



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA HİPOKAMPÜS KAYNAKLI NÖRAL KÖK
HÜCRELERE PROPİYONİK ASİT VE LİKOPENİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Fatih Serdar ŞAHİN**

**Danışman
Prof. Dr. Gökçen DİNÇ**

Doktora Tezi

**Şubat 2025
KAYSERİ**

Ütopayı Gerçeğe Dönüştüren Bilim; Kök Hücre...

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA HİPOKAMPÜS KAYNAKLI NÖRAL KÖK
HÜCRELERE PROPIYONİK ASİT VE LİKOPENİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Fatih Serdar ŞAHİN**

**Danışman
Prof. Dr. Gökçen DİNÇ**

Doktora Tezi

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2022-11847 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Şubat 2025
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserle bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Fatih Serdar ŞAHİN

İmza:



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Ratlarda Hipokampus Kaynaklı Nöral Kök Hücrelere Propiyonik Asit ve Likopenin Etkilerinin Araştırılması” adlı **Doktora Tezi** Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Fatih Serdar ŞAHİN

Danışman

Prof. Dr. Gökçen DİNÇ

Kök Hücre ABD Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Gökçen DİNÇ danışmanlığında **Fatih Serdar ŞAHİN** tarafından hazırlanan **“Ratlarda Hipokampus Kaynaklı Nöral Kök Hücrelere Propiyonik Asit ve Likopenin Etkilerinin Araştırılması”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

.... /... / 2025

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Gökçen DİNÇ

Üye : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Üye : Doç. Dr. Mehtap NİSARİ

Üye : Doç. Dr. Saime Betül BAYGELDİ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Burcu KARAGÜLLE

İmza:

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /...../ 2025

Prof.Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın en başından bu yana yanımda hep varlığını hissettiğim, çalışkanlığı ve özverisiyle ne pahasına olursa olsun hayallerime giden yolda yolumu açacak imkânlar sunan, yeteneklerime inanan ve her daim saygı duyan, akademik hayatımda yol gösteren değerli meslektaşım ve hocam **Prof Dr. Gökçen DİNÇ'e**

Akademik hayatımın bana kattığı en büyük hediye, hayata dair zorlu yolumuzda omuz omuza yürüyerek, bilimi hayatımızın gerçekleri ile harmanlayarak büyük başarılarla birlikte imza attığım, sırt sırta verip her zorluğu beraberce aşarak bugünlere geldiğim, zekası, fikirleri ve mükemmel çözümleriyle uzun görünen yollarımı kısaltan kök hücre konusunda deha niteliğinde çözümleri ve çıkarımları ile bütün çalışmalarına değer katan Saygıdeğer Eşim **Dr. Gülhan ŞAHİN'e**

Akademik hayatıma başlamamdaki en büyük role sahip herdaim desteklerini hissettiğim büyüklüğünü ve tevazusunu bizden hiçbir zaman esirgemeyen, kapısının bize hep gülüyüzle açıldığını bildiğimiz, herdaim bu yolda bizi yüreklendiren Saygıdeğer Hocam **Prof. Dr. Harun ÜLGER'e**

Kök hücre konusunda daha fakülte yıllarımda elimden ilk tutan, yol gösteren, yanımda olan ve bana akademik dünyanın en güzel tarafları ile örnek olan, bilginin üretime nasıl dönüştürülebileceğinin benim gözümdeki en büyük örneği, meslek hayatım boyunca her zaman bana destek olan **Prof Dr. Ayhan DÜZLER'e**

Kök hücre konusunda bana bütün yolların açılmasını sağlayan, bugün elde ettiğim bütün yeteneklerimin mimarı, kök hücre alanında en nitelikli eğitimi ve öğretimi almamı sağlayan, örnek aldığım bilim insanı Saygıdeğer Hocam **Prof. Dr. Mustafa ÇETİN'e**

Akademik hayatımın en başında laboratuvar becerilerimi geliştirebilmem için bana sonsuz faydalar sağlayan, bildiği herşeyi benimle hesapsızca paylaşan, öğrenirken banada öğreten, gülüyüzü ve bilimsel asaletiyle onur duyduğum Saygıdeğer Hocam **Doç. Dr. Mehtap NİSARİ'ye**

Bilimsel altyapıları ve emekleriyle çalışmama eşsiz benzersiz katkıları ve yetenekleri için **Doç. Dr. Ahmet EKEN'e ve Dr. Öğr. Üyesi Kemal Erdem BAŞARAN'a**

Emekleri, destekleri ve yetenekleri ile çalışmamıza katkılarından dolayı **Dr. Mustafa ERMİŞ'e, Dr. Mustafa Burak ACAR'a, Dr. Yusuf AYKEMAT'a, Uzm. Bio. Buket Banu ÖZKAN'a, Uzm. Bio. Nesime ÖNER BULUT'a**

Tez projesinin hayata geçirilmesini sağlayan Erciyes Üniversitesi BAP birimi'ne desteği için,

Herşeyden ve herkesten önce **Yüce Türk Milletinin** saygıdeğer emekleriyle elde edilen maddi ve manevi imkânları, bilimsel çalışmalarımız için seferber eden **Yüce Türk Devletinin** bizlere sunmuş olduğu tüm imkânlar için;

Sonsuz Saygı, Minnet ve Şükranlarımı Sunarım...

Fatih Serdar ŞAHİN

Şubat 2025/Kayseri

RATLARDA HİPOKAMPÜS KAYNAKLI NÖRAL KÖK HÜCRELERE PROPIYONİK ASİT VE LİKOPENİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatih Serdar ŞAHİN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Şubat 2025
Danışman: Prof. Dr. Gökçen DİNÇ

ÖZET

Nöral kök hücreler nörogenezin en önemli bileşenidir. Nörogenez sinir sisteminin organizasyonu ve rejenerasyonu için son derece önemli bir süreçtir. Nörodejenerasyondan en çok bu süreç etkilenir. Hipokampus merkezi sinir sisteminin en önemli nörogenez merkezidir. Nöral kök hücreler, nörotransmitterler ve nörotrofik faktörler yönünden hipokampus son derece zengindir. Otizm çevresel, metabolik, genetik, immünolojik, gastrointestinal, psikolojik etkilerle gelişebilen regresif bir hastalıktır. Dünya genelinde her yıl otizmin görülme sıklığı artmaktadır. Bu araştırma *in vitro* otizm modeli oluşturmak ve bu model üzerinde likopenin etkilerinin araştırılması ve modelin doğrulanabilmesi amacıyla planlanmış ve yürütülmüştür. Bu amaçla 3-8 haftalık erkek ratların hipokampus dokusundan elde edilen nöral kök hücreler propiyonik asit ile muamele edilerek *in vitro* otizm modeli oluşturulmuştur. Bu sürecin yönetimi ve hücresel düzeyde otizmin oluşturulması için bir takım nöromedyatörlerin tepkileri, apoptotik testlerin sonuçları ve likopenin etkilerinden elde edilen verilerden yararlanılmıştır. Bu testlerden elde edilen sonuçlar ile *in vitro* otizm oluşturularak literatüre katkı sunulmaya çalışılmıştır. Oluşturulan *in vitro* deney düzeneğinde kontrol grubuna ek olarak propiyonik asit 2 MM/24 saat ile hücresel olarak propiyonik asit asidemisi oluşturulmuştur. Oluşturulan propiyonik asit asidemisinin etkilerini geriye çevirmek amacıyla likopen (1 µM/24 saat ve 2 µM/24 saat) ile hücreler muamele edilmiştir. Çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular çerçevesinde propiyonik asit uygulaması ile IL-6, IL-10, Glutamat, GABA otizme göre anlamlı bir şekilde artışları gözlemlenmiştir (p<0,05). Propiyonik asit uygulaması ile asetilkolin, BDNF, FGF-2, NGF ve anandamidin de otizme göre anlamlı bir şekilde azalışları gözlemlenmiştir (p<0,05). Staufen-2 için sadece nörosfer morfolojisi ve proliferasyon yönünden anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (p<0,05). propiyonik asit ile muamele edilen hücrelere likopen verildiğinde her iki dozda da (1 µM, 2 µM) asetilkolin, anandamid ve BDNF yönünden son derece anlamlı yükselişler saptanmıştır (p<0,05). Aynı durumda hücreler 1 µM doz likopen ile muamele edildiğinde FGF-2'nin seviyesini yeterli miktarda yükseltmede başarılı olamamış ancak 2 µM doz likopen ile muamele edildiğinde son derece anlamlı bir yükselişe neden olmuştur (p<0,05). Staufen-2 için sadece nörosfer morfolojisi yönünden her iki dozda da (1 µM, 2 µM) anlamlı bir azalış belirlenmiştir (p<0,05). NGF'de otizm yönünden likopen verilen grupta herhangi bir olumlu etkiye rastlanılmamıştır. Propiyonik asitten dolayı yükselen proinflamatuvar sitokinlerin baskılanmasında; 2 µM likopenin IL-6 yönünden anlamlı olduğu, 1 µM likopenin de IL-10 yönünden anlamlı olduğu saptanmıştır (p<0,05). Propiyonik asitten dolayı yükselen GABA'nın seviyesinin düşürülmesinde 1 µM likopenin doz olarak yeterli gelmediği 2

μM likopenin ise son derece anlamlı bir şekilde düşüş sağladığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Propiyonik asitten dolayı yükselen glutamatta ise 1 μM likopenin anlamlı bir düşüşe sebep olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Akım sitometrik sonuçlar çerçevesinde de otizmde beklediği gibi; propiyonik asitin hücrelerin apoptoz oranını artırdığı likopen verildiğinde özellikle propiyonik asitten zarar görmüş hücrelerde apoptotik oranları (doza bağlı olarak) düşürdüğü, canlılığı ve ölüm oranını arttığı saptanmıştır. *İnvitro* olarak elde edilen sonuçlara göre; oluşturulan otizm modelinin nöral kök hücrelere ve nöromediyatörlere etkilerinin olduğu, ayrıca apoptoz, nekroz ve proliferasyon dengelerinde de değiştiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *İn vitro*; Likopen; Nöral Kök Hücre; Nörodejenerasyon; Otizm; Propiyonik Asit.



INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PROPIONIC ACID VE LYCOPENE ON NEURAL STEM CELLS FROM RAT HIPPOCAMPUS

Fatih Serdar ŞAHİN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Stem Cell Sciences

PhD. Thesis, February 2025

Supervisor: Prof. Dr. Gökçen DİNÇ

ABSTRACT

Neural stem cells are critical components of neurogenesis, a vital process for the organisation ve regeneration of the nervous system. This process is profoundly affected by neurodegeneration. The hippocampus is a major neurogenesis centre within the central nervous system, rich in neurotransmitters ve neurotrophic factors. Autism is a regressive disorder influenced by environmental, metabolic, genetic, immunological, gastrointestinal, ve psychological factors, with a rising prevalence worldwide. This study aimed to establish an *in vitro* autism model ve investigate the effects of lycopene on this model. Neural stem cells were isolated from the hippocampal tissue of 3-8 week-old male rats ve treated with propionic acid to create the *in vitro* autism model. Cellular responses, apoptotic tests, ve the influence of lycopene were evaluated to better understve autism at the cellular level. The findings contribute to the literature on *in vitro* autism models. In the experimental setup, propionic acid acidaemia was induced in cells using 2 mM propionic acid for 24 hours. Lycopene (liquid) was applied at doses of 1 µM ve 2 µM for 24 hours to counteract propionic acid -induced effects. The results revealed significant increases in IL-6, IL-10, glutamate ve GABA levels following propionic acid treatment ($p<0.05$), alongside significant decreases in acetylcholine, BDNF, FGF-2, NGF, ve anandamide levels ($p<0.05$). Staufen-2 expression showed a notable increase in neurosphere morphology ve proliferation ($p<0.05$). When cells treated with propionic acid were exposed to lycopene, significant increases in acetylcholine, anandamide, ve BDNF were observed at both doses ($p<0.05$). However, 1 µM lycopene was insufficient to elevate FGF-2 levels, whereas 2 µM induced a significant increase ($p<0.05$). Staufen-2 levels exhibited significant reductions at both lycopene doses ($p<0.05$), though these changes were not consistent with expectations for autism-related memory ve learning features. Similarly, no positive effect on NGF was observed in lycopene-treated groups. Lycopene demonstrated dose-dependent suppression of pro-inflammatory cytokines elevated by propionic acid; 2 µM significantly suppressed IL-6, while 1 µM notably reduced IL-10 ($p<0.05$). Regarding propionic acid -induced elevations in GABA levels, 1 µM lycopene was insufficient, but 2 µM caused a substantial reduction ($p<0.05$). In the case of glutamate, 1 µM lycopene resulted in a significant decrease ($p<0.05$). Flow cytometry findings showed that propionic acid increased apoptosis rates in line with autism-related expectations. Lycopene treatment, particularly in propionic acid-damaged cells, reduced apoptotic rates dose-dependently while improving cell viability ve reducing mortality. According to the results obtained *in vitro*, it has been determined that *in vitro* autism model has

effects on neural stem cells and neuromediators, and also changes the balance of apoptosis, necrosis and proliferation.

Keywords: Autism, *In vitro*, Lycopene, Neural Stem Cells, Neurodegeneration, Propionic Acid.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
TABLO LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Merkezi Sinir Sistemi Embriyolojisi ve Anatomisi	3
2.2. Hipokampus	5
2.3. Nöral Kök Hücreler	9
2.4. Nörosferler ve Nöral Rozetler	11
2.5. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB)	13
2.6. Propiyonik Asit, Propiyonat (E280, E281, E282, E283)	15
2.7. Otizm ve Propiyonik Asit Bağlantısı	18
2.8. Hastalık Modellerinin Kullanım Amaçları ve Önemi	19
2.9. Nörotrofik Faktörler ve Nörotransmitterler.....	19
2.9.1. FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2 - Fibroblast Büyüme Faktörü	
2).....	21
2.9.2. Anandamid	22
2.9.3. Staufen-2.....	24
2.9.4. NGF (Nerve Growth Factor- Sinir Büyüme Faktörü)	25
2.9.5. Asetilkolin	25
2.9.6. BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor-Beyin Kökenli	
Nörotrofik Faktör)	27
2.9.7. İnterlökinler (IL-6, IL-10)	28

2.9.8. Glutamat, GABA (Gama aminobütirik asit)	29
2.10. Likopen.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi	34
3.2. Deneyler ve Analizler Sırasında Kullanılan Malzemeler.....	35
3.2.1. Sarf Malzemeleri ve Cihazlar	35
3.3.Beyin Dokusundan Hücre Eldesi Sırasında Kullanılacak Olan Reaktiflerin Hazırlanması.....	39
3.4. Hipokampüsten Nöral Kök Hücre Eldesi.....	39
3.5. Akım Sitometri.....	47
3.5.1. Flow (Akım) Sitometri ile Apoptoz Protokolü.....	49
3.6. ELİZA (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) Yöntemi.....	50
3.6.1. ELİZA (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) Protokolü	50
3.7. Konfokal Mikroskopi ve Hücrelerin Kimliklendirilmesi.....	501
3.7.1. Konfokal Mikroskopi Protokolü.....	502
3.8. İstatistik	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Morfolojik Sonuçlar	54
4.2. Konfokal Mikroskopi Sonuçları.....	71
4.3. ELİZA Sonuçları	73
4.4. Flow (Akım) Sitometrik Analiz Sonuçları	79
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
7. KAYNAKLAR	100
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

%	: Yüzde
μM	: Mikromolar
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
BDNF	: Brain Derived Neurotrophic Factor
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CA	: Cornu Ammonis
Ca²⁺	: Kalsiyum İyonu
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
DEHB	: Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu
EGF	: Epidermal Growth Factor
ELISA	: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FAAH	: Amid Hidrolaz Enzimi
FACS	: Fluorescence Activated Cell Sorter
FGF	: Fibroblast Growth Factor
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FSC	: Forward Scatter Chanel
GABA	: Gama Aminobütirik Asit
GAD	: Glutamic Acid Decarboxylase
HRP	: Horseradish Peroxidase
IL	: Interleukin
MM	: Milimolar
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NGF	: Nerve Growth Factor
NKH	: Nöral Kök Hücre
NSAİ	: Non-steroid antiinflatuar ilaçlar
OSB	: Otizm Spektrum Bozukluğu
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PE	: R-phycoerythrin
PI	: Propidium iodide
PPA	: Propiyonik Asit, Propiyonat

RNA	: Ribo Nükleik Asit
RNSCEM	: Rat Neural Stem Cell Expansion Medium
Rpm	: Rounds Per Minute (Dakikadaki Devir)
SD	: Sprague Dawley
Shh	: Sonic hedgehog
Sox-2	: Sulfite oxidase-2
SSC	: Side Scatter Chanel
Str	: Streptavidin
SVZ	: Sub Ventriküler Zon
TCA	: Trikarboksilik asit
Th1	: Yardımcı T 1 - T helper 1
Th2	: Yardımcı T 2 - T helper 2
vb.	: ve benzeri
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1. ELISA istatistik sonuçları	73
--	----



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	Beynin bazı önemli anatomik yapıları	4
Şekil 2.2.	Ratlarda ve insanlarda MSS'nin anatomik olarak yerleşimi	5
Şekil 2.3.	<i>İn vitro</i> ortamda örnek nörosfer resimleri.....	12
Şekil 2.4.	Genç ve sağlıklı nörosfer resimleri ve mikrosilyalar (siyah oklar).	12
Şekil 2.5.	<i>İn vitro</i> nöral rozet örnekleri.....	13
Şekil 2.6.	Krebs (TCA) döngüsü ve propiyonat mekanizması	16
Şekil 2.7.	Likopenin kimyasal yapısı ve likopen içeren bazı meyveler	33
Şekil 3.1.	Flow (akım) sitometri cihazı.....	37
Şekil 3.2.	Lamin air kabin.....	38
Şekil 3.3.	İnverted mikroskop	38
Şekil 3.4.	ELİZA okuyucu	39
Şekil 3.5.	Rat beyninden hipokampusu çıkartmak için ana materyaller ve kabin düzeni.....	40
Şekil 3.6.	Rat beyninin kafatasından çıkartıldıktan sonra enine ve boyuna ölçümü.	430
Şekil 3.7.	Rat beyninin hemisferlerinin medyan hattın korpus kallozum kesilerek ikiye ayrılması.....	43
Şekil 3.8.	Hipokampusun beyin dokusu içindeki görüntüsü (turuncu çizgili alan)..	42
Şekil 3.9.	Hipokampusun beyinden izole edildikten sonraki görüntüsü (turuncu ok).....	42
Şekil 3.10.	Hipokampusun beyinden bilateral izolasyonu sonrası petrideki görüntüsü	43
Şekil 3.11.	Hipokampusun beyinden çıkartıldıktan sonra mins edilmesi.....	43
Şekil 3.12.	Hücre üretim sürecinin şematik olarak gösterimi.	44
Şekil 3.13.	Mins edilen dokuların enzim ile muamelesi.	45
Şekil 3.14.	Santrifüj işleminin ardından hücrelerin falkon tüpün dibinde oluşturduğu çökelti.....	45
Şekil 3.15.	Oluşturulan çalışma grupları	46
Şekil 3.16.	Akım sitometri cihazının temel çalışma prensibi	48
Şekil 3.17.	Akım sitometri cihazının sensörleri ve bileşenleri	49

Şekil 3.18.	Akım sitometrik analizlerde apoptotik testler için kullanılabilen örnek Şekil diyagram ve bölgeleri (dot blot). (A^+ : ölü hücreler, A^+B^- : geç apoptotik hücreler, B^+ : erken apoptotik hücreler, neg. : canlı hücreler, $A^+B^- + B^+$ = tüm apoptotik hücreler) 50
Şekil 4.1.	Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında flaskta oluşturduğu görüntü (10X). 54
Şekil 4.2.	Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında flaskta oluşturduğu görüntü (4X). 55
Şekil 4.3.	Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında ilk 24 saat içindeki görüntüsü ve nörosferik odakların oluşmaya başlaması (4X).....55
Şekil 4.4.	Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında ilk 48 saat içindeki görüntüsü ve nörosferik odakların oluşmaya başlaması (10X)....56
Şekil 4.5.	Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında ilk 36 saat içindeki görüntüsü ve nörosferik odakların oluşmaya başlaması (4X).....56
Şekil 4.6.	Kontrol grubu hücrelerinin ~5. gününde oluşturduğu irili ufaklı nörosferler ve dağılımları (10X).....57
Şekil 4.7.	Kontrol grubu hücrelerinin 1. haftada oluşturduğu sağlıklı bir siliyalı nörosferin yakından görünümü (karnabahar görünümü) (40X). 58
Şekil 4.8.	Kontrol grubu hücrelerinin 1. haftada oluşturduğu sağlıklı bir siliyalı nörosferin yakından görünümü (karnabahar görünümü) (20X). 58
Şekil 4.9.	Kontrol grubu hücrelerinin 1. haftadaki oluşturduğu irili ufaklı nörosferler ve dağılımları (10X).....59
Şekil 4.10.	Kontrol grubu hücrelerinden bir nöral rozetin 7-9.gün aralığında nörogenez sürecini yürütmesi (20X).....59
Şekil 4.11.	Kontrol grubu hücrelerinden bir nöral rozetin ortalama 9.günü ve nörogenez sürecini yürütmesi (20X).....60
Şekil 4.12.	Kontrol grubu hücrelerinden bir nöral rozetin ortalama 9.günden itibaren artık nörogenez sürecine başlaması ve diğer nöral rozetler ile dendritik bağlantılar kurması (10X).....61
Şekil 4.13.	Kontrol grubu hücrelerinin uzun süre besi yeri değişimi yapılmadan bırakıldığında herhangi bir nörosferin dönüştüğü sinir hücresi odakları (10X).....61

Şekil 4.14.	Likopen (1 μ M) grubu hücrelerinin nörosferik yapılarının görüntüsü (20X).....	62
Şekil 4.15.	Likopen (1 μ M) grubu hücrelerinin nöral rozet yapılarının görüntüsü (20X).....	63
Şekil 4.16.	Likopen (2 μ M) grubu hücrelerinin nörosferik yapılarının görüntüsü (20X).....	63
Şekil 4.17.	Likopen (2 μ M) grubu hücrelerinin oluşturduğu nöral rozet ve nörosferin aynı anda elde edilen görüntüsü (10X).	64
Şekil 4.18.	Likopen (2 μ M) grubu hücrelerinin oluşturduğu nöral rozet ve nörosferin aynı anda elde edilen görüntüsü (20X).	64
Şekil 4.19.	Likopen (2 μ M) grubu hücrelerinin oluşturduğu nöral rozet görüntüsü (20X).....	65
Şekil 4.20.	PPA verilen grubun hem nörosfer hemde nöral hücre odakları ile birlikte görülen görüntüsü (4X).....	66
Şekil 4.21.	PPA verilen grubun hem nörosfer hemde nöral hücre odakları ile birlikte görülen görüntüsü (4X).....	66
Şekil 4.22.	PPA verilen gruptaki nörosferlerin görüntüsü (sağda 40X, solda 20X). ..	67
Şekil 4.23.	PPA verilen gruptaki nörosferlerin görüntüsü (solda 40X, sağda 20X). ..	67
Şekil 4.24.	PPA verilen gruptaki nöral odakların görüntüsü (10X).....	68
Şekil 4.25.	PPA verilen gruptaki nöral odakların görüntüsü (10X).....	68
Şekil 4.26.	PPA verilen gruptaki nöral odakların görüntüsü (4X).....	69
Şekil 4.27.	PPA uygulamasının ardından likopen (1 μ M) uygulanan gruptaki bipolar nöral odakların görüntüsü (10X).....	70
Şekil 4.28.	PPA uygulamasının ardından likopen (2 μ M) uygulanan gruptaki nöral odakların görüntüsü ve multipolar nöritlerin görüntüsü (20X).	70
Şekil 4.29.	PPA uygulamasının ardından likopen (2 μ M) uygulanan gruptaki nörosferlerin ve multipolar nöritlerin aynı anda birlikte görüntüsü (10X).....	71
Şekil 4.30.	Konfokal mikroskopi ile nestin ve sox2 belirteçlerinin gösterilmesi ve istatistiki sonuçları.	72
Şekil 4.31.	Asetilkolin sonuçları	73
Şekil 4.32.	Anandamid sonuçları.	74

Şekil 4.33.	FGF-2 sonuçları.	74
Şekil 4.34.	GABA sonuçları.	75
Şekil 4.35.	Glutamat sonuçları.	76
Şekil 4.36.	IL-6 sonuçları.	76
Şekil 4.37.	IL-10 sonuçları.	77
Şekil 4.38.	NGF sonuçları.	77
Şekil 4.39.	BDNF sonuçları.	78
Şekil 4.40.	Staufen-2 sonuçları.	78
Şekil 4.41.	Kontrol grubu apoptoz sonuçları.	79
Şekil 4.42.	PPA grubu apoptoz sonuçları.	80
Şekil 4.43.	PPA+ likopen (1 µM) grubu sonuçları	80
Şekil 4.44.	PPA+ likopen (2 µM) grubu sonuçları.	81
Şekil 4.45.	Kontrol, likopen (1µM) , likopen (2µM) grupları sonuçları.	82
Şekil 4.46.	Kontrol ve likopen (1µM, 2 µM) gruplarının apoptoz/ölüm/canlılık grafiği.	83
Şekil 4.47.	Kontrol ve PPA+likopen (1µM, 2 µM) gruplarının apoptoz/canlılık ve ölüm grafikleri.	83

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöropsikiyatrik kökenli rahatsızlıklar günümüzde son derece yaygın olmakla birlikte bu hastalıkların belkide en önemlisi otizm spektrum bozukluğudur. Üstelik bu hastalığın görülme sıklığının günden güne arttığı bildirilmiştir. Otizm henüz teşhis ve tedavi bakımından nicel kriterlere dayandırılmamıştır (Abdelli ve ark., 2019; Amaral ve ark., 2008). Otizmin henüz nöropatolojisi tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Ancak farklı beyin bölgelerinde yapısal bozukluklar ve hücresel düzeyde de bozulmalar olduğu tespit edilmiştir. (Erdoğan ve ark., 2013; Palmen ve ark., 2004). Yapılan bir çok çalışmada elde edilen bulgular çerçevesinde otizmde beyin bölgeleri içerisinde en çok etkilenen nöroanatomik yapının hipokampus olduğu görüşü hakimdir (Bauman ve Kemper, 2005; Eigsti ve Shapiro, 2003).

Propiyonik asit genel olarak gıda ve süt endüstrisinde koruyucu olarak sık sık kullanılan bir organik asittir. Bu organik asitin enterik bakteriler tarafından barsakta sentezlendiği bilinmektedir. Propiyonik asit kan beyin bariyerini geçebilme özelliği sayesinde beyin dokularına geçerek otizm semptomları oluşturabilmektedir (Erten ve ark., 2020; Foley ve ark., 2014; Shultz ve ark., 2008; Witters ve ark., 2016). Ayrıca bazı NSAİ ve steroid ilaçların propiyonik asit ve türevlerini içerdiği de bilmektedir (Ommaty, 2008; Sarıcaoğlu ve Batur, 2021).

Nöral kök hücreler nörogenezin temelini oluşturan son derece önemli hücrelerdir. Sanılanın aksine nörogenezin aslında memelilerde bir ömür boyu devam ettiği bilinmektedir. Bu sebeple birçok nöral kökenli hastalığın nörogenez sürecinde olduğu bilinmektedir. Ayrıca nöral kök hücreler aracılığıyla immünmodülasyon sağlayan biyomoleküller ve nörotrofik faktörler sentezlenebilmektedir. Etik sebeplerden dolayı nöral kök hücrelerin insandan eldesi nerdeyse imkansızdır. Bu sebeple nöral tabanlı birçok çalışmada alternatif model olarak rat tercih edilmektedir. Ratların sinirsel

işleyişleri ve duyuşal senkronizasyonlarının insana son derece yakın olduğu bilinmektedir (Galiakberova ve Dashinimaev, 2020; Ito ve ark., 2022; Lindvall ve Kokaia, 2006; Reynolds ve Weiss, 1992).

Likopen kırmızı meyvelerde bulunan oldukça yüksek düzeyde antioksidan özellikleri olan önemli bir beta karotenoiddir. Ayrıca nörodejeneratif hastalıklar için koruyucu ve onarıcı etkinliği son derece yüksek olduğu bilinmektedir. Likopen kullanılarak yapılan *in vivo* hastalık modellerinde özellikle otizmin tedavisi için olumlu sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Çetin ve ark., 2017; Huang ve ark.,2018).

Bu bilgilerden yola çıkarak; rat hipokampüsünden elde edilen nöral kök hücrelerle *in vitro* otizm modeli oluşturularak, otizmin kök hücre düzeyindeki etkilerinin belirlenmesi ve bu modelle likopenin otizm üzerindeki iyileştirici etkilerinin kök hücre düzeyinde gözlemlenebilmesi amaçlanmıştır. Yani; otizmin bir nöral kök hücre hastalığı olup olmadığına dair veriler elde edebilmek ve endojen yada eksojen kök hücreşel otizm tedavisi için literatüre bu çerçevede katkı sunulması amaçlanmıştır.

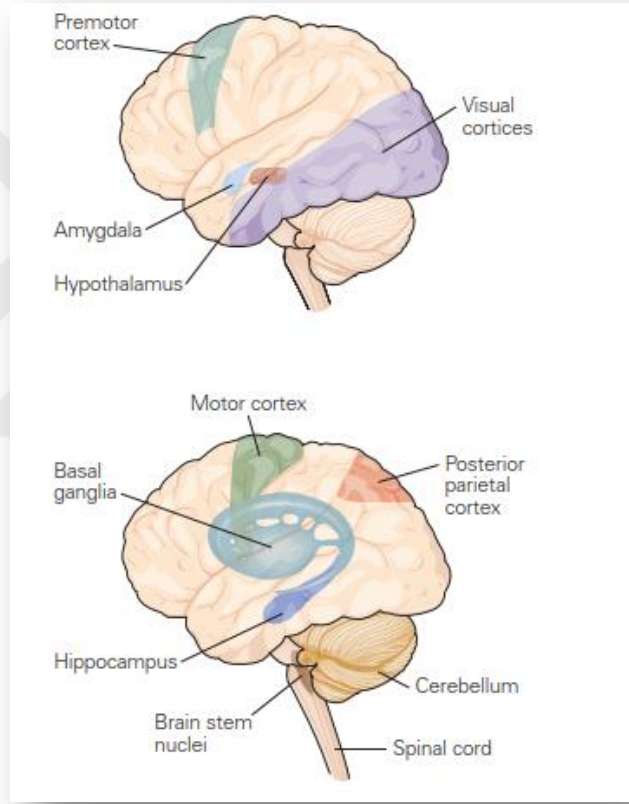
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Embriyolojisi ve Anatomisi

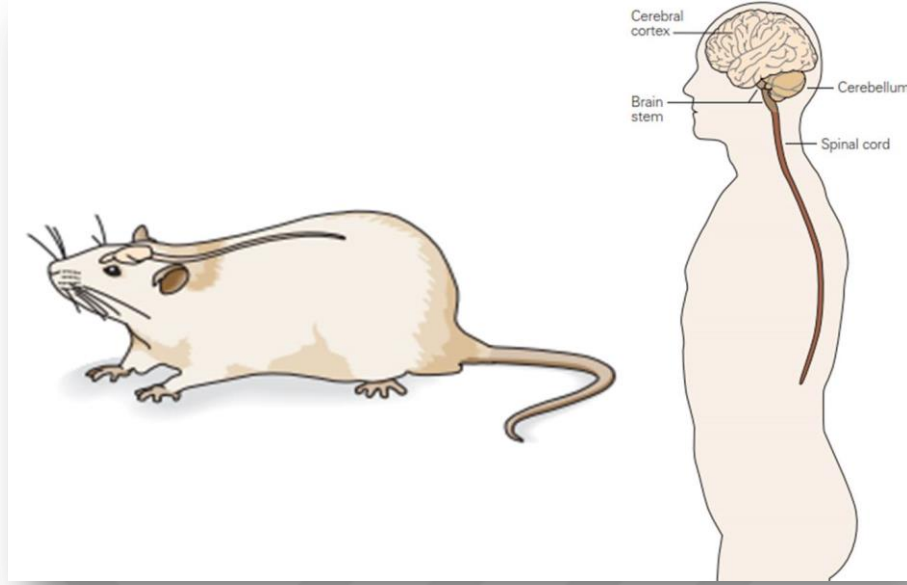
Tüm omurgalıların beyni ve omuriliği nöroektodermden köken alan nöral plakanın kendi etrafında katlanmasıyla oluşan nöral tüpten meydana gelmiştir (Şekil 2.1). Buradan köken alan hücreler embriyonik dönemden sonra nöronlara, astrositlere ve oligodentrositlere farklılaşarak nöral sistemi inşa ederler (Maynard ve Downes, 2019).

MSS embriyoda gastrulasyon safhasında ilk gelişen sistemlerdendir. Embriyonik germ yapraklarından birisi olan ektoderm sinir sisteminin oluşumunu sağlar. Nöroepitel hücrelerin, radial glial hücrelere dönüşümü ile nörogenez embriyonik olarak devam eder. Radial glial hücreler sinir sisteminin ilk ve gerçek nöral kök hücreleridir. Bu hücreler ara hücre formları ile nörogenezin devamını sağlarlar. Bu hücreler ilerleyen dönemlerde nöral progenitörlere yada gliyal progenitörlere farklılaşmadan birkaç kez seri halde bölünürler. Bu süreç beynin sub ventriküler zon (SVZ) bölgesinde gerçekleşir. Ayrıca SVZ’de kan damarları da bulunmaktadır. Buradan da anlaşılacağı üzere memelilerde bu bölge nöral kök hücrelerin ve nöral öncüllerin olduğu yaşamlarını sürdürdükleri, türevsel hücrelerin ilk ortaya çıkış yeridir. Nöral kök hücrelerin bir kısmı kendini yetişkinlik dönemine kadar faaliyet göstermeden saklarlar. Erişkin beyninde kök hücre varlığı bu şekilde sağlanır. Bu süreçte nöral yönde ilerleyen öncül hücrelerde hem mitotik hemde asimetric faaliyetlere rastlanmıştır. SVZ genel olarak nörojenik niş olarak adlandırılır. Yaşamın çeşitli evrelerinde bu bölgeden çıkan ve olgunlaşan nöronlar görev bölgelerine sırayla göç ederler. Kendi görev bölgelerine taşındıkları zaman akson ve dendrit oluşumunu sağlayarak görevlerine başlarlar (Can, 2014).

Embriyonik dönemde gelişim göstermekte olan beyinin SVZ'sinde üretilen nöral kök hücreler belirli bir disiplin içerisinde glial hücrelerin rehberliğinde neokortekse göç ederler. Bu göçün ardından kendi bölgelerine ulaştıklarında “homing” özellikleri çerçevesinde yerleşim gösterirler. Bu yerleşim tamamlandıktan sonra artık görev yapabilmek için akson ve dendritlerini komşu nöronlara uzatır ve bağlantı kurarlar. Bu süreç terminal farklılaşma sonucunda glial hücrelerin desteklediği nihai nöromimariyi oluşturur (Shultz ve ark., 2008; Wegiel ve ark., 2010).



Şekil 2.1. Beynin bazı önemli anatomik yapıları (Kandel ve ark., 2013).



Şekil 2.2. Ratlarda ve insanlarda MSS'nin anatomik olarak yerleşimi (Kandel ve ark., 2013).

MSS'nin en önemli bileşeni beyindir. Beyin muazzam bir yapıya sahiptir ve son derece gelişmiş bir organdır. Ayrıca rat beyinde insana göre bir takım farklılıklar mevcuttur. Şöyle ki bazı yapılar rat beyinde insan beynine göre orantısal olarak ya daha büyüktür ya daha küçüktür. Piriform korteks sıçanda serabral korteksin büyük parçasını oluştururken insanda küçük bir bölümünü oluşturur. Yine benzer şekilde ratlarda hipokampus son derece iyi gelişmiştir. Ayrıca insana oranla son derece büyüktür. Ayrıca lateral ventriküllerin hipokampal bağlantıları, ilişkileri insan ve ratta biraz farklıdır (Şekil 2.2) (Maynard ve Downes, 2019).

2.2. Hipokampus

Hipokampus kelime anlamı olarak Yunancada “denizati” kavramına karşılık gelmektedir. Latince karşılık olarak *Cornu Ammonis* (koçboynuzu) olarakta bilinmektedir. Anatomik olarak hafif bir şekilde “C” harfine benzemektedir. Hipokampus bölgeleri anatomik olarak CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak isimlendirilmiştir. Bu bölgeler tanımlanırken hücresel yapı farklılıkları esas alınmıştır. Bu bölgelerin isimleri oluşturulurken *Cornu Ammonis* isminin baş harflerinin kısaltması kullanılmıştır (İzci ve Erbaş, 2015).

Bu anatomik bölgelerden en önemlisi CA1 ve CA3 bölgeleri arasındaki iletişimidir. Çünkü bu bölgeler öğrenme, bellek ve bilgi işlenmesi gibi konularda son derece aktiftir. CA1'den elde edilen bilgiler prefrontal kortekse göçte önemli rol oynarlar. Ayrıca bu bölgelerdeki hücre yoğunluklarının özellikle ergenlik döneminde aktif bir şekilde arttığı bilinmektedir (İzci ve Erbaş, 2015).

Hipokampüsün özellikle nörotransmitter ve nörotrofik faktör (GABA, glutamat, kolin) sentezi açısından son derece aktif bir doku olduğu bilinmektedir. Hipokampüs elektriksel uyarım açısından da son derece aktif bir dokudur. Hipokampüs, yakın geçmişe dair hafızada depolanan bilgilerin organizasyonu içinde oldukça önemli bir dokudur. Hipokampüs her türlü duyuşsal, işitsel, görsel, kimyasal ve hormonal uyarım için hassastır. Bu özelliği ile hafızanın neden bu kadar geniş bir algıya sahip olduğu gerçeğinin cevabını taşımaktadır (İzci ve Erbaş, 2015).

Hipokampüs kortizol reseptörleri yönünden oldukça zengindir. Stres durumlarında amigdala ve hipokampüs arasında, organizma cevabı üzerine son derece önemli bir denge vardır. Hipokampüs birçok noktada sinyal iletimi için adeta bir kavşak görevi görmektedir. Hipotalamusun limbik sistemle olan bağlantıları, bilginin duygusal bir süzgeçten geçerek davranış olarak kodlanmasında önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bu özelliği ile organizmanın hareketleri ve tepkileri üzerine duyuşsal bir filtre gibi görev yaptığı bilinmektedir. Buna en büyük kanıt papez devresinin varlığıdır. Bu devrenin en önemli bileşeni hipokampüstür. Ayrıca hipokampüs, çok yoğun kortizol reseptörleri içermesi sebebi ile stres vb. uyaranlara göre bir takım değişimler geçirebilmektedir. Bundan dolayı uzun vadeli stresin hipokampal hücrelere zarar verebildiği, hücresel bozulmaları ve ölümleri tetiklediği bilinmektedir. Ayrıca hipokampüs kortizol salınımının inhibisyonunu negatif feedback etkisi ile sağlayarak amigdalanın tepkilerini dengede tutmaktada görevlidir (İzci ve Erbaş, 2015).

Hipokampüsün özellikle uzamsal öğrenme ve yön bulma konusunda son derece aktif bir doku olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. İlk olarak yetmişli yıllarda "konum hücreleri" olarak adlandırılan hücrelerin hipokampüste bulunduğu O'keefe tarafından rapor edilmiştir. (O'Keefe ve Dostrovsky, 1971). Ayrıca ilerleyen zaman içerisinde yapılan çalışmalarla konum bilgisinin her daim güncellendiği bulunmuştur. CA1 ve CA3 bölgelerinde bulunan ve bir pramidal nöron tipi olan konum hücrelerinin, konum

ve öğrenme gibi birçok faaliyetin merkezini oluşturdıkları yapılan birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (İzci ve Erbaş, 2015). Bütün bu bilgilere bakıldığında hipokampusla ilgili oluşan en geçerli kanaat bu dokunun son derece aktif bir doku olduğu gerçeğidir. Hali hazırda beyindeki en stratejik kök hücre lokalizasyonuna sahip olmasında bu görüşü destekler niteliktedir.

Hipokampusün bir diğer özelliği ise hafıza için boşluk oluşturmastır. Hipokampus gelen yeni bilgilerin beynin diğer noktalarına aktarılması ve tasnif edilebilmesi için son derece faal bir dokudur. Hipokampal hasar durumunda yakın hafıza ile ilgili son derece büyük sorunlar ortaya çıktığı yapılan birçok çalışmada gözlemlenmiştir. Bilindiği üzere bir olayı yada durumu kolay bir şekilde hatırlayabilmek için yer, zaman, kişiler gibi ayrıntılar çok önemlidir. Aslında hafıza temelinde bakılacak olursa bu tarz detayların tamamının hipokampüsten çağırılan bilgiler olduğu görülecektir (İzci ve Erbaş, 2015).

Hipokampusün en önemli görevlerinden biriside nörogenezin merkezi olmasıdır. Bu nedenle hipokampal nörogenez özellikle hafızanın oluşumu, yönetimi ve tasnifi için son derece önemlidir. Hipokampüste oluşan yeni hücrelerin olgunlaşma süreçlerindeki elektrofizyolojik özellikleri ve farklılıkları sayesinde patern ayrımı (benzer girdilerin farklı şekilde işlenerek ayrı çıktılara dönüştürülmesi işlemi) yapılabilmesine ve uyarımların tasniflenebilmesine dair bir takım bulgular mevcuttur. Bu sayede uzamsal ve epizodik (anısal) hafızaya katkıda bulunduğu bilinmektedir (Schmidt ve ark., 2012; Zhao ve ark., 2008). Hipokampüse gelen benzer nitelikli uyarımlar dentat girusta patern ayrımı yapılarak CA3'e aktarılırlar. Burada birbiri ile ilişkili olarak ayrı ayrı hafızalar haline getirilerek patern ayrımı tamamlanır (Yassa ve Stark, 2011). Dentat girusun patern ayrımındaki rolüne dair birçok çalışma mevcuttur (Gilbert ve ark., 2001; Sahay ve ark., 2011). Dentat girus (DG) bölgesindeki nöronlar öğrenme ve hafıza gibi süreçlerle yenilenirler. Ayrıca yeni anıların oluşmasında dentat girusta oluşan yeni nöronlara bağlıdır. Bütün bunlara ek olarak dentat girustaki nörogenez süreci; steroidler, glutamat reseptör etkinlikleri, egzersiz, enflamasyon ve antidepresanların etkileriyle değişebilmektedir (Can, 2014).

Nörogenez, sinir sisteminin oluşumunu ve gelişimini tanımlayan bir kavramdır. Bu süreçte en önemli görev nöral kök hücreleridir. Önceden nörogenezin embriyonik ve fetal dönemle sınırlı olduğu düşünülüyordu. Ancak son yıllardaki gelişmeler ışığında

erişkin dönemde bile nörogenezin, hipokampüsün çeşitli bölgelerinde sürdüğüne dair kanıtlar elde edilmiştir. Böylece nörogenezin erişkin dönemde gerçekleşmeyeceğine dair dogmalar geçerliliğini yitirmiştir. Bu çerçeveden bakıldığında nöral kök hücreler ve nöral progenitör hücreler için hipokampüs aslında çok önemli bir niştir. Çünkü burada nörolojik kökenli birçok hücre (glial hücreler, nöronlar, nöral öncüller vb.) üretilir, gerektiğinde farklılaştırılır ve göç mekanizmasıyla görev yerlerine gönderilirler (Lledo ve ark., 2006; Zhao ve ark., 2008).

Nörogenezin engellenmesine dair yapılan çalışmalarda koku ile ilgili testlerde patern ayrımının bozulduğu (Sahay ve ark., 2011), nörogenezin indüklendiği çalışmalarda da bu ayrımın yapılabildiği ve konumsal hafıza performansının güçlendiğine dair kanıtlar elde edilmiştir (Lange-Asschenfeldt ve Kojda, 2008). Ayrıca fizyolojik yaşlanma ve bilişsel engeli olan hastalarda yapılan çalışmalarda patern ayrımına dair bazı bozuklukların tespit edildiği rapor edilmiştir (Sahay ve ark., 2011).

Hipokampal hasar sonrası yeni bilgi edinmenin mümkün olmadığı ve hasardan kısa süre önce elde edilen bilgilerin hatırlanmasında zorlaştığı ancak, buna karşın hasardan çok önce edinilmiş olan bilgilerin ise hatırlanmasının zor olmadığı bilinmektedir. Buna sebep olarakta eski bilgilerin hipokampüste tasnif edilip kısa süreli hafızadan çıkartılarak uzun süreli hafızaya aktarıldığı yani beynin uzun süreli hafızası için kullandığı diğer bölgelere (medial prefrontal korteks, neokortikal yapılar vs.) bilgiyi transfer ettiği anlaşılmaktadır (Kitamura ve ark., 2009; Kitamura ve Inokuchi, 2014; Tanaka ve ark., 2014). Hipokampüste işleyen süreçler çerçevesinde devam eden nörogenezle; eski bilgilerin tasniflenip beynin kalıcı hafızasına aktarıldığı, yeni elde edilen bilgilerin de depolanabilmesi ve tasniflenebilmesi için dinamik bir sistem oluşturulduğu düşünülmektedir (Kitamura ve Inokuchi, 2014; Wojtowicz, 2012). Hipokampal nörogenez ile nöral ağa eklenen her bir genç nöronun daha hızlı ve kolay uyarılabilmesiyle (olgun nöronlara göre) sinaptik plastisiteyi artırdığına dair çeşitli raporlar vardır (Schmidt-Hieber ve ark., 2004). Bu sayede sisteme eklenen her yeni nöron ile hafızayı yöneten ve oluşturan nöral ağlar dinamik bir şekilde değişkenlik gösterir. Bu dinamizmi olumlu etkileyen her şey (egzersiz, yeni şeyler öğrenme vb.) hafızayı güçlendirir (Aimone ve ark., 2010). Bu dinamizmi olumsuz etkileyen her şey ise (baş edilemeyen korku, depresyon, daimi stres, anksiyete vb.) sadece hafızayı bozmakla kalmaz aynı zamanda yeni nöron üretimini ve nöral sağkalımı da bozar

(Kaneko ve Sawamoto, 2009). Buna ek olarak; hipokampusun sağ ve sol loblarının görsel ve sözel hafıza bakımından aktivasyonlarının birbirinden farklı olduğu, buna göre de bu bölgelerde oluşan hasarlar neticesinde loblara göre görsel veya işitsel hafızaya olan olumsuz etkilerinin farklı olduğu rapor edilmiştir (Songur ve ark., 2001).

Hipokampal dentat girus kaynaklı hücrelerin uyarılabilirlikleri özellikle 4-6 haftalık deney hayvanlarında maksimum düzeyde gerçekleşmektedir. Buda hücrelerin daha yüksek sinaptik plastisiteye sahip olduğu anlamına gelmektedir. Sekizinci haftaya gelindiğinde artık bu hücrelerin plastisite yeteneklerinin olgun bir rat ile nerdeyse aynı olduğu bilinmektedir (Aimone ve ark., 2010). Bu sebeple 3-8 haftalık ratların plastisite, nöroenez, sinaptogeneze ve nöral kök hücre temelli deneylerde kullanılmaları daha doğru sonuçlar elde edilebilmesi açısından önemlidir.

2.3. Nöral Kök Hücreler

Nöral kök hücreler (NKH) ilk olarak; 1989 yılında embriyonik sıçanların n beyninden elde edilerek tanımlanmıştır (Temple, 1989). NKH'in 1989'dan günümüze kadar beynin çeşitli yerlerinden eldesi sağlanmıştır (Reynolds ve Weiss, 1992; Taupin ve Gage, 2002).

Nöral kök hücreler bir takım nöral hücrelere (nöron, oligodentrosit, astroglia vb.) farklılaşabilen, kendini yenileme yeteneği bulunan ve asimetric blneabilen proliferatif hücre gruplarıdır. Ayrıca nöral kök hücreler ve nöral öncüller nestin ve sox-2 gibi belirteçleri ifade ederler. Nestin daha çok nöral kök hücreler tarafından ifade edilirken, sox-2'nin ağırlıklı olarak nöral blastlarda ifadesi mevcuttur. Ayrıca bu hücreler nöroenezin (erişkin ve embriyonal) temelini oluşturan son derece önemli hücrelerdir. Neredeyse tüm memelilerde nöroenez mekanizması, hücre farklılaşma süreçleri ve nöral hücrelerin evreleri gizemini korumaktadır. Günümüz teknolojesi ile nöroenezin aslında tüm memelilerde yaşam boyu devam ettiği gerçeğinin anlaşılmasıyla nöral kök hücreler ayrı bir önem kazanmıştır. Nöral kök hücrelerin elde edilmesi son derece zordur ve kaynağı son derece kısıtlıdır. Diğer kök hücrelere nazaran *in vitro* adaptasyonu düşüktür. Ayrıca retimi de son derece zordur. Özellikle insanda canlı dokudan eldesi etik nedenlerden dolayı neredeyse imknsızdır. Embriyonik olarak elde edilmesi sürecinde de yine bir takım etik nedenler bu hücrelere erişimin nn tıkamaktadır. Bu sebeple araştırmacılar alternatif kaynaklara yönelmek zorunda

kalmışlardır. Bu kaynakların başında indüklenmiş pluripotent kök hücreler ve deney hayvanları gelmektedir. Elde edilen nöral kök hücreler, özellikle nörogenez ve birçok nöral tabanlı (nörodejeneratif, nörogelişimsel) hastalığın oluşum mekanizması ve tedavi yöntemlerinin bulunabilmesi için son derece önemli bir materyaldir. Ayrıca nöral kök hücreler ilaç ve Ar-Ge çalışmaları içinde son derece önemlidirler. Nöral kök hücreler nörogenezin moleküler mekanizmasının anlaşılabilmesi için de büyük önem arz etmektedirler. Özellikle Wnt/ β -katenin, Shh, BMP gibi proteinler ve yolları nörogenezde oldukça önemlidirler. Birçok sitogenez faaliyetinde bu proteinler ve yolların önemli olduğu bilinmektedir. Bu yüzden nörogenezin tam anlamıyla aydınlatılması son derece elzemdir (Galiakberova ve Dashinimaev, 2020). Sinirsel işleyiş ve gelişim üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, insana en çok benzeyen sinir sisteminin ratlarda bulunduğu gözlemlenmiştir. Ito ve ark. tarafından yapılan bir çalışmaya göre rat ve insan sinir sistemi, duysal senkronizasyon olarak muazzam bir benzerliğe sahiptir (Ito ve ark., 2022).

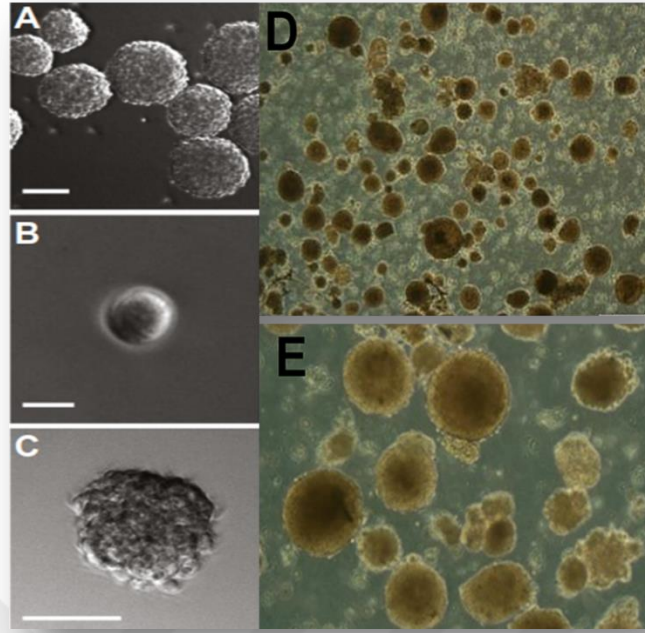
Multipotent olmaları ve kendini yenileyebilme yetenekleri sayesinde NKH'lar hücre replasman tedavileri açısından son derece önemli bir kaynaktır. Özellikle son yıllarda yapılan birçok araştırma neticesinde NKH nakli ile birçok nörodejeneratif hastalığın iyileşebileceğine dair bir takım bulgular elde edilmiştir (Tang ve ark., 2017). Erişkin NKH'lar genelde yerleşik nöron ağına entegre şekilde bilişsel ve duygusal işlevlere katkı sağlarlar (Toda ve Gage, 2018). Ayrıca NKH'lar nörogenezin ömür boyu sağlıklı şekilde sürdürülebilmesi açısından oldukça önemli bir etkinliğe sahiptirler. Özellikle MSS hasarları başta olmak üzere sinir sisteminin hasarlarını düzeltebilme potansiyelleri ve *in vivo* nakil geleceği açısından, NKH'ların *in vitro* proliferasyon ve sağkalım özelliklerinin geliştirilmesi çok önemlidir (Jaberi ve ark., 2021).

Beyinde nörogenez neredeyse her yaşta devam eden bir süreçtir. Bu sürecin başrol oyuncusu olan nöral kök hücreler beynin çeşitli yerlerinde saptanmıştır (Reynolds ve Weiss, 1992). Nöral kök hücreler aracılığı ile beynin endojen olarak kendini belirli sınırlar içerisinde onarabileceği görüşü kabul görmektedir (Lindvall ve Kokaia, 2006). Nöral kök hücrelerden nörogenez yoluyla oluşan yeni bir nöronun herhangi bir iletimde bulunabilmesi için ortalama geçen süre bir aydan fazladır. Bu sebeple nörogenez sürecinin belirli bir periyoda bağlı olduğu ve nöronların belirli bir sürecin sonunda aktif olarak görev yapabildiği bilinmektedir (Yücel ve ark., 2020).

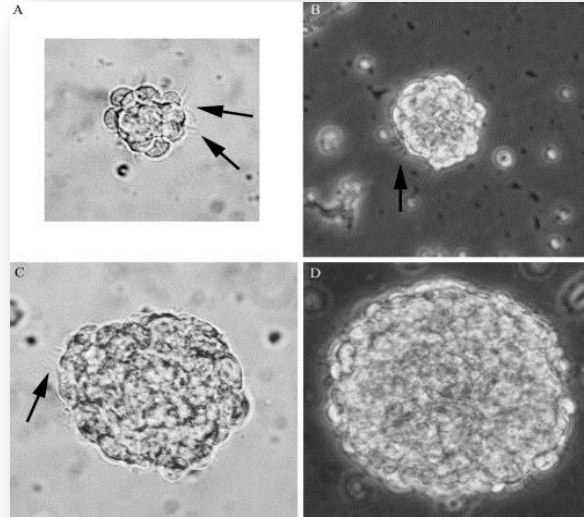
Nöral kök hücreler temel olarak birkaç ana nöral hücre grubuna (astrozit, oligodendrosit, nöron) dönüşebilen öncül özellikli hücrelerdir. Bu açıdan bakıldığında nörodejeneratif ve nörogelişimsel hastalıklar için tedavi potansiyeli barındırabileceği düşünülmektedir. Bu hücrelerin özellikle nakliyle ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen veriler umut vaatetmektedir. NKH'ların bu etkileri sadece hasarlı hücrelerin yerini alarak değil aynı zamanda immünmodülasyon ve nörotrofik faktör sentezleriyle de sağladıkları bildirilmiştir. (Han ve ark., 2016; Shin ve ark., 2000). Ayrıca kültür ortamında nöral kök hücreler ve nöral öncül hücreler nörosfer adı verilen yapılar oluşturmaktadırlar (Can, 2014).

2.4. Nörosferler ve Nöral Rozetler

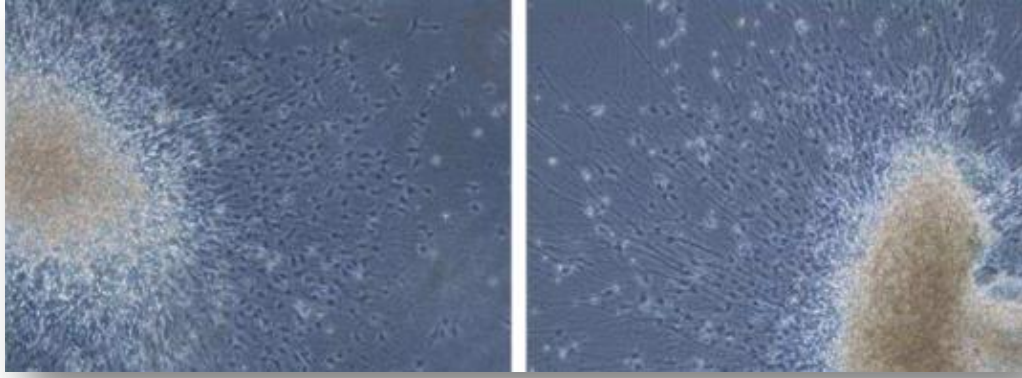
Nörosferler, nöral kök hücrelerin oluşturdukları *in vitro* olarak gözlemlenebilen hücre kümeleridir. *İn vitro* ortamda yapılan morfolojik muayenede nörosferlerin sınırlarında gözlemlenen silyalar nörosferlerin sağlıklı olarak geliştiğinin bir göstergesidir (Şekil 2.3, Şekil 2.4) (Fu ve ark.,2018; Park ve ark.,2012). Bu özelliklere ek olarak ideal nörosferler faz parlaklığını göstermelidir. Boyutları biraz küresel bir form izlemelidir. Boyutlar ve proliferasyon arttıkça küresel form daha belirgin ve sınırları daha net bir hale gelmelidir (Rietze ve Reynolds, 2006). Ayrıca FGF-2 ve EGF'nin bulunduğu bir ortamda büyüyen nörosferlerden elde edilen nöral kök hücreler özellikle nestin ifade ederler. Nöral rozetler ise nöral kök hücrelere göre daha öncül (blastik) karaktere sahip hücre kümeleridir. Ayrıca nöral rozet kümesinin içinde sadece blastik hücreler değil farklılaşmış nöral hücrelerinde bulunması mümkündür. *İn vitro* olarak tıpkı bir rozet gibi görünürler (Şekil 2.5). FGF-2 ve EGF'nin bulunduğu bir ortamda büyüyen nöral rozet karakterli blastik hücreler ise genel olarak sox-2 ifade ederler. Nörosferlerden ve nöral rozetlerden farklılaşma yoluyla birçok nöral hücre grubu elde etmek mümkündür. Nörosferler genel olarak yüzey tutunumu çok iyi olmayan hücre gruplarıdır. Nöral rozetler ise kültür kabında nöral erişkin hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu iki hücre grubundanda merkezi veya periferik sinir sistemine ait bir nöronu farklılaşma yolu ile elde etmek mümkündür (Galiakberova ve Dashinimaev, 2020).



Şekil 2.3. *İn vitro* ortamda örnek nörosfer resimleri A: Nörosferlerin toplu görünümü. B: Tek nörosfer odağı görünümü. C: Karnabahar görünümlü ve silyalı ideal bir nörosfer. D: Nörosferlerin toplu halde renkli görünümü. E: Nörosferlerin toplu halde daha büyük büyütme kullanılarak renkli görünümü (Jaberi ve ark., 2021; Ramasamy ve ark., 2013).



Şekil 2.4. Genç ve sağlıklı nörosfer resimleri ve mikrosilyalar (siyah oklar). A: Nörosfer ve siliya görünümü. B: Tek nörosfer karnabahar görünümü. C: Karnabahar görünümlü ideal bir nörosfer ve siliyası. D: Nörosferin yakından görünümü (Rietze ve Reynolds, 2006).



Şekil 2.5. *In vitro* nöral rozet örnekleri (Papst, 2019).

2.5. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB)

Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB), İlk defa 1943 yılında Kanner'in tanımladığı nöropsikiyatrik bir bozukluktur. Bu durum yaşamın çeşitli evrelerinde değişken şiddette semptomlar ile karakterize olarak devam etmektedir (Kanner, 1943). Otizm nörobiyolojik ve nöropsikiyatrik semptomlarla sürerken bu duruma immünolojik ve gastrointestinal semptomlarda eşlik edebilir (Trottier ve ark.,1999).

Otizmin çevresel ve genetik bir takım etkileşimlerin etkisiyle oluştuğu değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarla bu değerlendirmelerin doğru olduğuna dair birçok bulgu elde edilmiştir (MacFabe, 2012). Yapılan çalışmalar ve otizmle ilgili yayınlanan raporlar bir bütün halinde değerlendirildiğinde; genel olarak otizmin metabolik, genetik, immünolojik, gastrointestinal, çevresel, psikolojik etkilerle gelişebileceği ve ilerleyebileceğine dair bulgular vardır. Ayrıca barsak mikrobiyomunda bu hastalığın gelişmesinde etkinliği olduğuna dair birçok rapor bulunmaktadır. Özellikle besinlerin fermantasyonu ile barsakta bakteriler tarafından sentezlenen kısa zincirli yağ asitlerinin ve bu asitlerin metabolitlerinin hastalığın gelişiminde son derece etkin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu metabolitlerin immün sistem üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu ve bu sürecin hormon salgıları üzerinde de patolojik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Bütün bu karmaşık etkilerin MSS üzerinde bir takım gelişimsel yada dejeneratif sorunlara neden olduğu ve bu sorunlar neticesinde otizm spektrumlarının oluştuğu bilinmektedir (Finegold ve ark., 2002; Hu ve ark., 2006; Sarachana ve ark., 2010; Wiest, 2009).

İnsanda genel olarak sinir sisteminin oluştuğu ve olgunlaşmaya başladığı dönem; gebelikte 2. trimesterin sonu ile doğum sonrası 24 aylık yaş aralığıdır. Bu süreç sonucunda artık beynin ana taslağı oluşmuş ve son şeklini almıştır. Bu dönemde artık dendrit ve aksonal büyümeler, sinaptik oluşumlar, gliogenez, miyelinizasyon, nörotransmisyon gibi sistemler olgun hale gelmektedir (Yücel ve ark., 2020). Nöroplastisite için en önemli süreç postnatal 24 aylık süreçtir. Bu dönem nöral gelişim için son derece kritik bir süreçtir. Çünkü nöral gelişimin ve plastisitenin en yoğun olduğu dönemdir. Bu süreçte dil ve sosyal beceri gelişimi sağlanır. Bu süreç çok yoğun olmasada ergenlik dönemine kadar uzayabilir. Ancak bu dönemin erken kapanması durumunda OSB gelişimine sebep olabileceği bildirilmiştir (Berger ve ark., 2013).

OSB çeşitli spektrumlarda homojen olmayan bir biçimde seyreden genel olarak somut/soyut iletişim eksikliği ve sosyal etkileşim bozukluğuyla karakterizedir. Ayrıca nöropsikiyatrik (stereotipi, ekolali, anksiyete vb.) bazı bozukluklarla seyreden nörogelişimsel olduğu varsayılan bir hastalıktır. Otizm spektrum bozukluğuna sahip bireylerde %30-60 oranında mental gerilik spektrumunun bulunduğu bildirilmiştir. Otizm bazı çocuklarda 18 aya kadar kendini belli eder, ancak bazı çocuklarda bu dönem 18-24 ay aralığına kadar uzayabilmektedir. Ayrıca, bu süreçler net olmamakla birlikte çeşitli farklı dönemlere de dağılabilmektedir. Birçok vakada yapılan otopsi çalışmalarında dikkat çeken en önemli detay, amigdala ve hipokampal bölge formasyonlarında gözlemlenen heterojenitedir. Görüldüğü üzere otizm nörolojik olarak bazı farklılıklar içeren bir hastalıktır (Amaral ve ark., 2008).

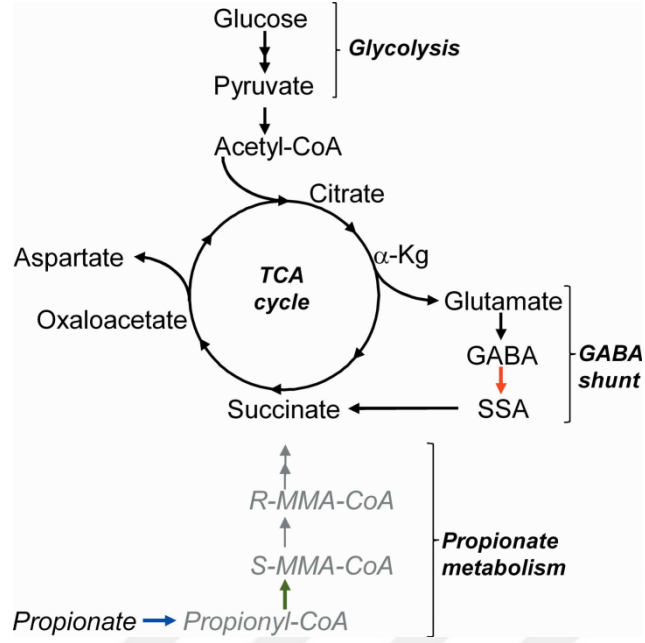
Otizmin nöropatolojisi halen açıklanabilmiş değildir. Ancak belirli beyin bölgelerinde (amigdala, frontal lob, hipokampus) normal dışı gözlemlerin otizmin nöropatolojisiyle ilgili bir takım ipuçları içerdiği düşünülmektedir. Gözlemlenen ve otizmde fonksiyonu olduğu düşünülen bu farklılıkların genel olarak çevresel ve genetik faktörlerin etkileriyle oluşmuş olabileceği görüşü hakimdir. Bunlar; anormal nörogenez, hem sayı hem de izometrik olarak düzensiz gelişen sinaptik bağlantılar, bozuk dendritik oluşumlar ve mikroglia kaynaklı inflamatuvar yanıt şeklinde kısaca özetlenebilir. Bütün bu anormal farklılıkların nöronların sayısı ve niteliğine etki edebileceği bildirilmiştir (Erdoğan ve ark., 2013). Bütün bunlara ek olarak otizmde proliferasyon bozuklukları ve apoptoz düzensizliğine bağlı olarak hücresel veya dokusal bozulmalar gözlemlendiği bildirilmiştir (Palmen ve ark., 2004).

Otizmin bir diğerk önemli nöroanatomik bölgesinin temporal lob olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalara göre frontal lobun limbik yapılarla bağlantısının bulunmasıyla önemli bir nöroanatomik odak olarak dikkat çekmektedir (Eigsti ve Shapiro, 2003). Ancak yapılan çalışmalar daha farklı nöroanatomik bölgelere kaydıkça, asıl odak noktasının hipokampüs olduğu gözlemlenmektedir. Yapılan otopsi çalışmalarında sık rastlanan bulgulardan bir tanesi; limbik sistem ve hipokampüste küçük hacimli, sık yerleşim gösteren nöronların bulunmasıdır. Bu düzensiz nöral mimarinin, nöral işlevlerin gerçekleşmesi esnasında çeşitli olumsuzluklar yaratabileceği görüşü hakimdir (Bauman ve Kemper, 2005). Ayrıca manyetik rezonans tabanlı çalışmalarda rastlanan bulgulardan biri de bilateral amigdala hacim artışıdır (Howard ve ark., 2000; Sparks ve ark., 2002). Bütün bunlara ek olarak erişkin otistik hastalardan elde edilen bulgulara göre; hipokampal hacimlerin genel olarak azaldığı rapor edilmiştir (Aylward ve ark., 1999).

Otizm genel olarak erkek çocuklarda kız çocuklarına göre 4 kat daha fazla gözlenen bir olgudur. Ayrıca otizimli kız çocuklarında zeka geriliği erkek çocuklardakine göre daha fazla gözlemlenmektedir (Baykara, 2003).

2.6. Propiyonik Asit, Propiyonat (E280, E281, E282, E283)

Propiyonik asit (PPA) genel olarak süt ve gıda endüstrisinde koruyucu olarak sık kullanılan bir organik asittir. Propiyonik asitin, barsakta bazı enterik bakterilerin son ürünleri olarak fermentasyon yoluyla organizmada da üretildiği bilinmektedir. PPA, barsak bariyerini ve kan beyin bariyerini geçebilme özelliğine sahip bir organik asittir. PPA seviyesi dokularda yükselince hücre içi asitleşmeye başlar ve bu reaksiyonların sonucunda proinflatuar sitokin uyarımlarıyla sistemik enflamasyon tetiklenir. PPA'nın özellikle nöral hücrelerde seviyesinin artmasıyla nörogelişimsel bozukluklar (propiyonik asidemi) gözlenmektedir. Böylece nörotransmitter madde geçişlerini bozarak bazı nöropsikiyatrik bozukluklara (otizm, MSS rahatsızlıkları vb.) ve sinaptik aktarım bozukluklarına neden olabilmektedir (Erten ve ark., 2020).



Şekil 2.6. Krebs (TCA) döngüsü ve propiyonat mekanizması (Morlve ve ark., 2018).

PPA dolaşıma katıldığı zaman (iç yada dış kaynaklı olarak) kan beyin bariyerini geçebilir. Bu geçiş sonrası özellikle nörotransmitter madde modülasyonu olmak üzere birçok sistemin metabolizması üzerine etki etmeye başlar. Çünkü yüksek PPA seviyesi hücreler için toksiktir. Propiyonik asidemi olarak adlandırılan bu süreç mide barsak sorunlarına, laterjiye ve hatta gelişim geriliğine varan patolojilere sebebiyet vermektedir (Witters et al. 2016). İlginç bir şekilde propiyonik asidemiyle otizm spektrum bozukluğunun genel semptomları neredeyse birbirinin aynı olarak seyretmektedir. Birçok çalışmada propiyonik asidemi ya bozulmuş barsak mikrobiyomu üzerinden kan dolaşımına PPA salınmasıyla yada gıda kaynaklı PPA maruziyetiyle oluşan OSB semptomlarının paralel seyrettiği bildirilmiştir (Foley ve ark., 2014; Shultz ve ark., 2008; Witters ve ark., 2016). Ayrıca otizm spektrum bozukluğuna sahip bireylerin dışkı örnekleri analiz edildiğinde PPA'nın yüksek düzeyde tespit edildiği rapor edilmiştir. Ancak, bütün bu verilere rağmen halen PPA'nın OSB üzerindeki etkisinin tam mekanizması aydınlatılamamıştır (Foley ve ark., 2014; Macfabe, 2012).

Propiyonik asidemi, metbolizmada propiyonil-CoA aktivitesinin bozukluğuna bağlı olarak gelişen (Şekil 2.6), kanda propiyonat birikmesi ile karakterize son derece önemli bir problemdir. Ayrıca propiyonik asidemi laterji, mental retardasyon ve striatum dejenerasyonuna neden olan bir hastalıktır. Son zamanlarda yapılan birçok çalışma

göstermiştir ki; propiyonatın hücre içinde birikerek ortamı asitleştirmesiyle otizm gelişimi tetiklenmektedir. Deneysel olarak yapılan birçok çalışmada; hayvanlara propiyonat verildiğinde, çeşitli biyokimyasal değişimlerin tespit edildiği bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda mikroRNA ve histon seviyesinde değişimler kaydedilmiştir. Bu durumların gen ekspresyonunu etkileyebileceği göz önüne alınmalıdır (Morlve ve ark., 2018).

İnsan mikrobiyomunda bulunan bazı enterik bakteriler kısa zincirli yağ asitleri üreterek organizmanın metabolik durumlarını etkileyebilirler. PPA kısa zincirli yağ asitlerinin içinde neredeyse en önemlilerindendir. PPA'nın gerek endojen olarak gerekse eksojen olarak eldesi mümkündür. PPA özellikle insan tüketimine sunulan birçok gıdada ve aynı şekilde hayvan tüketimi için sunulan birçok yemde katkı yada koruyucu olarak bulunmaktadır. PPA'nın çeşitli hücrelerin fizyolojisi üzerinde bazı olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir. PPA, mitokondriyal metabolizmada gerçekleşen tek zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda üretilen önemli bir ara üründür. Bu döngüde gerçekleşen bir takım patolojiler propiyonil-CoA'nın parçalanmasını bloke eder. Bunun sonucunda hücrede PPA'nın seviyesinin yükselmesi ile “propiyonik asidemi” olarak isimlendirilen hastalık tablosu meydana gelmektedir (Frye ve ark., 2016).

Propiyonik asit maruziyeti ve antimikrobiyal etkinlik yaratan diğer ajanların etkileri bütüncül olarak değerlendirildiğinde, başta barsak olmak üzere bütün bir metabolizmanın biyolojik coğrafyasını değiştirdiği ve bu etkilerin sonucunda bir takım nörogelişimsel etkilerin ortaya çıkışını tetiklediği bildirilmiştir. İnsanda propiyonik asit, *Bacteroides spp.* ve *Clostridium spp.* bakterileri tarafından polisakkaritlerin fermentasyonu ile barsaklarda üretilmektedir. Ayrıca PPA uygulanmasından sonra metabolizmada barsak hareketliliğini ve düz kas hareketliliğini artırdığı bildirilmiştir. Otizm spektrum bozukluğu olan hastalarda aynı zamanda gastrointestinal sistem bozuklukları gözlenmesinin altında bu sebeplerin yattığı düşünülmektedir (Choi ve ark., 2018).

Bütün bunlara ek olarak PPA türevleri, NSAİ ilaç gruplarından en önemlileridir. 1960'lı yıllardan itibaren piyasaya sürülmeye başlanan bu ilaçlar halen günümüzde birçok hastalıkta antienflamatuar tedavi için özellikle çocuk ve bebeklerde sık sık kullanılmaktadır. Bu grubun içinde bulunan başlıca etken maddeler; ibuprofen,

naproksen, flurbiprofen, ketaprofendir. Ayrıca bazı steroid ilaçlarında (flutikazon propiyonat) propiyonik asit içerdiği bilinmektedir. Bu etken maddeler özellikle bebek ve çocuklarda çok sık bir şekilde kullanılan şuruplarda, inhalerlerde, nebullerde ve nazal spreylerde bulunmaktadır (Ommaty, 2008; Sarıcaoğlu ve Batur, 2021). Görüldüğü üzere, PPA bebek ve çocuklarda gündelik hayatta gerek gıda gerek ilaç gerekse mikrobiyal aracılı olarak son derece büyük ve sinsi bir tehdit oluşturmaktadır.

2.7. Otizm ve Propiyonik Asit Bağlantısı

Otizm belirli spektrumlarla seyreden nörogelişimsel bir hastalıktır. Bu spektrumlar bazen basmakalıp ve tekrarlı hareketlerle, bazen konuşma sorunlarıyla, bazen zeka geriliği veya zihinsel geriliklerle, bazen de sosyal veya iletişimsel sorunlarla karakterize olabilen geniş bir yelpazeye sahiptir. Otizm spektrumları özellikle erken çocukluk döneminde kendini gösterir ve çoğu kez bu spektrumlar yaşam boyu ilerleyici bir şekilde seyredebilirler. OSB dünya genelinde gün geçtikçe daha fazla görülmeye başlanmıştır. *ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi*'nin verilerine göre bu oran 2000 yılında 1/120 iken, 2018 yılında bu oran 1/59'a kadar yükselmiştir. Otizmin genel olarak çevresel etkiler ve annenin bağışıklık sistemindeki bazı olumsuzluklar sonucu olduğu düşünülmektedir. Bütün bunlara ek olarak OSB'li bireylerin mikrobiyomunda bazı farklılıklar olduğunu bildiren raporlar mevcuttur. Bu durumun ilginç bir şekilde barsak mikrobiyomunu, PPA gibi kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini sağlayan bazı mikroorganizmaların çoğalması yönünde değiştirdiği bilinmektedir. Bu durum doğal olarak barsaklarda PPA üretiminin kronik olarak tetiklenmesini sağlayan farklı bir mikrobiyom kimliğiyle bireyi karşı karşıya bırakmaktadır. Bazı çalışmalarda PPA'nın mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğu ve bu durumun otizm spektrum bozukluğu olan birçok bireyde gözlemlenen mitokondriyel bozukluklarla örtüştüğü rapor edilmiştir. Bu yönüyle PPA ve otizm arasındaki bağlantıya yeni kanıtlar eklenmektedir (Abdelli ve ark., 2019)

Otistik beyinlerle ilgili yapılan birçok çalışma sonucunda ortaya çıkan en belirgin bulgular sinirsel ağlardaki nöronal iletişimin bozulduğu ve bu durumun -nöronun görev bölgesi ve işlevine göre- bir takım bozulmalara sebebiyet verdiği şeklindedir. Bu bozulmalar kendini stereotipik davranışlar, bilgisel algının işleme bozukluğu şeklinde dışavurumlarla gösterdiği rapor edilmiştir (Abdelli ve ark., 2019). Bu ve buna benzer

patolojiler MSS'nin genel durumunun tespiti için kullanılabilir. Buralardaki hormonların konsantrasyonları, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin seviyeleriyle, nişin durumuyla ilgili ipuçları elde edilebilir. Böylece nöral sistemin ve hatta organizmanın durumu hakkında bilgiler elde edilebilir. Nöropatolojilerdeki nörojenik mikro çevreye ilişkin mevcut literatürde bilgiler son derece sınırlıdır (Kazanis ve ark., 2008). Ayrıca bilinçsiz antibiyotik maruziyetinin mikrobiyomda olumsuz değişimlere sebep olduğu ve beyin barsak aksının olumsuz etkilenmesiyle nöropsikiyatrik bazı bozukluklara sebep olduğu bilinmektedir (Choi ve ark., 2018).

2.8. Hastalık Modellerinin Kullanım Amaçları ve Önemi

İnsanda görülen hastalıkların birçoğu günümüz şartlarıyla deney hayvanlarında modellenabilir durumdadır. Özellikle sinirsel hastalıklar bu konuda son derece önemli bir gruptur. Çünkü bu hastalıklar için elde edilecek veriler insanlarda deneme yanılma yoluyla elde edilemeyecek kadar önemlidir. Zira hasta insandan özellikle MSS'yi ilgilendiren hastalıklar için doku temini imkansızdır. Bunun yerine hayvanlardan yada *in vitro* modellerden yararlanılarak bilgi edinmeye çalışılır. Aksi halde etik nedenlerden dolayı herhangi bir ilerleme kaydetmek imkansızdır. Etik nedenlerin dışında özellikle *in vitro* modellerde hücre düzeyinde elde edilecek sonuçlar çok önemlidir. Çünkü hastalığın gerçek seyrini görme imkanı sunmaktadır. Günümüzde Parkinson, Alzheimer, Huntington gibi hastalıkların *in vitro* modelleri mevcuttur (Galiakberova ve Dashinimaev, 2020). Ancak otizm için şüana kadar herhangi bir *in vitro* model geliştirilememiştir. Geliştirilmiş olan modeller *in vivo* modeller olup hastalığın seyri konusunda organizmaya bağlı olarak bir takım yanıltıcı sonuçlar elde etmeye neden olabilmektedir. Otizm de *in vitro* model elde edilmesi hastalığın tam anlamı ile kök hücre düzeyinde nasıl bir etki oluşturduğunun görülmesi açısından son derece önemlidir. Zira nöron düzeyinde gözlemlenen bozulma artık farklılaşmış bir sonuç iken; nöral kök hücre evresinde gözlemlenen bozulma hastalığın nasıl başladığının belirlenmesi için son derece önemlidir.

2.9. Nörotrofik Faktörler ve Nörotransmitterler

Nörogenez sürecinde yeni oluşturulan nöral kök hücrelerin fonksiyonel nöral hücrelere farklılaşarak hasarlı bölgeye göç ettikleri bilinmektedir (Zhang ve ark., 2007). Ancak, nöral kök hücrelerin travmatik yada nörodejeneratif olguları doğal yollarla tedavi

edemediği bilinmektedir. Ancak nörotrofik faktörlerin bu durumlar için son derece yüksek bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle nöral kök hücre proliferasyonu ve yeni nöron oluşumu için endojen bir potansiyele sahip olmaları sebebiyle nörotrofikler dikkat çekmektedirler (Lykissas ve ark., 2007). Nörotrofik faktörler, NKH'ların endojen olarak çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik ederek MSS'de gözlemlenen bozuklukların onarımı için ciddi bir potansiyele sahiptir (Abdanipour ve ark., 2017).

Yetişkin beyinde genel olarak nöral kök hücreler bulundukları bölgelerde uyku fazında ve inaktif bir şekilde bulunurlar. Bu hücreler aktif halde iken SVZ'den göç ettiklerinde olfaktor bulbusa ilerlerler ve bu süreçte farklılaşmaya başlarlar. Bu sürecin birçok nörotrofik faktörün etkisiyle gerçekleştiği bilinmektedir. Bu göç sürecindeki nöroblastlar eğer yeterli duyuşal uyarıya uğramazlar ise mevcut nöral devreye katılamazlar ve yok olurlar. Yetişkinlerde nöral kök hücreler bir takım nörotrofik uyarımlarla etkin hale gelebilirler. Söz konusu uyarımlar göç mekanizmalarında da önemli bir etkinliğe sahiptirler. Bu faktörlerden en bilinenleri FGF, EGF ve BDNF'dir. Bu ve buna benzer birçok nörotrofik faktörlerin gelecekte çoğu nörodejeneratif hastalık için umut olacağı aşikârdır. Ancak bu faktörlerin direkt olarak kan yolu ile beyne ulaşması, BOS'a (Beyin Omurilik Sıvısı) geçmesi gibi bir takım soru işaretleri mevcuttur. Bu süreçlerin aşılması için kök hücre ve gen tedavilerinin büyük bir potansiyel barındırdığı rapor edilmiştir (Toprak ve ark., 2021).

Nöral kök hücreler hasarlı dokuların sadece fiziksel olarak tamiratını sağlamazlar, salgıladıkları nörotrofik faktörler ve immünmodülatör etkileriyle doku tamiratına yardımcı olurlar. Olası bir hipoksik koşulda nöral kök hücreler NGF, BDNF, VEGF gibi faktörlerin sekresyonunu sağlarlar. Böylece biyoaktif bir nöral rejenerasyon oluşturulmuş olur. Bu sayede hasar almış dokunun yapısı ve fonksiyonları iyileştirilmiş olur (Huang ve ark., 2018).

Nörotrofik faktör kullanımının, nöral kök hücrelerin klinik olarak kullanımından daha pratik olduğuna dair birçok görüş bulunmaktadır. Bu görüşlerin temel dayanağı ise hücre tedavinin gerek süre gerek maliyet gerekse manipülasyon yönünden bazı dezavantajlarının olmasıdır. Ayrıca nörotrofik faktörlerin üretim ve uygulama yönünden pratik olması, immün sistem yanıtı olarak daha güvenilir olması, depolama ve saklama

konusunda daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Nörotrofik faktör kullanımının, kök hücre havuzunun daha efektif kullanımını sağladığı görünmektedir (Huang ve ark., 2018). Bu faktörlerin beyinde endojen üretiminin diyetle artırılabilmesine dair raporlar mevcuttur. Bu sayede rejenerasyon amacı ile kullanılacak nörotrofiklerin yada nörotransmitterlerin bu yönüyle son derece avantajlı olduğu göz ardı edilmemelidir (Pase ve ark., 2015).

2.9.1. FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2 - Fibroblast Büyüme Faktörü 2)

Basic Fibroblast Growth Factor - Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) olarakta bilinmektedir. FGF proteinleri son derece büyük bir ailedir. Bu ailenin 22 üyesi bulunmaktadır (Woodbury ve Ikezu, 2014). FGF protein ailesi fizyolojik gelişim için çok çeşitli süreçlerde görev alırlar ve oldukça önemlidirler. Bu sinyal moleküllerinin etkinlikleri lokal yada genel olabilir. Bu sinyal moleküllerinde oluşabilecek düzensizlikler gelişimsel kusurlara sebebiyet verebilir (Ornitz ve Itoh, 2015). FGF-2'nin bu ailenin en önemli üyesi olduğu bilinmektedir. Özellikle nöral plastisite için son derece önemli bir faktördür (Reuss ve von Bohlen und Halbach, 2003). Embriyonik dönemde gastrulasyon evresi öncesinde FGF sinyallerinin başladığı bilinmektedir (Can, 2014). MSS'de tüm gelişimsel süreç boyunca FGF-2; nörogenez, hücresel farklılaşma, hücresel göç ve sağkalım gibi birçok hayati organizasyonda görev almaktadır (Esnafoğlu ve Ayyıldız, 2017).

In vitro olarak NKH'lar FGF-2 ile muamele edildiğinde daha yüksek bir proliferasyon oranı ve daha düşük bir apoptoz oranı elde edildiğine dair bulgular mevcuttur. Bu faktör sayesinde kök hücrelerin özelliklerini daha uzun bir süre devam ettirebildikleri bildirilmiştir (Galderisi ve ark., 2013). NKH'ların; FGF-2 ve EGF ile muamelesiyle *in vitro* olarak kök hücre özelliklerini kaybetmeden üretilebildiği bilinmektedir (Gritti ve ark., 1995).

FGF-2 sinyali *in vitro* olarak nöral kök hücrelerin kendini yenileme özelliklerinin sürdürülebilmesinde son derece önemlidir (Maric ve ark., 2003). Aynı şekilde *in vivo* olarakta nörojenik nişte kök hücrelerin, kök hücresel özelliklerinin sürdürülmesini de sağladığı bildirilmiştir (Zheng ve ark., 2004). Hatta aşırı FGF-2 ekspresyonu bulunan NKH'larla yapılan bir çalışmada, neonatal iskemik kortekse nakilden sonra bile *in vivo* proliferatif etkinliklerinin iyi bir şekilde korunduğuna dair bulgular elde edilmiştir

(Dayer ve ark., 2007). Bu durumu destekler nitelikte yapılan benzer çalışmalarda; FGF-2'nin, SVZ'de ve hipokampüste hücrel yenilenmenin ve progenitörlerin proliferasyonunun artışına katkısı olduğu rapor edilmiştir (Kuhn ve ark., 1997; Nakatomi ve ark., 2002). FGF-2 özellikle serebral korteks nöronlarının oluşumu için son derece önemlidir (Raballo ve ark., 2000; Temple ve Qian, 1995). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada; FGF-2 sinyalleri bozuk olduğunda serebral korteks gelişiminin bozulduğu, sinir yoğunluğunun bozulduğu ve MSS'nin bir takım farklı bölgelerinde de yapısal bozukluklara sebep olduğu rapor edilmiştir (Dono ve ark., 1998). Buna ek olarak FGF-2 sinyalinin bozulmasının otizm patogenezinde katkısının olabileceğine dair görüşler mevcuttur (Vaccarino ve ark., 2009). *In vivo* otizm hastalık modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada FGF-2'nin otizm modelinde kontrol grubuna göre seviyesinin düşük olduğu, ancak likopen etkisiyle genel olarak artış gösterdiği bildirilmiştir (Erten ve ark., 2020). Başka bir çalışmanın bulgularına göre otizmlili çocukların serum FGF-2 seviyelerinin sağlıklı gruba göre önemli derecede düşük olduğu bildirilmiştir (Esnafoğlu ve Ayyıldız, 2017). Yapılan hayvan çalışmaları da dikkate alındığında FGF-2'nin kan-beyin bariyerini geçtiği, bu sebeple serum ve beyin FGF-2 düzeylerinin birbiri ile örtüşebileceği değerlendirilmektedir (Deguchi ve ark., 2000; Deguchi ve ark., 2002). FGF-2'nin NKH proliferasyonu üzerinde son derece önemli etkinliği vardır. Yokluğunda NKH nöral progenitörlere farklılaşır. EGF ile birlikte özellikle hipokampal nöral kök hücre kaynakları üzerinde proliferatif etkinliği vardır. (Toprak ve ark., 2021).

2.9.2. Anandamid

Anandamid ilk olarak 1992'de domuz beyinde tespit edilmiştir. Araşidonik asit (omega-6) türevi olan anandamid endokanabinoid bir lipiddir. Endokanabinoidler genel olarak nörotransmitterlerden bir takım farklılıklara sahiptirler. Bunlardan en önemlileri depolanmak yerine anlık olarak sentezlenmeleri, yıkımlanmaları ve retrograde (postsinaptikten presinaptiğe doğru) sinyal iletim özelliğine sahip olmalarıdır. Anandamidler yıkımlanmak için amid hidrolaz enzimine (FAAH) ihtiyaç duyarlar. Bu enzim özellikle hipokampus ve amigdalada bulunur. Kanabinoidlerin (esrar kökenli etken maddeler) ekzojen alımlarının bir takım tıbbi suistimallere yol açması sebebiyle endojen kanabinoidlerin (endokanabinoidler) inhibisyonunun kontrol altına alınarak

seviyesinin yükseltilmesi ve yıkımlanmasının önlenmesi gibi stratejilerle etkinliklerinin artırılması sağlanmaktadır (Çınar ve Çınar, 2011).

Endokanabinoidlerin genel olarak nöral sistem özelinde sinaptik plastisiteyi düzenledikleri, nöroproteksiyon ve immünmodülasyon gibi bir takım özelliklere sahip oldukları bilinmektedir (Çınar ve Çınar, 2012). Bütün bunlara ek olarak anandamid motivasyon (konsantre olabilme/ düşünürken odaklanabilme) tipi davranışlarda son derece büyük rolü olduğu bilinmektedir. Ayrıca hafızanın güçlendirilmesi ve artırılması, bilgilerin konsolidasyonunun artırılabilmesi içinde son derece önemli görevlerinin olduğu bilinmektedir (Scienza-Martin ve ark., 2022; Scherma ve ark., 2019; Wei ve ark., 2015).

Otizmde endokanabinoidler üzerine yapılan prelinik hastalık modeli çalışmalar ışığında gözlemlenen en önemli olgulardan bir tanesinin endojen anandamid seviyesindeki düşüşler olduğu göze çarpmaktadır. Nöral sistem ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda anandamidin nöromodülasyonda son derece önemli görevleri olduğu kabul edilmektedir. Bu sebepler dikkate alınarak yapılan bir çalışmada otizmlili çocuklardan alınan örneklerde, plazmada kontrol grubuna göre anandamid seviyesinin önemli derecede düşük olduğu ve bu hastalığın patofizyolojisinde endokanabinoid sistemin önemli bir yeri olabileceği bildirilmiştir. Otizm özelinde anandamidin dikkat çeken bir nöromediyatör olması sebebi ile yapılan çalışmalarda farmakolojik olarak verilen anandamidin sosyal etkileşim üzerine olumlu katkılarının olduğu ve anksiyetik davranışlarda iyileşmeler sağladığı bildirilmiştir. Endokanabinoid sistemin otizm üzerindeki etkileri keşfedildikçe ve bu konudaki bilgi birikimi arttıkça anandamidin otizm semptomları ile ilişkili bir nöromediyatör olduğu gün yüzüne çıkmaktadır. Farmakolojik olarak otizm semptomları üzerinde anandamidin olumlu etkileri rapor edilmiştir. Bazı nöral hastalıklarda (epilepsi, travma sonrası stres bozukluğu) yapılan çalışmalarda; anandamid seviyelerinin düşüklüğüne dair raporlar mevcuttur (Karhson ve ark., 2018).

Otizm üzerinde yapılan son çalışmalarıyla anandamidin, oksitosinin sosyal etkilerine (sosyal ödül sinyali) aracılık ettiğini gösteren kanıtlar elde edilmiştir. Özellikle FAAH inhibisyonu ile deney hayvanlarında sosyal bozulmayı tamamen tersine çevirebildiğine

dair çalışma bulguları mevcuttur. Bu şekilde anandamid aktivitesi artırılan modellerde sosyal etkileşim artırılabilmiştir (Wei ve ark., 2016).

2.9.3. Staufen-2

RNA bağlayıcı proteinlerin, RNA'ların taşınımı ve sinaptik proteinlerin sentezi konusunda *in vivo* olarak son derece önemli roller üstlendikleri bilinmektedir. Staufen-2 özellikle beyne ve sinir sistemine daha özelleşmiş olarak görevler üstlenen önemli bir RNA bağlayıcı proteindir. RNA bağlayıcı protein staufen-2; genel olarak hipokampal mekânsal bağlantılı çalışma ve yenilik gibi durumlarda sinaptik plastisiteye muazzam katkılarının olduğu bilinmektedir. Ayrıca öğrenme ve bellek üzerinde son derece kritik görevleri vardır. Transgenik ratlarla yapılan çalışmada staufen-2 eksikliğinde; ratların hipokampal ilişkisel öğrenmede, hafıza odaklı ve bilişsel performansa bağlı görevleri yerine getirmede bir takım eksiklikler tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, çevresel bilgilerin bilişsel yönetimi ve ödüllendirmeye dayalı yeni duruma uyum sağlama esnekliği konusunda staufen-2'nin son derece önemli olduğuna dair çok güçlü kanıtlar elde edilmiştir (Berger ve ark., 2017).

Memelilerde staufen-2; hücre sağkalımı, dendrit oluşumu ve göç mekanizmalarıyla ilgili olarak bazı görevlere sahip olduğu bilinen çift sarmallı bir RNA bağlayıcı proteindir. Ayrıca yapılan bir çalışmada tavuk embriyolarında gelişmekte olan göz dokusunda staufen-2'nin ifade edildiği bildirilmiştir. Buradan hareketle göz morfogenezinde staufen-2'nin son derece etkin olduğu, staufen-2'nin yüksek ifadesinin göz çapının büyümesine düşük ifadesinin ise göz çapının küçülmesine sebep olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. Söz konusu çapın küçülmesinin ana nedeni olarak düşük staufen-2 ifadesine paralel hücre proliferasyon hızının azalması olarak değerlendirilmiştir. Bu durumun hücre farklılaşması veya ölümü ile bağlantısının olmadığına dair bulgular elde edildiği rapor edilmiştir. Ayrıca bu süreçte staufen-2 ve sox-2'nin paralel olarak ifadesinin değiştiğine dair bulgular da elde edildiği bildirilmiştir. Staufen-2'nin sox-2 ile paralel artış göstermesi hücrelerin blastik bir karakter kazandığının işaretidir. Staufen-2'nin, göz üzerinden elde edilen bu bulguları ve değerlendirmeleri MSS özelinde düşünüldüğünde; staufen-2'nin morfogenez ve proliferasyon üzerine etkinliğinin olduğu sonucuna ulaşılabilir (Cockburn ve ark., 2012).

2.9.4. NGF (Nerve Growth Factor- Sinir Büyüme Faktörü)

NGF nörotrofin ailesinin en önemli üyelerindendir. Bu faktörün özellikle periferel sinir sisteminde antiapoptotik ve trofik özelliklere sahip olduğu son derece iyi bilinmektedir (Fakheri ve ark., 2019). NGF nöral sistem için son derece önemli görevleri olan bir peptiddir. Nöral proliferasyon, sağkalım gibi stratejik görevleri vardır (Aloe ve ark., 2012). Yapılan çalışmalara göre beyni hipoksik hasarlara karşı koruduğunu gösteren raporlar mevcuttur (Holtzman ve ark., 1996).

NGF ‘nin sinir iletimi için son derece önemli görevleri vardır. İnsanda prenatal dönemin ortalarında hipokampüste NGF’nin ifadesi mevcuttur. Bu süreçten önce de neokortekste NGF ifadesi tespit edilmiştir. Periferel sinir sisteminde NGF’nin *Schwann* hücrelerinden sentezlendiği bilinmektedir (Aras ve Sarı, 2017). Hafızaya dayalı bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalarda NGF uygulamalarının kolinerjik nöron kaybını engelleyemediği ancak kolinerjik nöronlar için son derece önemli bir tropizma gösterdiği rapor edilmiştir. Ancak NGF üretmek için modifiye edilmiş hücreler intraventriküler olarak uygulandığında kolinerjik nöron kaybını 6 kat azalttığı bildirilmiştir (Sanberg ve Sanberg, 2006). Otizm hastalık modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada NGF’nin otizm modelinde kontrol grubuna göre seviyesinin düşük olduğu, ancak likopen etkisi ile genel olarak artış gösterdiği rapor edilmiştir (Erten ve ark., 2020). NGF’nin eksikliğinde nörotransmitter madde üretiminin etkilendiği ve bu durumun sonucunda kolinerjik nöronların zarar gördüğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla kolinerjik sistemin sağlıklı bir biçimde çalışmadığına dair bulgular elde edilmiştir (Aras ve Sarı, 2017).

2.9.5. Asetilkolin

Asetilkolin, nöromüsküler kavşakta motor nöronlar tarafından kullanılan nöromodülatör bir nörotransmitterdir. Aynı zamanda parasempatik sinir sisteminin ana nörotransmitteridir. (Marotta ve ark., 2020). Asetilkolin son derece iyi bilinen önemli bir nörotransmitterdir. Asetilkolin bağışıklık dahil olmak üzere nöral sistemde birçok biyolojik süreci düzenleyen bir mediyatördür. Birçok organizmada asetilkolin etkin olarak bulunmaktadır. Bu mediyatörün özellikle bağışıklık sistemi üzerinde de etkinliği iyi bilinmekle birlikte nöral sistemlede paralel bir etkinlik içinde bulunduğu bilinmektedir. Bağışıklık hücreleri (T hücreleri) tarafından hem üretilebildiği hemde

reseptör düzeyinde etkinliği olduğu bilinmektedir. Nöronlar ve hareket sistemi arasında birçok otonomik fonksiyonu düzenlediği bilinmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda serum asetilkolin seviyesindeki yüksekliğin hastalığın klinik semptomlarını iyileştirdiğine dair raporlar mevcuttur (Cox ve ark., 2020).

Gelişmekte olan bir organizmada asetilkolinin nöral sistemin oluşumunu düzenlediği rapor edilmiştir. Ayrıca çeşitli nörogelişimsel bozukluklar (DEHB, otizm vb.) üzerine yapılan çalışmalarda kolinerjik nöral geçişlerde bir takım eksiklikler olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak asetilkolin esterase enzimini bloke eden toksisitelerde (organofosfat zehirlenmeleri) asetilkolin metabolize edilemediği için yüksek asetilkolin seviyelerinin oluşmasının da nörogelişimsel hastalıklarla bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Saad ve ark., 2022). Ayrıca otizmde asetilkolinin kortikal düzeyde de eksikliği olduğuuna dair bir takım bulgular mevcuttur (Daharlı ve ark., 2022).

Hipokampus asetilkolin yönünden beyinde oldukça önemli bir bölgedir. Ayrıca bu bölge bellek oluşumu ve bilişsel faaliyetlerin merkezidir. Nörodejenerasyon durumunda bu sistem hasar gördüğu takdirde asetilkolin metabolizmasında olumsuz etkilediği bilinmektedir (Üçel, 2018). Asetilkolinin bilinen en önemli özelliklerinden birisi kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya geçişine aracılık etmesidir. Bu durumu hipokampüsteki bilgiyi kortekse dağıtarak sağladığı bilinmektedir (Hasselmo, 2006; Micheau J ve Marighetto, 2011).

Asetilkolin özellikle uykunun REM döneminde pik seviyeye ulaşmaktadır. Bilgilerin özellikle bu dönemde konsolidasyona uğradığı ve tasniflendiği bilinmektedir. Asetilkolinin hafızanın tasnifi için en önemli nörotransmitter olduğuuna dair en güçlü kanıtlardan birisi bu mekanizmadır (Watson ve ark., 2010). Asetilkolinin endojen olarak üretilebilmesi için en önemli etken madde deksipantenoldür (Kaya ve ark., 2007). Otizmde en önemli sorunların hafıza kaynaklı (hafızayı oluşturma, hafızayı kullanma, kısa vadeli hafızanın uzun vadeli hafızaya aktarılamaması vs.) olduğu göze çarpmaktadır. Bu sebeple otizmde hastaların gündelik hafıza ile hayatını idame ettirmeye çalışması aslında bütün sorunun kaynağı olarak değerlendirilebilir. Bütün bu bilgiler ışığında bakılacak olursa, asetilkolinin bellek ve öğrenme faaliyetleri için adeta bir orkestra şefi gibi çalıştığı ortaya çıkmaktadır. Asetilkolinin otizm için son derece önemli bir nörotransmitter olması aslında bu sebeptir. Ayrıca asetilkolinin bağışıklık

sistemi üzerindeki etkileri ve otizmde gözlemlenen bağışıklık sistemi ve gastrointestinal sistem kaynaklı sorunlarında aslında birbirine son derece paralel ilerlediği düşünüldüğünde, otizm etiyolojisinde asetilkolinin aslında ne kadar önemli bir nörotransmitter olduğu göze çarpmaktadır (Cox ve ark., 2020; Daharlı ve ark., 2022; Saad ve ark., 2022; Üçel, 2018; Watson ve ark., 2010).

2.9.6. Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF-Brain Derived Neurotrophic Factor)

BDNF, nörogenezin desteklenmesinde, progenitör hücrelerin proliferasyonunda, öncül hücrelerin farklılaşmasında ve sağkalımının desteklenmesinde son derece etkin bir faktördür. Özellikle nöral kök hücre nakli yapılan hastalık modellerinde BDNF'nin artış gösterdiği ve rejeneratif sürece doğru hücreleri desteklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Nöropsikiyatrik hastalıklarda, hafıza geriliği ve hipokampal hacim azalması gibi olgularda serumda BDNF'nin bariz düşüşleri bildirilmiştir. Aksine BDNF'nin serumdaki yüksekliğinin nöral sistemi nöral hastalıklara karşı koruyucu etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Toprak ve ark., 2021).

BDNF'nin nöronal sağ kalımı artırdığı ve sinaptik bağlantıları desteklediği bilinmektedir. BDNF'nin yeni oluşan nöronların farklılaşmasını da desteklediği rapor edilmiştir (Fakheri ve ark., 2019). BDNF'nin bir diğer önemli görevinde patern ayırımına aracılık etmesidir. BDNF ile ilgili yayınlanan bir raporda; BDNF inhibe edildiğinde patern ayırımının ortadan kalktığı, BDNF'nin yeniden enjekte edildiğinde ise patern ayırımının yeniden sağlandığı bildirilmiştir. Ayrıca BDNF'nin hipokampal öncül hücrelerin, nöral hücrelere farklılaşması ve sağkalımında önemli bir nöromediyatör olduğu bildirilmiştir (Kaptan ve Üzüm, 2016).

BDNF'nin belkide en önemli özelliği hafıza oluşumunda benzersiz görevlere sahip olmasıdır. Bunuda gerek nöral kök hücrelerin proliferasyonu gerekse nöral sağkalıma olan etkisi ile sağladığı düşünülmektedir. BDNF düzeyinin özellikle hipokampusün dentat girus bölgesinde çok yüksek olduğu bilinmektedir. Reseptör düzeyinde de nöral kök hücrelerde oldukça fazla ifadesi mevcuttur. Ayrıca ratlarda yapılan çalışmalar ışığında; kalori kısıtlaması sonucunda nörogenez, BDNF seviyesi ve konumsal/uzamsal hafızanın artışının paralel olarak seyrettiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak fizyolojik yaşlanmaya paralel olarak hipokampal BDNF seviyesinin azalmasıyla birlikte öğrenme ve

hafızasında olumsuz etkilendiği bilinmektedir. Bütün bu veriler değerlendirildiğinde; hafızanın BDNF ve nöroenez ekseninde yol aldığı görülmektedir (Kaptan ve Üzüm, 2016).

Genel anesteziğin BDNF, NGF gibi faktörleri inhibe ettiğine dair bulgular vardır. Ayrıca bir takım anesteziğin de (izofluran, nitroz oksite, midazolam) yenidoğan beyinlerinde kısmen BDNF azalmasına bağlı olarak nöronal apoptozu tetiklediğine dair sonuçların bulunduğu bilinmektedir (Zou ve ark., 2013).

Otizmde BDNF son derece önemli bir nörotransmitterdir. Otizmde BDNF seviyesinde bir takım değişiklikler tespit edildiği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada BDNF ifadesinin yaşa göre değişimleri incelenmiş ve otizmde BDNF seviyesi yaşa göre gecikmeli olarak yükseliş gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan hayvan çalışmaları da ele alındığında serum ve beyin BDNF seviyelerinin de korrele bir biçimde değiştiği rapor edilmiştir (Kato-Semba ve ark., 2007).

2.9.7. İnterlökinler (IL-6, IL-10)

Edinsel bağışıklık T ve B lenfositlerin aracılığı ile oluşturulur. Ancak bu bağışıklık sisteminin neredeyse tüm tepkisel yanıtları için yardımcı T hücreleri gereklidir. Bu hücreler B hücrelerinin aktivasyonu ile antikor üretimi için son derece önemli görevlere sahiptirler. Naif T yardımcı hücreler sitokin fonksiyonlarına ve görevlerine göre; yardımcı T 1 (Th1) ve yardımcı T 2 (Th2) şeklinde özelleşerek farklılaşırlar. Otizmlili bireylerde Th1'in genel olarak daha düşük olduğu, Th2'nin ise genel olarak daha yüksek olduğuna dair bulgular vardır. Buda OSB'de Th1 ve Th2 kaynaklı sitokinlerin dengesizliğine dair kanıtlar oluşturmaktadır. Genel olarak bir sitokin birden çok hücre grubu tarafından üretilir. Bağışıklık odaklı olarak bakıldığında IL-6 özellikle Th1 tarafından, IL-10 özellikle Th2 tarafından üretilirler. Yapılan bir çalışmada IL-6'nın da içinde olduğu bir takım sitokinlerin OSB'de sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında düzeyinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Buda OSB'de düzensiz bir bağışıklık tepkisinin bulunduğu bir kanıtı olarak sunulmuştur. Yapılan birçok çalışmada OSB'de hem merkezi hemde periferal olarak IL-6'nın yüksekliğine dair bulgular mevcuttur. Ayrıca stereotipinin artışıyla da ilişkili olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmada beyinde IL-6 seviyesinin yüksek

olduğunda, nöronal dendritik ve sinaptik gelişim dengesinin bozulmasıyla otizm benzeri davranışların modüle edilebildiği bildirilmiştir (Masi ve ark., 2017).

IL-6, beyindeki sinir sistemi organizasyonunun düzenlenmesinde çok büyük görevleri olan proinflamatuvar bir sitokindir. Proinflamatuvar sitokinler özellikle otizmde son derece önemli bir yere sahiptirler. IL-6 ekspresyon artışının otizm özelinde; bilişsel bozulmalar, öğrenme bozuklukları, sinaptik bozulmalar, kontrol edilemeyen kaygı, artan asosyalite ve sosyal etkileşim bozuklukları ile seyrettiğine dair bir takım raporlar mevcuttur (Wei ve ark., 2012). IL-6 birçok otistik beyinde yükselmesi tekrarlı şekilde bildirilmiş olmasına rağmen bu durum kesin bir mekanizma olarak tanımlanmamıştır (Li ve ark., 2009). Beyinlerinde IL-6 seviyesi yüksek olan fareler ile yapılan deneylerde bu farelerin bilişsel yetenek ve öğrenmelerinde bir takım anormalliklerle birlikte kaygı ve sosyal etkileşim bozukluklarının da varlığı rapor edilmiştir. Bu davranışlar otistik bulgular ile benzeşmektedir (Wei ve ark., 2011).

Otizm hastalık modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada IL-10 ve IL-6'nın ve otizm modelinde kontrol grubuna göre seviyesinin yüksek olduğu, ancak likopen etkisi ile genel olarak düşüş gösterdiği rapor edilmiştir. PPA'nın proinflamatuvar sitokinlerin salınımını teşvik ettiği bilinmekle birlikte, dokusal düzeyde IL-10 seviyelerini artırdığına dair bulgular vardır (Erten ve ark., 2020).

2.9.8. Glutamat, GABA (Gama aminobütirik asit)

Glutamat ve GABA embriyonik dönemde ortaya çıktığı bilinen nöromediyatörlerdir. Ayrıca nörogenez ve sinaptogenez sürecinde aktif görevleri olduğu bilinmektedir. Glutamat, memeli korteksindeki ana uyarıcı nörotransmitterdir. GABA, glutamattan üretilen genel olarak nöronal uyarılabilirlik dengesi ve nöronal homeostazis için son derece önemli görevlere sahip bir nörotransmitterdir. Beyin yapısı olgunlaştıkça GABA üretimi artar ve bu süreçte GABA ana uyarıcılardandır. GABA çoğalma, göç, sinaptik oluşumlar ve farklılaşma gibi birçok hücrel süreçte etkinlik gösterir. Glutamaterjik ve GABAerjik bir takım değişiklikler beyinde uyarıcı/inhibitör dengelerini bozar. Bu dengelerdeki bozulmalar gerek otistik olgular gerekse birçok nörogelişimsel bozukluklar için son derece önemlidir. OSB'li çocukların plazmalarındaki GABA ve glutamat seviyelerinde değişiklik gösterdiğine dair çeşitli bulgular mevcuttur (Benítez-Díaz ve ark., 2003; Luján ve ark., 2005; Marotta ve ark., 2020).

Bununla birlikte DEHB (Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu) ve otizm tanısı almış olan bireylerde yapılan geniş bir glutamaterjik ve GABAerjik gen seti analiz sonucunda, glutamatla hiperaktivite ve dürtüsellik semptomlarının şiddeti arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Ancak glutamat ve GABA gen setinde otizm semptomları için anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu durum OSB’de uyarıcı/inhibitör dengesizliğinin genetik olarak üzerine daha fazla çalışma ve araştırma yapılması ihtiyacını güçlendirmektedir (Marotta ve ark.,2020). Genelde yaşa bağlı olarak GABA ve glutamat seviyelerinde bir takım değişimler veya düzensizlikler gözlemlenebilir. GABA’yı sentezleyen enzimler GAD1 ve GAD2 olarak adlandırılırlar. Bu enzimler otizmde genel olarak sentezi azalmış olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bu durumun sonucunda otizmde GABA sentezinin azalması da gözlenmektedir. Otizmlili bireylerdeki nöronal uyarım ve nöronal inhibisyonadaki bozulmalarında GABA kaynaklı olduğuna dair bulgular mevcuttur. Yapılan çalışmalar sonucunda OSB’li ve normal bireyler arasında ilginç farklılıklar gözlenmiştir. Bunlardan belkide en ilginç olanı, normal bireylerde yaş ile birlikte GABA sentezini yöneten genlerin sinyal aktivitesi artarken, otizmlili bireylerde bu durumun tam tersi şekilde yaş ile azaldığı yönünde bulgular vardır. Buda GABAerjik nöronların otizmlili bireylerde yaşa bağlı olarak oransal azalmasının bir kanıtı olarak yorumlanmaktadır (Zhang ve ark., 2023).

GABAerjik aktiviteye sahip nöronlar çoğunlukla beynin striatumunda bulunurlar. Burada bulunan nöronların yüzde doksanı GABAerjiktir. Bu son derece yüksek bir orandır. Bu bölge özellikle bilişsel süreçler, karar verme yetisi, muhakeme, öğrenme ve hareket başlatılması gibi bir organizma için son derece önemli süreçlerin neredeyse hepsinde aktif rol alır. Ayrıca bu bölge göz hareketlerinden de sorumludur. Özellikle propiyonik asidemiye bu bölgenin son derece duyarlı olduğu bilinmektedir. Dolaşım yoluyla PPA’nın striatal nöronları etkilediği bilinmektedir. Burada GABA transaminazını inhibe ederek beyinde GABA seviyesinin yükselmesine neden olduğu ve buna bağlı olarak PPA letarjisinin oluştuğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Aynı zamanda bu durumun krebs döngüsü üzerinden enerji üretiminide olumsuz etkilemesi söz konusudur (Şekil 2.6). Glutaminerjik sistemin hafıza oluşumuna son derece büyük katkıları olduğu bilinmektedir. Bir inhibitör nörotransmitter olan GABA seviyeleri üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre bölgesel olarak öğrenme görevleri açısından çeşitli korrelasyonlara sahip olduğu bilinmektedir (Spurny ve ark.,

2020). Ayrıca glutamatın bellek oluşumu, belleğin kaydı ve bilişsel süreçlerde benzersiz görevleri mevcuttur (Mutluay ve Karataş, 2022).

Hipokampus özelinde yapılan çalışmalarda GABA seviyelerinin nörojeneze ve sinaptik bağlantılara göre şekillendiğine dair bulgular elde edilmiştir. Öğrenme görevi bakımından son derece önemli olan hipokampus bu sebeple önem arz etmektedir. Çünkü bir takım çalışmalar sonucunda GABA sinyallenmesinin progenitor hücreler ve blastik hipokampal nöronlar üzerine etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu sebeplerle aslında GABAerjik ve glutamaterjik sistemin hafıza oluşumunda karmaşık bir takım ilişkilere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca beynin topoğrafik değişimleriyle bu dengenin dahada karmaşık bir yapı halini aldığı gözlemlenmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen raporlara göre; azalan GABA seviyelerinin bilişsel aktivite kaybı ile ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir. Bu durumun yaş ile ilişkilendirildiğinde de öğrenme düzeyiyle ilgili bir risk faktörü olabileceği öngörülmüştür. Ayrıca *in vivo* hafıza oluşumunda hipokampal GABA seviyelerinin önemine de vurgu yapılmıştır (Spurny ve ark., 2020).

OSB'nin klinik öncesi modellerinde glutamaterjik ve GABAerjik seviyelerde dengesizlikler olduğuna dair bulgular mevcuttur. Ayrıca otistik hastalar ile yapılan bir çalışmada; plazmada daha yüksek glutamat konsantrasyonu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, kontrol deneklerine kıyasla beklenmedik şekilde daha yüksek GABA ve daha düşük glutamat/GABA seviyeleri elde edildiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre; otizmin nöroenflamasyon sonucu GABAerjik ve glutamaterjik sinapslarda dengesizlik gösteren nörogelişimsel bir sinaptik bozukluk olduğuna dair kanıtlar sunulmuştur (El-Ansary ve Al-Ayadhi, 2014). Ayrıca GABAerjik nöronların hiperfonksiyonun sinaps oluşumunu ve nöral plastisiteyi olumsuz etkilediği rapor edilmiştir (Jacop ve ark., 2009).

Ekstranöronal glutamat yüksekliği; nöronal göç sistematığı, nöronal plastisite ve sinaptogenez bozuklukları oluşturarak beyin mimarisini değiştirmeye başlar. GABA aracılı kalsiyum sinyalleşmesi, hücre çoğalması, farklılaşması gibi bazı durumlar ile bu değişim süreci düzenlenir. Bu değişimlerin sonuçlarına göre; işlevsel bozukluklarının dengesi, şekli ve şiddetine göre otizm spektrumunda değiştiğine dair görüşler vardır. Yayınlanan çeşitli raporlarda ise otizmlili hastalarda, kontrol grupları ile

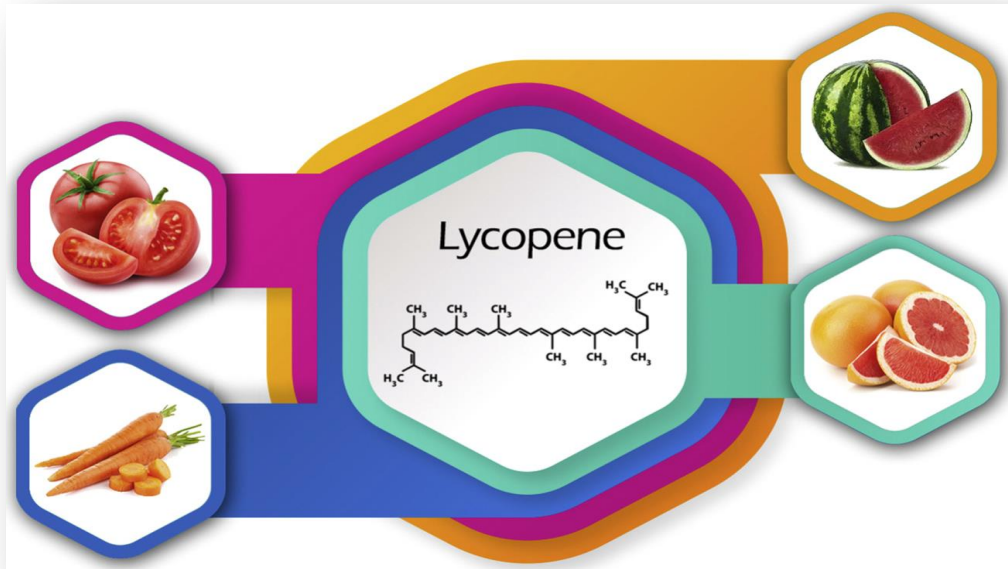
karşılaştırıldığında GABA seviyesi ve glutamat/GABA oranları önemli ölçüde düşük olarak bildirilmiştir. Görülen bu farklılıklar gerek hastalığın spektrum farkları, gerekse spektruma göre oluşan farklılıklar, GABA ve glutamatın çeşitli enzimler ile (glutamik asit dekarboksilaz vb.) dönüşümler içermesi, krebs döngüsündeki bir takım enzimsel reaksiyonlar, GABA'nın glutamattan ve glutamatında GABA'dan türetilmesi gibi sebeplerden dolayı her iki nörotransmitterdeki değişiklikler birbirini etkileyebilirler. Ayrıca glutamatın GABA'ya çevrilmesi sırasındaki reaksiyon basamakları da henüz keşfedilmemiştir (El-Ansary ve Al-Ayadhi, 2014). Bu sebeple farklı metabolizma cevaplarının olabileceği gerçeğinde göz ardı edilmemelidir.

2.10. Likopen

Likopen genel olarak kırmızı meyvelerde (özellikle domateste) bulunan kuvvetli bir antioksidandır (Şekil 2.7). Beta karotenden dahi daha güçlü antioksidan etkinliği olan bir karotenoiddir (Huang ve ark., 2018). Likopenin doğada bulunan kimyasal formu all-trans izomeridir. Bitkilerde ve gündelik diyetlerde bu şekilde bulunur. Likopen genel olarak yağda çözünür bir yapıya sahiptir. Likopenin *in vivo* olarak baskın bulunan formu ise cis-izomeridir. Bu formu suda çözünebilir olan formudur. Suda çözünebilen bir form olduğu için vücuttaki biyoyararlanımı all-trans formuna göre son derece yüksektir. Likopenin cis-izomerinin biyoyararlanımının yüksek olmasının sebebi kanda kolay absorbe olabilmesidir. Likopenin all-trans izomerden cis-izomere geçişi doğada yüksek ısı maruziyetiyle (domates salçası yapımı) gerçekleşir. Bu izomerik geçiş *in vivo* olarak bazı mide, barsak ve karaciğer enzimleri ile gerçekleştirilebilmektedir (Cooperstone ve ark., 2015; Gärtner ve ark., 1997; Ross ve ark., 2011). Likopen ile yapılan testler ve çeşitli klinik denemeler çerçevesinde elde edilen verilere göre; güven aralığı yüksek bir etken madde olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda kayda değer ciddi bir yan etki bildirimi de bulunmamaktadır (Trumbo ve ark., 2005). Polien zincirindeki kromofor molekül sayesinde kırmızı rengini ve antioksidan özelliğini kazanmıştır. Ayrıca likopenin antioksidan özelliğine ek olarak antikanser ve antiinflamatuvar özelliklerinin de olduğuna dair birçok çalışma vardır. Likopenin bir takım kanser türlerine ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu olduğuna dair raporlar mevcuttur. Üstelik birçok çalışmada bu hastalıkların tedavisi için ümit vaadeden sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Çetin ve ark., 2017). Bütün bunlara ek olarak likopenin çeşitli nörotrofiklerin (NGF, VEGF, BDNF) salınımını desteklediğine

dair çalışmalar vardır (Huang ve ark., 2018). Likopen, oksidatif hasara karşı güçlü bir β -karotenoid antioksidandır. Ayrıca *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda antioksidan etkinliğinin son derece fazla olduğu ve serbest radikal toplama yetkinliği olarak da son derece güçlü olduğu bildirilmiştir (Karataş ve Çöteli, 2016).

Likopen ile ilgili yapılan çok sayıda çalışma ve yayımlanan rapora göre vücuttaki birçok doku çeşidi için büyük faydalar barındırdığı ifade edilmiştir. Ayrıca birçok kanser türünde de elle tutulur faydalar sağladığı bildirilmiştir (Karataş ve Çöteli, 2016). Likopenin genel olarak bir takım kronik hastalıkların risklerini azalttığı ve enflamasyonu azalttığı bilinmektedir. Buna ek olarak mitokondriyal fonksiyonların düzeltilmesi, nöronal apoptoz ve enflamasyonun engellenmesi gibi faydaları da bildirilmiştir. Likopen ayrıca MSS homeostazisi açısından son derece önemlidir. Sinir hücrelerine Ca^{2+} alımını ve seviyesinin korunmasını sağlar. Çünkü Ca^{2+} nöron üretimi için olmazsa olmaz bir moleküldür (Mirahmadi ve ark., 2020). Nöral kök hücreler likopen ile muamele edildiklerinde NGF, BDNF, VEGF'nin salınımını artırdığına dair raporlar mevcuttur. Ayrıca apoptozu azalttığı ve aynı zamanda sinaptik proteinlerinde seviyesinde anlamlı bir artış sağladığına dair raporlar mevcuttur. (Huang ve ark., 2018).



Şekil 2.7. Likopenin kimyasal yapısı ve likopen içeren bazı meyveler (Mirahmadi ve ark., 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 07.04.2021 tarihli, 04 toplantı sayılı ve 21/91 numaralı onay kararı ile başlatılmıştır. Çalışma süresince yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TDK-2022-11847) tarafından desteklenmiştir.

Çalışmanın hücre kültürü kısmında Rietze ve ark. tarafından bildirilen nöral kök hücre kültürü protokolleri temel alınarak kombine edilmiş protokoller kullanılmıştır (Rietze ve Reynolds, 2006). Çalışmada PPA dozları için Abdelli ve ark., PPA maruziyet süreleri için Frye ve ark. çalışmaları baz alınmıştır (Abdelli ve ark., 2019; Frye ve ark., 2016; Frye ve ark., 2017). Likopen dozları ve muamele süreleri için Huang ve ark. çalışmaları baz alınmıştır (Huang ve ark., 2018). Çalışmada akım sitometrik analizler ise Karaöz, Ishaque ve ark., Carroll ve ark., Zou ve ark. tarafından bildirilen akım sitometrik protokol teknikleri çerçevesinde gerçekleştirilmiştir (Carroll ve ark., 2007; Ishaque ve Al-Rubeai, 2007; Karaöz, 2010; Zou ve ark., 2013).

3.1. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi

Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DEKAM) alınan 10 adet 3-8 haftalık erkek rat ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DEKAM) 10 adet erkek rattan steril şartlarda elde edilen beyinlerin Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) laboratuvarlarında hücre kültürü işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan bütün işlemler temel hücre kültürü protokollerine bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Deneyler ve Analizler Sırasında Kullanılan Malzemeler

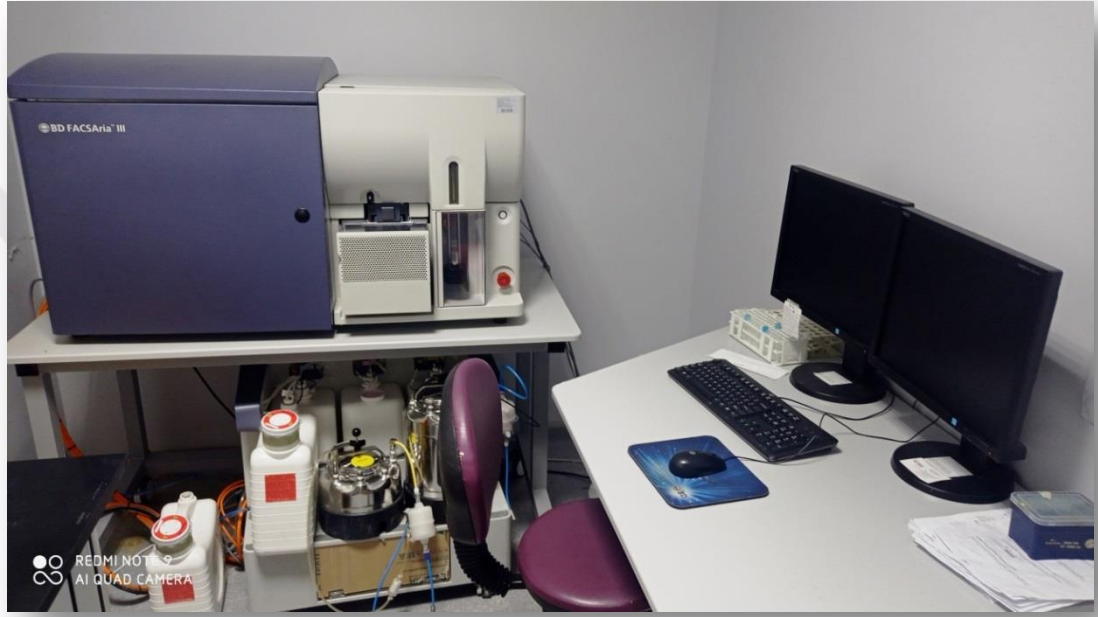
Çalışma ortamı %70'lik alkolle steril hale getirildikten sonra beyinlerden hipokampus dokularının eldesi sağlanmış ve ardından nöral kök hücre kültürü işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bütün işlemler sırasında kullanılan malzemelerin tümü sterildir. Söz konusu malzemeler aşağıda belirtilmiştir.

3.2.1. Sarf Malzemeleri ve Cihazlar

- Nestin PE antikor (Invitrogen, Lot. No: 307501)
- Anti SOX-2 FITC antikor (Millipore, Lot. No: 3874824)
- SOX-2 Alexa Fluor® antikor (R&D system, Cat. Number: IC2018V)
- Enzim Papain (Bostonchem, Cat. No: BPM-815681-25G)
- Enzim Trypsin/EDTA (Capricorn, Cat. No: TRY-3B)
- DMEM/Ham's F-12 w/ L-Glutamine Hücre Besiyeri (Capricorn Scientific, Cat. No: DMEM-12-A)
- Rat Neural Stem Cell Expansion Medium Kit (RNSCEM) (Sigma-Aldrich, Cat. No: SCM009)
- Fötal Bovine Serum (FBS) (Capricorn Scientific, Cat. No: FBS-HI-11A)
- Dubelco's Phosphate Buffer Saline (DPBS)-(Biowest, Cat No: L0615-500)
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Capricorn Scientific, Cat. No: HBSS-1A)
- Amfoterisin-B (Biological Industries, Cat. No: 03-028-1B)
- Penisilin / Streptomisin (100X) antibiyotik solüsyonu (Capricorn Scientific Cat. No: PS-B)
- TrypLE™ Express Enzim (Gibco Ref. 1260421)
- Cell Proliferation Staining Reagent - Green Fluorescence - Cytopainter (abcam Kat. No: ab176735)
- Akım Sitometri Annexin V-FITC/PI Apoptoz Kiti (elabscience, Cat.No: E-CK-A211)

- Rat ACh Eliza Kit 96T (Sunred, Ref. No: DZE201110723)
- Rat NGF Eliza Kit 96T (Sunred, Ref. No: DZE201110540)
- Rat FGF2 Eliza Kit 96T (Sunred, Ref. No: DZE201111335)
- Rat Glutamate Eliza Kit 96T (Sunred, Ref. No: DZE201111647)
- Rat Staufen2 Eliza Kit 96T (Sunred, Ref. No: DZE201117638)
- Rat IL-10 Eliza Kit 96T (Sunred, Ref. No: DZE201110109)
- Rat BDNF Eliza Kit 96T (Sunred, Ref. No: DZE201110477)
- Rat IL-6 Eliza Kit 96T (Sunred, Ref. No: DZE201110136)
- Rat Anandamide Eliza Kit 96T (Sunred, Ref. No: DZE201118325)
- Rat GABA Eliza Kit 96T (ELK Biotechnology, Cat. No: ELK9167)
- Sodium Propionate (Sigma, P1880-100G)
- Likopen (Bostonchem, Cat. No: BEE-100293-1G)
- Tetrahydrofuran (contains 250 ppm BHT) (Sigma-Aldrich Cat. No: 87368)
- Konik tabanlı santrifüj tüpü (Falkon Tüp) 15 ml (Fıratmed, Cat. No: 8890000106)
- Konik tabanlı santrifüj tüpü (Falkon Tüp) 50 ml (Fıratmed, Cat. No: 8870000087)
- 40 µm hücre süzgeci (Corning, Ref. No: 431750)
- Hücre kültürü kabı (Flask t25)
- Cam ve plastik petri kutusu (90mm)
- Jilet
- Thoma lamı
- Eppendorf tüp
- 22 parça mikro cerrahi seti
- Krio tüp

- Makro pipet (5 ml)
- Mikro pipet (5,100,1000 μ l)
- 6 kuyucuklu kültür kabı
- 24 kuyucuklu kültür kabı
- Pastör pipeti
- Kurutma kağıdı



Şekil 3.1. Flow (akım) sitometri cihazı (BD FACS Aria III- Cell Sorter).



Şekil 3.2. Lamin air kabin (Telstar Clean Air Class II).



Şekil 3.3. Inverted mikroskop (Leica DMI1).



Şekil 3.4. ELİZA okuyucu (Promega GloMax®-Multi Detection System).

3.3 Beyin Dokusundan Hücre Eldesi Sırasında Kullanılacak Olan Reaktiflerin Hazırlanması

Tam besiyeri; %99 RNSCEM +% 1 Amfoterisin B şeklinde, 37 °C’lik ortam sıcaklığında hazırlanmıştır. Tam HBSS (Hank’s Balanced Salt Solution); % 98 HBSS + %1 Penisilin/Streptomisin + %1 Amfoterisin B şeklinde, +1°C’lik ortam sıcaklığında hazırlanmıştır. Likopen (toz) + Tetrahydrofuran+BHT 1mg/ml = Likopen (sıvı) (1 μ M, 2 μ M) şeklinde oda sıcaklığında hazırlanmıştır. Propiyonik asit (2MM) oda sıcaklığında PBS ile hazırlanmıştır.

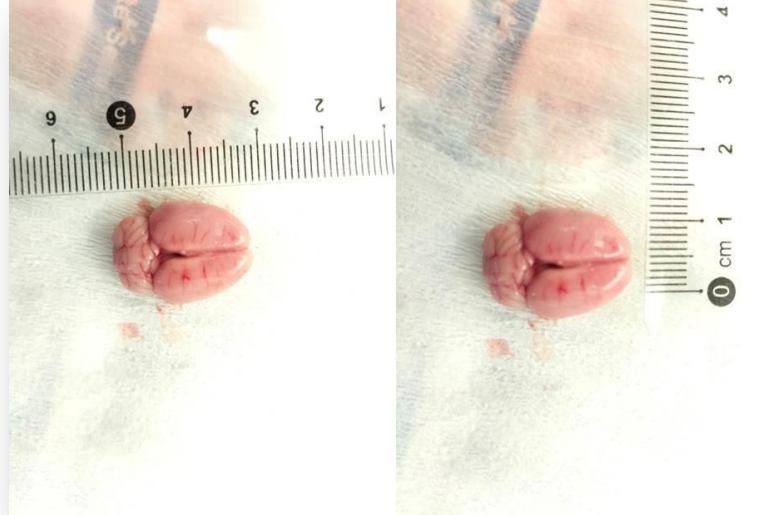
3.4. Hipokampüsten Nöral Kök Hücre Eldesi

Nöral kök hücrenin primer kültürden eldesi için 3-8 haftalık SD (Sprague Dawley) cinsi erkek ratlar kullanıldı. Etik kurul ilkelerine bağlı kalınarak eter anestezisi altında ratların kafatası dekapitasyon sonrası açılarak mikro cerrahi ile hippokampus bölgesel olarak eksize edildi. Beyin daha önceden hazırlanmış olan soğuk tampon çözelti (HBSS+ %1 Penisilin/Streptomisin + %1 Amfoterisin B) içerisinde, tek parça halinde hızlı bir

şekilde GENKÖK laboratuvarlarına ulaştırıldı (Şekil 3.5). Lamin air (class II) kabin içerisinde; Hank's tampon çözeltisinden beyin çıkartıldı. Daha sonra steril cam petri içerisine alındı. PBS ile 3'er kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından beyin, üzerine kurutma kâğıdı serilmiş olan buzun üzerine alındı ve ölçümleri yapıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Rat beyninden hipokampusu çıkartmak için ana materyaller ve kabin düzeni.



Şekil 3.6. Rat beyninin kafatasından çıkartıldıktan sonra enine ve boyuna ölçümü.

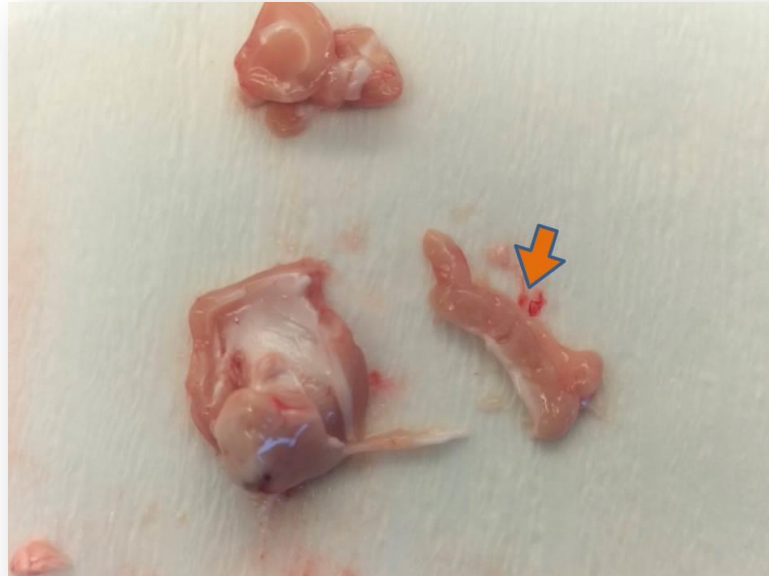
Mikrocerrahi ve künt diseksiyon teknikleri kullanılarak hipokampüs bölgesi eksize edilerek çıkartıldı (Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9). Ardından hipokampüs dokusu ayrı bir petri içerisine alındı (Şekil 3.10). Hipokampüs dokusu PBS ile nazikçe yıkandı ve steril jilet vasıtasıyla mins edildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.7. Rat beyninin hemisferlerinin medyan hattın korpus kallozum kesilerek ikiye ayrılması



Şekil 3.8. Hipokampüsün beyin dokusu içindeki görüntüsü (turuncu çizgili alan).



Şekil 3.9. Hipokampüsün beyinden izole edildikten sonraki görüntüsü (turuncu ok).

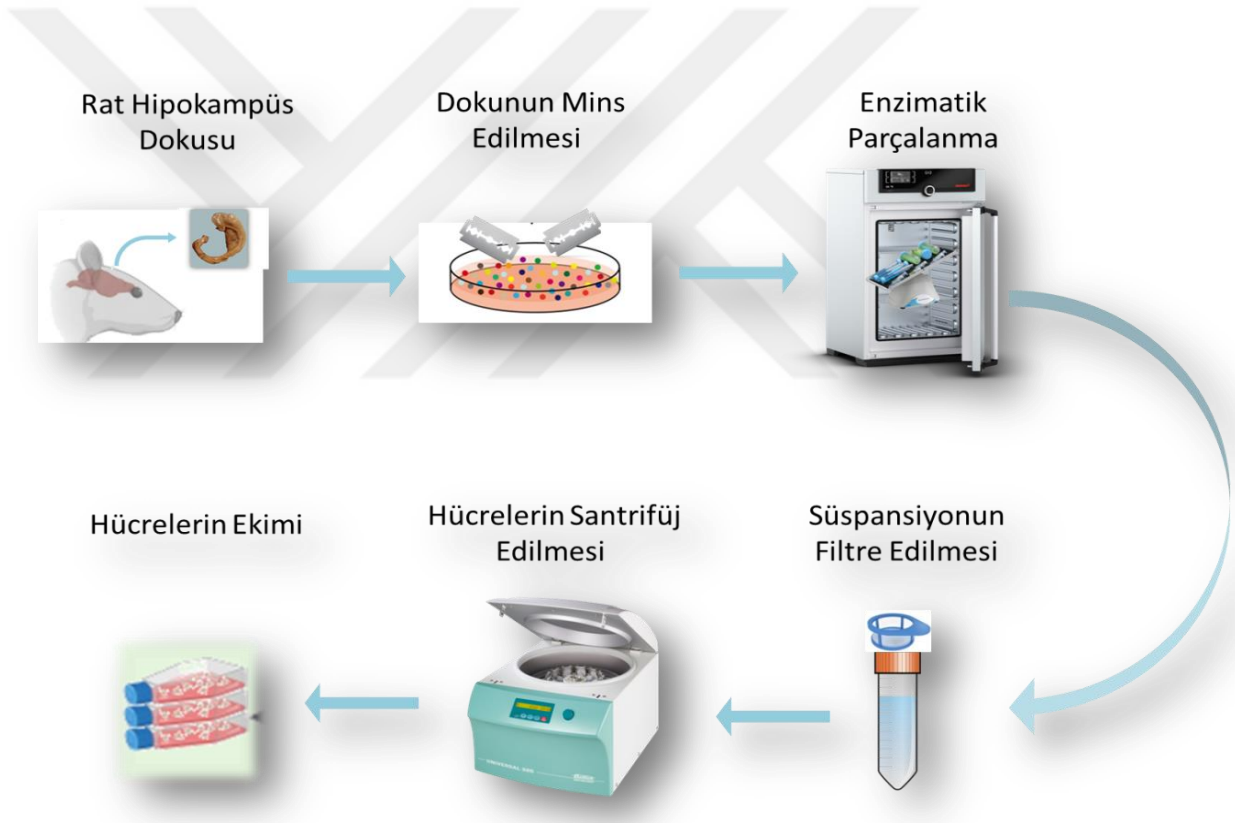


Şekil 3.10. Hipokampüsün beyinden bilateral izolasyonu sonrası petrideki görüntüsü.



Şekil 3.11. Hipokampüsün beyinden çıkartıldıktan sonra mins edilmesi.

Bu işlemin ardından mins edilen doku parçaları 3 ml papain solüsyonunda yeniden süspanse edildi. Papainizasyon süreci 20 dk. 37°C'lik % 5 CO₂ 'li inkübatörde gerçekleştirildi (Şekil 3.13). Bu süreç içerisinde yaklaşık 3'er dk. arayla atomik dairesel hareketlerle süspansiyonun homojen karışımı sağlandı ve tekrar inkübasyona bırakıldı. Ancak herhangi bir vorteks işlemi gerçekleştirilmedi. İnkübasyon sonunda ortalama 1'e 2 (~6 ml) oranında DMEM/F12+FBS eklenerek papain etkinliği durduruldu. Ardından 1300 rpm/ 3 dk. santrifüj işlemi uygulandı. Ardından tüm ortam 40 µm'lik hücre süzgecinden geçirilerek 50'lik falkonlara alındı. Hücreler PBS ile yıkandı ve 15'lik falkonlara alınarak tekrar yapılan santrifüj işleminin ardından hücrelerin toz çökelti halinde falkonun dibinde tortu şeklinde biriktiği gözlemlendi (Şekil 3.14).



Şekil 3.12. Hücre üretim sürecinin şematik olarak gösterimi.

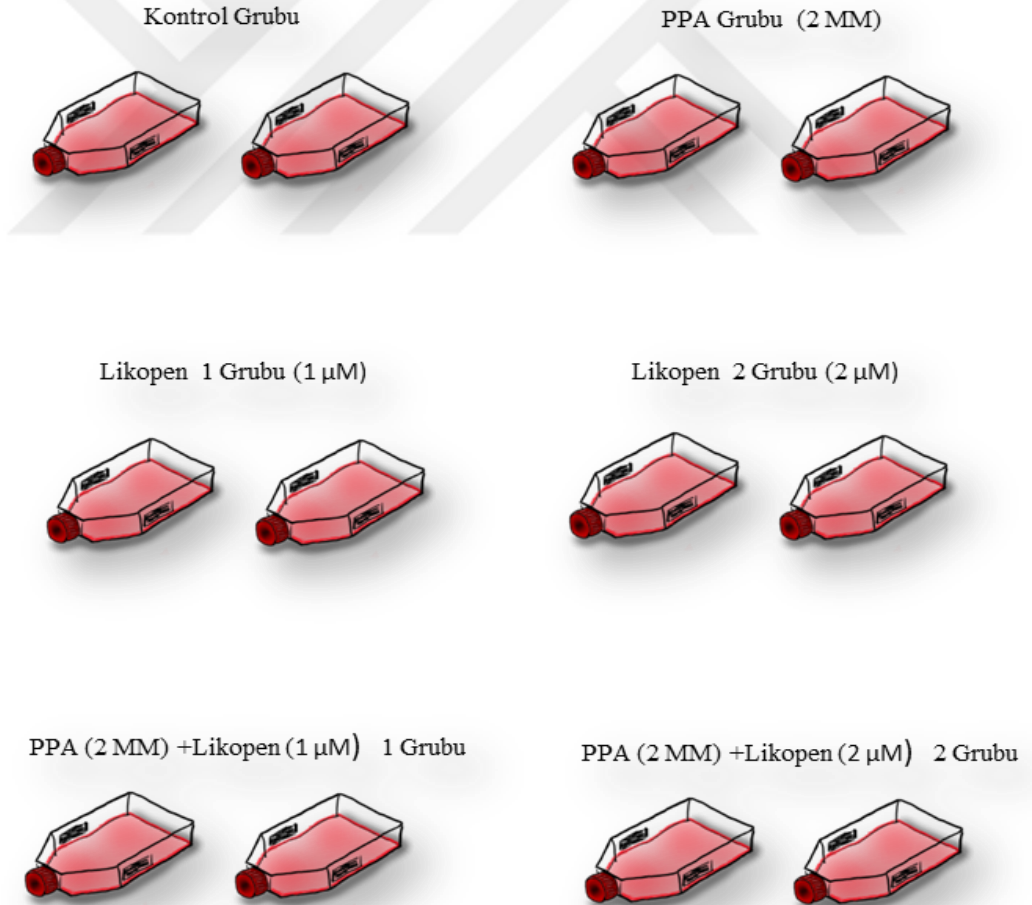


Şekil 3.13. Mins edilen dokuların enzim ile muamelesi.



Şekil 3.14. Santrifüj işleminin ardından hücrelerin falkon tüpün dibinde oluşturduğu çökelti.

Son olarak ortamda kalan süpernatant, tabandaki hücresel tortuya dokunmaksızın çok yavaş ve hassas bir şekilde uzaklaştırılarak RNSCEM (Rat Neural Stem Cell Expansion Medium) kit besiyeri eklendi. Hafif pipetaj ile homojenize edilen içeriğin T25 flasklara ekimi yapıldı. Kültür kapları ile rastgele çalışma grupları oluşturuldu (Şekil 3.15). Oluşturulan çalışma gruplarına reaktifler eklenirken kontrol grubuna diğer gruplara denk miktarda sadece PBS eklenmiştir. Tüm gruplar için verilen PPA miktarı 2MM çözünürlükte uygulanmıştır. Gruplar içerisinde likopen miktarı 1 μ M ve 2 μ M olarak uygulanmıştır. Söz konusu gruplardan analizler için kullanılacak olan örnekler aynı anda alınmaya özen gösterilmiştir. Ayrıca tüm deney gruplarının deney ve test şartlarının aynı olmasına azami derecede dikkat edilmiştir. Tüm deney grupları tüm reaktiflere 24 saat maruz bırakılmıştır.



Şekil 3.15. Oluşturulan çalışma grupları.

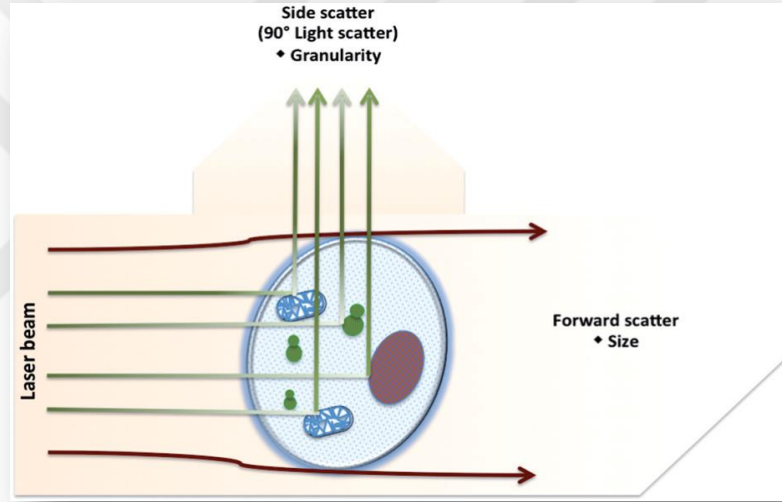
T25 flasklara ekim yapıldıktan sonra kültür kapları 37°C'lik % 5 CO₂ ihtiva eden inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin her 24 saatte bir morfolojik ve mikroskopik olarak muayenesi yapıldı. Ortalama 2-3 günde bir yeni besiyeri değişimi yapıldı. Nörosferlerin son derece hassas bir şekilde tutunma özelliği olduğu için besiyeri değişimleri yapılırken yıkama yapılmadan besiyeri değişimi sağlandı. Nöral kök hücrelerin morfolojik özellikleri ve değişimleri mikroskop altında incelendi. Nörosfer oluşumu özellikle nöral kök hücreler için son derece karakteristik morfolojik bir özellik olmakla birlikte; hücrelerin konfluense erişim sürecinde de genel olarak kök hücrelerin proliferatif özellikleride morfolojik olarak gözlemlendi. Nöral kök hücrelerin flask tabanından ve birbirlerinden ayrılmalrı için TrypLE™ enzimi kullanıldı. Analizler için nöral kök hücreler 7-9.günlerde alındı.

Nöral kök hücreler ve nöral öncül hücreler *in vitro* olarak kültür ortamında nörosfer adı verilen yapılar oluşturmaktadırlar. Bilindiği üzere nörosferik yapılar nöral kök hücre kültürleri için son derece ayırt edici olmakla birlikte yapılan birçok çalışmada nörosferik özellikler barındıran hücre gruplarının nerdeyse tamamının (~%98) Nestin ve sox-2 gibi önemli proliferatif yüzey belirteçlerini ifade ettiği yapılan birçok çalışma ile desteklenmiştir (Abdanipour ve ark., 2017; Can, 2014; Dayer ve ark., 2007; Fu ve ark., 2018; Galderisi ve ark., 2013; Galiakberova ve Dashinimaev, 2020; Jaberı ve ark., 2021; Park ve ark., 2012; Ramasamy ve ark., 2013; Rietze ve Reynolds, 2006). Ayrıca çalışmamızda kullanılan RNSCEM (Rat Neural Stem Cell Expansion Medium) kit besiyeri, nöral kök hücreler için özel bir besiyeridir. Nöral kök ve öncül hücrelerin beslenmesi için özel olarak formüle edilmiş bir kittir. Bu sebeple hücre kültürü ortamında bu besiyeri nöral kök hücrelerin ve nörosferik yapıların daha saf olarak elde edilmesi ve çoğaltılması için özellikle kullanılmıştır.

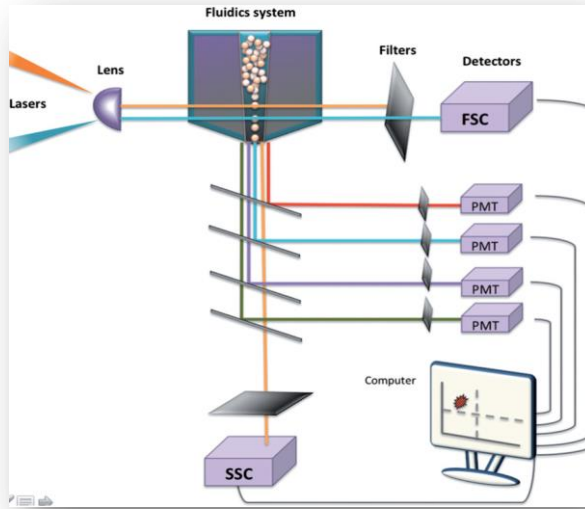
3.5. Akım Sitometri

Belirli bir organizmaya ait hücrelerin kimliklendirilmesi, morfolojik ve yaşamsal özellikleri bakımından sınıflandırılması için uygulanan yaygın bir tekniktir. Bu teknik genel olarak akıcı bir sıvı içerisinde geçen hücreler için kullanıldığından dolayı akım sitometri adını almıştır. Cihazın hidrodinamik özelliği sayesinde hücreler ışığın önünden tek tek geçebilirler (Şekil 3.16). Hücrelerin bilgileri sinyal dedektörleri ile tespit edilerek bilgisayara aktarılır (Taneli, 2007). Bilgisayardaki yazılım programı ile

hücreden gelen bilgiler anlamlı bir şekle dönüştürülerek kullanıcıya aktarılır (Şekil 3.17). Bütün bunlara ek olarak hücrelerin canlılık durumları ile ilgili testler ve apoptotik hücrelerin ölçümünde akım sitometri yöntemi ile yapılabilir. Üstelik son derece hızlı bir şekilde tespit edilebildiği içinde son derece güvenli olarak kabul edilmektedir. Çünkü apoptotik hücrelerin zaman kaybettikçe apoptotik indeksleri değiştiği için bu test için hız önemli bir güven belirtecidir. Akım sitometri, apoptozu plazma membran değişikliklerinin tespitiyle gerçekleştirmektedir. Annexin V aracılığı ile fosfatidilserinin plazma membranındaki konumu tespit edilerek hücrenin apoptotik indeksi tespit edilebilir (Şekil 3.18). PI (Propidium iyodür) aracılığı ile nekroz indeksi tespit edilebilir (Karaöz, 2010; Macey, 2007).



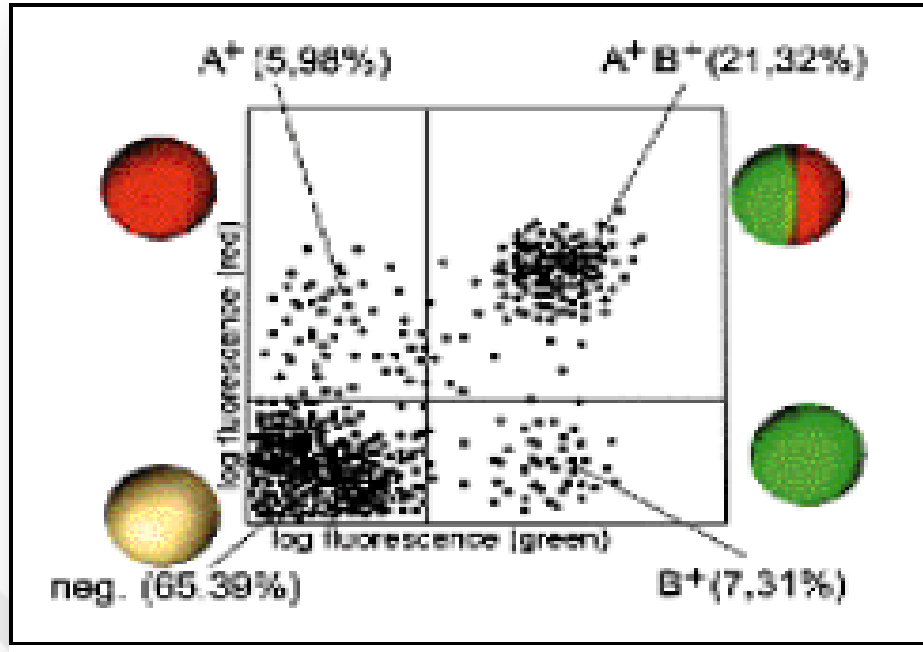
Şekil 3.16. Akım sitometri cihazının temel çalışma prensibi (Adan ve ark., 2017).



Şekil 3.17. Akım sitometri cihazının sensörleri ve bileşenleri (Adan ve ark., 2017).

3.5.1. Flow (Akım) Sitometri ile Apoptoz Protokolü

- Hücre kültüründen elde edilen süspansiyon 15 ml falkon tüplere konuldu. Ardından 1300 rpm/5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı.
- Çökelti halindeki hücelere PBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından nazikçe pipetaj yapıldı. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı.
- Çökeltiye 500 µl “Annexin V Binding Buffer” eklendi. Hücre süspansiyonuna nazikçe pipetaj yapıldı.
- Her bir tüpteki hücre süspansiyonuna; 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI eklendi. Oluşan süspansiyon tekrar yavaşça ve nazikçe vorteks uygulamadan karıştırıldı.
- Oluşan süspansiyon oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda ~20 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sürecinin sonunda her bir tüp buz üzerine alındı. Analiz süreci karanlık bir ortamda, maksimum yarım saat içinde tamamlandı.



Şekil 3.18. Akım sitometrik analizlerde apoptotik testler için kullanılabilen örnek şekil diyagram ve bölgeleri (dot blot). (A^+ : ölü hücreler, A^+B^- : geç apoptotik hücreler, B^+ : erken apoptotik hücreler, neg. : canlı hücreler, $A^+B^- + B^+ =$ tüm apoptotik hücreler) (Taneli, 2007).

3.6. ELİZA (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) Yöntemi

Antijen-antikor eşleşmesi mantığına göre çalışan enzimlerin kullanıldığı yöntemler ELİZA olarak adlandırılır. Bu yöntemler biyolojik sıvılarda bulunan moleküllerin (peptit, hormon, vitamin, kimyasal ajanlar) hem varlığını hemde konsantrasyonlarını renk değişimi yoluyla belirlemeye yarar. Bu yöntemle tespit edilecek olan moleküller çok düşük konsantrasyonlarda olsalar bile yüksek güvenilirlikle tespit edilebilirler. Çünkü bir antikoru kendi antijeni dışında farklı bir antijene bağlanması neredeyse imkansızdır. Sonraki yıllarda enzim tabanlı olarak geliştirilmiştir. Bu yöntem gelişimi sürecinden günümüze kadar birçok alanda (mikrobiyoloji, parazitoloji, viroloji vb.) hem teşhis hemde Ar-Ge amaçlı kullanılmaktadır (Aydın, 2015).

3.6.1. ELİZA (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) Protokolü

Kullanılan ELİZA kitleri; FGF-2, Anandamid, Staufen-2, NGF, Asetilkolin, BDNF, IL-6, IL-10, Glutamat, GABA.

Her kullanım öncesi numuneler (süpernatant- sekretom) tekrar tekrar vortekslendi. Bu şekilde her testin homojen örneklerle çalışılması sağlandı.

- Standart solüsyonlar hazırlandı.
- Mikroplakalarda ilk kuyucuklar boş bırakıldı. Sonraki ilk 5 kuyucuğa farklı dilüsyonlardaki standart solüsyonlar ilave edildi (50'şer µl).
- Kuyucuklara örnekler eklendi (40'ar µl).
- Standartların üzerine Str-HRP eklendi (50'şer µl).
- Örneklerin üzerine antibadi eklendi (10'ar µl).
- Örneklerin üzerine Str-HRP eklendi (50'şer µl).
- Mikroplakalar karanlık bir ortamda 37°C 60 dk. inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda yıkama solüsyonu ile mikroplakalar yıkandı (3'er kez).
- Mikroplakalara kromojen A ve kromojen B eklendi (50'şer µl).
- Mikroplakalar hafifçe el ile sabit bir zeminde çalkalandı.
- Mikroplakalar karanlık bir ortamda 37°C 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Mikroplakalardaki kuyucuklara stop solüsyonu eklendi (50'şer µl).
- 15 dk. içerisinde 450 nm dalga boyunda ELİZA okuyucu ile okuma yapıldı.

3.7.Konfokal Mikroskopi ve Hücrelerin Kimliklendirilmesi

Konfokal mikroskopi esasen bir ışık mikroskobu tekniğidir. Bu teknik özellikle 3 boyutlu görüntüleri daha yüksek çözünürlükte elde etmek için dizayn edilmiştir. Floresan özellikli boyalara ek olarak lazer ışını kullanımında mikroskopi teknolojisine dahil edilmesiyle konfokal mikroskopi son halini almıştır. Konfokal mikroskobinin en önemli özelliklerinden bir tanesi optik olarak kesit alabilmesidir. Bir diğer önemli özelliğide odak dışında görüntünün yeniden inşa edilerek odaktaki gereksiz ışımının sebep olduğu görüntü kaybının engellemesidir. Genel olarak bu mikroskopi tekniği biyolojik çalışmalar için kullanım alanı bulmuştur. Konfokal mikroskopi özellikle sinir sisteminin görüntülenmesi çalışmalarında daha çok tercih edilmektedir. Gelişim sürecinde teknolojinin getirdiği birçok özellik (lazerler, dedektörler, filtreler, bilgisayarlar, yazılımlar vb.) sayesinde konfokal mikroskopi birçok alanda vazgeçilmez bir görüntüleme tekniği olmuştur. Özellikle nöroanatomi, nörofizyoloji çalışmaları konfokal mikroskopi kullanımında başı çekmektedir (Sarı, 2021).

Hücrelerin morfolojileri genel olarak birbirine çok benzer yapıdadır. Ancak işlevsel olarak birbirine çok benzeyen hücreler bile bambaşka görevlere sahiptir. Bu sebeple hücrelerin kimliklendirilmesi son derece önemli bir durumdur. Bu sebeple hücrelerin gerek içsel gerekse dışsal olarak bir takım belirteç molekülleri mevcuttur. Bu moleküller belirli hücre tiplerine olan spesifik durumlarına göre kimlikleme için kullanılırlar (Camcıoğlu ve Deniz, 2007). Ancak nöral hücreler ve nöral kök hücreler morfoloji olarak diğer hücrelerden bir takım görsel farklara sahiptirler. Nöral kök hücreler ve nöral öncüller nestin ve sox2 gibi belirteçleri ettikleri için kimliklendirilmelerinde yaygın olarak bu belirteçler kullanılır. Nestin daha çok nöral kök hücreler tarafından ifade edilirken, sox2 ağırlıklı olarak nöral blastlarda ifade edilirler. Buna ek olarak nestinin nöral progenitör hücrelerde de ifadesi mevcuttur. Bütün bunlara ek olarak FGF-2'nin bulunduğu bir ortamda büyüyen nörosferlerden elde edilen nöral kök hücreler özellikle nestin ifade ederler (Galiakberova ve Dashinimaev, 2020).

NKH'lerin proliferasyon, kendini yenileme ve göç için görevli bir filament olan nestini yüksek düzeyde eksprese ettiği rapor edilmiştir. Bu sebeple nestinin bir proliferasyon belirteci olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca yapılan farklı çalışmalarda farklı proliferasyon belirteçleri ile nestinin paralel bir ifade seyrine sahip olduğu rapor edilmiştir. Kendini yenileme belirteci olan sox2'nin ekspresyon seviyesi, sıçanlardan elde edilen hücrelerde paralel bir ifadeye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca NKH'lar ve progenitör nöral hücrelerde sox2'nin ifadesinin mevcut olduğu bu sebeple proliferasyon belirteci olarak da ifade edildiği rapor edilmiştir (Cockburn ve ark., 2012; Jaber ve ark., 2021).

3.7.1. Konfokal Mikroskopi Protokolü

3 adet rattan alınan sabitlenmiş hipokampus kesitleri için her test için sırayla 3 slayt kullanıldı slaytlardan 3 tanesi analiz için primer slayt olarak kullanıldı. Elde ettiğimiz doku kesitlerinin membran permabilitesi için PBS tampon çözeltisi içerisinde çözünmüş %0.5 Triton X-100 içinde 2 saat bekletildi. Permeabilizasyondan sonra doku kesitleri PBS ile 3 kez x 5 dakika yıkandı. Nonspesifik fluorofor bağlayıcı bölgeler blok tamponu (PBS içinde %5 serum) kullanılarak 1 saat boyunca donkey serum ile blokladı. Bloklama işleminden sonra slaytlar bloklama kavonozundan çıkarıldı ve blok tamponunun fazlalığının giderilmesi için dikkatli bir şekilde kenarları ve arka tarafı

silindi. Slaytlar nem odalarına yerleştirildi ve primer antikörlerin (SOX-2 Alexa Fluor 405- conjugated antibody (R&D Systmens; Cat #IC2018V), Nestin conjugated PE antibody (Invitrogen Cat #MA5-23574) her biri için her bir dokuya ait doku kesitlerinin yüzeyine eklendi. Slaytlar nem odalarında +4 °C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün primer antikör ile muamele edilmiş olan slaytlar boyama kavonozuna tekrar konularak PBS ile 3’er kez x 5’er dakika yıkandı. Slaytlar tekrar boyama kavonozundan alınarak fazla blok tamponunun ortamdan uzaklaştırılması için dikkatli bir şekilde silindi. Fluoroforun ışıktan etkilenerek zarar görmesinin engellenmesi için nem odaları alimünyum folyo ile kaplandı. Boyanan doku slaytları DAPI ile birlikte anti-fade (Prolong Gold anti-fade reagent, Invitrogen, Oregon; renk solmasını önleyen koruyucu) kaplandı. Spektral dekonvolüsyon konfokal mikroskop (ZEISS AxioScop, Germany) kullanılarak 20X büyütme kesitleri görüntülemek için kullanıldı. İşlem gören her gruptan her primer antikör için 3 adet primer slayt kesitleri üzerinde 3 doku kesiti (toplamda her grup için $5 \times 3 = 15$ hipokampus doku kesiti) kullanılarak floresan yoğunluk analizi yapıldı. DAPI için mikroskobun emisyon ayarları 425-475nm aralığı olarak belirlendi. Yakalanan görüntüler antikör floresan yoğunluğu kullanılarak Image J (FIJI; software v. 2.0.0, <https://fiji.sc/>) programında analiz edildi (Nichols ve ark., 2012; Satriotomo ve ark., 2012; Satriotomo ve ark., 2016; Wilkinson ve ark., 2010; Wilkinson ve ark., 2011).

3.8. İstatistik

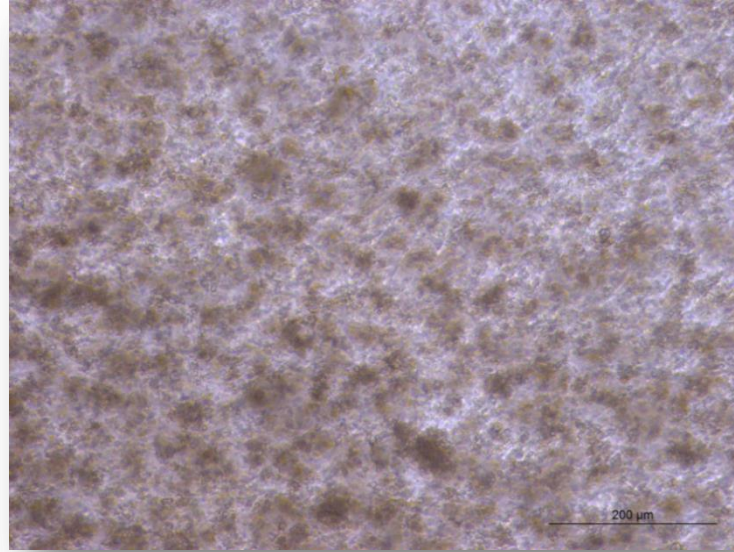
Eliza sonuçlarının incelenmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi ve alt grupların arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey Testi HSD kullanıldı ve bulgular ortalama standart sapma olarak sunuldu ve $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Konfokal mikroskopi sonuçlarının incelenmesinde Mann Whitney U testi ve Hodges-Lehmann testi kullanıldı ve $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

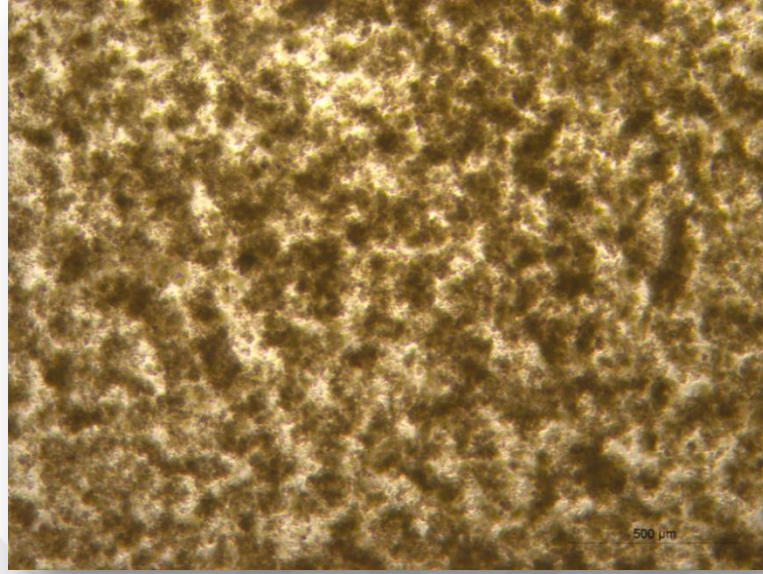
4. BULGULAR

4.1. Morfolojik Sonuçlar

Nöral kök hücreler ve nöral öncüller *in vitro* olarak yer yer nörosferik yapılarla yer yer nöral rozetlerle yer yer de immatür nöral hücre (kısa nöritli, büyük hücre gövdeli) odakları şeklinde kültürde gözlenmiştir. Nöral kök hücrelerin yada nöral öncül hücrelerin flasklardaki tutunumları genel olarak zamana bağlı olarak gözlenmiştir. Primer kültür eldesinden sonra yüzen hücrelerin kültür kabı tabanını kapladığı gözlenmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2).

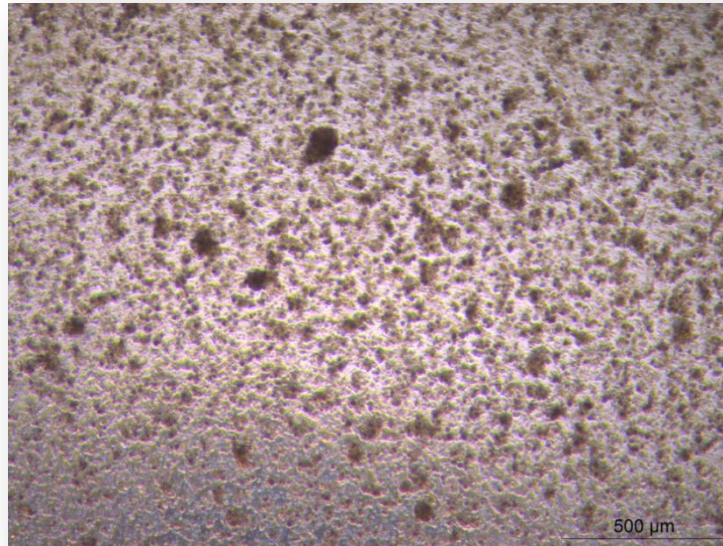


Şekil 4.1. Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında flaskta oluşturduğu görüntü (10X).

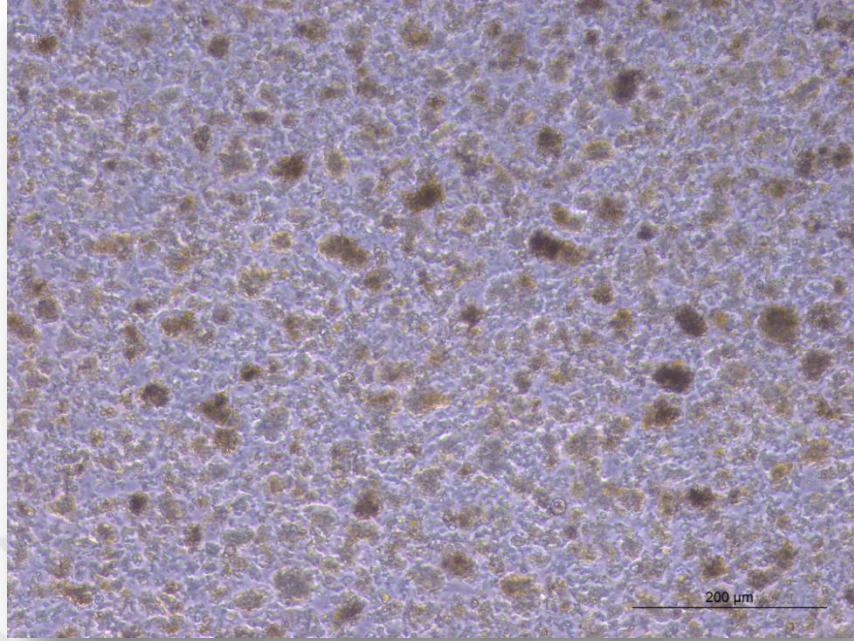


Şekil 4.2. Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında flaskta oluşturduğu görüntü (4X).

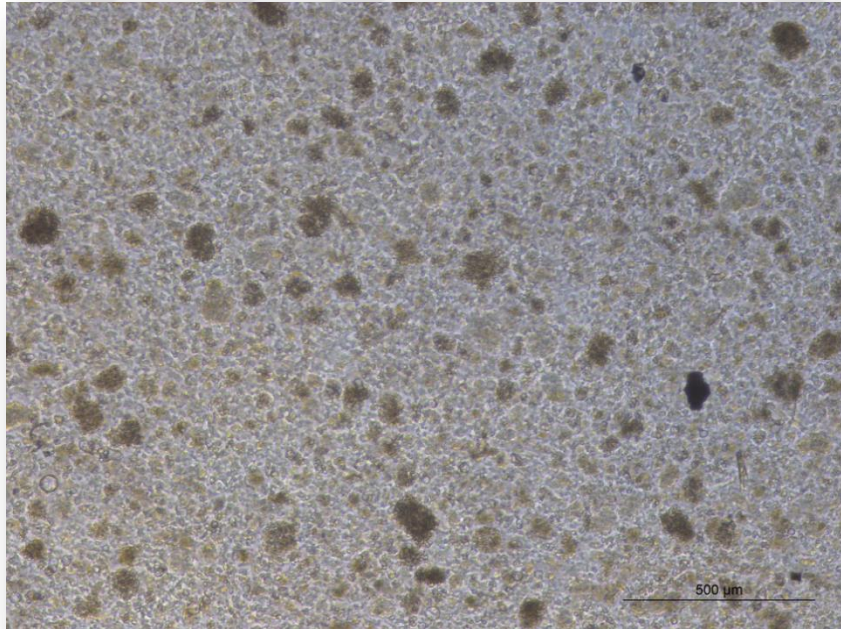
Bu hücrelerin zaman içerisinde belirli merkezler oluşturduğu, o merkezlerde yoğunlaşmaya başladığı ve genel olarak bu yoğunlaşmalardan nörosferik odakların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.3. Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında ilk 24 saat içindeki görüntüsü ve nörosferik odakların oluşmaya başlaması (4X).

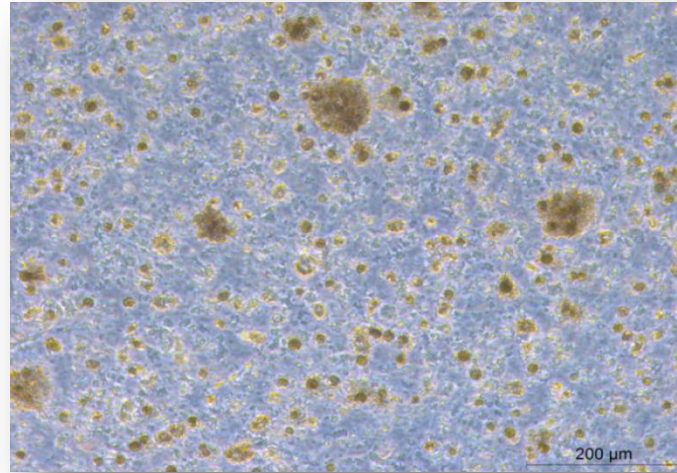


Şekil 4.4. Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında ilk 48 saat içindeki görüntüsü ve nörosferik odakların oluşmaya başlaması (10X).

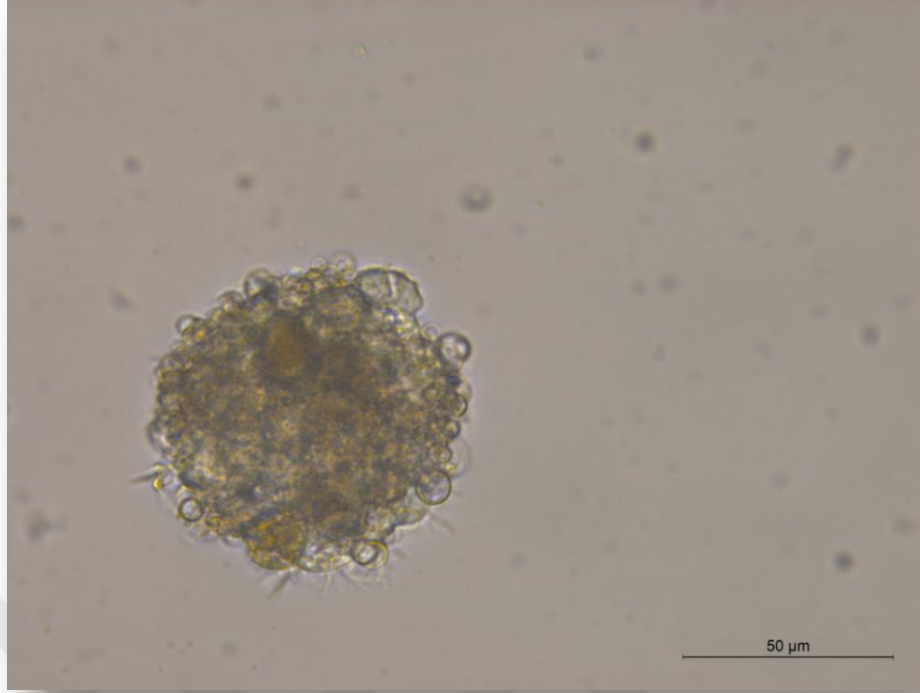


Şekil 4.5. Kontrol grubu hücrelerinin primer kültür eldesi sonrasında ilk 36 saat içindeki görüntüsü ve nörosferik odakların oluşmaya başlaması (4X).

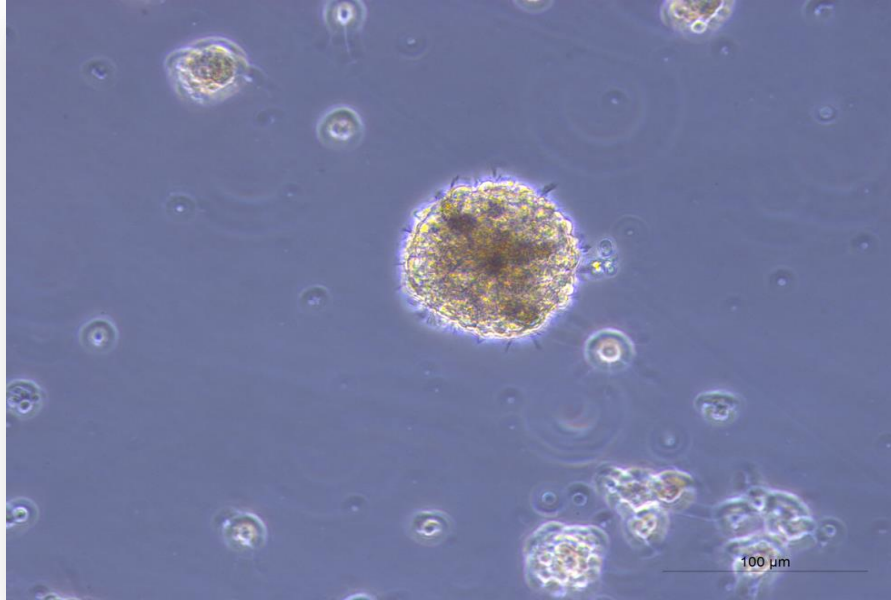
Bu süreç içerisinde hücrelerin tutunumlarının genel olarak çok zayıf olduğu ve pasif hareketlere son derece duyarlı bir şekilde yuvarlandığı gözlenmiştir. Bazı düşük çaplı nörosferlerin besi yeri içerisinde yüzdüğü görülmüştür. Primer kültürün ~5. gününde artık nörosferik odakların iyice belli olduğu ve çeşitli çaplardaki nörosferlerin ortama dağıldıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Primer kültür eldesinden itibaren 1. haftada nörosferlerin en iyi şekilde oluştuğu dönem olarak tespit edildi (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9). Yaklaşık bir hafta içinde tutunma özelliği son derece zayıf yüzen şekilde yer yer 50-200 μm büyüklüğünde nörosferik yapılar oluşmaya başladığı gözlemlendi. Üretilen nörosferlerin ışınslı uzantılara (silyalara) sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.7, Şekil 4.8). Kültür kaplarında 1. haftadan itibaren flastaki nörosferler toplanarak pasaj atılabilecek hale geldiği gözlemlendi. Bu süreçte pasaj atılmadığı takdirde hücreler ortalama 7-9 gün aralığında silyaları ile flast zeminine tutunmaya başlamıştır (Şekil 4.10). Bu süreç aslında nöral rozet oluşumunun başlangıcı olarak sayılabilir. Bu bulgu nörogenezde nöronların oluşumu olarak değerlendirildi. Çünkü nöritler (akson yada dendritik uzantı odakları) bu süreçte gözlemlenmeye başlamıştır (Şekil 4.10). Kontrol gruplarındaki hücrelerin nörosferik konturları düzgün ve nörosferik morfolojileri ideal durumdadır. Yuvarlak bir karnabahar görünümü mevcuttur (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9) kontrol grubunun genel olarak hücresel gövdeleri ve nöral rozetleri iyi durumdadır.



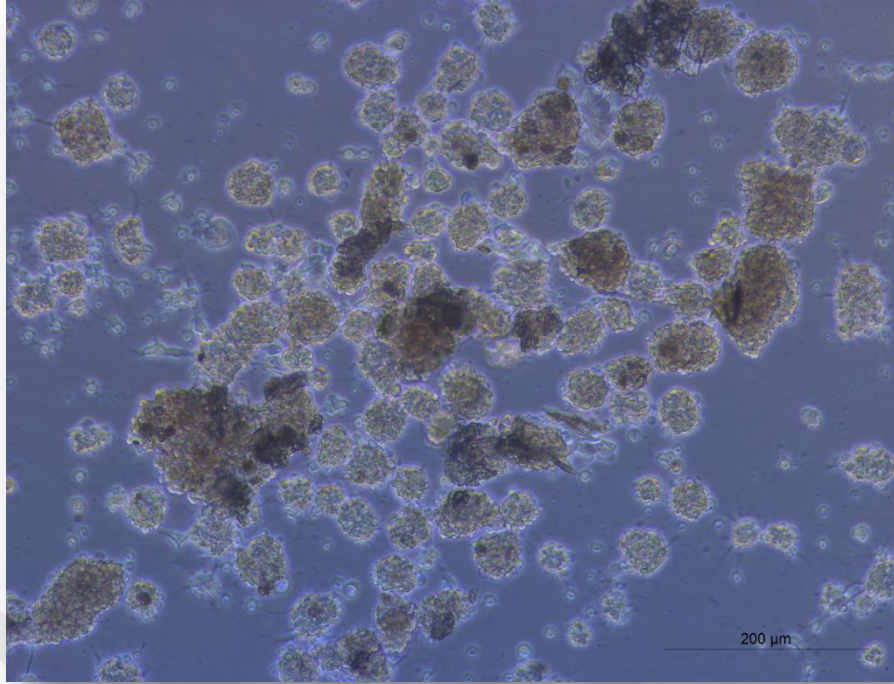
Şekil 4.6. Kontrol grubu hücrelerinin ~5. gününde oluşturduğu irili ufaklı nörosferler ve dağılımları (10X).



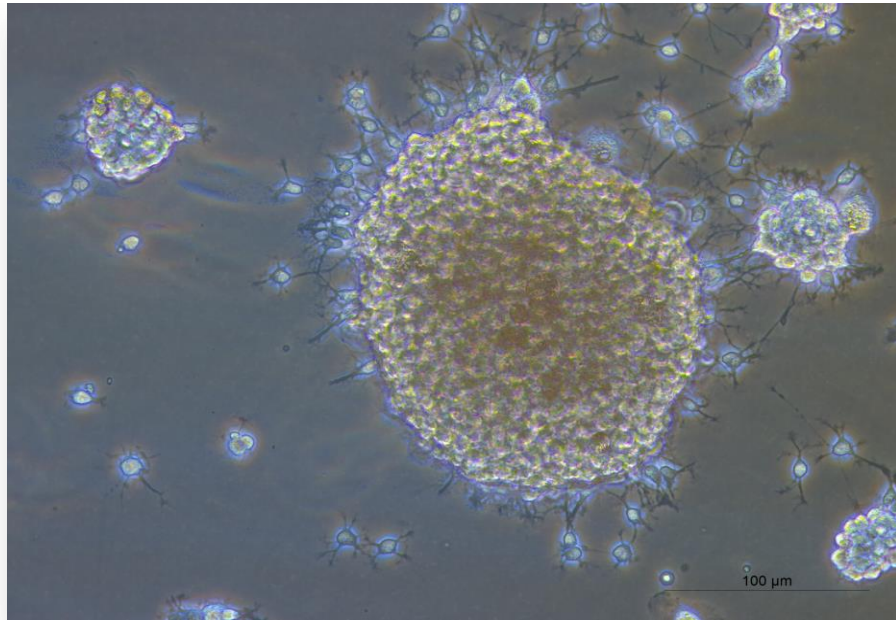
Şekil 4.7. Kontrol grubu hücrelerinin 1. haftada oluşturduğu sağlıklı bir siliyalı nörosferin yakından görünümü (karnabahar görünümü) (40X).



Şekil 4.8. Kontrol grubu hücrelerinin 1. haftada oluşturduğu sağlıklı bir siliyalı nörosferin yakından görünümü (karnabahar görünümü) (20X).

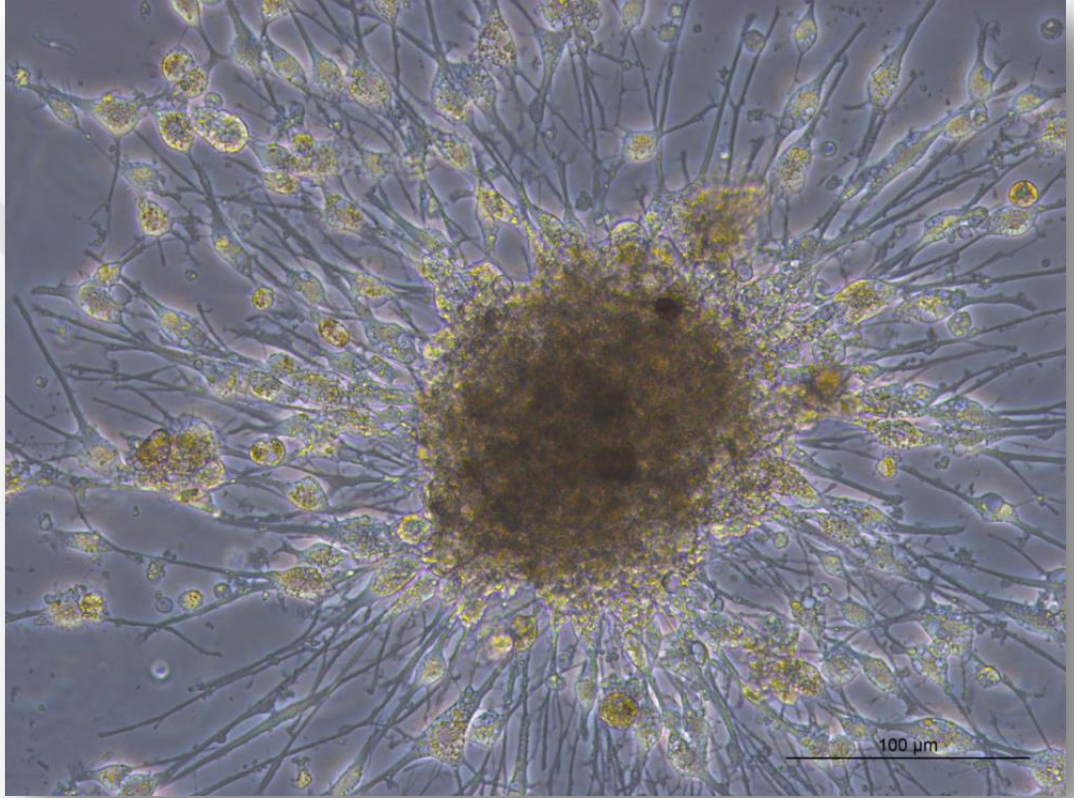


Şekil 4.9. Kontrol grubu hücrelerinin 1. haftadaki oluşturduğu irili ufaklı nörosferler ve dağılımları (10X).

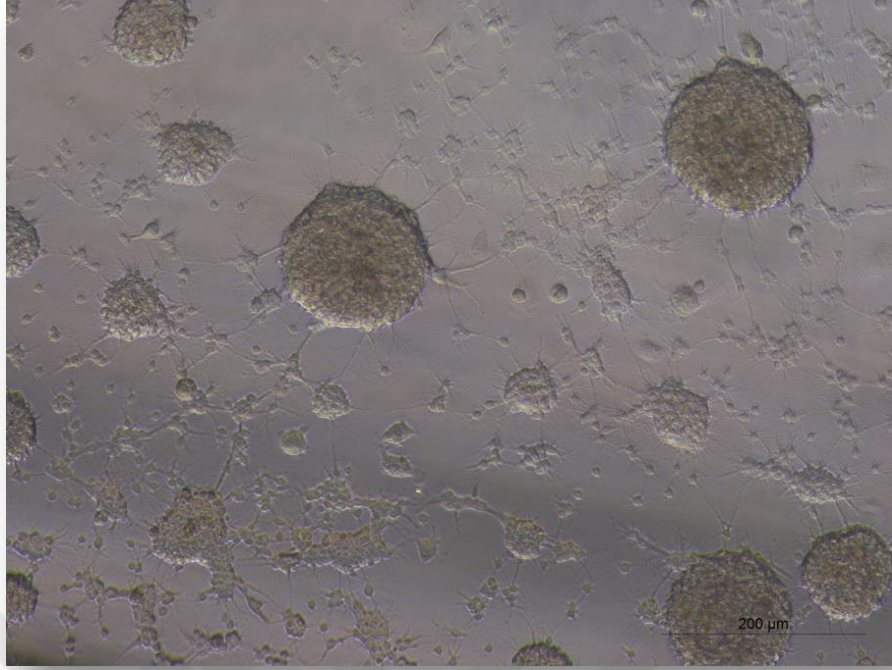


Şekil 4.10. Kontrol grubu hücrelerinden bir nöral rozetin 7-9.gün aralığında nörogenez sürecini yürütmesi (20X).

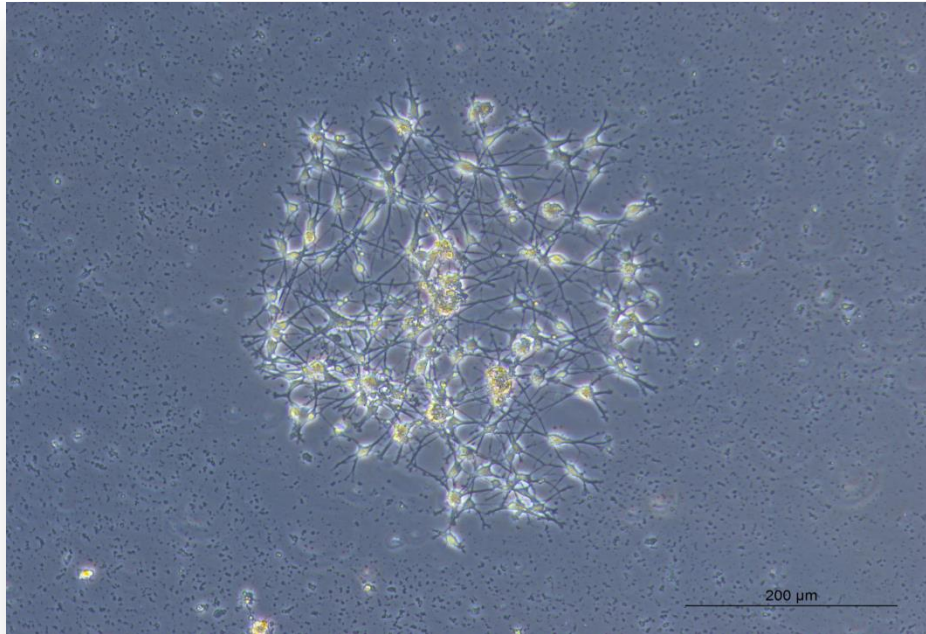
Kontrol grubu hücrelerinde kültürün 9. gününden itibaren nöral rozetler daha net bir şekilde gözlemlenmiştir. Bu süreç çerçevesinde nöral rozetlerin diğer komşu nöral rozetlerle bağlantılar kurduğu saptandı. Bu süreçte artık hücrelerin tam anlamıyla nöral morfolojilere bürünmeye başladığı gözlemlenebilmektedir. Bu süreç morfolojik olarak nöral hücrelerin varlığı için önemli bir kanıt olarak değerlendirildi (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13).



Şekil 4.11. Kontrol grubu hücrelerinden bir nöral rozetin ortalama 9.günü ve nörogenez sürecini yürütmesi (20X).

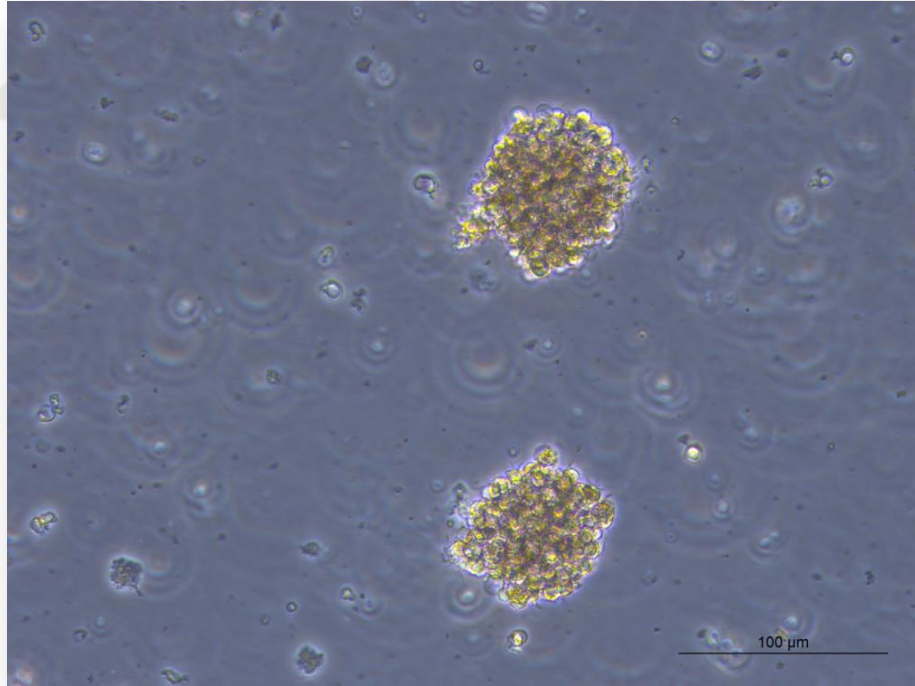


Şekil 4.12. Kontrol grubu hücrelerinden bir n6ral rozetin ortalama 9.günden itibaren artık n6rogenez s6recine başlaması ve diğer n6ral rozetler ile dendritik bağlantılar kurması (10X).

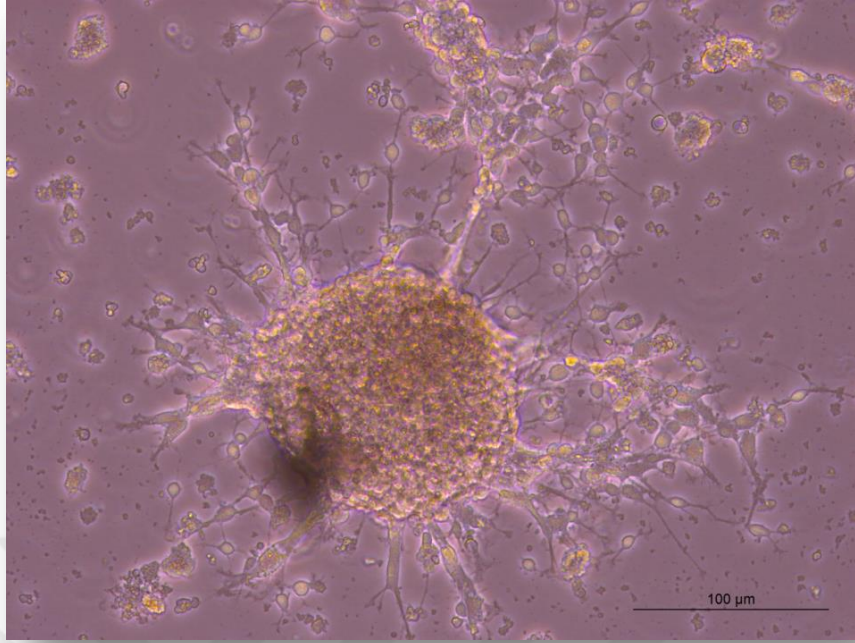


Şekil 4.13. Kontrol grubu hücrelerinin uzun s6re besi yeri değişimi yapılmadan bırakıldığında herhangi bir n6rosferin d6n6řt6ę6 sinir h6cre si odakları (10X).

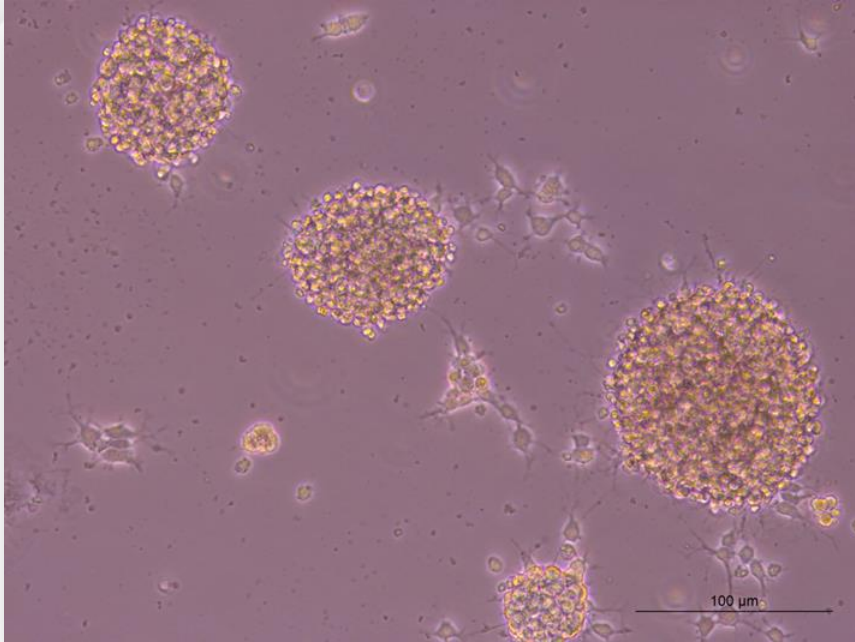
Sadece likopen verilen hücre grubunda dozdan bağımsız olarak nörosferler karnabahar görünümünü korumuştur (Şekil 4.14, Şekil 4.16). Özellikle nöral odaklar bariz daha yoğun bağlantılar içermektedir. Bu durum en net nöral rozetlerde kendini belli etmektedir. Diğer nöral odaklarda da özellikle multipolar görünüm dikkat çekmektedir (Şekil 4.15, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19). Likopen 1 μM verilen grupların nörit yapılarının kontrol grubuna göre daha büyük olduğu, likopen 2 μM verilen gruplarda özellikle multipolar nöral odakların daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19). Ancak nörosfer yapıları arasında kayda değer morfolojik bir fark bulunmadığı görülmüştür. Özellikle likopen 2 μM verilen hücrelerde nöral rozetler ile nörosferlerin aynı anda daha fazla bir arada bulunabildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Normal şartlarda nörosferler ve nöral rozetlerin aynı anda bulunurluğunun nadir olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun bütün nöral bilgiler ve bulgular gözleminde değerlendirildiğinde sinaptik plastisitenin artışı ve nöroenezin desteklenmesi yönünde olumlu bir bulgu olduğu değerlendirilmiştir.



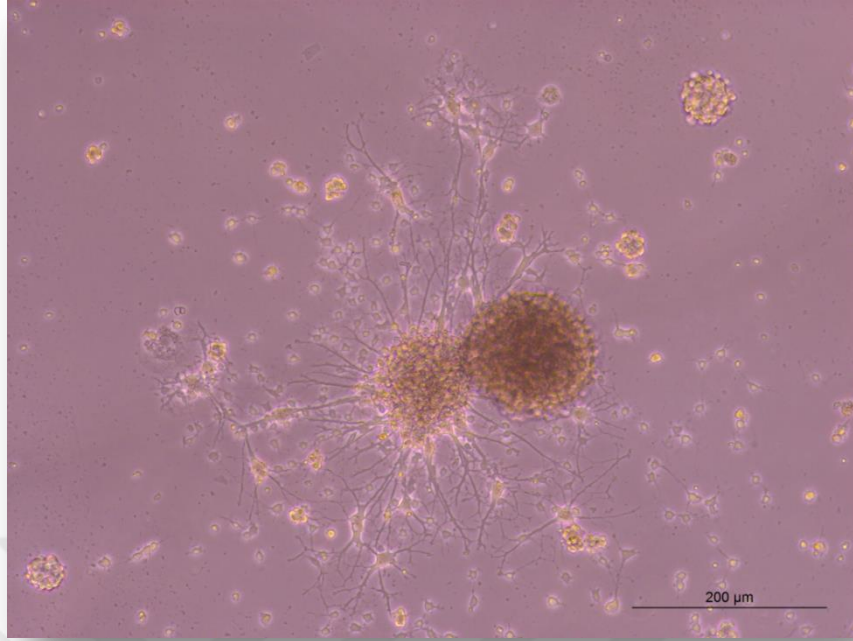
Şekil 4.14. Likopen (1 μM) grubu hücrelerinin nörosferik yapılarının görüntüsü (20X).



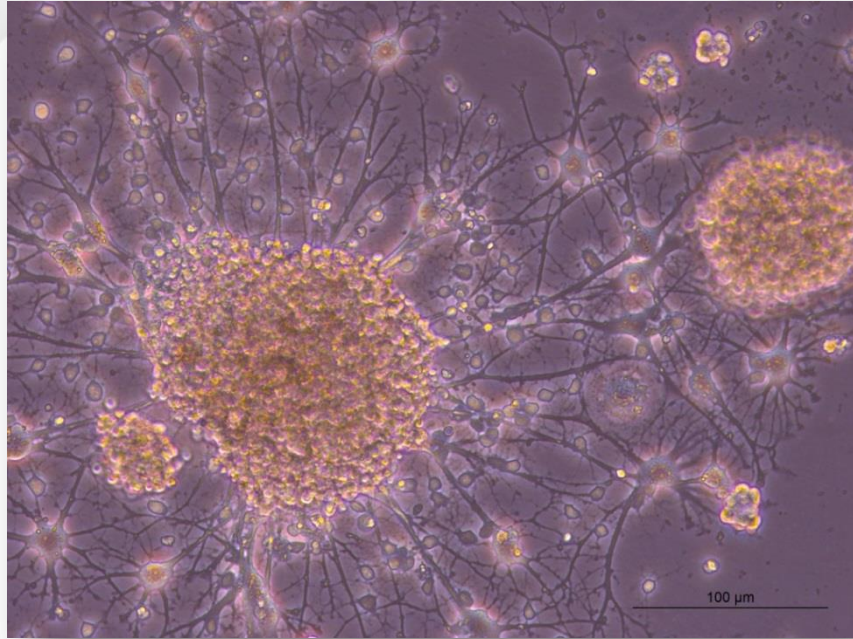
Şekil 4.15. Likopen (1 µM) grubu hücrelerinin nöral rozet yapısının görüntüsü (20X).



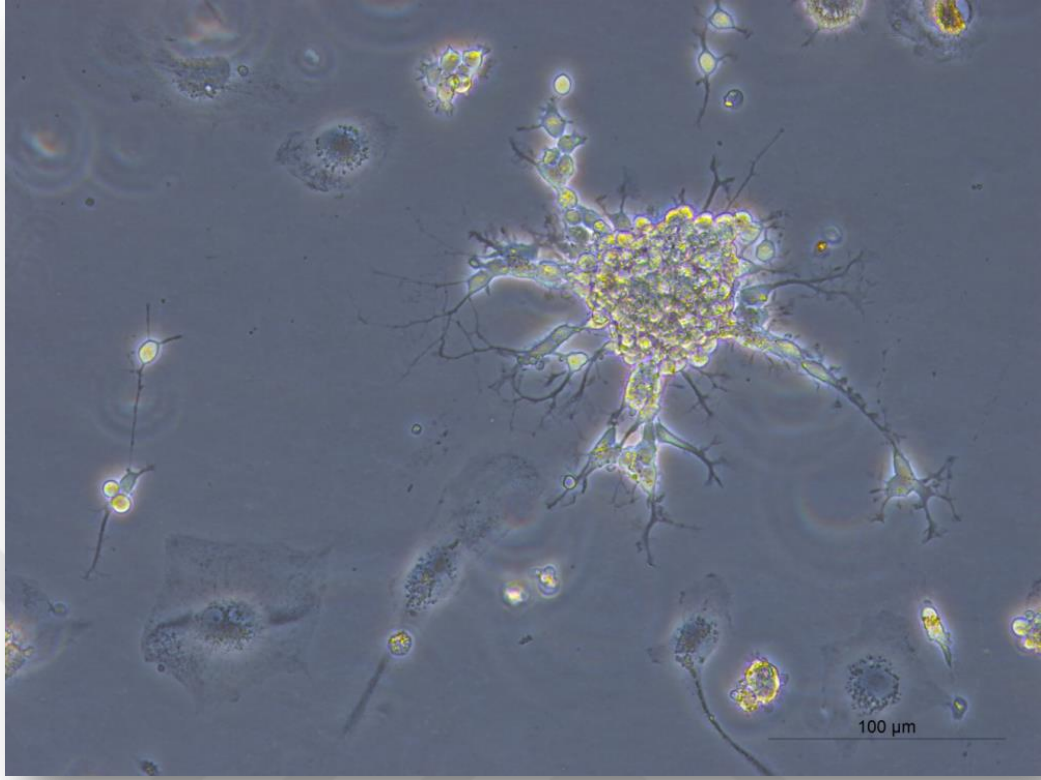
Şekil 4.16. Likopen (2 µM) grubu hücrelerinin nörosferik yapılarının görüntüsü (20X).



Şekil 4.17. Likopen ($2\ \mu\text{M}$) grubu hücrelerinin oluşturduğu nöral rozet ve nörosferin aynı anda elde edilen görüntüsü (10X).

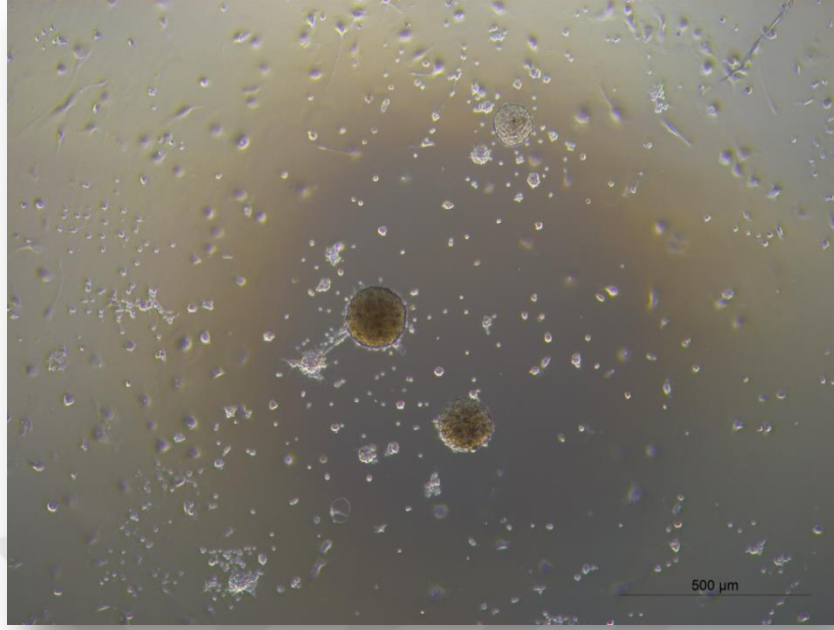


Şekil 4.18. Likopen ($2\ \mu\text{M}$) grubu hücrelerinin oluşturduğu nöral rozet ve nörosferin aynı anda elde edilen görüntüsü (20X).

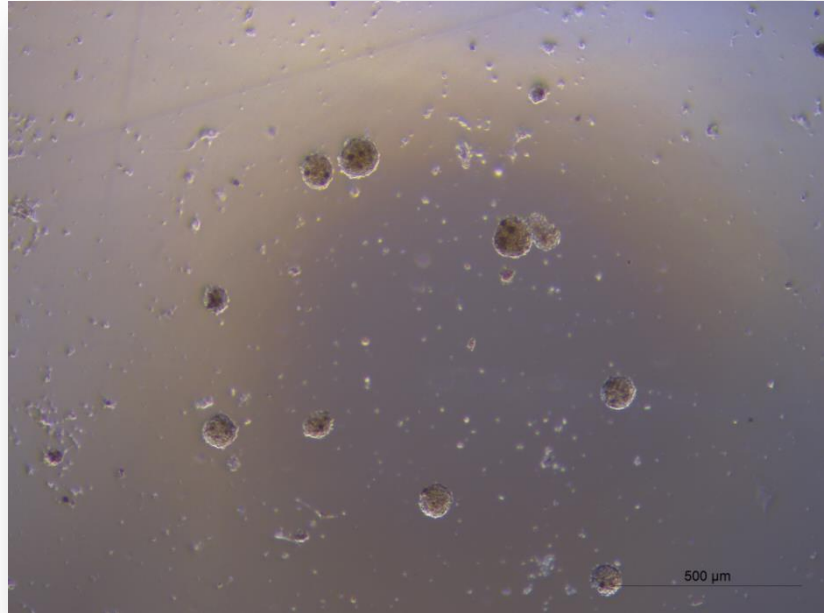


Şekil 4.19. Likopen ($2 \mu\text{M}$) grubu hücrelerinin oluşturduğu nöral rozet görüntüsü (20X).

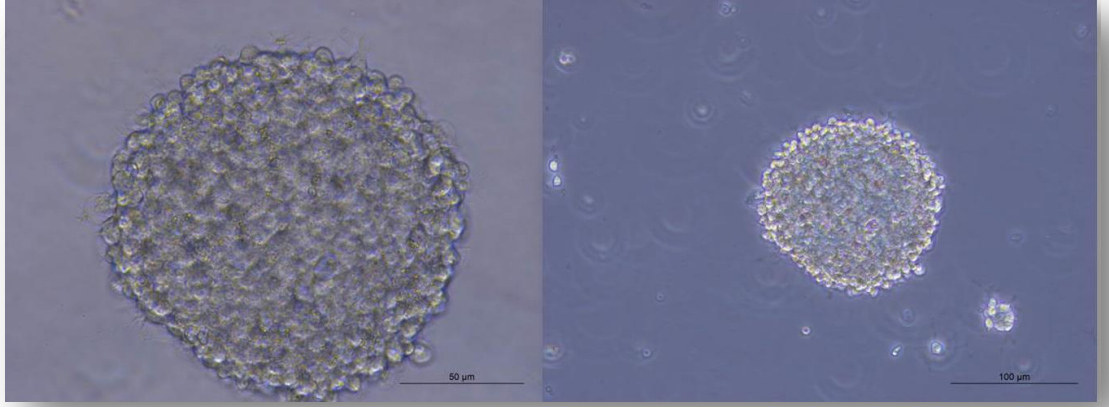
PPA uygulamasından sonra nörosferik konturlar karnabahar görünümünden ziyade daha şişkin ve pürüzsüz adeta bir balon gibi gözlenmiştir. Nörosferik silyaların yer yer varlığının ve belirginliğinin kaybolduğu (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23) ve nöral rozet oluşumunun fark edilir derecede azaldığı gözlemlenmiştir. PPA verilme sürecine kadar oluşan nöral odaklardaki nöritlerin kaybolduğu, sadece hücre gövdelerinin künt bir şekilde kaldığı ve normalde sosyal bağlantılar kuran nöral odakların bu bağlantıları kurmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26). PPA verilen gruplarda hücre-hücre bağlantıları yok denecek durumda olduğu ve sinir gövdelerinin künt halde kaldığı gözlemlenmiştir. Nörosferlerde karnabahar görünümünün kaybolmaya başlayarak nörosferik şekillerin daha pürüzsüz konturlara sahip bir forma büründüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23).



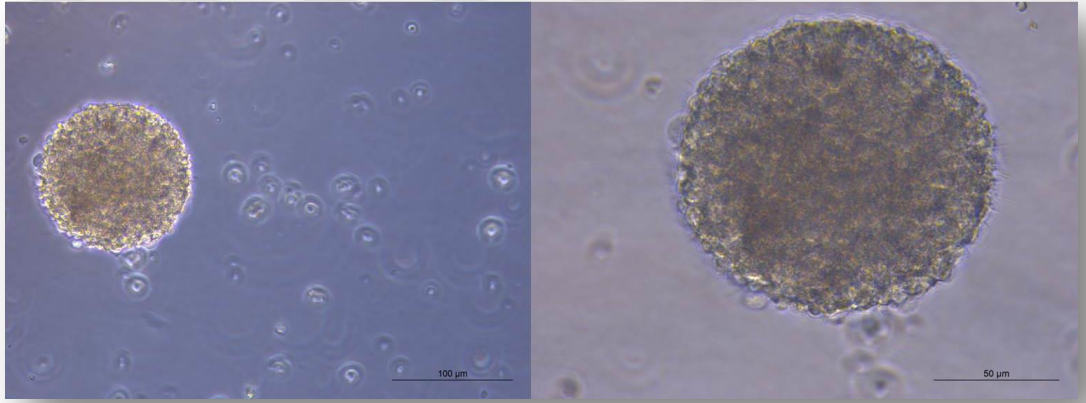
Şekil 4.20. PPA verilen grubun hem nörosfer hemde nöral hücre odakları ile birlikte görülen görüntüsü (4X).



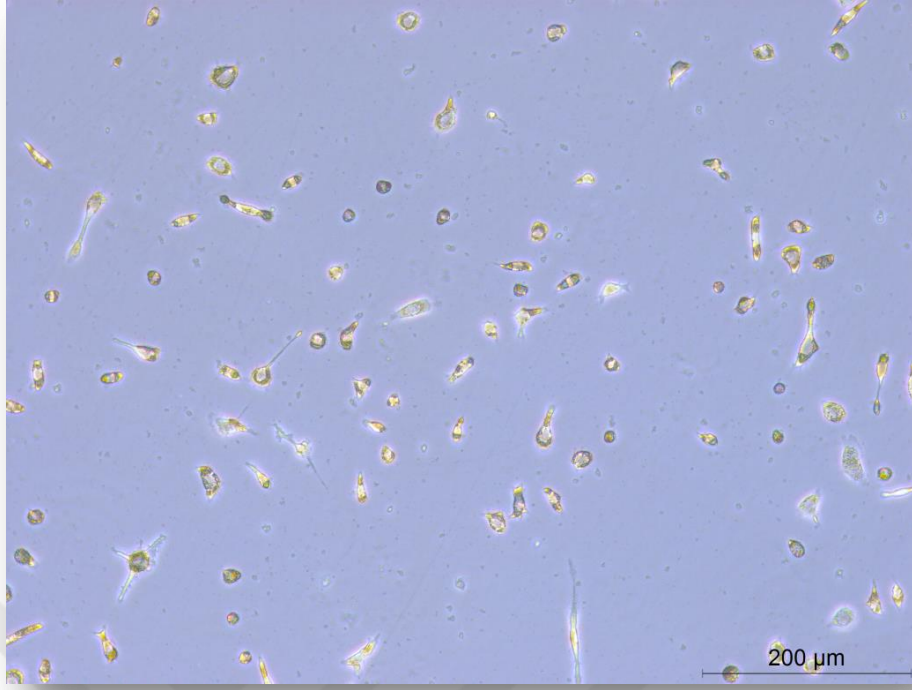
Şekil 4.21. PPA verilen grubun hem nörosfer hemde nöral hücre odakları ile birlikte görülen görüntüsü (4X).



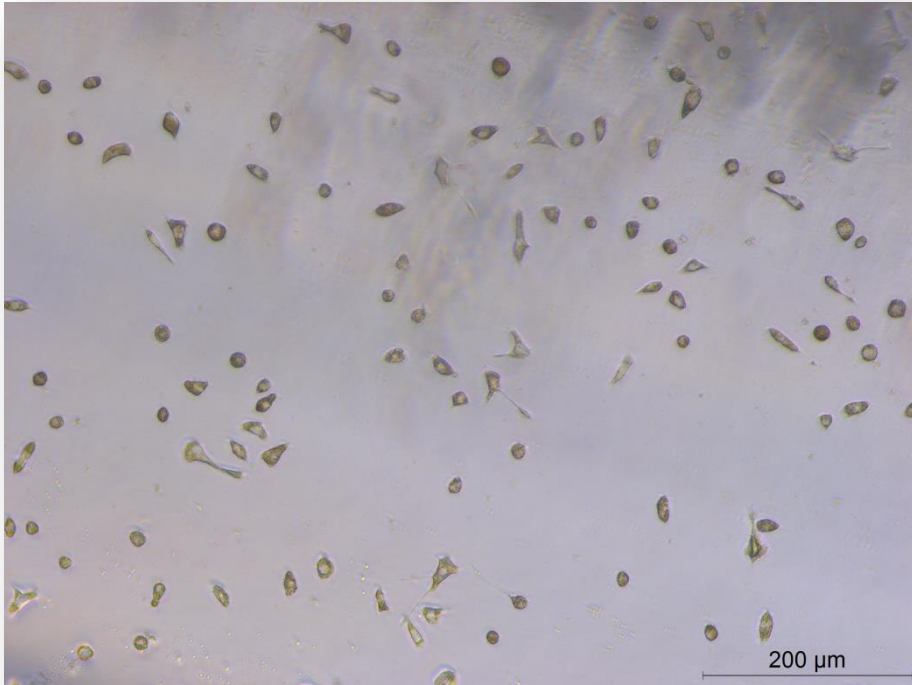
Şekil 4.22. PPA verilen gruptaki nörosferlerin görüntüsü (sağda 40X, solda 20X).



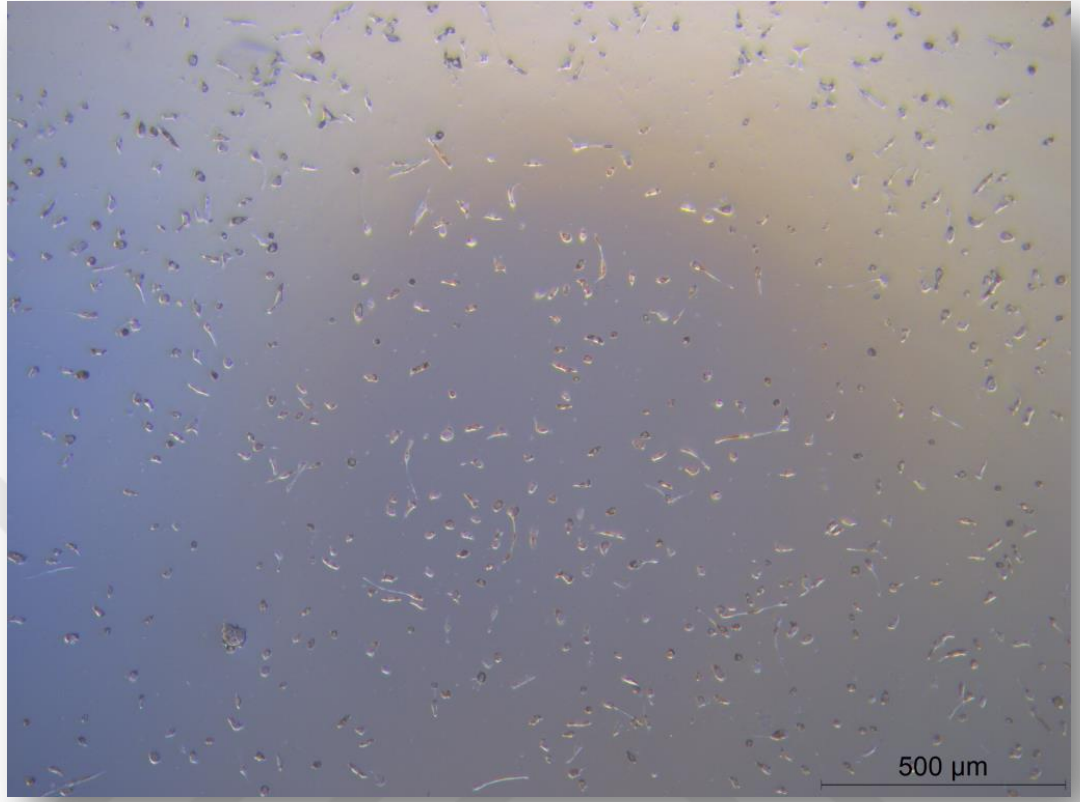
Şekil 4.23. PPA verilen gruptaki nörosferlerin görüntüsü (solda 40X, sağda 20X).



Şekil 4.24. PPA verilen gruptaki nöral odakların görüntüsü (10X).

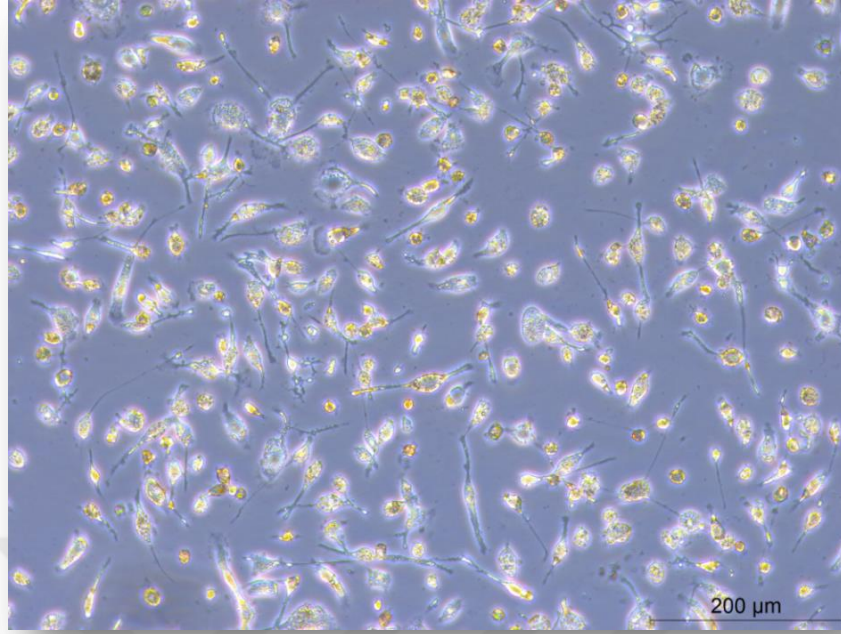


Şekil 4.25. PPA verilen gruptaki nöral odakların görüntüsü (10X).

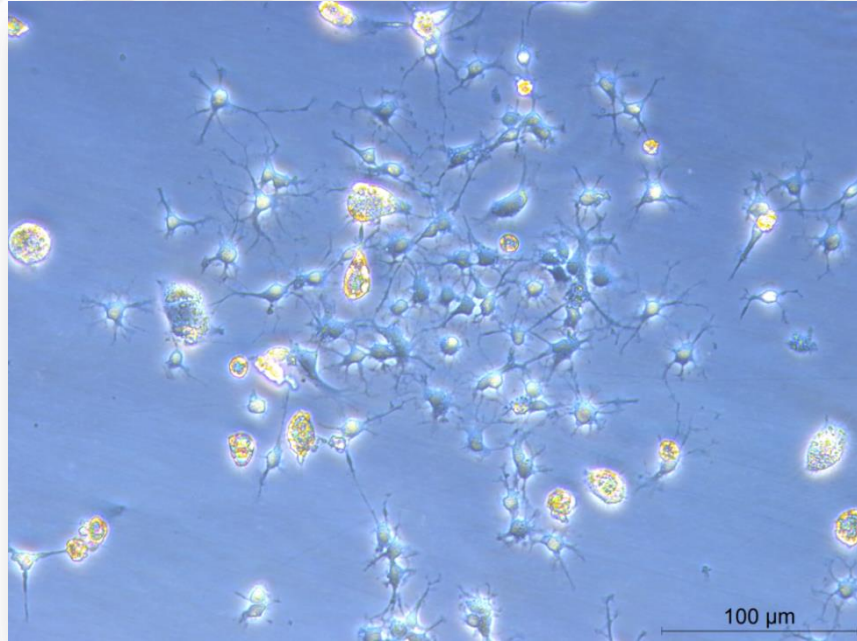


Şekil 4.26. PPA verilen gruptaki nöral odakların görüntüsü (4X).

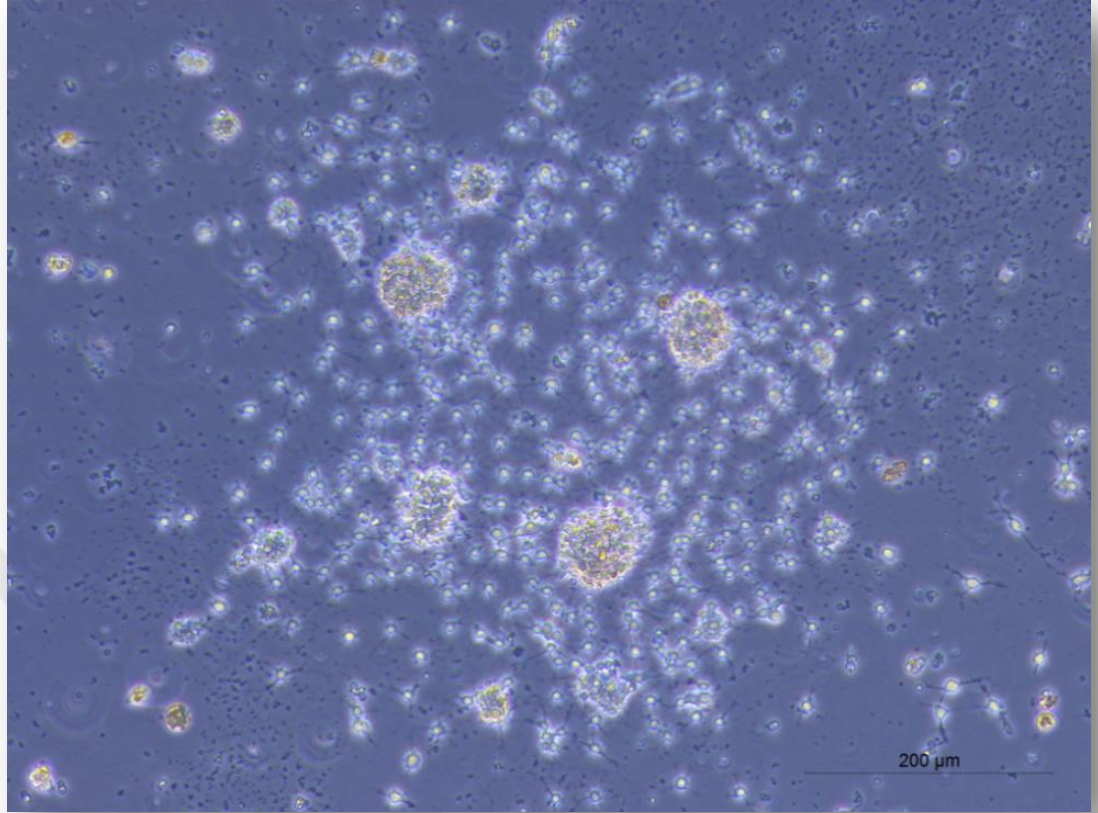
PPA verilmesini takiben likopen verilen gruptaki nörosferlerin dozdan bağımsız olarak yeniden karnabahar görünümüne kavuştukları gözlemlenmiştir. Ayrıca düzelmiş uzun sinaptik yapıları sinir odakları oluşturdukları gözlemlenmiştir. PPA'dan dolayı künt hale gelmiş olan sinir odaklarının tekrar nörit yapılarını oluşturmaya başladığı, özellikle 1 μM likopen verilenlerde bipolar şekilde, 2 μM likopen verilenlerde de multipolar şekilde yeniden sinirsel morfolojilere dönüşüm başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29).



Şekil 4.27. PPA uygulamasının ardından likopen ($1 \mu\text{M}$) uygulanan gruptaki bipolar nöral odakların görüntüsü (10X).



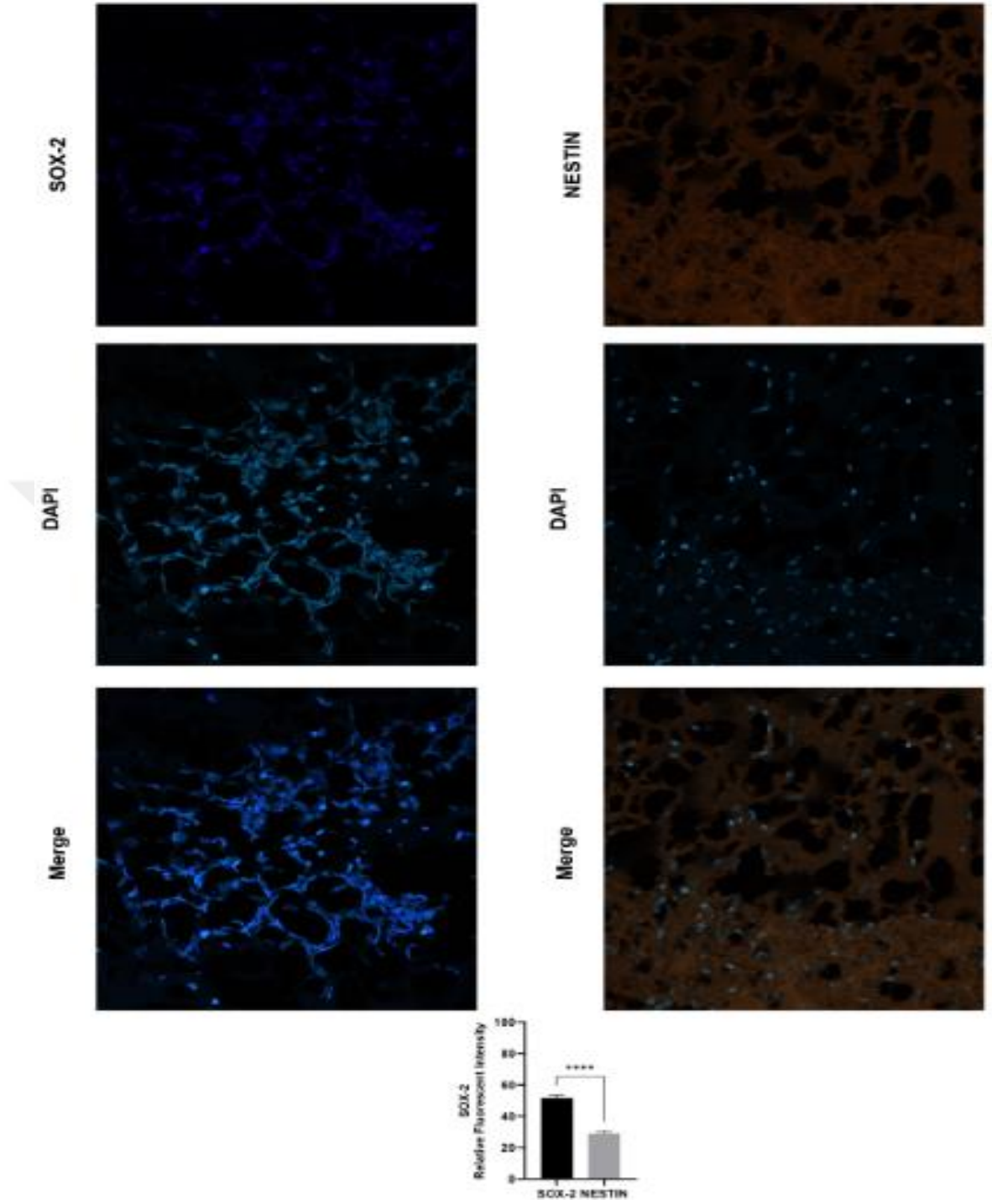
Şekil 4.28. PPA uygulamasının ardından likopen ($2 \mu\text{M}$) uygulanan gruptaki nöral odakların görüntüsü ve multipolar nöritlerin görüntüsü (20X).



Şekil 4.29. PPA uygulamasının ardından likopen ($2 \mu\text{M}$) uygulanan gruptaki nörosferlerin ve multipolar nöritlerin aynı anda birlikte görüntüsü (10X).

4.2. Konfokal Mikroskopi Sonuçları

Nöral kök hücreler ve nöral öncül hücrelerin kimliklendirilmesi için nestin ve sox2 kullanıldı. Elde edilen hipokampus dokusundan yapılan hücresel kimlikleme işlemi sonucunda konfokal intensitesi ölçüm olarak kabul edildi. Nestin % ~ 30 intensite verirken sox2 % ~ 50 intensite verdi ($p < 0,05$) (Şekil 4.30). Bu bulgulara göre hipokampus dokularında nöral kök hücreler ve nöral progenitör hücreler yüksek bir oranla tespit edildi.



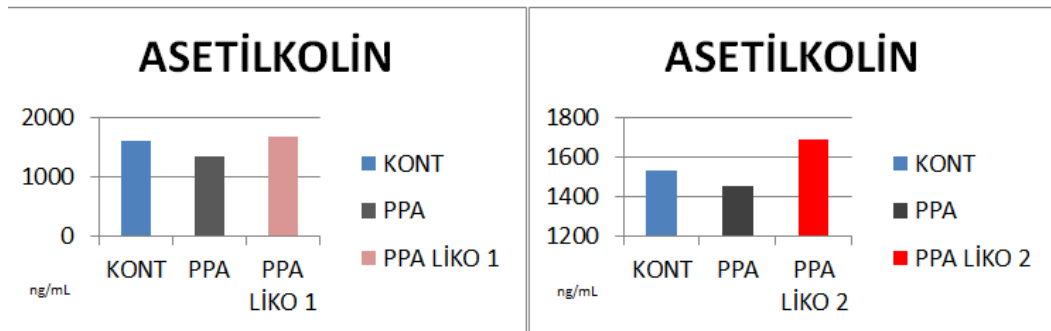
Şekil 4.30. Konfokal mikroskopi ile nestin ve sox2 belirteçlerinin gösterilmesi ve istatistiki sonuçları.

4.3. ELİZA Sonuçları

Tablo 4.1. ELISA istatistik sonuçları (*Tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD, $p<0,05$)

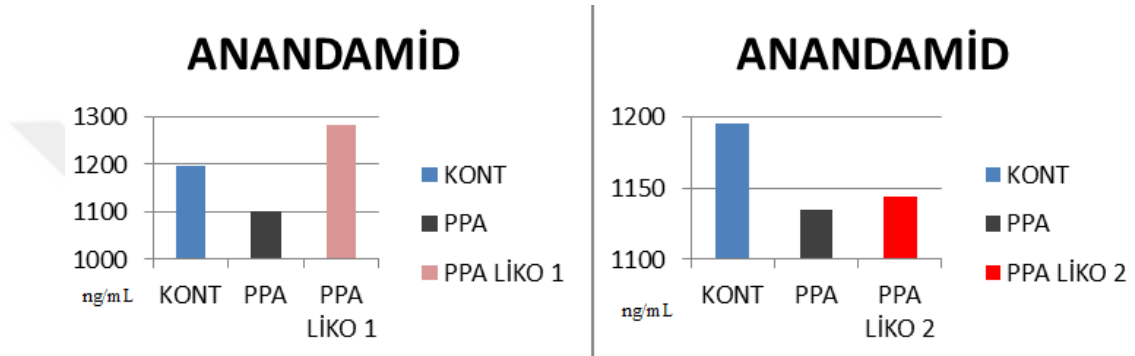
ELISA	Kontrol		PPA		Liko 1		Liko 2		F	p
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS		
Anandamid	1191,25 ^a	9,32	1118,75 ^a	8,32	1284,5 ^a	03,50	1143,00 ^a	01,00	207,71	<0,001
Stauferin	1243,50 ^a	9,01	1364,75 ^a	8,32	1264,50 ^a	03,50	1139,00 ^a	04,00	11,57	<0,001
Bdnf	1502,00 ^a	2,05	1434,75 ^a	2,22	1495,00 ^a	19,00	1438,50 ^a	09,50	24,65	<0,001
IL-6	938,50 ^a	0,45	1605,75 ^a	2,20	1710,50 ^a	01,50	1488,00 ^a	01,00	559,18	<0,001
GABA	629,50 ^a	0,45	999,00 ^a	4,99	1111,00 ^a	06,01	960,00 ^a	02,00	292,36	<0,001
Glutamat	1323,00 ^a	16,26	1455,25 ^a	0,34	1413,50 ^a	05,50	1425,00 ^a	03,00	31,23	<0,001
FGF-2	1316,00 ^a	10,89	1061,75 ^a	4,77	997,50 ^a	06,50	1212,00 ^a	04,00	89,91	<0,001
Asetilkolin	1564,25	1,96	1385,50	4,01	1673,00	04,00	1669,50	04,00	38,91	<0,001
Ngf	1545,50 ^a	2,50	1374,50 ^a	1,50	1359,50 ^a	03,50	-	-	562,77	<0,001
IL-10	1095,00 ^a	16,00	1159,00 ^a	2,00	843,00 ^a	04,00	-	-	485,43	<0,001

Bu çalışmada kontrol grubuna göre PPA verilen grupta asetilkolin seviyesinin düştüğü saptanmıştır ($p<0,05$). 1 μ M likopen verilen grupta ise kontrol grubuna göre daha yüksek bir asetilkolin seviyesi göze çarpmaktadır. 2 μ M likopen verilen grupta ise kontrol grubunun çok çok üzerinde yüksek bir asetilkolin seviyesi gözlemlenmiştir (Şekil 4.31) ($p<0,05$). Çalışma bulguları asetilkolinin otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır.



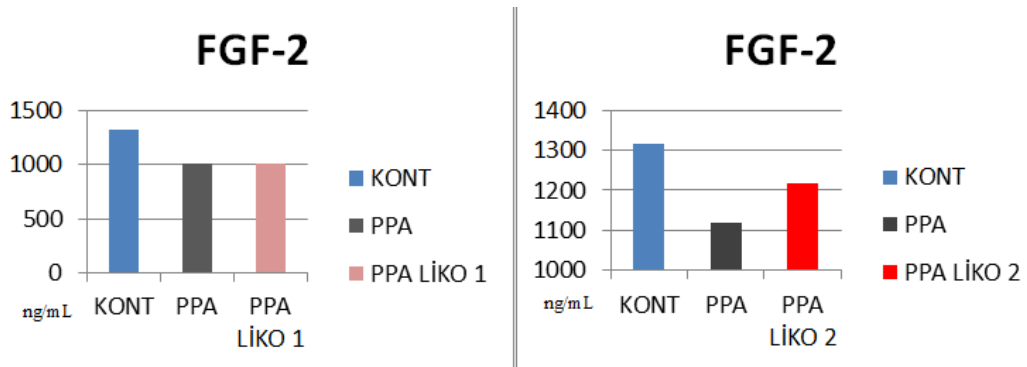
Şekil 4.31. Asetilkolin sonuçları

Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta anandamid düşüşü anlamlı olarak gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 1 μM likopen verilen grupta anandamid seviyesi kontrol grubundaki seviyenin dahi üzerine çıkmıştır. 2 μM likopen verilen grupta ise artış kontrol grubundaki seviyenin altında kalmış olmasına karşın PPA'ya göre kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.32) ($p<0,05$). Çalışma bulguları anandamidin otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır. 1 μM likopen ile muamele edilen grubun anandamid yönünden en anlamlı doza sahip olduğu gözlemlenmiştir.



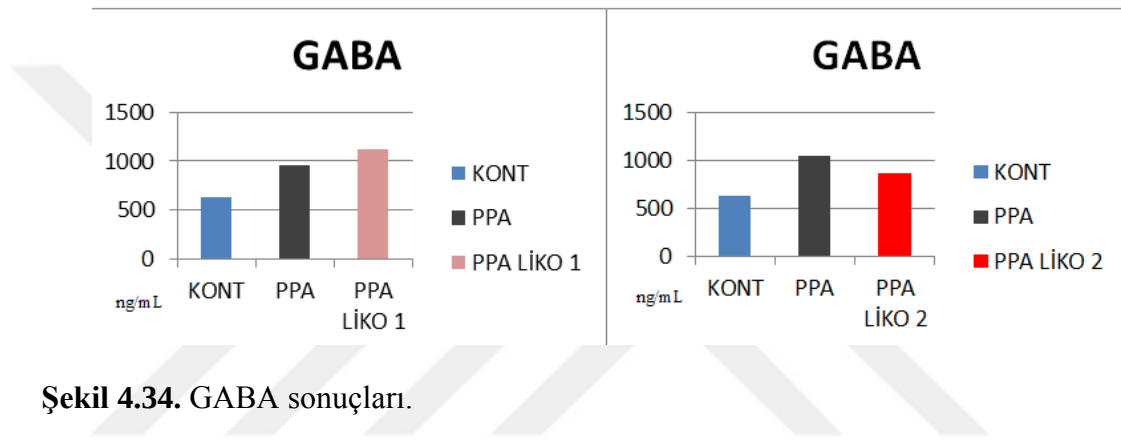
Şekil 4.32. Anandamid sonuçları.

Bu çalışmada kontrol grubuna göre PPA verilen grupta FGF-2 düşüşü anlamlı bir şekilde belirlenmiştir ($p<0,05$). 1 μM likopen verilen grupta FGF-2 seviyesinin artışı için kullanılan dozun tam olarak yeterli gelmediği ancak 2 μM likopen verilen grupta ise anlamlı bir artış olduğu ancak yine de kontrol grubu seviyesine ulaşamadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.33) ($p<0,05$). Çalışma bulguları FGF-2'nin otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır. 2 μM likopen ile muamele edilen grubun FGF-2 yönünden en anlamlı doza sahip olduğu saptanmıştır.



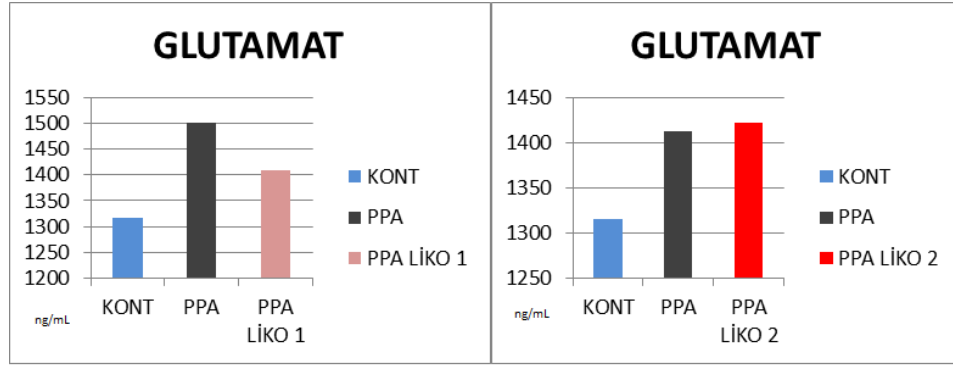
Şekil 4.33. FGF-2 sonuçları.

Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta GABA seviyesinin anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$). 1 μM likopen verildiğinde de PPA'ya bağlı GABA yükselişinin sürdüğü ve likopen dozunun GABA artışını düşürmekte yeterli olmadığı hatta yükselişini dahi durdurmaya yetmediği gözlemlenmiştir. Ancak 2 μM likopen verildiğinde kontrol grubu seviyesine düşmesede ona yakın bir şekilde GABA seviyesinin likopen etkisi ile düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.34) ($p<0,05$). Çalışma bulguları GABA'nın otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır. 2 μM likopen ile muamele edilen grubun GABA yönünden en anlamlı doza sahip olduğu gözlemlenmiştir.



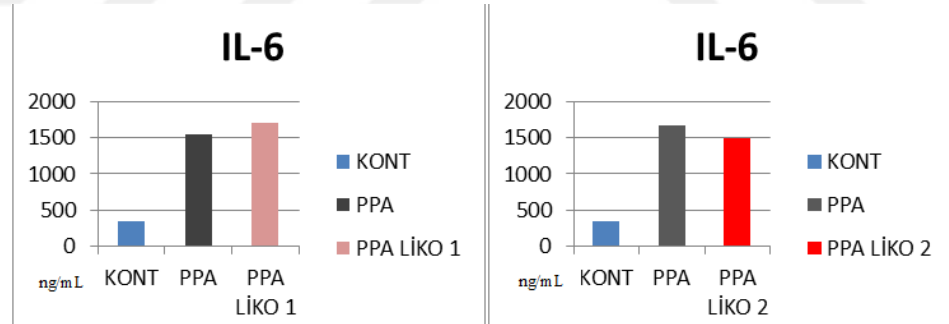
Şekil 4.34. GABA sonuçları.

Bu çalışmada kontrol grubuna göre PPA verilen grupta glutamat seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). 1 μM likopen verildiğinde de PPA'ya bağlı glutamat yükselişinin anlamlı bir şekilde düştüğü ancak kontrol grubu seviyesine inemediği gözlemlenmiştir. Ancak 2 μM likopen verildiğinde glutamat seviyesinin tekrar yükselişe geçtiği belirlenmiştir (Şekil 4.35) ($p<0,05$). Çalışma bulguları glutamatın ve GABA'nın otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır. 1 μM likopen ile muamele edilen grubun glutamat yönünden en anlamlı doza sahip olduğu gözlemlenmiştir.



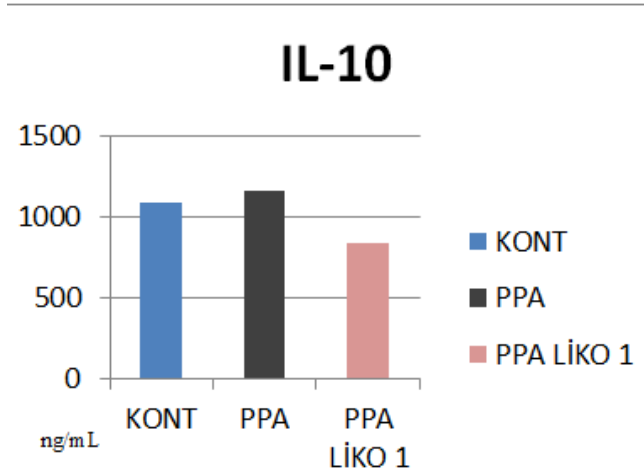
Şekil 4.35. Glutamat sonuçları.

Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta IL-6 seviyesinin anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$). 1 μM likopen verildiğinde de PPA'ya bağlı IL-6 yükselişinin sürdüğü ve likopen dozunun IL-6 artışını düşürmekte yeterli olmadığı hatta yükselişini dahi durdurmaya yetmediği gözlemlenmiştir. Ancak 2 μM likopen verildiğinde kontrol grubu seviyesine düşmesede IL-6'nın anlamlı bir seviyede likopen etkisi ile düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.36) ($p<0,05$). Çalışma bulguları IL-6'nın otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır. 2 μM likopen ile muamele edilen grubun IL-6 yönünden en anlamlı doza sahip olduğu gözlemlenmiştir.



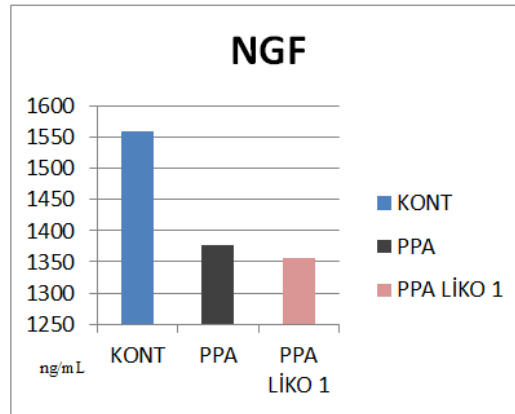
Şekil 4.36. IL-6 sonuçları.

Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta IL-10 seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). 1 μM likopen verildiğinde de PPA'ya bağlı IL-10 yükselişinin anlamlı bir şekilde düştüğü hatta kontrol grubu seviyesinin altına indiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.37) ($p<0,05$). Çalışma bulguları IL-10'un otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır. 1 μM likopen ile muamele edilen grubun IL-10 yönünden anlamlı doza sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.37. IL-10 sonuçları.

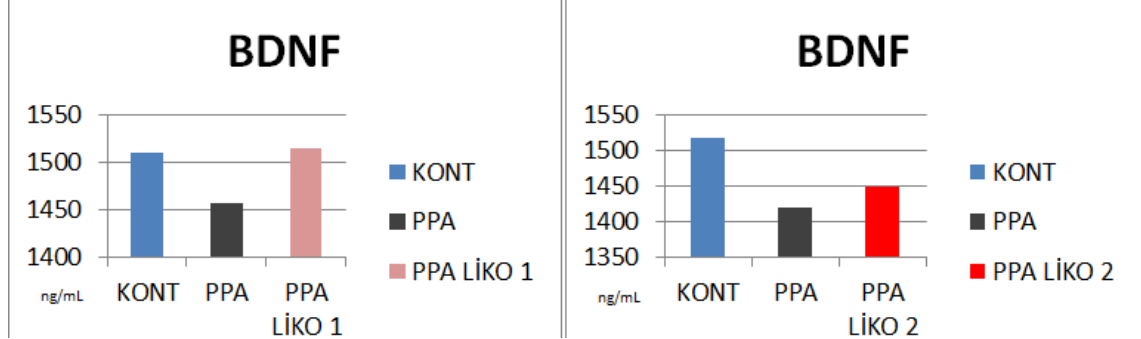
Bu çalışmada kontrol grubuna göre PPA verilen grupta NGF seviyesinin anlamlı bir şekilde düştüğü saptanmıştır ($p<0,05$). Ancak 1 μ M likopen verildiğinde seviyesinde düşüşün anlamlı bir şekilde devam ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.38) ($p<0,05$). Çalışma bulguları sadece PPA'nın otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır. Ancak 1 μ M likopen ile muamele edilen grubun NGF yönünden anlamlı olmadığı bulunmuştur. Ayrıca PPA'nın oluşturduğu düşüş hızını azalttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.38. NGF sonuçları.

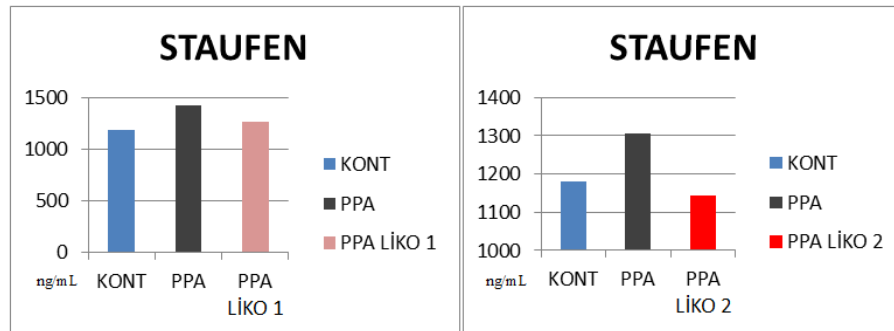
Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta BDNF düşüşü anlamlı bir şekilde saptanmıştır ($p<0,05$). 1 μ M likopen verilen grupta BDNF seviyesi anlamlı bir şekilde kontrol grubundaki seviyenin dahi üzerine çıkmıştır ($p<0,05$). 2 μ M likopen grupta ise artış kontrol grubundaki seviyenin altında kalmış olmasına karşın PPA'ya göre kıyaslandığında anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.39) ($p<0,05$).

Çalışma bulguları BDNF'nin otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır. 1 μ M likopen ile muamele edilen grubun BDNF yönünden en anlamlı doza sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.39. BDNF sonuçları.

Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta staufen2 seviyesinin anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). 1 μ M likopen verildiğinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir. 2 μ M likopen verildiğinde staufen2 seviyesi kontrol grubu seviyesinde altına anlamlı bir şekilde düşmüştür (Şekil 4.40) ($p < 0,05$). Çalışma bulguları staufen2'nin otizmdeki hafıza, öğrenme gibi rolleri rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde hem PPA hemde likopen dozları (1 μ M, 2 μ M) yönünden anlamsızdır. Ancak bulgular staufen2'nin nöral morfolojilerdeki görevleri ve proliferasyon artışları değerlendirildiğinde; PPA uygulanması sonrasında morfolojik olarak gözlemlenen nörosferik çap büyümesi ve proliferasyon artışı yönünden anlamlı olarak değerlendirilmiştir ($p < 0,05$).

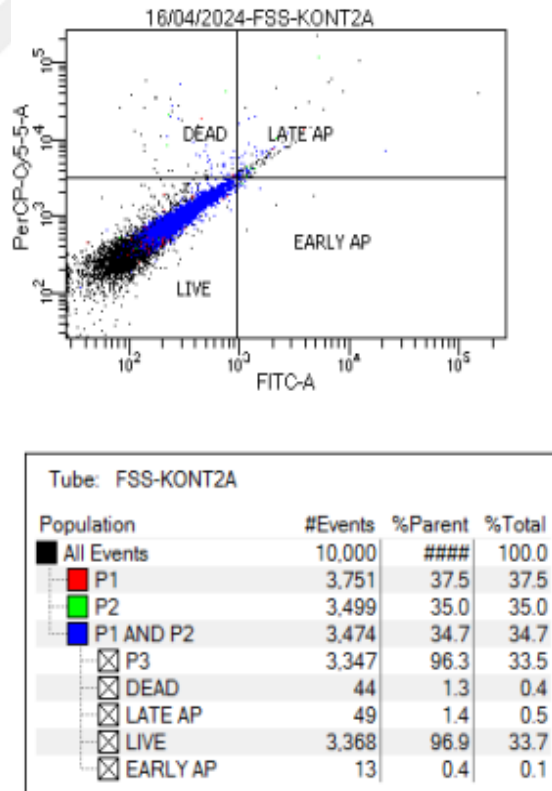


Şekil 4.40. Staufen-2 sonuçları.

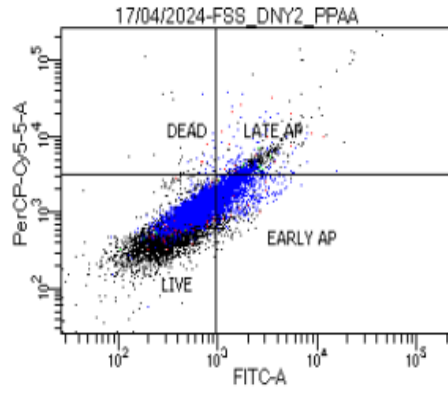
4.4. Flow (Akım) Sitometrik Analiz Sonuçları

PPA asidemisi oluşturulan grupta apoptoz oranı 20 kat artış göstermiştir (Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.47). PPA+likopen verilen gruplarda apoptoz oranı 6-7 kat azalmış (doza bağlı olarak) olup hücresel canlılık %40 üzerinde artış (doza bağlı olarak) göstermiştir (Şekil 4.43, Şekil 4.44, Şekil 4.47). Kontrol grubuna göre PPA verilen grupta ölüm oranı ~3 kat azalmış olup (Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.47), PPA grubuna göre de likopen verilen gruplarda % 25-50 aralığında hücresel ölüm (nekroz) artışı (doza bağlı olarak) gerçekleşmiştir (Şekil 4.42, Şekil 4.43, Şekil 4.44, Şekil 4.47).

Sadece likopen verilen gruplarda kontrol grubuna göre apoptoz oranı (doza bağlı olarak) yüzde 10-12 seviyelerinde kalmıştır. Buda PPA'ya göre yaklaşık 200/1 orana denk gelmektedir. Ayrıca sadece likopen verilen gruplarda (doza bağlı olarak) ölüm oranı kontrol grubuna göre ~ 3'te 1 oranında azalış göstermiştir. Sadece likopen verilen gruplarda hücresel canlılıkta kayda değer bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.45, Şekil 4.46).



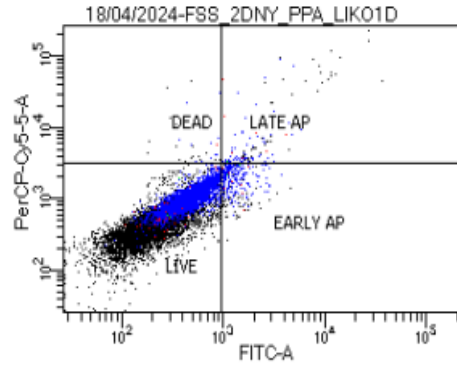
Şekil 4.41. Kontrol grubu apoptoz sonuçları.



Tube: FSS_DNY2_PPAA

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	5,127	51.3	51.3
P2	4,790	47.9	47.9
P1 AND P2	4,741	47.4	47.4
P3	4,724	99.6	47.2
DEAD	17	0.4	0.2
LATE AP	217	4.6	2.2
LIVE	3,018	63.7	30.2
EARLY AP	1,489	31.4	14.9

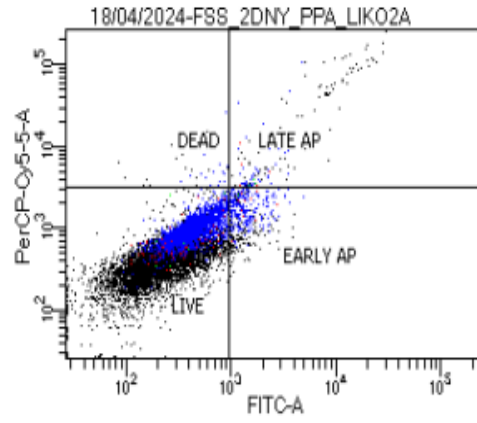
Şekil 4.42. PPA grubu apoptoz sonuçları.



Tube: FSS_2DNY_PPA_LIK01D

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	2,931	29.3	29.3
P2	2,681	26.8	26.8
P1 AND P2	2,665	26.7	26.7
P3	2,645	99.2	26.5
DEAD	13	0.5	0.1
LATE AP	75	2.8	0.8
LIVE	2,354	88.3	23.5
EARLY AP	223	8.4	2.2

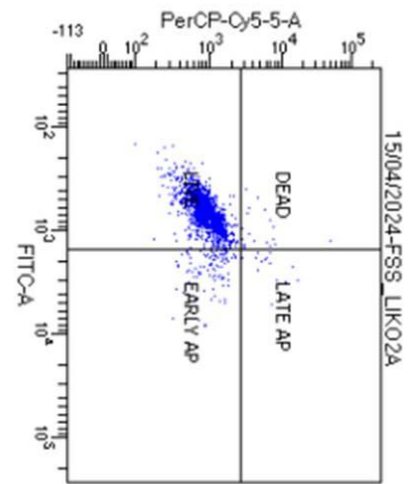
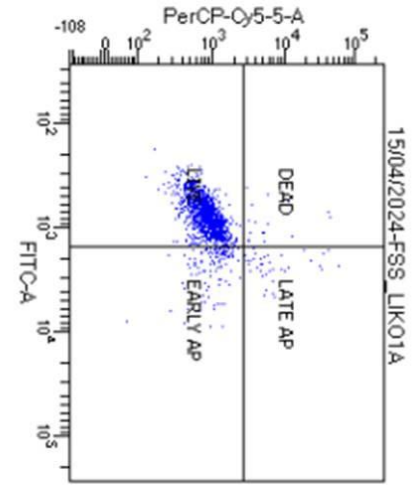
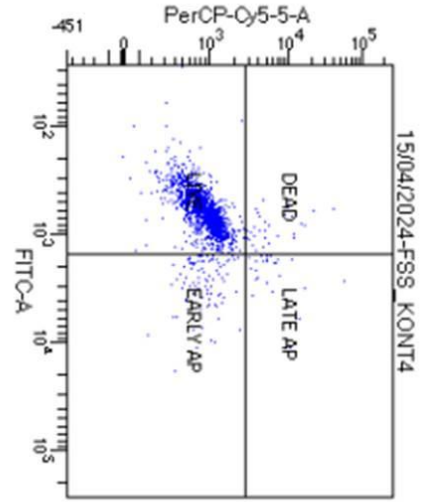
Şekil 4.43. PPA+ likopen (1 μ M) grubu sonuçları.



Tube: FSS_2DNY_PPA_LIKO2A

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	2,622	26.2	26.2
P2	2,381	23.8	23.8
P1 AND P2	2,363	23.6	23.6
P3	2,344	99.2	23.4
DEAD	15	0.6	0.2
LATE AP	51	2.2	0.5
LIVE	2,054	86.9	20.5
EARLY AP	243	10.3	2.4

Şekil 4.44. PPA+ likopen (2 μ M) grubu sonuçları.



Tube: FSS_KONT4

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	100.0	100.0
P1	3,781	37.6	37.6
P2	2,067	20.7	20.7
P1 AND P2	1,712	17.1	17.1
Q1	33	0.3	0.3
Q2	15	0.2	0.2
Q3	1,664	16.6	16.6
Q4	0	0.0	0.0
P3	1,689	16.9	16.9
DEAD	29	0.3	0.3
LATE AP	25	0.2	0.2
LIVE	1,563	15.6	15.6
EARLY AP	95	5.5	1.0

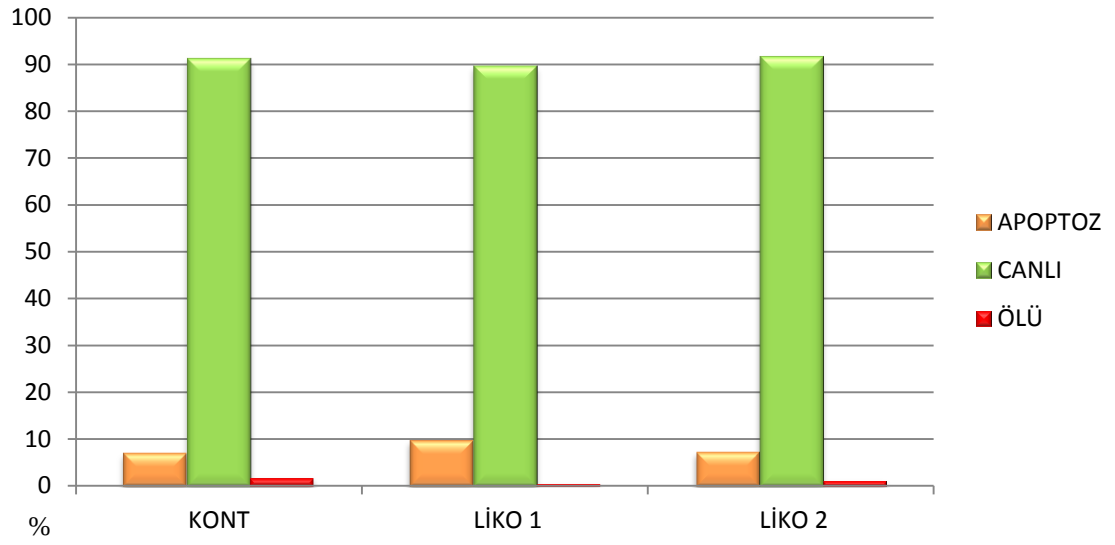
Tube: FSS_LIKO1A

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	100.0	100.0
P1	3,439	34.4	34.4
P2	1,934	19.3	19.3
P1 AND P2	1,537	15.4	15.4
Q1	37	0.4	0.4
Q2	8	0.1	0.1
Q3	1,492	14.9	14.9
Q4	0	0.0	0.0
P3	1,527	15.3	15.3
DEAD	18	0.2	0.2
LATE AP	39	0.4	0.4
LIVE	1,360	13.6	13.6
EARLY AP	120	7.8	1.2

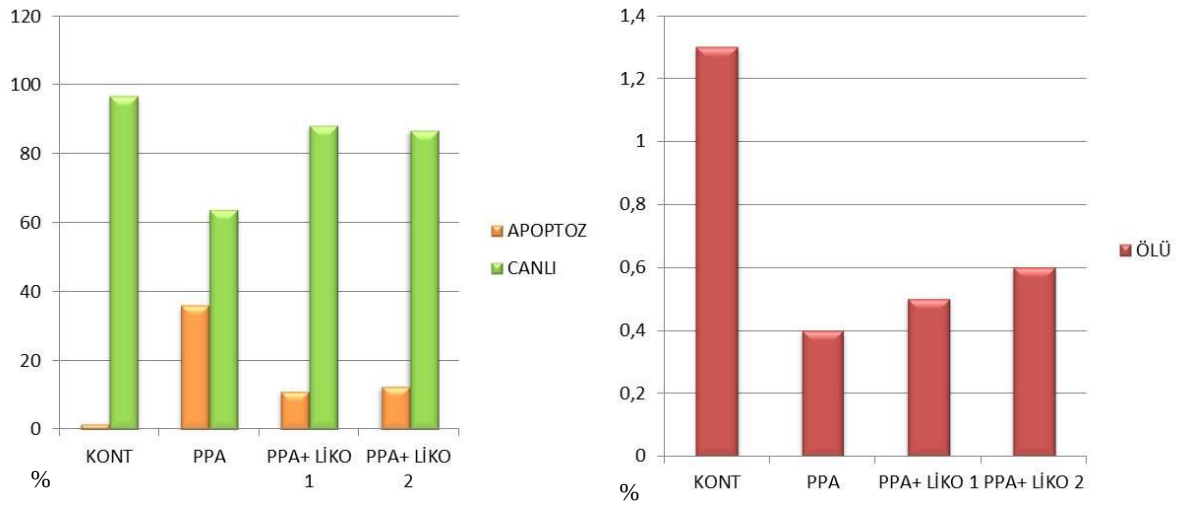
Tube: FSS_LIKO2A

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	100.0	100.0
P1	3,781	37.8	37.8
P2	2,044	20.4	20.4
P1 AND P2	1,693	16.9	16.9
Q1	27	0.3	0.3
Q2	5	0.0	0.0
Q3	1,661	16.6	16.6
Q4	0	0.0	0.0
P3	1,685	16.8	16.8
DEAD	19	0.2	0.2
LATE AP	15	0.2	0.2
LIVE	1,552	15.5	15.5
EARLY AP	107	6.3	1.1

Şekil 4.45. Kontrol, İlkopen (1µM) , İlkopen (2µM) grupları sonuçları.



Şekil 4.46. Kontrol ve likopen (1 μ M, 2 μ M) gruplarının apoptoz/ölüm/canlılık grafiği.



Şekil 4.47. Kontrol ve PPA+likopen (1 μ M, 2 μ M) gruplarının apoptoz/canlılık ve ölüm grafikleri.

5. TARTIŞMA

MSS hastalıkları gün geçtikçe artmaktadır. Bu hastalıklara en kapsamlı ve en hızlı şekilde tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için *in vivo* modellere ek olarak *in vitro* modellerinde geliştirilebilmesi elzemdir. MSS hastalıklarında kullanılmak üzere geliştirilen ilaçların NKH'lar üzerinde denenmesi hastalığın patogenezinin anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin daha hızlı geliştirilebilmesine imkân tanıyacaktır. Böylece *in vivo* modellerde metabolizmaya bağlı oluşabilecek hatalı sonuçların önüne geçilerek en net bilginin ve yöntemin eldesi için daha hızlı bir yol izlenebilecektir. NKH'ların etik sebeplerden dolayı direkt olarak insan beyninden elde edilmesi mümkün değildir. Bu duruma en güzel alternatif embriyonik yollarla NKH eldesidir, ama yine etik sorunlardan dolayı buda mümkün değildir. Bu nedenle en güzel elde yöntemi pluripotent kök hücrelerdir. Bu sayede özellikle *in vitro* nörogenez çalışmalarında en doğru sonuç en hızlı şekilde elde edilebilecektir. NKH'lar hakkında bilgimiz arttıkça nörodejeneratif hastalıkların tedavi potansiyeli için son derece önemli hücreler olduğu gerçeği karşımıza çıkmaktadır (Galiakberova ve Dashinimaev, 2020).

NKH'lar gelişmekte olan sinir sisteminin organizasyonu için son derece önemlidirler. Kök hücreler genel olarak farklılaşmanın temelini oluşturan unsurlardır. Eski inanışların aksine sinir sisteminin kendini yaşam boyu yenilediği ve nörogenezin organizmada ömür boyu devam ettiğini gösteren birçok kanıt elde edilmiştir. Sinir sisteminde oluşabilecek herhangi bir hasar yada hastalık durumunda da sinir kök hücrelerinin gerekli onarım için büyük bir potansiyel barındırdığı düşünülmektedir. Ayrıca NKH'ların uygun ortam ve şartlar altında nöral sistem hücrelerinede (oligodendrosit, astrosit ve nöronlar) farklılaşabildiği bilinmektedir (Ramasamy ve ark., 2013).

In vitro nöral kök hücre kültürleri için en önemli sorun; nöral kök hücrelerin kültürde çoğaltılmasının son derece zor olması ve farklı hücre tiplerine dönüşme yönünden son

derece hassas olmasıdır. Bu hassasiyet sebebi ile kültür ortamında nöral kök hücrelerin eldesi son derece zordur (Galderisi ve ark., 2013). Bu sorunun en güzel çözümü kullanılan besiyeri ortamında FGF-2 varlığıdır. Bu sayede özellikle hipokampal kökenli NKH'lar farklılaşmaya uğramaksızın büyür ve çoğalırlar. Aynı zamanda kendini yenileme özelliklerindeki *in vitro* olarak sürdürürler (Galderisi ve ark., 2013; Gritti ve ark., 1995; Kuhn ve ark., 1997; Maric ve ark., 2003; Nakatomi ve ark., 2002; Zheng ve ark., 2004). Otizm son yıllarda görülme sıklığı gitgide artan en önemli çocukluk çağı hastalıklarından birisidir. (Abdelli ve ark., 2019). Bu hastalık beyinde hücresel düzeyde son derece heterojen patolojiler içermektedir Otizmin heterojenik olması kök hücrelerin etken olma ihtimalini güçlendirmektedir. Çünkü kök hücreler öncül hücre formasyonlarına ve daha farklı alt hücre gruplarına dönüşebilmektedirler. Buna bağlı olarak oluşan patolojilerde son derece farklı hücre soyu örneklerine rastlamak mümkündür (Amaral ve ark., 2008). Çalışmamızda elde edilen konfokal mikroskopi sonuçlarına göre hücresel olarak nestin ve sox-2 yönünden son derece yüksek ve anlamlı ifadeler içeren hipokampus dokularından nöral kök hücreler elde edilerek *invitro* olarak çoğaltılmıştır (Şekil 4.30) ($p<0,05$). Nitekim çalışmamızın bütünü ele alındığında hücresel bazı farklılıkların tespit edildiği, bu durumunun nöromediyatör seviyelerinde ve hücresel sağkalım, apoptoz ve proliferasyon indekslerinde farklılıklara sebep olduğu açıkça gözlemlenmiştir.

Günümüzde parkinson, alzheimer, huntington gibi hastalıkların *in vitro* modelleri mevcuttur. (Galiakberova ve Dashinimaev, 2020). Ancak otizm için şuana kadar herhangi bir *in vitro* model geliştirilememiştir. Geliştirilmiş olan modeller *in vivo* modeller olup hastalığın seyri konusunda organizmaya bağlı olarak bir takım yanıltıcı sonuçlar elde etmeye neden olabilmektedir. Kaldı ki otizm için *in vitro* modelin hücresel düzeyde geliştirilmesi de aslında heterojen karmaşanın çözülebilmesi için tam anlamı ile hastalığın seyri konusunda net bilgi sunamayabilir. Zira hücresel düzeydeki seyri farklılaşmış bir sonuç iken kök hücresel evrede bunu modellemek hastalığın seyrinden ziyade nasıl başladığının belirlenmesi için son derece önemlidir. Böylece hastalığın çözümü için en net bilgilere daha kolay ulaşılabilecektir. Bu sebeple otizm ile ilgili en net verileri elde edebilmek için çalışmamızı kök hücre düzeyinde gerçekleştirdik. Ancak *in vitro* otizm modelinin daha detaylı ve net biçimde

oluşturulabilmesi için yine kök hücre düzeyinde ve daha farklı doğrulama yöntemleri kullanılarak üzerinde çalışılması elzemdir.

Nörotrofik faktörler ve nörotransmitterler sinir sistemi için son derece önemlidirler. Sinir sisteminin fizyolojik ve patolojik durumları hakkında bilgi sahibi olunabilmesi için nöromedyatörler son derece stratejiktir. Ayrıca MSS'nin hastalıklarına karşı tedaviler geliştirilebilmesi için de nöromedyatörler çok önemlidirler. Nöromedyatörlerin BOS geçişleri, organizmada metabolizasyona uğramaları sebebi ile *in vivo* modellerde bir takım yanıltıcı sonuçlara yol açmaktadır (Toprak ve ark., 2021). Bu sebeple kök hücre odaklı *in vitro* modelden elde edilecek nöromedyatörlerle ilgili bilgilerin nöral sistemle ilgili daha doğru sonuçlar vereceği düşünülmektedir. *In vitro* modeller dahada geliştirildikçe gelecekte kök hücre tedavileri için daha anlamlı bilgi birikimi sağlanabilecektir. Hem kök hücrelerin nasıl bu hastalıklardan etkilendikleri hem de bu durumu kök hücre evresinde iken nasıl hızla geri çevrilebileceğine dair ipuçları elde edilebilecektir. Kaldı ki çalışmamızda bununla ilgili birçok veri elde edilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak daha detaylı çalışmalar yapılması elzemdir.

Nöral kök hücreler nörogenezin (erişkin ve embriyonal) temelini oluşturan son derece önemli hücrelerdir. Nörogenez çeşitli hücreyel yollarla (*Shh*, *Wnt-β-katenin*, *BMP*, *Smad*, *TGF-β*) yönetilmektedir. Memelilerde nörogenez mekanizması, hücre farklılaşma süreçleri ve nöral hücrelerin evreleri gizemini korumaktadır. Nörogenez mekanizmasının tam olarak çözülebilmesi sinir sisteminin hücre farklılaşma evreleri ve hücreyel sağkalım özelliklerinin öğrenilebilmesi için son derece önemlidir (Galiakberova ve Dashinimaev, 2020). Bu yolların (*Shh*, *Wnt-β-katenin*, *BMP*, *Smad*, *TGF-β*) hematopoetik sistemdeki lösemik farklılaşma bozukluklarında da görev aldığı bilinmektedir. Hematopoetik hücrelerdeki farklılaşmalar kök hücreden itibaren evre evre gerçekleşmektedir. Lösemik hastalıkların birçoğu bu evreler üzerinde tek tek çalışılarak hangi blastik evrede hangi malignite oluştuğuna dair veriler elde edilerek çözülmüş ve tedavi yöntemleri bu şekilde geliştirilebilmiştir (Şahin, 2018). Bu süreçler aydınlatıldıkça nörogenez, nöral kök hücre ve nöral hücreler hakkında evresel bilgi birikimimiz arttığında birçok nörolojik hastalığın, hematopoetik ve lösemik hastalıklar gibi evresel süreçlerle ilişkilendirilerek benzer çözümler üreterek ve bu süreçlere müdahale edilerek nöral birçok hastalığın basit bir şekilde tedavi edilebilecek duruma geleceği aşikardır. Nöroloji alanında deneysel çalışmaların artışı ve *in vitro* olarak nöral

kök hücrelerin modellenenebilmesiyle birçok nörolojik hastalığın seyri, mekanizması ve sağaltımı için bilgi birikimi elde edilebilir. Otizmde nöronal devre bozulmasına neyin tam olarak sebep olduğu henüz tam olarak çözülememiş olsa da PPA verilen NKH'larda özellikle nörit sayısında azalmalar, yapısında bozulmalar ve aksonal büyümenin azalması yönünde bir etki görülmüştür. Ayrıca bu durumun nöron kaybı ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Abdelli ve ark., 2019). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında PPA verilen gruptaki hücrelerin nörit yapılarını neredeyse tamamen yok ettiği, sadece hücre gövdelerinin kaldığı ve fraktal yapıyı tamamen bozduğu gözlemlenmiştir. Nörit yapısını etkilemesi ile nörogenezi bu şekilde etkilediği değerlendirilmiştir. PPA'nın nöral devreleri bozunmaya uğrattığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26).

Nörosferlere PPA verildiği zaman nörosferlerin büyümelerini ve sayıca artışlarını tetiklediği ve proliferasyonunu uyardığına dair çalışma verileri mevcuttur (Abdelli ve ark., 2019). Bu çalışmada nörosfer büyümelerinin PPA verildiğinde kontrol grubuna göre gözle görülür derecede artış sergilediği ve bu nörosferik yapıların normalden daha yuvarlak bir morfolojiye büründüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23). Ayrıca kontrol grubundaki nörosferlerde gözlemlenen silyaların (Şekil 4.7, Şekil 4.8) PPA verilen nörosferlerde adeta yok olduğu saptanmıştır (Şekil 4.22, Şekil 4.23).

Likopen ile yapılan bir çalışmada; *in vitro* olarak kültür ortamında nöritleri farklı etkenler ile yok edilmiş olan nöral kök hücreler likopen ile muamele edildiğinde nörit yapılarının tekrar oluştuğu ve sinirsel ağ yapısını ağlar oluşturacak şekilde düzenlendiği ve daha uzun aksonal yapılar oluşturduğu rapor edilmiştir (Huang ve ark., 2018). Çalışmamızda 2 μ M likopen verilen grupta (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19), 1 μ M likopen verilen gruba göre (Şekil 4.15) morfolojik olarak daha büyük nörit ve daha fraktal ağ oluşumu gözlemlenmiştir. Ayrıca PPA uygulaması sonrasında nörit kaybı yaşayan hücre gruplarında; 2 μ M likopen verilen grupta (Şekil 4.28) yeniden multipolar nörit oluşumu gözlemlenirken, 1 μ M likopen verilen grupta (Şekil 4.27) yeniden bipolar nörit oluşumu gözlemlenmiştir. Yani fraktal yapı 2 μ M likopen ile yeniden oluşmaya başlarken, 1 μ M likopen ile fraktal yapı yeniden tam olarak oluşturulamamıştır.

Staufen-2'nin genel olarak öğrenme bellek, çevresel bilgilerin yönetimi gibi özelliklerde rolü vardır (Berger ve ark., 2017). Ayrıca nörosferlerin, sinirsel dokuların yada

organların morfolojik çaplarının artışıyla seviyesinin arttığı bilinmektedir (Cockburn ve ark., 2012). Kısa zincirli yağ asitlerinin (propionik asit, bütirik asit) genel olarak nöral kök hücrelerde *in vitro* proliferasyonu artırdığına dair bulgular mevcuttur. Ayrıca nörosfer çaplarında artırdığı tespit edilmiştir (Abdelli ve ark., 2019). Staufen-2 yükselişinin hücre proliferasyon artışı ve blastik hücre karakter kazanımı ile paralel bir seyir izlediği rapor edilmiştir (Cockburn ve ark., 2012). Otizm özelinde öğrenme ve bellek ile ilgili sorunlar olduğu için otizm yönünden çıkarımsal olarak PPA uygulanması sonrası düşüşü beklenilebilir. Ancak çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta staufen-2 seviyesi artmıştır. PPA'dan sonra likopen (1 µM) verildiğinde ise staufen-2 seviyesinde düşüş gerçekleşmiştir. Ayrıca PPA'dan sonra likopen (2 µM) verilen grupta staufen-2 seviyesinin kontrol grubu seviyesinde altına düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.40). Bu bulgular çalışmamız çerçevesinde değerlendirildiğinde hafıza, öğrenme vb. faaliyetler yönünden beklenen değerlerin aksine; PPA uygulanması sonrasında morfolojik olarak gözlemlenen nörosferik çap büyümesi ve proliferasyon yönünden uyumlu ve anlamlı bir bulgu olarak değerlendirilmektedir (p<0,05).

Asetilkolin nöromediyatör bir nörotransmitterdir. Özellikle hipokampus asetilkolin yönünden son derece zengin bir bölgedir. Ayrıca hipokampus hafıza ve bilişsel faaliyetlerin de merkezidir. Olası bir hipokampal hasarın asetilkolin metabolizmasını da olumsuz etkilediği bilinmektedir. Asetilkolinin bilinen en önemli özelliği kısa vadeli hafızanın uzun vadeli hafızaya geçişine aracılık etmesidir. Bunu da hipokampusteki bilgiyi kortekse taşıyarak yaptığı bilinmektedir. Bununla birlikte anısal hafızanın da hipokampus tarafından oluşturulduğuna dair bir çok kanıt bulunmaktadır (Hasselmo, 2006; İzci ve Erbaş, 2015; Micheau J ve Marighetto, 2011; Schmidt ve ark., 2012; Üçel, 2018; Zhao ve ark., 2008). Ayrıca asetilkolinin uyku döneminde bilginin konsolidasyonu ve hafızanın tasnifi için son derece önemli bir nörotransmitter olduğu bilinmektedir (Watson ve ark., 2010). Bütün bu bilgiler çerçevesinde düşünüldüğünde aslında asetilkolinin beyin kütüphanecisi gibi çalıştığı, bilgilerin doğru bir şekilde kullanılması ve anı haline getirilmesi için mükemmel bir nöromodülatör olduğu göze çarpmaktadır. Hipokampusun özellikle kısa süreli hafızadaki rolü düşünüldüğünde otizm spektrumuna sahip çocukların neden öğrendiklerini uzun vadede bilgi olarak özümseyemedikleri ve kullanamadıkları sorusu cevap bulmaktadır. Otizmliler çocuklar

aslında sürekli gündelik bir hafıza ile hayatlarını idame ettirme zorunluluğu yaşadıkları için bütün bu sorunlar ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Bir başka deyişle otizmlili çocuklar “anı” biriktirememektedirler. Bu sebeple otizmin tedavisine giden yolda, asetilkolinin sanıldığından çok daha büyük ve stratejik bir öneme sahip olduğu gerçeği göz ardı edilmemelidir.

Asetilkolin, sinir sistemine etkileri dışında bağışıklık sistemi içinde son derece önemli bir nörotransmitter maddedir. Birçok nöral hastalıkta, asetilkolin yüksekliğinin, hastalığın tedavisine katkısı olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (Cox ve ark., 2020). Otizm, DEHB gibi nörogelişimsel hastalıklarda kolinerjik bozukluklar tespit edildiğine dair raporlar mevcuttur. Ayrıca otizm özelinde kortikal düzeyde asetilkolin eksikliği olduğuna dair de raporlar mevcuttur (Daharlı ve ark., 2022; Saad ve ark., 2022). Bunları destekler nitelikte çocuklarda düşük asetilkolin seviyelerinin, hem klinik hemde klinik öncesi, otizm semptomlarını ağırlaştırdığı ve sosyal davranış bozuklukları oluşturduğuna dair veriler mevcuttur (Rahman ve ark., 2018). Ayrıca deney hayvanları ile yapılan otizm modellerinde de asetilkolin eksikliği bariz bir biçimde göze çarpmaktadır (Sharma ve ark., 2022). Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta asetilkolin seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 1 μ M likopen verilen grupta ise kontrol grubuna göre daha yüksek bir asetilkolin seviyesi göze çarpmaktadır. 2 μ M likopen verilen grupta ise kontrol grubunun çok çok üzerinde yüksek bir asetilkolin seviyesi gözlemlenmiştir (Şekil 4.31) ($p<0,05$). Çalışma bulguları asetilkolinin otizmdeki rolü çerçevesinde değerlendirildiğinde anlamlıdır.

NGF nöral sistem için son derece önemli bir büyüme faktörüdür. Nöral proliferasyon, ve sağkalım gibi önemli görevleri vardır (Aloe ve ark., 2012). Ayrıca sinir iletimi için oldukça önemli görevleri vardır (Aras ve Sarı, 2017). *İn vivo* otizm hastalık modellerinde NGF seviyesinin düşüklüğüne dair bir takım raporlar mevcuttur. Yine *in vivo* modellerde likopen ile seviyesinin yükseldiğine dair bulgular mevcuttur (Erten ve ark., 2020). Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta NGF seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir. 1 μ M likopen verildiğinde seviyesinde iseyine bir düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 4.38). Ancak düşüş hızının azalmış olduğu gözlemlenmiştir. Likopen yönünden beklenen etkinin gözlemlenemediği, olası sonucun likopen dozunun NGF açısından yeterli gelmemesi kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir.

Proinflatuar faktörlerden olan IL-6 ve IL-10 olası bir inflamasyonun moleküler ve hücreseel düzeyde tespit edilebilmesi bakımından son derece önemli sitokinlerdir. Otizimli bireylerde proinflatuar sitokin artışlarının, dengesiz bağışıklık tepkileri sonucunda oluştuğuna dair bulgular mevcuttur. Proinflatuar faktörlerin artışının dendritik ve sinaptik bozulmalara sebep olarak otizm benzeri davranışları modüle edebildiğine dair bulgular mevcuttur (Masi ve ark., 2017). Özellikle IL-6'nın artışının öğrenme bozukluğu, bilişsel bozukluklar, kaygı ve sosyal etkileşim bozukluklarına yol açtığına dair bulgular mevcuttur. Bu bulgular hali hazırda otistik benzeri davranışlar ile benzeşmektedir. Ancak bununla ilgili tam mekanizma henüz belirlenememiştir (Wei ve ark., 2011; Wei ve ark., 2012). *In vivo* otizm modellerinde, kontrol gruplarına göre IL-6 ve IL-10'un seviyelerinin yüksek olduğu, likopen etkisi ile doza bağılı olarak düşüş eğilimi gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca PPA'nın MSS'de proinflatuar sitokinlerin salınımını artırdığına dair bulgular mevcuttur (Erten ve ark., 2020). Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta IL-6 ve IL-10 için anlamlı yükseliş gösterdiği (Şekil 4.36, Şekil 4.37) ($p<0,05$), IL-6'daki yükselişin IL-10'a göre daha bariz olduğu gözlemlenmiştir. IL-10 seviyesinin 1 μ M likopen dozunda seviyesinin düşüşünün anlamlı bir şekilde gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.37) ($p<0,05$). Buna ek olarak IL-6'nın 1 μ M likopen dozunda, seviyesi düşme eğilimine girmemiş aksine PPA kaynaklı yükselişin devam ettiği gözlemlenmiştir. Ancak 2 μ M likopen dozunda ise IL-6 seviyesinde düşüş anlamlı bir şekilde gözlemlenmiştir (Şekil 4.36) ($p<0,05$). Bu durumun likopen dozuna bağılı olarak IL-6 seviyesini düşürmede olumlu bir sonuç olduğu değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre likopen verildiğinde her ne kadar doza bağımlı olarak farklı düşüş eğilimleri gözlemlense de, PPA kaynaklı proinflatuar cevabın tersine çevrilmesinde başarılı ve anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Glutamat ve GABA, nörogenez ve sinaptogenezde görev alırlar (Benítez-Díaz ve ark., 2003; Luján ve ark., 2005). Ayrıca glutamatın bellek oluşumu, belleğin kaydı gibi görevleri mevcuttur (Mutluay ve Karataş; 2022). Glutamat MSS'nin ana uyarıcı nörotransmitteridir. GABA glutamattan üretilen önemli bir nörotransmitterdir. Beyin yapısı olgunlaştıkça normal koşullarda GABA artar. GABA ve glutamat dengesi, otistik olgularda son derece önemli değişiklikler barındırır (Marotta ve ark., 2020). Otizmde genel olarak GABA sentezi yaş ile azalır. Bu da beynin inhibitör etkilerinin azaldığının

işaretidir (Zhang ve ark., 2023). Ayrıca bazı çalışmalarda da GABA seviyesinin plazma düzeyinde yüksek olduğuna dair bulgular elde edilmiştir. Buna ek olarak farklı çalışmalarda da yüksek GABA seviyelerinin sinaps oluşumunu ve nöral plastisiteyi olumsuz etkilediğine dair bulgular sunulmuştur (El-Ansary ve Al-Ayadhi, 2014; Jacop ve ark., 2009). Otistik hastalar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalara göre; GABA ve glutamat dengesinin hastalığın şiddeti, spektrumu, yaş vb. durumlarla değiştiği ve genel olarak anlamlı bir denge bulunmadığı yönünde bir takım bulgular vardır (El-Ansary ve Al-Ayadhi, 2014). Ancak PPA maruziyetinde GABA seviyesinin arttığı bilinmektedir. PPA ile birlikte beyin inhibe bir şekilde uyarılır. Bu da laterjik semptomlara sebep olmaktadır (Spurny ve ark., 2020). Bu etki PPA'nın krebs döngüsünde propiyonil-CoA'nın parçalanmasını bloke ettiği için ortaya çıkar (Şekil 2.6) (Frye ve ark., 2016; Morlve ve ark., 2018). Ayrıca birçok çalışmada glutamat seviyesinin fazla yükselmesi ve buna paralel GABA seviyesi artışlarının nörogelişimsel hastalıkların (otizm) göstergesi olduğuna dair kanıtlar sunulmuştur (Essa ve ark.,2013; Olloquequi ve ark.,2018). Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta GABA seviyesinin anlamlı bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.34) ($p<0,05$). 1 μM likopen verildiğinde de PPA'ya bağlı GABA yükselişinin sürdüğü ve likopen dozunun GABA artışını düşürmekte yeterli olmadığı hatta yükselişini dahi durdurmaya yetmediği saptanmıştır. Ancak 2 μM likopen verildiğinde kontrol grubu seviyesine düşmesede ona yakın bir şekilde GABA seviyesinin likopen etkisi ile geriye doğru çekildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.34) ($p<0,05$). Elde edilen bu bulgular kök hücrel otizm oluşumu için öngörülen PPA asidemisinin hücrelerde oluşturulabildiği ve GABA yükselişinin bu durumu anlamlı bir şekilde desteklediği yönünde yorumlanmıştır ($p<0,05$). Bu da oluşturulmak istenen *in vitro* otizm modeli için elde edilen en önemli bulgulardan birisidir. Ayrıca likopenin çeşitli dozları (belki de daha yüksek dozlarla) ile GABA seviyesinin düzeltilerek PPA'nın etkilerinin tamamen geriye döndürülebileceği ve bu yönde bir fayda elde edilebileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta glutamatın bariz bir şekilde arttığı, 1 μM likopen verilen grupta anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir. 2 μM likopen verilen grupta belli belirsiz bir yükseliş olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.35) ($p<0,05$). Kontrol grubuna göre hali hazırda seviyenin yüksek seyrettiği gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna göre 1 μM likopen ve 2 μM likopen verilen gruptaki seviyelerin nicel olarak hemen hemen

paralel seyrettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.35). Likopen verilen gruplarda GABA ve glutamat için bariz bir uyum ve dengeden söz etmek mümkün değildir. Bu da zaten otizmde beklenen bir durumdur. Ancak PPA verilen gruplarda GABA ve glutamatın anlamlı bir şekilde artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.34, Şekil 4.35) ($p<0,05$).

BDNF özellikle hafıza yönünden son derece önemli bir nöromediyatördür. Yüksekliğinde nöropsikiyatrik birçok hastalık yönünden koruyucu özelliği olduğu bilinmektedir. Ayrıca düşüklüğünde hafıza geriliğine sebep olduğu bilinmektedir (Toprak ve ark., 2021). Özellikle nöron oluşumunu ve nöronal sağ kalımı desteklediği yönünde bulgular mevcuttur. (Fakheri ve ark., 2019; Kaptan ve Üzüm, 2016). Ancak bilinen en önemli özelliği hafıza oluşumu ve hafızanın desteklenmesidir. Konumsal/uzamsal hafızayı ve öğrenmeyi de desteklediği bilinmektedir (Kaptan ve ark., 2015; Kaptan ve Üzüm, 2016). NKH'lar üzerinde yapılan çalışmalarda likopen muamelesinin BDNF seviyesini artırdığına dair kanıtlar mevcuttur (Huang ve ark., 2018). Ancak BDNF 'ye PPA'nın etkisi ile ilgili NKH tabanlı herhangi bir kanıt literatür bazında ulaşılamamıştır. Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta BDNF düşüşü anlamlı bir şekilde gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 1 μ M likopen verilen grupta BDNF seviyesi kontrol grubundaki seviyenin dahi üzerine çıkmıştır ($p<0,05$). 2 μ M likopen grupta ise artış kontrol grubundaki seviyenin altında kalmış olmasına karşın PPA'ya göre kıyaslandığında anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.39) ($p<0,05$).

Anandamid, endokanabinoid (esrar kökenli etkenler) bir nöromediyatördür. Genel olarak nöroprotektif etkinliklere sahiptir. Bilinen en önemli özellikleri motivasyon, bellek ve konsantrasyon (düşünürken odaklanabilme) üzerine etkilerinin varlığıdır (Çınar ve Çınar, 2011; Çınar ve Çınar, 2012; Scherma ve ark., 2019; Scienza-Martin ve ark., 2022; Wei ve ark., 2015). Otizmde gözlemlenen en önemli bulgulardan birisi endojen anandamid eksikliğidir. Otizmde farmakolojik olarak anandamid verildiğinde otistik bulgularda kayda değer iyileşmeler gözlemlendiği rapor edilmiştir. Hatta bazı çalışmalar anandamidin otizm için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini rapor etmiştir (Karhson ve ark., 2018; Wei ve ark., 2016). Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta anandamid düşüşü anlamlı olarak gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 1 μ M likopen verilen grupta anandamid seviyesi kontrol grubundaki seviyenin dahi üzerine çıkmıştır. 2 μ M likopen verilen grupta ise artış kontrol grubundaki seviyenin altında

kalmış olmasına karşın PPA'ya göre kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.32) ($p<0,05$). Ayrıca BDNF bulguları ile anandamid bulgularının paralellik gösterdiği saptanmıştır. Bu paralelliğin hafıza ve öğrenme odaklı iki nöromediyatör arasında gözlemlenmesi otizmle ilişkilendirildiğinde son derece anlamlıdır.

FGF-2'nin özellikle nöral plastisite nörogenez, hücrel farklılaşma, hücrel göç ve sağkalım gibi hücrel süreçlerde MSS'de görev aldığı bilinmektedir (Reuss ve von Bohlen und Halbach, 2003; Can, 2014). Ayrıca FGF-2'nin otizm patogenezeine katkısı olduğuna dair görüşler mevcuttur. *In vivo* otizm hastalık modellerinde FGF-2 seviyesinin düşük olduğu, ancak likopen etkisi ile genel olarak artış gösterdiği rapor edilmiştir. Yapılan başka bir klinik çalışmada da otizmlı çocukların serum FGF-2 düzeylerinin önemli derecede düşük olduğu rapor edilmiştir (Erten ve ark., 2020; Esnafoglu ve Ayyıldız, 2017; Vaccarino ve ark., 2009). Çalışmamızda kontrol grubuna göre PPA verilen grupta FGF-2 düşüşü anlamlı bir şekilde gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 1 μ M likopen verilen grupta FGF-2 seviyesinin artışı için verilen dozun tam olarak yeterli gelmediği ancak 2 μ M likopen verilen grupta ise anlamlı bir artış olduğu ancak yine de kontrol grubu seviyesine ulaşamadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.33) ($p<0,05$).

Otizmde, proliferasyon bozuklukları ve apoptoz artışına bağlı olarak bir takım hücrel veya dokusal bozulmalar gözlemlendiğine dair bulgular mevcuttur (Palmen ve ark., 2004). Yapılan *in vivo* çalışmalarda elde edilen bulgulara göre PPA kaynaklı otizm modellerinde, hipokampus dokularının apoptoza uğradığına dair çeşitli görüşler mevcuttur (Choi ve ark., 2018). Ayrıca NKH 'da nörit hasarı oluşturulan bir toksikasyon çalışmasında; likopenin hasarlı hücrelerdeki apoptoz seviyesini düşürdüğü ve hücrel hasarı iyi bir seviyede tersine çevirebildiği rapor edilmiştir (Huang ve ark., 2018). Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre PPA asidemisi oluşturulan grupta apoptoz oranı kontrol grubuna göre 20 kat artış göstermiştir (Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.47). Bunun üzerine PPA ardından likopen verilen gruplarda apoptoz oranı 6-7 kat azalmış (doza bağlı olarak) olup hücrel canlılık %40 üzerinde artış (doza bağlı olarak) göstermiştir (Şekil 4.43, Şekil 4.44, Şekil 4.47) Ayrıca kontrol grubuna göre PPA verilen grupta ölüm oranı ~3 kat azalmış olup (Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.47), PPA grubuna göre de likopen verilen gruplarda % 25-50 aralığında hücrel ölüm (nekroz) artışı (doza bağlı olarak) gerçekleşmiştir (Şekil 4.42, Şekil 4.43, Şekil 4.44, Şekil 4.47). Sadece likopen verilen gruplarda kontrol grubuna göre apoptoz oranı (doza

bağlı olarak) yüzde 10-12 seviyelerinde kalmıştır. Bu da PPA'ya göre yaklaşık 200/1 orana denk gelmektedir. Ayrıca sadece likopen verilen gruplarda (doza bağlı olarak)  l m oranı kontrol grubuna göre ~ 3'te 1 oranında azalış göstermiştir. Yine sadece likopen verilen gruplarda hücresel canlılıkta kayda değer bir değişim gözlenmemiştir (şekil 4.45, şekil 4.46).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Otizmin ilk başlarda çevresel ve genetik bir takım etkileşimlerin etkisi ile oluştuğu değerlendirilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalar ile bu değerlendirmelerin doğru olduğunu gösteren birçok bulgu elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar ve otizmle ilgili yayınlanan raporlar bir bütün halinde değerlendirildiğinde genel olarak otizmin metabolik, genetik, immünolojik, gastrointestinal, çevresel, psikolojik etkiler ile gelişebileceği ve ilerleyebileceğine dair birçok bulgu elde edilmiştir. Ayrıca barsak mikrobiyomunun da bu hastalığın gelişmesinde etkili olduğunu kanıtlayan birçok rapor bulunmaktadır. Özellikle besinlerin fermentasyonu ile barsakta bakteriler tarafından sentezlenen kısa zincirli yağ asitlerinin (PPA) ve bu asitlerin metabolitlerinin hastalığın gelişiminde son derece etkin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu metabolitlerin immün sistem üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu ve bu sürecin hormonal salgılar üzerinde de patolojik bazı etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bütün bu karmaşık etkilerin merkezi sinir sistemi üzerinde bir takım gelişimsel yada dejeneratif sorunlara neden olarak, neticede otizm spektrumunun oluşumuna sebep olduğuna dair bir takım kanıtlar bulunmaktadır (Choi ve ark., 2018, Sahin ve ark., 2022). Bu kadar çeşitli faktörün etkisine tek tek bakılması, değerlendirilmesi neredeyse imkansız olduğu ve son derece büyük bir zaman kaybına neden olacağı aşikardır. Bu sebeple çalışmamızda bütün bunların ortak olarak etkilediği öngörülen nöral kök hücreler incelenmiştir. Çalışmamız neticesinde; nöral kök hücrelerin bu süreçlerden moleküler yada morfolojik olarak etkilendiği gözlemlenmiştir. Likopenin bu süreçte düzenleyici ve destekleyici etkileri gözlemlenmiştir. Bütün bu bulgular değerlendirildiğinde; beslenmenin ve gıda katkılarının aslında nöral sağlık için ne kadar önemli bir unsur olduğu ortaya çıkmaktadır.

Hipokampus nitelik ve görevleri itibari ile değerlendirildiğinde kök hücrelerin beyindeki en büyük kaynağı olduğu ve göç mekanizmasının da başladığı ve

yönlendirildiği son derece stratejik bir bölgedir. Hipokampüsteki bozuklukların; blastik hücre organizasyon bozuklukları ve göç sistematizindeki bozulmalar ile karakterize olduğu bildirilmiştir (İzci ve Erbaş, 2015). Birçok sinir sistemi hastalığında hipokampüsün ve çevresinin blastik hücre formasyonları ile istila edildiği bilinmektedir. Ayrıca sinirsel birçok hastalığın seyrini de bu durumun belirlediği birçok çalışmada rapor edilmiştir. Ayrıca otizmlili hastalar üzerinde yapılan otopsi çalışmalarında da küçük hacimli ve sık yerleşim gösteren düzensiz nöronların varlığı birçok vakada tespit edilmiştir. Bu düzensiz nöral mimarinin nöral işlevlerin gerçekleşmesi için de olumsuzluklar yaratabileceği görüşü hakimdir (Amaral ve ark., 2008; Bauman ve Kemper, 2005). Kemik iliği, hematopoetik sistemin kök hücre kaynağı olmakla birlikte; hematopoetik sistemdeki hastalıkların birçoğu kemik iliğindeki organizasyon bozuklukları, heterojen hücre gruplarının kontrolsüz artışı ve istilasası ile karakterizedir. Ayrıca birçok lösemik tabloda da ortak olgu, blastik heterojen hücre formasyonun kemik iliğini istila etmesi ile karakterizedir (Şahin, 2018). Çalışmamızda elde edilen bütün nöral kök hücreler hipokampus kaynaklı olarak elde edilmiştir. Çünkü beyindeki neredeyse tüm nöral kök hücre kaynaklarının hipokampüste bulunduğu bilinmektedir. Bu çerçeveden bakıldığında hipokampüsün aslında bütün sinir sistemi için adeta bir “kemik iliği” vazifesi gördüğü aşikârdır. Otizmdeki hücre istila değerlendirildiğinde; bu iki sistem hücre yapıları ve fonksiyonları olarak her ne kadar birbirine uzak olsalar da, bu bağlamda birçok benzerliği barındırdığı göze çarpmaktadır. Otizm için yeni tedavi stratejileri belirlerken geleneksel yöntemlerin yanısıra tıpkı lösemiler gibi otizmin her spektrumu hücre olarak hangi evrede nasıl özellikte bulunduğu ve hangi semptomlara yada spektrumlara sebep olduğuna dair sınıflandırmalar yapılmalı ve bu yönde bilgi birimi oluşturulmalıdır.

Yetişkin beyinde genel olarak nöral kök hücreler bulundukları bölgelerde uyku fazında ve inaktif bir şekilde bulunurlar (Toprak ve ark., 2021). MSS’ nin hasarlı koşullar altında kendi kendini onarma kapasitesi sınırlıdır. Endojen olarak nöral kök hücrelerin onarım gücü bir dereceye kadar mevcuttur. Ancak bu onarım tamamen yeterli olamamaktadır. Bu çerçevede hipokampus kaynaklı kök hücrelerle yapılan çalışmalarda kök hücrelerin bazı ajanlarla uyarılarak onarım ve proliferasyon kapasitelerinin artırılabilirliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Abdanipour ve ark., 2017; Lindvall ve Kokaia, 2006). Bu sebeplerle; çalışmamız ile oluşturmaya çalıştığımız *in vitro* otizm

modeli aslında otizm için basit bir temel olarak tasarlanmıştır. Ancak otizm üzerine daha fazla nöromediyatör, daha fazla hücre çeşidi, daha çeşitli hücreler ve daha farklı disiplinlerin bakış açısı ile oluşturacak olan *in vitro* modeller son derece gereklidir. Ayrıca bu sürecin yönetimi ve aktive edilmesi için gerek içsel gerekse dışsal uyarılar ile nöral kök hücrelerin hangi nörotrofik faktörü nasıl kullandığı ve bu faktörlerin hangi durumda nasıl etkilendiğinin bilinmesi ve bu konuda bilgi birikimi oluşturulması gerekmektedir.

Çalışmamızda morfolojik olarak elde edilen bulgular çerçevesinde nörit kayıplarının PPA muamelesi ile artış gösterdiği likopen ile nörit kayıplarının geri kazanılabildiği gibi sinirsel fraktal geometrinin yeniden oluşturabildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca sinirsel bağlantıların likopen ile yeniden oluşturulabilmesi ile sinaptik faaliyetlerde artış gözlenebileceği değerlendirilmiştir. Ancak bu durumla ilgili daha net nicel kanıtlara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızdaki nörotrofik faktörler yönünden elde edilen sonuçlar *in vitro* otizm modeli oluşumu yönünden son derece önemlidir. Otizm modeli için en önemlisi GABA'dır. Çünkü PPA asidemisinin başarılı bir biçimde oluşturulabilmesi ve nöral kök hücrelerin otizmi için son derece önemli bir belirteçtir. Bununla birlikte; elde edilen asetilkolin sonuçlarının otizmdeki anısal hafıza ve öğrenme özelliklerinin bu modelle kök hücreler düzeyinde yansıtılabilmesi yönünden muazzam bir sonuç elde edilmiştir. Çünkü özellikle otizmlili çocuklarda gözlemlenen; bilgiyi kalıcı olarak öğrenememe, konsolide edememe yani bilgiyi tecrübe ve anıya çevirememesi sonucu gündelik hafıza ile yaşamak zorunda olmaları bu hastalığın temelini teşkil etmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre PPA ile muamele edilen hücrelerdeki asetilkolin düşüşü ve likopen ile bu seviyelerin tekrar yükseltilebilmesi bize otizmin hafıza ile ilgili semptomları yönünden son derece uyumlu hücreler kanıtları sunmaktadır. Bütün bunlara ek olarak öğrenme, konsantrasyon ve zekanın moleküler belirteci olarak bilinen anandamid ve BDNF ile ilgili elde edilen sonuçların otizmin bilişsel semptomlarıyla paralel bir şekilde uyumlu olması, oluşturmaya çalışılan *in vitro* otizm modelini daha güçlü veriler ile desteklemeye yardımcı olmaktadır. Aynı şekilde proinflatuar sitokinlerin (IL-6, IL-10) PPA muamelesi sonrasında artışı ve likopen verilimi sonrasındaki tepkilerinin otizmdeki hücreler inflamasyona model olarak paralel bir seyir göstermesi son derece önemli bir bulgudur.

Çalışmamızdaki akım sitometrik bulgulara göre PPA'nın asidemisi neticesinde muazzam bir apoptoz artışının tetiklendiği ve likopen muamelesi ile apoptotik artışın başarılı bir şekilde geriye çevrilebildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca ölüm ve canlılık oranlarının PPA uygulaması sonrası azalış sergilediği gözlemlenmiştir. Ancak likopen uygulamasının ardından PPA'ya göre hem canlılığın hemde ölüm oranının ilginç bir şekilde artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Buradan hareketle bozulmuş/hasarlı hücre gruplarının likopen tarafından yok edilmeye başlandığı şeklinde yorumlanmıştır. Bütün bu bilgiler ışığında düşünüldüğünde; oluşturulan *in vitro* otizm modelinde kök hücre havuzunun apoptoza uğradığı, yine bu sebeple kök hücre varlığının azalması ile sinirsel rejenerasyonun sağlanamaması sebebi ile bireylerde de klinik olarak otizmin regresif bir karaktere bürünebileceği düşünülmektedir. Bu sebeplerle oluşturulan otizm modelinde apoptotik indekslerin artışı, canlılık indeksinin azalışı göz önüne alındığında, hipokampüsteki nöral kök hücre havuzunun tahrip edildiği düşünülmektedir. Ayrıca nörit yapılarını ve nöromediyatör dengelerini bozarak hücrelerin sinaptik kalitesini düşürdüğü değerlendirilmiştir. Ayrıca likopenin, özellikle hasarlı hücrelerde, apoptotik indeksleri düşürdüğü, canlılık ve nekrotik indeksleri artırdığı, hücrelerin nöritlerini geri kazanmalarını sağlayarak hücrelerin sinaptik kalitesini artırdığı, algı ve hafızayla ilgili nörotrofik faktörleri desteklediği gözlemlenmiştir. Böylece hipokampüsteki nöral kök hücre havuzunun korunmasına katkıda bulunabileceği kanaatine varılmıştır. Ancak daha farklı yaklaşım ve yöntemler kullanılarak, özellikle evresel kök hücre çalışmaları yapılarak *in vitro* modelin teyit edilmesi önerilmektedir.

Sonuç olarak;

- Oluşturulan *in vitro* otizm modelinde nöral kök hücrelerin etkilendiğine dair birçok gözlem ve bulgu elde edilmiştir. Bu bulgular çerçevesinde otizmin kliniği için, kök hücre tabanlı tedavilerin üzerine daha fazla bilgi birikimi sağlayacak çalışmalara yoğunlaşılması ile umut vaadeden sonuçlar alınmasının mümkün olabileceği düşünülmüştür.
- Gıda, gıda katkıları ve beslenmenin aslında çocuklar için sanılandan daha da önemli olduğu; yeterli ve dengeli beslenmenin birçok hastalığı başlamadan bitirmede son derece büyük etkilerinin olduğu, barsak ve beynin birbirine özellikle hücresel düzeyde

sanılandan daha fazla etkilerinin olduğu düşünölmektedir. Ayrıca otizmin belki de beyinde değil ilk olarak barsakta başlıyor olabileceği sorunsalıda göz önünde bulundurulmalıdır.

- Otizmin tedavisinde nöroplastisite, kök hücre ve nörotransmitter odaklı yöntemlerin de göz önüne alınması değerlendirilmelidir.
- Otizmin *in vitro* model olarak oluşturulabilmesi sayesinde elde edilecek verilerin kök hücre düzeyinde ve en net biçimde elde edilebileceği aşıkardır. Ayrıca daha az deney hayvanı kullanımıyla etik ilkelerin daha da ileri bir seviyeye taşınmasına büyük katkılar sunacaktır. Bu sayede insan araştırmalarına ışık tutması ile otizmin daha hızlı bir şekilde tedavisinin bulunmasına öncölük edilmiş olacaktır.



7. KAYNAKLAR

- Abdanipour A, Noori-Zadeh A, Mesbah-Namin SA, Bakhtiyari S, Nejatbakhsh R, Anarkooli IJ. Di-(2-ethylhexyl) Phthalate-Induced Hippocampus-Derived Neural Stem Cells Proliferation. *Cell Journal (Yakhteh)*, 2017;19(1); 166-172.
- Abdelli LS, Samsam A, Naser SA. Propionic acid induces gliosis ve neuro-inflammation through modulation of PTEN/AKT pathway in autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, 2019; 9:8824; 1-12.
- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;(2): 163-176.
- Aimone JB, Deng W, Gage FH. Adult neurogenesis: integrating theories ve separating functions. *Trends Cogn Sci*, 2010;14; 325-337.
- Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J Transl Med*, 2012;10; 239.
- Aylward EH, Minshew NJ, Goldstein G, Honeycutt NA, Augustine AM, Yates KO, Barta PE, Pearlson GD. MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. *Neurology*, 1999; 53(9);2145-2150.
- Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW. Neuroanatomy of autism. *Trends in Neurosciences*, 2008;31(3); 137-145.
- Aras ŞY, Sarı EK. Ngf (sinir büyüme faktörü) ve fonksiyonları. *MAE Vet Fak Derg*, 2017;2(1); 91-96.
- Aydin S. A short history, principles, ve types of ELISA, ve our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 2015;72; 4-15.
- Bauman ML, Kemper TL. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review ve future directions. *Int. J. Devl Neuroscience*, 2005;23; 183-187.

- Baykara B. Otistik Çocukların Anne ve Babalarında Geniş Otizm Fenotipinin Nörobilişsel Görünümünün Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir 2003; s.: 1-72.
- Benítez-Díaz P, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Peña-Contreras Z, Palacios-Prü E. Prenatal ve postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex. *Dev Neurosci*, 2003;25; 366-374.
- Berger JM, Rohn TT, Oxford JT. Autism as the early closure of a neuroplastic critical period normally seen in adolescence. *Biol Syst Open Access*, 2013;20(1):41-49
- Berger SM, Fernández-Lamo I, Schöning K, Moya SMF, Ehses J, Schieweck R, Clementi S, Enkel T, Grothe S, OB Halbach, Segura I, Delgado-García JM, Gruart A, Kiebler MA, Bartsch D. Forebrain-specific, conditional silencing of *Staufen2* alters synaptic plasticity, learning, ve memory in rats. *Genome Biology*, 2017;18(222); 1-13.
- Camcıoğlu Y, Deniz G. Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları (1. Baskı), İstanbul Tıp Kitabevi. İstanbul, 2007: 9-266.
- Can A. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Akademisyen Tıp Kitabevi, Ankara 2014; s.: 5-512.
- Carroll S, Naeiri M, Al-Rubeai M. Monitoring of Growth, Physiology, ve Productivity of Animal Cells by Flow Cytometry, In: *Methods in Biotechnology: Animal Cell Biotechnology Methods ve Protocols* (2 nd ed.), 24, Pörtner R. (edt.), Humana Press, New Jersey, 2007; 223-238.
- Choi J, Lee S, Won J, Jin Y, Hong Y, Hur TY, Kim JH, Lee SR, Hong Y. Pathophysiological ve neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. *Plos One*, 2018;13(2); 1-17.
- Cockburn DM, Charish J, Tassew NG, Eubanks J, Bremner R, Macchi P, Monnier PP. The double-stranded RNA-binding protein *Staufen 2* regulates eye size. *Molecular ve Cellular Neuroscience*, 2012;51;101-111.
- Cooperstone JL, Ralston RA, Riedl KM, Haufe TC, Schweiggert RM, King SA, Timmers CD, Francis DM, Lesinski GB, Clinton SK. Enhanced bioavailability of lycopene when consumed as cis-isomers from tangerine

- compared to red tomato juice, a randomized, cross-over clinical trial. *Mol Nutr Food Res*, 2015;(59); 658-669.
- Cox MA, Bassi C, Saunders ME, Nechanitzky R, Morgado-Palacin I, Zheng C, Mak TW. Beyond neurotransmission: acetylcholine in immunity ve inflammation. *J Intern Med*, 2020;287(2); 120-133.
- Çetin S, Yur F, Taşpınar M, Dede S, Yüksek V. The effects of lycopene application on sodium fluoride (naf) applied renal cell line. *Int J Sec Metabolite*, 2017;4(3); 508-511.
- Çınar ÖG, Çınar R. Kannabinoid Tip 1 Reseptör (CB1) ve Terapötik Yaklaşımlara Genel Bakış-II. *Müsbed*, 2012;2(1); 1-8
- Çınar R, Çınar ÖG. Kannabinoid Tip 1 Reseptör (CB1) ve Terapötik Yaklaşımlara Genel Bakış-I. *Müsbed*, 2011;1(2); 149-154.
- Daharlı E, Yılmaz S, Koşan Z. Otizm ve Çevresel İlişkiler: Derleme. *JENAS Journal of Environmental ve Natural Studies*, 2022;4(1); 73-80.
- Dayer AG, Jenny B, Sauvain MO, Potter G, Salmon P, Zraggen E, Kanemitsu M, Gascon E, Sizonenko S, Trono D, Kiss JZ. Expression of FGF-2 in neural progenitor cells enhances their potential for cellular brain repair in the rodent cortex. *Brain*, 2007;130; 2962-2976.
- Deguchi Y, Naito T, Yuge T, Furukawa A, Yamada S, Pardridge WM, Kimura R. Blood-brain barrier transport of 125I-labeled basic fibroblast growth factor. *Pharm Res*, 2000;17(1); 63-69.
- Deguchi Y, Okutsu H, Okura T, Yamada S, Kimura R, Yuge T, Furukawa A, Morimoto K, Tachikawa M, Ohtsuki S, Hosoya KI, Terasaki T. Internalization of basic fibroblast growth factor at the mouse blood–brain barrier involves perlecan, a heparan sulfate proteoglycan. *J Neurochem*, 2002;83(2); 381-389.
- Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R. Impaired cerebral cortex development ve blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J*, 1998; 17(15); 4213-4225.
- Eigsti IM, Shapiro T. A systems neuroscience approach to autism: biological, cognitive ve clinical perspectives. *Ment Retard ve Dev Dis Res Rev*, 2003;9; 206-216.

- El-Ansary A, Al-Ayadhi L. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. *Journal of Neuroinflammation*, 2014;11(189); 1-9.
- Erdoğan H, Kelten B, Akdemir O, Karaoğlu A, Taşdemiroğlu E. Otizm ve serebellar mutizm: nöroanatomik bulguların bir derlemesi. *Maltepe Tıp Dergisi*, 2013;2(5); 57-65.
- Erten F, Gençoğlu H, Şahin K. Deneysel Otizm Spektrum Bozukluğu Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Likopenin Beyin IL-6, IL-10, FGF-2 ve NGF Düzeyleri Üzerine Etkisi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 2020;13(2); 139-143.
- Esnafoğlu E, Ayyıldız SN. Decreased levels of serum fibroblast growth factor-2 in children with autism spectrum disorder. *Psychiatry Research*, 2017;257; 79-83.
- Essa M, Braidy N, Vijayan K, Subash S, Guillemain GJ. Excitotoxicity in the pathogenesis of autism. *Neurotox Res*, 2013;23; 393-400.
- Fakheri F, Abdanipour A, Parivar K, Anarkooli IJ, Rastegar H. Lovastatin alters neurotrophin expression in rat hippocampus-derived neural stem cells in vitro. *Acta Neurobiol Exp*, 2019;79; 413-420.
- Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, McTeague M, Sandler R, Wexler H, Elizabeth MM, Collins MD, Lawson PA, Summanen P, Baysallar M, Tomzynski TJ, Read E, Johnson E, Rolfe R, Nasir P, Shah H, Haake DA, Manning P, Kaul A. Gastrointestinal microflora studies in late onset autism. *Clin Infect Dis*, 2002;35; 6-16.
- Foley KA, Ossenkopp KP, Kavaliers M, Macfabe DF. Pre- ve Neonatal Exposure to Lipopolysaccharide or the Enteric Metabolite, Propionic Acid, Alters Development ve Behavior in Adolescent Rats in a Sexually Dimorphic Manner. *PLoS One*, 2014;9; 1-13.
- Frye RE, Nankova B, Bhattacharyya S, Rose S, Bennuri SC, MacFabe DF. Modulation of Immunological Pathways in Autistic ve Neurotypical Lymphoblastoid Cell Lines by the Enteric Microbiome Metabolite Propionic Acid. *Front Immunol*, 2017;22(8); 1670.

- Frye RE, Rose S, Chacko J, Wynne R, Bennuri SC, Slattery JC, Tippet M, Delhey L, Melnyk S, Kahler SG, MacFabe DF. Modulation of mitochondrial function by the microbiome metabolite propionic acid in autism ve control cell lines. *Transl Psychiatry*, 2016;6; 1-10.
- Fu X, Li S, Zhou S, Wu Q, Jin F, Shi J. Stimulatory effect of icariin on the proliferation of neural stem cells from rat hippocampus. *BMC Complementary ve Alternative Medicine*, 2018;18(34); 1-9.
- Galderisi U, Peluso G, Di Bernardo G, Calarco A, D'Apolito M, Petillo O, Cipollaro M, Fusco FR, Melone MAB. Efficient cultivation of neural stem cells with controlled delivery of FGF-2. *Stem Cell Research*, 2013;10; 85-94.
- Galiakberova AA, ve Dashinimaev EB. Neural stem cells ve methods for their generation from induced pluripotent stem cells in vitro. *Front. Cell Dev Biol*, 2020;8 (815); 1-20.
- Gärtner C, Stahl W, Sies H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr*, 1997;(66); 116-122.
- Gilbert PE, Kesner RP, Lee I. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus ve CA1. *Hippocampus*, 2001;11; 626-636.
- Gritti A, Cova L, Parati EA, Galli R, Vescovi AL. Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neurosci Lett*, 1995;185(3); 151-154.
- Han MH, Lee EH, Koh SH. Current opinion on the role of neurogenesis in the therapeutic strategies for Alzheimer disease, Parkinson disease, ve ischemic stroke; considering neuronal voiding function. *International Neurourology Journal*, 2016: vol. 20, no.4; 276-287.
- Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning ve memory. *Curr Opin Neurobiol*, 2006;(6); 710-715.
- Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, Cheng Y, Ferriero DM. Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol*, 1996;39(1); 114-22.
- Howard MA, Cowell PE, Boucher J, Broks P, Mayes A, Farrant A, Roberts N. Convergent neuroanatomical ve behavioural evidence of an amygdala hypothesis of autism. *Neuroreport*, 2000;11; 2931-2935.

- Hu VW, Frank BC, Heine S, Lee NH, Quackenbush J. Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes. *BMC Genomics*, 2006;7; 1-18.
- Huang C, Gan D, Fan C, Wen C, Li A, Li Q, Zhao J, Wang Z, Zhu L, Lu D. The secretion from neural stem cells pretreated with lycopene protects against tert-butyl hydroperoxide-induced neuron oxidative damage. *Oxidative Medicine ve Cellular Longevity*, 2018;1-14.
- Ishaque A, Al-Rubeai M. Measurement of Apoptosis in Cell Culture, In: *Methods in Biotechnology: Animal Cell Biotechnology Methods ve Protocols* (2 nd ed.), Pörtner R. (edt.), Humana Press, New Jersey, 2007;24; 285-299.
- Ito Y, Shiramatsu TI, Ishida N, Oshima K, Magami K, Takahashi H. Spontaneous beat synchronization in rats: neural dynamics ve motor entrainment. *Sci Adv*, 2022;8, eabo7019; 1-11.
- İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg*, 2015; Cilt: 25, Sayı: 3, 287-295.
- Jaberi R, Mirsadeghi S, Kiani S. In vitro characterization of subventricular zone isolated neural stem cells, from adult monkey ve rat brain. *Molecular Biology Reports*. 2021;48; 1311-1321.
- Jacob TC, Wan Q, Vithlani M, Saliba RS, Succol F, Pangalos MN, Moss SJ. GABAA receptor membrane trafficking regulates spine maturity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009;106; 12500-12505.
- Kandel ER (edt.), Schwartz JH (edt.), Jessell TM (edt.), Siegelbaum SA (edt.), Hudspeth AJ(edt.). *Principles of Neural Science* (5th ed). McGraw-Hill Companies Inc, USA 2013; 337-371.
- Kaneko N, Sawamoto K. Adult neurogenesis ve its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res*, 2009;63; 155-164.
- Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 1943;2; 217-250.

- Kaptan Z, Akgün-Dar K, Kapucu A, Dedeakayoğulları H, Batu Ş, Üzüm G. Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; hippocampal ve prefrontal cortex BDNF level, expression of NeuN ve cell proliferation in dentate gyrus. *Brain Res*, 2015;1618; 194-204.
- Kaptan Z, Üzüm G. Erişkinlerde Hipokampal Nörogenezin Öğrenme-Hafıza Fonksiyonlarındaki Rolü. *Turk J Neurol*, 2016;22; 149-155.
- Karaöz E. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kurs Kitabı. Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kocaeli, 2010; s.:162-185.
- Karataş F, Çötel E. Kırmızı ve koyu kırmızı bazı meyvelerdeki a, e vitamini, beta karoten ve likopen miktarlarının araştırılması. *Güfbed/Gustij*, 2016;6(2); 61-66.
- Karhson DS, Krasinska KM, Dallaire JA, Libove1 RA, Phillips JM, Chien AS, Garner JP, Hardan AY, Parker KJ. Plasma anandamide concentrations are lower in children with autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, 2018;9(18); 1-6.
- Katoh-Semba R, Wakako R, Komori T, Shigemi H, Miyazaki N, Ito H, Kumagai T, Tsuzuki M, Shigemi K, Yoshida F, Nakayama A. Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases ve normal controls. *Int J Dev Neurosci*, 2007;25(6); 367-372.
- Kaya S (edt), Pirinçci İ, Ünsal A, Karaer Z, Traş B, Bilgili A, Akar F. Veteriner Farmakoloji Cilt II. 4. Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara 2007; s.: 250-260.
- Kazanis I, Lathia J, Moss L, Ffrench-Constant C. The neural stem cell microenvironment. *StemBook*, 2008; 2-25.
- Kitamura T, Inokuchi K. Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Mol Brain*, 2014;7(13); 1-8.
- Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, Sekiguchi M, Sugiyama H, Inokuchi K. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell*, 2009;139; 814-827.

- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor ve fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci*, 1997;17; 5820-5829.
- Lange-Asschenfeldt C, Kojda G. Alzheimer's disease, cerebrovascular dysfunction ve the benefits of exercise: from vessels to neurons. *Exp Gerontol*, 2008;43; 499-504.
- Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, Ji L, Brown T, Malik M. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol*, 2009;207; 111-116.
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*, 2006; 441(7097); 1094-1096.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis ve functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, 2006;7(3); 179-193.
- Luján R, Shigemoto R, López-Bendito G. Glutamate ve GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*, 2005;130; 567-580.
- Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, ve regeneration. *Curr Neurovasc Res*, 2007;4(2); 143-151.
- Macey MG. Principles of Flow Cytometry. In: Macey M.G. (eds), *Flow Cytometry: Principles ve Applications*. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey 2007; p.: 1-15.
- MacFabe DF. Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 2012;23; 1-24.
- Maric D, Maric I, Chang YH, Barker JL. Prospective cell sorting of embryonic rat neural stem cells ve neuronal ve glial progenitors reveals selective effects of basic fibroblast growth factor ve epidermal growth factor on self-renewal ve differentiation. *J Neurosci*, 2003;23; 240-251.
- Marotta R, Risoleo MC, Messina G, Parisi L, Carotenuto M, Vetri L, Roccella M. The Neurochemistry of Autism. *Brain Sci*, 2020;10(163); 1-18.
- Masi A, Glozier N, Dale R, Guastella AJ. The immune system, cytokines, ve biomarkers in autism spectrum disorder. *Neurosci Bull*, 2017;33(2); 194-204.

- Maynard RL, Downes N. Anatomy ve Histology of the Laboratory Rat in Toxicology ve Biomedical Research. Academic Press, London 2019; p.:231-259.
- Micheau J, Marighetto A. Acetylcholine ve memory: a long, complex ve chaotic but still living relationship. Behav Brain Res, 2011;221(2); 424-429.
- Mirahmadi M, Azimi-Hashemic S, Saburid E, Kamalie H, Pishbin M, Hadizadeha F. Potential inhibitory effect of lycopene on prostate cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020;129(110459); 1-8.
- Morlve C, Anne-Sofie Frølve AS, Pettersen MN, Storm-Mathisen J, Gundersen V, Rise F, Hassel B. Propionate enters GABAergic neurons, inhibits GABA transaminase, causes GABA accumulation ve lethargy in a model of propionic acidemia. Biochemical Journal, 2018;475; 749-758.
- Mutluay SU, Karataş H. A review of glutamate ve its receptors: their roles in brain physiology ve pathology. Acta Medica, 2022;53(2); 99-109.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell 2002;110; 429-441.
- Nichols NL, Dale EA, Mitchell GS. Severe acute intermittent hypoxia elicits phrenic long-term facilitation by a novel adenosine-dependent mechanism. J Appl Physiol, 2012;112, 1678-1688.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. Brain Res, 1971;34(1); 171-175.
- Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, Soriano FX, Binvignat O, Auladell C, Camins A. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological ve psychiatric disorders: Therapeutic implications. J Psychopharmacol, 2018;32; 265-275.
- Ommaty R. Vademecum Modern İlaç Rehberi (31. Baskı). Medical Tribune Türkiye, İstanbul 2008; s.: 169.
- Ornitz DM, Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. WIREs Dev Biol, 2015;4; 215-266.

- Palmen SJ, van Engelve H, Hof PR, Schmitz C. Neuropathological findings in autism. *Brain*, 2004;127(12); 2572-2583.
- Papst L. Investigating prenatal stress in a stem cell model of human neuronal development, Dissertation, Graduate School of Systemic Neurosciences, Ludwig-Maximilians-Universität, München 2019; 1-252.
- Park HR, Kong KH, Yu BP, Mattson MP, Lee J. Resveratrol inhibits the proliferation of neural progenitor cells ve hippocampal neurogenesis. *J Biol Chem*, 2012;287; 42588-42600.
- Pase CS, Teixeira AM, Roversi K, Dias VT, Calabrese F, Molteni R, Franchi S, Panerai AE, Riva MA, Burger ME. Olive oil-enriched diet reduces brain oxidative damages ve ameliorates neurotrophic factor gene expression in different life stages of rats. *J Nutr Biochem*, 2015;26(11); 1200-1207.
- Raballo R, Rhee J, Lyn-Cook R, Leckman JF, Schwartz ML, Vaccarino FM. Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation ve neurogenesis in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, 2000;13; 5012-5023.
- Rahman A, Freedman R, Hollander E. Alpha-7 nicotinic acetyl-choline receptor positive allosteric modulator galantamine in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry*, 2018;83; 369-370.
- Ramasamy S, Narayanan G, Sankaran S, Hong Yu Y, Ahmed S. Neural stem cell survival factors. *Archives of Biochemistry ve Biophysics*, 2013;534; 71-87.
- Reuss B, von Bohlen und Halbach O. Fibroblast growth factors ve their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res*, 2003;313; 139-157.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons ve astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992;255(5052); 1707-1710.
- Rietze RL, Reynolds BA. Neural stem cell isolation ve characterization. *Methods Enzymol*, 2006;419; 339-360.
- Ross AB, Vuong LT, Ruckle J, Synal HA, Schulze-Koenig T, Wertz K, Rumbeli R, Liberman RG, Skipper PL, Tannenbaum SR. Lycopene bioavailability ve metabolism in humans: an accelerator mass spectrometry study. *Am J Clin Nutr*, 2011;(93); 1263-1273.

- Saad AK, Akour A, Mahboob A, AbuRuz S, Sadek B. Role of Brain Modulators in Neurodevelopment: Focus on Autism Spectrum Disorder ve Associated Comorbidities. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022;15(5); 612.
- Sahay A, Wilson DA, Hen R. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus ve olfactory bulb. *Neuron*, 2011;70; 582-588.
- Sahin K, Orhan C, Karatoprak S, Tuzcu M, Deeh PBD, Ozercan IH, Sahin N, Bozoglan MY, Sylla S, Ojalvo SP, Komorowski JR. Therapeutic Effects of a Novel Form of Biotin on Propionic Acid-Induced Autistic Features in Rats. *Nutrients*, 2022;14(6); 1280.
- Sanberg PR (edt.), Sanberg CD(edt.). *Cell Therapy, Stem Cells, ve Brain Repair*. Humana Press, New Jersey 2006; 288-315.
- Sarachana T, Zhou R, Chen G, Manji HK, Hu VW. Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. *Genome Med*, 2010;2(23); 1-18.
- Sarı ZB. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopun Prensipleri ve Tıpta Kullanım Alanları. *Akd Tıp D*, 2021;7(3);457-462.
- Sarıcaoğlu F, Batur M. Ağrı Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar ve Yenilikler (1. baskı). *Nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar. Türkiye Klinikleri, Ankara 2021: s.;52-57.*
- Satriotomo I, Dale EA, Dahlberg JM, Mitchell GS. Repetitive acute intermittent hypoxia increases expression of proteins associated with plasticity in the phrenic motor nucleus. *Exp Neurol*, 2012; 237; 103-115.
- Satriotomo I, Nichols NL, Dale EA, Emery AT, Dahlberg JM, Mitchell GS. Repetitive acute intermittent hypoxia increases growth/neurotrophic factor expression in non-respiratory motor neurons. *Neuroscience*, 2016;322;479-488.
- Scherma M, Masia P, Satta V, Fratta W, Fadda P, Tanda G. Brain activity of anandamide: a rewarding bliss?. *Acta Pharmacol Sin*, 2019;3; 309-323.
- Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: the dentate gyrus ve pattern separation. *Behav Brain Res*, 2012;226; 56-65.

- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 2004;429; 184-187.
- Scienza-Martin K, Lotz FN, Zanona QK, Santana-Kragelund F, Crestani AP, Boos FZ, Calcagnotto ME, Quillfeldt JA. Memory Consolidation Depends on Endogenous Hippocampal Levels of Anandamide: CB1 ve M4, but Possibly not TRPV1 Receptors Mediate AM404 effects. *Neuroscience*, 2022;497; 53-72.
- Sharma A, Bhalla S, Mehan S. PI3K/AKT/mTOR signalling inhibitor chrysophanol ameliorates neurobehavioural ve neurochemical defects in propionic acid-induced experimental model of autism in adult rats. *Metab Brain Dis*, 2022;(6);1909-1929.
- Shin JJ, Fricker-Gates RA, Perez FA, Leavitt DB, Zurakowski R, Macklis JD. Transplanted neuroblasts differentiate appropriately into projection neurons with correct neurotransmitter ve receptor phenotype in neocortex undergoing targeted projection neuron degeneration. *Journal of Neuroscience*, 2000: vol. 20, no.19; 7404-7416.
- Shultz SR, Derrick FM, Klaus-Peter O, Shannon S, Jennifer W, Roy T, Donald PC. Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: Implications for an animal model of autism. *Neuropharmacology*, 2008;54; 901-911.
- Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. *T Klin J Med Sci* 2001;21; 427-431.
- Sparks BF, Friedman SD, Shaw DW, Aylward EH, Echelard D, Artru AA, Maravilla KR, Giedd JN, Munson J, Dawson G, Dager SR. Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. *Neurology*, 2002;59; 184-192.
- Spurny B, Seiger R, Moser P, Vanicek T, Reed MB, Heckova E, Michenthaler P, Basaran A, Gryglewski G, Klöbl M, Trattinig S, Kasper S, Bogner W, Lanzenberger R. Hippocampal GABA levels correlate with retrieval performance in an associative learning paradigm. *NeuroImage*, 2020;(204)116244; 1-7.

- Şahin FS. Erişkin Akut Miyeloid Lösemide Akım Sitometrik Minimal Rezidüel Hastalık Takibi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2018; 1-154.
- Tanaka KZ, Pevzner A, Hamidi AB, Nakazawa Y, Graham J, Wiltgen BJ. Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. *Neuron*, 2014;84; 347-354.
- Taneli F. Methodology of Flow Cytometry ve Its Role. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 2007;5(2); 75-82.
- Tang Y, Yu P, Cheng L. Current progress in the derivation ve therapeutic application of neural stem cells. *Cell Death Dis*. 2017;8; 1-12.
- Taupin P ve Gage FH. Adult neurogenesis ve neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*, 2002;69; 745-749.
- Temple S. Division ve differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature*, 1989;340; 471-473.
- Temple S, Qian X. bFGF, neurotrophins, ve the control of cortical neurogenesis. *Neuron*, 1995;15(2); 249-252.
- Toda T, Gage FH. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res*. 2018;373; 693-709.
- Toprak F, Toprak SF, Tokdemir SS. Yetişkin nörogenez ve nörodejeneratif hastalıklarda büyüme faktörlerinin rolü. *Experimed*, 2021;11(1); 57-66.
- Trottier G, Srivastava L, Walker CD. Etiology of infantile autism: a review of recent advances in genetic ve neurobiological research. *J Psychiatry Neurosci*, 1999;24; 103-115.
- Trumbo PR. Are there adverse effects of lycopene exposure?. *J Nutr*, 2005;(135); 2060-2061.
- Üçel Uİ. Tofisopam'ın skopolamin ile amnezi oluşturulmuş sıçanların kognitif parametreleri ve hipokampal morfolojileri üzerine etkilerinin araştırılması. *Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir* 2018; s.: 4-76.
- Vaccarino FM, Grigorenko EL, Smith KM, Stevens HE. Regulation of cerebral cortical size ve neuron number by fibroblast growth factors: implications for autism. *J Autism Dev Disord*, 2009;39(3); 511-520.

- Watson CJ, Baghdoyan HA, Lydic R. Neuropharmacology of sleep ve wakefulness. *Sleep Med Clin*, 2010; 5(4); 513-528.
- Wegiel J, Izabela K, Krzysztof N, Humi I, Jarek W, Elaine M, Shuang YM, Abha C, Ved C, Teresa WB, Mony L, Leslie ASL, Ira LC, Eric L, WTed B, Thomas W. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis ve neuronal migration, ve dysplastic changes. *Acta Neuropathologica*, 2010;119; 755-770.
- Wei D, Dinh D, Lee D, Li D, Anguren A, Moreno-Sanz G, Gall CM, Piomelli D. Enhancement of Anandamide-Mediated Endocannabinoid Signaling Corrects Autism-Related Social Impairment. *Cannabis ve Cannabinoid Research*, 2016; 1(1); 81-89.
- Wei D, Lee D, Cox CD, Karsten CA, Peñagarikano O, Geschwind DH, Gall CM, Piomelli D. Endocannabinoid signaling mediates oxytocin-driven social reward. *Proc Natl Acad Sci*, 2015;112(45); 14084-14089.
- Wei H, Chadman KK, McCloskey DP, Sheikh AM, Malik M, Brown WT, Li X. Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances ve mediates autism-like behaviors. *Biochim Biophys Acta*, 2012;1822; 831-842.
- Wei H, Zou H, Sheikh A, Malik M, Dobkin C, Brown T, Li X. IL-6 is increased in the cerebellum of the autistic brain ve alters neural cell adhesion, migration ve synapse formation. *J Neuroinflammation*, 2011; 8; 52.
- Wiest MM, German JB, Harvey DJ, Watkins SM, Hertz-Picciotto I. Plasma fatty acid profiles in autism: a case control study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009;80; 221-227.
- Wilkinson KA, Huey K, Dinger B, He L, Fidone S, Powell FL. Chronic hypoxia increases the gain of the hypoxic ventilatory response by a mechanism in the central nervous system. *J Appl Physiol*, 2010;109; 424-430.
- Wilkinson KA, Fu Z, Powell FL. Ventilatory effects of substance P-saporin lesions in the nucleus tractus solitarii of chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011;301;343-350.
- Witters P, Debbold E, Crivelly K, Kerckhove KV, Corthout'lar K, Debbold B, Anderson H, Vannieuwenborg L, Geuens S, Baumgartner M, Kozicz T, Yerleşiyor L, Morava E. Autism in patients with propionic acidemia. *Molecular Genetics ve Metabolism*, 2016;119; 317-321.

- Wojtowicz JM. Adult neurogenesis. From circuits to models. *Behav Brain Res*, 2012;227; 490-496.
- Woodbury ME, Ikezu T. Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis ve neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014;9(2); 92-101.
- Yassa MA, Stark CE. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci*, 2011;34; 515-525.
- Yücel F, Şen K, Duran O, Özcan M, Küçükgedik G. Nöroenez İnsanlarda Hayat Boyunca Devam Eder mi? (Derleme). *T.Tıp Öğr Arş D*, 2020;2(1); 1-4.
- Zhang P, Omanskad A, Andere BP, Gandal MJ, Stamova B, Schumannnd CM. Neuron-specific transcriptomic signatures indicate neuroinflammation ve altered neuronal activity in ASD temporal cortex. *PNAS*, 2023;120(10); 1-11.
- Zhang RL, LeTourneau Y, Gregg SR, Wang Y, Toh Y, Robin AM, Zhang ZG, Chopp M. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory ve proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J Neurosci*, 2007;27(12); 3157-3162.
- Zhao C, Deng W. Gage FH. Mechanisms ve functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 2008;132; 645-660.
- Zheng W, Nowakowski RS, Vaccarino FM. Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci*, 2004;26; 181-196.
- Zou WW, Xiao HP, Gu MN, Liu KX, Liu ZQ. Propofol induces rat embryonic neural stem cell apoptosis by activating both extrinsic ve intrinsic pathways. *Molecular Medicine Reports*, 2013;7; 1123-1128.

EKLER



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 07.04.2021

Toplantı Sayısı: 04

Karar No:21/91

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 07.04.2021 tarihinde
Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zühal HAMURCU	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
İzzet Burçin SATICIOĞLU	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTAI
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMiŞ	Veteriner Hekim	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.'dan Doç. Dr. Gökçen DİNÇ tarafından sunulan "Ratlarda Hipokampus Kaynaklı Nöral Kök Hücrelere Propiyonik Asit Ve Likopenin Etkilerinin Araştırılması" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 07.04.2021

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

RATLARDA HİPOKAMPÜS KAYNAKLI NÖRAL KÖK HÜCRELERE PROPIYONİK ASİT VE LİKOPENİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 4	% 2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr	% 2
İnternet Kaynağı		
2	dergipark.org.tr	<% 1
İnternet Kaynağı		
3	acikerisim.pau.edu.tr:8080	<% 1
İnternet Kaynağı		
4	docplayer.biz.tr	<% 1
İnternet Kaynağı		
5	Çentek, Eren. "Yerden ısıtılmalı oda havalandırmasında iterasyona başlama ve giriş türbülans parametrelerinin akış ve sıcaklık dağılımı üzerine etkisi", Bursa Uludağ University (Turkey), 2023	<% 1
Yayın		
6	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	<% 1
İnternet Kaynağı		
7	www.egejfas.org	<% 1
İnternet Kaynağı		
8	Semen, Zeynep. "Deve sütü laktoferrin'in kolorektal adenokarsinoma hücre hattı (Caco-2) üzerine antitümöral etkinliği", Ankara Üniversitesi (Turkey), 2024	<% 1
Yayın		

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Fatih Serdar ŞAHİN

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti (T.C.)

İŞ/DENEYİM

Tarım ve Orman Bakanlığı/ Kayseri Valiliği - Hayvan Sağlığı Birimi
2013-Halen

Semptom Dergisi (ISNN NO: 2757-7562 Dergi Hazırlama Kurulu Üyeliği)
2021-2022

2. Hudut Taburu/Kilis (Akerlik Hizmeti-Yedek Subay)
2012-2013

ERÜ Tıp Fakültesi Mehmet Kemal Dedeman Hematoloji-Onkoloji Hastanesi Hematoloji BD. 2010-2012

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora Kayseri	ERÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre ABD	Halen
Yüksek Lisans Kayseri	ERÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre ABD	2018
Yüksek Lisans Kayseri	ERÜ Veteriner Hekimliği Fakültesi	2010
Lise Kayseri	Kayseri Lisesi	2003

YAYINLAR:

- 1) Şahin FS. Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin AYGÜN & Veteriner Hekimlik, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Bilimsel Yayınları Tanıtım Kulübü; Zoom Derg, 2009;8;46-50.
- 2) Şahin C. Pala C. Kaynar L. Altuner Torun Y. Cetin A. Kurnaz F. Sıvgın S. Ve Sahin FS. Measurement of Hair Iron Concentration as a Marker of Body Iron Content, Biomedical Reports 3: 383-387, 2015
- 3) Şahin FS. Nöral Kök Hücreler,Düşünce,Beslenme ve Psikoloji. Semptom Derg, 2022;5;52-53.
- 4) Kanmaz YA, Yılmaz S, Özen A and Şahin FS, 2024. Isolation and Characterization of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells (ADSCs) from Sheep and Goats. Pak Vet J, 44(4): 1193-1200.

KURS ve SERTİFİKALAR

- 1) 5-8 Mart 2009 I. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi Kapadokya/NEVŞEHİR
- 2) 14-16 Mayıs 2009 XI. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresi İSTANBUL
- 3) 26-27 Haziran 2009 Türkiye Bilimler Akademisi IV. Kök Hücre Sempozyumu Bilkent/ANKARA
- 4) 5-6 Şubat 2010 I. Ulusal Mezenkimal Kök Hücre Sempozyumu ESKİŞEHİR
- 5) 12-13 Şubat 2010 I. Ulusal Genetik ve Biyoteknoloji Çalıştayı KAYSERİ
- 6) 22-26 Mart 2010 Kocaeli Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu KOCAELİ
- 7) 22-26 Mart 2010 Kocaeli Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi Flow Sitometri Kursu KOCAELİ

- 8) 25-26 Haziran 2010 Türkiye Bilimler Akademisi I. Kök Hücre Kursu ve V. Kök Hücre Sempozyumu Hacettepe Üniversitesi ANKARA
- 9) 1-3 Aralık 2010 Erciyes Üniversitesi Biyoteknoloji ve Araştırma Merkezi & GENECELL Company; II. Embriyonik Stem Cells, Training Course I-III on Management ve Business of Stem Cell Technologies ve Basics of Mammalian Cell Culture Course KAYSERİ
- 10) 15-16 Şubat 2011 Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) & Erciyes Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (ERBİYOTEK) II. Temel Kültürü Kursu KAYSERİ

(Katılımcı)

- 11) 15-16 Şubat 2011 Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) & Erciyes Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (ERBİYOTEK) II. Temel Hücre Kültürü Kursu KAYSERİ

(Organizatör)

- 12) 6 Ekim 2011 1st International Workshop on Stem Cell Research ve Applications KAYSERİ

(Organizatör)

- 13) 6 Ekim 2011 1st International Workshop on Stem Cell Research ve Applications KAYSERİ

(Katılımcı)

- 14) 7-9 Ekim 2011 1st International Conference on Stem Cell Research ve Applications KAYSERİ

(Katılımcı)

- 15) 7-9 Ekim 2011 1st International Conference on Stem Cell Research ve Applications KAYSERİ

(Organizatör)

- 16) 17-19 Şubat 2012 Kanser Kök Hücre Sempozyumu DENİZLİ
- 17) 12-14 Nisan 2012 Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium KAYSERİ

- 18) Araştırıcılar İçin Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 2012 KAYSERİ
- 19) 23-24 Şubat 2016 I.Yaşam bilimleri Sempozyumu KAYSERİ
- 20) 30 Eylül- 2 Ekim 2016 Science Camp of Turkish Equine Veterinary Assoc
Göreme/NEVŞEHİR
- 21) 8-9 Kasım 2017 Veterinary Cardiology ve Ultrasonography Conference ve
Workshop KAYSERİ
- 22) 12-15 Şubat 2018 Advanced Workshop in Nanomedicine ve Nanoscopy/Advanced
Cellular ve Molecular Workshop Erciyes University Betül Ziya Eren Genome ve
Stem Cell Center KAYSERİ

BECERİLER

- 1) İnsan Umbilikal Kord Ven Kaynaklı Endotel Hücre İzolasyonu, Kültürizasyonu ve İdentifikasyonu
- 2) Rat Karaciğer Doku Kültürü
- 3) Rat Kemik İliğı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu, Kültürizasyonu ve İdentifikasyonu
- 4) İnsan Yirmilik Diş Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu, Kültürizasyonu ve İdentifikasyonu
- 5) İnsan Süt Diş Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu, Kültürizasyonu ve İdentifikasyonu
- 6) İnsan Adipos dokudan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu, Kültürizasyonu ve İdentifikasyonu
- 7) İnsan Umbilikal Kord Perifer Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu, Kültürizasyonu ve İdentifikasyonu
- 8) İnsan Perifer ve Umbilikal Kord Kanı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Seperasyonu, İzolasyonu, Kültürizasyonu ve İdentifikasyonu
- 9) İnvitro Kök Hücre Farklılaştırma Yöntemleri

- 10) Temel Flow Sitometri Kullanımı Kök Hücre Karakterizasyonu ve Apoptoz Tayini
- 11) Ruminant Perikard kaynaklı kardiyak kök hücre eldesi ve akım sitometrik karakterizasyonu
- 12) Rat Propiyonik Asit Kaynaklı İnvivo Otizm Hastalık Modeli Oluşturulması
- 13) Rat Hipokampus Kaynaklı Nöral Kök Hücre Eldesi ve Kültürizasyonu.
- 14) Rat Hipokampal Nöral Kök Hücre Tabanlı Propiyonik Asit Kaynaklı İnvitro Otizm Modeli Oluşturulması.
- 14) ELİZA

POSTERLER

- 1) *The Role of Piwil2 in Reprogramming of Human Mesencymal Stem Cells*, S.Ozcan, D.Dabanli, F.S.Sahin, G.Toprak, G.Dinc, H.Akalin ,A.U.Ural, Y.Ozkul, M.Cetin, K.Nayernia, 1st İnternational Conferance on Stem Cell Research ve Applications 7-9 Ekim 2011 KAYSERİ
- 2) *Rabbit Dental Pulp Stem Cell Cultivation*, G.Toprak, S.Ozcan, Z.B.Gönen, D.Dabanli, F.S.Sahin, 1st İnternational Conferance on Stem Cell Research ve Applications 7-9 Ekim 2011 KAYSERİ
- 3) *Stem Cell İsolation From Human Exfoliated Deciduous Teeth*, Z.B.Gönen, S.Ozcan, G.Toprak, D.Dabanli, F.S.Sahin, 1st İnternational Conferance on Stem Cell Research ve Applications 7-9 Ekim 2011 KAYSERİ

GÖREV ALDIĞI TEZLER:

- 1) Kurnaz F. *İnsan Umblical Ven Endotel Hücre Kültüründe TNF-Alfa ile Oluşturulmuş İnvitro Greft Versus Host Hastalığı Modelinde Adrenomedüllinin Sitoprotektif Etkisi*. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Hematoloji BD, Kayseri 2011.
- 2) Şahin G. *Sığır Perikardiyumunda Kök Hücre Varlığının Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2017.

- 3) Kanmaz Aslan Y. *Koyun ve Keçilerde Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve İdentifikasyon*. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Anatomi ABD, Elazığ 2022.
- 4) Şahin G. *Propiyonik Asit Verilen Ratlardan Elde Edilen Nöral Kök Hücrelerin Evresel Takibi ve Değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2025.

VERDİĞİ SEMİNERLER:

- 1) Fatih Serdar Şahin, *H.U.V.E.C. ve Hazırlanma Yöntemleri*, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mehmet Kemal Dedeman Onkoloji ve Hematoloji Hastanesi 12 Ocak 2012 KAYSERİ
- 2) Fatih Serdar Şahin, *Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün & Kök Hücrenin Geçmişi ve Geleceği*, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD, Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesi 11 Mart 2016 KAYSERİ
- 3) Fatih Serdar Şahin, *Kök Hücrenin Tarihçesi & Veteriner Hekimliğinde Klinik Kullanımı*, Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD, Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesi 20 Ekim 2016 KAYSERİ
- 4) Fatih Serdar Şahin, *Ütopayı Gerçeğe Dönüştüren Bilim: Kök Hücre*, Veteriner Eğitim Bilim ve Araştırma Kongresi 2-5 Mart 2017 KAYSERİ