bulunan frontal lob, en büyük lob olup vücut için önemli işlevleri vardır. Örnek olarak hafıza, planlama, konuşma, kişilik verilebilir

(Neulinger, Oram, Tinson, O'Gorman, Shum, 2016). Ayrıca frontal lobta yer alan motor korteks hareket kontrolünde görev alır (Collins ve Koechlin, 2012).

Frontal lobun arkasında ve temporal lobun üstünde lokalize parietal lob, iki fonksiyonel bölge içerir. Anterior parietal lob, birincil duyu korteksini içerir ve korteks talamustan gelen dokunma, konum, titreşim, basınç, ağrı, sıcaklık gibi duysal girdilerin alınıp yorumlanmasından sorumludur (Berlucchi ve Vallar, 2018). Posterior parietal lob da kendi içinde iki bölgeye ayrılır: Superior parietal lobül ve inferior parietal lobül. Superior parietal lobül, motor planlama eylemi gibi yüksek dereceli işlevlerde yer alan somatosensoryel ilişki korteksini içerir. Inferior parietal lobül ise duyu-motor planlama, öğrenme, dil gibi karmaşık işlevlerde görev alır (Klingner ve Witte, 2018).

1.4.3.1.Temporal lob

Serebral kortekste yer alan en önemli ikinci kısım olan temporal lob, frontal lobun arkasında ve parietal lobun altında yer alır. Temporal lob, lateral ve medial olmak üzere iki yüzeye sahiptir (Kiernan, 2012). Lateral yüzey de üst, orta ve alt temporal girus olarak alt sınıflara ayrılır.

- Üst temporal girus tüm ses ve tonların çevirilmesi ve işlenmesinden sorumlu birincil işitsel korteks ile yorumlanmasında görevli ikincil korteksi kapsar.
- Orta temporal girus ses tanıma, kelime ve sesleri anlamlandırma, konuşma süreçlerinde görev alır.
- Alt temporal girus, birincil görsel korteksten temporal loba bilgiyi taşıyan yol olan ventral görsel yol ile görsel algılama ve yüz tanımadan sorumludur (Conway, 2018).

Temporal lobun medial yüzeyi, bildirimsel bellek için zorunlu olan hipokampus gibi önemli yapıları içerir. Bildirimsel bellek, yaşamınız boyunca gerçekleşen veya öğrenilen olayları, kavramları ve düşünceleri hatırlamayı sağlayan bir tür uzun süreli bellek çeşididir.

1.4.3.2.Oksipital lob

Oksipital lob, beyin korteksindeki en küçük lobdur ve beynin en arka bölgesinde, parietal lobun ve temporal lobun arkasında yer alır. Görsel girdilerin işleme ve

yorumlanması süreçlerinin gerçekleştiği oksipital lobda, talamustan görsel bilgi alınır, işlenir, yorumlanır, daha sonra bu işlenmiş bilgi daha fazla analiz edilmek üzere beyin diğer bölgelerine gönderilir. Sonuç olarak elde edilen görsel bilgiler, nesnelere belirlenmesine, tanınmasına ve birbirleriyle kıyaslanmasına yardımcı olur (Huff, Mahabadi, Tadi, 2021).

Yüksek derecede fonksiyonel ve karmaşıklık yapısına karşın, beyin ağırlıklı olarak sadece iki hücre tipinden, nöronlardan ve glia'dan, meydana gelmektedir.

1.5.Nöron Hücreleri

Nöronlar, kimyasal ve elektriksel yollarla iletişim kuran sinir sisteminin algılayan, ileten ve etkileyen hücreleridir (**Şekil 1.4.**). Morfolojilerinin, bağlantılarının ve işlevlerinin spektrumu oldukça geniştir. Tipik bir nöron, morfolojik olarak tanımlanmış dört bölgeden meydana gelir: (1) hücre gövdesi, (2) dendritler, (3) akson ve (4) presinaptik terminaller. Her bölgenin sinyal üretmede ayrı bir rolü vardır ve diğer sinir hücreleri ile iletişim kurarlar. Soma olarak da adlandırılan hücre gövdesi nöronun metabolik merkezidir. Hücrenin genlerini taşıyan çekirdeği, endoplazmik retikulumu ve hücrenin proteinlerini sentezleyen çekirdek uzantısını kapsar. Hücre gövdesi birkaç kısa dendrit ve uzun tek bir akson olmak üzere iki farklı uzantı taşımaktadır. Dendritler, ağaç benzeri dallanma gösterir ve diğer sinirlerden gelen sinyalleri alır. Aksonlar ise hücre gövdesinden biraz uzağa uzanır ve sinyali diğer sinirlere taşır. Akson yapıları olağandışı uzunluklarda olabilir. Omuriliğin aşağı kısmında yer alan motor nöronlar bir metreden daha uzun aksonlara sahip olabilmektedir. Nöronlar birbirleriyle ve vücut boyunca kan damarları, kas (düz ve iskelet) ve bezlerdeki hücreler ile iletişim kurmaktadır. Bilginin varış noktasına kaybolmadan ve bozulmadan taşınması elzemdir. Bilginin taşınımında bahsedilen mesafeler hücresel boyuta göre oldukça büyüktür. Nöronlar kendi efektör hücrelerine mesaj göndermede elektriksel iletişimi kullanmaktadır. Aksiyon potansiyeli olarak adlandırılan bu elektrik sinyalleri, başlangıç segmenti olarak adlandırılan aksonun başlangıcına yakın özel tetikleme bölgesinde başlar. Aksiyon potansiyelinin hızını arttırmak için aksonlar miyelin kılıf adı verilen bir yağ maddesi ile yalıtım sağlanacak şekilde sarılır.

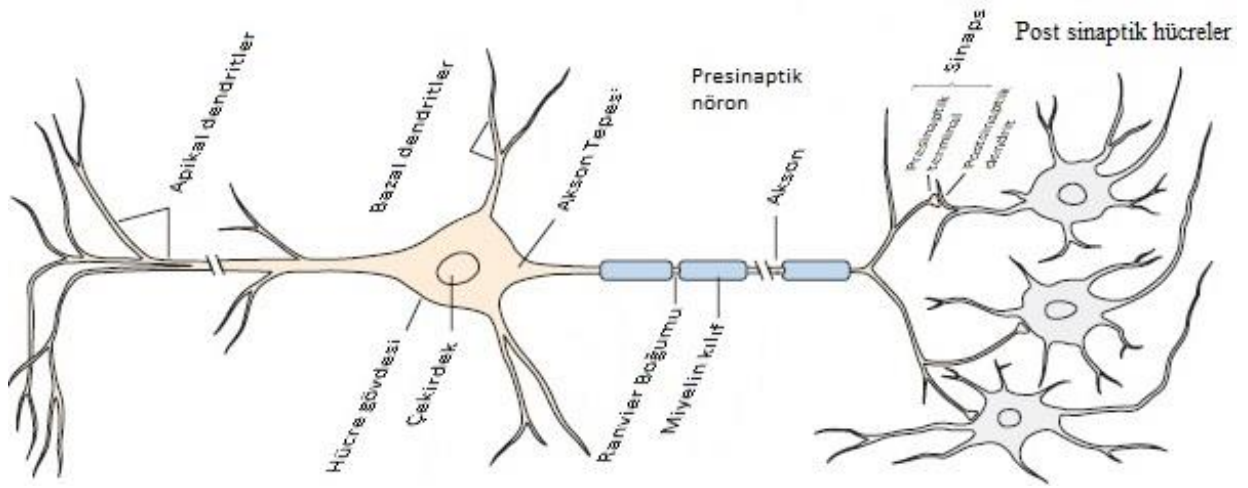
Akson yapıları diğer nöronlar ile sinaps denilen özel iletişim bölgelerinde iletişim kurmak için ince dallara bölünür (**Şekil 1.4.**). Bir sinyalin iletimi sürecinde sinyali

gönderen sinir hücresi presinaptik hücre olarak adlandırılırken sinyali alan hücre ise post sinaptik hücre olarak isimlendirilir.

Presinaptik hücreler sinyal iletimini, aksonun dalları üzerinde olup presinaptik uç ya da sinir ucu denilen ve özel olarak genişleyen bölgeler üzerinden gerçekleştirir. Presinaptik uçların çoğu postsinaptik nöronların dentriti ile sonlanır, fakat uçlar hücre gövdesi ya da daha az sıklıkla postsinaptik nöronların aksonunun başlangıç ya da bitişi ile de sonlanabilir.

Nöronlar unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere üç büyük grupta sınıflandırılmaktadır. Unipolar nöronlar, tek bir birincil işlemde geçerek çok sayıda dallanma oluşturan en basit nöronlardır. Bir dalı akson olarak hizmet ederken diğer dalı alıcı yapılar olarak işlev görür. Bu tip hücreler omurgalıların otonom sinir sisteminde fazla sayıda bulunmaktadır. Bipolar nöronlar çevreden sinyali alan bir dentritik yapı ve merkezi sinir sistemine bilgiyi taşıyan bir akson olmak üzere iki farklı yapıdan oluşan oval şekilli hücrelerdir. Duyu nöronlarının çoğu bipolardır. Dokunma, basınç ağrısı omuriliğe ileten resöptör nöronlar psödo-unipolar olarak adlandırılan bipolar nöronların bir varyantıdır. Multipolar nöronlara omurgalıların sinir sisteminde sıkça rastlanmaktadır. Tipik bir akson ve hücre gövdesinin etrafının çeşitli noktalarından çıkan çok sayıda dentritik yapıya sahip olan multipolar nöronların şekilleri çok farklıdır. Sergilemiş oldukları dallanma motifi genellikle diğer nöronlar ile yaptıkları sinaptik temaslar ile korelasyon göstermektedir. Beyincikte bir Purkinje hücresinin oluşturduğu dentritik motif, bir milyon iletiyi alacak kadar büyük ve gürdür.

Sinir hücreleri fonksiyonel olarak duyu nöronları, motor nöronlar ve ara nöronlar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Duyu nöronları vücudun çevresel algılayıcılarından bilgiyi alır ve sinir sistemine taşır. Bazı birincil duyu nöronları afferent nöronlar olarak da adlandırılır. Afferent terimi, bilgi algılanırsa da algılanmasa da bilginin çevreden sinir sistemine alınmasını sağlar. Motor nöronlar komutları beyin ya da omurilikten kaslara ya da bezlere taşıyarak buralardaki hücrelerin aktivitelerini ve bezlerin salgı kapasitelerini etkiler. Ara nöronlar çok sayıdadır, tasarım ve yerel olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Tasarım ara nöronlar beyinin bir bölgesinden diğer bölgesine sinyali iletmek için uzun aksonlara sahipken yerel ara nöronlar birbirine yakın nöronlar arası iletişimi sağlamak için kısa aksonlara sahiptirler.



Şekil 1.4. Nöron yapısı ve kısımları (Kandel, Eric R., 2013, s.22).

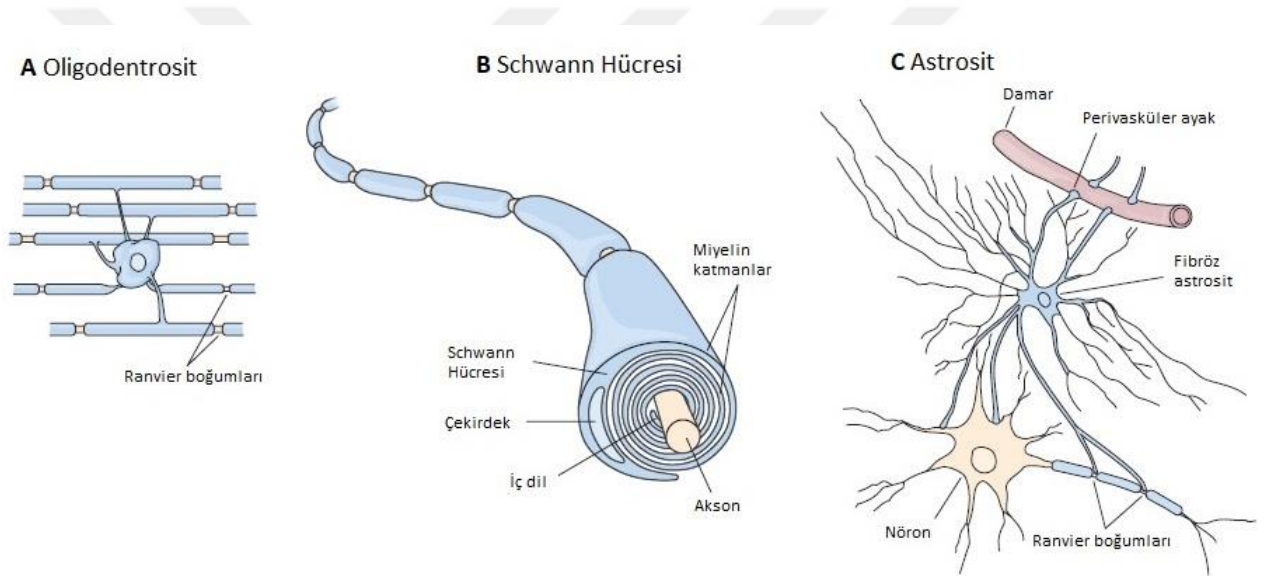
1.6.Glia Hücreleri

Omurgalıların merkezi sinir sisteminde yer alan glia hücreleri, nöronlardan 2-10 kat daha çok sayıdadır. Bu hücrelerin adı Yunanca tutkal kelimesinden köken almaktadır. Glial hücreler morfolojik olarak nöronlardan farklıdır, dentrit ve akson gibi hücresel uzantılardan yoksundurlar. Glialar nöronlar ile aynı ortak atayı paylaşmasına rağmen işlevsel olarak da farklılıklar gösterir. Nöronlar ile aynı zar özelliklerine sahip olamayan bu hücreler elektriksel olarak uyarım göstermezler. Omurgalı sinir sisteminde glialar mikroglia ve makroglia olarak iki ana sınıfa ayrılabilir: Mikroglia hücreleri, yaralanma, enfeksiyon ya da dejeneratif hastalıklar söz konusu olduğunda fagosit olan ve antijen sunan immun sistem hücreleridir. Makroglia hücrelerinin üç ana türü vardır: Oligodendrositler, Schwann hücreleri ve astrositler (Şekil 1.5.). İnsan beyninin tüm hücrelerinin %80'i makroglia'dır; bunların da yaklaşık olarak yarısını oligodendrositler oluştururken yarısını da astrositler oluşturur.

Merkezi sinir sisteminde görevli oligodendrositler ile çevresel sinir sistemindeki Schwann hücreleri, nöronların uzun akson uzantılarının etrafını kendi özel hücre zarları ile çevreleyerek yapının dış ortamdan izolesini sağlayan hücrelerdir. Miyelinizasyon olarak adlandırılan bu süreç nöron boyunca taşınan sinyallerin iletim hızını artırır.

Astrositler, beynin tüm alanlarında bulunan yıldız şekilli glial hücrelerdir. Beyindeki hücrelerinin neredeyse yarısını oluşturan astrositler, 1 µm'den daha yakın olan sinapslarla kurmuş oldukları fiziksel birlikteliklerle, nöronların beslenmesinde ve hücre dışı boşluktaki iyonların ve nörotransmitterlerin konsantrasyonlarının düzenlenmesinde

önemli rol oynarlar. Astrositler plazma membranında sahip oldukları yüksek afiniteli taşıyıcılar ile örneğin nörotransmitter olan glutamati, sinaptik yarıktan hızla uzaklaştırır. Bu alım mekanizmalarına müdahale, eksitotoksisite adı verilen bir süreç olan nöronların ölümüne yol açabilen yüksek hücre dışı glutamat konsantrasyonlarına neden olur. Astrositler ayrıca dopamin, norepinefrin, epinefrin ve serotonin de indirgerler. Astrositler ayrıca sinapsların gelişmesi için de önemlidir. Sinaps oluşumu için nöronun yüzeyini hazırlarlar ve yeni oluşan sinapsları stabilize ederler. Salgıladıkları nörotrofik ve gliotrafik faktörler ile astrositler, nöron ve oligodentrositlerin gelişimini ve hayatta kalmasını destekler. Bu glial hücreler yapılarında bulunan glutasyon peroksidaz gibi enzimler vasıtasıyla hipoksi, enflamasyon ve nöronal dejenerasyon durumlarında salınan toksik serbest oksijen radikallerini detoksifiye ederler.



Şekil 1.5. Başlıca glia hücre tipleri (Kandel, Eric R., 2013, s.27)

1.7.Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

Dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi gösteren atom veya moleküllere serbest radikal adı verilir (Savrun ve Uzun, 2001; Akyol, 2004). Moleküler oksijen insan vücudunda bütün hücrelere girerek dokularda fazlaca tüketilme özelliğine sahiptir. Oksijen molekülü yapısı gereği de radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denilince akla serbest oksijen radikalleri, ya da reaktif oksijen türevleri (ROS) gelmektedir (Akyol, 2004). Serbest oksijen radikalleri hidroksil (OH), süperoksit (O_2^-), nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir.

Başta mitokondriyal elektron taşınımı olmak üzere çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonları gibi oksijen gerektiren durumlarda ROS yapıları oluşmaktadır (Burçak, Andican, 2004). Ayrıca kişilerin maruz kaldığı; stres, radyasyon, bağışıklığı artırıcı bazı maddeler, pestisitler, anestetik maddeler, sigara dumanı ve aromatik hidrokarbonlar gibi bazı eksojen ajanlar da vücutta ROS oluşumuna neden olmaktadır (Akyol, 2004).

Serbest radikallerin artması veya antioksidan enzimlerin azalmasıyla, serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucu oksidatif stres ve beraberinde oksidatif hasar oluşur. Oksijen, süperoksit radikaline bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece toksik olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit radikali, süperoksit dismutaz (SOD) vasıtasıyla hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülür. Süperoksit grubuna kıyasla daha zayıf etki gösteren hidrojen peroksit, dokularda bulunan katalaz (CAT), peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GSH- Px) gibi antioksidan enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (Halliwell, 1984; Matés, 2000). Memeli organizmalarında NO'nun varlığı ilk 1916 yılında gösterilmiştir. Aktifleşmiş makrofajların NO salgıladığı 1985 yılında keşfedilmiştir. Nitrik oksit sentetaz (NOS) enziminin katalize ettiği ve ko-substrat olarak NADPH ve oksijenin kullanıldığı reaksiyon ile oluşan NO, fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda vazoregülasyon ve hücrel toksiteyi gösteren bir biyoregülatör molekül olarak görev yapmaktadır. Aynı zamanda damar basıncının ayarlanmasından ve kan hücreleriyle endotel arasındaki etkileşimin düzenlenmesinden sorumludur (Kuyumcu, A., Duzgun, A.P., Ozmen, M.M., Besler, H.T., 2004). NO'nun insan vücudunda koruyucu ve düzenleme etkilerinin yanı sıra zararlı etkileri de bulunmaktadır. Bunlar enzim fonksiyonlarını bozmak, DNA hasarı oluşturmak, lipid peroksidasyonu ve antioksidan tüketimi olarak sayılabilmektedir (Grisham ve ark., 1999).

Yapılan çalışmalarda oksidatif stresin apoptozis başta olmak üzere birçok biyoloji sürece etki ettiği ve hastalıkların temelinde yer alan en önemli faktörlerden biri olduğu gözlenmiştir.

1.8.Reaktif Oksijen Türevlerinin Mitokondri Üzerinden Yaşlılık ve Nörodejeneratif Hastalıklar ile İlişkisi

Nörodejeneratif hastalıklar insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Genellikle yaşlanma ile korelasyon gösteren bazı bozukluklar, kısmen yaşlı nüfusun son yıllarda artması nedeniyle de giderek yaygınlaşmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların birçok örneği mevcut iken en sık duyulanlar ise Alzheimer ve Parkinson ve MS 'dir. Bu hastalıklar patofizyolojileri bakımından çeşitlilik gösterirler. Bazı hastalıklar hafıza ve bilişsel bozulmalara neden olurken bazıları da kişinin hareket etme, konuşma ve nefes alma kabiliyetini etkiler. Nörodejeneratif hastalıkların temelinde, gen düzeyinde meydana gelen mutasyonlara ek olarak yaşlanmanın hücrel kompartmanlar üzerine olan etkisinin de rol aldığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Gitler ve ark., 2017; Reddy, 2011). Bahsi geçen bu kompartmanlardan biri hücrede enerji metabolizmasından sorumlu organel olan mitokondridir.

Mitokondri, hücrede çekirdeğin dışında, kendi DNA'sını (mitokondriyal DNA) ve RNA ve proteinleri sentezlemek için gerekli yapıları içeren tek organeldir (Douarre C. 2012). Mitokondriyal DNA, toplam hücrel DNA'nın yaklaşık %1'ini oluşturur ve oksidatif stresle ilişkili ROS saldırısına özellikle duyarlı olduğu düşünülmektedir. Mitokondriyal DNA da meydana gelen hasarlar, sonuçta mitokondriyal genomda mutasyonlara yol açar ve hastalıkları indükleyen ve şiddetlendiren mitokondriyal bozukluklar meydana gelir (Hollensworth, Shen, Sim, Spitz, Wilson, LeDoux., 2000).

1.8.1. Reaktif Oksijen Türevlerinin Mitokondri Yapı ve Geçirgenliğine Etkisi

Mitokondri, ökaryotik hücrelerde bulunan çift zarlı bir organeldir. İç zar ve dış zar, zarlar arası boşlukla birbirinden ayrılmıştır. Dış zar, yüzeyinde yer alan porin proteinleri nedeniyle iç zardan daha geçirgendir (Vajrala, Claycomb, Sanabria, Miller Jr, 2008). İç zar, adenosin trifosfat üretimine katılan oksidatif fosforilasyon ve elektron taşıma sisteminin gerçekleştiği yerdir. Normal fizyolojik koşullar altında, iç zar sadece yüksüz küçük moleküller için geçirgendir. İç zarın sahip olduğu seçici geçirgenlik eksojen antioksidanların mitokondriye ulaşmasını zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte, ROS yapıları iç mitokondriyal membranda, lipid peroksidasyonuna eğilimi arttırır (Kirkinezos ve ark., 2005).

Mitokondriyal fosfolipidlerin peroksidasyonu, iç mitokondriyal zarın proton geçirgenliğini artırabilir, mitokondriyal zarların akışkanlığını ve diğer biyofiziksel özelliklerini değiştirebilir ve iç-dış zarlardaki çeşitli taşıyıcıların ve solunum enzimlerinin biyokimyasal işlevlerini bozabilir (Stewart ve Heales, 2003).

Ek olarak, solunum enzimlerinin demir-sülfür merkezleri (örneğin, süksinat dehidrojenaz ve nikotinamid adenin dinükleotid dehidrojenaz) oksidatif modifikasyona eğilimlidir ve mitokondrinin elektron taşıma fonksiyonu oksidatif stres altında ortamda bulunan ROS'lar tarafından bozulabilir (Wei, Lu, Wei, Ma, Lee, 2001). Reaktif oksijen türevleri, mitokondri membran üzerindeki kanal yapılarında yer alan adenin nükleotid translokator yapısı üzerindeki tiyol gruplarının oksidasyonuna neden olarak, mitokondriyal geçirgenliğe etki etmektedir (Valko ve ark, 2007).

1.8.2. Reaktif Oksijen Türevlerinin Ca^{+2} Homeostazisine Etkisi

Ca^{+2} , kas kasılması, nörotransmitter salımı, hücre proliferasyonu, gen ekspresyonu ve hücre ölümü gibi pek çok sürecin düzenlenmesinde görevli hücre içi sinyal sisteminin önemli bir bileşenidir (Fu ve Yang, 2006). Plazma zarındaki voltaj bağlı ve ligand-geçitli kanallardan Ca^{+2} 'nin akışı, presinaptik terminallerden nörotransmitterlerin salınması ve postsinaptik nöron yanıtının oluşumu için kritik bir sinyaldir (Chang, Huang, Wang, 2012). Ca^{+2} 'un hücrede taşınımı plazma membranındaki Na^{+}/Ca^{+2} kanalları, plazma membranı ve endoplazmik retikulum Ca^{+2} -adenosin trifosfat sentazlar, kalbindin ve parvalbumin gibi Ca^{+2} bağlayıcı proteinler tarafından sağlanır (Andreazza, Wang, Young, 2010). Ca^{+2} iyonları aynı zamanda mitokondrilere taşıp buradan salınabilir ve bu süreç nöronal Ca^{+2} homeostazının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Aslında mitokondriyal Ca^{+2} salınımını azaltan genetik ve farmakolojik manipülasyonlar aşırı miktarlarda salınan nörotransmitterlerin nöronlar üzerinde oluşturabileceği hasara (eksitotoksisteye) karşı koruma sağlamaktadır (Mattson, 2007).

Bununla birlikte, aşırı ROS üretimi, proteinlere ve nükleik asitlere doğrudan zarar verebilir, oksidatif strese neden olabilir ve özellikle proteinlerdeki spesifik tiol gruplarının oksidasyonunu etkileyen mitokondriyal Ca^{+2} homeostazını değiştirebilir. Hücrede Ca^{+2} miktarının artışı, mitokondriyal potansiyelde değişikliğe neden olur ve bu süperoksit iyon radikallerinin üretimi ile sonuçlanır.

Ca^{+2} 'nin mitokondride aşırı birikimi membranlar arası seçici geçirgenliği sekteye uğratar, ozmotik basınç artış gösterir ve bu da dış mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulmasına sebep olur (Joshi, Sultana, Perluigi, Butterfield, 2005). Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki sürekli yükselmeler nöronal dejenerasyona ve hücre ölümüne neden olabilir (Ross, 2012).

1.8.3. Mitokondriyal Bozuklukların Alzheimer ile İlişkisi

Alzheimer hastalığı (AH), dünya çapında en yaygın görülen nörodejeneratif bozukluktur. Mitokondriyal dejenerasyon ve oksidatif hasar, AH' nin patogenezinde rol oynayan etkenlerdendir (Ferreiro ve ark., 2012). AH 'li bireyler üzerinde yapılan analizlerde, beyinlerinde protein, lipid ve DNA düzeyinde genel oksidatif hasar seviyelerinin yüksek olduğu göze çarpmaktadır (Giasson, Ischiropoulos, Lee, Trojanowski, 2002). AH 'de β -amiloid gibi proteinlerdeki oksidatif stres kaynaklı değişimler, proteinde yanlış katlanma ve agregat oluşumuna neden olabilir (Andersen, 2004). ROS üretimi ve amiloid plak oluşumu arasındaki ilişki, transgenik farelerde ve Alzheimer hastalarının insan beyin dokusunda da gösterilmiştir (Dumont ve ark., 2009; Shi ve ark., 2011)

Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığında, yaşlanma ile bağlantılı olarak birikim gösteren serbest radikaller, amiloid öncü protein moleküllerinin bölünmesini kolaylaştırdıkları β -sekretaz enzimini aktive eder (Shi ve ark., 2011). Bölünmüş amiloid öncü protein molekülü elektron taşıma zincirinin ve enzim aktivitelerinin bozulmasına, adenosin trifosfatın inhibisyonuna ve hem nükleer hem de mitokondriyal DNA proteinlerinin oksidasyonuna yol açar (Reddy, 2006). Alzheimer hastalarının beyinleri, mitokondriyal transkripsiyon ve replikasyonu baskılayan somatik mitokondriyal DNA mutasyonlarını barındırır (Andersen, 2004). Mitokondride meydana gelen bozukluklar en nihayetinde Alzheimer hastalarında nöronal hasara, nörodejenerasyona ve bilişsel gerilemeye yol açar (Tranah ve ark., 2012)

1.8.4. Mitokondriyal Bozuklukların Parkinson Hastalığı ile İlişkisi

Parkinson hastalığı, 60 yaş üstü nüfusun yaklaşık % 2'sini ve 80 yaşın üzerindeki % 4'ünü etkileyen ikinci en yaygın nörodejeneratif bozukluktur (Feeney ve ark., 2008). Beyindeki nöronal sitoplazmada ve sinir liflerinde fibröz protein birikimi ile karakterize olan bu hastalık üzerine yapılan çalışmalarda, mitokondriyaldeki kusurların da

(mitokondriyal DNA'daki mutasyonlar veya polimorfizmler ve mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki bozukluklar gibi) hastalıkta rol oynadığı görülmektedir (Abeliovich, 2010; Matsui ve ark., 2013; Momb ve ark., 2013; Alleyne, Mohan, Adogwa, 2012).

1.8.5. Mitokondriyal Bozuklukların Diğer Nörodejeneratif Bozukluklar ile İlişkisi

Mitokondriyal hasar, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının yanı sıra diğer nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde de önemli rol oynamaktadır. Mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin Down sendromunun temelinde yer alan ortak özelliklerden olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Helguera ve ark., 2013). Mitokondriyal DNA'nın mutant Huntington ile ilişkili oksidatif stresin önemli hedefi olduğunu ve mitokondriyal hasarın Huntington hastalığında rol oynadığını öne sürülmüştür (Siddiqui ve ark., 2012). Mitokondri elektron taşıma zincirindeki kompleks II' nin aktivitesinin Huntington hastalarının beyinlerinde az olduğu görülmüştür (Lin ve Beal, 2006). Friedreich ataksisi, mitokondriyal bir protein olan Frataksin ekspresyonu azalmasının neden olduğu yaygın bir ataksi formu olup mitokondrilerde meydana gelen oksidatif hasarının hastalığın patogenezinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (Marobbio, Pisano, Porcelli, Lasorsa, Palmieri, 2012; Xia ve ark., 2012)

1.9. Doku Mühendisliği

Canlı vücudu doku ve/veya organda meydana gelen çeşitli yaralanma ve işlev bozukluklarını bünyesinde barındırdığı kök hücreler ve ilişkili oldukları somatik hücreler ve ekstraselüler matriks elemanları gibi canlılık bileşenleri aracılığıyla ortadan kaldırmak noktasında oldukça yeteneklidir. Ancak vücutta meydana gelen hasarlar canlılığı tehdit edecek kadar üst boyutlara ulaştığında, hasarların giderilmesi noktasında bu potansiyel yetersiz kalmaktadır. Kök hücre ve doku mühendisliği çalışmaları ciddi yaralanma ve hasar durumlarının giderilmesi için gerekli potansiyeli sağlamak adına rejeneratif (yenileyici) ve reperatif (onarıcı) tedavi yaklaşımları üretmektedir. Doku mühendisliği tekniklerini ve kök hücre tabanlı tedavileri bir araya getiren bu yaklaşımlar ile vücudun sahip olduğu rejeneratif kapasitenin uyarılması ya da artırılması, normal fizyolojinin devamlılığının sağlanması ve hasarlı dokuların ya da organların tamir edilmesi hedeflenmektedir.

Doku mühendisliği, 90'lı yılların başında Langer ve Vacanti tarafından " biyolojik bir dokunun ya da organın fonksiyonlarının korunması, yeniden düzenlenmesi veya iyileştirilmesi ya da tamamen yeniden biyolojik dokuların oluşturulmasına yönelik mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir alan" olarak tanımlanmıştır (Langer ve Vacanti, 1993). Doku mühendisliği yaklaşımları, ilaç geliştirme ve yeni tedavilerin değerlendirilmesi için kullanılacak, sağlıklı veya patolojik doku ve organların in vitro modellerinin tasarımı ve ayrıca hastalığın başlangıcını ve ilerlemesini düzenleyen karmaşık fenomenlerin araştırılması için büyük önem arz etmektedir.

Klinik öncesi çalışmalarda kullanılan iki boyutlu (2B) hücre kültürlerinin, ilaç analizlerinde kullanımları için gerekli olan fenotipik özelliklerin çoğundan yoksun olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Grainger, 2014). Hücrelerin in vivo da buldukları 3 boyutlu ortam, hücreler ile onları çevreleyen hücre dışı matris yapısının aktif olarak etkileşime girmesine olanak tanır. Hücreler bu ortamda işlevlerini ve gen ekspresyon profilini güçlü bir şekilde etkileyen uyarıcılar (örneğin, çözünür faktörler ve fiziksel kuvvetler) ile bir arada bulunurlar. 3B bir in vitro model, hücrelerin büyümesine ve birbirleriyle ve kendisini çevreleyen hücre dışı matris ile etkileşime girmesine izin verir. 3B yapı, bir 3B matris desteği (iskele) veya iskeletsiz organoid kültürleri kullanılarak elde edilebilir.

1.9.1. Üç Boyutlu Doku Kültürleri ve Organoid Kavramı

3 boyutlu hücre kültürleri, günümüzde çok fazla ilgi gören bir teknik olup giderek yaygınlaşmaktadır. Kök hücre ve memeli gelişim biyolojisi alanındaki son gelişmeler de tekniğin kullanımı önemli ölçüde arttırmıştır. 3 boyutlu hücre kültürü tekniğinin temelinde embriyonik kök hücrelerin, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin ve ayrıca ilgilenilen organın progenitor hücreleri ile oluşturulmuş bir veya daha fazla hücre tipini bünyesinde barındıran hücre kaynaklı doku ve organ benzeri yapılar oluşturulması yatmaktadır ki bu yapılar, organoid olarak adlandırılır. Sınırlı miktarda başlangıç materyaliyle kurulabilen organoid kültürleri, şu anda kullanılan prelinik modeller (2B hücrelerin ve dokuların veya hayvanların kültür teknikleri) biyolojik tepkileri tahmin etmekte yetersiz kaldığı için yaşam bilimlerini etkileme potansiyeli yüksek gelişmiş bir araçtır. Bununla birlikte bu modeller, organların sahip olduğu birkaç önemli özelliği ifade etmesi gerekmektedir. İlk olarak, modellediği organın birden fazla hücre tipi içermesi gerekir, ikincisi o organa özgü bir

işlev göstermelidir ve üçüncüsü, hücreler organın kendisine benzer şekilde organize edilmelidir.

Tablo 1.1. Hücre hattı, ksenograflar ve organoidlerin birbirleri ile kıyaslanması. (Sachs ve Clevers, 2014).

Özellik	Hücre Hatları	Ksenograflar	Organoidler
Çalışma kolaylığı	+++	-	+
Başlatma başarı oranı	+	++	+++
Gelişim	+++	+	+++
Biyolojik stabilite	+	++	++
Genetik manipülasyon	+++	-	++
3 boyutlu gelişim	+/-	+++	++

(+++): Çok iyi, (++): Kullanılabilir, (+): Mümkün, (-): Kullanışlı değil.

20. yüzyılda, "organoid" kelimesi terimsel olarak biyotıp alanında farklı anlamları karşılamıştır. Örneğin bu terim alt hücreli yapıları tanımlayan "organel" kelimesinin yerine kullanılırken (Duryee ve Doherty, 1954) onkoloji alanında ise karmaşık doku benzeri bir mimariye sahip olan tümör yapılarını tanımlamak için kullanılmaktadır (Nesland, Simoes, Holm, Johannessen, 1985).

2009 yılında Sato ve arkadaşları tarafından 3-boyutlu bir kültür sistemi olan organoid kültürleri oluşturulmuştur (Sato ve ark., 2009). Yetişkin kök hücreler 3-boyutlu bir matriks içerisine ekilmiş ve organ orjinini oluşturan yapının oluşmasına imkan sağlanmıştır.

Ancak bu tekniğin temelleri çok daha eskiye dayanmaktadır. Organoid modelleme teknikleri, düşünce olarak kökenini biyolojik organizasyonun doğası hakkındaki temel araştırmalardan almaktadır. Bu tarihsel süreç kısaca ele alınacak olursa H.V. Wilson 'un olduğu deney iyi bir başlangıç noktası olacaktır.

Wilson gerçekleştirdiği deneyde, eğer bir sünger onu oluşturan hücrelerine ayrılır ve bu hücreler daha sonra rastgele yeniden birleştirilirse, yeni bir sünger oluşturabilmek adına hücrelerin yeniden organize olduklarını göstermiştir (Wilson, 1907).

Bu deney, yetişkin bir organizmanın hücrelerinin, dış uyarılara veya hücrelerin embriyolojik geçmişlerine bağlı anatomik düzenlemelerin yapılmasına gerek kalmadan çok hücreli bir yapıyı elde edebilmek için yeterli bilgi içerebileceğini gösteren önemli bir çalışmadır. Bugün kullanılan yöntemlerin temelini oluşturan çalışma ise belki de Ross Harrison tarafından 1906 yılında geliştirilen asılı damla doku kültürü tekniğidir (Harrison, 1906). 1900'lerin başlarında araştırmacılar, organogenez kültür koşullarında yeniden oluşturmak için çalışmalara doku parçalarını kültüre ederek başlamışlardır. Bu öncü deneyde Harrison sinir liflerinin kökenini incelemek istemiştir. Bunun için embriyo sinir kordonunun bir parçasını alarak üzerinde bir damla lenf sıvısı bulunan slayta yerleştirmiş ve bu sayede sinir liflerinin büyümesi için elverişli bir ortam sağlamıştır.

1950'lere kadar birçok organ in vitro olarak kültüre edilmiştir. Moscona, 1950'lerin başlarında erken civciv embriyolarının uzuv ve böbrek dokularını enzimatik olarak parçalamak için bir yöntem geliştirmiş ve bu sayede elde edilen hücrelerin süspansiyon halde kültüre edildiklerinde köken aldıkları dokuların yapısal desenini tekrardan oluşturdukları gözlemlemiştir (Moscona ve Moscona, 1952; Moscona, 1959). Böylece yapılan bu öncü deneyi takiben, yirminci yüzyılın ortalarında, fiziksel ve kimyasal yöntemler ile elde edilen hücrelerden, süspansiyon kültür koşullarında organ üretmeye yönelik çalışmalara başlanmıştır. Richard Swarm ve grubu, kondrosarkomların ekstraselüller matriksinin karakterizasyonu üzerinde çalışarak, kollajen, hyaluronik asit ve ilgili proteinler arasındaki etkileşimleri ortaya koymuşlardır ve bunu yaparak, bazal membranın özelliklerine sahip bir jel izole etmişler. Keşfi gerçekleştiren üç araştırmacının (Engelbreth, Holm ve Swarm) baş harfleri kullanılarak isimlendirilen EHS sarkomu, bugün ki bilinen adı ile matrijeldir (Swarm, 1963; Orkin ve ark., 1977). Erken dönemde yapılan bu çalışmalar, organoid ve 3B kültürlerin geliştirilmesi adına gerçekleştirilecek ileriki çalışmalara zemin hazırlamıştır. 1990'lı yıllarda, araştırmacılar köken aldıkları doku bakımından farklılıklar gösteren 3B organoid kültürleri test etmeye başlamışlardır. Doku morfogenezinin altında yatan mekanizmaları incelemek için kollajen destek yapıları kullanılarak oluşturulan ve organoid olarak adlandırılan modellemelerde morfogenezin büyüme faktörleri, morfojenler ve matris metaloproteinazların etkileşimine bağlı olduğunu gözlenmiştir (Simian ve ark., 2001).

2006 yılında yapılan bir araştırma, doku geometrisinin dallanma morfogenezinin yerini belirlediğini göstermiştir (Nelson, Vanduijn, Inman, Fletcher, Bissel, 2006). Yapılan

çalışmada fare meme epitel tübüllerinin 3B yapısını kontrol etme adına bir mikro modelleme yaklaşımı kullanılmış ve epitel tübüllerin, inhibe edici bir morfojen olarak hareket eden yerel TGF- β konsantrasyona göre dallanmanın konumunu belirlediği gözlenmiştir. Daha sonra, organoid yapılarını kültüre etmek için 96 kuyucuklu plakalarda laminin açısından zengin ekstrasellüler matriks kullanılarak primer fare meme organoidleri için modifiye edilmiş bir 3B kültür sistemi oluşturulmuştur. Birden fazla faktörün eşzamanlı olarak incelenmesini sağlayan bu yeni sistem, araştırmacılara organ morfogenez süreci üzerine etki eden faktörleri gözleme olanağı sağlamıştır (Fata ve ark., 2007).

1.9.1.1.Klinik Araştırma Araçları Olarak Organoidler

Organoidlere olan ilgideki mevcut artış esas olarak klinik bilimlerden kaynaklanmaktadır ve organoid teknolojileri ilaç geliştirme, toksikoloji, onkoloji, mikrobiyoloji ve rejeneratif tıpta uygulanmaktadır.

Terapötik moleküller (ilaçlar, antikorlar, vb.) için klasik araştırma-geliştirme süreci aday bileşiklerin in vitro sistemlerde ve basit hücre kültüründe ile başlar. Ardından sırası ile insan olmayan hayvanlarda güvenlik ve etkililik testine, oradan da faz I. (küçük grup; güvenlik), faz II denemeleri (orta grup; güvenlik ve etkinlik) ve faz III denemeleri (büyük grup; etkinlik, nadir yan etkiler, vb.) yoluyla geniş çaplı klinik test süreçleri gerçekleştirilir. Endüstriyel farmakologların karşılaştıkları sorunlardan biri, hayvan modellerinde güvenli gibi görünen bileşiklerin insanlar için beklenmedik toksisite göstermesidir. Bu tipik olarak ilacın geri çekilmesine neden olur ve büyük miktarlarda para ve araştırmacı zamanının boşa harcanması anlamına gelir. Hayvanlarda toksisite testlerinde başarısız oldukları için sonlandırılan ve aslında insanlarda tamamen güvenli ve faydalı olacak bileşikler de var olabilir. Bu şekilde boşa harcanan işin maliyetlerini taşıma ihtiyacı, ilaç geliştirme süreçlerini (ve ilaçların kendisini) çok pahalı hale getirir ve tıbbın ilerlemesine engel oluşturmaktadır. Bu nedenle ilaç geliştirme süreçlerinde, ilaç etkinliğinin ve toksisitesinin değerlendirilebileceği insan temelli sistemlere çok güçlü bir ihtiyaç duyulmaktadır.

İnsan organoidlerinin toksikolojide kullanımı yalnızca farmakoloji ile sınırlı değildir. Aynı zamanda çevresel toksik maddeler de bu şekilde incelenebilmektedir. Yakın tarihli bir örnek, prostat organoidlerinin gelişimi üzerindeki bisfenol-A'nın etkilerini

araştırmak için insan embriyonik kök hücreden türetilmiş prostat organoidlerinin kullanılmasıdır (Calderon-Gierszal ve Prins, 2015)

1.9.1.2.Organoidlerin Sınırlamaları

Organoidlerin sağlayabileceği faydalar çok çeşitli olmasına karşın her soruna çözüm oluşturmasının beklenmesi mümkün değildir. In vitro koşullarda büyüyen organoidler, bir vasküler sistem oluştursalar bile (ki çoğu damar oluşturma yeteneğine sahip hücre içermedikleri için) kan akışına sahip değildir. Oluşturulan organoidin canlı bir konakçıya nakledilmesi, sıklıkla organoidin konakçıda sürdürülebilirliğini sağlamak adına damar yapıları oluşturması ile sonuçlanır. Bu tür araştırma yaklaşımları organoidlerde anjiyo ve vasklojenez mekanizmalarını incelemek için kullanılma potansiyeline sahiptir (Risau ve ark., 1988).

EKH ve UPK hücre kökenli organoidlerle ilgili bir başka sorun da olgunlaşmama durumudur. Bu hücreler kullanılarak oluşturulan organoidler olgun eşdeğerlerinden ziyade fetal organların özelliklerini gösterir. Bağırsak villusları gibi bazı organoidler ise kültürde uzun vadede daha olgun bir fenotip kazanabilmiştir (Sinagoga ve Wells, 2015).

2. AMAÇ

Bu çalışmada, in vitro kültür koşullarında nöral kök hücre ve 3 boyutlu hücre kültürü tekniklerinin kullanılmasıyla organoid modelinin oluşturulması ve oluşturulan bu organoid modelinde mitokondri hasarının incelenmesi amaçlanmıştır. Oldukça ileri teknolojileri ve disiplinlerarası yaklaşımları barındıran doku mühendisliği ile in vitro kültür koşullarında in vivo fizyolojik yapıları taklit eden organ benzeri organoid yapıları literatüre katkı yapmak ve araştırmacıların yeni fikirler üretmesine olanak sağlamak çalışmanın başlıca hedeflerindedir.

Nöral kök hücreler kullanılarak oluşturulan bir organoid modeli, araştırmacılara hastalıkların temelinde yatan patolojik değişikliklerin belirlenip incelenme şansı sağlayacaktır. Hastalığın kaynağı belirlendiğinde tedavi yaklaşımları da hız kazanabilir.

Kültür koşullarında oluşturulacak bu organ benzeri yapı sayesinde hem deney hayvanları hem de gönüllü insan deneklerine ihtiyaç büyük ölçüde ortadan kalkacaktır. Hastalığın tedavi veya kökeninin araştırması için yapılacak olan çalışmalar, kültür şartlarında gerçekleştirileceği için de çalışmalar daha kontrollü gerçekleştirilebilecektir. Bu çalışma paralelinde ortaya çıkacak çalışmalar ve elde edilecek sonuçlar ışığında doku mühendisliği alanına belki de yeni kavramlar kazandırılacaktır.

3. YÖNTEM

Tez çalışması deneysel yöntemlerle Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarlarında yapılmıştır. Tezin etik kurul onayı Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan (**EK-1**) alınmıştır.

3.1.Hücreler ve Kültür Koşulları

Tez çalışmasında kullanılan fetal dönemdeki sıçan izole edilen nöral kök hücreler Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin hücre koleksiyonundan alınmıştır. Bu hücreler, daha önceki çalışmalarda elde edilmiş ve -152 °C'de muhafaza edilmiştir.

Sıçan kaynaklı bu kök hücreler, içerisinde nöral çoğalma eklentisi içeren nöral eklenti (StemPro; 1X), B27 eklentisi (1X), EGF (epithelial growth factor; 10 ng/ml), FGFb (fibroblast growth factor basic; 20 ng/ml), glutamax (%1), heparin (%0,02) ve pen/strep (%1) içeren DMEM F12 besiyeri kullanılarak kültüre edilmiştir. Kültürde ekimi yapılan hücreler 37 °C 'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğalmaya bırakılmıştır. Nöral kök hücre kültüründe kültüründe, besiyerindeki eklentilerin yetersizliği durumunda hücreler adesif forma geçip çoğalma kabiliyetlerini yitirmektedirler. Bu nedenle bu durum göz önünde bulundurularak 3 günde bir düzenli olarak besiyeri değiştirilmiştir. Kültür kabı dik konuma getirilip 2-3 dk beklendikten sonra yavaşça 1/3 besiyeri içeriği dibe çöken hücreleri rahatsız etmeden atılarak ve aynı miktarda besiyeri yavaşça eklenmiştir.

3.1.1. Nöral Kök Hücre Pasajı

Kültürde geçen 7-10. günlük bir süreç sonunda yeterli büyüklüğe ulaşan nöroküreler mikroskop altında incelenmiştir. Nöroküre boyutlarının 100 µm üzerine çıktığı durumlarda pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir (Azari, Louis, Sharififar, Mai, Reynolds, 2011). Pasaj işlemi için 200 µm'lik mikropipet 180 µm'ye ayarlanmış, 10-15 pipetasyon ile nöroküreler mekanik yöntem ile tekli hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Nöroküre seçiminde veya alt-kültürlemede yaklaşık 100 µm'de boyutuna dikkat edilmesinin nedeni daha fazla büyüyen nörokürelerde merkezde oksijen alamayan hipoksik bir bölgenin oluşması ve burada yer alan hücrelerin ölüme gitmesidir. Bu sebepten ötürü nörokürelerin boyutu 100 µm'yi geçmeyecek şekilde kültür süresi sınırlandırılmıştır.

3.1.2. Nöral Kök Hücre Dondurma İşlemi

Deney aşamasında o an için kullanılmayacak veya fazla olan kök hücreler, besiyerleriyle 50ml'lik falkon tüplerine alınıp 90g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan kısım dikkatlice uzaklaştırılmıştır ve 950 µl taze besiyeri yavaşıca hücrelere eklenerek dondurma tüplerine alınan hücrelerin üzerine yavaşıca 50 µl DMSO eklenmiştir. Sonrasında hücreler -152 °C'ye alınarak uzun süreli muhafazaları sağlanmıştır.

3.1.3. Nöral Kök Hücre Farklılaşma

Nöral kök hücreler karakterizasyon için farklılaşmaya alınmıştır. Bunun için hücrelerin ekilecekleri kültür kaplarının yüzeyi çeşitli proteinler ile kaplanmıştır. Kültür kaplarının içerisine öncelikle lameller konulmuş ardından her bir kuyucuğa yüzeyi kaplayacak kadar yaklaşık 1 ml poli-L ornitine eklenerek 1 saat 37 °C 'de inkübatörde bekletilmiştir. Sonrasında poli-L ornitine uzaklaştırılmış, kuyucuklar steril su ile yıkanmıştır. Hemen akabinde poli-L ornitinle kaplanmış kuyucuklara yaklaşık 1 ml laminin eklenerek 37 °C 'de inkübatörde 2 saat bekletilmiştir. Süre sonlandığında laminin uzaklaştırılarak kuyucuklar PBS ile yıkanmış ve ekimin için hazır hale getirilmiştir.

NKH'lar kuyucuk başına 100 bin hücre olacak şekilde kültür kaplarına NKH farklılaşma besiyeri ile ekilmiştir. bFGF ve heparin besiyerinden çekilmiştir. DMEM F12 bazal besiyeri, N2 eklentisi (%1), B27 eklentisi, EGF, glutamax, pen/strep (%1) eklenerek farklılaştırma besiyeri hazırlanmıştır. Hücreler hazırlanan bu farklılaştırma besiyeriyle kültüre edilmiştir. 2-3 günde bir kültür ortamındaki besiyeri tazelenmiştir. Bir haftalık kültür sürecinin sonunda nöron, oligodentrosit ve astrositlere farklılaşmış hücrelerin gösterilmesi adına lameller, %4 paraformaldehid çözeltisi ile 15 dk fikse edilmiştir. Nöronlar için Nestin, oligodentrositler için NG2 (nöroglia-2), astrositler için GFAP (glial fibriller asidik protein) ve S100 antikolarıyla immunohistokimyasal olarak boyanıp floresan mikroskopta incelenmiştir.

3.2.Hidrojen Peroksit Aracılı Hücresel Yaşlanma

Hücresel yaşlanma ilk kez 1961'de Hayflick ve meslektaşları tarafından insan diploid fibroblastlarının kültürde sınırlı sayıda hücre bölünmesi geçirdiğini gözlemlemeleri ile tanımlanmıştır (Hayflick ve Moorhead, 1961).

Primer kültürdeki çoğu normal hücre türü, en nihayetinde replikatif kapasitelerini tüketerek replikatif yaşlanma olarak adlandırılan bir büyüme durdurma durumuna girmektedirler (Cristofalo, Lorenzini, Allen, Torres, Tresini, 2004). Yaşlanan hücreler geri dönüşü olmayan bir şekilde büyümeyi durdururlar, ancak uzun süre canlılığını sürdürürler. Yaşlanan hücreler morfolojilerinde bir takım değişimler meydana gelir ve ayrıca yaşlanma ile ilişkili beta galaktosidaz ekspresyonu gösterirler (Dimri ve ark., 1995). Moleküler düzeyde yaşlanma, çok sayıda genin ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkilidir (Krtolica ve Campisi, 2002). Hücre döngüsü düzenlenmesinde görevli yollardan p53 ve Rb sinyal yolağı, replikatif yaşlanmada önemli rol oynar (Campisi, 2005). Ancak replikatif yaşlanma, hücre yaşlanma adı verilen daha yaygın bir tepkinin yalnızca bir örneğidir.

Oksidatif stresin neden olduğu hücre yaşlanma, yaşlanma araştırmaları için iyi bir in vitro model oluşturma potansiyeline sahiptir. Yaşlanmanın serbest radikal teorisi, aerobik metabolizma sırasında ortaya çıkan ROS yapılarının biyomoleküllere zarar verdiğı ve bunun sonucunda doku fonksiyonlarının azalmayla beraber yaşlanmaya neden olduğı sonucuna dayanır (Harman ve ark., 2001). ROS, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi oksijen merkezli serbest radikallerin yanı sıra hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi diğer reaktif, radikal olmayan yapıları kapsar (Dröge, 2002). Hidrojen peroksit (Q. Chen ve Ames, 1994) ,ultraviyole (UV) ışık (Rodemann, Bayreuther, Francz, Dittmann, Albiez, 1989), tert-butilhidroperoksit (Toussaint, Houbion, Remacle, 1992) ve hiperoksi (von Zglinicki, Saretzki, Döcke, Lotze, 1995) maruziyeti başta olmak üzere erken yaşlanmayı indüklemek için çeşitli oksidatif stres ajanları kullanılmıştır; bunlardan en yaygın kullanılanı ise hidrojen peroksittir.

Deney kapsamında NKH'ler değışen konsantrasyonlarda hidrojen peroksit ile muamele edilmiştir. Bunun için ilk olarak 1000 µM stok hidrojen peroksit solüsyonu, kültürde kullanılan standart besiyeri ile dilüe edilerek 5 µM'dan 150 µM'a kadar değışen konsantrasyonlarda hidrojen peroksit içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Ardından kültür kabındaki hücreler invert mikroskop ile incelenerek oluşan nörokürelerin boyutlarının 100-150 µm aralığında olduğı teyit edilmiştir. Sonra hücreler 50 ml'lik falkona toplanarak 90g de 5 dk santrifüj edilmiş ve üzerindeki sıvı dikkatle uzaklaştırılmıştır. 200 µm'lik mikropipet 180 µm'ye ayarlanmış, 10-15 pipetasyon yapılarak nöroküreler mekanik yöntem ile tekli hücre süspansiyonu haline getirilmiştir.

96 kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirilen bu deneyde kuyucuk başına 15 bin hücre olacak şekilde NKH ekilmiştir. Ekimi takiben hücrelerin bulunduğu kuyucuklara hidrojen peroksit içeren besiyeri eklenerek 37 °C inkübatörde 30 dk inkübasyon sağlanmıştır. Süre sonunda hidrojen peroksit içeren besiyeri, standart besiyeri ile değiştirilmiştir.

3.2.1. Oksidatif Stres Oluşumu Adına Uygun Hidrojen Peroksit Dozunun Tespiti

3.2.1.1.WST-1 Analizi ile Hücre Canlılık ve Çoğalmasının Tespiti

WST-1 testinde, kültürü ortamında bulunan tetrazolium halkaları hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturmaktadır. Ölü hücrelerin varlığında formazan kristali oluşmaz. Reaksiyon sonucu oluşan rengin yoğunluğu mitokondriyal aktivite ve dolaylı olarak ta hücre canlılığı ile doğrudan ilişkilidir.

Deney gruplarında canlılık ve çoğalımdaki farkları göstermek amacıyla WST-1 testi gerçekleştirilmiştir. 96-kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 15.000 hücre ekimi ile başlanan deneyde hücreler değişen konsantrasyonda hidrojen peroksit içeren besiyeri ile 37 °C 'ye ayarlı inkübatörde 30 dk muamele edilmiş. Sürecin sonunda hücrelerin besiyerleri çekilerek standart besiyerinde hücreler 24 saat kültüre edilmiştir. Ertesi gün analiz için hücrelere yeni besiyeri olarak; %10 WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche) içeren besiyeri eklenmiştir. 2 saat inkübasyon sonrası 96 kuyucuklu kültür kapları optik dansite (OD) tespiti adına spektrofotometre cihazında 450 nm dalga boyunda okutulmuş elde edilen absorbans değerlerine göre analizi yapılmıştır.

3.2.1.2.Beta Galaktosidaz Boyaması ile Yaşlanmanın Tespiti

Beta galaktosidaz boyama, yaşlanan hücrelerin saptanması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yöntem, artan lizozomal β -galaktosidaz enzim aktivitesinin tanımlanmasına dayanır. Normal koşullar altında hücreler, lizozomda β -galaktosidaz enzimini üretirler. Ancak, yaşlanma ile birlikte hücrelerde lizozomal kütle artar, bu nedenle yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidaz miktarındaki artış kullanılan bu yöntem ile mavi bir leke olarak görselleştirilebilir (Dimri ve ark., 1995).

Deney gruplarında yaşlanmanın gösterilmesi amacıyla beta galaktosidaz boyaması (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, Sigma) gerçekleştirilmiştir. 96-kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 15.000 hücre ekimi ile başlanan deneyde hücreler değişen konsantrasyonda hidrojen peroksit içeren besiyeri ile 37 °C’ de inkübatörde 30 dk muamele edilmiş. Sürecin sonunda hücrelerin besiyerleri çekilerek standart besiyerinde hücreler 24 saat kültüre edilmiştir. 24 saat sonra kuyucuklardaki hücre içeren besiyerleri toplanarak sitosantrifüj cihazında (Hettich ROTOFIX 32) 900 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süspansiyon haldeki hücrelerin bu sayede lam yüzeyine tutunmaları sağlanmıştır. Hazırlanan 1×’lik fiksasyon çözeltisi ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından boyama solüsyonu ile örnekler gece boyunca 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Işık mikroskopunda (Olympus IX71) görüntülemeleri yapılmıştır.

3.2.1.3. Beta Galaktosidaz Boyamasının Spektrofotometrik Analizi

Nöral kök hücrelerin kültür ortamında nöroküre oluşturmaları, skorlama ile analizi olanaksız kılmaktadır. Görsel değerlendirmenin de kantitatif sonuç vereceği düşünülerek, oksidatif stres oluşturmak için kullanılacak olan H₂O₂ konsantrasyonunun, yapılan beta galaktosidaz boyaması ile spektrofotometrik analizi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak sağlıklı NKH ‘ların kullanıldığı deney kapsamında NKH ‘lar 75 µM H₂O₂ içeren kültür besiyeri ile 30 dk kültüre edildikten sonra 24 saat standart kültür besiyeri ile kültüre edilmiştir. 24 saat sonra kuyucuklardaki hücre içeren besiyerleri toplanarak 90g de 5 dk santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Ardından PBS çözeltisi kullanılarak 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında hücreler falkon içerisinde 1X fiksasyon buffer ile 15 dk oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Süre sonunda PBS ile yapılan yıkama işlemi ile fiksasyon çözeltisi yapıdan uzaklaştırılmıştır. Kitin protokolü doğrultusunda hazırlanan boyama solüsyonu ile hücreler süspansiyon kültür koşullarında 1 gece 37 °C ‘de boyanmaya tabi tutulmuştur. 400 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Molecular Devices, VersaMax) analiz işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.4. TMRM Boyası ile Mitokondriyal Membran Potansiyelindeki Değişimin Tespiti

Hücre mitokondrilerindeki membran potansiyellerinde, H₂O₂ uygulaması sonucu meydana gelen değişimlerin tespiti için katyonik floresan bir boya olan Tetrametilrhodamin, Metil Ester (TMRM, Thermo Scientific), boyası kullanılmıştır.

Deney kapsamında ilk olarak 1000 μM stok hidrojen peroksit solüsyonu, NKH kültüründe kullanılan standart besiyeri ile dilüe edilerek 75 μM hidrojen peroksit içeren besiyeri hazırlanmıştır. Ardından kültür kabındaki hücreler mikroskop ile incelenerek oluşan nörokürelerin boyutlarının 100-150 μm aralığında olduğu teyit edilmiştir. Sonra hücreler 50 ml'lik falkona toplanarak 90g de 5 dk santrifüj edilmiş ve üzerindeki sıvı dikkatle uzaklaştırılmıştır. 200 μm 'lik mikropipet 180 μm 'ye ayarlanmış, 10-15 pipetasyon yapılarak nöroküreler mekanik yöntem ile tekli hücre süspansiyonu haline getirilmiştir.

96 kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirilen bu deneyde kuyucuk başına 15 bin hücre olacak şekilde NKH ekilmiştir. Ekimi takiben hücrelerin bulunduğu kuyucuklara hidrojen peroksit içeren besiyeri eklenerek 37 °C inkübatörde 30 dk inkübasyon sağlanmıştır. Süre sonunda hidrojen peroksitli besiyeri, standart besiyeri ile değiştirilmiştir. 24 saat sonra kuyucuklardaki hücre içeren besiyeri toplanarak 100g 'de 5 dk santrifüj edilmiş ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler içerisinde 10 μM TMRM içeren boya solüsyonu ile 37 °C 'de 30 dk inkübe edilerek boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda PBS ile yıkama yapılarak boya uzaklaştırılmış ve flow sitometrik analiz gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.5.RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Toplam RNA izolasyonu için High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche) kullanılmıştır. 200 μl PBS ile hücre pelletleri çözülmüştür. 400 μl lizis solüsyonu ile 15 sn vortexlendikten sonra örnekler 8000g'de 15 sn santrifüj edilerek kolonlara yüklenmiştir. 15 dk oda ısısında DNase ile muamele edildikten sonra alkol solüsyonları ile üç kez santrifüj edilerek yıkamaları yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar -80 °C de muhafaza edilmiştir.

cDNA Sentez Kiti (Biorad) kullanılarak, izole edilen toplam RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez reaksiyonu kurulurken bir reaksiyon için RNA miktarı 10 μg olacak şekilde hesaplanmıştır. İki temel basamaktan oluşan bu işlemde önce RNA'ya 46 °C 'de 20 dk boyunca rastgele bölgelerinden primerlerin bağlanması sağlanmıştır. Ardından 95 °C 'de 1 dk bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar -20 °C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.6. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadelerinin Analizi

İki boyutlu kültür koşullarında hidrojen peroksit uygulamasının ardından toplanan örneklerdeki spesifik belirteçlerin analizleri Real Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. Uygulanan hidrojen peroksit dozlarının farklılaşma üzerine etkisini ortaya koymak adına Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP), Nestin, Tirozin Hidroksilaz (TH) ve Tübülün Beta III (Tubb3) genlerinin primerleri kullanılmıştır. Oksidatif stres ile ilişkili olarak Süperoksit Dismutaz 1 (SOD1) ve Heme Oksijenaz (HO1) genlerinin primerleri, hücre sağ kalım tespiti için Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF) ve Siliar Nörotrofik Faktör (CNTF) genlerinin primerleri, proliferasyon ile ilişkili Ki67 genine ait primer ile Real-Time PCR deneyi yapılmıştır. Kontrol olarak β -Aktin genine ait primer kullanılmıştır (**Tablo 3.1.**). Real-Time PCR cihazı (Lightcycler 480-II, Roche) kullanılarak ilgili genlerin amplifikasyonu ölçülmüştür. Real-Time PCR ile elde edilen ölçüm değerleri referans gene göre normalize edilerek ilgili genlerin ifade seviyeleri belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Uygun Hidrojen Peroksit dozunun tespiti için yapılan kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan genler

Genlerin Açık İsimleri	İleri ve Geri Primerler	Baz Dizilimi (5'-3')
Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)	GFAP-F	TCCTGGAACAGCAAAACAAG
	GFAP-R	CAGCCTCAGGTTGGTTTCAT
Tirozin Hidroksilaz (TH)	TH-F	TCGGAAGCTGATTGCAGAGA
	TH-R	TTCCGCTGTGTATTCCACATG
Nestin	NESTIN-F	CCCTTAGTCTGGAGGTGGCTA
	NESTIN-R	GGTGTCTGCAACCGAGAGTT
Tübülün Beta III (TUBB3)	TUBB3-F	AGAGCCATTCTGGTGGAC
	TUBB3-R	GCCAGCACCCTCTGACC
Beta Aktin (ACT β)	ACT β -F	AGAGAAGCTGTGCTATGTTG
	ACT β -R	GTACTCCTGCTTGCTGATCC
Nörofilament Hafif Zincir (NF-L)	NF-L-F	TCCAGTTTGTGATTGTGTCCT
	NF-L-R	TGAACGAAGCTCTAGAGAAGCA
Süperoksit Dismutaz 1 (SOD1)	SOD1-F	CGGATGAAGAGAGGCATGTT
	SOD1-R	CCACCTTTGCCCAAGTCATCT
Hemeoksijenaz 1 (HO1)	HO1-F	GGTGTCCAGGGAAGGCTTTAAG
	HO1-R	GTGCAGCTCCTCAGGGAAGTAG

Ki-67	Ki67-F	GCAGACAAGCCTTCAGCAGTAA
	Ki67-R	TGGTACCATTGTCATCAATTTCAGT
Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF)	BDNF-F	GTCCCTTCTACACTTACCTCTTG
	BDNF-R	CTTTGTTTCACCCTTTCCACTCCT
Siliyer Nörotrofik Faktör (CNTF)	CNTF-F	CACCCCAACTGAAGGTGACT
	CNTF-R	ACCTTCAAGCCCCATAGCTT

3.3.Oksidatif Stres Uyarılan Nöral Kök Hücreler ile Organoidlerin Oluşturulması

Organoid yapılarının eldesi için kullanılan protokol kapsamında öncelikle kültür kabındaki hücrelerin invert mikroskop ile incelenerek oluşan nörokürelerin boyutlarının 100-150 µm aralığında olduğu teyit edilmiştir. Sonra hücreler 50 ml 'lik falkona toplanarak 90g 'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üzerindeki sıvı dikkatle uzaklaştırılmıştır. 200 µm 'lik mikropipet 180 µm 'ye ayarlanmış, 10-15 pipetasyon yapılarak nöroküreler mekanik yöntem ile tekli hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Bu işlemin ardından tek hücre süspansiyonu haline getirilen NKH'lar, 75 µM hidrojen peroksit içeren besiyeri ile 37 °C 'de 30 dk inkübe edilmiştir. Sürecin sonunda 90g 'de 5 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş, üstteki sıvı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonunda elde edilen hücre pelleti, 12 adet organoid için kuyucuk başına 10 'ar µL den 120 µL matrijel (Matrigel Matrix Growth Factor Reduced, BD) ile karıştırılmış ve non adhesive 96 kuyucuklu kültür kabına eklenmiştir. Matrijelin jelleşmesinin sağlanması adına 2 saat 37 °C 'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda jelleşen yapının tutunduğu yüzeyden kalkması ve kültür sürecinin başlaması adına kuyucuklara 100 µL farklılaşma besiyeri eklenmiştir.

3.3.1. Hücrelerin Farklılaştırılması ve Organoid Kültürü

Organoid yapıları, 28 gün boyunca hücre kültüründe kültüre edilmiştir. Hücrelerin nöral farklılaştırma basamakları göre 2-8 gün sürmektedir. Bu sürede hücrelerde B27 ile ektodermal farklılaştırma uyarılmıştır. Organoid kültüründe besiyeri içeriğinde nöral eklenti, B27 eklentisi, N2 eklentisi, EGF (10 ng/ml), glutamax ve %1 pen/strep yer alan DMEM F12 besiyeri kullanılmıştır. Besi ortamı 3 günde bir düzenli olarak yenilenmiştir.

3.3.2. Organoid Karakterizasyon Analizleri

3.3.2.1. Whole Mount Boyama

Organoidler, spatül ile kuyucuklardan tek tek toplanıp 24 kuyucuklu kültür kabına aktarılmış ve 1 ml soğuk PBS ile besiyeri içeriğini uzaklaştırmak adına yıkama işlemine başlanmıştır. Organoidlerin çekilmemesine dikkat edilerek kuyucuklardaki PBS çekilip atılmış yerine taze, PBS eklenmiş ve bu işlem toplamda 3 kere tekrarlanarak yıkama işlemi tamamlanmıştır. Organoidlerin üzerine %4 PFA eklenerek 20 dk fiksasyon sağlanmıştır. Fiksatifin uzaklaştırılması için yapılan yıkama, PBS kullanılarak gerçekleştirilmiş olup işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Sonrasında ilgili boyama protokolüne göre işlemlere devam edilmiştir.

3.3.2.2. Frozen (Kriyo) Kesit İçin Hazırlık

Kültürün belirli günlerinde izole edilen organoidler PBS ile yapılan yıkamanın ardından %4 PFA ile fikse edilmiştir. 1× PBS ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra organoidler %30 sukroz çözeltisi içerisine konularak 1 gece +4 °C 'de bekletilmiştir. Ertesi gün sukroz çözeltisi uzaklaştırılarak %7,5 jelatin ve %10 sukroz ile hazırlanan gömme solüsyonu organoidlerin üzerine eklenerek 37 °C 'de 20 dk solüsyonun 3 boyutlu yapıya penetrasyonu için inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu arada doku takibi için kullanılan metal takip kasetlerinin tabanı gömme solüsyonu kaplanmıştır. Son basamakta organoidler tabanı kaplı metal kasetlere alınmış, kuru buz ve %100 alkol ile hazırlanan karışım üzerinde 1-2 dk tutularak hızlı dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.3. Hematoksilen & Eosin Boyama

Organoid modellerinin histolojik değerlendirmesi için hematoksilen ve eosin boyaması gerçekleştirilmiştir. Kriyomikrotom cihazı (LEICA CM1520) kullanılarak 15 µm kalınlıkta alınan kesitler, azalan alkol serilerinden 4'er dk geçirilmiş ve yapılarındaki su uzaklaştırılmıştır. Ardından kesitlerde 5 dk hematoksilen boyası ile çekirdekler işaretlenmiştir. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının uzaklaştırılması için 4 dk musluk suyu ile yıkanan kesitler, 15 sn mordanlama solüsyonu ile muamele edilmiş ve hemen ardından 3 dk eozin boyası ile boyanmıştır.

Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve %100 alkolden geçirilen kesitler kuruduktan sonra entellan ile kapatılmış ve Leica DMI 4000 ışık mikroskopunda görüntülemeleri yapılmıştır.

3.3.2.4.İmmü floresan Boyama

Organoidlerin %4 PFA fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra organoid yapıları içeriğinde %10 sukroz ile %7,5 jelatin bulunan solüsyona gömülmüş ve kriyomikrotomda 15 µM kalınlıkla kesitler alınmıştır. Alınan kesitler her biri 10 dk olacak şekilde 2 kez %96 etanole tabi tutulmuştur. Kesitler sonrasında 50 mM pH 6,0 sitrat solüsyonuna alınarak 20 dk mikrodalga ışınlı antijen açığa çıkarma (antijen retrieval) işlemi gerçekleştirilmiştir. Mikrodalgadan çıkarılan örnekler 20 dk oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan örnekler distile suda çalkalandıktan sonra, PBS çözeltisine alınmış ve kesitlerin etrafı PapPen ile çizilmiştir. Ardından örnekler membran üzerinde gözenek yapıları oluşturarak primer antikorların hücre içerisine penetrasyonunu kolaylaştırmak adına %0,1 Triton-X deterjan çözeltisi ile 6-7 dk muamele edilmiştir.

Süre sonunda deterjan çözeltisi uzaklaştırılarak protein bloklama solüsyonu ile 10 dk oda sıcaklığında bloklama işlemi gerçekleştirilmiş ve örnekler çeşitli primer antikorlarla +4 °C 'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda primer antikor uzaklaştırılmış ve örnekler floresan boya eklenmiş uygun ikincil antikorlar ile 37°C 'de 90 dk inkübe edilerek işaretlenmiştir. Bağlanmayan antikorların yapıdan uzaklaştırılması için yapılan yıkama işleminin ardından son aşama olarak, nükleer boya içeren kapatma mediumu DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) ile kapatılmıştır. Örnekler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflanmıştır.

Tablo 3.2. Primer ve sekonder antikör tablosu

Antikor Adı	Katalog Numarası	Firma
Anti-Nestin	Orb-86833	Biorbyt
Anti-GFAP	Sc-33673	Santa Cruz
Anti-NG2	Ab-50009	Abcam
Anti-S100	Ab-868	Abcam
Anti-MAP2	Ab-11267	Abcam
Anti-TH	Sc-73152	Santa Cruz
Anti-Tau	Ab-131354	Abcam
Anti-Tubulin Beta III	Orb-100281	Biorbyt
Goat Anti-mouse FITC	Ab-98697	Abcam
Goat Anti-mouse AF488	Ab-150113	Abcam
Goat Anti-mouse AF555	Ab-150082	Abcam
Goat Anti-mose AF647	Ab-150115	Abcam

3.3.2.5.Organoid Beta Galaktosidaz Boyaması

Deney kapsamında ilk olarak, kontrol ve deney grubu organoid yapılarından birer örnek spatül yardımı ile eppendorf tüp içerisine alınmıştır. Organoidler PBS ile yıkanarak besiyeri içeriği uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan $1\times$ 'lik fiksasyon çözeltisi ile organoidlerin 20 dk fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyon işleminin ardından PBS ile yapılan yıkama ile fiksasyon ajanı uzaklaştırılmıştır. Ardından boyama solüsyonu ile organoidler $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün yapılan mikroskopik görüntülemenin ardından memeli ekstraksiyon buffer (M-PER, Thermo Scientific) içerisinde organoid yapıları insülin enjektörü kullanılarak parçalanmış ve hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Ardından 400 nm dalgaboyunda spektrofotometrede analizi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.6.Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi

Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan enzimler canlıyı hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve hidrosil gibi radikallere karşı koruyan önemli sistemlerdir. Serbest radikaller organizmada moleküler düzeyde birçok etkiye neden olur. ROS

miktarındaki artış hücre için toksiktir ve hücrede proteinleri, lipidleri ve nükleik asitleri hasara uğratarak hücre içi sinyal yollarını bozar (López-Alarcón ve Denicola, 2013). Serbest radikallerle uyarılan oksidatif stresin, Parkinson, Alzheimer, Huntington, Amyotrofik lateral skleroz, immün sistem bozuklukları, diyabet, kanser, kardiyovasküler bozukluklar ve kanser gibi yüzden fazla hastalığın oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir (Pisoschi ve Pop, 2015). Ayrıca, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın ilerleyici olması, yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Deney gruplarındaki SOD aktivitesinin ortaya koyulması amacıyla SOD analiz kiti kullanılarak (EnzyChrom Superoxide Dismutase Assay Kit, BioAssay Systems) gerçekleştirilen deney kapsamında ilk olarak, organoid yapıları spatül yardımı ile eppendorf tüp içerisine alınmıştır. Ardından 100 µl PBS organoidlerin üzerine eklenmiş ve insülin enjektörü yardımıyla yapının bütünlüğü bozularak hücre süspansiyonu eldesi sağlanmıştır. Örnekler 20 µl olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Sonraki basamakta içerisinde WST-1 ve Xanthine enzimi bulunan bir çalışma solüsyonu örneklerin üzerine konulmuştur. Son basamakta Xanthine oxidase enzimi kuyucuklara eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. 0. ve 60. dk 'larda 400 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak SOD enzim aktivitesinin analizi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.7. Organoid Tetrametilrodamin. Metil Ester (TMRM) Boyaması

Organoid modelini oluşturan hücre mitokondrilerindeki membran potansiyeli değişimlerinin tespiti için katyonik floresan bir boya olan TMRM boyası kullanılmıştır. Kriyomikrotom cihazı kullanılarak 15 µm kalınlıkta alınan kesitler, azalan alkol serilerinden 4'er dk geçirilmiş ve yapılarındaki su uzaklaştırılmıştır. Sonrasında PBS çözeltisine alınan örneklerin etrafı PapPen ile çizilmiştir. Örneklerin üzerine 10 µM TMRM içeren boya solüsyonu eklenmiş ve 37 °C 'de 30 dk boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda boya uzaklaştırılmış ve nükleer boya içeren kapatma mediumu DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) ile kapatılmıştır. Örnekler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000) incelenerek fotoğraflanmıştır.

3.3.2.8.Mitotracker Red Boyaması ile Total Mitokondri Miktarının Belirlenmesi

Organoid modelini oluşturan hücrelerdeki mitokondri sayısını ve dağılımını tespit etmek adına mitotracker red boyası kullanılmıştır. Mitotracker red, mitokondriyal membranda tiol-reaktif klorometil gruplarına bağlanarak membranlarda birikim gösteren floresan bir boyadır. Kriyomikrotom cihazı kullanılarak 15 µm kalınlıkta alınan kesitler, azalan alkol serilerinden 4'er dk geçirilmiş ve yapılarındaki su uzaklaştırılmıştır. PBS çözeltisine alınarak örneklerin etrafı PapPen ile çizilmiştir. Örneklerin üzerine 500 nM mitotracker red (Thermo Scientific) içeren boya solüsyonu eklenmiş ve 37 °C 'de 30 dk boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda boya uzaklaştırılmış ve nükleer boya içeren kapatma mediumu DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) ile kapatılmıştır. Örnekler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000) incelenerek fotoğraflanmıştır.

3.3.2.9.Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Organoid kültür sürecinin 1. 14. ve 28. gününde izole edilerek -80 °C 'de muhafaza edilen organoid modellerinden, kit kullanılarak (QIAGEN RNeasy Mini) RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada 3 boyutlu organid yapısı, lizis solüsyonu ile parçalanarak hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Bunun için organoid yapıları 350 µl lizis solüsyonu ile 10 sn vortexlenmiş ve oluşan hücre süspansiyonları kolonlara yüklenmiştir. Yıkama solüsyonları ile safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. İzole edilen RNA'lar -80 °C 'de muhafaza edilmiştir. Total RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis, Thermo) kullanılarak Ters Transkriptaz PCR yöntem ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İki temel basamaktan oluşan işlem kapsamında öncelikle RNA'ya 65 °C 'de 10 dk boyunca rastgele bölgelerinden primerlerin bağlanması sağlanmıştır. RNA'nın stabil kalması için hemen buza alınarak ters transkripsiyonu sağlayacak enzimi içeren karışım eklenmiştir. 50 °C 'de 30 dk, 85 °C 'de 5 dk bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiş oluşturulan cDNA'lar -20 °C 'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2.10. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Gen İfadelerinin Analizi

Üç boyutlu kültür koşullarında sağlıklı ve hidrojen peroksit uygulanan NKH'lar ile oluşturulan organoid modellerinde farklılaşma, oksidatif stres ve bununla bağlantılı hücrel yaşlanma ile ilişkili genlerin ifade düzeylerini belirlemek için, cDNA

örneklerinden Real-Time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan organoid modellerindeki hücre farklılaşmasının tespiti için Notch sinyal yolağına özgü Notch1 geni primeri, Hedgehog yolağına özgü SHH ve IHH genlerinin primerleri, WNT gen ailesi üyesi WNT3A geni primeri, Noggin primeri kullanılmıştır. Oksidatif stres ve hücre yaşlanmanın saptanması için MCT-4 primeri, NOX4 geni primeri, NOD2 geni primerleri, P22phox primeri, DUOX1 geni primeri, RAGE primeri, NRF2 primeri ve kontrol olarak β -Aktin genine ait primer ile Real-Time PCR deneyi yapılmıştır (**Tablo 3.3.**). RealTime PCR cihazı (Lightcycler 480-II, Roche) kullanılarak ilgili genlerin amplifikasyonları ölçülmüştür. Real-Time PCR ile elde edilen ölçüm değerleri referans gene göre normalize edilerek ilgili genlerin ifade seviyeleri belirlenmiştir.

Tablo 3.3. Organoid karakterizasyonu adına yapılan kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan genler

Genlerin Açık İsimleri	İleri ve Geri Primerler	Baz Dizilimi (5'-3')
NADPH Oksidase 4 (NOX4)	NOX4-F	CCCTTAGTCTGGAGGTGGCTA
	NOX4-R	GGTGTCTGCAACCGAGAGTT
P22PHOX	P22PHOX-F	AAAGAGGAAAAAGGGCTCCA
	P22PHOX-R	TAGGCTCAATGGGAGTCCAC
NRF2	NRF2-F	AGAGCCATTCTGGTGGAC
	NRF2-R	GCCAGCACCCTCTGACC
İleri Glikasyon Son Ürün Reseptörü (RAGE)	RAGE-F	CTACCTATTCCTGCAGCTTC
	RAGE-R	CTGATGTTGACAGGAGGGCTTTCC
Dual Oksidaz (DUOX1)	DUOX1-F	AGTTCCTGGACATCCTGGTG
	DUOX1-R	GTCAGCTCCTCCTTGTCCTG
Süperoksit Dismutaz 1 (SOD1)	SOD1-F	CGGATGAAGAGAGGCATGTT
	SOD1-R	CCACCTTTGCCCAAGTCATCT
Heme Oksijenaz 1 (HO1)	HO1-F	GGTGTCCAGGGAAGGCTTTAAG
	HO1-R	GTGCAGCTCCTCAGGGAAGTAG
Monokarboksilat Transporter 4 (MCT4)	MCT4-F	CTTGCTCCTTTAGCCACCAC
	MCT4-R	GAAACTGGCAAGTCCCAAAA
Indian Hedgehog (IHH)	IHH-F	TGACAGAGATGGCCATCTC
	IHH-R	AAACTCGCGCCTCTTGCCCTA

Sonic Hedgehog (SHH)	SHH-F	TTTCACAGAGCAGCAGTGGATGC
	SHH-R	TTAAATGCCTTGGCCATCTC
Notch 1	NOTCH1-F	CTCTACAGGCACACTCGTAGC
	NOTCH1-R	AACGCCTACCTCTGCTTCTG
Beta Aktin (ACTβ)	ACT β -F	AGAGAAGCTGTGCTATGTTG
	ACT β -R	GTACTCCTGCTTGCTGATCC
NOD2	NOD2-F	TTCTGCCTTACGAGGGTACTCTCT
	NOD2-R	ATGGTCCTCAGCTTAGCAGTGAAC
WNT3A	WNT3A-F	GTGAAGACATGCTGGTGGTC
	WNT3A-R	GGGCACCTTGAAGTAGGTGT
Noggin (NOG)	NOG-F	TGTGGTCACAGACCTTCTGC
	NOG-R	GTGAGGTGCACAGACTTGGA

3.3.2.11. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Total Protein Miktarının Belirlenmesi

BCA testi, örnekteki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan kolorimetrik bir analiz metodudur. Deney gruplarında total protein konsantrasyonlarının ortaya koyulması amacıyla BCA analiz kiti kullanılarak (SMART BCA Protein Assay Kit) gerçekleştirilen deney kapsamında öncelikle organoid yapıları spatül yardımı ile eppendorf tüp içerisine alınmıştır. Burada 100 μ l PBS organoidlerin üzerine eklenmiş ve insülin enjektörü yardımıyla yapının bütünlüğü bozularak hücre süspansiyonu eldesi sağlanmıştır. Örnekler 25 μ l kuyucuklara eklenmiştir.

Ardından kuyucuklara kit protokolüne göre hazırlanan ve içerisinde bikinkoninik asit bulunan solüsyon eklenerek ve 37 °C 'de 30 dk inkübasyon sağlanmıştır. 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak analiz işlemi gerçekleştirilmiştir.

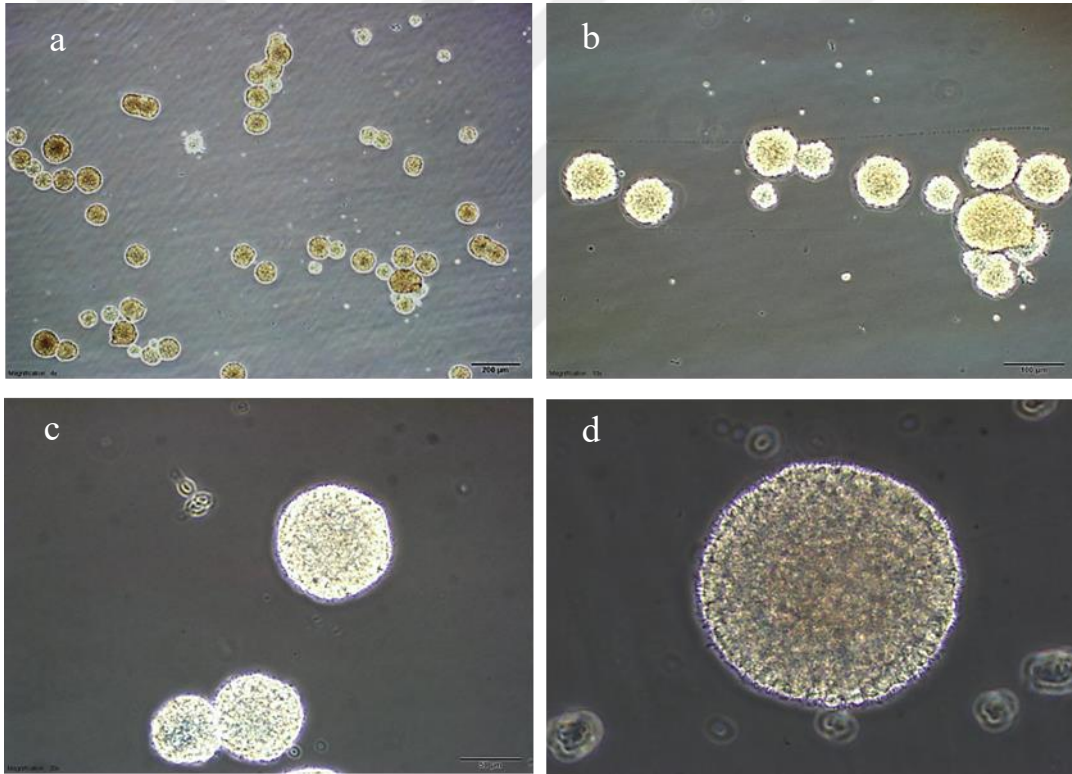
3.3.2.12. İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı ile gerçekleştirildi. Veriler, eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman–Keuls metodu ile test edildiler. Her deney en az üç kez tekrar edildi. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p < 0,05$ olduğunda anlamlı olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.Fetal sNKH'ler ve Karakterizasyonu

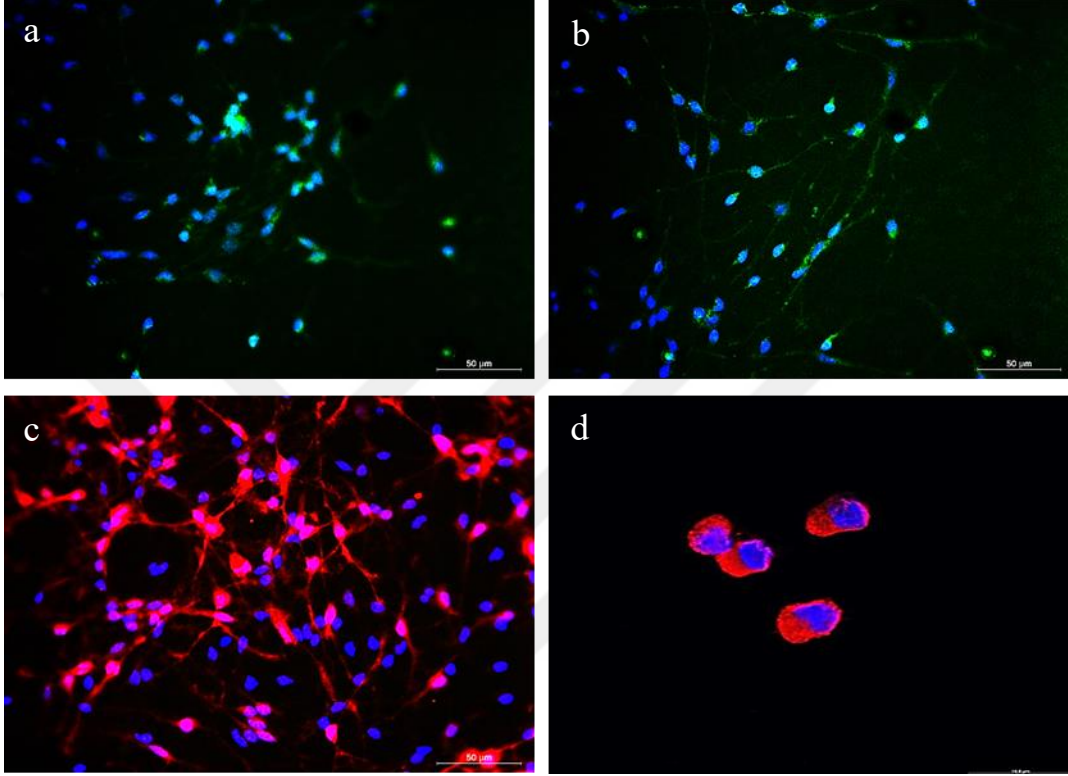
Tez çalışmasında -152 °C 'de saklanan sNKH'ler nöral eklenti, B27 eklentisi, EGF (10 ng/ml), FGF (20 ng/ml), glutamax, heparin ve %1 pen/strep içeren DMEM F12 besiyeri kullanılarak kültüre edilmiştir. Her üç günde bir kültür ortamındaki hücrelerin besiyerleri tazelenmiştir. Kültür kabında %70-80 yoğunluk veya nörokürelerin boyutlarının 100 µm ve üzerinde olması durumunda akutaz ile pasajlama yapılmıştır. İvert mikroskop altında hücre morfolojileri takip edilmiş ve NKH'ların karakteristik özelliklerinden olan nöroküre yapılarının oluştuğu gözlemlenmiştir (**Şekil 4.1.**).



Şekil 4.1. Sığan nöral kök hücre kültürü. Ölçek çubuğu : (a) 200 µm, (b) 100 µm, (c) 50 µm, (d) 20 µm.

Hücreler ilk izole edildiği zaman kök hücre belirteçlerine göre karakterizasyonları tamamlanmış, ancak üzerinden uzun süre geçtiği için karakterizasyon çalışmalarının tekrar yapılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu bağlamda hücreler farklılaşma yeteneğine göre tekrar karakterize edilmiştir. Nöral kök hücreler içerisinde N2 eklentisi, B27 eklentisi, glutamax, EGF, %1 pen/strep bulunan farklılaştırma besiyeriyle kültüre edilmiştir. Bir haftalık bir

farklılaşma sürecinin ardından nöron oligodentrosit ve astrosit farklılaşmış hücrelerin saptanması adına astrositler için GFAP ve S100, nöronlar için Nestin, oligodentrositler için NG-2 antikorları ile immünfloresan olarak boyanarak mikroskopta incelenmiştir. Herbirinin pozitif olması ve NKH'ların farklılaşma özelliklerini korumasıyla kök hücre karakterinde oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.2.).



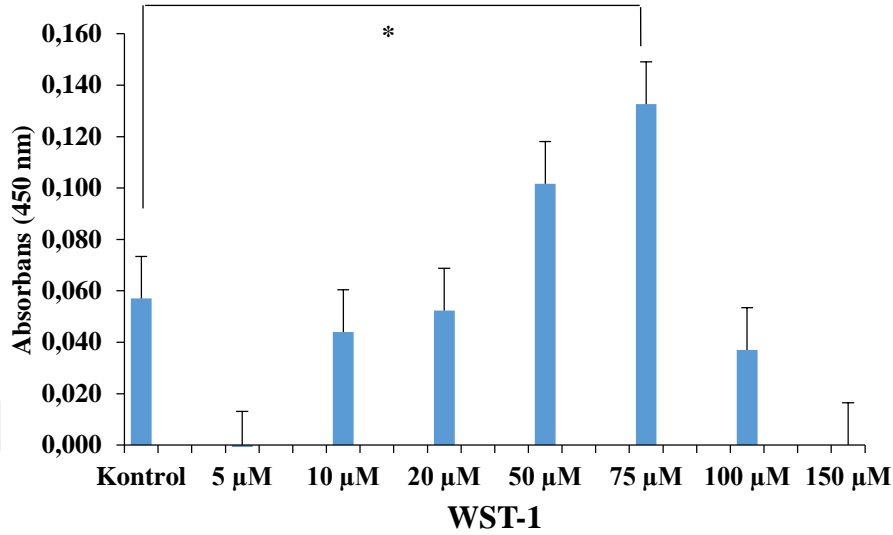
Şekil 4.2. Farklılaşma sonrası sNKH immünfloresan boyamaları. (a) GFAP, (b) NG2, (c) S100, (d) NESTİN. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte işaretlenmiştir. Ölçek çubuğu: (a-c) 50 µm, (d) 20 µm.

4.2.Oksidatif Stres Oluşumu İçin Uygun Hidrojen Peroksit Dozunun Tespiti

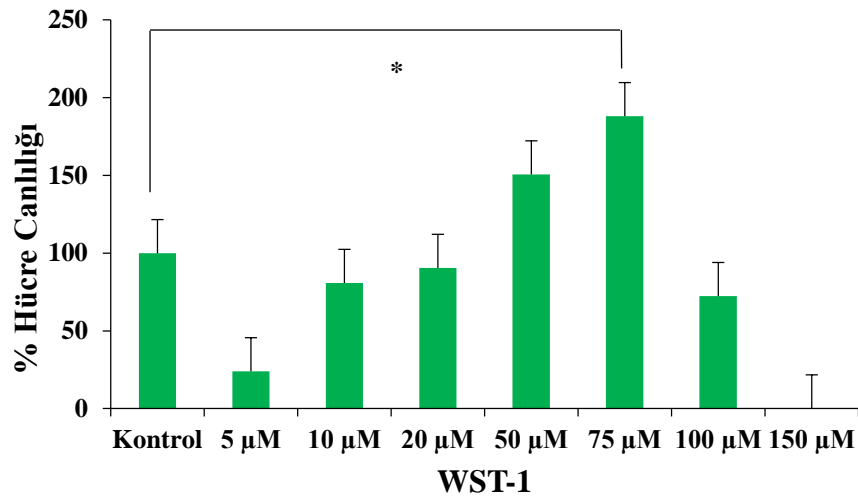
4.2.1. WST-1 Analizi ile Hücre Canlılık ve Çoğalmasının Tespiti

Değişen konsantrasyon değerlerinde H_2O_2 'nin hücre bölünmesi ve canlılığı üzerine etkisini araştırmak için WST-1 (Water soluble tetrazolium-1)'den yararlanılmıştır. WST-1 deneyi gerçekleştirmek için kültür ortamı tamamen uzaklaştırılıp %10 WST-1 reaktifi içeren DMEM-F12 ile 1,5 saat karanlık ortamdan standart hücre kültürü koşullarında inkübe edilmiştir. Kör okuma olarak hücre içermeyen ancak WST-1 reaktifli besiyeri içeren kuyucuğun kullanıldığı deneyin sonucunda 75 µM H_2O_2 konsantrasyonunun eşik değeri olduğu ve bu konsantrasyon değerinden sonra canlılığın düşmeye başladığı

gözlenmiştir (Şekil 4.4.). H_2O_2 uygulamasının devamında oksidatif stres uygulanan hücreler kullanılarak bir organoid modelinin oluşturulması tez çalışması kapsamında hedeflenmektedir. Bu nedenle $75 \mu M$ H_2O_2 konsantrasyonunun uygun konsantrasyon değeri olduğuna kanaat getirilmiştir.



Şekil 4.3. sNKH'lara değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H_2O_2 uygulamasının ardından yapılan WST-1 deneyinin grafiği (* : $P < 0,05$).

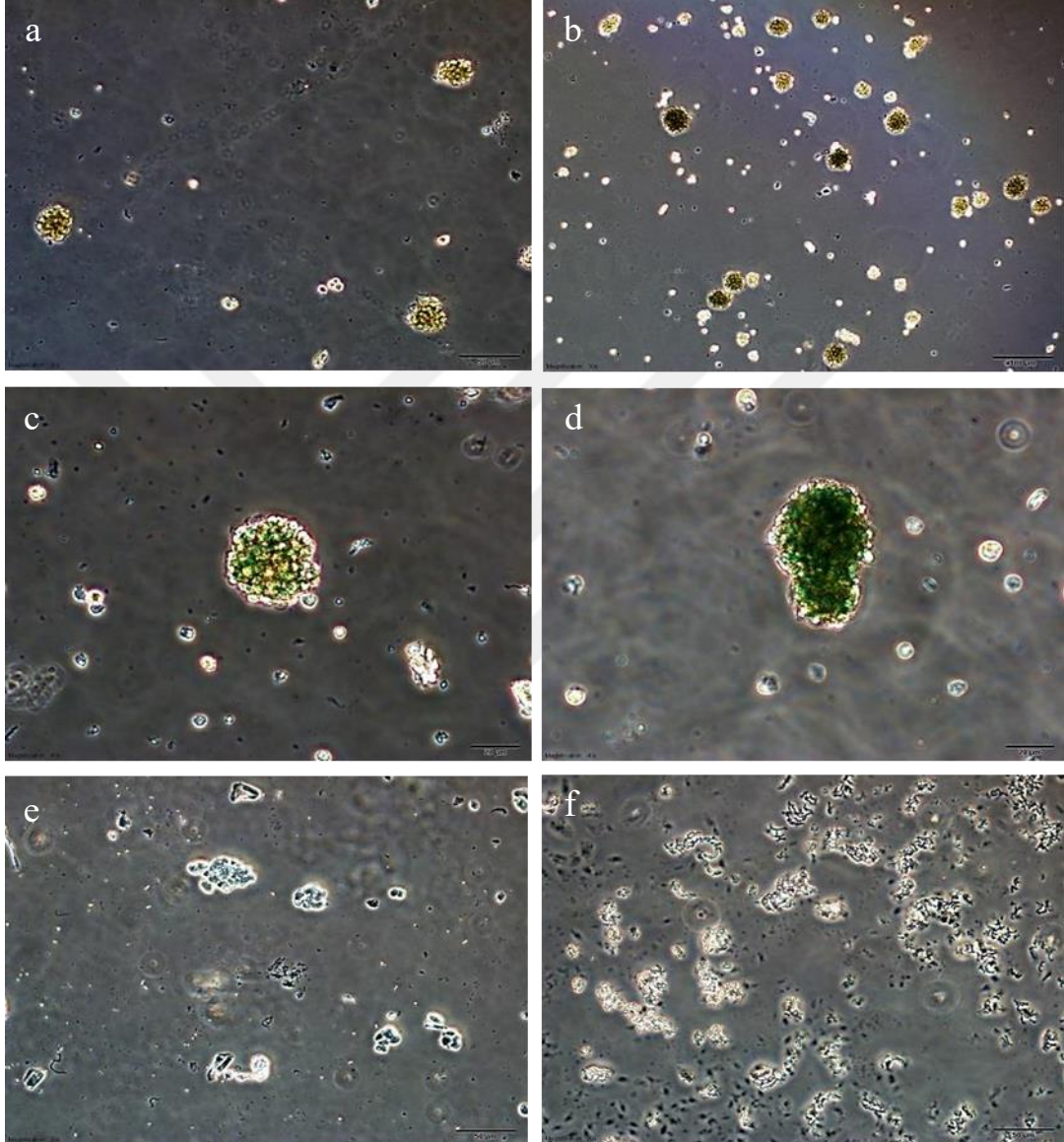


Şekil 4.4. sNKH'lara değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H_2O_2 uygulamasının ardından yapılan WST-1 deneyine dayalı hücre canlılığı grafiği (* : $P < 0,05$).

4.2.2. Beta Galaktosidaz Boyaması ile Yaşlanmanın Tespiti

$5 \mu M$ ' dan $150 \mu M$ 'a kadar değişen konsantrasyon da H_2O_2 'nin meydana getirdiği hücresel yaşlanmanın saptanması için beta galaktosidaz boyama yönteminden yararlanılmıştır.

Yöntem, artan lizozomal β -galaktosidaz enzim aktivitesinin tanımlanmasına dayanır. Normal koşullar altında hücreler, lizozomda β -galaktosidaz enzimini üretirler. Ancak, yaşlanma ile birlikte hücrelerde lizozomal kütle artar, bu nedenle yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidaz miktarındaki artış kullanılan bu yöntem ile mavi-yeşil bir leke olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.).



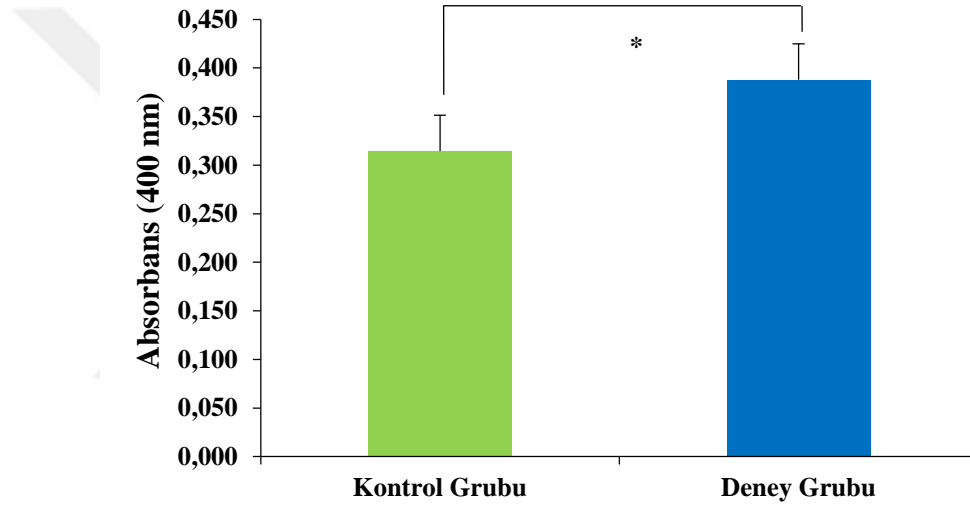
Şekil 4.5.sNKH'lara değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H_2O_2 uygulamasının ardından yapılan beta galaktosidaz boyamasının mikroskopik görüntüsü. (a) kontrol grubu, (b) 5 μM , (c) 20 μM , (d) 75 μM , (e) 100 μM , (f) 150 μM H_2O_2 konsantrasyonunu göstermektedir. Ölçek çubukları (b) 100 μm , (a,e,f) 50 μm , (c,d) 20 μm .

Değişen konsantrasyonda H_2O_2 maruziyetini takiben yapılan beta galaktosidaz boyamasının görüntüleri incelendiğinde, artan konsantrasyon değerlerinde yoğunlaşan bir boyama gözlemlenmiştir. 75 μM H_2O_2 konsantrasyon değeri boyamanın en yoğun olduğu

değer olarak gözlemlenmiştir. Bu değer üzerindeki H₂O₂ konsantrasyonlarının hücrede letal etki oluşturduğu boyama sonucu görülmüştür (Şekil 4.5).

4.2.3. Beta Galaktosidaz Boyamasının Spektrofotometrik Analizi

Süspansiyon kültür koşullarında gerçekleştirilen beta galaktosidaz boyamasının spektrofotometrede 400 nm dalga boyunda gerçekleştirilen analizi sonucunda oksidatif stres oluşturmak için kullanılan 75 µM H₂O₂ konsantrasyonunun, kontrol grubundaki hücrelere kıyasla uygulandığı hücrelerde hücresel yaşlanmayı indüklediği ve bu nedenle H₂O₂ uygulanan hücre grubundaki beta galaktosidaz boyamasının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu teyit edilmiştir (Şekil 4.6).

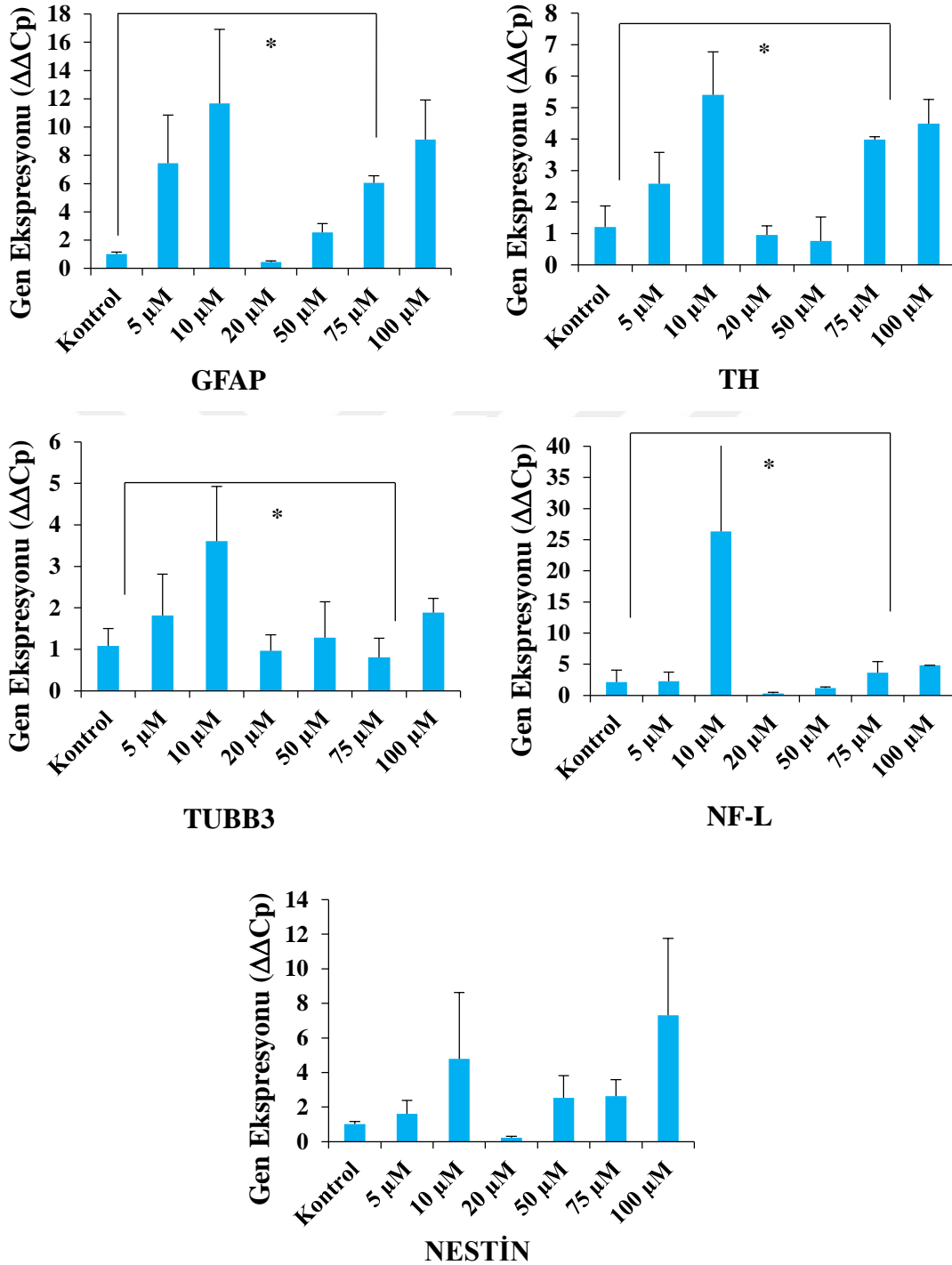


Şekil 4.6. sNKH'ların 75 µM H₂O₂ ile 30 dk kültürü sonrası yapılan beta galaktosidaz boyamasının spektrofotometrik analizinin grafiği (* : P<0,05).

4.2.4. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadelerinin Analizi

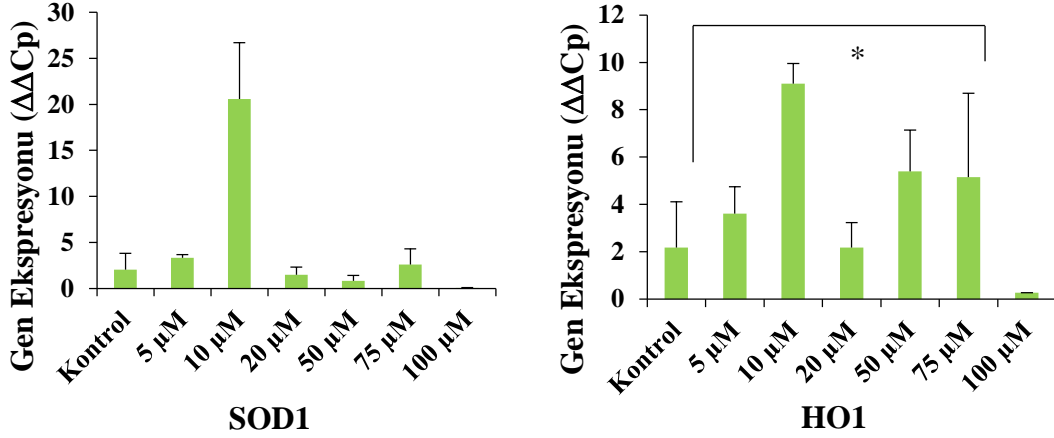
İki boyutlu kültür koşullarında hidrojen peroksit uygulamasının ardından toplanan örneklerde spesifik belirteçlerin analizleri Real Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. Uygulanan hidrojen peroksit dozlarının farklılaşma üzerine etkisini ortaya koymak adına GFAP, Nestin, TH, NF-L ve TUBB3 genlerinin primerleri, oksidatif stres ile ilişkili olarak SOD1 ve HO1 genlerinin primerleri, oksidatif stresin hücresel sağ kalım üzerine etkisinin tespiti için BDNF ve CNTF genlerinin primerleri, proliferasyon ile ilişkili olarak ta Ki67 genine ait primer ile Real Time PCR deneyi yapılmıştır. Kontrol (housekeeping gen) olarak β-Aktin genine ait primer kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar iki boyutlu kültür

ortamında farklılaşma belirteçlerinin ifadelerinin 10 μM H_2O_2 konsantrasyonunda arttığı, 20 μM 'da azalma gösterdiği ve sonrasında artan konsantrasyon değerlerinde (75 μM ve 100 μM) ikincil artış profili sergilediği şeklinde yorumlanmıştır (Şekil 4.7.).



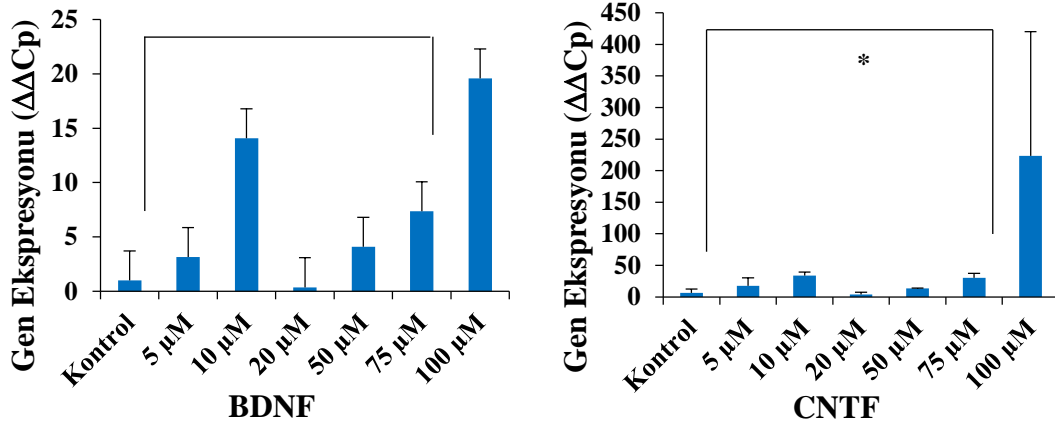
Şekil 4.7. sNKH'ların değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H_2O_2 uygulamasının ardından konsantrasyona bağlı olarak GFAP, TH, Tubb3, NF-L ve NESTİN belirteçlerinin ifade düzeylerinin incelenmesi. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır (* : $P < 0,05$).

Oksidatif stres ile ilişkili SOD1 ve HO1 genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, 10 μM H_2O_2 konsantrasyonunun büyük artış sergilediği, 20 μM da azaldığı, 50 μM ile 75 μM konsantrasyon değerlerinde tekrar artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.8.).



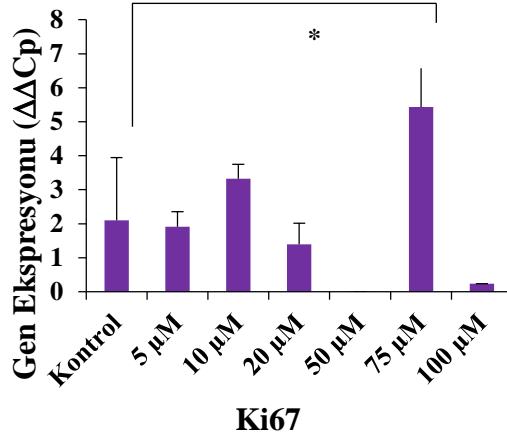
Şekil 4.8. sNKH'ların değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H_2O_2 uygulamasının ardından konsantrasyona bağlı olarak oksidatif stres belirteçlerinden SOD1 ve HO1'in ifade düzeylerinin incelenmesi. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır (* : $P < 0,05$).

Değişen konsantrasyonlarda uygulanan H_2O_2 'nin meydana getirdiği oksidatif stresin hücre sel sağ kalım üzerine etkisinin tespiti için BDNF ve CNTF genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde 10 μM H_2O_2 'nin hücrede bir stres meydana getirdiği ve bu stres ile ilişkili olarak sağ kalım genlerinin ekspresyonlarında bir artış olduğu görülmüştür. Uygulanan 20 μM H_2O_2 konsantrasyonunda bu genlerin ifadelerinin azaldığı 50 μM ve 75 μM H_2O_2 konsantrasyonları için ifadelerin tekrar yükseliş sergilediği görülmüştür. 100 μM da oldukça yüksek bir ekspresyon göstermiş olup bu konsantrasyon değerinin hücrede stres oluşturmaktan çok letal etkiye yol açtığı şeklinde yorumlanmıştır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. sNKH'ların değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H₂O₂ uygulamasının ardından konsantrasyona bağlı olarak BDNF ve CNTF belirteçlerinin ifade düzeylerinin incelenmesi. Referans gen olarak β-Aktin kullanılmıştır (* : P<0,05).

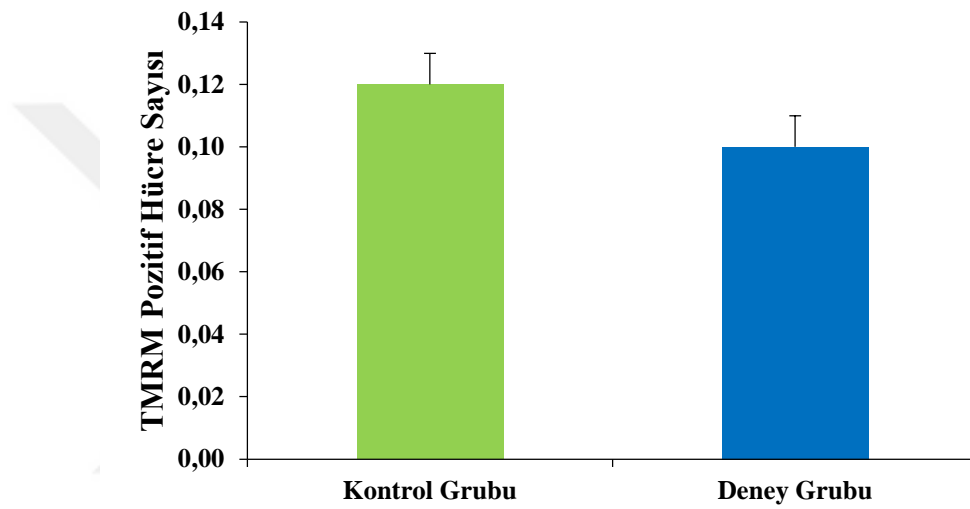
Hidrojen peroksidin değişen konsantrasyon değerlerinde hücre proliferasyon çoğalması üzerine etkisini belirlemek için Ki67 geninin ekspresyonu incelendiğinde 10 μM H₂O₂ konsantrasyonunda ifadenin arttığı, 20 μM 'da azalma gösterdiği ve 50 μM 'da görülmediği sonrasında 75μM H₂O₂ konsantrasyonunda ikincil artış profili sergilediği şeklinde yorumlanmıştır (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. sNKH'ların değişen konsantrasyon değerlerinde 30 dk H₂O₂ uygulamasının ardından konsantrasyona bağlı olarak proliferasyon belirteçlerinden olan Ki67'nin ifade düzeylerinin incelenmesi. Referans gen olarak β-Aktin kullanılmıştır (* : P<0,05).

4.2.5. TMRM Boyası ile Mitokondriyal Membran Potansiyelindeki Değişimin Tespit Edilmesi

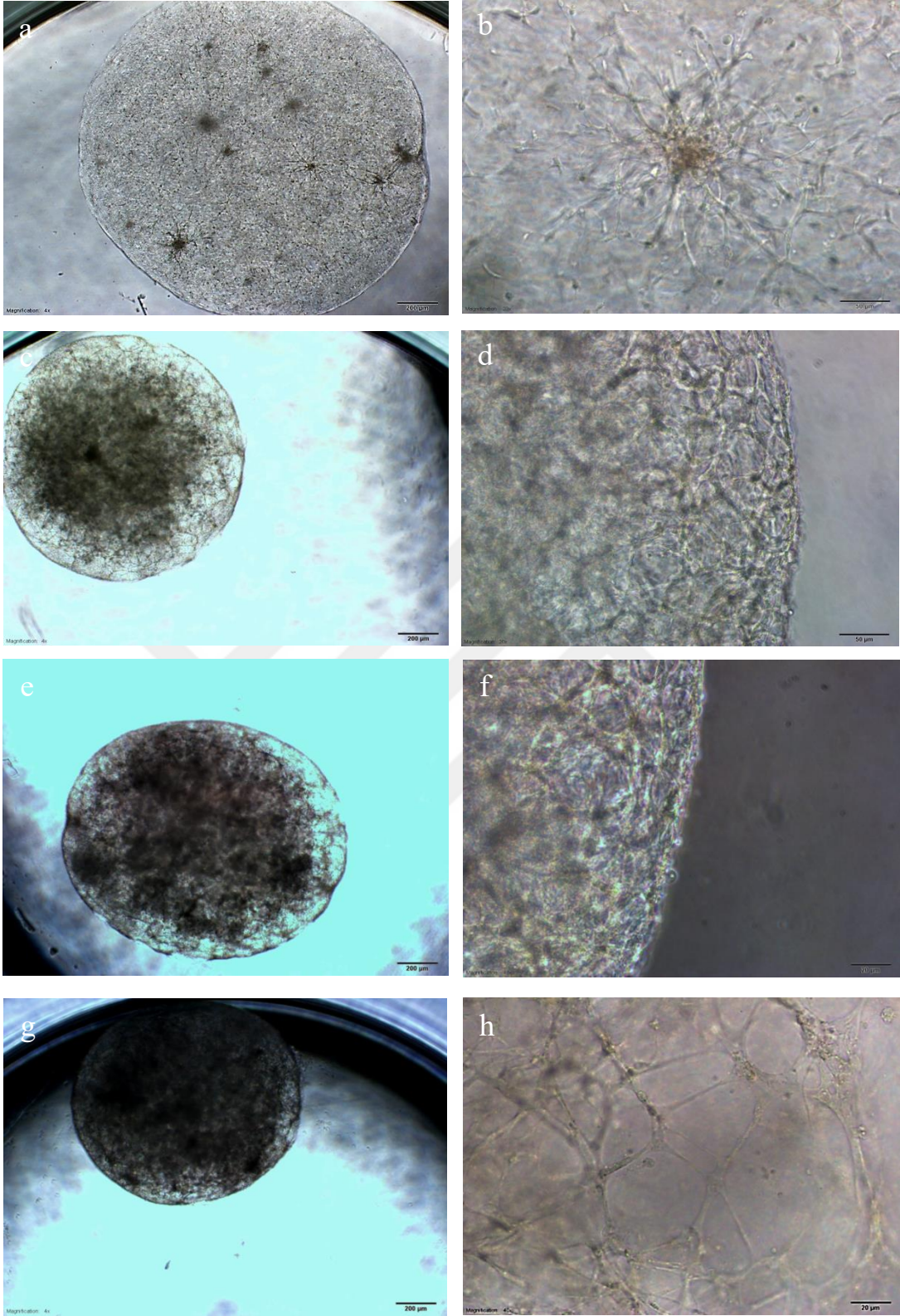
Hücre mitokondrilerindeki membran potansiyellerinde, H₂O₂ uygulaması nedeni ile meydana gelen değişimlerin tespiti için katyonik floresan bir boya olan TMRM boyası kullanılarak işaretleme yapılmıştır. Boyamayı takiben yapılan flow sitometrik analiz sonucunda kontrol grubundaki hücrelerin, 75 µM H₂O₂ uygulanmış hücrelere kıyasla membran potansiyelinde meydana gelen değişimleri ortaya koyan TMRM boyası ile daha fazla boyandığı gözlenmiştir (Şekil 4.11.).



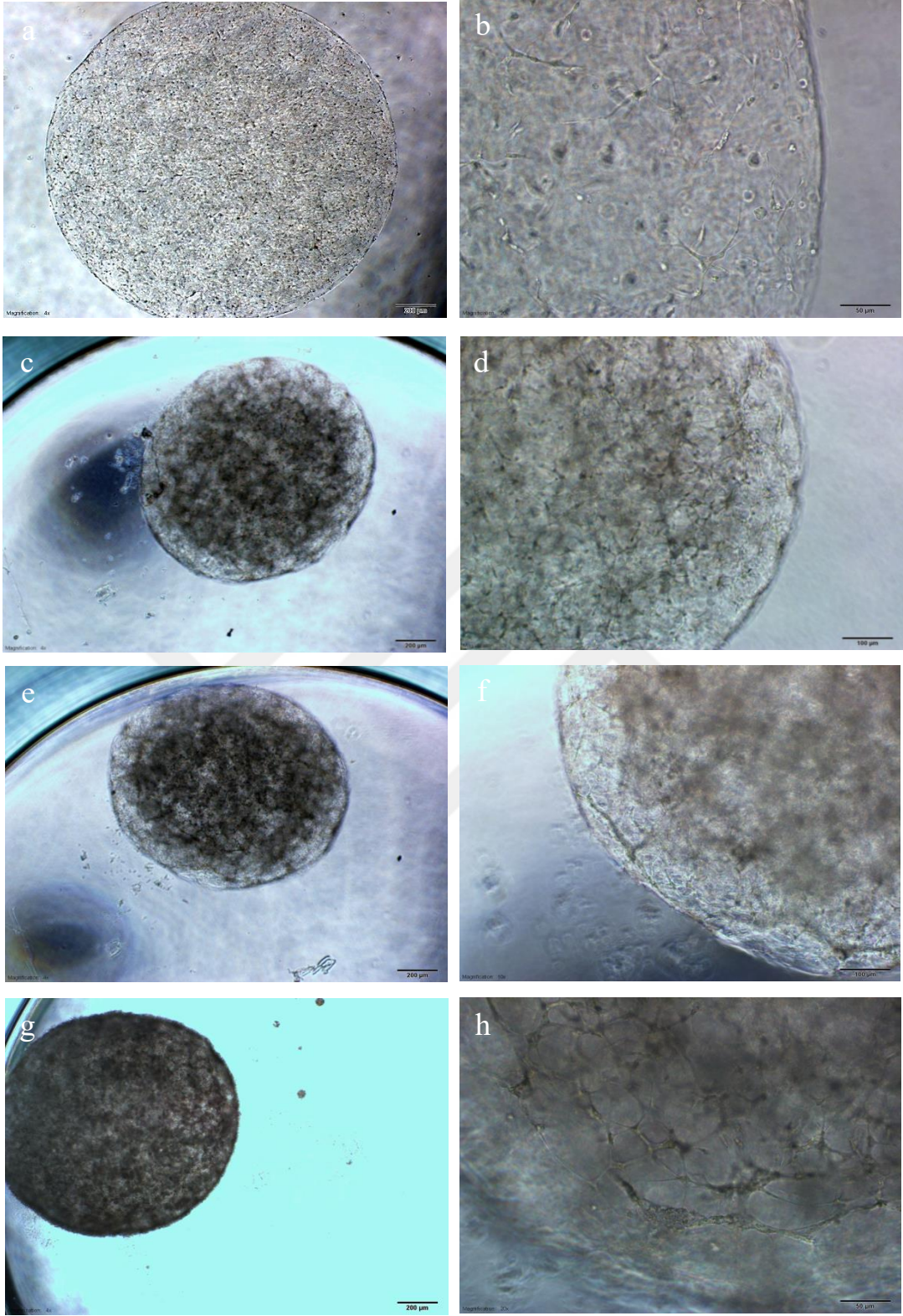
Şekil 4.11. sNKH'ların 75 µM H₂O₂ ile 30 dk kültürü sonrası yapılan TMRM Boyamasının flow sitometrik analizinin grafiği

4.3. Oksidatif Stres Oluşturulan NKH'lar ile Organoid Modellerinin Oluşturulması

Mekanik yöntem ile hücre süspansiyonu haline getirilen NKH'lar, 75 µM hidrojen peroksit içeren besiyeri ile 37 °C 'de 30 dk inkübe edilmiştir. Sürecin sonunda hücreler matrijel ile karıştırılmış ve non-adhesive 96 kuyucuklu kültür kabına eklenmiştir. Oluşturulan organoidler, 28 gün boyunca hücre kültüründe kültüre edilmiştir. Bu süreçte hücrelerde B27 ile ektodermal farklılaştırma uyarılmıştır. Organoid kültüründe besiyeri içeriğinde nöral eklenti, B27 eklentisi, N2 eklentisi, EGF (10 ng/ml), glutamax ve %1 pen/strep yer alan DMEM F12 besiyeri kullanılmıştır. Kültür sürecinde 3 günde bir düzenli olarak besiyeri yenilenmiştir.



Şekil 4.12. Kontrol sNKH'lar ile oluşturulan organoid modellerinin ışık mikroskobu görüntüleri **(a,b)** 1. Gün, **(c,d)** 9. Gün, **(e,f)** 16. Gün, **(g,h)** 28. Gün. Ölçek çubukları: **(a,c,e,g)** 200 µm, **(b,d,f)** 50 µm, **(h)** 20 µm.



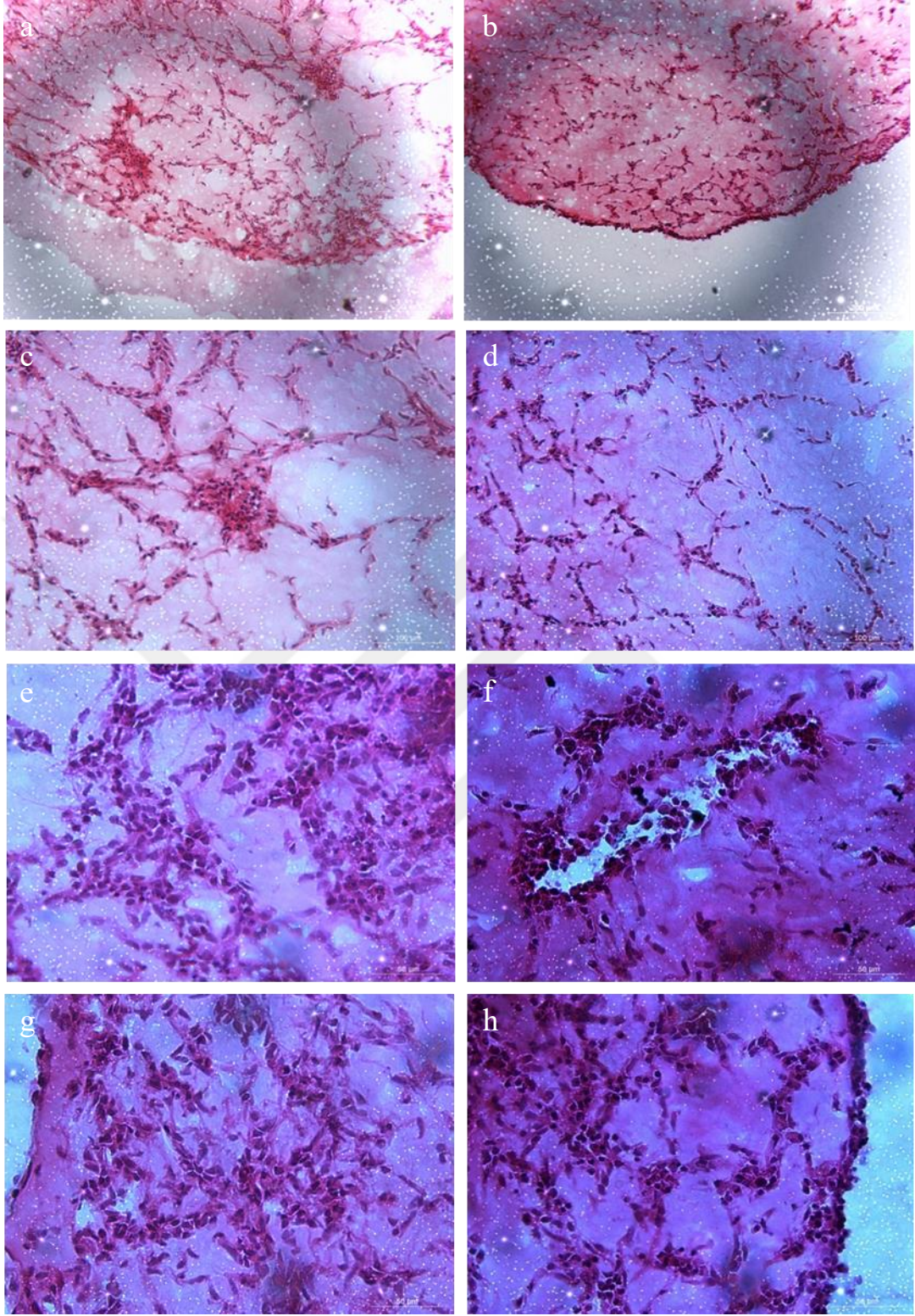
Şekil 4.13. sNKH'ların 75 μM H_2O_2 ile 30 dk kültürü sonrası bu hücreler ile oluşturulan organoid modellerinin ışık mikroskobu görüntüleri (a,b) 1. Gün, (c,d) 9. Gün, (e,f) 16. Gün, (g,h) 28. Gün. Ölçek çubukları: (a,c,e,g) 200 μm , (b,d,f,h) 50 μm .

Organoid modelleri kültür sürecinde sistematik olarak incelenmiştir. Kültürün erken evrelerinde kontrol grubu organoid modelindeki hücrelerin küme oluşturma eğilimleri görülmüştür (**Şekil 4.13.**). Hücrelerin H₂O₂ muamelesini takiben organoid oluşturmak için kullanıldığı modelde ise bu tarz bir eğilim gözlenmemiştir (**Şekil 4.12.**). Kültür sürecinin ortalarında kontrol grubu organoidlerinin merkezde yoğunlaşan bir hücre dağılımı nedeniyle karanlık bir merkeze ve kıyasla aydınlık bir çepere evrildiği gözlenmiştir (**Şekil 4.13.**).

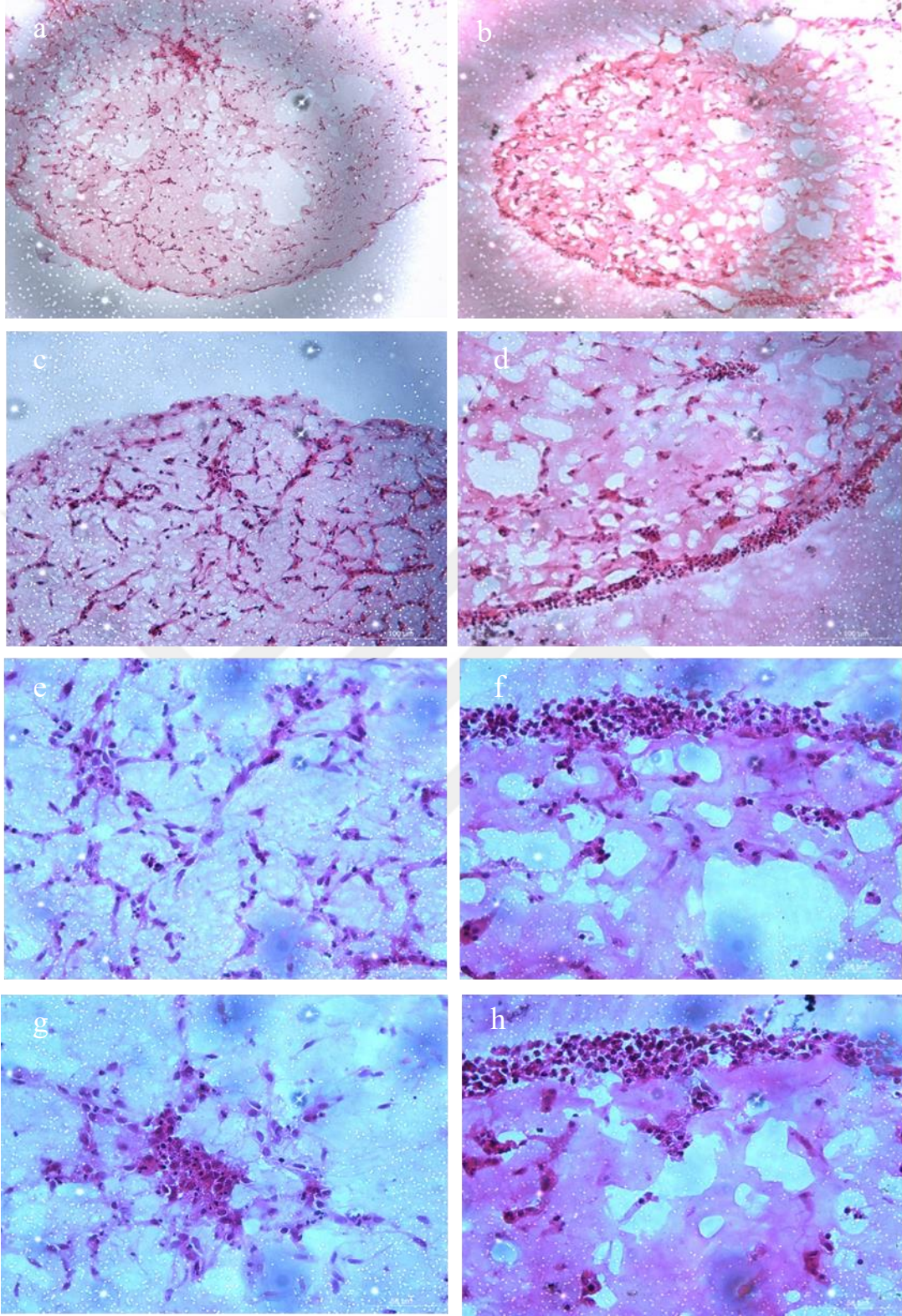
4.3.1. Organoid Modellerinin Hematoksilen ve Eozin Boyanması

Oluşturulan organoidler, %7,5 jelatin ve %10 sukroz ile hazırlanan gömme solüsyona gömülerek kriyomikrotom cihazı kullanılarak 15 µm'lik kesitler alınmıştır. Bu kesitler histolojik incelemelerde sıklıkla kullanılan Hematoksilen ve Eozin (HE) boyama ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

75 µM H₂O₂ ile oksidatif stres uyarılan hücreler ile oluşturulan organoid modellerinde, hücrelerin merkezden çepere doğru bir hücre göçü gerçekleştirdikleri ve burada yoğunlaştıkları gözlenmiştir. Kontrol grubu organoid modelinde hücrelerin kültür şartlarına benzer bir dağılım içerisine girerek nöroküre benzeri büyük hücre kümeleri oluşturma eğilimi gösterdiği gözlenmiştir (**Şekil 4.14.**). Hidrojen peroksit uygulanan hücreler ile oluşturulan organoid modellerinde ise hücrelerin bu tarz kümeler oluşturmadıkları tespit edilmiştir (**Şekil 4.14.**).



Şekil 4.14. Kontrol hücreler ile oksidatif stres uygulanmış sNKH'lar kullanılarak oluşturulan organoid modellerinin 14. gün hematoxilen ve eosin boyaması ışık mikroskobu görüntüleri. (a,c,e,g) kontrol, (b,d,f,h) deney grubu organoid modeli. Ölçek çubukları: (a,b,c,d) 200 µm,(e,f,g,h) 50 µm.



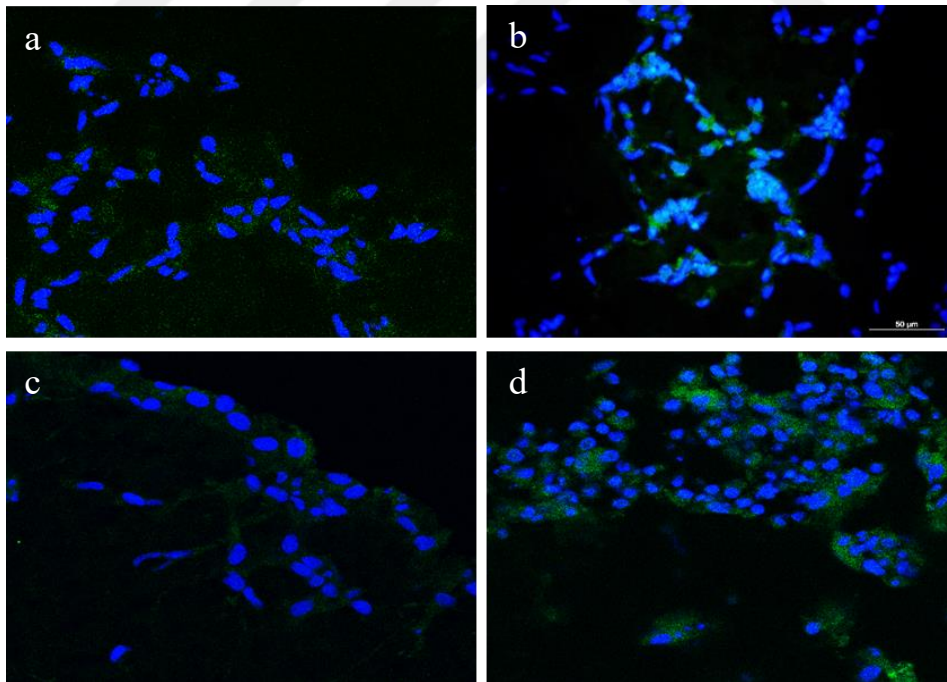
Şekil 4.15. Kontrol hücreler ile oksidatif stres uygulanmış sNKH'lar kullanılarak oluşturulan organoid modellerinin 28. gün hematoksilen ve eosin boyaması ışık mikroskobu görüntüleri. **(a,c,e,g)** kontrol, **(b,d,f,h)** deney grubu organoid modeli. Ölçek çubukları: **(a,b,c,d)** 200 µm, **(e,f,g,h)** 50 µm.

Kültürün 28. gününde sonlandırılarak analizi gerçekleştirilen organoid modellerini hematoksilin ve eozin görüntüleri incelendiğinde ise kontrol grubu organoid modeli içerisinde hücrelerin modelin sınırlarından çok merkezde toplanma eğilimi içerisinde oldukları gözlenmiştir (**Şekil 4.15.**). 75 μM H_2O_2 uygulanan hücreler ile oluşturulan modelde ise hücrelerin merkezi boş bırakacak şekilde organoid modelinin sınırlarında yığınlar halinde toplandıkları gözlemlenmiştir (**Şekil 4.15.**).

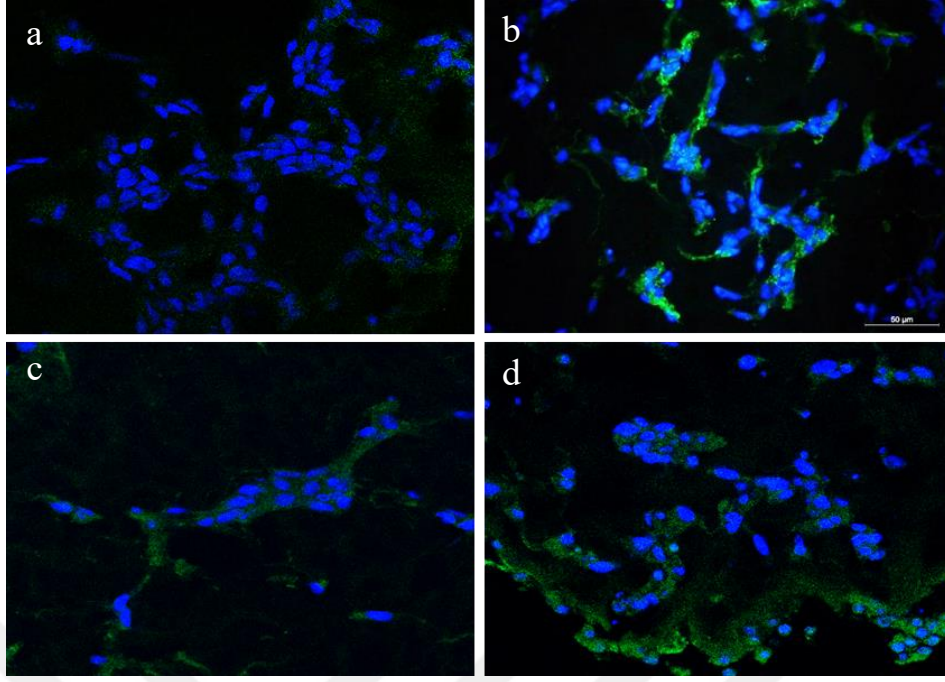
4.3.2. İmmüno Floresan Boyama

Kriyomikrotom cihazı kullanılarak 15 μm kalınlığında alınan kesitlerde hedeflenen antijene özgü primer antikor ile bu primere spesifik ışığa sağlayan sekonder antikorun kullanıldığı immün floresan bir boyama gerçekleştirilmiştir.

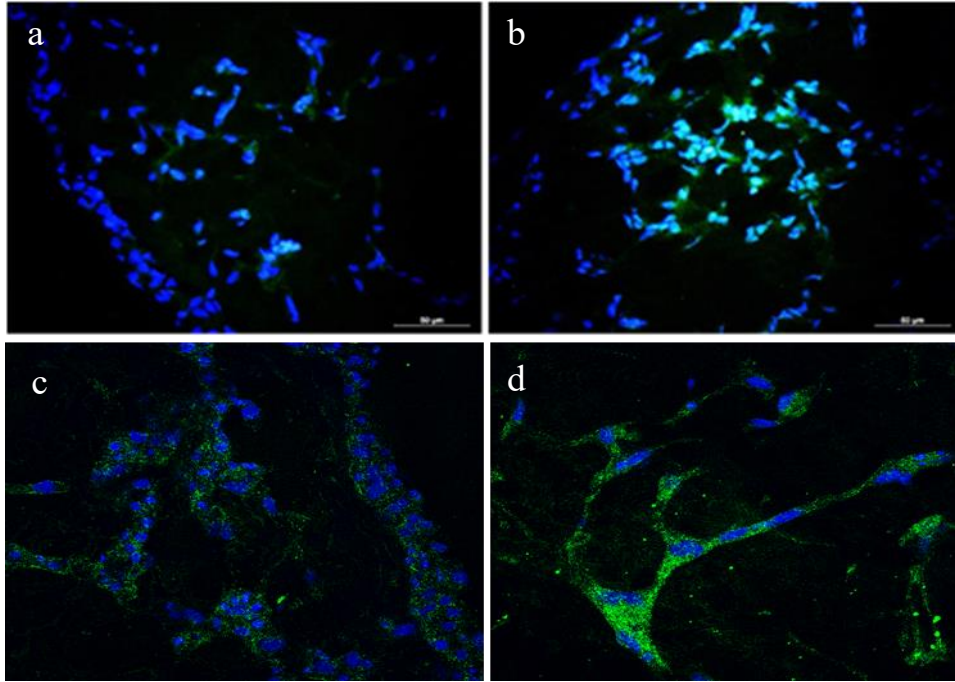
GFAP boyaması için H_2O_2 uygulanan hücreler ile oluşturulan 14. gün ve 28. gün organoid modellerinde boyamanın kontrol grubuna kıyasla daha yoğun olduğu görülmüştür. 14. ve 28. gün modelleri kıyaslandığında ise boyamanın 28. gün modellerinde 14. güne kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (**Şekil 4.16.**).



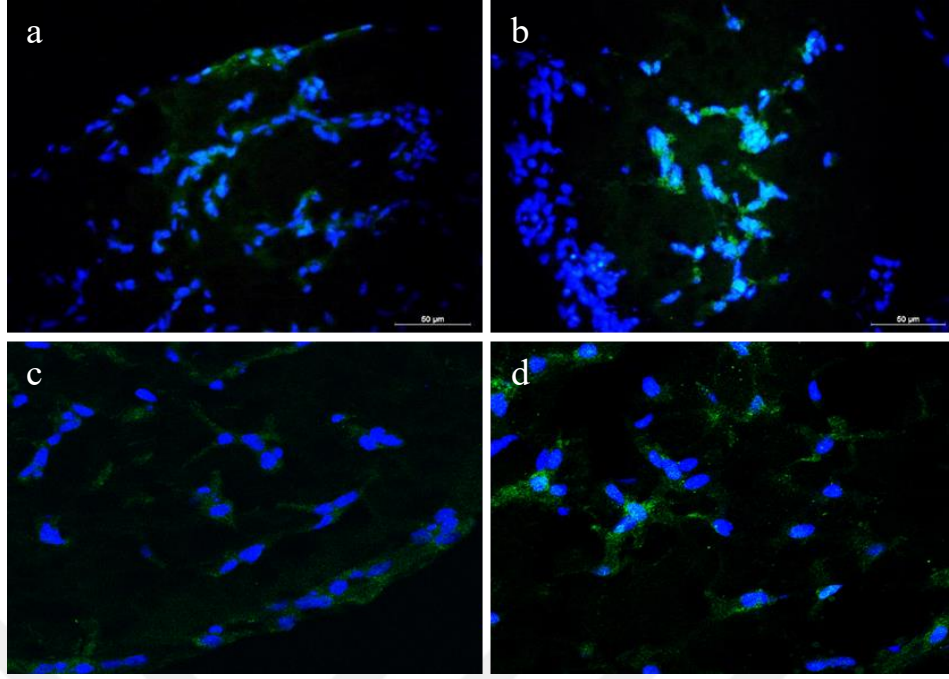
Şekil 4.16. Organoid modellerinde GFAP belirteci immüno floresan boyama görüntüsü (**a**) 14. gün kontrol grubu, (**b**) 14. gün H_2O_2 uygulanan grup, (**c**) 28. gün kontrol grubu, (**d**) 28. gün H_2O_2 uygulanan grup. (**a,b**) Floresan, (**c,d**) Konfokal mikroskop fotomikrografi. Ölçek çubuğu: 50 μm .



Şekil 4.17. Organoid modellerinde MAP2 belirteci immünfloresan boyama görüntüsü **(a)** 14. gün kontrol grubu, **(b)** 14. gün H₂O₂ uygulanan grup, **(c)** 28. gün kontrol grubu, **(d)** 28. gün H₂O₂ uygulanan grup. **(a,b)** Floresan, **(c,d)** Konfokal mikroskop fotomikrografı. Ölçek çubuğu: 50 µm.

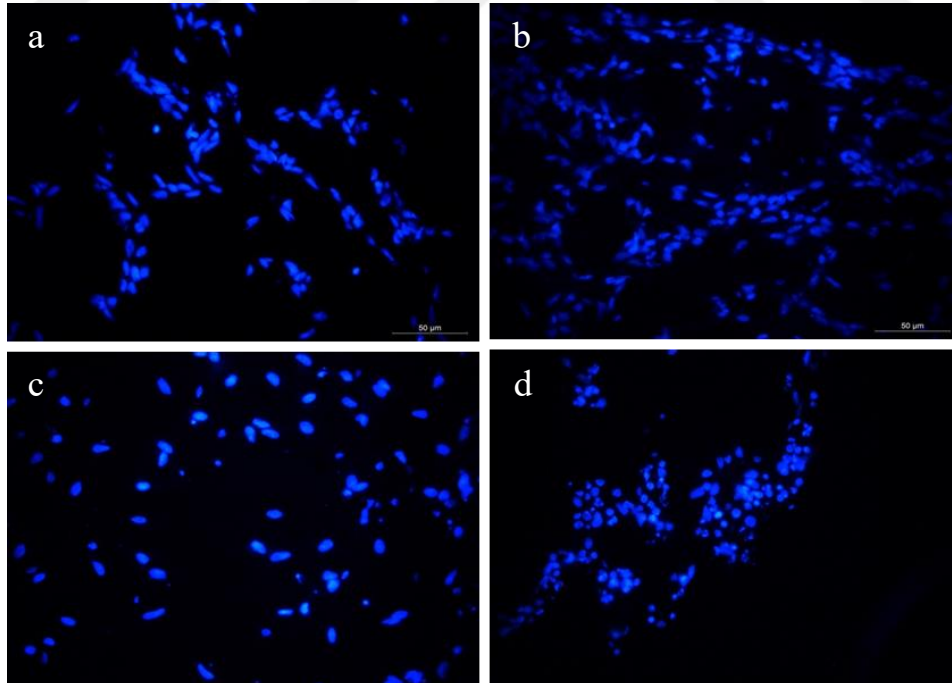


Şekil 4.18. Organoid modellerinde Tübülün Beta III belirteci immünfloresan boyama görüntüsü **(a)** 14. gün kontrol grubu, **(b)** 14. gün H₂O₂ uygulanan grup, **(c)** 28. gün kontrol grubu, **(d)** 28. gün H₂O₂ uygulanan grup. Ölçek çubukları: **(a,b)** 50 µm, **(c,d)** 20 µm.

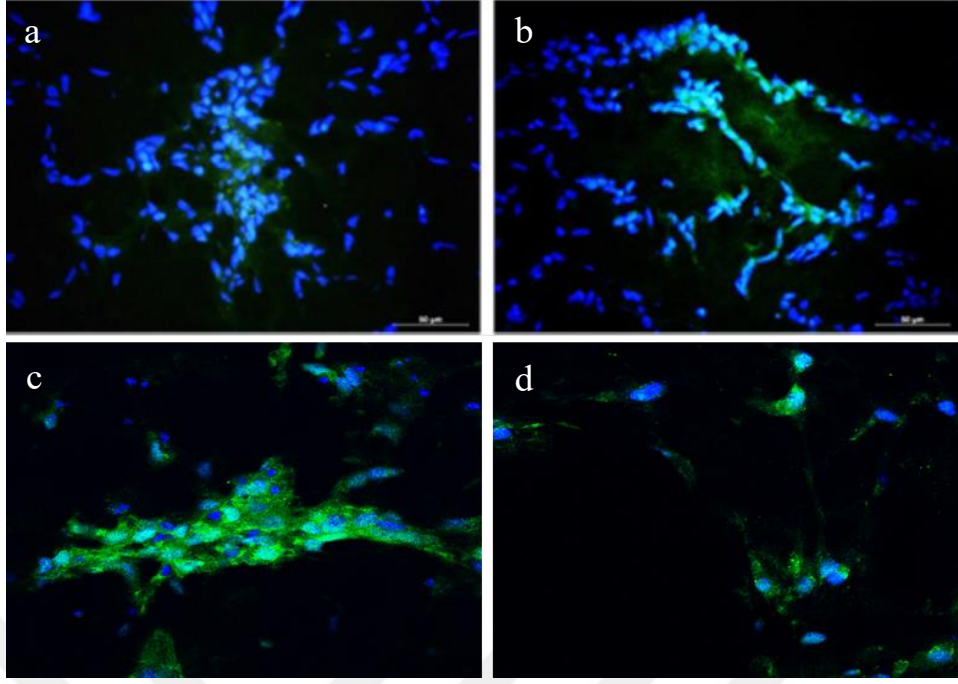


Şekil 4.19. Organoid modellerinde NG2 belirteci immünfloresan boyama görüntüsü **(a)** 14. gün kontrol grubu, **(b)** 14. gün H₂O₂ uygulanan grup, **(c)** 28. gün kontrol grubu, **(d)** 28. gün H₂O₂ uygulanan grup. Ölçek çubukları: **(a,b)** 50 µm, **(c,d)** 20 µm.

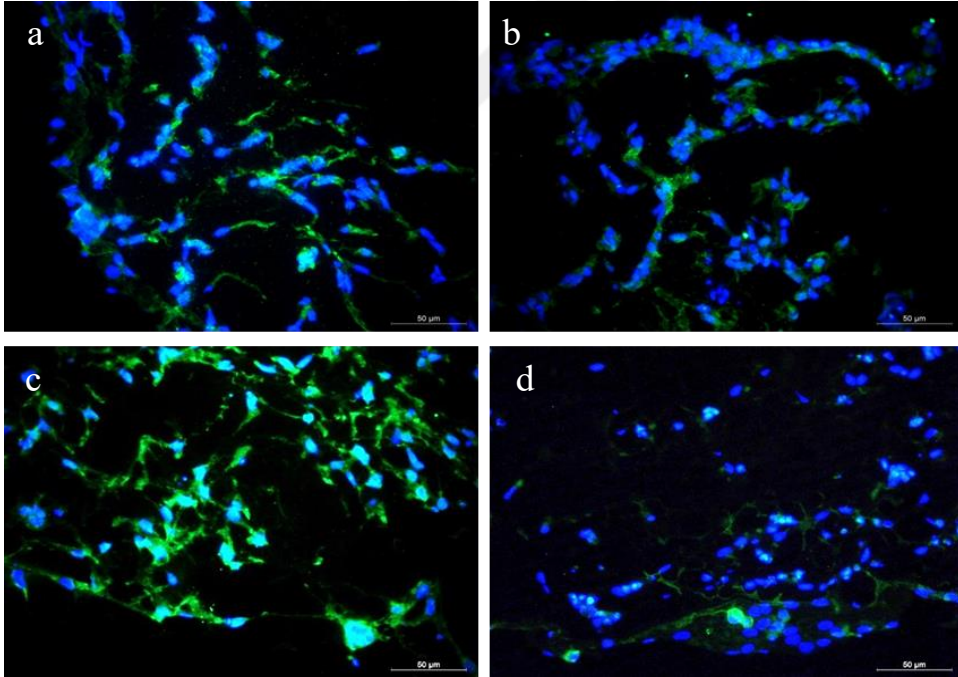
TH boyaması için 14. ve 28. gün organoid modellerinde herhangi bir boyamanın olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.20. Organoid modellerinde TH belirteci immünfloresan boyama görüntüsü **(a)** 14. gün kontrol grubu, **(b)** 14. gün H₂O₂ uygulanan grup, **(c)** 28. gün kontrol grubu, **(d)** 28. gün H₂O₂ uygulanan grup. Ölçek çubuğu: 50 µm.



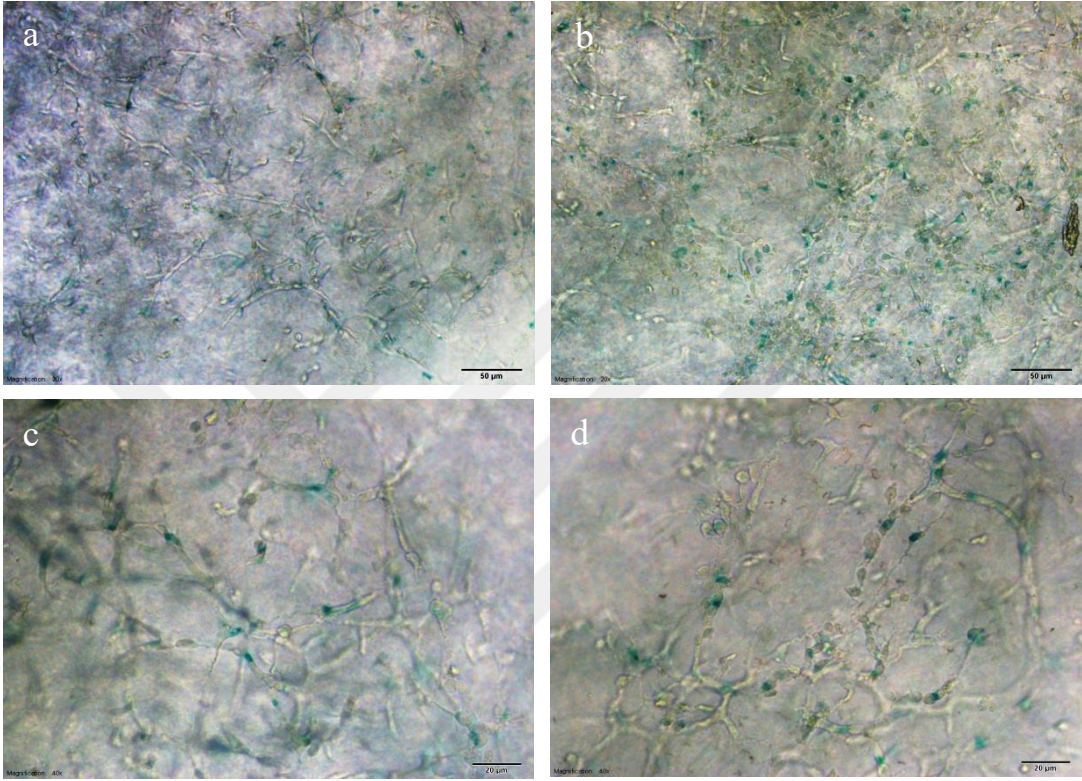
Şekil 4.21. Organoid modellerinde S100 belirteci immünfloresan boyama görüntüsü (a) 14. gün kontrol grubu, (b) 14. gün H₂O₂ uygulanan grup, (c) 28. gün kontrol grubu, (d) 28. gün H₂O₂ uygulanan grup. Ölçek çubukları: (a,b) 50 µm, (c,d) 20 µm.



Şekil 4.22. Organoid modellerinde Tau belirteci immünfloresan boyama görüntüsü (a) 14. gün kontrol grubu, (b) 14. gün H₂O₂ uygulanan grup, (c) 28. gün kontrol grubu, (d) 28. gün H₂O₂ uygulanan grup. Ölçek çubuğu: 50 µm.

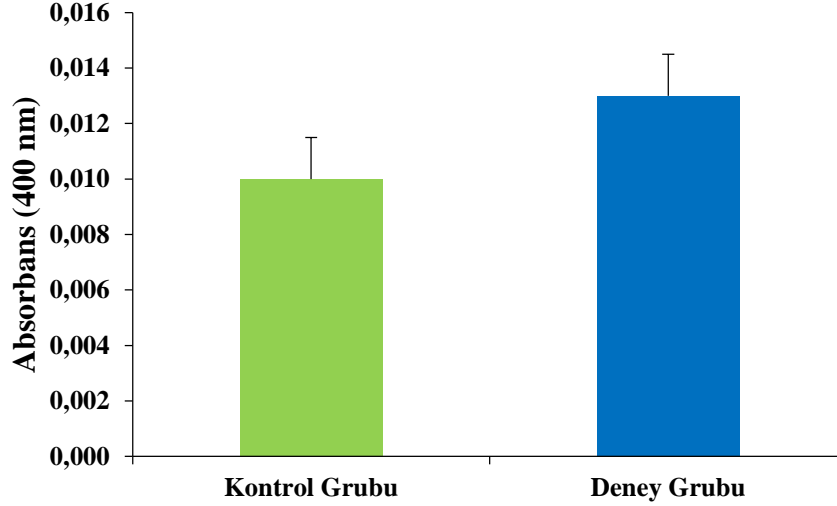
4.3.3. Organoid Beta Galaktosidaz Boyaması

Organoid kültürünün 4. gününde Beta galaktosidaz boyamasına tabi tutulan ve invert mikroskop altında gerçekleştirilen görüntüleme işlemin gerçekleştirilmiştir. Ardından organoid yapıları M-PER buffer çözeltisi ile parçalanarak hücre süspansiyonu haline getirilmiş ve spektrofotometre 400 nm dalga boyunca analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.23. Kontrol hücreler ile oksidatif stres uygulanmış sNKH'lar kullanılarak oluşturulan organoid modellerinin 4. gün beta galaktosidaz boyaması ışık mikroskobu görüntüleri. (a,c) kontrol, (b,d) deney grubu organoid modeli. Ölçek çubukları: (a,b) 50 µm, (c,d) 20 µm.

İnvert mikroskopta elde edilen görüntüler incelediğinde H₂O₂ uygulanan hücreler ile oluşturulan organoid modelinin, kontrol grubu organoid modeline kıyasla beta galaktosidaz boyası ile daha fazla boyandığı görülmüştür (Şekil 4.23.).



Şekil 4.24. Kontrol ve deney grubu organoidlerde kültürün 4. gününde yapılan beta galaktosidaz boyamasının spektrofotometrik analizinin grafiği.

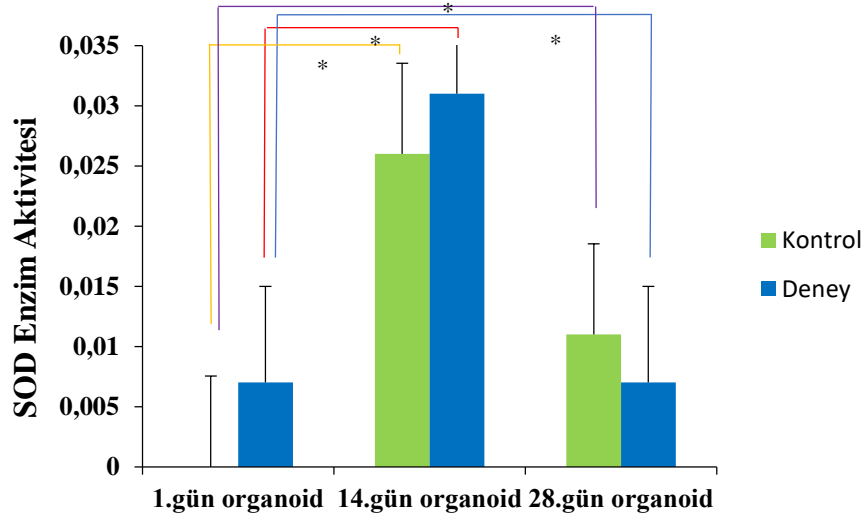
Gerçekleştirilen spektrofotometrik analiz sonucunda H_2O_2 aracılı oksidatif stres uygulanan hücreler ile oluşturulan organoid modelinin kontrol grubu organoid yapısına kıyasla hücreyel yaşlanmanın tespitinde kullanılan beta galaktosidaz boyası ile daha yoğun bir boyama sergilediği gözlenmiştir (Şekil 4.24.).

4.3.4. SOD Analizi ile Organoid Modellerindeki Oksidatif Stresin Tespiti

Deney gruplarında SOD aktivitesinin ortaya koyulması amacıyla kültür sürecinin 1. 14. ve 28. gününde toplanan organoidlerde SOD analiz kiti kullanılarak (EnzyChrom Superoxide Dismutase Assay Kit) hücrelerdeki süperoksit dismutaz seviyeleri belirlenmiştir (Şekil 4.25). Deney sonucunda 1. gün organoid modellerinde H_2O_2 uygulanan hücreler ile oluşturulan organoidlerde oksidatif stres kaynaklı SOD aktivitesinin yüksek olduğu, sağlıklı hücreler ile oluşturulan organoid modelinde SOD aktivitesinin görülmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.25).

14. gün organoid modellerinde, kontrol grubu modelinde hücrelerin merkezdeki lokalizasyonundan kaynaklı nekrotik bir bölgenin olduğu ve bunun neticesinde de SOD aktivitesinde 1. güne kıyasla bir artış olduğu gözlenmiştir. H_2O_2 uygulanan modeldeki SOD aktivitesinin 1. güne göre artış gösterdiği ve kontrol grubunun artan SOD aktivitesine rağmen kıyaslandığında bu grubun SOD aktivitesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25).

28. gün organoid modellerinde, her iki grup içinde SOD aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür. Kontrol grubunun SOD aktivitesi, merkezde toplanan hücrelerin oluşturmuş olduğu oksijensiz bölgedeki artış sebebi ile H₂O₂ uygulanan deney grubu organoid modelinin SOD seviyesinin üzerinde seyrettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.25).

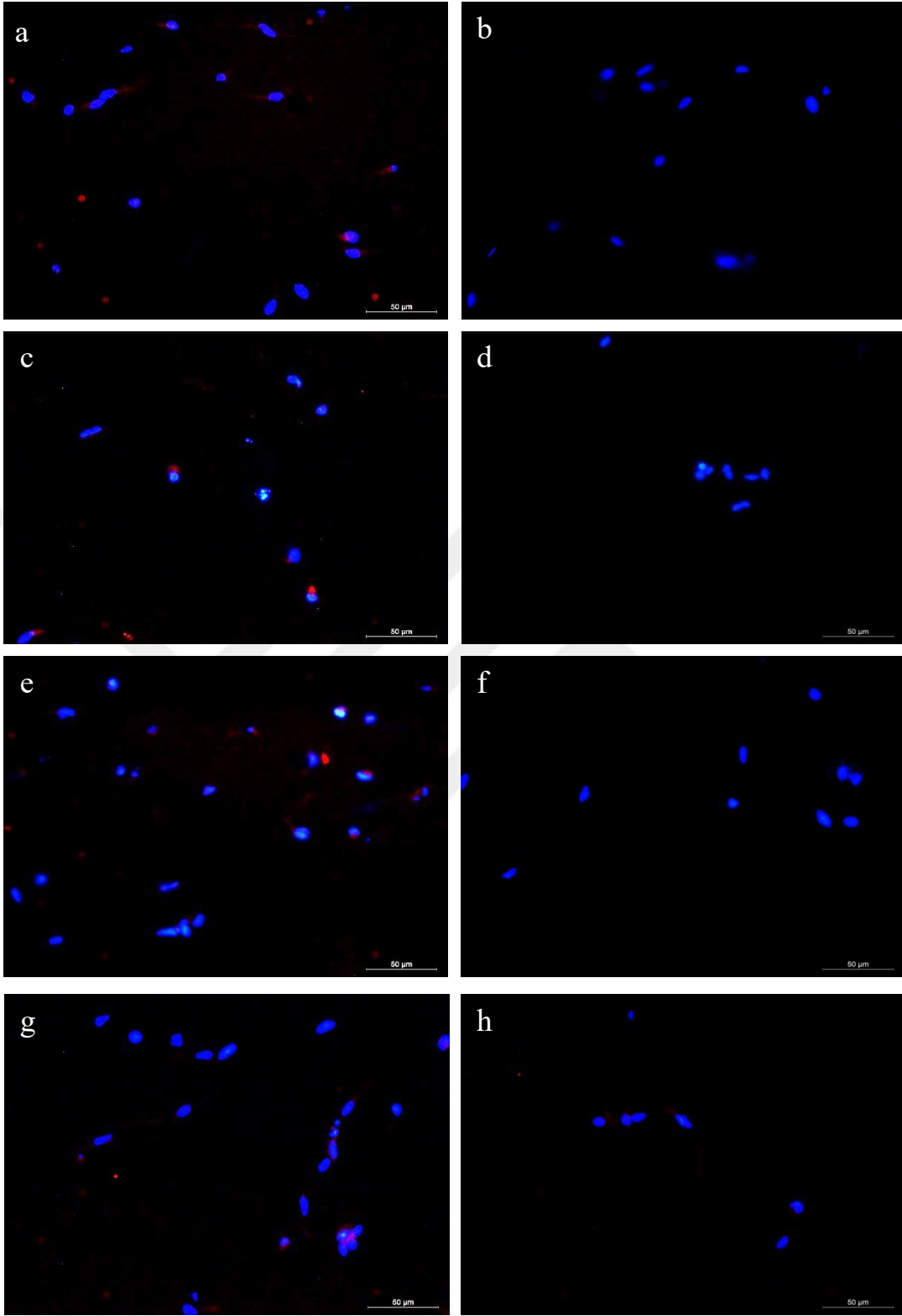


Şekil 4.25. Kontrol ve deney grubu organoid modellerinin 1., 14. ve 28. gün SOD aktivite grafiği (*: P<0,05).

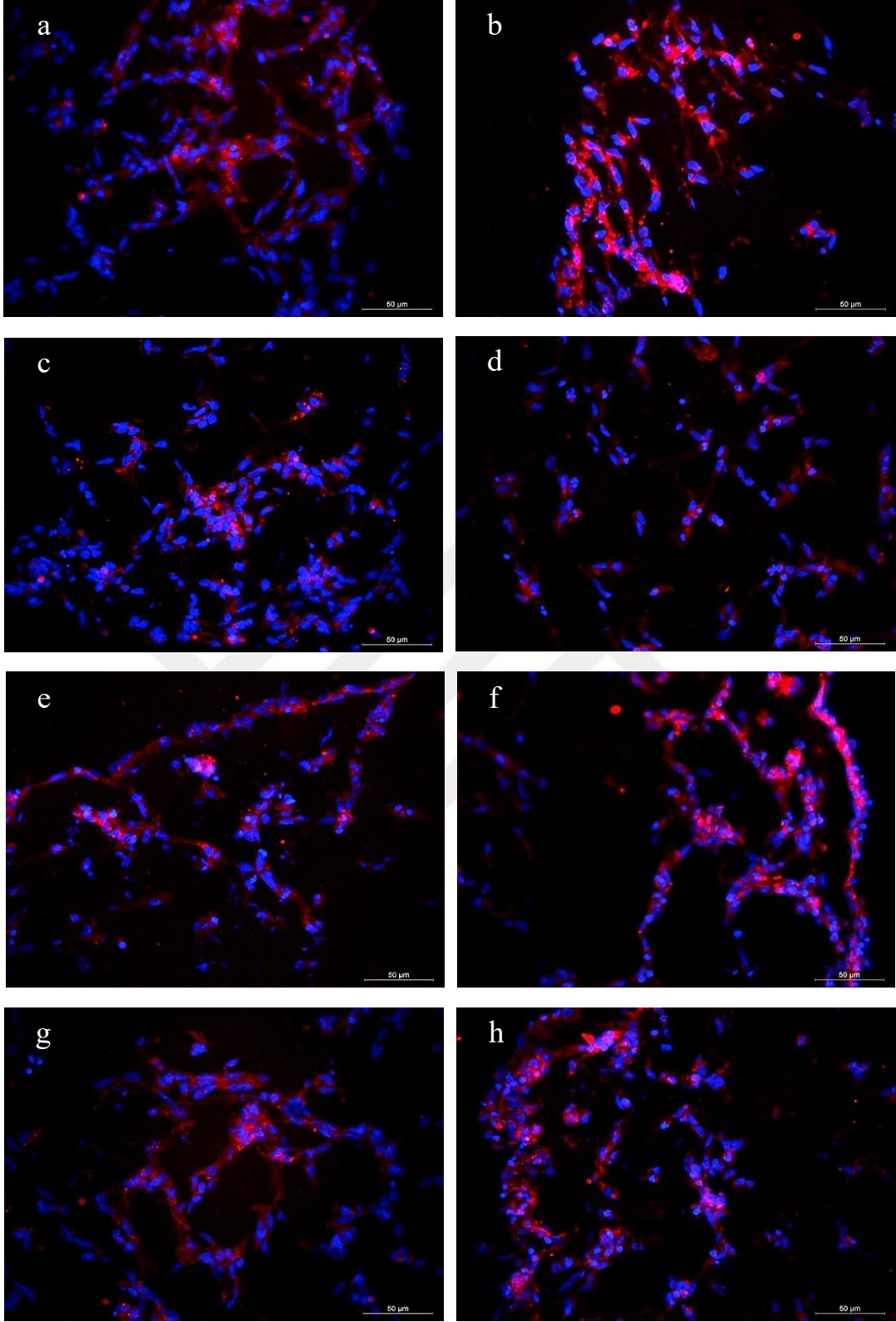
4.3.5. TMRM Boyası ile Organoid Modellerinde Mitokondri Membran Potansiyelinin Değerlendirilmesi

15 µm kalınlıkta alınan kesitlerde mitokondri membran potansiyeli değişiminin tespiti için katyonik floresan bir boya olan (TMRM), boyası kullanılarak yapılan floresan boyama gerçekleştirilmiştir.

1. gün organoid modellerinin TMRM boyaması incelendiğinde boyamanın deney grubunda kontrol grubuna kıyasla daha zayıf olduğu görülmüştür (Şekil 4.26.).

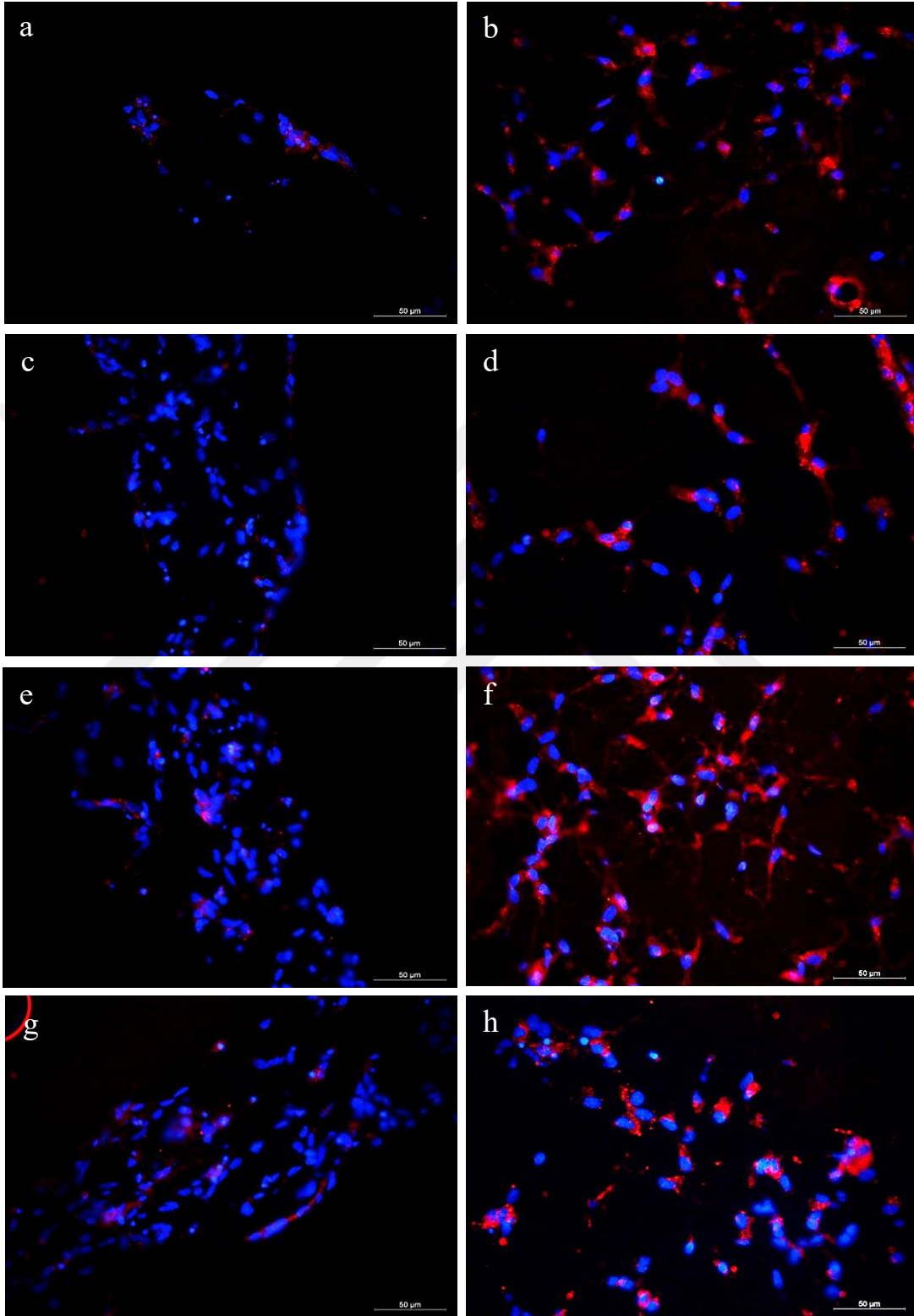


Şekil 4.26. 1. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin TMRM boyaması görüntüleri. (a,c,e,g) kontrol, (b,d,f,h) deney grubu organoid modelleri. Ölçek çubuğu: 50 µm.



Şekil 4.27. 14. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin TMRM boyaması görüntüleri. (a,c,e,g) kontrol, (b,d,f,h) deney grubu organoid modelleri. Ölçek çubuğu: 50 µm.

14. gün organoid modellerinin TMRM boyamasının deney grubunda ve kontrol grubunda benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.27.).

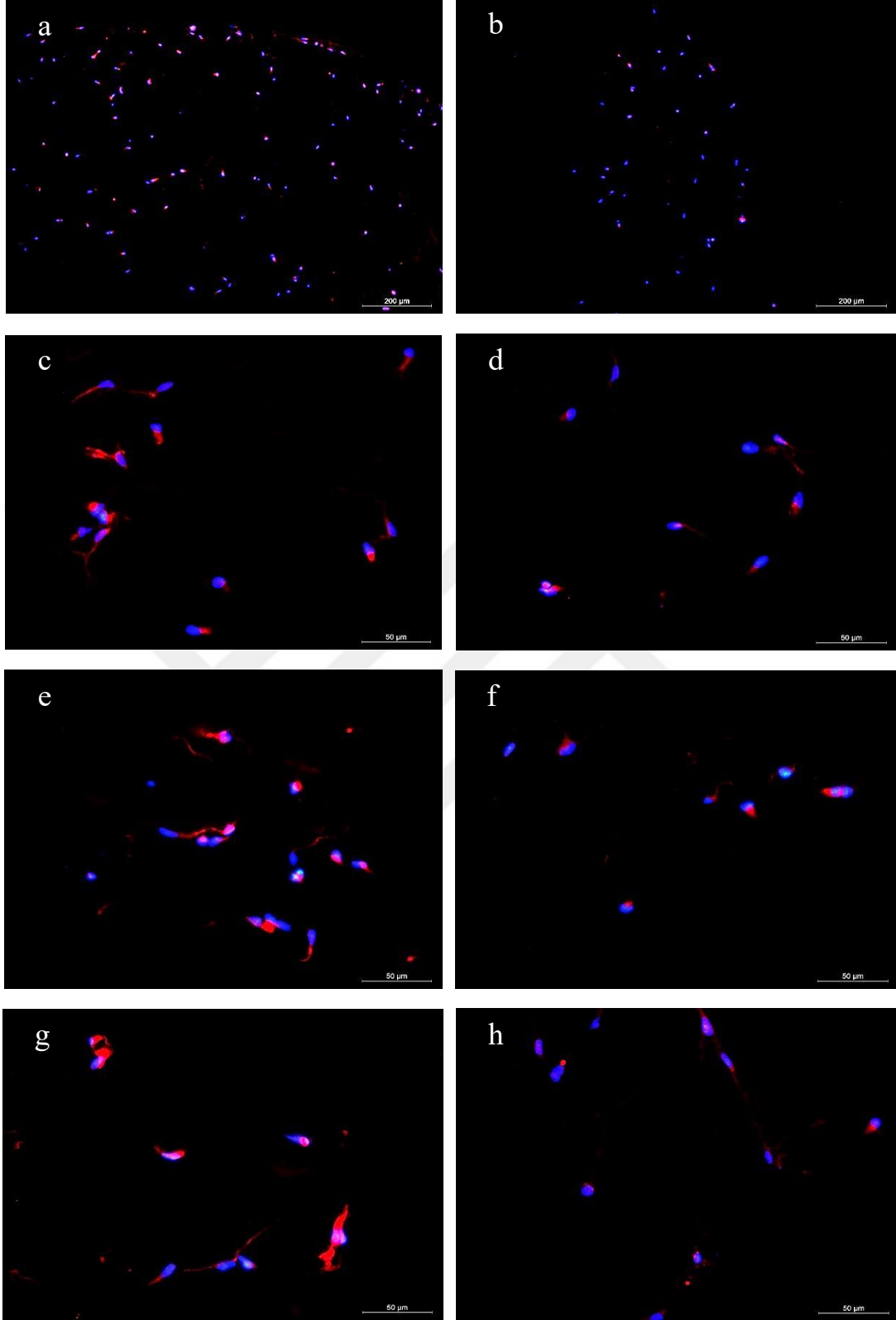


Şekil 4.28. 28. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin TMRM boyaması görüntüleri. (a,c,e,g) kontrol, (b,d,f,h) deney grubu organoid modelleri. Ölçek çubuğu: 50 µm.

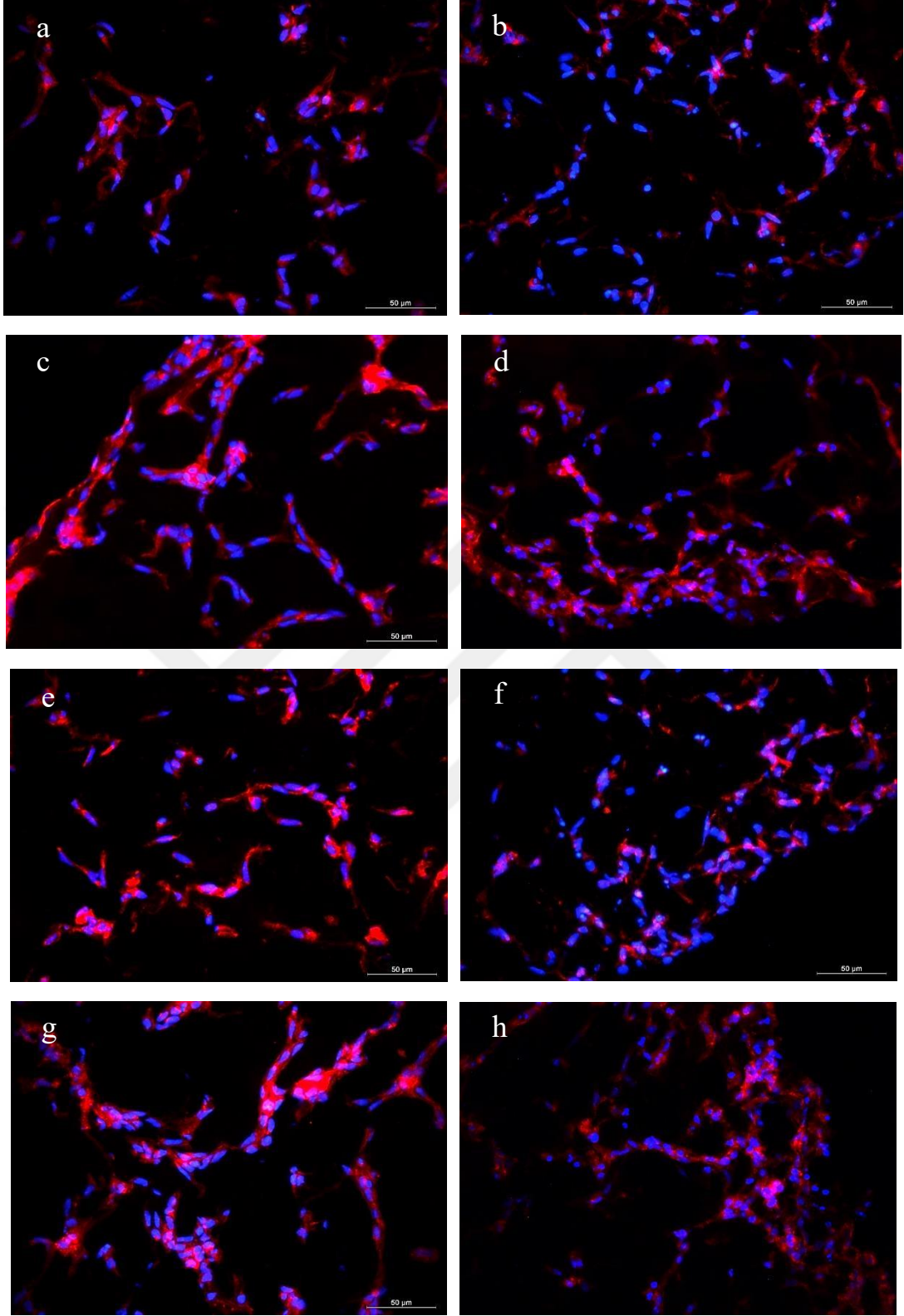
28. gününde analizi gerçekleştirilen kontrol ve deney grubu organoid yapılarının TMRM boyamaları için H₂O₂ uygulanan deney grubu organoidlerden alınan kesitlerin kontrol grubundan alınan kesitlere kıyasla daha yoğun bir boyama sergilediği gözlenmiştir (**Şekil 4.28.**). TMRM katyonik karakterli bir boya olup sağlıklı hücrelerde daha fazla birikim göstererek yoğun bir boyamaya sebebiyet verirken depolarize olmuş membran potansiyeli değişen mitokondrilerde zayıf bir boyamaya sebebiyet verir.

4.3.6. Mitotracker Red Boyaması ile Hücrede Total Mitokondri Sayısının Tespit Edilmesi

Organoid modelini oluşturan hücrelerdeki mitokondri sayısını ve dağılımını tespit etmek adına mitotracker red boyası kullanılmıştır. 1. gün organoid modellerinin mitotracker boyaması incelendiğinde oksidatif stres uygulanan hücrelerin kullanıldığı modelde kontrol grubu organoid modeline kıyasla boyamanın daha zayıf olduğu görülmüştür (**Şekil 4.29.**). Bunun sebebi hücreler üzerinde oluşturulan oksidatif stresin mitofaji sürecini indüklemesi ve bundan kaynaklı hücrede mitokondri sayısında meydana gelebilecek azalmalar olabilir.

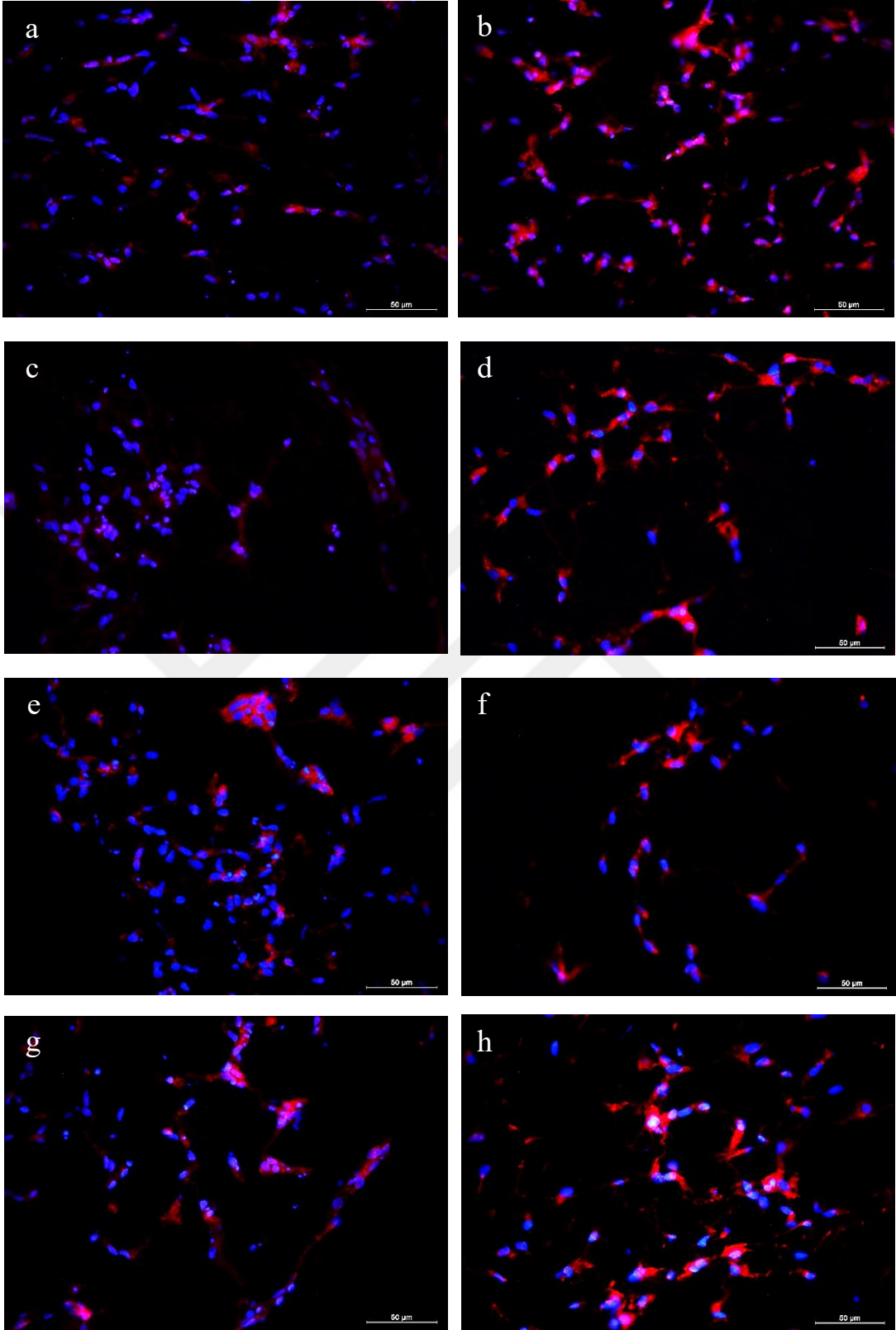


Şekil 4.29. 1. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin mitotracker red boyaması görüntüleri. (a,c,e,g) kontrol, (b,d,f,h) deney grubu organoid modelleri. Ölçek çubuğu: 50 μm .



Şekil 4.30. 14. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin mitotracker red boyaması görüntüleri. **(a,c,e,g)** kontrol, **(b,d,f,h)** deney grubu organoid modelleri. Ölçek çubuğu: 50 µm.

14.gün organoid modelleri mitotracker boyamalarının benzer seviyededir (**Şekil 4.30.**).

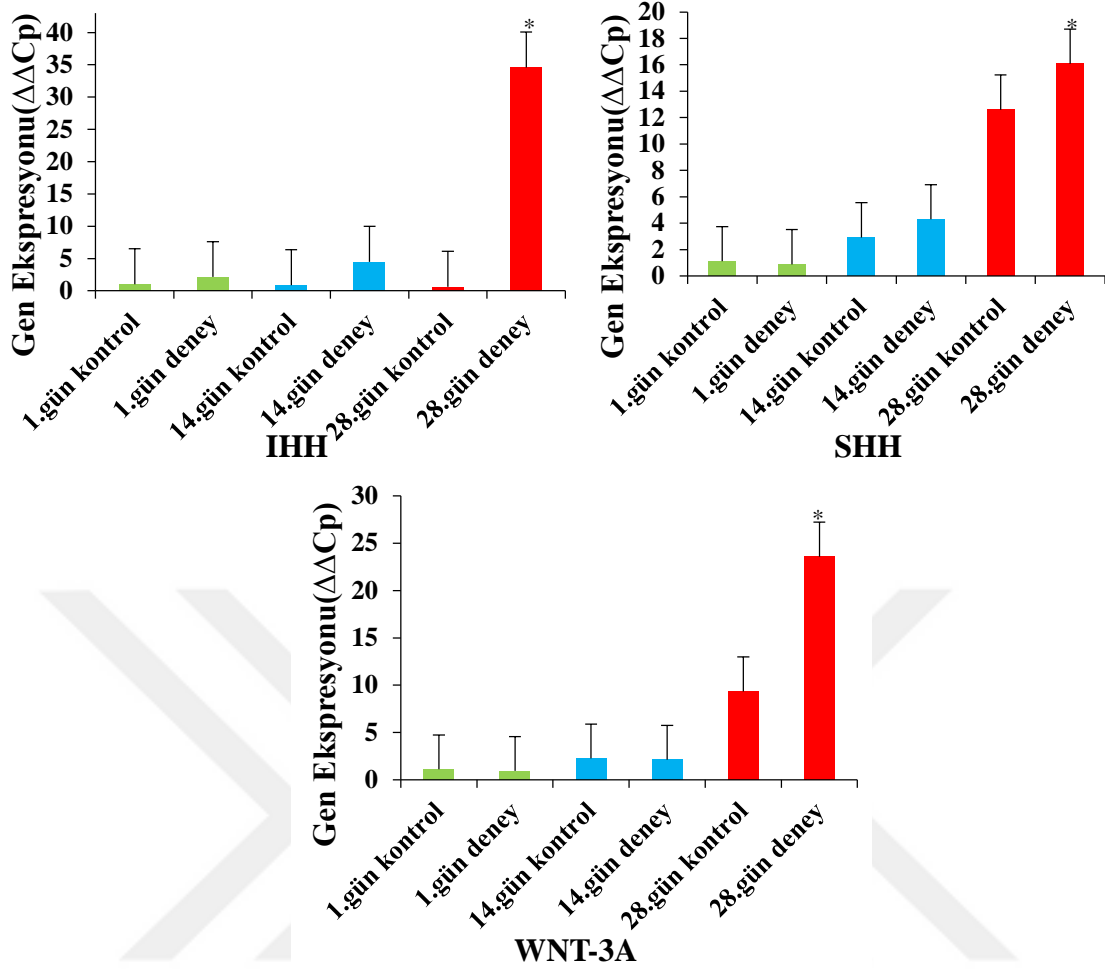


Şekil 4.31. 28. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinin mitotracker red boyaması görüntüleri. (**a,c,e,g**) kontrol, (**b,d,f,h**) deney grubu organoid modelleri. Ölçek çubuğu: 50 µm.

28. gün organoid modellerindeki mitotracker boyamaya bakıldığında H₂O₂ 'ye maruz bırakılan hücreler kullanılarak oluşturulan organoid modelinin hücrede mitokondrileri boyayan boya ile kontrol grubuna kıyasla daha yoğun olarak boyandığı görülmüştür (**Şekil 4.31.**). Bunun nedeninin 28. gün organoid modelinde, hücresel dağılımdan kaynaklı bir oksijen kıtlığının meydana gelmesi, bunun sonucunda mitokondri membran potansiyelindeki değişimi takiben oksidatif stres kaynaklı mitofajinin etkili olduğu düşünülmektedir.

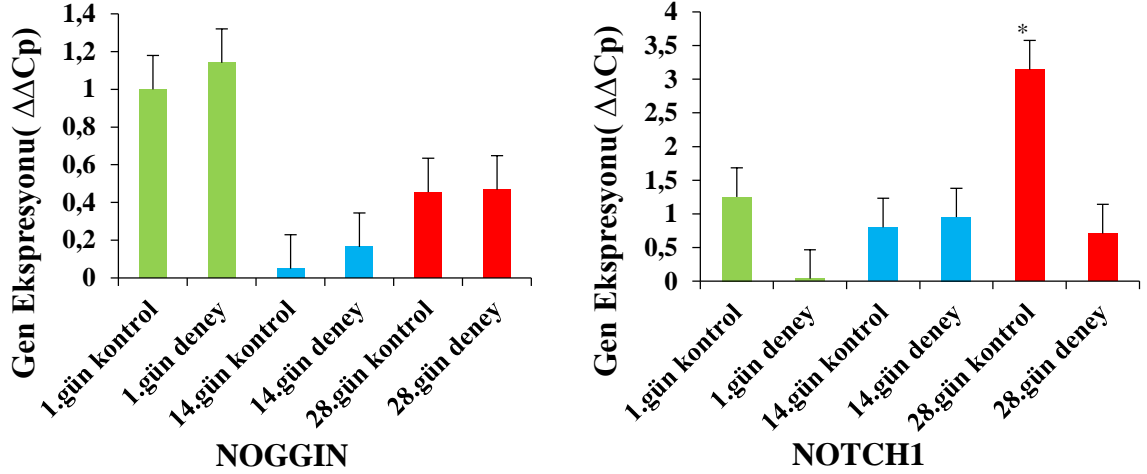
4.3.7. Organoid Modellerinde Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadelerinin Analizi

Sağlıklı ve H₂O₂ maruziyeti ile oksidatif stres oluşturulmuş NKH'lar kullanılarak oluşturulan organoid modellerinde 1., 14. ve 28. günlerdeki gen ifadeleri incelendiğinde farklılaşmanın tespiti adına Hedgehog yolağına özgü SHH ve IHH genleri ile Wnt-3a geni ifade düzeyleri incelendiğinde 1. ve 14. gün organoid modellerinde ifade düzeyleri birbirleri ile korelasyon gösterirken 28. gün organoid modellerinde başta deney grubu olmak üzere ifadelerde dramatik bir artış olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4.32.**). IHH geni ifade düzeyi 1. gün deney grubu organoid modelinde kontrol grubundan 2,1 kat yüksektir. 14. gün modellerinde deney grubunda genin ifadesi kontrol grubu ifadesinden 5,5 kat yüksektir. 28. gün modellerinde ise deney grubunda genin ifadesi artış göstermiş olup deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark 57,5 kat seviyesindedir (**Şekil 4.32.**). SHH geni ifade düzeyi 1. gün deney grubu ile kontrol grubun organoid modeli arasında bariz fark gözlenmezken 14. gün modellerinde deney grubunda genin ifadesi kontrol grubu ifadesinden 1,4 kat yüksektir. 28. gün modellerinde ise genin ifadesi artış göstermiş olup deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark 1,3 kat seviyesindedir (**Şekil 4.32.**). Wnt-3a geni ifade düzeyi 1. ve 14. gün deney grubu ile kontrol grubun organoid modeli arasında bariz fark gözlenmezken 28. gün modellerinde ise genin ifadesi artış göstermiş olup deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark 2,5 kat seviyesindedir (**Şekil 4.32.**).



Şekil 4.32. IHH, SHH ve WNT-3A belirteçlerinin 1. 14. ve 28. gün organoid modellerinde ifade düzeylerinin incelenmesi. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır (*: $P < 0,05$).

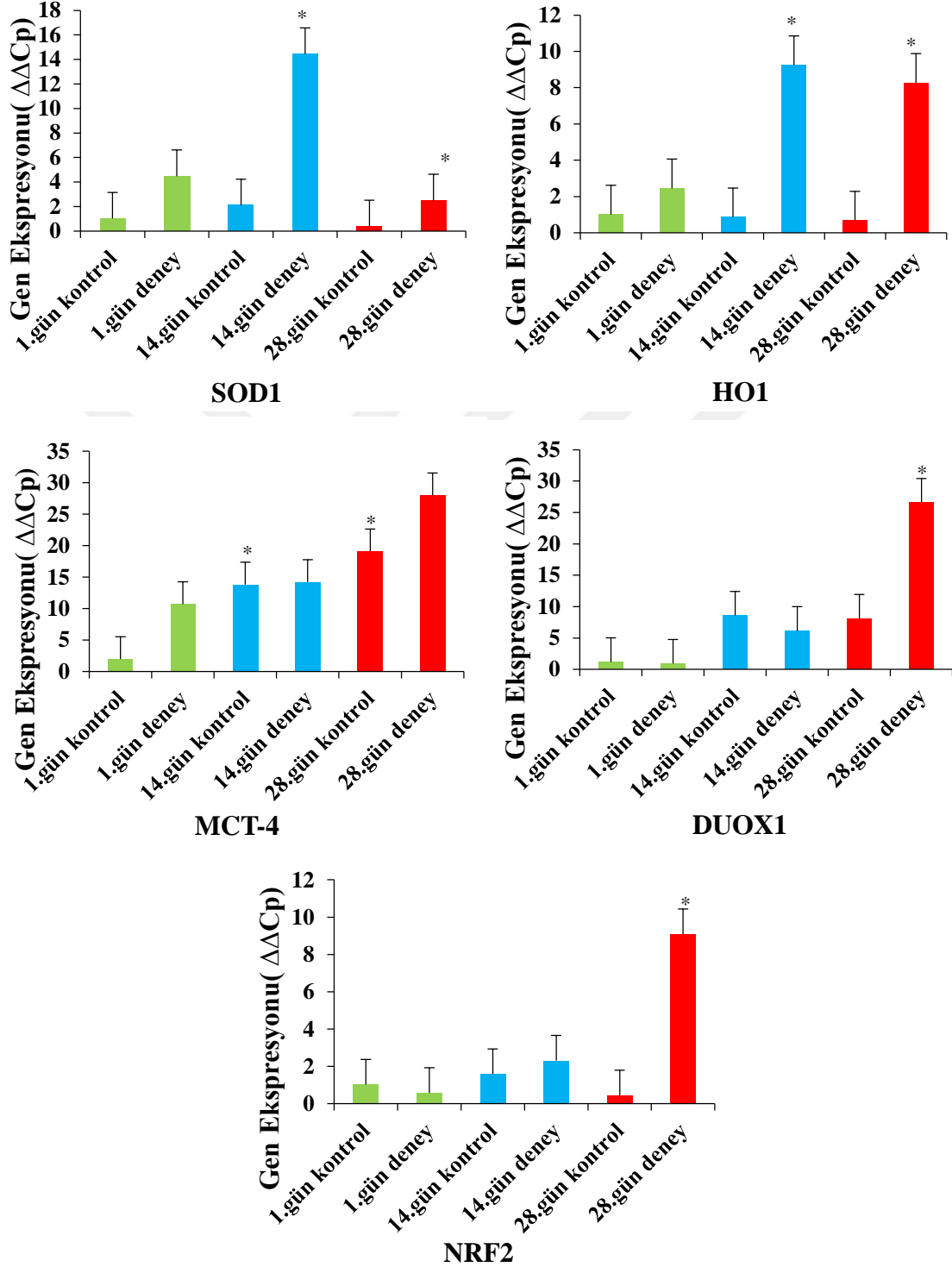
Organoid modellerinde hücre farklılaşmasının gen düzeyinde tespiti için Noggin ile Notch ifadelerine bakıldığında Noggin geni ifade düzeyi 1. gün deney grubu organoid modelinde kontrol grubuna kıyasla 1,1 kat artış göstermiştir. 14. gün modellerinde gen ifade düzeyi dramatik bir azalma göstermiş ve bu noktada deney grubu ifade seviyesi kontrol grubuna kıyasla 3,2 kat yüksektir. 28. gün modellerinde Noggin gen ifade seviyesi 14. güne kıyasla artış göstermiş olup deney grubu ifade düzeyi ile kontrol grubu ifade düzeylerinin birbirine oldukça yakın olduğu görülmüştür (**Şekil 4.33.**). Notch1 geni ifade seviyeleri incelendiğinde 1. gün deney grubu organoid modelinde kontrol grubundan 40 kat fazla olduğu görülmüştür. 14. gün modellerinde ise deney grubu ifadesi kontrol grubu ifadesinden 1,1 kat yüksektir. 28. gün modellerinde Notch1 gen ifade seviyesi 14. güne kıyasla artış göstermiş olup kontrol grubu ifade düzeyi deney grubundan 4,4 kat fazla olduğu görülmüştür (**Şekil 4.33.**).



Şekil 4.33. Organoid modellerinde NOGGIN ve NOTCH1 belirteçlerinin 1. 14. ve 28. gün ifade düzeylerinin incelenmesi. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır (*: $P < 0,05$).

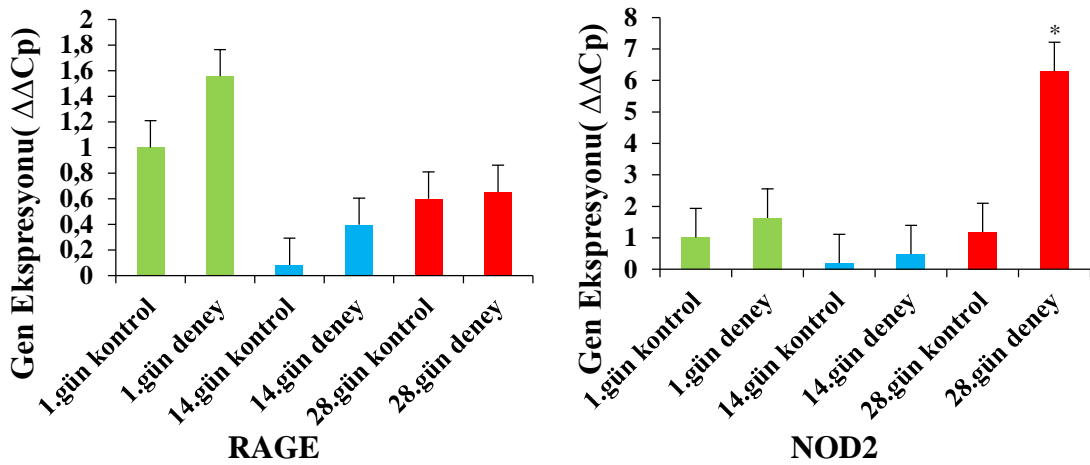
Organoid modellerinde oksidatif stres ile ilişkili SOD1, HO1, DUOX1 ve MCT-4 genlerinin ifade profilleri incelendiğinde SOD1 ve HO1 genleri için oksidatif stres uygulanarak oluşturulan deney grubu organoid modellerde bu genlerin ifadesi düzeyi sağlıklı hücreler ile oluşturulan kontrol grubu organoid modellerine göre daha yüksektir (**Şekil 4.34.**). SOD1 geni ifade düzeyi 1. gün deney grubu organoid modelinde kontrol grubuna kıyasla 4,4 kat artış göstermiştir. 14. gün modellerinde gen ifade düzeyi artış göstermiş ve deney grubu ifade seviyesi kontrol grubundan 6,8 kat yükselmiştir. 28. gün modellerinde SOD1 gen ifade seviyesi 14. güne kıyasla azalma göstermiş olup deney grubu ifade düzeyi kontrol grubundan 8,3 kat yüksektir (**Şekil 4.34.**). HO1 geni ifade düzeyi 1. gün deney grubu organoid modelinde kontrol grubuna kıyasla 2,4 kat artış göstermiştir. 14. gün modellerinde ise deney grubu ifade seviyesi artış göstermiş ve kontrol grubu ile arasındaki fark 11,5 kata yükselmiştir. 28. gün modellerinde HO1 gen ifade seviyesi 14. güne kıyasla azalma göstermiş olup deney grubu ifade düzeyi kontrol grubundan 13,6 kat yüksektir (**Şekil 4.34.**). MCT-4 geni incelendiğinde 1. gün deney grubu organoid modelinde genin ifadesi kontrol grubuna kıyasla 5,6 kat yüksektir. 14. gün modellerinde ise deney grubu ifadesi kontrol grubu ifadesinden 1,02 kat yüksektir. 28. gün modellerinde ise genin ifadesi artış göstermiş ve deney ve kontrol grubu arasındaki fark 1,4 kattır (**Şekil 4.34.**). DUOX1 geni için ise ifade düzeyi 28. gün deney grubu modelinde tepe noktasına ulaşmıştır. Bu noktada deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark 3,2 kat düzeyindedir (**Şekil 4.34.**). NRF2 geni ifade düzeyi 1. gün organoid modellerinde birbirlerine çok yakın olup kontrol grubunda deney grubuna kıyasla 1,7 kat daha yüksektir. 14. gün modellerinde ise deney grubu ifade seviyesi bir miktar artış göstermiş ve bu

noktada kontrol grubundan 1,5 kat fazla ifade edilmiştir. 28. gün modellerinde NRF2 gen ifade seviyesi deney grubunda dramatik bir artış göstermiş olup bu grubun ifade düzeyi kontrol grubundan 22,5 kat yüksektir (Şekil 4.34.).



Şekil 4.34. SOD1, HO1, MCT-4 ve DUOX1 belirteçlerinin 1., 14. ve 28. gün organoid modellerinde ifade düzeylerinin incelenmesi. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır. (*: $P < 0,05$).

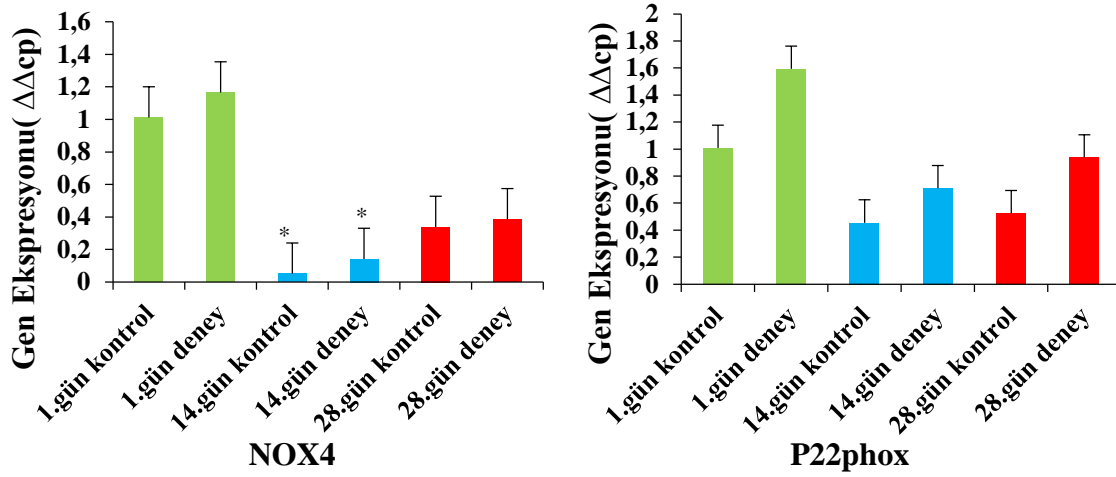
Organoid modellerinde oksidatif stres ile ilişkili RAGE ve NOD2 genlerinin ifade düzeyleri incelendiğinde RAGE geni için 1. gün deney grubu organoid modelindeki ifade seviyesi kontrol grubundan 1,5 kat yüksek olduğu görülmüştür. 14. gün modellerinde ise deney grubu ve kontrol grubunda genin ifade seviyesi azalmıştır. 14. gün modellerinde deney grubunda genin ifadesi kontrol grubu ifadesinden 4,8 kat yüksektir. 28. gün modellerinde ise genin ifadesi artış göstermiştir ve deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark 1,1 kat seviyesindedir (Şekil 4.35.). NOD2 geni ifade düzeyi 1. gün deney grubu organoid modelinde kontrol grubundan 1,6 kat yüksektir. 14. gün modellerinde gen ifade düzeyi azalma göstermiştir ve deney grubu ifadesi kontrol grubu ifadesinden 2,5 kat yüksektir. 28. gün modellerinde ise genin ifadesi deney grubunda dramatik bir artış göstermiştir ve deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark 5,7 kat seviyesindedir (Şekil 4.35.).



Şekil 4.35. RAGE ve NOD2 belirteçlerinin 1. 14. ve 28. gün organoid modellerinde ifade düzeylerinin incelenmesi. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır (*: $P < 0,05$).

Organoid modellerinde oksidatif stresin mitokondri üzerine etkisinin tespiti adına NOX4 ve P22phox genlerinin ifade düzeyleri incelendiğinde 1. gün organoid modellerinde ekspresyonların yüksek seviyede olduğu 14. güne gelindiğinde azaldığı NOX4 geni için 28. günde tekrar artış gösterdiği gözlenmiştir. NOX4 geni ifade düzeyi 1. gün deney grubu organoid modelinde kontrol grubundan 1,16 kat yüksektir. 14. gün modellerinde gen ifade düzeyi azalma göstermiştir ve deney grubu ifadesi kontrol grubu ifadesinden 2,8 kat yüksektir. 28. gün modellerinde ise genin ifadesi artış göstermiş ve deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark 1,1 kat seviyesindedir (Şekil 4.36.). P22phox geni ifade düzeyi 1. gün deney grubu organoid modelinde kontrol grubundan 1,5 kat yüksektir.

14. gün modellerinde NOX4 genine benzer şekilde gen ifade düzeyi azalma göstermiştir ve deney grubu ifadesi kontrol grubu ifadesinden 1,7 kat yüksektir. 28. gün modellerinde ise genin ifadesi artış göstermiş ve deney grubu ile kontrol grubu arasındaki fark 1,8 kat seviyesindedir (Şekil 4.36.).

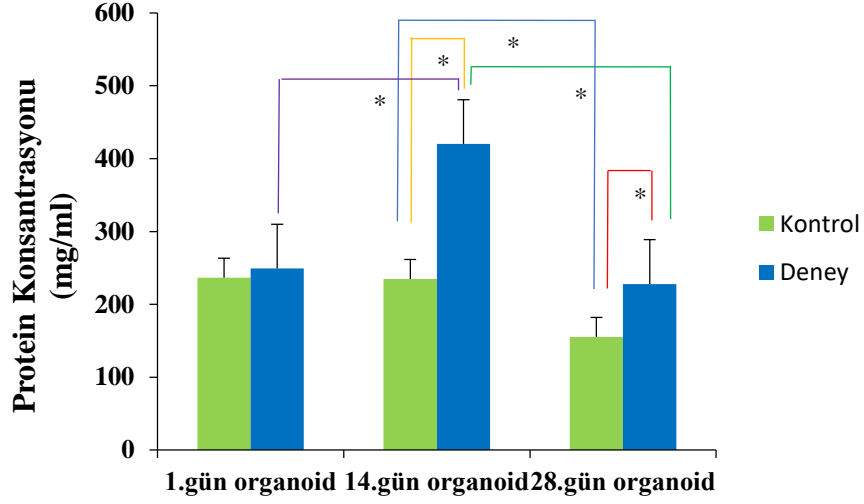


Şekil 4.36. NOX4 ve P22phox belirteçlerinin 1. 14. ve 28. gün organoid modellerinde ifade düzeylerinin incelenmesi. Referans gen olarak β-Aktin kullanılmıştır (*: P<0,05).

4.3.8. BCA Analizi ile Organoid Modellerinin Protein Miktarının Değerlendirilmesi

Deney gruplarında total protein konsantrasyonlarının ortaya koyulması amacıyla yapılan BCA analizi sonucunda 1. gün organoid modellerinde kendi aralarında kıyaslandığında H₂O₂ uygulanan hücreler ile oluşturulan organoid yapısının protein miktarı sağlıklı hücreler kullanılarak oluşturulan kontrol grubu organoid modeline göre %5,03 lük bir artış göstermiştir. Aynı şekilde 14. gün organoid modelleri 1. gün kontrol organoid modeli ile kıyaslanarak bir analiz yapıldığında H₂O₂ uygulanan hücreler ile oluşturulan organoid modelinin total protein miktarında %43,66 lık bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu artışın sebebi uygulanan oksidatif stresin hücrel bir uyarıya sebebiyet vermesi ve bundan kaynaklı hücre sayısında meydana gelen artış olabilir. 14. gün kontrol grubunda bariz bir farklılık gözlenmemiştir. 28. gün kontrol organoid modelinde total protein miktarında 1. gün kontrol organoid yapısına kıyasla %52,25 lik bir azalma olduğu gözlenmiştir. Total protein miktarındaki bu azalma matrijelin uzun süreli kültür sürecindeki degradasyonu ve hücre ölümlerinden kaynaklı olabilir.

28. gün H₂O₂ organoid modeli protein miktarına bakıldığında ise oksidatif stres kaynaklı uyarımın etkisindeki azalma ve matrijelin degradasyonu ile birlikte total protein miktarının 14. gün H₂O₂ organoid total protein miktarına kıyasla %85 lik bir azalma gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.36.). BCA analizi toplam protein miktarı tayininde kullanılan bir yöntemdir. Bundandır ki organoid modellerini oluştururken destek yapısı olarak kullanılan matrijelin protein içeriği de analiz sonuçlarına etki ettiği gerçeği unutulmamalıdır.



Şekil 4.37. 1. 14. ve 28. gün kontrol ve deney grubu organoid modellerinde BCA analizi grafiği (* : P<0,05).

5. TARTIŞMA

Nörodejeneratif hastalıkların temelinde, gen düzeyinde meydana gelen mutasyonlara ek olarak yaşlanmanın hücrel kompartmanlar üzerine olan etkisinin de rol aldığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bahsi geçen kompartmanlardan biri hücrede enerji metabolizmasından sorumlu organel olan mitokondridir. Yapılan çalışmalarda mitokondriyal DNA 'da meydana gelen değişiklikler, anormal mitokondriyal gen ekspresyon paterninin nörodejeneratif hastalıkların temelinde yer aldığını işaret etmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için etkin yaklaşımlara acil ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bunun için de her bir hastalığın nedenlerinin ve mekanizmalarının derinlemesine anlaşılması gerekmektedir.

İki boyutlu kültür sistemleri temel hücre biyolojisi ve tümörögenез için çığır açan yaklaşımlar sağlamaktadır. Ancak fizyolojik parametrelerdeki değişiklikler, organın veya tümörün doku mimarisi, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri, biyokimyasal etkileşimler ve sinyal yolları göz önüne alındığında 2-boyutlu sistemler yetersiz kalmaktadır.

Geliştirilen 3-boyutlu kültür sistemleri ile matrikse gömülü olarak yetiştirilen hücreler veya hücrel-sferoidler, dokuların ve tümörlerin in vivo ortamdaki mimarisini oluşturma noktasında kullanılmaya başlanmıştır. Bu nedenle bu 3-boyutlu kültür sistemleri kök hücre, organogenez, sağlıklı doku ve tümörlü doku mukayesesi, ilaç geliştirme ve toksisite gibi çalışmalar için daha uygun sistemler haline gelmiştir (Unger ve ark., 2014).

Hans Clevers ve Toshiro Sato 2009 yılında, biyolojik süreçler ve hastalıkların çalışılmasında çığır açacak kullanışlı bir model sistem olan ve yetişkin kök hücrelerden organ yapısının kopyasını oluşturan organoid kültür sistemini geliştirmişlerdir. Araştırmacıların bu konudaki çalışmaları halen devam etmektedir (Koo ve ark., 2011; Bartfeld ve Clevers, 2015; Boj ve ark., 2015). Günümüzde dünyanın birçok laboratuvarında farklı tipte organoidler ile gerek kanser gerekse diğer hastalıkların tedavisine yönelik araştırmalar yapılmaktadır (Boj ve ark., 2015; Leite ve ark., 2016; Astashkina ve ark., 2012). Organoidlerin sınırsız çoğalma potansiyelleri, biyolojik olarak stabil olmaları ve dondurulabilme kabiliyetleri gibi avantajlarından dolayı bu kültürler kullanışlı bir model sistem olarak kullanılabilir.

Çalışmada nöral kök hücreler üzerinde oksidatif stres oluşturmak için hidrojen peroksit kullanılmış ve oksidatif stres uygulanan nöral kök hücreler kullanılarak organoid yapıları oluşturulmuştur.

Organoid yapısını oluşturacak hücre seçimi çalışmanın ilk kritik basamağını oluşturmuştur. Çalışmanın amacı dikkate alındığında hem çoğalabilme hem de farklılaşabilme özellikleri ile kök hücreler model oluşturma noktasında göze çarpan ilk hücre gruplarıdır (Lancaster ve ark., 2013; Lancaster ve Knoblich, 2014). Literatürde embriyonik kök hücreler ile uPKH'ler çoğalma ve farklılaşma kapasitelerinin daha yüksek olmasından dolayı daha yaygın kullanılsa da bu hücrelerin izolasyon ve kültür süreçlerindeki zorluklardan dolayı çalışmamızda kullanılmamıştır.

Nöral kök hücrelerin izolasyonunun nispeten kolaylığı, multipotent karakterleri ve sinir sisteminde yer alan farklı hücreleri oluşturabilmeyi sağlayan geniş farklılaşma yelpazeleri bu hücreleri çalışmada kullanım için uygun kılan etmenler olmuştur. Bu çalışmada nöral kök hücrelerin kullanılması belli avantajları da beraberinde getirmektedir. Nöral kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri, hipoksik ortam koşullarına dayanıklılıkları ve kültür ortamında nöroküre olarak adlandırılan organize hücresel yapıları oluşturmaları bu avantajların başında gelmektedir (Han ve ark., 2017; Kjell ve ark., 2020).

Çalışmada, ilk olarak nöral kök hücrelerin karakterizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler karakteristik olarak kültür koşullarında nöroküre yapıları oluşturmuş ve astrosit için GFAP ve S100, oligodentrosit için NG2 ve nöron için Nestin belirteçlerini ifade ettiklerinden bu hücrelerin uzun süreli saklama koşullarından sonra dahi nöral kök hücre karakterini korudukları görülmüştür. Sonrasında değişen konsantrasyonlarda H₂O₂ kullanılarak nöral kök hücrelerde oksidatif stres oluşturulmuştur. Bu yaklaşım literatürde sıklıkla kullanılan bir stres oluşturma yöntemidir (Abdanipour ve ark., 2018; Kjell ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında diğer çalışmalardan farklı olarak hücre canlılığını azaltan H₂O₂ konsantrasyonu belirlemek yerine hücre üzerinde stres oluşturacak bir dozun belirlenmesi hedeflenmiştir. Kültür işleminin takiben WST-1 analizi, beta galaktosidaz boyaması ve gen ekspresyonu analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda 75 µM H₂O₂ konsantrasyonunun hücrede istenen etkiyi oluşturan doz olduğu tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde ise yapılan çalışmalarda 100 µM H₂O₂ konsantrasyon değerinin sıklıkla kullanıldığı görülmüştür (Abdanipour ve ark., 2018; Zakharova ve ark., 2019). Bu çalışmalarda H₂O₂ 'nin kullanım amacı NKH'ler üzerinde

stres oluşturmaktan ziyade apoptotik bir etki oluşturmak ve etken maddenin anti-apoptotik etkinliğini incelemektir. Ayrıca yine literatür çalışmalarında 100 μM H_2O_2 konsantrasyon değerinin zaman içerisinde hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (Konyalioglu, Armagan, Yalcin, Atalayin, Dagci, 2013). Bu yapılan tez çalışmasında oksidatif stres oluşturulan NKH'ler, organoid modelli oluşturmada kullanılacağı için hücre canlılığının yüksek olması gereklidir.

Seçilen H_2O_2 konsantrasyonunun mitokondri membran potansiyelinde meydana getirdiği değişimin gösterimi için hücreler iki boyutlu kültür koşullarında H_2O_2 ile kültüre edilerek TMRM boyası ile boyanmıştır. Boyamayı takiben yapılan flow sitometrik analiz sonucunda kontrol grubu hücrelerinin, 75 μM H_2O_2 uygulanmış hücrelere kıyasla TMRM boyası ile daha fazla boyandığı tespit edilmiştir. TMRM boyasının sağlıklı mitokondri membranlarında, depolarize olan mitokondrielerin membranlarına kıyasla daha fazla birikim gösteren bir boya olduğunu düşünürsek bu beklenen bir sonuçtur (Floryk ve Houstk, 1999; Morganti, Bonora, Ito, 2019). Literatür taramalarında fare embriyonik fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, hücrede ROS miktarında meydana gelen artışın mitokondri membran geçirgenliğini etkileyerek membran potansiyelinin bozulmasına neden olduğu ortaya koyulmuştur (Giaime, Yamaguchi, Gautier, Kitada, Shen, 2012).

2 boyutlu kültür sürecinin devamında oksidatif stres uygulanan NKH'lar ile oluşturulan organoid modellerinde karakterizasyon adına gerçekleştirilen hematoksilen ve eosin boyaması sonucunda hücrelerin model içerisinde beklenmedik bir dağılım sergiledikleri görülmüştür. 14. gün kontrol grubu organoid modellerinde hücrelerin nöral kök hücre karakteristiği olan nöroküre benzeri hücre kümeleri oluşturduğu ve daha çok kümeleşen bir dağılım profili sergiledikleri görülürken deney grubu organoid modellerinde hücrelerin merkezi boş bırakacak şekilde çeperde yoğunlaşan bir hücreyel dağılım içerisine girdiği belirlenmiştir. 28. gün organoid modellerinde ise gruplar arası hücreyel dağılım profili farkları daha bariz bir hal almıştır. Kontrol grubu organoid modellerinde hücrelerin merkezde yoğunlaşan bir toplanma eğilimi içerisinde oldukları görülmüştür. Deney grubu organoid modelinde ise hücrelerin kontrolün aksine organoidin merkezini boş bırakıp modelin sınırlarında hücreyel yığınlar halinde bir dağılım sergiledikleri gözlenmiştir. Kontrol grubu organoid modellerinde karşılaşılan nöroküre benzeri hücre kümeleri, modeldeki NKH'ların kök hücre karakteristiğini devam ettirdiğini işaret ederken deney

grubunda hücrelerin modeldeki heterojen dağılımları, oksidatif stres kaynaklı bir uyarımı ve hücreleri kök hücre karakterini terk ederek farklılaşmaya yönelttiği şeklinde yorumlanmıştır. Nitekim 2 boyutlu kültür koşullarında nöral progenitör hücrelere ön koşullandırma için düşük konantrasyon değerlerinde H₂O₂ uygulandığında hücrelerin migrasyon kapasitelerinde artış olduğu gösteren literatür çalışmaları mevcuttur (Sharma, Zhou, Netland, 2008). Normal şartlar altında SVZ ve SGZ 'da sessiz olarak bulunan NKH'lar, beyinde meydana gelen herhangi bir travma sonrası çevresel uyarılar etkisiyle içinde buldukları niş ortamını terk ederek proliferer olur ve travma bölgesine göç ederek (migrasyon), nöron yapılarına farklılaşırlar. 28. gün deney grubu organoid modelinde hücrelerin merkezi boş bırakacak şekilde çeperde toplanma eğilimi göstermeleri gen ekspresyonunda da nöronal farklılaşmayı destekleyen WNT3A geninin yüksek olduğu bu grupta oksidatif stres kaynaklı hücrel bir uyarım olduğu ve bu nedenle hücrelerin bu tarz bir dağılım sergilediği sonucunu desteklemektedir. (Muroyama, Kondoh, Takada, 2004).

Oluşturulan organoid modellerinde spesifik hücre gruplarının belirlenerek organoid modellerin tanımlanması adına gerçekleştirilen immünfloresan boyamalarda, 28. gün boyamalarının 14. gün boyamalarından daha yoğun olduğu görülmüştür. Glial hücre belirteçlerinden olan GFAP ve NG2 boyamaları için deney gruplarında boyamanın kontrol gruplarına kıyasla daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Nöronal hücre belirteçlerinden olan Tübülün Beta III boyamasının en yoğun olduğu 28. gün deney grubunda WNT3A gen ekspresyonunun da yüksek olduğu göz önünde bulundurulursa bu beklenen bir sonuçtur. Oluşturulan organoid modelinin, temelinde birçok etmenle birlikte oksidatif stresin de yattığı nörodejeneratif hastalıklardan hangisi için potansiyel bir model olduğunu tespit etmek adına toplumda en sık karşılaşılan nörodejeneratif hastalıklardan Parkinson ve Alzheimer'ın belirteçleri incelenmiştir. Sonucunda Parkinson hastalığı belirteci TH 'nin yapılan immünfloresan boyamalar neticesinde organoid modellerinde ifadesinin gözlenmediği tespit edilmiştir. Alzheimer hastalığı belirteçlerinden olan Tau 'nun yapılan immünfloresan boyamalar sonucunda organoid modellerinde pozitif olduğu yalnızca 28. gün deney grubunda boyamanın kontrol grubuna kıyasla daha zayıf olduğu görülmüştür. Boyama profilinin bu gruptaki farklılığı yüksek WNT3A ekspresyonu ile açıklanabilir çünkü WNT3A geni ekspresyon düzeyindeki artışın Alzheimer patolojisinde görülen beta amyloid fibrillerin neden olduğu nörodejenerasyonu azalttığı ve bu bağlamda hastalığın seyrine etki ettiği bilinmektedir (De Ferrari ve ark., 2003; Arrázola, Silva-Alvarez,

Inestrosa, 2015). Yapılan immünfloresan boyamalar sonucunda H₂O₂ 'nin hücre canlılığı ve çoğalmasının yanısıra spesifik hücre farklılaşmalarını da yönlendirdiği sonucu çıkarılmıştır. Organoid modellerinde antioksidan süperoksit dismutaz enzim aktivitesi, oluşturulan oksidatif stresin işaretçisi olarak değerlendirilmiştir. Çünkü oksidatif stres kaynaklı oluşan oksidan ajanların hücrede dengelenmesi adına fizyolojik bir yanıt olarak ortamdaki antioksidanların miktarında artış meydana gelmektedir. Kültürün erken evresinde, SOD enzim aktivitesinin yalnızca deney grubunda gözlenmesi H₂O₂ 'nin hücrede istenilen etkiyi oluşturduğuna işaret etmektedir. 14. gün kontrol organoid modelinde 1. güne kıyasla artan SOD enzim aktivitesinin, modelde yer alan hücrelerin merkezdeki lokalizasyonundan kaynaklı oksijensiz bir bölge oluşturmalarından kaynaklandığı sonucu çıkarılmıştır. 14. gün deney grubu modelinde SOD aktivitesinin 1. güne göre göstermiş olduğu artış oksidatif stres kaynaklı hücresel uyarımın etkilerinin halen devam ettiğine işaret etmektedir ki hematoksilen ve oesin boyamaları ile ortaya koyulan hücresel dağılım profili bu sonucu desteklemektedir. 28. gün organoid modellerinde, her iki grup içinde SOD aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür. Bu da H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stresin, hücreler üzerindeki etkinliğini yitirdiği sonucunu ortaya koymaktadır.

Organoid modellerinde mitokondriyal bozulmaların membran potansiyeli üzerinden değerlendirilmesi için gerçekleştirilen ve bu deney kapsamında kullanılarak ilk kez kriyokesitler üzerinde gerçekleştirilen TMRM boyaması sonucunda SOD analiz verilerini destekler nitelikte boyamalar elde edilmiştir. 1. gün modellerinde boyamanın deney grubunda kontrol grubuna kıyala daha zayıf olduğu görülmüştür. Sağlıklı mitokondrielerde birikim gösteren katyonik TMRM boyası için bu beklenen bir sonuçtur. Organoid kültürünün 14. gününde analizi gerçekleştirilen sağlıklı hücreler ile oluşturulan kontrol grubu organoid yapısı ile H₂O₂ uygulanan hücreler ile oluşturulan organoid modelinde benzer bir boyamanın olduğu görülmüştür. 14. günde her iki grup için SOD enzim aktivitesinde ve total protein miktarındaki artış bu zaman dilimi içerisinde organoid modelindeki hücre sayısında bir artışın meydana geldiğini ve modeldeki sağlıklı hücre sayısındaki artışı göstermektedir. 28. gününde ise deney grubu organoidlerinin kontrol grubuna kıyasla TMRM boyası ile daha yoğun bir boyama sergilediği gözlenmiştir. 28. günde SOD enzim aktivitesinin kontrol grubunda deney grubunun üzerinde seyrettiği göz önünde bulundurulursa kontrol grubundaki hücrelerin oksidatif stres kaynaklı bozulmaları

bu grubun sağlıklı mitokondrileri boyayan bir boya ile daha zayıf boyanmasının nedeni olabilir.

TMRM boyaması sonucunda elde edilen verilerin desteklenmesi adına organoid modellerindeki toplam mitokondri miktarını ortaya koyan floresan bir boya olan mitotracker red boyaması gerçekleştirilmiş ve TMRM boyaması ile korelasyon gösteren sonuçlar elde edilmiştir. 1. gün organoid modellerinin mitotracker boyaması incelendiğinde deney grubu modelinde kontrol grubuna kıyasla boyamanın daha zayıf olduğu görülmüştür. Bunun sebebi hücreler üzerinde oluşturulan oksidatif stresin mitofaji sürecini indüklemesi ve bundan kaynaklı hücrede mitokondri sayısında meydana gelebilecek azalmalar olabilir (Dolman, Chambers, Mandavilli, Batchelor, Janes, 2013; Barbour ve Turner, 2014). Oksidatif stresin yapılarda oluşturduğu reaktif oksijen türevleri, canlıda mitokondri biyogenezini etkilemekte ve mitofaji adı verilen süreç doğrultusunda mitokondri sayısında azalmaya neden olmaktadır. Mitokondri biyogenezinde azalma ve mitofaji süreçleri Alzheimer, Tip1 diyabet gibi hastalıklar ile canlıda yaşlanma ile paralellik gösteren bir süreçtir (Wallace, 1999; Jornayvaz ve Shulman, 2010). 14.gün organoid modellerinin mitotracker boyamalarının birbirine benzer seviyede olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni kültürün bu safhasında her iki gruptaki organoid modellerini oluşturan hücreler üzerinde herhangi bir stres faktörünün etkisinin olmaması ya da modelde yer alan hücre sayısındaki artıştan kaynaklanması olabilir. 28. gün organoid modellerindeki mitotracker boyamaya bakıldığında deney grubu organoid modelinin hücrede mitokondrileri boyayan mitotracker boyası ile kontrol grubuna kıyasla daha yoğun olarak boyandığı görülmüştür. Bunun nedeninin 28. gün kontrol organoid modelinde, hücresel dağılımdan kaynaklı bir oksijen yetersizliğinin meydana gelmesi bunun sonucunda mitokondri membran potansiyelindeki değişimi takiben oksidatif stres kaynaklı mitofaji olduğu düşünülmektedir. Organoid modellerinde farklı genlerin ifade düzeylerine bakıldığında Hedgehog sinyal yolağı bileşenlerinden olan SHH, oksidatif stres koşullarında ROS oluşumunu engelleme, mitokondriyal hasarı önleme ve ATP üretimini artırma gibi antioksidatif etkilerin uyarılmasını gerçekleştirdiği literatür taramalarında görülmüştür (He ve ark., 2017; Chen, Yang, Hwang, Yang, 2018). Yapılan çalışmada da 28. gün deney grubunda yüksek olduğu gözlenen SHH ifadesi aynı grupta gözlenen yoğun mitotracker boyamasını destekler niteliktedir. Bu sonuçlar 28. gün deney grubu organoid yapısında oksidatif strese karşı bir hücresel yanıtın oluştuğunu göstermektedir. WNT Beta Katenin

sinyal yolağı üyesi ve hücrel farklılaşma süreçlerinde görev alan WNT3A geninin artan ifadesi, nöral farklılaşmaya işaret etmektedir (Muroyama ve ark., 2004). 28. gün deney grubunun kontrol grubuna kıyasla yüksek seyreden ifade düzeyi, bu deney grubu için oluşturulan oksidatif stresin nöral hücre farklılaşmasını desteklediğini ifade etmektedir. Aynı zamanda WNT3A geni ekspresyon düzeyindeki artışın Alzheimer patolojisinde görülen beta amyloid fibrillerin neden olduğu nörodejenerasyonu azalttığı ve bu bağlamda hastalığın seyrine etki ettiği yapılan literatür taramalarında görülmüştür (De Ferrari ve ark., 2003; Arrázola ve ark., 2015). 28. gün deney grubundaki WNT3A geninin yüksek ifade düzeyi, Alzheimer belirteçlerinden Tau belirtecinin aynı grup için kontrol grubuna kıyasla zayıf olan boyamasının nedenini açıklar niteliktedir. Tip1 transmembran protein ailesi üyelerinden olan Notch1 geni hücrel farklılaşma süreçlerinde görevli olup genin ifadesindeki artış glial hücre farklılaşmasını ifade etmektedir. 28. gün kontrol grubunun deney grubundan yüksek olan ifade düzeyi, glial hücre farklılaşmasının bu grup için daha fazla olduğunu ifade etmektedir (Hojo ve ark., 2000; Grandbarbe ve ark., 2003). Nöral farklılaşmayı işaret eden WNT3A geni ile 28. gün gruplarında birbirine zıt bir ifade profili sergiledikleri gözlenmiştir. Bu sonuçlar da H₂O₂ uygulamasının spesifik hücre farklılaşmasını uyardığını işaret etmektedir. BMP profillerinin ifadeleri üzerinden nöral ve glial hücre farklılaşmalarını yönlendiren Noggin geninin deney ve kontrol gruplarındaki yakın ifadeleri, spontan hücre farklılaşmasının başarılı şekilde gerçekteştiği yönünde yorumlanırken, 14. günde meydana gelen azalmanın organoid boyutunun neden olduğu sınırlamadan kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır (Morell, Tsan, O'Shea, 2015).

Oksidatif stres belirteçlerinden SOD1 ve HO1 genlerinin deney grupları için kontrol gruplarının üzerinde seyreden ifade profilleri, H₂O₂ kullanılarak oluşturulması hedeflenen oksidatif stresin başarılı bir şekilde gerçekteştirildiğini ortaya koymaktadır. SOD1 ve HO1 ile zıt bir ifade profili gösteren RAGE seviyesi sonuçları destekler niteliktedir. SOD'un biyokimyasal analiz kiti kullanılarak gerçekteştirilen analizinden elde edilen sonuçlar da gen ekspresyonunu desteklemektedir. 14. gün deney grubunda ifade tepe noktaya ulaşarak bu noktadan sonra azalma eğilimine girdiği görülmektedir. ROS yapılarının canlıda oluşum kaynaklarından biri olan DUOX1 'in 28. gün deney grubunda kontrol grubunun üzerinde seyreden ifadesinin, ROS'ların deney grubu modelinde yüksek birikimini ifade ettiği şeklinde yorumlanmıştır (Kennedy ve ark., 2010). Ayrıca DUOX1'in değişen ortam şartlarına yanıt olarak immün sistem hücreleri başta olmak üzere farklı

hücre gruplarında hücre migrasyonunu uyardığını gösteren literatür çalışmaları mevcuttur (Balta, Kramer, Samstag 2020).

Oksidatif stresin mitokondri etkinliği üzerine etkisinin incelenmesi adına MCT-4 geni ifadesi incelendiğinde, bu ifadenin kültürün ilerleyen süreçlerinde doğrusal bir artış gösterdiği görülmüştür. MCT-4 genindeki artışı genelde mitokondri hasarını göstermektedir. NRF2 mitokondriyal biyogenezi ve mitokondriyal ROS homeostazisini sağlar. NRF2 gen ifadesindeki azalma mitokondri sayısında azalma, mitokondri biyogenezinde aksama ve mitofaji süreçleri ile ilişkilendirilmiştir (Chen, Guo, Kong 2012; Barbour ve ark., 2014). 28. gün deney grubunda, kontrol grubuna kıyasla yüksek seyreden ifade profili mitotracker red boyaması ile birbirlerini desteklemektedir. Otafaji ve apoptozis süreçlerinde görev alan NOD2 hücresel sağ kalımı destekler ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu sağlar. NRF2 geni ile benzer ifade profili sergileyen NOD2 geninin mitofaji süreçlerinde rol aldığı da yapılan literatür taramalarında görülmüştür. (Lupfer ve ark., 2013; Maurya ve ark., 2015; Levy vd., 2020). NOX4 ve NOX ailesi alt birimlerinden P22phox, oksijen sensörü olarak işlev görür ve oksijenin çeşitli ROS 'lara indirgenmesini katalize ederler. NOX4 tarafından üzerilen ROS yapıları hücrede sinyal iletimi, farklılaşma gibi süreçlerde rol oynar. Yapılan literatür taramalarında NOX4 ifadesindeki meydana gelen artışın oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Genin ifade düzeyindeki azalma ise streste azalmaya işaret eder. (Vendrov ve ark., 2015). NOX4 'ün 14. gün deney gruplarındaki düşük ifadesi bu gruplardaki yüksek antioksidan seviyelerinden kaynaklandığı şeklinde yorum yapılmıştır. Antioksidan seviyesindeki artış, oksidanlar ile dengeyi sağlayacağından ötürü hücresel streste azalma sebebiyet verip NOX4 seviyesinde azalmaya neden olur.

Organoid modellerinde total protein miktarının belirlenmesi adına gerçekleştirilen BCA analizi sonucunda deney gruplarında protein miktarlarının kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek olduğu ve 14. günde tepe noktaya ulaşan değer bu noktadan sonra destek yapısı olarak kullanılan matrijelin da kültür sürecinde bozulup yıkılmasından kaynaklı olarak azalma profili sergilediği tespit edilmiştir. Protein miktarında meydana gelen bu değişimler aynı zamanda organoidlerde gözlemlemeyi beklediğimiz mikroçevrenin tekrar düzenlenmesinin (reorganizasyonun) bir kanıtıdır. Bu şekildeki bir düzenleme farklı proteazların ve dokuya özgü yapısal proteinlerin tekrar salgılanmasını içerdiğinden zamana bağlı olarak devamlı değişim göstermesi beklenmektedir.

5.1.Sınırlılıklar

Çalışmada kullanılan matrijel yapısı, protein içerikli olup in vivo hücre dışı matriks yapısını taklit etmek amacıyla kullanılmıştır. Karakterizasyon analizlerinde gerçekleştirilen histolojik ve immünfloresan boyama yöntemlerinde bu yapı boyanın penetrasyonu için bir engel teşkil etmiş ve non-spesifik boyamalara sebebiyet vererek boyamanın kalitesini etkilemiştir. Matrijel yapısının uzaklaştırılması noktasında ise NKH'ların belirtilen deney koşulları içerisinde kendi hücre dışı matriks yapılarını sentezleyemeyeceği ve yapay destek yapının uzaklaştırılması 3 boyutlu organoid yapısının bütünlüğünü bozacağından ötürü gerçekleştirilememiştir.

Yapılan literatür taramalarında organoid modellerinin analizi noktasında kriyomikrotom cihazları kesit alınırken tercih edilen cihazlar oldukları saptanmıştır. Bu nedenle yapılan tez çalışmasında da kriyomikrotom cihazı kullanılarak kriyo kesitler alınmış ve immünfloresan ve histolojik boyamalar gerçekleştirilmiştir. Ancak bu yöntem boyamalarda, kullanılan antikörlerin bu yöntem ile uyumlu olmamasından ötürü boyamalara etki etmiştir. Alternatif bir metod olarak doku takibi sürecinde sıkça kullanılan parafine gömme yöntemi denenmiş ancak sıcak paraffinin matrijel yapısını ve bütünlüğünü bozduğu için kullanılamamış ve yerine kriyo kesit tekniği kullanılmaya devam edilmiştir.

Organoid yapılarında total protein miktarının tespiti için gerçekleştirilen BCA analiz metodunda destek yapı olarak kullanılan matrijel sahip olduğu protein içeriği nedeniyle sonuçlar üzerine etki etmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan nöral kök hücreler sıçan beyininden fetal dönemde izole edilmiştir. Şayet erişkin bireyden izole edilen nöral kök hücreler çalışmada kullanılmış olsaydı organoid, Alzheimer modeli olarak daha iyi bir doku yapısını ortaya koyabilirdi. Ancak erişkin nöral kök hücreye erişimin zor ve elde edilen hücrelerin az oluşu çalışmayı sınırlayan bir faktör olmuştur.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında kimyasal bir ajan olan H_2O_2 kullanılarak nöral kök hücrelerde bir oksidatif stres oluşturulması ve stres oluşturulan hücreler ile organoid modellerinin oluşturulması amaçlanmıştır. Söz konusu bu 3 boyutlu çalışmada, 2 boyutlu kültür koşullarından farklı olarak hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin daha fazla olması ve hem H_2O_2 hem de farklılaştırma besiyerinden kaynaklı uyarılar ile organ benzeri hücresel organizasyonların gözleneceği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar H_2O_2 'nin spesifik hücre farklılaşmalarını yönlendirdiği ve hücre davranışlarını etkilediğini göstermektedir. Bu veriler gen ekspresyon analizleri, histolojik ve immün floresan analizler ve biyokimyasal analizler ile kuvvetli bir şekilde ortaya koyulmuştur.

Hidrojen peroksidin değişen konsantrasyon değerlerinde hücreler üzerinde farklı etkiler oluşturduğu ve belirlenen dozda hücre farklılaşmasını yönlendirerek hücre çoğalmasını desteklediği görülmüştür.

Nöral kök hücrelerin organoid modelleri oluşturulması noktasında yeterli potansiye sahip oldukları ve organoid modellerinde hücresel davranış profillerinin zaman içerisinde değişim gösterdiği ortaya konulmuştur. Yine bu çalışmada nörodejeneratif hastalıkların temelinde yer alan faktörlerden birinin zaman içerisinde hücrede biriken oksidatif stresin ve stresten kaynaklı mitokondrilerde meydana gelen bozulmalar olduğu gösterilmiştir.

Oluşturulan organoid modelinin Alzheimer hastalığının tedavi süreçlerinde kullanım potansiyeli taşımaktadır.

Geliştirilen organoid modelinde NKH 'ların migrasyonu ve farklılaştığı gösterilmiştir. Hücre farklılaşmalarının kısmen karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olup organoid modelinin ve modeldeki hücrelerin daha ayrıntılı tanımlanmasını sağlayacak çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Abdanipour, A., Jafari Anarkooli, I., Shokri, S., Ghorbanlou, M., Bayati, V., Nejatbakhsh, R. 2018. "Neuroprotective effects of selegiline on rat neural stem cells treated with hydrogen peroxide". *Biomed Rep*, 8(1), 41–46.
- Abeliovich, A. 2010, Şubat. "Parkinson's disease: Mitochondrial damage control.". *Nature*. England.
- Akyol O. 2004. "Şizofrenide oksidatif stres". *Kocatepe Tıp Dergisi*, (5), 15–25.
- Albin, R. L., Young, A. B., Penney, J. B. 1989. "The functional anatomy of basal ganglia disorders.". *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366–375.
- Alleyne, T., Mohan, N., Adogwa, A. 2012. "Elevated ferric, calcium and magnesium ions in the brain induce protein aggregation in brain mitochondria.". *The West Indian Medical Journal*, 61(2), 122–127.
- ALTMAN, J. 1962. "Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine.". *Experimental Neurology*, 5, 302–318.
- Amit, M., Itskovitz-Eldor, J. 2002. "Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells.". *Journal of Anatomy*, 200(Pt 3), 225–232.
- Amunts, K., Kedo, O., Kindler, M., Pieperhoff, P., Mohlberg, H., Shah, N. J., ... Zilles, K. 2005. "Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps.". *Anatomy and Embryology*, 210(5–6), 343–352.
- Andersen, J. K. 2004. "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?". *Nature Medicine*, 10 *Suppl*, S18-25.
- Andreazza, A. C., Shao, L., Wang, J.-F., Young, L. T. 2010. "Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder.". *Archives of General Psychiatry*, 67(4), 360–368.
- Arıncı Kaplan, E. A. 2014. "*Arıncı - Anatomi 1-2*". GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ.
- Arrázola, M. S., Silva-Alvarez, C., Inestrosa, N. C. 2015. "How the Wnt signaling pathway protects from neurodegeneration: the mitochondrial scenario.". *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 166.
- Astashkina, A. I., Mann, B. K., Prestwich, G. D., Grainger, D. W. 2012. "A 3-D organoid kidney culture model engineered for high-throughput nephrotoxicity assays.". *Biomaterials*, 33(18), 4700–4711.
- Azari, H., Louis, S. A., Sharififar, S., Vedam-Mai, V., Reynolds, B. A. 2011. "Neural-colony forming cell assay: an assay to discriminate bona fide neural stem cells from neural progenitor cells.". *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (49).
- Balta, E., Kramer, J., Samstag, Y. 2020. "Redox Regulation of the Actin Cytoskeleton in Cell Migration and Adhesion: On the Way to a Spatiotemporal View.". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 618261.
- Barbour, J. A., Turner, N. 2014. "Mitochondrial Stress Signaling Promotes Cellular Adaptations". *International Journal of Cell Biology*, 2014, 156020.
- Bartfeld, S., Clevers, H. 2015. "Organoids as Model for Infectious Diseases: Culture of Human and Murine Stomach Organoids and Microinjection of Helicobacter Pylori.". *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (105).
- Batista, L. F. Z. 2014. "Telomere biology in stem cells and reprogramming.". *Progress in Molecular Biology*

and Translational Science, *125*, 67–88.

Bayart, E., Cohen-Haguener, O. 2013. "Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells.". *Current Gene Therapy*, *13*(2), 73–92.

Beattie, G. M., Otonkoski, T., Lopez, A. D., Hayek, A. 1997. "Functional beta-cell mass after transplantation of human fetal pancreatic cells: differentiation or proliferation?". *Diabetes*, *46*(2), 244–248.

Berlucchi, G., Vallar, G. 2018. "The history of the neurophysiology and neurology of the parietal lobe.". *Handbook of Clinical Neurology*, *151*, 3–30.

Boj, S. F., Hwang, C.-I., Baker, L. A., Chio, I. I. C., Engle, D. D., Corbo, V., ... Tuveson, D. A. 2015. "Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer.". *Cell*, *160*(1–2), 324–338.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., Robertson, E. 1984. "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines.". *Nature*, *309*(5965), 255–256.

Burçak, G; Andican, G. 2004. "Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma". *CERRAHPAŞA TIP DERGİSİ*, *4*(35), 159–169.

Calderon-Gierszal, E. L., Prins, G. S. 2015. "Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Prostate Organoids In Vitro and its Perturbation by Low-Dose Bisphenol A Exposure". *PLOS ONE*, *10*(7), e0133238. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133238>

Campisi, J. 2005. "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors.". *Cell*, *120*(4), 513–522.

Cananzi, M., Atala, A., De Coppi, P. 2009. "Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine.". *Reproductive Biomedicine Online*, *18 Suppl 1*, 17–27.

Carpenter, M. K., Rosler, E. S., Fisk, G. J., Brandenberger, R., Ares, X., Miura, T., ... Rao, M. S. 2004. "Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system.". *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *229*(2), 243–258.

Çerçi Ece, E. H. 2019. "Kök Hücre", *14*(2), 221–228.

Chang, Y., Huang, S.-K., Wang, S.-J. 2012. "Coenzyme Q10 inhibits the release of glutamate in rat cerebrocortical nerve terminals by suppression of voltage-dependent calcium influx and mitogen-activated protein kinase signaling pathway.". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(48), 11909–11918.

Chen, Q., Ames, B. N. 1994. "Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(10), 4130–4134.

Chen, S.-D., Yang, J.-L., Hwang, W.-C., Yang, D.-I. 2018. "Emerging Roles of Sonic Hedgehog in Adult Neurological Diseases: Neurogenesis and Beyond.". *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8).

Chen, X., Guo, C., Kong, J. 2012. "Oxidative stress in neurodegenerative diseases.". *Neural Regeneration Research*, *7*(5), 376–385.

Chikada, H., Ito, K., Yanagida, A., Nakauchi, H., Kamiya, A. 2015. "The basic helix-loop-helix transcription factor, Mist1, induces maturation of mouse fetal hepatoblasts". *Scientific Reports*, *5*(1), 14989.

Collins, A., Koehlin, E. 2012. "Reasoning, learning, and creativity: frontal lobe function and human decision-making.". *PLoS Biology*, *10*(3), e1001293.

Conway, B. R. 2018. "The Organization and Operation of Inferior Temporal Cortex.". *Annual Review of*

Vision Science, 4, 381–402.

Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., Tresini, M. 2004. "Replicative senescence: a critical review." *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10–11), 827–848.

De Ferrari, G. V., Chacón, M. A., Barriá, M. I., Garrido, J. L., Godoy, J. A., Olivares, G., ... Inestrosa, N. C. 2003. "Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils." *Molecular Psychiatry*, 8(2), 195–208.

De Smet, H. J., Paquier, P., Verhoeven, J., Mariën, P. 2013. "The Cerebellum: Its role in language and related cognitive and affective functions". *Brain and language*, 127.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., ... Pereira-Smith, O. 1995. "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363 LP – 9367.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. 1999. "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." *Cell*, 97(6), 703–716.

Dolman, N. J., Chambers, K. M., Mandavilli, B., Batchelor, R. H., Janes, M. S. 2013. "Tools and techniques to measure mitophagy using fluorescence microscopy." *Autophagy*, 9(11), 1653–1662.

Dröge, W. 2002. "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.

Dryden, W. 2012. "Pluralism in counselling and psychotherapy: Personal reflections on an important development". *European Journal of Psychotherapy & Counselling*, 14, 103–111.

Dumont, M., Ho, D. J., Calingasan, N. Y., Xu, H., Gibson, G., Beal, M. F. 2009. "Mitochondrial dihydrolipoyl succinyltransferase deficiency accelerates amyloid pathology and memory deficit in a transgenic mouse model of amyloid deposition." *Free Radical Biology & Medicine*, 47(7), 1019–1027.

DURYEE, W. R., DOHERTY, J. K. 1954. "Nuclear and cytoplasmic organoids in the living cell." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 58(7), 1210–1231.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., Gage, F. H. 1998. "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nature Medicine*, 4(11), 1313–1317.

Erker, L., Azuma, H., Lee, A. Y., Guo, C., Orloff, S., Eaton, L., ... Grompe, M. 2010. "Therapeutic liver reconstitution with murine cells isolated long after death." *Gastroenterology*, 139(3), 1019–1029.

Evans, M. J., Kaufman, M. H. 1981. "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos". *Nature*, 292(5819), 154–156.

Fata, J. E., Mori, H., Ewald, A. J., Zhang, H., Yao, E., Werb, Z., Bissell, M. J. 2007. "The MAPK(ERK-1,2) pathway integrates distinct and antagonistic signals from TGF α and FGF7 in morphogenesis of mouse mammary epithelium." *Developmental Biology*, 306(1), 193–207.

Feeney, C. J., Frantseva, M. V, Carlen, P. L., Pennefather, P. S., Shulyakova, N., Shniffer, C., Mills, L. R. 2008. "Vulnerability of glial cells to hydrogen peroxide in cultured hippocampal slices." *Brain Research*, 1198, 1–15.

Ferreiro, E., Baldeiras, I., Ferreira, I. L., Costa, R. O., Rego, A. C., Pereira, C. F., Oliveira, C. R. 2012. "Mitochondrial- and endoplasmic reticulum-associated oxidative stress in Alzheimer's disease: from pathogenesis to biomarkers." *International Journal of Cell Biology*, 2012, 735206.

Floryk, D., Houstěk, J. 1999. "Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) is suitable for cytofluorometric measurements of mitochondrial membrane potential in cells treated with digitonin." *Bioscience Reports*,

19(1), 27–34.

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., Lalykina, K. S. 1970. "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.". *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4), 393–403.

Fu, J.-D., Yang, H.-T. 2006. "Developmental regulation of intracellular calcium homeostasis in early cardiac myocytes.". *Sheng Li Xue Bao : [Acta Physiologica Sinica]*, 58(2), 95–103.

Gage, F. H. 2000. "Mammalian neural stem cells.". *Science (New York, N.Y.)*, 287(5457), 1433–1438.

Giaime, E., Yamaguchi, H., Gautier, C., Kitada, T., Shen, J. 2012. "Loss of DJ-1 Does Not Affect Mitochondrial Respiration but Increases ROS Production and Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening". *PloS one*, 7, e40501.

Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q. 2002. "The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases.". *Free Radical Biology & Medicine*, 32(12), 1264–1275.

Gitler, A. D., Dhillon, P., Shorter, J. 2017, Mayıs. "Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope.". *Disease Models & Mechanisms*.

Goldman, S. A., Nottebohm, F. 1983. "Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8), 2390–2394.

Grainger, D. W. 2014, Nisan. "Cell-based drug testing; this world is not flat.". *Advanced Drug Delivery Reviews*. Netherlands.

Grandbarbe, L., Bouissac, J., Rand, M., Hrabé de Angelis, M., Artavanis-Tsakonas, S., Mohier, E. 2003. "Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process.". *Development (Cambridge, England)*, 130(7), 1391–1402.

Grisham, M. B., Jourd'Heuil, D., Wink, D. A. 1999. "Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation.". *The American Journal of Physiology*, 276(2), G315-21.

Halliwell, B. 1984. "Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance.". *Medical Biology*, 62(2), 71–77.

Han, X., Yu, L., Ren, J., Wang, M., Liu, Z., Hu, X., ... Gao, Z. 2017. "Efficient and Fast Differentiation of Human Neural Stem Cells from Human Embryonic Stem Cells for Cell Therapy". *Stem Cells International*, 2017, 9405204.

Hanna, J. H., Saha, K., Jaenisch, R. 2010. "Pluripotency and cellular reprogramming: Facts, hypotheses, unresolved issues". *Cell*, 143(4), 508–525.

Harman, S. M., Metter, E. J., Tobin, J. D., Pearson, J., Blackman, M. R. 2001. "Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging.". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(2), 724–731.

Harrison, R. G. 1906. "Observations on the living developing nerve fiber". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 4(1), 140–143.

Hayflick, L., Moorhead, P. S. 1961. "The serial cultivation of human diploid cell strains.". *Experimental Cell Research*, 25, 585–621.

He, W., Cui, L., Zhang, C., Zhang, X., He, J., Xie, Y., Chen, Y. 2017. "Sonic hedgehog promotes neurite outgrowth of cortical neurons under oxidative stress: Involving of mitochondria and energy metabolism.". *Experimental Cell Research*, 350(1), 83–90.

- Helguera, P., Seiglie, J., Rodriguez, J., Hanna, M., Helguera, G., Busciglio, J. 2013. "Adaptive downregulation of mitochondrial function in down syndrome.". *Cell Metabolism*, 17(1), 132–140.
- Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., Kageyama, R. 2000. "Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene *Hes5* in mouse retina.". *Development (Cambridge, England)*, 127(12), 2515–2522.
- Hollensworth, S. B., Shen, C., Sim, J. E., Spitz, D. R., Wilson, G. L., LeDoux, S. P. 2000. "Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress.". *Free Radical Biology & Medicine*, 28(8), 1161–1174.
- Huff, T., Mahabadi, N., Tadi, P. 2021. "Neuroanatomy, Visual Cortex.". Treasure Island (FL).
- Jornayvaz, F. R., Shulman, G. I. 2010. "Regulation of mitochondrial biogenesis.". *Essays in Biochemistry*, 47, 69–84.
- Joshi, G., Sultana, R., Perluigi, M., Butterfield, D. A. 2005. "In vivo protection of synaptosomes from oxidative stress mediated by Fe²⁺/H₂O₂ or 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride by the glutathione mimetic tricyclodecan-9-yl-xanthogenate.". *Free Radical Biology & Medicine*, 38(8), 1023–1031.
- Kakinuma, S., Nakauchi, H., Watanabe, M. 2009. "Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease.". *Journal of Gastroenterology*, 44(3), 167–172.
- Kandel, Eric R. James, H. Schwartz Thomas, Jessell, Thomas M. Siegelbaum, Steven A., Hudspeth, A. J. 2013. "*Principles of Neural Science*". (A. J. Kandel, Eric R. James, H. Schwartz Thomas, Jessell, Thomas M. Siegelbaum, Steven A., Hudspeth, Ed.) (Fifth).
- Kandel Eric, Greendard Paul, C. A. 2000. "Signal transduction in the nervous system".
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G. 2004. "Milestones of neuronal development in the adult hippocampus.". *Trends in Neurosciences*, 27(8), 447–452.
- Kennedy, K. A. M., Ostrakhovitch, E. A., Sandiford, S. D. E., Dayarathna, T., Xie, X., Waese, E. Y. L., ... Li, S. S. C. 2010. "Mammalian Numb-interacting Protein 1/Dual Oxidase Maturation Factor 1 Directs Neuronal Fate in Stem Cells*". *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17974–17985.
- Kiernan, J. A. 2012. "Anatomy of the temporal lobe.". *Epilepsy Research and Treatment*, 2012, 176157.
- Kirkinezos, I. G., Bacman, S. R., Hernandez, D., Oca-Cossio, J., Arias, L. J., Perez-Pinzon, M. A., ... Moraes, C. T. 2005. "Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice.". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(1), 164–172.
- Kjell, J., Fischer-Sternjak, J., Thompson, A. J., Friess, C., Sticco, M. J., Salinas, F., ... Götz, M. 2020. "Defining the Adult Neural Stem Cell Niche Proteome Identifies Key Regulators of Adult Neurogenesis.". *Cell Stem Cell*, 26(2), 277-293.e8.
- Klingner, C. M., Witte, O. W. 2018. "Somatosensory deficits.". *Handbook of Clinical Neurology*, 151, 185–206.
- Kong, F., Zheng, C., Xu, D. 2014. "Telomerase as a "stemness" enzyme.". *Science China. Life Sciences*, 57(6), 564–570.
- Konyalioglu, S., Armagan, G., Yalcin, A., Atalayin, C., Dagci, T. 2013. "Effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in embryonic neural stem cells.". *Neural Regeneration Research*, 8(6), 485–495.

- Koo, B.-K., Stange, D. E., Sato, T., Karthaus, W., Farin, H. F., Huch, M., ... Clevers, H. 2011. "Controlled gene expression in primary Lgr5 organoid cultures". *Nature Methods*, 9(1), 81–83.
- Krtolica, A., Campisi, J. 2002. "Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(11), 1401–1414.
- Kuyumcu, A., Duzgun, A.P, Ozmen, M.M., Besler, H.T. 2004. "Travma ve enfeksiyonda nitrikoksidin rolü". *Ulus Travma Dergisi*, 10(3), 149–159.
- Lancaster, M. A., Knoblich, J. A. 2014. "Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells". *Nature Protocols*, 9(10), 2329–2340.
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., ... Knoblich, J. A. 2013. "Cerebral organoids model human brain development and microcephaly". *Nature*, 501(7467), 373–379.
- Lanciego, J. L., Luquin, N., Obeso, J. A. 2012. "Functional neuroanatomy of the basal ganglia". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), a009621.
- Langer, R., Vacanti, J. P. 1993. "Tissue engineering". *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–926.
- Laywell, E. D., Rakic, P., Kukekov, V. G., Holland, E. C., Steindler, D. A. 2000. "Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13883–13888.
- Leite, S. B., Roosens, T., El Taghdouini, A., Mannaerts, I., Smout, A. J., Najimi, M., ... van Grunsven, L. A. 2016. "Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro". *Biomaterials*, 78, 1–10.
- Levy, A., Stedman, A., Deutsch, E., Donnadieu, F., Virgin, H. W., Sansonetti, P. J., Nigro, G. 2020. "Innate immune receptor NOD2 mediates LGR5⁺ intestinal stem cell protection against ROS cytotoxicity via mitophagy stimulation". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201902788.
- Lin, M. T., Beal, M. F. 2006. "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases". *Nature*, 443(7113), 787–795.
- López-Alarcón, C., Denicola, A. 2013. "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays". *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10.
- Lupfer, C., Thomas, P. G., Anand, P. K., Vogel, P., Milasta, S., Martinez, J., ... Kanneganti, T.-D. 2013. "Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection". *Nature Immunology*, 14(5), 480–488.
- Ma, D. K., Bonaguidi, M. A., Ming, G., Song, H. 2009. "Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system". *Cell Research*, 19(6), 672–682.
- Marcus, A. J., Coyne, T. M., Black, I. B., Woodbury, D. 2008. "Fate of amnion-derived stem cells transplanted to the fetal rat brain: migration, survival and differentiation". *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(4), 1256–1264.
- Marobbio, C. M. T., Pisano, I., Porcelli, V., Lasorsa, F. M., Palmieri, L. 2012. "Rapamycin reduces oxidative stress in frataxin-deficient yeast cells". *Mitochondrion*, 12(1), 156–161.
- Martin, G. R. 1981. "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12 II), 7634–7638.
- Matés, J. M. 2000. "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species

toxicology." *Toxicology*, 153(1–3), 83–104.

Matsui, H., Gavinio, R., Asano, T., Uemura, N., Ito, H., Taniguchi, Y., ... Takahashi, R. 2013. "PINK1 and Parkin complementarily protect dopaminergic neurons in vertebrates." *Human Molecular Genetics*, 22(12), 2423–2434.

Mattson, M. P. 2007. "Calcium and neurodegeneration." *Aging Cell*, 6(3), 337–350.

Maurya, C. K., Arha, D., Rai, A. K., Kumar, S. K., Pandey, J., Avisetti, D. R., ... Tamrakar, A. K. 2015. "NOD2 activation induces oxidative stress contributing to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle cells." *Free Radical Biology & Medicine*, 89, 158–169.

McKay, R. 1997. "Stem cells in the central nervous system." *Science (New York, N.Y.)*, 276(5309), 66–71.

Michalova, J., Savvulidi, F., Sefc, L., Forgacova, K., Necas, E. 2011. "Cadaveric bone marrow as potential source of hematopoietic stem cells for transplantation." *Chimerism*, 2(3), 86–87.

Momb, J., Lewandowski, J. P., Bryant, J. D., Fitch, R., Surman, D. R., Vokes, S. A., Appling, D. R. 2013. "Deletion of *Mthfd11* causes embryonic lethality and neural tube and craniofacial defects in mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), 549–554.

Morell, M., Tsan, Y., O'Shea, K. S. 2015. "Inducible expression of noggin selectively expands neural progenitors in the adult SVZ." *Stem cell research*, 14(1), 79–94.

Morgani, S. M., Canham, M. A., Nichols, J., Sharov, A. A., Migueles, R. P., Ko, M. S. H., Brickman, J. M. 2013. "Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions." *Cell Reports*, 3(6), 1945–1957.

Morganti, C., Bonora, M., Ito, K. 2019. "Improving the Accuracy of Flow Cytometric Assessment of Mitochondrial Membrane Potential in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Through the Inhibition of Efflux Pumps." *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (149).

Morrison, S. J., Spradling, A. C. 2008. "Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life." *Cell*, 132(4), 598–611.

MOSCONA, A. A. 1959. "Tissues from dissociated cells." *Scientific American*, 200(5), 132-4 passim.

Moscona, A., Moscona, H. 1952. "The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo." *Journal of Anatomy*, 86(3), 287–301.

Muroyama, Y., Kondoh, H., Takada, S. 2004. "Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 915–921.

Nelson, C. M., Vanduijn, M. M., Inman, J. L., Fletcher, D. A., Bissell, M. J. 2006. "Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures." *Science (New York, N.Y.)*, 314(5797), 298–300.

Nesland, J. M., Sobrinho-simões, M. A., Holm, R., Johannessen, J. V. 1985. "Organoid Tumor in the Thyroid Gland." *Ultrastructural Pathology*, 9(1–2), 65–70.

Neulinger, K., Oram, J., Tinson, H., O'Gorman, J., Shum, D. H. K. 2016. "Prospective memory and frontal lobe function." *Neuropsychology, Development, and Cognition. Section B, Aging, Neuropsychology and Cognition*, 23(2), 171–183.

Orkin, R. W., Gehron, P., McGoodwin, E. B., Martin, G. R., Valentine, T., Swarm, R. 1977. "A murine tumor producing a matrix of basement membrane." *The Journal of Experimental Medicine*, 145(1), 204–220.

ÖZEN Asuman, GÜL SANCAK İrem, CEYLAN Ahmet, Ö. Ö. 2016. "Isolation of adipose tissue-derived

stem cells". *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 137–141.

Palmer, T. D., Schwartz, P. H., Taupin, P., Kaspar, B., Stein, S. A., Gage, F. H. 2001. "Cell culture. Progenitor cells from human brain after death.". *Nature*, 411(6833), 42–43.

Pisoschi, A. M., Pop, A. 2015. "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review.". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.

Reddel, R. R. 2003. "Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer.". *Cancer Letters*, 194(2), 155–162.

Reddy, P. H. 2006. "Mitochondrial oxidative damage in aging and Alzheimer's disease: implications for mitochondrially targeted antioxidant therapeutics.". *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2006(3), 31372.

Reddy, P. H. 2011. "The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease". NIH Public Access, 14, 8–18.

Reynolds, B. A., Weiss, S. 1992. "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.". *Science (New York, N.Y.)*, 255(5052), 1707–1710.

Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H. G., Sasse, J., Eklom, P., Kemler, R., Doetschman, T. 1988. "Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies.". *Development (Cambridge, England)*, 102(3), 471–478.

Rodemann, H. P., Bayreuther, K., Francz, P. I., Dittmann, K., Albiez, M. 1989. "Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro.". *Experimental Cell Research*, 180(1), 84–93.

Ross, W. N. 2012. "Understanding calcium waves and sparks in central neurons.". *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(3), 157–168.

Sachs, N., Clevers, H. 2014. "Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes.". *Current Opinion in Genetics & Development*, 24, 68–73.

Sanai, N., Tramontin, A. D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S., ... Alvarez-Buylla, A. 2004. "Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration.". *Nature*, 427(6976), 740–744.

Sangkum, P. 2016. "Research highlights on stem cell therapy for the treatment of Peyronie's disease". *Translational Andrology and Urology*, 5(3), 363–365.

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. 2009. "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche.". *Nature*, 459(7244), 262–265.

Savrun, K., Uzun, N. 2001. "KRON İ K TOLUEN VE n-HEKSAN İ NTOKS İ KASYONUNDA PER İ FER İ K S İ N İ R S İ STEM İ HASARI: ELEKTROF İ ZYOLOJ İ K İ NCELEME*". *CERRAHPAŞA TIP DERGİSİ*, 32(3), 42–50.

Schwartz, P. H., Bryant, P. J., Fuja, T. J., Su, H., O'Dowd, D. K., Klassen, H. 2003. "Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex.". *Journal of Neuroscience Research*, 74(6), 838–851.

Sharma, R. K., Zhou, Q., Netland, P. A. 2008. "Effect of oxidative preconditioning on neural progenitor cells". *Brain Research*, 1243, 19–26.

Shi, Q., Xu, H., Yu, H., Zhang, N., Ye, Y., Estevez, A. G., ... Gibson, G. E. 2011. "Inactivation and

- reactivation of the mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase complex.". *The Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17640–17648.
- Shi, Y., Sun, G., Zhao, C., Stewart, R. 2008. "Neural stem cell self-renewal.". *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 65(1), 43–53.
- Siddiqui, A., Rivera-Sánchez, S., Castro, M. del R., Acevedo-Torres, K., Rane, A., Torres-Ramos, C. A., ... Ayala-Torres, S. 2012. "Mitochondrial DNA damage is associated with reduced mitochondrial bioenergetics in Huntington's disease.". *Free Radical Biology & Medicine*, 53(7), 1478–1488.
- Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., Bissell, M. J. 2001. "The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells.". *Development (Cambridge, England)*, 128(16), 3117–3131.
- Sinagoga, K. L., Wells, J. M. 2015. "Generating human intestinal tissues from pluripotent stem cells to study development and disease.". *The EMBO Journal*, 34(9), 1149–1163.
- Smith, A. G. 2001. "Embryo-derived stem cells: of mice and men.". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 435–462.
- Somoza, R. A., Rubio, F. J. 2012. "Cell therapy using induced pluripotent stem cells or somatic stem cells: this is the question.". *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(3), 191–196.
- Stewart, V. C., Heales, S. J. R. 2003. "Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration.". *Free Radical Biology & Medicine*, 34(3), 287–303.
- Suda, T., Arai, F., Shimmura, S. 2005. "Regulation of stem cells in the niche.". *Cornea*, 24(8 Suppl), S12–S17.
- Susan Standring (Ed.). 2015. "*Gray's Anatomy*".
- Swarm, R. L. 1963. "Transplantation Of A Murine Chondrosarcoma In Mice Of Different Inbred Strains.". *Journal of the National Cancer Institute*, 31, 953–975.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. 2007. "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.". *Cell*, 131(5), 861–872.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. 2006. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.". *Cell*, 126(4), 663–676.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. 1998. "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.". *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147.
- Thomson, J. A., Marshall, V. S. 1998. "Primate embryonic stem cells.". *Current Topics in Developmental Biology*, 38, 133–165.
- Toussaint, O., Houbion, A., Remacle, J. 1992. "Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture.". *Mechanisms of Ageing and Development*, 65(1), 65–83.
- Tranah, G. J., Nalls, M. A., Katzman, S. M., Yokoyama, J. S., Lam, E. T., Zhao, Y., ... Yaffe, K. 2012. "Mitochondrial DNA sequence variation associated with dementia and cognitive function in the elderly.". *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 32(2), 357–372.
- Unger, C., Kramer, N., Walzl, A., Scherzer, M., Hengstschläger, M., Dolznig, H. 2014. "Modeling human carcinomas: physiologically relevant 3D models to improve anti-cancer drug development.". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 79–80, 50–67.

- Vajrala, V., Claycomb, J. R., Sanabria, H., Miller, J. H. J. 2008. "Effects of oscillatory electric fields on internal membranes: an analytical model.". *Biophysical Journal*, 94(6), 2043–2052.
- Valente, S., Alviano, F., Ciavarella, C., Buzzi, M., Ricci, F., Tazzari, P. L. 2014. "Human cadaver multipotent stromal / stem cells isolated from arteries stored in liquid nitrogen for 5 years". *Stem Cell Research & Therapy*, 5(1), 1–14.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. 2007. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- Vendrov, A. E., Vendrov, K. C., Smith, A., Yuan, J., Sumida, A., Robidoux, J., ... Madamanchi, N. R. 2015. "NOX4 NADPH Oxidase-Dependent Mitochondrial Oxidative Stress in Aging-Associated Cardiovascular Disease.". *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(18), 1389–1409.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., Lotze, C. 1995. "Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?". *Experimental Cell Research*, 220(1), 186–193.
- Wallace, D. C. 1999. "Mitochondrial diseases in man and mouse.". *Science (New York, N.Y.)*, 283(5407), 1482–1488.
- Wei, Y. H., Lu, C. Y., Wei, C. Y., Ma, Y. S., Lee, H. C. 2001. "Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system.". *The Chinese Journal of Physiology*, 44(1), 1–11.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., Gage, F. 2001. "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations.". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 387–403.
- Wilson, H. V. 1907. "On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges". *Journal of Experimental Zoology*, 5(2), 245–258.
- Xia, H., Cao, Y., Dai, X., Marelja, Z., Zhou, D., Mo, R., ... Li, K. 2012. "Novel frataxin isoforms may contribute to the pathological mechanism of Friedreich ataxia.". *PloS One*, 7(10), e47847.
- Yamanaka, S. 2009. "A fresh look at iPS cells.". *Cell*, 137(1), 13–17.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. 2007. "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.". *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), 1917–1920.
- Zakharova, I. O., Sokolova, T. V., Bayunova, L. V., Zorina, I. I., Rychkova, M. P., Shpakov, A. O., Avrova, N. F. 2019. "The Protective Effect of Insulin on Rat Cortical Neurons in Oxidative Stress and Its Dependence on the Modulation of Akt, GSK-3beta, ERK1/2, and AMPK Activities.". *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15).
- Zhao, C., Deng, W., Gage, F. H. 2008. "Review Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis", 645–660.
- Zhao, T., Zhang, Z.-N., Rong, Z., Xu, Y. 2011. "Immunogenicity of induced pluripotent stem cells.". *Nature*, 474(7350), 212–215.

8. ÖZGEÇMİŞ

<u>Kişisel Bilgiler</u>	
Adı Soyadı	Onur ÖZCAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Üsküdar/24.12.1995
İletişim Adresi	Seymen Mahallesi, Öğretmenler Caddesi, Bahçecik/Başiskele
Telefon	5416618527
E-posta Adresi	o.ozcantr@gmail.com
Eğitim Bilgileri (Tarih Sırasına Göre)	09/2018-06/2021 Yüksek Lisans Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı, Kocaeli/TÜRKİYE. 09/2014-06/2018 Lisans Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum/TÜRKİYE. 09/2010-06/2014 Lise Oruçreis Anadolu Lisesi, Kocaeli/TÜRKİYE
Mesleki Deneyim/ İşyeri Bilgileri	
Yabancı Dil Bilgileri	İngilizce
Üye Olduğu Mesleki/ Sosyal Kuruluşlar	
<u>Bilimsel Etkinlikler</u>	
Makaleler	
Projeler	2018-2020 TÜbitak-1001- In-vitro sisplatin stresine maruz bırakılan böbrek mikroçevresi ile indüklenen Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının sisplatin nefrotoksitesisi üzerine iyileştirici etkilerinin araştırılması (Bursiyer öğrenci)
Bildiriler	4. International Health Science and life Congress, 8-10 April 2021 (Sözlü Bildiri)
Ödüller	
Diğer	

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umutepe Yerleşkesi /KOCAELİ
	Telefon	0262 303 74 50
	Faks	0262 303 74 63
	E-Posta	gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr

Başvuru Bilgileri	Araştırmacının Adı	Nöral Kök Hücre Organoid Modelinin Mitokondri Hasarı Açısından İncelenmesi			
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2020/47			
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Prof. Dr. Yusufhan YAZIR			
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Histoloji ve Embriyoloji			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)			
	Destekleyici	TÜBİTAK-KÜ BAPB			
	Araştırmacının Türü	Yüksek Lisans Tezi			
	Araştırmaya Katılan Merkezler	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	Ulusal <input checked="" type="checkbox"/>	Uluslararası <input type="checkbox"/>

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama
	Başvuru Dilekçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başvuru Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırmacının Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Hücre veya doku kültürü çalışması
	Araştırma Protokolü	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırma Bütçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Literatür Örneği	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Taahhütname	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	İzin Belgeleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başhekimlik Onayı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Özgeçmişler	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay formu	12.02.2020/KOGOEK01.5	1/2

EK.1 Etik Kurul Onayı (Devamı)

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2020/221	Proje No: 2020/47	Tarih: 13.07.2020
	Prof. Dr. Yusufhan YAZIR sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur. * <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır. *		

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

Etik Kurul Üyeleri

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
Prof. Dr. Canan BAYDEMİR Üye	Biyoistatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yusufhan YAZIR Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	İLİŞKİLİ
Doç. Dr. Ceyla ERALDEMİR Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Çiğdem VURAL Üye	Patoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Evren DEMİRSOY Üye	Dermatoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Nurettin Özgür DOĞAN Üye	Acil Tıp	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Cem CERİT Üye	Psikiyatri	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Enver Alper SİNANOĞLU Üye	Ağız Diş Ve Çene Radyolojisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğretim Üyesi Aslıhan AKPINAR Üye	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* Gerekçe ve öneriler:

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu Onay formu	Rev. Tarihi / No.su: 12.02.2020/KOGOEK01.5	Sayfa 2/2
--	--------------------------	---	--------------

Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen şekilde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun şekilde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Romen rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde yazıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde yazıldı.
- Ana metin satır aralığı 1,5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar alfabetik sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.
- Lisansüstü eğitim sırasında yapmış olduğu yayınlar ve bildirimler eklendi.
- Teze ait intihal raporu eklendi.

..... / / 20....

Yazar

İmza

..... / / 20....

Danışman

İmza