

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı**

**MPTP FARE MODELİNDE NÖRAL KÖK HÜCRE  
TRANSPLANTASYONU VE MELATONİN'İN PARKİNSON  
HASTALIĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hazırlayan  
Elgin Orçum UZUNLU**

**Danışmanlar  
Prof. Dr. Müberra KOŞAR  
Doç. Dr. Mükerrerem Betül AYCAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Nisan 2015  
KAYSERİ**

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı**

**MPTP FARE MODELİNDE NÖRAL KÖK HÜCRE**  
**TRANSPLANTASYONU VE MELATONİN'İN PARKİNSON**  
**HASTALIĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hazırlayan**  
**Elgin Orçum UZUNLU**

**Danışmanlar**  
**Prof. Dr. Müberra KOŞAR**  
**Doç. Dr. Mükerrerem Betül AYCAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Nisan 2015**  
**KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

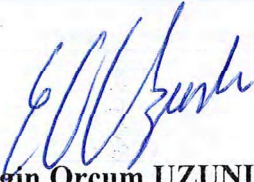
Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Elgin Orçum UZUNLU

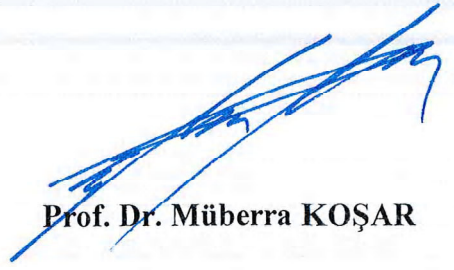
İmza:

**YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

“MPTP Fare Modelinde Nöral Kök Hücre Transplantasyonu ve Melatonin’in Parkinson Hastalığı Üzerine Etkisi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

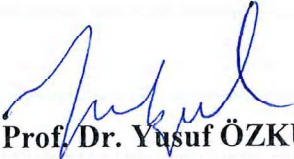
Elgin Orçum UZUNLU

**Danışmanlar**

Prof. Dr. Müberra KOŞAR



Doç. Dr. M. Betül AYCAN

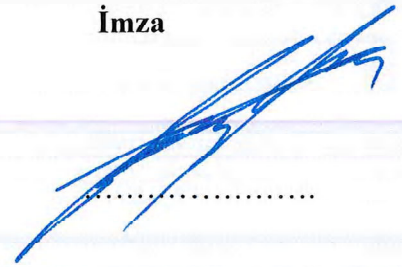
**Anabilim Dalı Başkanı**

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

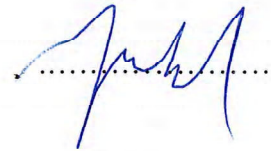
**Prof. Dr. Müberra KOŞAR ve Doç. Dr. M. Betül AYCAN** danışmanlığında **Elgin Orçun UZUNLU** tarafından hazırlanan “**MPTP Fare Modelinde Nöral Kök Hücre Transplantasyonu ve Melatonin’in Parkinson Hastalığı Üzerine Etkisi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı**’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**JÜRİ:****İmza**

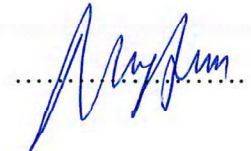
Danışman: Prof. Dr. Müberra KOŞAR  
(ERÜ Eczacılık Farmakognozi ABD)



Üye: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL  
(ERÜ Tıp Fak. Genetik ABD)



Üye: Prof. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ  
(Mersin Üni. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ABD)

**ONAY:**

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

...../...../.....

**Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR**  
**Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin deneysel çalışmalarımı yurt dışında yürütmem için gerekli maddi desteği almamda yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Fahrettin KELEŞTEMUR'a ve Rektör Yardımcısı Prof. Dr. Abdulhakim ÇOŞKUN' a,

Öğrenciliğim sırasında ve tez çalışmam süresince ilgi ve yardımlarıyla bana destek olan, yurt dışında eğitim almamı sağlayan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Müberra KOŞAR' a ve sayın Doç. Dr. M. Betül AYCAN' a,

Çalışma materyalinin sağlanmasında, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım Granada Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Germaine ESCAMES' e ve tüm Granada Üniversitesi Biyomedikal Araştırma Merkezi Biyoteknoloji Enstitüsü çalışanlarına,

Başta Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL olmak üzere anabilim dalında görevli tüm öğretim üyelerine ve tecrübelerinden yararlandığım öğrenci arkadaşım Fatih Serdar ŞAHİN'e,

Ayrıca bana her zaman güvenen, maddi ve manevi desteğini üzerimden hiç eksik etmeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elgin Orçum UZUNLU

Nisan 2015 Kayseri

# MPTP FARE MODELİNDE NÖRAL KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU VE MELATONİN'İN PARKİNSON HASTALIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Elgin Orçum UZUNLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Nisan 2015

Danışman: Prof. Dr. Müberra KOŞAR

İkinci Danışman: Doç.Dr. Mükerrrem Betül AYCAN

## ÖZET

Parkinson hastalığı (PH), dopamin sentezleyen nöronların kaybı sonucu dopamin transferindeki bozukluklar ile karakterize kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Sonucunda motor fonksiyonlarında bozulmalar meydana gelmektedir. Bu çalışmanın amacı N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin'i (MPTP) farelerde kullanılarak Parkinson hastalığı modeli oluşturmak, kayba uğrayan dopaminerjik nöronların, nöral kök hücre (NKH) transplantasyonu ile telafisini sağlamak ve melatonin (aMT) hormonu ile bu transplantasyonun desteklenmesidir. Araştırmada 12 adet C57BL/6 erkek fare, rastgele eşit sayıda 4 gruba ayrıldı. Gruplar hiçbir uygulama yapılmayan genel kontrol (Grup 1), MPTP uygulaması ile Parkinson modeli oluşturulduktan sonra Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) uygulanan Parkinson grubu (Grup 2), Nöral Kök Hücre (NKH) transplantasyonu yapılan Parkinson+NKH grubu (Grup 3) ve NKH transplantasyonu yapılan ve transplantasyon sonrası sularına melatonin (aMT) katılan Parkinson+NKH+Melatonin grubu (Grup 4) şeklinde oluşturuldu. Gruplardaki fareler ad-libitum (geleneksel) yem ve su ile beslendi ve gece 00:00–04:00 saatleri arasında video görüntüsü alınarak lokomotor aktivitelerine bakıldı. Perfüzyon işlemi sonucunda beyinleri çıkartılıp immuno histokimyasal boyama ile dopamin sentezinin başlangıcında gerekli enzim olan Tirozin Hidroksilaz (TH) aktivitesi incelendi. Tedavi gruplarında TH immün pozitif hücre sayısının Parkinson grubuna göre arttığı gözlemlendi. Locomotor aktivitenin Parkinson grubunda anlamlı derecede azaldığı, tedavi gruplarında ise önemli bir artış gösterdiği belirlendi. Bu sonuçlar Parkinson grubunda beyin sapı dopaminerjik nöron sayısında anlamlı bir kayıp olduğunu; NKH transplantasyonunun ise bu nöronlarda göreceli bir artışa sebep olduğunu ve melatoninin bu etkiyi arttırdığını göstermiştir. MPTP ile Parkinson modeli oluşturulmuş C57BL6 farelerde NKH transplantasyonuna melatonin hormonunun etkisi ilk olarak bu çalışma ile incelenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Nöral Kök Hücre, Parkinson hastalığı, Melatonin, MPTP

**THE EFFECTS OF NEURAL STEM CELL TRANSPLANTATION AND  
MELATONIN TREATMENT IN MPTP MOUSE MODEL OF PARKINSON'S  
DISEASE**

**Elgin Orçum UZUNLU**

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences**

**Department of Stem Cell Sciences**

**M.Sc Thesis, April 2015**

**Supervisor: Prof. Dr. Müberra KOŞAR**

**Second Supervisor: Doç.Dr. Mükerrerem Betül AYCAN**

**ABSTRACT**

Parkinson's disease is a chronic neurodegenerative disorder characterized by disturbances in the transfer out of dopamine because of losing dopamine expressing neurons. As a results of motor function deterioration occurs. The aim of this study, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) using to generate the model of Parkinson's disease, neural stem cells (NSC) transplantation to provide compensation for the loss of dopaminergic neurons and support to treatment with Melatonin (aMT). In this study, 12 of C57BL/6 male mice randomly divided into 4 groups. Groups 1; control vehicle, Group 2; Parkinson group that phosfate buffer saline (PBS) transplantation after the MPTP treatment, Group 3; Parkinson+NSC group that NSC transplantation, Group 4; Parkinson+NSC+melatonin group that NSC transplantation and waters made of melatonin (aMT) after transplantation. After the animals had free access to water and food throughout the experiment, the video image viewed the locomotor activity between 12:00 a.m. and 04:00 a.m. Brains were removed after perfusion process and tyrosine hydroxylase (TH) activity which is essential for dopamine synthesis was examined by immunohistochemical staining. The amount of TH immuno positive cells were found to be higher in treatment groups than Parkinson group. Locomotor activity were also significantly reduced in Parkinson group while both treatment groups significantly increased it compared to Parkinson group. These results shown that dopaminergic neurons significantly decrease in Parkinson group and transplantation of NSC caused a relative increase in these neurons and aMT enhances this effect. In this study, the melatonin's effects to NSC transplantation in MPTP induced C57BL6 mice model of Parkinson were investigated for the first time.

**Key Words:** Neurol Stem Cell, Melatonin, Parkinson Disease, MPTP.

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK .....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	x
TABLolar VE ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Parkinson Hastalığı.....	2
2.1.1. Parkinson Hastalığı Tanımı, Belirtileri ve Tarihçesi.....	2
2.1.2 Parkinson Hastalığının Sınıflandırılması.....	3
2.1.3. Parkinson hastalığının etiyolojisi .....	4
2.1.4. Parkinson hastalığının patolojisi .....	4
2.1.5. Parkinson hastalığının epidemiyolojisi .....	5
2.1.6. Dopamin sentezi ve tirozin hidroksilaz .....	6
2.2. Kök Hücre .....	6
2.2.1. Kök Hücrenin Tarihçesi .....	7
2.2.2. Kök hücrenin özellikleri .....	9
2.2.3. Kök hücre çeşitleri .....	11
2.2.4. Nöral kök hücreler .....	12
2.3. Melatonin Hormonu .....	16
2.3.1. Melatonin sentezi ve salınımı .....	17
2.4. N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP).....	18
2. 4.1 MPTP molekülünün keşfi ve sınıflandırılması .....	18
2. 4.2. MPTP'nin etki mekanizması .....	18
2. 5. Probenesit.....	19

3.GEREÇ VE YÖNTEM .....	21
3.1. Materyal .....	21
3.2. Çalışma Popülasyonu.....	21
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler Çözeltiler .....	21
3.4. Kullanılan Aletler .....	26
3.5. Deney Protokolü.....	26
3.5.1 Nöral Kök Hücre İzolasyonu, Primer Kültürü ve Farelerin Diseksiyonu .....	26
3.5.2. Kültürdeki hücrelerin pasajlanması.....	29
3.5.3. Transplantasyonda kullanılacak hücrelerin hazırlanması.....	32
3.5.4. C57/BL6 farelerde MPTP/Probenesit kullanılarak kronik parkinson modeli oluşturulması .....	33
3.5.5. NKHlerin C57/BL6 farelere transplantasyonu .....	33
3.5.5.1. Farelerin transplantasyona hazırlanması.....	33
3.5.5.2. NKH'lerin MPTP fare modeline transplantasyon .....	33
3.5.5.3. Transplantasyon Sonrası Farelerin Bakımı .....	35
3.5.5.4. Lokomotor Aktivitenin Ölçülmesi.....	36
3.5.5.5. Perfüzyon .....	37
4.BULGULAR .....	38
4.1. Locomotor aktivite .....	38
4.2. İmmunohistokimyasal Boyama.....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
6.KAYNAKLAR .....	46
ÖZGEÇMİŞ	

## KISALTMALAR

$\mu$ M	:	Mikromol
$\mu$ L	:	Mikrolitre
NKH	:	Nöral Kök Hücre
EKH	:	Embriyonik Kök Hücre
MPTP	:	N-metil-4-fenil-1.2.3.6- tetrahidropiridin
RPM	:	Dakikadaki Dönme Sayısı (Rotation Per Minute)
g	:	g kuvveti
PH	:	Parkinson hastalığı
aMT	:	Melatonin
ALS	:	Motor nöron hastalığı (Amyotrofik lateral skleroz)
MPP+	:	1-metil-4-fenil-piridinium iyonu
MPDP	:	1-metil-4-fenil-2.3-dihidropiridin
MAO-B	:	Monoamin oksidaz B
GFP	:	Yeşil Florasan Protein (Green Floresent Protein)
PBS	:	Fosfat tuzlu su tamponu (Phosphate buffered saline)
DMEM/F12	:	Dulbecco'nun modifiye Eagle Solüsyonu (Dulbecco's Modified Eagle Medium" Ham's F12)
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
FGF	:	Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor)
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)
FBS	:	Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
HBSS	:	Hank'ın dengeli tuz solüsyonu (Hank's Buffered Salt Solution)
NGF	:	Sinir büyüme faktörü (Nerve growth factor)
PBS	:	Fosfatla tamponlanmış salin (Phosphate buffered saline)
PS	:	Penisilin-Streptomisin

BSA	:	Sığırdan elde edilmiş albümin (Albumin, from bovine serum)
FCS	:	Fötüs buzağı serum (Föetal Calf Serum)
SHNT	:	Somatik Hücre Nükleus Transferi
IPSCCELL	:	İndüklenmiş pluripotent kök hücre (Induced Pluripotent Stem Cell)
IUPAC	:	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
Mg	:	Miligram
Kg	:	Kilogram
SVZ	:	Sub ventrikal bölge (Subventricular zone)
SCZ	:	Sub kallosal bölge (Subcallosal zone)

## TABLOLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b> Kök Hücrenin Tarihsel Süreci.....	7
<b>Tablo 4.1.</b> Gruplardaki farelerin 4 saatlik süre içerisinde kat ettikleri ortalama mesafelere ait veriler..	39
<b>Tablo 4.2.</b> Gruplardaki farelerin 4 saatlik süre içerisinde dinlenerek geçirdikleri toplam süreye ait yüzde verileri.....	40
<b>Şekil 2.1.</b> Dopamin sentezi .....	6
<b>Şekil 2.2.</b> Kök hücrelerin bölünme şekilleri.....	10
<b>Şekil 2.3.</b> Nöral Kök Hücre ve kaynaklık ettiği hücreler.....	13
<b>Şekil 2.4.</b> Sagittal kesitten subventrikal bölgeye bakış ve Nörosfer görünümü .....	14
<b>Şekil 2.5.</b> Yetişkin Merkezi Sinir Sistemindeki farklı nörojenik bölgeler .....	15
<b>Şekil 2.6.</b> Melatoninin moleküler yapısı. ....	17
<b>Şekil 2.7.</b> Pineal gland'da melatonin sentezinin kontrolü.....	18
<b>Şekil 2.8.</b> Probenesit'in moleküler yapısı. ....	20
<b>Şekil 3.1.</b> SVZ'nin çıkarılmasına ait resimler .....	27
<b>Şekil 3.2.</b> Nöral Kök Hücrelerin izolasyonu ve primer kültüre ait resimler. ....	27
<b>Şekil 3.3.</b> Besi yerinden hücrelerin uzaklaştırılmasına ait resimler. ....	29
<b>Şekil 3.4.</b> Nöral Kök Hücrelerin besi yerine ekimine ait resimler..	32
<b>Şekil 3.5.</b> Tansplantasyonun aşamalarına ait resimler.....	34
<b>Şekil 3.6.</b> Farede Bregma ve Lambda'nın yeri.....	35
<b>Şekil 3.7.</b> Deney Grupları .....	36
<b>Şekil 3.8.</b> İmmunohistokimya için hazırlanmış beyin dokusu .....	36
<b>Şekil 4.1.</b> Beyin dokusunun immunohistokimyasal boyama resimleri .....	41
<b>Grafik 4.1.</b> Gruplardaki farelerin 4 saatlik süre içerisinde kat ettikleri ortalama mesafelere ait verilerin grafikte görünümü .....	39
<b>Grafik 4.2.</b> Gruplardaki farelerin 4 saatlik süre içerisinde dinlenerek geçirdikleri toplam süreye ait yüzde verilerinin grafikte görünümü. ....	40

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu hastalıkta dopaminerjik nöronlar üzerinden dopamin transferindeki bozukluklar belirleyici özelliştir. Bu dopamin iletimindeki bozukluk nedeniyle ekstrapiramidal motor fonksiyonlarında bozulmalar meydana gelmektedir. Bu şekilde hastaların yaşam kalitesi düşmekte ve kendi kendilerini kontrol etmeleri imkânsız hale gelmektedir. Bu rahatsızlık kişiyi yatağa bağımlı hale getirmektedir. Hastalığın tedavisinde ise antikolinergik ilaçlar ve uzun süreli kullanımlarında bağımlılık geliştiren benzodiazepinler gibi nörolojik ilaçlar kullanılmaktadır. Ayrıca bu ilaçlar kesin bir çözüm de getirmemektedir. Bazen çok erken yaşlarda dahi bu rahatsızlık gelişebilmektedir. Bu nedenle bu hastalığın tedavisinde daha az toksik ürünlerin kullanılması ve alternatif tedavi yöntemlerinin arayışı ise büyük bir ivme ile devam etmektedir. Bu modern tedavi yöntemleri arasında kök hücre tedavisi de büyük önem kazanmıştır. Herhangi bir kimyasal madde uygulamaksızın kişinin kendi hücreleri ile hastalıklar bu yöntem kullanılarak tedavi edilebilmektedir.

Bu kapsamda bu projede PH' de kök hücre ve melatonin tedavisinin etkisi incelenecektir. Projenin amacı MPTP fare modelinde nöral kök hücre transplantasyonu ve melatonin uygulamasının Parkinson hastalığı üzerine etkilerinin incelenmesidir.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Parkinson Hastalığı

#### 2.1.1. Parkinson Hastalığı Tanımı, Belirtileri ve Tarihçesi

Parkinson hastalığı (PH), kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. PH'nin başlıca özelliği *Substantia nigra*'nın *Pars compacta* bölümünde dopamin ileten nöronların seçici ve aşamalı olarak kaybıdır. Dopamin üreten nöron seviyesinin *Stratium*'da düşmesi extrapiramidal motor fonksiyonunun bozulmasına yol açar (1-3). İlk defa 1817 yılında James Parkinson makalesinde hastalığı "titremeli felç" olarak tarif etmiştir. Jean Marie Charcot, Parkinson hastalığının orijinal tanımına kas sertliği, mikrografi, duyuşal değişiklikler gibi birçok özelliği eklemiş ve hastalığa onu tanımlayan ilk kişinin adı olan Parkinson'u vermiştir (4). 1919 yılında Tretiakoff ve ark. ve 1960 yılında da Ehringer ve Hornykiewicz hastalıkla ilişkilili olarak *Substantia nigra*'da dopaminerjik nöronların kayba uğradığını açıklamıştır. 1967 yılında da Cotzias ve ark. Parkinson hastalığında levedopa ilacının klinik kullanıma girmesini sağlamıştır (5).

Parkinson hastalığında temel bozukluk, koordine hareketleri düzenleyen beyin bölümlerindedir. Eğer bu bozukluğa yol açan sebep tam bilinmiyorsa İdyopatik Parkinson hastalığı denir.

Hastalığın ana temel belirtileri istirahat tremoru, sertlik, istemli hareketlerin yavaşlaması, durması ve dengeyi koruyamamadır. Titreme ilk ortaya çıkan belirti olup, genellikle başlangıçta tek eldedir. Zamanla aynı taraf bacağı ve karşı ele geçebilir. Sıklıkla hastalıktan vücudun bir yarısı baskın olarak etkilenir. Titreme dinlenirken olup, uyurken kaybolur (istirahat tremoru). İstirahat tremorunda başparmak ya da parmakları etkileyerek saniyede 4-6 Hz hızla "hap sayma" şeklinde hareketler gözlenir (6). Sinirlilik ve yorgunluk titremeyi artırır. Sertlik veya katılık boyun kaslarından başlar ve

başın gövdede öne doğru itilmesine sebep olur. Bel kemiği de etkilenip bel hafif öne eğilir, diz, kalça ve kol eklemleri bükük hal alır. Hasta, küçük hızlı adımlarla sendeleyerek yürür, hantallaşır, saatlerce oturur. Yazıya büyük başlar, harfler gittikçe küçülür ve yazının okunması güçleşir. Monoton bir konuşması vardır. Kasların tonusu arttığı için (sertleşme) bükülü kolun açılmaya çalışılması sırasında dişli çark hareket ettiriliyormuş hissi alınır. Pierre Marie tarafından tanımlanan göz kırpmada azalma yararlı bir erken bulgudur. Yüzdeki kas faaliyetleri (mimik ve jestler) silinir. Yüzde donuk bakış (Stellwag bulgusu), anlamsız çehre (maske yüz) vardır. Hareketlere başlamakta güçlük çeker, cildi yağlanır ve hastaların % 40'ında bunama görülür. Kelimelerin son hecesini tekrar eder. Gözünü kırpmaması söylendiği halde burun köküne vurulunca göz kırpma hareketi kontrol edilemez. Gözlerin yukarıya doğru dakikalar hatta saatlerce kayması da, hastayı çok rahatsız eden bir durumdur (7).

### **2.1.2 Parkinson Hastalığının Sınıflandırılması**

#### **1- Primer (İdyopatik) Parkinsonizm**

Nedeni: Parkinson hastalığı ve Jüvenil Parkinsonizm (8).

#### **2- Sekonder (Edinsel, semptomatik) Parkinsonizm**

Nedeni: İnfeksiyöz hastalıklar (Postensefalitik, yavaş virüs enfeksiyonu, AIDS), ilaçlar (Dopamin reseptör blokerleri), toksinler (MPTP, CO, Mn, Hg, metanol, etanol), vasküler hastalıklar (Multienfarkt demans, Binswanger Hastalığı), travmalar (Boksör ensefalopatisi), hipoksi, metabolik hastalıklar (Paratiroid hastalıkları, hipotiroidi, hepatoserebral dejenerasyon), hemiparkinsonizm-hemiatrofi ve diğer hastalıklar (beyin tümörleri, normal basınçlı hidrosefali, siringomezensefali).

#### **3- Heredodejeneratif Parkinsonizm**

Nedeni: Huntington hastalığı, Wilson hastalığı, Hallervorden- Spatz hastalığı, Familial Olivopontoserebellar atrofi, Familial bazal gangliyon kalsifikasyonu (Fahr hastalığı), Seroid-lipofuksinoz, Gerstmann-Straussler-Scheinker Hastalığı, Machodo-Joseph hastalığı, Periferik nöropatili ailesel Parkinson, Nöroakantositozis, Lubag (Filipino X'e bağlı distoni ve parkinsonizm tablosu), Striatal nekrozlu mitokondrial sitopatiler.

#### 4- Parkinson Plus Sendromlar

Nedeni: Progresif supranükleer paralizi (PSP), Kortikobazal-gangliyonik dejenerasyon (KBGD), Multisistem Atrofiler (MSA) [Shy-Drager sendromu (SDS/MSA-A)/Striatonigral dejenarasyon (SND/MSA-P)/Sporadik olivopontoserebellar atrofi (OPCA/MSA-C)], Guam'ın parkinsonizm-demans-ALS kompleksi (PDACG), Parkinsonizm-primer demans kompleksi, Progresif pallidal atrofi – pallidonigral dejenerasyon, Pallidopiramidal hastalık.

##### 2.1.3. Parkinson hastalığının etiyojisi

Normal olarak insan beyinde belli bölgelerde dopamin üreten beyin hücreleri (nöronlar) bulunur. Bu hücreler beyin *Substansiya nigra* adı verilen belli bir alanında yoğunlaşmış halde bulunurlar. Dopamin *Substansiya nigra* ile vücut hareketlerini kontrol eden diğer beyin bölgeleri arasında mesajlar ileten bir kimyasaldır. Dopamin insanların akıcı ve koordine hareketler yapmalarını sağlar. Dopamin üreten hücrelerin %60-80' i kayba uğradığında, *striatal* dopamin seviyesi %80-85 oranında azalır ve yeterli miktar dopamin üretilemez, böylece Parkinson hastalığının motor belirtileri ortaya çıkar. Beyin hücrelerindeki bu yetersizlik süreci nörodejenerasyon olarak adlandırılır. Mevcut kurama göre Parkinson hastalığının en erken belirtileri enterik sinir sistemi, alt beyin sapı ve beyin kökü yollarında ortaya çıkmaktadır. Bu kurama göre Parkinson hastalığı bu bölgelerden beyin daha üst bölümlerine yani *Substansiya nigra* ve beyin kabuğuna doğru yayılım gösterir. Bu kuram koku duyusu kaybı veya azalması, uyku bozuklukları ve kabızlık belirtilerinin hastalığın titreme ve hareketlerde yavaşlama gibi motor belirtilerinden yıllarca önce başlaması ile destek bulmaktadır.

Bu nedenle son yıllarda araştırmacılar hastalığın erken döneminde beliren bu motor olmayan belirtilerini mümkün olduğunca erken belirleyerek hastalığın ilerlemesini durdurmanın yollarını aramaktadırlar (9).

Parkinson hastalığında *Lokus seruleus*, rafe çekirdeği ve Meynert'in bazal çekirdeği gibi birçok diğer dopaminerjik ve dopaminerjik olmayan hücre gruplarında da nöropatolojik bulguların olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (10 ).

##### 2.1.4. Parkinson hastalığının patolojisi

*Substantia nigra*'da nöronal kayıp ve gliozis yanında, kalan nöronlarda intrasitoplazmik eozinofilik Lewy cisimcikleri ve interselüler alanda Lewy nöritlerinin varlığı ile

tanımlanır. Lewy cisimcikleri alfa-sinuklein, ubikitinin, parkin ve nöroflamanlar gibi çeşitli proteinlerden oluşurlar (10). Ancak; parkin mutasyonu ile bağlantılı kalıtsal Parkinson olgularında; Lewy cisimciklerinin olmaması bu eozinofilik inklüzyon cisimlerinin PH tanısı için patolojik bulgu olmadığını düşündürmektedir.

### **2.1.5. Parkinson hastalığının epidemiyolojisi**

Türkiye’de 100000 civarında Parkinson hastası olduğu tahmin edilmektedir. Her yıl yaklaşık 10000 civarında yeni hastaya teşhis konulmaktadır. Tüm dünyada 10 milyon hasta olduğu bilinmektedir. Parkinson hastalığı prevalansı 60-90 yaşları arasında artmaktadır. Tüm popülasyonun % 0.3’ünü 65 yaş üstü insanların ise %3’ etkilemektedir. Hastaların % 5-10’unda semptomlar 40 yaşın altında ortaya çıkmaktadır. (8).

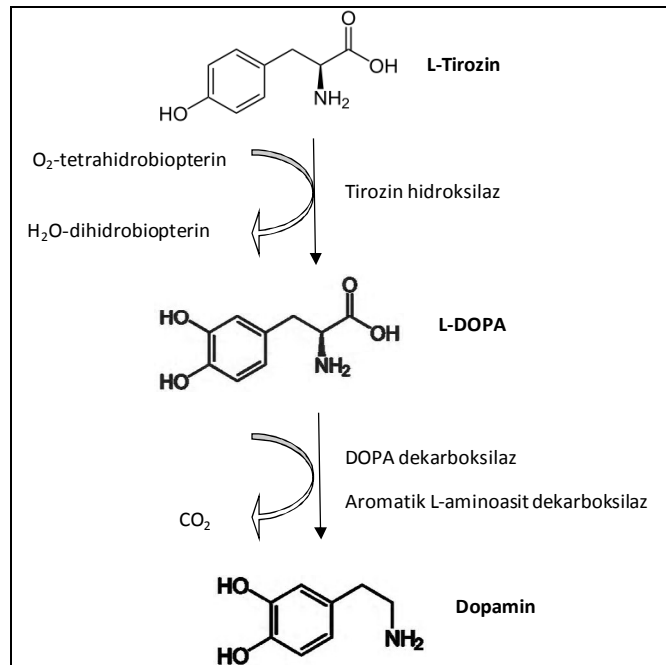
Parkinson hastalığı, beyinde eksilmiş olan dopamini yerine koyma amacıyla hayat boyu ilaç tedavisi gerektirmektedir. Günümüzde hastalığı ortadan kaldıran kesin bir tedavinin henüz bulunmamasına karşın, mevcut ilaçlar belirtileri büyük ölçüde düzeltmekte ve birçok hastanın aktif ve üretken bir şekilde yaşamını sürdürmesini sağlayabilmektedir. Böylece Parkinson hastalarının çoğu, düzenli tedaviyle uzun yıllar mutlu olarak yaşarlar. İlaç seçiminde hastanın yaşı, hastalığın şiddeti, önde gelen belirti ve hastayı en fazla rahatsız eden şikâyet göz önüne alınır (11).

İlaçlara daima küçük dozlardan başlanır, gerekirse doz yavaş yavaş artırılır. Dopamin beyne geçemediği için onun ön maddesi olan ve beyinde dopamine çevrilen levodopa'nın farklı enzim kombinasyonlarıyla olan preparatları verilir. Levodopa güçlü bir ilaç olmasına karşın hastalık belirtileri yeni başlamış ya da hafif derecede iken özellikle genç yaştaki hastalara hemen verilmemesi genelde tercih edilir. Çünkü etkinliğinin 5-6 yıl içinde azaldığı veya vücutta istem dışı aşırı hareketlere yol açtığı bilinmektedir. Parkinson hastalığında levodopa dışında dopamine benzer etkiye sahip birçok başka ilaç da yaygın olarak kullanılmaktadır (apomorfin, bromokriptin, pramipeksol, kabergolin, lisurid, pridedil, ropinirol). Bu grup ilaçlar ya başlangıç tedavisi olarak tek başına ya da levodopaya eklenerek kullanılabilir. Her hastada tedavi seçimi ve dozları farklıdır. Hekim, hastanın tedavisinde uygun ilaç dozlarını buluncaya kadar birçok kez değişiklik yapabilir. Parkinson hastalığının uzun süreli bir hastalık olması nedeniyle hasta ile hekimin işbirliği şarttır (11).

Kullanılan bu nörolojik ilaçlar kişiyi farklı şekillerde de etkilediklerinden günümüzde farklı alternatif tedavi yöntemleri aranmaktadır. Bunlardan birisi de kök hücre tedavileridir. Günümüzde pek çok hastalığın tedavisinde kök hücre çalışmaları hızla devam etmektedir.

### 2.1.6. Dopamin sentezi ve tirozin hidroksilaz

Sentez işlemi tirozinin kandan, aktif taşıma pompa ile nöron içine alınmasıyla başlar. Tirozin nöron içinde ilk olarak tirozin hidroksilaz enzimi ile etkileşir ve DOPA ortaya çıkar. İkinci adım DOPA'nın, DOPA dekarboksilaz enzimi ile etkileşmesi sonucunda dopaminin oluşmasıdır (Şekil 2,1).



Şekil 2.1. Dopamin sentezi

## 2.2. KÖK HÜCRE

Kök hücreler, kendini yenileyebilen, sınırsız bölünebilme yeteneğine sahip ve vücudun ihtiyacı olduğunda kendi kökeni dışındaki birden fazla hücreye dönüşebilen özel hücrelerdir (12).

### 2.2.1. Kök Hücrenin Tarihçesi

**Tablo 2.1.** Kök Hücrenin Tarihsel Süreci

Yıl	Gelişme	Kaynak
1878	Memeli yumurtalarını vücut dışında fertilize etme çalışmaları başlamıştır.	
1959	<i>İn vitro</i> fertilizasyon çalışmalarında tavşan üretilmiştir.	(13)
1960	Sıçanlarda teratokarsinomların embriyonik germ hücrelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir.	(14)
1961	James Till ve Ernest Mcculloh, yaptıkları çalışmalar sonucunda hematopoetik kök hücrelerin temel özelliklerini tanımlamışlardır.	(15)
1968	Edwards ve Bavister ilk kez insan yumurtasının <i>in vitro</i> fertilizasyonunu gerçekleştirdiler.	
1970	Kök hücreler, embriyonik gelişimi göstermek amacıyla kültür ortamında çoğaltılmıştır.	
	Stevens, insan primordial germ hücrelerinden embriyonik germ hücreleri elde etmiştir.	
1975	Mintz embriyonik kök hücrelerini geliştirmekte olan bir fare blastosistine enjekte ederek sağlıklı mozaik bir fare elde etmiştir.	
1976	Fridenstein ilk kez fetal buzağı serumu (FCS) kullanarak yapmış olduğu kemik iliği kültürlerinde adhezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonileri bulduğunu ve bunların kemik veya yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir.	(16)
1978	İlk <i>in vitro</i> fertilizasyon bebeği, İngiltere’de doğmuştur.	(17)
	İnsan göbek kordon kanında hematopoietik kök hücreler keşfedilmiştir.	(18)
	Schofield kök hücrede niş kavramını tanımlamıştır.	(19)
1980	Castro-Malaspina, insan kemik iliğinden mezenkimal kök hücreleri izole edip <i>in vitro</i> özelliklerini karakterize etmişlerdir. Bu özellikler adherent olması, monositlere benzer ama fagositik olmaması, faktör VIII üretmedikleri için endotelial hücreden ayrılabilmesi, sitokin üretmesi ve hematopoetik kök hücrelerin gelişimini indükleyebilmesidir.	
1981	Evans ve Kaufman 3,5 günlük blastosistlerin iç hücre kitlesinden fare embriyonik kök hücrelerini elde edip kültürde çoğaltmayı başarmışlardır.	(20)
1989	Pera, üç ana germ tabakasının her birinden, insan embriyonal karsinom hücre dizilerini elde etmiştir.	(21)
1992	Nöral Kök Hücrelerin <i>in vitro</i> kültürü yapılmıştır.	(22)
1994	<i>İn vitro</i> fertilizasyon için gönüllülerce verilen örneklerden insan blastosistleri izole edilmiş ve kültürde 2 pasaj sağlanmıştır.	(23)
1995	Wisconsin Üniversitesi’nde primat embriyonik kök hücreler <i>in vitro</i> şartlarda Rhesus maymunundan elde edilmiştir.	(24)

1996	Campbell, embriyodan elde edilen embriyonik hücrelerden ilk koyun klonlamasını yapmıştır.	
1997	Lösemnin hematopoietik kök hücrelerden köken aldığı anlaşılmıştır ve kanser kök hücreleri ile ilgili ilk doğrudan kanıt elde edilmiştir.	(25)
1998	Wisconsin-Madison Üniversitesi'nden James Thomson, insan blastosistlerinin iç hücre grubundan insan embriyonik kök hücrelerini elde etmiş ve kültürde çoğaltmıştır.	(26)
	Jhon Hopkins Üniversitesi'nde Jhon Gearhart çalışmaları sonucunda, 5-9 haftalık fetusun gonal kıvrım ve mezenter bölgesindeki primordiyal germ hücrelerinin kültürlerinden insan embriyonik germ hücrelerini izole etmiştir.	(27)
	Mayani ve Lansdorp göbek kordonu kanının hematopoietik kök hücre bakımından oldukça zengin olduğunu ve kemik iliği ile büyük benzerlik gösterdiğini bildirmiştir.	(28)
1999	Chapman ve ark. totipotent kök hücrelerin, vücudun her hücre tipini oluşturabilen, tam olarak fonksiyonel bir organizmanın gelişimini sağlayabilen hücreler olduğunu, ayrıca kemik, kas, kıkırdak, yağ ile diğer bağ ve destek dokularını oluşturabilme kapasitesine sahip olan mezenkimal kök hücrelerin özel bir multipotent kök hücre tipi olduğunu da bildirmiştir.	(29)
2001	Wobus, embriyonik kök hücrelerin (EKH) blastosistler içerisine transferini takiben ilk kimerik canlılar elde etmiş ve embriyonik kök hücrelerin yetişkin bir canlının bütün dokularını oluşturabileceğini ortaya koymuştur.	(30)
	Odorico ve ark. hayvan modellerinde pluripotent veya fotal kök hücrelerin transplantasyonu ile diyabet, Parkinson hastalığı, travmatik medulla spinalis hasarı, Pürkinje hücre dejenerasyonu, karaciğer ve kalp yetmezliği, kas distrofisi ve osteogenesis imperfekta gibi çeşitli kronik hastalıkların tedavileri üzerine umut verici çalışmalar yapmıştır.	(32)
2002	Angelo Vescovi ve ekibi, fare beyinlerinden elde ettikleri sinir kök hücrelerini, radyasyona maruz bırakılmış farelere nakletmiş ve sonuçta nakilden 5 ay sonra denek fareler yeni kan hücreleri üretmeye başlamıştır. Yapılan incelemelerde bu kan hücrelerinin, nöral kök hücrelerinden kaynaklandığını kanıtlamışlardır.	(33)
2003	S. Shi yetişkin kök hücre kaynağı olarak çocukların ilk dişlerinin kullanılabileceğini keşfetmiştir.	
	Lisker embriyonik ve yetişkin kök hücreler dışında fotal dokulardan da kök hücreler elde edilebilmekte olduğunu bildirmiştir.	
2004	Hwang Woo-Suk ve ark. insan oositinden bir kaç insan embriyonik kök hücre hattı yarattığını iddia etmiştir.	(33)
2005	Vats ve ark. kemik iliğinden sağlanan progenitörlerin nekroz sonucu hasar gören kalp kasına göç ederek kalp fonksiyonlarını geliştirebildiğini göstermiştir.	(34)
2006	K.Takahashi ve S.Yamanaka'nın "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors" çalışması ve Yamanaka faktörlerinin keşfi ( <i>Oct 4, Sox2, c-Myc ve Klf 4</i> ).	
	Colin McGuckin ve Nico Forraz göbek kordonu kanı kullanarak embriyonik benzeri kök hücreler elde etti.	(35)

	Moon ve ark. kültürden elde edilen EKH'lerde, differensiyasyon olarak ektodermal hücreler sinir hücrelerine; endodermal hücreler pankreatik $\beta$ hücreleri ve karaciğer epitel hücrelerine; mezodermal hücreler de kemik, kas, kan, kıkırdak hücreleri ile bağ ve destek dokularına dönüşebildiklerini açıklamıştır.	
2007	Dr. Anthony Atala insan amniyotik sıvısından kök hücre elde ettiğini ve Amniotik Kök Hücre adını verdiği bu hücrelerden de birçok hücre tipi elde edilebileceği hususunda bir makale yayınlamıştır	(36)
2008	Yamanaka, fare karaciğer ve mide hücrelerinden pluripotent kök hücre elde etmiştir. Bu yeni geliştirilen IPS hücreler daha öncelilere göre embriyonik kök hücrelere daha çok benzemekte ve tümörojenik değildirler.	(37)
	Dejenerasyon oluşmuş dize mezenkimal kök hücreler enjekte edilmiş ve enjeksiyondan 24 hafta sonra MRI incelemesinde karilaj oluşumu gözlemlenmiştir.	(38)
2010	ABD Ulusal Sağlık Enstitüsünde (NIH)'de indüklenmiş Parkinson hastalıklı farelerin beyinlerine Endometriyal kök hücreler enjekte edilmiştir. Araştırmacılar beş hafta sonra hayvanların striatolarını inceledikleri zaman, kök hücrelerin striatum ve substantia nigrayı doldurmuş olduğunu bulmuşlardır.	
	Güney Koreli araştırmacılar tarafından, sağlıklı domuz kıkırdağından geliştirilmiş <i>extracellular matrix scaffold</i> (hücre dışı doku iskelesi) ile tavşan MKH'lerin kombinasyonu kullanılmış, hücre dışı ortam iskelesindeki MKH'lerden kartilaj hücreleri gelişmiş ve sentetik bir scaffold'a göre daha fazla kartilaj benzeri doku üretilmiştir.	(39)

Ülkemizde kök hücre çalışmaları 1960'lı yıllarda Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün tarafından başlatılmıştır ve günümüzde Kayseri, Ankara, İstanbul, Trabzon, Gebze, İzmir ve Antalya'daki çeşitli üniversite ve özel laboratuvarlarda çalışmalar sürmektedir. Sağlık Bakanlığı 2005 yılında yayınladığı genelgeyle insan embriyonik kök hücre araştırmalarının durdurulmasını öngörmüştür (40). Aynı yıl Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA), kök hücre konusundaki araştırmaların taşıdığı stratejik önemi göz önüne alarak Kök Hücre Çalışma Grubu adı altında bilim insanlarının katılımına açık, çok disiplinli bir grup kurmuştur. 2006 yılına gelindiğinde ise Sağlık Bakanlığı yayınladığı ikinci bir genelgeyle bakanlık bünyesinde "Kök Hücre Nakilleri Bilimsel Danışma Kurulu" kurulduğunu ve embriyonik olmayan kök hücre çalışmaları için bir kılavuz oluşturulduğunu bildirmiştir. Genelge, kök hücrelerle klinik deneme yapmak isteyen merkezlerin bu kuruldan izin almalarını öngörmektedir.

### 2.2.2. Kök hücrenin özellikleri

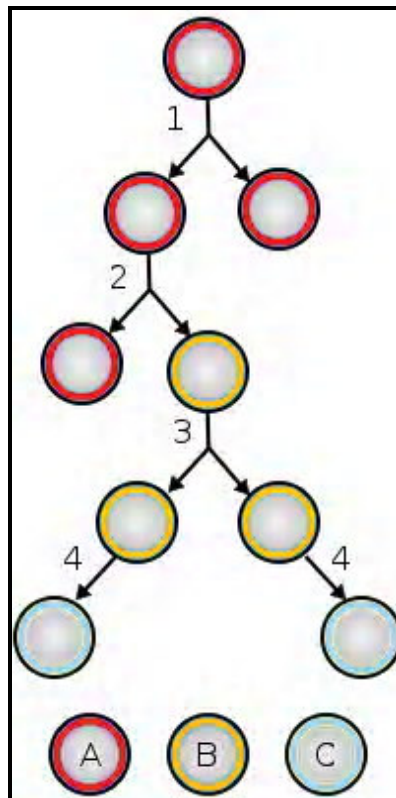
Kök hücreleri vücudun diğer hücrelerinden ayıran bazı özelliklere sahiptir bunlar;

1) Kök hücrelerin sınırsız bölünebilme yeteneği: Hücrelerin bölünme kapasitesini, yani ömrünü belirleyen faktörlerden biri doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve telomer

adı verilen DNA zincirleridir. Hücre her çoğalma döngüsü sırasında ve oksidatif DNA hasarı gibi nedenlerden dolayı telomerik DNA'sının bir kısmını kaybeder. Bu kaybı önlemek amacıyla telomerler, telomeraz enzimi tarafından uzatılırlar. Somatik hücrelerin çoğunda telomeraz etkin durumda değildir. İnsan germ, tümör ve embriyonik kök hücre serilerinde ise telomeraz etkinliği vardır. Bu durum, kök hücrelere sınırsız bölünme özelliği kazandırır (41).

2) Kök hücrelerin kendini yenileyebilme özelliği: Bir kök hücre popülasyonunun var olmasını ve kök hücrenin kendisini yenilemesini sağlayan 2 mekanizma vardır (Şekil 2.2).

- a) Asimetrik hücre bölünmesi (zorunlu asimetrik replikasyon): Bir kök hücre, kendiyile özdeş olan bir ana hücreye bölünür, diğer yavru hücre ise farklılaşır.
- b) Stokastik farklılaşma: Bir kök hücre iki farklı oğul hücreye bölündüğünde, başka bir kök hücre mitozla gider ve ana hücreye özdeş iki kök hücreyi üretir.



**Şekil 2.2.** Kök hücrelerin bölünme şekilleri. A: Kök Hücre; B: Öncül Hücre; C: Farklılaşmış Hücre; 1: Simetrik kök hücre bölünmesi; 2: Asimetrik kök hücre bölünmesi; 3: Öncül bölünme; 4: Son bölünme.

3) Farklılaşma kapasitesi (potensi): Kök hücreler özelleşmiş hücrelere kaynaklık ederler.

- a) Totipotent (omnipotent): Bu hücreler, tüm ve yaşayan bir organizmayı oluşturabilirler (42). Zigot ve blastomer totipotenttir (43). Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir. Totipotent bir hücre, anne kaynaklı uygun destekle yeni bir bireye kaynaklık edebilen hücredir (44).
- b) Pluripotent: Totipotent hücrelerin soyundan gelirler (42). Erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde hücreler, 'blastosist' denilen ortası boşluklu mikroskobik hücre topluluklarına dönüşürler. Blastosist üç yapıdan oluşur; blastosisti çevreleyen hücre tabakası *Trofoblast*, blastosistin içindeki blastosöl boşluğu ve blastosölün sonunda yer alan iç hücre kitlesi (45). İç hücre kitlesi pluripotent özelliğe sahip olup, üç germ tabakasından meydana gelen, embriyonik membranlar hariç bütün hücre tiplerine farklılaşabilirler (43).
- c) Multipotent: Çok sayıda hücreye farklılaşma potansiyelidir. Fetal dönemde hücreler daha özel görevlere sahip olan erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Bu hücreler, tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Örneğin hematopoetik hücreler (43).
- d) Oligopotent: Lenfoit ya da miyeloit hücreler gibi sadece birkaç hücre tipine farklılaşabilirler (43).

4) Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Bir kök hücre, bir kalp kasında olduğu gibi kanı vücuda pompalamak için komşu hücrelerle birlikte çalışmaz, eritrositlerde olduğu gibi oksijeni dokulara taşıyamaz. Ancak, özelleşmiş hücrelere dönüşmek üzere kaynak oluşturabilir.

### 2.2.3. Kök hücre çeşitleri

Kök hücreler temel olarak iki farklı kaynaktan elde edilirler. Bunlar;

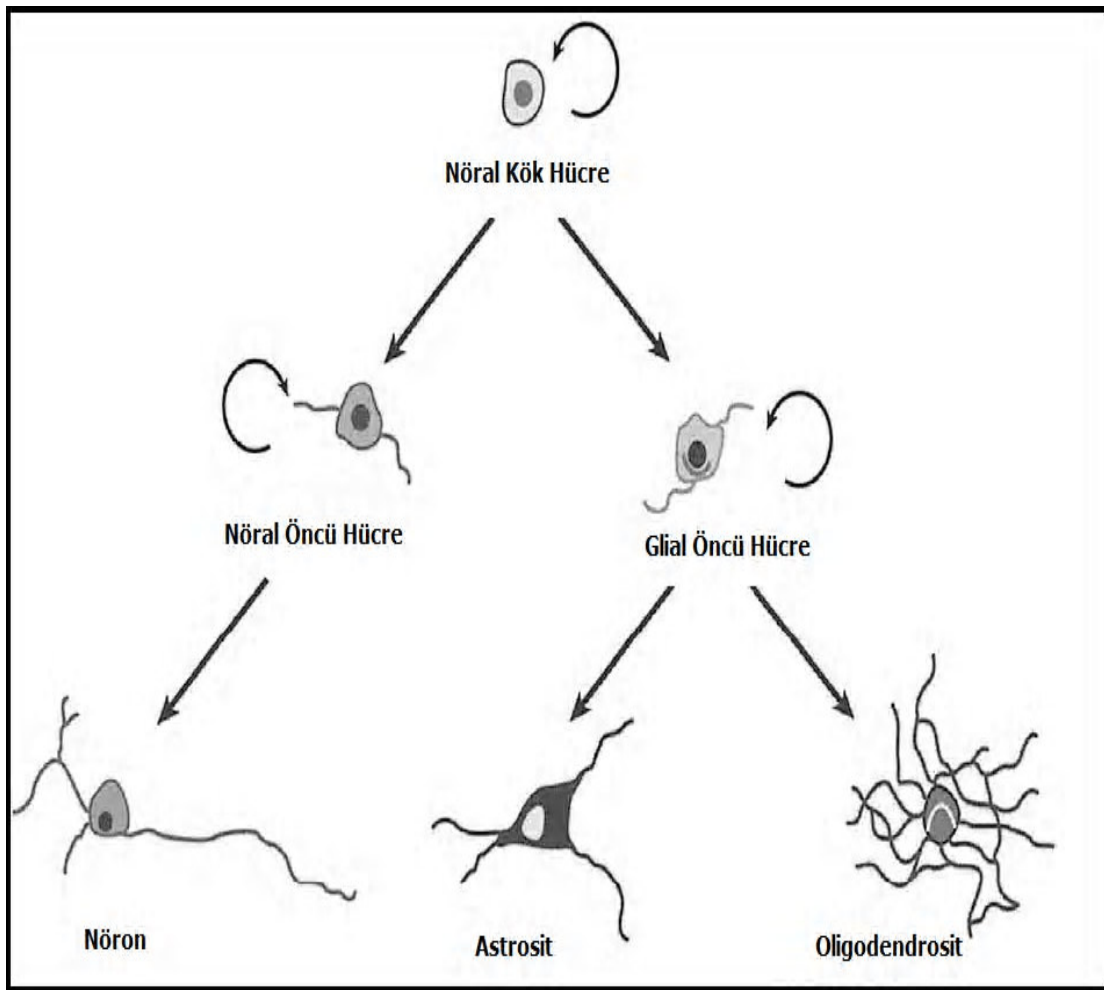
1) Embriyonik kök hücreler (EKH): Embriyo, fertilizasyonun 4. veya 5. gününde "blastosist" denilen içi boşluklu hücre topluluklarına dönüşür. EKH'ler, blastosistin iç hücre kitlesindeki hücrelerden (embriyoblastlar) elde edilir ve pluripotent özelliğe sahiptir.

2) Embriyonik olmayan kök hücreler: Canlının doğumundan sonraki dönemde embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilirler. Embriyonik olmayan kök hücreler organizmada birçok doku veya organda bulunabilir. Embriyonik olmayan kök hücrelerin büyüme, çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri EKH'lere göre daha düşüktür. (47). Embriyonik olmayan kök hücreler kaynaklarına göre alt sınıflara ayrılırlar:

- a) Erişkin kök hücreler
- b) Fetüs kök hücreler
- c) Kadavradan elde edilen kök hücreler
- d) Partonet hücreler
- e) Göbek kordonu ve plasenta kök hücreleridir.

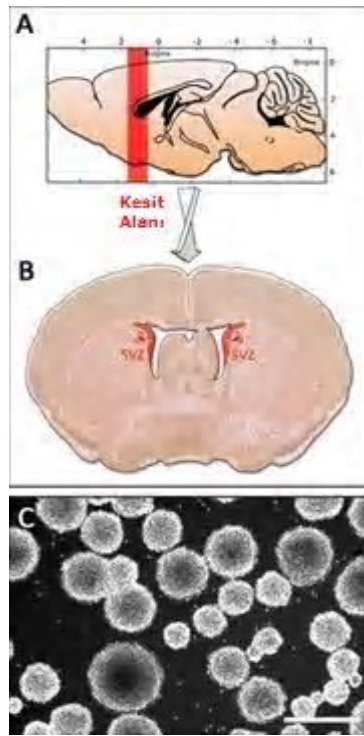
#### **2.2.4. Nöral kök hücreler**

Merkezi sinir sistemi kök hücreleri, omurgasızlarda nöral gelişim sürecinin araştırılması sırasında nöral öncül hücrelerin bulunması ile keşfedilmiştir. Merkezi sinir sistemi Kök Hücreleri embriyonik, fetal ve yetişkin sinir sisteminden izole edilebilirler. NKH'lerin fonksiyonu, birçok NKH oluşturabilmesi ve projenitor hücrelere farklılaşabilmesidir. MSS kök hücreleri, MSS bölgesine bağlı olarak glial, astrosit ve oligodentrositlere köken oluşturabilir (Şekil 2.3).



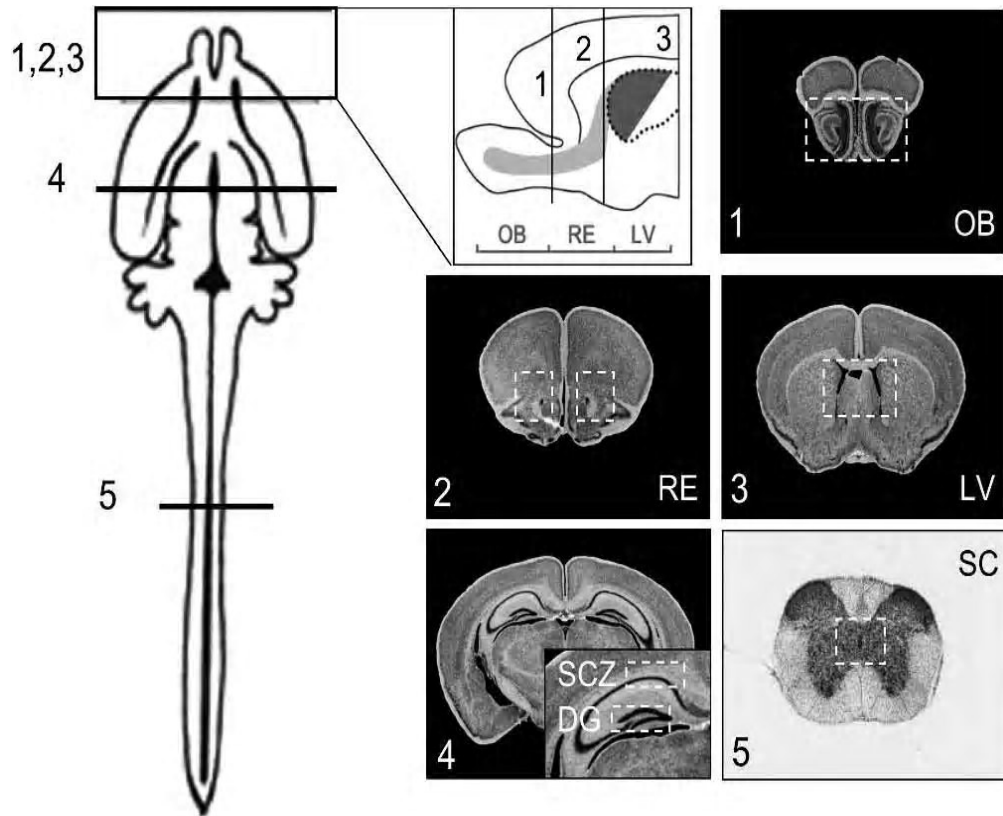
Şekil 2.3. Nöral Kök Hücre ve kaynaklık ettiği hücreler.

Fötal ve Yetişkin Nöral Kök Hücreler; NKH'ler ilk olarak sıçanların *stratumunda*, *subventrikular bölgede (SVZ)* ve *neonatal* gelişimdeki memeli embriyosunun ön beyinde bulunmuştur. Nöral kök hücrelerin kültürdeki en önemli özelliği nörosfer oluşturmalarıdır (Şekil 2.4) (47-49). Bu multipotent özellikteki glial hücreler (*radial glia*) SVZ'de tanımlanmıştır (50). Radial glia hücreleri yetişkinlikle beraber SVZ'den kaybolurlar ve yerlerini *multiciliated ependimal* hücrelere bırakırlar. Radial glia hücreleri, gelişmekte olan memeli beyinde, sürüngenlerin ve kanatlıların sinir sisteminde, öncül görevi görürler (51).



**Şekil 2.4.** Sagittal kesitten SVZ'ye bakış A, Neonatal fare SVZ görüntüsü B, 1 haftalık kültürdeki nörosfer (500 µm ölçekli) C (52)

Yetişkin beyin kök hücrelerinin, *hipokampal dentate gyrus*daki subgranular bölgesinde (SGZ) oluştuğuna dair veriler vardır. Yetişkin NKH'lerin ana kaynağı SVZ, SGZ ve *olfactory bulbus*dur. Ayrıca NKH'ler *neocortex striation*, *olfactory tubercle*, *amygdala*, *substantia nigra* ve *spinal cord*da bulunurlar ( Şekil 2.5) (53-58).

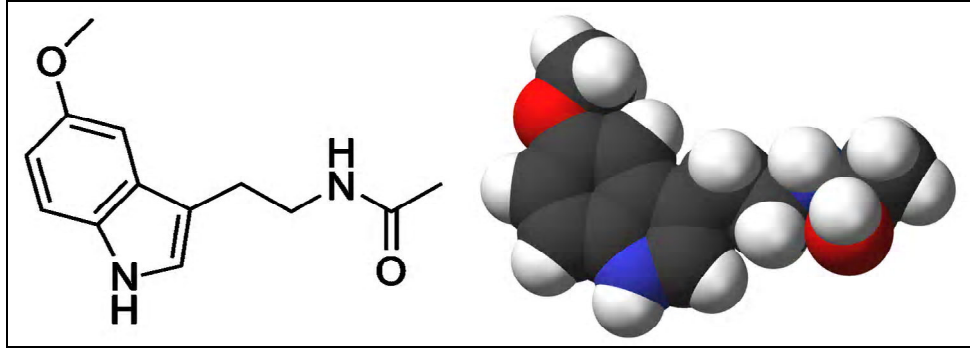


**Şekil 2.5.** Yetişkin Merkezi Sinir Sistemindeki farklı nörojenik bölgeler. Kesit 1 de *Bulbus Olfactoryus* (OB), kesit 2 ve 3 te SVZ her iki lateral ventricles ve *rostral extension* (RE). Kesit 4 de Hipokampüsteki *Dentate gyrus* (DG) ve *Subcallosal zone* (SCZ). Kesit 5 de *Spinal cord* (SC) Ependimal kanal (59).

Günümüzde nörolojik hastalıklarda kök hücrelerin rejeneratif amaçla kullanımları da hızla artmaktadır. Hasarlı sinir sistemi hücrelerinde kök hücrelerin bu hasarların onarılmasında ideal birer kaynak olduğu kanısı da yaygınlaşmaktadır. Kök hücreler, PH tedavisinde genellikle iki strateji ile uygulanmaktadır. İlk stratejide esas dopaminerjik nöronlara dönüşecek kök hücrelerin *in vitro* ortamda oluşturulması ve sonradan nakli (60), ikinci stratejide ise kök hücrelerin *Substantia nigra* bölgesine önceden nakli ve burada dopaminerjik nöron hücrelerine dönüşmesini sağlamaktır (61). Yapılan bazı çalışmalarda ilk stratejide olduğu gibi *in vitro* dopaminerjik nöronların oluşturulması ve sonradan organizmaya nakli ile PH tedavisinde olumlu sonuçlar alınmıştır (62).

### 2.3. Melatonin Hormonu

Melatonin epifiz bezinin pinealosit adı verilen hücrelerinden salgılanır. Pinealosit hücreleri ışığa duyarlıdır. Elektromanyetik dalga yoğunluğu arttıkça melatonin salgılanması azalır. Melatonin bir tür etanoamittir (63). IUPAC (Uluslar arası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) isimlendirmesine göre adı N-[2-(5-metoksi-1H-indol-3-il)etil]'dir (Şekil 2.6.). Melatonin, kişiden kişiye değişse de yaklaşık olarak 23:00 ile 05:00 saatleri arasında ve karanlıkta salgılanan bir hormondur (64). Hormon uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynar. Bunun haricinde melatoninin güçlü salgılanmasının kansere karşı koruyucu etkisi vardır. Pineal bez, yaklaşık üç yüz yıl önce Fransız filozof Descartes tarafından “ruhun tahtı” olarak tanımlanmış, ancak melatoninin varlığı 1958 yılında dermatolog Lerner tarafından belirlenmiştir. Sığır pineal bez ekstrelerinin, kurbağa deri rengini açtığını gözleyen Lerner, melanin granüllerinin agregasyona uğradığını belirlemiş ve ekstrelerden izole ettiği bu maddeye melatonin adını vermiştir (65-66). İnsanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alan pineal bez (epifiz bezi), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır. Memelilerde fotik mesajları nöroendokrin sinyallere dönüştürebilen pineal bez, retinadan alınan görsel uyarılara cevap olarak, başta melatonin olmak üzere, birçok hormon salgılayabilir (67). Bu nedenle lösemi ve diğer kansere yakalananların kesinlikle karanlık ortamlarda yatırılmaları istenmektedir. Yapılan son araştırmalara göre hormonun yaşlanmayı geciktirici etkisi olduğu da bildirilmiştir (68). Melatonin üretimi ise yaşla birlikte azalmaktadır. Bu nedenle yaşlanmayla gelişen pek çok hastalıkta (Parkinson, Alzheimer, kalp hastalığı, vs.) melatonin eksikliğine rastlanmaktadır. Bu nedenle son yıllarda melatonin tedavisinin bu tip rahatsızlıkların gelişimleri üzerine etkileri incelenmektedir. Pappolla ve ark. melatoninin Alzheimer hastalığında nöroblastoma hücrelerinin ölümünü engellediğini göstermiştir (69). Weishaupt ve ark. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)'li hastalarla yaptığı çalışmada melatonin uygulamasının umut verici sonuçlarını bildirmiştir (70). Çeşitli çalışmalarda kulak çınlamasına karşı başarılı sonuçlar elde edilmiştir (71-74). Kim ve ark. kırmızı şarap ile melatoninin kalbi koruyucu etkisini incelemiştir (75). Melatoninin kardiovasküler sistemle ilişkisi de çeşitli bilim adamlarınca incelenmiştir (76).

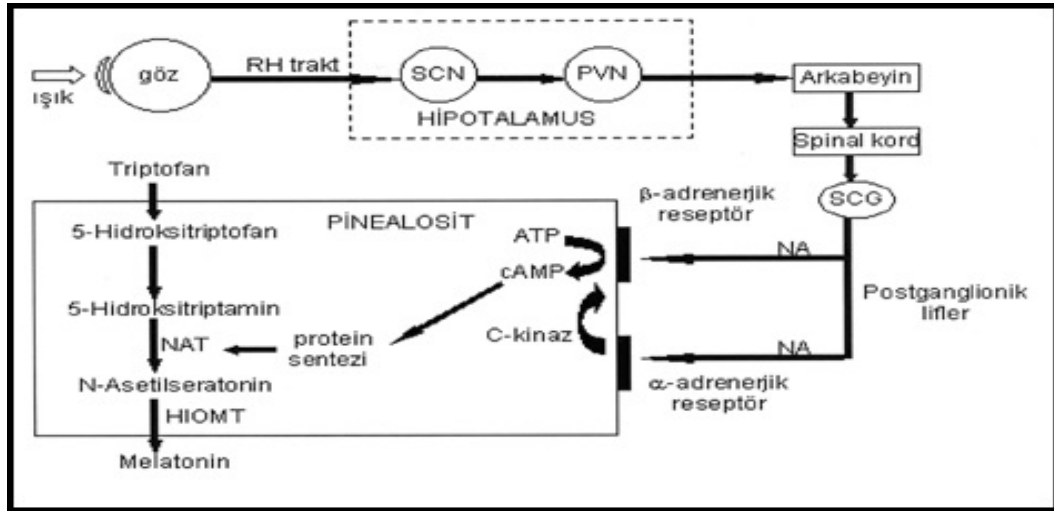


Şekil 2.6. Melatoninin moleküler yapısı.

### 2.3.1. Melatonin sentezi ve salınımı

Melatonin, epifiz bezinde triptofandan sentezlenir ve plazmada proteinlere bağlıdır. Karaciğerde sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize olur ve başlıca metaboliti 6-Hidroksimelatonin sülfat (6-HMS)'dir. İnsanlarda ekzojen melatoninin kısa bir metabolik yarı ömrü (20-60 dk.), büyük bir hepatik geçiş etkisi vardır. Ayrıca pirol halkasındaki oksidasyonla da metabolize olmaktadır (77).

Pineal denervasyon ve ganglionektomi melatoninin ritmik sentezini bozar. Norepinefrin, melatonin sentezini alfa-1 stimülasyonun güçlendirdiği, beta-1 reseptör aracılığıyla sağlar. İkinci mesajcı olarak cAMP aracılığıyla N-asetil transferaz aktivitesini artırır. Epifiz, retina ve suprakiazmatik nükleus (SKN) ışığın görme dışı etkilerinin algılanmasında ve değerlendirilmesinde temel yapılardır. Retinal fotoreseptörler, çevreden gelen ışığı retinohipotalamik yol ile SKN'a taşıyan elektriksel iletilere çevirirler. Bu monosinaptik retinal yol tüm büyük memelilerde gösterilmiştir. SKN, medial-ventral hipotalamusta yerleşmiş, günün uzunluğunu yorumlayan küçük nöron demetlerinden oluşur (Şekil 2.7.).



**Şekil 2.7.** Pineal gland'da melatonin sentezinin kontrolü. SCN; Suprakiazmatik nükleus, RH; retinohipotalamik, PVN; Paraventriküler nükleus, SCG; Superior servikal ganglion, NA; Norepinefrin, NAT; 5-Hidroksitriptamin-Nasetiltransferaz, HIOMT; Hidroksiindol-O-metiltransferaz.

## 2. 4. N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP)

### 2. 4.1 MPTP molekülünün keşfi ve sınıflandırılması

ABD' de "yapay heroin" üreten yeraltı laboratuvarlarında sentez edilip bağımlılara satılan meperdin benzeri bir madde içinde, safsızlık olarak çok az miktarda bulunan bir metabolit farkedilmiştir. Bu metabolit idiyopatik Parkinson hastalığına çok benzeyen geri dönüşümsüz bir sendrom oluşturmuştur. Yapılan çalışmalarda bu maddenin MPTP (N-metil-4-fenil-1.2.3.6- tetrahidropiridin) olduğu saptanmıştır. MPTP lipofilik bir yapıya sahip olup kan beyin bariyerini kolayca aşabilir. MPTP bir öncül maddedir, kendisi toksik bir madde değildir.

### 2. 4.2. MPTP'nin etki mekanizması

MPTP kan beyin bariyerini aşarak beyne girer ve oradan glial hücreler tarafından hücre içine alınır. Hücre içerisindeki MPTP, MAO-B enzimi tarafından MPDP+ (1-metil-4-fenil-2.3-dihidropiridin) ye dönüştürülür. MPDP+ bilinmeyen bir mekanizma ile etkin bir nöroksin olan MPP+( 1-metil-4-fenilpiridinium)' e dönüşür.

MPP+ hücre dışına çıktığı zaman dopamin taşıyıcıları yardımıyla Dopaminerjik Nöronlar içine taşınır. Bu aşamadan sonra hücrenin içindeki MPP+ farklı yollarla hücrenin ölümüne neden olur.

Hücre içine giren MPP+ serbest Fe<sup>2+</sup> lerinin artışına neden olur. Serbest Fe<sup>2+</sup> lerinin artışına bağlı olarak hücrede oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif strese bağlı olarak Lipid peroksidasyonu, Protein oksidasyonu ya da DNA hasarı meydana gelir ve bunlar hücrenin ölümüne yol açar.

Mitokondri içerisinde ise MPP+ 2 ayrı yol izleyerek hücredeki ATP'nin ani düşüşüne neden olur.

Birinci yol: MPP+, kompleks I' i inhibe ederek Elektron Taşıyıcı Zincirin inhibisyonuna sebep olur ve ani ATP düşüşüne neden olur.

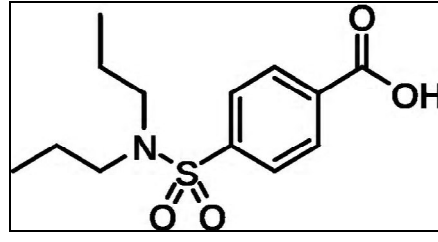
İkinci yol: MPP+ mitokondri içerisinde, Alfa ketoglutarat dehidrogenazı inhibe etmesi ile hücre de ani ATP düşüşü meydana gelir.

Hücrede ATP'nin ani düşüşüne bağlı olarak doğrudan hücre ölümü gerçekleşmesi dışında, eksitotoksisite meydana gelir. Buna bağlı olarak hücrede kinaz, proteaz ve endonükleaz enzimlerinin aktivasyonu meydana gelir ve hücre ölümü gerçekleşir. Dolaylı eksitotoksisiteye bağlı olarak peroksinitritin artışı da gözlemlenebilir. Bu da hücre ölümüne yol açan bir etkidir.

Sonuç olarak Dopaminerjik nöronun ölmesi başta Parkinson hastalığı olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olur (78-81).

## **2. 5. Probenesit**

Probenesit küçük yapılu bir molekül olup (Şekil 2.8.), idrarla ürik asit çıkışını engelleyen böbrek tübüller bloker bir maddedir. Organik anyonların böbreklerden atılımını engeller. Üratın tübular emilimini baskılar. Probenesit, diğer ilaçların böbrek tübüllerinden atılımını da engeller ve ayrıca böbrek yetmezliği bulunan hastaların tedavisinde de kullanılır. Probenesit antibakteriyel tedavide de yardımcı olarak kullanılır. Probenesit DMSO (Dimetil sülfoksit) içinde çözülebilir. Probenesit'in deneysel çalışmalarda kullanılmasının nedeni; MPTP'nin beyinden ve böbreklerden hızlı temizlenmesini ve atılımını engellemesidir. Bu şekilde MPTP organizmada daha uzun süre kalıp etkili olur (82). DMSO ve Probenesit'in striatal Dopaminerjik Nöronların üretiminde ve üzerinde hiçbir etkisi yoktur (83).



Şekil 2.8. Probenesit'in moleküler yapısı.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, İspanya Granada Üniversitesi, Biyomedikal Araştırma Merkezi, Biyoteknoloji Enstitüsü'nde Prof. Dr. Germaine Escames Rosa başkanlığında yapılmıştır.

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada MPTP fare modelinde nöral kök hücre transplantasyonu ve melatonin uygulamasının Parkinson hastalığı üzerine etkileri incelenmiştir.

#### 3.2. Çalışma Popülasyonu

Bu çalışmada 12 adet 4 aylık, ağırlıkları 25 ile 30 gram arasında değişen C57BL/6 erkek fareler kullanılmıştır. Toplam 4 grup oluşturulmuştur (**Grup 1:** genel kontrol "K", **Grup 2:** Parkinson "P", **Grup 3:** Parkinson + NKH "P+N", **Grup 4:** Parkinson + NKH + Melatonin "P+N+M" ve her grupta 3'er adet olmak üzere 12 adet fare kullanılmıştır. Sonuçlar her grup için 3'er fare üzerinden verilmiştir.

#### 3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler Çözeltiler

Deneyleerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta ilgili firmalardan temin edilerek kullanılmıştır. Çözeltiler sterilizasyon kurallarına uyularak hazırlanmıştır.

- Melatonin; Helsinn Cehemicals SA Batch (8E9S104)
- Propanediol ( PG); Pancreac (144747)
- Phosphate Buffer Saline 1X ph 7.4 (PBS) without (-) Calcium Chloride, Magnesium Chloride; Invitrogen/Gibco

- DMEM/F12 (Dulbecco Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture); Gibco (11320-074)
- Antibiyotik Antimiyotik Solüsyon; Sigma-Aldrich (A5955-100ml)
- HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid ve N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) ); Sigma (H3375-250g)  
Lot: 031M5427
- EDTA; Sigma-Aldrich
- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline); Gibco (14287-080)
- EBSS; Invitrogen (24010)
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution); Invitrogen/Gibco (14025-126)
- $\text{NHCO}_3$
- L- cys
- FGF (Fibroblast Growth Factor); Sigma (F0291-25UG)
- EGF(Endothelial Growth Factor); Sigma (E2759-15MG)
- L-Glutamin; Invitrogen/Gibco (2503-081)
- Heparin
- İnsülin; Sigma (I2643-250MG)
- HCl steril 0.1 M
- Mili-Q  $\text{H}_2\text{O}$
- Sodyum Bikarbonat; Invitrogen/Gibco (25080)
- BSA (Albumin, from bovine serum); Sigma (A3059-100G)
- Apo-transferrin human; Sigma (T2252-500MG)
- PAPAİN; Worthington (32J13555)
- Pütresin; Sigma (P7505)
- Progesteron; Sigma (P8783-5G)
- Retinoik asit; Sigma (R2625-50MG)

- Poli-D-lizin hidrobromit; Sigma (P1024-100MG)
- FBS (Fetal Bovine Serum); Sigma (F6178-500ML)
- Probenesit; Sigma (P8761-25MG)
- Fenil metil süfonil florid; Sigma (P7626)
- Ketamin hidroklorit; IMALGENE® 1000 Inyetable
- Medetomidin hidroklorit; ASTfarma BV, Sedastart 10 ml Inyetable
- Tripan mavisi

Pütresin solüsyonu (40 mL)

- 38.6 mg Pütresin
- 40 ml H<sub>2</sub>O mili-Q

Glikoz solüsyonu ( %30)

- 7.5 g glikoz
- 25 ml H<sub>2</sub>O mili-Q

İnsülin solüsyonu (40 ml)

- 100 mg insülin
- 4 ml 0.1 M'lık HCl
- 40 ml H<sub>2</sub>O mili-Q

FGF hazırlanması (-20°C de saklandı)

- 15 ml TRIS (10 nM) (0,018 g TRIS + 15 ml H<sub>2</sub>O mili-Q)
- 15 mg BSA
- 0.2-µm' lik Filtreden geçirildi.
- 1 ml FGF

EGF hazırlanması (-20°C de saklandı)

- 11.3 mg BSA
- 11.3 ml H<sub>2</sub>O mili-Q
- Elde edilen karışımdan 100 µl alınıp 100 µl EGF le karıştırıldı.

Hormon karışımı (250 ml) (son karışım 0.2-µm lik filtreden geçirildi)

- 170 ml DMEM/F12
- 4 ml Glikoz solüsyonu (%30)
- 3 ml NaHCO<sub>3</sub>
- 1 ml HEPES (1 M)
- 200 mg Apotransferrin
- 20 ml İnsülin solüsyonu
- 20 ml Putresin solüsyonu
- 20 µl Progesteron (2 µM)
- 20 µl Sodyum Selenit (3 mM)

Ön besiyerinin hazırlanması (100 ml)

- 83 ml DMEM/F12
- 2 ml Glikoz solüsyonu
- 1.5 ml NaHCO<sub>3</sub>
- 0.5 ml HEPES (1 M)
- 1 ml L-Glutamin
- 10 ml Hormon karışımı
- 2 ml Antibiyotik/Antimiyotik

Son besiyerinin hazırlanması ( 9,966 ml):

- 40 mg BSA
- 10 ml ön besiyeri kontrol,
- %2'lik 40 µl Heparin
- 0.2-µm'lik filtreden geçirildi
- 4 µl FGF
- 0.2 µl EGF

Papain enziminin hazırlanması (Aktive olması için 37<sup>0</sup>C de 20 dk bekletildi.)

- 14 mg Papain
- 2.7 mg L-Cys
- 2.7 mg EDTA
- 15 ml EBSS
- 0.22 µm'lik filtreden geçirildi.

PBS (%10 luk PBS )

- 10 ml PBS
- 90 ml H<sub>2</sub>O mili-Q

Anestezik solüsyonu (500 µl)

- 37.5 µl Ketamin
- 50 µl Medetomidin
- 412.5 ml serum fizyolojik (NaCl % 0,9)

Melatonin (aMT ışık görmemelidir.)

9.28 mg aMT üzerine 1 ml Poli etileneglikol eklendi ısıtıcılı karıştırıcıda karıştırıldı ardından Klas 2 Kabin içerisine alındı. Klas 2 Kabin içerisinde üzerine 9 ml PBS (%10) eklendi ve 0.22 µm lik filtreden geçirildi.

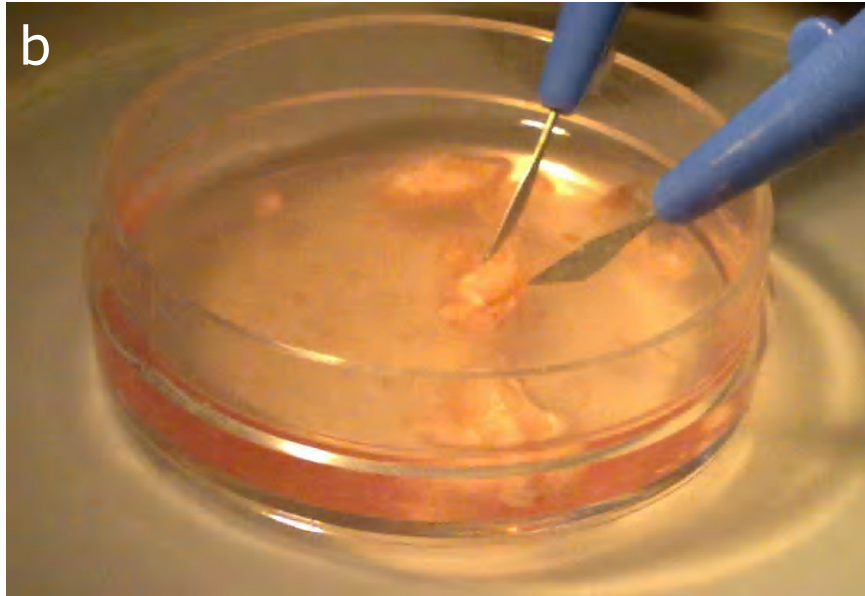
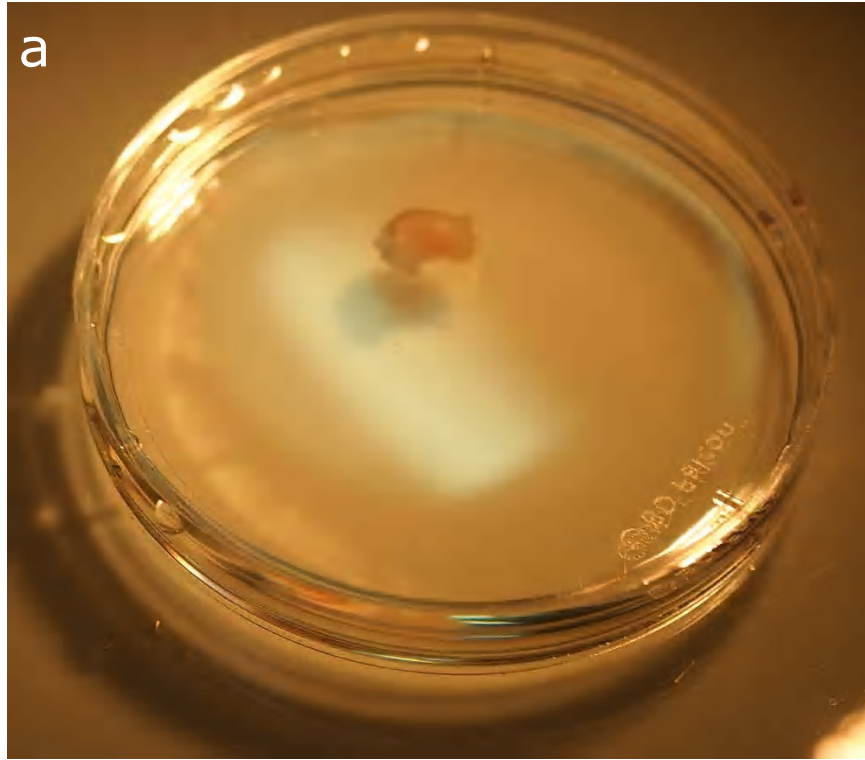
### 3.4. Kullanılan Aletler

- Santrifüj cihazı ; EPPENDORF, Centrifuge 5810
- Santrifüj cihazı ; EPPENDORF, Centrifuge 5702
- Buz makinası ; ESCOLANO, Difri
- İnkübatör ; MEMMERT, INCO 2
- Klas 2 Kabin ; TELSTAR, BioSTARPlus
- Mikro matkap ; PROXXON
- Transfüzyon cihazı ; GILSON, Minipils 3
- Hassas terazi ; SCALTEC
- Konfokal mikroskop ; NIKON, AZ-C1
- Magnetik karıştırıcı ; AGITADOR MAGNETICO, MC-8
- Buzdolabı ; LIEBHERR, Premium frost-free
- Sıcak su banyosu ; OVAN, Bath Shaker BS127E
- Derin dondurucu ; THERMO FORMA ULT 86 FREEZER Model 906
- Stereotaksik cihazı ; STOELTING CO., Quintessential Stereotaxic Injector Cat. No 53311

### 3.5. Deney Protokolü

#### 3.5.1 Nöral Kök Hücre İzolasyonu, Primer Kültürü ve Farelerin Diseksiyonu

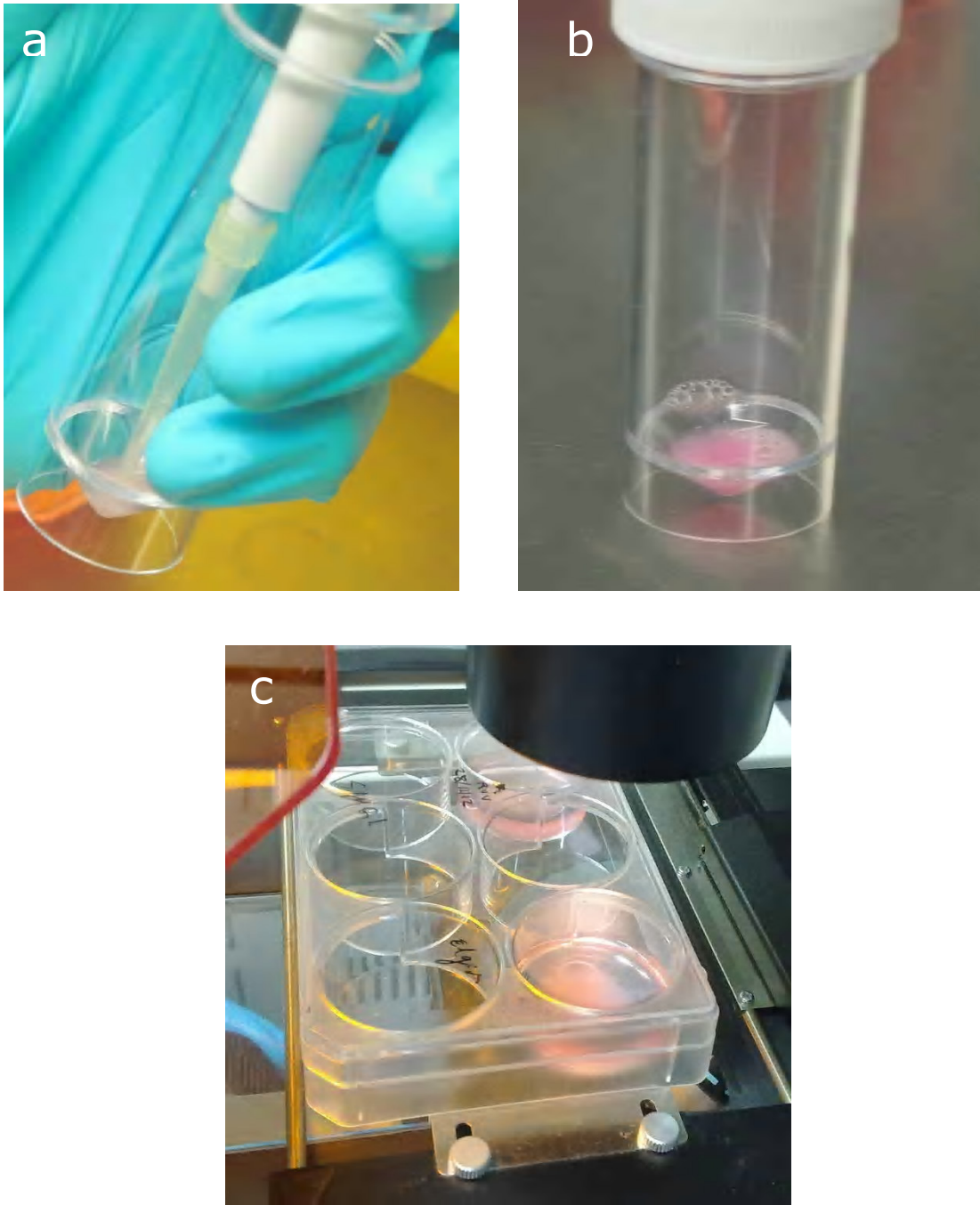
Nöral Kök Hücre izolasyonu için kullanılacak olan C57/BL6 fareler hayvan refahına uygun şekilde servikal dislokasyon yöntemiyle öldürüldü. Alkol ile başları dezenfekte edildi. Büyük makas yardımı ile baş boyun hizasından kesilerek gövdeden ayrıldı. Kafatası beyne zarar verilmeden cerrahi manipülasyonla açıldı ve beyin çıkartılıp içinde DPBS olan petri kabına yerleştirildi. Mikroskop altında mikrobistürü ile beyin median hattı boyunca ensize edildi. Beyin sağ ve sol iki loba ayrıldı. Her iki lobdan SVZ çıkarıldı ve içinde DBPS bulunan diğer petri kabına alındı (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** SVZ'nin çıkarılmasına ait resimler. Düz ışık mikroskobu altında beyinden SVZ'nin mikrobistüri ile ayrılması A, SVZ ve çevre dokular B..

**SVZ'nin küçük parçalara ayrılması ve içerisinde papain enzimi bulunan tüplere aktarılması**

İki adet steril bisturi yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. SVZ parçaları içlerinde papain enzimi bulunan tüplere aktarıldı. İçlerinde papain enzimi ve SVZ parçaları bulunan tüpler 35 dakika boyunca 37°C deki sıcak su banyosuna inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon işlemi bitince tüpler oda sıcaklığında 300 g'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminin ardından süpernatant sıvı uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 1ml ön besiyeri eklendi ve ardından pelet ön besiyeri içinde süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon halindeki pelet 0.70-µm lik filtreden geçirilip üzerine 7 ml ön besiyeri eklendi. Oda sıcaklığında 600 g'de 5 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant sıvı uzaklaştırıldı. Kalan pelet üzerine 100 µl ön besiyeri eklendi. Ardından süspansiyon işlemi yapıldı. Süspansiyon halindeki pellet üzerine 7 ml ön besiyeri eklendi. Oda sıcaklığında 600 g'de 10 dk sürecek son santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası süpernatant sıvı uzaklaştırıldı ardından pellet üzerine 100 µl son besiyeri eklendi ve süspansiyon işlemi yapıldı. 100 µl'lik karışım, içerisinde 5 ml son besiyeri bulunan 6' lı petri kabının 1 kuyusuna ekildi. Hücreler invert mikroskop altında incelendi ve 37°C de %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem bulunan inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** Nöral Kök Hücrelerin izolasyonu ve primer kültüre ait resimler. Hücrelerin besi yerinde süspansiyonu A, Süspansiyon edilmiş hücreler B, Primer kültürdeki hücrelerin mikroskop altında incelenmesi C.

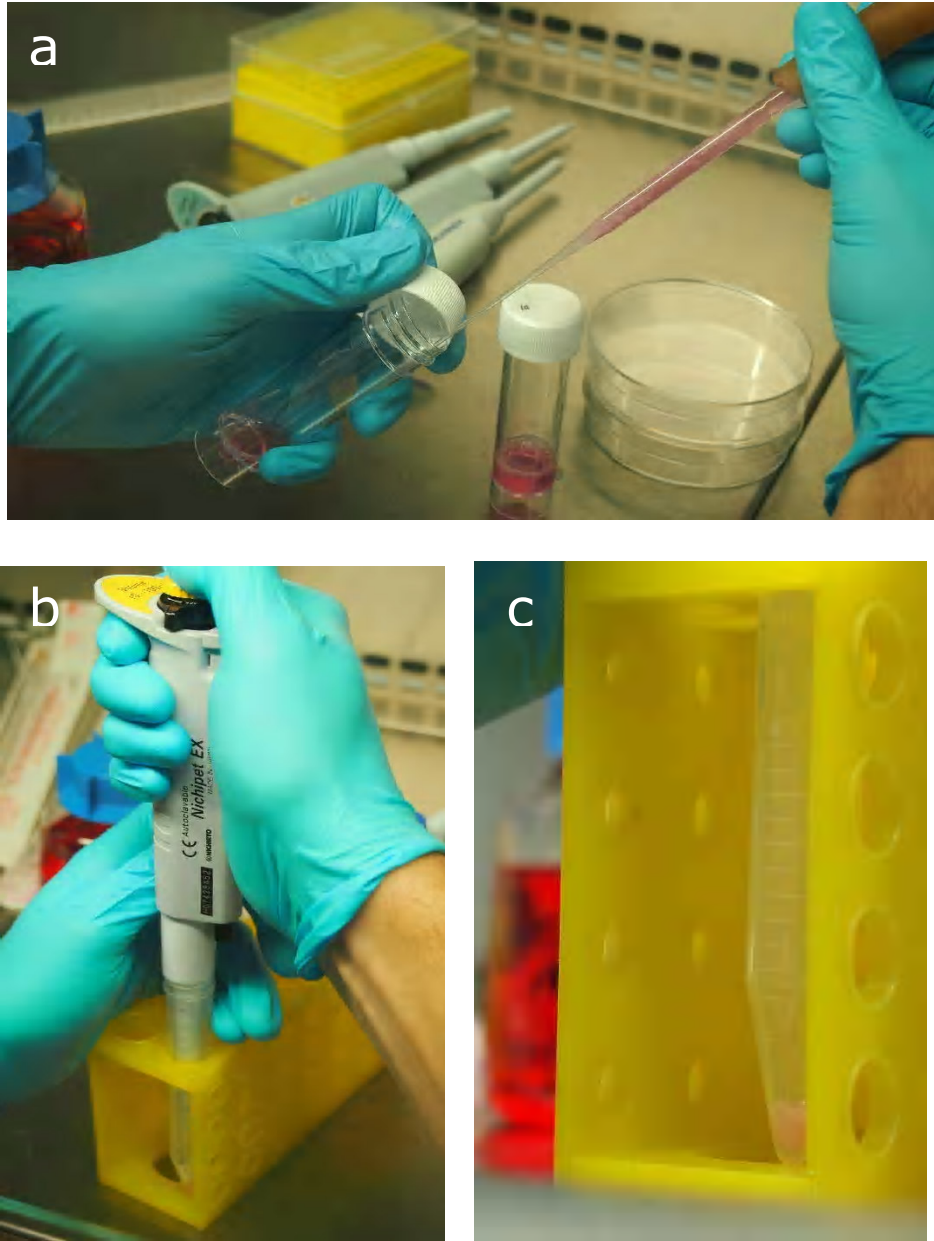
### 3.5.2. Kültürdeki hücrelerin pasajlanması

Besiyeri hücre karışımı, pipet ile alınarak santrifüj tüpüne aktarıldı. 400g de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Ardından süpernatant sıvı uzaklaştırıldı. Peletin üzerine 100 µl ön besiyeri eklendi. Ardından süspansiyon işlemi yapıldı. Süspansiyon halindeki pelet üzerine 7 ml ön besiyeri eklendi. Oda sıcaklığında 400 g'de 10 dk olmak üzere

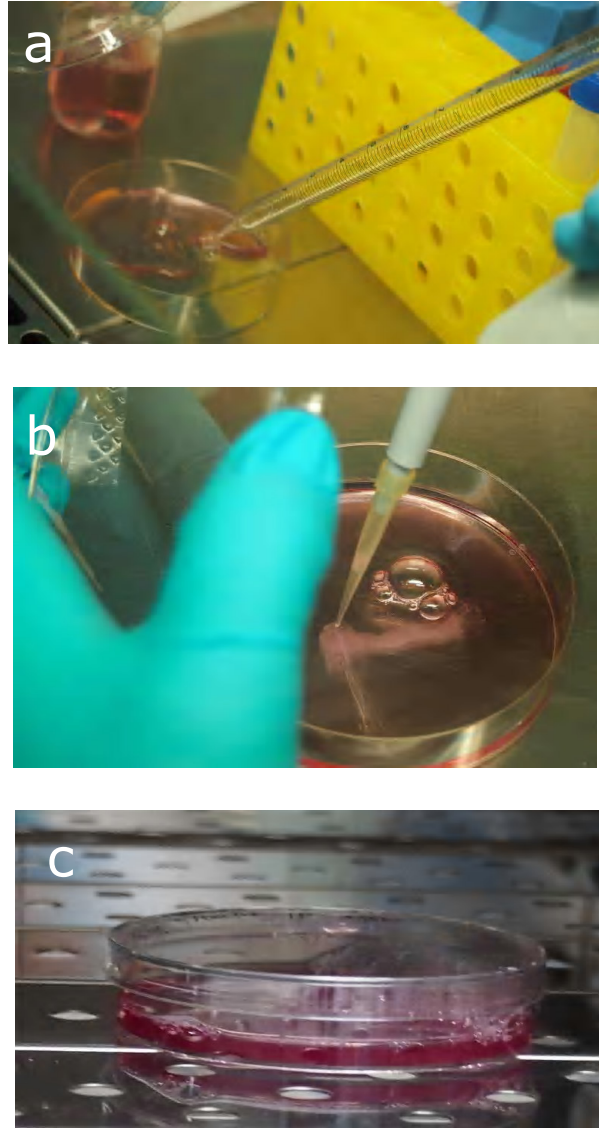
ikinci santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Ardından süpernatant sıvı uzaklaştırıldı. Peletin üzerine 100 µl ön besiyeri eklendi ve süspansiyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından son kez oda sıcaklığında 400 g'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminden sonra süpernatant sıvı uzaklaştırıldı ve peletin üzerine 100 µl ön besiyeri eklendi ve süspansiyon işlemi yapıldı. 100 µl'lik karışım, içerisinde 20 ml son besiyeri bulunan petri kabına ekildi.

Deneysel çalışmada kullanılan nöral kök hücreler literatürlerde yer alan NKH izolasyon şartları ve prosedürü kullanılarak primer kültür hazırlandı. Hazırlanan bu primer kültürden birinci, ikinci ve üçüncü pasajlar hazırlandı. İlk pasajdan sonra yapışma özelliği olmayan NKH'ler kültür ortamında asılı kalarak nörosferler oluşturmaktadır. Bu özellik de NKH'lere karakteristik bir özelliktir. Bu nedenle gerek NKH'lere spesifik izolasyon prosedürünün kullanılması gerekse elde edilen bu nörosferlerin incelenmesi ile elde edilen hücrelerin NKH olduğu kesinleştirilmiştir.

Hücreler invert mikroskop altında incelendi ve 5 gün boyunca 37°C de %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem bulunan inkübatöre inkübasyona bırakıldı. Beşer gün ara ile ikinci ve üçüncü pasajlama işlemleri gerçekleştirildi. İkinci ve üçüncü pasajlama işlemlerinde birinci pasajlamadaki uygulamalar tekrarlandı. Üçüncü pasajlamadan 5 gün sonra hücreler transpalantasyon için hazırlandı (Şekil 3.3-4).



**Şekil 3.3.** Besi yerinden hücrelerin uzaklaştırılmasına ait resimler. Süpernatant sıvının uzaklaştırılması A, Süspansiyon işlemi B, Süspansiyon halindeki besiyeri C.



**Şekil 3.4.** Nöral Kök Hücrelerin besi yerine ekimine ait resimler. Petri kabına son besiyerinin koyulması A, Nöral Kök Hücrelerinin besi yerine ekimi B, İnkübatör içerisindeki NKH besiyeri kültürü C.

### 3.5.3. Transplantasyonda kullanılacak hücrelerin hazırlanması

Petri kabındaki besiyeri örnek toplama tüplerine alındı. Oda sıcaklığında 400 g'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminden sonra süpernatant sıvı uzaklaştırıldı. Peletin üzerine 100  $\mu$ l PBS eklendi ve hücrelerin süspansiyonu yapıldı. 100  $\mu$ l'lik PBS, hücre karışımı falkon tüpe alındı. Falkon tüp içerisinde süspansiyon işlemi yapıldı. 100  $\mu$ l'lik karışımdan 10  $\mu$ l ependorf tüpe aktarıldı. İçerisinde 10  $\mu$ l PBS, hücre karışımı olan ependorf tüpe 10  $\mu$ l (1X1) Tripan mavisini eklenip süspansiyon yapılarak 20  $\mu$ l karışım elde edildi. 20  $\mu$ l yeni karışım thoma lamına alınarak, düz ışık mikroskop

altında sayım yapıldı ve ml'deki hücre sayısı hesaplandı. Tripan mavisi negatif yüklü bir boya olup, hücre membranı zarar görmüş ve canlı olmayan hücreleri boyayarak mikroskop altında mavi görünmelerini sağlar.

Falkon tüpde kalan PBS, hücre karışımı oda sıcaklığında 400 g'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminden sonra süpernatant sıvı uzaklaştırıldı. Altta kalan pelet mikropipet yardımıyla ependorf tüpe aktarıldı. Ependorf tüp soğuk zincir altına alındı.

#### **3.5.4. C57/BL6 farelerde MPTP/Probenesit kullanılarak kronik Parkinson modeli oluşturulması**

5 hafta boyunca 3.5 gün ara ile toplamda 10 dozluk Probenesit/MPTP uygulaması yapılmıştır. Probenesit solüsyonunun hazırlanması 1 adet fare için 30 µl DMSO içine 250 mg/kg olacak şekilde Probenesit eklendi.

MPTP solüsyonunun hazırlanması 1 adet fare için 30 µl HCl içine 25 mg/kg olacak şekilde MPTP eklenir.

İlk önce farelere intraperitoneal olarak Probenesit solüsyonu enjekte edildi. En az 2 saatlik bekleme süresinin ardından subkütan olarak MPTP solüsyonu enjekte edildi.

#### **3.5.5. NKHlerin C57/BL6 farelere transplantasyonu**

##### **3.5.5.1. Farelerin transplantasyona hazırlanması**

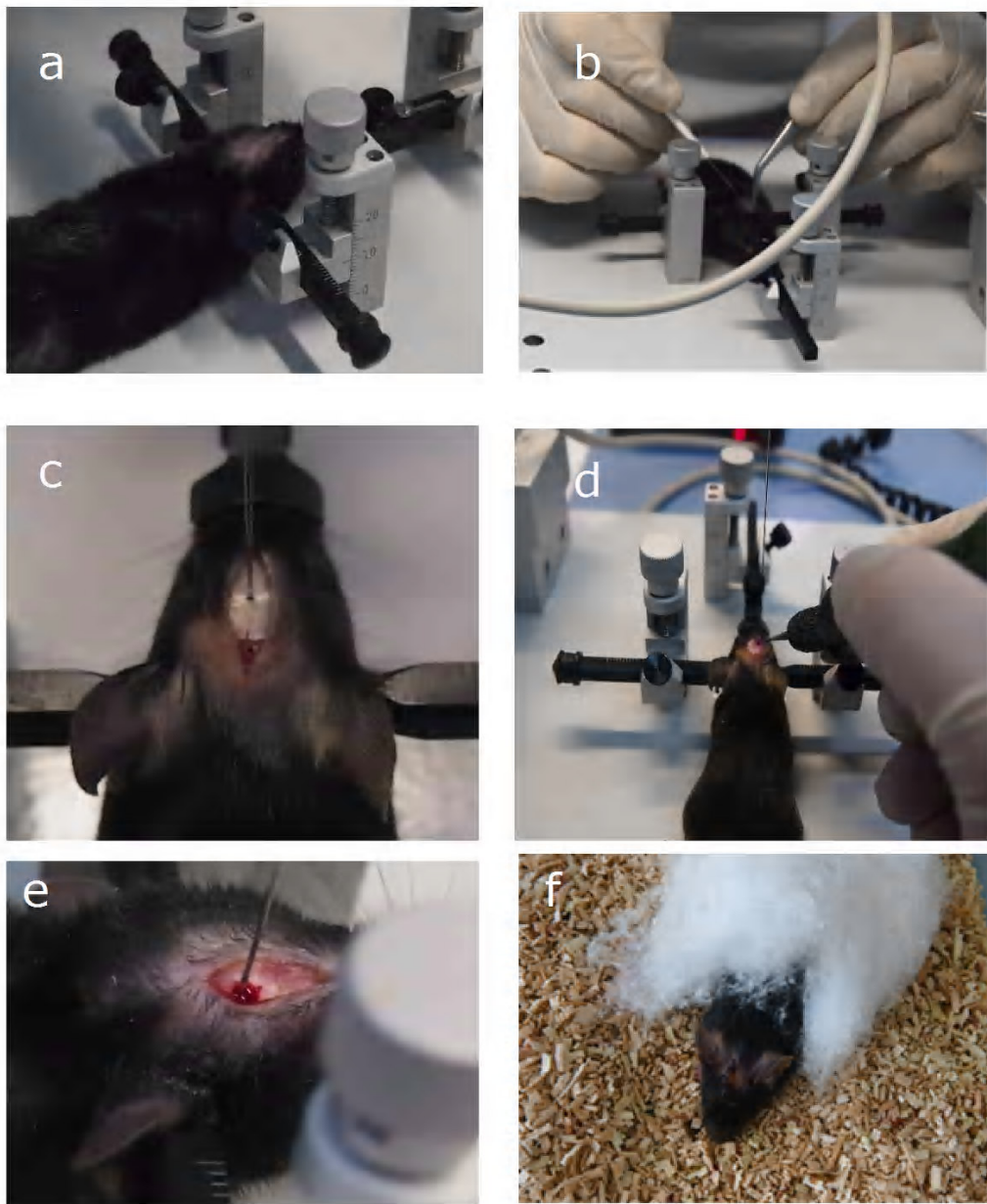
Farelerin ağırlıkları belirlendi ve 10 µl/g dozda anestezi madde intraperitoneal olarak enjekte edildi. Anestezi altındaki farenin kafasındaki kulak hizasından göz hizasına kadar olan alan tıraş edildi. Fare stereotaksis operasyon aparatına yerleştirildi.

##### **3.5.5.2. NKH'lerin MPTP fare modeline transplantasyon**

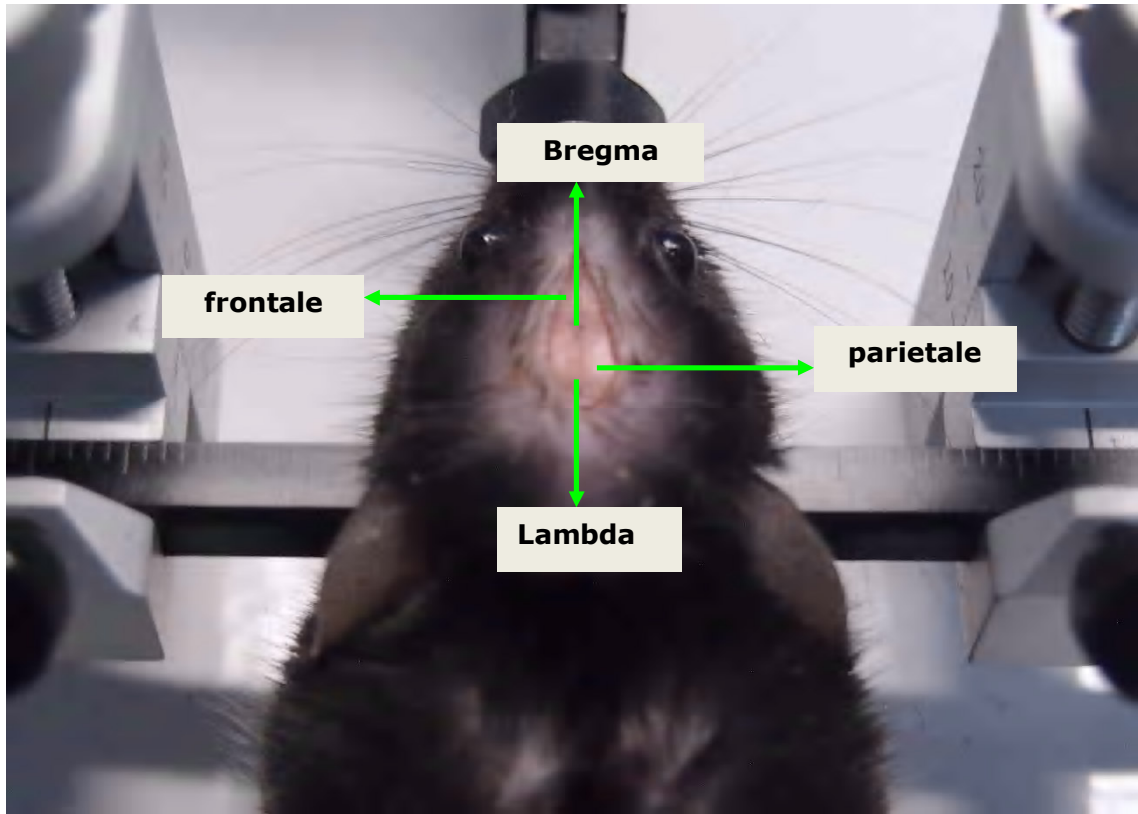
Tıraşlı bölge batikon ile sterilize edildi. Kafa derisi cranialden caudale doğru median hat boyunca, göz hizasından kulak hizasına kadar ensize edildi. Bregma ve lambda kafatası üzerinde işaretlendi. Atlasta Bregma 0.50 mm, İnteraural 4.30 mm bölgesinde; Hedef nokta CPU olmak üzere enjektör ucu Bregma noktasına getirilerek;

- Anterior-Posterior (AP); -2.45 mm = -0.245 cm
- Medio-Lateral (ML); - 2.1 cm = -0.21 cm

- Dorsal-Ventral (DV-Profund P); 1.8 mm = 0.18 cm
- Farenin bregma noktasının AP, ML, DV değerleri atlastaki seğilen bølgenin koordinat değerleri ile toplandı. Elde edilen sonuç seğilen bølgenin fare üzerindeki koordinatlarını verir. Elde edilen koordinat işaretlendi.
- İşaretlenen bölgede “burr hole” açıldı.  $1 \times 10^6/5 \mu\text{l}$  hücre hipokampüse transplante edildi. Operasyon bölgesine ipek ip ile sütür atıldı (Şekil 3.5-6).



**Şekil 3.5.** Tansplantasyonun aşamalarına ait resimler. Stereotaktik cihazına sabitlenmiş fare A, Farenin kafa derisinin ensizyonu B, Kafası ensize edilmiş fare C, Mikro matkap ile hedef bölgede “burr hole” açılması D, Stereotaktik enjektörü ile tranplantasyon E, Transplantasyon sonrası sütür atılmış fare F.

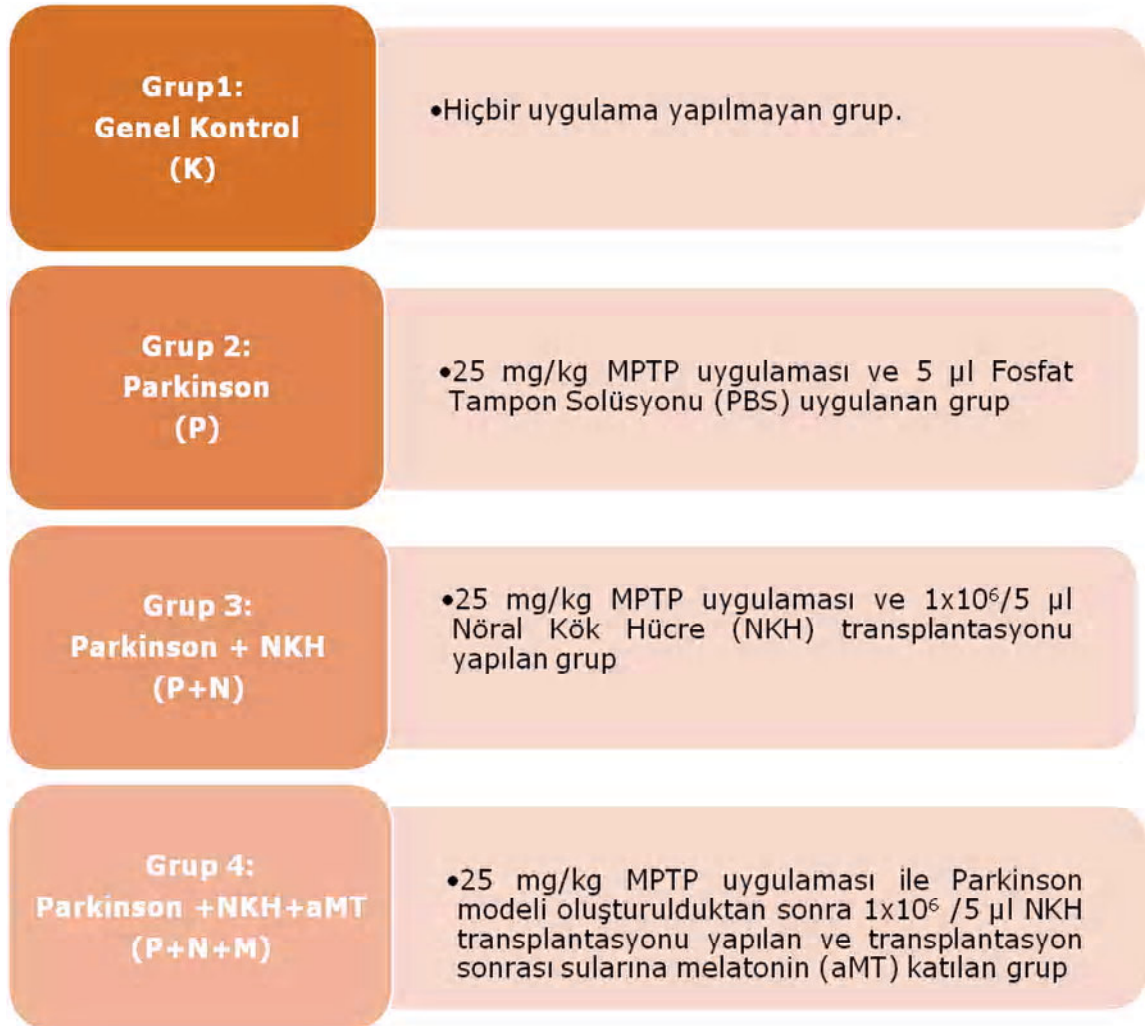


Şekil 3.6. Farede Bregma ve Lambda'nın yeri.

### 3.5.5.3. Transplantasyon Sonrası Farelerin Bakımı

Çalışmada 12 (On iki) adet C57BL/6 erkek fare kullanıldı. Tüm guruplardaki fareler 12 saat aydınlık ve karanlık döngüsünde, temiz plastik kafeslerde %45 nem,  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  de, Granada Üniversitesi Biyomedikal Araştırma Merkezi Hayvan ünitesinde tutulmuştur. Her gruptaki fareler ad-libitium yem ve su ile beslendi ve gün aşırı suları değiştirildi (Şekil 3.7.).

Gruplar;



Şekil 3.7. Deney Grupları

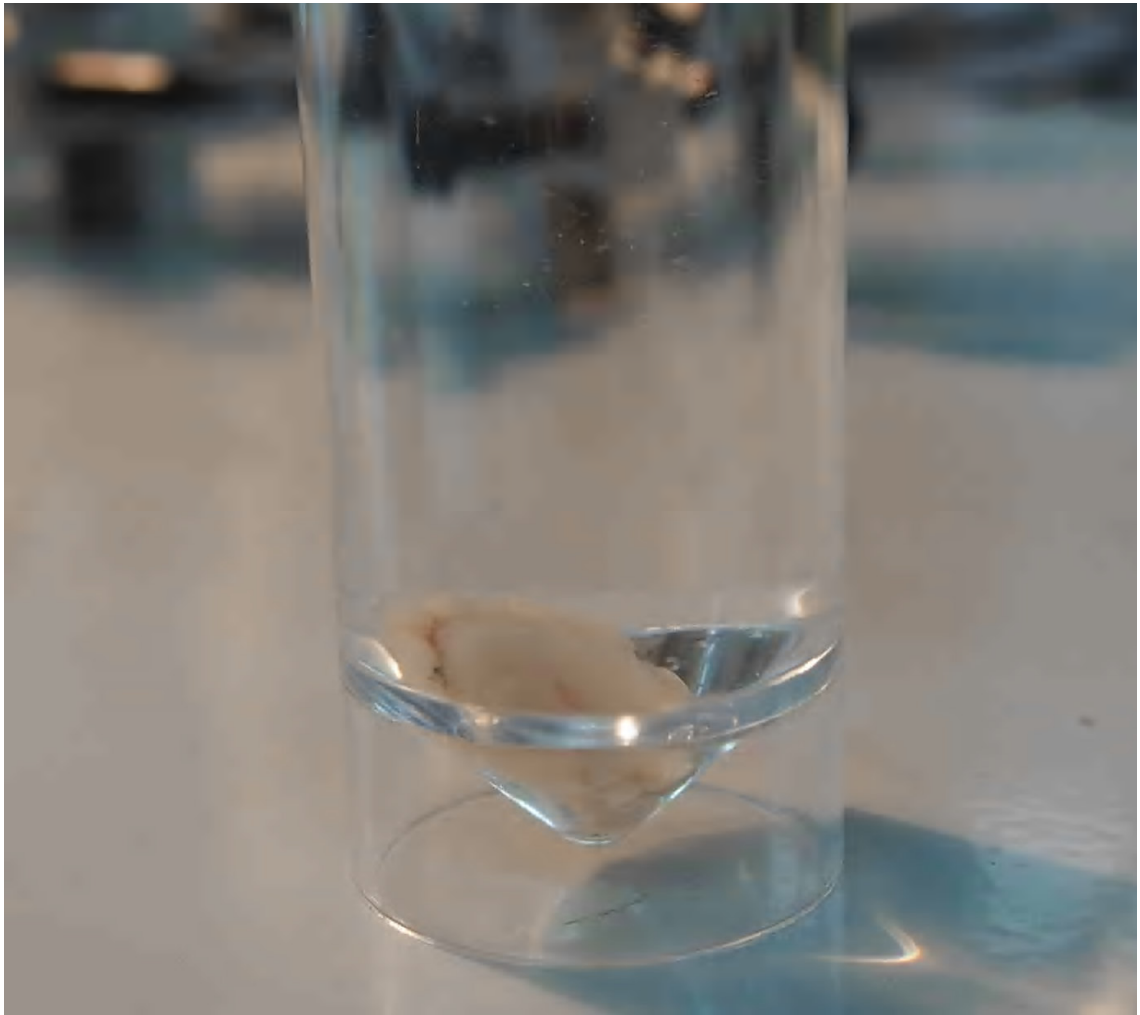
#### 3.5.5.4. Lokomotor Aktivitenin Ölçülmesi

Projenin bu aşaması sadece bu amaç için yapılmış, ses izole odada gerçekleştirilmiştir. 00:00 – 04:00 saatleri arasında Grid actimeter kafesler (50 cm × 27 cm × 24 cm) kullanılmıştır.

Transplantasyondan 1 hafta sonra, fareler geceleri aktif oldukları 4 saat boyunca kat ettikleri mesafenin ve dinlendikleri sürenin ölçümü için video kaydına alınmıştır. Bu video kaydı SMART programı ile analiz edilmiştir. Bu süre zarfında fareler oda sıcaklığında tutulmuş olup, Ad-libitium yem ve su verilmiştir.

### 3.5.5.5. Perfüzyon

Farelere anestezik solüsyon verildi. Anestezi altındaki fare sabitlendi. Fareye inguinal bölgeden boyuna kadar, median hat boyunca, iç organlara zarar vermeden deri ensizyonu yapıldı. Toraks kalbe zarar vermeden kesilip açıldı. Kalbin sol karıncığına paralel olacak şekilde kanül ile girildi. Sağ kulakçık kesildiği anda, sol karıncığa 10 dakika boyunca transfüzyon cihazı yardımıyla serum fizyolojik verildi. Daha sonra 10 dakika boyunca formaldehit solüsyonu verildi. Farenin kafatası açılarak beyin içerisinde formaldehit bulunan falkon tüpe koyuldu. Örnek tirozin hidroksilaz enzimine, immuno histokimyasal yöntemle bakılması için ilgili labaratuara gönderildi (Şekil 3.8).



**Şekil 3.8.** İmmunohistokimya için hazırlanmış beyin dokusu

## **4.BULGULAR**

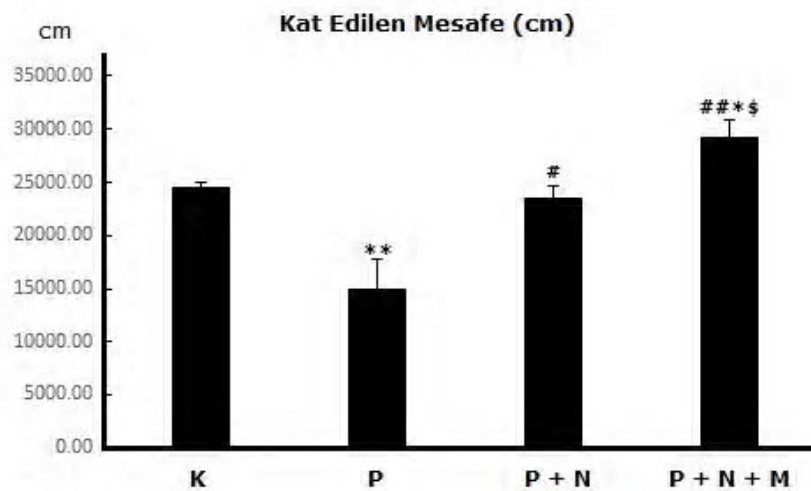
### **4.1. Lokomotor aktivite**

Hem kontrol hem de işlemde geçmiş farelerin gece 4 saatlik (14400 sn) hareketleri kayıt altına alınmış olup, "SMART" programı ile kat ettikleri mesafelere ait veriler Tablo 4.1 ve Grafik 4.1' de, 4 saatlik süre içerisinde dinlendikleri zamana ait veriler ise Tablo 4.2 ve Grafik 4.2' de sunulmuştur.

Lokomotor aktivite değerlendirildiğinde Parkinson grubunda aktivite testinde kat edilen mesafe anlamlı derecede azalırken ( $p<0.001$ ), Parkinson + NKH grubunda Parkinson grubuna göre ( $p<0.05$ ) lokomotor aktivitede önemli bir artış olmuştur. Parkinson + NKH + Melatonin grubunda ise hem Kontrole ( $p<0.05$ ), hem Parkinson grubuna göre ( $p<0.001$ ) hemde Parkinson + NKH grubuna göre ( $p<0.05$ ) anlamlı ederecede artış olduğu gözlenmiştir.

**Tablo 4.1.** Her bir gruptaki farelerin 4 saatlik sürede kat ettikleri mesafenin cm cinsinden değerleri ve gruplara ait ortalama verileri.

		Toplam Kayıt Altına Alınan Zaman (sn)	Kat Edilen Mesafe (cm)	Ortalama Mesafe (cm)
<b>K</b>	K 1	14400	24220.55	24619.27 ±398.72
	K 2	14400	25017.98	
	K 3	14400	24619.27	
<b>P</b>	P 1	14400	11515.27	14901.31 ±2945.16
	P 2	14400	16868.25	
	P 3	14400	16320.40	
<b>P + N</b>	P + N 1	14400	23283.14	23576.72 ±1089.53
	P + N 2	14400	24782.96	
	P + N 3	14400	22664.06	
<b>P + N + M</b>	P + N + M 1	14400	29070.58	29245.27 ±1739.24
	P + N + M 2	14400	31065.26	
	P + N + M 3	14400	27599.97	

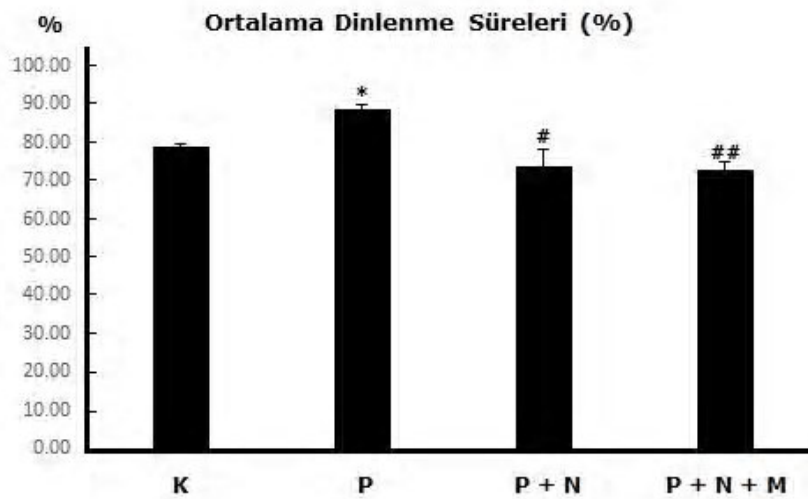


**Grafik 4.1.** Gruplardaki farelerin 4 saatlik süre içerisinde kat ettikleri ortalama mesafelere ait veriler  
 \*\*:p<0.001, \*:p<0.05 Kontrol Grubu (K) ile kıyaslama, #:p<0.05, ##:p<0.001 Parkinson Grubu (P) ile kıyaslama, \$:p<0.05 Parkinson + Nöral Kök Hücre Grubu kıyaslama (P+N).

Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer parametre ise toplam dinlenme süreleridir. Total dinlenme süreleri gruplara göre karşılaştırıldığında Parkinson grubunda ( $p<0.05$ ) dinlenme süresi anlamlı derecede artarken, Parkinson + NKH grubunda ( $p<0.05$ ) ve Parkinson + NKH + Melatonin grubunda ( $p<0.001$ ) Parkinson grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır.

**Tablo 4.2.** Her bir gruptaki farelerin 4 saatlik süre içerisinde dinlenerek geçirdikleri toplam süre ve yüzde verileri.

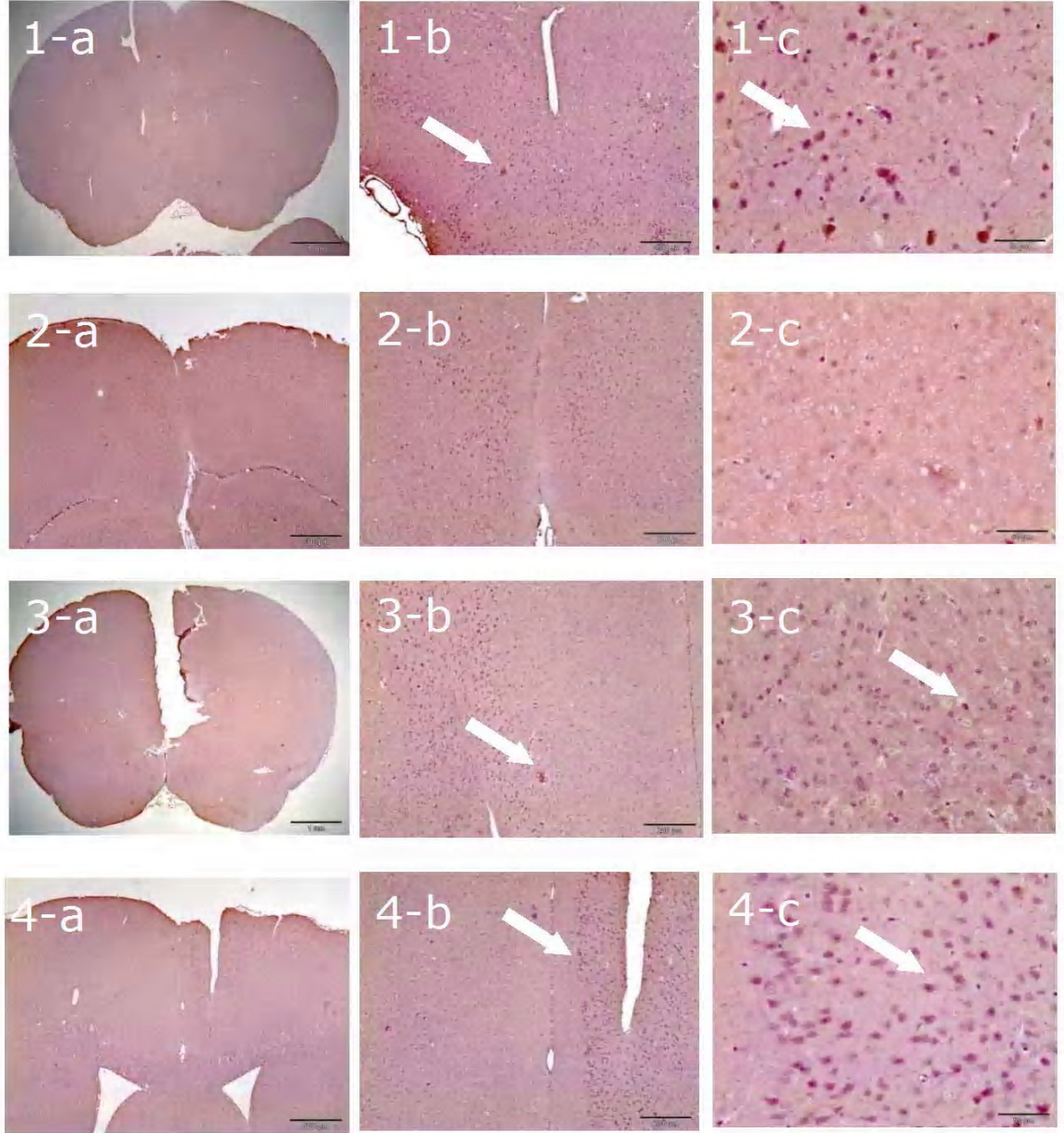
		Toplam Kayıt Altına Alınan Süre (sn)	Dinlenme Süresi (%)	Dinlenme Süresi (sn)	Ortalama Dinlenme Süresi (sn)	Ortalama Dinlenme Süresi (%)
<b>K</b>	K 1	14400	79.38	11430.72	11374.56	78.99 ±0.70
	K 2	14400	78.01	11233.44		
	K 3	14400	79.58	11459.52		
<b>P</b>	P 1	14400	90.55	13039.20	12810.24	88.96 ±1.13
	P 2	14400	88.02	12674.88		
	P 3	14400	88.31	12716.64		
<b>P + N</b>	P + N 1	14400	79.27	11414.88	10603.68	73.64 ±4.60
	P + N 2	14400	68.01	9793.44		
	P + N 3	14400	73.63	10602.72		
<b>P + N + M</b>	P + N + M 1	14400	76.05	10951.20	10501.92	72.93 ±2.22
	P + N + M 2	14400	71.04	10229.76		
	P + N + M 3	14400	71.70	10324.80		



**Grafik 4.2.** Gruplardaki farelerin 4 saatlik süre içerisinde dinlenerek geçirdikleri toplam süreye ait yüzde verilerinin grafikte görünümü. \*:  $p<0.05$  Kontrol Grubu (K) ile kıyaslama, #:  $p<0.05$ , ##:  $p<0.001$  Parkinson Grubu (P) ile kıyaslama.

## 4.2. İmmunohistokimyasal Boyama

Perfüzyon sonrası çıkarılan beyin dokusuna ait immunohistokimyasal boyama sonuçları Şekil 4.1' de görüldüğü gibidir.



**Şekil 4.1.** Beyin dokusunun immunohistokimyasal boyama resimleri. 1-a, 1-b, 1-c de Kontrol Grubu, 2-a, 2-b, 2-c de Parkinson Grubu, 3-a, 3-b, 3-c de Nöral Kök Hücre Grubu, 4-a, 4-b, 4-c de Melatonin Grubu gösterilmektedir. Tirozin Hidroksilaz immun pozitif nöronlar (ok).

İmmunohistokimyasal sonuçlara göre P grubunda, TH immun pozitif nöronların oran ve boyama yoğunluğu, K grubuna göre göreceli azalmış bulunmuştur. NKH transplantasyonu uygulanan her iki grupta TH immun pozitif nöronların oran ve boyama yoğunluğu Parkinson grubundan daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar Parkinson grubunda beyin sapı dopaminerjik nöron sayısında anlamlı bir kayıp olduğunu; NKH transplantasyonu tedavisinin ise bu nöronlarda göreceli bir artırma yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada MPTP molekülü ile Parkinson Hastalığı modeli oluşturulmuş farelerde nöral kök hücre transplantasyonunun etkisi dopaminerjik nöron kaybının telafisinin immuno histokimyasal yöntemle ve meydana gelen motor aktivitelerdeki yavaşlama ve titremelerin, farelerin gece aktif olduğu sürelerde video kaydına alınarak dinlenme sürelerinin ve kat ettikleri yolun ölçülmesi yöntemi ile araştırılmıştır.

Günümüzde Parkinson modeli fareler, transgenik yöntemler (84) ile elde edilebildiği gibi çeşitli molekül uygulamaları (MPTP ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA)) ile de elde edilebilir. Bu çalışmada MPTP kullanmamızın nedeni; çeşitli bilim adamları tarafından yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, MPTP molekülü uygulamalarının canlıda dopaminerjik nöronların ölümüne neden olması ile birlikte Parkinson hastalığının temel patolojik nedenini taklit etmesidir. Bu durum MPTP uygulamasının neden Parkinson hastalığının modelini oluşturmak için kullanıldığını bize göstermektedir. (80-81, 85). Hideki Oizumi ve arkadaşlarının C57BL/6J farelerde yaptığı çalışmada kronik maruziyet grubundaki farelere 5 gün boyunca tuzlu su içerisinde intraperitoneal MPTP HCL (30 mg/kg) uygulamasının striatumdaki dopamin konsantrasyonunu düşürdüğünü bildirmişlerdir (86).

Bu çalışmada MPTP molekülünün uygulanmaya başlamasını takip eden 3'üncü haftadan itibaren farelerde motor aktivitelerde yavaşlama ve kollarda titremeler görülmeye başlamıştır. MPTP ve TH ilişkisine yönelik yapılan çalışmalarda MPTP uygulanmış fare ve memelilerde bu enzimin aktivitesinin görülmediği çeşitli metotlarda ortaya konmuştur. Liu ve ark. yaptıkları bir çalışmada yetişkin C57BL6 farelere 2'şer saat aralıklar ile 4 doz intraperitoneal 20 mg/kg MPTP ve kontrol grubuna aynı dozda

serum fizyolojik uygulamış son dozdan 7 gün sonra fareler öldürülmüş beyin dokusunda TH immun pozitif nöron sayısının anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir ( $p<0.001$ ) (87). Sawsan A. Zaitone ve ark. Swiss albino sıçanlarda yaptığı bir çalışmada 2 şer saat aralıklar ile 4 doz intraperitoneal 20 mg/kg MPTP ve kontrol grubuna aynı dozda serum fizyolojik uygulamış ve bu çalışma neticesinde TH immun pozitif nöron sayısının MPTP grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ( $p<0.05$ ) (88). Simone A. Van den Berge ve arkadaşlarının 12 haftalık C57/BL6 erkek fareler kullanarak haftada 2 kez olmak üzere 5 hafta boyunca subkutan MPTP (25 mg/kg) ve intraperitoneal Probenesit (250 mg/kg) uygulaması sonucu oluşturduğu kronik MPTP Parkinson modelinde yaptığı analizlerde dopamin seviyesinin ve TH seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük olduğunu bulmuşlardır (89). Bu çalışmada immuno histokimyasal yöntemle dokular incelendiğinde MPTP uyguladığımız farelerde dopamin sentezinin bir göstergesi olan tirozin hidroksilaz aktivitesine rastlanamamıştır. Bu sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (90,91). Bu sonuçlar MPTP uygulanan hastalıklı grubunda beyin sapı dopaminerjik nöron sayısında anlamlı bir kayıp olduğunu; NKH transplantasyonu tedavisinin ise bu nöronlarda göreceli bir artırma yaptığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Tocharus C. ve arkadaşlarının Sprague–Dawley sıçanlardan izole ettikleri nöral kök hücre kültürlerinde melatonin uygulamasının nörosfer oluşumunda etkili olduğunu kanıtlamışlardır (92-96). Bizim çalışmamızda ise Nöral kök hücre transplantasyonu yapılan farelere melatonin uygulandığında immüno histokimyasal boyama sonuçlarına göre melatoninin TH aktivitesini artırdığı ve dopaminerjik etkinliği ve nöral kök hücre transplantasyonu pozitif yönde etkilediği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.1).

Parkinson hastalığı'nın temel özelliklerinden birisi olan lokomotor aktivitenin azalması günümüze kadar birçok çalışma ile gösterilmiştir (97-102). Lei Liu ve arkadaşlarının aynı çalışmasında son dozdan 3 gün sonra yapılan MPTP uygulaması öncesi ve MPTP uygulaması sonrası lokomotor aktivite testinde toplam mesafe yüzdesinde MPTP uygulaması sonrası grupta anlamlı bir azalma görülmüştür ( $p<0.05$ ) (86). Sawsan A. Zaitone ve arkadaşlarının Swiss albino sıçanlarda yaptığı bir çalışmada 2 şer saat aralıklar ile 4 doz intraperitoneal 20 mg/kg MPTP ve kontrol grubuna aynı dozda serum fizyolojik uygulamış lokomotor aktiviteyi ölçmüş, MPTP grubunda hareketin anlamlı olarak azaldığını bulmuşlardır (88) . MPTP ile oluşturulan Parkinson modelinde diğer

çalışmalara paralel olarak bizim çalışmamızda da lokomotor aktivitenin anlamlı derecede bozulduğu görülmüştür. Locomotor aktivitenin değerlendirilmesinde kat edilen toplam mesafe ile toplam dinlenme süresi değerlendirilmiştir ve Parkinson grubunda katedilen toplam mesafe anlamlı derecede azalma gösterirken (Grafik 4.1 \*\*:p<0.001), toplam dinlenme süresinin de arttığı (Grafik 4.2. \*:p<0.05) bulunmuştur.

Sonuç olarak, çalışmamızın klinik ve immunohistokimyasal sonuçları NKH transplantasyonun başarılı olduğunu göstermiştir. Ayrıca melatonin NKH transplantasyonu başarısını artırmış ve dopaminerjik etkinliğin göstergesi olarak TH aktivitesinin de artırdığı bulunmuştur. Çalışmada Parkinson modeli oluşturulmuş farelerde nöral kök hücre transplantasyonu üzerine melatonin etkinliği farelerde ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. Gerçekleştirilen alışma sonuçları melatoninin Parkinson hastalığında kök hücre nakli üzerine pozitif etki gösterdiği yönünde yorumlanmış olup, ileride yapılacak daha kapsamlı ve farklı parametrelerin değerlendirildiği çalışmalar ile bu etkinin doğruluğu ve etkinliği daha ayrıntılı olarak belirlenecektir.

## 6.KAYNAKLAR

1. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889–909.
2. Oh JD, Chase TN. Glutamate-mediated striatal dysregulation and the pathogenesis of motor response complications in Parkinson's disease. *Amino Acids* 2002;23:133–139.
3. De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinsons disease. *Lancet Neurol* 2006;5:525-535.
4. Fahn S, Przedborski S. Parkinsonism. In: Rowland LP. ed, *Merrit's Textbook of Neurology*, (10 th ed.), Philedelphia, Lipincott Williams and Wilkins, 2000; pp. 679-683.
5. Przedborski S. Etiology and Pathogenesis of Parkinson disease. In: Frances Destefano ed, *Parkinson's disease and movement disorders*, (5th Edition) Philedelphia, Lipincottm Williams and Wilkins, 2007; pp. 77-93.
6. Victor M, Ropper AH. *Adams and Victor's Principles of Neurology* (8 th ed), McGraw-Hill, Medical Publishing Division 2005; pp. 1318.
7. Gürer R. İdiopatik Parkinson Hastalığı Etyopatogenezinde Seruloplazminin Yeri ve Proton MR Sprektroskopi ile Verifikasyonu, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği, İstanbul. 2005: 74.

8. Paulson HL, Stern MB. Clinical manifestation of Parkinson's Disease. In: Watts RL Koller WC ed New-York Mc-Graw Hill. 1997; pp. 51-52.
9. Stewart AF, William JW, editors. Parkinson's Disease Diagnosis and Clinical Management (2 nd Ed). Demos New York 2007; pp. 1000.
10. Jankovic J, Tolosa E. Parkinson's Disease and Movement Disorders (fifth edition), Lippincott Williams &Wilkins a Wolters Kluwer business 2006; pp. 448.
11. Menza M, Marsh L. editors. Psychiatric Issues in Parkinson's Disease Practical Guides, Taylor & Francis, London and New York 2005; 356.
12. Vats A, Bielby RC, Tolley NS, Nerem R, Polak JM. Stem Cells, Lancet 2005; 366:592-602.
13. Chang MC, Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature 1959; 8:466-467.
14. Dündar M. Kök Hücre ve Kök Hücre Tedavisi, Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları Kitabı, Dündar M, Bağış H. Erciyes Üniversitesi Yayınları Kayseri. 2010; pp. 93-112.
15. Till JE, Mc Culloch EA. Radiat Res. 1961; 14:213-222.
16. Fridenstein A. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. Arch Pathol 1982; 44:3-11.
17. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo Lancet 1978; 12;2:366.
18. Prindull G, Prindull B, Meulen N. Hamematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. Acta Paediatr Scandi 1978; 67:413-6.
19. Türkiye Bilimler Akademisi, Kök Hücre Çalışma Grubu, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, TÜBA rapor numarası:20, Birinci Basım: ANKARA. 2009:11-113.
20. Evans MJ. And Kaufman MH, Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. Nature 1981; 292:154-156.

21. Pera MF, Cooper S, Mills J, Parrington JM. Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells. *Differentiation* 1989;42:10-23.
22. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from Isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255:1707– 1710.
23. Bongs A, Fong CY, Ng SC, Ratman S. Isolation and culture of inner mass cell from human blastocysts. *Hum Reprod* 1994; 9:2110-2117.
24. Thomson J.A, Kalishman J, Golos TG, et al. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 1996; 55:254-259.
25. Wilmut I, Schnieke A, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.
26. Thomson JA, Itskovitz-Eldor Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145–1147.
27. Shambloott MJ, Axelman J, Wang Ş, et al. Derivation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Human Primordial Germ Cells. *Proc Nat'l Acad Sci* 1998; 95:13726-13731
28. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cell* 1998; 16:153–165.
29. Chapman R, Frankel MS, Garfinkel MS. Stem cell research and applications: Monitoring the frontiers of biomedical research. *Am Assoc Adv Sci Inst Civil Soc* 1999; 34:405–416.
30. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspec Med* 2001; 22:149–164.
31. Odorico JS, Kaufman DS. And Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19:193– 204
32. Vescovi AL, Rietze R, Magli MC, Bjornson C. Hematopoetic potential of neural stem cells. *Nat Med* 2002; 8:536-537.

33. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, et al. And Moon SY. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303:1669–1674.
34. Vats A, Bielby RC, Tolley NS, Nerem R, Polak JM. Stem cells. *Lancet* 2005; 366: 592–602.
35. McGuckin C, Forraz N, Baradez MO, Basford C, Dickinson AM, et al. Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling. *Acta Neurobiol Exp* 2006; 66:321-329
36. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; 25:100–106
37. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; 32:699–702.
38. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* 2008; 11:343–353.
39. Choi KH, BH Choi, Park SR, Kim BJ, Min BH. The chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells on an extracellular matrix scaffold derived from porcine chondrocytes. *Biomaterials* 2010; 31:5355-5365.
40. Embriyonik Kök hücre kullanımı, T.C. Sağlık Bakanlığı, Genelge-2005/141
41. Verfallie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology* 2002; 1:369-391.
42. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology* 2009; 114:185–199.
43. Schöler HR. The Potential of Stem Cells: An Inventory, In: *Human biotechnology as Social Challenge*, Knoepffler N, Schipanski D, Sorgner SL. Ashgate Publishing Ltd Hampshire. 2007; pp. 27-56
44. Daley GQ, Goodell MA, Synder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Am Soc Hematol*. 2003; 34:398-418.

45. Eridani S. Stem cells for all seasons? Experimental and clinical issues. *J R Soc Med* 2002; 95:5-8.
46. Wobus, A.M. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med* 2001; 22: 149-164.
47. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145–1147.
48. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255:1707–1710.
49. Reubinoff B. Current status of human embryonic stem cell research. *Ethics Law Moral Philos. Reprod Biomed* 2007; 2:121–124.
50. Kriegstein AR, Gotz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* 2003; 43:37–43.
51. Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 2000; 127:5253–5263.
52. Web\_1,(2013) Bio protocol web sitesi;  
<http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=868> (Erişim tarihi 12.12.2014)
53. Johansson CB. Mechanism of stem cells in the central nervous system. *J Cell Physiol* 2003; 196:409–418.
54. Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10910–10917.
55. Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:11464–11469.
56. Bedard A, Cossette M, Levesque M, Parent A. Proliferating cells can differentiate into neurons in the striatum of normal adult monkey. *Neurosci Lett* 2002; 328:213–216.

57. Bedard A, Levesque M, Bernier PJ, Parent A. The rostral migratory stream in adult squirrel monkeys: contribution of new neurons to the olfactory tubercle and involvement of the antiapoptotic protein Bcl-2. *Eur J Neurosci* 2002; 16:1917–1924.
58. Zhao M, Momma S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:7925–7930.
59. Galli R, Gritti A, Vescovi AL. Adult Neural Stem Cells In: *Neural Stem Cells methods and Protocols* (second edition), Weiner LP. New Jersey, Human Press 2008; pp 67-84.
60. Piccini P, Lindvall O, Björklund A, et al. Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol* 200; 48:689-695.
61. Hagell P, Piccini P, Björklund A, et al. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2002; 5:627-628.
62. Freed CR, Greene PE, Breese RE, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344:710-719.
63. Hardeland R, Melatonin, hormone of darkness and more occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2001 – 2018.
64. Khaldy H, Escames G, León J, et al. Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiology of Aging* 2003; 24:491–500.
65. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336: 186-195.
66. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.
67. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26:1141-1155.
68. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology* 2008; 85:335–353.

69. Pappolla MA, Sos M, Omar RA et al. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci* 1997; 17:1683–1690.
70. Weishaupt JH, Bartels C, Pölking E, et al. Reduced oxidative damage in ALS by high-dose enteral melatonin treatment. *J Pineal Res* 2006; 41:313–323.
71. Hurtuk A, Dome C, Holloman CH, et al. Melatonin: can it stop the ringing? *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2011; 120: 433–440.
72. Megwalu UC, Finnell JE, Piccirillo JF. The effects of melatonin on tinnitus and sleep. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134:210–213.
73. Rosenberg SI, Silverstein H, Rowan PT, Olds MJ. Effect of melatonin on tinnitus. *Laryngoscope* 1998; 108:305–310.
74. Pirodda A, Raimondi MC, Ferri GG. Exploring the reasons why melatonin can improve tinnitus. *Med Hypotheses* 2010; 75:190–191.
75. Lamont KT, Somers S, Lacerda L, Opie LH, Lecour S. Is red wine a SAFE sip away from cardioprotection? Mechanisms involved in resveratrol and melatonin-induced cardioprotection. *Journal of Pineal Research* 2011; 50:374–380.
76. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Melatonin and Cardiovascular Disease: Myth or Reality?. *Rev Esp Cardiol* 2012; 65:215-218.
77. Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangre P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26:412–419.
78. Langston JW. The Impact of MPTP on Parkinson's Disease Research: Past, Present, and Future. In: *Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management*. Factor SA, Weiner WJ, eds. New York Demos Medical Publishing 2002; pp 299-329.
79. Luo Q, Peng G, Wang J, Wang S. The Establishment of Chronic Parkinson's Disease in Mouse Model Induced by MPTP. *Journal of Chongqing Medical University* 2010; 8:1149–1151.
80. Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Nature Protocols* 2007; 2:141–151.

81. Ekstrijm G, di Monte D, Sandy MS, Smith MT. Comparative Toxicity and Antioxidant Activity of 1-Methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine and Its Monoamine Oxidase B-Generated Metabolites in Isolated Hepatocytes and Liver Microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1987; 255:14-18.
82. Petroske E, Meredith GE, Callen S, Totterdell S, Lau YS. Mouse Model of Parkinsonism: a Comparison Between Subacute MPTP and Chronic MPTP/Probenecid Treatment. *Elsevier Neuroscience* 2001; 106:589-601.
83. Lau YS, Trobough KL, Crampton JM, Wilso JA. Effects of probenecid on striatal dopamine depletion in acute and long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Gen Pharmacol* 1990; 21:181-187.
84. Magen I, Chesselet MF. Progress in Brain Research. Genetic mouse models of Parkinson's disease: The State Of The Art 2010; 184:53-87.
85. Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP Mouse Models of Parkinson's Disease: An Update. *J Parkinsons Dis* 2011; 1:19-33.
86. Oizumi H, Hayashita-Kinoh H, Hayakawa H, et al. Alteration in the differentiation-related molecular expression in the subventricular zone in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience Research* 2008; 60:15-21.
87. Liu L, Peritore C, Ginsberg J. Protective role of SIRT5 against motor deficit and dopaminergic degeneration in MPTP-induced mice model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*. 2015; 281:215-221.
88. Zaitone SA, Hammad LN, Farag NE. Antioxidant potential of melatonin enhances the response to L-dopa in 1-methyl 4-phenyl 1.2.3.6-tetrahydropyridine-parkinsonian mice. *Pharmacological Reports* 2013; 65:1213-1226.
89. Van den Berge SA, Miriam E, Van Strien ME, Joanna A, Korecka JA. The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain* 2011; 134: 3249-3263.

90. Nicolas Aznavour N, Christophe Cendres-Bozzi C, Laetitia Lemoine L, et al. MPTP Animal Model of Parkinsonism: Dopamine Cell Death or Only Tyrosine Hydroxylase Impairment? – A Study Using PET Imaging, Autoradiography, and Immunohistochemistry in the Cat. *CNS Neurosci Ther* 2012; 18:934-41.
91. Pickel VM, TH Joh, Field PM, Becker CG, Reis DJ, Cellular Localization of Tyrosine Hydroxylase by Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1975; 23:1-12.
92. Moriya T, Horie N, Mitome M, Shinohara K. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res* 2007; 42:411–418.
93. Kong X, Li X, Cai Z. Melatonin Regulates the Viability and Differentiation of Rat Midbrain Neural Stem Cells. *Cell Mol Neurobiol* 2008; 28:569–579.
94. Sotthibundhu A, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J Pineal Res* 2010; 49:291–300.
95. Tocharus C, Puriboriboon Y, Junmanee T, et al. Melatonin enhances adult rat hippocampal progenitor cell proliferation via erk signaling pathway through melatonin receptor. *Neuroscience* 2014; 275:314–321.
96. Daadi MM, Grueter BA, Malenka RC, et al. Dopaminergic Neurons from Midbrain-Specified Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Engrafted in a Monkey Model of Parkinson’s Disease. *J PLoS ONE* 2012; 7:1-11.
97. Khaldy H, Escames G, León J, Bikjdaouene L, Acuña-Castroviejo D. Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiology of Aging* 2003; 24:491–500.
98. Capitelli C, Sereniki A, Santos-Lima MM, et al. Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. *European Journal of Pharmacology* 2008; 594:101–108.

99. Fu J, Zhao SD, Liu HJ, et al. Melatonin promotes proliferation and differentiation of neural stem cells subjected to hypoxia in vitro. *J Pineal Res* 2011; 51:104–112.
100. Abo-Grisha N, Essawy S, Abo-Elmatty DM, Abdel-Hady Z. Effects of intravenous human umbilical cord blood CD34+ stem cell therapy versus levodopa in experimentally induced Parkinsonism in mice. *Arch Med Sci* 2013; 9:1138–1151.
101. Vezoli J, Fifel K, Leviel V, et al. Early Presymptomatic and Long-Term Changes of Rest Activity Cycles and Cognitive Behavior in a MPTP-Monkey Model of Parkinson's Disease. *J PLoS ONE* 2011; 6:1-12.
102. Fifel K, Vezoli J, Dzahini K, et al. Alteration of Daily and Circadian Rhythms following Dopamine Depletion in MPTP Treated Non-Human Primates. *J PLoS ONE* 2014; 9:1-15

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Elgin Orçum UZUNLU

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 01.01.1987 Tokat

Medeni Durumu: Bekar

Tel: 0539 274 75 31

Fax:

email: eloruzunlu@gmail.com

Yazışma Adresi: Maltepe Mahallesi Onur Sokak 2/13 Çankaya/Ankara

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi	2011
Lise	Anıttepe Lisesi, Ankara	2004

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
-----	-------	-------

### YABANCI DİL

İngilizce, İspanyolca